

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE DE TLEMCCEN ABOU-BEKR BELKAÏD

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



Département d'Ecologie et Environnement



MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

Mr. SMARI Mohammed Yacine

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

EN

Filière

HYDROBIOLOGIE MARINE ET CONTINENTALE

Spécialité

SCIENCES DE LA MER

Thème :

**Identification des marqueurs moléculaires chez un mollusque
bivalve, exemple de la moule *Mytilus galloprovincialis***

Soutenu le 26 Juin 2023, devant le jury composé de :

Présidente : Melle DAMERDJI Amina

Grade : Professeur Université de Tlemcen

Encadreur: Mr. BENDIMERAD Med. El Amine

Grade: M.C.A. Université de Tlemcen

Examineur : Mr NEHAR Benameur

Grade : M.C.A. Université de Tlemcen

Co-encadreur: Mr. BABA Ahmed El Bey

Grade: Professeur W.I.R.A.G.E.N. - Oran

Année universitaire : 2022 - 2023

Remerciements

Tout d'abord je remercie Allah qu'il m'a accordé la force et la patience pour réaliser ce travail et pour sa guidance.

Je remercie mon encadreur Mr. BENDIMERAD Mohammed El Amine maître de conférences « A » au département d'écologie et environnement à l'université de Tlemcen pour son aide, sa disponibilité et ses orientations au long de la réalisation de mon travail.

J'adresse mes remerciements et ma gratitude à mon Co-encadreur Mr Baba Ahmed El Bey, Professeur à WIRAGEN - Oran, pour m'avoir aidé à réaliser ce travail et nous avoir fourni toutes les capacités possibles pour l'accomplissement et sa contribution à faciliter la réalisation des expérimentations nécessaires à mon mémoire de fin d'étude.

Je remercie sincèrement Melle DAMERDJI Amina Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, université de Tlemcen d'avoir accepté de présider le jury.

Je remercie également Mr NEHAR Benameur, maître de conférences « A » à l'Université de Aboubakr Belkaid à Tlemcen, d'avoir accepté de discuter et d'évaluer mon travail.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à WIRAGEN - Oran, enseignement de recherche spécialisé en biologie moléculaire et médicale, et à toute l'équipe. Leurs précieux soutien dans la gestion et la mise en œuvre de mon travail expérimental a été de la plus haute importance.

Je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette mémoire

Dédicace

**Je dédie ce mémoire à mes chers
parents et toute ma famille et mes
collègues de promo sciences de la mer
master 2 années 2022-2023 et à nos
enseignants.**

**J'exprime ma gratitude à tous mes
proches, mes amis et tous ceux qui
m'ont soutenu durant mon cursus
académique**

Merci pour tout.

Liste des figures

Figure 1: Les zones de répartition des différentes espèces de moules (Santaclara et al., 2006)	5
Figure 2 : L'Anatomie interne d'un <i>Mytilus</i> spp (Bouallegui 2014).....	7
Figure 3: l'aspect extérieur et intérieur des valves de <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Louis Marteil 1979).....	8
Figure 4: Le cycle biologique des moules Jahangard et al. (2010) et Ventura et al. (2016)	12
Figure 5: Les bassins et sous bassins de la méditerranée (Millot and Taupier Letag , 2005)	15
Figure 6: Les limites réglementaires du littoral d'Oran (Smahi Zakaria 2019).....	16
Figure 7: localisation de la baie d'Oran	18
Figure 8: localisation géographique de la ville d'Oran (Google maps)	19
Figure 9: La structure en double hélice de l'ADN (Pray, L. 2008).....	21
Figure 10: Structures chimiques des quatre bases azotées de l'Adn : adénine, thymine, guanine, cytosine (Hartl, D.L .2005).....	22
Figure 11: Structure chimique du nucléoside d'ADN (Hartl, D.L .2005).....	23
Figure 12: la structure chimique du nucléotide (Hartl, D.L .2005).....	23
Figure 13: La structure chimique de la chaîne polynucléotidique orientée et possède deux extrémités, l'extrémité 5'P et l'extrémité 3'OH (Philippe LUCHETTA).....	24
Figure 14: La structure chimique de la double hélice d'ADN (Pierre Murat2010)	24
Figure 15: le mécanisme de la Réplication D'Adn (Ameur Abdelkader 2016)	26
Figure 16: Un cycle de réaction en chaine par polymérase (De Connie R 2022)	28
Figure 17: Le thermocycleur (appareil photo).....	29
Figure 18: Le schéma d'électrophorèse sur le gel d'agarose (Monica Sebastiana 2022)	30
Figure 19: Les échantillons collectés de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	35
Figure 20: l'ADN Extrait par La Méthode de L'NAOH.....	36
Figure 21: l'ADN extrait par le kit commercial.....	37
Figure 22: Les paires d'amorces à l'état lyophilisées des 16s rDNA et 18s rDNA.....	38
Figure 23: La préparation des mélanges des tubes PCR pour les amorces 18s	39
Figure 24: La préparation des mélanges des tubes PCR pour les amorces 16s	40
Figure 25: Migration d'ADN sur gel d'agarose.....	41
Figure 26: visualisation des bandes de fragments d'ADN du gène 18S rDNA par électrophorèse sur gel d'agarose sous UV à l'aide de deux amorces	44
Figure 27: la visualisation des bandes de fragment amplifié du gène 18S rDNA par électrophorèse sur gel d'agarose.....	45
Figure 28: la visualisation des bandes de fragment amplifié du gène 16S rDNA par électrophorèse sur gel d'agarose.....	46
Figure 29: La vérification de la qualité des séquences obtenues par la méthode Sanger	47
Figure 30: l'identification de genre d'espèces par BLAST NCBI.....	48
Figure 31: l'alignement des séquences partielles de gène 18s rDNA par le logiciel MEGA X.....	48
Figure 32: L'arbre phylogénétique généré par la méthode de (Maximum Likelihood) basée sur le fragment de gène 18s rDNA.....	49
Figure 33: l'identification d'espèces <i>Mytilus galloprovincialis</i> par BLAST NCBI	50
Figure 34: l'alignement des séquences partielles de gène 16s rDNA par le logiciel.....	51
Figure 35: Arbre phylogénétique généré par la méthode de (Maximum Likelihood) basé sur le fragment de gène 16s rDNA a l'aide de logiciel MEGA.....	52

Figure 36: la distance génétique entre les espèces de <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Le logiciel GENEIOUS PRIME)	53
Figure 37: Distribution des Souches génétique de l'espèce <i>Mytilus galloprovincialis</i> dans l'Est atlantique et la Méditerranée (Vert : Souche méditerranéenne), (Rouge : Souche atlantique), (Noir : Souche Non attribuée)	54

Liste des tableaux

Tableau 1: Communauté des espèces benthique du Médiolittoral de la zone côtière (Kallouch M.E.M 2013).....	17
Tableau 2 : Les différentes marqueurs moléculaires étudiés dans des différentes études chez le genre Mytilus (Gosling2021, Lourenco et al., 2015).	32
Tableau 3: Préparation du Produit PCR	41
Tableau 4: Préparation des amorces	42
Tableau 5: Comparaison entre les deux travaux.....	55

Liste des abréviations

FAO : Food and Agriculture Organisation

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

EDTA : diamine tétra-acétique

TAE : Tris Acétate EDTA

TBE : Tris Borate EDTA

dNTP : désoxynucléosides triphosphates

rDNA : ADN ribosomique

NGS : Le séquençage nouvelle génération

NaOH : Hydroxyde de sodium

HCl : chlorure d'hydrogène

Bp : paires de bases

RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction

Uv : ultraviolet

NCBI : National Center of Biotechnology Information

Table des matières

Dédicace	2
Liste des figures	4
Liste des tableaux	6
Liste des abréviations	7
Introduction	1

Chapitre 1 : Etude Bibliographique sur les Mollusques Bivalves

I LES MOLLUSQUES BIVALVES	4
1. Généralités	4
2. Mytilus galloprovincialis	4
2.1 Description	4
2.2 Phylogénie	5
2.2.1 L'arbre taxonomique	5
2.3 Distribution géographique.....	5
2.4 L'anatomie externe	5
2.5 L'anatomie interne	6
2.5.1 Le manteau	6
2.5.2 Le pied	6
2.5.3 Branchies	6
2.5.4 Les muscles adducteurs.....	6
2.5.5 La gonade	7
2.6 La physiologie	8
2.6.1 Le système nerveux	8
2.6.2 Le système circulatoire	8
2.6.3 L'appareil excréteur	8
2.6.4 Le système digestif	9
2.7 La reproduction	9
2.7.1 La sexualité	9
2.7.2 La gamétogenèse.....	9
2.7.3 La fécondation	10
2.7.4 Le cycle de vie.....	11
2.8 Le mode d'alimentation.....	12
2.9 La croissance.....	12
2.10 L'aquaculture et l'aspect économique et productif.....	13

Chapitre 2 : Présentation de la zone de prélèvement

1. Description du littoral Algérien.....	15
2. Représentation de littoral d'Oran	15
3. La zone de prélèvement	18
3.1 la Baie D'Oran	18
3.1.1 La situation géographique	18
3.1.2 La ville d'Oran	18
3.1.3 Le port d'Oran.....	19

Chapitre 3 : Notion sur la biologie Moléculaire et L'ADN

1. La notion d'ADN :.....	21
1.1 Le concept d'ADN :	21
1.2 Les bases azotiques :	21
1.2.1 Les bases pyrimidines :.....	21
1.2.2 Les bases puriques :.....	21
1.3 Le sucre désoxyribose.....	22
1.4 Les nucléosides.....	22
1.5 La structure des nucléotides	23
1.5.1 Les phosphates	23
1.5.2 Le nucléotide	23
1.5.3 Les liaisons phosphodiesters	23
2. La réplication « chez les eucaryotes »	25
2.1 Les étapes de la réplication de l'Adn chez les eucaryotes :	25
3. L'ARN ou acides ribonucléiques :	26
3.1 Les types D'ARN :	26
4. La notion d'espèce :	26
5. L'ADN conservé :.....	27
6. Les primers universels :	27
7. Les méthodes d'identification moléculaire d'une espèce.	27
7.1 La PCR (Polymérase Chain Réaction) :	27
7.1.1 Le thermocycleur.....	29
7.2 L'électrophorèse :.....	29
7.3 Le séquençage de l'ADN :	30
7.4 La phylogénétique des espèces :.....	30
7.5 Les marqueurs moléculaires :.....	31
7.5.1 Les Différents marqueurs d'ADN utilisés pour l'identification des espèces (eucaryotes, procaryotes) et les végétaux et les champignons	31

7.5.2 Les différents marqueurs moléculaires utilisés chez le genre <i>Mytilus</i>	32
---	----

Chapitre 4 : Matériels et Méthodes

1. L'extraction d'ADN.....	35
2. La conception des amorces et les conditions de la PCR.....	37
2.1 PCR : Marqueur ADNr 18s	37
2.2 PCR : Marqueur ADNr 18s et 16s (Amorces spécifique).....	38
2.2.1 La préparation des amorces lyophilisées.....	38
2.2.2 PCR : Marqueur 18s.....	39
2.2.3 PCR : Le marqueur 16S :	39
3. L'électrophorèse	40
3.1 Le protocole.....	40
4. Préparation des mélanges de PCR et des tubes d'amorces pour le séquençage (Méthode de Sanger).....	41
4.1 Produits PCR	41
4.2 Préparation des amorces.....	42

Chapitre 5 : Résultats et Discussion

1. Les résultats de la visualisation d'amplification par électrophorèse.....	44
1.1 Le contrôle de la qualité d'ADN extrait sur gel d'agarose	44
1.2 Les résultats d'amplification du gène 18S rDNA avec des amorces spécifiques	44
1.3 Les résultats d'amplification du gène 16S rDNA avec des amorces spécifiques	45
2. L'identification moléculaire de Mollusque Bivalves <i>Mytilus galloprovincialis</i> par le séquençage partielle des gènes 18s rDNA et 16s rDNA	46
2.1 La correction des séquences	46
2.2 Identification moléculaire de genre d'espèce par la séquence partielle du gène 18s rDNA.....	47
2.3 L'identification moléculaire d'espèce <i>Mytilus galloprovincialis</i> par la séquence partielle du gène 16s rDNA.....	49
3. Discussion	53
3.1 Comparaison des résultats	54
CONCLUSION	56
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	57

Introduction

Les mollusques, représentent le plus grand embranchement des espèces après les arthropodes, avec une grande diversité existante. La majorité des mollusques sont des espèces marines caractériser par un plan corporel de base et des conditions d'habitats très varié, en trouve même des espèces mollusques dans l'eau douce et terrestres. Les plus importantes classes de mollusques sont les bivalves, considère comme la deuxième la plus grande classe parmi leur espèces connus : les palourdes, les coquilles Saint-Jacques et les moules et les huîtres, c'est des espèces avec un corps enfermé dans deux valves de coquille. Les bivalves sont largement cultivés dans le monde et la production mondiale des bivalves ou bien lamellibranches a augmenté de façon significative au cours des 50 dernières années, passant de 0,9 million de tonnes en 1950 à 14 millions de tonnes en 2000, ce qui représente environ 26% de la production mondiale de pêche selon la FAO. Cette croissance de la production de bivalves est due à une forte demande sur le marché international, tandis que les populations naturelles ont diminué en raison de la surpêche. Pour répondre à la demande, de nombreux systèmes de culture intensive ont été développés pour diverses espèces de bivalves, ce qui a considérablement augmenté leur présence sur le marché international. **(Montserrat Espineira 2009).**

Les bivalves jouent un rôle important dans les écosystèmes marins et d'eau douce, la plupart des espèces vivant dans les habitats océaniques avec des écologies variées. Certaines sont sessiles et se fixent à des surfaces dures, tandis que d'autres s'enfouissent à différentes profondeurs dans le sable ou les sédiments des fonds marins ou des lits de rivière. La plupart des espèces se nourrissent en filtrant des particules de nourriture à partir de l'eau environnante à l'aide de surfaces de branchies largement élargies. Cependant, leur mode d'alimentation peut les exposer à des risques pour la santé publique car ils peuvent accumuler des contaminants et des bactéries, des virus et des toxines. Malgré cela, de nombreuses espèces sont importantes pour l'aquaculture et les industries de la pêche dans le monde entier. Les classifications des bivalves ont historiquement été basées sur des caractères simples tels que la morphologie des coquilles et des organes internes, mais les analyses phylogénétiques récentes utilisent des données moléculaires et ont permis de préciser les relations entre les différentes espèces. Les Bivalves sont divisés en deux classes, Protobranchia et Autobranchia, eux-mêmes divisés en plusieurs groupes. Les protobranches sont considérés comme plus primitives et utilisent leurs palpes labiaux pour se nourrir **(Gosling 2021)**. Les données moléculaires sont importantes pour étudier les populations de bivalves et pour étudier les relations entre les organismes vivants. Cet outil a évolué au fil du temps avec le développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire notamment la PCR, ce qui a conduit à un grand nombre d'approches utilisées par les chercheurs pour identifier et classer les espèces ou les populations. Les marqueurs moléculaires jouent un rôle crucial dans la phylogénétique, la génétique des populations, l'écologie et la taxonomie des bivalves. Ils sont essentiels pour comprendre les populations de bivalves et leur impact sur notre environnement. Bien que de nombreux marqueurs génétiques aient été développés, les études scientifiques identifient des marqueurs moléculaires comme les plus utiles et les plus fiables pour les études de population de bivalves tels que COI, 16S rDNA ou 18S rDNA, et ITS2 nucléaire. Cependant, la répartition inégale des fonds de recherche entre les pays développés et en développement constitue un

obstacle au développement d'une méthodologie commune pour les études génétiques sur les bivalves. **(Dragomir-Cosmin David, 2011)**

En Algérie, l'identification de ces produits de la pêche a souvent été liée à l'étude morphologique et anatomique. Cependant avec l'avènement de la PCR et des études des séquences d'ADN, l'outil moléculaire est devenu incontournable pour l'identification et la labellisation des espèces de moules comestibles.

Notre travail est une approche et étude préliminaire pour le développement au sein de notre laboratoire d'outils moléculaire d'identification des moules et leur marqueurs moléculaire. Pour cela nous avons travaillé sur *Mytilus galloprovincialis*, une moule méditerranéenne largement répandue dans les cotes algériennes, comme matériel biologique expérimental.

La présente étude est composée de cinq parties, qui étudie des aspects importants sur les mollusques bivalves, notre travail est spécifiquement sur l'espèce *Mytilus galloprovincialis*.

Le chapitre 1 : Résume l'étude bibliographique des mollusques bivalves, en se concentrant sur *Mytilus galloprovincialis*. Cette partie permet de collecter des informations essentielles pour cette espèce, nous parlons de leur biologie, physiologie et son écologie et son cycle de vie.

Le chapitre 2 : présente la zone d'étude, qui est la côte d'Oran, et décrit ses caractéristiques. Cette partie met en évidence la géographie de la zone, le climat et son environnement, qui jouent un rôle important dans l'habitat et pour le développement de *Mytilus galloprovincialis*.

Le chapitre 3, c'est une introduction à la biologie moléculaire et l'ADN, ainsi qu'une découverte des techniques d'identification moléculaire. Cette partie permet de comprendre les bases moléculaires de l'identification des espèces, et les méthodes utilisées.

Le chapitre 4 : Consacré à la partie expérimentale du mémoire. Il décrit avec détail les méthodes et les protocoles et aussi les approches qui ont été utilisées pour réaliser l'étude. Cette partie inclut des informations sur les analyses et la manipulation ainsi que les expériences réalisées dans le cadre de ce travail.

Enfin, le chapitre 5 présente les résultats obtenus dans notre travail et une discussion approfondie de ces derniers, avec une analyse et une interprétation des données recueillies.

Nous terminons avec une conclusion générale.

Chapitre 1 : Etude
Bibliographique sur les
Mollusques Bivalves

I LES MOLLUSQUES BIVALVES

1. Généralités

Les mollusques sont le plus grand phylum d'animaux après les arthropodes. Ce sont des animaux à corps mou qui ont une coquille pour protéger leur corps. Ils ont une symétrie bilatérale et trois parties principales : un pied musculueux, une masse viscérale et un manteau qui peut produire une coquille. Certains mollusques utilisent une radula pour manger et il y a plus de 180 000 espèces décrites ; la majorité d'entre elles étant marines. Les mollusques peuvent être classés en sept groupes différents : aplacophores, monoplacophores, polyplacophores, scaphopodes, bivalves (lamellibranches), gastéropodes et céphalopodes. **(Cahen D. 2006).**

Les bivalves ou lamellibranches sont une classe de mollusque. Ce sont des organismes dotés de deux valves qui se ferment grâce à une charnière. Leur corps est comprimé sur les côtés et protégé par un manteau. Les bivalves n'ont ni tête ni radula, et sont généralement séparés en deux sexes différents. La plupart d'entre eux sont des filtreurs qui s'enfouissent dans les sédiments et passent donc la plupart de leur temps immobiles et donc sédentaires. La classe des bivalves comprend 31 000 espèces, 20 000 d'entre elles existent toujours. Le plus grand représentant de cette classe est le bénitier, qui peut mesurer jusqu'à 135 cm, la moule est sans doute l'espèce la plus connue de ce groupe. **(Cahen D, 2006).**

2. *Mytilus galloprovincialis*

2.1 Description

C'est une espèce de classe des mollusques bivalves et de la famille des mitilidae, appelé aussi la moule méditerranéenne qui a une coquille lisse en forme de triangle allongé. Le bec forme l'apex. Le bord antérieur est droit, le bord postérieur est large et arrondi. La surface est marquée par des lignes de croissance concentrique. Leur couleur extérieure est noire, bleue et peut être brune. L'intérieur est blanc avec une cicatrice musculaire distincte. La coquille peut atteindre une longueur de 150 mm **(Abbott 1974 ; Coan 2000 ; Coan et valentich-scott, in Carlton 2007)**. La moule méditerranéenne se fixe sur des roches, bois flottant et autres structures, par l'intermédiaire des fils de byssus.

Mytilus galloprovincialis fait partie du complexe de genre des espèces *M. edulis*, *M. trossulus*, *M. californianus*. Ces espèces sont distinguées morphologiquement selon des analyses statistiques biométriques **(McDonald et al 1991, Westfall et Gardner 2010)**.

La salinité de 37‰ du milieu marin permet à *M. galloprovincialis* une bonne filtration à température entre 23 et 28 °C, relativement bonne à 18 °C, mais ralentit entre 10 et 14 °C bien que certains travaux stipulent qu'entre 10 et 20 °C, la température semble avoir peu d'effet sur la filtration selon **LUBET (1973)**. La filtration s'arrêterait en dessous de 8 °C. Cette espèce peut se développer dans des eaux avec des températures moyennes d'hiver de 7-8 °C et des températures moyennes d'été de 26-27 °C.

Les moulières de *Mytilus galloprovincialis* jouent un rôle important dans la purification de l'eau en filtrant les particules en suspension. Ils réduisent la turbidité de l'eau et améliorent la disponibilité en plancton **(Asmus et Asmus, 1991)**, la présence d'une colonie de moules peut augmenter la quantité de nutriments bio-assimilables dans le milieu et donc produire plus de plancton. Cependant, dans certains cas, cela peut aussi être un indicateur d'une zone polluée

ou en déclin écologique. Les moulières peuvent également servir de refuge ou de lieu de vie pour d'autres organismes.

2.2 Phylogénie

2.2.1 L'arbre taxonomique

Règne : Animal

Embranchement : Mollusques

Classe : Bivalves

Ordre : Mytiloides

Famille : Mytilides

Genre : Mytilus

Espèce : *Mytilus galloprovincialis*

2.3 Distribution géographique

Mytilus galloprovincialis est une espèce de moule qui vit sur des substrats durs allant jusqu' à 40 m de profondeur. Elle est présente le long des côtes et des rivages rocheux, ainsi que dans les ports et les estuaires abrités. L'aire de répartition indigène se trouve en Méditerranée et dans l'Atlantique oriental, mais elle a également été introduite dans d'autres régions telles que la côte Pacifique de l'Amérique du Nord, le Japon, Hong Kong, l'Afrique du Sud, le Chili et l'Australie, probablement à cause des activités humaines, (Gosling, 1992) (Comesana et al., 1998) ;(McDonald et Koehn, 1988). La figure 1 récapitule cette distribution côtière.

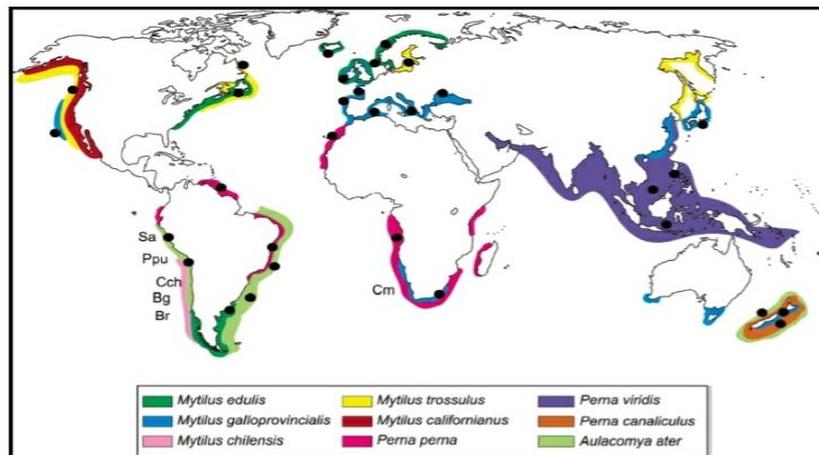


Figure 1: Les zones de répartition des différentes espèces de moules (Santacalara et al., 2006)

2.4 L'anatomie externe

Les variations morphologiques entre *M. galloprovincialis* et les autres genres de *Mytilus* sont sous la dépendance de facteurs biotiques (Lubet P., 1959).

La Coquille est allongée, sécrétée par le manteau, su quadrangulaire et équivalve avec une couleur violacée et composée à 95 % de carbonate de calcium. **(Bouallegui 2014).**

La moule a une surface striée et une periostracum adhérent, un crochet terminal incurvé vers l'avant et pointu. La surface ventrale des valves est légèrement aplatie et le bord ventral droit n'est jamais concave, tandis que le bord postérieur est arrondi. Le bord ligamentaire forme un angle saillant avec le bord dorsal. L'intérieur des valves est lisse, avec une zone périphérique sombre et une région médiane opaque. Le ligament est interne et peu épais. La charnière comporte de 3 à 4 petits denticules **(Lubet P., 1973).**

2.5 L'anatomie interne

2.5.1 Le manteau

Le corps de la moule est entouré d'un manteau. Ce dernière comporte deux lobes libres au niveau ventrale et soudés ou niveau dorsale. Ils définissent les limites de la cavité palléale, le manteau présente une région postérieure noire violacée. Le principal rôle est d'assurer la formation de la coquille.

2.5.2 Le pied

Le pied musculueux est allongé. Il a un rôle dans la locomotion et l'adhérence de la moule à son substrat. La glande se trouve dans la base du pied. Son rôle est de sécréter les filaments protéiques du byssus permettant aux individus de se fixer fortement ou substrat.

2.5.3 Branchies

Ils ont des filaments séparés, avec deux types de fil-branchie formés de deux feuillets, ils déterminent les courants d'eau qui traverse la cavité palléale. Les branchies sont des organes de filtration et de respiration, ils agissent comme un filtre pour l'alimentation en retenant les particules en suspension. Ces particules sont englobées de mucus ensuite acheminés vers les palpes branchiaux et la bouche pour être consommées, tandis que les particules non consommables sont rejetées à l'extérieur.

2.5.4 Les muscles adducteurs

Chez *Mytilus galloprovincialis*, les muscles adducteurs sont des muscles dimyaires, ce qui signifie qu'ils sont composés de deux muscles qui fonctionnent en opposition pour sceller la coquille. Le muscle antérieur est chargé de fermer la coquille, tandis que le muscle postérieur est chargé de l'ouvrir. Les deux muscles adducteurs sont reliés aux valves de la coquille par des tendons.

Chez *Mytilus galloprovincialis*, les muscles adducteurs sont le principal moyen de protéger l'organisme contre les menaces naturelles telles que les prédateurs et les risques environnementaux tels que les marées et les vagues. De plus, ces muscles jouent un rôle dans la mobilité de l'organisme en permettant la nage et en facilitant l'attachement à des substrats fermes tels que les rochers.

Structurellement, le muscle adducteur de la moule méditerranéenne contient des fibres musculaires striées. Les fibres musculaires sont composées de protéines contractiles, telles que la myosine et l'actine, qui permettent aux muscles de se contracter. Les muscles adducteurs sont alimentés par le métabolisme des glucides et des lipides **(Mangum et Carefoot, 2007 ; Pechenik, 2014 ; Hutchison et al., 2014).**

2.5.5 La gonade

Les moules sont gonochoriques, c'est-à-dire les sexes sont séparés, et généralement les mâles et les femelles sont équivalents. Les gonades s'étendent dans la plupart des parties du corps, à l'exception des branchies et le pied et les muscles et la plupart des gonades se trouvent dans le manteau à la région postérieure plutôt que les masses viscérales, ça explique son épaisseur inhabituelle chez les moules, les gonades sont constituées de tissu germinal, qui est responsable de la production des gamètes, ainsi que de tissu somatique. La couleur du tissu reproducteur puisse être un indicateur du sexe chez les *Mytilus* mais elle doit être considérée avec prudence et le prendre avec autre caractéristique anatomiques pour la détermination précise de sexe. La gonade chez les *Mytilus* est constituée d'un système de canaux aboutissant à un gonopore situé à l'extrémité de la papille génitale, cette dernière se trouve dans la partie exhalante de la cavité du manteau. Les gamètes sont libérés par l'ouverture exhalante du manteau et la fécondation a lieu dans la colonne d'eau. Après la libération des gamètes, le manteau devient fin et transparent. (Gosling 2021).

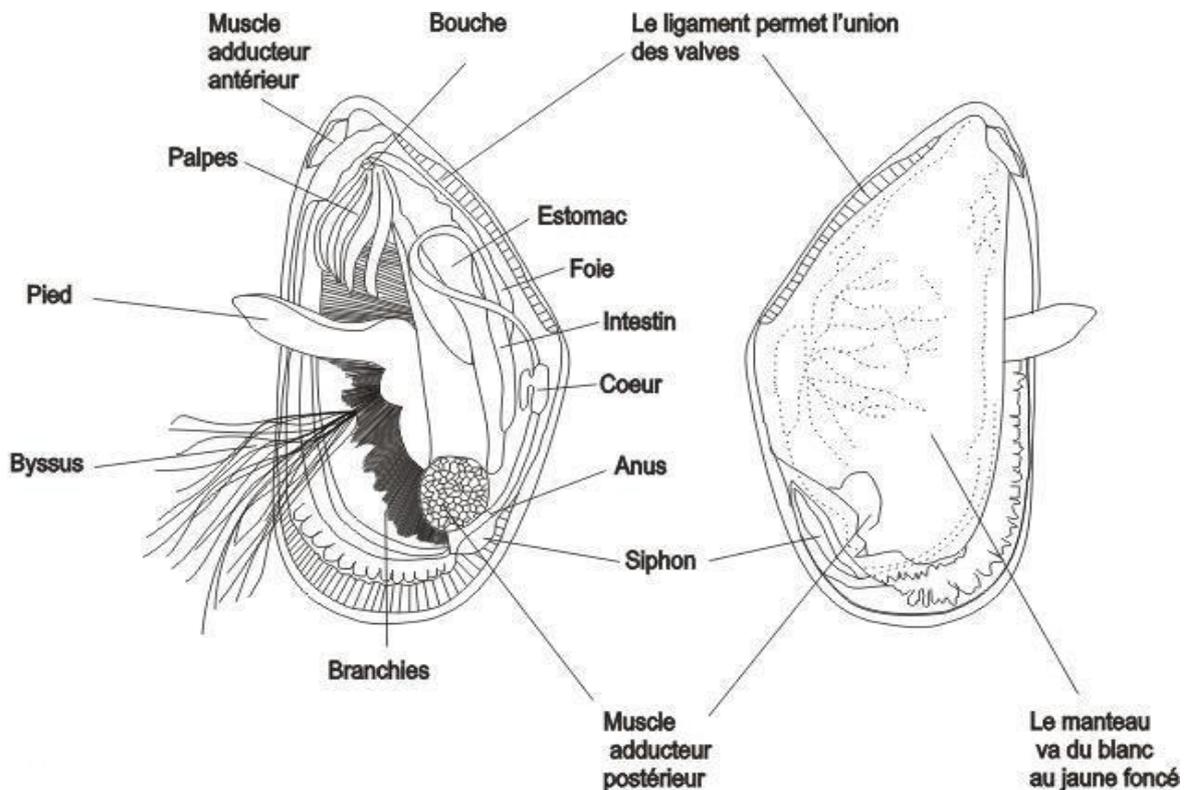


Figure 2 : L'Anatomie interne d'un *Mytilus* spp (Bouallegui 2014)

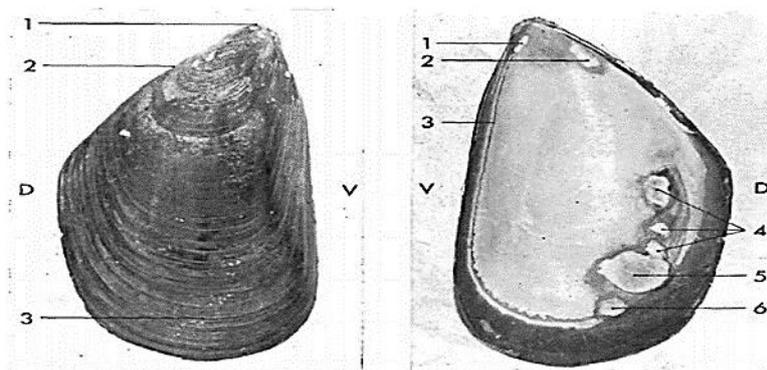


Figure 3: l'aspect extérieur et intérieur des valves de *Mytilus galloprovincialis* (Louis Marteil 1979)

. **A gauche, aspect extérieur** : D : face dorsale, V : face ventrale, 1 : crochet, 2 : charnière. 3 : strie d'accroissement.

. **A droite, aspect intérieur** : 1 : Muscle adducteur antérieur, 2 muscle rétracteur antérieur du pied, 3 : impression palléale, 4 muscles rétracteurs postérieurs du pied et du byssus, 5 : muscle adducteur postérieur, 6 : muscle du siphon anal.

2.6 La physiologie

2.6.1 Le système nerveux

Comparé à d'autres animaux, le système nerveux d'une moule est relativement simple. Il est à symétrie bilatérale et se compose de trois paires de ganglions, ainsi que de plusieurs paires de nerfs. Les ganglions cérébraux sont reliés à l'œsophage par une brève commissure dorsale. Deux paires de cordons nerveux s'étendent de chaque ganglion cérébral vers la partie postérieure de l'animal. Une paire se dirige directement vers le ganglion viscéral, situé à la surface du muscle adducteur arrière. La deuxième paire s'étend vers les ganglions pédieux dans une direction postérieure et ventrale (**Campos-Candela, 2017**).

2.6.2 Le système circulatoire

L'appareil circulatoire de la moule est simple, il se compose d'un cœur dorsal (enveloppé par le péricarde) qui comprend une oreillette latérale et une oreillette ventricule. L'hémolymphe qui est un mélange de sang avec la lymphe, ce dernier est libéré par les deux aortes se propage dans tout le corps par un réseau complexe de vaisseaux sanguins. Ce système artériel conduit à des espaces ouverts appelés lacunes dépourvues de parois appropriées. L'hémolymphe n'est pas transportée à travers un système de vaisseaux distincts au cours de ce processus. Il atteint finalement les reins, où il subit une purification avant de passer par les branchies. Dans ces organes, il est oxygéné en (O₂) et libère du dioxyde de carbone (CO₂). Après l'oxygénation, l'hémolymphe rejoint les oreillettes du cœur.

Un circuit supplémentaire est superposé au circuit primaire. L'hémolymphe qui traverse le manteau a la capacité de revenir directement au cœur, en contournant les reins et les branchies. Au cours de son voyage à travers le manteau, il se produit également un échange de dioxyde de carbone et d'oxygène (**Naouel kamel 2014**)

2.6.3 L'appareil excréteur

Comprend deux reins bruns rougeâtre qui sont positionnés ventralement à la cavité péricardique autour du cœur et dorsalement à l'axe branchial et sur toute la longueur des

palpes labiaux au muscle adducteur postérieur et communiquent à la cavité palléale, les déchets de sang qui passent par la paroi du cœur, passent par la cavité péricardique avec les produits d'excrétion des glandes péricardiques qui sont aussi impliquées dans la filtration de l'hémolymphe. Le liquide de la cavité péricardique passe ensuite dans les reins qui ajoutent leur propre sécrétion, puis sont rejetés dans la cavité palléale, les reins ont un rôle d'élimination des métaux lourds et des radionucléides. L'urine de filtration finale contenant une forte concentration d'ammoniac (**Bachelot 2010, Gosling 2021**).

2.6.4 Le système digestif

Le système digestif de la moule *Mytilus galloprovincialis* constitué par les organes suivants : la bouche, les palpes labiaux, l'œsophage, l'estomac, la glande digestive et qui se termine par l'anus. Les palpes labiaux ont un rôle essentiel chez les moules et les mollusques bivalves en général, et la diffusion des chaînes alimentaires excédentaires dans la zone de la bouche en direction vers la surface du manteau sous la forme de pseudomatières fécales (**Boromthanasri, W., 1986**). La bouche est une structure ciliée qui débouche sur un œsophage étroit, l'estomac est intégré dans la glande digestive avec une forme large. Le stylet cristallin qui est semi transparent prend naissance au bout de l'estomac et son rôle principal est de sécréter des enzymes qui facilitent la digestion et mélangent le contenu de l'estomac, il assure la digestion des aliments, la glande digestive des *Mytilus* a un rôle de stockage des réserves métaboliques, qui sont des sources énergétiques essentielles pour la production des gamètes et au moment de stress physiologique. Les particules émises par l'estomac et les déchets de la glande digestive passent par un long intestin enroulé et sont transformées en boules fécales avant d'être jetées par l'anus (**Thibaut Dumas 2020**).

2.7 La reproduction

2.7.1 La sexualité

Les moules se reproduisent par diffusion gonochorique. Les gonades s'étendent dans tout le corps et sont de couleur crème chez les mâles et rose chez les femelles, la coloration des gonades peut permettre la différenciation des sexes chez les genres *Mytilus*. Des millions de gamètes sont libérés lors d'événements de ponte, la fécondation est externe et donne des larves microscopiques planctoniques vagiles. La vie pélagique des larves dure en moyenne une trentaine de jours, et pendant cette période, différentes phases larvaires se succèdent (trochophore, D-veligère, larve veligère, pediveligère).

Ensuite, c'est la période de fixation appelée aussi la période de recrutement : la larve perd son vélum et ses capacités de nage, un pied apparaît, elle devient ainsi compétente pour la métamorphose. Elle se fixe sur le substrat et devient une moule juvénile.

L'âge de la maturité sexuelle (1 à 2 ans), la reproduction a lieu plusieurs fois par an. (**Ramasamy Santhanam, 2018**), (FAO). Les gonades de *Mytilus* sont pas distinctes anatomiquement, ce qui facilite le changement de sexe et comprend des gamètes mâles ou femelles envahissant le manteau. (**Boukadida 2017**).

2.7.2 La gamétogenèse

1. Le stade 0 : chez les moules c'est un moment de repos sexuel et de régénération et il commence après l'émission des gamètes. Pendant cette période, les réserves de glucides et de lipides s'accumulent ainsi que les follicules sont absents. Il y a peu de cellules mères, oogonies et spermatogonies, présentes sur la paroi folliculaire et elles donnent naissance à des gonies primaires qui s'accumulent dans les acinis gonadiques. Même si la période de repos

varie selon l'habitat de l'espèce, elle se déroule habituellement durant les périodes chaudes de juillet à août.

2. Stade 1 : cette phase est connue par la multiplication des cellules mères pour former une oogonie ou une spermatogonie. Ce stade se termine par la formation de plusieurs follicules, donnant une apparence moins homogène au manteau de la moule.

3 Stade 2 : ovogenèse et spermatogenèse. Les follicules sont de plus en plus visibles, ce qui confère au manteau une couleur caractéristique pour chaque sexe (rouge-orange pour les femelles et blanc-crème pour les mâles). Les gamètes n'ont pas encore atteint leur maturité.

4. stade 3 : la moule a atteint la maturité sexuelle, c'est-à-dire que ses gamètes, ses œufs ou ses spermatozoïdes sont maintenant matures et prêts à être relâchés dans l'eau. À cette étape, la moule peut vider sa gonade une ou plusieurs fois, lui permettant ainsi de participer activement à la reproduction de son espèce.

- Le stade 1 commence entre le mois d'octobre et novembre dans l'automne, la gamétogenèse se produit en hiver, les gonades des moules atteignent leur maturité en printemps, cela signifie qu'elles sont prêtes à produire des gamètes (les cellules reproductrices). Pendant les mois de printemps, Les moules subissent une période de ponte partielle pendant laquelle elles libèrent une partie de leurs gamètes dans l'eau. Suivie par une période de gamétogenèse rapide, durant laquelle les moules produisent rapidement de nouveaux gamètes jusqu'au début de l'été, où les gonades atteignent à nouveau leur pleine maturité. Cette deuxième période de gamétogenèse est plus prononcée chez les moules qui vivent dans des habitats où les conditions alimentaires sont favorables, car la production de gamètes nécessite une grande gamme de ressources. (**Gosling, 1992**). Puis, une ponte moins importante qui peut se produire durant l'été (**Banni et al. 2011 ; Gosling, 1992**).

Il y a plusieurs facteurs qui influencent sur les cycles sexuels de la moule et parmi ces facteurs sont des facteurs internes et externes (comme les facteurs climatiques, hydrologiques et nutritionnels) et génétiques et métaboliques. Ces facteurs peuvent influencer le bon déroulement de la gamétogenèse (**Seed, 1969 ; SUÁREZ et al., 2005**). La température et la nourriture sont les principaux facteurs qui contrôlent la durée et le moment du cycle de reproduction de la moule (**Gray et al., 1997 ; Lemaire et al., 2006**). Les variations saisonnières et latitudinales de la température ont un impact significatif sur la période de la gamétogenèse, sur tous chez les espèces qui se reproduisent au printemps ou en été. Les températures hivernales peuvent conditionner la ponte, avec des pontes plus précoces à l'issue d'hivers doux. (**His & Cantin, 1995**).

2.7.3 La fécondation

La gamétogenèse aboutit à la maturation des gamètes, et ils sont prêts à être émis dans l'eau. Cette émission exige un stimulus exogène, tel qu'un changement de température ou une injection chimique, qui peut stimuler la ponte chez certaines espèces telles que les moules. Les basses températures peuvent inhiber l'émission de gamètes de *Mytilus galloprovincialis*, tandis que les températures de plus de 20 °C favorisent la ponte. La ponte des ovules se fait par contraction musculaire à une forme de cordonnet orange et l'éjaculation des spermatozoïdes se produit sous forme d'un mince filet blanc continu. La moule produit un grand nombre d'ovules de petite taille (**Bayne et al., 1978**). La fécondation de la moule est

externe et elle se produit dans le milieu naturel et suivie d'une série de divisions cellulaires qui peuvent être observées sous microscope (**Boukadida 2017**).

2.7.4 Le cycle de vie

Le cycle de vie de *Mytilus galloprovincialis* se compose de deux phases distinctes :

1- Phase embryonnaire :

Après la fécondation, deux globules polaires sont expulsés et il y a division cellulaire (50-80 minutes après la fécondation). Chez le *Mytilus*, la segmentation est spirale. L'embryon commence à bouger en se retournant grâce à l'apparition des cils au bout de 6 heures.

2- Phase larvaire :

- La larve trochophore :

La première phase larvaire, atteint environ 24 heures après la fécondation. La larve trochophore est couverte de cils apicaux et possède un flagelle qui lui permet de bouger autour d'elle-même. La moule développe une glande coquillière à partir de l'ectoderme dorsal et sécrète une petite coquille transparente.

- Le stade véligère ou Prodissoconque 1 :

Ce stade Atteint 48 heures après la fécondation. La larve est bien développée et prend une forme de « D », la larve possède un vélum pour se déplacer et l'intestin commence à fonctionner. Après trois jours La formation de la coquille est terminée. Dans ce stade la larve passe à la phase exotrophe (**Bayne, 1965**).

- Le stade Umbo-veligère :

Le second coquillage est formé (Prodissoconque 2), et au bout de 10 jours l'ombre commence à se former. La larve atteint environ 240 µm et possède un vélum bien développé pour se déplacer activement dans le pélagos. Après 17 à 18 jours, une tache photosensible apparaît (**Boukadida, 2017**).

- Le stade pédiveligère :

Est atteint après 22 à 24 jours, où la larve devient plus lourde avec un pied bien développé et peut nager au-dessus ou ramper sur le substrat benthique.

- La métamorphose :

Le développement larvaire d'une moule peut prendre jusqu'à trente-cinq jours, se produit une fois que la larve a trouvé un substrat définitif, cette phase est caractérisée par la dégénérescence du vélum et la formation des ébauches branchiales et l'allongement du pied et la formation de la coquille oblique et un crochet bien visible. Le stade de larve plantigrade est atteint à ce moment-là. (**Carriker, 1961**).

- La phase juvénile :

Dans ce stade la moule appelée aussi naissain, se développe après la métamorphose. Au cours de ce stade, la moule ressemble déjà à un adulte et possède tous les organes nécessaires à l'exception des gonades. Lorsque le moule atteint une dimension de 1 à 2 mm, elle se détache de son support initial et peut se déplacer pour trouver un endroit approprié pour s'attacher.

Les jeunes moules préfèrent souvent les fissures protégées, où elles peuvent se fixer solidement et se développer en toute sécurité. (Le Gall, 1969).

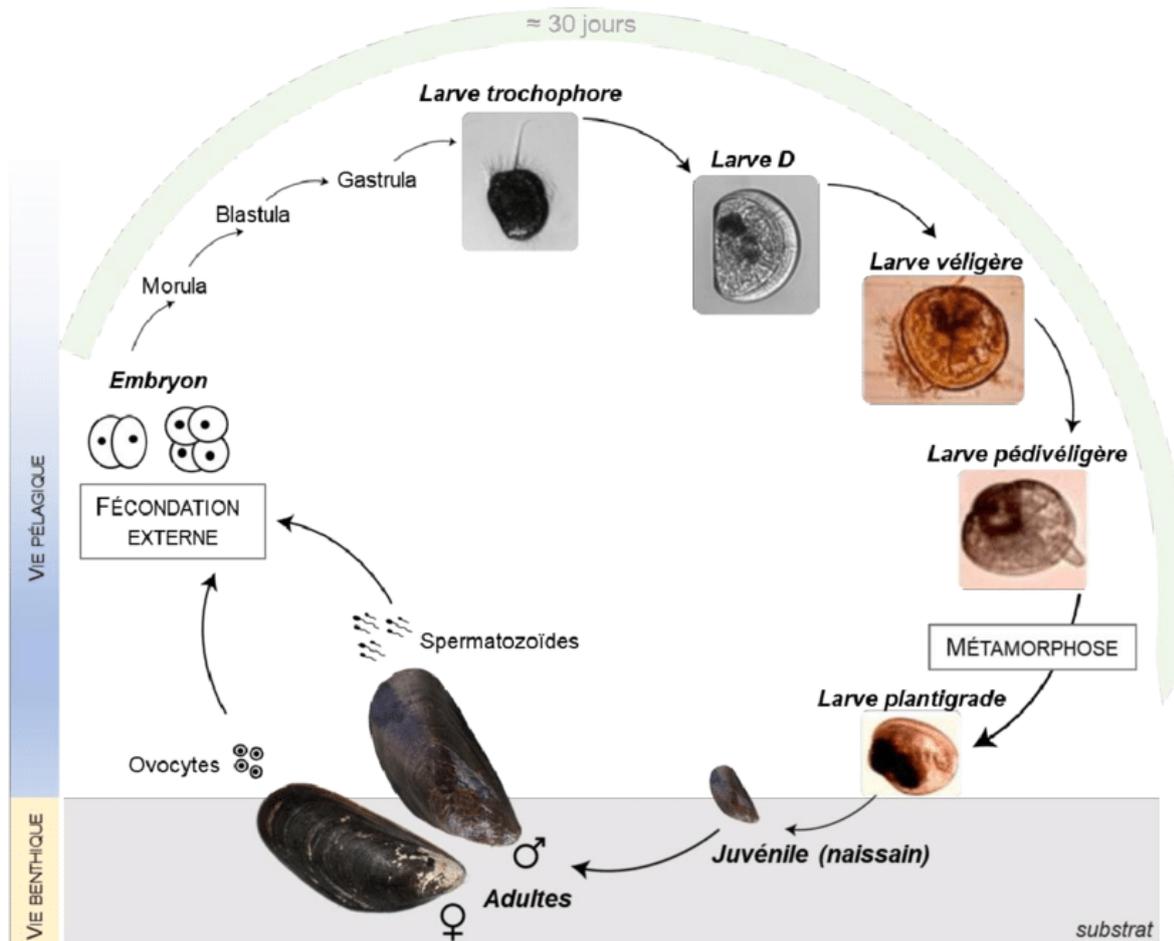


Figure 4: Le cycle biologique des moules Jahangard et al. (2010)

2.8 Le mode d'alimentation

La moule *Mytilus galloprovincialis* est un filtreur et se nourrit d'une large gamme d'organismes planctoniques et de détrit. Elle alimente en pompant de l'eau à travers des branchies élargies en forme de tamis. Les particules alimentaires s'accumulent sur les lamelles des branchies et sont ensuite transportées par des cils vers la bouche. Les particules fines sont ingérées et voyagent dans l'œsophage et l'estomac (Santhanam, 2018).

2.9 La croissance

L'espèce de moule méditerranéenne croît rapidement et peut arriver à 70 mm au cours de sa première année dans des conditions favorables. Les résultats d'une étude montrent que les taux de recrutement et de croissance les plus élevés sont obtenus sur des sites exposés par rapport aux sites abrités des vagues directes ou aux sites exposés à une forte action des vagues (Santhanam, 2018).

2.10 L'aquaculture et l'aspect économique et productif

En domaine de conchyliculture l'espèce *Mytilus galloprovincialis* a connu un développement dans les années 1970-1980, à partir d'un niveau de production faible (Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO, 2019). En 2002, la production de cette moule a été estimée à 131 473 tonnes, pourtant, ces chiffres n'intègrent pas les 201 025 tonnes de production en Espagne (signalée comme *M. edulis* mais possiblement *M. galloprovincialis*) ni les plus de 663 000 tonnes en Chine (principalement *M. galloprovincialis*) (Programme d'information sur les espèces aquatiques cultivées – *Mytilus galloprovincialis*). En 2017, la production de *Mytilus galloprovincialis* arrivait à 101 162 tonnes, ainsi que celle de moules non spécifiées en Espagne et en Chine s'élevait à 241 785 tonnes et 927 609 tonnes (FAO, 2019).

La production de capture de la moule méditerranéenne dans le monde a connu une grande augmentation, de plus de 50 000 tonnes en 1997 et 2002 et 2003, avant de connaître une forte baisse. En 2016, elle s'établissait à une production de 1 000 tonnes (FAO, 2019)

Chapitre 2 : Présentation de la zone de prélèvement

1. Description du littoral Algérien

Le littoral algérien représente un linéaire côtier de 1622,8 Km, avec une superficie terrestre de 3929.41 km², et une superficie marine de 27 998 km². Le nombre des communes côtières est de 136, environ 43 de la population totale sont concentrées sur le littoral algérien, ce dernier se divise en trois zones côtières : l'est, centre et l'ouest. Le littoral algérien avec 32 îles et 208 ilots 71 aires marines d'intérêt écologique à protéger, appartient à la section des climats méditerranéens, le principal facteur climatique est l'influence saharienne. Les zones du littoral algérien ont le même climat, avec des étés chauds et des hivers doux.

Ce littoral caractériser par une grande diversité biologique et écologique possède des plages, des criques et des lagunes et abrite une riche biodiversité de grande variété des espèces marines avec une faune marine comprenant les poissons, les mollusques, les crustacés, les mammifères marins, et une faune terrestre inclus des oiseaux et des reptiles et d'autres animaux.

Dans le plan économique le littoral algérien possède une grande importance avec des activités comme l'exploitation de ressources halieutique et l'activité de la pêche, il y a des activités qui sont nocives pour l'environnement et de la biodiversité comme la pollution industrielle, les activités pétrochimiques « d'Arzew-Bethioua et de Skikda les pôles pétrochimiques algériens ». (Iakahal farida 2016) (Boudouresque 2016) (Meddour-sahar 2017) (Benouareth 2019)

Le littoral algérien est caractérisé par l'absence de plateau continental ou bien un plateau continental étroit sauf à l'extrême ouest, et la présence de deux couches d'eaux superposées, l'eau atlantique modifiée qui pénètre dans la mer D'Alboran et l'eau méditerranéenne. (Benamar 2011).

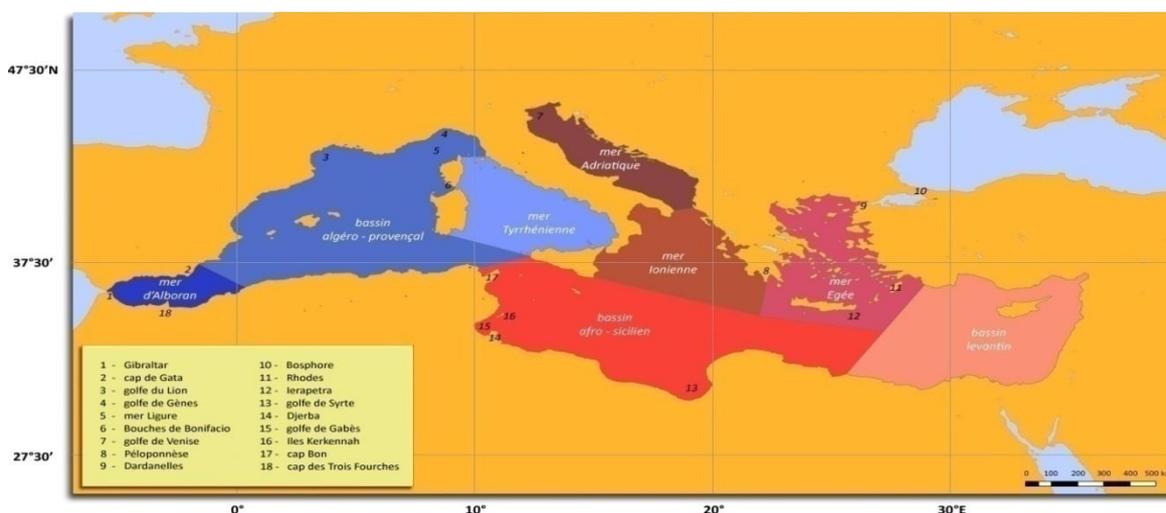


Figure 5: Les bassins et sous bassins de la méditerranée (Millot and Taupier Letag , 2005)

2. Représentation de littoral d'Oran

Le littoral d'Oran située dans l'ouest algérien comprend quatorze communes et il s'étend sur 124 km, avec une profondeur de 6,2 Km, il présente une largeur moyenne de 20 à 25 Km. La côte oranaise constituée d'une série de cap, de l'est à l'ouest (cap Ferrat, cap carbon, cap de

l'aiguille) (cap falcon, cap lindles, cap sigale). On trouve deux types de formation sur la côte oranaise, il y a des zones rocheuses et des zones sableuses caractérisées par des plages ouvertes.

Ce littoral, a un plateau continental réduit, son climat est méditerranéen, avec un été chaud et un hiver doux, la baie d'Oran, a une vitesse moyenne périodique qui se caractérise par la prédominance des vents d'Ouest en hiver et au printemps et des vents d'Est en été et au début de l'automne, les pluies à haute fréquence se localisent dans la région d'Oran. (Benamar 2011).

Ce littoral est caractérisé par trois paramètres climatiques, une humidité élevée et constante et une faible amplitude thermique et des températures modérées et des brises de terre et de mer régulières.

Le littoral d'Oran a une humidité relative élevée à cause de déficit hydrique de la région semi-aride. Les valeurs moyennes de l'humidité relative atteignent généralement plus de 70%, et sont plus basses au milieu de la journée. Cela favorise une riche biodiversité en fournissant de l'humidité aux plantes, même en zone aride. Les températures moyennes annuelles sont environ de 20°C avec des amplitudes thermiques faibles à modérées. Les températures maximales moyennes annuelles ne dépassent pas 30°C et les températures minimales moyennes annuelles sont d'environ 12°C à 15°C. (Zakaria Smahi 2019)



Figure 6: Les limites réglementaires du littoral d'Oran (Smahi Zakaria 2019)

La zone côtière oranaise connu par sa biodiversité, comprend une variété d'habitats qui offrent un large diversité d'espèces animales et végétales , parmi ces espèces marines : les poissons comme le mérrou , le loup de mer , le thon rouge , les mollusque comme les huitres et les moules et les coquillages , les herbiers marins présentent un élément important de la biodiversité dans la zone côtière oranaise sont également importants pour la protection contre l'érosion des côtes ainsi que des algues et des plantes marines.

Les espèces benthiques présentent une grande diversité dans la zone côtière oranaise soit à la faune floristique ou bien faunistique.

Tableau 1: Communauté des espèces benthique du Médiolittoral de la zone côtière (Kallouch M.E.M 2013).

Les espèces benthiques du Médiolittoral de la zone côtière oranaise	
Classification des espèces	Nom scientifique des espèces
Mollusques Gastéropodes	<i>Patella caerulea</i> <i>Pattella rusica</i> <i>Pattella ferrugina</i> <i>Pattella ulyssiponensis</i> <i>Pattella safiana</i> <i>Pattella vulgata</i> <i>Thais haemastoma</i> <i>Monodonta turbinata</i> <i>Littorina neritoides</i> <i>Vermetus cristatus</i>
Echinodermes	<i>Paracentrotus lividus</i> Etoile de mer (Asteroidea)
Mollusques Bivalves	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
Crustacés	<i>Chthamalus stellatus</i> <i>Ligia italica</i> <i>Pachygrapsus marmoratrus</i> Crabe sp (Brachyura) <i>Pollicipes cornucopiae</i>
Cnidaires	<i>Anemonia viridis</i> <i>Actina equina</i>
Spongiaires	<i>Crambe crambe</i> <i>Haliclona cratera</i>
Polyplacophores	<i>Chiton olivaceus</i>

3. La zone de prélèvement

3.1 la Baie D'Oran

Elle est située au Nord-Ouest de pays et s'étendant entre le cap Falcon et la pointe de l'aiguille avec une distance de 25 km et profondeur de 12 km, elle appartient aux montagnes côtières Tel Septentrional elle prend la forme d'une demi circonférence régulière qui s'ouvre d'Ouest en mer avec des fonds profonds. Leurs caps sont résistants aux vagues et constitués de schistes crétacés. La houle du large entre facilement dans la baie et frappe les falaises du fond de la baie l'endroit unique qui est bien protégé de la mer agitée est l'anse de mers el kebir qui se trouve à environ 5 km au Nord-Ouest d'Oran dans la rive occidentale de la baie. **(Marga Anatole 1885).**

La baie d'Oran occupe la partie centrale du littoral d'Oran et possède une structure morphologique variable, elle comporte trois zones, la cote D'Ain el turk et le fond est occupé par mers el kebir, Oran, la côte de Canastel. **(Smahi Zakaria 2019).**

Cette baie est caractérisée par l'absence d'oued à l'exception de quelques petits wadis côtiers d'importance modeste. Le Golfe d'Oran est au centre partie de la côte oranaise et s'ouvre d'Ouest en Est, il est entre la baie Andalous et le golfe d'Arzew.

3.1.1 La situation géographique

La baie d'Oran est située au nord de la ville d'Oran, elle se situe entre le golfe d'Andalousie et le golfe D'Arzew, la baie d'Oran est ouverte en Ouest et en Est et est dominée à l'Ouest par la montagne de l'Aïdour cette dernière a une hauteur de 420 à 580 mètres et dominée en Est par le cap de l'Aiguille, Les coordonnées géographiques de la baie d'Oran sont 35°43'30" N et 0°39'16" W.



Figure 7: localisation de la baie d'Oran(Malika Gherram 2018)

3.1.2 La ville d'Oran

La ville d'Oran, est situé dans le littoral Ouest du pays précisément au fond de la baie d'Oran, cette ville est le chef-lieu de la wilaya d'Oran, borde le golfe d'Oran. À l'ouest de la ville, la montagne Aïdour et un plateau connu sous le nom de Moulay Abdelkader al-Jilani offrent des caractéristiques importantes. La situation géographique spécifique de la ville peut être identifiée par ses coordonnées de 35° 42' 10" nord et 0° 38' 57" ouest.



Figure 8: localisation géographique de la ville d'Oran (Google maps)

3.1.3 Le port d'Oran

Le port d'Oran, situé au centre de la baie, est un port mixte fonctionne à la fois comme un port de commerce et de pêche. Il dispose d'un impressionnant dispositif de quais de six kilomètres avec des profondeurs allant de 7 à 12 mètres. Étant le premier port en eau profonde disponible depuis le détroit de Gibraltar, il offre un excellent accès pour les grands navires (**Benamar 2011**).

Chapitre 3 : Notion sur la
biologie Moléculaire et l'ADN

1. La notion d'ADN :

1.1 Le concept d'ADN :

La molécule d'ADN ou bien l'acide désoxyribonucléique est une molécule qui porte les informations génétique, se trouve presque dans tous les cellules eucaryotes et procaryotes est une hélice de deux brins complémentaires appariés qui s'enroulent l'un a l'autre (double hélice), chaque brin a un squelette qui constitue une série des groupes de sucre désoxyribose et phosphate et chaque sucre est attaché avec l'un des quatre bases azotique : (A) Adénine, (C) Cytosine, (G) Guanine, (T) Thymines, les deux brins d'ADN sont reliés par des liaisons dihydrogène, trois liaisons qui lient le cytosine avec guanine et deux liaisons entre adénine et thymine, la séquence de l'ADN code des informations biologiques comme l'instruction pour fabriquer des protéines, les mutations dans la séquence d'ADN entraînent des troubles génétiques et biologiques évolutifs. (Watson JD 1953) (Albert, B 2002).

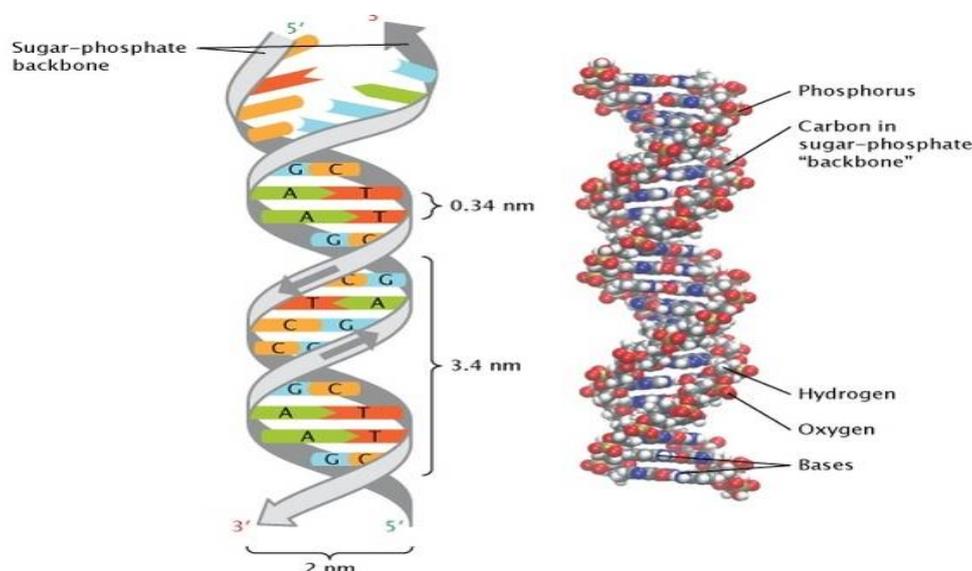


Figure 9: La structure en double hélice de l'ADN (Pray, L. 2008)

1.2 Les bases azotiques :

La molécule d'Adn est caractérisée par des bases azotique attachés au carbone 1, ces quatre bases azotiques divisés en deux structures (pyrimidines et purines).

1.2.1 Les bases pyrimidines :

- **Cytosine** : constitué de noyau pyrimidine et le carbone n 4 est substitue par une fonction amine et est substitue par la fonction cétone au carbone numéro 2.
- **Thymine** : porte des fonction cétones au carbone numéro 4 et 2 et au carbone numéro 5 est substitue par un méthyle. (Christian moussard 2020)

1.2.2 Les bases puriques :

Des noyaux purines composant à gauche de 4 carbones et 2 N avec un cycle pentagonal a droit.

- **Adénine** : est substituée par une fonction amine au carbone numéro 6 et constitue un noyau purine.
- **Guanine** : au carbone numéro 2 est substituée par une fonction amine et au carbone numéro 6 par une fonction cétone. (hartl, D.L.2005)

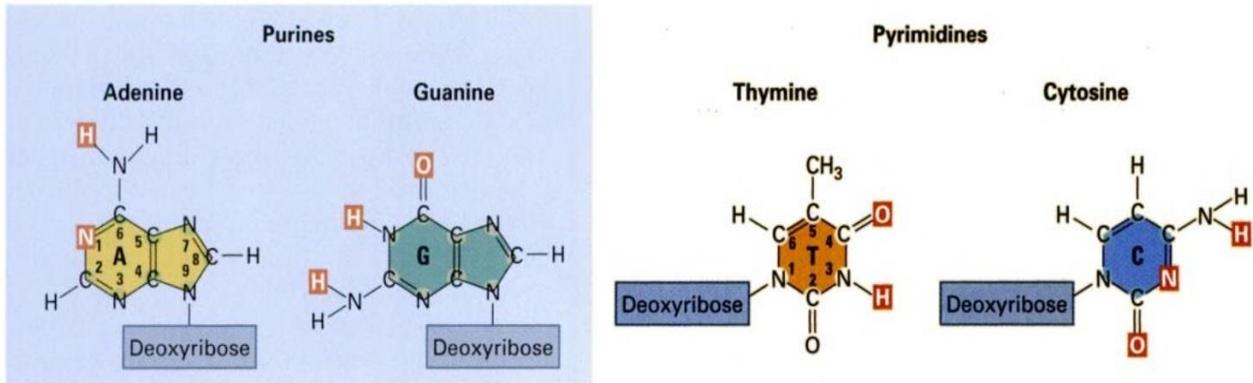


Figure 10: Structures chimiques des quatre bases azotées de l'ADN : adénine, thymine, guanine, cytosine (Hartl, D.L. 2005)

1.3 Le sucre désoxyribose

Appelé aussi 2-désoxyribose, c'est un pentose dérivé du ribose par le remplacement d'hydroxyle en position 2 par l'hydrogène. C'est à dire la perte de l'oxygène, les carbonnes de désoxyribose sont numérotés de 1' à 5'. (turner et al., 2000) (Ameur Abdelkader 2016).

1.4 Les nucléosides

Sont des molécules composées du pentose liées avec une paire de base par une liaison équivalente : N-Osidique à la position-1 de l'anneau du sucre pentose et lie à l'azote de la base au point d'attache à la position N1 pour les pyrimidines et la position N9 aux purines, pour former un nucléoside. (Ameur Abdelkader 2016).

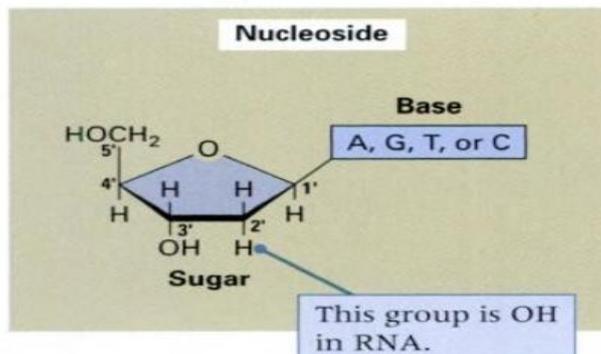


Figure 11: Structure chimique du nucléoside d'ADN (Hartl, D.L .2005)

1.5 La structure des nucléotides

1.5.1 Les phosphates

Les phosphates sont reliés en C5 du sucre désoxyribose (le site de d'estérification), la molécule de phosphate rend le nucléotide chargé négativement, les acides nucléiques comportent un seul phosphate. (Mouna ABABOU 2019) (ChristianMoussard 2005).

1.5.2 Le nucléotide

Est un ester phosphorique de nucléoside, constitue de base et de pentose et d'un groupe de phosphate, lorsqu'un groupe phosphate est attaché au sucre, le nucléoside devient un nucléotide. (ChristianMoussard 2005) (Hartl, D.L .2005).

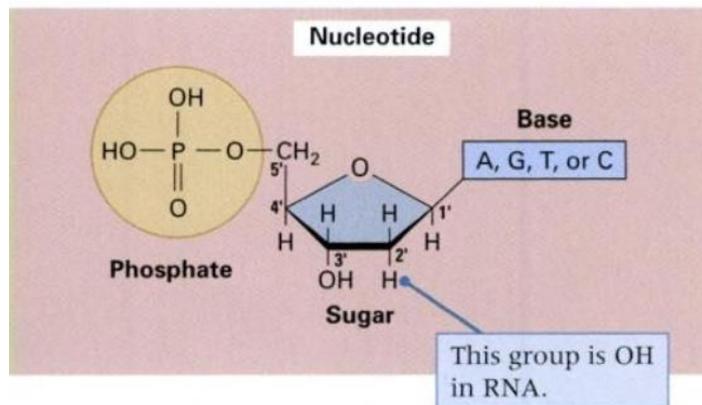


Figure 12: la structure chimique du nucléotide (Hartl, D.L .2005)

1.5.3 Les liaisons phosphodiesters

Dans les acides nucléiques les nucléotides sont liés et former une chaîne de poly nucléotides alors, le phosphate est attaché au carbone 5 d'un sucre est lié à l'hydroxyle attaché au carbone 3 du sucre suivant dans la chaîne des nucléotides, ces liaisons chimiques qui permettent les sucres des nucléotides de lier par l'intermédiaire des groupes phosphates sont appelées les liaisons phosphodiesters et leur orientation 5'-3'-5'-3' (Hartl, D.L .2005)

Les groupes terminaux dans toutes les chaînes poly nucléotides sont de groupe phosphate 5'-phosphate (5'-P) a une extrémité et à l'autre extrémité le groupe hydroxyle (3'-OH) (Hartl, D.L .2005).

1.1 Les hybridations « les liaisons hydrogène » :

Les liaisons hydrogènes sont formées entre les paires de bases azotées complémentaires, adénine se lie a une paire de base thymine avec deux liaisons hydrogène cette hybridation est moins stable et guanine se lie avec la cytosine avec trois liaisons hydrogène est cette hybridation elle est plus stable. (Fig14).

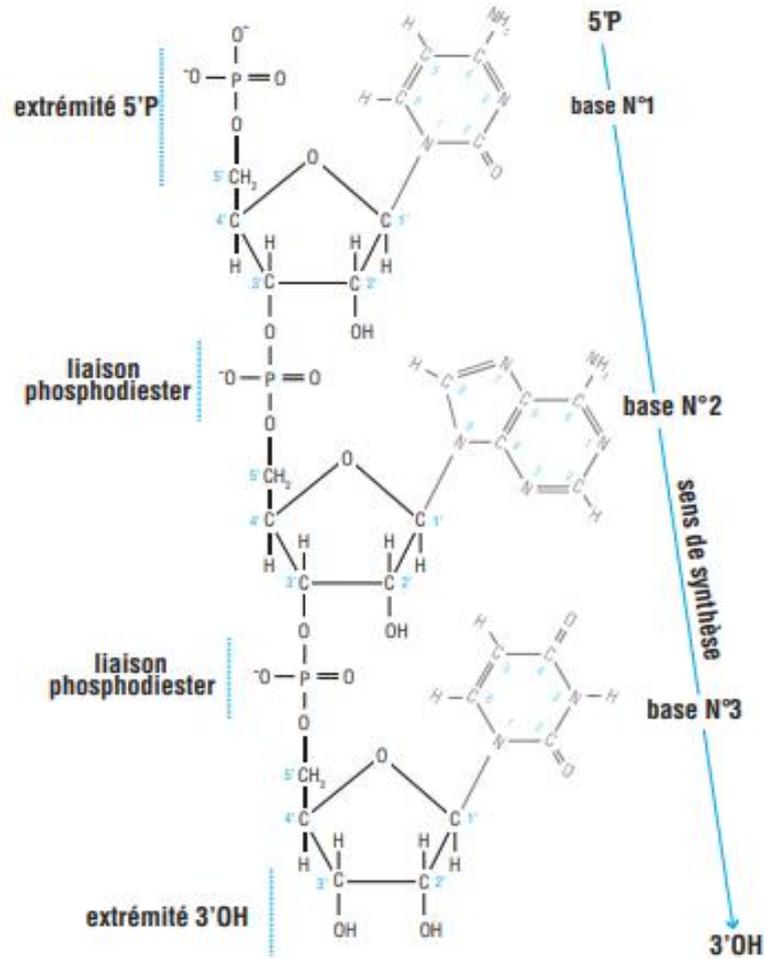


Figure 13: La structure chimique de la chaîne polynucléotidique orientée et possède deux extrémités, l'extrémité 5'P et l'extrémité 3'OH (Philippe LUCHETTA)

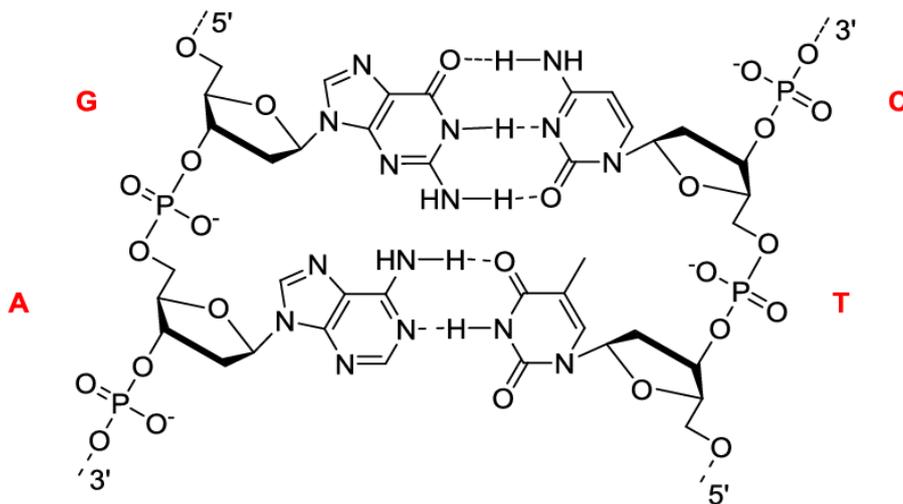


Figure 14: La structure chimique de la double hélice d'ADN (Pierre Murat2010)

2. La réplication « chez les eucaryotes »

C'est la synthèse d'ADN sous le mode semi conservatif, la cellule duplique son ADN avant la division cellulaire, c'est une étape essentielle dans la reproduction des cellules.

Il existe plusieurs origines de réplication qui permettent de répliquer l'ADN, les deux fourches de réplication avancent dans les sens différents

L'ADN des eucaryotes possède plusieurs réplifications (Ameur Abdelkader 2016).

2.1 Les étapes de la réplication de l'Adn chez les eucaryotes :

La Formation des fourches mobiles de la réplication : la double hélice d'ADN commence à se dérouler au niveau de chaque origine de réplication dans les deux sens, grâce à l'enzyme topoisomérase.

La séparation des deux brins : par l'enzyme helicase les doubles brins sont séparés et les Protéines SSB qui gardent les deux brins séparés pendant la réplication.

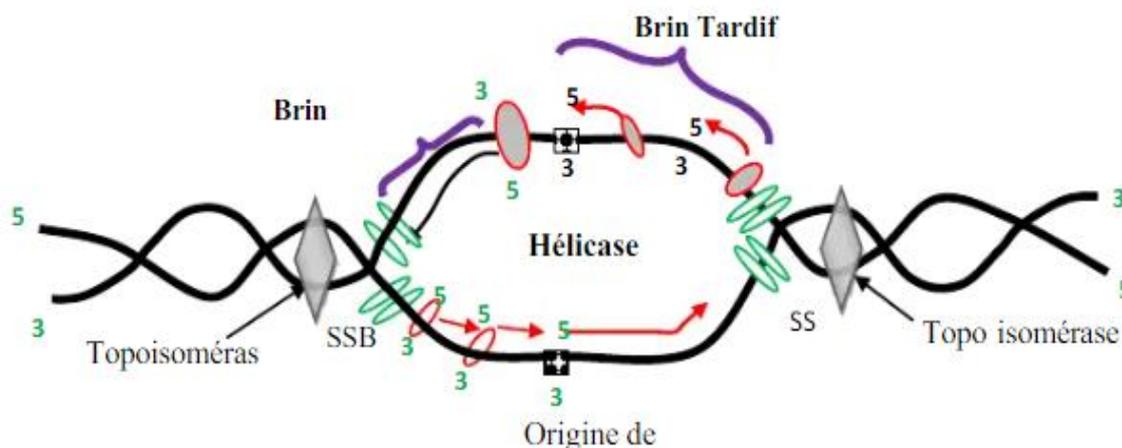
La synthèse des brins précoce et tardif : se déroule par deux façon une façon continue pour le brin précoce et l'autre brin d'un façon discontinue (**fragment d'Okazaki**), par l'enzyme ADN polymérase.

L'amorçage : les fragments d'ARN appelés amorces (4 à 12 nucléotides) sont nécessaires pour le début de réplication des deux brins comme point de départ pour la synthèse des brins d'ADN a la polymérisation, les ADN polymérase ne peut qu'ajouter des nucléotides a chaînes nucléotidiques préexistantes. Ainsi Pour le brin précoce, une seule amorce est nécessaire, par contre le brin tardif chaque fragment d'Okazaki a besoin de sa propre amorce.

L'élongation : Après le processus d'amorçage, des nucléotides sont ajoutés par l'ADN polymérase pour former une nouvelle chaîne qui est synthétisée sur la base du brin matrice complémentaire. L'ADN polymérase III est l'enzyme responsable du processus de synthèse de l'ADN.

L'enlèvement des amorces : Les amorces d'ADN doivent être éliminées avant la fin de la réplication, et toutes les lacunes temporaires créées au cours du processus sont remplies d'ADN.

La ligation : Après élimination de l'amorce ARN, le vide laissé est remplacé par un fragment d'ADN synthétisé par l'ARN polymérase, et après l'intervention d'une autre enzyme (ligase), les fragments OKAZAKI sont reliés par les liaisons phosphodiesters (**Ameur Abdelkader**



2016).

Figure 15: le mécanisme de la Réplication D'Adn (Ameur Abdelkader 2016)

3. L'ARN ou acides ribonucléiques :

Ils sont présents dans les eucaryotes et les procaryotes au niveau de cytoplasme et le noyau avec une structure simple brin, ils sont intermédiaires entre ces deux, ils ont des fonctions importantes dans la cellule comme un élément essentiel à la synthèse des protéines (l'exécution de la synthèse protéique).

3.1 Les types D'ARN :

1. ARN messagers (ARNm) : transcrit l'information génétique de l'ADN pour la synthèse des protéines est considéré comme le lien entre l'information génétique d'ADN et la protéine. (Ameur Abdelkader 2016)

2. ARN de transfert (ARNt) : c'est un adaptateur entre les acides aminés et l'ARNm au synthèse protéique, il contient la région anticodon qui est complémentaire à une séquence de trois nucléotides spécifiques. (Ameur Abdelkader 2016)

3. ARN ribosomiaux (ARNr) : il a un rôle principal dans la traduction, est impliqué dans la formation de liens peptidiques entre les acides aminés. (ChristianMoussard 2005) (Iodish H 2000).

4. La notion d'espèce :

L'espèce est un groupe d'individus qui présentent des caractères communs il s'agit d'un ressemblent génétiquement et morphologiquement, et qui peuvent se reproduire entre eux. L'espèce présente l'unité de base de la classification biologique. Cette définition signifie que les membres d'une même espèce partagent les mêmes caractéristiques physiques et la même composition génétique, ainsi que des mécanismes de reproduction compatibles. Ainsi, ils sont distincts d'autres genres d'espèces, qui présentent des différences morphologiques et génétiques, et qui ne peuvent pas se reproduire avec succès généralement.

Les espèces en biologie moléculaire sont définies en fonction de leurs diversités génétiques dans les séquences d'ADN. Chaque organisme possède une séquence d'ADN unique, qui contient les renseignements génétiques qui en déterminent les caractéristiques. En comparant des séquences d'ADN entre différents individus ou populations, il convient d'observer des variations. Ces variations génétiques dans les séquences D'ADN sont ce qui permet d'identifier les différentes espèces. Dans la plupart des cas, la séquence génétique utilisée pour l'identification des espèces est une région conservée et ne change pas beaucoup avec le temps. Cette région est utilisée comme "code-barres" pour identifier différentes espèces, et les gènes mitochondriaux et ribosomal comme COI, et cytochrome b et 16S ARNr sont les codes-barres d'ADN les plus utilisés. Cependant, pour plusieurs espèces d'animaux, d'autres régions D'ADN génomique peuvent être visées pour l'identification des espèces. (Hebert PDN 2003) (Hajibabaei 2006).

5. L'ADN conservé :

La séquence conservée de l'ADN présente une région de l'ADN qui est similaire ou bien identique entre différentes espèces ou entre différentes régions du génome de la même espèce. Ces séquences d'ADN conservées peuvent être des régions codantes qui codent des protéines, et peuvent être des régions non codantes qui peuvent avoir d'importantes fonctions de régulation. Ces séquences sont très importantes car elles peuvent être utilisées pour étudier la taxonomie des espèces et leur variation génétique. Également pour identifier les gènes ou comprendre leur comportement pour différentes fonctions biologiques. (Albert,B et *al.*, 2014). (Brown T.A2017).

6. Les primers universels :

Sont des amorces d'ADN fabriquées en laboratoire qui peuvent être utilisées pour amplifier des régions d'ADN particulières de différentes espèces. Ces amorces sont fabriquées pour cibler des régions d'ADN conservées entre différentes espèces, et aussi sont utilisées pour amplifier ces régions dans différentes espèces sans avoir besoin de concevoir des amorces spécifiques pour chaque espèce. (Kalendar,R 2011)

Les amorces universelles sont utilisées en PCR pour amplifier des régions spécifiques de l'ADN, cela permet aux scientifiques de comparer les séquences d'ADN entre différentes espèces pour détecter la diversité génétique. (Weisburg W.G1991)

Plusieurs types d'amorces universelles ont été conçus pour cibler différentes régions d'ADN préservées. Comme les amorces 16S rDNA sont utilisées pour amplifier des régions spécifiques du gène 16S rDNA, qui est conservé entre différentes espèces bactériennes et permettre de distinguer les différentes souches bactériennes dans l'environnement. (Wang,L 2019) (Wilson W.J 2002).

7. Les méthodes d'identification moléculaire d'une espèce.

La méthode est basée sur la comparaison d'une séquence d'ADN précise (code à barres) avec les séquences de référence.

Il y a plusieurs méthodes ou technique moléculaires innovantes pour l'identification des espèces et sont des techniques basées sur l'analyse de l'ADN ou l'ARN permettant d'identifier les espèces dans un échantillon prélevé d'un tissu donné. A continuation, certaines des méthodes les plus courantes :

7.1 La PCR (Polymérase Chain Réaction) :

C'est une technique utilisée pour l'amplification des séquences d'ADN spécifiques au sein d'un échantillon, avec l'utilisation des amorces spécifiques, la PCR peut détecter des séquences d'ADN spécifiques pour certaines espèces, même possible avec des échantillons de mauvaise qualité. Les produits PCR peuvent alors être amplifier et analysés par électrophorèse aux fins d'identification (Mullis,K.B 1994).

- **Préparation de l'échantillon** : Il faut extraire l'ADN ou l'ARN de l'échantillon biologique par des protocoles d'extraction d'ADN et le purifier avant de l'utiliser pour la PCR.
- **Préparation de la solution de réaction PCR** : La solution de la réaction PCR contient des nucléotides (DNTP, A, G, C, T) et l'enzyme de la Taq polymérase et un tampon de réaction qui crée un PH stable et fournit les ions de magnésium (MgCl₂) et le ddH₂O ou de l'ARN, et des amorces d'ADN spécifiques à la région que nous dois amplifier.

Les Séquences des cycles de la PCR :

La PCR comprend trois étapes principales : la dénaturation et l'hybridation de l'amorce et l'élongation.

- 1). Dénaturation : L'échantillon des tubes PCR est chauffé à une température de 94 ° pour dénaturer l'ADN et séparés les doubles brins.
- 2). L'hybridation D amorces : avec une température de 55 à 65 °C, les amorces se fixent a chaque brin d'ADN simple.
- 3). L'élongation : dans cette étape La température est augmentée à 72°C et permet l'activation de la Taq polymérase pour ajouter des DNTP complémentaires qui synthétisent un nouveau brin d'ADN. Ce cycle est répété environ 35 fois pour amplifier la région cible de façon exponentielle. (Mullis,K.B 1994).

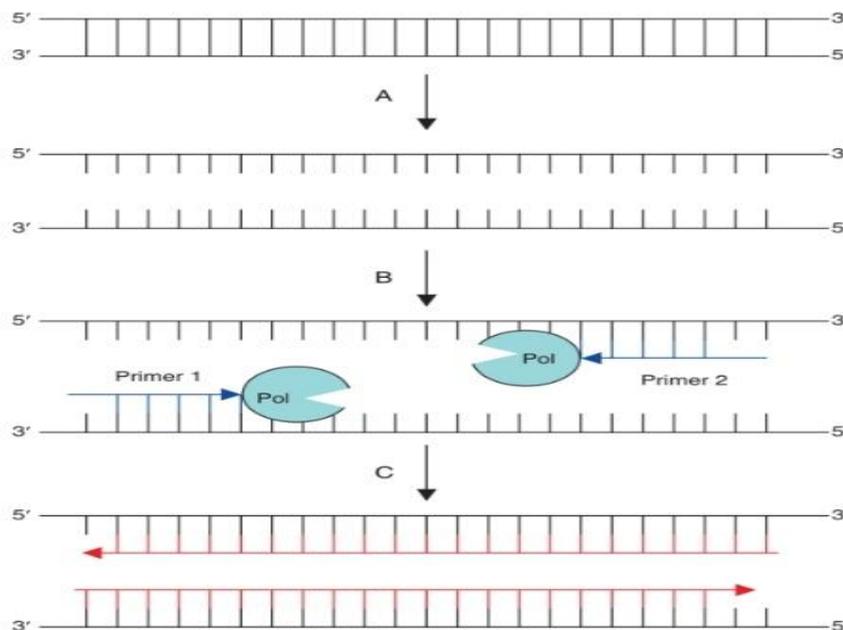


Figure 16: Un cycle de réaction en chaîne par polymérase (De Connie R 2022)

7.1.1 Le thermocycleur

Thermocycleur ou bien machine de PCR sont des instruments essentiels dans la biologie moléculaire pour l'amplification des acides nucléiques par la réaction en chaîne polymérase, cet appareil présente un bloc thermique avec des trous ou les tubes de PCR avec le mélange sont placés, il chauffe et refroidit les mélanges des PCR avec des températures et des durées précises qui permettent l'amplification des séquences D'ADN ciblé. (Raghibir 2019)



Figure 17: Le thermocycleur (appareil photo)

7.2 L'électrophorèse :

C'est une technique de la biologie moléculaire et chimie qui permet de séparer les molécules chargées indépendamment de leur charge électrique ou leur taille. Est utilisée principalement pour séparer des acides nucléiques ou des protéines et aussi pour évaluer le taux de purification d'une protéine et séquencer L'ADN ou bien déterminer la taille des bandes de fragments amplifiés. L'utilisation de l'électrophorèse pour la séparation des acides nucléiques comprend à placer le gel d'agarose dans un support transparent avec règle fluorescente après le versement du solution de gel d'agarose dans le support on enlève la peigne qui doit laisser des puits dans le gel, après l'emplacement de gel dans la cuve d'électrophorèse et le submerger par la solution de tampon d'électrophores (TAE ou TBE) , on dépose les échantillons de PCR et le marqueurs de taille d'ADN dans les puits de pole négatif qui est ensuite soumis à un champ électrique par l'injecteur. Les molécules vont être séparé à travers le gel selon leur taille et leur charge, les molécules les plus grandes migrent lentement que les petites créant ainsi des bandes différenciées de molécules séparées. L'électrophorèse et aussi utilisée pour séparer les fragments d'ADN par la digestion enzymatique, pour analyser les polymorphismes de longueur de fragment de restriction (RFLP), cette technique est utilisée pour nombreuses autres applications en biologie.

La technique de l'électrophorèse permet la visualisation des bandes d'amplification d'ADN quand la réaction PCR est terminée, le gel d'agarose contient une matrice de pores qui lui permet de séparer les fragments en fonction de leur taille. Si l'ADN possède une charge négative alors elle passe vers l'électrode positive. (W Suza 2021)

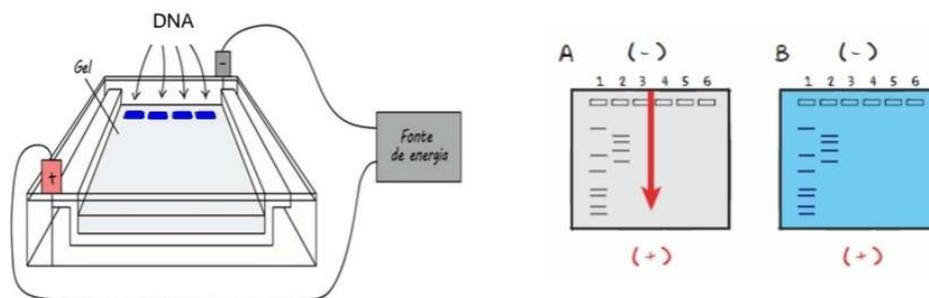


Figure 18: Le schéma d'électrophorèse sur le gel d'agarose (Monica Sebastiana 2022)

7.3 Le séquençage de l'ADN :

Le séquençage de l'ADN c'est de déterminer l'ordre quatre bases azotées A.C.G.T dans une séquence d'ADN donné. Cette technique est essentielle dans le domaine génétique et en biologie moléculaire et dans autre disciplines de la science de la vie utilisée pour séquencer des régions d'ADN génomique de grande taille, cela permet d'identifier des gènes et des mutations ainsi que des marqueurs moléculaires et la lecture de l'information génétique. Dans le domaine médical, il permet le diagnostic des maladies, l'étude de la paternité et la synthèse de médicaments. (J. Lamoril, 2008).

Il existe deux techniques de séquençage de l'ADN connus et utilisables, la première et celle de Sanger décrite en 1977 la deuxième est le séquençage de nouvelle génération (NGS). Ces deux méthodes sont similaires au niveau de la manipulation , appelée aussi le séquençage didésoxy , se fait par l'ajout des nucléotides fluorescents par L'ADN polymérase dans le brin matrice d'ADN un par un et chaque paire de base est identifiée, la différence essentielle entre ces deux méthodes est la capacité de séquençage, le NGS peut séquencer des millions de fragments et des gènes ou alors le génome complet, contrairement la méthode Sanger qui peut séquencer un petite partie du fragment d'un gène avec un nombre faible de cibles de façon rapide et économique (Sanger F. 1977).

Chaque méthode a des avantages et défis et à leur spécificité et facilité d'utilisation, le séquençage est même utilisé en microbiologie médicale, peut faciliter la détection des pathogènes dans des échantillons clinique ou environnementaux (J. Lamoril, 2008).

7.4 La phylogénétique des espèces :

La phylogénie est l'étude des relations parentes entre les espèces différentes et détermine leur classification évolutionnaire précisément en fonction de leurs ancêtres communs et permet de le rapprochées, généralement par la phylogénie moléculaire, on peut reconstruire les relations ancestrales par l'analyse des séquences d'ADN ou d'acides aminés. La phylogénie moléculaire est basée sur les mutations aléatoires au fil du temps et la transmission des

mutations génétiques aux futures générations par les ancêtres, ces variations génétiques appelée polymorphisme, sont considérées comme des marqueurs phylogénétiques et elles permettent des constructions des arbres phylogénétiques après l'alignement des séquences par des outils bio-informatique. Le choix de ces marqueurs phylogénétiques selon le niveau taxonomique étudié, que ce soit une ADN mitochondriale ou bien nucléaire. Enfin, la phylogénie moléculaire est une méthode essentielle pour la construction des arbres phylogénétiques, qui permet d'étudier l'évolution des espèces et de les identifier à partir de leurs séquences d'ADN. **(Amira Laihi, 2020).**

7.5 Les marqueurs moléculaires :

Sont des fragments d'ADN ou d'un gène présentant des polymorphismes, en biologie moléculaire les marqueurs moléculaires sont utilisés pour l'identification des espèces ou d'une séquence de pool d'ADN inconnu. Ils sont aussi utilisés pour détecter la variation génétique dans le génome d'espèces et ils sont utiles pour l'analyse phylogénétique. **(Gosling 2021).**

Les marqueurs moléculaires les plus utiles dans la recherche de l'aquaculture et en pêche est les RFLP généralement chez l'ADN mitochondriaux, comprend à utiliser les enzymes bactériennes, appelées endonucléases de restriction, ces enzymes de restriction coupent l'ADN dans des sites spécifiques, créant des fragments qui doivent être détecté par électrophorèse sur gel. Les marqueurs microsatellites aussi ont également été utilisés dans diverses applications en aquaculture. Le séquençage de NGS est parmi les techniques les plus modernes et les plus avancées et efficace pour acquérir les marqueurs moléculaires **(Gosling 2021).**

7.5.1 Les Différents marqueurs d'ADN utilisés pour l'identification des espèces (eucaryotes, procaryotes) et les végétaux et les champignons :

Il s'agit d'un barcoding moléculaire pour identifier les êtres vivants et étudier leur diversité génétique, plusieurs régions conservées dans les gènes ont été utilisées comme marqueurs en fonction de la famille d'espèces. Voici quelques exemples de régions d'ADN conservées pour différentes catégories d'organismes :

- Les Animaux : La région de la sous unité du gène (COI) du cytochrome oxydase dans l'ADN mitochondriale a été largement utilisée pour l'identification et la classification des animaux. Ce gène présente plusieurs copies et sa région présente des séquences conservées qui permettent une amplification de l'ADN facile et fiable. **(hebert 2003).**
- Les Procaryotes : La région de l'ARNr 16S est utilisée largement pour l'identification et la classification des bactéries et autres microorganismes. Cependant, pour les études plus spécifiques, les gènes codant pour des protéines telles que l'ADN gyrase (gyrB) et la sous-unité ribosomique 30S (rpsA) ont été utilisés pour étudier la diversité génétique des procaryotes. **(Muling M.2008).**
- Les Eucaryotes : La région de l'ARNr 18S (petite sous-unité du ribosome) est utilisée pour étudier la variation génétique des eucaryotes, comme les protistes. Cette région présente également des séquences conservées qui permettent l'identification des eucaryotes **(Medling.L1988).**
- Les végétaux : les régions de l'ADN chloroplastique telles que les gènes rbcL et matK ont été utilisées pour étudier la diversité génétique des plantes. En plus La

région de l'ARNr 18S également a été utilisée pour la classification des plantes (Sang T 1995).

- Les Champignons : les régions d'ADN ribosomique ITS (Internal Transcribed Spacer) ont largement été utilisées pour l'étude de la diversité fongique, aussi les régions de l'ARNr 18S et de l'ARNr 28S sont utilisées pour l'identification. (Withe T.J 1990) (Schoch et al 2012).

7.5.2 Les différents marqueurs moléculaires utilisés chez le genre *Mytilus*

Différentes études génétiques des espèces *Mytilus* ont utilisé des marqueurs moléculaires. Chaque étude a un objectif principal qui est mis en évidence. Les différents marqueurs moléculaires utilisés sont les SNPs (polymorphismes d'un seul nucléotide), les AFLPs (polymorphismes de longueurs de fragments amplifiés), les ESTs (étiquettes de séquence exprimées), les SSRs (répétitions de séquences simples), les RFLPs (polymorphismes de longueurs de fragments de restriction) et les RAPDs (polymorphismes aléatoires amplifiés de l'ADN).

Les différentes espèces de moules étudiées sont Me (*Mytilus edulis*), Mg (*Mytilus galloprovincialis*), Mt (*Mytilus trossulus*), Mc (*Mytilus californianus*), Mch (*Mytilus chilensis*), Mcor (*Mytilus coruscus*) et Pc (*Perna canaliculus*). Avec l'utilisation de ces marqueurs moléculaires, il est possible d'évaluer la diversité génétique entre les populations de moules, ainsi que leur structure et leur histoire évolutive, et de les identifier. (Gosling 2021).

Tableau 2 : Les différents marqueurs moléculaires étudiés dans des différentes études chez le genre *Mytilus* (Gosling2021, Lourenco et al., 2015).

Les marqueurs moléculaires	Les espèces de <i>Mytilus</i> étudiés	L'étude	Les résultats
ADN mitochondrial COI	<i>Mytilus sp.</i>	Vallejo et al., 2017	La présence de <i>Mytella charruana</i> a été confirmée avec une correspondance d'identité moyenne de 94%. C'est la première fois que cette espèce envahissante est enregistrée dans la baie de Manille. La présence de cette moule invasive pourrait entraîner une concurrence avec la moule <i>Perna viridis</i> indigène.
SNPs	Me, Mg et Mt	Larrain et al., (2018)	La moule bleue indigène du Chili présente une différence génétique significative par rapport aux espèces de référence. Par conséquent, elle devrait être reconnue comme une

			espèce distincte et nommée <i>Mytilus chilensis</i> .
Marqueurs nucléaires (Me 15/16, EF- bis, ITS) et marqueur Mitochondrial (ND2- COIII).	Me, Mg and Mt	Kijewski et <i>al.</i> , (2011)	Une différence génétique entre les populations de <i>Mytilus galloprovincialis</i> de la Méditerranée et de la mer Noire. Les fréquences alléliques varient le long des côtes européennes. Les allèles de l'espèce <i>Mytilus trossulus</i> ont été signalés pour la première fois dans les eaux froides d'Islande, de la mer de Barents et de la mer Blanche
Glu5', 16s RFLP	M.edulis, galloprovincialis, trossulus	Lourenco et <i>al.</i> , 2015	<i>Mytilus galloprovincialis</i> présente une diversité génétique importante le long des côtes du sud de l'Europe et du nord de l'Afrique, avec plusieurs populations identifiables. Cependant, certaines de ces populations étaient morphologiquement indiscernables mais génétiquement différentes.

Chapitre 4 : Matériel et
Méthodes

1. L'extraction d'ADN

Les échantillons de notre espèce de la moule de *Mytilus galloprovincialis* ont été collectés dans la baie d'Oran au mois de Mars 2023, l'ADN a été extrait par deux protocoles d'extraction : Protocole 1 : par NAOH et le protocole 2 : à l'aide d'un kit d'ADN spécifique aux espèces marines. Le tissu ciblé par la présente étude est le manteau de la moule.



Figure 19: Les échantillons collectés de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Photo originale, 2023)

Protocole 1 :

- Broyage : Le tissu de la moule est écrasé et broyé pour libérer des cellules et de l'ADN.
- Mélange du broya : pour dissoudre les membranes cellulaires 4 ml de NAOH ont été ajoutés au tissu broyé.
- Vortex : pour faciliter la libération de l'ADN le mélange est remué à grande vitesse.
- Prélèvement de 5 μ l du mélange : les 5 μ l du mélange prélevé sont transférés dans un nouveau tube.
- Neutralisation : pour stabiliser l'ADN un volume de 40 μ l d'NAOH est ajouté pour neutraliser le mélange.
- Incubation : le mélange est incubé à 75°C pendant 15 minutes dans le thermocycleur en raison de dénaturation des protéines et l'inactivation des enzymes qui pourraient endommager l'ADN.
- La Neutralisation finale : on ajoute 360 μ l de solution de Tris-HCl pH 7 pour neutraliser l'ADN et ramener le pH à un degré plus neutre (**Kit alcaline Wiragen**)



Figure 20: l'ADN Extrait par La Méthode de L'NAOH
(Photo originale, 2023)

Protocole 2 :

- On prendre 30 mg de tissu broyé et haché et on le transfère dans un tube de micro-centrifugeuse de 1,5 ML qui a été stérilisé .
- Ensuite, on ajoute 200 microlitres de lyse buffer (LB8) et 20 microlitres de RNase A dans le tube désigné. Agiter la solution au vortex pendant 10 secondes, puis laisser incuber à température ambiante pendant 2 minutes.
- Après on ajoute 20 µl de protéinase K dans le tube, on confirme l'immersion totale du tissu dans la solution. Ensuite, on utilise un vortex pour bien mélanger le contenu du tube.
- On incube le tube à 55 °C jusqu'à ce que la lyse soit terminée, le temps d'incubation peut différer selon le type de tissu utilisé par exemple, les tissus de crustacés et les mollusques nécessitent seulement 30 minutes, on a utilisé un vortex pour bien mélanger à nouveau le contenu du tube.
- On mélange 1,5 x fois du volume de binding buffer (BB8) avec notre mélange et après on confirme la présence d'éthanol et on mélange la solution bien avant de le mettre sur une colonne de centrifugation. Le produit doit être soumis à une centrifugation à 12 000x g pendant 30 secondes. Ensuite, le produit doit être jeté.
- Après on ajoute 500 µl de clean buffer (CB8) et confirmé la présence d'éthanol, le mélange doit être centrifugé une autre fois à 12 000 g pendant 30 secondes. Une fois cette opération est terminée, le circuit peut être jeté. On répète l'étape une autre fois.
- On ajoute 500 µl de Wash buffer (WB8) (vérifier que l'éthanol a bien été ajouté), centrifuger à 12 000 g pendant 30 secondes, jeter le flux traversant. Répétez cette étape une fois.
- Le produit soumis à une centrifugation à 12 000x g pendant 2 minutes pour éliminer complètement le Wash buffer (WB8) résiduel.
- On Place la colonne de centrifugation dans un micro-tube stérile de 1,5 ml. Ajouter 50 à 200 µl d'éluion buffer (pour une plus grande efficacité, préchauffer l'Elution buffer

à 60 à 70°C) et de l'eau distillée (pH > 7,0) au centre de la colonne. On incube avec une température ambiante pendant 2 minutes, centrifuger à 12000 x g pendant 1 minute pour éluer l'ADN génomique. Pour mieux produire l'ADN, on répète cette étape une fois. (Huang. Y *et al.*, 2016)



Figure 21: l'ADN extrait par le kit commercial

(Photo originale, 2023)

2. La conception des amorces et les conditions de la PCR

Par une réaction de PCR Standard qui comprend quatre amorces pour de gènes suivants : 16S rDNA et deux amorces universelles de 18s pour les eucaryotes et une amorce 18s spécifique pour l'espèce *Mytilus galloprovincialis*, ces amorces fixées à des régions complémentaires de fragments des gènes ciblés.

Dans notre travail nous avons pris des amorces spécifiques de l'ADNr 16s F1 (GGTAGCCGATAATTTGCTT) R1 (AGCCAACATCGAGGTCGCAA) et 18s F1 (CCGCGAATGGCTCATTAATCAG) R1 (GATCAGCACAAAGTTATCCAG) de l'étude (IVAN F. BENDEZU *et al* 2005) comme référence.

2.1 PCR : Marqueur ADNr 18s

Pour la première expérience, afin de tester la fiabilité de l'ADN, on a utilisé deux amorces universelles pour les eucaryotes pour amplifier des portions du gène de 18s rDNA, à savoir 18s et F1/R1. Ces amorces ont été utilisées pour réaliser la réaction PCR dans des tubes PCR de 25 µL chaque tube contient :

- 1 µL d'ADN total (5 ng) extrait par le kit
- 1 µL (0,2 mM) pour chaque amorce
- 9,5 µL de ddH₂O.

Pour le supermix de PCR il contient :

- La Taq polymérase
- Le buffer 10x
- Le Mgcl2
- Les dNTPs

Le mélange final du super mix contient 12,5 μL pour un tube de PCR de 25 μL . Pour l'ADN extrait par NaOH, on a ajouté 5 μL d'ADN et 5,5 μL de ddH₂O, et pour le supermix, on a ajouté 12,5 μL et 1 μL pour chaque amorce. Après la préparation du mélange PCR, nos échantillons sont placés dans le thermocycleur pour l'amplification, le cycle commence par une dénaturation initiale pendant 5 minutes à 94 °C, suivie de 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes et une hybridation à 51 °C pendant 30 secondes et l'élongation à 72°C pendant 30 secondes. Enfin, une élongation finale est réalisée à 72°C pendant 5 minutes.

2.2 PCR : Marqueur ADNr 18s et 16s (Amorces spécifique)**2.2.1 La préparation des amorces lyophilisées**

Nous avons commandé des amorces spécifiques fabriquées en laboratoire d'un état lyophilisé pour des gènes 18s rDNA et de 16s, rDNA chaque tube d'amorce a une quantité de 20 nmol. La première étape est d'ajouter 200 μL de l'eau moléculaire aux tubes des amorces lyophilisées. Ensuite, nous centrifugeons les solutions pour éliminer tout résidu afin de bien mélanger. Ainsi, le stock de 100 μM est prêt pour l'utilisation. Pour utiliser les amorces en PCR, il faut diluer le stock 10 x fois par l'eau pour obtenir une solution d'amorce à 10 μM .

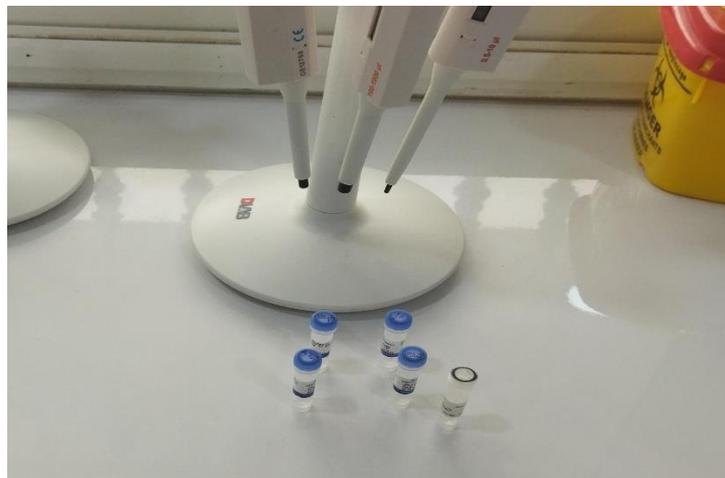


Figure 22: Les paires d'amorces à l'état lyophilisées des 16s rDNA et 18s rDNA

(Photo originale, 2023)

2.2.2 PCR : Marqueur 18s

La réaction PCR par les amorces spécifiques du gène de 18s rDNA (18s Forward 1/Reverse 1) (Ivan F. Bendezu et al., 2005) : La PCR a été réalisée dans des tubes de PCR de 25 μ L pour chaque tube contient :

- 1 μ L d'ADN total (5ng) extrait par le kit
- 1 μ L/0,2 Mm pour chaque amorce
- 9,5 μ L de ddH₂O

On ajoute en plus 12,5 μ L de super mix de PCR qui contient :

- La Taq polymérase
- Le buffer 10x
- Le tampon Mgcl 2
- dNTPs

Le volume total de la solution de chaque tube PCR est de 24 μ L. Pour l'ADN extrait par NAOH, on a utilisé 5 μ L d'ADN et 5,5 μ L de ddH₂O. Après la préparation du mélange de PCR, on place les échantillons dans un thermocycleur pour les amplifier. Le cycle comprend une dénaturation initiale pendant 5 minutes à 94 °C, suivie de 40 cycles de dénaturation à 94 °C pendant 1 minute et une hybridation de 55 °C pendant 1 minute et une élongation à 72 °C pendant 2 minutes et une élongation finale à 72 °C pendant 5 minutes.



Figure 23: La préparation des mélanges des tubes PCR pour les amorces 18s (Photo originale, 2023)

2.2.3 PCR : Le marqueur 16S :

Les amorces spécifiques du 16s rDNA : La réaction PCR a été réalisée dans des tubes de 25 μ L contenant :

- 1 μ L d'ADN total du kit
- 1 μ L d'amorces d'une concentration de 0,2 mM chacune

- 9,5 μL de ddH₂O

On ajoute 12,5 μL de supermix de la PCR qui contient

- La Taq polymérase
- De buffer 10x
- Mgcl 2
- dNTPs

Le volume total de la solution de chaque tube PCR est 24 μL . Après on place les échantillons dans le thermocycleur pour démarrer les cycles de la réaction PCR qui comprend une dénaturation initiale pendant 5 minutes à 94 °C, suivie de 40 cycles de la dénaturation à 94 °C pendant 1 minute et une hybridation à 55 °C pendant 1 minute, et une élongation à 72 °C pendant 2 minutes et une élongation finale à 72 °C pendant 5 minutes.



Figure 23: La préparation des mélanges des tubes PCR pour les amorces 16s

(Photo originale, 2023)

3. L'électrophorèse

Le produit de la PCR amplifiée sera passé par une analyse d'électrophorèse pour la vérification de l'amplification des bandes d'ADN de notre produit PCR.

3.1 Le protocole

Les étapes de l'électrophorèse comprennent l'utilisation d'un tampon TAE et un gel d'agarose pour séparer les fragments d'ADN. Pour la préparation du gel, on ajoute 25 ml de tampon TAE au l'eau distillée pour obtenir une solution totale de 250 ml, après on prélève 50 ml de solution tampon et on ajoute 0,75 gramme d'agarose. La solution d'agarose est fondue aux micro-ondes pendant 2 à 3 minutes, puis agitée pour homogénéiser le mélange. On recouvre la solution d'agarose et laisser refroidir quelques minutes jusqu'à ce que le flacon puisse être touché par main. Pour la visualisation des bandes d'ADN amplifiée, on ajoute 3 μL de Gold View dans la solution, qui est ensuite versée dans un support transparent et on met la solution tampon TAE dans une cuve d'électrophorèse. Le marqueur de taille d'ADN est placé dans le premier puits et les

produits de PCR dans les autres puits pour vérifier la migration des fragments d'ADN amplifiés. L'électrophorèse est branchée par l'injecteur et la migration est déclenchée jusqu'à ce que les fragments d'ADN soient suffisamment séparés, et enfin, les résultats sont visualisés sous UV.

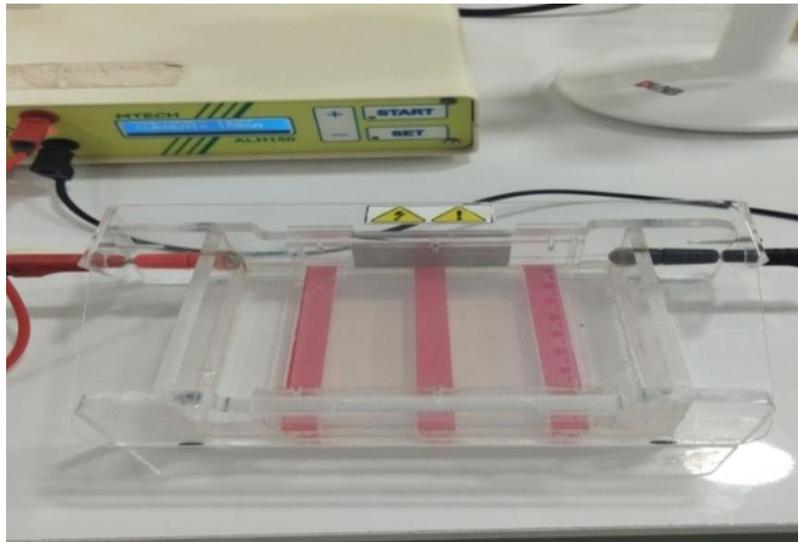


Figure 24: Migration d'ADN sur gel d'agarose
(Photo originale, 2023)

4. Préparation des mélanges de PCR et des tubes d'amorces pour le séquençage (Méthode de Sanger)

4.1 Produits PCR

On prépare quatre tubes, deux pour le gène 16S rDNA et deux pour le gène 18S rDNA. D'abord on va numéroter comme suit : 16S (14,15) et 18S (16,17), dans chaque tube, on ajoute 20 µl de produit PCR (concentration : 5 ng/µl). (**Geno Screen GUIDE D'USAGE**).

Tableau 3: Préparation du Produit PCR

Nom de l'échantillon	Nature de l'échantillon	Taille du produit	Volume (µL)
14	PCR	335 bp	20
15	PCR	335bp	20

16	PCR	195bp	20
17	PCR	195 bp	20

4.2 Préparation des amorces

Pour les tubes des amorces, il faut préparer un volume d'amorce au moins de 10 µl avec une concentration de 5 pmol/µL.

- Il faut confirmer l'absence de sites d'hybridation secondaires et pas de mismatches.
- La longueur de l'amorce doit être comprise entre 18 et 25 bases,
- Le pourcentage de GC doit être entre 40% et 60%.
- La température (T_m) de fusion moléculaire entre 50°C et 60°C
- Pas d'épingles (hairpins) de plus de 3 bases
- L'amorce doit être dépourvue de sels et d'EDTA ou autres contaminants.
- Le volume minimal accepté est 1 µL pour chaque réaction de séquençage. (**Geno Screen GUIDE D'USAGE**).

Alors pour préparer la solution des amorces on a choisi un seul primer forward, on a ajouté 5 µl d'amorce forward de 18S rDNA et 16S rDNA pour chaque tube numéroté F16s : (A14, A15) et F18s : (A16, A17). Après, on ajoute 5 µl d'eau dans chaque tube numéroté. La solution pour le volume d'amorce devient 10 µL et cette quantité de 10 µL est une solution d'une quantité totale concentrée d'amorce qu'on peut utiliser pour plusieurs réactions de séquençage, alors, on a prélevé 5 µL de volume total pour chaque tube des quatre et on a envoyé les échantillons d'amorces pour le séquençage.

Tableau 4: Préparation des amorces

Amorce spécifique	Concentration (µM)	Volume (µL)
A14	5	5
A15	5	5
A16	5	5
A17	5	5

Chapitre 5 : Résultats et
Discussion

1. Les résultats de la visualisation d'amplification par électrophorèse

1.1 Le contrôle de la qualité d'ADN extrait sur gel d'agarose

Pour cette expérience nous avons évalué et testé la qualité et la concentration de notre ADN extrait de l'espèce *Mytilus galloprovincialis* par les deux protocoles, nous avons amplifié des fragments d'ADN par deux paires d'amorces universels du gène 18S rDNA (Bleu et Noir).

Les résultats de visualisation obtenus par électrophorèse sur gel d'agarose ont montré des amplifications d'environ 400 paires de bases pour les « primers » (les amorces) universels Bleu et environ 800 paires de bases pour les primers universels Noir. Dans les Puits 1 et 2 on a mis 5 μ l d'ADN extrait par NaOH, tandis que dans les puits 3 et 4 on a utilisé 1 μ l d'ADN extrait par le kit commercial. Cette expérience à confirmer que les deux méthodes d'extraction d'ADN qui ont été réalisées sont réussites et elles ont donné des résultats positifs pour l'amplification de l'ADN de *Mytilus galloprovincialis* avec ces amorces universels des eucaryotes. Cette expérience et juste un essai pour l'évaluation de la qualité de notre ADN extraite, dans l'avenir, on doit faire des expériences nécessaires avec d'autres amplification d'ADN par des amorces spécifiques pour l'objet de l'identification moléculaire et vérification la spécificité des amorces pour notre espèce.

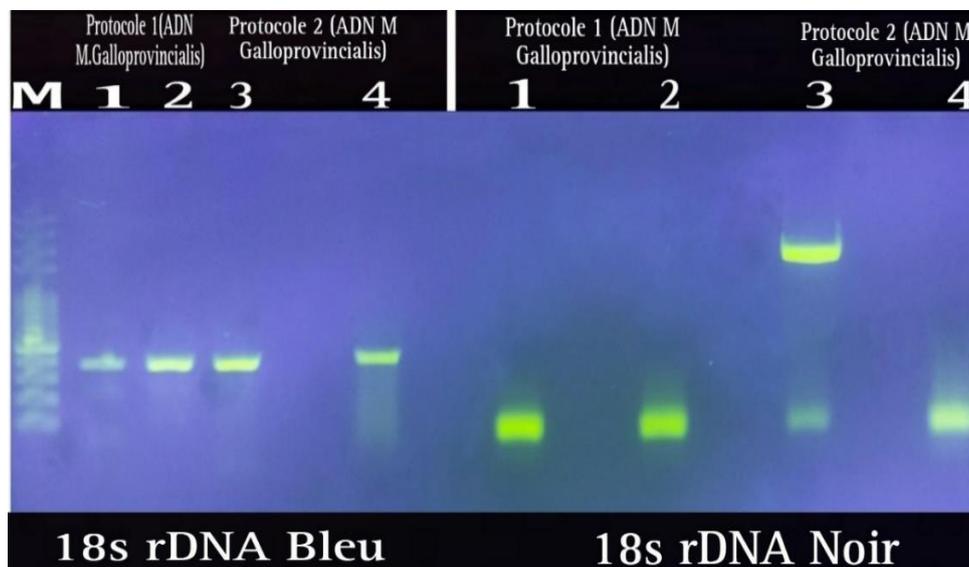


Figure 25: visualisation des bandes de fragments d'ADN du gène 18S rDNA par électrophorèse sur gel d'agarose sous UV à l'aide de deux amorces

(Photo Originale 2023)

1.2 Les résultats d'amplification du gène 18S rDNA avec des amorces spécifiques

Les résultats de l'amplification partielle de gène 18s rDNA avec des amorces spécifiques, a montré des amplifications des bandes de fragment de taille 195 paires de bases, cela

signifie que la réaction d'amplification PCR est réussite et spécifique, les fragments d'ADN ciblés ont migré dans le gel d'agarose à 0,75 % et ont été visualisés sous UV après la coloration avec GoldView. Ces résultats montrent que les amorces fixent efficacement la région cible du gène 18s rDNA

Les puits 1 et 2 de la cuve d'électrophorèse contiennent de l'ADN concentré extrait par le kit (1 μ L), tandis que les puits 3 et 4 contiennent de l'ADN extrait à l'aide de NaOH (5

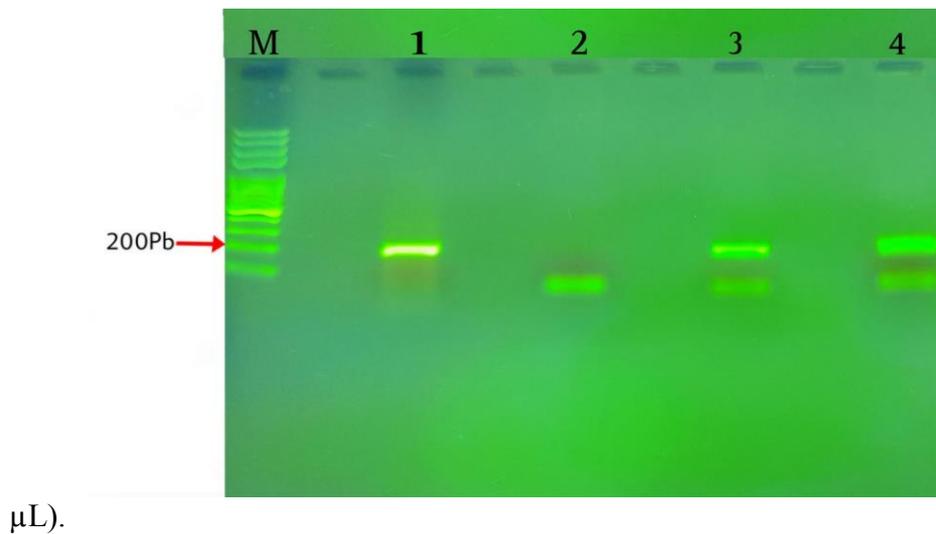


Figure 26: la visualisation des bandes de fragment amplifié du gène 18S rDNA par électrophorèse sur gel d'agarose

(Photo Originale 2023)

1.3 Les résultats d'amplification du gène 16S rDNA avec des amorces spécifiques

Les résultats de l'amplification partielle de gène 16s rDNA chez *Mytilus galloprovincialis* avec des amorces spécifiques a montré des amplifications des bandes de fragment de taille de 335 paires de bases, les séquences de gène amplifiées ont été analysées par l'utilisation de gel d'agarose à 0.75% et visualisées par UV après la coloration de gold view. Cela signifie que les résultats d'amplification est réussi et la taille du fragment correspond à la taille attendue du gène cible. Ces résultats indiquent que l'amorce spécifique a bien ciblé le fragment de gène d'intérêt pour notre espèce.

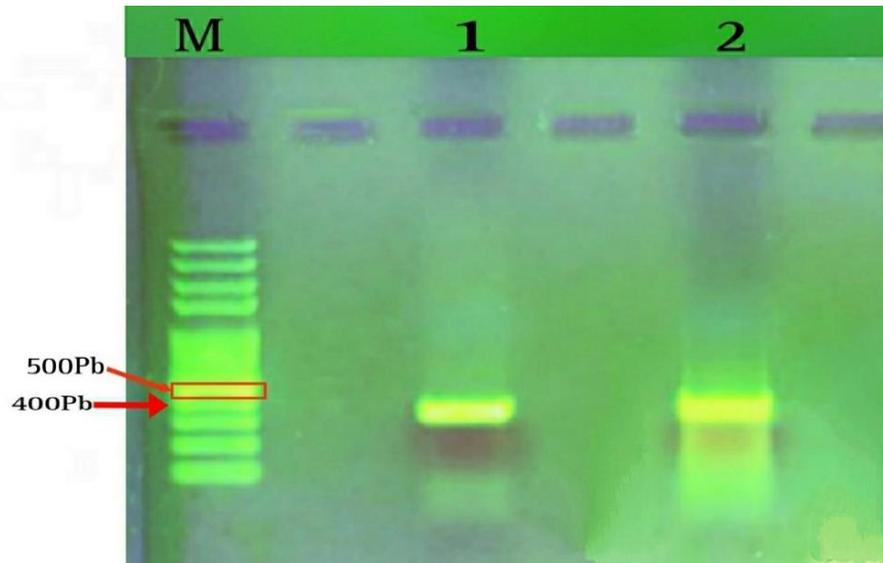


Figure 27: la visualisation des bandes de fragment amplifié du gène 16S rDNA par électrophorèse sur gel d'agarose

(Photo Originale 2023)

2. L'identification moléculaire de Mollusque Bivalves *Mytilus galloprovincialis* par le séquençage partielle des gènes 18s rDNA et 16s rDNA

2.1 La correction des séquences

On peut transformer Les fichiers de produits de séquençage (A14.A15.A16.A17) sur plusieurs logiciels tel que 4Peak et DNA Baser assembler pour effectuer la vérification de la qualité des séquences et corriger les nucléotides besoin. On a utilisé le logiciel *GENEIOUS PRIME* pour examiner les chromatogrammes et la qualité des séquences obtenus.

- Le document AB1 14 présente une qualité élevée de 87,5%
- Le document AB1 15 présente une qualité élevée de 89,5%
- Le document AB1 16 présente une qualité faible de 15,5%
- Le document AB1 17 présente une bonne qualité de 64,1%

Alors cela signifié que les trois séquences (AB1 14.15.17) sont qualifiées pour l'analyse phylogénétique et pour l'identification par contre la séquence AB1 16 présente une qualité faible et elle doit être éliminée de l'analyse.

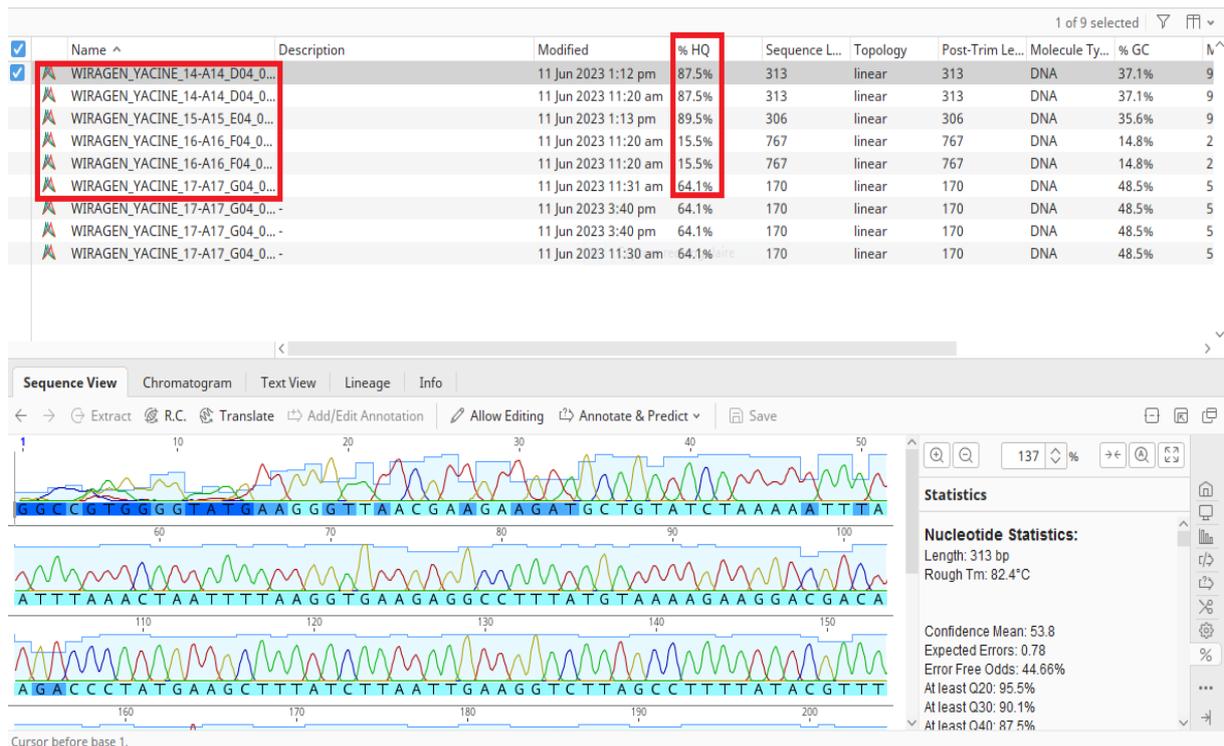


Figure 28: La vérification de la qualité des séquences obtenues par la méthode Sanger (Photo Originale 2023)

2.2 Identification moléculaire de genre d'espèce par la séquence partielle du gène 18s rDNA

Après la correction et la vérification des séquences on a soumis notre séquence partielle de 18s rDNA au tableau de recherche de NCBI BLAST et on a obtenus une liste d'identification des espèces *Mytilus* (*Mytilus spp*) notamment *Mytilus edulis*, *galloprovincialis*, *chilensis*, *trossulus*, avec un pourcentage d'identification d'environ 98,62 % pour toutes les espèces de genre *Mytilus*, cela signifie que notre séquence partielle de 18s a permis d'identifier le genre mais pas l'espèce, alors notre espèce appartient au genre *Mytilus*.

Par la suite on a construit un arbre phylogénétique basé sur l’alignement des séquences pour visualiser les relations évolutives entre ces espèces de bivalves, l’arbre phylogénétique se divise en trois groupes :

- Le premier groupe regroupe spécifiquement les espèces de la moule de la famille Mytilidae, genre *Mytilus* ce groupe est distinct des autres familles de bivalves étudiées.
- Le deuxième groupe est constitué par les espèces de *Pecten maximus* de la famille Pectinidae qui ils sont proche génétiquement.
- Le troisième Groupe regroupe les espèces de *Crassostrea gigas* de la famille Ostreidae, qu’ils sont étroitement regroupés et proche avec le cluster de la famille de Pectinidae par rapport au Mytilidae et partage un ancêtre commun.

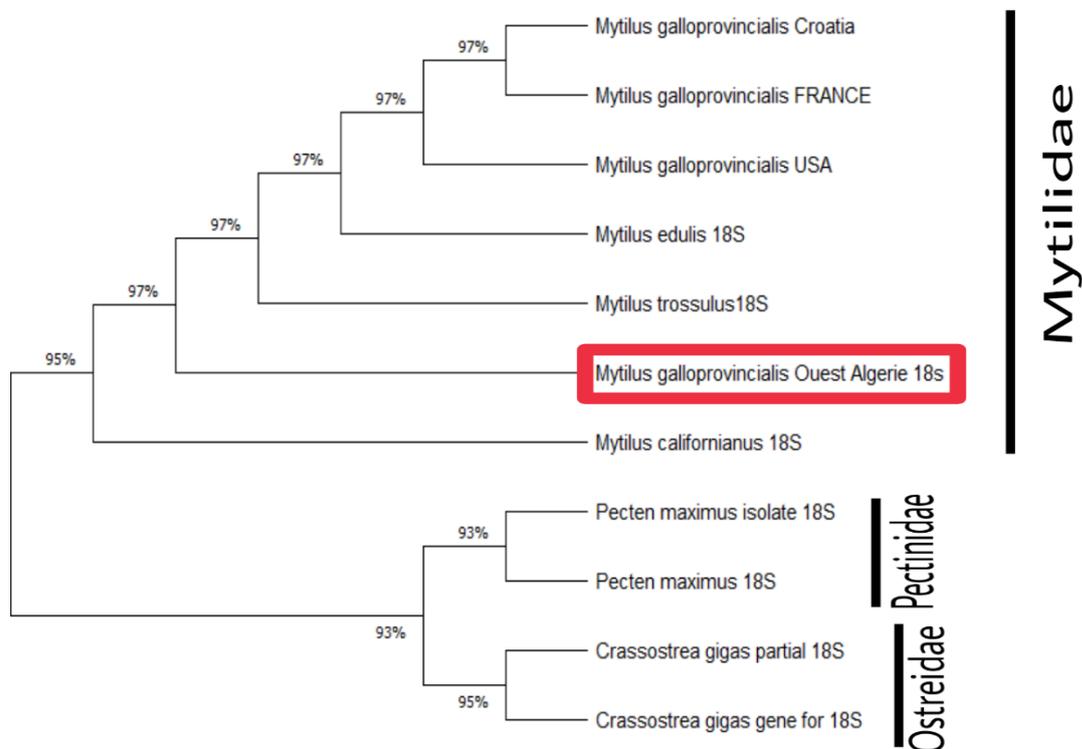


Figure 31: L'arbre phylogénétique généré par la méthode de (Maximum Likelihood) basée sur le fragment de gène 18s rDNA

(Photo Originale 2023)

2.3 L'identification moléculaire d'espèce *Mytilus galloprovincialis* par la séquence partielle du gène 16s rDNA

Pour confirmer l'identification de notre espèce nous avons soumis la séquence partielle de gène 16s rDNA au tableau de recherche sur l'outil BLAST NCBI, nous avons obtenus des résultats de similarité jusqu'à 99,65 % avec l'espèce *Mytilus galloprovincialis* à l'aide de la

base des données, cela signifie que le fragment de 16s rDNA étudié a permis d'identifier spécifiquement l'espèce *Mytilus galloprovincialis*.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Mytilus galloprovincialis isolate YQ42 (M) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Mytilus gallopro...	514	514	97%	4e-141	99.65%	424	KC835249.1
Mytilus galloprovincialis isolate G-Sp7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Mytilus gallopro...	503	503	97%	9e-138	98.94%	362	AF023569.1
Mytilus galloprovincialis isolate G-Fr6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Mytilus gallopro...	503	503	97%	9e-138	98.94%	398	AF023562.1
Mytilus galloprovincialis isolate G-Fr3(m) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Mytilus gallopro...	503	503	97%	9e-138	98.94%	398	AF023569.1
Mytilus galloprovincialis isolate G-Fr3(m) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Mytilus gallopro...	503	503	97%	9e-138	98.94%	415	AF023557.1
Mytilus galloprovincialis isolate G-Fr1(m) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Mytilus gallopro...	503	503	97%	9e-138	98.94%	414	AF023553.1
Mytilus galloprovincialis isolate FK9 (M) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Mytilus gallopro...	497	497	97%	4e-136	98.58%	424	KC835231.1
Mytilus galloprovincialis isolate FK70 (M) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Mytilus gallopro...	497	497	97%	4e-136	98.58%	424	KC835229.1
Mytilus galloprovincialis isolate FK47 (M) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Mytilus gallopro...	497	497	97%	4e-136	98.58%	424	KC835227.1
Mytilus galloprovincialis isolate ORI27 haplotype M mitochondrial, complete genome	Mytilus gallopro...	497	497	97%	4e-136	98.58%	16639	FJ890850.1
Mytilus galloprovincialis isolate G-Sp8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Mytilus gallopro...	497	497	97%	4e-136	98.58%	403	AF023570.1
Mytilus galloprovincialis isolate G-Fr5(m) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Mytilus gallopro...	497	497	97%	4e-136	98.58%	388	AF023561.1
Mytilus galloprovincialis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Mytilus gallopro...	492	492	97%	2e-134	98.23%	484	KY272990.1
Mytilus galloprovincialis isolate YO51 (M) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	Mytilus gallopro...	492	492	97%	2e-134	98.23%	424	KC835251.1

Figure 32: l'identification d'espèces *Mytilus galloprovincialis* par BLAST NCBI

(Photo Originale 2023)

Par la suite, en utilisant le logiciel MEGA X pour l'alignement de séquence de 16s rDNA d'espèce *Mytilus galloprovincialis* avec d'autres espèces *Mytilus galloprovincialis* provenant de la zone méditerranéenne Sud (Le Maroc, La Tunisie) et la zone méditerranéenne nord (l'Espagne) ainsi que des séquences de *Mytilus galloprovincialis* atlantique hybride avec *Mytilus edulis*, ces séquences nous les avons pris à partir de numéros d'accèsion de l'étude (Lourenco et al., 2015).

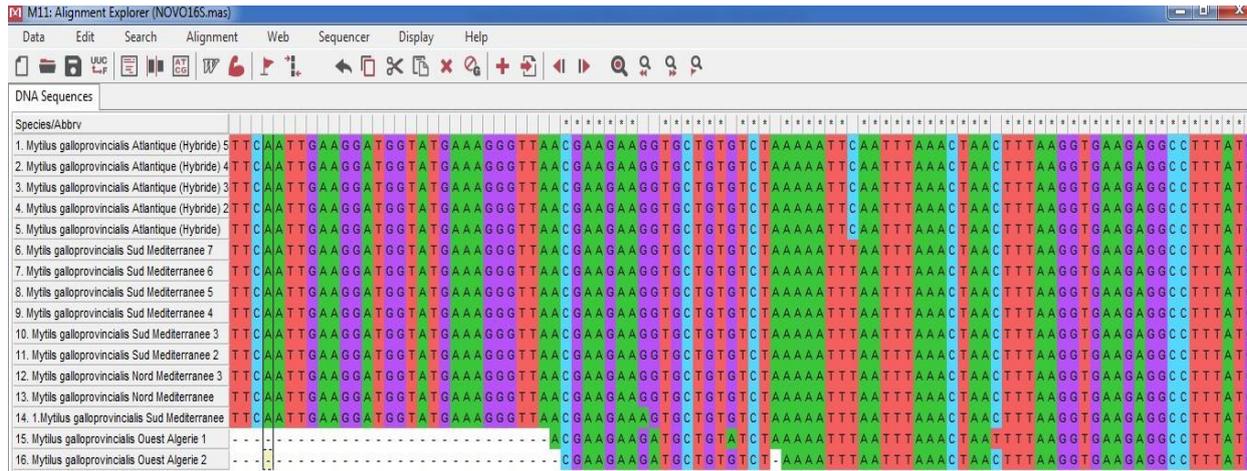


Figure 33: l’alignement des séquences partielles de gène 16s rDNA par le logiciel

(Photo Originale 2023)

Après on a construire un arbre phylogénétique à l’aide de logiciel MEGA X basé sur l’alignement de notre séquence étudiée de 16s rDNA et les autres séquences pour évaluer la diversité génétique des espèces de *Mytilus galloprovincialis* de l’hémisphère Sud et l’hémisphère Nord et connaître la position de notre échantillon étudié parmi eux.

Les résultats de notre analyse phylogénétique ont montré que notre séquence d'espèce *Mytilus galloprovincialis* forme un groupe indépendant et séparé d'autres groupes d'espèces *Mytilus galloprovincialis* des différentes zones comprenant surtout les espèces de l'hémisphère Sud (Le Maroc, La Tunisie).

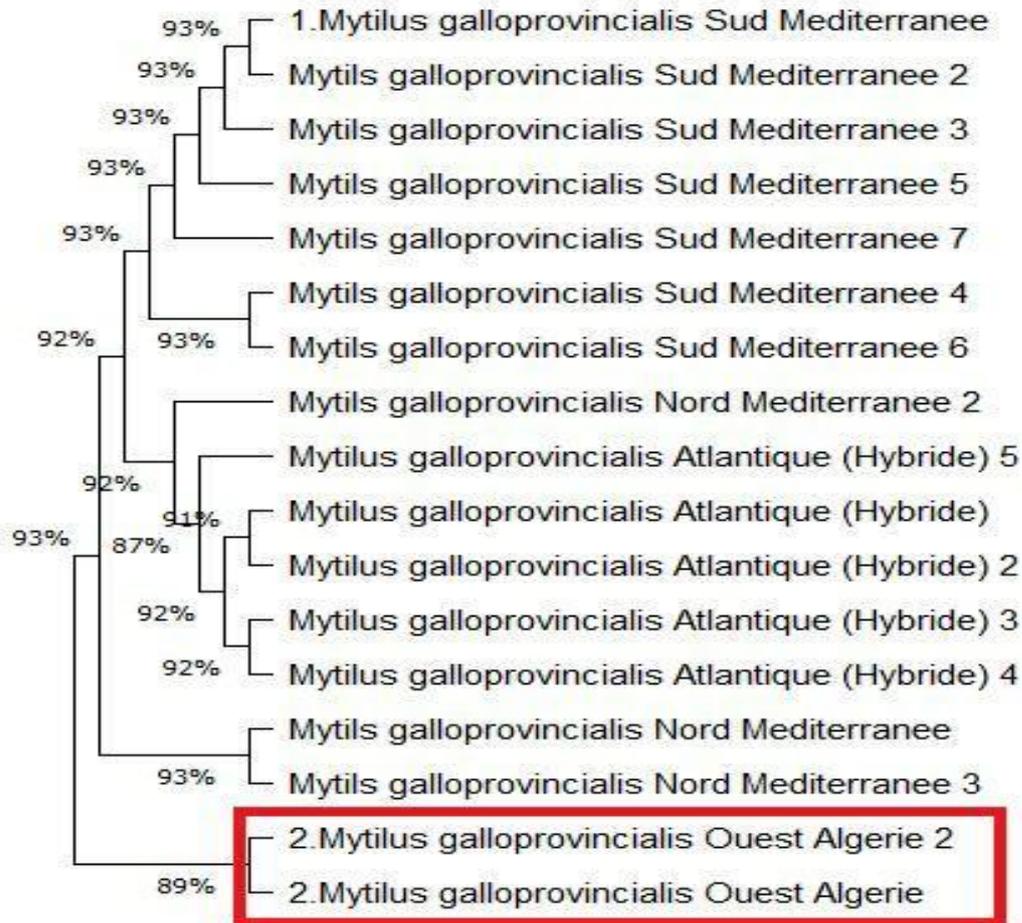


Figure 34: Arbre phylogénétique généré par la méthode de (Maximum Likelihood) basé sur le fragment de gène 16s rDNA a l'aide de logiciel MEGA

(Photo Original 2023)

Après on a réalisé une analyse de la distance génétique entre les séquences des espèces avec le logiciel *GENEIOUS PRIME* et on a déterminé que les échantillons de *Mytilus galloprovincialis* les plus proche de nos espèces étudiées étaient ceux de la zone méditerranéenne Nord (Espagne) par rapport aux autres espèces de *Mytilus galloprovincialis* atlantiques et Sud méditerranéennes, cela signifie qu'il existe une relation étroite entre les espèces d'Espagne et notre espèce prélevée dans la baie d'Oran.

| Mytilus gall... |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 0.005 | 0.003 | 0.006 | 0.003 | 0.006 | 0.003 | 0.020 | 0.017 | 0.015 | 0.012 | 0.015 | 0.015 | 0.009 | 0.134 | 0.077 | |
| | 0.003 | 0.006 | 0.003 | 0.006 | 0.003 | 0.020 | 0.017 | 0.015 | 0.012 | 0.015 | 0.015 | 0.009 | 0.135 | 0.077 | |
| 0.003 | | 0.003 | 0.000 | 0.003 | 0.000 | 0.017 | 0.014 | 0.012 | 0.009 | 0.012 | 0.012 | 0.006 | 0.132 | 0.074 | |
| 0.006 | 0.003 | | 0.003 | 0.000 | 0.003 | 0.020 | 0.017 | 0.015 | 0.012 | 0.015 | 0.013 | 0.007 | 0.133 | 0.075 | |
| 0.003 | 0.000 | 0.003 | | 0.003 | 0.000 | 0.017 | 0.014 | 0.012 | 0.009 | 0.012 | 0.012 | 0.006 | 0.132 | 0.074 | |
| 0.006 | 0.003 | 0.000 | 0.003 | | 0.003 | 0.020 | 0.017 | 0.015 | 0.012 | 0.015 | 0.013 | 0.007 | 0.133 | 0.075 | |
| 0.003 | 0.000 | 0.003 | 0.000 | 0.003 | | 0.017 | 0.014 | 0.012 | 0.009 | 0.012 | 0.012 | 0.006 | 0.132 | 0.074 | |
| 0.020 | 0.017 | 0.020 | 0.017 | 0.020 | 0.017 | | 0.003 | 0.012 | 0.009 | 0.014 | 0.029 | 0.023 | 0.149 | 0.091 | |
| 0.017 | 0.014 | 0.017 | 0.014 | 0.017 | 0.014 | 0.003 | | 0.009 | 0.006 | 0.011 | 0.026 | 0.020 | 0.146 | 0.088 | |
| 0.015 | 0.012 | 0.015 | 0.012 | 0.015 | 0.012 | 0.012 | 0.009 | | 0.003 | 0.009 | 0.024 | 0.018 | 0.144 | 0.086 | |
| 0.012 | 0.009 | 0.012 | 0.009 | 0.012 | 0.009 | 0.009 | 0.006 | 0.003 | | 0.006 | 0.021 | 0.015 | 0.141 | 0.083 | |
| 0.015 | 0.012 | 0.015 | 0.012 | 0.015 | 0.012 | 0.014 | 0.011 | 0.009 | 0.006 | | 0.024 | 0.018 | 0.144 | 0.086 | |
| 0.015 | 0.012 | 0.013 | 0.012 | 0.013 | 0.012 | 0.029 | 0.026 | 0.024 | 0.021 | 0.024 | | 0.007 | 0.130 | 0.072 | |
| 0.009 | 0.006 | 0.007 | 0.006 | 0.007 | 0.006 | 0.023 | 0.020 | 0.018 | 0.015 | 0.018 | 0.007 | | 0.127 | 0.070 | |
| 0.135 | 0.132 | 0.133 | 0.132 | 0.133 | 0.132 | 0.149 | 0.146 | 0.144 | 0.141 | 0.144 | 0.130 | 0.127 | | 0.058 | |
| 0.077 | 0.074 | 0.075 | 0.074 | 0.075 | 0.074 | 0.091 | 0.088 | 0.086 | 0.083 | 0.086 | 0.072 | 0.070 | 0.058 | | |

**Figure 35: la distance génétique entre les espèces de *Mytilus galloprovincialis* (Le logiciel GENEIOUS PRIME)
(Photo Original 2023)**

Avec ces résultats on peut faire des observations suivantes

- Notre espèce forme un groupe indépendant, cela signifie qu’il est génétiquement éloigné aux autres espèces de *Mytilus galloprovincialis* .
- Les échantillons de *Mytilus galloprovincialis* du Nord méditerranéen d’Espagne est la plus proche de notre espèce étudiée par-rapport aux autres espèces au niveau d’analyse de la distance génétique.

Ces résultats de diversité génétique peuvent être interprétés comme une indication de l'hybridation de la moule méditerranéenne dans la côte Oranaise due aux différents facteurs tel que les conditions environnementales et les fractures géographique.

3. Discussion

La Méditerranée est une mer presque fermée, bordée par le détroit de Gibraltar dans l’Ouest et par le détroit siculo Tunisien dans l’Est, qui agit comme une barrière génétique à diverses espèces, dans l’Ouest les eaux Atlantique pénètrent dans la mer d’Alboran par le détroit de Gibraltar , cette mer relie les eaux Atlantiques et Méditerranéennes et elle crée un mouvement d’eaux et des courants et des gyres anticycloniques de l’Ouest du Front d’Almeria-Oran (des gyres occidentaux), et un courant unidirectionnel Nord-Sud à l’Est du AOF. De plus, une partie du flux des gyres orientaux d’Alboran est piégée au niveau de l’AOF pour contribuer au courant Algérien qui se dirige vers l’Est d’Oran le long de la côte algérienne.

Le front d’Almeria-Oran présente un point chaud de différenciation génétique pour plusieurs espèces, il se situe à environ 400 kilomètres à l’est de Gibraltar, ce front désigne le point de

fusion de la Méditerranée avec l'océan Atlantique. Il représente une frontière instable (Tahani El Ayari 2015).

3.1 Comparaison des résultats

Dans cette étude (Tahani El Ayari 2015) ont utilisé des marqueurs génétiques pour étudier la structure génétique d'espèces *Mytilus galloprovincialis* distribués sur le littoral Algérien et espagnol, l'analyse des échantillons Algériens montre une large zone côtière hybride d'environ 600 Km à Oran, caractérisée par la présence de deux lignées génétiques différentes, cela signifie la présence de l'isolement reproducteur dans cette zone qui permet de maintenir la diversité génétique.

Cette zone hybride se termine par un changement génétique au niveau du golfe de Béjaïa (Barrière du golfe de Béjaïa, GBB) qui est considérée comme une barrière à la dispersion, les réalisateurs de cette étude proposent deux zones de tension l'une située au front Almeria-Oran au Nord et l'autre au golfe de Béjaïa au Sud. Ces zones ont un rôle de différenciation des lignées génétiques dans cette zone hybride mosaïque, les chercheurs ont proposé aussi un flux de gènes unidirectionnel du Nord vers le Sud aurait pu être responsable de la persistance de la lignée méditerranéenne dans la région Sud et généré la structure génétique mosaïque actuelle des moules.

En fin les fractures essentielles qui sont responsables de cette mosaïque génétique chez les espèces *Mytilus galloprovincialis* dans cette partie de littoral algérien sont :

- Le Front d'Almeria-Oran (AOF) et Barrière du golfe de Béjaïa, GBB)
- Les gyres anticyclonique occidentaux et orientaux
- L'isolement reproductif

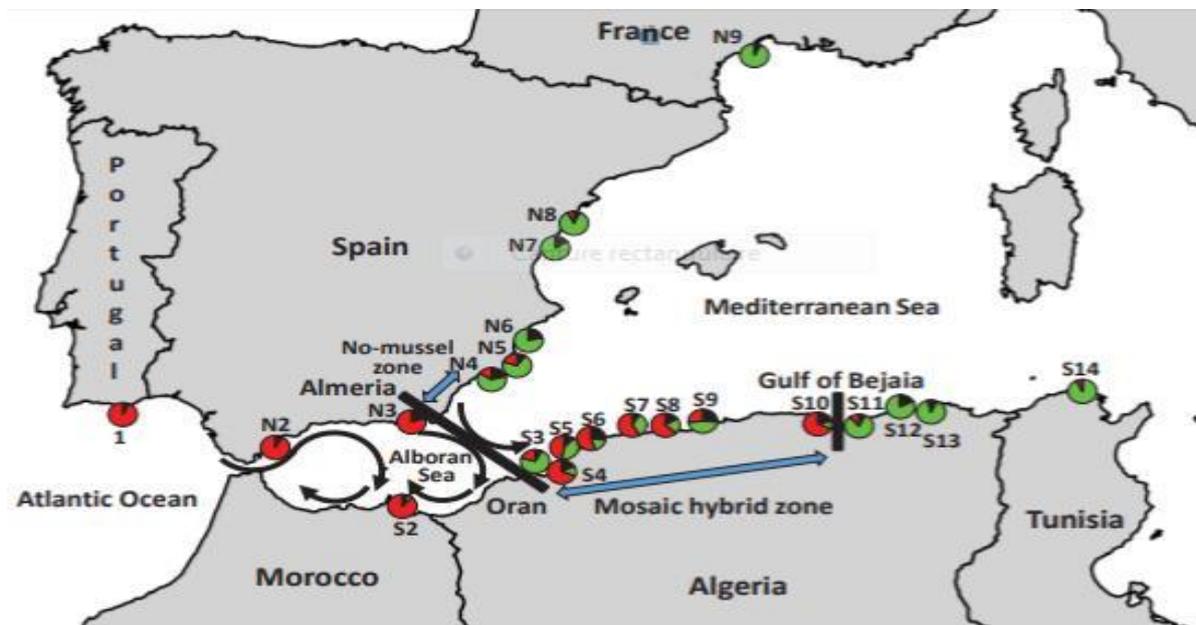


Figure 36: Distribution des Souches génétique de l'espèce *Mytilus galloprovincialis* dans l'Est atlantique et la Méditerranée (Vert : Souche méditerranéenne), (Rouge : Souche atlantique), (Noir : Souche Non attribuée)

(Tahani El Ayari 2015)

Tableau 5: Comparaison entre les deux travaux

L'étude	Les résultats
Tahani El Ayari, 2015	<ul style="list-style-type: none"> • Les échantillons S1-N2-1 représentent des souches atlantiques en majorité. • Les échantillons S3 jusqu'à S10 représentent des souches hybrides mosaïque. • Les échantillons S11 jusqu'à S14 représentent des souches atlantiques en majorités
La présente étude, 2023	<ul style="list-style-type: none"> • Des échantillons de <i>Mytilus galloprovincialis</i> prélevé à Oran représentent une diversité génétique et un « <i>Clade</i> » indépendant par apport aux échantillons des espèces ibériques, atlantiques et Sud méditerranéennes

CONCLUSION

L'identification des marqueurs moléculaires est une approche importante pour caractériser les mollusques bivalves notamment les moules, qui permet de les différencier et d'étudier le flux et la diversité génétique, les marqueurs moléculaires sont des séquences répétées ou des régions variables spécifiques dans l'ADN d'espèces.

Notre travail a été réalisé dans le but de l'identification moléculaire d'espèce *Mytilus galloprovincialis* par des marqueurs (Barcode ADN) de 18s rDNA et 16s rDNA, et d'évaluer la diversité de poêle génétique de cette espèce sur la côte oranaise et améliorer les données phylogénétiques des mollusques bivalves dans notre pays.

L'approche moléculaire, a une importance cruciale dans le domaine d'aquaculture et la biologie marine, elle permet de garantir la pureté du stock pour l'élevage.

On a prouvé la réussite d'extraction d'ADN d'un Mollusque bivalves par deux protocoles expérimentaux, par un kit alcalin d'NAOH et par un kit commercial des espèces marines et nous avons pu prouver par l'amplification partielle par PCR l'efficacité de notre marqueur choisir 16s rDNA qui permet d'identifier l'espèce de la moule méditerranéenne et aussi l'efficacité des amorces spécifiques choisies qui permettent de générer un fragment de taille d'environ 335 Pb.

Les techniques de séquençage et les outils bio-informatiques ces des innovations très importantes et efficaces pour les études biologiques et évolutives, par ces techniques nous avons réussi à identifier notre espèce ainsi que sa variabilité au sein de ces marqueurs moléculaires.

A travers nos résultats, nous avons obtenu une diversité génétique et une composition génétique complexe et unique au sein d'espèce *Mytilus galloprovincialis* qui prouve les caractéristiques physiques, géographiques et environnementales spécifiques de la région et leur impact sur la côte oranaise et la Méditerranée en général.

Les nouvelles données sont considérées comme des sources importantes, et donne une idée pour les futures études sur la diversité génétique et écologique des espèces Marines en Algérie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ababou, M. (2019).** Les Acides Nucléiques. Faculté des Sciences Rabat: Laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines p5.
- Abbott, R. Tucker (1974)** , American seashells Van Nostrand Reinhold, New York.
- Abdelkader, AmeerAmeer. (2016).** Génétique générale - Version reliée.Edition Al-jazair P12, 13, 16 et 21.
- Alberts, B. et al. (2014).** Molecular Biology of the Cell. Garland Science.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002).** Molecular Biology of the Cell (4th edition). Garland Science, New York.
- Asmus, R.M. et Asmus, H. (1991).**Mussel beds: limiting or promoting phytoplankton. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.
- Bachelot, M. (2010).** Contamination de moules (*Mytilus sp.*) en milieu marin par des substances pharmaceutiques et produits de soin.p 62 Thèse d'Université Montpellier 1.
- Banni, M., Negri, A., Mignone, F., Boussetta, H., Viarengo, A. &Dondero, F.(2011).** Gene expression rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.)across an annual cycle. PloS one, 6(5), e18904.
- Bayne, B. (1965).** Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). Ophelia, 2(1), 1–47.
- Bayne, B. L., & Hawkins, A. J. (1997).** Protein metabolism, the costs of growth, and genomic heterozygosity: two hypotheses about the effects of heterozygosity on growth rate in bivalve molluscs. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 352(1350), 169-176.
- Bayne, B. L., Holland, D. L., Moore, M. N., Lowe, D. M. &Widdows, J. (1978).**Further studies on the effects of stress in the adult on the eggs of *Mytilus edulis*.Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 58(04),825.
- BenamarNerdjess (2011).** Etude de la biologie, de l'exploitation et de la contamination par les métaux lourds (cadmium, plomb et zinc) d'un poisson osseux : la sardinelle ronde *Sardinella aurita* (Valenciennes, 1847) pêchée dans la baie d'Oran. Thèse de Doctorat, Université d'Oran Es-Sénia, Algérie. P 20 ,23
- Bendezu, I. F., Slater, J. W., & Carney, B. F. (2005).** Identification of *Mytilus spp.* and *Pecten maximus* in Irish Waters by Standard PCR of the 18S rDNA Gene and Multiplex PCR of the 16S rDNA Gene. Marine Biotechnology,p 687,695.
- Benouareth, D. (2019).** Impact de la pollution pétrolière sur la faune marine: cas du littoral algérien. Mémoire de Master, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Alger, Algérie.
- Boromthanasat, W., 1986.** Ecophysiologie de *Mytilus edulis* L. dans le bassin de Marennes-Olérons : alimentation et bilan d'énergie. Thèse, Univ. Nantes. P 10 .Bos, 2005,
- Bouallegui, Younes& Ben younes, Ridha&Hermi, Fatma&Oueslati, Mohamed. (2014).** Marine organisms immunity: PracticalTasksHandbook 2. P 5.
- Boudouresque, C. F. (2016).** Écosystèmes marins et littoraux de Méditerranée: caractéristiques, fonctionnement, menaces et perspectives. Editions Quae.
- Brown, T.A. (2017).** Genomes 4. Garland Science.

- Cahen, D. (2006).** Dossier didactique, Moules natures, Muséum des Sciences naturelles 13.14 p.
- Campos-Candela, C. A., Martínez-Pita, I., Sánchez-Alcázar, J. A., García-Gómez, J. C., & García-García, B. (2017).** Nervous system of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 97(1), 129-139.
- Carriker, M. (1961).** Interrelation of functional morphology, behaviour, and autecology in early stages of the bivalve *Mercenari mercenaria*. J Elisha Mitchell SciSoc, 77, 168–241.
- Coan, Eugene V.; Valentich-Scott, Paul (2007)** The Light and Smith Manual: Intertidal Invertebrates from Central California to Oregon, University of California Press, Berkeley CA. Pp. 807-859
- Coan, Eugene V.; Valentich-Scott, Paul; Bernard, Frank R. (2000)** Bivalve Seashells of Western North America Santa Barbara Museum of Natural history, Santa Barbara CA.
- Comesana AS, Posada D, Sanjuan A, 1998.** *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in northern Africa. J. Exp. Mar. Biol. Ecol, 223:271-283.
- Coughlan J., 1985** The circulatory system of bivalve molluscs. Journal of the Marine Biological Association of the UK,.
- David, D. C., & Savini, D. (2011).** Molecular approaches to bivalve population studies: A review. Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară, Tom XII, 1-7.
- Espineira, M., Gonzalez-Lavin, N., Vieites, J.M., & Santaclara, F.J. (2007).** Development of a Method for the Genetic Identification of Commercial Bivalve Species Based on Mitochondrial 18S rRNA Sequences. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(2), 495-502.
- Gosling EM, 1992.** Systematic and geographic distribution of *Mytilus*. In: Gosling EM, ed. The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 1-20.
- Gosling, E. (2021).** Marine Mussels: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Boca Raton, FL: CRC Press.p 43
- Gosling, E. e. (1992).** The mussel *Mytilus* : ecology, physiology, genetics and culture.
- Gray, A., Seed, R. & Richardson, C. (1997).** Reproduction and growth of *Mytilus edulis chilensis* from the Falkland Islands. Scientia Marina, 61(2), 39–48.
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN. (2006).** DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:968–971.
- Hartl, D.L. and Jones, E.W. (2005)** Essential genetics: A genomics perspective. 4th Edition, Jones & Bartlett Publishers, Burlington.p206
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003)** "Biological identifications through DNA barcodes." Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270(1512): 313-321.
- His, E. & Cantin, C. (1995).** Biologie et physiologie des coquillages
- Huang Y , Wang W , Ren Q . 2016** Two host microRNAs influence WSSV replication via STAT gene regulation[J]. Scientific Reports, , 6(1):23643.
- Hutchison, E.A., Robertson, L.S., Foster, G.D., & Lockwood, B.L. (2014).** Lipid metabolism in the adductor muscle of the blue mussel, *Mytilus edulis*: Effects of fasting and refeeding. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 172-173, 36-45.
- Jahangard S., Williams M., Mercer J., Ab Rahim E., Ingram B., 2010.** A technical report on hatchery production of blue mussel *Mytilus galloprovincialis* at the Victoria Shellfish (VSH), Queenscliff - 2008. Department of primary industries.

- Kalendar, R., Lee, D., Schulman, A. H. (2011).** FastPCR software for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Methods in Molecular Biology*, 764, 1-17
- Kallouche, M.E.M. (2013).** Evaluation de la qualité faunistique benthique médiolittoral de la zone côtière oranaise (littoral algérien occidental). Thèse de doctorat en sciences, Université d'Oran 1, p 208.
- Khandpur, R.S. (2019).** Thermocycler (PCR Machine). In *Compendium of Biomedical Instrumentation*, Volume 2, Chapter 366. Wiley Online Library.
- Kier, W.M., Mangum, C.P., & Carefoot, T.H. (2007).** The functional morphology of the adductor muscle scar in the bivalve, *Mytilus edulis*. *Journal of Morphology*, 268(3), 189-203.
- Laihi, A., & Hannachi, A. (2020).** DNA barcoding de *Sphingonotus rubescens* (Orthoptera: Acrididae) des régions de Biskra et Adrar, Algérie [Master's thesis, University of Mohamed Khider Biskra]. p 4.5.
- LAKAHAL, Farida et SALEM, Abdelaziz. 2016** Problématique de l'environnement marin : cas du littoral ouest algérien. Université d'Oran 2.
- Lamoril J, Ameziane N, Deybach JC, Bouizegarène P, Bogard M. 2008.** Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immunoanalyse & Biologie Spécialisée*. (5): 260-279.
- Le Gall, P. (1969).** Etude des moulières normandes : renouvellement, cycle, croissance. These, Université de Caen.
- Lemaire, N., Pellerin, J., Fournier, M., Girault, L., Tamigneaux, E., Cartier, S. & Pelletier, E. (2006).** Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *Mytilus spp.* from farm sites of eastern Quebec. *Aquaculture*, 261(2), 729–751.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L. S., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000).** *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman. P40.
- Lourenc, o, C. R., Nicastro, K. R., Serra, o, E. A., Castilho, R., & Zardi, G. I. (2015).** Behind the mask: cryptic genetic diversity of *Mytilus galloprovincialis* along southern European and northern African shores. *Journal of Molluscan Studies*, 81(3), 364-369.
- Lubet, P. (1959).** Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidae et les Pectinidae (Moll. Bivalves). *Revue des travaux de l'Office (scientifique et technologique) des Pêches maritimes*,
- Lubet, P. (1959).** Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidae et les Pectinidae (Moll. Bivalves). *Revue des travaux de l'Office (scientifique et technologique) des Pêches maritimes*,
- Lubet, P. (1973).** Exposé synoptique des données biologique sur la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819). *Synopsis FAO sur les pêches* p 212.
- Luchetta, P. (2018).** L'essentiel de biologie moléculaire. Maître de conférences à l'université de Cergy-Pontoise p7.
- Mahon, C.R., Lehman, D.C. (2022).** *Textbook of Diagnostic Microbiology - E-Book*. Elsevier Health Sciences. p232.
- Marga, A. (1885).** Géographie militaire: Première partie, généralités sur la France, tome II, France frontières maritimes, plateau central, statistique militaire, Algérie et colonies. Quatrième édition, revue et corrigée. Paris: Berger-Levrault et Cie, Libraires-éditeurs. P 213.
- Marteil, L. (1976).** La conchyliculture française, 2ème partie: Biologie de l'huître et de la moule. Éditions du CNRS. P317.
- McDonald JH, Koehn RK, 1988.** The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus trossulus* on the Pacific coast of North America. *Mar. Biol.*, 99:111-118.
- McDonald, J. H.; Seed, R.; Koehn, R. K. (1991)** Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the Northern and Southern Hemispheres., *Marine Biology* 111(3): 323-334

- Meddour-Sahar, O. (2017).** Pollution marine en Algérie: état des lieux, impacts et perspectives. *Revue des Energies Renouvelables*, 20(1), 119-128.
- Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S., & Sogin, M. L. (1988).** The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71(2).
- Millot, C., Taupier-Letage, I. (2005).** Circulation in the Mediterranean sea. *HdbEnvChem*, Vol. 5, Part K, 29-66.
- Moussard, C. (2005).** Biologie moléculaire. *Biochimie des communications cellulaires*. De Boeck p 5, 6.
- Moussard, C. (2020).** *Biochimie et biologie moléculaire (2e édition)*. DE BOECK
- Mühling, M., Woolven-Allen, J., Murrell, J. C., & Joint, I. (2008).** Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *The ISME Journal*, 2(4), 379-392.
- Mullis, K. B. (1994).** The polymerase chain reaction. Nobel lecture. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 29(10), 1179-1181.
- Murat, Pierre. (2010).** Utilisation de gabarits peptidiques pour le contrôle de l'auto-assemblage de dérivés de la Guanine : Des tétrades de guanines aux quadruplexes d'acides nucléiques.
- Pechenik, J.A. (2014).** *Biology of the Invertebrates (7th ed.)*. New York: McGraw-Hill Education.
- Pray, L. (2008)** Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. *Nature Education* 1(1):100.
- Ramasamy Santhanam. (2018).** *Biology and Ecology of Marine Life: Biology and Ecology of Edible Marine Bivalve Molluscs*. CRC Press. P102 103.
- Sang, T., & Crawford, D. J. (1995).** *Plant molecular systematics: introduction*. Chapman & Hall.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Santaclara, F.J., (2006)** Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:8463 p.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., & Fungal Barcoding Consortium. (2012).** Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.
- Sebastiana, M. (2022).** PCR and agarose gel electrophoresis [Laboratory classes]. Parade College.
- Seed, R. (1969).** The digestive system of *Mytilus edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 49(1), 1-15.
- Seed, R. (1969).** The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores - I. Breeding and settlement. *Oecologia*, 3(3-4), 277-316.
- Shumway, S. E. (1996).** A review of the physiology and ecology of *Mytilus edulis* in Atlantic Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(10), 2482-2498.
- SMAHI ZAKARIA (2019).** Étude de la dynamique côtière de l'ouest algérien par utilisation de la télédétection et des systèmes d'information géographiques. Thèse de doctorat en sciences de géographie et de l'aménagement du territoire, Université d'Oran 2, Faculté des Sciences de la Terre et de l'Univers. P20
- SMAHI ZAKARIA (2019).** Étude de la dynamique côtière de l'ouest algérien par utilisation de la télédétection et des systèmes d'information géographiques. Thèse de doctorat en sciences de géographie et de l'aménagement du territoire, Université d'Oran 2, Faculté des Sciences de la Terre et de l'Univers. P17

- SMAHI ZAKARIA (2019).** Étude de la dynamique côtière de l'ouest algérien par utilisation de la télédétection et des systèmes d'information géographiques. Thèse de doctorat en sciences de géographie et de l'aménagement du territoire, Université d'Oran 2, Faculté des Sciences de la Terre et de l'Univers V p 19.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*, 98(3), 503-517.
- SUEREZ, M. P., ALVAREZ, C., MOLIST, P. & JUAN, F. S. (2005).** Particular aspects of gonadal cycle and seasonal distribution of gametogenic stages of *Mytilus galloprovincialis* cultured in the estuary of vigo. *Journal of Shellfish Research*, 24(2), 531–540.
- Suza, W. & Lee, D. (2021).** PCR and Gel Electrophoresis. Dans Suza, W. & Lee, D. (Éds.), *Genetics, Agriculture and Biotechnology*.
- Thibaut Dumas 2020** Les approches –omiques, métabolomique et protéomique, pour l'étude de la relation de cause à effet entre contaminants émergents, produits pharmaceutiques et organismes marins, *Mytilus galloprovincialis*. Sciences agricoles. Université Montpellier, France.
- Ventura A., Schulz S., Dupont S., 2016.** Maintained larval growth in mussel larvae exposed to acidified under-saturated seawater. *Sci. Rep.*, 6 (1): 1-8, doi: 10.1038/srep23728
- Wang, L., Wang, S., Li, H., Chen, H., Li, Y., Liu, J., Liu, J. (2019).** Development of universal PCR amplification primers targeting the conservative region of HPT gene in *Fusarium*. *BMC Microbiology*, 19(1), 187.
- Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (1953).** Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Westfall, Kristen M.; Gardner, Jonathan P. A. (2010)** Genetic diversity of Southern hemisphere blue mussels (*Bivalvia: Mytilidae*) and the identification of non-indigenous taxa, *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 898-909
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. and Taylor, J.W. (1990)** Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York, 315-32.
- Wilson, W. J., Strout, C. L., DeSantis, T. Z., Stilwell, J. L., Carrano, A. V., & Andersen, G. L. (2002).** Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology. *Molecular and Cellular Probes*, 16(2), 119-1.

موجز

بلح البحر الأبيض المتوسط هو ثنائي الصدفتين يغزو ساحل البحر الأبيض المتوسط وخاصة في الساحل الجزائري، لهذا السبب فإنه يخضع للتهجين بأصناف بلح البحر الأخرى، ويختلف شكله من وسط إلى آخر حسب الخصائص البيئية والجغرافية، وأصبح التعرف المورفولوجي على أنواع بلح البحر أمرا صعبا، ولكن من خلال تطوير البيولوجيا الجزيئية وتقنيات التكنولوجيا الحيوية، أصبح تحديد الجزيئات والتميز بين الأنواع أسهل. *Mytilus* الهدف من عملنا هو استخدام العلامات الجزيئية والتعرف عليها من خلال توصيف تسلسلات الحمض النووي المحددة الموجودة في النوع في المنطقة الساحلية لخليج وهران، بعد ذلك، تم *Mytilus galloprovincialis* وتحديد اختلافها الجيني، جمعنا عيناتنا من *galloprovincialis* ومجموعة جينومية بحرية تجارية وقمنا باختبار وتقييم جودة NAOH إجراء استخراج الحمض النووي بواسطة اثنين من مجموعة كيت القلوية ، بعد أن ribosomal primers 18s بمساعدة اثنين من الجين electrophoresis وتصور PCR الحمض النووي المستخرج من خلال تضخيم والذهاب من خلال التصوير بالضوء rDNA 18 و rDNA قمنا بتضخيم تسلسل الحمض النووي الخاص بنا باستخدام برايمرات محددة من 16 الكهربائي والأشعة فوق البنفسجية، في النهاية، تم تحليل العينات المضخمة بواسطة طريقة تسلسل سانجر للحصول على تسلسلات عن طريق الملف ، بناء الأشجار الوراثية واكتشاف *Mytilus galloprovincialis* وباستخدام الأدوات المعلوماتية الحيوية التي حددناها للجنس والأنواع ، الخصوصية الجينية لهذا النوع في ساحل وهران.

غرب الجزائر، الكلمات الرئيسية: *Mytilus galloprovincialis*، DNA، PCR

Summary

Mediterranean mussels are bivalves invading the Mediterranean coast and especially in the Algerian coast, for this reason it is subject to hybridization with other mussel varieties, and its morphology differs from one medium to another according to environmental and geographical characteristics and morphological identification of mussel species has become difficult , but by the development of molecular biology and techniques of biotechnology, molecular identification and distinction of species has become easier. The objective of our work is to use molecular markers and identify it by characterizing the specific DNA sequences present in the species *Mytilus galloprovincialis* and to determine their genetic variation, we collected our samples from *Mytilus galloprovincialis* in the coastal area of Oran Bay, Subsequently, DNA extraction was performed by two NAOH alkaline Kit rotocols and a commercial marine genomic kit and we tested and evaluated the quality of our extracted DNA through PCR amplification and electrophoresis visualization with the assistance of two Gene ribosomal primers 18s, after we amplified our DNA sequence by using specific primers of 16 rDNA and 18s rDNA and going through electrophoresis and UV light visualization, at the end the amplified samples were analysed by the Sanger sequencing method to obtain sequences by file and using the bioinformatic tools we identified the genus and the species *Mytilus galloprovincialis*, build phylogenetic trees and detect the genetic specificity of this species in the Oran coast.

Key words: *Mytilus galloprovincialis*, DNA, PCR, West Algerian.

Résumé

les moules méditerranéennes sont des bivalves envahissant la côte méditerranéenne et notamment dans le littoral algérien, pour cette raison elle est sujette à l'hybridation avec d'autres variétés de moules, et sa morphologie diffère d'un milieu à l'autre selon les caractéristiques environnementales, géographiques et l'identification morphologiques des espèces de moules est devenu difficile, mais par le développement de la biologie moléculaire et les techniques de la biotechnologie, l'identification moléculaire et la distinction des espèces est devenu plus facile. L'objectif de notre travail est d'utiliser des marqueurs moléculaires et l'identifier par la caractérisation des séquences d'ADN spécifiques présent dans l'espèce *Mytilus galloprovincialis* et pour déterminer leur variation génétique, nous avons prélevé nos échantillons de *Mytilus galloprovincialis* a la zone côtière de la baie d'Oran, Par la suite, on a réalisé l'extraction de l'ADN par deux protocoles Kit alcaline d'NAOH et un kit génomique commercial d'espèces marines et nous avons tester et évaluer la qualité de notre ADN extrait par l'amplification PCR et la visualisation par l'électrophorèse avec l'aide deux Amorces du Gene ribosomal 18s, après on a amplifié notre séquence d'ADN par l'utilisation des amorces spécifiques de 16 rDNA et 18s rDNA et passant par l'électrophorèse et la visualisation par la lumière UV, en fin les échantillons amplifiés ont été analysés par la méthode de séquençage Sanger pour obtenir des séquences par fichier et a l'aide des outils bio-informatiques nous avons identifier le genre et l'espèce *Mytilus galloprovincialis*, construire des arbres phylogénétiques et détecter la spécificité génétique de ce espèce dans la côte oranais.

Mots clés : *Mytilus galloprovincialis*, ADN, PCR, Ouest algérien.