

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Abderrahmane Mira-Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-chimique

Filière : Sciences Biologiques

Option : Génétique Appliquée



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme de
MASTER

Thème

Suivi du Développement Embryonnaire et
Contribution à l'Etude Cytogénétique Comparative de
la Caille japonaise *Coturnix japonica* avec le Poulet
domestique *Gallus domesticus*

∞ **Présenté par :**

M^{elle} MESSAOUDI Samia et M^{elle} OUSSALAH Ahlem

∞ **Soutenu le : 16 Juin 2015**

∞ **Devant le jury composé de :**

Mr BASLI	MCA	Président
M ^{me} Y.BENMESSAOUD	MAA	Encadreuse
M ^{me} KEBBI	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2014 / 2015

Dédicace

Je dédie ce modeste travail ;

A mes chers parents ;

Quoique je fasse, je ne pourrai jamais vous rendre le 1 centième de ce que vous avez fait pour moi, je vous remercie pour tous les sacrifices que vous avez fait pour moi et pour vos encouragements ainsi pour l'amour et l'affection que vous m'avez toujours apportés.

A mes chers frères et sœurs ;

Sihem et son mari Youcef, Sofiane et sa fiancée Sabrina, Nesrine et son mari Toufik ainsi qu'à mon petit frère Didine et à mes adorables cailleaux Yani et Rayane.

A ma meilleure amie et sœur Nariméne qui a toujours été à mes côtés pendant des années et toujours à mon écoute ainsi que toute sa famille, du plus grand au plus petit.

Je cite également ma chère camarade Samia, merci pour ton soutien lors mes déplacements à Alger et pour les agréables moments que nous avons passés ensemble en réalisant ce travail.

A Mme Benmessaoud, Mme Debbeche, Mme Ouahmed, Mr Sahnoune, Mr Zouag Abd Lhamid (Mon enseignant au primaire).

A mes amis (es) : Samira, Kahina, Biba, Mouloud, Abd salem et Ilyes et à toute la promotion Génétique de l'année 2014-2015 Merci pour tous les moments agréables que nous avons passés pendant ces années, je cite en particulier notre délégué Jugurtha, merci pour tout Jugo.



Dédicace

Par la grâce de Dieu, je dédie ce travail à la mémoire :

A mes chers parents et ma famille qui ont du supporté mon absence et mes baisses de morale, je les remercie pour leur soutien tout au long de mes études. Je dédie ce travail à eux, pour leur amour, douceur et encouragements.

A mon grand père qui m'a toujours encouragé

A mes frères, merci pour tout

A mes sœurs, leurs maris et leurs enfants

A mon adorable neveu Youssef

A ma superbe amie et sœur Amina

A mon binôme Ahlem pour les moments de travail, de sérieux, de stress et de rigolade qu'on a partagé au cours de la réalisation de ce mémoire

A mes enseignants

A toutes mes amies, mes collègues et à toute la promotion Génétique appliquée 2014/2015

A tous ceux qui m'ont souhaité la réussite



Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons tout d'abord à exprimer nos remerciements les plus sincères à Dieu le tout puissant qui nous a donné la force, la patience, et la santé tout au long de ce travail.

Notre profonde gratitude va à notre promotrice, Mme Benmessaoud Y, d'avoir accepté de nous encadrer, pour ses conseils, ses orientations et sa gentillesse.

Nos sincères remerciements vont également à Mr Basli qui nous a honorés en acceptant d'être président de ce jury ; Mme Kebbi pour avoir accepté la charge d'être notre examinatrice.

Nous tenons aussi à remercier Mr Begdouche de nous avoir accueilli avec gentillesse dans son laboratoire, ainsi que toute l'équipe des laboratoires de Biologie animale et d'Ecologie.

Nos sincères remerciements vont également à tous nos enseignants et enseignantes, pour leurs conseils et leurs critiques constructives, qui nous ont permis d'évoluer tout au long de notre cursus. Ainsi que l'équipe du département BPC

Un grand merci va également à l'équipe de recherche au centre Cynégétique de Zéralda et à l'équipe de l'établissement ZIZI, plus particulièrement à Monsieur Saci Nassim.

Enfin, nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements les plus vifs vont également à tous ceux qui ont attribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Ahlem & Samia

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2n : nombre diploïde des chromosomes

ADN : Acide **D**ésoxyribo**N**ucléique

ADN mt: **ADN** mitochondrial

BAC: **B**acterial **A**rtificial **C**hromosome

BrdU : 5 **B**romo-2,-**d**éoxy **U**ridine

°**C** : degré Celsius

Cj : *Coturnix japonica*

Cm: centimètre

CO₂: dioxyde de carbone

E.S.O.C : **E**xtrait **S**tandardisé d'**Œ**ufs de **C**ailles

FISH: **F**luorescent ***I**n **S**itu* **H**ybridization

g : gramme

G x: **G**rossissement

GC : Paire de bases **G**uanine-**C**ytosine

GGA : *Gallus gallus domesticus*

GTG : Bandes **G** (**G**iemsa **T**rypsine **G**iemsa)

h : heure

HNF3β : **H**epatocyte **N**uclear **F**actor **3β**

Jrs : jours

Max : maximum

mM : milimole

μg : microgramme

μl: microlitre

min : minute

Min : minimum

ml : millilitre

mm : millimètre

N°: numéro

NaCl : Chlorure de sodium

NADH: Nicotinamide Adénine Déshydrogénase

O₂ : dioxygène

p: Bras court

pb : Paire de Base

PBS : Tampon Phosphate Salin

pH : potentiel Hydrogène

QTL : Quantitative Trait Loci

q : Bras long

RBG : Bandes R (**R**Reverse, **B**rdU, **G**iemsa)

rpm: Rotation Par Minute

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

S : Phase de Synthèse d'ADN

SVF: Sérum de Veau Fœtal

T°: Température en degré Celsius

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

- Figure 1** : Répartition de la caille japonaise *Coturnix japonica* dans le monde.....3
- Figure 2** : Caille japonaise, (a) adulte de sexe male (en capture), (b) Œuf pondu.....3
- Figure 3** : Couple de caille japonaise adulte, (a) Femelle, (b) Mâle.....4
- Figure 4** : Composition de l'œuf de caille (a) en acides aminés essentiels,
(b) en acides gras essentiels, (c) en vitamines et (d) en minéraux.....6
- Figure 5** : Organisation d'un œuf d'oiseau.....7
- Figure 6** : Segmentation et formation de la blastula chez l'embryon d'oiseau
(a) Vue polaire des premiers stades de segmentation de l'embryon d'oiseau
(Blastodisque, stades 2, 4, 8, 16, et 128 blastomères), (b) Jeune blastula (stade 32 à 64
cellules).....8
- Figure 7** : Formation de l'hypoblaste.....9
- Figure 8** : Coupe sagittale d'embryon de poulet âgé de 96 heures avec ses annexes embryonnaires...11
- Figure 9** : (a) Caryotype de caille japonaise femelle en coloration conventionnelle
(b) Spermatoctes en pachytènes avec les centromères marqués en jaune.
Les flèches indiquent les cinq microchromosomes qui sont acrocentriques.....12
- Figure 10**: (a) Les macrochromosomes 1-8 et ZW de la caille japonaise marqués en bandes GTG
(b) idiogramme de la caille japonaise.....13
- Figure 11** : Poule domestique *Gallus domesticus* de souche Isa brown.....13
- Figure 12** : Caryotype de la poule domestique (*Gallus domesticus*) en coloration conventionnelle
(a) :Mâle (Homogamétique), (b) :Femelle (Hétérogamétique).....14
- Figure 13**: Caryotypes de la poule domestique *Gallus domesticus*
(a): En bandes GTG (b): En bandes RBG.....14
- Figure 14** : Morphologie des chromosomes mitotiques chez les eucaryotes supérieurs.
(a):Principaux éléments du chromosome. (b): Micrographie électronique de
chromosomes mitotiques. (c): Différents types de chromosomes.....15

Figure 15 : Idiogramme standard des 8 premières paires chromosomiques et les chromosomes sexuels (Z et W) de la poule domestique <i>Gallus domesticus</i> : en bandes GTG, (b) en bandes RBG.....	17
Figure 16 : Arbre phylogénique de la caille japonaise et du poulet domestique construit à partir de deux gènes mitochondriaux le cytochrome b et le NADH.....	18
Figure 17 : Délétion chromosomique.....	20
Figure 18 : Duplication chromosomique.....	20
Figure 19 : Inversion chromosomique.....	21
Figure 20 : Translocation chromosomique.....	22

Chapitre II

Figure 21 : Œufs fécondés, (a) : Œufs de la caille japonaise (b): Œufs de la poule domestique...	23
Figure 22 : Position horizontale de l'œuf.....	24
Figure 23 : Œufs en incubation dans une étuve ventilée.....	24
Figure 24 : Méthode de retournement des œufs.....	25
Figure 25 : Mirage des œufs (a) :Mire-œufs artisanal (b) Mirage réalisé sur un œuf de poulet....	25
Figure 26 : Etapes d'ouverture de la fenêtre de l'œuf	26
Figure 27 : Etapes de fermeture de la fenêtre de l'œuf.....	27
Figure 28 : Observation d'un embryon de la caille japonaise par la technique <i>In vitro</i> (a) en milieu liquide (b) à sec.....	28
Figure 29 : Hôte à flux laminaire.....	29
Figure 30 : Dilacération des organes d'un embryon de caille japonaise âgé de 9 jours.....	29
Figure 31 : Mise en culture (a) : Etuve réglée à 41°C (b): boîtes de culture dans l'étuve.....	30
Figure 32 : Produits utilisés en coloration.....	33
Figure 33 : Etapes de la Technique de marquage en bandes GTG.....	34
Figure 34 : Observation des lames sous microscopes photonique.....	34

Chapitre III

Figure 35 : Embryon de caille japonaise <i>Coturnix japonica</i> âgé de 5 jours (Stade 27 HH) (a) selon Ainsworth <i>et al</i> (2010), (b) Originale.....	37
Figure 36 : Embryon de caille japonaise <i>Coturnix japonica</i> âgé de 7 jours (stade 32 HH) : (a) selon Ainsworth <i>et al</i> (2010), (b) Originale.....	37
Figure 37 : Embryon de caille japonaise <i>Coturnix japonica</i> âgé de 8 jours (Stade 35 HH) : (a) selon Ainsworth <i>et al</i> (2010), (b) Originale.....	38
Figure 38 : Embryon de caille japonaise <i>Coturnix japonica</i> âgé de 9 jours (Stade 36 HH): (a) selon Ainsworth <i>et al</i> (2010), (b) Originale.....	38
Figure 39 : Embryon de caille japonaise <i>Coturnix japonica</i> âgé de 10 jours (stade 38 HH): (a) selon Ainsworth <i>et al</i> (2010), (b) Originale.....	39
Figure 40 : Embryon de caille japonaise <i>Coturnix japonica</i> âgé de 12 jours, (a) selon Ainsworth <i>et al</i> (2010), (b) Originale.....	39
Figure 41 : Embryon de caille japonaise <i>Coturnix japonica</i> âgé de 14 jours (stade 43 HH): (a) selon Ainsworth <i>et al</i> (2010), (b) Originale.....	40
Figure 42 : Embryon de caille japonaise <i>Coturnix japonica</i> âgé de 15 jours (stade 44 HH): (a) selon Ainsworth <i>et al</i> (2010), (b) Originale.....	40
Figure 43 : Embryon de caille japonaise <i>Coturnix japonica</i> âgé de 17 jours (stade 46 HH): (a) selon Ainsworth <i>et al</i> (2010), (b) Originale.....	41
Figure 44 : Fixation des embryons de la caille japonaise <i>Coturnix japonica</i> à différents stades de développement (Originale).....	41
Figure 45 : Dilacération (a) d'un embryon âgé de 5 jours en entier (Bouillie cellulaire), (b) d'organes issus d'un embryon de poulet âgé de 9 jours (Originale).....	42
Figure 46 : Tapis de fibroblastes d'un embryon de caille japonaise observé au microscope inversé (GX10).....	43
Figure 47 : Métaphases de la caille japonaise <i>coturnix japonica</i> observées au microscope photonique (GX100)	

(a) : en coloration conventionnelle (b) : en bandes GTG (Originale).....	44
Figure 48 : Caryotype de la caille japonaise <i>coturnix japonica</i> (de sexe femelle) proposé en bandes morphologiques GTG (Originale).....	45
Figure 49 : Inversion péricentrique sur les chromosomes 1 et 2 de la caille japonaise, (a) inversion du clone BAC (P2-6) sur le chromosome, (b) inversion du clone BAC (107K17) sur le chromosome 2.....	48
Figure 50: Homologie morphologique entre les chromosomes 3 des deux espèces au cours de l'évolution.....	48
Figure 51 : (a) Hybridation complète du chromosome 4 du poulet sur le chromosome 4 de la caille japonaise (b) L'ordre des Clones BAC sur le chromosome 4 mitotique de la caille japonaise (CJA4) est identique à celui du poulet (GGA4) et aussi sur les chromosomes 4 en écouvillon (c).....	49
Figure 52: Carte cytogénétique comparative des chromosomes 5 et 6 entre la caille japonaise <i>Coturnix japonica</i> (à gauche) avec ceux du poulet domestique <i>Gallus domesticus</i> (à droite)	49
Figure 53 : Représentation de la possibilité de formation du chromosome 7 chez la caille japonaise (à gauche) et le poulet domestique (à droite).....	50
Figure 54 : Eventuels réarrangements chromosomiques ayant probablement survenus sur les chromosomes 8 de la caille japonaise et du poulet.....	51
Figure 55 : Comparaison des idiogrammes en bandes GTG des chromosomes sexuels Z de la caille japonaise et de la poule domestique. Cartographie de (A) quatre gènes fonctionnels (PRLR, GHR, ALDOS et MUSK) du poulet conservés dans le même ordre chez la caille japonaise (B) de deux clones BAC	52
Figure 56 : Inversion ayant probablement survenue sur le chromosome W de la caille japonaise conduisant à la forme acrocentrique de ce dernier.....	52
Figure 57 : Illustration schématique du caryotype aviaire ancestral et ses orthologues du poulet. La seule différence étant le chromosome 4 du poulet, qui est représenté par les chromosomes ancestraux 4 et 10.....	53
Figure 58 : Arbre phylogénique de 7 genres de Phasianidés construit à partir de la séquence COI de l'ADN mitochondrial.....	54

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I

Tableau I : Quelques données chiffrées sur la biométrie de la caille japonaise4

Chapitre III

Tableau II : Effectifs du matériel biologique.....35

Tableau III : Troubles influençant le développement embryonnaire.....36

Tableau IV : Tableau récapitulatif des stades de développement de la caille japonaise obtenus jusqu'au 17^{ème} jour d'incubation.....36

Tableau V : Description morphologique comparative des chromosomes en coloration GTG de la caille japonaise *Coturnix japonica* obtenus avec ceux de la littérature (caille japonaise et poulet domestique).....47

Tableau VI : Correspondances entre les machrochromosomes de la poule domestique *Gallus domesticus* et de la caille japonaise *Coturnix japonica*.....51

Tableau VII : Comparaison des chromosomes de 1 à 10 et le chromosome sexuel Z chez la caille japonaise et le poulet domestique.....53

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

SOMMAIRE

INTRODUCTION_____1

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1- BIOLOGIE DE LA CAILLE JAPONAISE_____2

I.1.1-CLASSIFICATION ET HISTORIQUE_____2

I.1.2- DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE _____2

I.1.3- DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DE LA CAILLE JAPONAISE_____3

I.1.3.1-MORPHOLOGIE_____3

I.1.3.2-DIMORPHISME SEXUEL_____4

I.1.3.3-BIOMÉTRIE_____4

I.1.4- REPRODUCTION DE LA CAILLE JAPONAISE_____5

I.1.5-COMPOSITION ET BIENFAITS DES ŒUFS DE LA CAILLE
JAPONAISE_____5

**I.2-DESCRIPTION DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE CHEZ LES
OISEAUX_____6**

I.2.1- LA FÉCONDATION_____6

I.2.2- LA SEGMENTATION_____7

I.2.3- LA PRÉ-GASTRULATION (MISE EN PLACE DE L'HYPOBLASTE) _____8

I.2.4- LA GASTRULATION_____9

I.2.5- LA NEURULATION_____9

I.2.6- L'ORGANOGENESE ET LA FORMATION DES ANNEXES
EMBRYONNAIRES_____10

I.3-CYTOGÉNÉTIQUE DES OISEAUX_____11

I.3.1-CARACTÉRISTIQUES DU GÉNOME AVIAIRE_____11

I.3.2- DESCRIPTION DU CARYOTYPE DE LA CAILLE JAPONAISE ET DU
POULET DOMESTIQUE_____12

I.3.2.1- CARYOTYPE DE LA CAILLE JAPONAISE_____12

SOMMAIRE

I.3.2.2- CARYOTYPE DU POULET DOMESTIQUE	13
I.3.3- NOMENCLATURE ET CLASSIFICATION DES CHROMOSOMES METAPHASIQUES	15
I.3.4- TECHNIQUES DE MARQUAGE CHROMOSOMIQUE	15
I.3.4.1- COLORATION CONVENTIONNELLE	15
I.3.4.2- MARQUAGE CHROMOSOMIQUE EN BANDES GTG (BANDES G-TRYPISINE-GIEMSA) ET RBG (REVERSE BANDING GIEMSA)	16
I.4 –PHYLOGENIE	17
I.4.1- PHYLOGNIE DE LA CAILLE JAPONAISE ET DU POULET DOMESTIQUE	17
I.4.2- LES REMANIEMENTS CHROMOSOMIQUES	19
I.4.2.1-LES DELETIONS	19
I.4.2.2-LES DUPLICATIONS	20
I.4.2.3-LES INVERSIONS	21
I.4.2.4- LES TRANSLOCATIONS	21
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	
II.1- LIEU DE TRAVAIL	23
II.2-MATERIEL BIOLOGIQUE	23
II.2.1- ŒUFS FECONDES	23
II.3-METHODOLOGIE	23
II.3.1- SUIVI DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE	24
II.3.1.1- CONSERVATION DES ŒUFS	24
II.3.1.2- INCUBATION DES ŒUFS	24
II.3.1.3- MIRAGE	25
II.3.1.4-TECHNIQUES D'OBSERVATION	25
3.1.4.1-TECHNIQUE <i>IN VIVO</i>	25

SOMMAIRE

3.1.4.2-TECHNIQUE <i>IN VITRO</i>	27
II.3.1.5- REALISATION DE PREPARATIONS DURABLES D'EMBRYONS DE CAILLE JAPONAISE <i>COTURNIX JAPONICA</i>	28
II.3.2-CULTURE CELLULAIRE	28
II.3.2.1-PRELEVEMENT ET DILACERATION DES ORGANES	29
II.3.2.2-MISE EN CULTURE	29
II.3.2.3-RECOLTE	31
II.3.2.4- CHOC HYPOTONIQUE	31
II.3.2.5-FIXATION	31
II.3.2.6-ETALEMENT CHROMOSOMIQUE	32
II.3.2.7-TECHNIQUES DE MARQUAGES CHROMOSOMIQUES	32
II.3.2.7.1- COLORATION CONVENTIONNELLE	32
II.3.2.7.2-TECHNIQUE DE MARQUAGE EN BANDES GTG (BANDES G- TRYPHINE GIEMSA)	33
II.3.2.8- OBSERVATIONS DES LAMES SOUS MICROSCOPE PHOTONIQUE	34
II.2.3- ETABLISSEMENT DES CARYOTYPES	34

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1- MATERIEL BIOLOGIQUE	35
III.1.1- EFFECTIFS DES ŒUFS ET D'EMBRYONS	35
III.2- INCUBATION DES ŒUFS ET SUIVI DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE	36
III.2.1- LES STADES DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE OBTENUS	36
III.2.2-REALISATION DE PRÉPARATIONS DURABLES D'EMBRYONS DE CAILLE JAPONAISE	41
III.3- CULTURE CELLULAIRE ET ETALEMENT CHROMOSOMIQUE	42
III.3.1- DILACERATION DES ORGANES	42
III.3.2-MISE EN CULTURE, RECOLTE, CHOC HYPOTONIQUE, FIXATION, ETALEMENT CHROMOSOMIQUE	42

SOMMAIRE

III.4-MARQUAGES CHROMOSOMIQUES ET OBSERVATIONS DES METAPHASES	43
III.4.1- DESCRIPTION DES CHROMOSOMES DE LA CAILLE JAPONAISE <i>COTURNIX JAPONICA</i> ET CARTE CHROMOSOMIQUE COMPAREE	46
CONCLUSION	55
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	57
ANNEXES	64

Introduction

∞INTRODUCTION∞

La Biologie du Développement est au carrefour de plusieurs disciplines telles que la Biologie Cellulaire, le Développement Embryonnaire, la Génomique, la Biologie Moléculaire et l'Evolution. Pendant des décennies, l'Embryologie et la Génétique évoluaient en parallèle sans qu'un rapport ne soit établi entre les gènes et les règles développementales régissant la transformation de l'œuf fécondé en un embryon. La Biologie du Développement est devenue ainsi une discipline extraordinairement inclusive (Spyros, 2001). La cytogénétique conventionnelle est l'une de ses disciplines. C'est dans ce contexte que notre travail se positionne.

Les oiseaux sont des vertébrés ovipares, homéothermes caractérisés par les plumes, le vol et un petit génome. On connaît 20 milles espèces d'oiseaux formant une classe et 25 Ordres principaux. En effet, la caille japonaise *Coturnix japonica* est un oiseau appartenant à l'ordre des Galliformes et à la famille des Phasianidés, il est élevé et domestiqué principalement pour la consommation alimentaire en raison de la qualité de sa viande et de ses œufs. Egalement, cette espèce caractérisée par sa petite taille et sa prolifération rapide, elle est choisie et considérée comme un excellent modèle animal de laboratoire y est donc utilisée dans maints domaines de recherches scientifiques, notamment pour les études embryologiques et cytogénétiques comparatives.

Les études phylogénétiques réalisées sur cette espèce révèlent que malgré les différences phénotypiques, la caille japonaise présente des homologies génomiques frappantes avec le poulet domestique *Gallus domesticus* appartenant aussi à la même famille et au même ordre et qui représente le standard chez les oiseaux. Or, certaines différences morphologiques ont été aussi observées sur certains de leurs chromosomes. De ce fait, la question qui se pose toujours est « Quelle est l'espèce qui est apparue en premier, la caille ou le poulet ? ». Pour cela, le présent travail vise à suivre en premier lieu le développement embryonnaire de la caille japonaise et en deuxième lieu, établir le caryotype en bandes morphologiques GTG de cette espèce puis de le comparer avec celui du poulet afin de proposer des hypothèses concernant les relations phylogénétiques afin de retracer l'histoire évolutive de ces deux espèces aviaires domestiques.



*Revue
bibliographique*

I.1- BIOLOGIE DE LA CAILLE JAPONAISE

La caille japonaise sauvage *Coturnix japonica* est un oiseau terrestre qui habite les zones herbeuses. Elle a été domestiquée principalement pour la production de sa viande savoureuse et de ses œufs riches en vitamines (Mills *et al.*, 1997).

La petite taille de cet oiseau, sa croissance rapide, sa maturité sexuelle précoce, le court intervalle de génération (3 à 4 générations par année), l'embryon facilement accessible, manipulé et visualisé au fur et à mesure qu'il grandit, ainsi que sa physiologie comparable à celle des humains, sont d'importants critères qui font de la caille japonaise un excellent modèle animal de laboratoire dans de nombreux domaines de recherche, tel que la biologie du développement et la génétique. Egalement, les cailles adultes sont utiles pour les études des maladies et du vieillissement (Huss *et al.*, 2008; Alkan *et al.*, 2010 ; Moula *et al.*, 2014).

I.1.1- CLASSIFICATION ET HISTORIQUE

Il existe environ 40 espèces de cailles dans le monde, seule la caille japonaise *Coturnix japonica* est élevée et domestiquée depuis le 11^{ème} siècle au Japon, principalement, pour son chant, d'où son nom: la caille du japon (japanese quail) (Crawford, 1990; Huss *et al.*, 2008 ; Guide d'élevage, 2010). Cette espèce appartient à l'ordre des Galliformes et à la famille des Phasianidés, son nom scientifique est: *Coturnix japonica* (Linné, 1758). Elle a été pour longtemps considérée comme une sous-espèce de la caille des blés ou caille européenne *Coturnix coturnix* et a été désignée comme *Coturnix coturnix japonica* (Westmore, 1952). Toutefois, en raison de preuves taxonomiques ultérieures concernant les différences dans le chant (voix), la sympatrie (deux espèces phylogénétiquement proches vivant sur un même territoire mais ne s'hybridant pas) et la non-viabilité (mortalité) des hybrides, la caille japonaise est maintenant considérée comme une espèce différente de la caille des blés et porte une nouvelle appellation, *Coturnix japonica* (Mills *et al.*, 1997).

I.1.2- DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE

Les cailles japonaises sont retrouvées en Asie orientale, y compris le nord de la Mongolie, l'île de Sakhaline et dans les régions du lac Baïkal, au nord-est de la Chine, le Japon, la Corée du Nord, la Corée du Sud, le Laos, le Vietnam, le Cambodge, le Myanmar, le Bhoutan, l'Inde ainsi qu'en Russie (Mills *et al.*, 1997). Il y a aussi des populations introduites (espèce pouvant se reproduire naturellement dans une aire géographique dont elle n'est pas originaire) en Italie et à Hawaï (Etats unis) en 1921 (Figure 1) (Shwartz *et al.*, 1949).

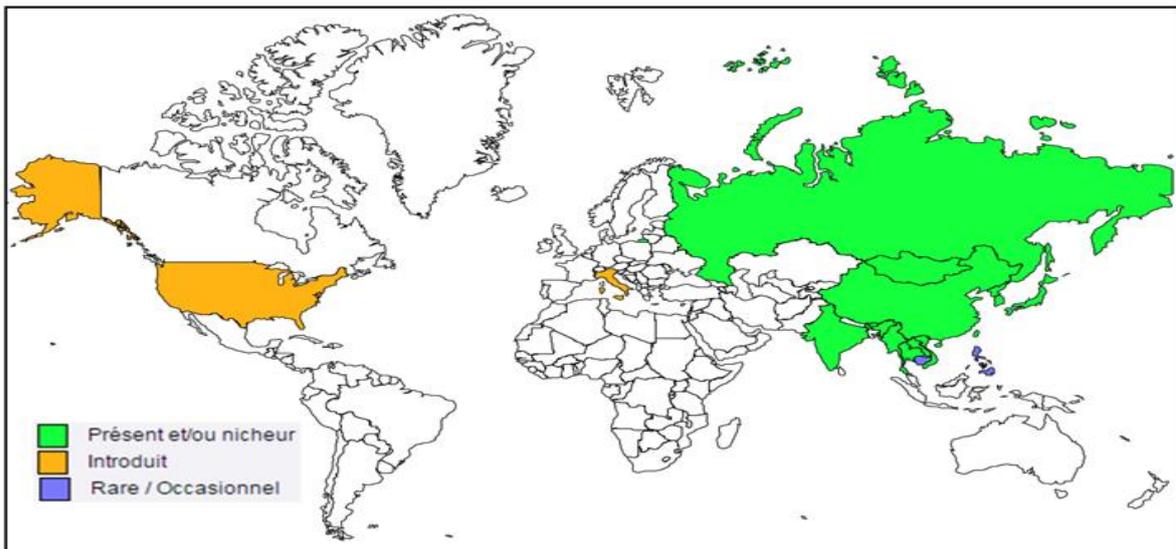


Figure N°1: Répartition de la caille japonaise *Coturnix japonica* dans le monde (Modifiée d'après Oiseaux.net, 2015).

I.1.3- DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DE LA CAILLE JAPONAISE

I.1.3.1- MORPHOLOGIE

La caille japonaise se caractérise par un plumage du corps de couleur brun foncé et se différencie de la caille des blés par la voix, les plumes de la gorge et du menton effilées et non arrondies, l'absence du dessin (en ancre) à la gorge du mâle (Figure 2a) (Linné, 1758).

Les œufs de la caille domestique sont caractérisés par une variété de couleurs, allant du brun foncé, blanc à chamois (jaune pâle), chacune est fortement tachetée de noir ou brun. Le poids moyen d'un œuf de *Coturnix japonica* est d'environ 10 grammes (environ 8% du poids corporel de la femelle) (Figure 2b) (Alkan *et al.*, 2010).

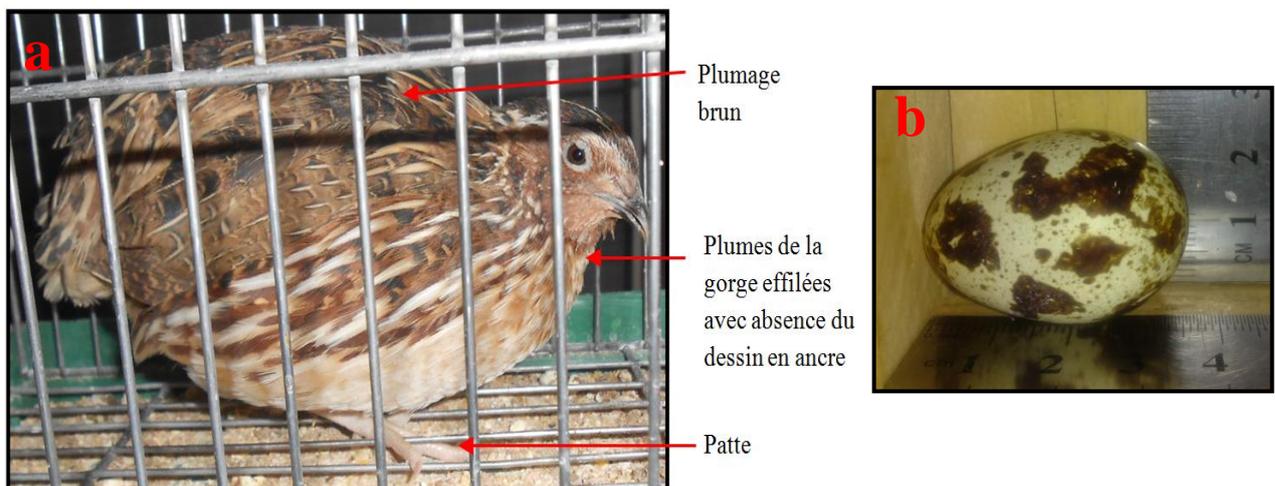


Figure N°2: Caille japonaise, (a) adulte de sexe male (en capture), (b) Œuf pondu (Originale).

I.1.3.2- DIMORPHISME SEXUEL

L'espèce *Coturnix japonica* présente un léger dimorphisme sexuel. Cependant, les femelles sont plus volumineuses que les mâles. Egalement, à partir de la 3^{ème} semaine d'âge, les deux sexes peuvent être distingués par la couleur du plumage de la poitrine. En effet, les femelles ont une poitrine pâle tachetée en noir, alors que les mâles se caractérisent par un plumage de plastron (poitrine) uniforme de couleur brun orangé et c'est la même couleur sur les joues, ce qui est absent chez la femelle (Figure 3) (Mills *et al.*, 1997; Huss *et al.*, 2008).

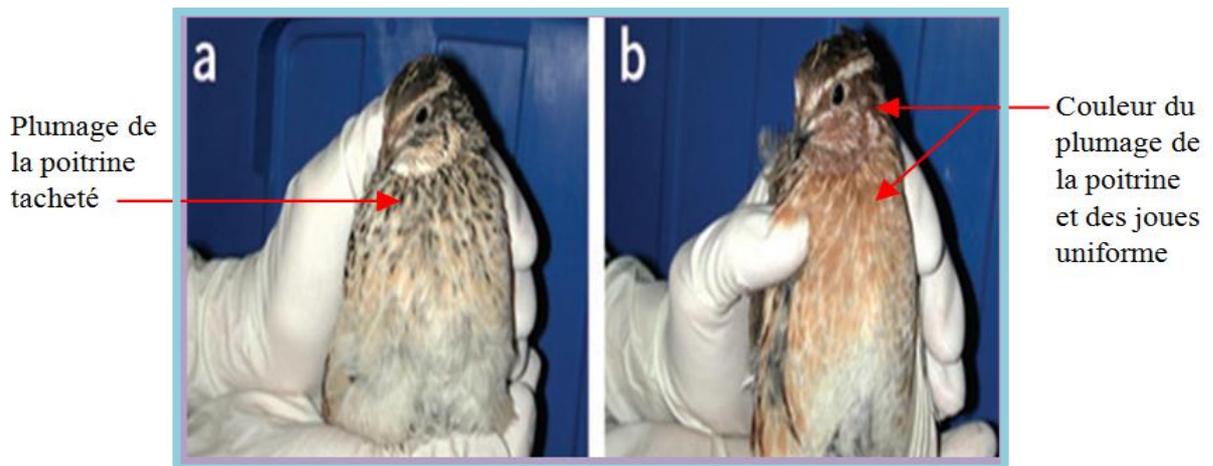


Figure N°3: Couple de caille japonaise adulte, (a) Femelle, (b) Mâle (Huss *et al.*, 2008).

I.1.3.3- BIOMÉTRIE

Les caractéristiques biométriques de la caille japonaise sont mentionnées dans le Tableau I.

↳ **Tableau I:** Quelques données chiffrées sur la biométrie de la caille japonaise (Office vétérinaire fédéral, 2000; Makoto-Mizutani, 2003; Ainsworth *et al.*, 2010).

Besoin alimentaire par jour (blé, maïs,...etc.)	20-25 g
Besoin en eau par jour	Environ 30 ml
Durée de couvaison	17-18 jours (Min. 16,5 - Max. 20 jours)
Poids corporel du mâle adulte	100-130 g
Poids corporel de la femelle adulte	120-160 g
Longueur du corps	120-180 mm
Poids des œufs	9-13 g
Longueur des œufs	Environ 30 mm

I.1.4- REPRODUCTION DE LA CAILLE JAPONAISE

La caille japonaise commence à atteindre la maturité sexuelle à environ 6 à 8 semaines d'âge. L'adoption du comportement sexuel se traduit chez le mâle par des tentatives d'accouplement et des cris lancés le matin et le soir, également par la présence de sperme dans les excréments. Alors que, la femelle manifeste sa maturité sexuelle en pondant des œufs, avec un nombre qui peut aller de 180 à 300 œufs par an (**Moula et al., 2014**).

Les femelles d'oiseaux disposent de deux sites de stockage prolongé des spermatozoïdes dans leur oviducte, le site utéro-vaginal et le site infundibulaire qui sont des glandes tubulaires dites « en doigts de gant ». Dans ces glandes, les gamètes mâles peuvent survivre et conserver leur pouvoir fécondant pendant des durées allant de plusieurs jours à plusieurs semaines selon l'espèce, en effet, la fécondation de plusieurs œufs est possible sans qu'il y ait nécessité d'accouplement avant chaque ovulation. Cependant, chez la caille domestique la durée maximale de la période fertile (durée pendant laquelle la femelle pond des œufs fertiles après accouplement), peut atteindre 10 jours et chez la poule 21 jours (**Battelier et al., 2009**).

La caille japonaise domestique marquée par la perte du phénotype migrateur peut se reproduire toute l'année (**Villot et al., 2013**). La reproduction est déclenchée notamment par la durée du jour (ou photopériode). Par conséquent, si le temps de la lumière du jour chute à moins de 12 h, la caille peut réduire ou cesser la ponte. L'espérance de vie des cailles femelles pondeuses est d'environ 3-4 ans, les mâles souvent survivent jusqu'à leur cinquième année (**Huss et al., 2008 ; Blesbois et Brillard, 2009**).

I.1.5- COMPOSITION ET BIENFAITS DES ŒUFS DE LA CAILLE JAPONAISE

Beaucoup de gens, en particulier dans les pays asiatiques, consomment les œufs de caille vu que ces derniers sont très riches en vitamines, minéraux et antioxydants. Malgré leur petite taille, leur valeur nutritive est trois à quatre fois plus riche que les œufs de poulet. La consommation régulière d'œufs de caille (2 œufs par jours) aide à lutter contre de nombreuses maladies, car ils sont considérés comme un combattant naturel contre les troubles digestifs tels que les ulcères de l'estomac. Ces petits œufs renforcent le système immunitaire, ils permettent de promouvoir la santé de la mémoire, augmentent l'activité du cerveau et de stabiliser le système nerveux. Ils luttent contre l'anémie en augmentant le taux d'hémoglobine dans le corps tout en éliminant les toxines et les métaux lourds (**Troutman, 2012**).

Les Chinois se servent des œufs de caille afin de guérir la tuberculose, l'asthme (L'Extrait Standardisé d'Œufs de Cailles (E.S.O.C) contient différentes enzymes appelées: Ovomucoïdes et ovoïnhibiteurs. Celles-ci ont le pouvoir, scientifiquement démontré,

d'inhiber les protéases humaines responsables du phénomène d'inflammation et donc du déclenchement de la cascade allergique et même le diabète (Bruttman *et al.*, 2013). La valeur nutritionnelle des œufs de caille est beaucoup plus élevée par rapport à celle offerte par d'autres œufs (Figure 4) (Tunsaringkarn *et al.*, 2013).

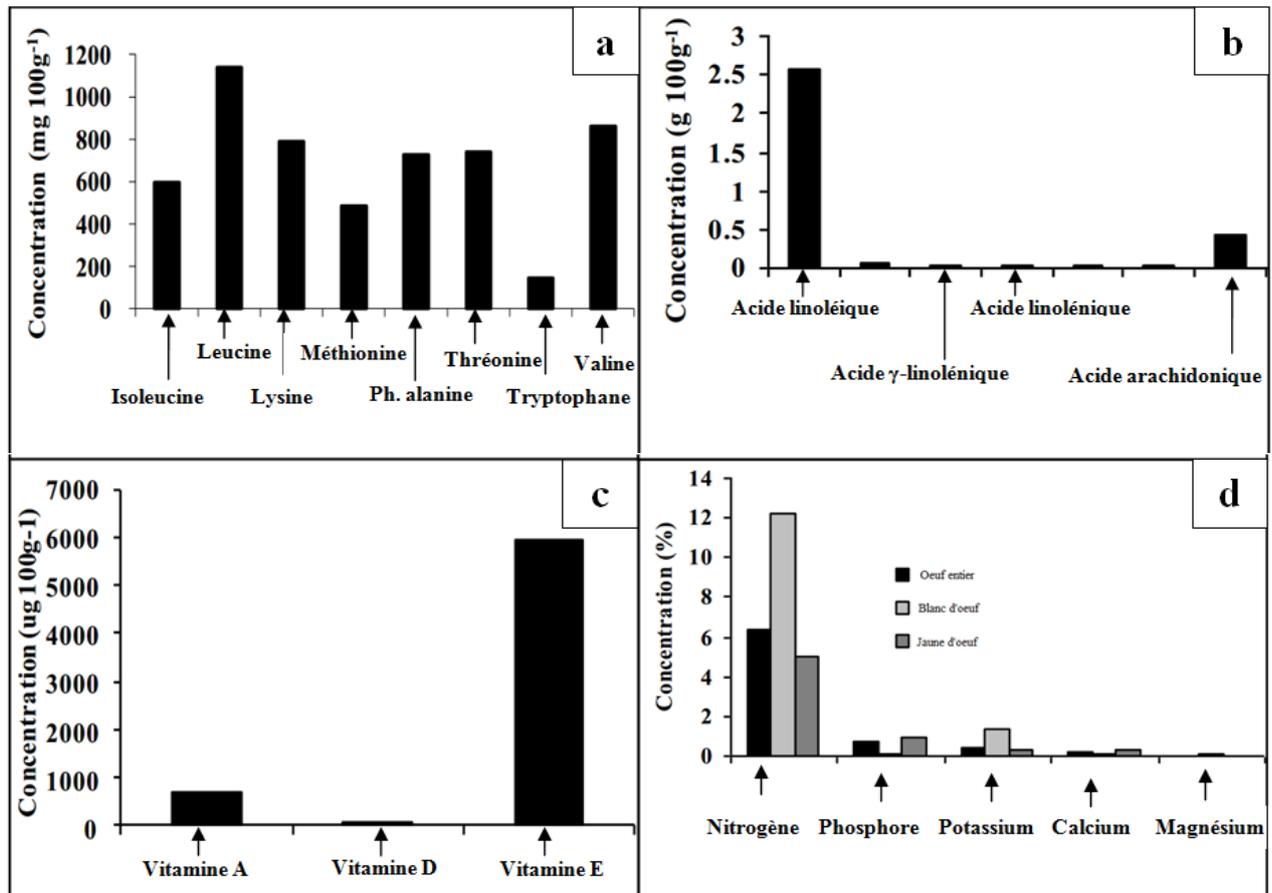


Figure N°4: Composition de l'œuf de caille (a) en acides aminés essentiels, (b) en acides gras essentiels, (c) en vitamines et (d) en minéraux (Modifiée d'après Tunsaringkarn *et al.*, 2013).

I.2-DESCRIPTION DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE CHEZ LES OISEAUX

La formation et la croissance de l'embryon d'oiseau se déroule en six principales phases ;

I.2.1- LA FÉCONDATION

La fécondation a lieu 5 à 7 minutes après l'ovulation. L'ovocyte rentre dans l'infundibulum et rencontre les spermatozoïdes qui sont remontés depuis le site de stockage utéro-vaginal. En libérant l'acrosine, les spermatozoïdes sont capables d'hydrolyser la membrane perivitelline interne et de pénétrer dans l'ovocyte, cette réaction acrosomique conduit à la formation du pronucléus mâle qui se rapproche du centre du disque germinal et fusionne avec le pronucléus

femelle. La chromatine se décondense et la tête des spermatozoïdes se transforme en une sphère contenant le matériel nucléaire. Les premières divisions embryonnaires s'initient 3 heures après la fécondation et se déroule en parallèle avec la formation de l'œuf (Figure 5) (Blesbois et Brillard, 2009).

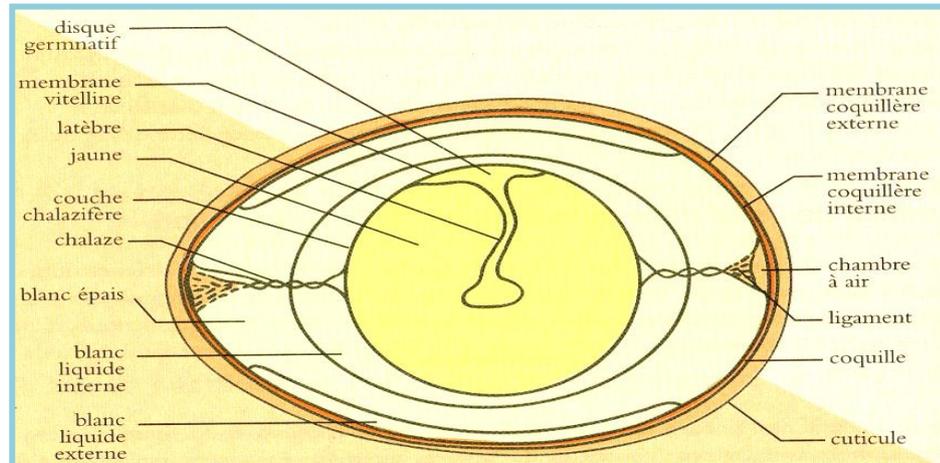


Figure N°5: Organisation d'un œuf d'oiseau (Battelier *et al.*, 2009).

I.2.2- LA SEGMENTATION

L'œuf téolécithe (riche en vitellus) des oiseaux se caractérise par une segmentation partielle (méroblastique), qui n'intéresse que le disque germinatif contenant le noyau zygotique. Cette segmentation dite ainsi discoïdale abouti à une discoblastula constituée d'un feuillet cellulaire séparé du vitellus par une cavité, le blastocœle (Le Moigne et Foucrier, 2010). Le blastodisque en segmentation (blastoderme) compte 8 blastomères centraux à limites nettes et 8 blastomères périphériques dont les limites avec le vitellus sont peu distinctes. Aux stades 32 et 64, les blastomères centraux acquièrent une limite inférieure. Suite à la multiplication des cellules de disque central, plusieurs assises cellulaires se mettent en place et une cavité se creuse (entre celles-ci et le vitellus sous jacent) formant le blastocœle. On distingue alors plusieurs régions dans le blastoderme. Au centre, l'aire pellucide (épiblaste) avec les cellules au dessus de la cavité de segmentation. À la périphérie, l'aire opaque qui comprend 3 zones (la zone de recouvrement avec des mitoses actives et des blastomères bien individualisés au contact du vitellus), (le rempart germinatif: une zone profonde avec des blastomères individualisés), (la zone de jonction: une assise profonde sans limites nettes avec le vitellus, elle constitue le syncytium vitellin) (Figure 6) (Slack, 2004; Le Moigne et Foucrier, 2010).

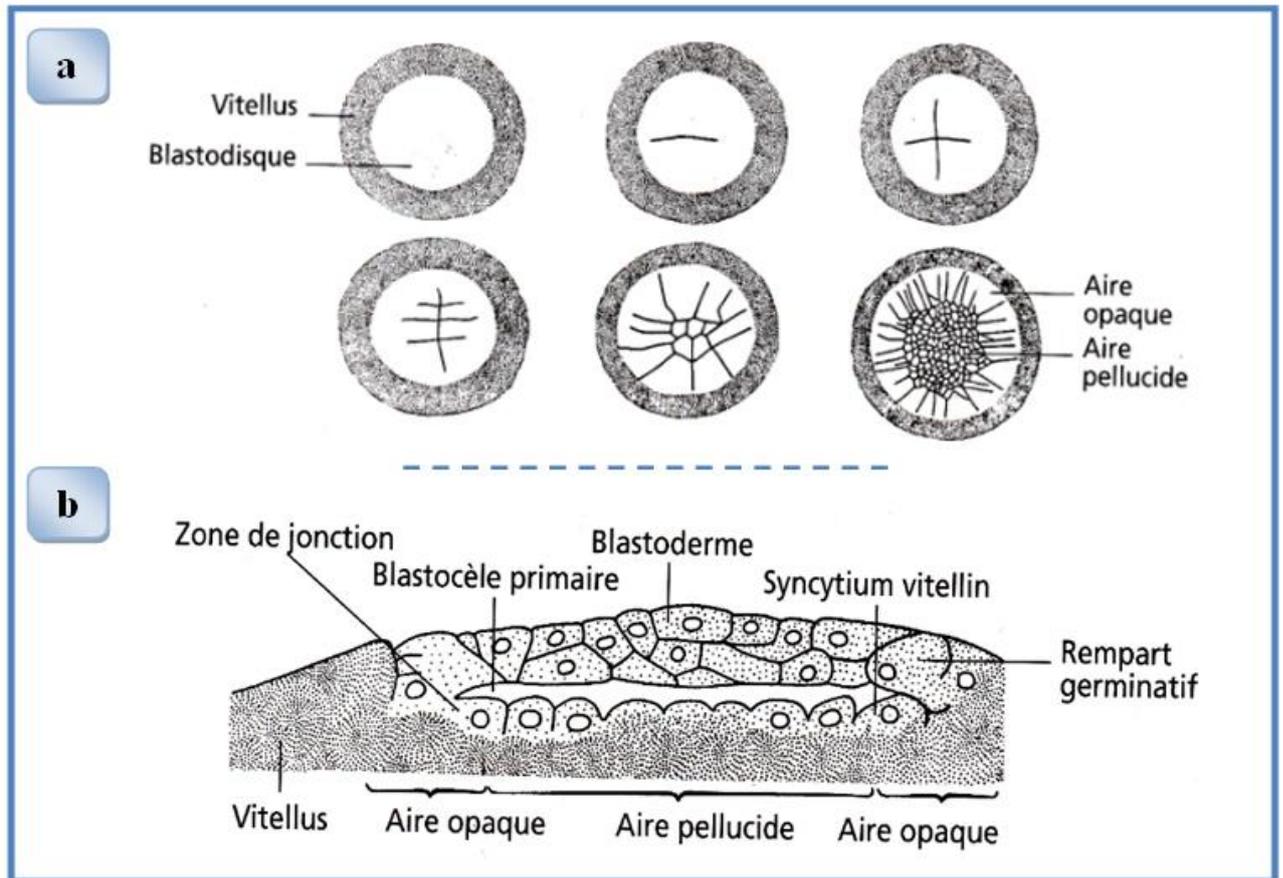


Figure N°6: Segmentation et formation de la blastula chez l'embryon d'oiseau. (a) Vue polaire des premiers stades de segmentation de l'embryon d'oiseau (Blastodisque, stades 2, 4, 8, 16, et 128 blastomères), (b) Jeune blastula (stade 32 à 64 cellules) (Le Moigne et Foucrier, 2010).

I.2.3- LA PRÉ-GASTRULATION (MISE EN PLACE DE L'HYPUBLASTE)

Juste avant le début de la gastrulation, des cellules isolées provenant de l'aire pellucide migrent en profondeur dans le blastocèle primaire et forment l'hypoblaste primaire. Ensuite, une seconde migration plus importante de cellules issues de la partie profonde de la zone marginale postérieure se manifeste dans le sens postéro-antérieur constituant ainsi l'hypoblaste secondaire. Ce dernier rejoint et repousse les îlots de cellules de l'hypoblaste primaire en donnant naissance à l'hypoblaste (ou entophylle), qui est à l'origine des structures extra-embryonnaires, tandis que l'embryon proprement dit provient de l'épiblaste (ou ectophylle) (Figure 7). Au moment où l'œuf est pondu, il aura en général juste commencé la formation de l'hypoblaste secondaire et le blastoderme total est constitué d'environ 60 000 cellules (Le Douarin, 1999; Slack, 2004; Le Moigne et Foucrier, 2010).

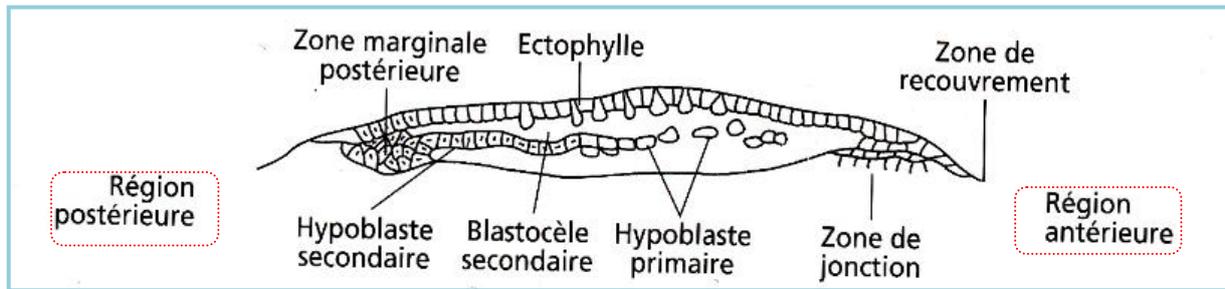


Figure N°7: Formation de l'hypoblaste (Le Moigne et Foucrier, 2010).

I.2.4- LA GASTRULATION

Une condensation de cellules appelée la ligne primitive naît au bord postérieur de la zone pellucide et s'allonge jusqu'à atteindre le centre. Elle exprime le gène *brachyury*, impliqué dans l'activation des gènes mésodermiques tardifs et le contrôle des mouvements de gastrulation. Les cellules de l'épiblaste migrent vers la ligne primitive et la traversent pour devenir la partie mésodermique et endodermique de la couche inférieure. La zone pellucide change graduellement d'une forme de disque à une forme de poire et une autre condensation appelée nœud de Hensen apparaît à l'extrémité antérieure de la ligne primitive. Celle-ci exprime divers facteurs de transcription, comprenant les gènes *gooseoid*, *not* et *HNF3β*. Le nœud contient les cellules de la notochorde présomptive dont certaines migrent antérieurement pour former le prolongement encéphalique. Le reste du nœud se déplace postérieurement et au fur et à mesure qu'il le fait, les structures principales du plan corporel apparaissent dans son sillage, la notochorde se trouve dans la ligne du milieu, les somites de part et d'autres et la plaque neurale dans l'épiblaste (Slack, 2004).

I.2.5- LA NEURULATION

Lors de la formation de la corde, une ébauche du tube neural apparaît (après 20-21 heures d'incubation) sous forme de replis de part et d'autre de la ligne médiane de la plaque neurale (Le Moigne et Foucrier, 2010). Les bourrelets se soudent dans le plan médian dorsal formant le tube neural et des cellules se détachent de part et d'autre de la zone de jonction. En même temps, le repli céphalique s'accroît, séparant la tête de la surface de l'épiblaste. Simultanément, l'embryon se referme sur sa face ventrale pour former le tube digestif, ce qui rapproche les deux ébauches de cœur en un seul organe ventral par rapport au tube digestif. Les somites qui donneront ultérieurement naissance aux vertèbres, aux muscles du tronc et des membres et au derme, se différencient à partir de la 20^{ème} heure d'incubation

(**Le Douarin, 1999; Le Moigne et Foucrier, 2010**) et continuent à naître dans une succession antéro-postérieure à partir des plaques segmentaires de mésoderme qui flanquent la notochorde et le tube neural. À environ 36 heures, il y a 10 somites et le tube neural s'est fermé pour former les vésicules du cerveau antérieur, du cerveau moyen et du cerveau postérieur (**Slack, 2004**).

I.2.6- L'ORGANOGENESE ET LA FORMATION DES ANNEXES EMBRYONNAIRES

L'organogenèse est une période qui modèle progressivement la forme du corps et assure la différenciation et l'organisation des tissus et des organes, tout en impliquant une combinaison de processus complexes, finement régulés dans l'espace et dans le temps; tel que des mouvements morphogénétiques, des remodelages, des migrations cellulaires, des ségrégations, des fusions d'ébauches, des inductions, des différenciations, des croissances et des morts cellulaires programmées (**Darribère, 2007**). Chez l'espèce aviaire, qui se caractérise par un développement dit directe, l'organogenèse se manifeste pleinement à partir de la 20^{ème} heure d'incubation avec apparition dans la région antérieure des premiers signes de neurulation, marqué par la régression de la ligne primitive, qui est substituée par différenciation du repli céphalique correspondant à la plaque neurale (**Batellier et Gorovoun, 2009; Le Moigne et Foucrier, 2010**). Trois jours après l'incubation, en compte 40 somites et une tête bien développée, le cœur et les membres commencent à se former. Des îlots sanguins (siège de l'hématopoïèse) et des vaisseaux apparaissent dans les zones extra-embryonnaires. Ces derniers se connectent avec les vaisseaux de l'embryon en un système circulatoire unique et le cœur bat (**Le Douarin, 1999**). À ce stade, l'embryon se couche sur sa gauche et la tête subit une flexure marquée. L'embryon est alors nourri à partir des annexes embryonnaires, qui sont des formations d'origine ectodermique, mésodermique et endodermique qui se développent hors du corps de l'embryon proprement dit et qu'elles lui assurent également, des fonctions de protection, de respiration, de stockage et d'élimination des déchets (Figure 8) (**Le Douarin, 1999; Le Moigne et Foucrier, 2010**). La cavité amniotique, remplie de liquide assure une protection mécanique. Le chorion (ou séreuse de Von Baer), situé juste sous la coquille entoure tout l'embryon. L'allantoïde, un diverticule endodermique de l'intestin, est le siège des échanges gazeux (O₂ et CO₂), le réceptacle excréteur où s'accumule l'acide urique (**Le Douarin, 1999; Slack, 2004**), le site d'absorption de l'albumen et de la mobilisation du calcium de la coquille, utilisé notamment pour l'élaboration du squelette embryonnaire. Enfin, la vésicule vitelline, apparaît la première, elle

entoure le vitellus et ses parois sont très vascularisées. Elle sert d'organe digestif extra-embryonnaire (système enzymatique interne très riche), qui assure en effet l'absorption de nutriments du vitellus et leurs transport jusqu'à l'embryon, ainsi que la synthèse de protéines spécifiques et le stockage temporaire des produits de dégradation (avant que l'allantoïde ne remplisse son rôle) (Slack, 2004; Batellier et Gorovoun, 2009 ; Le Moigne et Foucrier, 2010).

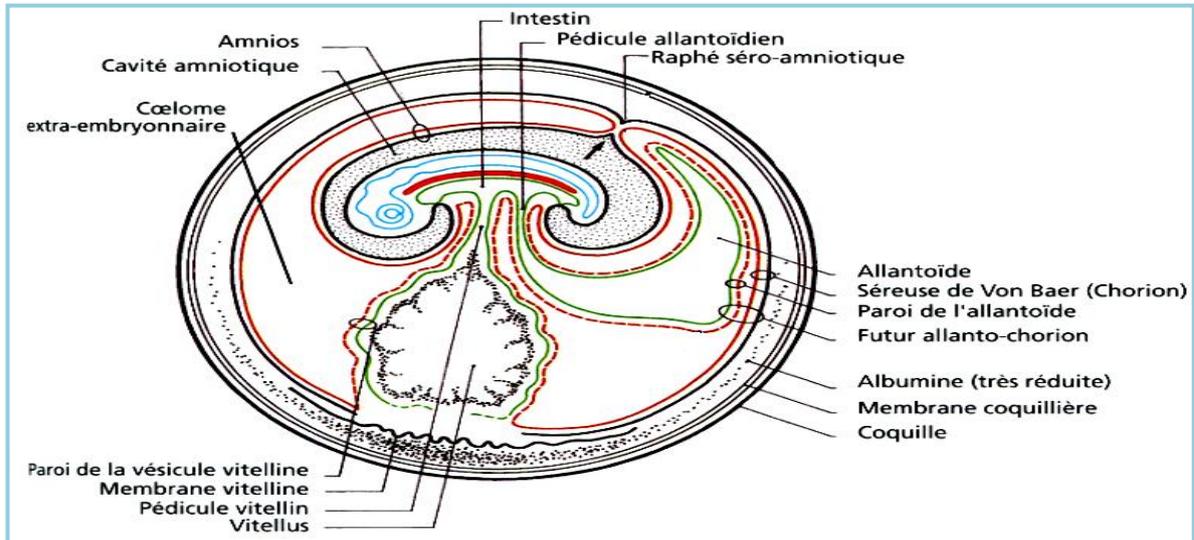


Figure N°8 : Coupe sagittale d'embryon de poulet âgé de 96 heures avec ses annexes embryonnaires (Modifié d'après Le Moigne et Foucrier, 2010).

I.3-CYTOGÉNÉTIQUE DES OISEAUX

La cytogénétique est une discipline de la génétique qui permet d'identifier et d'observer les chromosomes à l'état prométaphasique ou métaphasique (Rotureau, 2012). Elle permet d'établir le caryotype (nombre de chromosomes) d'un organisme à partir des chromosomes métaphasiques. De plus, l'utilisation de divers traitements physiques ou chimiques permet de faire apparaître des bandes spécifiques sur les chromosomes et pour cette raison, ces techniques portent le nom de banding ou de coloration en bandes (Harry, 2001).

I.3.1-CARACTÉRISTIQUES DU GÉNOME AVIAIRE

Le caryotype aviaire se compose d'un grand nombre de chromosomes. Environ 63% des oiseaux étudiés ont un nombre diploïde conservé de $2n = (74 \text{ à } 86)$ chromosomes, qui sont subdivisés en deux groupes. Les macrochromosomes constituant (6 à 10 paires) avec une paire de chromosome sexuel et les microchromosomes, plus abondants (30 à 34 paires) qui sont assez particuliers, en raison de leur taille minuscule, leur haute teneur en GC et leur morphologie non distinguable, mais avec une importance génétique loin d'être négligeable. En

effet, ils représentent environ un quart à un tiers du génome total et contiennent plus de 50% des gènes (Fillon, 1998; Griffin *et al.*, 2007). Chez l'espèce aviaire, la détermination sexuelle repose sur le système ZZ/ZW. Le chromosome W est porté par les femelles, ce sont donc elles qui sont hétérogamétiques tandis que les mâles sont homogamétiques. Le chromosome W (1 % du génome haploïde aviaire) ne possède qu'une petite région euchromatique à la partie terminale de son bras court (Gilgenkrantz, 2004).

1.3.2- DESCRIPTION DU CARYOTYPE DE LA CAILLE JAPONAISE ET DU POULET DOMESTIQUE

I.3.2.1- CARYOTYPE DE LA CAILLE JAPONAISE

Le caryotype de la caille japonaise est constitué de 78 chromosomes ($2n=78$) dont 6 paires de macrochromosomes et 33 paires de microchromosomes (Talluri *et al.*, 1965; Schmid *et al.*, 1989). Les macrochromosomes (1 et 2) sont submetacentriques, le (3, 5, 6, 7 et le 8) sont acrocentriques, le 4 est télacentrique (Figures 9-10) (Sazaki, 1981; Stock et Bunch, 1982). Le chromosome Z est métacentrique, alors que le chromosome W est acrocentrique (Figure 10a) (Turpin *et al.*, 1974). Concernant les microchromosomes, la plupart sont submetacentriques chez la caille japonaise (Figure 10b) (Calderon et Pigozzi, 2006).

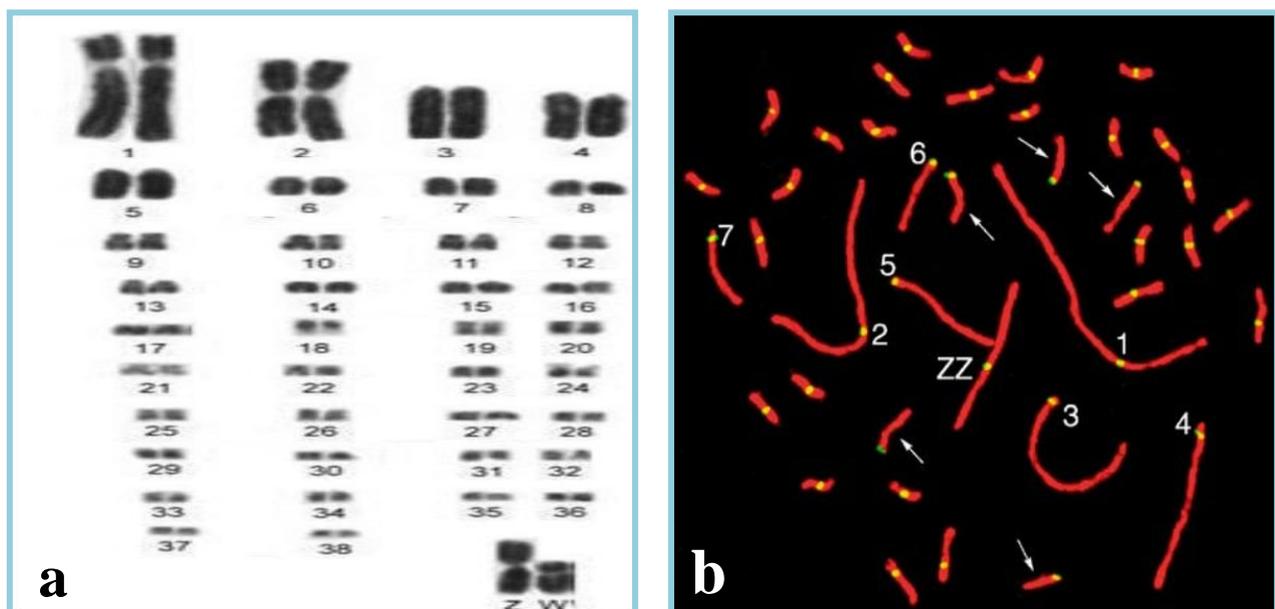


Figure N°9: (a) caryotype de caille japonaise femelle en coloration conventionnelle (Schmid *et al.*, 1989), (b) Spermatocyte en pachytènes avec les centromères marqués en jaune. Les flèches indiquent les cinq microchromosomes qui sont acrocentriques (Calderon et Pigozzi, 2006).

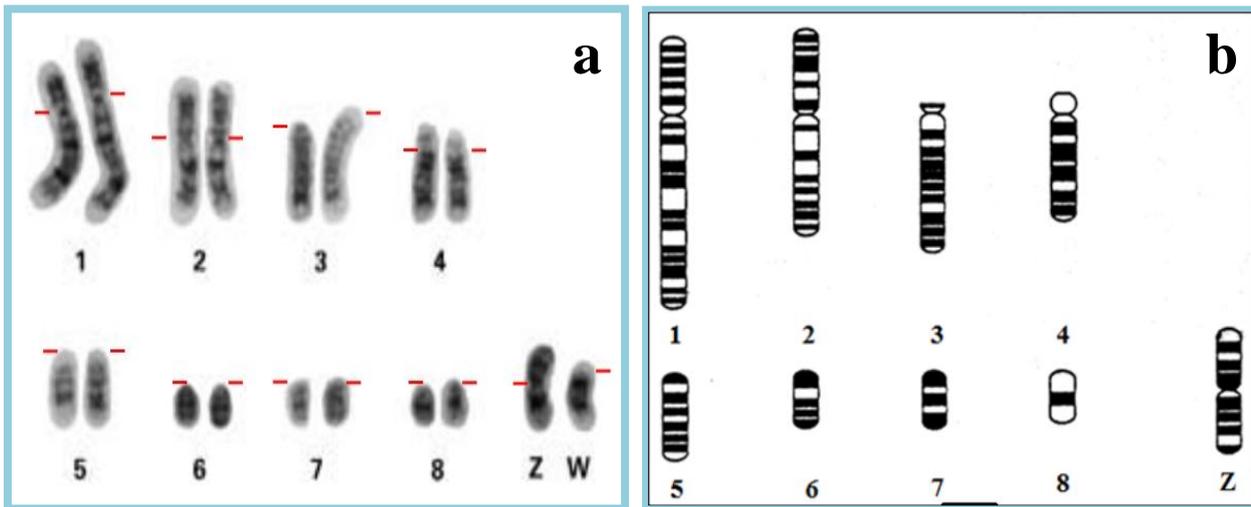


Figure N°10 : (a) Les macrochromosomes 1-8 et ZW de la caille japonaise marqués en bandes GTG (Shibusawa *et al.*, 2001), (b) idiogramme de la caille japonaise (Stock et Bunch, 1982).

I.3.2.2- CARYOTYPE DU POULET DOMESTIQUE

Le poulet est une espèce aviaire d'élevage dont l'aire d'extension actuelle est la plus vaste (Wageningen *et al.*, 2004). Cet oiseau ressemble à certaines races domestiques de la variété rouge dorée à plastron noir si l'on fait référence aux coqs, ou dorée saumonée si l'on se réfère aux poules (Figure 11). C'est la première espèce domestique que son génome a été étudié en détail en établissant une carte génétique et physique (Fotsa, 2008).



Figure N°11 : Poule domestique *Gallus domesticus* de souche Isa Brown (Isapoultry.com).

Le caryotype normal de la poule ($2n=78$) est constitué de 38 paires d'autosomes, morphologiquement différents, classés par ordre de taille décroissant et d'une paire de chromosomes sexuels Z et W (Figure 12). La taille du gonosome Z est intermédiaire entre celle du 4 et celle du 5, tandis que le gonosome W a une taille et une morphologie semblables à la 8^{ème} paire. Les huit premières paires chromosomiques sont des macrochromosomes dont les 6 premières paires représentent approximativement 65% de la longueur totale du génome (Fechheimer, 1971). Parmi les 8 paires de macrochromosomes, 3 paires sont submétacentriques (1, 2 et 8) ayant leur centromère situé à peu près dans la région médiane, 2 paires sont télacentriques (4 et 7) ayant leur centromère situé en région subtélomérique et 3 paires sont acrocentriques (3, 5 et 6) avec leur centromère en région terminale (Figure 13). Les deux

chromosomes sexuels (Z et W) sont métacentriques. La morphologie des 30 paires de microchromosomes est beaucoup plus homogène, la plupart sont acrocentriques (Fotsa, 2008).

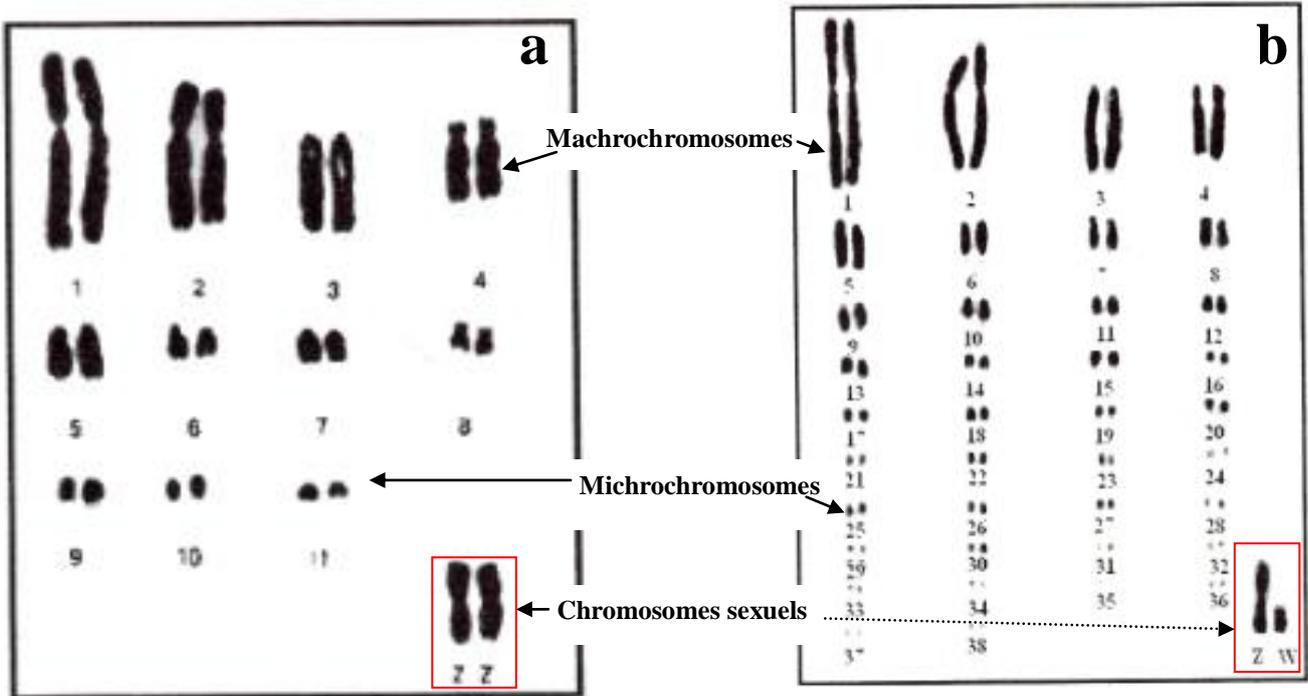


Figure N°12: Caryotype de la poule domestique (*Gallus domesticus*) en coloration conventionnelle (a): Mâle (Homogamétique), (b): Femelle (Hétérogamétique) (Ladjali, 1994).

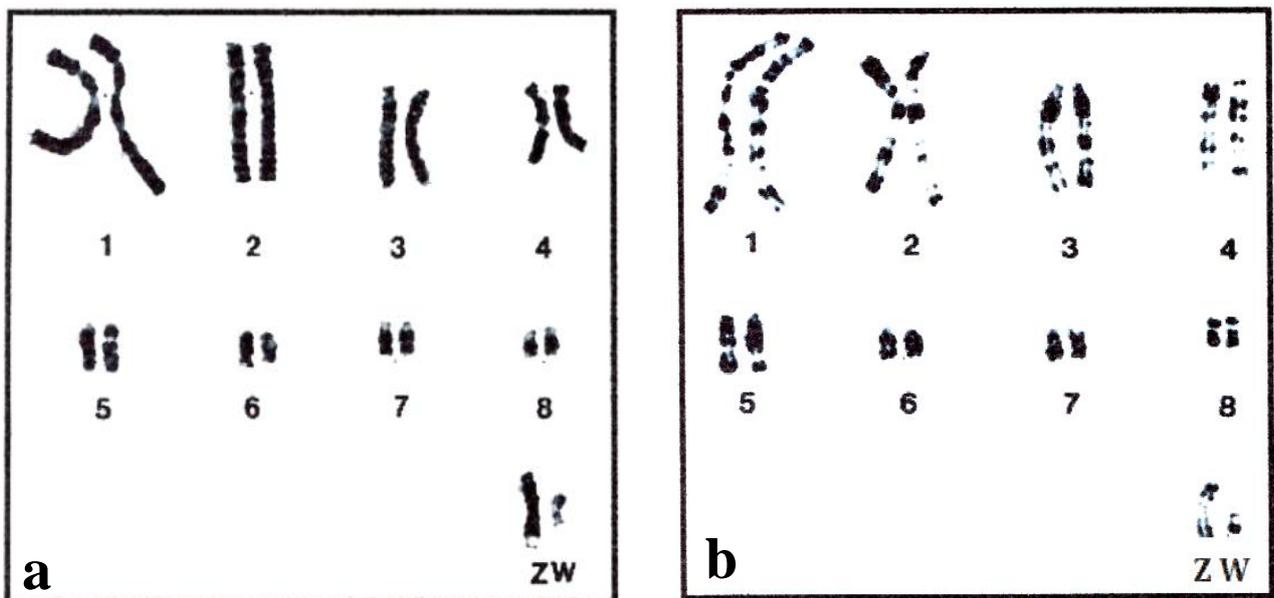


Figure N°13 : Caryotypes de la poule domestique *Gallus domesticus* (a) : En bandes GTG (b): En bandes RBG (Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999).

I.3.3-NOMENCLATURE ET CLASSIFICATION DES CHROMOSOMES METAPHASIQUES

On distingue quatre types de chromosomes selon la localisation du centromère par rapport aux bras (Figure 14) (Pollard *et al.*, 2004) :

- **Métacentrique (médiocentrique):** Le centromère est situé au milieu du chromosome, il le divise en deux chromatides égales, les deux bras ont la même taille.
- **Submétacentrique (submédiocentrique):** La position du centromère est asymétrique de sorte que chaque chromatide comporte un bras court (p) et un bras long (q).
- **Télocentrique:** Pour lequel le centromère est situé en région subtélomérique.
- **Acrocentrique:** Pour lequel le centromère est en position terminale.

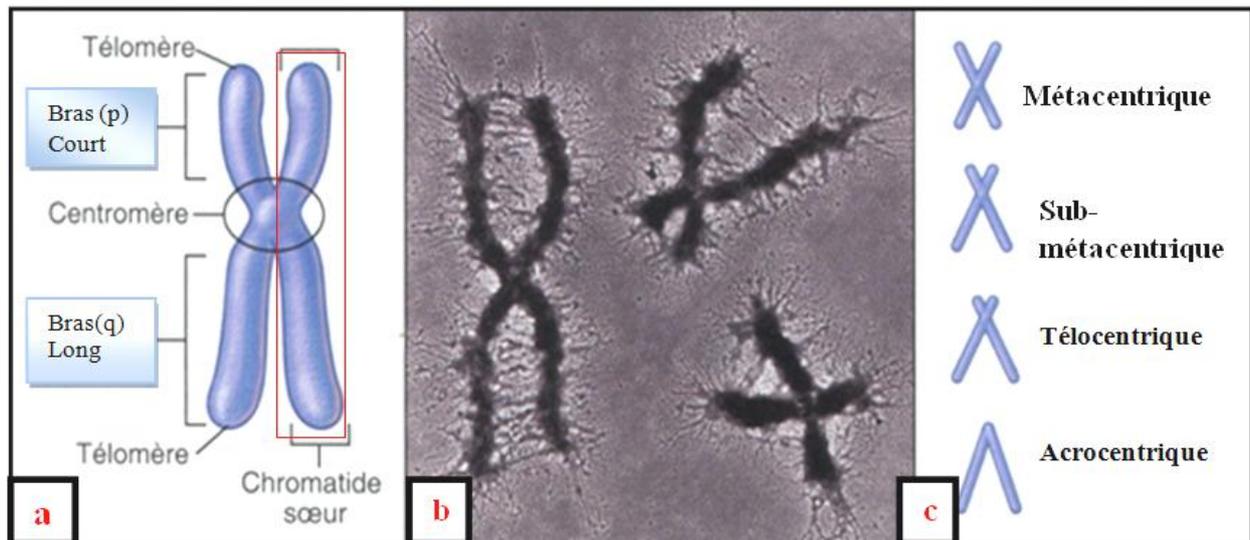


Figure N° 14 : Morphologie des chromosomes mitotiques chez les eucaryotes supérieurs. (a): Principaux éléments du chromosome. (b) : Micrographie électronique de chromosomes mitotiques. (c): Différents types de chromosomes (Modifiée d'après Pollard *et al.*, 2004).

I.3.4- TECHNIQUES DE MARQUAGE CHROMOSOMIQUE

I.3.4.1- COLORATION CONVENTIONNELLE

Le caryotype est une présentation des paires de chromosomes. Ceux-ci sont classés et numérotés selon une convention. Les bases de ce classement sont, la taille des chromosomes, la position de leur centromère et leur profil de bandes spécifique. En génétique médicale, le caryotype contribue à la détection d'éventuels remaniements chromosomiques en microscopie. Il est aussi caractéristique de chaque espèce, mais il peut également être utilisé afin de définir un individu ou une cellule (Eberhard, 2005; Le Caignec, 2011).

I.3.4.2- MARQUAGE CHROMOSOMIQUE EN BANDES GTG (BANDES G-TRYPHINE-GIEMSA) ET RBG (REVERSE BANDING GIEMSA)

La représentation de la totalité des bandes chromosomiques est appelée « caryogramme ».

La classification classique des chromosomes a rapidement été dépassée depuis l'apparition des techniques de marquages en 1970. Ces techniques de bandes permettent d'individualiser chaque chromosome par des bandes caractéristiques. Elles sont identiques sur les deux chromosomes homologues et permettent une classification bien précise (**Eberhard, 2005**). Différents traitements impliquant la dénaturation et/ou la digestion enzymatique de la chromatine, puis l'incorporation de colorants spécifiques de l'ADN tel que le Giemsa qui permet de compter et de classer les chromosomes en fonction de leur taille et de leur indice centromérique. Les méthodes de marquage dit *banding* révèlent le long des chromosomes une alternance de bandes transversales, faiblement ou fortement colorées dont la disposition topographique est spécifique de chaque paire chromosomique.

↳ Principe

Les bandes G (GTG) obtenues par digestion enzymatique (la trypsine) et les bandes R (RBG) par dénaturation thermique ont chacune un contenu spécifique en ADN. Ces deux marquages, en contretypage, sont complémentaires. Lorsque l'on a une bande sombre avec l'une des techniques, avec l'autre on obtient une bande claire. Le marquage révèle l'euchromatine c'est à dire les régions chromosomiques où l'ADN est préférentiellement transcrit et l'hétérochromatine sont les régions chromosomiques où l'ADN est préférentiellement inactif. De telles bandes permettent de différencier précisément les chromosomes et les points de translocation, des délétions sub-chromosomiques...etc (Figure 15) (**Harry, 2001; Eberhard, 2005; Le Caignec, 2011**).

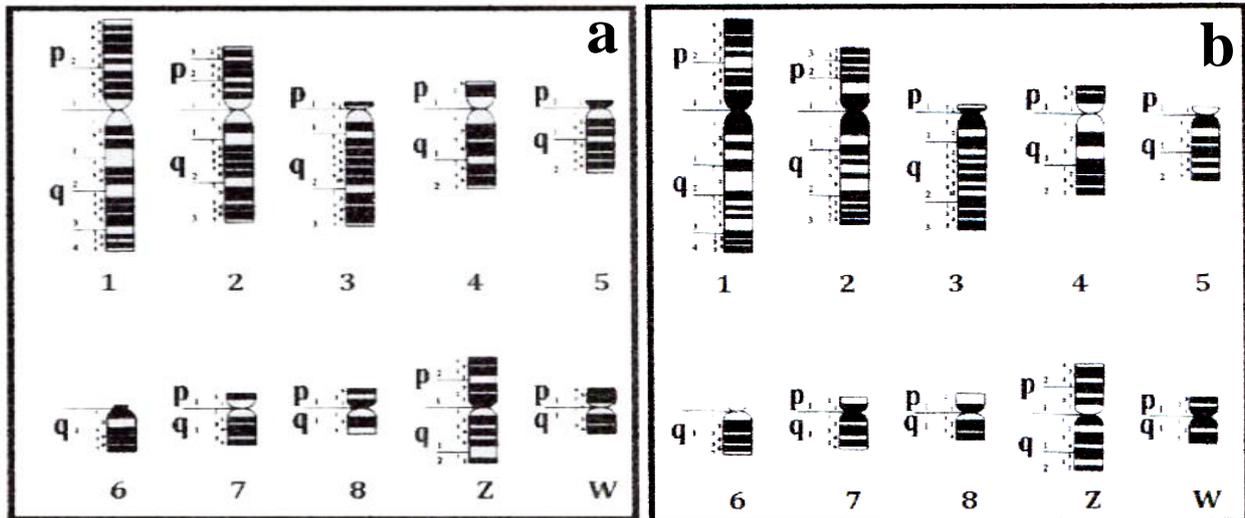


Figure N°15 : Idiogramme standard des 8 premières paires chromosomiques et les chromosomes sexuels (Z et W) de la poule domestique *Gallus domesticus* (a) : en bandes GTG, (b) en bandes RBG (Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999).

I.4 -PHYLOGENIE

La phylogénie est un système de classification qui a l'objectif de retracer l'histoire évolutive des organismes à travers l'établissement des arbres phylogénétiques et d'estimer le temps de divergence entre les organismes depuis leur dernier ancêtre commun (Harry, 2001; Brown, 2004). La phylogénie joue un rôle central dans de nombreux domaines, tel que la conservation, la nomenclature, la physiologie, l'évolution moléculaire et la biologie comparative (ce qui fait l'intérêt de notre étude) (Laurin, 2013).

Actuellement, vu que la structure des ADN mitochondriaux est relativement simple, leur organisation est conservée (par transmission maternelle) et que leur taux de mutations sont plus élevés que ceux de l'ADN nucléaire, ces ADN sont fréquemment utilisés pour la construction des arbres phylogénétiques, l'estimation des relations entre les groupes d'animaux, la génétique des populations et l'évolution moléculaire. Aujourd'hui, les génomes mitochondriaux de 109 espèces aviaires sont déterminés et disponibles sur la base de données GenBank (Kan *et al.*, 2010).

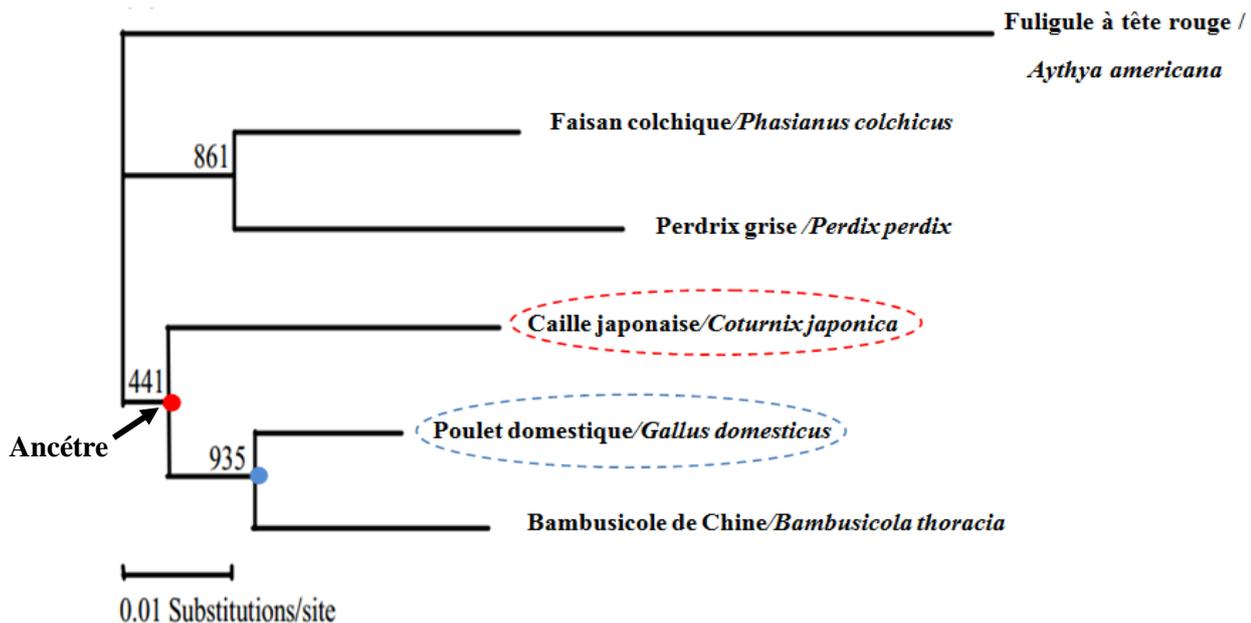
I.4.1- PHYLOGNIE DE LA CAILLE JAPONAISE ET DU POULET DOMESTIQUE

La caille japonaise et le poulet domestique, sont deux espèces étroitement liées ayant divergées il ya 35-46 millions d'années (Kawahara-Miki *et al.*, 2013). Elles appartiennent au même ordre (Galliformes) à la même famille (Phasianidae) et possèdent la même longueur du génome ($1,2 \times 10^9$ bp), ainsi qu'un caryotype similaire de $2n=78$ chromosomes, composé de

macrochromosomes morphologiquement distinguables (1-8) et les chromosomes sexuels (ZW) et des microchromosomes indiscernables. Des études cytogénétiques comparatives, ont révélé une homologie des chromosomes hautement conservée entre ces deux espèces avec seulement quelques réarrangements chromosomiques observés qui étaient essentiellement des inversions péricentriques dans les chromosomes 1, 2, 4 et 8 (Sasaki, 1981; Stock et Bunch, 1982; Shibusawa *et al.*, 2001; Roussot *et al.*, 2003).

Il est aussi intéressant de noter que, les homologies de séquence des gènes mitochondriaux entre la caille japonaise et le poulet domestique sont de 78,0 à 89,9%. En effet, le génome mitochondrial de la caille japonaise est un ADN circulaire constitué de 16 697 paires de bases (pb), un peu plus petit que celui du poulet qui est de 16 775 (Nishibori *et al.*, 2001).

L'analyse d'une séquence de 1143 pb du cytochrome b ainsi qu'une séquence de 1041 pb du gène de la sous unité 2 de NADH (Nicotinamide Adénine Déshydrogénase) de la caille japonaise, a montré qu'une espèce ancestrale a divergé pour donner en premier, le genre *Coturnix*, suivi de *Gallus* puis de *bambusicola*. La perdrix grise et le faisan colchique sont d'apparition plus récente (taux de substitutions plus élevé) que la caille japonaise (Figure 16) (Nishibori *et al.*, 2001).



⚠NB: L'échelle représentée par la barre verticale indique le taux de substitutions par site (mutations produites pendant l'évolution entre les différentes espèces).

Figure N°16: Arbre phylogénétique de la caille japonaise et du poulet domestique construit à partir de deux gènes mitochondriaux le cytochrome b et le NADH (Modifiée d'après Nishibori *et al.*, 2001).

En revanche, cette présente étude vise à établir le caryotype de la caille japonaise, afin de le comparer avec celui du poulet domestique (cité dans la littérature) et d'identifier d'éventuels réarrangements chromosomiques ayant survenus au cours de l'évolution de ces deux espèces domestiques. Dans un second temps des hypothèses d'ordre phylogénique seront proposées tout en répondant à la question posée: quelle est l'espèce qui est apparue en premier, la caille ou le poulet ?

I.4.2- LES REMANIEMENTS CHROMOSOMIQUES

On appelle des anomalies chromosomiques de structure, toute modification fonctionnellement importante de la structure chromosomique normale. Elles sont classées en fonction de leurs types cytologiques et de leurs conséquences phénotypiques. Les principaux types cytologiques sont : si le remaniement concerne deux chromosomes différents, donc c'est une translocation (réarrangement de segments de chromosomes). Par contre, s'il s'agit d'un seul chromosome, donc, c'est soit : une délétion (perte), une duplication, une inversion (rotation), ou une insertion....etc et en fonction de leur effet, on peut distinguer les anomalies de structure équilibrées (pas de perte ni de gain de matériel génétique) ou déséquilibrées (perte ou gain de matériel génétique, visible sur un caryotype classique) (Harry, 2001; Eberhard, 2005).

I.4.2.1-LES DELETIONS

Les délétions se traduisent par la perte d'un segment de chromosome ne portant pas de centromère. En effet, le segment de chromosome délété dit : acentrique (sans centromère) ne peut plus se déplacer et sera perdu. Les délétions ne mettent en jeu qu'un seul chromosome et peuvent être de deux types :

❖ Lorsque la délétion se situe en **position terminale**, on parle de déficience. Dans ce cas, il n'y a qu'une seule cassure chromosomique et le segment ne comportant pas de centromère est perdu (Figure 17a) (Harry, 2001; Eberhard, 2005).

❖ Lorsqu'il y a deux cassures chromosomiques, on parle de **délétion segmentaire** ou **interstitielle**, il y a alors perte du fragment situé entre les deux cassures (Figure 17b) (Harry, 2001; Eberhard, 2005).

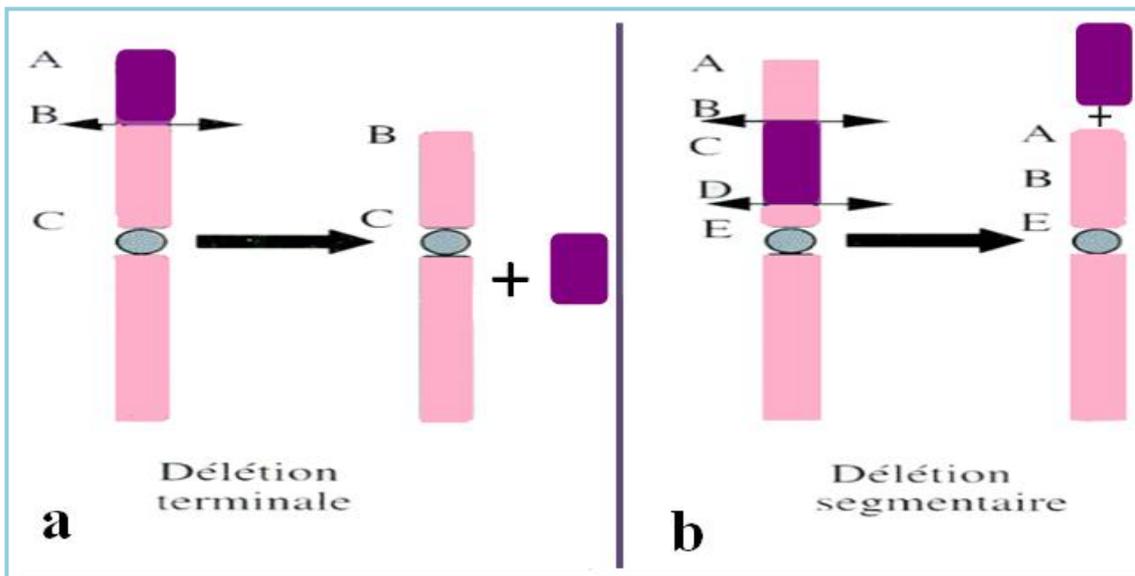


Figure N°17 : Délétion chromosomique (Modifiée d'après Harry, 2001)

I.4.2.2-LES DUPLICATIONS

Les duplications conduisent à une augmentation du matériel chromosomique et se traduisent par une répétition (une copie d'un fragment de chromosome). Une duplication peut être envisagée comme une insertion, mais la séquence insérée est une copie d'une région qui est déjà présente sur le chromosome receveur. Une répétition peut être:

- ❖ **Intrachromosomique** : elle se fait sur un même chromosome soit sur le même bras soit sur des bras distincts (Figure 18a).
- ❖ **Interchromosomique** : elle se fait sur un autre chromosome conduisant à un crossing-over inégal (Figure 18b) (Harry, 2001; Eberhard, 2005).

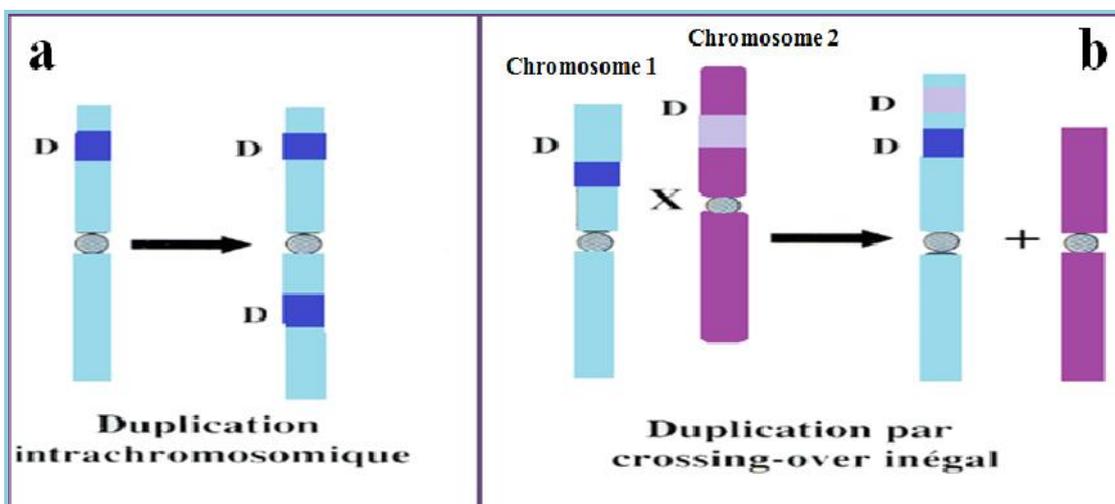


Figure N°18 : Duplication chromosomique (Modifiée d'après Harry, 2001).

I.4.2.3- LES INVERSIONS

Les inversions correspondent à un retournement d'un segment chromosomique de 180° . Dans ce cas, il y'a également une double cassure chromosomique dans deux régions différentes d'un même chromosome, mais non accompagnée d'une perte du matériel chromosomique, car le segment cassé est « recollé » après rotation. Les inversions ne concernent qu'un seul chromosome. Selon que le centromère est ou non impliqué dans l'inversion on distingue:

- ❖ Les inversions **paracentriques** : si le centromère n'est pas inclus dans l'inversion (Figure 19a).
- ❖ et les inversions **péricentriques** : si le centromère est inclus dans l'inversion. Dans ce cas, une inversion peut transformer un chromosome acrocentrique en un chromosome métacentrique et inversement (Figure 19b) (Harry, 2001; Eberhard, 2005).

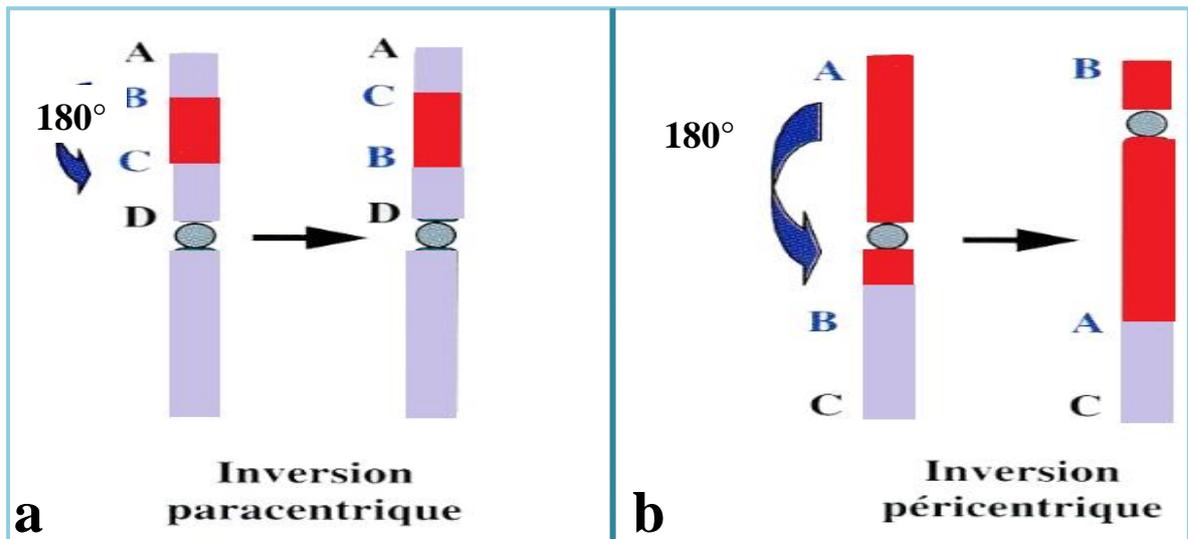


Figure N°19 : Inversion chromosomique (Modifié d'après Harry, 2001)

I.4.2.4- LES TRANSLOCATIONS

La translocation fait référence à un échange de segments chromosomiques. Elle peut résulter de la fusion centrique de deux chromosomes acrocentriques en formant un chromosome métaphasique (translocation robertsonienne) ou d'un échange de segments entre deux chromosomes (translocation réciproque). Lors de la fusion centrique, deux chromosomes entiers sont impliqués. Lors de la translocation réciproque, seule une partie de chacun des deux chromosomes est échangée. Il est important de préciser le point de cassure sur chacun des deux chromosomes participant à la translocation, qui est considérée équilibrée s'il n'y a

pas d'altération quantitative du matériel génétique, sinon elle est dite déséquilibrée (Figure 20) (Harry, 2001; Eberhard, 2005).

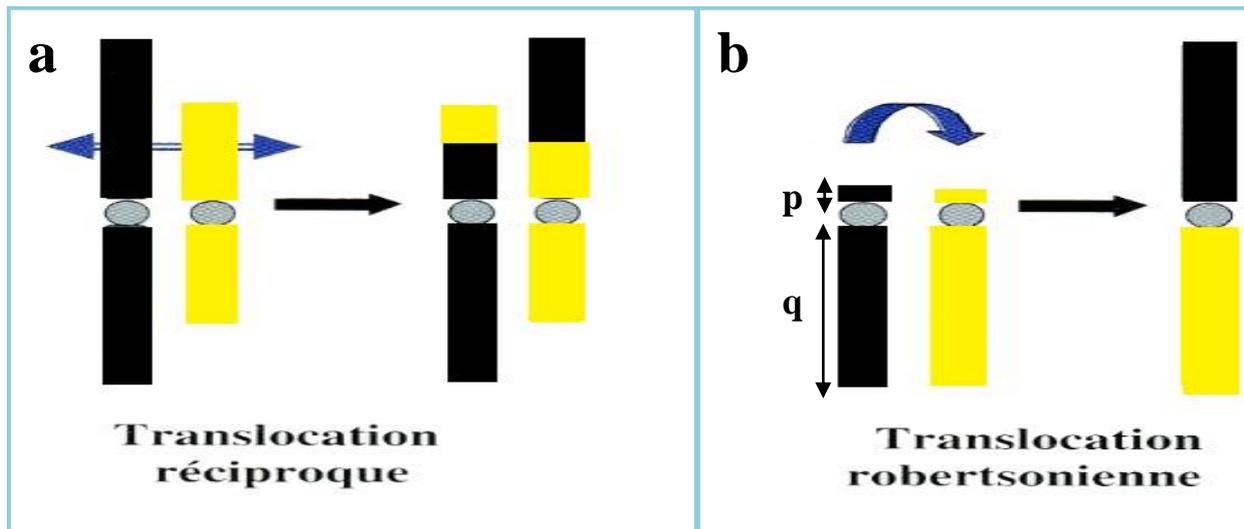
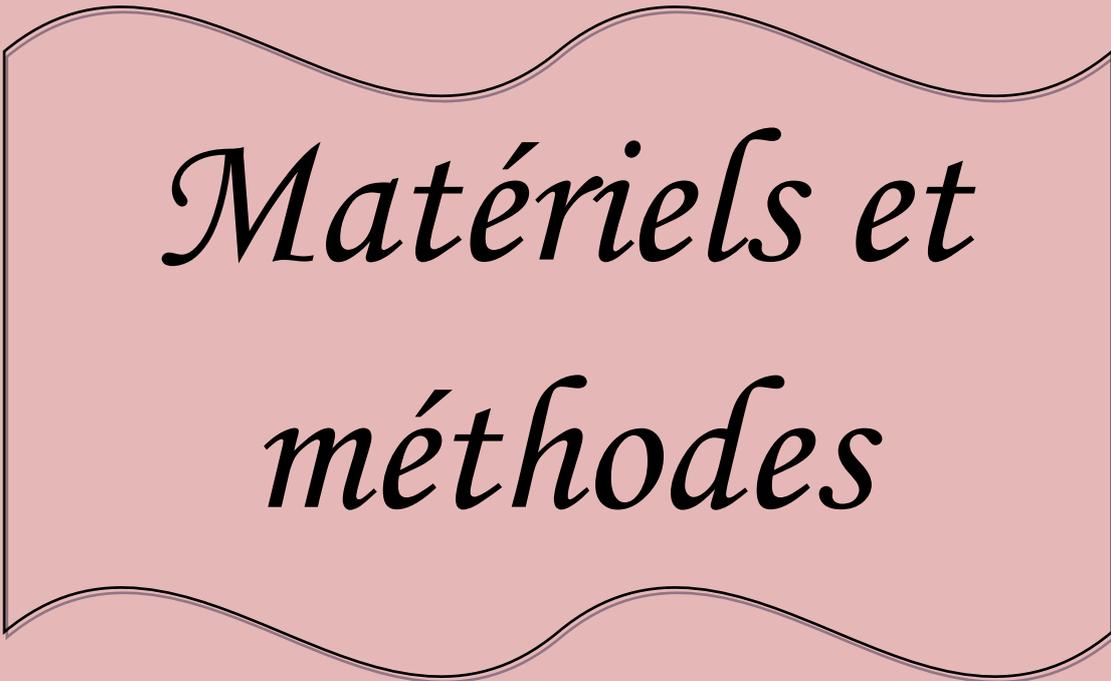


Figure N°20: Translocation chromosomique (Modifiée d'après Eberhard, 2005).



*Matériels et
méthodes*

II.1- LIEU DE TRAVAIL

Cette étude a été réalisée au niveau de deux laboratoires : au Laboratoire d'Ecologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université Abderrahmane MIRA à Bejaia (UAM-Bejaia) et au Laboratoire de Génétique du Développement de la Faculté des Sciences Biologiques à l'Université des Sciences et de la Technologie de Houari Boumediene (USTHB, Alger).

II.2- MATERIEL BIOLOGIQUE

II.2.1- ŒUFS FECONDES

Afin d'obtenir des embryons âgés entre 8 et 12 jours, deux lots d'œufs naturellement fécondés ont été utilisés. Le premier lot était composé de 29 œufs de caille japonaise *Coturnix japonica* issus du Centre Cynégétique de Zéralda (Alger) alors que le deuxième lot était de 17 œufs de la poule domestique *Gallus domesticus* (de souche ISA BROWN) provenant du couvoir ZIZI d'Aokas à Béjaia (Figure 21a et b).



Figure N°21 : Œufs fécondés, (a) : Œufs de la caille japonaise (**Originale, UAM-Bejaia**), (b) : Œufs de la poule domestique (**Couvoir ZIZI**).

II.3-METHODOLOGIE

La présente étude s'est basée essentiellement sur deux méthodes. La première consiste à incuber des œufs dans le but de suivre le développement embryonnaire chez la caille japonaise tout en le comparant avec la littérature. La deuxième, repose sur l'étude cytogénétique de la caille japonaise qui consiste à réaliser une culture cellulaire issue à partir d'organes d'embryons âgés entre 8 et 12 jours qui permet d'obtenir des étalements chromosomiques dans le but d'établir le caryotype de la caille japonaise puis de le comparer avec celui du poulet domestique dans un but phylogénétique.

II.3.1- SUIVI DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

II.3.1.1- CONSERVATION DES ŒUFS

Pour un bon déroulement du développement embryonnaire, les œufs doivent être d'abord triés. En effet, ceux qui étaient malformés, fêlés, ou très sales ont été éliminés.



Figure N°22: Position horizontale de l'œuf

Cependant, ceux légèrement sales ont été délicatement nettoyés avec un chiffon sec et propre. Ensuite, les œufs sélectionnés ont été placés sur des supports, en position horizontale (le gros bout à gauche) puis conservés à température ambiante comprise entre 13 et 15°C, dans un endroit bien aéré à l'abri de la lumière (Figure 22) (Castaing, 1979).

II.3.1.2- INCUBATION DES ŒUFS

L'incubation des œufs a été réalisée dans une étuve ventilée. La température de l'étuve doit être réglée à 37,5°C et chauffée 24 heures au préalable. Deux récipients remplis d'eau ont été mis à l'intérieur de l'étuve pour favoriser une atmosphère humide (Figure 23) (Castaing, 1979).



Figure N°23 : Œufs en incubation dans une étuve ventilée (Originale, UAM-Bejaia).

À partir du 2^{ème} jour d'incubation, le retournement des œufs est indispensable pour éviter que l'embryon n'adhère à la coquille, mais aussi pour assurer une bonne aération de l'œuf (coquille poreuse). En effet, des rotations ont été pratiquées au minimum deux fois par jour (½ tour le matin, ½ tour le soir avec des mains propres) du 2^{ème} au 14^{ème} jour d'incubation (Figure 24) (Castaing, 1979).

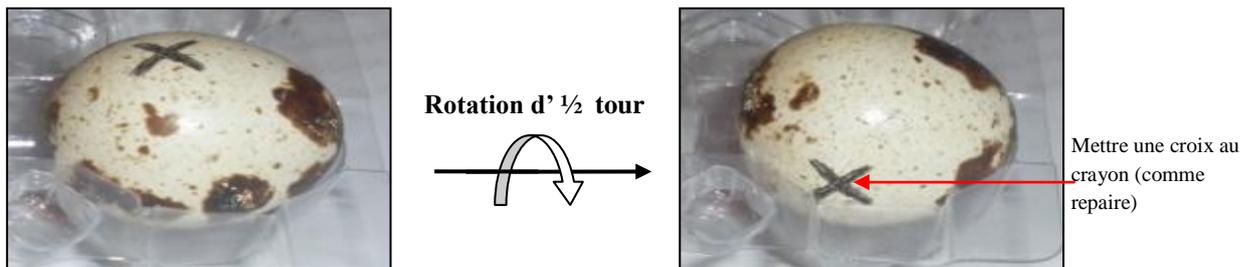


Figure N°24: Méthode de retournement des œufs (Originale, UAM-Bejaia).

II.3.1.3- MIRAGE

C'est l'observation par transparence à travers la coquille à l'intérieur de l'œuf. C'est une technique utile pendant l'incubation, car elle permet de détecter les œufs clairs (infertiles) et les embryons morts, qui génèrent des gaz toxiques. Le mirage permet également d'évaluer le bon développement de la chambre à air (augmentation de son volume). Cette technique peut être réalisée à partir de 5^{ème} jour d'incubation. L'œuf à mirer est ainsi retiré de l'incubateur et placé sur le mire-œufs dans une pièce sombre (Figure 25) (Wageningen *et al.*, 2004).

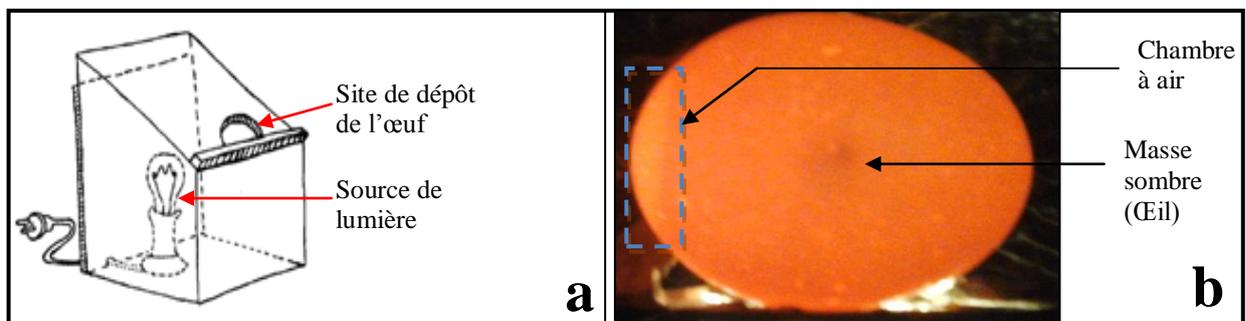


Figure N°25: Mirage des œufs (a) :Mire-œufs artisanal (Wageningen *et al.*, 2004), (b) Mirage réalisé sur un œuf de poulet (Originale, UAM-Bejaia).

✍ **NB:** Vu que la coquille de la caille japonaise est tachetée et que sa taille est petite, le mirage a été effectué uniquement sur les œufs de poulet.

II.3.1.4-TECHNIQUES D'OBSERVATION

Deux techniques d'observation ont été utilisées dans le présent travail :

3.1.4.1-TECHNIQUE *IN VIVO*

C'est une technique qui permet d'observer les embryons à des stades précoces durant leur genèse, ceci par l'ouverture d'une petite fenêtre à la surface de la coquille des œufs.

Protocole

L'œuf est retiré de l'incubateur et placé sur un support tout en gardant la même position, en prenant soin de ne pas le secouer, ni le renverser pour éviter de déplacer l'embryon qui se trouve à la surface du jaune situé directement sous la coquille. Il est préférable de faire descendre l'embryon en effectuant un petit trou sur le petit bout de l'œuf, pour prélever environ 1 ml d'albumen en utilisant une micropipette de 1000 µl (embout stérile). Le trou a été rebouché avec de la paraffine liquéfiée déposée à l'aide d'un pinceau. Ensuite, au moyen d'une pince et des ciseaux, une fenêtre a été délicatement découpée sur la coquille. L'observation de l'embryon est donc possible, soit sous la loupe binoculaire, ou à l'œil nu. La manipulation de l'œuf et la prise des photos ont été faites très rapidement afin d'éviter la perte des embryons pendant l'opération (Arrêt cardiaque du au choc thermique) (Figure 26).

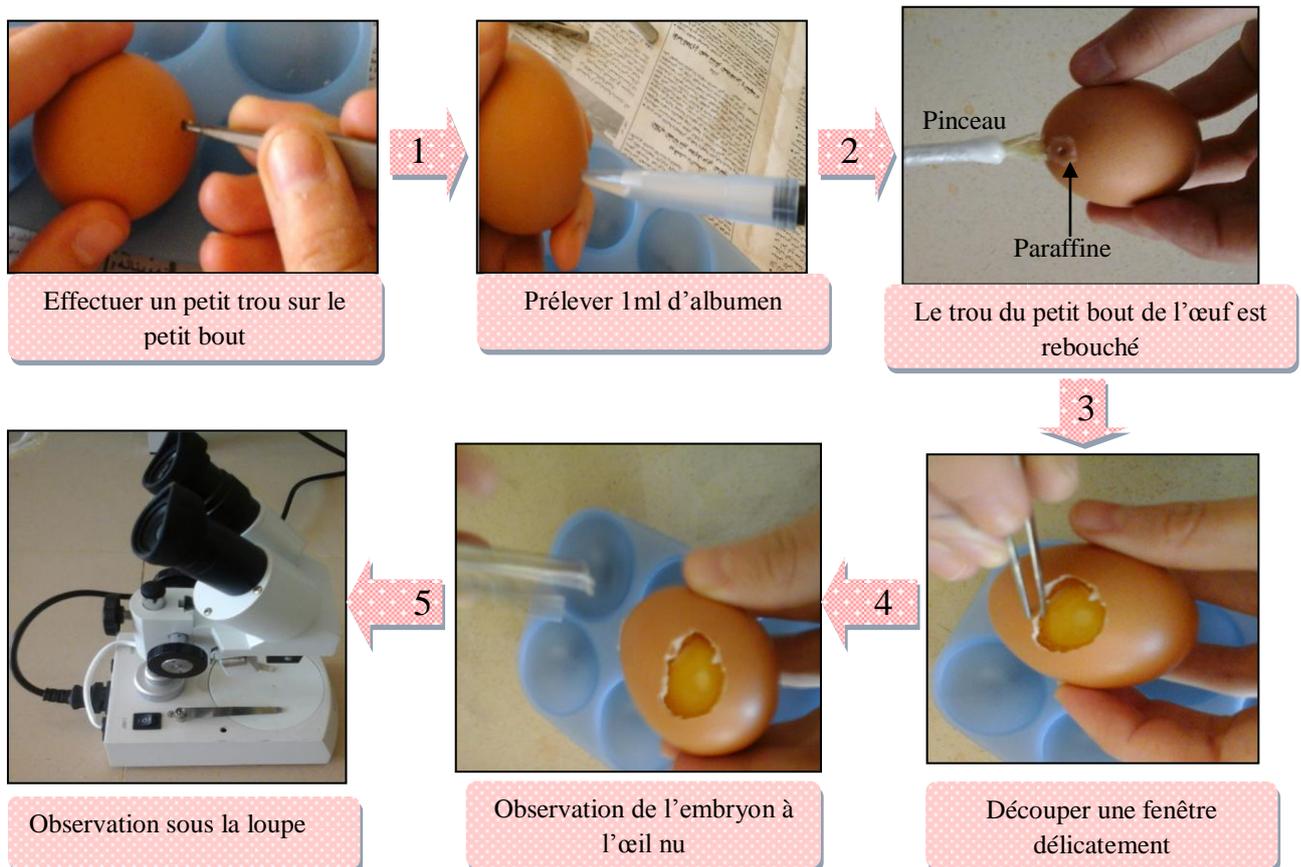


Figure N°26: Etapes d'ouverture de la fenêtre de l'œuf (Originale, UAM-Bejaia).

À l'effet d'observer et de suivre l'évolution des différents stades ultérieurs du développement embryonnaire, les fenêtres réalisées sur les coquilles ont été refermées et les œufs ont été remis dans l'incubateur. Pour ce faire; deux techniques peuvent être utilisées selon le cas:

Si l'observation devrait être réalisée quelques heures seulement après l'ouverture de l'œuf, il suffirait de refermer la fenêtre à l'aide d'un ruban adhésif transparent de 5 cm de largeur.

Par contre, si l'observation devrait s'effectuer après quelques jours, dans ce cas, il serait nécessaire de refermer soigneusement l'ouverture avec un anneau de paraffine déposée sur la fenêtre, en collant ses bords à l'aide d'une spatule à chaud sur la coquille de l'œuf (Figure 27).

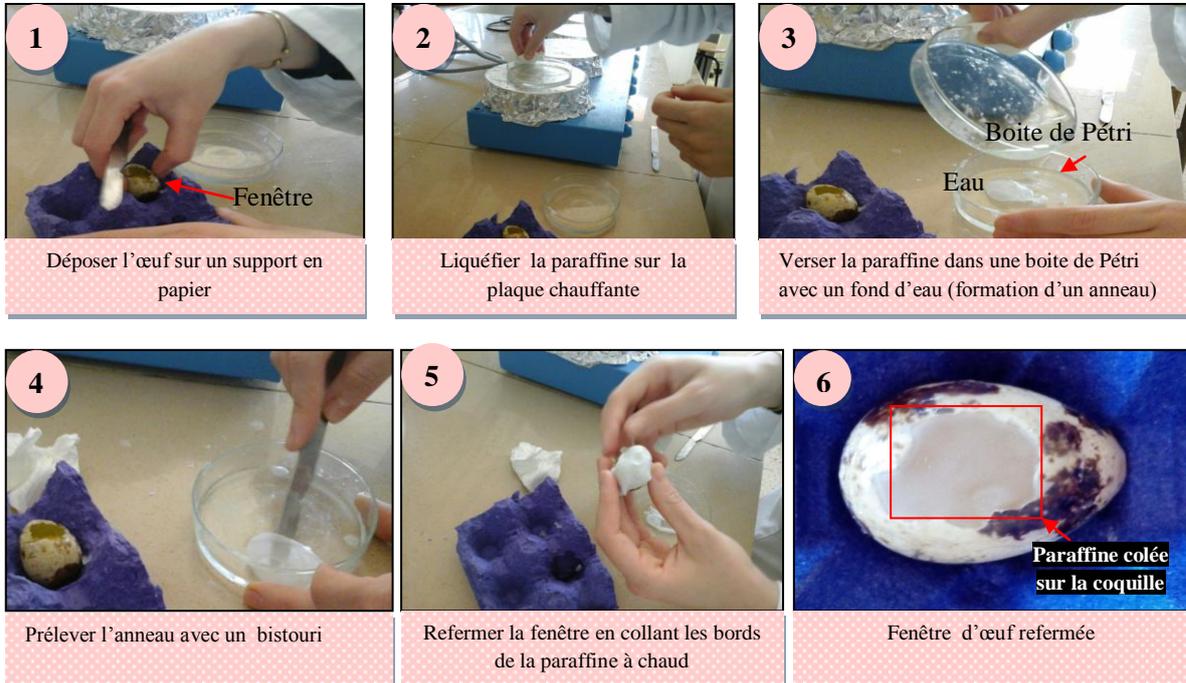


Figure N°27: Etapes de fermeture de la fenêtre de l'œuf (Originale, UAM-Bejaia).

3.1.4.2-TECHNIQUE *IN VITRO*

La technique *In vitro* est réalisée au moment où l'embryon est jugé mort (immobile) ou lorsque les embryons ont atteint un stade de développement assez avancé (embryon assez grand) ou quand la fenêtre ne suffit plus pour observer l'embryon en entier. L'œuf est donc cassé dans une boîte de Pétri afin d'observer à l'œil nu les membres, les annexes embryonnaires ou encore les organes internes.

Protocole

La manipulation se fait soit à sec sur un support en verre (Boîte de Pétri) soit en milieu liquide. Dans ce cas, l'œuf est cassé dans une boîte de Pétri contenant du liquide physiologique (1 litre d'eau distillée + (9) g de NaCl). L'embryon est ensuite détaché de ses annexes à l'aide d'une paire de ciseaux et d'une pince, puis prélevé avec un verre de montre et placé dans une autre boîte de pétri contenant du liquide physiologique propre.

L'observation des embryons est réalisée soit à la loupe binoculaire (sur fond noir), soit au microscope photonique à faible grossissement, ou encore à l'œil nu (Figure 28).

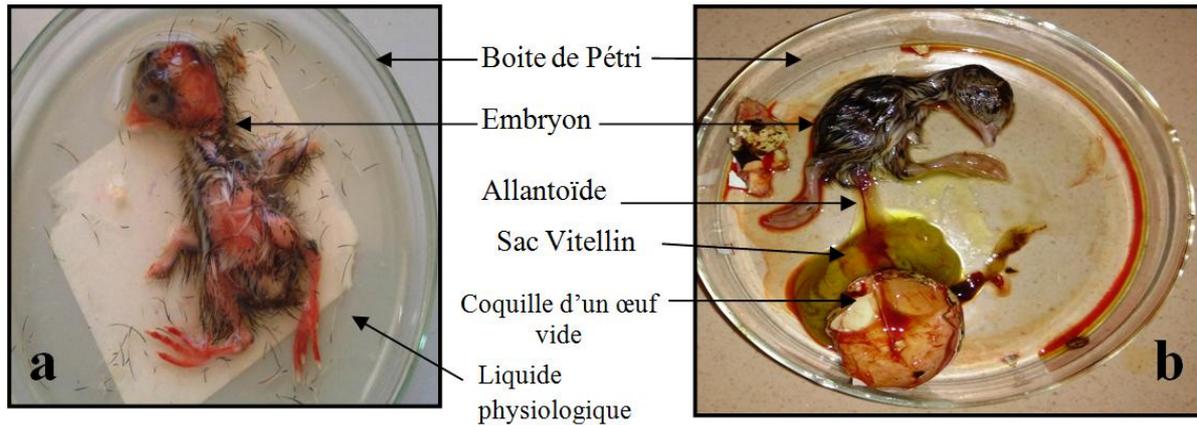


Figure N°28: Observation d'un embryon de la caille japonaise par la technique *In vitro*. (a) en milieu liquide (b) à sec (Originale, UAM-Bejaia).

II.3.1.5- REALISATION DE PREPARATIONS DURABLES D'EMBRYONS DE CAILLE JAPONAISE *COTURNIX JAPONICA*

Dans le cas où l'embryon est sacrifié *In vitro*, il sera aussitôt fixé dans le but de le conserver (à long terme) dans l'état le plus proche possible de l'état vivant pour d'éventuelles études (histologiques ou autres).

Pour ce faire, l'œuf entier est versé dans une boîte de Pétri. L'embryon est débarrassé de ses annexes et nettoyé avec du liquide physiologique ensuite fixé dans un récipient contenant du liquide de Clarke (3 volumes d'éthanol+1 volume d'acide acétique) pendant 10-15 min. Enfin, il est déplacé dans un bocal en verre étiqueté (nom de l'espèce et l'âge estimé de l'embryon) contenant de l'alcool à 95%.

II.3.2-CULTURE CELLULAIRE

Dans un second temps, la technique de culture cellulaire a été réalisée afin d'obtenir des cellules en métaphase, stade auquel les chromosomes deviennent de plus en plus compacts et courts, ces derniers sont issus de fibroblastes d'embryon de la caille japonaise. Vu le manque de matériel nécessaire, la majorité de ses étapes ainsi que l'étalement chromosomique n'ont pas pu être réalisés à l'Université de Bejaia, mais au niveau de l'USTHB à Alger, par notre promotrice.

II.3.2.1-PRELEVEMENT ET DILACERATION DES ORGANES

 Protocole

Après environ 8-9 jours d'incubation, l'œuf est retiré de l'incubateur et mis dans un endroit stérile (sous une hôte à flux laminaire) désinfecté à l'alcool, puis cassé dans une boîte de Pétri stérile (Figure 29). À l'aide d'une paire de ciseaux et d'un scalpel, l'embryon est débarrassé de ses annexes, retourné sur son dos, décapité puis disséqué. Les organes internes (poumon, cœur, rein, foie...) ont été récupérés (Figure 30). Dans le cas où l'embryon est petit, les organes ne seront pas distincts, donc toute la masse embryonnaire sera dilacérée.



Figure N° 29 : Hôte à flux laminaire (USTHB).

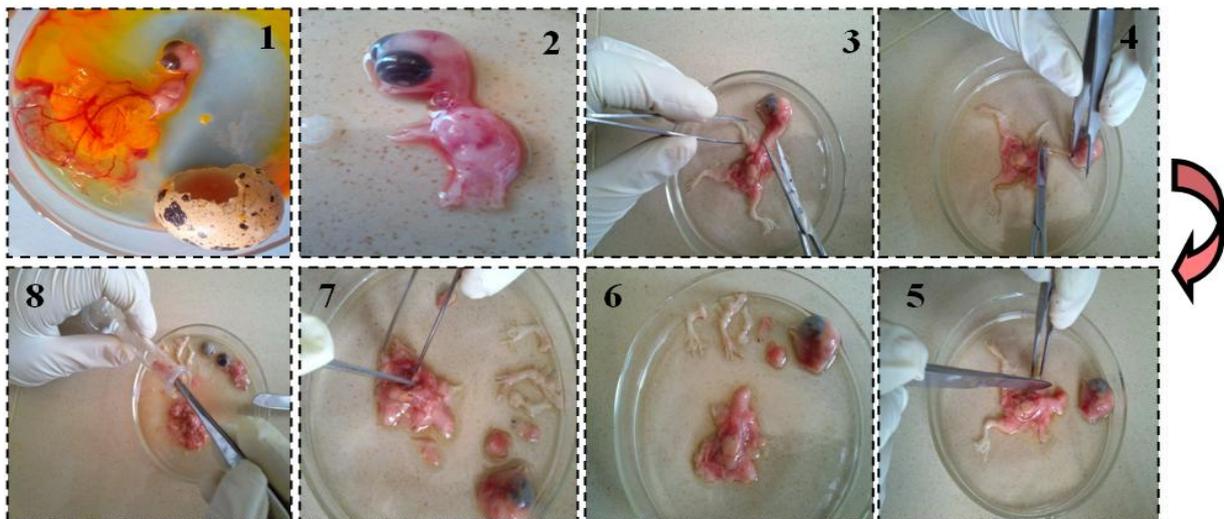


Figure N°30 : Dilacération des organes d'un embryon de caille japonaise âgé de 9 jours (Originale, UAM-Bejaia).

II.3.2.2-MISE EN CULTURE

Les organes récupérés ont été dilacérés au moyen d'une pince et d'une lame de bistouri. Cette action doit être effectuée rapidement pour garder les cellules à l'état vivant. Par la suite, les petits fragments d'organes ont été mis dans une fiole de 25 ml contenant de la trypsine à 0.05% (Pour la composition, voir annexe) avec un barreau magnétique. La préparation a été placée sur un agitateur pendant 10 à 15 min à une vitesse modérée (pour une bonne dissociation cellulaire).

L'action de la trypsine est arrêtée par l'ajout de (1ml) de milieu de culture: Roswell Park Memorial Institute (RPMI) avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) (pour la composition, voir annexe). Le tout est transféré dans un tube de 15ml puis centrifugé à 1200 tours par minute « rpm » pendant 10 min. Le surnageant est éliminé alors que le culot est remis en suspension dans des boîtes de culture de 25 cm² avec environ 7ml de milieu de culture (réchauffée au préalable à 37°C) au bain marie. Les boîtes sont mises dans l'étuve réglée à 41°C (Figure 31).

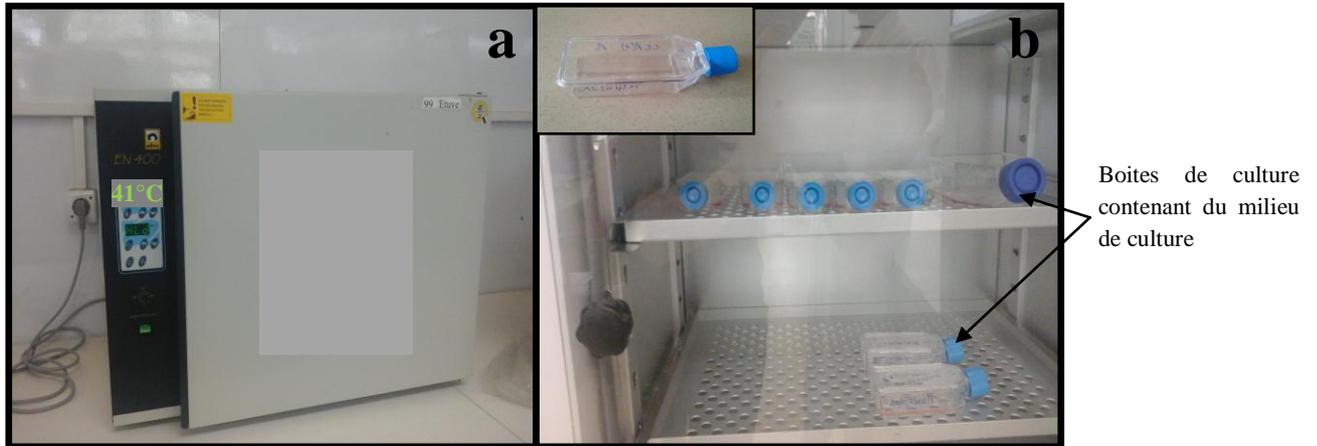


Figure N°31: Mise en culture (a) : Etuve réglée à 41°C (b) : boîtes de culture dans l'étuve (photos prises à l'USTHB, Alger).

NB:

1. L'observation des cellules au microscope inversé, quelques jours après la mise en culture, a révélé l'adhésion d'un grand nombre de cellules au fond des boîtes formant un tapis de fibroblastes. Lorsque les cellules sont confluentes, une trypsination est effectuée pour les dissocier et les détacher du fond de la boîte. Au moment où les cellules sont décollées, elles sont centrifugées puis remises en suspension dans du milieu réparties dans des boîtes de 75cm². Chaque trypsination (repiquage) correspond à un passage.
2. La synchronisation du cycle cellulaire à l'aide de la thymidine (précurseur de la thymine) permet d'accumuler un maximum de cellules au stade prométaphase. En effet, l'addition de la thymidine en excès dans le milieu de culture provoque le blocage réversible du cycle cellulaire pendant la phase S (phase de synthèse d'ADN). Ce phénomène est induit par l'inhibition de la synthèse du 2'-désoxycytidine, un des désoxyribonucléotide triphosphate nécessaire à la réplication de l'ADN. La levée de l'inhibition par la suite avec la BSS⁺ (Hank's Balanced Salt Solution), permet le

redémarrage de la synthèse de l'ADN et les cellules passent de manière assez synchrone, par les différents stades conduisant à la mitose. Ceci permet de récolter un grand nombre de cellules en prophase ou en prométaphase grâce à un contrôle de cycle cellulaire. Après la levée de l'inhibition, une observation des cellules sous microscope inversé permet de surveiller le cycle cellulaire grâce au comptage des doublets (cellules en division réfringentes), la récolte des cellules est favorisée au moment où ces doublets cellulaires atteignent un nombre maximal.

II.3.2.3-RECOLTE

Afin d'obtenir des préparations chromosomiques, il faut récolter les cellules au stade de la mitose et les faire gonfler par un traitement hypotonique pour avoir une bonne dispersion des chromosomes. Quand le nombre de cellules rondes en division est assez important, une trypsination à 0.05% est effectuée sur des boîtes de 75 cm² pendant 5 min à une température de 41°C, puis un rinçage est effectué avec une solution de tampon Phosphate Salin (PBS⁻). Au moment où les cellules se sont décollées, l'activité de l'enzyme est inhibée par l'ajout de milieu de culture (RPMI) contenant 10% de SVF (voir annexe) ensuite la suspension a été transférée dans un tube de 15 ml avec 30 µl de colchicine et centrifugé 10 min à 1200 rpm. La colchicine exerce un effet inhibiteur sur la polymérisation des fibres du fuseau mitotique sur lesquels se fixent les centromères des chromosomes qui empêchent la transition de la métaphase à l'anaphase.

II.3.2.4 Choc hypotonique

Cette étape consiste à récupérer le culot obtenu et le remettre dans une solution hypotonique (voir en annexe) préchauffée à 37°C. La suspension est ensuite incubée dans un bain marie à (37°C pendant 13 min), ce qui entraîne le gonflement des cellules par effet osmotique. Ce choc facilite l'éclatement des membranes plasmiques des cellules, ce qui entraîne la dispersion des chromosomes, qui seront fixés et étalés sur des lames propres.

II.3.2.5-FIXATION

La fixation permet de conserver la structure interne des cellules et de préparer ces dernières au marquage chromosomique. Une préfixation a été effectuée par 1ml de fixateur (voir en annexe) pendant 5 min à 37°C dans un milieu hypotonique. Une fixation a été réalisée après centrifugation de la suspension cellulaire pendant 10 min à une vitesse de 1200 rpm, puis le culot a été remis dans 6 ml de fixateur à 4°C pendant 15 min, par la suite, une nouvelle

centrifugation a été effectuée pendant 10 min à 1200 rpm, le culot est repris dans 6 ml de fixateur, les tubes sont laissés à 4°C pendant 15 min jusqu'à une nuit maximum. Enfin, l'étalement de l'échantillon biologique (chromosome) sur les lames sera ainsi possible.

II.3.2.6-ÉTALEMENT CHROMOSOMIQUE

Afin d'obtenir des préparations chromosomiques, 2 à 3 gouttes de la suspension cellulaire sont laissées tomber d'une hauteur de 10 cm sur des lames préalablement lavées et mises dans de l'eau froide. Elles ont été séchées sur un portoir pendant 24 heures maximum.

✍ **NB** : Ces étalements chromosomiques peuvent être conservés pendant longtemps (pour des colorations ultérieures). En effet, les lames ont été congelées aussitôt séchées. Celles à colorer doivent vieillir.

II.3.2.7-TECHNIQUES DE MARQUAGES CHROMOSOMIQUES

Le marquage chromosomique en bandes GTG, l'observation des lames, ainsi que le découpage des chromosomes ont été réalisés au niveau du Laboratoire d'Ecologie, A-MIRA, Bejaia.

3.2.7.1-COLORATION CONVENTIONNELLE

La coloration au Giemsa (dite: conventionnelle) était la coloration la plus utilisée (le standard) avant l'apparition des techniques en bandes. Cette méthode permet d'avoir une idée précise de la morphologie générale des chromosomes, elle est également utilisée pour révéler le marquage chromosomique produit par certains traitements (digestion à la trypsine...etc.) (**Ladjali, 1994 ; Ladjali et al., 1995**).

☞ **Principe**

Le Giemsa est le produit de mélange de six groupes de colorants, principalement des thiazines chargés positivement. Ces derniers interagissent avec le groupement phosphate chargé négativement de l'ADN induisant une diminution de la longueur d'onde d'absorbance du colorant qui passe du bleu pâle au bleu foncé (**Popescu, 1998**).

✍ **Protocole**

Les lames ont été rincées à l'eau courante puis incubées dans la solution de coloration (Giemsa) à 6% pendant 10 à 20 minutes à température ambiante. Elles ont été ensuite rincées abondamment à l'eau de robinet puis à l'eau distillée. Les lames ont été séchées à l'air libre et observées au microscope photonique en lumière blanche (Gx40 et x100).

3.2.7.2-TECHNIQUE DE MARQUAGE EN BANDES GTG (BANDES G-TRYPSINE-GIEMSA)

☞ Principe

Dans cette technique, une dénaturation des protéines chromosomiques est réalisée avec de la trypsine, ensuite les chromosomes sont colorés au moyen du Giemsa. Chaque paire de chromosomes homologues possède une distribution caractéristique de bandes claires et sombres.

✍ Protocole

Pour obtenir la trypsine (à 0,25%), une quantité de 0,25g de trypsine en poudre a été dissoute dans 100 ml de PBS⁻. Le mélange a été mis dans un Bécher contenant un barreau magnétique et placé sur l'agitateur à une vitesse modérée. Ensuite, la solution de Giemsa a été préparée (pour un volume de 25ml=1,5 ml de colorant Giemsa a été mélangé avec 0.75ml de Tampon phosphate et 22,75 ml d'eau distillée).

Les lames à colorer ont été immergées dans la trypsine (à 0,25 %) pendant 12 secondes puis rincées dans un bain de PBS⁻ (pour bloquer l'action de l'enzyme). Ces lames ont été ensuite colorées avec la solution de coloration pendant 15 à 20 min, lavées abondamment à l'eau de robinet puis à l'eau distillée et enfin asséchées à l'air libre (Figure 32 et 33).



- 1 : Eau distillée
- 2 : Solution PBS⁻
- 3 : Trypsine en poudre
- 4 : Solution de coloration (Giemsa)
- 5 : Lames séchées

**Figure N°32 : Produits utilisés en coloration
(Originale, UAM-Bejaia).**

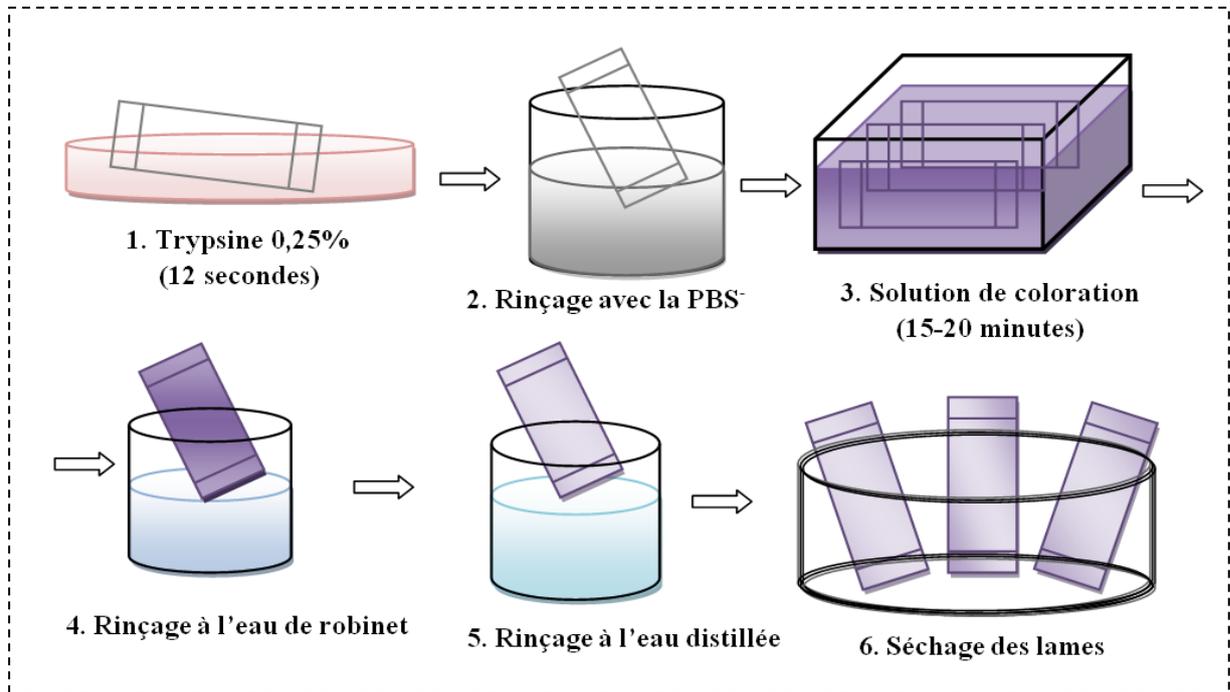


Figure N°33 : Etapes de la Technique de marquage en bandes GTG (Originale, UAM-Bejaia).

II.3.2.8- OBSERVATIONS DES LAMES SOUS MICROSCOPE PHOTONIQUE

Après la coloration et le séchage, les lames ont été observées et analysées sous un microscope photonique au grossissement (x40) pour localiser les métaphases, puis au grossissement (X 100) pour la prise des photos (à l'huile à immersion). Un appareil photos de type (Lumix : 12 Megapixels) a été utilisé dans la présente étude pour la prise en photos des métaphases colorées (Figure 34).



Figure N°34 : Observation des lames sous microscope photonique (Originale, UAM-Bejaia).

II.2.3- ETABLISSEMENT DES CARYOTYPES

L'établissement du caryotype de la caille japonaise *Coturnix japonica* a été réalisé après la prise des photos des métaphases colorées. Les chromosomes ont été découpés à l'aide du logiciel Adobe Photoshop CS5, puis organisés en paires, suivant la taille, la position du centromère, ainsi que le nombre de bandes GTG. Les paires chromosomiques sont ensuite classées selon un ordre décroissant (du plus grand au plus petit). Le caryotype de la caille japonaise ainsi établi a été ensuite comparé avec celui du poulet domestique *Gallus domesticus*.



*Résultats et
discussions*

III.1- MATERIEL BIOLOGIQUE

III.1.1- EFFECTIFS DES ŒUFS ET D'EMBRYONS DE LA CAILLE JAPONAISE

Sur un total de 29 œufs de caille japonaise *Coturnix japonica*, on a pu suivre le développement de plusieurs embryons à des stades avancés (jusqu'au 17^{ème} jour d'incubation). On constate que l'effectif des embryons vivants était assez réduit par rapport au nombre total des œufs mis à notre disposition (Tableau II).

↳ **Tableau II** : Effectifs du matériel biologique

Type d'œufs	Œufs de caille
Nombre total	29
Œufs infertiles	8
Embryons vivants	10
Embryons morts (à différents stades)	11

En effet, on a eu de nombreux cas de mortalité dus à plusieurs causes, parmi lesquelles on peut citer, les coupures d'électricité au niveau de l'université qui ont influé directement sur le développement des futurs cailleteaux (arrêt du fonctionnement de l'étuve pendant des heures). De plus, la ventilation de l'étuve est tombée en panne pendant dix jours. Cela a engendré un étouffement (léthal) des embryons. En 3^{ème} lieu, le retard occasionné par l'insuffisance de places à l'intérieur de l'étuve pour incuber les œufs. En effet, on ne pouvait pas incuber les 29 œufs en même temps dans une étuve. On a du attendre environ 21 jours pour lancer d'autres lots. Or, ce temps perdu a été un facteur fatal pour les œufs stockés (la période de pré-incubation a été dépassée de vingt jours, en plus des variations de température) (Tableau III). Dès le lancement des derniers œufs, on a remarqué qu'aucun embryon ne s'est développé. Néanmoins, malgré toutes ces conditions défavorables empêchant ainsi le bon déroulement du développement embryonnaire de la caille japonaise *Coturnix japonica*, on a pu obtenir plusieurs stades.

↳ **Tableau III :** Troubles influençant le développement embryonnaire (Modifiée d'après Wageningen *et al.*, 2004).

Cause probable	Prévention
Troubles de la mort des embryons	
a. Œufs trop vieux; conservés ou transportés dans de mauvaises conditions.	Il ne faut pas utiliser des œufs datant de plus d'une semaine
b. Ventilation insuffisante	Il faut aérer la couveuse
c. Trop peu d'humidité.	Il faut contrôler l'humidité; ajouter des récipients d'eau, ou un torchon humide
Poussins bien développés mais pas d'éclosion (ne parviennent pas à casser la coquille).	
a. Mauvaise humidité a.1: Air trop sec: chambre à air trop grande a.2: Air trop humide: chambre à air trop petite	a.1) Ajouter des récipients d'eau ou vaporiser plus souvent. a.2) Il faut enlever quelques récipients d'eau.

III.2- INCUBATION DES ŒUFS ET SUIVI DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

III.2.1- LES STADES DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE OBTENUS

Les différents stades de développement embryonnaire obtenus pour la caille japonaise sont résumés dans le Tableau IV.

↳ **Tableau IV :** Tableau récapitulatif des stades de développement de la caille japonaise obtenus jusqu'au 17^{ème} jour d'incubation (UAM, Béjaia).

Embryons	Temps d'incubation	Estimation de l'âge selon Ainsworth <i>et al</i> (2010)	Stade selon Hamburger-Hamilton (1951) correspondant
1	5 jours	5 jours	27
2	7 jours	6,5 jours	32
3	8 jours	8 jours	34
4	9 jours	8-9 jours	36
5	10 jours	9,5 jours	37
6	12 jours	11 jours	40
7	14 jours	14 jours	43
8	15 jours	15-16 jours	44
9	17 jours	16-16,5 jours	45

☞ Les 9 stades observés ont été pris en photos, légendés, comparés avec la littérature et présentés comme suit (Figures 35-43) :

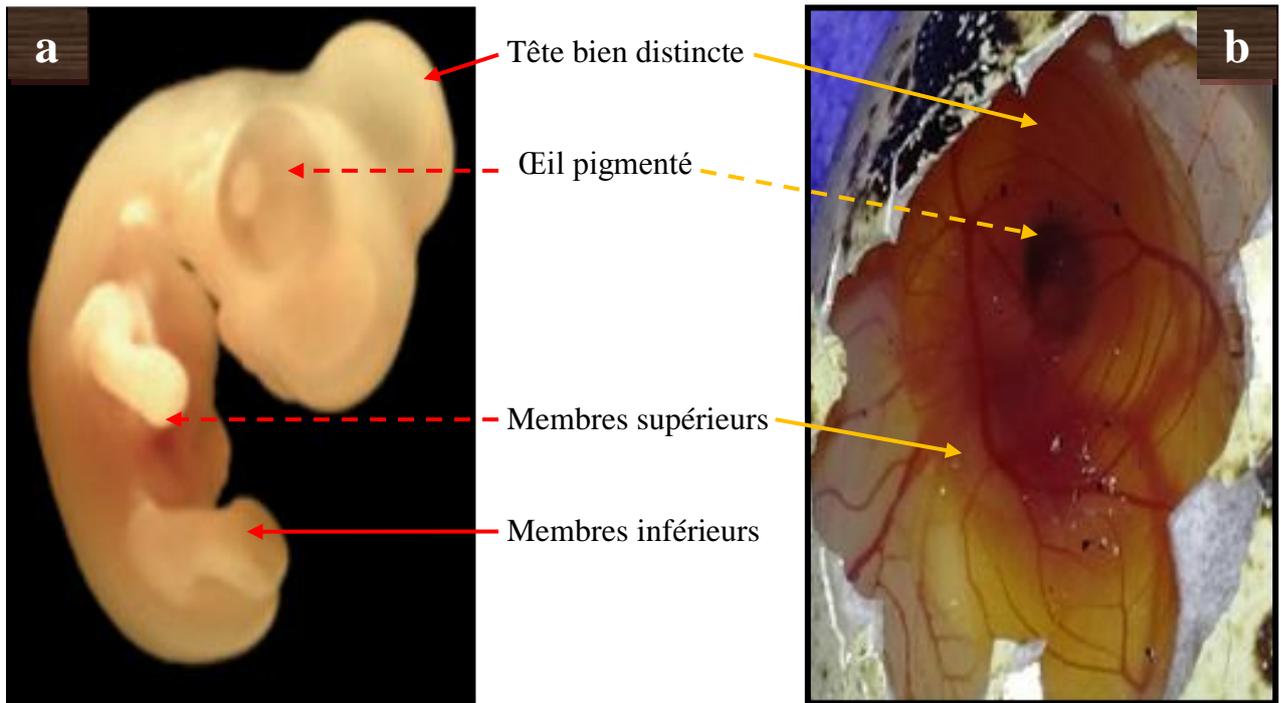


Figure N°35 : Embryon de caille japonaise *Coturnix japonica* âgé de 5 jours (Stade 27 HH) :
 (a) selon Ainsworth *et al* (2010), (b) Originale (UAM, Bejaia).

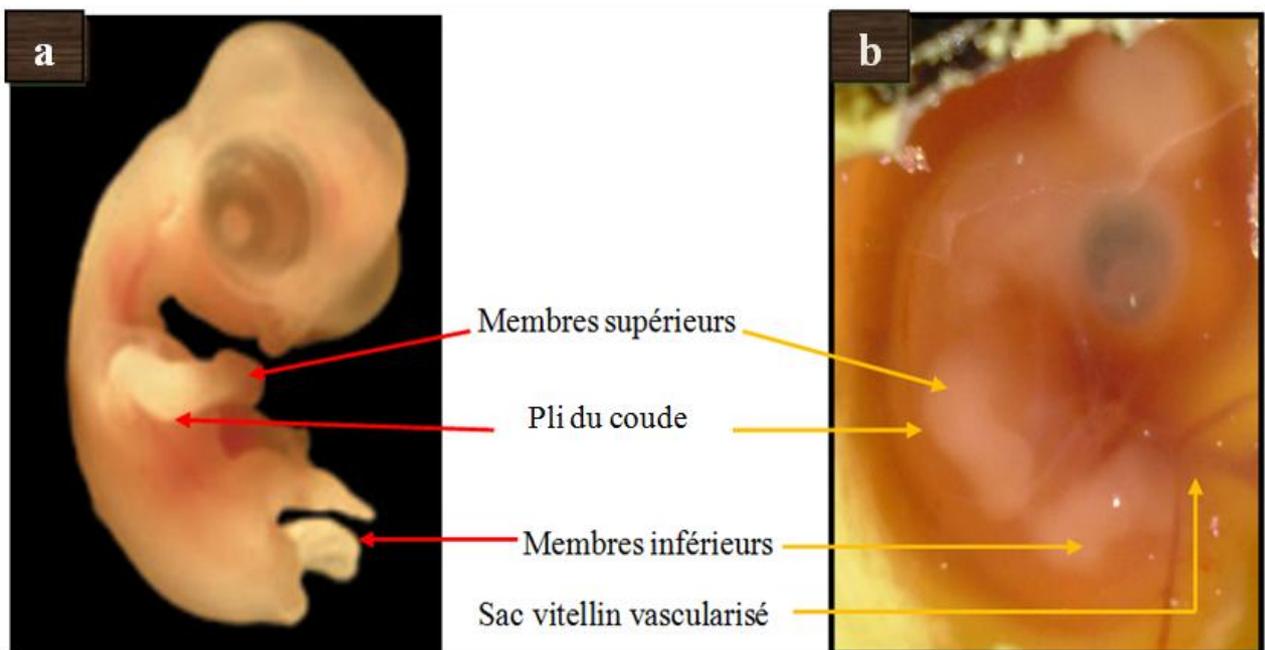


Figure N°36 : Embryon de caille japonaise *Coturnix japonica* âgé de 7 jours (stade 32 HH) :
 (a) selon Ainsworth *et al* (2010), (b) Originale (UAM, Bejaia).

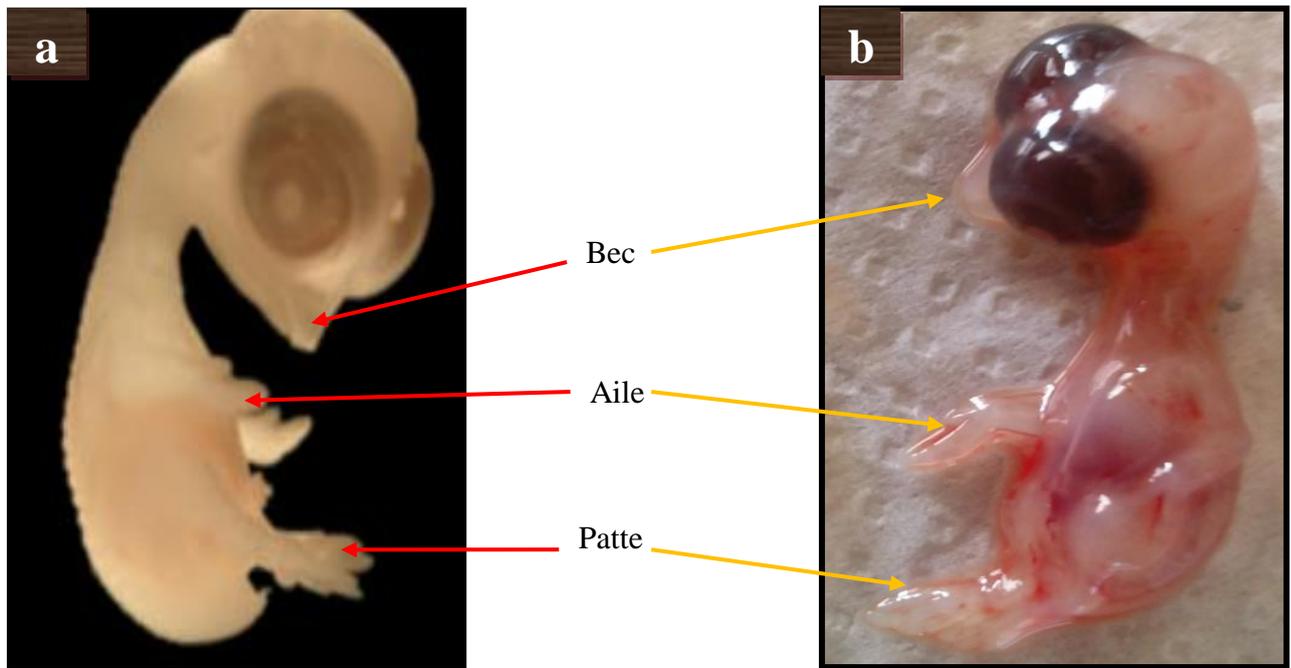


Figure N°37: Embryon de caille japonaise *Coturnix japonica* âgé de 8 jours (Stade 34 HH) :
 (a) selon Ainsworth *et al* (2010), (b) Originale (UAM, Bejaia).

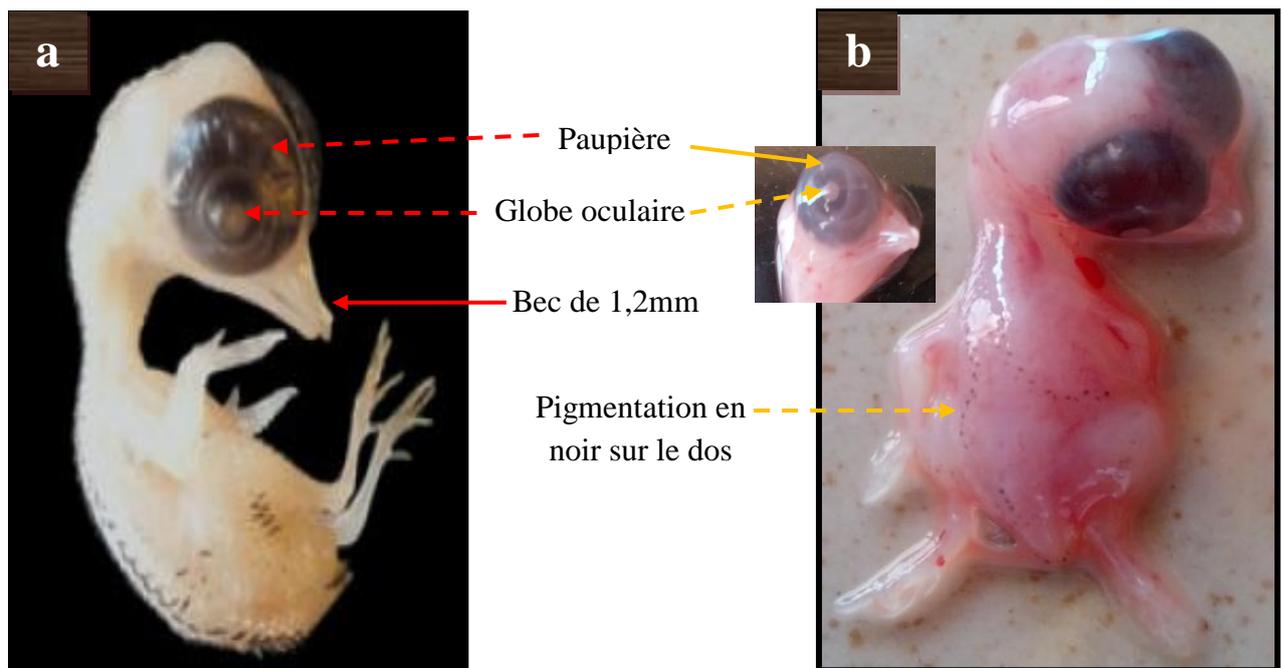


Figure N°38 : Embryon de caille japonaise *Coturnix japonica* âgé de 9 jours (Stade 36 HH):
 (a) selon Ainsworth *et al* (2010), (b) Originale (UAM, Bejaia).

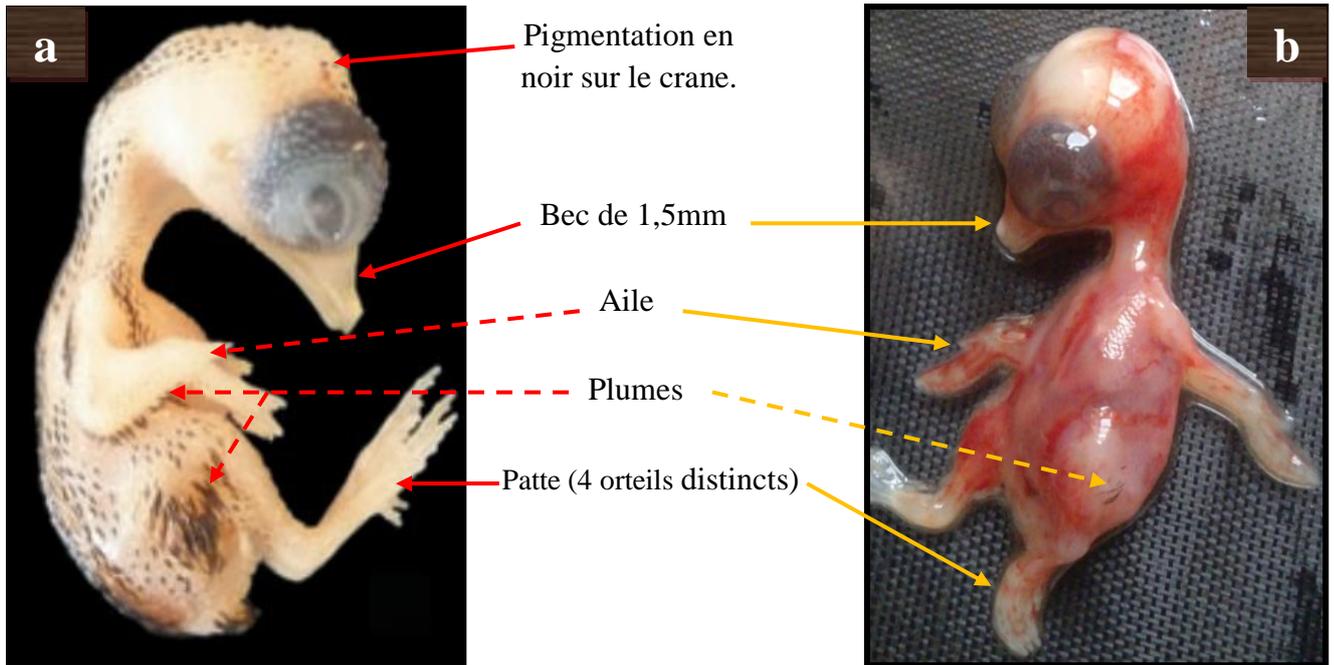


Figure N°39 : Embryon de caille japonaise *Coturnix japonica* âgé de 10 jours (stade 37 HH):
 (a) selon Ainsworth *et al* (2010), (b) Originale (UAM, Bejaia).

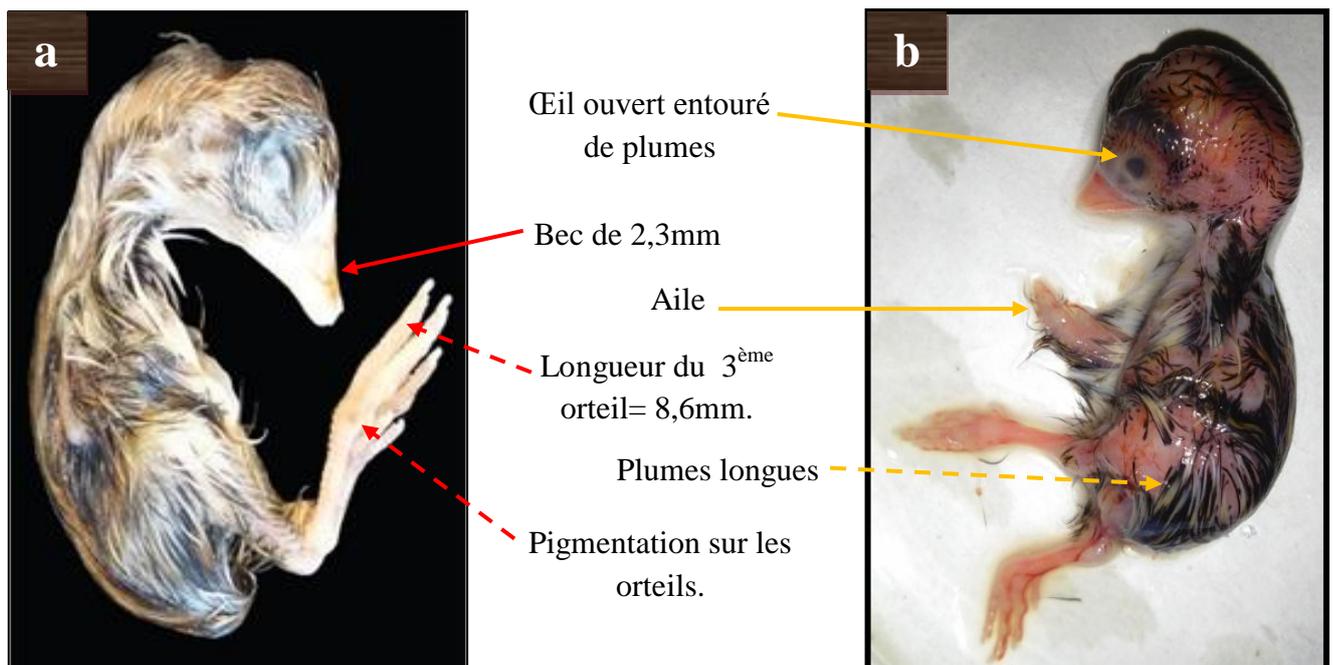


Figure N°40 : Embryon de caille japonaise *Coturnix japonica* âgé de 12 jours (stade 40 HH),
 (a) selon Ainsworth *et al* (2010), (b) Originale (UAM, Bejaia).

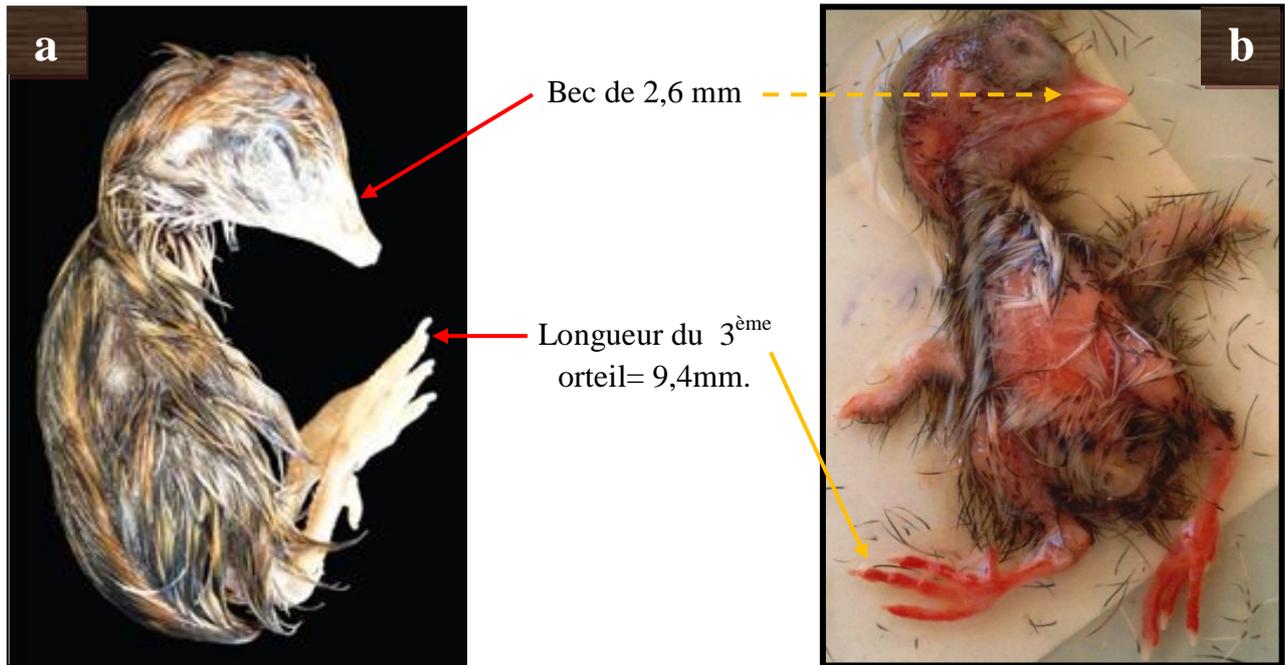


Figure N°41 : Embryon de caille japonaise *Coturnix japonica* âgé de 14 jours (stade 43 HH):
 (a) selon Ainsworth *et al* (2010), (b) Originale (UAM, Bejaia).

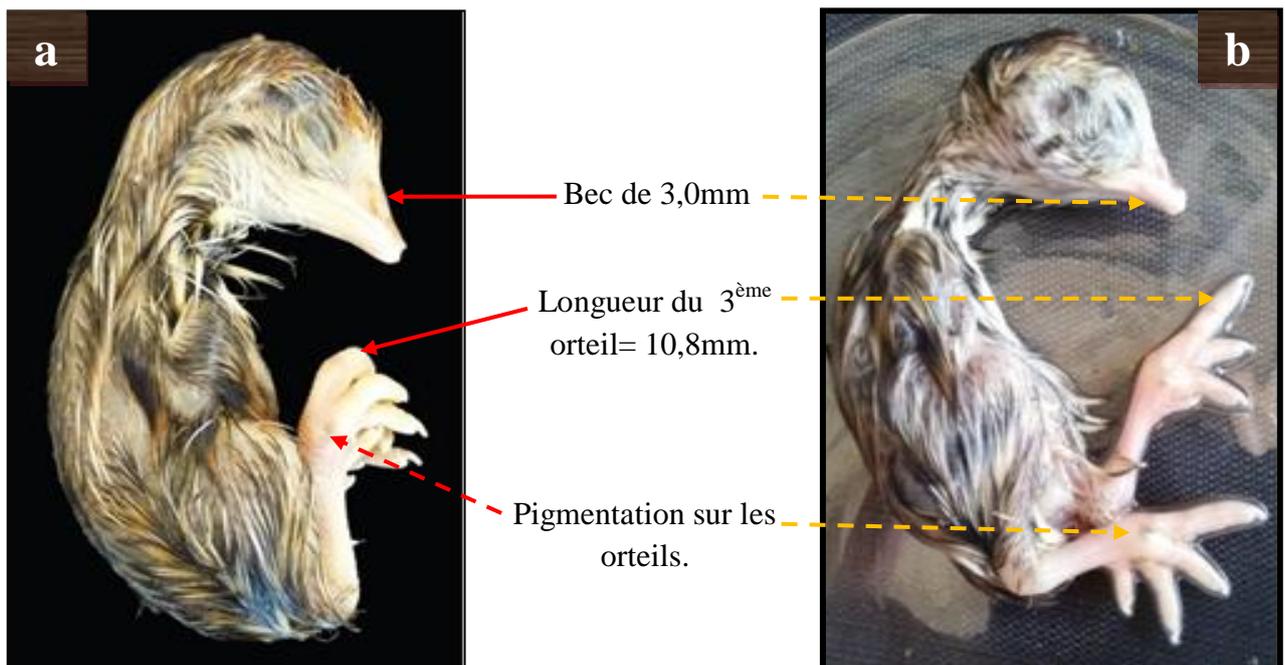


Figure N°42 : Embryon de caille japonaise *Coturnix japonica* âgé de 15 jours (stade 44 HH):
 (a) selon Ainsworth *et al* (2010), (b) Originale (UAM, Bejaia).

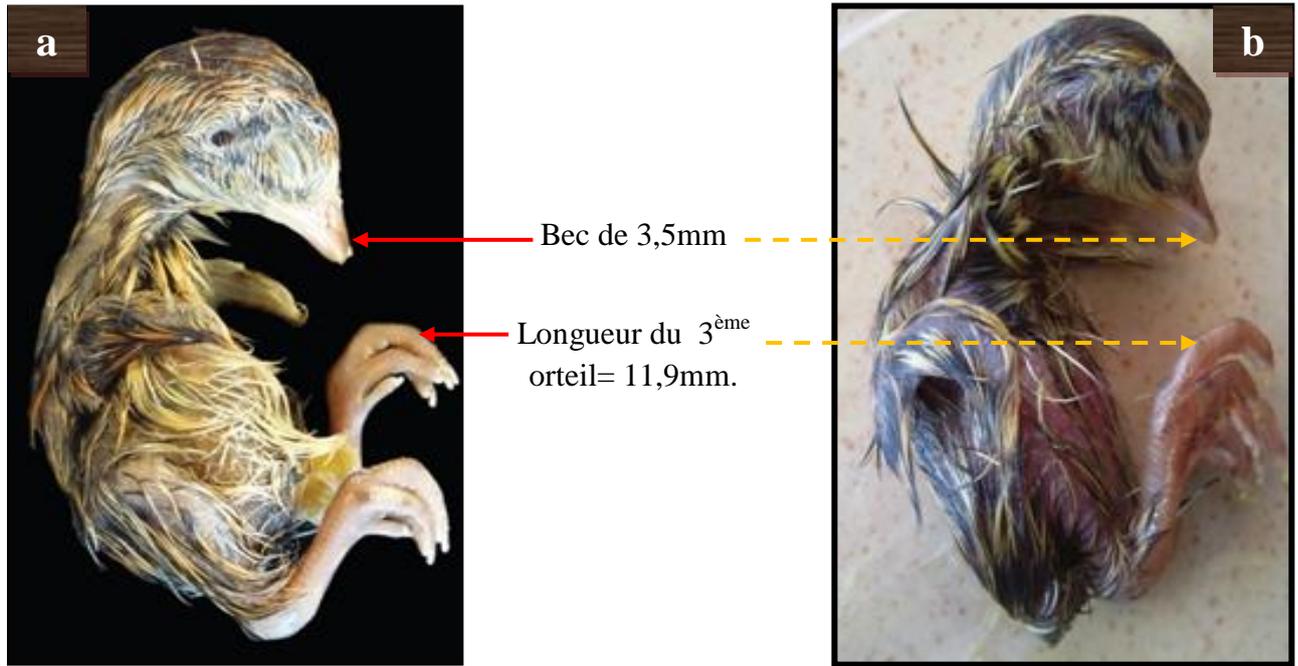


Figure N°43 : Embryon de caille japonaise *Coturnix japonica* âgé de 17 jours (stade 46 HH):
(a) selon Ainsworth *et al* (2010), (b) Originale (UAM, Bejaia).

En effet, la comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature révèle que l'âge estimé pour les embryons obtenus correspond réellement au temps d'incubation et nos résultats concordent bien avec ceux d'Ainsworth *et al* (2010).

III.2.2-REALISATION DE PRÉPARATIONS DURABLES D'EMBRYONS DE CAILLE JAPONAISE

Les embryons sacrifiés à différents stades ont été fixés (afin de les conserver pour des études ultérieures éventuellement pour des coupes histologiques) puis pris en photos (Figure 44).

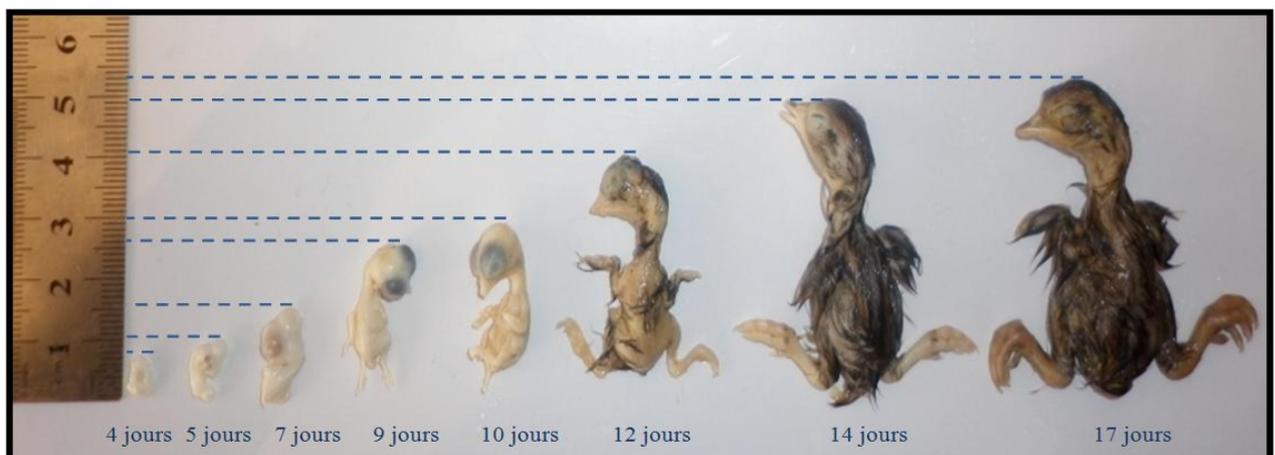


Figure N°44 : Fixation des embryons de la caille japonaise *Coturnix japonica* à différents stades de développement, Originale (UAM, Bejaia).

III.3- CULTURE CELLULAIRE ET ÉTALEMENT CHROMOSOMIQUE

III.3.1- DILACERATION DES ORGANES

Comme ça été mentionné dans le chapitre précédent, la culture cellulaire et les étalements chromosomiques ont été réalisés à l'USTHB (Alger). Malgré cela, avec les moyens restreints qu'on possédait, on a simulé les premières étapes de la culture cellulaire. En effet, après incubation des œufs, les embryons vivants ont été sacrifiés pour le prélèvement de leurs organes afin d'avoir des cellules vivantes dans le but d'effectuer une culture cellulaire. Pour cela, des organes tels que le poumon, le cœur, le rein...etc ont été prélevés à partir d'embryons âgés entre 8 et 12 jours puis dilacérés (Figure 45a). Or, les embryons âgés entre 3 et 5 jours ont été entièrement dilacérés (mis à part les yeux) vu que leurs organes ne sont pas encore développés (Figure 45b).

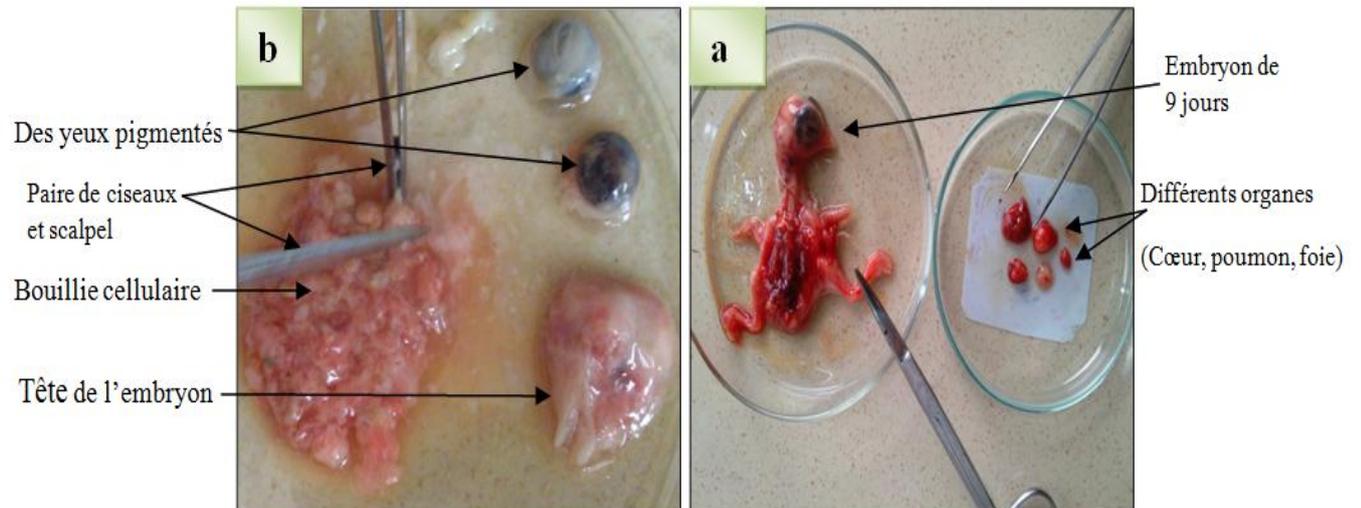


Figure N°45 : Dilacération (a) d'organes issus d'un embryon de poulet âgé de 9 jours, (b) d'un embryon âgé de 5 jours en entier (Bouillie cellulaire), Originale (UAM Bejaia).

Après dilacération des différents organes embryonnaires, une agitation de la bouillie cellulaire (à vitesse modérée) avec la de trypsine (0.05%) a été effectuée pendant 5 min pour favoriser la dissociation des cellules entre elles.

III.3.2-MISE EN CULTURE, RECOLTE, CHOC HYPOTONIQUE, FIXATION, ÉTALEMENT CHROMOSOMIQUE

Toutes ces étapes ont été réalisées au niveau du Laboratoire de Génétique du Développement à l'USTHB (par notre promotrice). Le suivi des cultures cellulaires a montré au microscope

inversé la présence de fibroblastes (cellules fusiformes) dès le 2^{ème} jour de la mise en culture des cellules. Au bout d'une semaine, il y'a eu formation d'un tapis cellulaire (Figure 46).

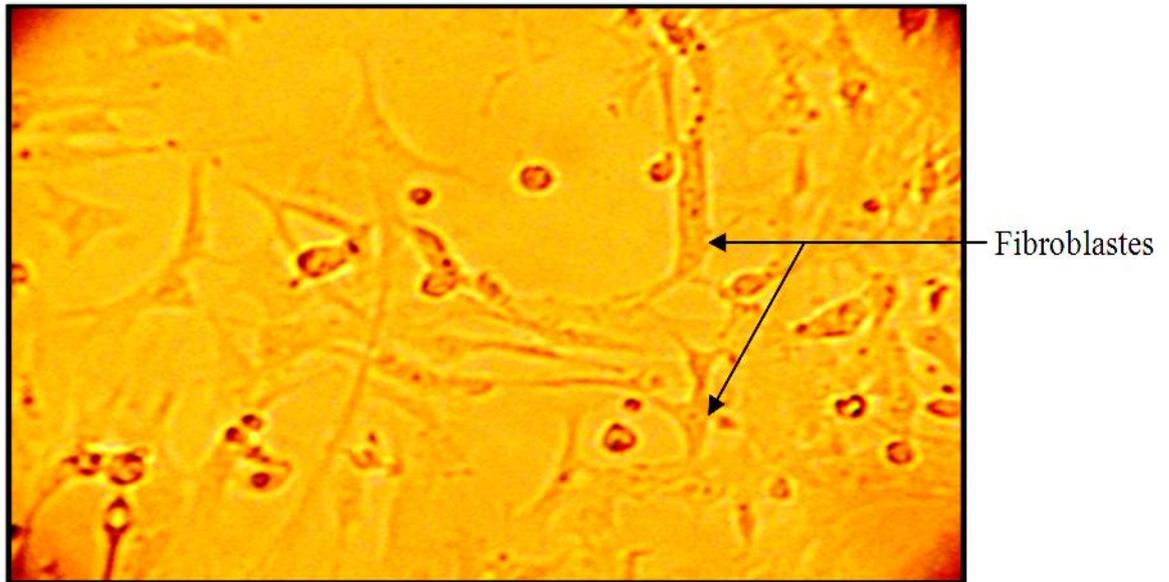


Figure N°46 : Tapis de fibroblastes d'un embryon de caille japonaise observé au microscope inversé (GX10) (Kartout-Benmessaud, Thèse de Doctorat en cours).

III.4- MARQUAGES CHROMOSOMIQUES ET OBSERVATIONS DES METAPHASES

L'observation au microscope photonique des étalements chromosomiques ainsi obtenus, nous a permis de repérer quelques métaphases. Ces dernières ont été sélectionnées et prises en photos à différents grossissements (GX40 ; X100) et à différentes mises au point (Figure 47). L'indice mitotique est en moyenne d'une métaphase par champ. Cela est du probablement à un potentiel cellulaire initial assez moyen.

Les chromosomes ont été découpés en utilisant le logiciel Photoshop (CS5) et classés en fonction de 3 critères : par ordre décroissant selon leur taille, la position de leurs centromères et enfin selon le nombre de bandes morphologiques GTG. Le caryotype ainsi établi en bandes morphologiques GTG est illustré sur la Figure 48.

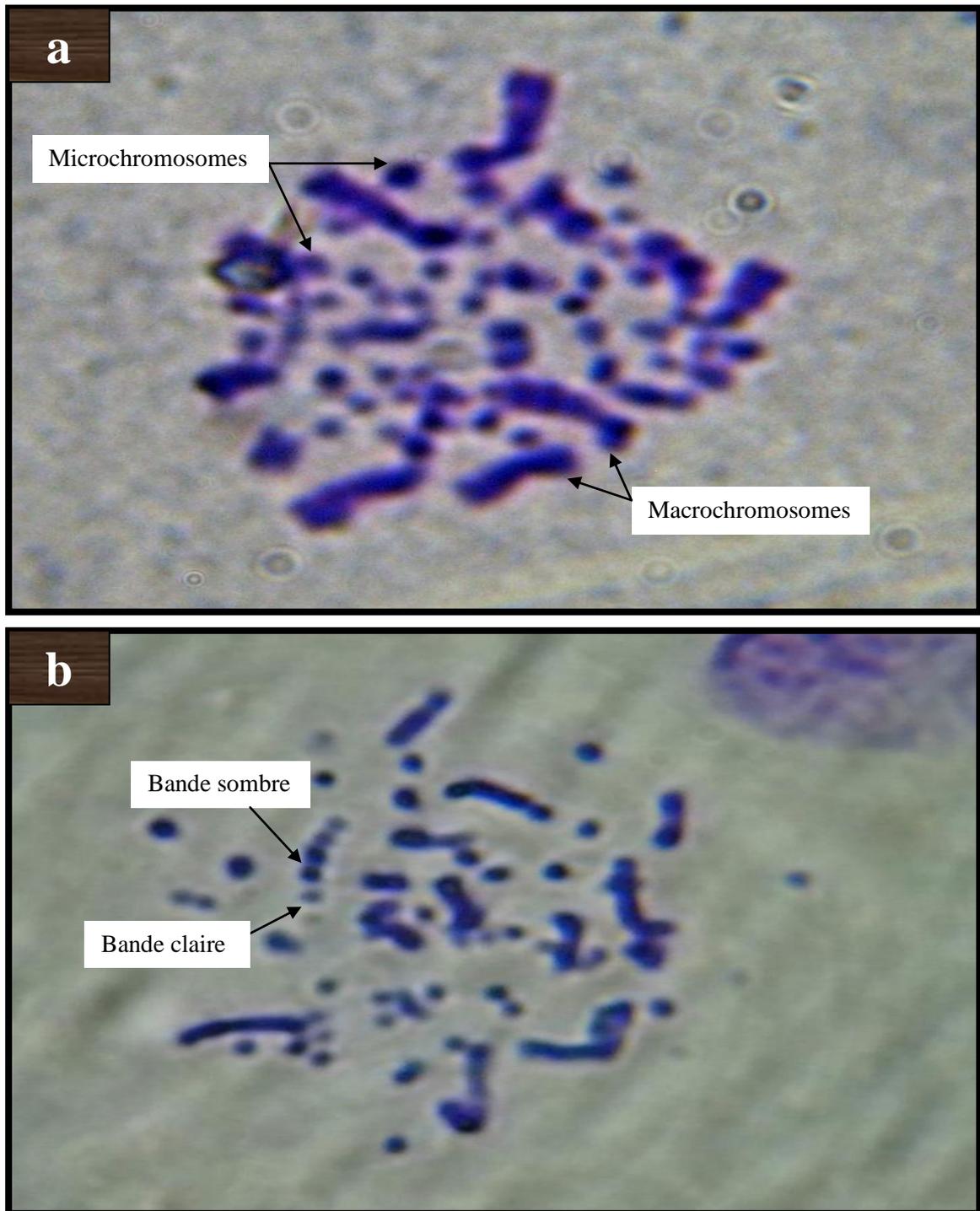


Figure N°47 : Métaphases de la caille japonaise *Coturnix japonica* observées au microscope photonique (GX100), (a) : en coloration conventionnelle (b) : en bandes GTG, Originale (UAM, Bejaia).

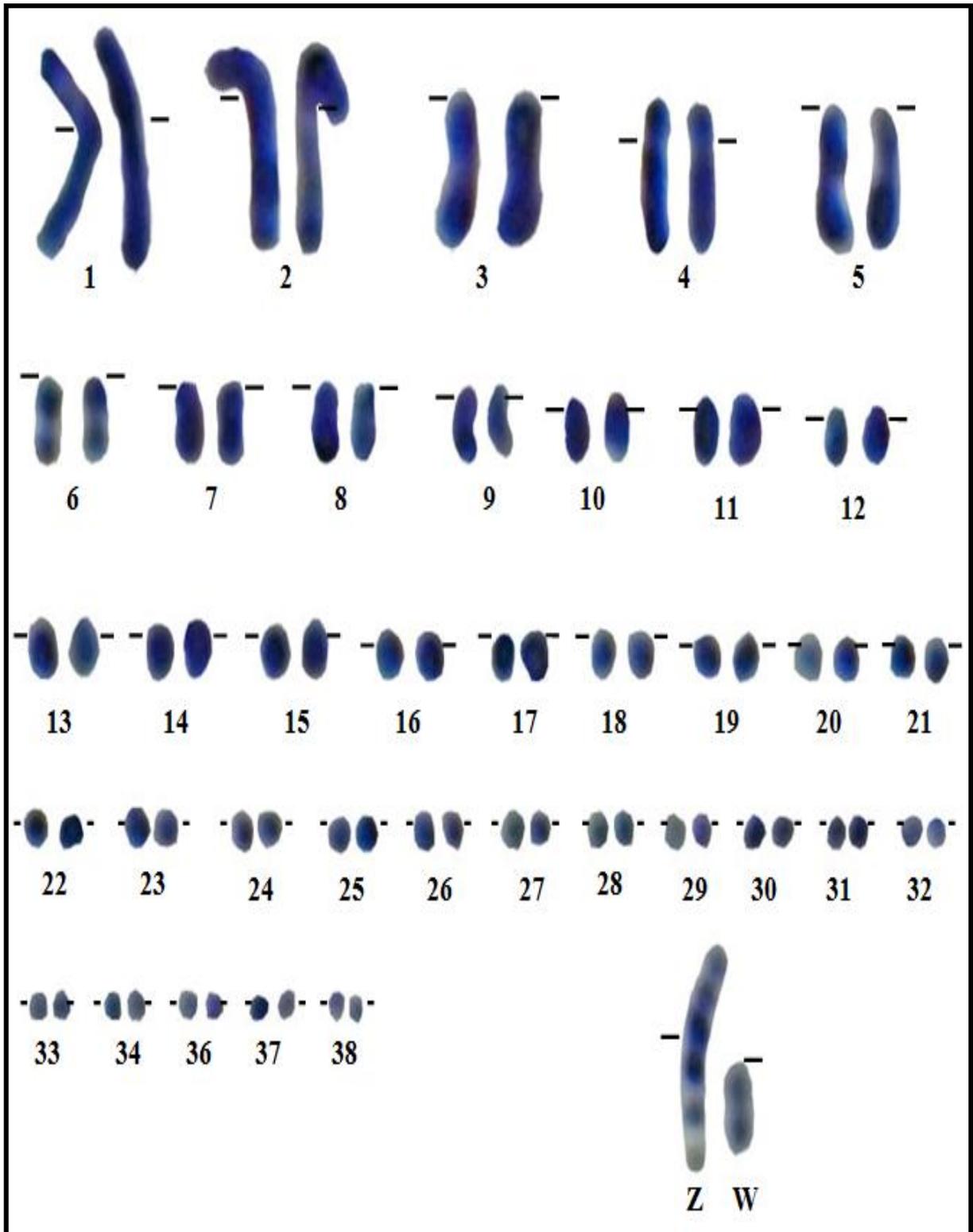


Figure N°48 : Caryotype de la caille japonaise *Coturnix japonica* (de sexe femelle) proposé en bandes morphologiques GTG (Originale, UAM-Bejaia).

L'évolution morphologique des chromosomes d'espèces appartenant à l'ordre des galliformes entraîne beaucoup d'ambiguïté dans le groupe. Néanmoins, le nombre et la morphologie des chromosomes sont relativement conservés entre ces espèces (**Takagi et Sasaki, 1974**). La caille japonaise et le Poulet domestique ont le même nombre de chromosomes ($2n=78$), mais des différences morphologiques ont été identifiées sur plusieurs paires chromosomiques (**Crawford, 1990**).

III.4.1- DESCRIPTION DES CHROMOSOMES DE LA CAILLE JAPONAISE *COTURNIX JAPONICA* ET CARTE CHROMOSOMIQUE COMPAREE

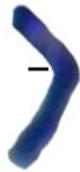
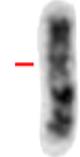
La morphologie des huit premières paires chromosomiques et des chromosomes sexuels ZW de la caille japonaise obtenus a été comparée avec celle des chromosomes de **Shibusawa et al. (2001)** et avec celle des chromosomes du poulet domestique *Gallus domesticus* de **Ladjali-Mohammedi et al. (1999)** (Tableau V).

Les résultats obtenus dans le présent travail concordent avec ceux de la littérature (**Stock et Bunch, 1982 ; Shibusawa et al., 2001**). Or, les chromosomes de la caille japonaise présentent des similitudes morphologiques avec ceux du poulet domestique sur la plupart des chromosomes (**1, 2, 3, 4, 5, 6** et le chromosome sexuel **Z**) mais aussi quelques différences sur les chromosomes **7, 8** et le **W**.

Les relations phylogénétiques font l'objet d'études intensives. En effet, des études interspécifiques comparatives réalisées sur ces deux espèces ont suggéré que la morphologie de leurs chromosomes est hautement conservée et que quelques réarrangements chromosomiques produits au cours de l'évolution ont été identifiés (**Shibusawa et al., 2001; Fillon et al., 2003 ; Kayang et al., 2006; Zlotina et al., 2012**).

En effet, les chromosomes **1 et 2** de la caille japonaise et du poulet domestique sont morphologiquement similaires (submétacentriques) (**Sasaki, 1981 ; Stock et Bunch 1982 ; Ladjali-Mohammedi et al., 1999**). Or, la présence d'une éventuelle inversion péricentrique sur ces deux chromosomes de la caille japonaise a été démontrée en utilisant des clones BAC spécifiques au poulet puis hybridés *In situ* sur des métaphases de la caille japonaise par la technique d'hybridations *In situ* en fluorescence (FISH) (**Shibusawa et al., 2001; Kayang et al., 2006**) (Figure 49).

↳ **Tableau V:** Description morphologique comparative des chromosomes en coloration GTG de la caille japonaise *Coturnix japonica* obtenus (UAM, Bejaia) avec ceux de la littérature (D'après Shibusawa *et al.*, 2001) et du Poulet domestique *Gallus domesticus* de Ladjali-Mohammedi *et al.* (1999).

	Caille japonaise (Originale)	Caille japonaise (Shibusawa <i>et al.</i> 2001)	Poulet domestique (Ladjali <i>et al.</i> , 1999)
Chromosome 1			
	Submetacentrique	Submetacentrique	Submetacentrique
Chromosome 2			
	Submetacentrique	Submetacentrique	Submetacentrique
Chromosome 3			
	Acrocentrique	Acrocentrique	Acrocentrique
Chromosome 4			
	Telocentrique	Telocentrique	Telocentrique
Chromosome 5			
	Acrocentrique	Acrocentrique	Acrocentrique
Chromosome 6			
	Acrocentrique	Acrocentrique	Acrocentrique
Chromosome 7			
	Acrocentrique	Acrocentrique	Telocentrique
Chromosome 8			
	Acrocentrique	Acrocentrique	Submétacentrique
Chromosome Z			
	Métacentrique	Métacentrique	Métacentrique
Chromosome W			
	Acrocentrique	Acrocentrique	Métacentrique

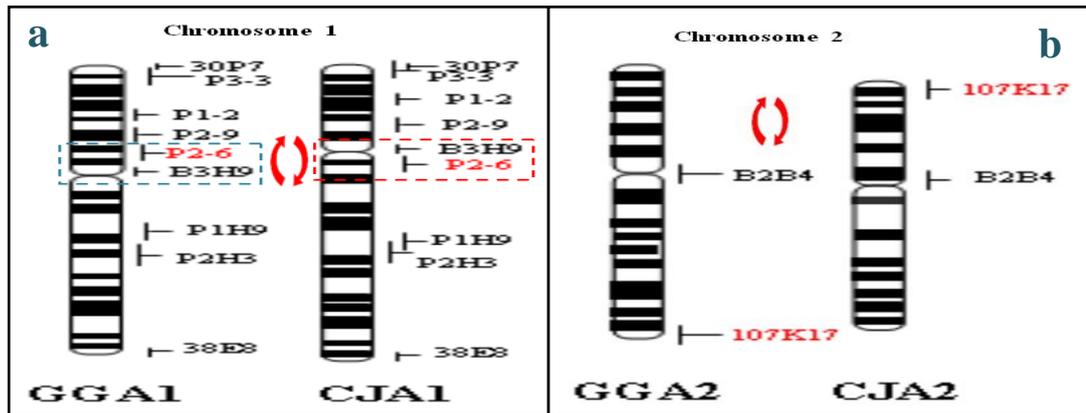


Figure N°49: Inversion péricentrique sur les chromosomes 1 et 2 de la caille japonaise, (a) inversion du clone BAC (P2-6) sur le chromosome, (b) inversion du clone BAC (107K17) sur le chromosome 2 (Modifiée d'après Kayang *et al.*, 2006).

Les chromosomes 3 sont acrocentriques et semblent être conservés entre ces deux espèces (Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999; Shibusawa *et al.*, 2001). En effet une forte homologie des motifs en bandes GTG a été observée après comparaison du chromosome 3 de la caille japonaise avec celui du poulet domestique (Figure 50) (Kayang *et al.*, 2006).

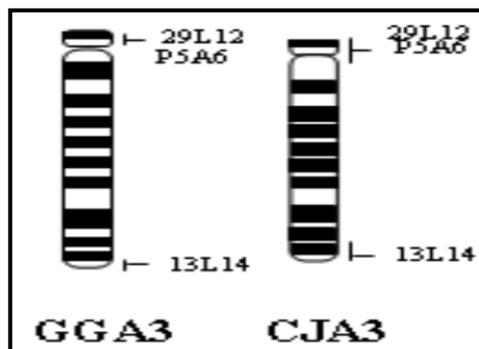


Figure N°50: Homologie morphologique entre les chromosomes 3 des deux espèces au cours de l'évolution (Kayang *et al.*, 2006).

Aussi, les études réalisées sur le chromosome 4 du poulet domestique ont révélé que ce dernier semble être le plus conservé du génome aviaire. Grâce à la technique de la peinture chromosomique réalisée par Guttenbach *et al.* (2003) (Figure 51a) ainsi que des FISH de clones BAC sur des chromosomes mitotiques (Figure 51b) et méiotiques (Figure 51c), la présence d'un éventuel réarrangement chromosomique a été détectée. Ce dernier a été expliqué non pas par une inversion péricentrique mais par la formation d'un néocentromère (Zlotina *et al.*, 2012).

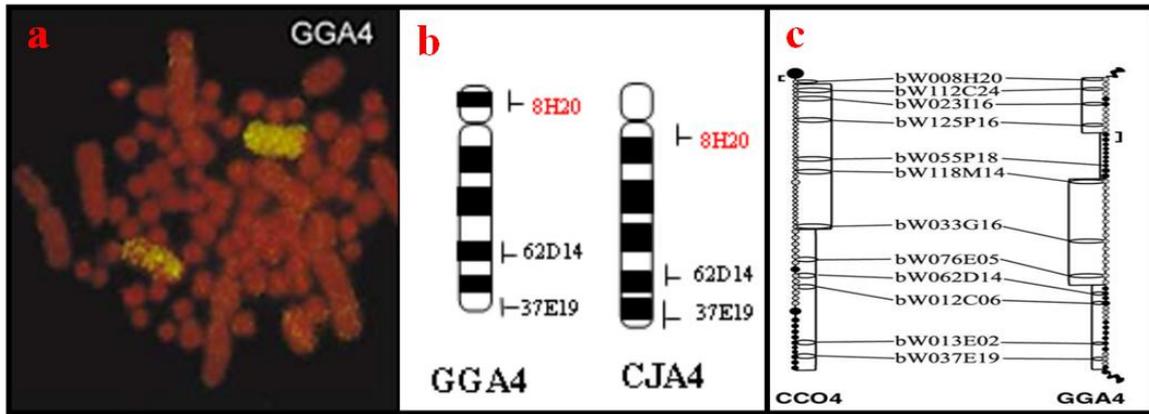


Figure N°51: (a) Hybridation complète du chromosome 4 du poulet sur le chromosome 4 de la caille japonaise (Guttenbach *et al.*, 2003), (b) L'ordre des Clones BAC sur le chromosome 4 mitotique de la caille japonaise (CJA4) est identique à celui du poulet (GGA4) (Kayang *et al.*, 2006) et aussi sur les chromosomes 4 en écouvillon (c), (Galkina *et al.*, 2006).

Les chromosomes 5 et 6 de la caille japonaise et du poulet domestique sont acrocentriques, ils sont morphologiquement similaires chez les deux espèces. Une forte homologie est observée après comparaison des motifs des bandes GTG. Ce résultat démontre que la caille et le poulet ne représentent aucun réarrangement chromosomique au niveau des chromosomes 5 et 6, ils ont du être conservés au cours de l'évolution (Figure 52) (Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999; Shibusawa *et al.*, 2001).

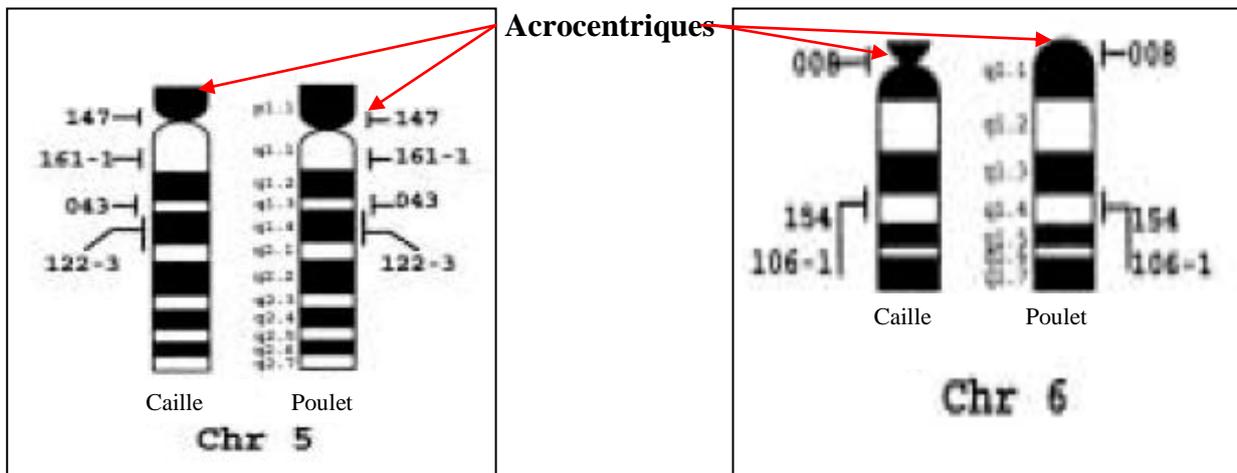


Figure N° 52 : Carte cytogénétique comparative des chromosomes 5 et 6 entre la caille japonaise *Coturnix japonica* (à gauche) avec ceux du poulet domestique *Gallus domesticus* (à droite) (Shibusawa *et al.*, 2001).

Le chromosome 7 de la caille japonaise est acrocentrique, alors que celui du poulet domestique est télocentrique (Stock et Bunch, 1982). Le chromosome 7 acrocentrique aurait pu subir une fusion avec un microchromosome conduisant à la formation d'un chromosome télocentrique. Aussi, une fission (délétion) aurait pu se produire sur le chromosome 7 télocentrique lors de l'évolution conduisant à la formation d'un chromosome acrocentrique et d'un microchromosome (Figure 53).

En effet, selon une étude réalisée sur les chromosomes 7 de la caille japonaise *Coturnix japonica* et le poulet domestique *Gallus domesticus*, la présence d'un réarrangement intrachromosomique lors de l'évolution a été révélée (Fillon *et al.*, 2003).

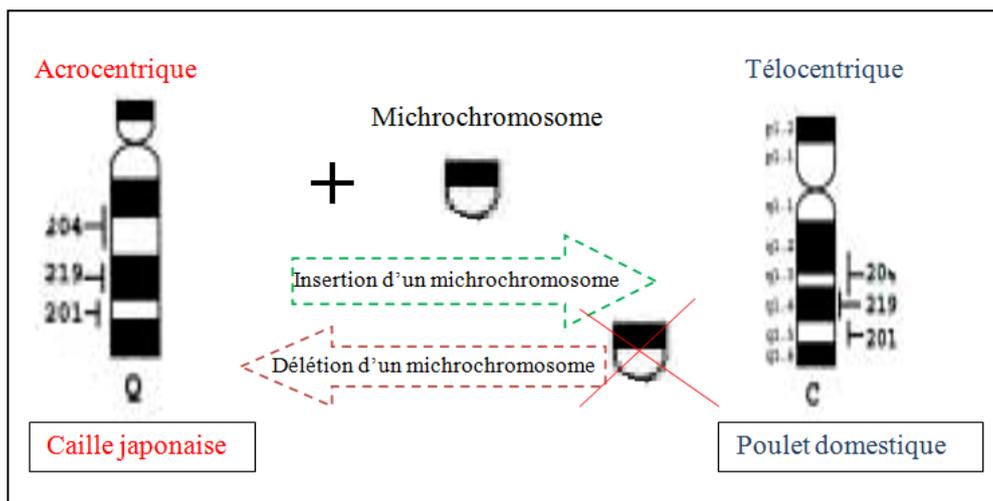


Figure N°53 : Représentation de la possibilité de formation du chromosome 7 chez la caille japonaise (à gauche) et le poulet domestique (à droite) (Modifiée d'après Shibusawa *et al.*, 2001).

Les chromosomes 8 sont morphologiquement différents chez la caille japonaise et le poulet domestique. Ils sont respectivement acrocentrique et submétacentrique. La comparaison des motifs des bandes GTG de ces chromosomes a montré une différence dans la conservation des bandes. En effet, ces différences peuvent s'expliquer probablement par une perte d'un segment chromosomique (délétion) chez la caille japonaise conduisant à la forme acrocentrique, ou bien par duplication du matériel génétique sur le chromosome 8 du poulet (Figure 54).

En effet, des inversions péricentriques ont été détectées sur le chromosome 8 de la caille japonaise par rapport au chromosome homologue du poulet domestique (Fillon *et al.*, 2003; Sasazaki *et al.*, 2006).

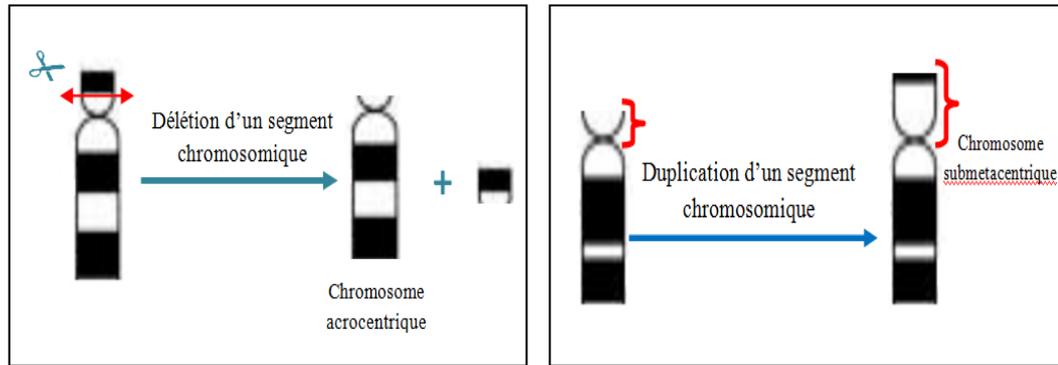


Figure N°54 : Eventuels réarrangements chromosomiques ayant probablement survenus sur les chromosomes 8 de la caille japonaise et du poulet.

↪ **Tableau VI :** Correspondances entre les macrochromosomes de la poule domestique *Gallus domesticus* et de la caille japonaise *Coturnix japonica* (Fillon *et al.*, 2003)

Machrochromosomes de la poule	Machrochromosomes de la caille
1	1(inversion)
2	2(inversion)
3	3
4	4(inversion)
5	5
6	6
7	7(réarrangement)
8	8 (inversion)
Z	Z

Le chromosome Z de la caille japonaise et du poulet domestique sont métacentriques, ils sont morphologiquement similaires chez les deux espèces, une forte homologie est observée après comparaison des motifs des bandes GTG. Ce résultat démontre que la caille et le poulet ne présentent pas d'inversion péricentrique au niveau des chromosomes sexuels Z. Ces derniers ont du être conservés au cours de l'évolution exactement comme les chromosomes 5 et 6 (Figure 55a). Or, un autre réarrangement chromosomique de type néocentromère a pu être confirmé grâce aux chromosomes en écouvillon (Zlotina *et al.*, 2012). En effet, l'ordre des

clones BAC hybridés est hautement conservé or la position génétique des centromères est différente (Figure 55b) (Kayang *et al.*, 2006).

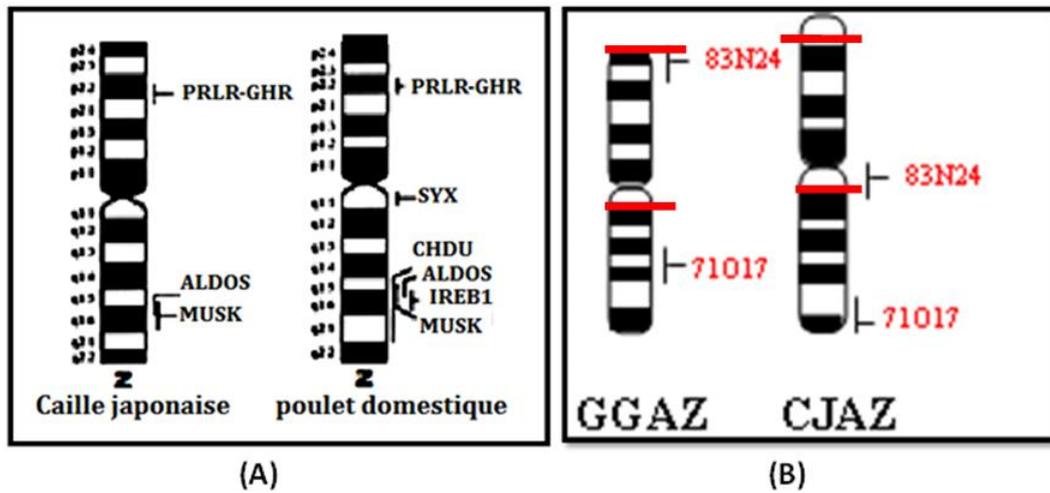


Figure N°55 : Comparaison des idiogrammes en bandes GTG des chromosomes sexuels Z de la caille japonaise et de la poule domestique. Cartographie de (A) quatre gènes fonctionnels (PRLR, GHR, ALDOS et MUSK) du poulet conservés dans le même ordre chez la caille japonaise (Suzuki *et al.*, 1999), (B) de deux clones BAC (Kayang *et al.*, 2006).

Le chromosome W de la caille japonaise est acrocentrique, tandis que celui du poulet est métacentrique (Ladjali mohammedi *et al.*, 1999). Une fusion de deux microchromosomes chez le poulet domestique (ou une inversion péri-centrique chez la caille japonaise) aurait pu se produire durant l'évolution (Figure 56) (Fillon *et al.*, 2003).

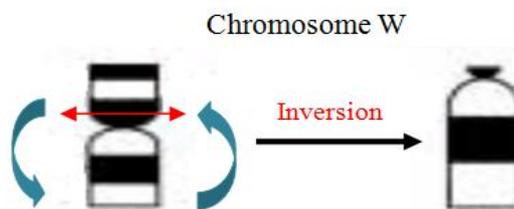


Figure N°56 : Inversion ayant probablement survenue sur le chromosome W de la caille japonaise conduisant à la forme acrocentrique de ce dernier.

En conclusion, une très haute conservation de groupes de synténie a été démontrée pour le poulet et la caille japonaise (Shibusawa *et al.*, 2001; Guttenbach *et al.*, 2003 ; Schmid *et al.*, 2005 ; Kayang *et al.*, 2006 ; Sasazaki *et al.*, 2006). Néanmoins, le taux de réarrangements intra-chromosomiques et le changement de l'ordre des gènes ne semblent pas être faibles. En

effet, des inversions péricentriques ne sont pas le principal mécanisme de la différence de morphologie entre les chromosomes du poulet et de la caille. Le repositionnement des centromères de certains chromosomes n'est pas accompagné de remaniement génique mais plutôt, ces centromères semblent être formés de novo chez le poulet et la caille japonaise (Galkina *et al.*, 2006).

A l'issu des résultats obtenus dans la présente étude et en se basant sur le caryotype aviaire ancestral (Figure 57) et sur le schéma hypothétique des éventuels remaniements produits entre les deux espèces (Tableau VII) proposé par Griffin *et al.*, 2007 on peut dire que :

Le poulet domestique semble être plus ancestral que la caille japonaise (vu que le caryotype de la poule ressemble plus à celui de l'ancêtre présumé). Néanmoins, ceci reste une hypothèse à confirmer.

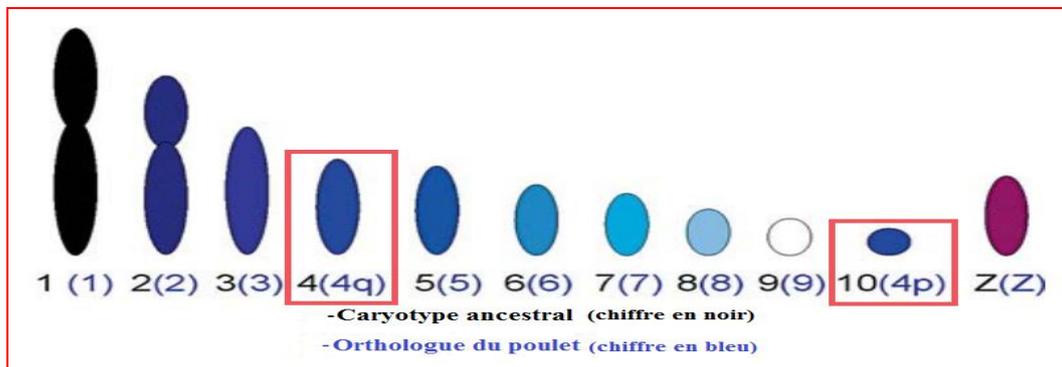
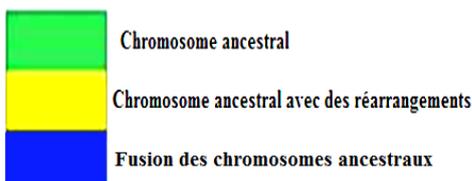


Figure N°57 : Illustration schématique du caryotype aviaire ancestral et ses orthologues du poulet. La seule différence étant le chromosome 4 du poulet, qui est représenté par les chromosomes ancestraux 4 et 10 (Griffin *et al.*, 2007).

↳ **Tableau VII :** Comparaison des chromosomes de 1 à 10 et le chromosome sexuel Z chez la caille japonaise et le poulet domestique (Griffin *et al.*, 2007).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Z
Poulet domestique	Chromosome ancestral	Chromosome ancestral	Chromosome ancestral	Fusion des chromosomes ancestraux	Chromosome ancestral	Chromosome ancestral	Chromosome ancestral	Chromosome ancestral avec des réarrangements	Chromosome ancestral	Fusion des chromosomes ancestraux	Chromosome ancestral
Caille japonaise	Chromosome ancestral avec des réarrangements	Chromosome ancestral avec des réarrangements	Chromosome ancestral	Fusion des chromosomes ancestraux	Chromosome ancestral	Chromosome ancestral	Chromosome ancestral avec des réarrangements	Chromosome ancestral avec des réarrangements	Chromosome ancestral	Chromosome ancestral	Chromosome ancestral



A → Inversion péricentrique

Or, les arbres phylogénétiques construits à partir des gènes mitochondriaux (le cytochrome **b** et le Nicotinamide Adénine Déshydrogénase: **NADH**) de la caille japonaise, ont montré que le genre *Coturnix* est d'apparition plus ancestrale que le genre *Gallus* (Nishibori *et al.*, 2001). Également, l'analyse d'une séquence de 694-pb du gène mitochondrial codant pour le cytochrome C Oxydase 1 (COI) a été utilisée pour identifier les relations phylogéniques entre les espèces appartenant à la famille des Phasianidés (Figure 58) (Kan *et al.*, 2010; Huang et Ke, 2014; Shen *et al.*, 2014).

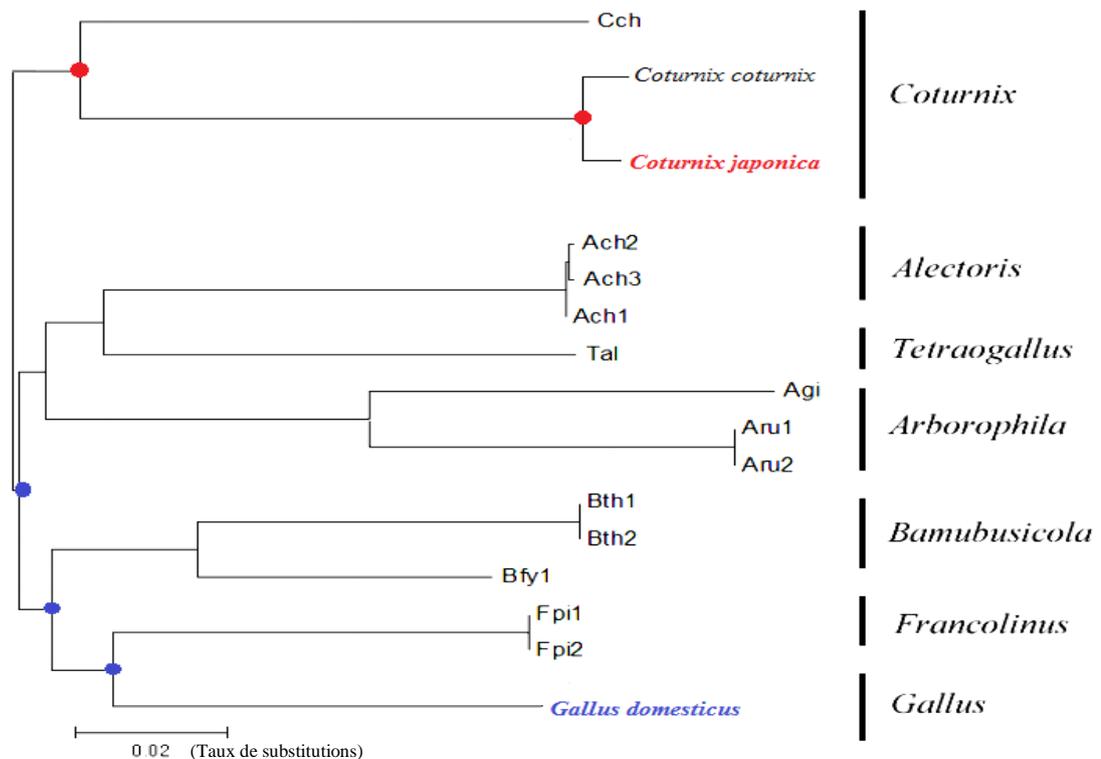
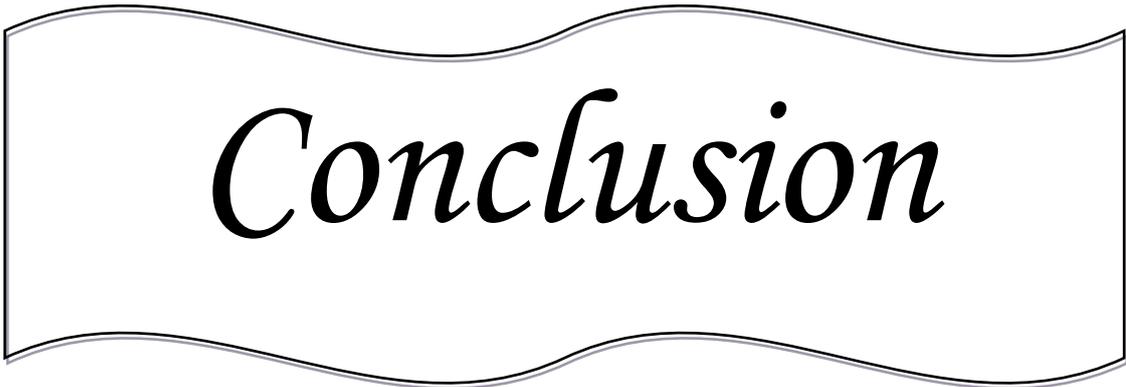


Figure N°58: Arbre phylogénétique de 7 genres de Phasianidés construit à partir de la séquence COI de l'ADN mitochondrial (Modifiée d'après Huang et Ke, 2014).

D'après l'arbre phylogénétique ci-dessus, le genre *Coturnix* est apparu avant le genre *Gallus*, donc c'est le plus ancestral. Mais cette étude ne reflète pas vraiment la réalité vu qu'il n'y a que deux gènes qui ont été utilisés. Par conséquent la question posée « qui est l'espèce la plus ancestrale ? » reste encore une énigme à révéler. Pour ce faire, des études ultérieures plus approfondies devraient être envisagées à l'échelle moléculaire en utilisant les clones BAC ou plus de gènes mitochondriaux pour pouvoir répondre à la question préalablement posée.



Conclusion

❧CONCLUSION❧

Le présent travail nous a permis d'apporter des connaissances fondamentales concernant le développement embryonnaire et la génétique de la caille japonaise *Coturnix japonica* en décrivant son génome. En effet, des cultures de fibroblastes issus d'embryons âgés entre 8 et 12 jours d'incubation ont été réalisées. Ainsi, nous avons réussi à obtenir des chromosomes métaphasiques.

Le nombre diploïde des chromosomes de la caille japonaise a été estimé à $2n=78$, comme chez la plupart des Phasianidés. La comparaison avec les résultats de la littérature nous a facilité l'identification des macrochromosomes de la caille japonaise. Concernant les microchromosomes, vu leur petite taille, ils ont été extrêmement difficiles à identifier.

Nous avons ainsi proposé un caryotype en bandes morphologiques GTG correspondant aux cinq premières paires autosomiques et aux 33 paires de microchromosomes, en plus des chromosomes sexuels ZW pour cette espèce.

Par ailleurs, une description individuelle des chromosomes de la caille japonaise a été effectuée. La comparaison des huit premières paires chromosomiques et des chromosomes sexuels ZW de la caille japonaise avec ceux de la littérature nous a permis de confirmer la concordance des résultats obtenus. Or, la comparaison avec les chromosomes du poulet domestique *Gallus domesticus* nous a permis de constater une forte homologie sur la majorité des chromosomes mis à part l'existence de quelques différences morphologiques au niveau des chromosomes 7, 8 et le chromosome sexuel W.

En effet, malgré la très bonne conservation des génomes aviaires, l'observation de quelques remaniements intrachromosomiques sur les macrochromosomes a été démontrée. En plus des événements de fusion/fission et inversions péricentriques ; la formation de néocentromères a été constatée (sur les chromosomes 3, 4 et Z). Par contre, des réarrangements interchromosomiques de type translocation n'ont jamais été observés.

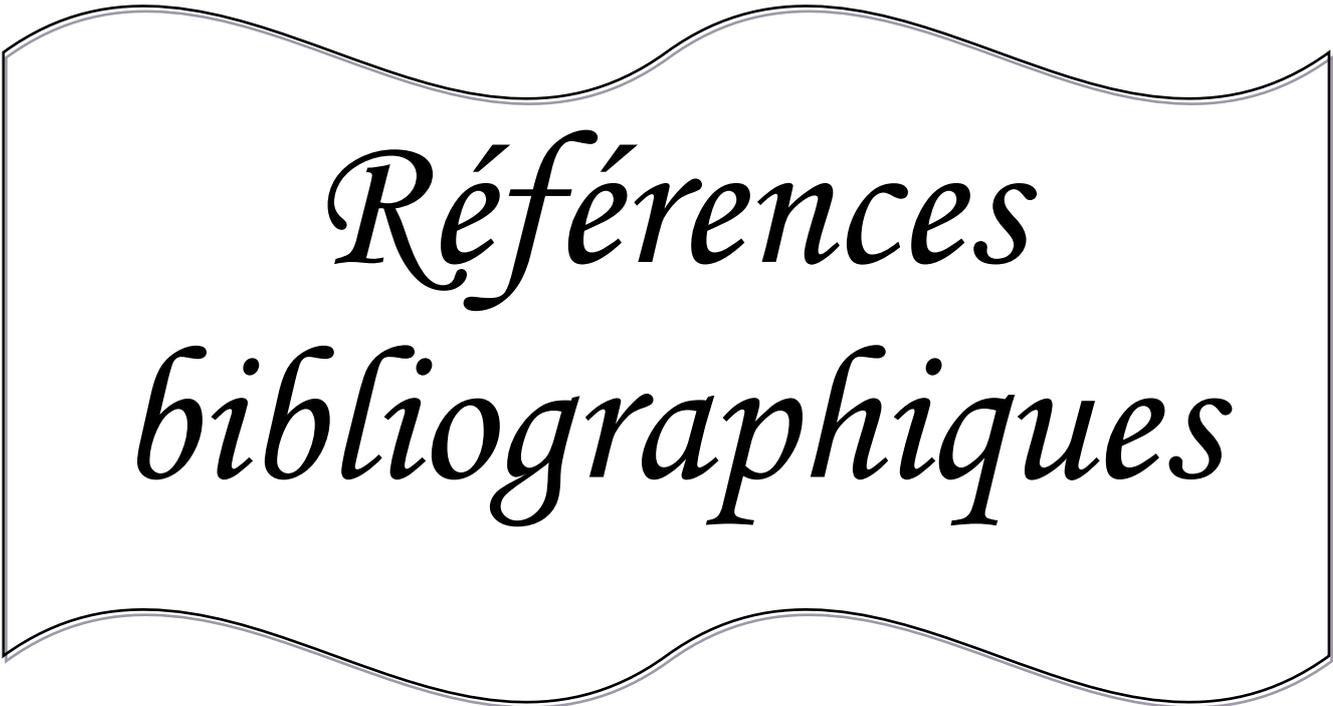
Cependant, cette étude cytogénétique comparative entre les deux espèces d'oiseaux domestiques nous a permis de conclure que, vu que le poulet domestique présente un génome conservé et très proche du génome ancestral et vu que les divers réarrangements chromosomiques ont été identifiés sur le génome de la caille japonaise (témoignant son évolution), la caille semble être d'apparition plus récente (**Griffin et al., 2007**). D'autre part, les arbres phylogénétiques construits à partir de deux gènes mitochondriaux montrent que le genre *Coturnix* est plus ancestral que le genre *Gallus*.

Ces résultats soulèvent d'intéressantes questions d'évolution. Néanmoins, l'utilisation de la carte génétique de la poule permettra de faire progresser la génétique moléculaire chez

❧CONCLUSION❧

d'autres espèces de volaille. En effet, cette énigme ne sera levée qu'avec des études moléculaires plus approfondies utilisant le maximum de clones BAC (marqueurs moléculaires spécifiques au poulet) et qui seront hybridés sur des métaphases de la caille japonaise. Aussi, l'utilisation d'un nombre plus important de gènes mitochondriaux rendra plus fiables les arbres ainsi construits.

Nous rappelons que la caille japonaise est une espèce de choix au laboratoire, connue pour sa chair savoureuse et ses œufs à effet thérapeutique démontré. Il est donc nécessaire de décrire son génome entier en identifiant ses microchromosomes (très riches en gènes) par des Hybridations *In Situ* en Fluorescence. En manipulant ses gènes (de type QTL), nous allons ainsi favoriser son élevage et s'investir sur le plan économique, médical ainsi que pour la recherche scientifique.



*Références
bibliographiques*

A

1. Ainsworth S. J., Stanley R. L. et Evans D. J. R., (2010). Developmental stages of the Japanese quail. *Journal of Anatomy*, 216: 3–15.
2. Alkan S., Karabağ K., Galiç A., Karsli T. and Balcioğlu M-S. (2010). Determination of Body Weight and Some Carcass Traits in Japanese Quails (*Coturnix coturnix japonica*) of Different Lines. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (2): 277-280.

B

3. Batellier., Blesbois., Brillard. et Gorovoun. (2009). La Reproduction chez les oiseaux. In: *Reproduction des animaux d'élevage*. Dijon Cedex : Editions Educargi, 2^{ème} édition. P. 333-405.
4. Brown T-A. (2004). Phylogénétique moléculaire. In: *Génomés*. Paris: Editions Flammarion. P. 483-503.
5. Bruttman, G., Crasborn, J., Christian K. A et Sainte-Laudy., (2013). *Et si les personnes allergiques devaient leur salut aux œufs de cailles ?*

C

6. Calderón PL. and Pigozzi MI. (2006). MLH1-focus mapping in birds shows equal recombination between sexes and diversity of crossover patterns. *Chromosome Res*, 14: 605–612.
7. Castaing J. (1979). *Aviculture et petits élevages*. Editions J.-B. Baillière. P. 240-255.
8. Crawford R.D. (1990). Origin and history of poultry species. In: *Poultry Breeding and Genetics*. Amsterdam: Elsevier. P.1–41.

D

9. Darribère T. (2007). *Introduction à la biologie du développement*. Editions Belin, Paris. P.71.

E

10. Eberhard P. (2005). Chromosomes. In: *Atlas de poche de Génétique*. Editions Flammarion Médecine Science, Paris, P. 179-203
11. Eberhard P. (2008). Chromosomes. In: *Atlas de poche de Génétique*. Editions Flammarion Médecine Science, Paris, P. 179-203.

F

12. Fechheinmer, N.S. (1971). Cytogenetic considerations in animal breeding. *Ann. Génét. Sél. Anim*, 3: 43-58.
13. Fillon V., Morisson M., Zoorob R. *et al.* (1998). Identification of 16 chicken microchromosomes by molecular markers using two colour fluorescence in situ hybridization (FISH). *Chromosom Res*, 6(4): 307–313.
14. Fillon V., Vignoles M., Garrigues A., Frédérique P., Mireille M., Crooijmans R., Groenen M., Gellin J. and Vignal A. (2003). La Carte Cytogénétique Du Poulet: Un Moyen Pour Identifier Les Micro-chromosomes Et Pour Comparer Les Génomes Aviaires, *Cinquièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours*, 26 et 27 mars 2003.
15. Fotsa, J.K. (2008). *Characterization of local chicken populations (Gallus gallus) in Cameroon*. Travail en vue de l'obtention du grade de docteur, Discipline: Génétique animale/Génétique animale et Systèmes de Production, Paris. P. 301.

G

16. Galkina S., Deryusheva S., Fillon V., Vignal A., Crooijmans R., Groenen M., Rodionov A. and Gaginskaya E. (2006). FISH on avian lampbrush chromosomes produces higher resolution gene mapping. *Genetica*, 128:241–251.
17. Gilgenkrantz S. (2004). Le sexe des oiseaux. *MEDECINE/SCIENCES*, 20: 1004-8.
18. Griffin DK., Robertson LBW., Tempest HG. and Skinner BM. (2007). The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetics. *Cytogenet Genome Res*, 117: 64–77.
19. Guttenbach M., Nanda I., Feichtinger W., Masabanda J. S., Griffin d. K. and Schmid M. (2003). Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints 1-9 in nine different bird species. *Cytogenetic and genome research*, 103(1-2): 173-184.

H

20. Hamburger AG and Hamilton HL. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morph*, 88: 42–92.
21. Harry M. (2001). Les mutations. In : *Génétique moléculaire et évolutive*. Paris : Editions Maloine. P. 153-163.

22. Huang ZH and Ke D.H. (2014). DNA barcoding and evolutionary relationships of the Phasianidae family in China. *Genetics and Molecular Research*, 13 (3): 7411-7419.
23. Huss D., Poynter G. and Lansford R. (2008). Japanese quail (*Coturnix japonica*) as a laboratory animal model. *LAB ANIMAL*, 37: 513-519.

K

24. Kan XZ, Yang JK, Li XF, Chen L, Lei ZP, *et al.* (2010) Phylogeny of major lineages of galliform birds (Aves: Galliformes) based on complete mitochondrial genomes. *Genet Mol Res*, 9: 1625–1633.
25. Kartout Y. (2010). Etude Cytogénétique de la Caille des Blés *Coturnix coturnix* Etablissement de Chromosomes à Haute Résolution. Thèse de Magistère, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene Alger-Algérie. p. 90
26. Kawahara-Miki R., Sanoa S., Nunomec M., Shimmura T., Kuwayama T., Takahashi S., Kawashima T., Matsuda Y., Yoshimura T. et Kono T. (2013). Next-generation sequencing reveals genomic features in the Japanese quail. *Elsevier Genomics*, 101: (345–353).
27. Kayang B. B., Fillon V., Murayama M., Miwa M., Leroux S., Fève K., Monvoisin J-L., Pitel F., Vignoles M. *et al.* (2006). Integrated maps in quail (*Coturnix japonica*) confirm the high degree of synteny conservation with chicken (*Gallus gallus*) despite 35 million years of divergence. *BMC Genomics*, 7:101.

L

28. Ladjali K. (1994). Caryotype de la poule domestique *Gallus domesticus* et incidence des anomalies chromosomiques dans les troubles de la reproduction. Thèse de Doctorat, Institut National de la Recherche Agronomique Paris-Grignon .p. 179.
29. Ladjali K., Txier-Boichard M. and Gibiu E.P. (1995). High resolution chromosome preparations for G and R Banding in *Gallus domesticus*. *J. heredity* 86: 136-139.
30. Ladjali-Mohammedi K., Bitgood J.J., Tixier-Boichard M., and Ponce de Leon F.A. (1999). International System for Standardized Avian Karyotype (ISSAK): Standardized banded karyotypes of the domestic fowl *Gallus domesticus*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 86:271-276.
31. Laurin, M. (2013). Systematics beyond phylogenetics/La systématique au-delà de la phylogénétique. *Comptes rendus Palevol*, 12 (6): 327–331.

32. Le Caignec, C. (2011). Caryotype humain : Technique-Indications., *Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale*, 8.
33. Le Douarin. (1999). Systèmes modèles. In: *Biologie du développement les grands principes*. Paris: Editions Dunod. p. 31-37.
34. Le Moigne A. et Foucrier J. (2010). *Biologie du développement*. Paris: Editions Dunod, 7^{ème} édition. p. 413.
35. Linné Carl. (1758). Système de la Nature, division en classe, ordre, genre et espèces, avec les caractères, les différences, les synonymes et les localisations. 10^{ème} édition: decima reformata, holimiae, in pensis direct.

M

36. Mills A. D., Crawford L. L., Domjan M. and Faure J. M. (1997). The Behavior of the Japanese or Domestic Quail *Coturnix japonica*. Elsevier Science. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21(3). p. 261-281.
37. Mizutani M. (2003). The Japanese Quail. *Laboratory Animal Research Station*, Nippon Institute for Biological Science, Kobuchizawa, Yamanashi, Japan. p. 143-163.
38. Moula, N., Philippe, F-X., Ait Kaki, A., Touazi, L., Antoine-Moussiaux, N. and Leroy, P. (2014). Ponte et qualité d'œufs de cailles élevées en conditions semi intensives dans l'est algérien. *Archivos de Zootecnia*, 63(244): 693-696.

N

39. Nishibori M., Mayashi T., Tsudzuki M., Yamamoto Y. and Yasue H. (2001). Complete sequence of the Japanese quail *Coturnix japonica* mitochondrial genome and its genetic relationship with related species. *Animal Genetics* 32 (6): 380-385.

O

40. Office Vétérinaire Fédéral. (2000). Détention professionnelle de cailles (*Coturnix japonica*) pour la production d'œufs et de viande. *Protection des animaux*. Berne. P. 6.

P

41. Pollard T-D. and Earnshaw W-C. (2004). Structure des chromosomes. In: *Biologie cellulaire*. Coordination scientifique de l'édition française. Paris. P. 199.
42. Popescu P., Hayes H. and Dutrillaux B.C. (1998). *Techniques de cytogénétique animale*. INRA Editions, Paris : 260.

R

43. Rotureau, M.B, (2012). Techniques, nomenclatures-Apport des techniques moléculaires-*Cytogénétique morphologique et moléculaire*,117.
44. Roussot O., Feve K., Plisson-Petit F., Pitel F., Faure J.M., Beaumont C. and Vignal A. (2003). AFLP linkage map of the Japanese quail *Coturnix Japonica*. *Genet Sel Evol.* 35(5): 559-72.

S

45. Sasaki M. (1981). High resolution G-band karyotypes of the domestic fowl and the Japanese quail. *Chrom Inform Service*, 31:26–28.
46. Sasazaki S., Hinenoya T., Lin B., Fujiwara A. and Mannen H. (2006). A comparative map of macrochromosomes between chicken and Japanese quail based on orthologous genes. *Animal Genetics* 37 (4): 316-320.
47. Schmid M., Enderle E., Schindler D. and Schemp W. (1989). Chromosome banding and DNA replication patterns in bird karyotype. *Cytogenet Cell Genet*, 52: 139-146.
48. Schmid M., Nanda I. and Burt D. W. (2005). Second Report on Chicken Genes and Chromosomes 2005. *Cytogenet. Genome Res.* 109: 415-479.
49. Schwartz, C.W. & Schwartz, E.R. (1949) *A Reconnaissance of the Game Birds in Hawaii. Hilo, Hawaii: Hawaii Board of Commissioners of Agriculture and Forestry.*
50. Shen YY., Dai K., Cao X., Murphy RW., Shen XJ. and Zhang YP. (2014).The Updated Phylogenies of the Phasianidae Based on Combined Data of Nuclear and Mitochondrial DNA. *PLOS ONE*, 9:1-5.
51. Shibusawa M, Minai S, Nishida-Umehara C *et al.*, (2001). A comparative cytogenetic study of chromosome homology between chicken and Japanese quail. *Cytogenet Cell Genet*, 95:103–109.
52. Slack J. (2004). *Biologie du développement* (Traduction de la 1^{ère} édition anglaise/2001). Bruxelles: Editions De Boeck. p. 482.
53. Spyros A-T. (2001). La génétique moléculaire des organismes modèles: un paradigme de principes généraux en biologie. *Biologie et génétique de développement*, 12.
54. Stock A.D and Bunch T.D. (1982). The evolutionary implication of chromosome banding pattern homologies in the bird order Galliformes. *Cytogenet. Cell. Genet*, 34: 136-148.

55. Suzuki T., Kansaku N., Kurosaki T., Shimada K, Zadworny D., Korde M., Mano T., Namikawa T. and Matsuda Y. (1999). Comparative FISH mapping on Z chromosomes of chicken and Japanese quail. *Cytogenet. Cell.Genet.* 87: 22-26.

T

56. Takagi, N. and Sasaki, M. (1974). *A phylogenetic study of bird karyotypes. Chromosoma* 46: 91-120.
57. Talluri V and Vegnil L. (1965). Fine Resolution of Karyogram of the quail *Coturnix japonica*. *Chromosoma*, 17 (3): 264-272.
58. Tunsaringkarn T., Tungjaroenchai W and Wattasit S. (2013). Nutrient Benefits of Quail (*Coturnix Coturnix Japonica*) Eggs. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 3:1-8.
59. Turpin R., Hartung M. and Stahl MA. (1974). Identification du chromosome W chez la caille japonaise *Coturnix japonica*. *C.R Acad. Sct*, 278: 2157-2160.

V

60. Villot L., Robert A., Chancelier C. et Gregoire A. (2013). Caille des blés (*Coturnix coturnix coturnix*) et Caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*) Hybridation et perspectives de Gestion.

W

61. Wageningen N V., Meinderts J., Bonnier P. et Kasper H. (2004). *Agrodok 34 - L'incubation des œufs par les poules et en couveuse*. Pays-Bas. P. 58.
62. Westmore, A. (1952). A revised classification of the birds of the world. *Smithsonian Misc Collect*, 177: 1-22.

Z

63. Zlotina A., Galkina S., Krasikova A., Crooijmans R. P. M. A., Groenen M. A. M., Gaginskaya E. and Deryusheva S. (2012). Centromere positions in chicken and Japanese quail chromosomes: de novo centromere formation versus pericentric inversions. *Chromosome Res*, 20: 1017-1032.

64. Troutman. (2012). *What Are the Benefits of Quail Eggs?*
http://www.ehow.com/list_6671158_benefits-quail-eggs.html Accessed 9th May 2012.
65. <http://maps.oiseaux.net/caille.du.japon.html>
66. [http://www.lavoixdupaysan.org/8.php?subaction=showfull&id=1237287489&archive=&startfrom=&ucat=8&\[07.07.2010 15:55:57\]](http://www.lavoixdupaysan.org/8.php?subaction=showfull&id=1237287489&archive=&startfrom=&ucat=8&[07.07.2010%2015:55:57])
67. <http://www.chickensales.com.au/poultrybreed/isa-brown/>



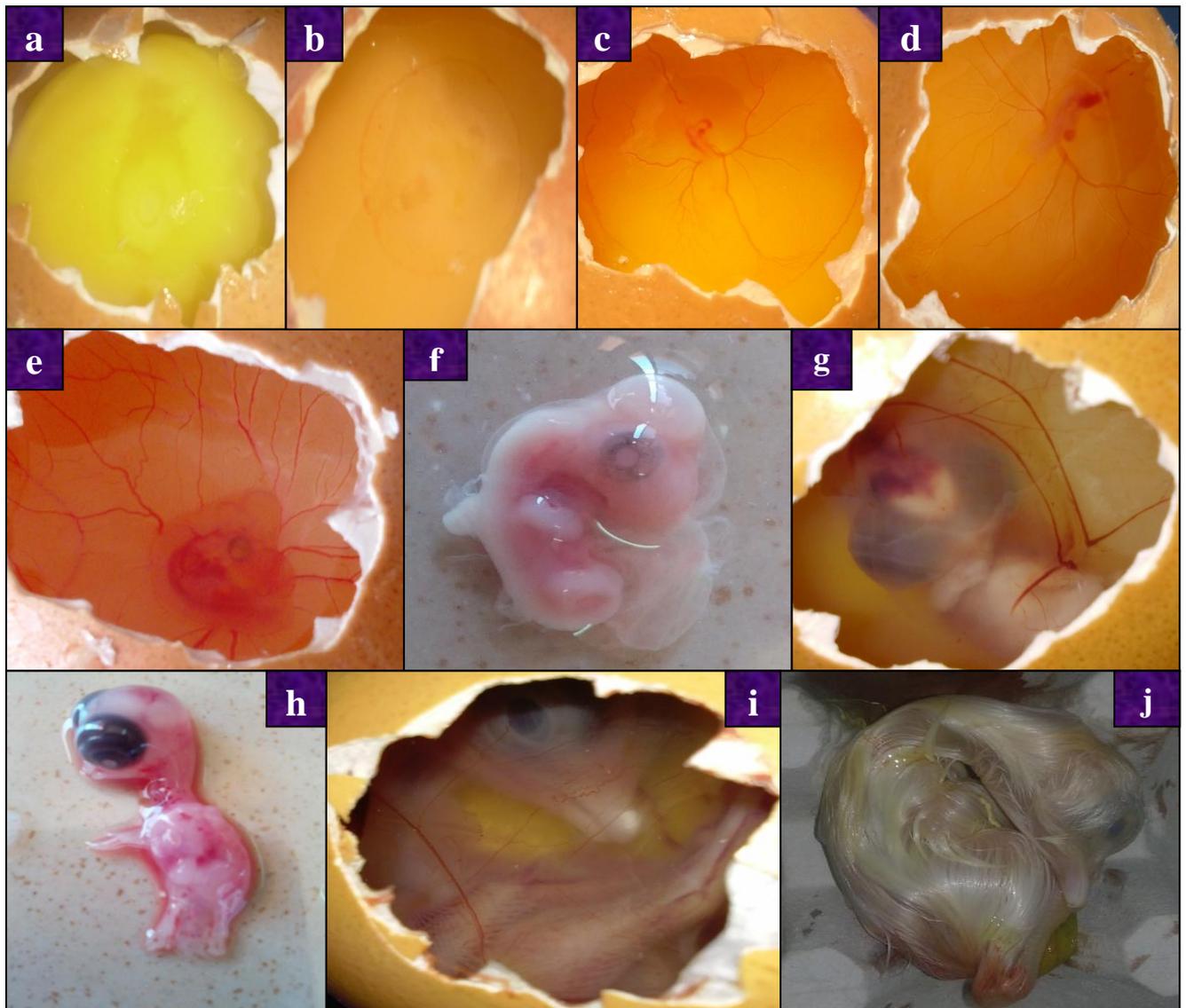
Annexes

RESULTATS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE OBTENUS POUR LE POULET DOMESTIQUE

Tableau II : Effectifs du matériel biologique

Type d'œufs	Œufs de poulet
Nombre total	17
Œufs infertiles	3
Embryons vivants	11
Embryons morts (à différents stades)	3

Les stades du développement embryonnaire obtenus pour le poulet domestique sont présentés sur la figure suivante :



Les différents stades de développement embryonnaire obtenus pour le poulet domestique *Gallus domesticus* (Originale, UAM Bejaia).

- (a)** : Embryon de poulet domestique *Gallus domesticus* à 48 heures d'incubation (stade 13 HH).
- (b)** : Embryon de poulet domestique *Gallus domesticus* à 55 heures d'incubation (stade 16-18 HH).
- (c)** : Embryon de poulet domestique *Gallus domesticus* âgé de 3 jours (Stade 19-20 HH).
- (d)** : Embryon de poulet domestique *Gallus domesticus* âgé de 4 jours (Stade 23-24 HH).
- (e)** : Embryon de poulet domestique *Gallus domesticus* âgé de 5 jours (Stade 26 HH).
- (f)** : Embryon de poulet domestique *Gallus domesticus* âgé de 7 jours (Stade 30-31 HH).
- (g)** : Embryon de poulet domestique *Gallus domesticus* âgé de 9 jours (Stade 35 HH).
- (h)** : Embryon de poulet domestique *Gallus domesticus* âgé de 10 jours (Stade 36-37 HH).
- (i)** : Embryon de poulet domestique *Gallus domesticus* âgé de 12 jours (Stade 38 HH).
- (j)** : Embryon de poulet domestique *Gallus domesticus* âgé de 18 jours (Stade 44 HH).

☛ CULTURE CELLULAIRE

SOLUTIONS NECESSAIRES

- Milieu de culture cellulaire RPMI-10 % SVF

- Milieu RPMI 1640+20 mM HEPES-L.Glutamine (Gibco Réf: 15160-047, lot : S25016D).
- Sérum de veau foetal (Gibco Réf: 15160-047 lot: 3086587): 10%
- L-Glutamine 200 mM (Gibco) : 1%
- Pénicilline et Streptomycine (Gibco) :1%
- Fungizone (Gibco) : 1%

-Solution de colchicine 1X

Solution de stockage 10X (40 µg/ml) : dissoudre 0.4 mg de colchicine dans 10 ml de solution de PBS⁻ puis conserver en fraction de 1ml à -20°C.

Solution de travail 1X (4µg/ml): diluer 1 ml de la solution 10X dans 9 ml de solution de PBS⁻ et conserver en fraction de 1 ml à -20°C.

-Solution hypotonique de KCL (0.075 M)

Dissoudre 5.6 g de KCL dans 1 litre d'eau distillée.

-PHA

Dissoudre 5 mg de pHA (Sigma) dans 5 ml d'eau distillée. Cette solution doit être filtrée (0.22 µm) et conservée en fraction de 1 ml à -20°C.

-Solution de PBS⁻ (Dulbecco's phosphate buffered saline) sans Ca²⁺ et sans Mg²⁺

- NaCl (137 mM) : 8 g
- KCL (5.4 mM) : 0.2 g
- Na₂HPO₄
- 12H₂O (8mM) : 2.89 g
- KH₂PO₄ (1.47 mM) : 0.2 g
- Eau distillée qsp 1 litre.

☞ La solution ainsi préparée doit être à pH= 7,2 est autoclavée.

- Solution de coloration de Giemsa 6%

Pour un volume de 25 ml, mélanger 1.5 ml de colorant Giemsa (Sigma Aldrich) avec 23.5 ml de tampon phosphate.

- Tampon phosphate

- Na₂HPO₄-12H₂O:2.9g.
- KH₂PO₄- : 0.2 g.
- NaCl: 8g.
- KCl: 0.2 g.
- H₂O qsp 1 litre.

☞ Le pH de cette solution est ajusté à 7-7.2 à l'aide d'une solution de soude ou bien d'acide chlorhydrique.

- Solution BSS+ (Hank's balanced Salt solution) avec Ca²⁺ composée de:

- NaCl (137 mM): 8 g
- KCl (5.4 mM):0.4g
- MgSO₄-7H₂O (0.81 mM): 0.2 g
- Na₂HPO₄- 12H₂O (0.33 mM): 0.12 g
- KH₂PO₄ (0.44 mM): 0.06 g
- Eau distillée 1 litre.
- La solution ainsi préparée est autoclavée, ensuite sont rajoutés stérilement (filtre 0.45µm)
- 6 ml d'une solution de NaHCO₃ à 5.6% et 2 ml d'une solution de CaCl₂ (1M). Le pH de la solution finale est de 7.2 -7.7.

-Trypsine

Dissoudre 0.05 g de trypsine en poudre (Sigma) dans 100 ml de solution PBS- pour la trypsine à 0,05% et 1 g de trypsine pour la trypsine à 1%, puis filtrer avec un filtre de 0.22 µm.

- Solution thymidine IX (10 mg/ml)

Dissoudre 100 mg de Thymidine (Sigma) dans 10 ml de milieu RPMI. Filtrer la solution en utilisant un filtre de 0.22 µm.

-Fixateur

3 volumes d'Ethanol+ 1 volume d'acide acétique.



Matériel techniques

- Etuve de laboratoire de type **MEMMERT** : C'est un appareil dans lequel on crée un environnement particulier pour l'incubation des œufs, elle est dotée d'une table de commande (réglage de la température) et une ventilation ;
- Plaque chauffante.
- Support des œufs en carton ;
- Matériel de pesée des œufs constitué d'une balance de précision ;
- Une loupe binoculaire composée de deux lentilles convergentes.
- Trousse de dissection : composée de 2 ciseaux de dissection, des pinces de dissection, des instruments de découpe comme le scalpel ; un bistouri..etc
- Paraffine : elle est sous forme cristal, transparente, elle fond à une température de 71°C ;
- Matériel de mirage : mire-œufs artisanal fabriqué au Laboratoire d'Ecologie.
- Boîte de pétrie et lames en verre ; lamelles
- Pinceau, étiquette; crayon ;
- Appareil photo de type : **SONNY**.

- Microscope photonique de type : **OPTIKA**.

ملخص

السمان الياباني كوترنكس جابانكا هو طائر صغير ينتمي لعائلة الدجاجيات، تربى لميزاتها المختلفة مما يجعل منها حيوان نموذجي في المختبر في علم الأحياء التنموي. يهدف هذا العمل إلى إعطاء تفسيرات افتراضية لعلاقات النشوء والأصل التطوري بين السمان الياباني و فصيلة مقارنة تسمى الدجاج الأليف. هذه الدراسة تساهم من خلال الدراسة الوراثية الخلوية، المقارنة للإجابة على السؤال الذي لا يزال غير واضح لدى علماء الوراثة "ما هو النوع الأقدم: السمان أم الدجاج؟". للقيام بذلك، تم تعقب التطور الجنيني للسمان الياباني للحصول على الأجنة الذين تتراوح أعمارهم بين ٨ و ١٢ يوم. ثانيا تم زرع خلايا ليفية من هذه الأجنة من أجل الحصول على الصبغيات الطورية وتحديد النمط النووي بأشرطة GTG لهذه الفصيلة بين الدجاج والسمان الياباني، على معظم مقارنة مورفولوجية أول ثمانية أزواج جسمية والصبغيات الجنسية أن هناك تشابه صبغي محفوظ للغاية الصبغيات بصرف النظر عن وجود بعض الاختلافات الشكلية (على الصبغيات 7 و 8 و W). قد تكون وقعت خلال التطور الذي تم إثباته من خلال العديد من الأبحاث العلمية. في الواقع، العديد من أحداث الاندماج / الانشطار انقلاب سونتومتر ومع ذلك، فإن هذه النتائج تثير تساؤلات مثيرة للاهتمام للتطور الذي يسمح لنا أن نستنتج أن السمان يبدو من ظهر مؤخرا (غريفين وآخرون، ٢٠٠٧). وعلاوة على ذلك فإن شجرة النشوء والتطور التي شيدت من خلال الجينات الميتوكوندريا تبين أن كوترنكس هو النوع الأقدم، وسيتم رفع هذا اللغز من خلال الدراسات الجزيئية أكثر تفصيلا.

الكلمات الرئيسية: السمان الياباني، الدجاج الأليف، علم الوراثة الخلوية، النمط النووي، النشوء والتطور.

Résumé

La caille japonaise *Coturnix japonica* est un petit oiseau appartenant à la famille des Phasianidés et à l'ordre des Galliformes. Cette espèce a été élevée et domestiquée pour ses différentes caractéristiques faisant d'elle un bon modèle animal de laboratoire dans le domaine de la Biologie du Développement. Le présent travail vise à donner des explications hypothétiques aux relations phylogénétiques et à l'origine évolutive qui existent entre la caille japonaise et une espèce apparentée nommée poulet domestique *Gallus domesticus*. En effet, cette étude consiste à contribuer par une étude cytogénétique comparative pour répondre à une question qui reste encore non élucidée par les généticiens « quelle est l'espèce la plus ancestrale : la caille ou la poule ? ». Pour ce faire, le développement embryonnaire de la caille japonaise a été suivi afin d'obtenir des embryons âgés entre 8 et 12 jours. Dans un second temps, des cultures cellulaires de fibroblastes issus de ces embryons ont été entreprises dans le but d'obtenir des chromosomes métaphasiques puis d'établir le caryotype en bandes morphologiques GTG de cette espèce. La comparaison de la morphologie des huit premières paires autosomiques ainsi que les chromosomes sexuels ZW suggère que l'homologie chromosomique est hautement conservée entre le poulet et la caille japonaise sur la plupart des chromosomes mis à part l'existence de quelques différences morphologiques (sur les chromosomes 7, 8 et le W). Cependant, ces différences ont été expliquées par des remaniements intrachromosomiques qui auraient pu se produire au cours de l'évolution ce qui a été démontré par plusieurs travaux de la littérature. En effet, plus des événements de fusion/fission et inversions péracentriques, la formation de néocentromères a été constatée.

Cependant, ces résultats soulèvent d'intéressantes questions d'évolution ce qui nous a permis de conclure que la caille semble être d'apparition plus récente (Griffin *et al.*, 2007). D'autre part, les arbres phylogénétiques construits à partir de deux gènes mitochondriaux montrent que le genre *Coturnix* est plus ancestral que le genre *Gallus*. En effet, cette énigme ne sera levée qu'avec des études moléculaires plus approfondies.

Mots clés: *Coturnix japonica*, *Gallus domesticus*, Cytogénétique, Caryotype, Phylogénie.

Abstract

Japanese quail *Coturnix japonica* is a small bird belonging to the family Phasianidae and order of Galliformes. This species was domesticated and raised for its various features making it a good laboratory animal model in the field of Developmental Biology. The present work aims to give explanations to the hypothetical phylogenetic relationships and evolutionary origin between Japanese quail and a related species called domestic chicken *Gallus domesticus*. Indeed, this study is to contribute through a comparative cytogenetic study to answer a question that is still not elucidated by geneticists' what is the species most ancient: the quail or the chicken? ". To do this, the embryonic development of Japanese quail was followed to obtain embryos aged between 8 and 12 days. Secondly, cell cultures of fibroblasts from these embryos were undertaken in order to obtain metaphase chromosomes and to establish the karyotype by morphological GTG bands to this species. Comparing the morphology of the first eight autosomal pairs and the sex chromosomes ZW suggests that chromosomal homology is highly conserved between chicken and Japanese quail on most chromosomes apart from the existence of some morphological differences (on chromosomes 7, 8 and W). However, these differences were explained by intrachromosomal rearrangements that may have occurred during the evolution that has been shown by several works of literature. Indeed, more fusion / fission events and pericentric inversions, neocentromeres formation was observed. However, these results raise interesting questions of evolution which allowed us to conclude that the quail seems to be of more recent appearance (Griffin *et al.*, 2007). Furthermore, phylogenetic trees constructed from two mitochondrial genes show that the genus *Coturnix* is the ancestral genus *Gallus*. Indeed, this puzzle will be lifted with more detailed molecular studies.

Key words: *Coturnix japonica*, *Gallus domesticus*, Cytogenetics, Karyotype, Phylogeny.