

**N° d'ordre : 46/2010-M/SN**

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene  
Faculté des Sciences Biologiques



**MEMOIRE**

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de:

**MAGISTER**

En SCIENCES DE LA NATURE

Option : Biologie et Génétique du Développement

Par : M<sup>elle</sup> **MESLI Amel**

Sujet :

**La Tourterelle des Bois (*Streptopelia turtur* L.)  
Espèce Locale Protégée : Etablissement du Caryotype  
à Partir de Cultures Cellulaires Issues d'Embryons et  
d'Animaux Adultes**

Soutenu publiquement le 21 Juin 2010, devant le jury composé de :

<b>M. BOUHADDAD R.,</b>	Professeur à l'USTHB	Président
<b>Mme LADJALI-MOHAMMEDI K.,</b>	Maître de Conférences /A à l'USTHB	Directrice de mémoire
<b>M. DOUMANDJI S.E.,</b>	Professeur à l'INA	Examineur
<b>M. BELHAMRA M.,</b>	Maître de Conférences /A à l'Université de Biskra	Examineur
<b>Mme AMIROUCHE N.,</b>	Maître de Conférences /A à l'USTHB	Examinatrice

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene  
Faculté des Sciences Biologiques



**MEMOIRE**

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de:

**MAGISTER**

En SCIENCES DE LA NATURE

Option : Biologie et Génétique du Développement

Par : M<sup>elle</sup> **MESLI Amel**

Sujet :

**La Tourterelle des Bois (*Streptopelia turtur* L.)  
Espèce Locale Protégée : Etablissement du Caryotype  
à Partir de Cultures Cellulaires Issues d'Embryons et  
d'Animaux Adultes**

Soutenu publiquement le 21 Juin 2010, devant le jury composé de :

<b>M. BOUHADDAD R.,</b>	Professeur à l'USTHB	Président
<b>Mme LADJALI-MOHAMMEDI K.,</b>	Maître de Conférences /A à l'USTHB	Directrice de mémoire
<b>M. DOUMANDJI S.E.,</b>	Professeur à l'INA	Examineur
<b>M. BELHAMRA M.,</b>	Maître de Conférences /A à l'Université de Biskra	Examineur
<b>Mme AMIROUCHE N.,</b>	Maître de Conférences /A à l'USTHB	Examinatrice

## ***Remerciements***

Au terme de ce travail qui a été mené au sein d'une équipe jeune et pleine d'énergie passionnée de science et de connaissance du Laboratoire de Génétique du Développement, sous la direction du Docteur *LADJALI-MOHAMMEDI Kafia*. Je tiens à remercier ma directrice pour son encadrement, sa disponibilité et pour son soutien. Aujourd'hui, je réalise qu'elle a été d'une grande aide, qu'elle m'a éclairé et contribué à mon accomplissement scientifique.

Mes remerciements vont au Professeur *Rachid BOUHADDAD* de m'avoir honorée par sa présidence du jury.

Mes remerciements vont aussi au Professeur *Saleh Eddine DOUMANDJI*, pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie également le Docteur *Nadia AMIROUCHE* d'avoir aimablement accepté de participer comme membre du jury et d'examiner mon travail.

Un grand merci au Docteur *Mohamed BELHAMRA* qui lui aussi m'a été d'une aide exceptionnelle et a accepté plaisamment de juger mon travail.

Il serait indigne de ma part d'obéir à l'égoïsme qui est le naturel de l'être humain sans faire état du soutien et des encouragements de Monsieur le Directeur de la LPS *Ali FERRAGH* ainsi que son autorité, tant sur le plan moral que matériel.

Je tiens également à remercier Monsieur *Omar ACHOU* Directeur du Centre Cynégétique de Zéralda et son équipe pour leur dévouement.

Un laboratoire est forcément le toit d'une équipe scientifique que je remercie pour sa générosité et son soutien mais surtout pour son amitié profonde. Je remercie également *Monsieur Khaled FANTAZI* pour son extrême gentillesse et pour sa bienveillance.

Ce travail aujourd'hui accompli est un hommage à la mémoire du Colonel Ali TOUNSI, le Moudjahid, lequel de son vivant m'a permis d'étudier afin de compter parmi le personnel intellectuel et scientifique.

# Dédicaces

La référence est souvent le fruit d'un amas de peurs et de souffrances et c'est grâce à l'affection des miens que j'ai puisé volonté et force. Chers parents, c'est entre larmes et émotions que je vous dédie ces quatre années d'études, qui je dois dire, ont été pénibles et remplies de moments intenses.

Je salue la confiance de mes parents et je fonds souvent aux souvenirs des craintes et des regards tristes et impuissants de mon père et de ma maman face aux situations délicates auxquelles j'ai été confrontée.

Je crois qu'aujourd'hui, je viens de satisfaire les dernières volontés de mon père (ALLAH Yerrahmou): " je veux qu'elle étudie et qu'elle arrive!! ". *Papa*, je suis arrivée et je te dédie toutes mes ambitions.

Je dédie ces années de labeur à mes grands parents, à ma famille grands et petits, à mes amis et surtout à cette voix qui m'a soutenu, encouragé et ma poussé à me découvrir et à me surpasser.

Je ne peux également oublier de dédier ce travail à mon oncle, le Professeur *MESLI Abdelrezak* pour son soutien moral et ses précieux conseils. Je remercie encore une fois le Docteur *BELHAMRA Mohammed* pour m'avoir soutenu et de nous avoir choyé lors de notre visite à Biskra.

Je dédie le fruit de mon travail aux autorités du LPS et plus précisément à monsieur le sous directeur *Ali FERRAGH* pour son soutien et sa générosité, à monsieur *Mohammed ZEKRI*, à monsieur *Abdenour NANA* pour avoir pressentie et accompagné mes moindres soucis ainsi qu'à madame *Salîha BELKHIRAT* pour sa compréhension et son soutien.

Je dédie ce mémoire à *SAID*, l'élément clé du lancement de ma pratique. Il m'a guidé dans mes sorties sur terrain, mais il a aussi choyé mes œufs et a eu du souci pour moi quand j'en avais, merci à toi et à ton bon fond.

Enfin je dédie mon mémoire et mon bonheur à Mademoiselle *Sofia BELABES* qui je dois dire a été l'ouïe et le réconfort dont j'ai eu besoin. Elle a été plus qu'une amie, une main forte.

# Résumé

La tourterelle des bois *Streptopelia turtur* est un oiseau nicheur et migrateur appartenant à la famille des Colombidés. Cette espèce possède une chair savoureuse et sucrée très appréciée. Cependant, la chasse excessive même durant la période de reproduction, le braconnage et les changements des écosystèmes ont provoqué un déclin important, notamment en Algérie.

Le caryotype de *Streptopelia turtur* n'a jamais été décrit et aucune étude génétique n'a été réalisée sur cette espèce en Algérie. Nous proposons alors de commencer à décrire le génome de cet animal par l'établissement du caryotype à haute résolution en bandes structurales GTG et dynamiques RBG. Nous avons décrit neuf paires de macrochromosomes ainsi que le chromosome sexuel Z obtenus à partir de cultures primaires de fibroblastes issues de poussins et d'embryons à différents stades du développement. Le nombre chromosomique diploïde a été estimé à  $2n=78$  comme pour la plupart des espèces appartenant à cet ordre.

Une cartographie chromosomique comparée a été établie entre l'espèce *Streptopelia turtur* et des espèces appartenant à l'ordre des Colombiformes et des Galliformes comme la poule domestique *Gallus domesticus*. Ceci a révélé une homologie entre les quatre premières paires chromosomiques, les chromosomes 8, 9 et le chromosome sexuel Z et la conservation de la taille des chromosomes 4, 5, 6 et 7 chez les Colombiformes. Certaines inversions de bandes chromosomiques ont été descellées notamment sur le chromosome 1 entre *Streptopelia turtur* et *Gallus domesticus*. Ceci est le résultat de réarrangements chromosomiques survenus au cours de l'évolution.

Des cartographies chromosomiques comparées ont été établies entre la tourterelle des bois et les autres espèces étudiées pour la première fois, dans notre laboratoire (la caille des blés, l'outarde houbara et la perdrix gabra).

Cette étude nous permettra aussi de déceler d'éventuelles anomalies chromosomiques de nombre ou de structure responsables de mortalités embryonnaires précoces.

**Mots clés:** tourterelle des bois *Streptopelia turtur*, espèce endémique, déclin, embryons, poussins, culture primaire de fibroblastes, caryotype, chromosomes à haute résolution, bandes morphologiques GTG, bandes dynamique RBG, génome, cartographie comparée.

# **Sommaire**

<b>Introduction générale</b>	1
<b>Chapitre I : Données bibliographiques</b>	3
<b>1) Biologie de la Tourterelle des bois <i>Streptopelia turtur</i></b>	3
1.1- Taxonomie et phylogénie des Colombiformes	3
1.2- Description de l'espèce <i>Streptopelia turtur</i>	3
1.3- Les sous espèces de <i>Streptopelia turtur</i>	7
1.4- La répartition géographique	7
1.5- Biologie de la reproduction	8
1.6- Migration et hivernage	8
1.7- Déclin de l'espèce et lois de protection	12
<b>2) La cytogénétique aviaire</b>	12
2.1- Historique de la cytogénétique	12
2.2- Caractéristiques du caryotype aviaire	12
2.3- Détermination du sexe chez les oiseaux	13
2.4- Standardisation des caryotypes	13
2.4.1- Standardisation du caryotype de l'Homme et des animaux domestiques	13
2.4.2- Standardisation du caryotype de la poule domestique	15
2.5- Techniques appliquées en cytogénétique aviaire	16
2.5.1- Structure des chromosomes métaphasique	16
2.5.2- Techniques de culture cellulaire	16
2.5.3- Synchronisation des cultures cellulaires et obtention de chromosomes en prométaphase	16
2.5.4- Techniques de colorations et de marquages chromosomiques : La coloration classique	19
2.5.5- Techniques révélant les bandes structurales GTG et dynamiques RBG	19
2.5.5.1- Techniques révélant des bandes structurales	19
2.5.5.2- Techniques révélant des bandes dynamiques	20
2.5.6- Description des caryotypes établis chez les Colombiformes	20

<b>3) La cartographie génique</b>	23
3.1- Caractéristiques du génome aviaire	23
3.2- Structure du génome de la poule domestique et des Colombiformes	23
3.3- La carte génétique	24
3.4- La carte physique	26
<b>4) La carte chromosomique comparée</b>	26
<b>5) Objectif du travail</b>	30
<b>Chapitre I : Matériels et Méthodes</b>	
<b>1) Matériel Biologique</b>	31
<b>2) Culture cellulaire</b>	31
2.1-Technique directe	31
2.2- Culture de lymphocytes	32
2.3- Culture de fibroblastes	34
2.4- Protocole de la trypsination	38
<b>3) Technique d'obtention des chromosomes en prophase et en prométaphase</b>	38
<b>4) Préparation des étalements chromosomiques</b>	41
4.1- Récolte des cellules	41
4.2- Choc hypotonique	41
4.3- Préfixation	41
4.4- Fixation	41
4.5-Etalement	41
<b>5) Technique de marquage chromosomique</b>	42
5.1- Coloration classique (conventionnelle) au Giemsa	42
5.2-Technique de marquage mettant en évidence des bandes morphologiques G ou dynamiques R	44
5.2.1- Techniques de marquage mettant en évidence des bandes G	44
5.2.2- Techniques de marquage mettant en évidence des bandes R	44

5.2.3- Technique de coloration FPG (fluorochrome-photolyse-Giemsa)	45
6) Techniques d'établissement des caryotypes	46
6.1- Prise de photographies et traitement des images	46
6.2- Classification des Chromosomes	46

### **Chapitre III : Résultats**

<b>1) Matériel animal</b>	48
<b>2) Culture cellulaire</b>	48
<b>3) Synchronisation du cycle cellulaire</b>	48
<b>4) Marquages chromosomiques et première description des chromosomes de la Tourterelle des bois <i>Streptopelia turtur</i></b>	49
4.1- Les bandes structurales GTG	49
4.2-Description des neuf premières paires chromosomiques et du chromosome sexuel Z de la tourterelle des bois <i>Streptopelia turtur</i> en bandes GTG	53
4.3- Caryotype en bandes RBG	53
4.4-Description des neuf premières paires chromosomiques et du chromosome sexuel Z de la tourterelle des bois <i>Streptopelia turtur</i> en bandes RBG	54

### **Chapitre IV : Discussions**

<b>1) Culture cellulaire</b>	57
<b>2) Double synchronisation des fibroblastes de la tourterelle des bois</b>	57
<b>3) Etablissement du Caryotype à haute résolution de la tourterelle des bois, <i>Streptopelia turtur</i></b>	57
3.1- Cartographie Chromosomique Comparée	58

<b>Conclusion et perspectives</b>	71
-----------------------------------	----

<b>Références bibliographiques</b>	72
------------------------------------	----

### **Annexes**

## Liste des Figures

- Figure 1.** Arbre phylogénétique consensus montrant l'évolution de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur* par rapport aux autres espèces appartenant à l'ordre des Columbiformes. 4
- Figure 2.** Arbre phylogénétique montrant l'évolution du genre *Streptopelia* par rapport au genre *Gallus*. 5
- Figure 3.** (A) La tourterelle des bois *Streptopelia turtur* au Centre Cynégétique de Zéralda, (CCZ). (B) Patch à lignes noires et blanches sur le coup et un plumage bleu-gris sur la tête et l'abdomen. (C) Un cou de couleur rose et une poitrine blanche. (D) et (E) Coloration chamoise orangée des plumes au dessus et grise au dessous des ailes. (F) Couleur blanche du plumage sous la queue. (G) et (H) Absence du patch noir et blanc chez les jeunes tourterelles des bois. 6
- Figure 4.** Répartition géographique de l'espèce *Streptopelia turtur*. 10
- Figure 5.** Nid de la tourterelle des bois sur un pommier situé au Centre Cynégétique de Zéralda. 10
- Figure 6.** Poussin de la tourterelle des bois âgé d'environ 4 jours au Centre Cynégétique de Zéralda. 10
- Figure 7.** Suivi démographique de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur* à travers quelques Wilayas de l'Algérie. 11
- Figure 8.** Le caryotype standard en bandes RBG des huit premières paires et les chromosomes sexuels Z et W de la poule domestique (à gauche) et les idiogrammes correspondant (à droite). 14
- Figure 9.** Le caryotype standard en bandes GTG des huit premières paires et les chromosomes sexuels Z et W de la poule domestique (à gauche) et les idiogrammes correspondant (à droite). 14
- Figure 10.** Caryotype de la poule domestique *Gallus domesticus* en coloration conventionnelle. 18
- Figure 11.** Caryotype de *Columba livia domestica*, avec 80 chromosomes. 22
- Figure 12.** Caryotype de *Streptopelia risoria var. alba*, avec 74 chromosomes. 22
- Figure 13.** Les neuf premières paires chromosomiques de la tourterelle rieuse *Streptopelia roseogrisea* en coloration conventionnelle. 22
- Figure 14.** (A) et (B) Hybridation de sondes spécifiques aux chromosomes du poulet *Gallus domesticus* sur les chromosomes du pigeon domestique *Columba livia*. Chaque figure montre un chromosome du pigeon domestique *Columba livia* en rouge sur lequel s'est hybridée la sonde du poulet. 28
- Figure 15.** Peinture chromosomique. 29
- Figure 16.** Comparaison des bandes G du chromosome sexuel Z entre le poulet (A) et le 29

pigeon **(B)**. Les chromosomes Z possèdent des bandes structurales G homologues chez les deux espèces.

- Figure 17.** Embryons et poussins mis en culture. 33
- Figure 18.** Les différentes étapes de mise en culture d'un embryon de la tourterelle des bois. 36
- Figure 19.** Culture cellulaire primaire issue d'un embryon de la tourterelle des bois âgé de 7 jours (Vue au microscope inversé (GX40X10X6)). 37
- Figure 20.** Mécanisme du blocage de la synthèse d'ADN lors d'une double synchronisation à la thymidine. 40
- Figure 21.** Apparition de cellules arrondies (en division) 3 heures après de la levée du blocage par la thymidine durant une double synchronisation chez la tourterelle des bois (G x 40 x 10 x 4). 40
- Figure 22.** Action du BrdU sur la phase S du cycle cellulaire et influence sur le type de bandes révélées. 43
- Figure 23.** Mirage d'un œuf de tourterelle des bois effectué par les techniciens du CCZ. 47
- Figure 24.** Embryons de la tourterelle des bois. 47
- Figure 25.** Cultures cellulaires primaires issues d'embryons de la tourterelle des bois (GX40X10X6). 50
- Figure 26. (A) et (B)** Chromosomes allongés obtenus après une double synchronisation à la thymidine en bandes GTG **(A)** et coloration conventionnelle **(B)** (G x100 x 10 x 3). 51
- Figure 27. (A) et (B)** Chromosomes en prométaphase de la tourterelle des bois en bandes GTG. **(C)** Chromosomes en prométaphase d'un embryon de l'espèce *Streptopelia turtur* âgé de 15 jours, observés au microscope optique en contraste de phase (GX100X3). **(D)** Métaphase partielle de la tourterelle des bois marquée en bandes dynamiques RBG (G x 100 X3). 52
- Figure 28.** Première proposition du Caryotype de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur*, de sexe mâle en bandes structurales GTG. 53
- Figure 29.** Première proposition du Caryotype de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur*, de sexe mâle en bandes dynamiques RBG. 55
- Figure 30.** Fibroblastes fusiformes à prolongements cytoplasmiques observés sur des cultures de lignées cellulaires établies chez l'homme **(A et B)** et chez la tourterelle des bois (après 28 jours de mise en culture) **(C)**. 59
- Figure 31. (A)** Chromosomes 1 à 8 et chromosomes sexuels Z et W de la poule domestique en bandes GTG. **(B)** chromosomes 1 à 8 et chromosomes sexuels ZZ de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur*, issus d'un embryon mâle en bandes GTG. 61
- Figure 32.** Comparaison de la morphologie des huit premières paires chromosomiques et des chromosomes sexuels en bandes GTG entre la poule domestique *Gallus domesticus* à gauche 61

et la tourterelle des bois *Streptopelia turtur* à droite.

**Figure 33.** (A) Le caryotype de la poule domestique en bandes RBG. (B) Le caryotype de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur*, issu d'un embryon mâle en bandes RBG. 62

**Figure 34.** Comparaison des huit premières paires chromosomiques et des chromosomes sexuels en bandes RBG entre la poule domestique *Gallus domesticus* et la tourterelle des bois, *Streptopelia turtur*. 62

**Figure 35.** Comparaison des motifs en bandes G des chromosomes 1 chez le poulet (P), le pigeon (PG) et la tourterelle des bois (T). 65

**Figure 36.** Comparaison du chromosome 1 en bandes G chez trois espèces appartenant à l'ordre des Colombiformes (A: *Columbina talpacoti*; B: *Leptotila rufaxilla*; C: *Streptopelia turtur*). 65

**Figure 37.** Comparaison du chromosome 3 en bandes GTG, chez les espèces: *Streptopelia turtur* (S.t), *Gallus gallus* (G.g), *Streptopelia capicola* (S.c) et *Columba domestica* (C.d). 65

**Figure 38.** Hybridation *In Situ* en Fluorescence (FISH) du clone du chromosome 4 du poulet (GGA4) sur une métaphase du pigeon domestique *Columba livia*. 66

**Figure 39.** Réarrangements chromosomiques possibles à l'origine de la formation de chromosomes submétacentyriques (A, B et D), télocentriques (C) et acrocentriques (E). 67

**Figure 40.** Comparaison des chromosomes en bandes structurales GTG chez *Streptopelia turtur* (à droite) et une autre espèce appartenant à l'ordre des Colombiformes *Leptotila rufaxilla* (à gauche). 70

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Critères morphologiques distinguant les sous espèces de <i>Streptopelia turtur</i>	9
<b>Tableau 2:</b> Représentation des variations de la taille des ailes chez quatres sous espèces de <i>Streptopelia turtur</i>	9
<b>Tableau 3 :</b> Descriptions des macrochromosomes du poulet <i>Gallus domesticus</i>	17
<b>Tableau 4:</b> Techniques de marquage des chromosomes de la poule <i>Gallus domesticus</i> et principes biochimiques et fonctionnels	21
<b>Tableau 5 :</b> Variabilités interspécifiques, recensées chez les Colombiformes	25
<b>Tableau 6:</b> Sondes spécifiques des chromosomes du poulet	28
<b>Tableau 7:</b> Comparaison morphologique des chromosomes de la tourterelle des bois vec la poule domestique, l'outarde houbara, la perdrix gabra et de la caille des blés	60

# **Abréviations**

# Abréviations

**%**: pourcentage

**°** : degré

**°C** : degré Celsius

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**AFLP**: Amplified Fragment Length Polymorphism

**ARN**: Acide RiboNucléique

**AT**: paire de bases Adénine-Thymine

**ATPase8/ 6-COIII** : ATP synthase F0 subunits 8 and 6 plus part of Cytochrome *c* Oxydase subunit III

**Ba OH**: hydroxyde de baryum

**BAC**: Bacterial Artificial Chromosome

**BAP** : Biodiversity Action Plan.

**BrdU** : 5-bromo- 2' déoxyuridine

**BSS**: Hank's Balanced Salt Solution

**BTO**: British Trust for Ornithology

**CCZ**: Centre Cynégétique de Zéralda

**CDP**: Cytidine DiPhosphate

**CENP-B**: human centromere antigen B

**cM** : centiMorgan

**cm**: centimètre

**COI**: Cytochrome *c* Oxydase subunit I

**con A**: concanavaline A

**Cyt-b**: Cytochrome b

**DAPI**: 4'-6-diamino-2-phenylindole

**dCDP**: désoxycytidine diphosphate

**dCTP**: désoxycytidine triphosphate

**DMSO** : diméthylsulfoxyde

**dTTP**: désoxythymidine triphosphate

**dUDP**: désoxyuridine diphosphate

**EDTA**: Acide EthylèneDiamineTétraacétique, sel disodique dihydraté

**FdU** : 5-fluorodéoxyuridine

**FIB7**:  $\beta$  fibrinogen intron 7

**FISH**: Fluorescent *In Situ* Hybridization

**FPG**: Fluorochrome-Photolyse-Giemsa

**FSB**: Faculte des Sciences Biologiques

**G**: Giemsa

**g**: gramme

**GC**: paire de bases Guanine-Cytosine

**GGA**: *Gallus Gallus*

**GTG**: bandes G (Giemsa-Trypsine-Giemsa)

**HEPES**: N-2- hydroxyethylpiperazine-N'-2- ethanesulfonic acid

**ICC**: International Chromosome Conference

**ICSAK**: International Committee for the Standardization of the Avian Karyotype

**IRBP**: Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein

**ISCN**: International System for Human Cytogenetic Nomenclature

**ISCNDA**: International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals

**ISSAK:** International System for Standardized Avian Karyotypes  
**ITIS:** Système d'Information Taxonomique Intégré  
**Kb:** Kilo base  
**M:** Molaire  
**Mb:** Méga base  
**mg:** milligramme  
**mg:** milligramme  
**min:** minute  
**ml:** millilitre  
**Mya:** Milliards d'années  
**ND2:** NADH Dehydrogenase subunit 2  
**NOR:** Région Organisatrice de Nucléoles  
**p:** bras court d'un chromosome à 2 bras  
**PBS:** Dulbecco's Phosphate Buffered Saline  
**pg :** picogramme  
**pH:** potentiel Hydrogène  
**PHA:** PhytoHémAgglutinine  
**Phase S:** phase de Synthèse de l'ADN  
**PNR1:** Programme National de Recherches 1  
**PR1:** proline-rich sequences 1  
**PWM :** PokeWeed Mitogène  
**Q :** Quinacrine  
**qsp:** Quantité suffisante pour  
**R:** Reverse  
**RAG-1:** Recombination Activating Protein  
**RBG :** bandes R (Reverse-BrdU-Giemsa)  
**rpm:** rotation par minute  
**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute  
**SNP:** Single Nucleotid Polymorphism  
**SPEC:** European Conservation Concern  
**SSC:** Standard Saline Solution  
**STOC:** Suivi Temporel des Oiseaux Communs  
**SVF :** Sérum de Veau Foetal  
**Tpm :** tour par minute  
**UDP:** Uridine DiPhosphate  
**USTHB:** Université des Sciences Technologiques Houari Boumediene  
**UV:** lumière UltraViolette  
**vol:** volume  
**YAC:** Yeast Artificial Chromosome

# **Introduction**

## **Générale**

# Introduction Générale

Les oiseaux sont apparus au Jurassique, il y a environ 130 millions d'années. Ces espèces ovipares se différencient des autres espèces par la présence des plumes et par l'envol (Alonso *et al.*, 2004). On recense actuellement 9000 espèces dont 38% sont menacées d'extinction. Cette menace est l'une des conséquences des déséquilibres bioclimatiques provoqués essentiellement par l'Homme. Ce dernier a causé entre 50 et 1000 fois plus d'extinctions au cours des 100 dernières années (Bed'home, 1999; GreenFacts, 2005).

La tourterelle des bois *Streptopelia turtur* est oiseau appartenant à l'ordre des Colombiformes originaire du supercontinent Gondwana. Cette espèce appartient au genre *Streptopelia* qui selon une étude phylogénétique basée sur huit séquences géniques nucléaires et mitochondriales, a divergé il y a 30 millions d'années après le genre *Gallus* (Pereira *et al.*, 2007). Elle représente la seule espèce de Colombidés du Paléarctique occidental réalisant une migration transcontinentale. Cette espèce possède le statut d'un oiseau estivant nicheur migrateur, rencontré en Algérie notamment au Nord pour la sous-espèce *Streptopelia turtur arenicola* et au Sud pour la sous-espèce *Streptopelia turtur hoggara*.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à une espèce en déclin la tourterelle des bois *Streptopelia turtur*. Malgré son caractère migratoire, plusieurs témoignages d'écologistes Algériens renseignent sur l'existence de populations de tourterelles des bois observées en dehors de leur saison de reproduction. Ceci révèle l'existence d'un éventuel phénomène de spéciation allopatrique qui serait en cours d'apparition chez les sous-espèces migratrices de la tourterelle des bois. Toutefois, l'histoire de l'évolution montre que les spéciations nécessitent généralement plusieurs centaines de milliers d'années.

Plusieurs études démographiques réalisées en Algérie ont montré que la tourterelle des bois est en diminution significative (Tales, 2003; Boukhemza-Zemmouri *et al.*, 2008). Cette espèce est une victime permanente du braconnage notamment durant sa période de reproduction (Peiro, 2001). C'est ainsi que les autorités Algériennes ont réglementé sa chasse du 15 Juillet au 7 Août en se basant sur la loi n° 88-08 du 26 Janvier 1988 ainsi que sur l'ordonnance n° 06-05 du 15 Juillet 2006 relative à la protection et à la préservation de certaines espèces animales menacées de disparition (Journal Officiel de la République Algérienne n° 79, 2006). Il est important de signaler que cette espèce souffre d'une compétition importante avec la tourterelle turque durant sa période de reproduction, notamment pour les ressources alimentaires et pour la nidification (Dubois M. C., 2002). En plus du braconnage intensif et d'une reproduction parfois perturbée, cette espèce a diminué à cause des problèmes rencontrés en cours de migration et sur les lieux d'hivernage. Ainsi, les variations climatiques, la pression démographique, l'extension de l'agriculture et la désertification sont manifestement un défi majeur pour la préservation de la biodiversité. L'importante diminution des effectifs a permis de classer la tourterelle des bois parmi les espèces prioritaires du Plan d'Action de la Biodiversité (BAP) à cause de son statut de conservation défavorable en Europe (Baillie *et al.*, 2001; Brown, 2002; Jiguet et Julliard, 2006). Elle a également été intégrée en 2003, dans le Programme National de Recherches (PNR1), dans le but d'identifier les sous-espèces Algériennes, de caractériser d'éventuels hybridations entre les espèces sympatriques et de permettre le sexage de cette espèce qui ne possède aucun dimorphisme sexuel apparent (PNR1, 2003).

Très peu de travaux ont été menés sur la génétique de la tourterelle des bois. En effet, la plupart de ces études concernaient la phylogénie et, à ce jour, aucune étude cytogénétique n'a été effectuée sur cette espèce (Nowak, 1975; Goodwin, 1983; Johnson *et al.*, 2001; Pereira

*et al.*, 2007). Sur les 9000 espèces qui sont classifiées actuellement les caryotypes de seulement 8.4 % d'oiseaux, ont été décrits (Bed'hom, 1999).

L'objectif de cette étude est de décrire le génome de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur*, en établissant son caryotype pour la première fois en Algérie. Cette étude cytogénétique sera d'un apport fondamental et permettra de contribuer à l'établissement d'une base de données génomique sur cette espèce en déclin.

Ce travail regroupe quatre principaux chapitres dont le premier rassemble l'ensemble des données écologiques, cytogénétiques et génomiques de la tourterelle des bois et des espèces apparentées. Nous commencerons d'abord par décrire sa position phylogénétique, sa morphologie, sa biologie de la reproduction ainsi que certaines études démographiques réalisées sur cette espèce en déclin. Par la suite, nous détaillerons les principales techniques de marquages cytogénétique chez les espèces aviaires et nous citerons les différentes études cytogénétiques déjà réalisées chez d'autres espèces de Colombiformes ainsi que celles réalisées chez la poule domestique. Enfin, nous évoquerons les principales caractéristiques des génomes aviaires ainsi que des études de cartographie génique comparée.

Le second chapitre consiste à exposer la démarche expérimentale qui nous permettra dans un premier temps de réaliser des cultures cellulaires de fibroblastes à partir de poussins et d'embryons à différents stades du développement. Puis, nous expliquerons, par la suite, le procédé de la double synchronisation des fibroblastes ainsi que les principales techniques de marquages chromosomiques en bandes morphologiques GTG et dynamiques RBG, réalisées pour la première fois chez la tourterelle des bois en Algérie.

Nous présenterons dans les deux derniers chapitres l'essentiel de nos résultats puis nous discuterons l'aspect des cultures de fibroblastes, le nombre diploïde et la morphologie des chromosomes de cette espèce grâce à l'ensemble des données bibliographiques que nous avons rassemblé. Enfin, nous établirons des comparaisons interspécifiques de bandes morphologiques GTG et dynamiques RBG avec des espèces appartenant à l'ordre des Colombiformes ainsi qu'avec la poule domestique, considérée comme modèle de l'organisation des génomes aviaires (Yamashina et Makino, 1946; Makino *et al.*, 1956; Galton et Bredbury, 1966; Itoh *et al.*, 1969; De Lucca, 1984; Guttenbach *et al.*, 2003; Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999).

L'obtention de chromosomes allongés chez cette espèce et la description précise des chromosomes en bandes structurales GTG et dynamiques RBG nous permettra par la suite d'entamer la description du génome de cette espèce et de procéder à une comparaison avec des espèces étudiées dans notre laboratoire, telle que la poule domestique, la caille des blés, la perdrix gabra et l'outarde houbara.

# **CHAPITRE I**

## **Données bibliographiques**

# 1) Biologie de la Tourterelle des bois *Streptopelia turtur*

## 1.1-Taxonomie et phylogénie des Colombiformes

L'ordre des Colombiformes regroupe entre 300 et 312 espèces réparties en deux familles représentées par les Ptérocilidés (les Gangas) et les Columbidae (Colombes, Pigeons et Tourterelles) (Hanzak, 1967; ITIS\*Amérique du Nord, 2008). La famille des Columbidae (Columbidae) se divise en cinq sous familles constituées des Didunculinae, les Gourinae, les Otidiphabinae, les Treroninae et les Columbinae. La famille des Columbinae comporte le genre *Streptopelia* (Bonaparte, 1855) qui renferme différentes espèces dont l'espèce *Streptopelia turtur* (Morel, 1985; Peterson, 2007; ITIS\*Amérique du Nord, 2008).

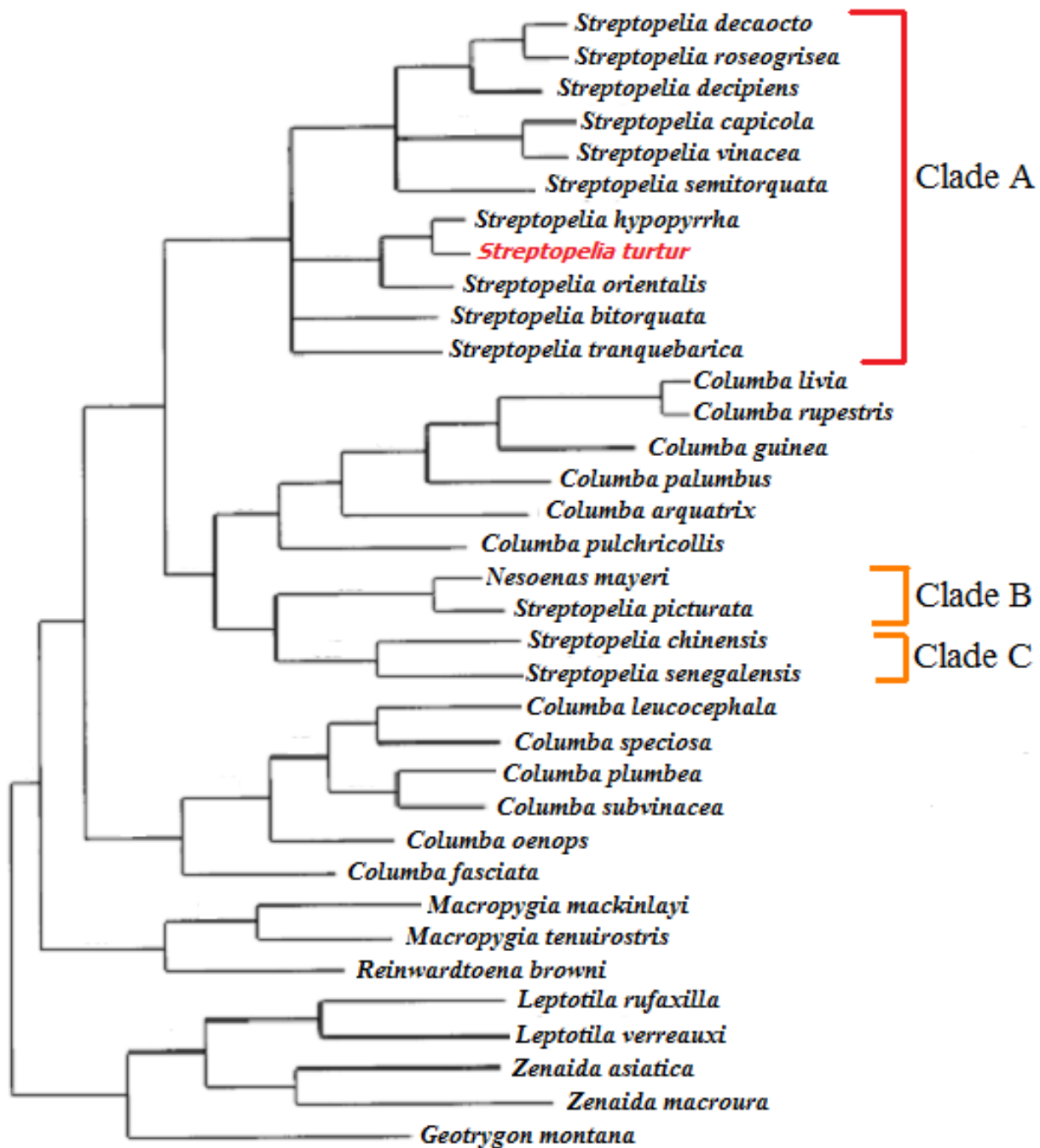
Des études phylogénétiques basées sur les caractéristiques morphologiques et sur les relations présumées entre les espèces appartenant au genre *Streptopelia* ont été effectuées (Nowak, 1975; Goodwin, 1983). Par ailleurs, aucun arbre définitif n'a été établi qui serait basé sur des analyses phylogénétiques rigoureuses. Une autre étude phylogénétique a été effectuée chez les pigeons et les tourterelles sur l'analyse de parcimonie (évaluation des changements évolutifs pour toutes les séquences d'une espèce ayant dérivé d'un ancêtre commun) des séquences combinées de trois gènes mitochondriaux (le Cytochrome-b «Cyt-b», la cytochrome oxydase I «COI» et la sous unité 2 du nicotinamide adénine dinucléotide déshydrogénase «ND2») et d'un gène nucléaire (l'intron 7 du B-fibrinogène «FIB7»). Dans cette étude, trois clades majeurs A, B et C du genre *Streptopelia* renfermant l'espèce *Streptopelia turtur* ont été décrits (Figure 1). L'arbre phylogénétique ainsi obtenu, ne pourrait être considéré comme définitif pour les genres *Columba*/*Streptopelia*, car une tranche importante de pigeons Africains a été négligée (Lecointre et Le Guyader, 2001; Cheke, 2005; Hemida, 2005).

Une autre étude phylogénétique a été menée sur 78 espèces et sous-espèces de pigeons et de tourterelles et une espèce appartenant à un autre taxon, l'*Aerodramus salanganus*. Les taux d'insertions (introduction d'une séquence génétique mobile ou virale dans un gène) et de délétions ont été analysés dans deux gènes mitochondriaux (le cyt-b et l'ATPase 8) et dans un gène nucléaire (le FIB7). L'analyse de parcimonie de ces séquences combinées a permis de reconstruire la phylogénie de ces espèces en fournissant deux arbres les plus parcimonieux. Les nœuds (point de rencontre de trois branches dans un arbre représentant une espèce ou un ancêtre) des arbres résultant de cette analyse étaient pour la plupart appuyés par plus de 50% de répétitions bootstrap (valeur obtenue par l'analyse de la robustesse qui montre la résistance d'un nœud à la perturbation des données) (Kaplan et Delpech, 1996; Lecointre et Le Guyader, 2001; Johnson, 2004; Hemida, 2005).

Plus récemment, chez la famille des Columbidae l'analyse des séquences combinées de cinq gènes mitochondriaux (ATPase8/ 6-COIII, ND2, Cyt-b et COI) ainsi que trois autres gènes nucléaires (RAG-1, IRBP et FIB7) a permis de réaliser un arbre phylogénétique consensus et a également montré le caractère ancestral du genre *Gallus* par rapport aux genres *Columba* et *Streptopelia* (Figure 2). Par ailleurs, le genre *Streptopelia* aurait divergé en même temps que le genre *Columba*, il y a environ 30 millions d'années (Pereira *et al.*, 2007).

## 1.2- Description de l'espèce *Streptopelia turtur*

L'espèce *Streptopelia turtur* est un petit animal de 26 à 28 cm, pesant entre 130 et 180g. Cet oiseau possède un cou mince, une tête ronde et une poitrine profonde ressemblant ainsi à un pigeon. Sur la tête le plumage est bleu-gris alors que sur l'abdomen, le ventre et sous la queue il est blanc (Figure 3). Cet animal est coloré en gris et en noir et porte une bande terminale blanche distincte à l'envol. Le cou et la poitrine sont roses et le bec est foncé.



**Figure 1.** Arbre phylogénétique consensus montrant l'évolution de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur* par rapport aux autres espèces appartenant à l'ordre des Columbiformes (Johnson *et al.*, 2001). Cet arbre a été réalisé grâce à l'analyse de parcimonie des séquences combinées de 3 gènes mitochondriaux (Cyt-b, ND2 et COI) et d'un gène nucléaire (FIB7). Cette analyse montre l'existence de 3 clades\* A, B et C dans le genre *Streptopelia*. L'espèce *Streptopelia turtur* appartient au clade A.

**COI:** sous unité I du cytochrome *c* oxydase.

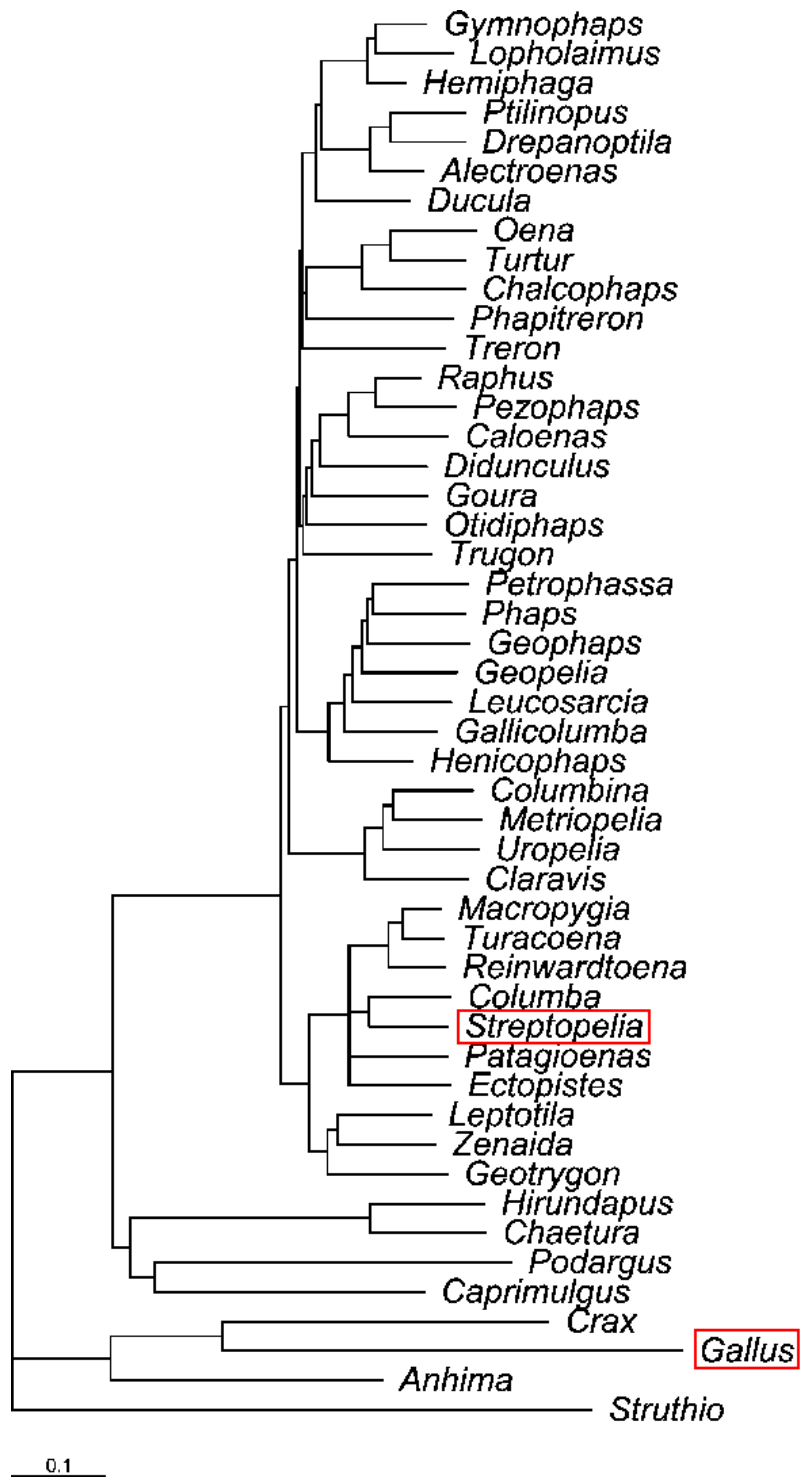
**Cyt-b:** Cytochrome b.

**FIB7:** intron 7 du  $\beta$  fibrinogène.

**ND2:** sous unité 2 du nicotinamide adénine dinucléotide déshydrogénase.

\* **Clade:** taxon strictement monophylétique\*\* (Lecointre et Le Guyader, 2001; Hemida, 2005).

\*\* **Monophylétique:** caractéristique d'espèces appartenant au même taxon et se regroupant sur la même racine (Lecointre et Le Guyader, 2001; Hemida, 2005).



**Figure 2.** Arbre phylogénétique montrant l'évolution du genre *Streptopelia* par rapport au genre *Gallus* (Pereira *et al.*, 2007). Cet arbre à été obtenu après le séquençage de 8 gènes nucléaires et mitochondriaux (ATPase8/ 6-COIII, ND2, Cyt-b, COI, RAG-1, IRBP et FIB7). Il montre la divergence précoce du genre *Gallus* par rapport au genre *Streptopelia*.

**ATPase8 / 6-COIII:** sous unité 8 et 6 de l'ATP synthase F0/ sous unité III de la Cytochrome *c* Oxydase.

**RAG-1:** protéine activatrice de la recombinaison.

**IRBP:** protéine de liaison des photorécepteurs rétiniens.

\*La barre d'échelle représente le nombre de substitutions par site.



**Figure 3.** (A) La tourterelle des bois *Streptopelia turtur* au Centre Cynégétique de Zéralda, (CCZ). (B) Patch à lignes noires et blanches sur le cou et un plumage bleu-gris sur la tête et l'abdomen. (C) Un cou de couleur rose et une poitrine blanche. (D) et (E) Coloration chamoise orangée des plumes au dessus et grise au dessous des ailes. (F) Couleur blanche du plumage sous la queue. (G) et (H) Absence du patch noir et blanc chez les jeunes tourterelles des bois (Source de la photo G: Dubois, 2002).

Un patch évident de lignes blanches et noires est présent sur les côtés du cou (Cramp, 1985; Goodwin, 1983; Snow et Perrins, 1998). Les pattes et la peau entourant les yeux sont rouges/violettes (Browne et Aebischer, 2000). Les jeunes sont plus bruns (ternes) et n'ont pas de marque bicolore (patches) sur le cou. La tourterelle des bois émet un roucoulement (rou-rr) doux et ronronné, nécessaire durant sa période de reproduction et se nourrit généralement dans les champs. Son vol est rapide et assez brusque et lui permet de quitter son perchoir avec de bruyants battements d'ailes (Snow et Perrins, 1998; Heinzel *et al.*, 2004). Il n'existe pas de dimorphisme sexuel apparent mais de légères différences dans le plumage et dans la taille existent chez les deux sexes (Browne et Aebischer, 2000). L'espèce *Streptopelia turtur* peut être confondue avec la tourterelle orientale *Streptopelia orientalis*, mais cette dernière diffère par des ailes plus tachetées, un dos plus foncé, une poitrine plus brune, d'étroites barres alaires blanches et des lignes gris-bleues et noires sur le cou (Heinzel *et al.*, 2004).

### 1.3-Les sous-espèces de *Streptopelia turtur*

L'espèce *Streptopelia turtur* comporte les sous-espèces *Streptopelia turtur* ssp. *turtur*, *Streptopelia turtur* ssp. *arenicola*, *Streptopelia turtur* ssp. *isabellina* et *Streptopelia turtur* ssp. *hoggara*. La sous-espèce *Streptopelia turtur* ssp. *rufescence* a été rattachée à la sous-espèce *Streptopelia turtur* ssp. *isabellina* (Goodwin, 1967; Morel, 1985). Il existerait également deux autres sous-espèces appelées *Streptopelia turtur* ssp. *loei* et *Streptopelia turtur* ssp. *moltonii* qui sont moins bien décrites (Peterson, 2007; ITIS\*Amérique du Nord, 2008; Jordi, 1987; Von, 1923). La reconnaissance des sous-espèces peut s'effectuer par l'examen du plumage (Tableau 1). Ce dernier passe par tous les intermédiaires, entre le brun terne du manteau et le gris-bleu de la tête à une couleur générale chamoise orangée (Morel, 1985), mais aussi, par la mesure de la longueur de l'aile (Tableau 2) (Vaurie, 1965; Viega, 1998).

### 1.4-La répartition géographique

La tourterelle des bois *Streptopelia turtur*, est une espèce migratrice, dont l'aire de nidification englobe une vaste zone du Paléarctique occidental et central (Figure 4) (Morel, 1985). La zone de reproduction de cet oiseau s'étend sur l'Europe, l'Asie et l'Afrique du nord. La population Européenne est entièrement migratrice et sa zone d'hivernage s'étend sur le Sahel Africain (Glutz, 1980; Geroudet, 1983; Cramp, 1985).

La sous-espèce *Streptopelia turtur* ssp. *turtur* se rencontre presque à travers toute l'Europe et l'Ouest Asiatique alors que la sous-espèce *Streptopelia turtur* ssp. *arenicola* s'étend de l'Afrique du Nord (en incluant les îles Baléares) jusqu'au Moyen Orient. La sous-espèce *Streptopelia turtur* ssp. *hoggara* est présente dans les montagnes du Sahara Central alors que la sous-espèce *Streptopelia turtur* ssp. *rufescens* est localisée en Egypte et au Nord du Soudan (Cramp, 1985). Il existe deux sous-espèces en Algérie la sous espèce *Streptopelia turtur* ssp. *arenicola* et la sous-espèce *Streptopelia turtur* ssp. *hoggara*. La sous-espèce *arenicola* niche dans de nombreux habitats boisés de la mer jusqu'au sud (Ouergla, El Golea, Béchar et peut être Beni Abbés) et s'arrête aux piedmonts du Djurdjura en Kabylie. L'*hoggara* habite le Hoggar, le Tassili et peut être Timimoun et elle est observée en hiver à Adrar, Djanet, El Goléa, Raggan et Ain Salah (Isenmann et Moali, 2000). L'espèce *Streptopelia turtur* a été également observée dans deux zones humides, classées sites RAMSAR en 2005, à Sebkhath El Melah (à 12 Km d'El Meniaa, Wilaya de Ghardaïa) et à l'embouchure de Moulouya située près de la frontière Algéro-Marocaine (Boumezbeur, 2005; Cherkaoui *et al.*, 2006).

## 1.5-Biologie de la reproduction

La tourterelle des bois construit généralement son nid sur des arbres assez étoffés au voisinage des zones de cultures et des marécages. En Algérie, cette espèce niche préférentiellement sur les oléastres, sur le frêne et le cyprès chauve (Khifer et Leroul, 2005). Alors qu'elle préfère l'aubépine et le sureau en Grande Bretagne (Murton, 1968). On estime la hauteur moyenne de ses nids en Algérie, entre 3.35 et 3.40 m à partir du sol et entre 2.32 et 2.4 m en Grande Bretagne et en Espagne (Khifer et Leroul, 2005; Murton, 1968; Icona, 1989). Les nids sont généralement situés sur des branches loin du trône et souvent orientés vers l'Est (Figure 5) (Khifer et Leroul, 2005). En Algérie, l'espèce *Streptopelia turtur arenicola* se reproduit dans le Nord du 25 Avril jusqu'au 15 Juillet et se caractérise par 1 à 3 pontes de deux œufs (Peiro, 2001; Khifer et Leroul, 2005). L'espèce *Streptopelia turtur* du Maroc se reproduit du mois d'Avril jusqu'à la mi-Mai avec une seconde ponte vers le mois de Juillet appelée ponte de remplacement et dont les oisillons ne font que rarement partie de l'effectif migrateur (El Mastour, 1988) (Figure 6). En France, la période de reproduction s'étale de la fin du mois d'Avril jusqu'au mois de Juillet (Yeatman-Berthelot et Jarry, 1994).

L'incubation des œufs commence juste après la ponte et dure 14 à 16 jours. La couvée s'étale sur 40 à 45 jours avec une durée de nourrissage ne dépassant pas les 18 jours (Peiro, 2001; Browne, 2002; Khifer et Leroul, 2005; Dubois, 2002). Une baisse de la reproduction, estimée à 11.87%, a été observée entre 2003 et 2005 dans certaines régions de l'Algérie causée par la chute des œufs du nid, l'abandon des nids par les parents, la non éclosion et la prédation au stade oisillon (Khifer et Leroul, 2005; Boukhemza-Zemmouri *et al.*, 2008).

## 1.6- Migration et hivernage

La tourterelle des bois fait partie du catalogue des espèces signalées en Algérie. Elle bénéficie également du statut d'un oiseau migrateur et estivant nicheur abondant mais n'hivernant qu'occasionnellement au Maroc (Isenmann et Moali, 2000; Thévenot *et al.*, 2003; Hanane, 2009).

Le caractère essentiellement migrateur de la tourterelle des bois lui permet de quitter ses aires de reproduction Européennes pour aller rejoindre les zones d'hivernage d'Afrique selon trois voies principales. En effet la première voie est Ibérique empreintée par les populations de l'Europe de l'Ouest passant par le sud de la France et la Péninsule Ibérique afin de traverser le Maroc et la Mauritanie. La deuxième voie est Italo-Grecque, elle est empreintée par les individus de l'Europe Centrale en passant par la Tunisie et la Libye. Enfin, la dernière voie est la voie Egypto-Syrienne par laquelle transitent les populations de l'Europe de l'Est et de l'Asie (Khifer et Leroul, 2005; Alerstam, 1992).

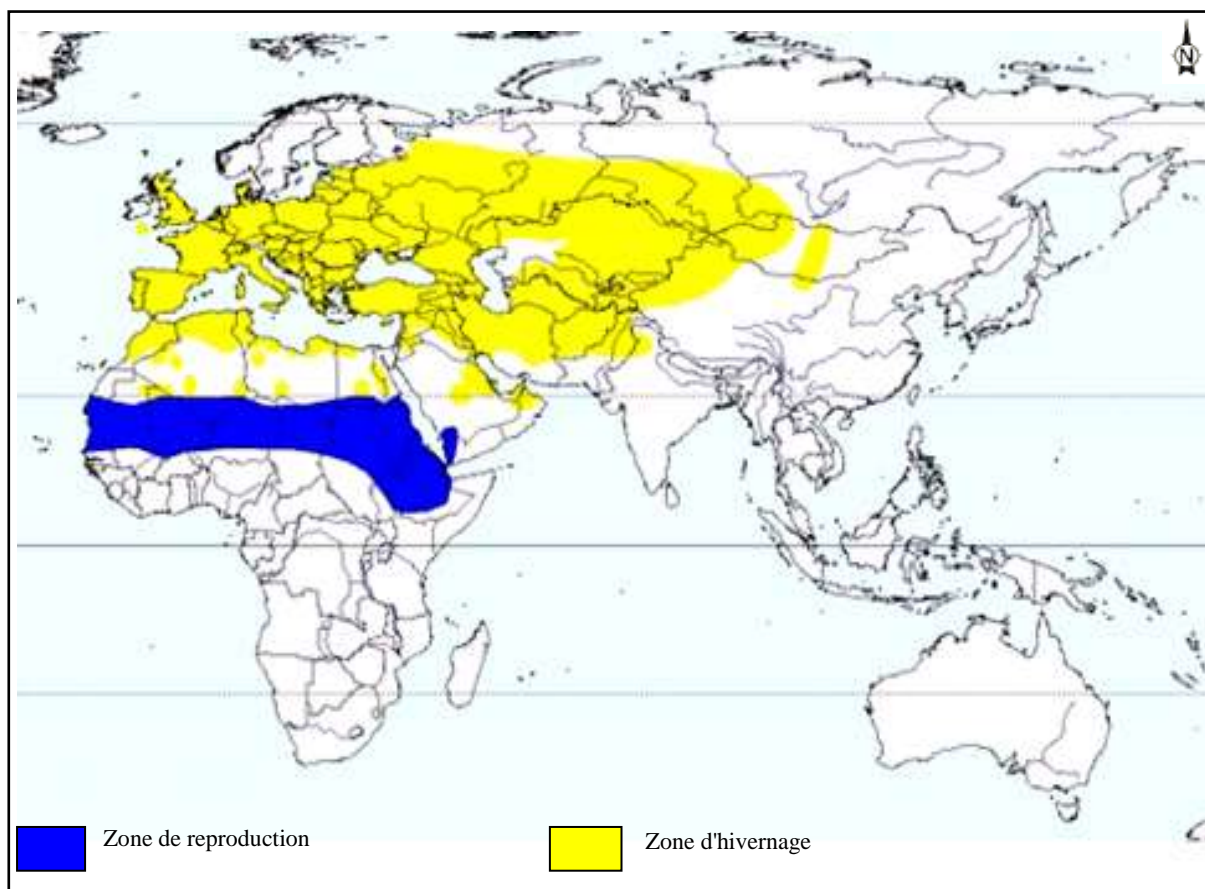
Les sous-espèces *Streptopelia turtur* ssp. *hoggara* ainsi que *Streptopelia turtur* ssp. *rufescens* sont souvent qualifiées de sédentaires n'entreprenant que de petits mouvements migratoires, alors que *Streptopelia turtur* ssp. *turtur* et *Streptopelia turtur* ssp. *arenicola* sont migratrices (Cramp, 1985; Dubois, 2002). En hiver, la sous-espèce *Streptopelia turtur* ssp. *hoggara* est observée en Algérie à Adrar, Djanet, El Goléa, Tamenrasset, Timimoun, Reggan et même à Ain Salah (Isenmann et Moali, 2000), mais aussi presque régulièrement les mois de Décembre et Janvier à l'embouchure de Moulouya au Maroc (Thévenot *et al.*, 2003). Les sous-espèces *Streptopelia turtur* ssp. *turtur* et *Streptopelia turtur* ssp. *arenicola*, quant à elles, passent la majorité de l'hiver (du début du mois d'Octobre jusqu'à la fin du mois de Mars) dans la région du Sahel en Afrique et au sud du Sahara. (Cramp, 1985). Il existe un léger décalage d'arrivée entre les sous-espèces *Streptopelia turtur* ssp. *turtur* et *Streptopelia turtur* ssp. *arenicola* au

**Tableau 1.** Critères morphologiques distinguant les sous espèces de *Streptopelia turtur* (Morel, 1985).

Sous espèces	Caractères morphologiques		
	Taille	couleur tête	Couleur manteau
<i>Streptopelia turtur</i> ssp. <i>turtur</i>	la plus grosse	gris-bleue	brun terne
<i>Streptopelia turtur</i> ssp. <i>isabellina</i>	la plus petite	roux orangé ou chamois	roux orangé ou chamois
<i>Streptopelia turtur</i> ssp. <i>hoggara</i>	intermédiaire entre <i>isabellina</i> et <i>turtur</i>	grise (couronne)	plus rousse que grise
<i>Streptopelia turtur</i> ssp. <i>arenicola</i>	plus petite que <i>turtur</i>	gris bleu moins intense et moins étendu sur la nuque que <i>turtur</i>	brun terne plus pâle que <i>turtur</i>

**Tableau 2.** Représentation des variations de la taille des ailes chez quatre sous espèces de *Streptopelia turtur* (Witherby, 1952; Vaurie, 1965; Morel, 1985; Viega, 1998).

Critères de sélection			<i>Streptopelia turtur</i> ssp. <i>turtur</i>	<i>Streptopelia turtur</i> ssp. <i>Isabellina</i>	<i>Streptopelia turtur</i> ssp. <i>hoggara</i>	<i>Streptopelia turtur</i> ssp. <i>arenicola</i>	
			Afrique du nord	Asie			
Longueur de l'aile	Mâle	Effectif	20	6	3	20	20
		Taille (mm)	173 – 182 (178)	158 – 169 (163)	169 – 173 (171)	166 – 180 (173)	163 – 176 (169)
	femelle	Effectif	-	3	3	-	-
		Taille (mm)	166 – 175 (170.5)	160 – 163 (161)	163 – 172 (167)	-	-



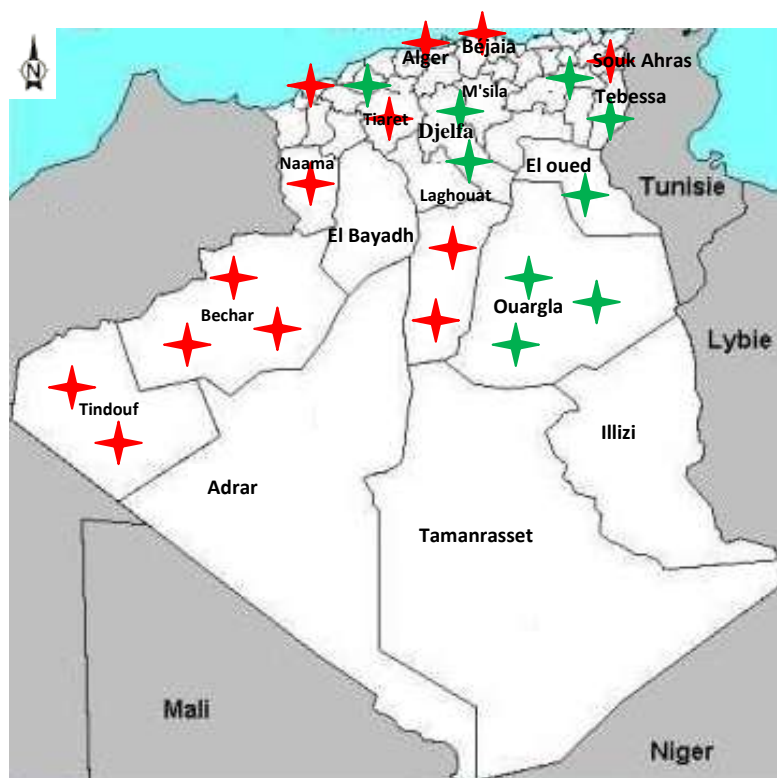
**Figure 4.** Répartition géographique de l'espèce *Streptopelia turtur* (Del Hoyo *et al.*, 1997).



**Figure 5.** Nid de la tourterelle des bois sur un pommier situé au Centre Cynégétique de Zéralda.



**Figure 6.** Poussin de la tourterelle des bois âgé d'environ 4 jours au Centre Cynégétique de Zéralda.



★ Regression    ★ Augmentation

**Figure 7.** Suivi démographique de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur* à travers quelques Wilayas de l'Algérie (Tales, 2003).

Maroc, car la sous-espèce *arenicola* arrive au mois de Mars, tandis que la sous-espèce *turtur* arrive au mois d'Avril (Morel, 1986).

### **1.7-Déclin de l'espèce et lois de protection**

En Europe, l'espèce *Streptopelia turtur* est en déclin. Elle figure dans l'annexe II/2 de la directive CEE 79/409, appelée également directive d'oiseau dont l'objectif est d'assurer la protection de tous les oiseaux sauvages sur le territoire Européen et des états membres. Cette espèce a également un statut de conservation défavorable en Europe, classée en catégorie 3 d'après la priorité mondiale SPEC (European Conservation Concern) (Sylvain *et al.*, 1997; Heath *et al.*, 2000, Birdlife International, 2004b). Le programme de Suivi Temporel des Oiseaux Communs (STOC) en France (2005- 2006) déclare une diminution significative de 14% des effectifs (Jiguet et Julliard, 2006). Des travaux organisés par le British Trust for Ornithology (BTO) ont rapporté un déclin de 69% de l'effectif de cette espèce en Grande Bretagne entre 1968 et 1998 (Baillie *et al.*, 2001). Ce déclin si important a poussé le gouvernement de Grande Bretagne a placé la tourterelle des bois sur la liste des espèces prioritaires sur le plan d'action de la biodiversité (Biodiversity Action Plan, BAP) (Brown, 2002).

En Algérie, la tourterelle des bois fait partie du Programme National de Recherches (PNR1), pris en charge par le Centre Cynégétique de Zéralda (CCZ) et dont le but est de dresser un plan de gestion rationnel des populations Maghrébines et Ouest Européennes dans le cadre d'une collaboration Internationale. Ce plan permet de connaître la répartition spatio-temporelle des populations Maghrébines et Ouest Européennes, d'identifier un éventuel polymorphisme phénotypique entre ces deux populations et d'effectuer le sexage des individus (PNR1, 2003). Des études statistiques menées en Algérie, ont prouvé parfois une augmentation des effectifs et parfois une régression qui semble être prédominante sur l'ensemble des zones recensées (Figure 7) (Tales, 2003; Boukhemza-Zemmouri *et al.*, 2008).

## **2) La cytogénétique aviaire**

### **2.1- Historique de la cytogénétique**

Vers 1885, Weisman, Strasburger, Köllicker et Hertwig ont qualifié la chromatine de base physique de la transmission des caractères. Cette notion a été confirmée vingt ans après, grâce aux études de Sutton, Boveri et De Vries et a montré l'intérêt capital de la cytogénétique. Cette dernière permet d'apparier des chromosomes homologues et de les classer. Après des traitements spécifiques, les bandes chromosomiques ainsi obtenues permettent l'identification des chromosomes et la détection d'éventuels réarrangements chromosomiques. L'avènement des techniques de biologie moléculaire a permis l'identification et le séquençage des fragments d'ADN suivi de leur localisation sur des régions chromosomiques précises. Ensuite, des cartes chromosomiques très informatives ont été construites.

### **2.2-Caractéristiques du caryotype aviaire**

Les Colombiformes ont fait partie des premiers oiseaux dont les caryotypes ont été établis à partir des cellules testiculaires en division (Guyer, 1902). Cependant l'étude des caryotypes aviaires a toujours connu un grand retard en comparaison avec les mammifères. Ainsi seuls 10% des espèces d'oiseaux ont eu leur caryotype établi (Bed'home, 1999). Les espèces aviaires se caractérisent par un nombre diploïde de chromosomes élevé, allant de 40 pour l'oedicnème criard *Burhinus oedicnemus* à 138 chromosomes pour le Martin-pêcheur *Alcedo atthis*. Deux tiers des espèces possèdent un nombre de chromosomes diploïde compris entre 76 et 82 (Bed'home, 1999). Les caryotypes des oiseaux sont fortement hétérogènes. Ils

comportent un nombre réduit de grands chromosomes appelés macrochromosomes et un grand nombre de chromosomes ponctiformes appelés microchromosomes (Fillon, 1998; Bed'home, 1999). Les macrochromosomes du poulet représentent environ 75% de la taille totale de son génome, pour une moyenne de 106 Mb par chromosome (Smith et Burt, 1998). Alors que les microchromosomes ne représentent que 25% du génome, pour des tailles physiques estimées entre 7 et 23 Mb. Les microchromosomes contiennent plus de 50% des gènes et représentent 23% du génome de la femelle (Smith et Burt, 1998; Bloom *et al.*, 1993; Burt, 2002). La morphologie des microchromosomes est beaucoup plus homogène et la plupart sont acrocentriques et très difficiles à identifier individuellement en microscopie optique (Kaelbling et Fechheimer, 1983; Ladjali, 1994). L'attribution d'un groupe de liaison à chaque paire de microchromosomes est très difficile, mais ils peuvent être identifiés par des sondes moléculaires spécifiques (Fillon *et al.*, 1998).

La femelle des oiseaux représente le sexe hétérogamétique (ZW) (Spillman, 1908; Werner, 1927) et le mâle est homogamétique (ZZ). La taille du chromosome Z se caractérise par sa stabilité et son uniformité durant l'évolution et représente généralement entre 5.2% à 7.4% de la totalité du génome (De Lucca, 1984; Ohno *et al.*, 1964).

### **2.3-Détermination du sexe chez les oiseaux**

Chez le poulet, la description de 16 grands chromosomes chez le mâle et de 15 chez la femelle ainsi que 62 autres petits éléments dans les deux sexes a permis de proposer 78 chromosomes chez le mâle et 77 chez la femelle (Yamashina, 1944). Ces derniers résultats ont permis de proposer les chromosomes sexuels ZZ pour le mâle et Z0 pour la femelle qui ne possède qu'une copie de ce chromosome. Le chromosome W a été décrit par la suite, comme étant plus petit que le chromosome Z, souvent hétérochromatique et à réplication tardive (Ohno, 1961; Schmid, 1962). Il n'ya généralement pas de dimorphisme sexuel chez les oiseaux. Ainsi la plupart des Colombidae (60 %) sont qualifiés de monomorphiques (Wu *et al.*, 2007) et on a souvent recours à des techniques de sexage moléculaire.

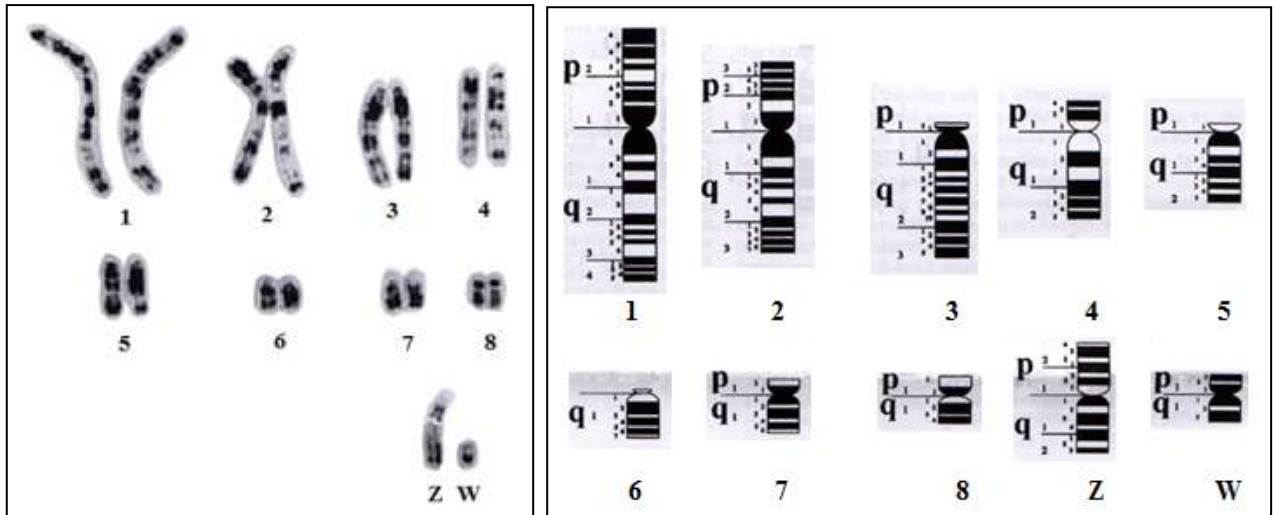
L'espèce *Streptopelia turtur* présente des variations de la taille de l'aile et de la couleur du plumage chez les des deux sexes (Tableau 1 et 2) (Witherby, 1952; Vaurie, 1965; Morel, 1985; Viega, 1998). Chez la sous-espèce *arenicola* certaines femelles possèdent des plumes chamoises à l'extrémité de la tache du cou, au lieu d'être grises ou blanches. Cette différence de coloration fournit ainsi un aspect moins contrasté à la tache qui tend à se confondre avec l'ensemble du cou teinté de chamois (Morel, 1985).

Des études réalisées chez la tourterelle orientale *Streptopelia orientalis* ont permis de construire deux sondes reconnaissant le chromosome W de *Streptopelia orientalis*, de *Streptopelia chinensis* et de *Columba livia*. Les deux sondes (Tursex OPAV17-F et Tursex OPAV17-R) ont amplifié un fragment de 777 pb, présent que chez les femelles (Wu *et al.*, 2007). Une bonne amplification du marqueur a été observée chez les Colombidés à l'exception de différences mineures dans la taille des fragments concernant *Streptopelia chinensis* (778 pb) et *Columba livia* (770 pb). Par contre aucune amplification n'a été détectée chez l'espèce *Streptopelia chinensis formosa* et chez les mâles. La comparaison des produits d'amplification montre une homologie de 96% entre ces trois séquences avec une variation de 21 pb seulement (Wu *et al.*, 2007). Une étude similaire chez les pigeons a révélé la présence d'une séquence femelle-spécifique de 732 pb (GenBank, No. AY944219) amplifiée grâce aux sondes DoveOPC20F et DoveOPC20R (Horng *et al.*, 2005, 2006).

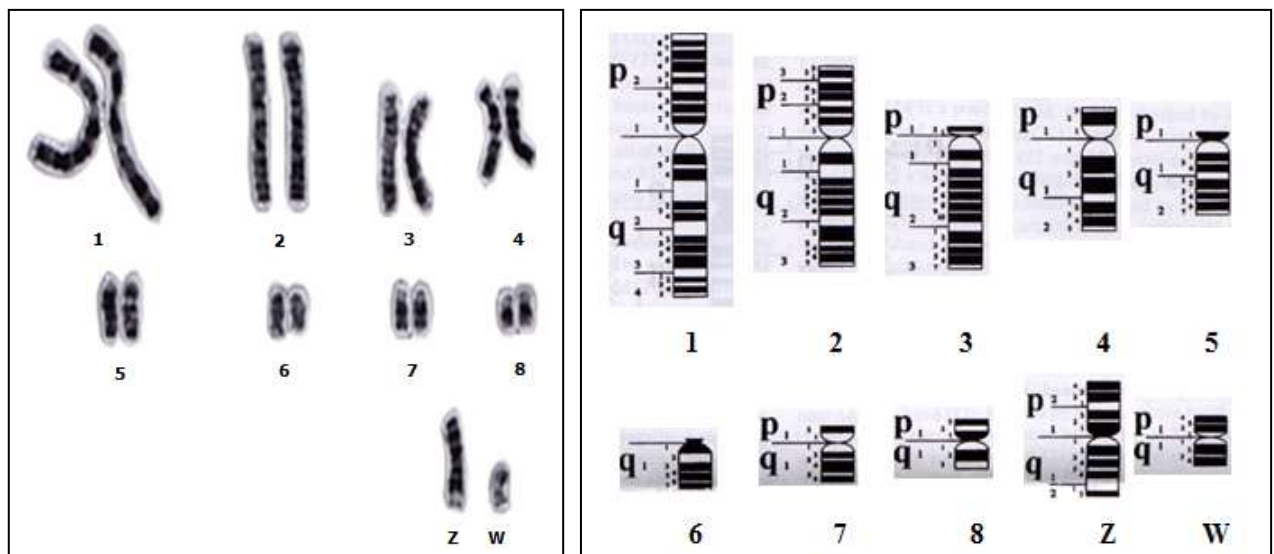
### **2.4-Standardisation des caryotypes**

#### **2.4.1- Standardisation du caryotype de l'Homme et des animaux domestiques**

La première réunion de standardisation des chromosomes humains a eu lieu à Denver



**Figure 8.** Le caryotype standard en bandes RBG des huit premières paires et les chromosomes sexuels Z et W de la poule domestique (à gauche) et les idiogrammes correspondant (à droite) (Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999).



**Figure 9.** Le caryotype standard en bandes GTG des huit premières paires et les chromosomes sexuels Z et W de la poule domestique (à gauche) et les idiogrammes correspondant (à droite) (Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999).

Depuis, plusieurs réunions d'experts ont amélioré la nomenclature et la classification des chromosomes (Conférence de London, 1960; Conférence de Chicago, 1966; Conférence de Paris, 1971 et son supplément de 1975; ISCN de Stockholm, 1977; ISCN de Paris, 1980; ISCN, 1985; Cancer Supplement ISCN, 1985; ISCN de Memphis, 1995; 16<sup>th</sup> International Chromosome Conference (16<sup>th</sup> ICC), 2007). Cette nomenclature définit les formules chromosomiques normales et pathologiques et donne des symboles pour les différentes anomalies de nombre et de structure les plus fréquentes. Elle contient également une nomenclature des bandes pour chaque chromosome selon différentes techniques de marquages. Des caryotypes sont proposés comme référence ainsi que des idéogrammes correspondants. Les animaux domestiques ont eux aussi bénéficié de réunions de standardisation. La première réunion s'est déroulée à Guelph en 1976 (Reading Conference, 1976) et a abouti à l'établissement des caryotypes standards en bandes G pour les principales espèces d'élevage dont la vache, le mouton, la chèvre, le cheval et le lapin. Depuis d'autres conférences se sont tenues, comme celle de l'INRA de Jouy-en-Josas en 1989, l'ISCNDA (1989), le 8<sup>e</sup> colloque des animaux domestiques à Guelph en 1993 qui a corrigé le caryotype standard du mouton et le 9<sup>e</sup> congrès américain en 1995 à l'université du Texas.

#### **2.4.2- Standardisation du caryotype de la poule domestique**

Au début des années 80 un groupe de travail s'est réuni à St Paul (Université du Minnesota), composé de chercheurs, tels que Bitgood (Université du Wisconsin), Fechheimer (Université de l'Ohio), Bloom (Université de Cornell), Biederman (Université du Calgary) et tant d'autres. Au début des années 90, le développement de la carte génétique moléculaire du poulet nécessitait l'utilisation d'un caryotype standard. C'est alors qu'un autre groupe des plus grands cytogénéticiens, dont F. A. Ponce de Leon, P. Popescu, N. Fechheimer et K. Ladjali, se sont rencontrés le 19 Août 1992 en Utrecht à l'occasion du 10<sup>ème</sup> colloque Européen de cytogénétique animale, aboutissant aux recommandations suivantes:

- 1- Etablir une corrélation entre les bandes G et R à partir de chromosomes métaphasiques et prométaphasiques en adoptant la nomenclature du standard des chromosomes humains (ISCN, 1978);
- 2- Classer les chromosomes selon la taille par ordre décroissant en plaçant les chromosomes sexuels à part;
- 3- La bande caractéristique du chromosome sexuel Z (large et claire) qui est colorée négativement en bande C est considérée comme caractéristique du bras q du chromosome Z;
- 4- Etablir les représentations schématiques des chromosomes en noir et blanc (Ladjali, 1994).

La réunion de standardisation de l'International Committee for the Standardization of the Avian Karyotype (ICSAK) tenue en 1993 à Guelph a été organisée par Abel Ponce de Leon et Kafia Ladjali. Ce comité a ainsi abouti à la réalisation d'un standard à usage universel en cytogénétique aviaire (Ladjali *et al.*, 1995). Le caryotype standard, International System for Standardized Avian Karyotypes (ISSAK), établi chez le poulet en bandes GTG et RBG où les huit paires de macrochromosomes et les chromosomes sexuels Z et W ont été décrits et publiés par Ladjali-Mohammedi *et al* en 1999 (figure 8 et 9). Les chromosomes ont été numérotés selon l' International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 1978) et classés en se basant sur leur taille avec l'orientation du bras court (p) vers le haut. Ce caryotype a été utilisé comme référence pour les caryotypes aviaires.

Ainsi, le caryotype normal de la poule domestique *Gallus gallus domesticus*, est constitué de 78 chromosomes, comprenant 76 autosomes et 2 chromosomes sexuels Z et W. La classification des chromosomes du poulet dépend de la définition attribuée par les différents auteurs, ainsi le poulet possède 6 à 10 paires de macrochromosomes (Smith et Burt, 1998; Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000). Les autosomes sont morphologiquement différents et sont classés par ordre de taille décroissant. La taille du gonosome Z est intermédiaire entre celle du chromosome 4 et du chromosome 5 tandis que le gonosome W a une taille et une morphologie semblable à la huitième paire (Tableau 3) (Ladjali, 1994; Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999; Masabanda *et al.*, 2004).

## **2.5-Techniques appliquées en cytogénétique aviaire**

### **2.5.1- Structure des chromosomes métaphasique**

Le chromosome est constitué d'ADN et de protéines histones et non histones, organisés en chromatine spiralisée (Berkaloff *et al.*, 1981; Barch, 1991). Au cours de la division cellulaire, la chromatine se condense permettant une parfaite individualisation des chromosomes qui sont constitués de deux chromatides unies au niveau du centromère (Watson *et al.*, 1989). La chromatine comprend l'euchromatine (portions codantes de l'ADN) et l'hétérochromatine (l'ADN hautement ou moyennement répété et généralement non transcrit) (Babu et Verma, 1987; Watson *et al.*, 1989). L'hétérochromatine (1/5 à 1/3 de l'ADN total) est répliquée tardivement à la fin de la phase S du cycle cellulaire. Elle est localisée au niveau des centromères, des organisateurs nucléolaires, des constriction secondaires, des télomères, le chromosome Y des mammifères et des insectes ainsi que le chromosome sexuel W des oiseaux contenant de l'hétérochromatine avec un taux variable selon les espèces (Stahl et Hartung, 1981). Il n'existe pas de constriction secondaires sur les chromosomes de la poule (Ladjali, 1994).

### **2.5.2- Techniques de culture cellulaire**

Il existe naturellement des tissus spontanément en division active tels que la moelle osseuse, le tissu testiculaire et les tissus néoplasiques et des caryotypes peuvent être établis à partir de ces types cellulaires. Ces méthodes sont appelées des techniques directes. Ainsi, chez le poulet après 16 heures de développement embryonnaire, on peut obtenir un nombre raisonnable de cellules analysables en métaphase (Fechheimer et Jaffe, 1966a; Fechheimer *et al.*, 1968a; Ladjali, 1994; Ladjali *et al.*, 1995a; Ladjali *et al.*, 1995b).

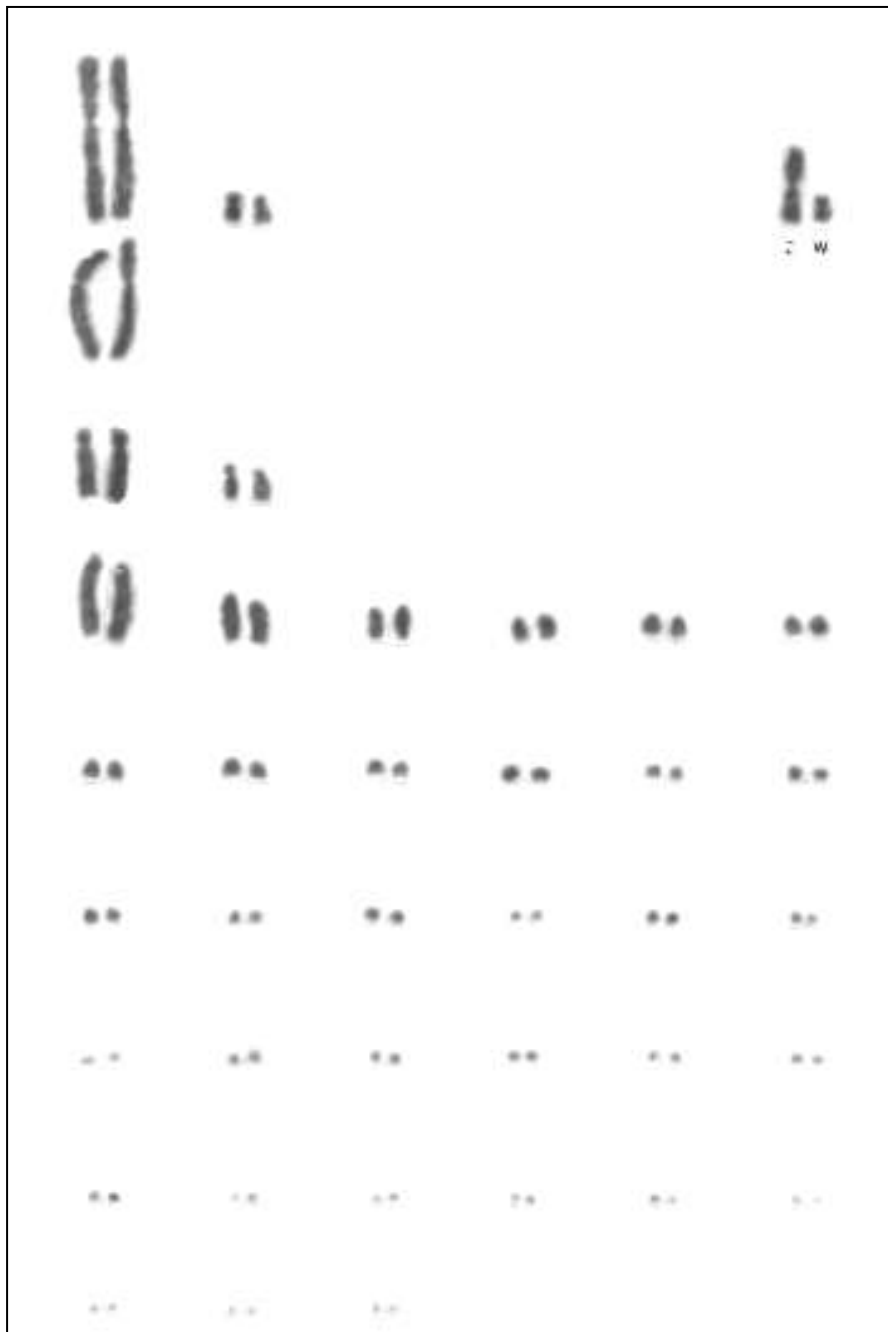
Par ailleurs, l'étude des caryotypes peut être réalisée par la culture de cellules lymphocytaires, des fibroblastes ou cellules amniotiques (Boué *et al.*, 1979). Ces méthodes constituent les techniques indirectes. La colchicine est utilisée comme agent antimitotique. Les chromosomes sont séparés et individualisés grâce à la découverte du choc hypotonique par Hsu, (1952) (Dutrillaux et Couturier, 1981; Ladjali, 1994).

La culture primaire de fibroblastes est souvent issue de biopsies du derme mais aussi de nombreux autres tissus (aponévrose, muscles, reins, gonades, cœur, poumons) prélevés de préférence sur des embryons de 9 jours (Ladjali, 1994; Ladjali *et al.*, 1995c).

Les cultures de lymphocytes nécessitent des conditions et des réactifs spécifiques. Ainsi, suite à la découverte des propriétés mitogènes de la phytohémataglutinine (PHA) et d'autres lectines mitogènes telles que la concanavaline A et le pokeweed, les cultures de lymphocytes ont pu être effectuées à partir du sang total (Moorhead *et al.*, 1960; Ladjali, 1994).

**Tableau 3.** Descriptions des macrochromosomes du poulet *Gallus domesticus* (Ladjali, 1994 ; Ladjali *et al.*, 1995c; Masabanda *et al.*, 2004).

Groupe de classification du chromosome	Numéro du chromosome	Morphologie du chromosomes	Bras p		Bras q	
			Bandes GTG	Bandes RBG	Bandes GTG	Bandes RBG
Groupe A	1	Submétacentrique	15	11	19	17
	2	Submétacentrique	11	9	17	15
	3	Acrocentrique	2	2	19	17
	4	Télocentrique	3	4	9	8
	5	Acrocentrique	1	1	11	9
	6	Acrocentrique	7	7	-	-
	7	Télocentrique	2	2	6	6
	8	Submétacentrique	3	2	3	4
	Z	Métacentrique	7	7	8	7
	W	Métacentrique	4	3	4	3



**Figure 10.** Caryotype de la poule domestique *Gallus domesticus* en coloration conventionnelle (Ladjali, 1994).

### **2.5.3- Synchronisation des cultures cellulaires et obtention de chromosomes en prométaphase**

La condensation des chromosomes atteint son apogée au début de la métaphase. Ainsi cette condensation conduit au raccourcissement des chromosomes et à la diminution des Structures en bandes qui permettent l'identification précise des chromosomes. Lors de la préparation d'étalements chromosomiques, les chromosomes sont à divers stades de division allant de la prophase à la métaphase. La synchronisation permet la récolte d'un nombre important de cellules au stade de prométaphase et après des marquages chromosomiques spécifiques, offre un dessin en bandes dit à « haute résolution » sur des chromosomes allongés. Cette méthode s'appuie sur l'action inhibitrice de certains agents sur la synthèse de l'un des désoxyribonucléotides triphosphate nécessaire à la réplication de l'ADN n'interférant que peu ou pas avec la synthèse de l'ARN et des protéines. La levée de l'inhibition conduit au redémarrage de la synthèse d'ADN permettant d'obtenir des cellules en prophase et en prométaphase selon le moment où les cellules sont récoltées. Parmi les agents bloquants les plus utilisés, il existe l'améthoptérine ou méthotrexate, l'aminoptérin, le 5-fluorodéoxyuridine (FdU) et la thymidine en excès (Ladjali, 1994; Ladjali *et al.*, 1995c; Popescu *et al.*, 1998).

### **2.5.4- Techniques de colorations et de marquages chromosomiques : La coloration classique**

La coloration conventionnelle des chromosomes est réalisée avec du Giemsa ou plus rarement l'acridine orange (Couturier *et al.*, 1973). Ces colorants, utilisés seuls, donnent une idée de la morphologie générale des chromosomes (Figure 10). Ils sont également utilisés pour révéler les bandes chromosomiques. Le Giemsa est un mélange complexe de molécules appartenant principalement au groupe des thiazines, chargées positivement et interagissant avec les groupements phosphate de l'ADN. La liaison thiazine-ADN provoque une diminution de la longueur d'onde d'absorbance du colorant qui passe du bleu pâle au bleu foncé (Comings, 1978).

### **2.5.5- Techniques révélant les bandes structurales GTG et dynamiques RBG**

Les bandes chromosomiques caractérisent des segments de chromatine présentant des propriétés fonctionnelles et structurales particulières. Elles sont mises en évidence par des réactions biochimiques faisant intervenir les composants chromosomiques (ADN et protéines). Les marquages chromosomiques dépendent de la réplication de l'ADN et de la condensation des chromatides (Cormings, 1978; Drouin *et al.*, 1994; Ladjali *et al.*, 1995c) (tableau 4). Les différents marquages sont classés suivant un code spécifique à trois lettres. Ce code est adopté pour distinguer la technique cytogénétique utilisée. Ainsi la première lettre correspond au type de bandes, la seconde à la nature de la technique et la troisième au colorant utilisé.

Chez le poulet les chromosomes à haute résolution ont été obtenus, pour la première fois, après une double synchronisation à la thymidine. Un nombre de bandes égal à 391 a été décrit sur un caryotype haploïde de 10 paires de chromosomes et les chromosomes sexuels (182 bandes R et 209 bandes G). Des sous-bandes ont été analysées à différents stades de condensation et les bandes observées en métaphase sont le résultat de la fusion progressive d'un certain nombre de sous-bandes prophasiques (Ladjali *et al.*, 1995c).

#### **2.5.5.1-Techniques révélant des bandes structurales**

Ce type de bandes s'appuie uniquement sur la structure intrinsèque des chromosomes, sans traitements préalables durant la culture cellulaire et fournit des bandes structurales C, Q, G et R. La technique des bandes C colore sélectivement l'hétérochromatine constitutive, riche

en ADN répété, quelque soit le stade du cycle cellulaire. Elle marque seulement les régions centromériques et télomérique des macrochromosomes et la majorité des microchromosomes qui sont entièrement hétérochromatiques (Pardue et Gall, 1970; Pollock et Fechheimer, 1981). Les techniques de bandes Q et G, mettent en évidence des régions riches en bases AT, alors que celles des bandes R mettent en évidence les régions riches en GC (Van de Sande *et al.*, 1977; Carlenius *et al.*, 1981; Caspersson *et al.*, 1968; Fritschi et Stranzinger, 1985; Stock *et al.*, 1974; Wang et Shoffner, 1974). Chez le poulet, une coloration multiple (DA-DAPI) ayant pour but la mise en évidence de régions riches en bases AT et GC (Schweizer, 1980; Auer *et al.*, 1987), a révélé la présence d'un bloc hétérochromatique riche en GC dans la région terminale du bras court du chromosome 1. La région terminale du bras long du chromosome 2 et le microchromosome porteur de l'organisateur nucléolaire portent un bloc hétérochromatique également. Un petit bloc riche en GC a été révélé sur l'un des bras du chromosome W. Les régions riches en AT ont été localisées en régions terminales et péracentromériques du chromosome W.

La technique de coloration Ag-NOR révèle les régions organisatrices du nucléole contenant des gènes codant pour l'ARN ribosomique, localisées sur le chromosome classé comme la 16<sup>ème</sup> paire (Goodpasture et Bloom, 1975; Bloom et Bacon 1985; Macera et Bloom, 1981; Miller *et al.*, 1996; Wain *et al.*, 1998).

#### **2.5.5.2- Techniques révélant des bandes dynamiques**

Les bandes dynamiques (G et R) sont obtenues après incorporation d'un analogue structural de la thymidine, le 5-bromo- 2' déoxyuridine (BrdU), dans l'ADN chromosomique pendant la phase S de réplication. Si le BrdU est incorporé pendant la première moitié de la phase S et après traitement particulier, c'est-à-dire coloration par un fluochrome (Hoechst 33258), suivie d'une protéolyse et une coloration au Giemsa, des motifs en bandes G (réplication tardive) apparaissent. Si l'incorporation du BrdU s'effectue avant les dernières heures de la culture qui représentent 6 à 7 heures chez le poulet, les bandes R (réplication précoce) sont mises en évidence (Perry et Wolf, 1974 ; Schmid et al, 1989 ; Ponce de Leon et al, 1992; Ladjali, 1994; Ladjali *et al.*, 1995c).

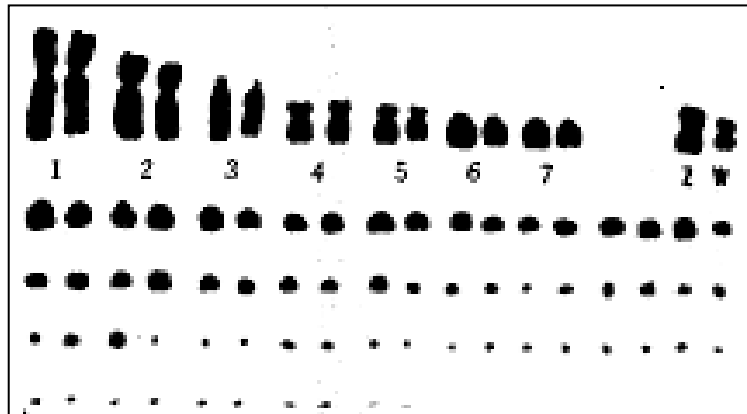
#### **2.5.6- Description des caryotypes établis chez les Colombiformes**

Certaines études ont décrit huit paires de chromosomes chez le pigeon domestique *Columba livia* (Guyer, 1902) et d'autres travaux ont décrit 16 et 18 macrochromosomes chez les tourterelles et les pigeons (Yamashina et Makino, 1946; Makino *et al.*, 1956; Galton et Bredbury, 1966; Itoh *et al.*, 1969). Par la suite, des cultures de pulpe de plumes (Sasaki *et al.*, 1968) réalisées sur certaines espèces des Colombiformes, ont décrit 74 chromosomes pour l'espèce *Streptopelia risoria* et l'espèce *Streptopelia risoria var.alba* et 80 chromosomes pour l'espèce *Columba livia domestica* (Figure 11 et 12). Ces études révèlent une fois de plus l'homologie des macrochromosomes entre *Streptopelia risoria* et *Streptopelia risoria var.alba* (Itoh *et al.*, 1969). Les 5 premières paires chromosomiques sont généralement similaires entre les pigeons et les tourterelles (Itoh *et al.*, 1969).

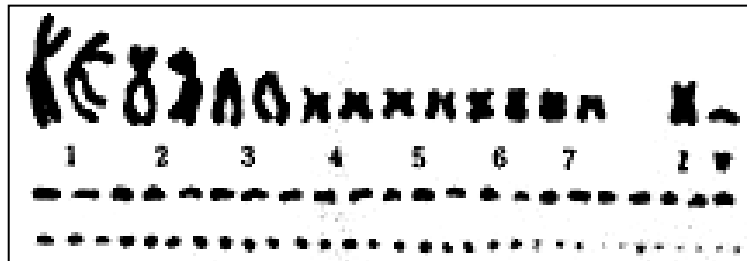
Les chromosomes 1 et 2 sont submetacentriques et le chromosome 3 est décrit comme subtélomériques ou télomériques (Itoh *et al.*, 1969) alors qu'il apparaît acrocentrique sur les caryotypes proposés dans l'article de Itoh *et al.*, (1969) (Figure 11 et 12). Les chromosomes 4 et 5 sont submetacentriques. Le chromosome 6 est télomérique chez *Columba livia domestica* et métacentrique chez *Streptopelia risoria var.alba*. Il est parfaitement connu que les chromosomes 6 et 7 sont différents entre les espèces de Colombiformes (Itoh *et al.*, 1969). Il est important de signaler que le chromosome 6 de *Columba livia domestica* apparaît acrocentrique alors qu'il est décrit comme télomérique sur la photo du caryotype proposé par Itoh *et al.*, (1969) (Figure 11).

**Tableau 4.** Techniques de marquage des chromosomes de la poule *Gallus domesticus* et principes biochimiques et fonctionnels (Ladjali, 1994).

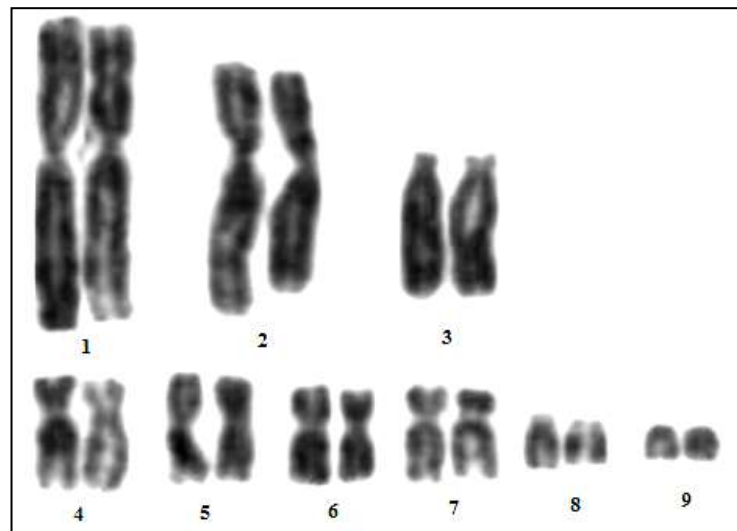
<b>Marquages</b>	<b>Principes</b>	<b>Auteurs</b>
<b>Bandes C (de centromère)</b>	Coloration de l'hétérochromatine constitutive contenant de l'ADN répété, de réplication tardive pendant la phase de synthèse de l'ADN. Marquage du chromosome W chez la poule. Traitement à l'hydroxyde de baryum (Ba OH) et coloration au Giemsa.	Pardue et Gall, 1970; Stefos et Arrighi, 1971; Carlenius <i>et al.</i> , 1981; Pollock et Fechheimer, 1981.
<b>NOR (de région organisatrice du nucléole)</b>	Coloration par la méthode Ag-NOR, technique de précipitation argentique utilisant une solution de nitrate d'argent.	Bloom et Bacon, 1985; Auer <i>et al.</i> , 1987.
<b>Bandes G (de Giemsa)</b>	Coloration de l'euchromatine riche en AT, utilisant soit l'action d'une enzyme protéolytique (trypsine), soit une dénaturation par la chaleur des différents composés protéiques et/ou nucléiques.	Seabright, 1971; Stock <i>et al.</i> , 1974; Carlenius <i>et al.</i> , 1981; Schmid <i>et al.</i> , 1989; Bitgood <i>et al.</i> , 1981; Rytzman et Tegelstrom, 1981; Wang et Shoffner, 1974.
<b>Bandes R (de reverse)</b>	Coloration de l'euchromatine riche en GC, mise en évidence par une dénaturation par la chaleur ou par l'action de produits fluorescents ayant une affinité pour les bases GC comme la chromomycine A3, l'olivomycine et la mithramycine.	Schweizer, 1976; Van de Sande <i>et al.</i> , 1977; Schnedl <i>et al.</i> , 1977; Carlenius <i>et al.</i> , 1981; Auer <i>et al.</i> , 1987; Olsen, 1987; Schmid <i>et al.</i> , 1987; Ponce de Leon <i>et al.</i> , 1992.
<b>Bandes Q (de quinacrine)</b>	Coloration de l'euchromatine (l'ADN transcrit), induit par la quinacrine ou le DAPI.	Bloom et Goodpasture, 1976; Bloom et Macera, 1974; Fritschi et Stranzinger, 1985.



**Figure 11.** Caryotype de *Columba livia domestica*, avec 80 chromosomes (Itoh, 1969).



**Figure 12.** Caryotype de *Streptopelia risoria var. alba*, avec 74 chromosomes (Itoh, 1969).



**Figure 13.** Les neuf premières paires chromosomiques de la tourterelle rieuse *Streptopelia roseogrisea* en coloration conventionnelle (Guttenbach *et al.*, 2003).

Le chromosome Z de *Columba livia domestica* est métacentrique (Figure 11) (Itoh *et al.*, 1969). Le chromosome W a été désigné comme étant le plus petit des macrochromosomes, il est métacentrique chez *Columba livia domestica* et télocentrique chez *risoria var. alba* alors qu'il apparaît acrocentrique sur le caryotype proposé (Figure 12) (Itoh *et al.*, 1969). L'étude du caryotype de *Streptopelia roseogrisea* en coloration conventionnelle (Figure 13), révèle un nombre de chromosomes diploïde égal à 78 chromosomes avec la présence de neuf paires de macrochromosomes. Cette étude montre des chromosomes 1, 2 et 3 facilement identifiables alors que les chromosomes 4, 5, 6 et 7 sont tous métacentriques à submétacentrique. Les chromosomes 8 et 9 sont acrocentriques (Guttenbach *et al.*, 2003).

### **3) La cartographie génique**

#### **3.1-caractéristiques du génome aviaire**

La taille physique des génomes d'oiseaux varie entre 2 et 3,8 pg. Elle est faible et semble être très conservée par rapport à celle des vertébrés pouvant mesurer entre 1 et 280 pg. La taille du génome de la poule est de 2,5 pg, soit une longueur de 1,2 milliards de paires de bases par génome haploïde (Olofsson et Bernardi, 1983; Tiersch et Wachtel, 1991; Bloom *et al.*, 1993). Une partie importante du génome de la poule (55%) se concentre dans les quatre premières paires chromosomiques et sur le chromosome Z. Alors que 20% est contenue dans les paires chromosomiques 5 à 10. Le reste du génome (25%) est localisé sur les paires 11 à 38 (Stubblefield et Oro, 1982; Bloom *et al.*, 1993). Chez les espèces aviaires le génome mâle est plus grand que le génome femelle à cause de l'écart de taille entre les gonosomes Z et W. Cette dernière particularité a d'ailleurs été appliquée au sexage de certaines espèces (De Vita *et al.*, 1994; De Vita *et al.*, 1995).

#### **3.2-Structure du génome de la poule domestique et des Colombiformes**

Une étude réalisée chez 19 espèces d'oiseaux révèle en moyenne 60 à 75% de séquences uniques, 13 à 20% de séquences moyennement répétées et entre 10 et 20% de séquences hautement répétées. Les séquences répétées sont moins nombreuses, moins longues et plus dispersées que chez les autres vertébrés (Epplen *et al.*, 1979). Le génome de la poule contient 12% d'ADN répété localisé au niveau des centromères des microchromosomes. Alors que le génome humain contient 36% de séquences répétées (Stefos et Arrighi, 1974; Lewin, 1980; Moran, 1993).

La comparaison de la taille des introns et des exons entre les mammifères et les oiseaux n'a révélé aucune différence (Bed'home, 1999; Vinogradov, 1999). Une étude de la fréquence des substitutions nucléotidiques chez les pigeons et les tourterelles, a montré un taux 6 fois plus faible dans les introns nucléaires par rapport aux introns du gène mitochondrial, le cyt-b (Johnson et Clayton, 2000).

L'évaluation du programme d'insertions et des délétions chez les Colombiformes a été réalisée grâce à l'alignement des séquences du gène FIB7. Cette méthode a montré l'existence d'une insertion nucléotidique d'environ 77 pb spécifique aux Colombiformes (Prychitiko et Moore, 2003; Johnson, 2004). La taille des délétions / insertions a été estimée à environ 1 à 167 pb avec un ratio de 44/7. Le nombre de délétions dépasse celui des insertions toujours représentées par des éléments répétés (Johnson, 2004).

L'organisation moléculaire des centromères est encore mal connue chez les oiseaux (Bed'home, 1999). Parmi les séquences centromériques répétées présentes chez les espèces du genre *Columba*, existe une séquence riche en proline (PR1) d'environ 900 pb. Cette séquence est localisée sur les chromosomes 2, 6 et 1 et possède un fragment d'une vingtaine de

nucléotides similaire aux séquences CENP-box (séquence génique de 17 pb qui lie une protéine centromérique CENP-B (80 KD), hautement conservée) des mammifères (Solovei *et al.*, 1996).

La distribution des séquences télomériques (TTAGGG) a été très peu étudiée chez les oiseaux (Bed'Hom, 1999). La taille des signaux télomériques paraît relativement hétérogène chez plusieurs espèces. Des signaux télomériques interstitiels (séquences TTAGGG retrouvées en dehors des régions télomériques) ont été mis en évidence chez quelques espèces, notamment la poule *Gallus domesticus* et la colombe inca *Columbina inca* (Meyne *et al.*, 1989; Meyne *et al.*, 1990). Les sites interstitiels chez la poule domestique sont localisés sur les chromosomes 1 et 2 constituant probablement des traces de fusion (télomères ancestraux) survenues durant l'évolution des oiseaux (Nanda et Schmid, 1994).

Des études ont été également réalisées sur la protéine P-opsine rétinienne intervenant dans la synthèse de la mélatonine pinéale chez le poulet et la caille japonaise (Cassone et Menaker, 1983; Barrett et Underwood, 1991). Il a été alors montré que le gène de la P-opsine du pigeon *Colomba livia*, possède 84% d'homologie avec celui du poulet *Gallus domesticus* et entre 54 à 63% avec ceux des autres vertébrés. Ce gène manque d'un site de N-glycozylation N-terminal et possède par contre plus de sites de phosphorylation C-terminal que chez le poulet (Kawamura et Yokoyama, 1996).

### 3.3-La carte génétique

La carte génétique sert à décrire l'ordre relatif des marqueurs génétiques au sein d'un groupe de liaison et d'assigner ce groupe à des chromosomes. La distance est exprimée en centimorgan (cM) (1cM = 1% de recombinaison =  $10^6$  pb). Le centimorgan exprime le taux de descendants pour lesquels il ya recombinaison entre 2 marqueurs (Thomas Hunt Morgan, 1933). La construction d'une carte génétique consensus nécessite le repérage de gènes polymorphes (plusieurs allèles différents dans la population) dont les plus utilisés sont les AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) et les microsatellites (dinucléotides répétés en tandem et dispersés dans le génome) (Schmid *et al.*, 2005; Griffiths *et al.*, 2006).

Chez le poulet, la première carte génétique a été réalisée grâce aux travaux de Hutt, (1936), suivie de nombreux autres études (Hutt, 1949; 1960; 1964; Somes, 1973; 1979; 1987; 1988a; 1988b). D'après les récentes données, le nombre de marqueurs obtenus chez le le poulet est de 2261 loci répartis en 53 groupes de liaisons couvrant une distance de 4200 cM (Groenen *et al.*, 2000). Actuellement, les cartes de liaison couvrent 30 chromosomes, l'objectif étant d'avoir pour chaque chromosome un groupe de liaison correspondant (Schmid *et al.*, 2005).

La carte de liaison reste l'outil essentiel pour la cartographie des QTL (Quantitative Trait Loci). Cette dernière contient 45 microsatellites localisés (Jacobson *et al.*, 2004; Rabie, 2004) augmentant ainsi le nombre de marqueurs à 2306.

Une nouvelle génération de marqueurs d'ADN, les SNP (Single Nucleotide Polymorphism), est apparue ces dernières années (Jin *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 1997; McKenzic *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). Ces différences uniques de nucléotides entre les individus sont retrouvées dans les régions fonctionnelles et non fonctionnelles du génome (Schmid *et al.*, 2005). On estime à 15 millions le nombre total de SNPs chez l'humain (Botstein et Rish, 2003), alors que le génome aviaire n'a bénéficié que de très peu d'études sur ces marqueurs. Ainsi le séquençage réalisé chez cinq espèces (la poule domestique, la caille, la poule de Guinée, le pigeon et la poule à coquille blanche) utilisant 21 fragments de cDNA spécifiques à la dinde, fournit une fréquence de SNP (généralement des transitions C↔T et

**Tableau 5.** Variabilités interspécifiques, recensées chez les Colombiformes (Chromosome Atlas, 1971; De Lucca et de Aguiar, 1976; De Lucca et de Aguiar, 1978; Shields, 1982).

Ordre des Colombiformes	Espèces	Nombre diploïde	Nombre fondamental	Description du type de réarrangement chromosomique
	<i>Colomba livia</i>	80	92	-
	<i>Colomba palumbus</i>	78	90	02 microchromosomes en moins
	<i>Colomba cayennensis</i>	76	92	Fusion pour former le chromosome 8
	<i>Colomba picazuro</i>	76	92	Fusion pour former le chromosome 8
	<i>Colomba speciosa</i>	76	92	Fusion pour former le chromosome 8
	<i>Colombina talpacoti</i>	76	90	-
	<i>Colombina passerina</i>	76	92	Fission ou fusion dans le chromosome 8
	<i>Colombina minuta</i>	76	90	Fission ou fusion dans le chromosome 7
	<i>Colombina picui</i>	76	80	Fission ou fusion dans les chromosomes 2, 3, 5, 8 et Z.
	<i>Leptotila rufaxilla</i>	76	90	-
	<i>Leptotila verreauxi</i>	76	96	Réarrangement centromérique sur le chromosome 7. Fusion pour former le chromosome 9. Avec 2 microchromosomes en plus.

A↔G) égale à une mutation sur 159 pb chez le pigeon et à une mutation sur 1632 pb chez la caille (Smith *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 2005). Certaines études ont été menées sur l'association des SNPs au phénotype chez le poulet. On a alors identifié un polymorphisme d'un seul nucléotide dans une région hautement conservée liée à la résistance naturelle associée à la protéine 1 du macrophage (NRAMP1) chez les jeunes poulets. Un SNP dans la région NRAMP1 est associé au contrôle de la résistance au *Salmonelles* (Beaumont *et al.*, 2003).

### 3.4-La carte physique

La carte physique est l'assemblage de longs fragments d'ADN chromosomiques (dont la distance physique est exprimée en Kilo base (kb) ou en Méga base (Mb)) ou contigs. Les contigs sont des fragments d'ADN chevauchants et contigus qui permettent lorsqu'ils sont mis bout à bout, de recouvrir de longues distances sur un chromosome ou sur la molécule d'ADN (Schmid *et al.*, 2000; Griffiths *et al.*, 2006). Ainsi deux types de banques d'inserts ont été développés chez le poulet. Les banques de YAC (Yeast Artificial Chromosome) couvrent de grandes distances physiques et sont faciles à développer. On recense 36 000 clones élaborés avec des inserts d'une taille située entre 450 et 634 kb. L'autre type de banque d'inserts est représenté par les banques BAC (Bacterial Artificial Chromosome), divisées en deux types de banques. La première banque a utilisé l'enzyme de restriction *HindIII* fournissant ainsi 50 000 clones avec des inserts d'environ 134 kb et la deuxième banque a utilisé l'enzyme de restriction *BamHI* avec 38 000 clones et des inserts d'environ 150 kb. Ces clones couvrent plus de 95 % du génome du poulet et sont assemblés en 260 contigs, dont 226 peuvent être assignés à un chromosome particulier (Schmid *et al.*, 2005).

### 4) La carte chromosomique comparée

Une étude comparant le nombre de chromosomes diploïde, le nombre fondamental et la position du centromère, a été réalisée chez les Colombiformes. Cette étude a révélé l'existence de variabilités interspécifiques dues à des phénomènes de fissions et de fusions et à des réarrangements centromériques (Tableau 5) (Chromosome Atlas, 1971; De Lucca et de Aguiar, 1976; De Lucca et de Aguiar, 1978; Shield, 1982). D'autres études réalisées dans le but de découvrir des variabilités intraspécifiques dans l'ordre des Colombiformes, ont montré l'existence d'un dimorphisme centromérique dans les chromosomes 1 et 2 chez l'espèce *Treron phoenicoptera* (Ansari et Kaul, 1979a).

Une autre étude réalisée chez les espèces *Streptopelia capicola* et *Columba livia domestica* a révélé la présence de 4 paires de chromosomes submétacentriques de taille moyenne chez *Streptopelia capicola*. Alors que *Columba livia domestica* possède 2 paires de chromosomes submétacentriques et 4 autres paires acrocentriques. Ces résultats suggèrent que des mécanismes de fusions se sont produits durant l'évolution conduisant à un nombre diploïde plus faible chez *Streptopelia capicola* (76 chromosomes) (Takagi et Sasaki, 1974; Stock et Mengden, 1975). Chez les oiseaux, les mécanismes de fusions centromériques semblent avoir été nombreux à s'être produits durant l'évolution (Stock *et al.*, 1974). Il est important de savoir que le poulet (espèce à caractères ancestraux) ne possède que 2 paires de chromosomes acrocentriques, soit les chromosomes 3 et 7 (Stock et Mengden, 1975).

La comparaison des bandes G des chromosomes de *Gallus domesticus*, *Streptopelia risoria* et *Columba livia*, appartenant à trois familles différentes, a révélé des homologies chez les deux premières paires chromosomiques. Le chromosome 1 du poulet présentait des réarrangements par rapport aux espèces *Columba domestica* et *Streptopelia risoria*, par inversion de quelques bandes sur les deux bras (Stock *et al.*, 1974). Les Galliformes et les Colombiformes présentent un taux important d'inversions chromosomiques (Sasaki, 1981;

Schmid *et al.*, 2000; Stock et Mengden, 1975). Une étude réalisée sur 14 espèces appartenant aux Colombiformes du Brésil, révèle la présence d'une large bande positive sur la région distale du bras long du chromosome 1 chez toutes les espèces (De Lucca, 1984).

Des peintures chromosomiques des 10 premières paires de chromosomes ainsi que le chromosome Z et 9 microchromosomes du poulet (Tableau 6) ont été utilisés pour analyser le degré d'homologie avec des espèces appartenant à l'ordre des Colombiformes et Passeriformes (Masabanda *et al.*, 2004; Fillon *et al.*, 1998; Griffin *et al.*, 1999; Schmid *et al.*, 2000). Une importante conservation des groupes de synténies a été révélée pour ces deux ordres (Shetty *et al.*, 1999; Schmid *et al.*, 2000; Shibusawa *et al.*, 2002; Guttenbach *et al.*, 2003; Kasai *et al.*, 2003; Derjusheva *et al.*, 2004). Ainsi, le chromosome 1 du poulet s'hybride sur le chromosome 1 du pigeon domestique. Le chromosome 4 du poulet s'hybride sur les deux chromosomes 4 et 10 du pigeon domestique (Derjusheva *et al.*, 2004) (Figure 14 A et B). Des sondes spécifiques aux chromosomes du poulet *Gallus domesticus* 1 à 9 (GGA1 à GGA9) ont été hybridées sur des métaphases de la tourterelle rieuse *Streptopelia roseogrisea* et ont montré une bonne conservation des chromosomes 1, 2 et 3 entre ces deux espèces. Alors que des hybridations partielles ont été observées pour les chromosomes 4 à 9 (Guttenbach *et al.*, 2003) (Figure 15). Dès que la sonde complète d'un chromosome d'une espèce s'hybride sur l'un des deux bras d'une autre espèce, ceci suggère que des phénomènes de fusions se sont déroulés lors de l'évolution des oiseaux (Guttenbach *et al.*, 2003).

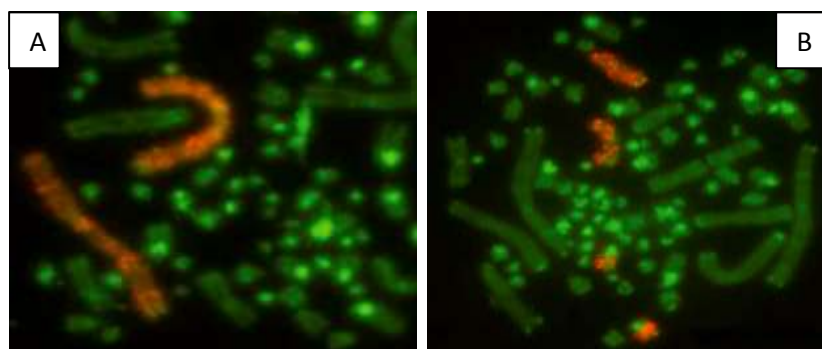
Une étude réalisée sur les Colombiformes du Brésil a montré que le chromosome Z avait conservé sa morphologie métacentrique à l'exception de l'espèce *Columbina picui* dont le chromosome Z est télocentrique (De Lucca, 1984). Par ailleurs, une bonne conservation a été observée chez la tourterelle rieuse *Streptopelia roseogrisea*, le pigeon biset *Columba livia* et la poule domestique *Gallus domesticus* en bandes G (Figure 16). Un segment hétérochromatique peut être présent ou absent à l'extrémité du bras court du chromosome Z chez la tourterelle rieuse *Streptopelia roseogrisea*, le pigeon biset *Columba livia* et la poule domestique *Gallus domesticus* (De la Sena *et al.*, 1991; Stock *et al.*, 1974).

Le chromosome W des espèces appartenant à l'ordre des Colombiformes tels que *Claravis pretiosa* et *Scardafella squammata*, est classé parmi les macrochromosomes. Ceci pourrait suggérer que ce chromosome n'a subi aucun remaniement durant l'évolution de ces espèces (De Lucca, 1984).

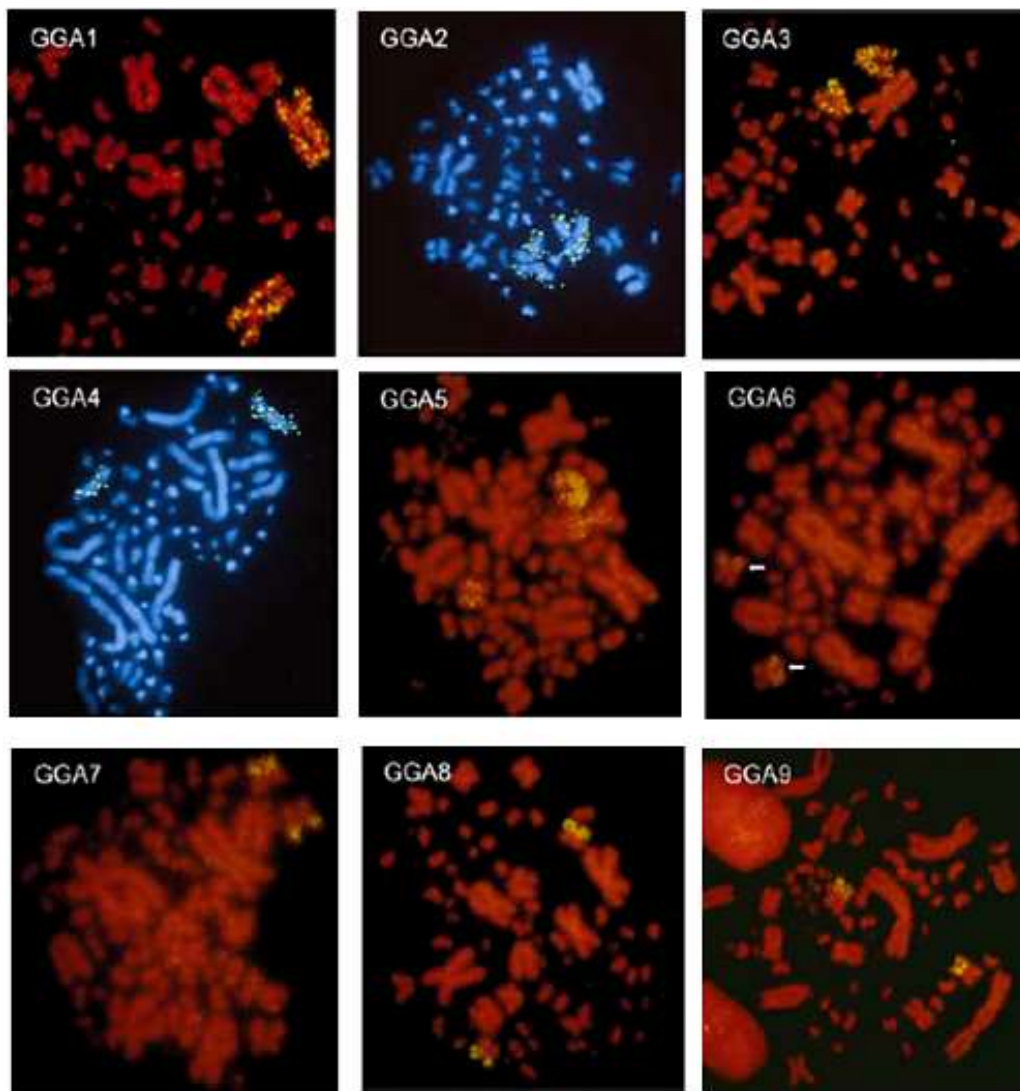
L'ensemble des connaissances apportées dans cette recherche bibliographique nous servira de charpente pour nos études génomiques. Aucune donnée génétique n'a été rapportée sur la tourterelle des bois *Streptopelia turtur* mise à part, une analyse phylogénétique utilisant l'ADN mitochondrial de cette espèce en déclin. Ceci va nous permettre d'interpréter nos résultats et d'établir des comparaisons avec des espèces proches de la tourterelle des bois.

**Tableau 6.** Sondes spécifiques des chromosomes du poulet (Masabanda *et al.*, 2004)

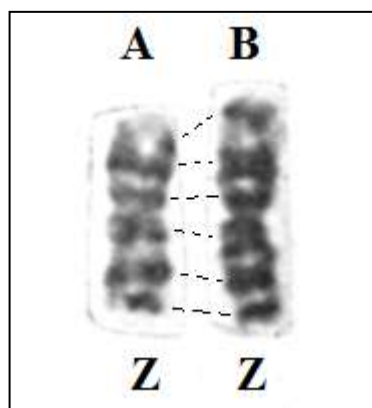
Groupe	Numéro du chromosome	Peinture Chromosomique	BAC (ou cosmid)	Groupe de liaison	Marqueur
Groupe A	1	+	+	NA	
	2	+	+	NA	
	3	+	+	NA	
	4	+	+	NA	
	5	+	+	NA	
	6	+	+	NA	
	7	+	+	NA	
	8	+	+	NA	
	9	+	+	E36C06W08	MCW0134
	10	+	+	E29C09W09	ADL0112
Groupe B	11	+	+	E30C14W10	LEI0143
	12	+	+	E16C17W22	MCW332
	13	+	+	E48C28W13W27	GCT907
	14	-	+	E35C18W14 + C37	GCT903
	15	-	+	E18C15W15 + C37	GCT14
	16	-	+	NOR chromosome	MCW371
Groupe C	17	-	+	E41W17 + C24	ADL0293
	18	+	+	E31E21C25W12	FASN
	19	+	+	E52W19	ACACA
	20	-	+	E47W24 + E32	ADL324
	21	-	+	E54	PLOD
	22	-	+	E38	TVSB3
	23	+	+	E27C36W25W26	MCW249
	24	+	+	E49C20W21	GCT905
	25	+	-	-	-
	26	+	+	E60E04W23	GCT906
	27	+	+	E59C35W20	GCT22
	28	+	+	E53C34W16	GCT904
	29	+	+ (cosmid)	E62	ROS0257
	30	+	+ (cosmid)	E65	ROS0263
	31	+	+ (cosmid)	E64	ROS0264
	32	-	+ (cosmid)	E25C31	-
Groupe D	33	+	-		-
	34	+	-		-
	35	+	-		-
	36	+	-		-
	37	+	-		-
	38	+	-		-
Groupe A	Z	+	-	NA	
	W	+	-	NA	



**Figure 14:** (A) et (B) Hybridation de sondes spécifiques aux chromosomes du poulet *Gallus domesticus* sur les chromosomes du pigeon domestique *Columba livia*. Chaque figure montre un chromosome du pigeon domestique *Columba livia* en rouge sur lequel s'est hybridée la sonde du poulet (Derjusheva *et al.*, 2004).



**Figure 15.** Peinture chromosomique (Guttenbach *et al.*, 2003). Chaque figure montre les chromosomes de la tourterelle rieuse *Streptopelia roseogrisea* qui ont été hybridés sur des sondes spécifiques au poulet *Gallus domesticus*.



**Figure 16.** Comparaison des bandes G du chromosome sexuel Z entre le poulet (A) et le pigeon (B). Les chromosomes Z possèdent des bandes structurales G homologues chez les deux espèces (Stock et Mengden, 197

# Objectif du travail

La tourterelle des bois *Streptopelia turtur* est une espèce migratrice endémique à l'Afrique du Nord. Elle est classée en déclin et ses effectifs sont en diminution constante à cause de la chasse excessive ainsi que le déséquilibre des écosystèmes.

En Algérie, le Centre Cynégétique de a mené des études écologiques sur cet oiseau menacé pour recenser les effectifs sur les zones d'hivernage et de nidification.

Le but de ce travail est d'entamer la description du génome de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur*, pour la première fois. Cette étude a été initiée à la demande du Centre Cynégétique de Zéralda. Le caryotype à haute résolution sera aussi établi pour décrire les chromosomes avec précision afin de déceler des anomalies chromosomiques responsables de mortalités embryonnaires précoces. Une banque de données génétiques sera aussi mise en place.

Ces travaux sont réalisés au Laboratoire de Génétique du Développement (FSB, USTHB) dont la principale thématique est l'étude génomique des espèces menacées.

Mise à part une étude phylogénétique sur l'ADN mitochondrial incluant d'autres espèces de Colombiformes, aucune autre donnée génétique n'est disponible sur la tourterelle des bois *Streptopelia turtur*.

Cette première étude nous permettra aussi d'effectuer des cartographies comparées avec des espèces proches et de détecter les remaniements chromosomiques qui se sont produits lors de l'évolution des oiseaux.

# **CHAPITRE II**

## **Materiel Et Methodes**

# Matériel et Méthodes

Le laboratoire de l'équipe de Génétique du développement a été installé en Février 2006 et il est fonctionnel depuis Avril 2008.

## 1) Matériel Biologique

Les œufs de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur*, ont été obtenus grâce à une collaboration avec le docteur Belhamra du Centre Cynégétique de Zéralda (CCZ). Des sorties sur le terrain ont été effectuées en compagnie d'un chasseur du centre (CCZ). Plusieurs opérations de repérage et de comptage des nids de tourterelles des bois ont été réalisées à partir du mois d'avril 2008. Les œufs prélevés juste après la ponte (surveillance des nids par le chasseur associé à notre travail), ont été incubés dans un incubateur à rotation où les conditions d'hygrométrie (55%) et de température (37,5°C) ont été respectées afin d'éviter la déshydratation et d'assurer le bon déroulement du développement embryonnaire.

Toutes les techniques de culture cellulaire sont effectuées sous une hotte à flux laminaire. Les cultures cellulaires primaires ont été réalisées à partir de fragments de tissus prélevés sur des organes d'embryons issus d'œufs à différents stades du développement. En effet des embryons âgés de 2, 7 et 15 jours ont été mis en culture. Des fragments d'organes issus de poussins qui venaient d'éclore, ont été également mis en culture (Figure 17).

## 2) Culture cellulaire

L'ensemble des techniques de culture utilisées pour *Streptopelia turtur*, sont spécifiques au poulet. Les techniques cytogénétiques utilisées ont été adaptées au poulet (Ladjali, 1994) puis utilisées chez la tourterelle des bois.

Il existe deux techniques distinctes de culture cellulaire : la culture directe, dite également à très court terme et la technique indirecte que nous avons adoptée pour la réalisation de ce travail.

### 2.1-Technique directe

Cette technique est utilisée sur des tissus spontanément en division (embryon de 16 à 18 heures, pulpe de plumes, tissus néoplasiques, moelle osseuse et tissus testiculaires) (Guyer, 1902; Dutrillaux et Couturier, 1981; Ladjali, 1994; Ladjali *et al.*, 1995a; Ladjali *et al.*, 1995b). Les embryons âgés de 16 heures permettent l'obtention d'un nombre raisonnable de cellules analysables en métaphase (Fechheimer et Jaffe, 1966a; Fechheimer *et al.*, 1968b; Ladjali, 1994; Ladjali, 1994). A cet âge, la ligne primitive est formée et l'embryon mesure à peine 2 mm alors qu'il ne mesure qu'environ 8 mm à 48 heures (Ladjali, 1994).

#### Protocole

L'œuf est incubé à 37°C pendant 16 heures. Ensuite, 0.2 ml de colchicine (concentration finale: 0.05mg/ml) sont injectées dans la chambre à air 3 heures avant la fin de la culture. L'œuf est ensuite cassé dans une coupelle remplie d'eau sans rompre la membrane du jaune. L'embryon est alors séparé du blastoderme à l'aide d'une paire de ciseaux et d'une pince chirurgicales. Par la suite, l'embryon est déposé dans une solution de citrate de sodium (0.45%) préalablement chauffée à 37°C (pendant 15 à 20 mn) et dissocié avec une pipette Pasteur. La suspension cellulaire est centrifugée pendant 10 mn à 1000 rpm (correspondant à 400g), puis 3ml de fixateur (1 volume d'acide acétique / 3 volumes d'éthanol) sont ajoutées goutte à goutte sur le culot. Le mélange est laissé décanter pendant 10 mn. Le précipité issu de la décantation est alors enlevé avec un morceau de papier après avoir incliné le tube.

L'opération est reproduite deux à trois fois jusqu'à élimination de tous les débris. Deux autres fixations sont réalisées à 4 °C (Ladjali *et al.*, 1995a; Ladjali *et al.*, 1995b).

### Remarque

Cette technique n'a pas pu être réalisée chez la tourterelle des bois. La couvée est automatique dès la ponte chez cette espèce. Le développement de l'œuf est enclenché alors que chez d'autres espèces telles que la perdrix gabra, la couvée de l'œuf ne suit pas forcément le moment de la ponte.

### Solutions nécessaires

#### ➤ Solution de Colchicine 10X (C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub>; PM= 399.43789 g/mol)

Colchicine (Sigma) : 0.5 mg

Solution de PBS- : 10 ml

La solution est filtrée stérilement sur une membrane 0.22 µm et conservée en fractions de 1 ml à -20°C.

#### ➤ Solution de PBS<sup>-</sup> (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

NaCl (137 mM) : 8g

KCl (2.7 mM) : 0.2g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-12H<sub>2</sub>O (8 mM) : 2.89g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>- (1.47 mM) : 0.2g

H<sub>2</sub>O qsp 1 litre

La solution de PBS- est autoclavée et conservée à +4°C.

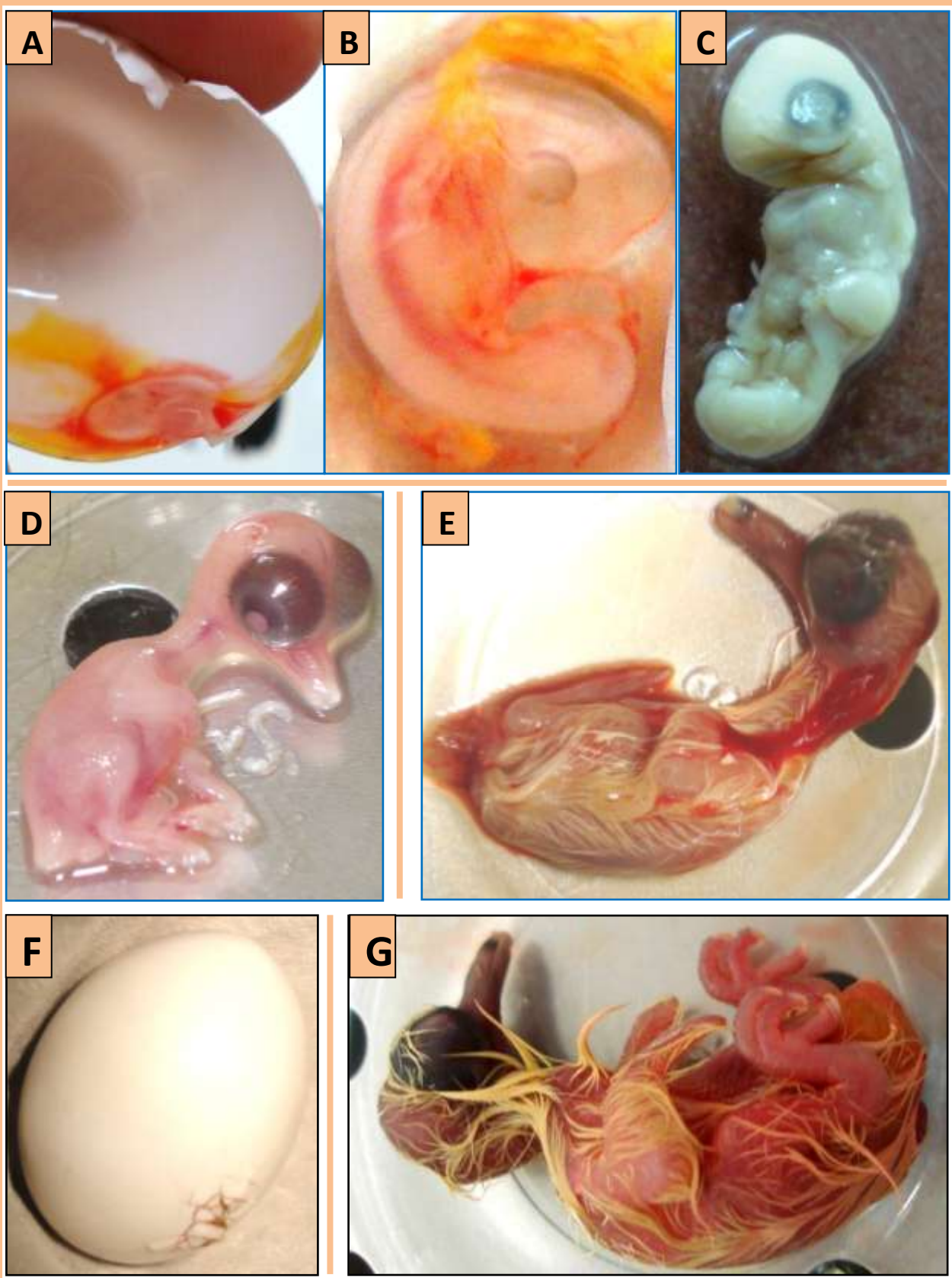
## 2.2- Culture de lymphocytes

Les lymphocytes peuvent être mis en culture à partir du sang total (Moorhead *et al.*, 1960), généralement prélevé à partir de la veine jugulaire ou alaire. Ainsi, les lymphocytes peuvent être obtenus après séparation par sédimentation ou par centrifugation en gradient de densité (Boyum, 1968). Les érythrocytes des oiseaux ont la particularité d'être nucléés, ce qui rend difficile leur séparation des autres cellules sanguines. Les meilleurs résultats semblent avoir été obtenus après séparation des lymphocytes (Ladjali, 1994).

La culture des lymphocytes repose sur une transformation des lymphoblastes (lymphocytes B et T) *in vitro* grâce à l'action des mitogènes appelés lectines, tels que la phytohémagglutinine (PHA), la concanavaline A (con A) et le pokeweed mitogène (PWM) (Popescu *et al.*, 1998).

### Protocole

On prélève environ 10 ml de sang de la veine jugulaire ou alaire dans un tube de 15 ml stérile et hépariné (héparine de sodium). Le prélèvement doit se faire avec des aiguilles adaptées à la taille de l'oiseau (calibre 25/ longueur 5/8'' pour un poussin âgé de moins de 15 jours). Le sang total prélevé est ensuite complété de 0.2 ml de phytohémagglutinine (PHA) afin d'agglutiner les érythrocytes et d'accélérer la séparation grossière des types cellulaires. Le tube est ensuite centrifugé à 1000 rpm (400 g) pendant 20 min. Le surnageant contenant le plasma et les leucocytes est aspiré délicatement puisensemencé dans un tube de 15 ml contenant 7 ml de milieu de culture RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, GIBCO) additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, GIBCO) et de PHA comme agent mitogène. Le tube contenant le reste du surnageant avec le culot (érythrocytes agglutinés) est recentrifugé à la même vitesse pendant 5 mn. Ensuite, 1,5 ml de surnageant (phase acellulaire) sont aspirés et ajoutés à la culture. Le tube contenant la culture est incubé dans une étuve à



**Figure 17.** Embryons et poussins mis en culture. (A et B) Embryon de 48 h; (C) Embryon de 72 h; (D) Embryon âgé d'environ 7 jours; (E) Embryon âgé d'environ 15 jours; (F et G) Œuf pendant l'éclosion donnant naissance à un poussin.

chaleur sèche à 41°C pendant 72 heures et est délicatement retourné chaque heure. Avant l'arrêt de la culture, on ajoute 10 µl de colchicine (concentration finale: 0.004 µg/ml) pendant 5 min pour bloquer les divisions cellulaires. Après centrifugation des deux tubes à 1200 rpm pendant 12 min, les culots sont remis en suspension dans 5 ml de solution hypotonique (KCl 0.075M) pendant 13 min au bain marie à 37°C. Après une deuxième centrifugation à 1200 rpm pendant 12 min le culot est dissout dans 10 ml de fixateur et remis à 37°C pendant 5 min. Le premier fixateur est éliminé après centrifugation du tube à 1200 rpm pendant 12 min. Le culot obtenu est remis dans 5 ml de fixateur à 4°C pendant 15 min. Le deuxième fixateur est éliminé après centrifugation à 1200 rpm pendant 12 min et une troisième fixation est réalisée à 4°C pendant une nuit. Le lendemain le tube est centrifugé à 1200 rpm pendant 10 min et 1 ml de fixateur est gardé pour remettre le culot en suspension.

### **Remarques**

La culture de lymphocytes n'a pas été utilisée dans cette étude, par ce que nous avons obtenu des cultures de fibroblastes. En effet, nous avons effectué des cultures de cellules embryonnaires en raison de leur important indice mitotique par rapport à celles issues d'un animal adulte. Ainsi le nombre de générations d'une cellule embryonnaire est d'environ 50 contre 20 pour les cellules de tissus adultes (Iadjali, 1994).

### **Solutions nécessaires**

➤ **Milieu RPMI 1640 + 20 mM HEPES – L.Glutamine (Gibco Réf : 22409-031, lot : 305511)**

Sérum de Veau Foetal (Gibco Réf : 15160-047, lot: 3086587) : 10%  
L-Glutamine 200 mM (Sigma) : 1%  
Pénicilline et Streptomycine (Sigma) : 1%  
Fungizone (Sigma): 1%

➤ **Solution de colchicine 1X**

Colchicine (Sigma): 0.4 mg  
PBS-: 10 ml  
Conserver la solution de colchicine 1X en fractions de 1ml à -20°C.

➤ **Solution hypotonique de KCl (0.075 M)**

Dissoudre 5.6 g de KCl dans 1 litre d'eau distillée

## **2.3- Culture de fibroblastes**

Les cultures de cellules primaires sont issues de tissus prélevés, pour la plupart, sur des embryons à différents stades du développement. Une mise au point de cette technique a été réalisée chez le poulet dans notre Laboratoire de Génétique du Développement ensuite a été adaptée à la tourterelle des bois.

Les fibroblastes sont des cellules d'origine mésenchymateuse qui gardent une grande plasticité fonctionnelle au-delà du stade fœtal. Ces cellules mises en culture, ont une forme irrégulière ou en fuseau qui leur permet de résister plus longtemps que les cellules de forme polygonale (épithéliale). Après quelques jours de culture, les fibroblastes deviennent une population cellulaire majoritaire (Hayes, 1993).

Les œufs mis en culture étaient âgés entre 48 heures et 15 jours. Nous détaillerons ici le traitement d'un embryon âgé de 15 jours.

## Protocole

Toutes les manipulations ont été réalisées sous une hotte à flux laminaire vertical dans des conditions stériles (Model : Polaris 72).

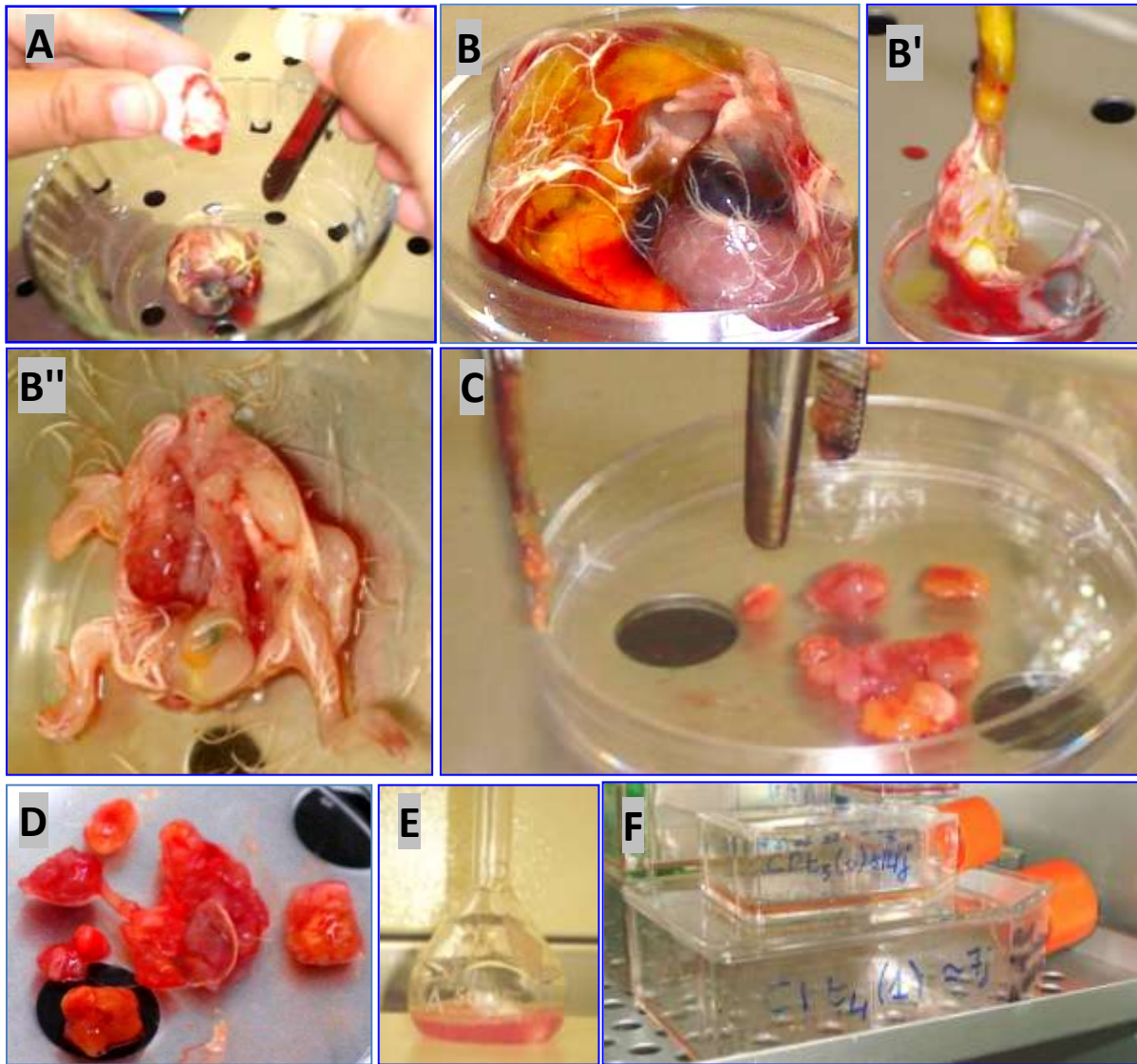
Après avoir cassé l'œuf (coquille nettoyée avec de l'alcool à 70%) dans une boîte de Petri stérile, l'embryon est débarrassé de ses annexes et quelques organes sont entièrement prélevés (poumons, cœur, foie et reins) en plus des fragments musculaires. Les organes sont dilacérés à l'aide de ciseaux et d'une pince chirurgicale. Les petits fragments obtenus sont dissociés dans un premier temps dans 3 ml d'une solution de trypsine à 0.05% (Sigma) (préalablement chauffée à 37°C). Puis, l'ensemble est mis sous agitation durant 15 min avec un barreau aimanté à une vitesse modérée afin d'éviter la formation de mousse pouvant provoquer l'éclatement des cellules. La suspension cellulaire est laissée ensuite décanter durant 2 à 3 min, puis le surnageant est transféré dans un flacon conique de 50 ml supplémenté de 2 ml de SVF (GIBCO) afin d'inactiver l'action de la trypsine. La suspension cellulaire est centrifugée pendant 5 mn à 2000 tpm. Le surnageant est aspiré à l'aide d'une pompe à vide et le culot est dissocié et homogénéisé avec une pipette pasteur dans 1 ml de RPMI 1640-HEPES (GIBCO) additionné de 10% de SVF, supplémenté d'antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine Fungizone à 1%; Sigma). La suspension cellulaire, complétée à 6 ml, est ensemencée dans une boîte de culture (Flask) de 25 cm<sup>2</sup> et mise dans une étuve (Núve EN400) à 41°C (Figure 18 et 19A). Après quelques heures, les cellules sont observées à l'aide d'un microscope inversé (Zeiss Axiovert 40c, objectif GX40) montrant un début d'adhésion des cellules vivantes au fond de la boîte (Figure 19B). Le lendemain, une adhésion totale et une forte activité mitotique est exprimée par un changement de la couleur du milieu de culture qui devient jaune. Alors, un lavage avec du milieu de culture sans SVF (RPMI 1640, GIBCO) est réalisé pour éliminer les cellules non adhérentes, les débris organiques et les toxines résultant de l'activité cellulaire. Puis, 4 ml de RPMI 1640 enrichi avec 10% de SVF sont rajoutés. Ce changement du milieu est renouvelé dès que le milieu devient jaune (en moyenne une fois tous les trois jours). La boîte est remise dans l'étuve et est régulièrement observée au microscope inversé. Les fibroblastes (Figure 19C) s'installent progressivement et après en moyenne 5 à 7 jours les cellules deviennent confluentes pour certains embryons de tourterelle des bois (Figure 19D), et subissent une trypsination afin de répartir les cellules dans 2 boîtes. La trypsination permet la multiplication des cellules en évitant le phénomène d'inhibition de contact.

## Remarques

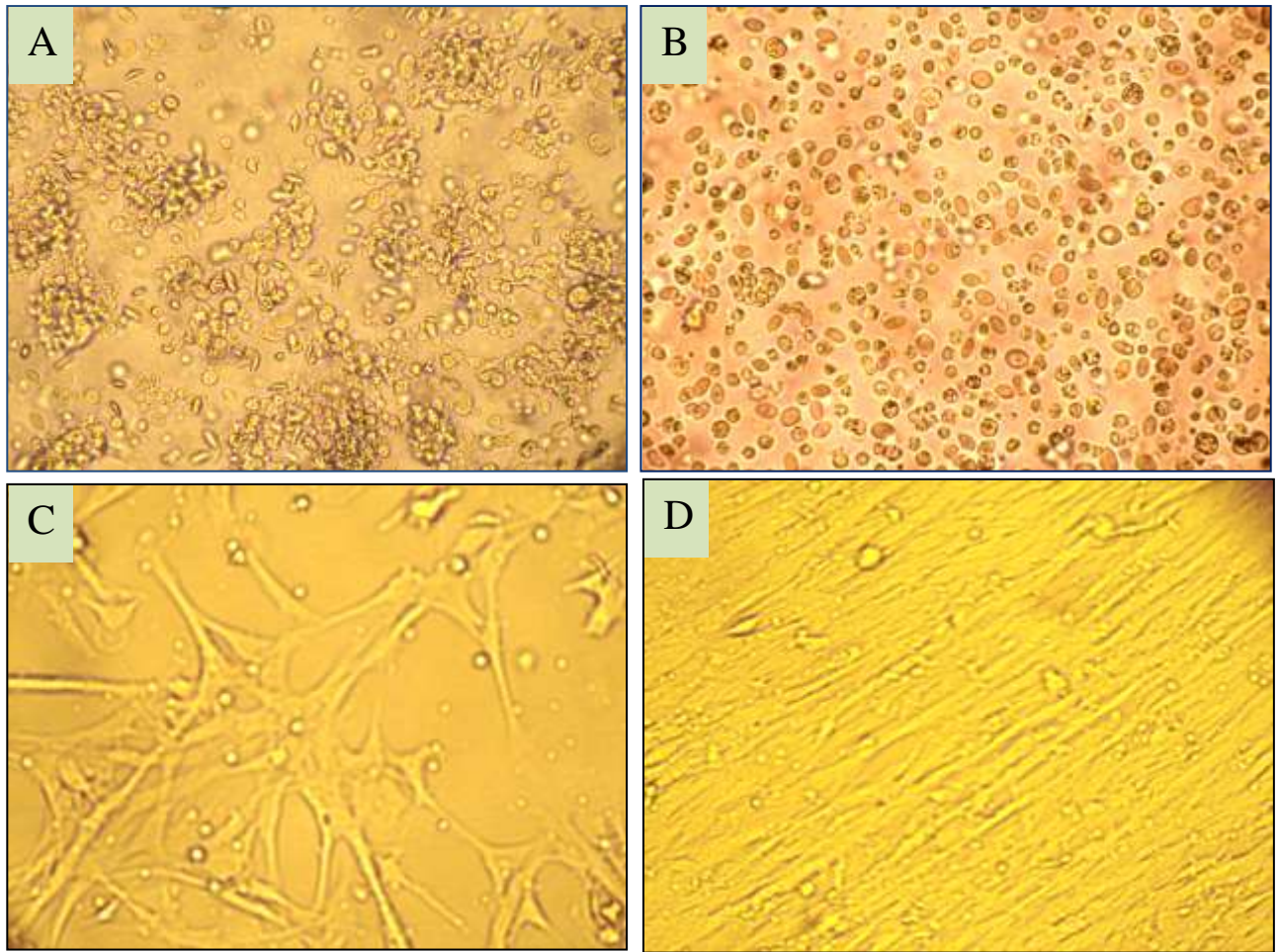
Lors de la mise en culture des cellules issues de différents organes (poumons, cœur, foie et reins), une coloration au bleu de trypan des cellules mortes peut être effectuée afin de les distinguer des cellules vivantes. Les cellules peuvent être comptées approximativement à l'aide d'une lame de Malassez et sont généralement inoculées à une concentration de 0.5 à 3 x 10<sup>6</sup> de cellules par ml de milieu complet à 10 % de SVF dans une boîte de culture de 25 cm<sup>2</sup> (Ladjali, 1994).

Une forte mortalité cellulaire est observée si ces dernières sont mises en contact prolongé avec de la trypsine (Ladjali, 1994). Ainsi, pour éviter cette perte cellulaire nous avons préféré ne pas compter les cellules. Le culot est estimé visuellement et est réparti dans deux boîtes de culture.

Les meilleurs résultats de culture ont été obtenus à partir des cellules du cœur, du foie et des poumons d'embryons âgés entre 7 et 14 jours. Alors que l'embryon âgé de 2 jours a fourni des phénotypes cellulaires très différents. Les cultures ont pu être maintenues jusqu'au 2<sup>ème</sup> passage pendant 78 jours concernant l'espèce *Streptopelia turtur*. L'activité cellulaire commence à baisser vers le 6<sup>ème</sup> passage et peut être maintenue jusqu'au 12<sup>ème</sup> passage chez l'embryon de poulet (Ladjali, 1994). Les moments les plus propices pour obtenir les



**Figure 18.** Les différentes étapes de mise en culture d'un embryon de la tourterelle des bois. (A) L'œuf est cassé après nettoyage de la coquille avec de l'éthanol à 70%. (B), (B') et (B'') L'embryon est disséqué. (C), (D) et (E) Prélèvement, dilacération des organes et dissociation des cellules dans une solution de trypsine à 0,05%. (F) Incubation des cellules dans une étuve à 41°C.



**Figure 19.** Culture cellulaire primaire issue d'un embryon de la tourterelle des bois âgé de 7 jours (Vue au microscope inversé (GX40X10X6)). (A) et (B) Cellules ovales issues du foie, du cœur, des poumons et de fragments musculaires après quelques heures de la mise en culture. (C) Mise en place de fibroblastes quelques jours après la mise en culture. (D) Mise en place d'un tapis dense de fibroblastes (état de confluence).

meilleures préparations chromosomiques sont situés entre le 2<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> passage (Ladjali, 1994).

## 2.4- Protocole de la trypsination

Après un certain nombre de divisions, les cellules bien différenciées forment un tapis continu au fond de la boîte et atteignent l'état de confluence (figure 19D). A ce stade l'inhibition de contact freine les divisions mitotiques et une trypsination est nécessaire afin de transférer les cellules dans deux boîtes de 75cm<sup>2</sup>. Ainsi, le milieu jauni, est aspiré et rejeté et les cellules sont rincées avec 3ml de PBS<sup>-</sup> à 37 °C. Ensuite sont ajoutés 2 ml de trypsine à 0.05% sans EDTA par boîte de culture. Les cellules sont incubées environ 2 à 3 min à 41°C. Lorsque le tapis de cellules commence à se détacher du fond de la boîte, les cellules sont dissociées avec une pipette Pasteur. La suspension (trypsine-cellules) est entièrement aspirée et transférée dans un flacon conique de 15 ml. On ajoute alors 2 ml de milieu de culture complet avec du SVF afin d'inactiver l'action de la trypsine. Le tube est ensuite centrifugé pendant 10 min à 2000 tpm. Le culot est remis en suspension dans deux boîtes de 75 cm<sup>2</sup>, contenant chacune 8 ml de milieu complet enrichi de 10% de SVF.

### Remarques

Une trypsination correspond à un passage. Les cellules peuvent être congelées de préférence juste après le premier passage dans une solution contenant du sérum de veau fœtal et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) à la concentration de 10<sup>7</sup> à 10<sup>8</sup> cellules par ml et conservées dans de l'azote liquide.

### Solutions nécessaires

#### ➤ Solution de trypsine à 0.05%

Trypsine (Sigma): 0.05 g

PBS<sup>-</sup> : 100 ml

La solution est conservée à -20°C.

## 3) Technique d'obtention des chromosomes en prophase et en prométaphase

Les chromosomes commencent à se condenser au fur et à mesure du déroulement de la prophase et atteignent une condensation quasi complète en début de métaphase (Watson *et al.*, 1989). La compaction des chromosomes et leur raccourcissement conduit à une diminution des structures en bandes qui sont révélées par les techniques de marquages chromosomiques permettant l'identification précise des chromosomes. La synchronisation des cellules permet de récolter un nombre important de cellules en prophase et en prométaphase. Ainsi des motifs en bandes dits à « haute résolution » sur des chromosomes allongés sont obtenus. La synchronisation du cycle cellulaire s'effectue grâce à l'action inhibitrice de certains agents de la synthèse de l'un des désoxyribonucléotides triphosphate nécessaire à la réplication de l'ADN (Figure 20). La levée de l'inhibition conduit au redémarrage de la synthèse d'ADN permettant la récolte des cellules en prophase et en prométaphase selon le moment de la récolte (Ladjali, 1994; Ladjali *et al.*, 1995c; Popescu *et al.*, 1998). Parmi les agents synchronisant, il existe l'améthoptérine, le méthotrexate, l'aminoptérin, la 5-fluorodéoxyuridine (FdU) et la thymidine en excès. Une inhibition de la synthèse de l'ADN, n'est obtenue que si la concentration extracellulaire de la thymidine est supérieure à 1mM (Xeros, 1962). La thymidine est moins toxique que les autres agents déjà cités et peut être utilisée pour une double synchronisation. La double synchronisation permet d'augmenter le

nombre de cellules synchronisées et atteint même les cellules qui ont échappé au premier blocage (Viegas-Péquignot et Dutrillaux, 1978; Hayes *et al.*, 1991; Ladjali, 1994; Ladjali *et al.*, 1995c).

### **Protocole**

Le premier jour les cellules sont trypsinées vers 11 heures du matin et le contenu d'une boîte de culture est dissocié dans deux boîtes chacune contenant 10 ml de milieu RPMI 1640-HEPES (10% de SVF) préalablement chauffé à 37°C. Après une incubation d'environ 4 à 5 heures à 41°C, 1ml d'une solution de thymidine stérile est ajoutée dans la culture (concentration finale : 7,182mM, Sigma). Les cellules sont remises dans l'étuve pour un premier blocage qui doit durer entre 16 et 18 heures.

Le deuxième jour vers 8 heures, les cellules apparaissent presque toutes bloquées (Figure 21). Les cellules sont alors lavées 3 fois pendant 15 mn avec une solution de BSS+, préalablement chauffée à 41 °C. Ensuite les cellules sont incubées dans 10 ml de milieu complet (10% SVF). Après 4h30 à 5 heures, 1ml de thymidine est ajouté pour provoquer le deuxième blocage de 16 à 17 heures.

Le troisième jour, les cellules sont lavées de la même façon que précédemment et incubées avec du milieu complet RPMI 1640- HEPES (SVF 10%). Un ou plusieurs champs de cellules sont repérés au microscope inversé. Un comptage régulier des cellules en division (rondes et réfringentes) est effectué environ toutes les demi-heures, à partir de la première heure après la levée du blocage. Quand le nombre de cellules rondes (en division) devient suffisamment important, les cellules sont traitées avec 30 µl d'une solution de colchicine à 1X (concentration finale : 0.031mM) et récoltées.

### **Remarque**

Chez le poulet, le moment de la récolte varie entre 6 et 7 heures après la levée du blocage (Ladjali, 1994). Concernant la tourterelle des bois, la récolte des cellules après le 2<sup>ème</sup> blocage s'effectue après environ 4H30 min.

### **Solutions nécessaires**

#### **➤ Solution de thymidine 1X (C<sub>5</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>H<sub>6</sub>, PM: 126,113622 g/mol)**

Thymidine (41.13 mM, Sigma) : 100 mg

Milieu RPMI (Gibco, Réf: 22409-031, lot: 305511) : 10 ml

La solution est filtrée stérilement sur une membrane de 0.22 µm et est utilisée soit extemporanément, soit conservée pendant quelques jours à 4°C.

#### **➤ Solution de BSS<sup>-</sup> (Hank's Balanced Salt Solution)**

NaCl (137 mM) : 8g

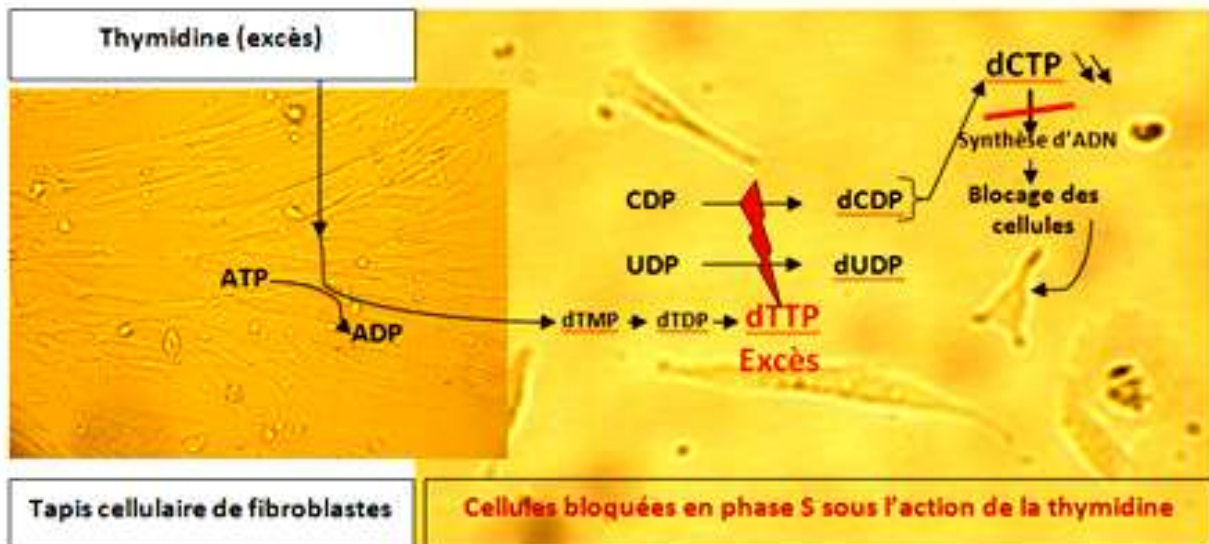
KCl (5.4 mM) : 0.4g

MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O (0.81 mM) : 0.2g

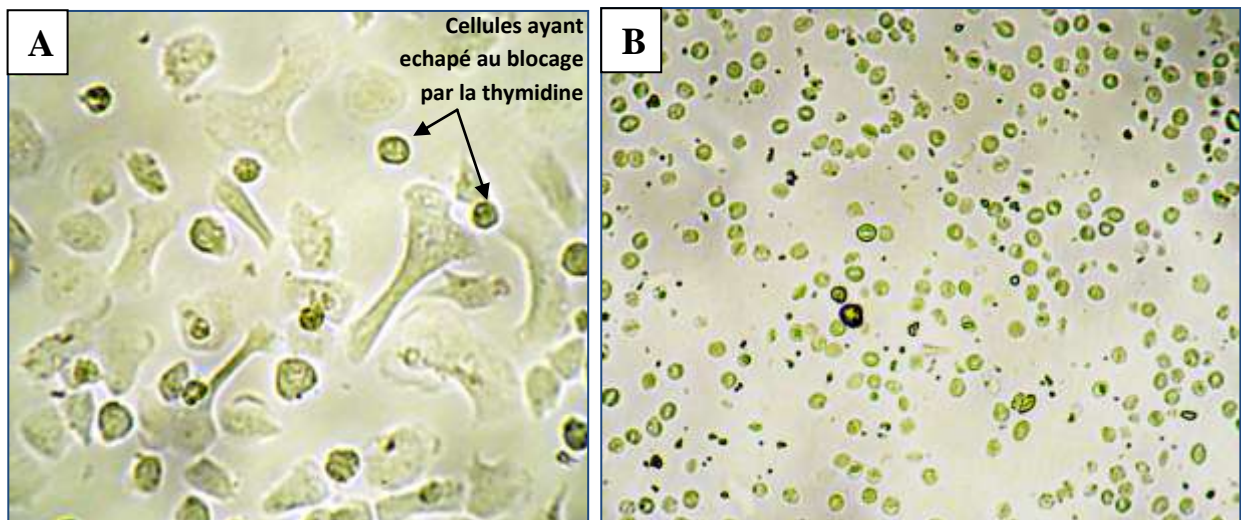
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-12H<sub>2</sub>O (0.33 mM) : 0.12g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.44 mM) : 0.06g

H<sub>2</sub>O qsp 1 litre



**Figure 20.** Mécanisme du blocage de la synthèse d'ADN lors d'une double synchronisation à la thymidine. La Thymidine pénètre dans la cellule à des concentrations définies par les besoins intracellulaires et se transforme en (dTTP). Ce dernier empêche la réduction du CDP en dCDP et du UDP en dUDP, en inhibant la ribonucléotide réductase. Ainsi l'addition de la thymidine en excès, provoque l'accumulation de dTTP et bloque la synthèse de l'ADN de façon réversible, en diminuant la quantité de dCTP synthétisée (Dutrillaux, 1975; Viegas-Pequinot *et al.*, 1978; Hayes, 1993).



**Figure 21.** Apparition de cellules arrondies (en division) 3 heures après de la levée du blocage par la thymidine durant une double synchronisation chez la tourterelle des bois (G x 40 x 10 x 4). (A) Aspect des cellules bloquées par la thymidine. (B) les cellules rondes correspondent aux cellules en division après la levée du blocage.

La solution est ensuite autoclavée et 6 ml d'une solution stérile  $\text{NaHCO}_3$  à 5,6 % (filtrée sur une membrane de 0.45  $\mu\text{m}$ ) sont ajoutés pour ajuster le pH final de la solution à 7,2 -7,4. La solution BSS+ utilisée pour la synchronisation est obtenue après addition à la BSS- de 2 ml d'une solution de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (filtrée sur une membrane de 0.45  $\mu\text{m}$ , 2mM final).

## **4) Préparation des étalements chromosomiques**

### **4.1- Récolte des cellules**

Après le deuxième blocage et après environ 5 heures de mise en culture, les cellules sont trypsinées comme décrit précédemment (trypsin GIBCO à 0,25 % avec EDTA). Ensuite les cellules sont récupérées dans un tube conique de 15 ml dans lequel est ajoutée une solution de colchicine de 1X (Sigma, concentration finale: 0.031 mM). Le tube est alors centrifugé à 2000 rpm pendant 10 mn.

### **4.2- Choc hypotonique**

La suspension cellulaire est incubée dans une solution hypotonique qui entraîne un gonflement des cellules par effet osmotique afin de faciliter l'éclatement des cellules et d'assurer une bonne dispersion des chromosomes sur les lames. Cette solution est composée de sérum dilué au 1/6 dans de l'eau distillée.

Après l'ajout de la colchicine, les cellules sont récoltées dans un tube et centrifugées à 1500 rpm pendant 10 min. Ensuite, le surnageant est aspiré et est rejeté. Le culot est dissocié avec une pipette pasteur dans 1 ml de choc hypotonique préchauffé à 37 °C. Le mélange est ensuite homogénéisé à l'aide d'une pipette Pasteur et la suspension est complétée jusqu'à 10 ml avec le choc hypotonique et incubée durant 13 min dans un bain-marie à 37°C.

### **4.3- Préfixation**

Cette étape permet d'éviter l'éclatement des cellules gonflées lors des centrifugations suivantes. Sans sortir le tube du bain marie, 1 ml de fixateur est ajouté en homogénéisant et la suspension est laissée pendant 5mn à 37°C au bain-marie.

### **4.4- Fixation**

Les cellules sont fixées avec une solution de fixateur (1 volume d'acide acétique et 3 volumes de méthanol). Cette étape permet de préserver les structures chromosomiques.

Le tube conique est centrifugé pendant 10 min à 2000 rpm. Le surnageant est rejeté puis 10 ml de fixateur sont ajoutés sur le culot en homogénéisant avec une pipette Pasteur. Le tube est mis à +4°C pendant 15 mn, puis centrifugé à 1500 rpm pendant 10 mn. Le surnageant est éliminé puis 6 ml de fixateur sont ajoutées au culot. La suspension obtenue est conservée une nuit à +4°C.

### **4.5-Etalement**

Après fixation et centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans un 1 ml de fixateur. Ce dernier est ajusté après observation au microscope photonique en contraste de phase et au grossissement GX10, afin de renseigner sur l'un indice mitotique (10 métaphases par champs). La suspension cellulaire est étalée sur lames humides en laissant tomber une

goutte d'une hauteur de 10 cm sur chaque lame, préalablement lavée, froide et recouverte d'un fin film d'eau. L'excès d'eau autour de la goutte déposée est tamponné (important pour les analyses ultérieures) et les lames sont laissées sécher à l'air libre. Les lames sont congelées à -20 °C et peuvent être conservées pendant plusieurs mois.

## 5) Technique de marquage chromosomique

Ces techniques sont appliquées pour étudier la structure interne des chromosomes. Elles permettent de révéler une série de bandes séquentielles appropriées aux différents stades de contraction (Gustavson, 1980) et présentant des propriétés fonctionnelles et structurales particulières.

### 5.1- Coloration classique (conventionnelle) au Giemsa

Cette coloration offre une idée sur la morphologie générale des chromosomes. Elle est aussi utilisée pour révéler le marquage produit par certains traitements, tel que les marquages en bandes G ou en bandes R, utilisés dans ce travail.

Le colorant Giemsa est un mélange complexe de six groupes de colorants ayant différents degrés d'oxydation et principalement le groupe des thiazines. Ces derniers se lient au groupe phosphate de l'ADN chromosomique et induisent une diminution de la densité optique et de la longueur d'onde d'absorbance du colorant (Comings, 1978). Un changement de couleur se produit se traduisant par un passage du bleu clair au rouge violacé ou magenta foncé.

#### Protocole

Les lames d'étalements chromosomiques issues des cultures sont rincées à l'eau courante, puis à l'eau déminéralisée. Elles sont plongées horizontalement dans une solution de Giemsa à 6% et incubées pendant 10 min à température ambiante. Les lames sont ensuite retirées du colorant et rincées abondamment à l'eau courante et à l'eau déminéralisée. Elles sont séchées à l'air libre et les métaphases sont observées grâce à un microscope photonique (Zeiss Primo Star) à lumière blanche (G x 40; G x 100). Les métaphases les plus complètes sont photographiées grâce à deux appareils photos numériques (Canon Power-Shot A640, 10.0 méga pixels; Sony Cyber-Shot DSC-W55, 7.2 méga pixels).

#### Remarques

Les chromosomes de la tourterelle des bois, comme la plupart des oiseaux, fixent quelquefois très mal le Giemsa. Le temps de coloration estimé à 10 min pour la poule s'est révélé moins efficace pour la tourterelle des bois et a été rallongé à 3 jours. L'augmentation de la durée de coloration a été nécessaire pour l'obtention d'une coloration homogène et pour ensuite la révélation des marquages en bandes structurales GTG et dynamiques RBG chez la tourterelle des bois.

#### Solutions nécessaires

➤ **Tampon phosphate:** pour 500 ml

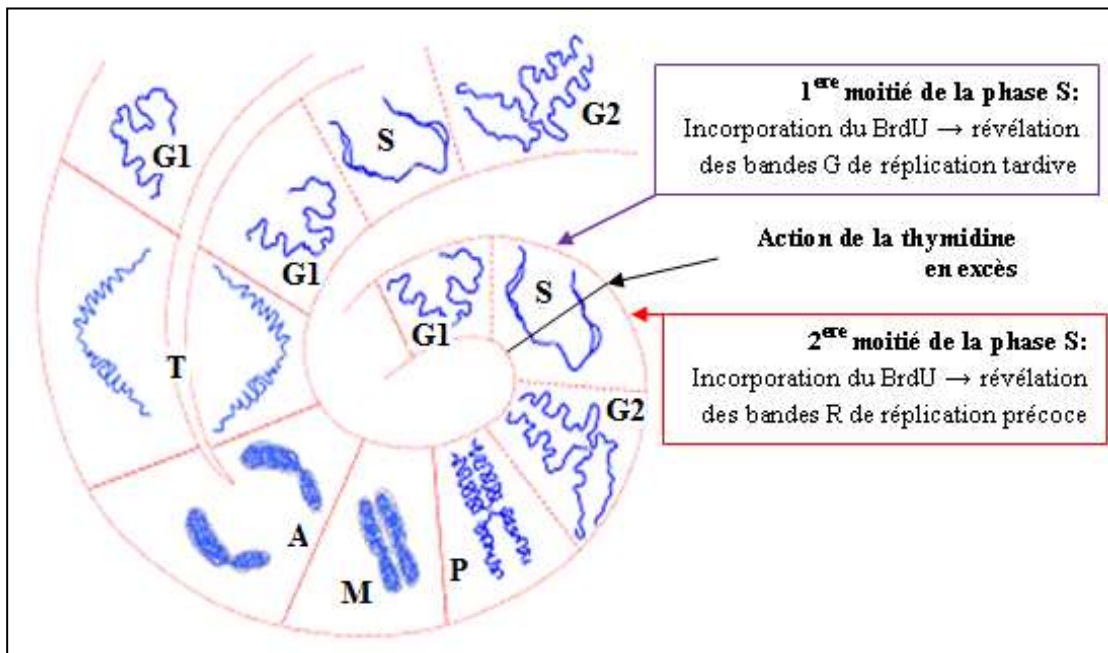
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-12H<sub>2</sub>O : 1.45 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0.1 g

NaCl : 4 g

KCl : 0.1 g

Le pH final du tampon est ajusté à 7,15 en ajoutant progressivement un volume d'une solution HCl 1N.



**Figure 22.** Action du BrdU sur la phase S du cycle cellulaire et influence sur le type de bandes révélées.

**G1** : Gap1; **S** : Synthèse; **G2** : Gap2; **P**: Prophase;  
**M**: Métaphase; **A**: Anaphase; **T**: Télaphase

➤ **Solution de Giemsa à 6%:** pour 25 ml  
Giemsa L (Sigma) : 1.5 ml  
Tampon phosphate (pH 7,15) : 23,5 ml  
La solution de coloration est préparée extemporanément

## **5.2-Technique de marquage mettant en évidence des bandes morphologiques G ou dynamiques R**

### **5.2.1-Techniques de marquage mettant en évidence des bandes G**

Ces techniques révèlent des bandes dites structurales ou morphologiques, faisant intervenir uniquement la structure intrinsèque du chromosome (Ladjali, 1994). Aucun traitement préalable n'est effectué durant la culture. Cette technique décrite par Seabright, (1971), et modifiée par Ladjali *et al.*, (1995c), repose sur l'action protéolytique de la trypsine.

#### **Protocole**

Les lames des étalements chromosomiques sont plongées dans un bain de trypsine à 0,25 % à température ambiante pendant 10 à 12 secondes. Les lames sont retirées puis rincées durant quelques secondes dans deux bains successifs de PBS<sup>-</sup> à température ambiante, afin d'inactiver l'action de la trypsine. Les lames sont colorées au Giemsa selon le protocole qui a été décrit précédemment. L'observation des métaphases est réalisée grâce à un microscope photonique (GX40; GX100) (Zeiss Primo Star) avec un filtre vert. La Prise de photos est effectuée grâce à un appareil à photos numériques (Canon Power-Shot A640, 10.0 méga pixels; Sony Cyber-Shot DSC-W55, 7.2 méga pixels).

#### **Remarque**

Les lames destinées à ce type de traitement, doivent être séchées à l'air et vieilles pendant 3 à 10 jours. Les lames qui ont été congelées, peuvent être utilisées juste après leur décongélation.

#### **Solutions nécessaires**

➤ **Solution de trypsine (0.25%) :**  
Trypsine porcine (1 :250, Sigma) : 62,5g  
PBS<sup>-</sup>: 25 ml

Cette solution peut être préparée soit extemporanément ou congelée à – 20°C.

### **5.2.2- Techniques de marquage mettant en évidence des bandes R**

Ces techniques reposent sur des traitements particuliers effectués à la fin de la culture cellulaire comme l'incorporation du 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU). Ce dernier est un analogue structural de la thymidine (Zakharov et Egolina, 1968; Zakharov et Egolina, 1972). Son incorporation s'effectue durant la réplication de l'ADN chromosomique (Ladjali, 1994; Ladjali *et al.*, 1995c). Les bandes R correspondent aux régions de l'euchromatine riches en GC. Le BrdU n'est incorporé qu'en substitution de la thymidine exogène, non synthétisée par la cellule et dont la durée d'incorporation dépend de celle du cycle cellulaire. L'incorporation du BrdU durant la première moitié de la phase S permet l'obtention de bandes G (réplication tardive). Alors que son incorporation durant les dernières heures de la culture met en évidence des bandes R (réplication précoce) (Figure 22). La synchronisation des cellules permet de

contrôler le cycle cellulaire et d'obtenir une incorporation du BrdU dans la majorité des cellules. L'ajout du 5-fluoro-2'-déoxyuridine (FdU) permet l'augmentation du rendement de la synthèse de la thymidine endogène (Bell et Wolff, 1966).

### **Protocole**

Une quantité de 33 µl de BrdU est ajoutée à un volume de 10 ml de milieu de culture de cellules synchronisées (concentration finale : 10 mg/ ml) juste à la fin du deuxième blocage par la thymidine. Afin d'optimiser l'incorporation du BrdU, une quantité d'environ 100µl d'une solution de FdU est ajoutée (concentration finale : 0,74mg/ml) après une heure de l'incorporation du BrdU. Les cellules sont par la suite incubées à 41 °C jusqu'au moment de la récolte (Viegas-Péquignot et Dutrillaux, 1978; Ladjali, 1994; Ladjali *et al.*, 1995c).

### **5.2.3- Technique de coloration FPG (Fluorochrome-Photolyse-Giemsa)**

Cette technique se base sur l'action d'un fluorochrome (Hoechst 33258) capable de se fixer sur l'ADN chromosomique. Sous l'effet d'une exposition à la lumière noire, le BrdU incorporé à l'ADN, subit une photolyse et un ensemble de réactions radicalaires. Ces mécanismes ont pour effet de diminuer l'affinité des régions riches en BrdU au Giemsa. La coloration se produit alors uniquement dans les régions de l'ADN n'ayant pas incorporé le BrdU (Perry et Wolf, 1974; Douarin *et al.*, 1989; Ladjali *et al.*, 1995c).

### **Protocole**

Les étalements chromosomiques sont plongés pendant 20 min dans une solution de Hoechst 33258 (concentration finale 1 mg/100ml) préparée extemporanément. Ils sont ensuite rincés à l'eau courante puis à l'eau déminéralisée. Les lames sont déposées à plat dans des boîtes de Pétri et recouvertes d'une solution de SSC à 2X. Elles sont ensuite exposées pendant 90 min à une lumière noire (ampoule Mazdafluor OE TFWN 20) à une distance de 15 cm. Ces lames sont rincées à l'eau du robinet puis à l'eau déminéralisée et plongées dans une solution de Earle à pH 6.5 sans bicarbonate, durant 10 mn à 87°C. Les lames sont alors lavées et colorées au Giemsa à 6%. Elles sont ensuite observées au microscope photonique (GX40 puis GX100) (Zeiss Primo Star) avec un filtre vert.

### **Solutions nécessaires**

#### **➤ Solution de Hoechst 100 X**

Hoechst 33258 (sigma) : 100 mg

H<sub>2</sub>O : 100 ml

Cette solution est conservée par fractions de 1 ml à -20°C. Au moment du traitement, 1 ml de la solution 100 X est dilué dans 99 ml de H<sub>2</sub>O.

#### **➤ Solution de SSC 20X (Standard Saline Solution)**

NaCl (3M): 175,2 g

Na<sub>3</sub> C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>-2H<sub>2</sub>O (0.3 M): 88.2 g

H<sub>2</sub>O qsp 1 litre.

La solution est autoclavée et conservée à +4°C.

#### **➤ Solution de Earle 10X :**

NaCl : 68 g

KCl : 4 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (0.01 M) : 1.4g

MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O ( 8.1 mM) : 2 g

Glucose (0.055M) : 10 g  
CaCl<sub>2</sub> (18 mM) : 2 g  
Rouge de phénol : une pincée  
H<sub>2</sub>O qsp 1 litre.

Le mélange est filtré et conservé à 4°C. La solution mère (10 X) est diluée le jour même de l'utilisation, pour obtenir une solution 1X et le pH est ajusté à 6,8 avec une solution saturée de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-12H<sub>2</sub>O.

➤ **Solution de BrdU (5-bromo-2'-déoxyuridine)**

BrdU (Sigma) : 30.7 mg  
PBS<sup>-</sup> : 10 ml

Le mélange ainsi obtenu est filtré sur une membrane 0.22µm et conservé par fractions de 250 ou 500 µl à -20°C.

➤ **Solution de FdU (5-fluoro-2'-déoxyuridine) 10X**

FdU (Sigma) : 7.5 mg  
PBS<sup>-</sup> : 10 ml

La conservation est réalisée à - 20°C par fractions de 1 ml 10X (3mM). Pour la solution de travail, 1ml à 10X (3 mM) est dilué dans 9 ml de PBS<sup>-</sup>. Le mélange est ensuite filtré sur une membrane 0.22 µm et conservé en fraction de 500 µl ou de 1 ml à - 20°C.

## **6) Techniques d'établissement des caryotypes**

### **6.1- Prise de photographies et traitement des images**

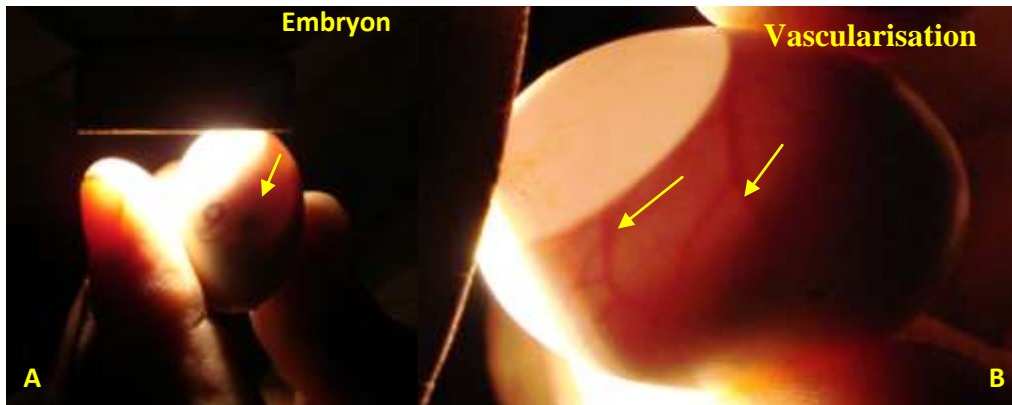
Les étalements chromosomiques marqués en bandes et colorés au Giemsa, sont observés à l'objectif GX10. Les lames sont observées par la suite, à l'objectif GX40 afin de sélectionner les métaphases les plus complètes. L'analyse des bandes chromosomiques s'effectue à l'aide d'un objectif GX100 en utilisant une goutte d'huile à immersion. La prise de photos, nécessite des mises aux points au microscope (réglages de luminosité, zoom et contraste). Les appareils à photos numériques utilisés sont à haute résolution et sont adaptés au microscope (Canon Power-Shot A640, 10.0 méga pixels; Sony Cyber-Shot DSC-W55, 7.2 méga pixels). Les photos sont alors transférées sur un ordinateur pour des traitements graphiques (luminosité et contraste) grâce à des logiciels spécialisés (Microsoft Office Picture Manager) mais sans retoucher la structure chromosomique.

### **6.2- Classification des Chromosomes**

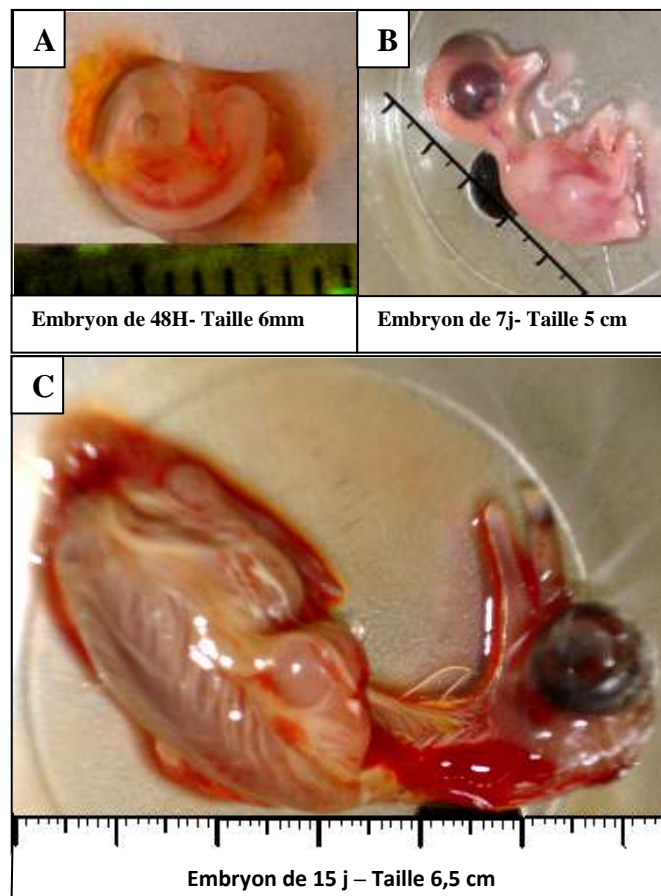
Les photos des métaphases les plus complètes, sont traitées grâce à un logiciel spécifique «Adobe Photoshop 7.0 ». Ainsi les chromosomes sont découpés individuellement et déposés sur un fond blanc. On procède par la suite au classement des chromosomes par ordre de taille décroissant, en prenant en considération la position du centromère. Les chromosomes sexuels sont classés à part. Le caryotype de la tourterelle des bois a été établi pour la première fois, selon le caryotype standard du poulet en bandes GTG et RBG qui est considéré comme une référence en cytogénétique aviaire (Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999). Les chromosomes ont été également identifiés et classifiés en utilisant des caryotypes déjà établis chez d'autres espèces appartenant à l'ordre des Colombiformes (Yamashina et Makino, 1946; Makino *et al.*, 1956; Galton et Bredbury, 1966; Itoh *et al.*, 1969; De Lucca, 1984; Guttenbach *et al.*, 2003).

# **Chapitre III**

## **Résultats**



**Figure 23.** Mirage d'un œuf de tourterelle des bois effectué par les techniciens du CCZ. (A) Embryon visible à travers la coquille (application d'une lampe contre la coquille). (B) Vascularisation visible des annexes embryonnaires.



**Figure 24.** Embryons de la tourterelle des bois. (A) Embryon de 48 heures, entièrement mis en culture. (B) Embryon de 7 jours. (C) Embryon de 15 jours.

# Résultats

## 1) Matériel animal

Nous avons obtenu le matériel biologique grâce à une collaboration avec le Docteur Belhamra du Centre Cynégétique de Zéralda (CCZ). Nous avons ainsi collecté 7 œufs sur lesquelles un mirage (Figure 23A, B) a été effectué. Certains d'entre eux ont été incubés à 39°C en respectant les conditions d'hygrométrie. L'un des embryons rapporté du CCZ, a éclos au Laboratoire de Génétique du Développement (USTHB). Nous l'avons alors remis en captivité et photographié après 3 semaines pour distinguer entre oiseaux juvéniles et adultes (Figure 6).

Pour la réalisation de ce travail, quatre cultures cellulaires ont été effectuées à partir d'organes d'embryons à différents stades du développement (48 heures, 7 jours, 15 jours et un poussin) (Figure 24).

## 2) Culture cellulaire

Les cellules des organes (foie, poumons, reins, bréchet et fragments musculaires) issus de l'animal âgé d'environ 15 jours (Figure 25A) ont été maintenues en culture pendant 78 jours. Les cellules fusiformes adhèrent au fond de la boîte après 2 jours de culture (Figure 25B).

Le milieu de culture est changé tous les 2 à 3 jours, ce qui signifie que l'activité cellulaire est intense. Un remplissage progressif des boîtes de culture est alors observé (Figure 25C, D et E). La division incessante des fibroblastes permet le tissage d'un tapis cellulaire (Figure 25E). Après la première trypsination, l'activité cellulaire a commencé à baisser.

L'œuf de la tourterelle des bois de 48 heures, a été dissocié et soumis à l'action de la trypsine. Les cellules ont adhéré au fond de la boîte après 24 heures de mise en culture. Alors, les cellules ont nécessité un changement du milieu de culture le jour même. Nous avons alors constaté, après 4 jours de mise en culture, l'installation d'un tapis de fibroblastes qui a nécessité une trypsination. Ensuite les divisions cellulaires ont été ralenties et une seconde trypsination a été effectuée après 2 mois de culture.

## 3) Synchronisation du cycle cellulaire

Nous avons effectué des doubles synchronisations à la thymidine après le 2<sup>ème</sup> passage. Cette technique a été appliquée afin d'obtenir un nombre important de cellules en prométaphase. Un suivi régulier, au microscope inversé, a été effectué afin d'observer les différentes formes que peuvent prendre les cellules sous l'action d'agents bloquants.

Les fibroblastes ont été parfaitement synchronisés après le 2<sup>ème</sup> passage. Après deux blocages consécutifs et ajout du BrdU, nous avons remarqué que les cellules de la tourterelle des bois résistaient très bien aux différents traitements utilisés lors de la synchronisation sans l'apparition de cellules mortes. Nous avons repéré au microscope inversé, des champs de cellules bloquées que nous avons photographiées régulièrement après la levée du blocage et de l'administration du BrdU et du FdU. Le comptage régulier des cellules rondes et réfringentes (cellules en division) et des doublets (cellules déjà divisées) a permis d'estimer le demi-cycle de la tourterelle des bois à 4h30 (Figure 25F). Au moment où le nombre de cellules réfringentes dépasse le nombre des doublets, les cellules sont récoltées afin d'obtenir un maximum de cellules en prométaphase. Nous avons estimé le temps d'incorporation du BrdU à environ 4 h30 chez la tourterelle des bois.

Certaines cultures n'ont subi qu'une simple synchronisation sans l'administration du BrdU, au préalable. Les chromosomes ainsi obtenus ont été utilisés pour les techniques de marquage en bandes GTG.

#### **4- Marquages chromosomiques et première description des chromosomes de la Tourterelle des bois *Streptopelia turtur***

L'application de la double synchronisation sur des cultures de fibroblastes appartenant à la tourterelle des bois, nous a permis d'obtenir des chromosomes allongés (Figure 26A). Ces derniers sont dits à « haute résolution » et ont été obtenus pour la première fois chez cette espèce. Dans le cadre de ce travail, nous avons effectué 3 doubles synchronisations. Nous avons également réalisé 3 simples synchronisations. Plusieurs récoltes de cellules non synchronisées réfringentes (cellules en division) directement à partir des boîtes de cultures ont été effectuées.

Les cellules récoltées et fixées, ont été étalées sur des lames (Micro Slides, Single Frosted, CORNING) à raison d'une quinzaine de lames par tube récolté. Les étalements chromosomiques ont permis d'effectuer des marquages chromosomiques mettant en évidence des bandes morphologiques GTG (Figure 27A et B). Les chromosomes issus des doubles synchronisations ont permis la révélation des bandes dynamiques RBG après incorporation du BrdU (Figure 27D).

Plus de 80 lames ont été traitées et colorées chez les quatre animaux traités. L'observation au microscope photonique, en contraste de phase, a montré la présence d'une moyenne de 10 métaphases exploitables par lame (Figure 27C). La dispersion des chromosomes sur les lames a été causée par l'utilisation d'une centrifugeuse à rotor angulaire (Sigma 2-16P, rotor 12151). En effet, les culots obtenus ont été sous forme de trainées sur les parois des tubes qui se remettaient rapidement en suspension et nécessitaient l'augmentation de la vitesse de centrifugation à 3000 rpm, conduisant à la dispersion des chromosomes.

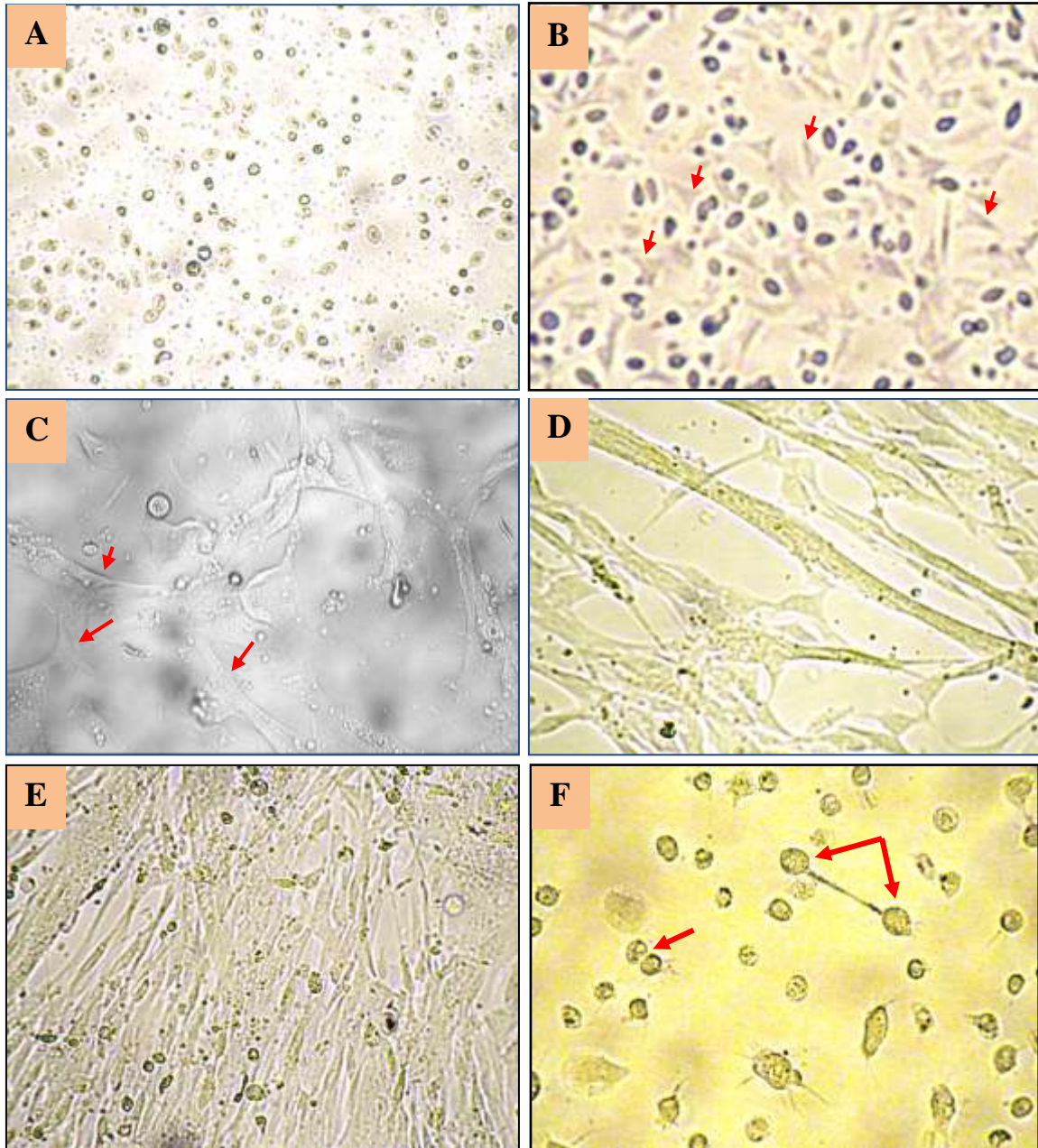
Le nombre diploïde des chromosomes de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur* a été estimé pour la première fois à 78 chromosomes, grâce à l'analyse des métaphases les plus complètes (Figure 26B). Comme pour tous les oiseaux, les microchromosomes ont été difficiles à identifier (Figure 26A). En effet, 9 paires de macrochromosomes, 29 paires de microchromosomes et deux chromosomes sexuels ZZ ont été établis. Nous avons classé les chromosomes dans un ordre de taille décroissant (Pollock et Fechheimer, 1976; Stock et Bunch, 1982; Ladjali *et al.*, 1995c), en tenant compte de la morphologie des bandes et de la position du centromère.

##### **4.1- Les bandes structurales GTG**

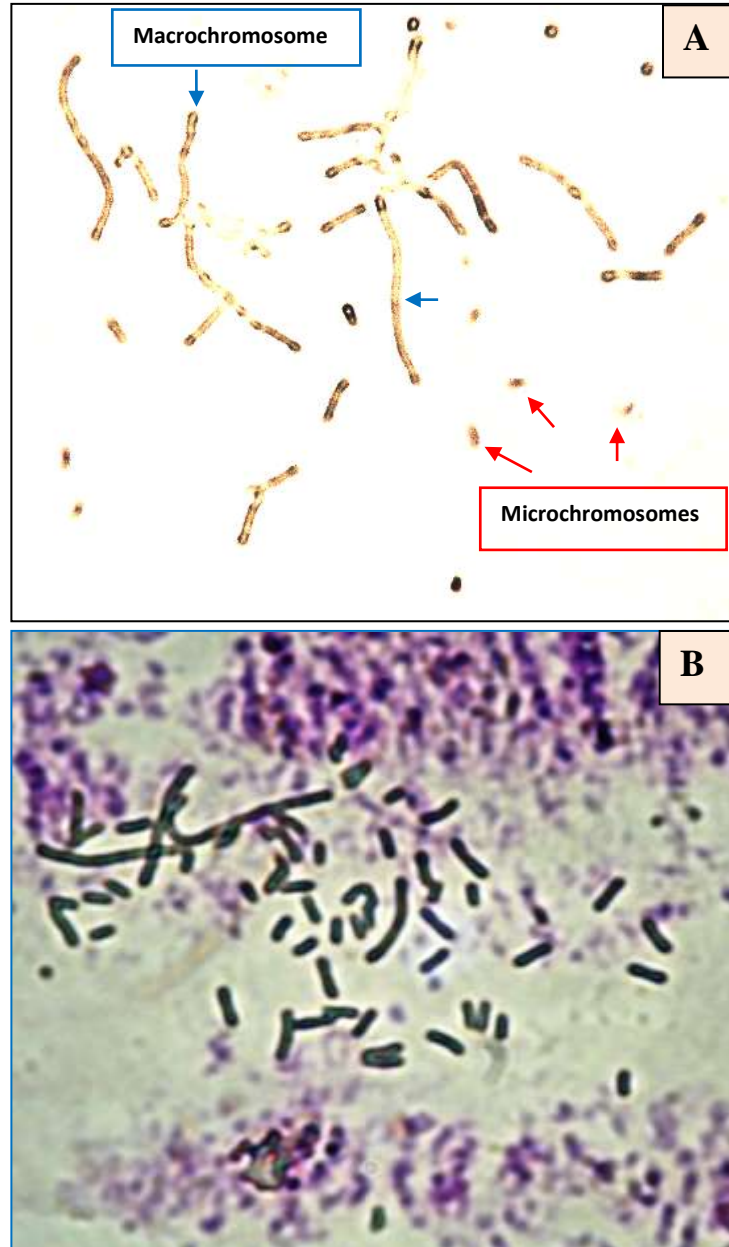
La révélation des bandes structurales GTG (Figure 27A et B) est basée sur la digestion enzymatique avec une protéolyse (Seabright, 1971; Ladjali, 1994; Ladjali *et al.*, 1995c) et ne nécessite aucun traitement préalable durant la culture cellulaire. Les chromosomes sont utilisés 3 à 10 jours après leurs étalements. Les bandes GTG permettent la caractérisation précise des chromosomes.

Elles sont reproductibles seulement si toutes les conditions de coloration sont respectées, comme le pH, la concentration de la trypsine et l'âge de la lame.

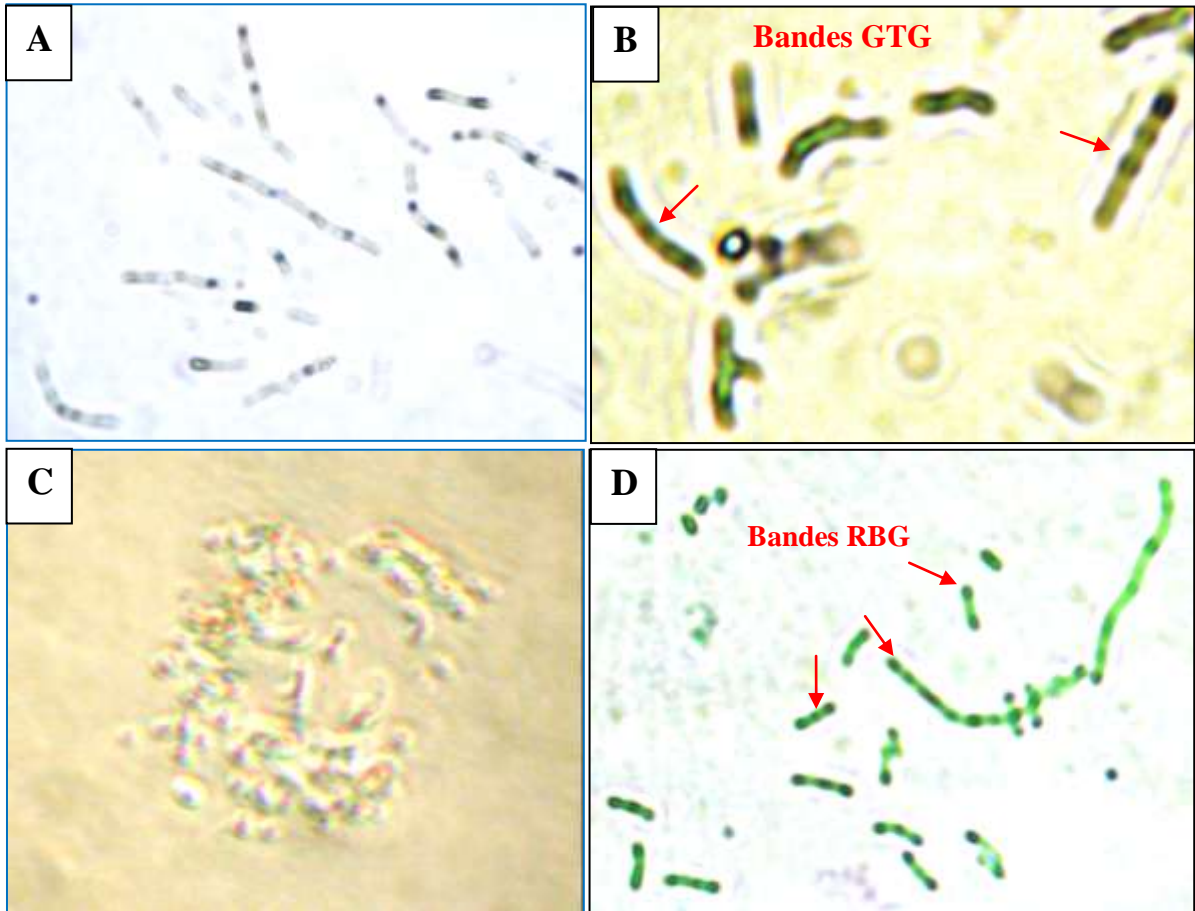
Le caryotype en bandes GTG ainsi établi montre la présence de neuf paires de macrochromosomes (Figure 28). Les trois premiers macrochromosomes ainsi que les chromosomes 8, 9 et Z sont facilement identifiables. Alors que les paires chromosomiques 4 et 5 se ressemblent elles. De la même façon, les chromosomes 6 et 7 se ressemblent entre eux aussi. Ceci rend difficile l'identification de ces chromosomes. La description détaillée de la morphologie et du motif en bandes GTG des neuf premières paires de macrochromosomes et des chromosomes sexuels ZZ est mentionnée ci-dessous.



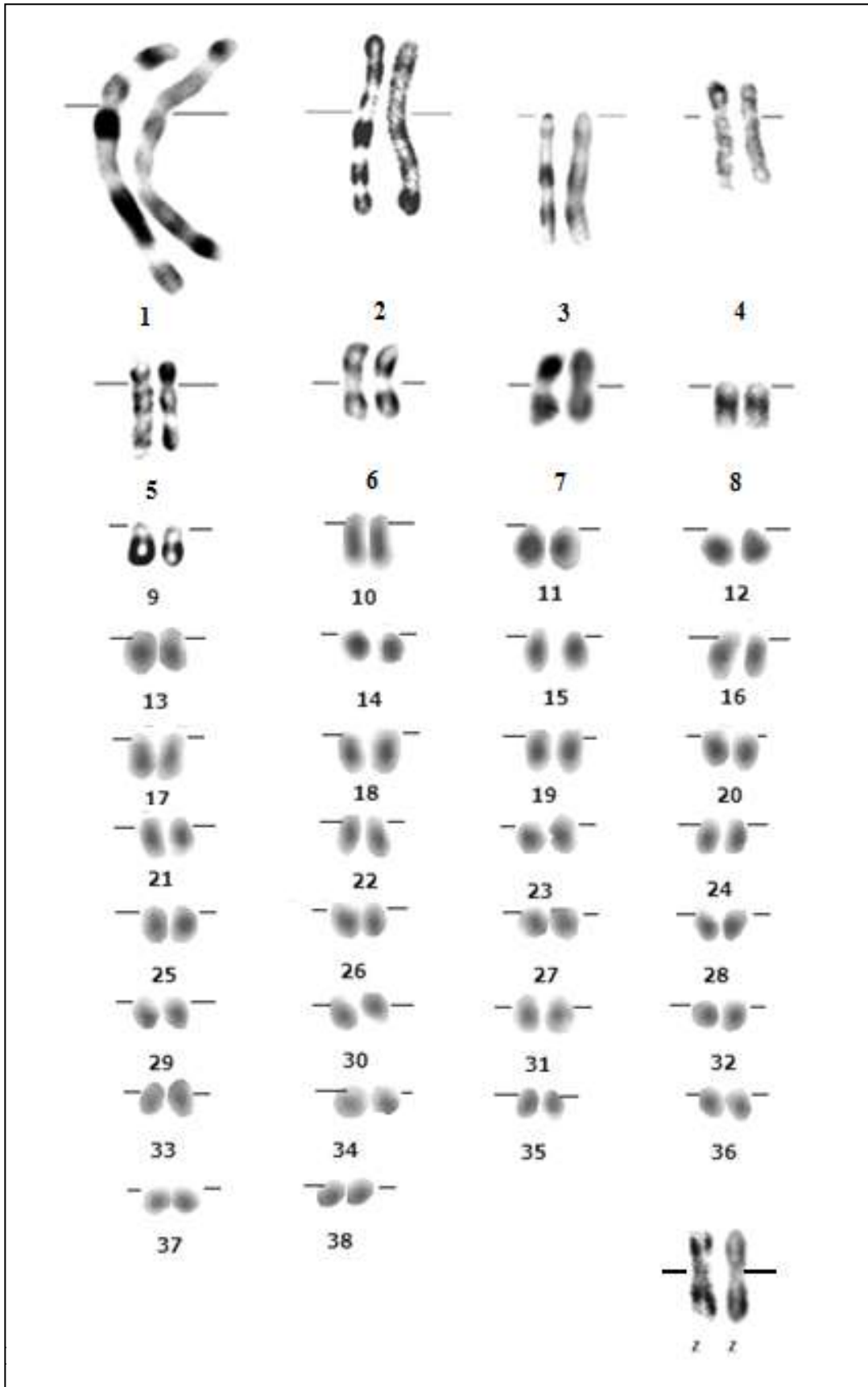
**Figure 25.** Cultures cellulaires primaires issues d'embryons de la tourterelle des bois (GX40X10X6). (A) et (B) Début de mise en place de fibroblastes issus du foie, du cœur et des poumons d'un embryon de la tourterelle des bois âgé de 15 jours. (C), (D) et (E) Mise en place progressive d'un tapis de fibroblastes. (F) Reprise des divisions cellulaires après la levée du blocage par de la thymidine lors de la double synchronisation (les flèches indiquent des doublets cellulaires en fin de division).



**Figure 26.** (A) et (B) Chromosomes allongés obtenus après une double synchronisation à la thymidine en bandes GTG (A) et coloration conventionnelle (B) (G x100 x 10 x 3).



**Figure 27.** (A) et (B) Chromosomes en prométaphase de la tourterelle des bois en bandes GTG. (C) Chromosomes en prométaphase d'un embryon de l'espèce *Streptopelia turtur* âgé de 15 jours, observés au microscope optique en contraste de phase (GX100X3). (D) Métaphase partielle de la tourterelle des bois marquée en bandes dynamiques RBG (G x 100 X3).



**Figure 28.** Première proposition du Caryotype de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur*, de sexe mâle en bandes structurales GTG.

## **4.2-Description des neuf premières paires chromosomiques et du chromosome sexuel Z de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur* en bandes GTG**

**Chromosome 1:** Le chromosome 1 de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur* est submétacentrique. Le bras long (q) montre cinq bandes G positives et quatre bandes négatives. Le bras court (p) présente trois bandes G positives visibles et trois bandes négatives.

**Chromosome 2:** Le chromosome 2 de la tourterelle des bois est submétacentrique. Le bras long (q) montre trois bandes G positives et quatre bandes négatives. Le bras court (p) présente trois bandes G positives et trois bandes négatives.

**Chromosome 3:** Le chromosome 3 est acrocentrique. Le bras long (q) présente trois bandes G positives et quatre bandes négatives.

**Chromosome 4 :** Le chromosome 4 est télocentrique. Il montre quatre bandes G positives et quatre bandes négatives visibles sur le bras long (q). Le bras court (p) montre la présence de deux bandes positives et trois bandes négatives.

**Chromosome 5:** Le chromosome 5 est télocentrique. Le bras long présente quatre bandes G positives alternées par cinq bandes négatives. Le bras court quant à lui présente une bande positive et deux bandes négatives.

**Chromosome 6:** Le chromosome 6 est métacentrique. Chaque bras chromosomique semble porter deux bandes G positives et deux bandes négatives. Le centromère est marqué négativement.

**Chromosome 7:** Le chromosome 7 de la tourterelle des bois est métacentrique. Chaque bras chromosomique semble porter une bande positive et une bande négative principale médiane.

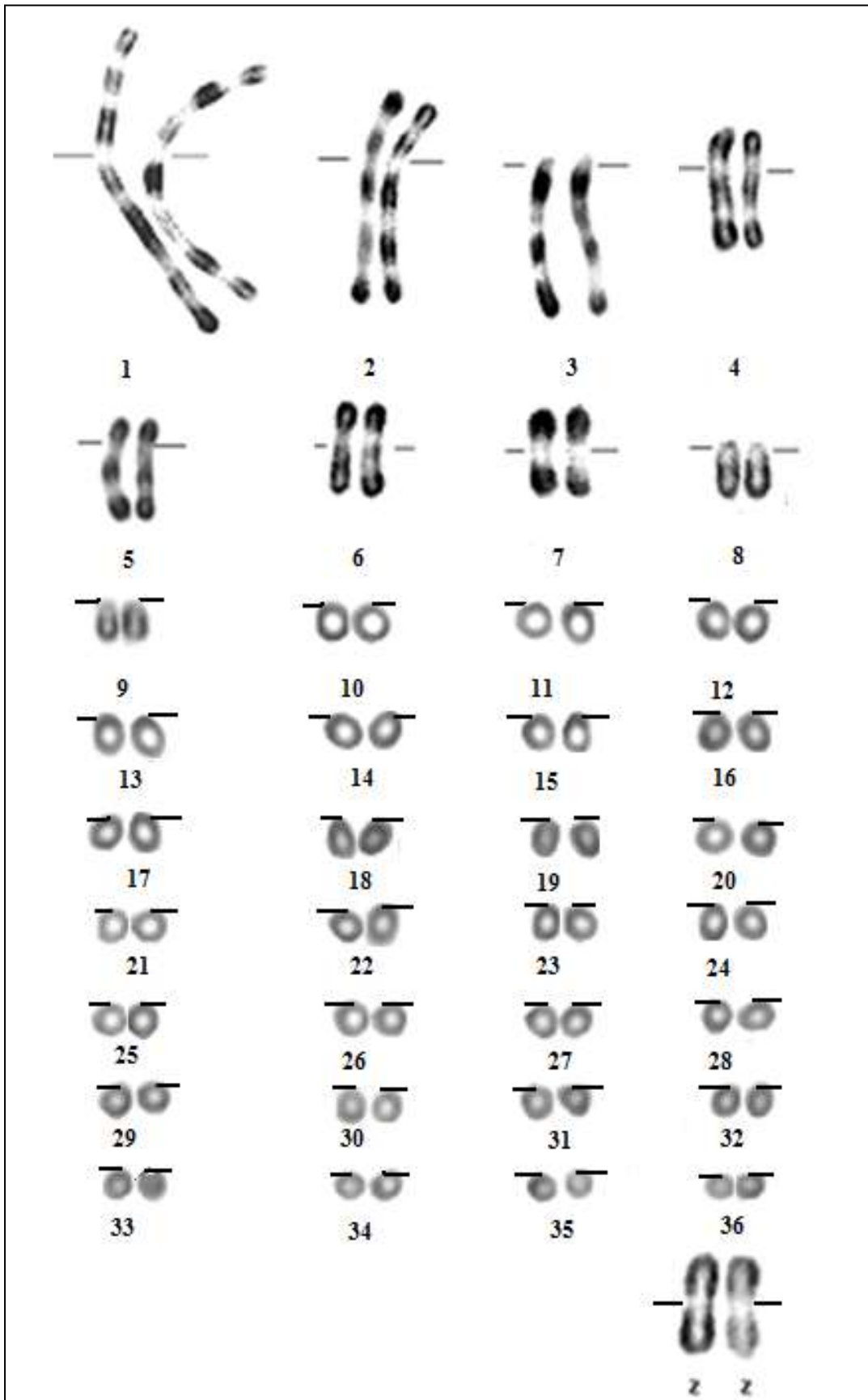
**Chromosome 8:** Le chromosome 8 est acrocentrique. Il montre 1 bande G positive sur le bras long et deux bandes négatives apparentes.

**Chromosome 9:** Le chromosome 9 est acrocentrique. Le bras long montre deux bandes G positives alternées par deux bandes négatives.

**Chromosome Z:** Le chromosome sexuel Z de l'espèce *Streptopelia turtur* est métacentrique. Le centromère est marqué négativement. On observe deux bandes G positives, deux bandes négatives et une large bande négative à l'extrémité du bras court (p). Le bras long (q) présente trois bandes positives apparentes, deux bandes négatives et une large bande négative à l'extrémité.

## **4.3- Caryotype en bandes RBG**

Le caryotype en bandes RBG (Figure 29) a été établi à partir de l'analyse des métaphases les plus complètes. Les chromosomes ayant subi une double synchronisation par la thymidine sont allongés. Ils ont été traités pour un marquage en bandes RBG. Ainsi les bandes obtenues sont de bonne qualité signifiant une bonne incorporation du BrdU. Le temps d'incorporation du BrdU est d'environ 4 heures et 30 minutes. La description des neuf paires de macrochromosomes, des chromosomes sexuel ZZ, est établie ci-dessous (Figure 29).



**Figure 29.** Première proposition du Caryotype de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur*, de sexe mâle en bandes dynamiques RBG.

#### **4.4-Description des neuf premières paires chromosomiques et du chromosome sexuel Z de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur* en bandes RBG**

**Chromosome 1 :** Le chromosome 1 de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur* est submétacentrique. Il présente quatre bandes R positives et quatre bandes négatives sur le bras long (q). Le bras court (p) montre trois bandes R positives et trois bandes négatives.

**Chromosome 2 :** Le chromosome 2 de l'espèce *Streptopelia turtur* est submétacentrique. Il montre trois bandes R positives visibles sur le bras long et trois bandes négatives. Le bras court montre deux bandes R positives et deux bandes négatives.

**Chromosome 3 :** Le chromosome 3 est acrocentrique. Le bras long présente quatre bandes positives alternées de quatre bandes négatives.

**Chromosome 4 :** est télocentrique et montre au niveau du bras long trois bandes positives avec une large bande centrale et deux bandes négatives. Le bras court porte une bande positive terminale et une seule bande négative.

**Chromosome 5 :** Le chromosome 5 est télocentrique et présente au niveau du bras long deux bandes R positives ainsi que deux bandes négatives. Le bras court présente une bande R positive télomérique et une autre bande négative.

**Chromosome 6 :** Le chromosome 6 est métacentrique. Chaque bras chromosomique semble porter deux bandes positives centrées par une bande négative. Le centromère est marqué négativement.

**Chromosome 7 :** Le chromosome 7 est métacentrique. Deux bandes positives sont visibles sur chaque bras chromosomique, avec une bande négative médiane. Le centromère semble également marqué négativement.

**Chromosome 8 :** Le chromosome 8 est acrocentrique. Deux bandes positives sont observées aux extrémités télomériques du chromosome avec une bande claire centrale.

**Chromosome 9 :** Le chromosome 9 de la tourterelle des bois est acrocentrique. Les extrémités du chromosome semblent porter deux bandes positives centrées d'une large bande claire.

**Chromosome Z :** Le gonosome Z de l'espèce *Streptopelia turtur* est métacentrique. Deux bandes R positives et une bande négative sont visibles sur chaque bras. Le centromère est marqué négativement.

# **Chapitre IV**

## **Discussion**

# Discussion

## 1) Culture cellulaire

La culture de fibroblastes issus d'embryons âgés de 2, 7 et 14 jours et de poussins a été réalisée dans un milieu de culture RPMI (1640) avec 10 % de SVF, sous une hotte à flux laminaire vertical. Après quelques heures de mise en culture, les cellules avaient un aspect ovalaire et d'autres arrondies. Nous avons remarqué que l'adhésion des cellules au fond des boîtes de culture se produisait généralement au bout d'environ 3 heures. Après 24 heures d'incubation à 41°C les cellules fusiformes avec des prolongements cytoplasmiques apparaissaient (Figure 30A, B et C), correspondant aux fibroblastes.

A la mise en culture, la quantité du tissu pulmonaire prélevé était la plus importante par rapport aux autres organes. Les fibroblastes représentent environ 37% du parenchyme pulmonaire et sont la principale source de protéines de la matrice extra cellulaire. Ils permettent ainsi le maintien de l'intégrité tissulaire et influencent l'activité et la différenciation des cellules voisines (Dhainaut *et al.*, 1998).

Le changement du milieu a été effectué tous les 2 à 3 jours, révélant ainsi une forte activité cellulaire. Le milieu de culture permet de maintenir le pH entre 7.6 et 7.8 grâce à l'acide N-2- hydroxyethylpiperazine-N'-2- éthanesulfonique (HEPES) contenu dans le RPMI complet. Après 3 à 4 semaines de culture, les cellules ont été trypsinées et le rythme des divisions cellulaires a commencé à baisser. Après 2 mois, les fibroblastes sont devenus plus allongés et comportaient parfois des vacuoles, ce qui correspondait au vieillissement des cellules (Hayflick, 1965; Martin, 1977; Dimri *et al.*, 1995; Van der Loo *et al.*, 1998; Carnero *et al.*, 2003).

Les cellules issues de l'embryon âgé de 48 heures qui a été entièrement dissocié et mis en culture, ont adhéré totalement après 24 heures de culture. Une première trypsination a été effectuée après 4 jours.

## 2) Double synchronisation des fibroblastes de la tourterelle des bois

Chez la tourterelle des bois, les cultures de fibroblastes ont été doublement synchronisées après le deuxième passage par de la thymidine en excès, pour la première fois. En effet, le dédoublement du blocage permet d'obtenir un nombre important de cellules en prométaphase. Les cellules ayant échappé au premier blocage sont lors de ce deuxième traitement à la thymidine synchronisées. Cette méthode a été utilisée pour la première fois sur des cellules jeunes, ayant un potentiel de division élevé entre le 2<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> passage chez le poulet. A ce stade les cellules supportent mieux les différentes substances (Thymidine en excès, BrdU et FdU) ajoutées dans le milieu de culture (Ladjali, 1994; Ladjali *et al.*, 1995c).

Une observation régulière des cellules après la levée du blocage par de la thymidine a été effectuée. Ceci a permis d'estimer la durée moyenne du demi cycle à 4h30' correspondant ainsi au temps d'incorporation du BrdU chez la tourterelle des bois. Les techniques de marquage en bandes R ont révélé un marquage correct sur des chromosomes allongés. Ceci correspond à une bonne incorporation du BrdU. Chez le poulet, le demi-cycle cellulaire est estimé à environ 6 et 7 heures (Ladjali, 1994).

## 3) Etablissement du Caryotype à haute résolution de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur*

La technique de double synchronisation à la thymidine et les marquages chromosomiques, en bandes structurales GTG et dynamiques RBG, ont été adaptés à partir de protocoles établis chez le poulet (Ladjali, 1994; Ladjali *et al.*, 1995c). Nous présentons, pour

la première fois, des caryotypes en bandes morphologiques GTG et dynamiques RBG chez la tourterelle des bois.

Le caryotype standard de la poule domestique (Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999) a facilité l'identification des chromosomes de la tourterelle des bois. Ce génome est considéré comme ancestral parce qu'il présente des caractéristiques communes à de nombreuses espèces d'oiseaux (Bed'home, 1999).

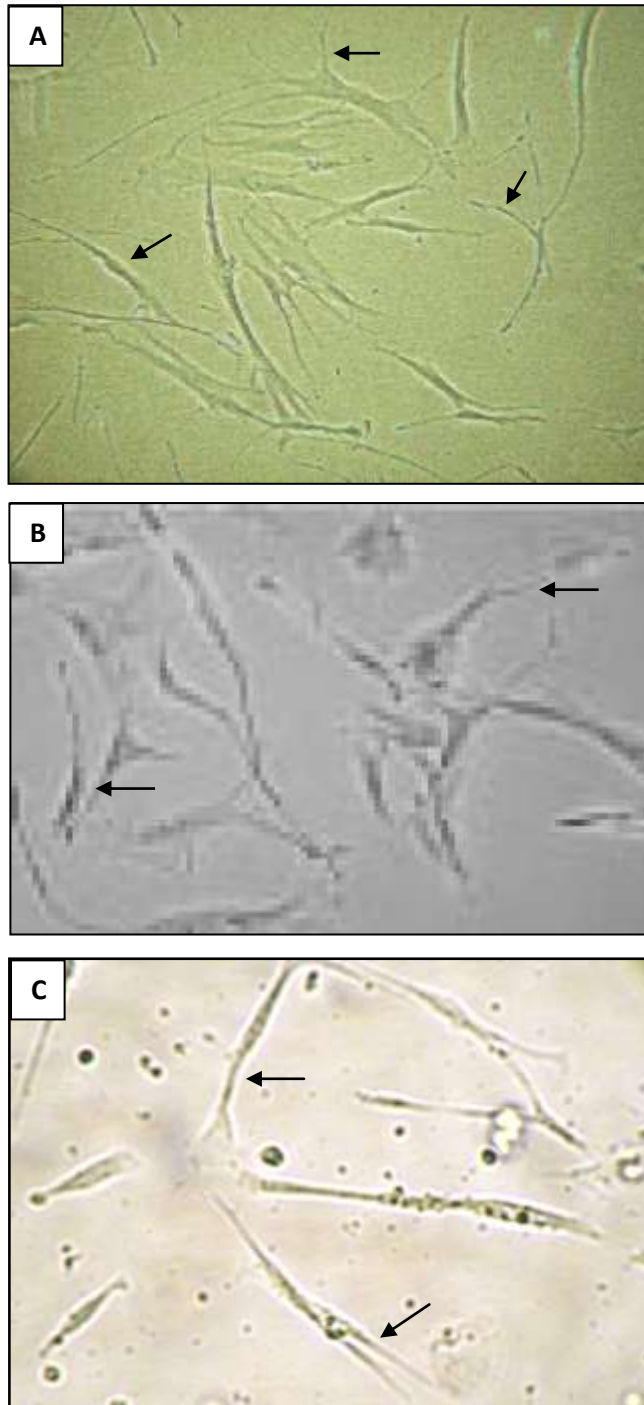
Nous avons estimé, pour la première fois, le nombre de chromosomes diploïde à 78 chromosomes. En effet, 9 paires de macrochromosomes, 29 paires de microchromosomes et deux chromosomes sexuels ZZ chez le mâle de la tourterelle des bois ont été identifiés. Ce nombre de chromosomes diploïde semble être en accord avec celui décrit chez les colombiformes. L'ordre des colombiformes possède généralement entre 86 et 68 chromosomes avec 86 chromosomes chez *Geotrygon montana* et 68 chromosomes chez *Uropelia campestris* (De Lucca, 1984). Le caryotype de la tourterelle rieuse *Streptopelia roseogrisea*, appartenant à ce même ordre, est constitué également de 78 chromosomes. Le même nombre de chromosomes est retrouvé aussi chez la poule domestique, la perdrix gabra et la caille des blés appartenant à des ordres différents (Guttenbach *et al.*, 2003; Pollock et Fechheimer, 1976; Fillon *et al.*, 2003; Ouchia, 2009; Kartout, 2010). Alors que le nombre de chromosomes diploïde a été estimé à  $80 \pm 2$  chromosomes chez l'outarde houbara appartenant à l'ordre des Gruiformes (Mahiddine, 2009). Les espèces *Streptopelia risoria* et *Streptopelia risoria var. alba*, appartenant au même genre que *Streptopelia turtur* possèdent un nombre de chromosomes diploïde égal à 74 chromosomes (Itoh *et al.*, 1969). Ces variabilités dans le nombre de chromosomes seraient le résultat de fissions ou de fusions ainsi que des réarrangements centromériques (Chromosome Atlas, 1971; De Lucca et de Aguiar, 1976; De Lucca et de Aguiar, 1978).

Comme pour la plupart des oiseaux, l'identification individuelle des microchromosomes de la tourterelle des bois est très difficile à réaliser. En effet, les microchromosomes sont de morphologies homogènes et sont pour la plupart acrocentriques (Kaelbling et Fechheimer, 1983; Belterman et De Boer, 1984; Ladjali, 1994). L'utilisation de marqueurs moléculaires spécifiques à chaque paire de microchromosomes permettra de les distinguer individuellement (Fillon *et al.*, 1997).

### 3.1- Cartographie Chromosomique Comparée

Aucune description des chromosomes n'a été réalisée chez l'espèce *Streptopelia turtur* avant ce présent travail. Nous avons identifié les neuf paires chromosomiques grâce à la comparaison effectuée avec les espèces de Columbidae déjà décrites en bandes GTG (De Lucca, 1984). Nous avons aussi effectué des comparaisons avec des espèces proches phylogénétiquement comme *Streptopelia risoria var. alba*, *Streptopelia roseogrisea* et *Columba livia* appartenant au même ordre, pour lesquelles des caryotypes ont été établis (Stock et Mengden, 1975; Yamashina et Makino, 1946; Makino *et al.*, 1956; Galton et Bredbury, 1966; Itoh *et al.*, 1969; Guttenbach *et al.*, 2003). Nous avons également utilisé le caryotype standard du poulet considéré comme référence pour la description des chromosomes de la tourterelle des bois (Figure 31A, 31B, 32, 33A, 33B et 34) (Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999). Les caryotypes déjà établis pour l'outarde houbara *Chlamydotis undulata*, la perdrix gabra *Alectoris barbara* et la caille des blés *Coturnix coturnix* ont été comparés avec le caryotype de la tourterelle des bois (Mahiddine, 2009; Ouchia, 2009; Kartout, 2010) (Tableau 7).

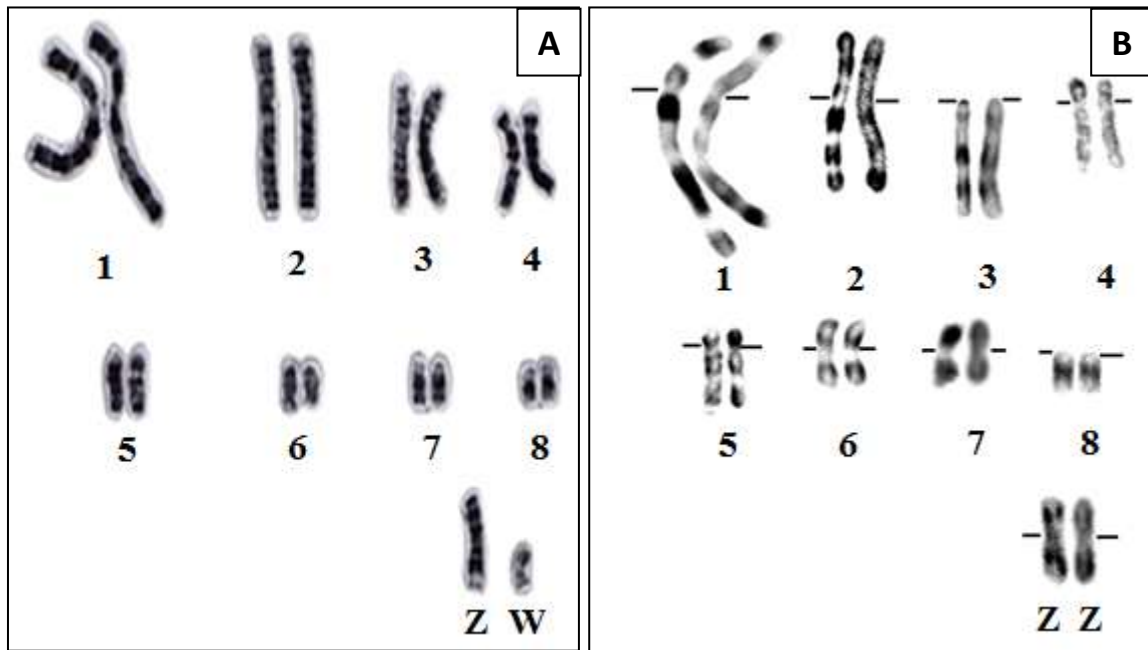
Nous avons facilement identifié les chromosomes 1, 2, 3, 8, 9 et le gonosome Z grâce à leurs et leurs morphologies qui sont différentes. Alors que les chromosomes 4 et 5 semblent



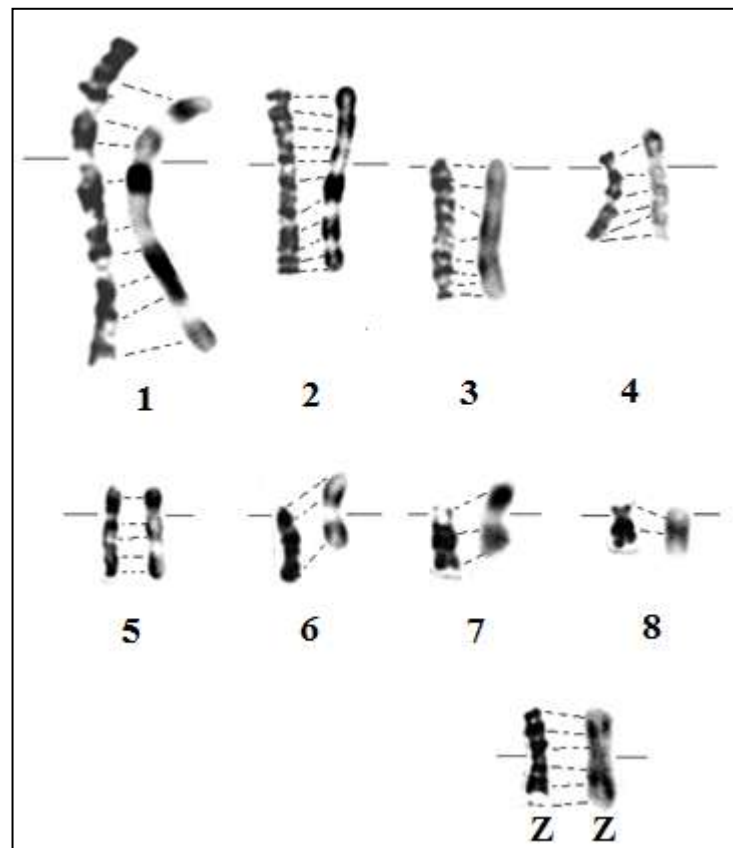
**Figure 30.** Fibroblastes fusiformes à prolongements cytoplasmiques observés sur des cultures de lignées cellulaires établies chez l'homme (**A**) et (**B**) (Keira *et al.*, 2004; Carnero *et al.*, 2003) et chez la tourterelle des bois (après 28 jours de mise en culture) (**C**).

**Tableau 7.** Comparaison morphologique des chromosomes de l'espèce *Streptopelia turtur* avec l'espèce *Gallus domesticus*, *Chlamydotis undulata undulata*, *Alectoris barbara* et l'espèce *Coturnix coturnix* (Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999; Mahiddine, 2009; Ouchia, 2009; Kartout, 2010).

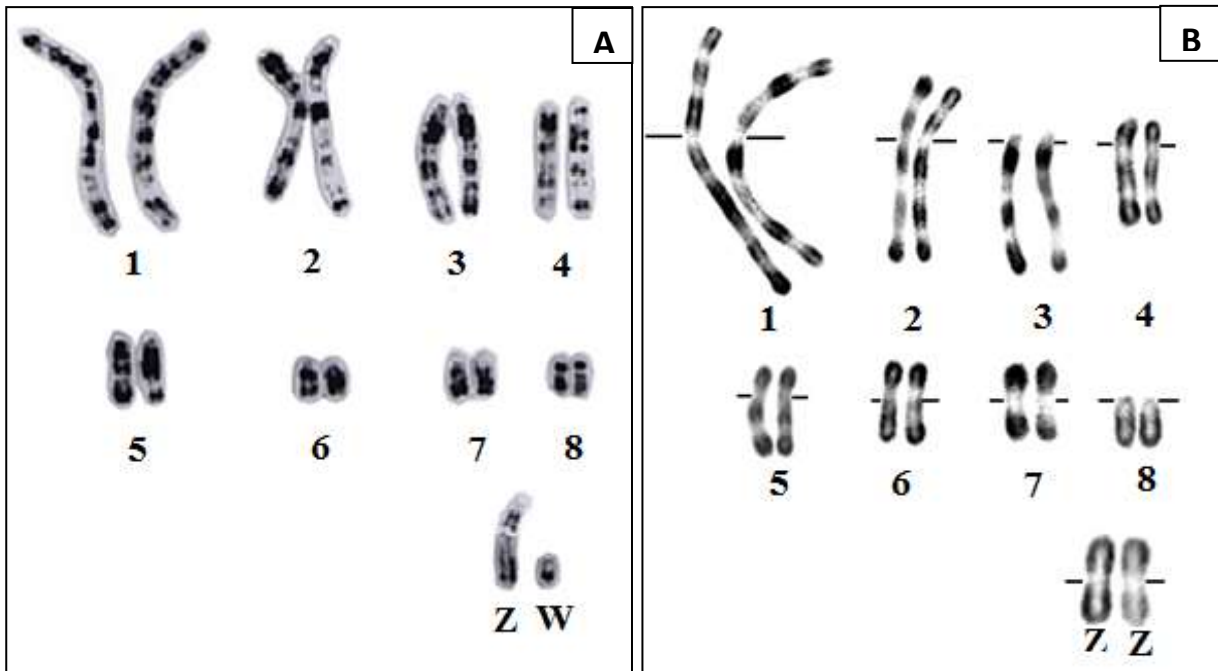
Chromosomes Espèces	<i>Streptopelia turtur</i>	<i>Chlamydotis undulata undulata</i>	<i>Alectoris barbara</i>	<i>Coturnix coturnix</i>	<i>Gallus domesticus</i>
Chromosome 1	submétacentrique	submétacentrique	submétacentrique	télocentrique	submétacentrique
Chromosome 2	submétacentrique	submétacentrique	submétacentrique	submétacentrique	submétacentrique
Chromosome 3	acrocentrique	acrocentrique	acrocentrique	acrocentrique	acrocentrique
Chromosome 4	télocentrique	télocentrique	télocentrique	télocentrique	télocentrique
Chromosome 5	télocentrique	acrocentrique	acrocentrique	acrocentrique	acrocentrique
Chromosome 6	métacentrique	acrocentrique	acrocentrique	acrocentrique	acrocentrique
Chromosome 7	métacentrique	métacentrique	métacentrique	télocentrique	télocentrique
Chromosome 8	acrocentrique	acrocentrique	métacentrique	acrocentrique	submétacentrique
Chromosome Z	métacentrique	submétacentrique	métacentrique	submétacentrique	métacentrique



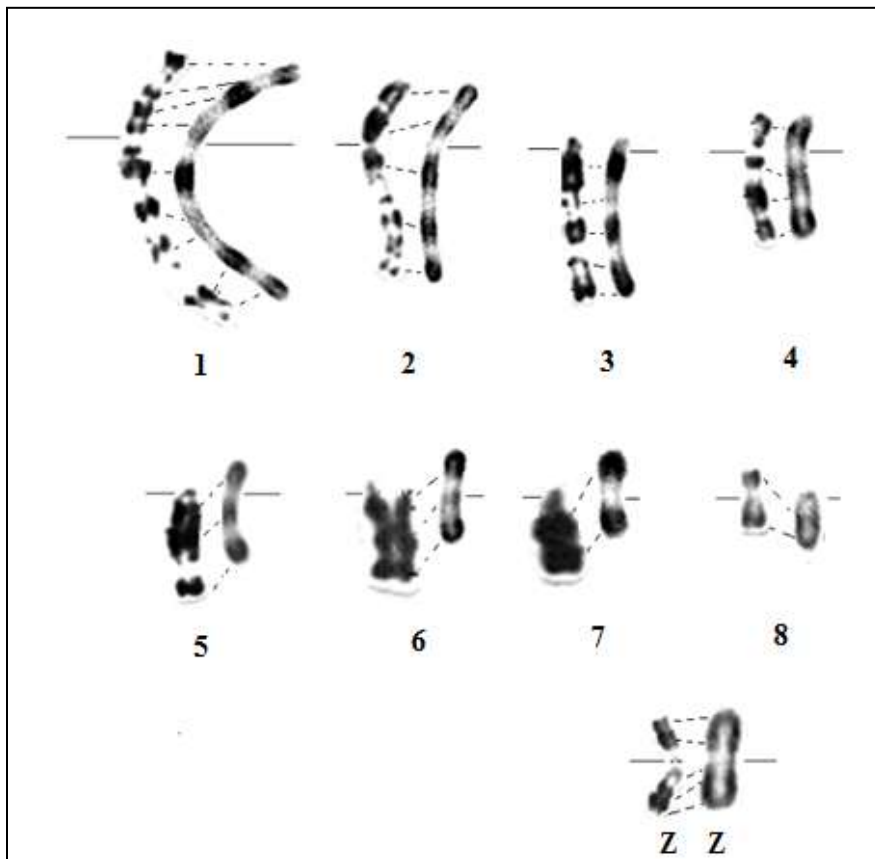
**Figure 31.** (A) Chromosomes 1 à 8 et chromosomes sexuels Z et W de la poule domestique en bandes GTG (Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999). (B) chromosomes 1 à 8 et chromosomes sexuels ZZ de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur*, issus d'un embryon mâle en bandes GTG.



**Figure 32.** Comparaison de la morphologie des huit premières paires chromosomiques et des chromosomes sexuels en bandes GTG entre la poule domestique *Gallus domesticus* à gauche (Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999) et la tourterelle des bois *Streptopelia turtur* à droite.



**Figure 33.** (A) Le caryotype de la poule domestique en bandes RBG (Ladjali-Mohammedi et *al.*, 1999). (B) Le caryotype de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur*, issu d'un embryon mâle en bandes RBG.



**Figure 34.** Comparaison des huit premières paires chromosomiques et des chromosomes sexuels en bandes RBG entre la poule domestique *Gallus domesticus* (Ladjali-Mohammedi et *al.*, 1999) et la tourterelle des bois, *Streptopelia turtur*.

être similaires entre eux et les chromosomes 6 et 7 semblent aussi être similaires entre eux. Ces dernières mêmes observations ont été également notés chez l'espèce *Streptopelia roseogrisea* (Guttenbach *et al.*, 2003). De nombreux Colombiformes se caractérisent par la présence de macrochromosomes métacentriques (chromosomes 4, 5, 6 et 7) comme ceux décrits chez *Uropelia campestris* (De Lucca, 1984). Alors que le poulet possède des macrochromosomes morphologiquement différents (Smith et Burt, 1998; Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000).

Les paires chromosomiques 1 et 2 de la tourterelle des bois sont submétacentriques. Ces résultats concordent avec ceux obtenus pour la plupart des oiseaux (Denjean *et al.*, 1997). La comparaison du chromosome 1 de l'espèce *Gallus domesticus* et celui des espèces *Streptopelia risoria* et *Columba livia* en bandes structurales GTG a révélé la présence de réarrangements chromosomiques par l'inversion de certaines bandes sur les deux bras chromosomiques (Stock et Mengden, 1975) (Figure 35). Une étude réalisée sur 14 espèces appartenant à l'ordre des Colombiformes a révélé la présence d'une large bande G positive qui est conservée dans la région distale du bras long du chromosome 1 (De Lucca, 1984). Le marquage en bandes G du chromosome 1 de *Streptopelia turtur* a révélé aussi la présence de cette large bande caractéristique de la famille des Colombiformes (Figure 36).

Chez la tourterelle des bois le chromosome 3 est acrocentrique. La morphologie de ce chromosome est conservée chez plusieurs espèces de l'ordre des Galliformes (poule domestique, perdrix gabra et caille des blés) et chez les autres espèces appartenant à l'ordre des Gruiformes telle que l'outarde houbara (Ladjali, 1994; Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999; Mahiddine, 2009; Ouchia, 2009; Kartout, 2010). Itoh *et al.* (1969), ont décrit un chromosome 3 télacentrique chez les tourterelles comme *Streptopelia risoria* et *Streptopelia risoria var. alba* ainsi que chez les pigeons. Alors que, sur les figures proposées dans l'article, le chromosome 3 apparaît comme acrocentrique (Figure 11 et 12). Le chromosome 3 est métacentrique à submétacentrique chez *Streptopelia roseogrisea* et *Claravis pretiosa* (Guttenbach *et al.*, 2003; De Lucca, 1984). Le chromosome 3 appartenant à l'espèce *Streptopelia roseogrisea*, est décrit comme métacentrique alors qu'il apparaît acrocentrique sur les figure de l'article (Guttenbach *et al.*, 2003) (Figure 13). Chez les Colombiformes, une inversion péricentrique aurait survenue durant l'évolution, formant un chromosome télacentrique ou subtélacentrique à partir d'un chromosome ancestral (Stoch et Mengden, 1975) (Figure 37). Des mécanismes de fissions et de fusions ont été également décrits pour le chromosome 3 chez *Columbina picui* (Shield, 1982).

La comparaison des motifs en bandes GTG et RBG des 3 premières paires chromosomiques chez la tourterelle des bois, la poule domestique, la perdrix gabra et l'outarde houbara montre une bonne conservation chromosomique entre ces espèces (Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999; Mahiddine, 2009; Ouchia, 2009) (Figure 32 et 34). Ces résultats sont en accord avec ceux de Takagi et Sasaki, (1974), qui ont montré la conservation des trois premiers chromosomes chez 9 ordres différents d'oiseaux.

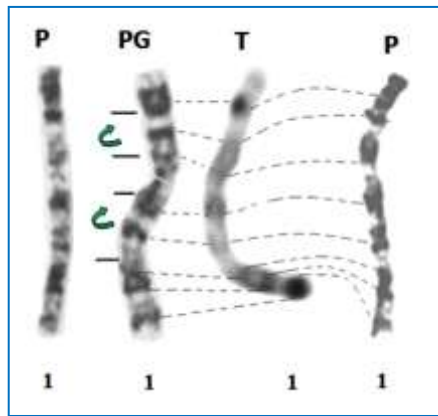
Le chromosome 4 de la tourterelle des bois est télacentrique et de taille semblable à celle du chromosome 5. Chez les pigeons et les tourterelles, le chromosome 4 est submétacentrique notamment chez l'espèce *Streptopelia roseogrisea* (Guttenbach *et al.*, 2003; Itoh *et al.*, 1969).

L'hybridation de clones de BAC du chromosome 4 du poulet sur les métaphases de la caille des blés *Coturnix coturnix*, révèle l'existence d'une inversion sur le chromosome 4 de *Coturnix coturnix*, alors que chez la dinde *Meleagris gallopavo*, les clones BAC se sont hybridés sur le chromosome 4 et sur un microchromosome (Schmid *et al.*, 2005). L'application de la technique de peinture chromosomique avec des sondes du chromosome 4

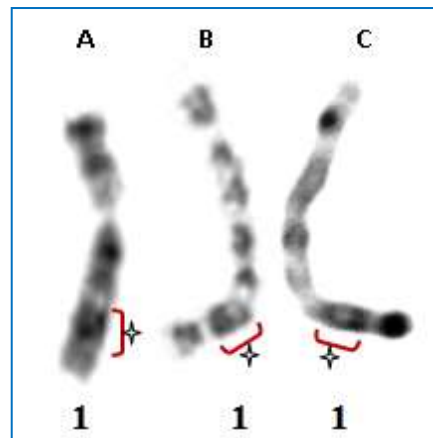
entier du poulet sur des métaphases du pigeon domestique a montré une hybridation sur les chromosomes 4 et 10 du pigeon (Derjusheva *et al.*, 2004) (Figure 38). Une étude similaire a également montré une hybridation partielle des sondes des chromosomes 4, 5, 6, 7, 8 et 9 entiers du poulet sur les chromosomes homologues de la tourterelle rieuse *Streptopelia roseogrisea*. Ces derniers résultats confirment l'existence de réarrangements chromosomiques de types fusions, ayant formé des chromosomes métacentriques à submétacentriques (Guttenbach *et al.*, 2003) (Figure 39C). Cependant, la morphologie submétacentrique du chromosome 4 des Colombiformes serait le résultat d'une inversion péricentrique qui aurait pu se produire au niveau du chromosome 4 submétacentrique de la tourterelle rieuse durant l'évolution.

Le chromosome 5 de la tourterelle des bois est télocentrique, contrairement à la morphologie méta- à submétacentrique décrite chez les pigeons et les autres tourterelles (Itoh *et al.*, 1969; Guttenbach *et al.*, 2003). Ce chromosome est acrocentrique chez le poulet, l'outarde houbara, la caille des blés et la perdrix gabra (Ladjali, 1994; Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999; Mahiddine, 2009; Ouchia, 2009; Kartout, 2010). Le chromosome 5 de la tourterelle des bois résulte probablement de la fusion d'un macrochromosome et d'un microchromosome tous les deux acrocentriques (Figure 39C). Ce chromosome est bien conservé chez la poule domestique *Gallus domesticus*, le pigeon domestique *Columba livia* et la caille des blés *Coturnix coturnix*. Des hybridations des clones de BAC spécifiques au chromosome 5 du poulet ont confirmé ces observations (Schmid *et al.*, 2005). Chez les deux genres *Columba* et *Streptopelia*, le chromosome 5 a probablement aussi subi des réarrangements de types inversions péricentriques à partir d'un chromosome ancestral acrocentrique conduisant à la formation de chromosomes télocentriques et submétacentriques. Cependant, chez la famille des Colombiformes, des études ont montré que certaines paires chromosomiques étaient plus exposées aux réarrangements chromosomiques par rapport à d'autres et que les paires les plus stables étaient les paires chromosomiques 3, 4 et 5 (De Lucca, 1984).

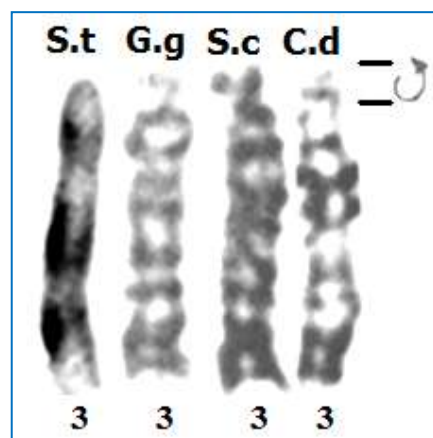
L'espèce *Streptopelia turtur* possède des chromosomes 6 et 7 qui sont métacentriques. Alors que le chromosome 6 est acrocentrique chez le poulet, la caille des blés, la perdrix gabra et l'outarde houbara (Ladjali, 1994; Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999; Mahiddine, 2009; Ouchia, 2009; Kartout, 2010). Le chromosome 7 de la tourterelle des bois est semblable à celui de l'outarde houbara et de la perdrix gabra mais différent de celui du poulet et de la caille des blés décrits comme télocentriques (Ladjali, 1994; Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999). Le chromosome 6 est télocentrique chez *Columba livia domestica*, submétacentrique chez *Geopelia cuneata*, et métacentrique chez *Streptopelia risoria var. alba*, alors qu'il apparaît chez cette dernière comme acrocentrique sur le caryotype proposé dans l'article de Itoh *et al.*, (1969). Des réarrangements chromosomiques sont probablement à l'origine de ces variations chromosomiques. Ainsi l'utilisation des techniques de peinture chromosomique avec des sondes spécifiques au chromosome 6 du poulet a montré une hybridation partielle sur le bras long du chromosome 6 de la tourterelle rieuse (Guttenbach *et al.*, 2003). Ce résultat est en faveur d'un remaniement chromosomique de type translocation robertsonienne qui se serait produit chez cette espèce à partir d'un chromosome acrocentrique ancestral et d'un microchromosome (Figure 39A). Alors que le chromosome 6 est bien conservé entre le poulet, la caille des blés, le canard et le pigeon domestique (Schmid *et al.*, 2005; Guttenbach *et al.*, 2003; Derjusheva *et al.*, 2004). Certaines études réalisées sur l'évolution des caryotypes des oiseaux, ont montré que des mécanismes de translocations robertsoniennes et de fusions en tandem entre les microchromosomes pourraient être à l'origine de la formation des macrochromosomes de taille moyenne (Tegelstrom et Rytman, 1981; Rodionov, 1996). Les séquences télomériques présentes dans les régions interstitielles



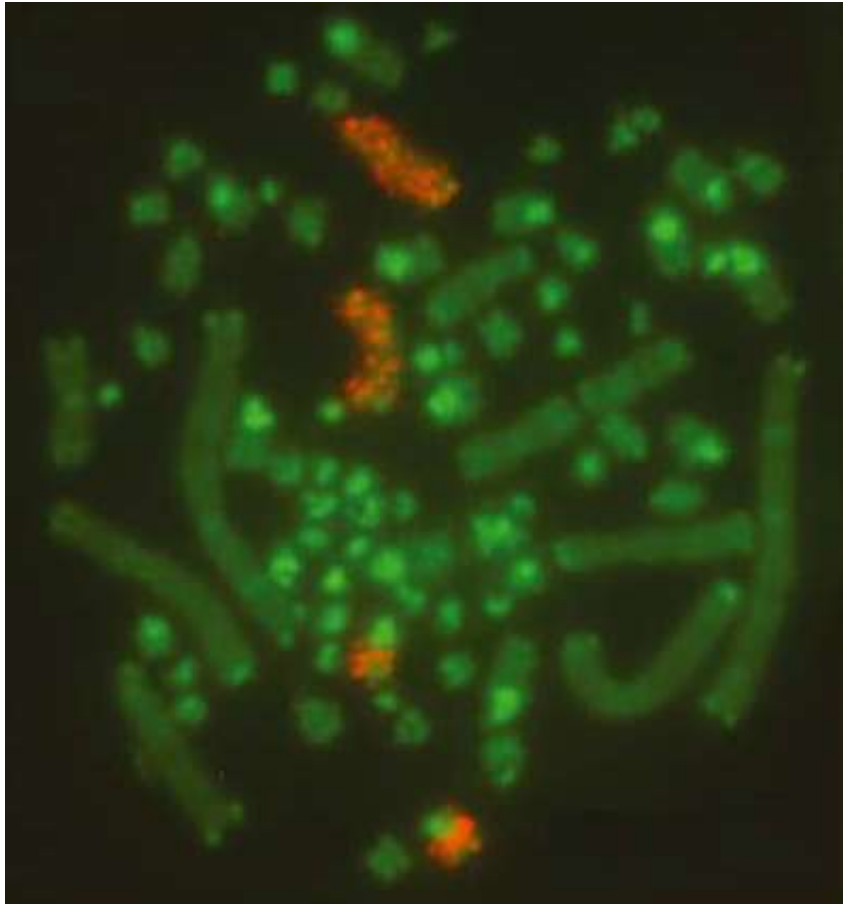
**Figure 35.** Comparaison des motifs en bandes G des chromosomes 1 chez le poulet (**P**), le pigeon (**PG**) et la tourterelle des bois (**T**). Le Chromosome 1 du pigeon, montre des inversions de bandes sur les deux bras chromosomiques (Stock et Mengden, 1975; Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999)



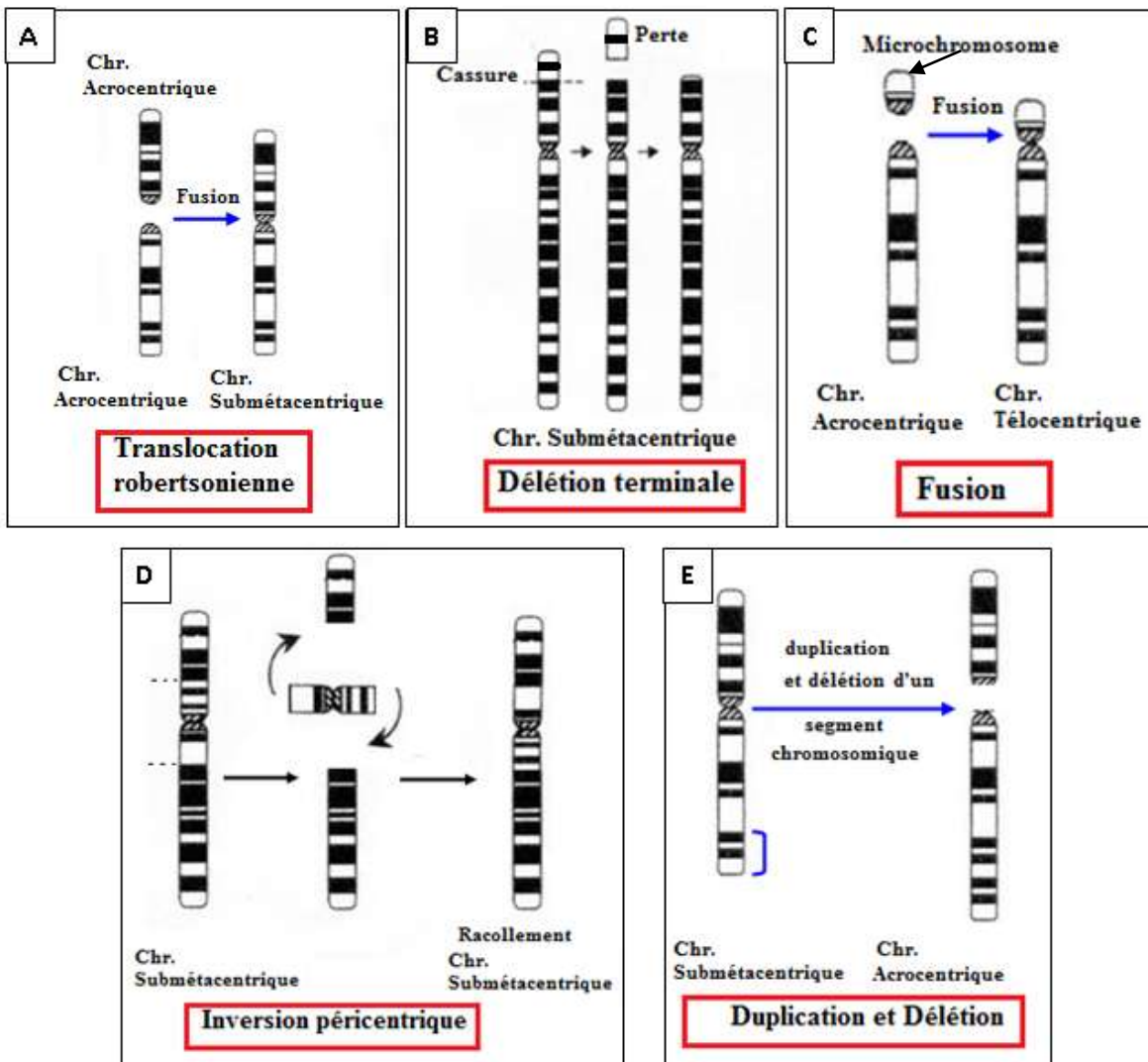
**Figure 36.** Comparaison du chromosome 1 en bandes G chez trois espèces appartenant à l'ordre des Columbiformes (**A**: *Columbina talpacoti*; **B**: *Leptotila rufaxilla*; **C**: *Streptopelia turtur*). Il existe une large bande G distale positive sur le bras long du chromosome 1 chez les trois espèces et chez l'ensemble des Columbiformes (De Lucca, 1984).



**Figure 37.** Comparaison du chromosome 3 en bandes GTG, chez les espèces: *Streptopelia turtur* (**S.t**), *Gallus gallus* (**G.g**), *Streptopelia capicola* (**S.c**) et *Columba domestica* (**C.d**). Le chromosome 3 aurait subi une inversion péricentrique chez les Columbiformes (Stoch et Mengden, 1975).



**Figure 38.** Hybridation *In Situ* en Fluorescence (FISH) du clone du chromosome 4 du poulet (GGA4) sur une métaphase du pigeon domestique *Columba livia* (Derjusheva *et al.*, 2004). Cette technique a montré une hybridation de la sonde du chromosome 4 du poulet sur les chromosomes 4 et 10 du pigeon domestique.



**Figure 39.** Réarrangements chromosomiques possibles à l'origine de la formation de chromosomes submétacentriques (A, B et D), télacentriques (C) et acrocentriques (E).

et péricentromériques seraient alors des signaux résiduels de cette organisation. Elles seraient aussi à l'origine de l'augmentation du nombre des macrochromosomes métacentriques et submétacentriques est observée chez les espèces possédant peu de microchromosomes (Rodionov, 1996). Une hybridation partielle de sondes spécifiques au chromosome 7 du poulet a été observée sur le bras long du chromosome 7 de la tourterelle rieuse. D'autres études ont montré une bonne conservation du chromosome 7 entre le poulet et le pigeon domestique et ont révélé des réarrangements intrachromosomiques des marqueurs génétiques de la caille des blés et du canard pour ce même chromosome (Schmid 2005; Guttenbach *et al.*, 2003; Derjusheva *et al.*, 2004). Chez les Colombiformes, le chromosome 7 aurait subi des remaniements chromosomiques de type inversion péricentrique pour former le chromosome métacentrique (Figure 39D). Certains auteurs décrivent des tailles presque semblables pour les paires chromosomiques 4, 5, 6 et 7 notamment chez *Streptopelia roseogrisea* (Guttenbach *et al.*, 2003). Le chromosome 8 de l'espèce *Streptopelia turtur* est acrocentrique et différent du chromosome 8 du poulet qui est submétacentrique. Alors que ce chromosome est métacentrique chez la perdrix gabra (Ladjali, 1994; Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999; Ouchia, 2009). Chez l'outarde houbara et la caille des blés le chromosome 8 est acrocentrique (Mahiddine, 2009; Kartout, 2010). Une duplication d'un segment chromosomique terminal suivi d'une délétion chromosomique du bras court à partir d'un chromosome ancestral aurait pu survenir durant l'évolution (Figure 39B et E). L'ordre des galliformes renfermant le poulet, a divergé il y a 101 Milliards d'années à partir des Galloanserae (Galliformes et Ansériformes). Ces derniers ont divergé des Neoaves il y a 122,2 Millions d'années. Les Neoaves comprennent la plupart des oiseaux tels que les Colombiformes. Chez ces derniers les genres *Columba* et *Streptopelia* ont divergé il y a moins de 30 Millions d'années (Pereira, 2007).

Le chromosome 9 de la tourterelle des bois est acrocentrique comme celui de la poule domestique et de la perdrix gabra (Ladjali, 1994; Ladjali-Mohammedi *et al.*, 1999; Ouchia, 2009). Il a été également décrit comme acrocentrique chez la dinde (Stock et Bunch, 1982). Les chromosomes 10, 11 et 12 de la tourterelle des bois sont acrocentriques comme ceux de la poule domestique, la caille des blés et la perdrix gabra (Ladjali *et al.*, 1995c; Ouchia, 2009; Kartout, 2010). Les motifs des bandes dynamiques RBG et morphologiques GTG établis chez cette espèce pour les chromosomes 10, 11 et 12 sont de faible résolution et n'ont pas permis d'établir une cartographie comparée avec les chromosomes correspondants de la poule domestique (Ladjali *et al.*, 1995c).

Le chromosome sexuel Z de l'espèce *Streptopelia turtur* est métacentrique comme chez la majorité des Colombiformes, à l'exception de *Columbina picui* où il est télocentrique (De Lucca, 1984). La taille du chromosome Z de la tourterelle des bois se situe entre celle des chromosomes 4 et 5 comme il a été décrit pour l'ensemble des Colombiformes. La taille du chromosome Z peut parfois correspondre à celle de la 5<sup>ème</sup> paire chez *Scardafella squammata* et à la 3<sup>ème</sup> chez *Streptopelia risoria var. alba* et *Geopelia cuneata* (De Lucca, 1984; Feshheimer, 1990). La taille du chromosome Z reste homogène et bien conservée entre les différentes espèces par rapport à celle du chromosome W (Ohno *et al.*, 1964; Feshheimer, 1990; Stock et Bunch, 1982 ; Bloom, 1974). Cependant, chez l'espèce *Streptopelia risoria var. alba*, la taille du chromosome Z a été décrite comme correspondant à celle du chromosome 3 alors que le chromosome Z proposé dans la figure de l'article de Itoh *et al.*, (1969), semble plus petit (Figure 11). La comparaison des motifs des bandes morphologiques G du chromosome sexuel Z, chez trois espèces (*Streptopelia roseogrisea*, *Gallus gallus* et *Columba livia*) a révélé la présence de similitudes (Stock et Mengden, 1975). Chez la perdrix gabra le chromosome Z est aussi métacentrique comme chez la perdrix rouge (Arruga *et al.*,

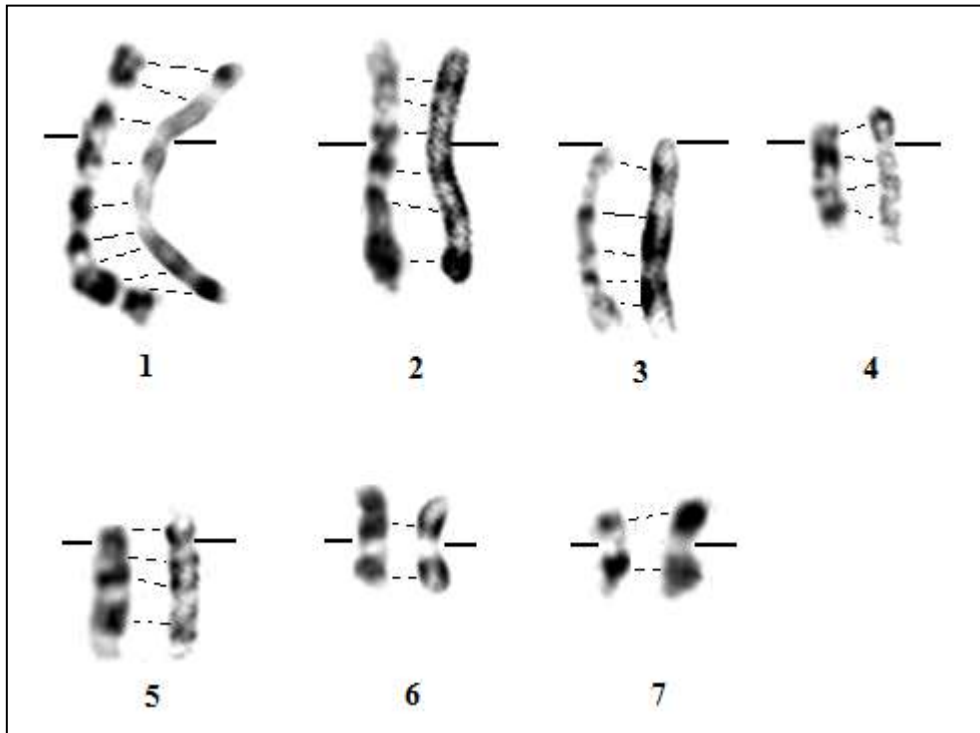
1996; Ouchia, 2009). Les chromosomes Z de l'outarde houbara et de la caille des blés sont submétacentriques (Mahiddine, 2009; Kartout, 2010).

Nous n'avons pas pu décrire le chromosome sexuel W parce que nous avons analysé des embryons de sexe mâle. Le chromosome W est décrit comme étant le plus petit des macrochromosomes. Il est de morphologie métacentrique chez *Columba livia domestica* et télocentrique chez *Geopelia cuneata* et *Streptopelia risoria var. alba* (Itoh *et al.*, 1969).

La définition des motifs des bandes GTG et RBG obtenus pour les macrochromosomes a été de bonne qualité et nous a permis d'établir, pour la première fois, le caryotype à haute résolution de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur*. Néanmoins, la caractérisation des chromosomes peut être améliorée par la réalisation de marquages chromosomiques en bandes séquentielles, qui permet d'obtenir les deux types de bandes (G et R) sur un même chromosome.

La cartographie chromosomique comparée, réalisée entre l'espèce *Streptopelia turtur* et l'espèce *Leptotila rufaxilla* a mis en évidence des similitudes pour les sept premières paires chromosomiques (De Lucca, 1984) (Figure 40). Des erreurs ont été relevées sur des caryotypes déjà établis (Itoh *et al.*, 1969; De Lucca, 1984) (Figure 11, 12, 13 et 41).

La présence d'un nombre important de microchromosomes limite la description des caryotypes des oiseaux aux macrochromosomes. Toutefois, lorsque les chromosomes sont très allongés, on peut étendre la comparaison aux quinze premières paires chromosomiques (Ladjali, 1994; Ladjali *et al.*, 1995c). Dans notre étude les neuf premières paires chromosomiques ont été décrites grâce au succès de la technique de double synchronisation qui a été appliquée pour la première fois sur les cellules de la tourterelle des bois.



**Figure 40.** Comparaison des chromosomes en bandes structurales GTG chez *Streptopelia turtur* (à droite) et une autre espèce appartenant à l'ordre des Colombiformes *Leptotila rufaxilla* (à gauche) (De Lucca, 1984). Une erreur dans la présentation du chromosome 3 a été relevée sur l'article proposé par De Lucca, (1984). Nous avons inversé ce chromosome pour établir une correspondance.

# **Conclusions et Perspectives**

## Conclusions et Perspectives

La culture de fibroblaste à partir d'embryons et de poussins de la tourterelle des bois, a été mise au point dans notre Laboratoire de Génétique du Développement, en adaptant les protocoles déjà établis chez le poulet (Ladjali, 1994).

La technique de double synchronisation à la thymidine a été appliquée pour la première fois sur les cellules de la tourterelle des bois. La durée du demi-cycle cellulaire a été estimée à environ 4h30', contrairement au poulet pour lequel le demi cycle est de 7 heures (Ladjali, 1994; Ladjali *et al.*, 1995c).

Nous avons obtenu des chromosomes allongés, dits à «haute résolution», chez l'espèce *Streptopelia turtur*. L'importante décompactions des chromosomes nous a permis d'obtenir des motifs en bandes GTG et RBG de bonne résolution.

Nous avons estimé, pour la première fois, chez la tourterelle des bois, le nombre diploïde à 78 chromosomes. Nous avons également décrit les neuf premières paires chromosomiques et le chromosome sexuel Z en bandes morphologiques GTG et dynamiques RBG. Nous avons, par la suite, procédé à une comparaison des huit premières paires chromosomiques et du gonosome Z avec les chromosomes du poulet. Nous avons aussi comparé les chromosomes de *Streptopelia turtur* avec ceux de *Streptopelia risoria*, *Streptopelia risoria var. alba*, *Streptopelia roseogrisea*, *Columba livia* et *Leptotila rufaxilla*. Nous avons pu mettre en évidence des similitudes entre les quatre premières paires chromosomiques et le chromosome sexuel Z du poulet et de la tourterelle des bois.

Cette première étude est d'un apport fondamental et constitue une première étape de la description du génome de cette espèce en déclin.

Nous allons établir un caryotype définitif chez cette espèce et le soumettre à la Communauté Scientifique Internationale. Nous envisageons également d'appliquer les techniques de marquage en bandes C afin d'identifier avec précision les centromères des chromosomes de la tourterelle des bois.

L'identification individuelle des microchromosomes est envisagée avec des marqueurs moléculaires spécifiques (Fillon *et al.*, 1998). L'application de la technique de la peinture chromosomique avec l'hybridation de clones de chromosomes spécifiques au poulet sur des métaphases de la tourterelle des bois, permettra de révéler d'éventuels réarrangements chromosomiques qui se sont produits lors de l'évolution de cette espèce. La détection des régions conservées entre le poulet et la tourterelle des bois sera alors possible.

La localisation, chez la tourterelle des bois, de gènes impliqués dans le développement embryonnaire précoce tels que les gènes Hox déjà localisés chez le poulet (Ladjali-Mohammedi *et al.*, 2001) permettra de comprendre les mécanismes d'apparition d'anomalies responsables de mortalité.

**Références**  
**Bibliographiques**

1. **Alerstam T. 1992.** Bird Migration. Cambridge University Press. 420 p.
2. **Alonso P.D., Milner A.C., Ketcham R.A., Cookson M.J. et Rowe T.B. 2004.** *The avian nature of the brain and inner ear of Archaeopteryx.* *Nature.* 430: 666 – 669.
3. **Ansari H. A. et Kaul D. 1979a.** Inversion polymorphism in common Green Pigeon, *Treron phoenicoptera* (Latham) (Aves). *Jpn. J. Genet.* 54 : 197-202.
4. **Arruga M.V., Tehejedor M.T., Villaroel M.R., Heriz A., Ferreira E. et Abenia F.J. 1996.** Genetic studies of *Alectoris rufa* and *A. Graeca* in Spain. *Arch. Zootec.* 45: 339-344.
5. **Auer H., Mayr B., Lambrou M. et Schleger W. 1987.** An extended chicken karyotype, including the NOR chromosome. *Cytogenet. Cell. Genet.* 45: 218–221.
6. **Babu A. et Verma R.S. 1987.** Chromosome structure: euchromatin and heterochromatin. *Intern. Rev. Cytol.* 108: 1-60.
7. **Baillie S.R., Crick H.Q P., Balmer D.E., Bashford R.I., Beaven L.P., Freeman S.N., Marchant J.H., Noble D.G., Raven M.J., Wernham C.V. et Thewlis R. 2001.** Breeding birds in the wider countryside: their conservation status 2000. BTO Research Report 252, British Trust for ornithology, Thetford.
8. **Barch M.J. 1991.** The act cytogenetics laboratory manual. Barch (ed), Raven Press, New York. 625p.
9. **Barrett R. K. et Underwood H. 1991.** Retinally perceived light can entrain the pineal melatonin rhythm in Japanese quail. *Brain. Res.* 563: 87-93.
10. **Beaumont C, Protais J, Pitel F, Leveque G, Malo D, Lantier F, et al. 2003.** Effect of two candidate genes on the *Salmonella* carrier state in fowl. *Poult Sci* 82:721–726.
11. **Bed'Hom B. 1999.** Etude des caryotypes atypiques des Accipitridae (Aves, Falconiformes) par cytogénétique classique et moléculaire, et modélisation de leur évolution. Thèse de doctorat d'état Université de Tours. 185p.
12. **Bell S. et Wolf S. 1966.** Effects of FUdR and thymidine on incorporation of deoxycytidine into DNA of *Vicia fabla*. *Exp. Cell. Res.* 42: 408.
13. **Belterman R.H.R. et De Boer L.E.M. 1984.** A karyological study of 55 species of birds, including Karyotypes of 39 species new to cytology. *Genetica.* 65: 39-82.
14. **Berkaloff A., Bourguet J., Favard P. et Lacey J.-C. 1981.** Biologie et physiologie cellulaire. Collection Méthodes, Herman, Paris. Vol. IV. 187p.
15. **BirdLife International. 2004b.** Birds in European Union: a status assessment. BirdLife International, Wageningen, NL. 50 p.
16. **Bitgood J.J. et Shoffner R.N. 1990.** Cytology and cytogenetics. Poultry Breeding and genetics. 1123.
17. **Bloom S.E. 1974.** Current knowledge about the avian W chromosome. *Bioscience.* 24: 340-344.
18. **Bloom S.E. et Bacon L.D. 1985.** Linkage of the major histocompatibility (B) and complex and the nucleolar organizer in the chicken. *J. Hered.* 76: 146-154.
19. **Bloom S.E., Delany M.E. et Muscarella D.E. 1993.** Constant and variable features of avian chromosomes. In *Manipulation of Avian Genome.* 35-59.

20. **Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R. et al. 1980.** Construction of a genetic linkage map in map using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
21. **Boué J., Nicolas H., Barichard F. et Boué A. 1979.** Le clonage des cellules du liquide amniotique aide dans l'interprétation des mosaïques chromosomiques en diagnostic prénatal. *Ann. Génét.* 22- 3.
22. **Boukhemza-Zemmouri N., Belhamra M., Boukhemza M., Doumandji S. et Voisin J.-F. 2008.** Biologie de reproduction de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur arenicola* dans le Nord de l'Algérie. *Alauda*, LXXVI : 207-222.
23. **Boumezbeur A. 2005.** Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar; Sebket El Melah (Wilaya de Ghardaïa). Ministère de l'agriculture et du développement rural, direction générale des forêts. 11p.
24. **Boyom A. 1968.** Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 21 (suppl. 97): 31.
25. **Browne S.J. 2002.** The breeding ecology of a declining farmland bird: the turtle dove *streptopelia turtur*. Thèse de doctorat Université Montfort. 239p.
26. **Browne S.J. et Aebischer N.J. 2000.** The capture and ringing of Turtle Doves. *Ringers' Bulletin.* 10: 48.
27. **Burt D.W. 2002.** Origin and evolution of avian microchromosomes. *Cytogenetic. Genome. Res.* 96: 97-112.
28. **Carlenius C., Rytzman H., Tegelstrom H. et Jansson H. 1981.** R-, G- and C-banded chromosomes in the domestic Fowl (*Gallus domesticus*). *Hereditas.* 94: 61-66.
29. **Carnero A., Blanco C., Blanco F., Castro M.E., María V.G., Fominaya J., Link W., Martínez J.F., Moneo V., Renner O., Romero L. et Rosado A. 2003.** Exploring cellular senescence as a tumor suppressor mechanism. *Rev. Oncol.* 5 (5):249-65.
30. **Caspersson T., Farber S., Foley G.E., Kudinowski J., Modest E.J., Simonsson E., Wagh U. et Zech L. 1968.** Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* 49: 219–222.
31. **Cassone V.M. et Menaker M. 1983.** Sympathetic regulation of chicken pineal rhythms. *Brain Res.* 272: 311-317.
32. **Cheke A.S. 2005.** Naming segregates from the *Columba-Streptopelia* pigeons following DNA studies on Phylogeny. *Bull. B.O.C.* 125 (4): 293-295.
33. **Cherkaoui I., Boutaleb A., Faqih Y. et Saddik M. 2006.** Quelques observations d'oiseaux rares ou peu communs en hiver 2005-2006 à l'embouchure de la Moulouya et dans la plaine de Triffa (nord-est du Maroc). *Go-South Bull.* 3:43-47.
34. **Chicago Conference. 1966.** Standardization in human cytogenetics. Birth Defects: Original Article Series, II: 2.
35. **Chromosome Atlas. 1971.** Fish, amphibians, reptiles and birds. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York: Vol. 1.
36. **Collins F.S., Guyer M.S., Chakravarti A. 1997.** Variations on a Theme: Cataloging Human DNA Sequence Variation. *Science.* 278:1580–1581.

37. **Comings D.E. 1978.** Mechanisms of chromosome banding and implication for chromosome structure. *Ann. Rev. Genet.* 12: 25-46.
38. **Couturier J., Dutrillaux B. et Lejeune J. 1973.** Etude des fluorescences spécifiques des bandes R et des bandes Q des chromosomes humains. *C.R. Acad. Sci (Paris)*. 276: 339-342.
39. **Cramp S. 1985.** The birds of the Western Palearctic. University Press, Oxford: 353-363.
40. **De la Seña C.A., Fechheimer N.S. et Nestor K.E. 1991.** Variability of C-banding patterns in Japanese quail chromosomes. *Genome*. 34: 993-997.
41. **De Lucca E. J. 1984.** Chromosomal evolution of South American Columbiformes (Aves). *Genetica*. 62: 177-185.
42. **De Lucca E. J. et De Aguiar M. L. R. 1978.** A karyosystematic study in Columbiformes (Aves). *Caryologia*. 43:249-253.
43. **De Lucca E.J. et De Aguiar M.L.R. 1976.** Chromosomal evolution in Columbiformes (Aves). *Caryologia*. 29: 59-68.
44. **De Vita R., Cavallo D. et Dell’Omo G. 1995.** La citometria a flusso del DNA come metodo per l’identificazione del sesso in specie sessualmente monomorfe: il capovaccaio (*Neophron percnopterus* ). *Suppl. Ric. Biol. Selvaggina*. 22: 135-138.
45. **De Vita R., Cavallo D., Eleuteri P. et Dell’Omo G. 1994.** Evaluation of interspecific DNA content variations and sex identification in Falconiformes and Strigiformes by flow cytometric analysis. *Cytometry*. 16: 346-350.
46. **Del Hoyo J., Elliott A. et Sargatal. 1997.** Handbook of the birds of the world. Sandgrouse to Cuckoos, Lynx edicions, Barcelona. Vol 4.
47. **Denjean B., Ducos A., Darré A., Pinton A., Séguéla A., Berland H., et al. 1997.** Caryotypes des canards communs (*Anas platyrhynchos*), Barbarie (*Cairina moschata*) et de leur hybride. *Revue Méd. Vét.* 148:695–704.
48. **Derjusheva S., Kurganova A., Habermann F. et Gaginskaya E. 2004.** High chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds. *Chromosomes Research*. 12: 715-723.
49. **Dhainaut J.F., Marin N., Thebert D. et Marullo S. 1998.** Fibroblaste et phénomènes de régénération et de réparation alvéolaire. *Réan. Urg.* 7: 333-346.
50. **Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I. et Pereira-Smith O. 1995.** A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci (U S A)*. 92:9363–9367.
51. **Douarin R., Messier P.E. et Richer C.L. 1989.** DNA denaturation for ultrastructural banding and the mechanism underlying the fluorochrome photolysis Giemsa technique studied with anti-5-bromodeoxyuridine antibodies. *Chromosoma*. 98:174-180.
52. **Drouin R., Holmquist P. et Richer C.L. 1994.** High-resolution replication bands compared with morphologic G- and R-bands. *In Advances in human genetics*. 22: 47-115.

53. **Dubois M.C. 2002.** Contribution a l'étude de la tourterelle des bois (*Streptopelia turtur*): biologie, zoologie, chasse. Thèse de doctorat. Université Paul-Sabatier de Toulouse. 133p.
54. **Dutrillaux B. 1975.** Sur la nature et l'origine des chromosomes humains. Monographie des Annales de Génétique (*Expansion Scientifique Française, Paris, France*).
55. **Dutrillaux B. et Couturier J. 1981.** La pratique de l'analyse chromosomique, 84p.
56. **El Mastour A. 1988.** La tourterelle des bois, biologie, écologie et législation de sa chasse au Maroc. *Bull. Men. Off. Nat. Chasse.* 127 : 43-47.
57. **Epplen J.T., Diedrich U., Wagenmann M., Schmidtke J. et Engel W. 1979.** Contrasting DNA sequence organization patterns in sauropsidian genomes. *Chromosoma.* 75: 199-214.
58. **Fechheimer N.S. et Jaffe W.P. 1966a.** Fertility and embryo death in double-yolked eggs. *J. Report. Fert.* 12: 363-364.
59. **Fechheimer N.S., Zartman D.L. et Jaap R.G. 1968a.** Estimates of the primary and subsequent embryonic sex ratios in the chicken. *Proc. VIth Cong. Intern. Reprod. Anni. Insemin. Artif. (Paris).* 417- 419.
60. **Fechheimer N.S., Zartman D.L. et Jaap R.G. 1968b.** Estimates of the primary and subsequent embryonic sex ratios in the chicken. *Proc. VI th Cong. Intern. Reprod. Anni. Insem. Artif. (Paris),* 417-419.
61. **Feshheimer N.S. 1990.** Chromosomes of chickens, In Domestic animal cytogenetics. 1st ed (McFeely RA, ed). San Diego, California: Academic Press, 169-207.
62. **Fillon V. 1997.** Apport de la cartographie cytogénétique de *Gallus gallus domesticus* à la connaissance des microchromosomes d'oiseaux. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II.
63. **Fillon V., Morisson M., Zoorob R., Auffray C., Douaire M. et al. 1998.** Identification of 16 chicken microchromosomes by molecular markers using two-colour fluorescence in situ hybridization (FISH). *Chromosome Res.* 6: 307–313.
64. **Fillon V., Vignoles M., Garrigues A., Pitel F., Mireille M., Crooijmans R., Groenen M., Gellin J. et Vignal A. 2003.** La carte cytogénétique du poulet : un moyen pour identifier les microchromosomes et pour comparer les genomes aviaires. 5<sup>ème</sup> Journée de la Recherche Avicole, Tours.4p.
65. **Fritschi S. et Stranzinger G. 1985.** Fluorescent chromosome banding in inbred chicken: Quinacrine bands, sequential chromomycin an DAPI bands. *Theor. App. Genet.* 71: 408-412.
66. **Galton M. et Bredbury P.R. 1966.** DNA replication patterns of the sex chromosomes of the pigeon (*Columba livia domestica*). *Cytogenetics.* 5: 295-306.
67. **Geroudet. 1983.** Limicoles, Gangas et Pigeons d'Europe. Delachaux et Niestlé, Neuchâtel, Paris. Vol. 2. 264p.
68. **Glutz Von Blotzheim U.M. 1980.** Handbuch der vögel mitteleuropas. Akademische verlagsgesellschaft, Wiesbaden.
69. **Goodpasture C. et Bloom S.E. 1975.** Visualization of molecular organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma (berl.).* 53: 37-50.

70. **Goodwin D. 1967.** Pigeons and doves of world. British Museum (Naturel History).
71. **Goodwin D. 1983.** Pigeons and Doves of the world. Cornell University Press, New York.
72. **Griffin D.K., Haberman F., Masabanda J., O'Brien P., Bagga M. et al. 1999.** Micro- and macrochromosome paints generated by flow cytometry and microdissection: tools for mapping the chicken genome. *Cytogenet. Cell. Genet.* 87: 278–281.
73. **Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C. et Gelbart M. 2006.** Introduction a l'analyse génétique. Editions De Boeck Université. 4<sup>e</sup> édition. 782p.
74. **Groenen M.A.M., Cheng H.H., Bumstead N., Benkel B.F., Briles W.E., Burke T. et al. 2000.** A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Res.* 10:137–147.
75. **Gustavsson I. 1980.** Banding techniques in chromosome analysis of domestic animals. *Adv Vet. Sci. Comp. Med.* 24:245-289.
76. **Guttenbach M., Nanda I., Feichtinger W., Masabanda J.S., Griffin D.K. et Schmid M. 2003.** Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints 1-9 in nine different bird species. *Cytogenetic and Genome Research.* 103: 173-184.
77. **Guyer F.M. 1902.** Spermatogenesis of normal and hybrid pigeons. *Bull. Univ. Cincinnati* 21. Ser. II, vol. II.
78. **Hanane S. 2009.** Variabilité spatio-temporelle des âges ratios chez la Tourterelle des bois *Streptopelia turtur* dans les plaines du Souss et du Tadla (Maroc). *Go-South Bull.* 6:124-127.
79. **Hanzak J. 1967.** Encyclopédie illustrée des oiseaux. GRUND. 578p.
80. **Hayes H. 1993.** Analyse caryotypique et cartographie génique comparée chez les trois principaux bovidés domestiques : le bœuf (*Bos taurus L.*), le mouton (*Ovis aries L.*) et la chèvre (*Capra hircus L.*). Thèse de doctorat, Université Paris 7. 173p.
81. **Hayes H., Petit E. et Dutrillaux B. 1991.** Comparaison of RBG-banded karyotypes of cattlem sheep and goats. *Cytogenet. Cell genet.* 57: 51-55.
82. **Hayflick L. 1965.** The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.* 37:614-36.
83. **Heath M., Borggreve C. et Peet C. 2000.** European Bird populations: Estimation and trends. Birdlife International (Birdlife Conservation Series No. 10), Cambridge.
84. **Heinzel H., Fitter R. et Parslow J. 2004.** Guide Heinzel des oiseaux d'Europe, d'Afrique du nord et du moyen orient. Delachaux et Niestlé (Paris, 1996). Nouvelle ed. p198.
85. **Hemida F. 2005.** Les Sélaciens de la côte algérienne : Biosystématique des Requins et des Raies ; Ecologie, Reproduction et Exploitation de quelques populations capturées. Thèse de Doctorat d'état, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumedienne. 233p.
86. **Horng Y.M., Wu C.P., Wang Y.C. et Huang M.C. 2005.** *Columba livia* female-specific genomic sequence. *NCBI.* AY944219.
87. **Horng Y.M., Wu C.P., Wang Y.C. et Huang M.C. 2006.** A novel molecular genetic marker for gender determination of pigeons. *Theriogenology.* 65:1759–68.

88. **Hsu T.C. 1952.** Mammalian Chromosome *in Vitro*. The karyotype of man. *J. Hered.* 53: 167-172.
89. **Icona. 1989.** Determinacion del status de la tortola comun *Streptopelia turtur*. Infor final. Instituto Nacional para la conservacion de la naturaleza servicio de vida silvestre. 321p.
90. **ISCN de Memphis. 1995.** An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 114 p.
91. **ISCN de Paris. 1980.** An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Bird Defects. Vol. 17. No.5.
92. **ISCN. 1978.** An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. *Cytogenet. Cell. Genet.* 21:309-404.
93. **ISCN. 1985.** An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. *Cytogenet.* 118p.
94. **ISCNDA. 1989.** International System for Cytogenetic Nomenclature for Domestic Animals. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 53: 65–79.
95. **Isenman P. et Moali A. 2000.** Oiseaux d'Algérie. Birds of Algéria. Editions S.E.O.F. Paris: 336p.
96. **ITIS\* Amérique du Nord. 2008.** Système d'Information Taxonomique Intégré.
97. **Itoh M., Ikeuchi T., Shimba H., Mori M., Sasaki M. et Makino S. 1969.** A comparative karyotype study in fourteen species of birds. *Japan. J. Genetics*. Vol. 44. 3: 163-170.
98. **Jacobson L., Park H.B., Wahlberg P., Jiang S., Siegel P.B. et Anderson L. 2004.** Assignment of fourteen microsatellites markers to the chicken linkage map. *Poultry Sci.* 83:1825-1831.
99. **Jiguet F. et Julliard R. 2006.** Programme STOC pour la France (2005-2006). 18p.
100. **Jin L., Underhill P.A., Oefner P.J. et Cavalli-Sforza L.L. 1995.** Systematic search for polymorphisms in the human genome using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Am J Hum. Genet.* 57 Suppl: 26.
101. **Johnson K.P. 2004.** Deletion Bias in Avian Introns over Evolutionary Timescales. *Molecular Biology and Evolution*. 21(3):599-602.
102. **Johnson K.P. et Clayton D.H. 2000a.** Nuclear and mitochondrial genes contain similar phylogenetic signal for pigeon and doves (Aves : Columbiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 14 : 141-151.
103. **Johnson P.K., De Kort S., Dinwoodey K., Mateman A.C., Ten Cate C., Lessells M. et Clayton H.D. 2001.** A molecular phylogeny of the dove genera *Streptopelia* and *Columba*. *The Auk*. 118(4): 874-887.
104. **Jordi L.I.F. 1987.** El Llibre dels ocells de Catalunya. *Edicions Cap Roig, planes*. 63-64.
105. **Kaelbling M. et Fechheimer N.S. 1983.** Synaptonemal complexes and chromosome complement of domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Cytogenet. Cell. Genet.* 35 : 87-92.
106. **Kaplan J.-C. et Delph M. 1996.** Biologie moléculaire et médecine. *Médecine-Science. Flammarion*. 2<sup>e</sup> édition. 790p.

107. **Kartout Y. 2010.** Etude cytogénétique de la caille des blés *Coturnix coturnix*: Etablissement de chromosomes à haute résolution. Thèse de Magister, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumedienne, 90p.
108. **Kasai F., Garcia C., Arruga M.V. et Ferguson-Smith M.A. 2003.** Chromosome homology between chicken (*Gallus gallus domesticus*) and the red-legged partridge (*Alectoris rufa*); evidence of the occurrence of a neocentromere during evolution. *Cytogenet Genome. Res.* 102: 326–330.
109. **Kawamura S. et Yokoyama S. 1996.** Molecular characterization of the pigeon P-opsine gene. *Gene.* 182: 213-214.
110. **Keira S.M., Ferreira L.M., Graugnani A., Duarte I.S. et Santos I.A.N. 2004.** Modelo experimental para cultura de fibroblastos. *Acta. Cir. Bras.* 19: 11-16.
111. **Khifer L. et Leroul M. 2005.** Contribution à l'étude bioécologique de la tourterelle des bois, *Streptopelia turtur arenicola* dans l'arboretum de la forêt des planteurs, à Zéralda et dans la vallée du Sébaou, en Kabylie. Mémoire Ingénieur d'état Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou: 94p.
112. **Ladjali K. 1994.** Caryotype de la poule domestique « *Gallus domesticus* » et incidence des anomalies chromosomiques dans les troubles de la reproduction. Thèse de doctorat, INRA de Jouy en Josas: 179p.
113. **Ladjali K., Bordas A., Crihiu E.P. et Tixier-Boichard M. 1995a.** Contribution de la cytogénétique à l'étude de la fertilité de deux lignées de poules pondeuses sélectionnées sur la consommation alimentaire résiduelle. *Genet. Sel. Evol.* 27: 313-322.
114. **Ladjali K., Tixier-Boichard M. et Gibiu E.P. 1995c.** High resolution chromosome preparations for G and R Banding in *Gallus domesticus*. *Journal of heredity.* 86: 136-139.
115. **Ladjali K., Tixier-Boichard M., Bordas A. et Mérat A. 1995b.** Cytogenetic study of early chicken embryos: effect of naked neck gene and high ambient temperature. *Poultry Science.* 74: 903-909.
116. **Ladjali-Mohammed K., Bitgood J.J., Tixier-Boichard M. et Ponce de Leon F.A. 1999.** International system for standardized avian karyotypes (ISSAK): standardized banded karyotypes of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Cytogenet. Cell. Genet.* 86:271-276:
117. **Ladjali-Mohammed K., Grapin-Botton A., Bonnin A. et Le Douarin N. 2001.** Distribution of HOX gene in the chicken genome reveals a new segment of conservation between human and chicken. *Cytogenet. Cell. Genet.* 92: 157-161.
118. **Lecointre G. et Le Guyader H. 2001.** Classification phylogénétique du vivant, Belin. 543p.
119. **Lewin B. 1980.** Gene expression 2. 2<sup>e</sup> édition, John Wiley and Sons, New York.
120. **Macera M.J. et Bloom S.E. 1981.** Ultrastructural studies of the nucleoli in diploid and trisomic chicken. *J. Hered.* 72: 249-252.
121. **Mahiddine M. 2009.** Outarde houbara « *Chlamydotis undulata undulata* »: Etude du caryotype d'une espèce locale menacée d'extinction à partir de cultures cellulaires issues d'embryons et d'animaux adultes. Thèse de Magister, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumedienne, 87p.

122. **Makino S., Udagawa T. et Yamashina Y. 1956.** Karyotype studies in birds. A comparative study of chromosomes in the Columbidae. *Caryologia*. 8: 275-293.
123. **Martín G.M. 1977.** Cellular aging-clonal senescence. A review (Part I). *Am J Pathol*. 89: 484-511.
124. **Masabanda J.S., Burt D.W., O'Brien P.C.M., Vignal A., Fillon V., Walsh P.S., Cox H., Tempest H.G., Smith J., Habermann F., Schmid M., Matsuda Y., Ferguson-Smith M.A., Grooijmans R.P.M.A., Groenen M.A.M. et Griffin D.K. 2004.** Molecular cytogenetic definition of chicken genome: the first complete avian karyotype. *Genetics*. 166: 1367-1373.
125. **McKenzie S.E., Mansfield E., Rappaport E., Surrey S. et Fortina P. 1998.** Parallel molecular genetic analysis. *Eur J Hum Genet*. 6:417-429.
126. **Meyne J., Baker R.J., Hobart H.H., Hsu T.C., Ryder O.A., Ward O.G., Wiley J.E., Wurster-Hill D.H., Yates T.L. et Moyzis R.K. 1990.** Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in Vertebrate chromosomes. *Chromosoma*. 99: 3-10.
127. **Meyne J., Ratliff R.L. et Moyzis R.K. 1989.** Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among Vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 86: 7049-7053.
128. **Miller M.M., Goto R.M., Taylor R.L., Zoorob R., Auffray C. et al. 1996.** Assignment of Rfp-Y to the chicken major histocompatibility complex/NOR microchromosome and evidence for high-frequency recombination associated with the nucleolar organizer region. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 93: 3958-3962.
129. **Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J., Battips D.M. et Hungerford D.A. 1960.** Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res*. 20: 613-616.
130. **Moran C. 1993.** Microsatellite repeats in pig (*Sus domestica*) and chicken (*Gallus domesticus*). *J. Hered.* 84: 274-280.
131. **Morel M.Y. 1985.** La tourterelle des bois, *Streptopelia turtur*, en Sénégal : évolution de la population au cours de l'année et identification des races. *Alauda*. 53 (2):100-110.
132. **Morel M.Y. 1986.** Mue et engraissement de la tourterelle des bois *Streptopelia turtur*, dans une steppe arbustive du nord Sénégal, région de Richard-Toll. *Alauda*. 54 (2):121-137.
133. **Murton R.K. 1968.** Breeding migration and survival of turtle dove. *British Birds*. 61: 193-212.
134. **Nanda I. et Schmid M. 1994.** Localization of the telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequence in chicken (*Gallus domesticus*) chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet*. 65: 190-193.
135. **Nowak E. 1975.** Zur Systematik der Gattung *Streptopelia* (Columbiformes, Aves). *Bonner Zoologische Beitrage*. 26:135-154.
136. **Ohno S. 1961.** Sex chromosomes and microchromosomes of *Gallus domesticus*. *Chromosoma* (Berl). 11: 484-498.
137. **Ohno S., Stenius C., Christian L.C., Beçak W. et Beçak L.M. 1964.** Chromosomal uniformity in the avian sub-class Carinatae. *Chromosoma*. (Berl). 15:280-288.

138. **Olofsson B. et Bernardi G. 1983.** Organisation of nucleotide sequence in the chicken genome. *Eur. J. Biochem.* 130: 241-245.
139. **Ouchia S. 2009.** Caryotype de la Perdrix gabra *Alectoris barbara* : Etablissement de Chromosomes à Haute Résolution à Partir de Cultures Cellulaires Issues d'Embryons et d'Animaux Adultes. Thèse de Magister, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumedienne, 101p.
140. **Pardue M.L. et Gall J.G. 1970.** Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. natl. Aca. sci.* 64: 600-604.
141. **Paris conférence (1971), Supplement (1975). 1975.** Standardization in Human Cytogenetics. *Birth Defects. Cytogenet. Cell. Genet.* 15: 201-238.
142. **Peiro V. 2001.** Ecologie de la reproduction de la tourterelle des bois en Espagne. *Faune sauvage.* 253:63-65.
143. **Pereira S.L., Johnson K.P., Clayton D.H. et Baker A.J. 2007.** Mitochondrial and Nuclear DNA Sequences Support a Cretaceous Origin of Columbiformes and a Dispersal-Driven Radiation in the Paleogene. *Syst. Biol.* 56(4):656–672.
144. **Perry P. et Wolf S. 1974.** New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature.* 261: 156-158.
145. **Peterson A.P. 2007.** Columbiformes. Zoonomen - Zoological Nomenclature Resource.
146. **PNR1. 2003.** Programme National de Recherches (Avis d'appel n°3), Bilan de recherche ponctuelle annuelle. Centre Cynégétique de Zéralda (CCZ). 14p.
147. **Pollock B.J. et Fechheimer N.S. 1981.** Variable C-banding patterns and proposed C-band karyotype in *Gallus domesticus*. *Genetica.* 54 :273-279.
148. **Pollock D.L. et Fechheimer N.S. 1976.** The chromosome number of *Gallus domesticus*. *Br. Poult. Sci.* 17: 39-42.
149. **Ponce de Leon F.A., Li Y. et Weng Z. 1992.** Early and late replicative chromosomal banding patterns of *Gallus domesticus*. *J. Hered.* 83: 36-42.
150. **Popescu P., Hayes H. et Dutrillaux B.C. 1998.** Techniques de cytogénétique animale. INRA éditions, Paris: 260p.
151. **Prychitiko T.M. et Moore W.S. 2003.** Alignment and phylogenetic analysis of B-fibrinogen intron 7 sequences among avian orders reveal conserved regions within the introns. *Molecular Biology and Evolution.* 20 : 762-771.
152. **Rabie T.K.S.M. 2004.** Pulmonary hypertension syndrome in chicken: Peeking under QTL peaks. Chapter 4, Validation and fine-scale mapping of quantitative trait loci affecting pulmonary hypertension syndrome (PHS) in droilers using advanced intercross line. *Thesis.* 65-83.
153. **Reading Conference. 1976.** Proceedings of The First International Conference for the Standardization of Banded Karyotypes of Domestic Animals, Reading. *Hereditas.* 92, 145.
154. **Sasaki M. 1981.** High resolution G-band karyotypes of the domestic fowl and the Japanese quail. *Chromosome Information Service.* 31:26 -28.

155. **Sasaki M., Ikeuchi T. et Makino S. 1968.** A feather pulp culture technique for avian chromosomes, with notes on the chromosomes of the peafowl and the ostrich. *Experientia*. 24: 1292- 1293.
156. **Schmid M., Enderle E., Schindler D. et Schempp W. 1989.** Chromosome banding and DNA replication patterns in bird karyotypes. *Cytogenet. Cell. Genet.* 52:139–146.
157. **Schmid M., Nanda I. et Burt D.W. 2005.** Second Report on Chicken Genes and Chromosomes 2005. *Cytogenet Genome Res.* 109:415-479.
158. **Schmid M., Nanda I., Guttenbach M., Steinlein C., Hoehn M. et al. 2000.** First report on chicken genes and chromosomes 2000. *Cytogenet. Cell. Genet.* 90: 169–218.
159. **Schmid W. 1962.** DNA replication patterns of the heterochromosomes in *Gallus domesticus*. *Cytogenetics*. 1:344-352.
160. **Schweizer F. 1980.** An optical study of the giant radio galaxy NGC 1316 (Fornax a). *Ap. J.* 237:303-318.
161. **Seabright M. 1971.** A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 2:971-972.
162. **Shetty S., Griffin D.K.N. et Graves J.A. 1999.** Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome Res.* 7 : 289-295.
163. **Shibusawa M., Nishida-Umehara C., Masabanda J., Griffin D.K., Isobe T. et Matsuda Y. 2002.** Chromosome rearrangements between chicken and guinea fowl defined by comparative chromosome painting and FISH mapping of DNA clones. *Cytogenet Genome. Res.* 98:225–230.
164. **Shield G.F. 1982.** Comparative avian cytogenetics: a review. *Condor*. 84: 45-58.
165. **Smith J. et Burt D.W. 1998.** Parameters of the chicken genome *Gallus gallus*. *Anim. Genet.* 29: 290–294.
166. **Smith J., Bruley C.K., Paton I.R., Dunn I., Jones C.T. et al. 2000.** Differences in gene density on chicken macrochromosomes and microchromosomes. *Anim. Genet.* 31: 96–103.
167. **Smith J., Paton I.R., Murray F., Crooijmans R., Groenen M. et Burt D.W. 2002.** Comparative mapping of human Chromosome 19 with the chicken shows conserved synteny and gives an insight into chromosomal evolution. *Mammalian Genome*. 13: 310–315.
168. **Snow D.W. et Perrins C.M. 1998.** The turtle dove, *Streptopelia turtur* in: The birds of the Western Palearctic. Concise edition vol.1 (Non passerines). Oxford University Press. 856-859.
169. **Sokolow N.N., Tiniakow G.G. et Trofimov J.E. 1936.** On the morphology of the chromosomes in Gallinaceae. *Cytologia*. 7: 466-489.
170. **Solovei I.V., Joffe B.I., Gaginskaya E.R. et Macgregor H.C. 1996.** Transcription on lampbrush chromosomes of a centromerically localized highly repeated DNA in pigeon (*Columba*) relates to sequence arrangement. *Chrom. Res.* 4: 588-603.
171. **Spillman W.J. 1908.** Spurious allelomorphism: results of some recent investigation. *Am. Nat. Res.* 42: 610-615.
172. **Stahl A. et Hartung M. 1981.** L'hétérochromatine. *Annals de Génétique*. 24: 69-77.

173. **Stefos K. et Arrighi F.E. 1974.** Respective DNA of *Gallus domesticus* and its cytological location. *Exp. Cell Genet.* 13: 410-418.
174. **Stock A.D. et Bunch T.D. 1982.** The evolutionary implications of chromosome banding pattern homologies in the bird order Galliformes. *Cytogenet. Cell. Genet.* 34:136-148.
175. **Stock A.D. et Mengden G.A. 1975.** Chromosome banding pattern conservatism in birds and non-homology of chromosome banding patterns between birds, turtles and amphibians. *Chromosoma.* 50:69-77.
176. **Stock A.D., Arrighi F.E. et Stefos K. 1974.** Chromosome homology in birds: banding patterns of the chromosomes of the domestic chicken, ring-necked dove, and domestic pigeon. *Cytogenet. Cell Genet.* 13: 410-418.
177. **Stubblefield E. et Oro J. 1982.** The isolation of specific chicken macrochromosomes by zonal centrifugation and flow sorting. *Cytometry.* 2: 273-281.
178. **Sylvain M.M., Clément D., Jonard A., Massé P., Pagès M.J-M. et Neau M.P. 1997.** Suivi ornithologique du parc éolien De Port-La-Nouvelle. Species of European Conservation Concern (SPEC).
179. **Tales Z. 2003.** La tourterelle des bois (*Streptopelia turtur L.*), validation de la sous espèce locale. Contribution à l'évaluation de la situation biologique de la population en phase du cycle de reproduction en Algérie. Mémoire d'Ingénieur d'état en Agronomie, UMMTO: 122p.
180. **Thévenot M., Vernon J.D.R. et Bergier P. 2003.** The Birds of Morocco. *British Ornithologist Union Checklist Series.* 20: 594.
181. **Tiersch T.R. et Wachtel S.S. 1991.** On the evolution of genome size of birds. *J. Hered.* 82: 363-368.
182. **Van de Sande J.H., Lin C.C. et Jorgenson K.F. 1977.** Reverse banding on chromosomes produced by guanosine-cytosine specific DNA binding antibiotic: olivomycin. *Science.* 195:400-402.
183. **Van der Loo B., Fenton M. J. et Erusalimsky J.D. 1998.** Cytochemical detection of a senescence associated beta-galactosidase in endothelial and smooth muscle cells from human and rabbit blood vessels. *Exp Cell Res.* 241:309-315.
184. **Vaurie C. 1965.** The birds of Palearctic Fauna. Non-Passeriformes. Witherby Ltd, London Limited, 552-555.
185. **Veiga J. 1998.** Eléments d'un plan en faveur de la tourterelle des bois (*Streptopelia turtur*). *Bulletin de liaison et d'information d'O.M.P.O.* (oiseaux migrants du paléarctique occidental). 17:7-16.
186. **Viegas-Péquiniot E. et Dutrillaux B. 1978.** Une méthode simple pour obtenir des prophase et des prométaphases. *Ann. Genet.* 21: 122-125.
187. **Vinogradov A.E. 1999.** Intron-genome size relationship on a large evolutionary scale. *J. Mol. Evol.* 49: 376-384.
188. **Von A.J. 1923a.** Neue Volgelrassen von den Balearen. *Falco.* 19:3-5.
189. **Wain H.M., Toye A.A., Hughes S. et Bumstead N. 1998.** Targeting of marker loci to chicken chromosome 16 by representational difference analysis. *Anim. Genet.* 29: 446-452.

190. **Wang D.G., Fan J.B., Siao C., Berno A., Young P., Sapolsky R. et al. 1998.** Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*. 280:1077–1082.
191. **Wang N. et Shoffner R.N. 1974.** Trypsin G- and C-banding for interchange analysis and sex identification in the chicken. *Chromosoma*. (Berl). 47: 61-69.
192. **Watson J.D., Hopkins N.H., Roberts J.W., Steitz J.A. et Weiner A.M. 1989.** Biologie moléculaire du gene. Interéditions, Paris. 4<sup>e</sup> édition. 1312 p.
193. **Werner O.S. 1927.** The chromosome of the indian Runner duck. *Biol. Bull*. 52:330-372.
194. **Witherby H. F. 1952.** The handbook of british birds. Witherby Ltd, London: 4: 141-145.
195. **Wu C.-P., Horng Y.-M., Wang R.-T., Yang K.-T. et Huang M.-C. 2007.** A novel sex-specific DNA marker in Columbidae birds. *Theriogenology*. 67: 328–333.
196. **Xeros N. 1962.** Desoxyriboside control and synchronization of mitosis. *Nature*. 194, 682.
197. **Yamashina M.Y. 1944.** Karyotype studies in birds I. comparative morphology of chromosomes in seventeen races of domestic fowl. *Cytologia*. 13: 270-296.
198. **Yamashina Y. et Makino S. 1946.** A study on the chromosomes of pigeon and doves. *Seibutu*. 2: 92-100.
199. **Yeatman-Berthelot D. et Jarry G. 1994.** Nouvel atlas des oiseaux nicheurs de France. Société ornithologique de France: 776p.
200. **Zakharov A.F. et Egolina N.A. 1968.** Asynchrony of DNA replication and mitotic spiralisation along heterochromatic portions of Chinese hamster chromosomes. *Chromosoma*. 23:365.
201. **Zakharov A.F. et Egolina N.A. 1972.** Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes I. BUdR revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. *Chromosoma*. (Berl.). 38: 341–365.

# Annexe I

## Composition du milieu de culture RPMI 1640 (GIBCO) sans HEPES

Acides Amines	
Appellation	Concentration (mg/l)
L-Arg (base libre)	200
L-Asp	50
Acide L-Aspartic	20
L-Cystine	50
Ac.L-Glutamique	20
L-Glu	300
Glutathion ( réduit )	1
Gly	10
L-His	15
L-Hydroxyproline	20
L-ILeu	50
L-Leu	50
L-Lys, HCl	40
L-Met	15
L-Phe	15
L-Pro	20
L-Ser	20
L-Thr	20
L-Try	0,5
L-Tyr	20
L-Val	20
Vitamines	
Vitamine B12	0,2
D-Pantothenate, Ca	0,005
Choline,Cl	0,25
Acide folic	3
I-Inositol	1
Niacin	35
Ac.Para	1
Aminobenzoique	1
Pyridoxine, HCl	1
Riboflavine	1
Thiamine, HCl	0,2

## ABSTRACT

Turtle Dove *Streptopelia turtur*, is a nesting migratory bird, belonging to the family of Columbides. This endemic species of the North of Africa possesses a savoury and sweet flesh very appreciated. However, the excessive hunting also during its breeding period, poaching and ecosystem's changes provoked the decline of this species.

The karyotype of *Streptopelia turtur* has never been described and no genetics studies have been made on this species in Algeria. We propose to begin de description of the genome of this species by the establishment of the karyotype at high resolution by GTG and RBG banding. We have described 9 pairs of macrochromosomes and the Z chromosome harvested from primary culture of fibroblasts from chicks and embryos at different stages of development. Diploid chromosome numbers have been established at  $2n=78$ , as well as most species belonging to this order. A comparative mapping was realized between *Streptopelia turtur* and species belonging to the order of Columbiformes and Galliformes as domestic fowl *Gallus domesticus*. Our study revealed a homology for the first fourth autosomal pairs, the pairs 8, 9, the sexual chromosome Z and the conservation of the height of the chromosomes 4, 5, 6 and 7 in the order of Columbiformes. Some inversions of G-bands have been noticed in the chromosome 1 of *Streptopelia turtur* in comparison with *Gallus domesticus*. This is the result of chromosomal rearrangements occurred during bird evolution.

A comparative mapping was realized between the turtle dove and other birds studied in our Laboratory as Common Quail, Houbara bustard and Barbary partridge.

This study will permit also to detect eventual chromosomal abnormalities of number and structure which cause early embryonic death.

**Key words:** Turtle Dove *Streptopelia turtur*, endemic species, decline, embryos, chicks, primary culture of fibroblasts, Karyotype, chromosomes at high resolution, morphologic bands GTG, dynamic bands RBG, genome, compared cartography.

## ملخص:

القمري *Streptopelia turtur*، المسمى باليمام القمري هو طائر حاضن و مهاجر ينتمي الى فصيلة الحمام. هذا الطائر المتواجد خاصة في افريقيا الشمالية يتميز بلحم حلو المذاق جد معتبر. ولكن الصيد المفرط حتى خلال فصل تكاثره و كذا التغيرات البيئية تسببت في انخفاض ملحوظ في العدد الاجمالي.

الى هذا اليوم، لا توجد اي دراسة للطابع النووي أو دراسة وراثية للقمري في الجزائر. لهذا الصدد نقترح ابتداء وصف جينوم هذا الطائر عن طريق وصف الطابع النووي ذو الدقة العالية بالاشرطة الشكلية GTG و الديناميكية RBG. نتج عن هذا ابراز 9 صبغيات و كذا الصبغي الجنسي Z عن طريق استنابت الخلايا المغزلية مستخرجة من كتاكيت و أجنة عند مختلف مراحل التطور الجنيني. تم كذلك احصاء عدد الصبغيات الزوجي الذي قدر ب 78 صبغي و ذلك طبقا لمعظم الطيور المنتمية لهذه العائلة.

تمت مقارنة صبغية بين القمري و بعض الطيور المنتمية لعائلة الحمام و الدجاج (الدواجن) كالدجاج الاليف و نتج عنها في أولى الصبغيات الاربعة و الصبغيات 8 و 9 و كذلك الصبغي Z مع اظهار المحافظة الشكلية للصبغيات 4,5,6,7 عند عائلة الحمام. تم كذلك ابراز بعض الاختلافات في تصاميم الاشرطة G للصبغي 1 بالمقارنة مع الدجاج الاليف و هذا قد يكون نتيجة مستجدات صبغية حدثت خلال تطور الطيور. قمنا ايضا بمقارنة صبغية بين *Streptopelia turtur* و كذا بعض الطيور المدروسة في مخبرنا كسمان الحقول و الحبار و الحجل المغربي.

قد تمكننا هذه الدراسة لاحقا من احصاء بعض الاختلافات الصبغية في العدد و الشكل التي قد تؤدي الى الموت المبكر للاجنة.

**الكلمات الرئيسية:** القمري، طائر شمال افريقيا، انخفاض العدد الاجمالي، أجنة، كتاكيت، استنابت الخلايا المغزلية، الطابع النووي، صبغيات ذو الدقة العالية، أشرطة شكلية GTG، أشرطة ديناميكية RBG، جينوم، مقارنة صبغية.