

N° d'ordre:66/2012-M/SB

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 pour l'obtention du **diplôme de MAGISTER**  
En: SCIENCES DE LA NATURE

Spécialité : Biologie et Génétique du Développement

Par : M<sup>elle</sup> AYATI Houria

*Sujet:*

**Contribution à la conservation d'une espèce menacée :**  
**Description des**  
**Chromosomes du cerf de Berbérie**  
*Cervus elaphus barbarus*

Soutenu publiquement le **28/06/2012** devant le jury composé de :

<b>M<sup>r</sup> BOUHADDAD R.</b>	Professeur à l'USTHB	Président
<b>M<sup>me</sup> LADJALI-MOHAMMEDI K.</b>	Maître de Conférences/A, à l'USTHB	Directrice de Memoire
<b>M<sup>r</sup> HANIFI N.</b>	Maître de Conférences /A, à l'USTHB	Examineur
<b>M<sup>r</sup> BELHAMRA M.</b>	Professeur (Université de Biskra)	Examineur
<b>M<sup>r</sup> GOUICHICHE M.</b>	Directeur du Centre Cynégétique de Zéralda	Invité

Année Universitaire **2011 - 2012**

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à mes chers parents, pour les encouragements qu'ils m'ont apporté durant mes études, qu'ils trouvent ici, le témoignage de mon affection et de ma profonde gratitude. Que Dieu me prête vie pour leur rendre au moins le un centième de ce qui m'ont apporté.*

*A mon adorable sœur Nassima et mon cher frère Ahmed pour leur soutien moral.*

*A toute ma famille maternelle et paternelle.*

*Je tiens à remercier M<sup>r</sup> Sayad Moussa pour son soutien moral et son aide précieuse et également mes amis(e) Naima, Soumia, Adel et Tata Nadira pour leurs encouragements.*

## Remerciements

Je commence par remercier le bon Dieu qui m'a donné la volonté, le courage et la patience pour pouvoir réaliser ce travail.

Le travail présenté ici a été effectué au sein de l'Équipe de Génétique du Développement (LBCM, FSB, USTHB). Il a été dirigé par le Docteur *Ladjali-Mohammedi Kafia* à qui j'adresse toute ma reconnaissance, ma gratitude et mes sincères remerciements pour m'avoir soutenue, guidée, conseillée dans mes recherches et d'avoir veillé sur le bon déroulement de ce travail en m'enseignant la rigueur scientifique. Elle trouve ici le fruit de ses efforts fournis durant ces années.

Je remercie vivement le *Professeur Bouhaddad Rachid* d'avoir accepté de présider ce jury.

J'adresse également mes sincères remerciements au *Docteur Hanifi Nadir* qui a gentiment accepté d'examiner et juger ce travail.

Je remercie chaleureusement le *Professeur Belhamra Mohamed* d'avoir accepté d'évaluer ce travail, pour nous avoir suggéré de travailler sur cette espèce élevée en captivité au Centre Cynégétique de Zéralda et pour tout le soutien et les encouragements apportés à notre équipe.

Je tiens également à assurer à *Monsieur Gouichiche M'hamed*, Directeur du Centre Cynégétique de Zéralda, mon sincère remerciement pour ses conseils, d'être prêt à fournir toute aide pour faciliter la recherche et qui a aimablement accepté notre invitation pour faire partie de ce jury.

Mes remerciements s'adressent aussi au *Docteur Zerrouki Souad* pour sa collaboration, pour son extrême gentillesse, sympathie et de nous avoir fourni le matériel biologique.

Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements à *M<sup>me</sup> Larinouna Fatiha* et *M<sup>r</sup> Makhlouf*, ainsi que toutes les personnes du Centre Cynégétique de Zéralda et de la Réserve de Chasse de Zéralda pour leurs aides précieuses et pour l'acquisition du matériel biologique.

J'aimerai finalement remercier tous les membres de l'Équipe de Génétique du Développement qui sont devenus mes amies, pour leurs aides précieuses, leur soutien moral. Elles étaient présentes dans les moments difficiles. Merci à Sihem, Lila, Assia, Rima, Fella, Yasmine, Sabrina, Sara, Sabrina, Amel, Sara et Ahlem. Je remercie également *M<sup>r</sup> Fantazi Khaled* (INRAA) qui a contribué au fonctionnement de ce Laboratoire.

## Résumé

Le cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* est une espèce endémique de l'Afrique du Nord dont l'aire de répartition se limite aujourd'hui au Nord Est de l'Algérie et au Nord Ouest de la Tunisie. Cette régression des effectifs est sous l'effet de plusieurs menaces comme le braconnage, la déforestation causant une fragmentation des habitats et les catastrophes naturelles pouvant entraîner la disparition de l'espèce. En Algérie, plusieurs tentatives de conservation du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* ont été mises en place avec la création d'aires protégées (Parc National d'EL Kala, Parc Zoologique de Ben Aknoun). Aussi, des programmes de renforcement des populations (Centre Cynégétique de Zéralda) et de réintroduction de cet animal dans son habitat naturel ont été initiés (forêts d'Akfadou de Bejaia et de Collo de Skikda).

Dans le but d'entamer la description du génome du cerf de Berbérie, une étude cytogénétique a été entreprise. Ceci afin de déceler d'éventuelles anomalies chromosomiques responsables de mortalités embryonnaires précoces et d'établir une comparaison avec d'autres espèces de cervidés tel que *Cervus elaphus corsicanus*. Nous avons ainsi établi les caryotypes en bandes GTG et RBG à partir de cultures de lymphocytes. Les techniques appliquées ont été adaptées à cette espèce au laboratoire de Génétique du Développement à partir de protocoles mis au point chez l'Homme et les mammifères domestiques. Des synchronisations du cycle cellulaire avec l'incorporation du BrdU, qui est un analogue structural de la thymidine lors de la réplication de l'ADN, ont été réalisées. Ceci nous a permis d'obtenir des chromosomes très allongés dits « à haute résolution ». Le nombre de chromosomes diploïde a été estimé à 68 chromosomes, comme pour la plupart des espèces appartenant à cette famille. La comparaison individuelle des paires d'autosomes et des chromosomes sexuels XY du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* et du cerf de Zéralda *Cervus elaphus* avec les chromosomes du cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus*, nous a permis de révéler des homologies ainsi que certaines différences pour le chromosome 1 et le chromosome 33 de ces deux sous-espèces.

**Mots clés** : Cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus*, espèce menacée, génome, Bandes GTG et RBG, caryotype, chromosomes.

# ***SOMMAIRE***

<b>Introduction Générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction</b>	
<b>1. Biologie du cerf de Berbérie.....</b>	<b>2</b>
1.2.Taxonomie et phylogénie du cerf de Berbérie .....	2
1.2.1. Taxonomie du cerf de Berbérie .....	2
1.2.2. Caractéristiques des cervidés .....	2
1.2.3 Phylogénie des cervidés .....	6
1.3.Description du Cerf de Berbérie.....	9
1.3.1 Description morphologique.....	9
1.3.2 Ramure (Trophée).....	11
1.4.Nomenclature du cerf élaphe.....	11
1.5.Régime alimentaire.....	11
1.6.Reproduction .....	13
1.7.Comportement .....	13
1.8.Indices de présence.....	15
1.9. Longévité et mortalité .....	15
1.10. Répartition géographique .....	15
1.11. Statut et conservation .....	15
a) Les menaces d’extinctions .....	15
b) La Taille de la population .....	15
c) Elevage en captivité .....	18
d) Conservation <i>in situ</i> .....	18
e) Statut de l’espèce.....	20
<b>2. Cytogénétique des cervidés.....</b>	<b>22</b>
2.1. Historique .....	22
2.2.Principes des techniques de cytogénétique.....	22
2.2.1. Synchronisation des cellules .....	22
2.2.2. Technique de marquage chromosomique .....	23

a)Coloration conventionnelle au Giemsa .....	25
b) Techniques de marquages chromosomiques révélant les bandes morphologiques.	25
c) Techniques de marquages chromosomiques révélant les bandes dynamiques.....	25
2.3.Evolution chromosomiques des cervidés.....	25
2.4.Caractéristique du caryotype des cervidés .....	27
2.5.Caryotype du cerf de Berbérie <i>Cervus elaphus barbarus</i> .....	27
2.6.Conservation génétique entre <i>Cervus elaphus barbarus</i> et <i>Cervus elaphus</i> .....	27
<i>Corsicanus</i>	
2.7. Génomique et cartographie génique .....	30
a)Carte génétique .....	30
b)Carte physique.....	30
c)Cartographie comparée .....	30
<b>Objectif du travail.....</b>	<b>33</b>

## **Chapitre 2 : Matériel et méthodes**

<b>1. Matériel biologique.....</b>	<b>34</b>
<b>2. Méthodes .....</b>	<b>34</b>
2.1. Culture de fibroblastes.....	34
2.2. Culture de lymphocytes.....	36
2.2.1. Mise en culture .....	37
2.2.2. Synchronisation des cellules .....	37
2.2.3. La Récolte des cellules et Préparation des étalements chromosomiques....	42
<b>3. Techniques de marquages chromosomiques.....</b>	<b>43</b>
3.1. Coloration conventionnelle au Giemsa.....	43
3.2. Coloration chromosomique en bandes structurales et dynamiques.....	44
a)Technique révélant les bandes structurales .....	44
b)Technique révélant les bandes dynamiques Bandes R- BrdU- Giemsa	45
<b>4. Classification des chromosomes et établissement des caryotypes....</b>	<b>47</b>

## Chapitre III : Résultats

1. Matériel biologique.....	48
2. Culture cellulaire.....	48
3. Synchronisation des cellules et obtention de chromosomes allongés.....	48
4. Marquages chromosomiques et première description des chromosomes du cerf de Berbérie <i>Cervus elaphus Barbarus</i> en bandes structurales GTG.....	50
5. Marquages chromosomiques et première description des chromosomes du cerf de Berbérie en bandes dynamiques RBG.....	54

## Chapitre IV : Discussion

1. Cultures cellulaires .....	57
2. Marquages chromosomiques et première description précise des chromosomes du Cerf de Berbérie <i>Cervus elaphus barbarus</i> .....	57
3. Cartographies Chromosomiques Comparées.....	60
3.1. Comparaisons du caryotype du cerf de Berbérie <i>Cervus elaphus barbarus</i> du Parc Zoologique de Ben Aknoun avec le caryotype du cerf d'Europe <i>Cervus elaphus corsicanus</i> . .....	60
3.2. Comparaisons du caryotype du cerf de Berbérie <i>Cervus elaphus barbarus</i> du Parc Zoologique de Ben Aknoun avec le caryotype du cerf de la réserve de Ain Beccouch de la Tunisie.....	60
3.3. Comparaisons des caryotypes du cerf issu de la réserve de chasse de Zéralda <i>Cervus elaphus</i> et du cerf d'Europe <i>Cervus elaphus corsicanus</i> .....	62
3.4. Comparaison du chromosome 33 de différentes espèces de cervidés .....	62
3.5. Comparaison du caryotype du cerf de Berbérie <i>Cervus elaphus barbarus</i> de Ben Aknoun avec le caryotype de <i>Mazama gouzoubira</i> .....	62

<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>67</b>
--	-----------

<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>68</b>
---	-----------

# Abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNmt:	ADN mitochondrial
AFLP :	Amplified Fragment Length Polymorphism
BACs :	Bacterial Artificial Chromosomes
BrdU :	5-bromo-2-déoxyuridine
CDP :	Cytidine DiPhosphate
CITES :	Commerce International des Espèces de Faune et de Flore Sauvages Menacées d'Extinction
CMP :	Cytidine MonoPhosphate
cM :	Centimorgan
Con A :	Concanavaline A
dATP :	déoxyAdénosine TtriPhosphate
dCDP :	déoxyCytidine DiPhosphate
dGTP :	déoxyGuanosone TriPhosphate
dNTP :	déoxyriboNucléotide TriPhosphate
dTTP :	déoxyThymidine TriPhosphate
dUDP :	déoxyUridine DiPhosphate
EDTA :	Ethylène Diamine Tétraacétique
FdU :	5-fluoro-2-déoxyuridine
FISH :	Fluorescence In Situ Hybridization
FPG :	Fluorochrome-Photolyse-Giemsa
GC :	paire de bases Guanine-Cytosine
GTG :	Bande G, par action de la Trypsine, colorées au Giemsa
Kb :	Kilobase
Mb :	Megabase
NOR :	Région Organisatrice de Nucléoles
P :	bras court du chromosome
Pb :	Paire de bases
PHA :	Phytohémagglutinine
q :	bras long du chromosome
QTL :	Quantitative Trait Loci
RBG :	Bande R, par incorporation du BrdU, coloration au Giemsa
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphisme
Rpm :	Rotation par minute
tpm :	Tours par minute
RPMI :	Roswell Park Memorial Institute
SVF :	Sérum de Veau Foetal
UDP :	Uridine DiPhosphate
UICN :	Union Internationale pour la Conservation de la Nature
UV :	Ultraviolet
YACs :	Yeast Artificial Chromosomes

# Liste des Figures

- Figure 1 :** cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus*, une biche et un faon dans la réserve de Braptia (El Kala).
- Figure 2 :** répartition historique de cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* en Afrique du Nord.
- Figure 3 :** classification de la famille des cervidés.
- Figure 4 :** arbre phylogénétique des cervidés basé sur l'analyse de l'ADN mitochondrial.
- Figure 5 :** arbre phylogénétique des cervidés basé sur l'analyse de l'ADN mitochondrial.
- Figure 6 :** cerf de Berbérie de sexe mâle dans le Parc zoologique de Ben Aknoun.
- Figure 7 :** des femelles de cerf de Berbérie dans la réserve de Braptia.
- Figure 8 :** cerf de Berbérie de sexe femelle dans la réserve de Braptia.
- Figure 9 :** structure détaillée des bois du cerf.
- Figure 10 :** faon du cerf de Berbérie au Musée d'El Kala.
- Figure 11 :** faon de 1 mois et demi.
- Figure 12 :** répartition géographique du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* et localisation des réserves naturelles en Algérie.
- Figure 13 :** crâne d'un cerf tué par les braconniers.
- Figure 14 :** crâne d'un cerf tué par les braconniers.
- Figure 15 :** cerfs de Berbérie et des biches du Centre Cynégétique de Zéralda.
- Figure 16 :** cerfs de Berbérie et des biches du Parc Zoologique de Ben Aknoun.
- Figure 17 :** réserve naturelle de Bouchegouf.
- Figure 18 :** réserve de Braptia (Parc National d'El Kala).
- Figure 19 :** réserve d'El Aioun.
- Figure 20 :** massifs d'Ouled Bechih et de Boumezrana.
- Figure 21 :** caryotype en coloration conventionnelle du *Muntiacus muntjak vaginalis*.
- Figure 22 :** caryotype en coloration conventionnelle du *Capreolus capreolus* (2n=70).
- Figure 23 :** évolution des chromosomes de la sous famille des cervinés.
- Figure 24 :** caryotype en bandes R du *Cervus unicolor*.
- Figure 25 :** caryotype en bandes R du *Axis axis*.
- Figure 26 :** caryotype en coloration conventionnelle de *Cervus elaphus*.
- Figure 27 :** caryotype en coloration conventionnelle de *Dama dama*.
- Figure 28 :** carte génétique du *Cervus elaphus*.
- Figure 29 :** suite de la carte génétique du *Cervus elaphus*.
- Figure 30 :** cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* de sexe mâle en captivité au Parc Zoologique de Ben Aknoun.
- Figure 31 :** cerf Elaphe *Cervus elaphus* de sexe mâle, Réserve de chasse de Zéralda.
- Figure 32 :** les différentes étapes du prélèvement de sang du cerf élaphe *Cervus elaphus* de sexe mâle de la veine jugulaire.
- Figure 33 :** étapes de mise en culture des lymphocytes du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* sous une hotte à flux laminaire.
- Figure 34 :** mécanisme de blocage de la synthèse de l'ADN par de la thymidine en excès utilisée pour la synchronisation des cellules.

- Figure 35 :** métaphase des chromosomes du cerf de Berbérie.
- Figure 36 :** caryotype en bandes GTG du *Cervus elaphus barbarus* de sexe mâle du Parc Zoologique de Ben Aknoun.
- Figure 37 :** caryotype en bandes GTG du *Cervus elaphus* du cerf de sexe mâle de la réserve de chasse de Zéralda.
- Figure 38 :** caryotype en bandes RBG du *Cervus elaphus barbarus* du cerf de sexe mâle du Parc Zoologique de Ben Aknoun.
- Figure 39 :** caryotype en bande G du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* de la réserve de Ain Beccouch de la Tunisie.
- Figure 40 :** caryotype en bande G du cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus*.
- Figure 41 :** comparaison des chromosomes en bandes GTG du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* (à gauche) avec les chromosomes du cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus* (à droite).
- Figure 42 :** comparaison des chromosomes 1 et 33 en bandes GTG du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* (à droite) avec les chromosomes du cerf de Berbérie de la réserve de Ain Beccouch de Tunisie (à gauche).
- Figure 43 :** comparaison des chromosomes du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* (à gauche) dans A, B et C en bandes GTG avec les chromosomes du cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus* (au milieu) et les chromosomes du cerf de la réserve de chasse de Zéralda *Cervus elaphus* (à droite).
- Figure 44 :** comparaison du chromosome 33 de différentes espèces de cervidés (*Dama dama*, *Cervus nippon nippon* et *Cervus elaphus L.*
- Figure 45 :** caryotype de *Mazama gouzoubira* (2n=69).
- Figure 46 :** comparaison des chromosomes du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* avec les Chromosomes de *Mazama gouzoubira*.
- Figure 47 :** éventuel réarrangement chromosomique à l'origine de la formation du chromosome 33 chez les cervidés.

# Liste des Tableaux

**Tableau I** : les principales caractéristiques des cervidés.

**Tableau II** : comparaison morphologique entre le cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* et le cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus*.

**Tableau III** : techniques de marquages des chromosomes

**Tableau IV** : code des techniques de marquages chromosomiques

# ***INTRODUCTION GENERALE***

# Introduction Générale

Chaque année deux espèces sur 1000 disparaissent alors que la reconstitution d'une espèce nécessiterait de cinq à dix millions d'années (Leakey et Lewin, 1999). L'Algérie recèle une faune sauvage riche et très variée. Elle abrite 163 espèces protégées, dont 108 espèces d'oiseaux, 47 espèces de mammifères et 08 espèces de reptiles. Sur les 163 espèces protégées, 23 espèces sont menacées de disparition (13 espèces de Mammifères, 7 espèces d'Oiseaux et 3 espèces de Reptiles) (DGF, 2012). La destruction de la biodiversité s'observe à travers de multiples facteurs, dont beaucoup sont actuellement les résultats d'une exploitation anarchique de nombreuses espèces végétales ou animales sauvages par les populations humaines. Elle se manifeste aussi par la dégradation des écosystèmes.

Le cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* est une espèce endémique de l'Afrique du Nord qui est menacée de disparition. Cet ongulé a vu son aire se morceler et se rétrécir dangereusement suite aux modifications de son environnement (braconnage, incendies et urbanisations). Aujourd'hui, il est localisé dans une étroite bande littorale empiétant légèrement sur le territoire Tunisien (Hajji *et al.*, 2007). Cette situation a conduit à son classement par l'Union International pour la Conservation de la Nature (UICN) sur le tableau C de la convention africaine en 1969. Il est aussi classé par l'UICN dans la catégorie de faible risque d'extinction (Wemmer, 1998). L'espèce figure également sur l'annexe III de la conservation internationale des espèces animales et végétales non commercialisées (CITES). En Algérie, cette conception de déclin apparent a conduit les pouvoirs publics à prendre des mesures pour la protection de l'espèce et de son habitat. Les premières mesures se sont concrétisées par la parution du décret n°83-509 du 20 Août 1983, relatif aux espèces animales non domestiques. Ce dernier a été complété par celui du 12 Avril 1995. Des mesures de conservation de l'espèce *in situ* ont été prises ensuite avec l'installation du Parc National d'El Kala et la Réserve de Bouchegouf à Guelma. En plus, le Centre Cynégétique de Zéralda en collaboration avec la Direction Générale des Forêts a adopté l'élevage en captivité du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* et sa réintroduction dans les massifs de l'Akfadou et de Collo.

Dans ce présent travail, nous nous sommes proposé de réaliser, une étude cytogénétique du cerf de Berbérie en décrivant ses chromosomes et en établissant son caryotype à haute résolution à partir de cultures de lymphocytes. Par la suite, cette étude permettra de déceler d'éventuelles anomalies chromosomiques, pouvant être la cause de mortalités embryonnaires précoces.

La première partie de cette étude est consacrée à un rappel bibliographique concernant la biologie, la phylogénie, la cytogénétique et la génomique du cerf de Berbérie.

La seconde partie a pour objet d'expliquer notre démarche expérimentale pour l'établissement du caryotype à partir de cultures de lymphocytes.

Enfin, La troisième et dernière partie est consacrée à la présentation de nos résultats. Ensuite, nous établirons une comparaison des bandes chromosomiques avec celles du cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus* et nous discuterons les points les plus importants. A la fin, les perspectives de notre travail seront évoquées.

# Chapitre 1

## Introduction



## 1. Biologie du cerf de Berbérie

### 1.2. Taxonomie et phylogénie du cerf de Berbérie

#### 1.2.1. Taxonomie du cerf de Berbérie

Le cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* (Benett, 1833) (Figure 1) est le dernier représentant des cervidés africains (Dolan, 1988; Dhoub, 1998; Amadou, 2002; Oumani *et al.*, 2004). Cette espèce est endémique en Afrique du Nord dont l'aire de répartition géographique s'étendait de l'Algérie à la Tunisie du Nord et de la côte jusqu'à l'Atlas Saharien. Des populations auraient même existées au Sud du Sahara, lorsque les conditions pluviométriques le permettaient (Figure 2). Par la suite, ces populations se sont divisées en petits groupes résiduels qui ont fini par disparaître (Salez 1959; Burthey, 1991). Au début du 18<sup>ème</sup> siècle, l'aire de répartition géographique du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* se limitait à l'Est de Tébessa dans la région de Djbel Onk, ainsi que dans la forêt de l'Edough au dessus de Annaba, et au Nord Est de la Kabylie notamment à Bejaia (Burthey, 1991). Aujourd'hui sa localisation géographique se limite au Nord Est de l'Algérie et au Nord Ouest de la Tunisie, dans un triangle délimité par Annaba en Algérie et Tabarka Ghardimou en Tunisie (Oumani *et al.*, 2004).

Le cerf de Berbérie appartient à la famille des cervidés, la sous famille des cervinés, la classe des mammifères, l'ordre des artiodactyles (les membres reposent sur un nombre paire de doigts), le sous-ordre des ongulés (les animaux marchent sur l'extrémité des doigts, garnis de sabots) et la superfamille des ruminants (Bonnet et Klein, 1991; Roger, 2003). Le cerf de Berbérie est un animal appartenant au genre *Cervus* et à l'espèce *Cervus elaphus* (Linné, 1758). Cette dernière inclue 22 sous-espèces (Ueckermann, 1987; Ohtaishie et Gao, 1990; Mhmut *et al.*, 2002), dont les plus connues comprennent *Cervus elaphus barbarus* (Benett, 1833), *Cervus elaphus hippelaphus* (Erxleben, 1877), *Cervus elaphus elaphus* (Linnaeus, 1758), *Cervus elaphus atlanticus* (Lonnberg, 1906), *Cervus elaphus scoticus* (Lonnberg, 1909), *Cervus elaphus corsicanus* (Erxleben, 1777) et *Cervus elaphus hispanicus* (Hilzhermer, 1909) (Ludt *et al.*, 2004).

#### 1.2.2. Caractéristiques des cervidés

Les cervidés sont des mammifères ruminants, herbivores dont la particularité est le port de bois sur la tête des mâles (Crigel *et al.*, 2001). On ne les rencontre que chez les cervidés, mais les plus primitifs du genre *Moschus* et *Hydropotes* n'en portent pas. Le renne fait ainsi figure d'exception, puisque la femelle porte également des bois. Ce sont des attributs sexuels secondaires, que généralement seuls les mâles arborent. Ces derniers tombent et repoussent chaque année. D'autres caractères peuvent contribuer à la caractérisation de la famille des cervidés et sont répartis sur le Tableau I. Les cervidés sont répertoriés en Amérique et en Eurasie, du Paléarctique jusqu'au Néarctique (Mahmut *et al.*, 2002). En effet, on rencontre des cervidés autochtones en Asie où ils sont apparus, en Amérique du Nord et du Sud, en Europe, dans les îles continentales Européennes et en Afrique du Nord. L'Australie et Afrique noire n'abritent pas de cervidés autochtones. Ils ont été introduits à Cuba, en Nouvelle-Guinée, en Australie, en Nouvelle-Zélande et en Nouvelle-Calédonie (Novak, 1991).

Cette famille est vaste et très diversifiée puisqu'elle comporte 17 genres et 40 espèces classées en deux grandes sous-familles (Figure 3).



Figure 1: Cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus*, une biche et un faon dans la réserve de Braptia (El Kala) (Photo du Centre cynégétique de Zéralda).

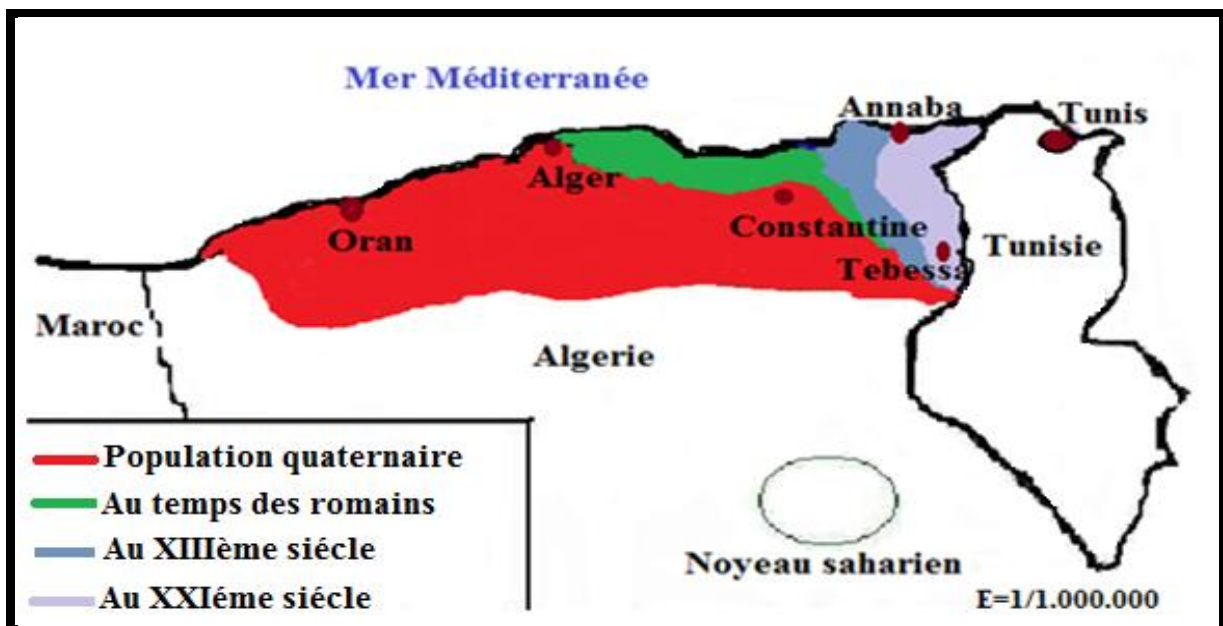
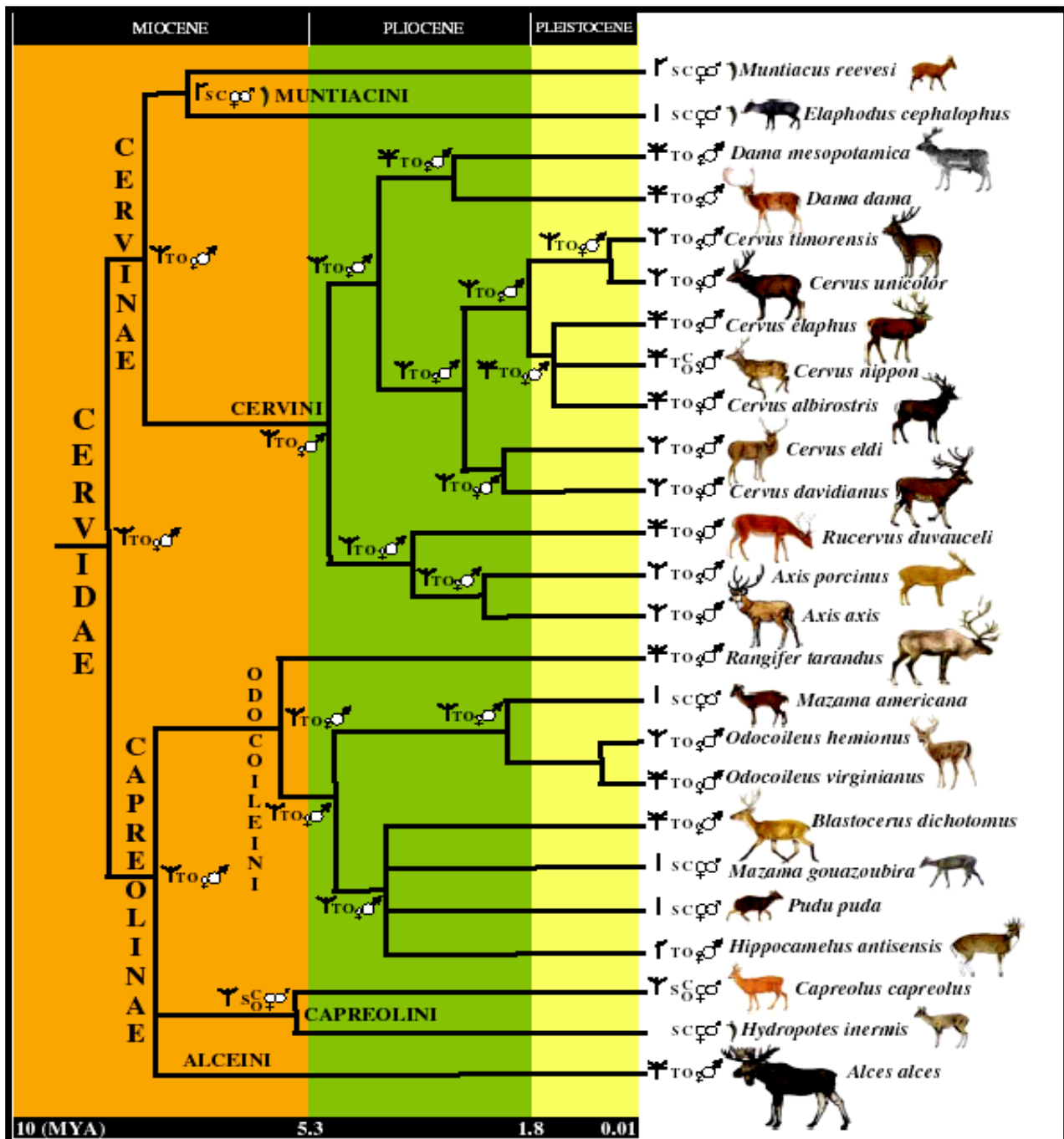


Figure 2: Répartition historique de cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* en Afrique du Nord (Burthey, 1991).



Tableau I: les principales caractéristiques des cervidés.

<p><b>Denture</b></p>	<p>La formule dentaire de la famille des cervidés est: <math>I=0/3</math> <math>C=(0-1)/1</math> <math>Pm=3/3</math> <math>M=3/3</math>, les canines supérieures sont bien développées, en forme de sabre (Roger, 2003).</p>
<p><b>Glandes</b></p>	<p>Presque tous les cervidés ont une glande faciale ou larmier, en dessous de l'œil. Une glande au niveau de la queue (le goupillon), au niveau de pattes postérieures (brosses), des glandes sébacées en regard de l'os canon des membres pelviens. Ces glandes servent à marquer leur présence, à se reproduire et à retrouver les autres congénères dans le biotope (Roger, 2003)</p>
<p><b>Le crâne</b></p>	<p>L'os lacrymal est percé de deux trous lacrymaux séparés par un pont osseux. Alors que les Giraffidés et la plupart des Bovidés n'ont qu'un seul trou lacrymal. Notons cependant qu'un Cervidé, <i>Alces</i>, ne possède souvent qu'un seul trou lacrymal (Genevieve <i>et al.</i>, 1989).</p>
<p><b>Les métatarses (c'est l'ensemble de cinq os longs du pied)</b></p>	<p>Le sillon de la face intérieure du métatarse s'enfonce profondément en tunnel à l'extrémité distale pour déboucher en vue inférieure, à mi-distance des faces antérieures et plantaire. Alors que chez les Bovidés et les Giraffidés, le sillon reste ouvert sur toute sa longueur (Genevieve <i>et al.</i>, 1989).</p>
<p><b>Autres caractéristiques</b></p>	<p>Les cervidés n'ont pas de vésicule biliaire (sauf le genre <i>Moschus</i>) et leur estomac est divisé en quatre compartiments (Rolland, 2003)</p>



**Figure 3: Classification de la famille des cervidés.** La famille des cervidés est subdivisée en deux grandes sous-familles. La sous-famille des Cervinés et la sous-famille des Capréolinés (Clément *et al.*, 2006). Les symboles sur la figure indiquent différents caractères. Nombre d'andouilles ( | : 1 cors, T : 2 cors, Y : 3 cors, X : 4 cors ou plus). Taille du corps (S: Petit, T:Grand). Monomorphisme: ♂♂, dimorphisme: ♂♂. Type d'habitat (O :ouvert, C : fermé).

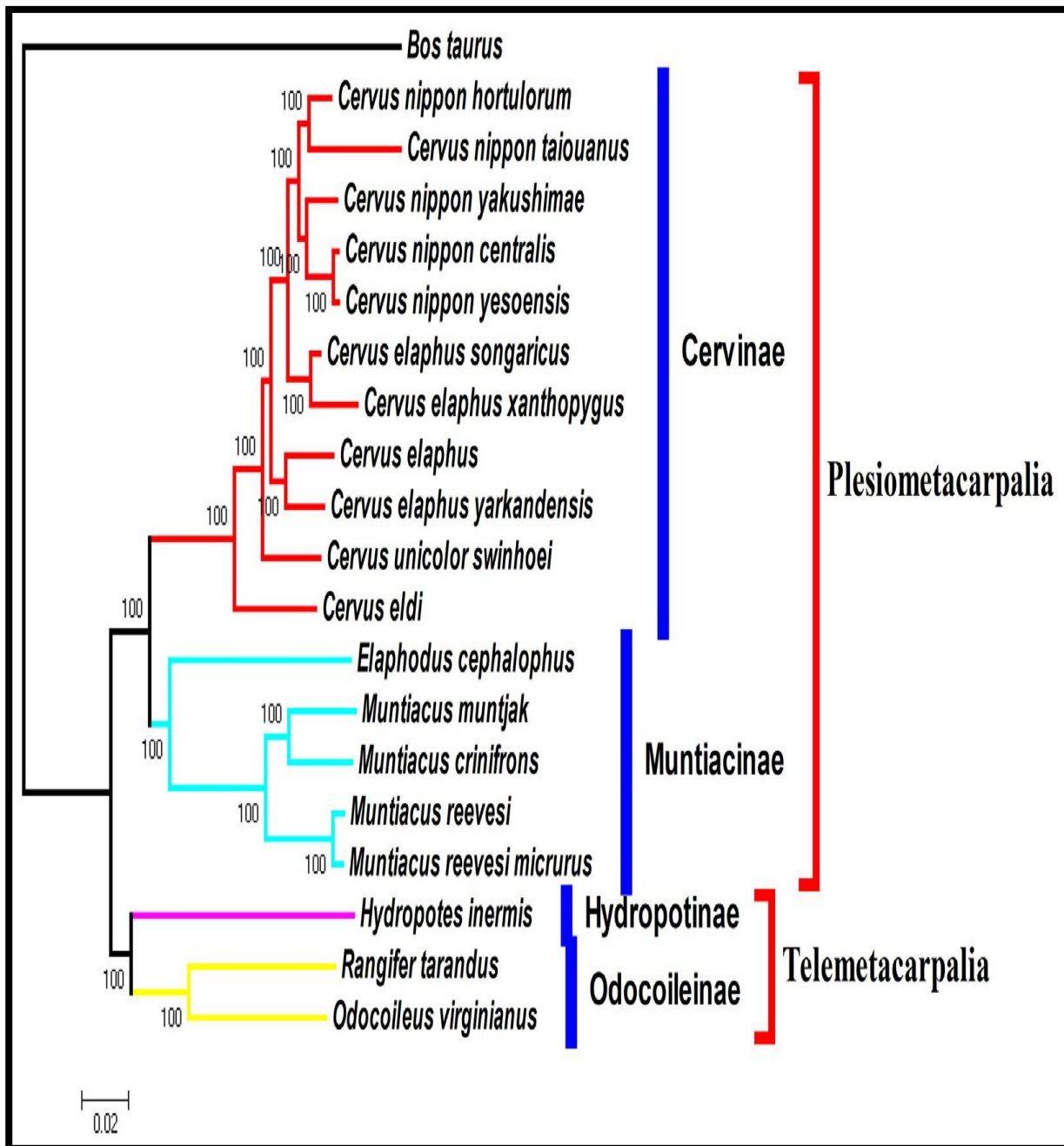


La sous-famille des Cervinés est constituée de deux tribus. Celles des Cervini regroupent le genre *Cervus*, *Axis*, *Dama*, *Rucervus* et le cerf Père David (*Elaphurus davidianus*). La tribu des Muntiacini regroupe *Muntiacus* et *Elaphodus*. La sous-famille des Capreolinés est constituée de trois tribus, comme les Capreolini (*Capreolus* et *Hydropotes*), les Odocoileini (*Rangifer*, *Mazama*, *Odocoileus* et *Blastocerus*) et la tribu des Alceini (*Alces*) (Clément *et al.*, 2006).

### 1.2.3 Phylogénie des cervidés

Les cervidés actuels sont le résultat de plusieurs millions d'années d'évolution. Leurs premiers ancêtres sont apparus il y a environ 30 millions d'années dans les forêts tropicales d'Asie durant la période de Miocène (Clément *et al.*, 2006). Les systématiciens se sont souvent basés sur des caractères morphologiques, paléontologiques et sur l'existence de croisements fertiles entre les individus pour établir les classifications. L'importance grandissante de la vision phylogénétique (ou cladistique) en systématique, aidée par les techniques actuelles d'électrophorèse des protéines ou de séquençage de l'ADN remettent en question les anciennes classifications phénotypiques. Plusieurs études moléculaires ont été effectuées sur des séquences d'ADN mitochondrial comme le cytochrome b, D-loop (régions de contrôle de la réplication) et les séquences 16s et 12s de l'ARN ribosomal (Douzery et Randi, 1997; Wang et lan, 2000; Matthee *et al.*, 2001; Hassanin et douzery, 2003; Ludt *et al.*, 2004). Ces études ont contribué à la compréhension des relations évolutives de la famille des cervidés (Ling *et al.*, 2006). En effet, une analyse phylogénétique utilisant la comparaison de séquences d'ADN mitochondrial de 33 espèces a montré que les Cervidés sont monophylétiques (groupes incluant un ancêtre et la totalité de ses descendants) (Randi *et al.*, 1998, Kuwayama et Ozawa, 2000; Polziehn et Strobeck, 2002). D'autres études des séquences nucléotidiques du cytochrome b de l'espèce *Cervus elaphus* ont aussi montré qu'elle est monophylétique (Pitra *et al.*, 2004; Kuznetsova *et al.*, 2005; Clément *et al.*, 2006; Zhang W.Q et Zhang M.H, 2012). En effet, l'espèce *Cervus elaphus* est subdivisée en quatre groupes. Le premier groupe comprend *c.e atlanticus*, *c.e hippelaphus*, *c.e hispanicus*, *c.e corsicanus* de l'Europe, *c.e barbarus* de l'Afrique du Nord et *c.e maral* de l'Iran et de la Turquie. Le deuxième groupe est constitué de *c.e actrianus* et *c.e yarkandensis* d'Asie centrale. Le troisième groupe est constitué de deux sous-espèces de la Sibérie (*c.e songaricus*, *c.e sibiricus*) et une espèce de l'Amérique du Nord *c.e canadensis*. Enfin, le quatrième groupe comprend quatre sous-espèces de Chine *c.e wallichii*, *c.e macneili*, *c.e xanthopygus* et *c.e.kansuensis* (Pitra *et al.*, 2004). Selon la localisation géographique, l'espèce *Cervus elaphus* est subdivisée en trois lignées. La lignée Ouest s'étend d'Iberia dans les îles britanniques à la Scandinavie, l'Allemagne et l'Ouest de la Pologne. La lignée Est couvrent les Balkans, en atteignant le Nord de L'Autriche, la Hongrie et la République Tchèque. La troisième lignée est limitée à la Sardaigne et le Nord de l'Afrique (Polziehn et Strobeck, 1998; Niedzialkowska *et al.*, 2011). La population ancestrale se situe dans la région du Sud-Ouest du Tarim en Asie (Ludt *et al.*, 2004). Des analyses biochimiques et moléculaires de la région de contrôle du cytochrome b de l'ADN mitochondrial (mtDNA, D-loop) des espèces de cervidés a permis de distinguer deux groupes. Les Télémétacarpies dont les vestiges osseux des deuxièmes et cinquièmes métacarpies sont situés à l'extrémité distale de l'os canon et les Plésiométacarpies dont les vestiges osseux des deuxièmes et cinquièmes métacarpies sont à l'extrémité proximale de l'os canon (Randi *et al.*, 1998; Hassanin et Douzery, 2003; Kuznetsova *et al.*, 2005). Le groupe des Plésiométacarpies concerne les Cervinés et les Muntiacinés. Le groupe des Télémétacarpies concerne les Odocoilinés et les Hydropotinés (Randi *et al.*, 1998; Randi *et al.*, 2001; Ludt *et al.*, 2004; Kuznetsova *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2006) (Figure 5). Plusieurs méthodes, y compris maximum de parcimonie (ensemble de méthodes phylogénétiques fondées sur l'utilisation d'une matrice de caractères), de vraisemblance (est une méthode statistique utilisée pour inférer les





**Figure 5:** Arbre phylogénétique des cervidés basé sur l'analyse de l'ADN mitochondrial (Zhang W.Q. et Zhang M.H., 2012). La famille des cervidés est subdivisée en deux groupes : les Plésiométacarpalia et les Télémétacarpalia.



paramètres de la distribution de probabilité d'un échantillon donné) et l'analyse des clades (c'est la construction de groupes monophylétiques dits clades qui incluent un ancêtre commun et l'ensemble de sa descendance), ont révélé que le cerf est originaire de la région située entre le Kirghizistan et le Nord de l'Inde (Ludt *et al.*, 2004). C'est en Asie que se trouve le plus grand nombre d'espèces de cervidés. Le cerf élaphe *Cervus elaphus*, serait apparu en Europe au Pléistocène moyen (entre 0.7 à 0.55 millions d'années) (Kurten, 1968; Lister, 1984, 1990, 1993). La tribu des Muntiacini qui a été considérée comme la tige primitive de tous les cervidés, a survécu en Europe il y a 15 millions d'années. Cette dernière a disparu à la fin de la période de pliocène et a été remplacée par *Eustylocerus pierensis* qui a été considérée comme étant le premier membre connu des cervidés (Vislobokova, 2008).

Plusieurs chercheurs ont montré la relation étroite existant entre les deux sous-espèces *Cervus elaphus barbarus* et *Cervus elaphus corsicanus* et indiquent qu'elles sont très proches et forment un clade à part entière (Polziehn et Strobeck, 2002; Ludt *et al.*, 2004) (Figure 4). D'autres auteurs, tout en reconnaissant la divergence de ce clade, leurs conservent le statut de sous-espèces (Pitra *et al.*, 2004). En s'appuyant uniquement sur la grande ressemblance morphologique et éthologique et en tenant compte de l'absence de fossile à l'Ouest de Tlemcen, certains auteurs pensaient que le cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* a été introduit en Afrique du Nord à travers l'isthme qui reliait la Sicile à la Tunisie (Salez, 1959). D'autres auteurs suggèrent que le cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus* dérive du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* et qu'il a été introduit par les phéniciens aux îles Tyrrhéniennes (Hajji *et al.*, 2008).

### 1.3. Description du Cerf de Berbérie

#### 1.3.1 Description morphologique

Le cerf de Berbérie est un gibier de grande taille, dont la couleur du pelage est brun clair tirant sur le roux en été et brun foncé tirant sur le gris en hiver, avec des macules blanchâtres plus au moins visibles, disposées souvent en ligne longitudinale sur les flancs (Dolan, 1988; Geist, 1998). Ceci démarque nettement le cerf de Berbérie du cerf d'Europe. L'observation des tâches est très fréquente chez la femelle (Figure 7). Chez le mâle, les tâches sont plus rares, absentes ou peu apparentes (Figure 6). Le ventre et la partie fessière sont de couleur claire. La queue est courte, les membres sont fins et musclés, la tête fine et allongée avec des oreilles bien développées, garnies à l'intérieur de longs poils clairs. Le mâle mesure 120-140 cm de hauteur au garrot pour un poids de 140-200 kg. La femelle plus petite est caractérisée par une hauteur au garrot de 100 à 110 cm pour un poids de 120 à 140 kg (Burthey, 1991). Le poids du cerf varie considérablement selon l'âge, le sexe, la région, la qualité du milieu, la saison (abondance de nourriture), la sous-espèce et aussi selon la période de reproduction pour les mâles et l'allaitement pour les femelles (Drion *et al.*, 2003). Le cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* ressemble beaucoup au cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus* mais il est moins lourd (Salez, 1959) (Tableau II).

**Tableau II:** Comparaison morphologique entre le cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* et le cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus*.

Espèce	Référence	Longueur (cm)	Hauteur au garrot (cm)	Poids (Kg)
Cerf de Berbérie	Muller et Hajib (1996)	120-200	120-140	120-140
Biche de Berbérie		120-140	100-110	100-110
Cerf d'Europe	O.N .C (1984)	175 -240	125-145	110-180
Biche d'Europe		160-200	90-125	80-110



**Figure 6: Cerf de Berbérie de sexe mâle dans le Parc Zoologique de Ben Aknoun (Laboratoire de Génétique du Développement).**



**Figure 7: Des femelles de cerf de Berbérie dans la réserve de Braptia (Photo du Parc National d'El Kala).**



### 1.3.2 Ramure (Trophée)

Les bois sont la principale caractéristique des cervidés. Ce sont des ramifications osseuses à renouvellement annuel, dérivées de l'os frontal riches en calcium et en phosphore (Bubenick, 1989; Kierdorf. U et Kierdorf. H, 2001; Molnar, 2007; Gyurjan *et al.*, 2007). Contrairement aux cornes des bovidés qui sont des productions vivantes et pérennes protégées par une gaine de kératine, les bois des cervidés sont des organes osseux pleins et caducs présents sur la tête des mâles. Seuls les rennes femelles (*Rangifer tarandus*) portent des bois (Kierdorf. U et Kierdorf. H, 2001). Les cerfs perdent leurs bois aux mois de Février-Mars. La blessure formée sur le pivot (protubérance frontale de nature osseuse) est le point de départ de la croissance des nouveaux bois. Durant leur croissance, ils sont recouverts d'une peau richement irriguée par des vaisseaux sanguins (bois en velours). A la fin de la croissance des bois aux mois de Juillet-Août, parfois jusqu'au mois d'Octobre en fonction de l'âge de l'animal, le taux de testostérone augmente dans la circulation sanguine. Ceci entraîne un arrêt de la vascularisation de la ramure et la perte des velours par frottement contre les branches et les troncs d'arbustes (Rolf et Fisher, 1996). La croissance des bois est influencée par l'état nutritionnel de l'animal et elle est retardée en cas de restriction alimentaire. Elle dépend aussi de l'entraînement photopériodique (Suttie *et al.*, 1985; Suttie *et al.*, 1989; Suttie *et al.*, 1995a, Webster *et al.*, 1999). Les premiers bois apparaissent vers l'âge de 9 mois sur la tête du mâle. A un an, ils sont visibles et le mâle est appelé daguet (il a 2 dagues). Le cerf de Berbérie porte des bois spécifiques caractérisés par l'absence du sur-andouiller (Figures 8 et 9). Les merrains ont une longueur de 80 à 120 cm, de couleur marron avec des extrémités blanches et perlées. Les bois les plus forts sont de 16 à 18 cors avec un poids d'environ 3.5kg (Kacem et Muller, 1994). La morphologie des bois est en partie sous contrôle génétique et leur développement chez les jeunes cerfs est plus rapide que chez les adultes (Crigel *et al.*, 2001; Rolland, 2003; Roger, 2003). La fonction des bois est sujette à de nombreuses spéculations. Les bois déterminent en grande partie la place hiérarchique d'un cerf et donc ses chances de reproduction. Un cerf dominant perd son rang et son harem s'il est décoiffé. Les bois servent principalement à l'expression du statut social, aux combats entre les cerfs mâles ou contre les prédateurs et comme organe dissipateur des phéromones (Roger, 2003; Drion *et al.*, 2003). Le rôle potentiel de la ramure dans le contrôle de la température corporelle a été démenti par plusieurs études (Crigel *et al.*, 2001).

### 1.4. Nomenclature du cerf élaphe

Une femelle est dite Faon jusqu'à l'âge d'un an, Bichette entre un à deux ans, puis Biche au delà de cet âge. Un mâle est nommé Faon jusqu'à l'apparition de ses pivots vers six mois, au-delà et jusqu'à l'âge d'un an c'est un hère. Après un an, il porte des bois, il se dénomme Daguet, puis devient Cerf à 4 cors (andouillers), 6 cors, etc.

### 1.5. Régime alimentaire

Le cerf comme la majorité des espèces ruminantes, possède un appareil digestif volumineux avec un estomac à quatre compartiments. L'absence de la vésicule biliaire est compensée par la présence d'une large gamme de bactéries spécialisées pour scinder une partie des macromolécules de cellulose en éléments simples réutilisés dans la fabrication des protéines (Hofmann, 1989). Le cerf présente une activité alimentaire crépusculaire mais qui peut s'effectuer tant de jour que de nuit. Les dérangements humains provoquent une activité beaucoup plus nocturne. Le choix de son alimentation suit le cycle saisonnier de la végétation. En effet, le cerf adapte son régime aux disponibilités alimentaires du milieu fréquenté. Ce régime se compose de plus de 60% d'herbacées



Figure 8: Les bois du cerf de Berbérie (Photo prise au musée d'El Kala).

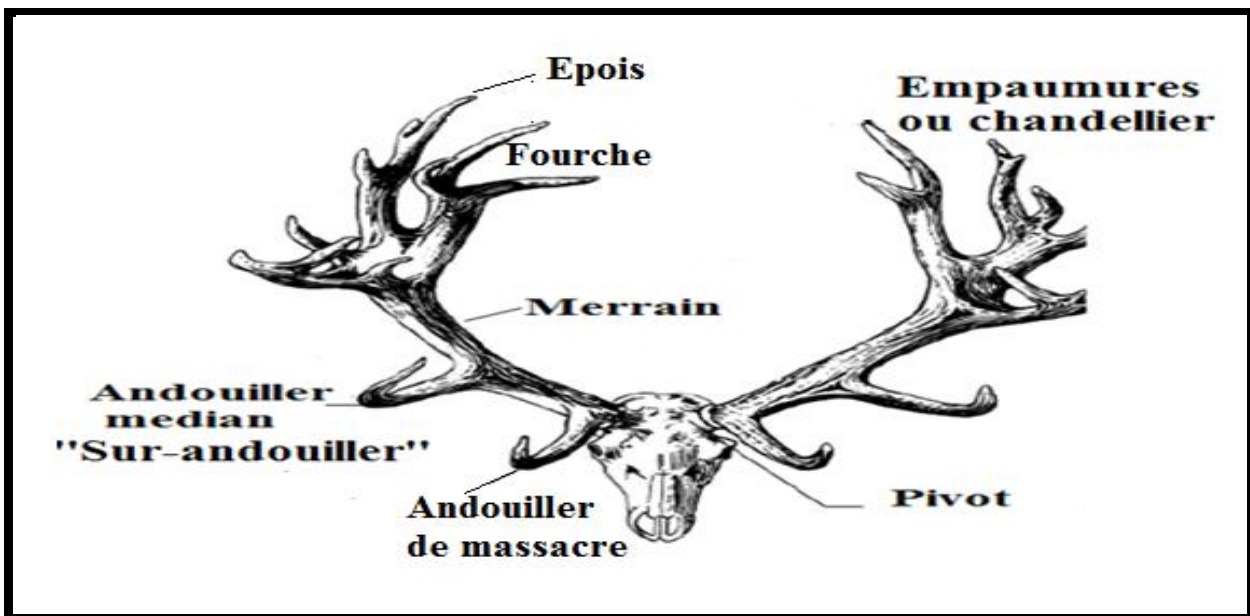


Figure 9: Structure détaillée des bois du cerf (Crigel *et al.*, 2001). Le merrain compose l'axe des bois et il est directement en prolongement avec la protubérance osseuse frontale (pivot). Les andouillers, ou cors, se détachent le long du merrain, ont une disposition constante et se dirigent généralement vers l'avant. Le bois peut présenter plusieurs types d'andouillers, soit deux formant une enfourchure, soit au moins trois cors qui forment ainsi une empaumure. Les cors ont nommés épois.



et graminées. La consommation d'herbacées monocotylédones et d'arbres reste majoritaire (80%). Celle des graminées est maximale au printemps (36%) et minimale en été (14%). Ceci coïncide avec l'explosion puis le dessèchement de la végétation herbacée. En hiver, le cerf se retourne vers des espèces arbustives qu'il délaisse le reste de l'année (*Erica arborea*, *Calycotome spinosa*, *Cytisus triflorus*, *Rubus ulmifolius*, *Hedera helix*). Cet animal utilise peu les arbres en dehors de l'été. Le rôle des zénaies est non négligeable en période critique (Burthey, 1991). Ainsi, les feuilles de chêne zeen (*Quercus faginea*), de chêne liège (*Quercus suber*), de chêne vert et de chêne kermès ne sont pas dédaignées (Kacem et Muller, 1994).

### 1.6. Reproduction

Comme de nombreux mammifères, la plupart des cervidés présentent un caractère saisonnier de leur fonction de reproduction qui se traduit par une alternance entre des périodes d'activités et d'inactivité sexuelles. Ces dernières sont dictées par des rythmes photopériodiques (variation de la période du jour). La saison d'accouplement ou brame débute vers la mi-Septembre et dure environ un mois. Avant le rut, les hardes d'été de cerfs se séparent. Ceci est lié à l'augmentation de leurs inquiétudes, leurs agressivités, leurs incompatibilités d'humeur et leurs envies d'agression à l'encontre des autres congénères du groupe. Cette agressivité avant le rut est liée à l'augmentation de la testostérone dans la circulation sanguine (Roger, 2003). La période de rut est marquée par le cri rauque retentissant du mâle, le raire. Par ce cri qui s'étend à plusieurs kilomètres, le mâle avertit les femelles réceptives de sa présence et intimide ses concurrents. Il devient agressif pendant cette période. Les mâles entrent les premiers en rut et fécondent la première femelle en chaleur, souvent la plus âgée. Le cerf est polygame. Un cerf de plus de 3 ans, en bon état peut assurer la saillie de trente femelles. La gestation dure environ huit mois (233 jours) et la mise bas a lieu entre le mois d'Avril et le mois de Juin. La biche met au monde un faon, rarement deux. Le nouveau né a une jolie livrée mouchetée qu'il perd dès l'âge de 3 mois (Figures 10 et 11). La mise bas dure en général de trente minutes à deux heures. La lactation peut dépasser 150 jours et pourrait même se poursuivre jusqu'à 260 jours (Roger, 2003). Chez les cervidés, il semble que le principal mécanisme d'entrée en saison sexuelle soit dépendant des variations photopériodiques et de sécrétions de la mélatonine (Drion *et al.*, 2003; Locateli et Mermillod, 2005). Le facteur le plus important conditionnant la fertilité est le poids lors de la période de reproduction. Il est possible de définir un poids minimum en dessous duquel la fertilité est nulle (52Kg) (Thimonier et Semper, 1989). Les biches se reproduisent généralement à partir de l'âge de trois ans jusqu'à l'âge de treize ans. Les mâles de l'âge de six ans jusqu'à 12 ans. Dès le stade de daguet, ils peuvent féconder des femelles isolées ou en œstrus tardif (Roger, 2003).

### 1.7. Comportement

Le cerf est une espèce grégaire et sédentaire vivant en harde qui évolue au cours de l'année. Les groupes de cerfs sont de petite taille et sont composés le plus souvent de deux à trois individus et atteignent rarement cinq. Le comportement grégaire varie selon les saisons, c'est surtout en hiver et au printemps que les cerfs de Berbérie se regroupent. Les hardes femelles sont plus en vues que les groupes des mâles et des mixtes quelle que soit la saison. En été, il se produit un éclatement des groupes se traduisant par une fréquence accrue des animaux solitaires (Oumani *et al.*, 2007). Les cerfs sont surtout crépusculaires. Ce mammifère possède une organisation très marquée de type matriarcal dans laquelle, la cohésion familiale la plus étroite s'observe dans la cellule de base composée de la biche, de son faon et souvent du daguet ou bichette (Fichant, 1976).



Figure 10: Faon du cerf de Berbérie au Musée d'El Kala.



Figure 11: Faon de 1 mois et demi (Photo prise à la réserve de chasse de Zéralda le 02-06-2009) (Laboratoire de Génétique du Développement).



### 1.8. Indices de présence

Ces indices révèlent la présence de l'espèce dans un biotope. Comme le cerf est un animal craintif et discret, il est donc important de chercher quelques indices pour se rendre compte de sa présence tels que: Des empreintes, les fumées, l'écorçage, l'abroutissement et le frottis (Roger, 2003).

### 1.9. Longévité et mortalité

Le cerf vit plus de vingt ans sans intervention de l'homme. Il peut vivre jusqu'à 25 ans en captivité, âge qu'il n'atteint jamais à l'état sauvage où les individus dépassant les 15 ans sont rares (Roger, 2003).

### 1.10. Répartition géographique

Le biotope spécifique du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* est le maquis, les forêts de chêne liège (*Quercus suber*) et de chêne zeen (*Quercus faginea*) de l'Afrique du Nord (Kacem et Muller, 1994). En Algérie, il est cantonné actuellement dans les réserves de Béni Salah (Guelma) situées au Nord Est de l'Algérie et au Parc National d'El Kala qui est situé à la frontière Algéro-Tunisienne. On le trouve aussi dans les massifs de Oued Bechih et Boumézrane (wilaya de Souk - Ahrass) situés au Nord- Est de l'Algérie (Figure 12) (Lahmar et Gouichiche, 2004). En Tunisie, les cerfs capturés ont été répartis dans les réserves de faune d'Ain Beccouche (110ha) près de Tabarka (Khroumirie), de Mhébes (382ha) près de Sedjenane (Mogods). Ils sont installés dans un enclos d'élevage et d'exposition (3ha) au Feïdja ainsi qu'au Parc Zoologique de la ville de Tunis (Gouichiche, 2006)

### 1.11. Statut et conservation

#### a- Les menaces d'extinctions

La population *Cervus elaphus barbarus* endémique de l'Afrique du Nord est menacée de disparition. Cette régression est due essentiellement au braconnage. Il existe un marché important pour les parties du cerf tels que la venaison et les bois en velours qui sont utilisés en médecine traditionnelle comme remède (Figures 13 et 14). Les incendies répétés, la réduction et le morcellement de l'habitat par l'ouverture des routes et des pistes, l'urbanisation, le feu, la prédation par les chiens et la contamination par les maladies et les parasites du bétail (lorsqu'il y a chevauchement dans le territoire) ont grandement participé à la réduction des effectifs de cette espèce (Crown et Holloway, 1973; Dolan, 1988; Oumani, 2006; Lovari *et al.*, 2009). En plus, l'absence de plan de gestion, la mauvaise connaissance de l'écologie et de l'éthologie de l'animal, le manque de suivi rigoureux, l'absence de coordination entre l'Algérie et la Tunisie a provoqué le déclin de cette espèce.

#### b- La Taille de la population

En Algérie, le nombre de cerf de Berbérie s'élevait de 300 à 400 têtes au début des années 50 avant la guerre d'indépendance et de 400 à 600 têtes au milieu des années 70 (Salez, 1959; Wemmer, 1998). L'aire de répartition aurait diminué au 20<sup>ème</sup> siècle (Kacem, 1986; Dolan, 1988). En 1960, la population restante de cerf de Berbérie a été estimée à 200 à 300 individus dont une dizaine se trouvaient en Tunisie (Burthey *et al.*, 1990). Dans les années 1980, la population du cerf

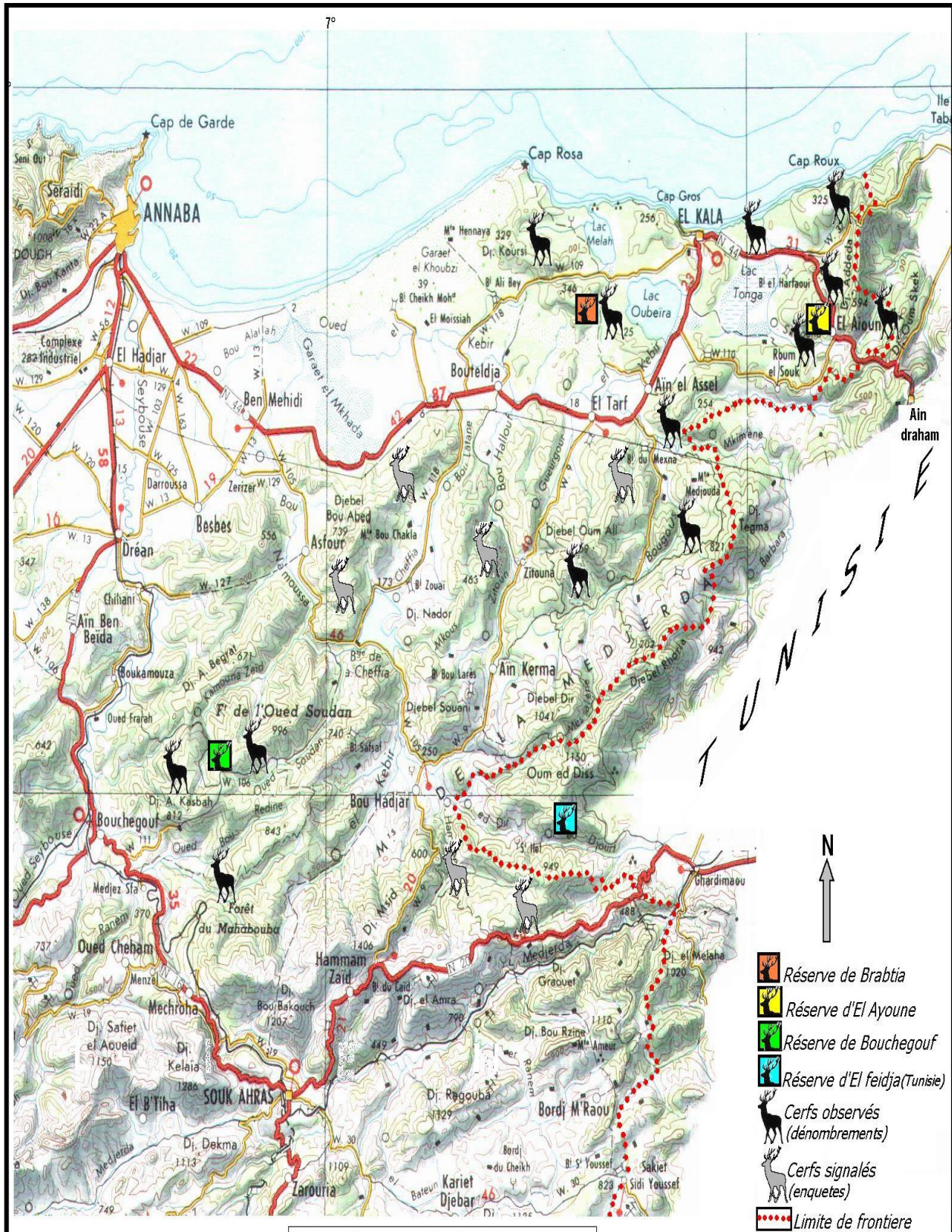


Figure 12 : Localisation des populations du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* dans les différentes réserves naturelles en Algérie. Echelle: 1/500.000 (Lahmar et Gouichiche, 2004).



**Figure 13: Crâne d'un cerf tué par les braconniers.** Réserve de Bouchegouf, Guelma. (Laboratoire de Génétique du Développement, le 24-04-2012).



**Figure 14: Crâne d'un cerf tué par les braconniers.** Réserve de Bouchegouf, Guelma. (Laboratoire de Génétique du Développement, le 24-04-2012).



de Berbérie avait considérablement augmentée en Algérie (Kacem, 1986; Dolan, 1988). Il est possible de trouver dans le maquis de l'Algérie des densités de l'ordre de 30/40 cerfs au Km<sup>2</sup>. La population totale en Algérie a été estimée à environ 2000 têtes (Dolan, 1988). Aucune estimation précise des effectifs n'a été réalisée avant 1988, en dehors de quelques battues échantillons réalisés par la société bulgare Lescomplekt (1988) donnant un (1) cerf aux 100 ha dans la forêt d'Oum Sekak (Wilaya d' El Taref) près de la frontière Tunisienne et quatre (4) aux 100 ha dans la réserve naturelle des Beni-Salah (Wilaya de Guelma). Durant les années 2004 à 2006, la population était de 50 à 60 individus selon l'estimation des services techniques de l'administration des forêts en Algérie. En Tunisie, les estimations préliminaires des effectifs du cerf de Berbérie donnent une certaine idée de l'effort de la Direction Générale des Forêts dans la sauvegarde de cette espèce. Ils ont dénombré une dizaine d'individus en 1960 (ONC, 1991), 2000 individus en 1994 (DGF, 1994) et 3000 en 1996. Alors que la taille totale de la population en 2006 est estimée à environ 800 individus (Oumani, 2006). Au Maroc, la population du cerf de Berbérie est éteinte. La réintroduction du cerf de Berbérie au Maroc a été effectuée à partir de la population Tunisienne. Un premier lâcher a été réalisé en 1989 dans la réserve de faune de Kissarit (Azrou) à partir d'animaux capturés à Feidja (1 cerf et 6 biches). En Mars 1994, six cerfs (2 mâles et 4 biches) étaient relâchés au Parc National de Tezakka avec l'assistante technique Allemande (GTZ) (Gouichiche, 2006).

### c- Elevage en captivité

La conservation de l'extinction de cette espèce nécessite à la fois deux types de mesures de conservation. En effet, la conservation *ex-situ* c'est-à-dire en dehors de l'habitat naturel, constitue la première démarche à accomplir pour sauvegarder le cerf de Berbérie. De nombreuses infrastructures de base ont été mises en place pour accueillir la population de cerf dont la provenance avait diverses origines. En effet, le Centre Cynégétique de Zéralda a adopté l'élevage en captivité de cette espèce depuis 1995. Le noyau de cerfs existant a été constitué à partir d'animaux captifs de diverses provenances (Réserve de chasse de Mascara, Parc Zoologique de Ben Aknoun et le Parc National d' El Kala). Cette unité a permis la multiplication de l'espèce (Figure 15). Au bout de dix années d'élevage en captivité, l'opération de lâcher, première du genre en Algérie en ce qui concerne les grands mammifères, a été effectuée avec succès dans les forêts d'Akfadou (Wilaya de Bejaia) en 2005 et en 2006 et au Collo (Wilaya de Skikda) en 2008. Les objectifs fixés par le Centre Cynégétique de Zéralda n'ont pas été atteints pleinement puisque le taux de mortalité au niveau des enclos est élevé. Sur huit années, 16 mortalités ont été constatées. Il est envisagé de recourir à la multiplication du cerf en semi-liberté. Le Parc Zoologique de Ben Aknoun a adopté aussi l'élevage en captivité du *Cervus elaphus barbarus*. L'origine de ces populations est la même que celle du Centre Cynégétique de Zéralda. Cet élevage a commencé avec quatre (4) individus (deux couples) en 1982-1984. Actuellement le nombre de cerfs est de 11 individus (3 mâles et 8 femelles) (Figure 16).

### d-Conservation *in situ*

Quel que soit l'intérêt de sauvegarde des espèces menacées avec à des mesures de préservation *ex-situ*, seule la préservation de leurs habitats est susceptible, dans le long terme de donner de bons résultats. Actuellement nous assistons à une diminution sensible de l'aire de répartition de cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus*. En Algérie, un premier intérêt a été manifesté pour la préservation de cette espèce *in situ* par la création de la **réserve de Béni-Salah (Réserve de Bouchégouf)**, située au Nord Est de l'Algérie (Guelma) dans le cadre d'une coopération Algéro-



**Figure 15: Cerfs de Berbérie et des biches du Centre Cynégétique de Zéralda (Photo du Centre Cynégétique de Zéralda).**



**Figure 16: Cerfs de Berbérie et des biches du Parc Zoologique de Ben Aknoun (Laboratoire de Génétique du Développement).**



Canadienne (Figure 17). En 2010, la Conservation des Forêts de Guelma a dénombré 50 cerfs de Berbérie à l'intérieur de la réserve et 40 individus à l'extérieur (Lahmar et Gouichiche, 2004).

**La réserve de Braptia** qui est incluse dans le Parc National d'El Kala. Elle est entièrement clôturée et a été destinée à la multiplication du cerf de Berbérie depuis 1976 (Figure 18). Les résultats obtenus au niveau de cette réserve sont encourageants et nécessitent un renforcement des capacités humaines et matérielles. En effet, depuis l'introduction du premier couple de cerf dans la réserve en 1989, l'évolution de la croissance des effectifs est régulière (Lahmar et Gouichiche, 2004).

**La réserve d'El Aioun** a été créée dans le cadre du projet GEF-Banque Mondiale. Elle est constituée d'un enclos de 220 hectares situé dans la zone de Koudiat el Ouahch au Nord de l'agglomération d'El Aioun (Figure 19) (Lahmar et Gouichiche, 2004).

**Les massifs de Ouled Bechih et de Boumézrana** (Willaya de Souk Ahras). Ces massifs correspondent à la limite Sud de la répartition du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus*. Ils sont caractérisés par des peuplements de chêne zeen (Figure 20) (Lahmar et Gouichiche, 2004).

En Tunisie, le gouvernement Tunisien a entrepris des mesures urgentes afin de garantir la sauvegarde de cette espèce. Ces mesures ont été concrétisées en 1963 par le classement des forêts fréquentées par les cerfs le long de la frontière Tuniso-Algérienne, en réserves ou toutes sortes de chasses sont strictement interdites. En parallèle, des aménagements visant l'amélioration de l'habitat du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* ont été réalisés. La création d'une réserve à El Feidja en 1966, a permis la réintroduction des cerfs dans différentes réserves entre 1978 et 1992, comme à Ain Baccouch et à Mhebès et même au Maroc en 1992 (Lahmar et Gouichiche, 2004).

### e-Statut de la sous-espèce

Plusieurs mesures de protection ont été entreprises pour assurer la pérennité de cette espèce. En effet, le cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* est hautement protégé en Algérie et sa chasse avait été interdite par la loi Française du 16/12/1929 et 09/06/1937. Après l'indépendance, l'Algérie a adhéré à plusieurs conventions internationales dont la convention pour la protection et la conservation de la nature signée à Alger en 1968. Ce n'est qu'en 1983 que le cerf est totalement protégé en Algérie par le décret n°83-509 du 20 Août 1983, relatif aux espèces animales non domestiques protégées. Plusieurs textes ont été aussi consacrés comme la loi n° 03-10 du 19 Juillet 2003 relative à la protection de l'environnement dans le cadre du développement durable et la loi n° 04-07 du 01 Août relative à la chasse ainsi que l'ordonnance n° 06-05 du 19 Juillet 2006 relative à la protection et à la préservation de certaines espèces animales menacées de disparition.

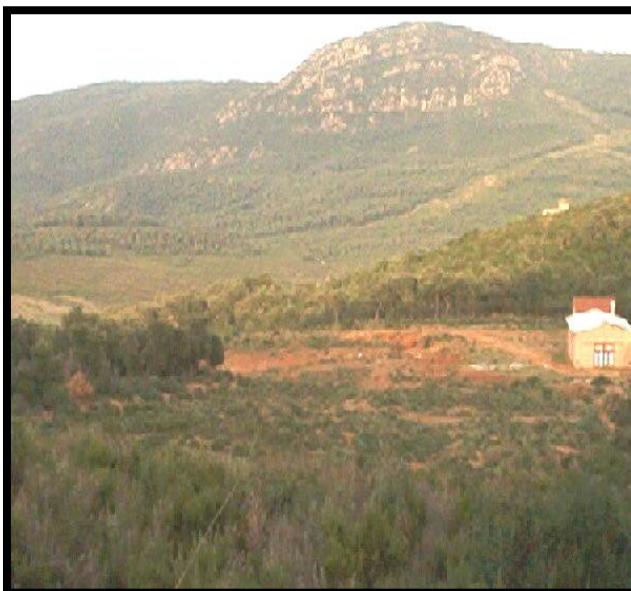
En Tunisie, le cerf est protégé depuis 1963 par l'article 7 de l'arrêté de la chasse. En plus, la création dans les années 60 d'une réserve naturelle d'El Feidja a permis la propagation de cette espèce, qui selon la DGF est estimé à 2000 individus. Par ailleurs, l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) a classé le cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* dans le tableau C de la conservation africaine de 1969, dans ces termes « ne peut être chassé ou capturé que sur autorisation de la plus haute autorité compétente dans l'intérêt national ou dans un but scientifique ». En 2000, l'UICN a classé l'espèce dans la catégorie LR (Lower Risk), faible risque d'extinction (Wemmer, 1998). En effet, en 1994, la Direction Générale des Forêts Tunisienne a publié un rapport dans lequel la taille de la population de cerf était de 2000 individus. Selon ce rapport l'espèce a été enlevée de la liste rouge de l'UICN. L'espèce figure aussi sur l'annexe III de la convention sur le commerce international des espèces de faune et de flores sauvages menacées d'extinction (CITES).



**Figure 17: Réserve naturelle de Bouchegouf (Guelma)**(Laboratoire de Génétique du du Développement, le 24-04-2012)



**Figure 18: Réserve de Braptia** (Photo du Centre Cynégétique de Zéralda).



**Figure 19: Réserve d'El Aioun** (Photo du Centre Cynégétique de Zéralda)



**Figure 20: Massifs de Ouled Bechih et de Boumezrana** (Photo du Centre Cynégétique de Zéralda)



## 2. Cytogénétique des cervidés

### 2.1. Historique

C'est après la découverte du choc hypotonique par Hsu en 1952 que l'étude des chromosomes en cytogénétique classique a pu se développer. La formule chromosomique humaine a été établie en 1959 par Tijo et Levan (Tjio et Levan, 1956). Ensuite les études du caryotype se sont étendues à de nombreux mammifères (Hsu, 1952; Matthey, 1973). Aussi, la caractérisation précise des chromosomes a connu un véritable essor dans les années 70 lors de l'apparition des premières techniques de bandes chromosomiques qui a permis, par la suite, de passer du caryotype en coloration conventionnelle au caryotype en bandes (Carspersson *et al.*, 1970; Dutrillaux et Lejeune, 1971; Sumner *et al.*, 1971; Seabright *et al.*, 1971). Celui-ci est beaucoup plus précis et permet de détecter la présence d'anomalies chromosomiques (Dutrillaux, 1973; Popescu, 1990; Hayes, 1993; Ladjali *et al.*, 1995; Vassart *et al.*, 1995).

Les chromosomes sont constitués d'une molécule d'ADN associée à de nombreuses autres molécules, principalement des histones. Le degré de compaction de l'ADN varie au cours du cycle cellulaire. La métaphase représente l'étape où les chromosomes sont individualisés. Expérimentalement, les chromosomes en métaphase sont obtenus après l'addition de la colchicine qui inhibe la formation du fuseau mitotique et empêche la progression de la mitose vers l'anaphase. Les cellules sont mises en milieu hypotonique afin de faciliter la dispersion des chromosomes. Ensuite, ces préparations sont traitées, fixées et étalées sur les lames (Comings, 1978).

Actuellement, le développement des techniques de biologie moléculaire permet d'identifier, d'isoler et de séquencer des fragments d'ADN. Il est alors non seulement possible d'identifier des gènes, mais aussi de les associer à des régions chromosomiques précises. Ainsi, la localisation de gènes importants par leur fonction biologique, a permis de construire les cartes physiques chromosomiques de l'homme et des animaux domestiques (Hayes, 1993; De Sario Albertina *et al.*, 1995; Ladjali Mohammedi *et al.*, 2001).

### 2.2. Principes des techniques de cytogénétique

Chez les mammifères, les lymphocytes B et T sont les seules cellules du sang susceptibles d'être transformées en cellules actives et proliférantes. Cette transformation de lymphoblastes est induite *in vivo* par des antigènes et peut être stimulée *in vitro* par des lectines. Les lymphocytes peuvent être mis en culture à partir du sang total, ou après séparation par centrifugation en gradient de densité (Boyum, 1968; Moorhead *et al.*, 1960). La culture de fibroblastes est difficile à réaliser sur des animaux adultes car la biopsie peut causer des arrêts cardiaques. La durée de la culture cellulaire est variable et dépend du type cellulaire et de la quantité du matériel biologique disponible au départ. L'accumulation des cellules en métaphase se réalise par l'adjonction de la colchicine. Cette dernière inhibe la formation du fuseau achromatique, ce qui empêche la progression de la mitose vers l'anaphase. Les cellules sont ensuite mises en milieu hypotonique, afin de les faire gonfler, puis fixées et enfin étalées sur les lames. Quelques heures plus tard, les méthodes de marquages peuvent être utilisées (Caspersson *et al.*, 1970; Ladjali *et al.*, 1995).

#### 2.2.1. Synchronisation des cellules

La culture cellulaire permet d'obtenir des préparations chromosomiques à différents stades de condensation. En métaphase, les chromosomes sont compacts et courts, avec pour conséquence une diminution du nombre de bandes révélées par les techniques de marquages. L'identification des chromosomes est plus facile et plus exacte si le nombre de bandes révélées est plus grand et la



définition de leur motif est meilleure. La synchronisation des cellules, à l'aide de la thymidine (précurseur de la thymine), l'améthoptérine, l'aminoptérine et le 5-Fluoro-2'-déoxyUridine (FdU) permet d'accumuler un maximum de cellules au stade de prométaphase. La thymidine, ajoutée en excès au milieu de culture, provoque le blocage du cycle cellulaire d'une façon réversible pendant la phase S de synthèse de l'ADN par inhibition de la synthèse de la 2'-déoxycytidine, un des triphosphates nécessaire à la réplication de l'ADN. Le traitement des chromosomes par des techniques de marquages produit des bandes ayant une haute résolution (Viegas Piquiniot et Dutrillaux, 1978; Hayes, 1993; Ladjali *et al.*, 1995).

### 2.2.2. Technique de marquage chromosomique

Les chromosomes sont de taille et de forme diverses. Ils présentent le long de leurs bras, à la suite de coloration ou de traitement particuliers, des bandes plus ou moins colorées dont la succession constitue un motif précis et reproductible. Cette propriété très précieuse permet d'identifier les chromosomes et d'établir un caryotype. Aussi, la description des remaniements chromosomiques ainsi que la localisation des marqueurs devient possible et permettant de comparer les chromosomes entre eux et entre espèces proches, ou éloignées.

#### \* Marquage de l'euchromatine

L'euchromatine est révélée par les méthodes de marquages chromosomiques produisant les bandes Q, R et G et correspondant à l'ADN transcrit. La dénomination des bandes Q (de Quinacrine), G (de Giemsa) et R (de Reverse) provient des différents types de traitements et de colorations employés. Ainsi, une succession de bandes est obtenue. Ces dernières sont soit intensément colorées et elles sont dites bandes positives, ou légèrement colorées correspondant aux bandes négatives. Les motifs des bandes Q induits par la Quinacrine résultent d'une excitation différentielle du fluorochrome selon la richesse de l'ADN en séquences AT. Les bandes R correspondent aux régions de l'euchromatine riches en GC. Elles font intervenir un traitement thermique qui dénature les segments les plus sensibles. Les motifs des bandes G sont obtenus par digestion avec à des enzymes protéolytiques comme la trypsine (Dutrillaux *et al.*, 1971; Ladjali *et al.*, 1995). Les structures mises en évidence par les différentes méthodes de coloration ont été répertoriées et classifiées selon un code de trois lettres (Tableaux III et IV). La première lettre définit le type de bandes, la deuxième la nature de la technique et la troisième le colorant utilisé (Hayes, 1993; Ladjali, 1994).

#### \* Marquage de l'hétérochromatine

L'hétérochromatine est constituée de séquences d'ADN hautement répétées qui se répliquent tardivement durant la phase de synthèse (S) de l'ADN. C'est une fraction qui ne se décondense pas durant l'interphase et qui se situe surtout dans les régions juxta-centromériques de tous les chromosomes. Elle est mise en évidence par les différentes techniques de marquages. La plus répandue est celle des bandes C qui colore les régions juxta-centromériques de tous les chromosomes (Summer, 1972). Elles sont révélées après des traitements successifs dans des conditions acides, alcalines et salines à une température élevée suivie d'une coloration au Giemsa (Coming *et al.*, 1973). Une autre technique, les bandes Ag-NOR, consiste en la coloration des organisateurs nucléolaires, situés sur les bras des chromosomes acrocentriques chez l'homme (Bloom et Goodpasture, 1976).



**Tableau III:** Techniques de marquages des chromosomes (Comings, 1978; Hayes, 1993; Ladjali, 1994).

Marquages	Principe	Auteurs
<b>Bandes G</b> (Giemsa)	Coloration de l'euchromatine riche en AT (réplication tardive, faible densité en gènes) en utilisant soit l'action de la trypsine soit une dénaturation par la chaleur des différents composés protéiques et nucléiques.	Seabright, 1971; Evans <i>et al.</i> , 1973; Schnedl et Czaker, 1974; Carlenius <i>et al.</i> , 1981; Schmid <i>et al.</i> , 1989; Ladjali <i>et al.</i> , 1995.
<b>Bandes R</b> (Reverse)	Coloration de l'euchromatine riche en GC (réplication précoce, forte densité en gènes) par dénaturation thermique.	Carlenius <i>et al.</i> , 1981; Di Berardino et Innuzzi, 1982; Hayes <i>et al.</i> , 1991; Ponce de leon <i>et al.</i> , 1992; Ladjali <i>et al.</i> , 1995.
<b>Bandes Q</b>	Coloration de l'euchromatine riche en AT par la Quinacrine ou DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole)	Bloom et Goodpasture, 1976; Gustavsson <i>et al.</i> , 1976a; Hansen, 1973.
<b>Bandes C</b> (Centromère)	Coloration de l'hétérochromatine constitutive (ADN répété, réplication tardive) par un traitement à l'hydroxyde de barium (BaOH) et coloration au Giemsa.	Evans <i>et al.</i> , 1973; Schnedl et Czaker, 1974; Carlenius <i>et al.</i> , 1981; Pollock et Fehheimer, 1976.
<b>Bandes NOR</b>	Coloration des régions organisatrices du nucléole par la méthode Ag-NOR, technique de précipitation argentique utilisant une solution de nitrate d'argent.	Di Meo <i>et al.</i> , 1991
<b>Bandes T</b>	Coloration des régions télomériques	Dutrillaux, 1973.

**Tableau IV :** Code des techniques de marquages chromosomiques (Conférence de standardisation des chromosomes humains, 1971; Hayes, 1993; Ladjali, 1994).

Code	Type de marquage chromosomique et bandes révélées
GTG	Bandes G, par action de la Trypsine, colorées au Giemsa.
GBG	Bandes G, par incorporation du 5-Bromo-2'-déoxyUridine (BrdU), colorées au Giemsa.
GAG	Bandes G, par l'action d'une solution saline, coloration au Giemsa.
CBG	Bandes C, par l'action de l'hydroxyde de Barium, coloration au Giemsa.
RFA	Bandes R, Fluorescentes, coloration par l'Acridine orange.
RHG	Bandes R, dénaturation thermique (Heat), coloration au Giemsa.
RBG	Bandes R, par incorporation du BrdU, coloration au Giemsa.
RBA	Bandes R, par incorporation du BrdU, coloration par l'Acridine orange.
RBP	Bandes R, par incorporation du BrdU, coloration à l'iodure de Propidium.
QFQ	Bandes Q, Fluorescentes, coloration par la Quinacrine.
QFH	Bandes Q, Fluorescentes, coloration au Hoechst 33258



### a) Coloration conventionnelle au Giemsa

La coloration au Giemsa représente la coloration la plus utilisée car elle permet d'avoir une idée précise de la morphologie générale des chromosomes. Le Giemsa est aussi utilisé pour la révélation des marquages induits par certains traitements de marquages chromosomiques (Couturier *et al.*, 1973).

### b) Techniques de marquages chromosomiques révélant les bandes morphologiques

Les mécanismes des différentes techniques révélant les bandes structurales reposent uniquement sur la structure intrinsèque des chromosomes qui ne nécessitent aucun traitement au préalable. Les méthodes révélant les bandes morphologiques G utilisent soit l'action d'une enzyme protéolytique, soit des conditions douces de dénaturation. Ces traitements agissent sur les liaisons stabilisant la structure des composés protéiques ou nucléiques de la chromatine (Ladjali *et al.*, 1995).

### c) Techniques de marquages chromosomiques révélant les bandes dynamiques

Les bandes R (Reverse) correspondent aux régions de l'euchromatine riches en GC (Comings, 1973; Dutrillaux et Covic, 1974). Les techniques de marquages révélant les bandes dynamiques impliquent l'incorporation d'un analogue structural de la thymidine qui est le 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU) dans l'ADN chromosomique durant la phase de synthèse de l'ADN (S) du cycle cellulaire. L'incorporation du BrdU est à peu près équivalente dans toutes les cellules récoltées. Ce type de technique est appliqué sur des cellules synchronisées pour lesquelles, la majorité des cellules sont au même stade de division. Grâce aux propriétés de photo-décomposition des segments chromosomiques ayant incorporés le BrdU, plusieurs marquages ont été développés permettant de colorer de manière différentielle ces régions. Le dessin des bandes ainsi obtenu est reproductible et caractéristique du stade pendant lequel le BrdU est ajouté et de la durée de son incorporation (Zakharov et Eglina, 1968; Ladjali *et al.*, 1995).

## 2.3. Evolution chromosomiques des cervidés

De nombreuses études cytogénétiques ont été réalisées sur de nombreuses espèces de cervidés et ont contribué à la compréhension de leurs évolutions (Gustavsson et Sundt, 1968; Goldonie *et al.*, 1984; Fontana et Rubini, 1990). Les cervidés éteints avaient un nombre diploïde de chromosomes qui varie de  $2n=6$  chez la femelle Indian muntjac *Muntiacus muntjac vaginalis* (Figure 21) à  $2n=80$  chez *Capreolus capreolus pygargus* (Wurster et Benirschke, 1970; Neitzel, 1987). Ceci les rends un groupe idéal pour l'étude de l'évolution chromosomique (Li *et al.*, 2000; Ling *et al.*, 2006). Plusieurs études ont montré que des fissions chromosomiques du caryotype chez le pecoran ( $2n=58$ ) ont abouti à la formation du caryotype ancestral de la famille des Cervidés (Slate *et al.*, 2002; Ling *et al.*, 2006). Ce dernier serait composé de 35 chromosomes acrocentriques ( $2n=70$ , FN=70). Les Télémétacarpiciens (classification de la famille des Cervidés) ont en général un Nombre Fondamental (NF) de 72 à 74 et le plus souvent 70 chromosomes. Certains genres présentent une réduction du nombre de chromosomes (*Blastocerus*  $2n=66$ ). D'autres genres possèdent des micro-chromosomes surnuméraires, tel que *Capreolus capreolus* qui possède 70 chromosomes (NF = 72) (Figure 22). Alors que *Capreolus pygargus*, peut posséder jusqu'à  $2n= 80$  chromosomes, dont 10 sont des micro-chromosomes. Tous les Plésiométacarpiciens ont un nombre fondamental de 70 chromosomes et un chromosome X qui est acrocentrique à l'exception de *Muntiacus* et d'*Elaphodus*. Ces exemples illustrent la grande variabilité des caryotypes des Ruminants.

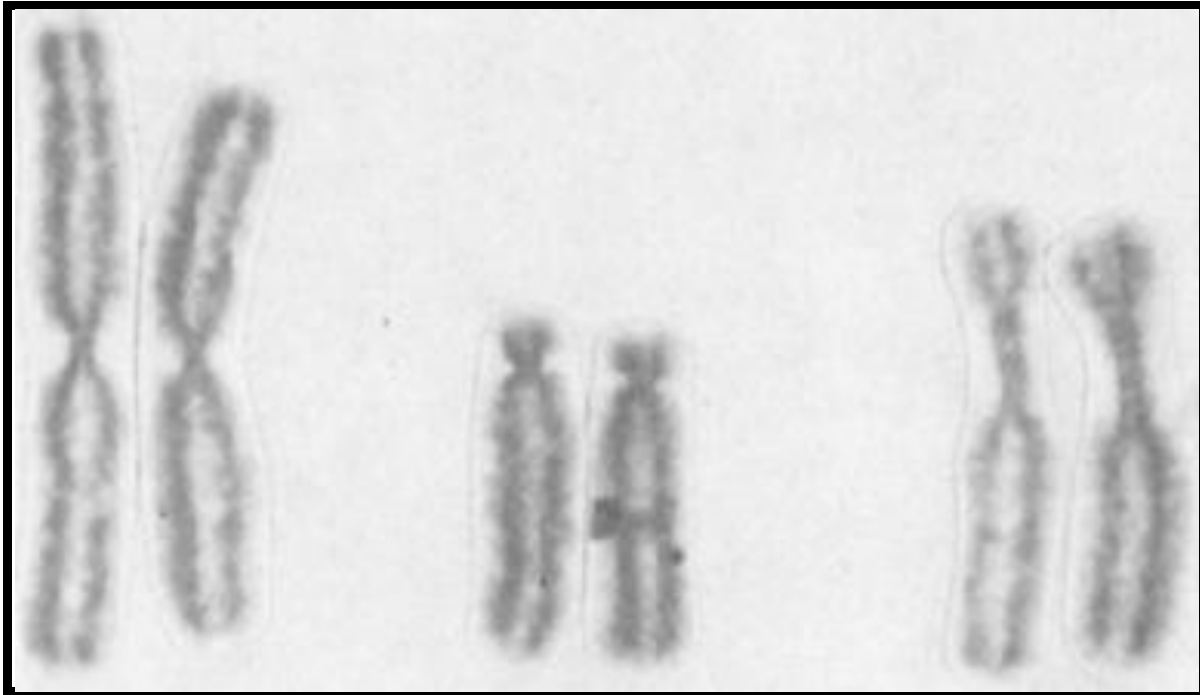


Figure 21: Caryotype en coloration conventionnelle du *Muntiacus muntjak vaginalis* ( $2n=6$ ) (Wurster et Atkin, 1972).

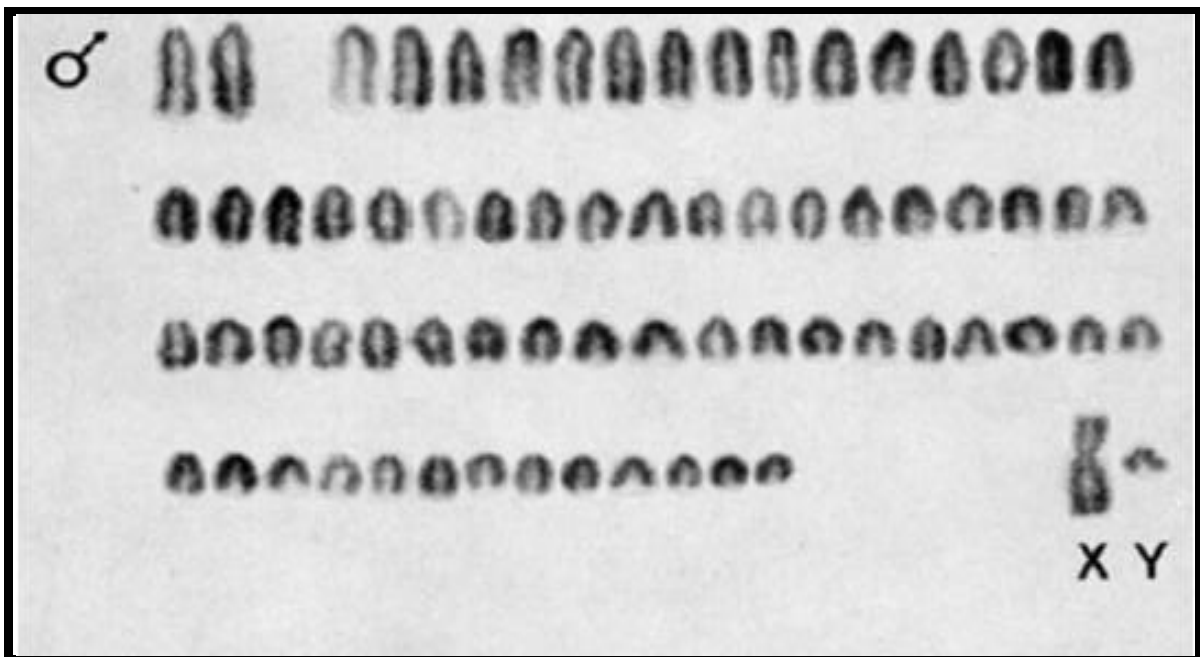


Figure 22: Caryotype en coloration conventionnelle du *Capreolus capreolus* ( $2n=70$ ) (Gustavsson et sundt, 1968).



La translocation Robertsonienne (fusion de deux chromosomes acrocentriques) est le principal réarrangement chromosomique de la sous-famille des Cervinés (Figure 23). Le nombre de chromosomes de cette sous-famille varie de 56 à 68 chromosomes avec un nombre fondamental de 70 (NF = 70) (Figures 24, 25, 26 et 27) (Bonnet *et al.*, 2003). Le caryotype de l'espèce *Cervus elaphus* comprend habituellement 68 chromosomes et ceci serait suite à la fusion de deux autosomes qui ont abouti à la formation d'une paire de chromosomes métacentriques (Neitzel; Fontana et Rubini, 1990; Bonnet *et al.*, 2003; Ling *et al.*, 2006). Pour les Oidocoilins, c'est l'inversion péricentrique qui est prédominante. Cependant la fusion des répétitions en tandem a contribué à l'évolution de la sous famille des Muntiacinés (Wurster et Benirschke, 1967b; Hsu *et al.*, 1975; Shi *et al.*, 1980; Herzog, 1987; Fontana et Rubini, 1990; Bonnet *et al.*, 2003).

#### 2.4. Caractéristiques du caryotype des cervidés

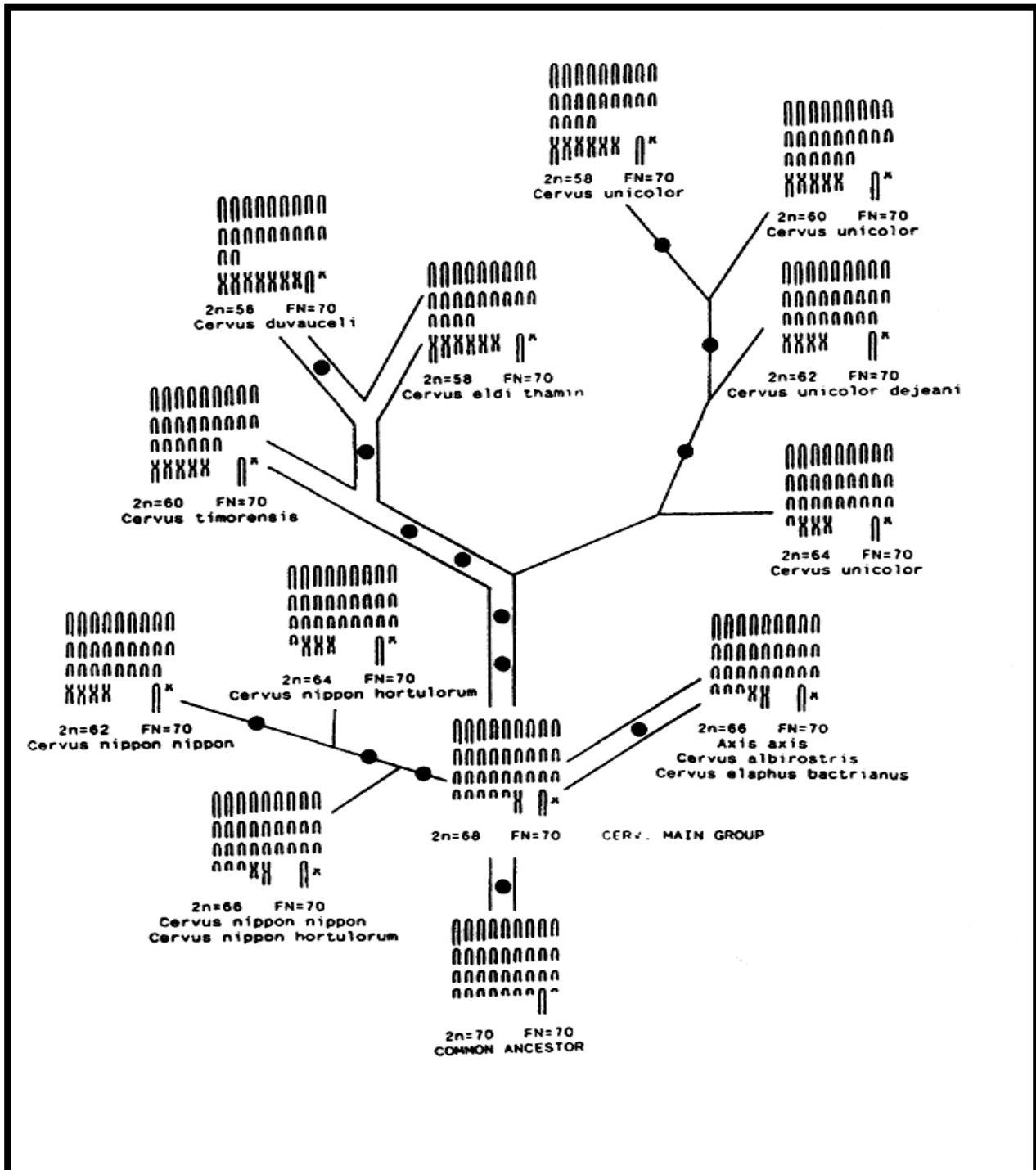
Les cervidés constituent une famille très intéressante pour l'étude de l'évolution chromosomique. Les études du caryotype en bande G de plusieurs espèces de cervinés, ont montré que la position des organisateurs nucléolaires sur les chromosomes sont communs à toutes les espèces de cervinés (Bonnet *et al.*, 2003). La sous-famille des cervinés possède généralement 68 chromosomes (NF = 70) avec 64 autosomes qui sont acrocentriques et deux autosomes métacentriques, un chromosome X acrocentrique, constituant le plus grand chromosome et un chromosome Y submetacentrique, constituant le plus petit chromosome (Herzog, 1987; Fontana et Rubini, 1990; Lee et Lin, 1996).

#### 2.5. Caryotype du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus*

Un premier caryotype du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* en bandes G et en bandes C a été proposé. Ce caryotype a été réalisé à partir de cultures de lymphocytes prélevées sur des individus de la réserve naturelle d'Ain Beccouch et du Zoo de Beldevere en Tunisie. Le nombre diploïde des chromosomes a été estimé à 68 chromosomes comme pour la plupart des membres d'autres espèces de Cervinés (Hajji *et al.*, 2008).

#### 2.6. Conservation génétique entre *Cervus elaphus barbarus* et *Cervus elaphus corsicanus*

Le cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* ressemble beaucoup au cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus*. En effet, les taxons Corsico-Sarde et Nord-Africain n'ont pas le sur-andouiller. Une étude phylogénétique basée sur des séquences du cytochrome b a montré une relation étroite entre les cerfs Sardes et de Berbérie qui forment un clade bien distinct (Ludt *et al.*, 2004). Ces deux sous-espèces présentent une faible variabilité génétique. Certains auteurs considèrent que ces deux sous-espèces forment un seul clade (Hajji *et al.*, 2007; Hajji *et al.*, 2008). D'autres considèrent que les deux espèces pourraient être séparées (Pitra *et al.*, 2004). Cependant d'autres études sont envisageables pour éclaircir la relation phylogénétique qui existe entre ces deux sous-espèces. Une analyse génétique plus détaillée des trois sous-populations de cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* de la Tunisie issus de trois réserves (El Feidja, Ain Baccouch et Mhèbes) a montré un très fort taux de consanguinité. En effet, la baisse de l'effectif conduit à un goulot d'étranglement car ces populations sont génétiquement homogènes. Aucune structuration n'a été observée au sein de cette population. De ce fait, les cerfs en Tunisie constituent une population fragmentée en de petites sous-unités qui ne présentent aucun signe de différenciation, leur patrimoine génétique est très pauvre (Hajji *et al.*, 2007; Hajji *et al.*, 2008). Des analyses similaires sont à préconiser pour la



**Figure 23: Evolution chromosomiques de la sous-famille des cervinés (Fontana et Rubini, 1990).** Le caryotype ancestral des cervinés comprendrait un Nombre Fondamental de 70 chromosomes (NF=70). A la suite des translocations Robertsonienne (représenté en cercle noir) le nombre de chromosomes a diminué chez les différentes espèces de cervinés.

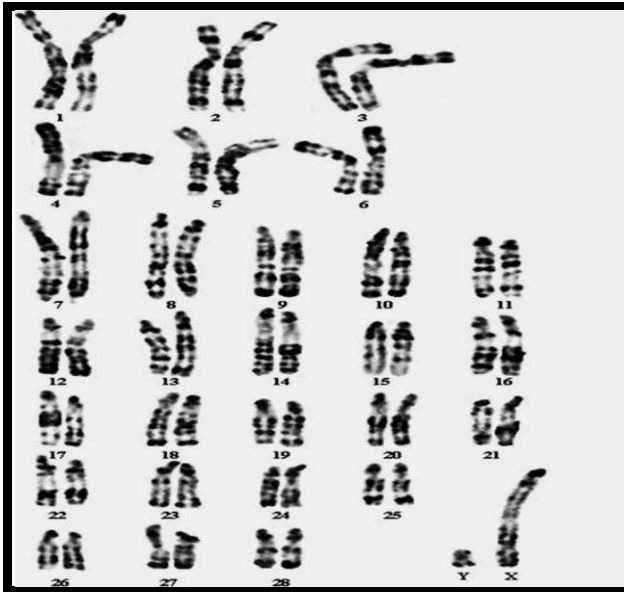


Figure 24: Caryotype en bandes R du *Cervus unicolor* ( $2n=57$ ) (Bonnet *et al.*, 2003)

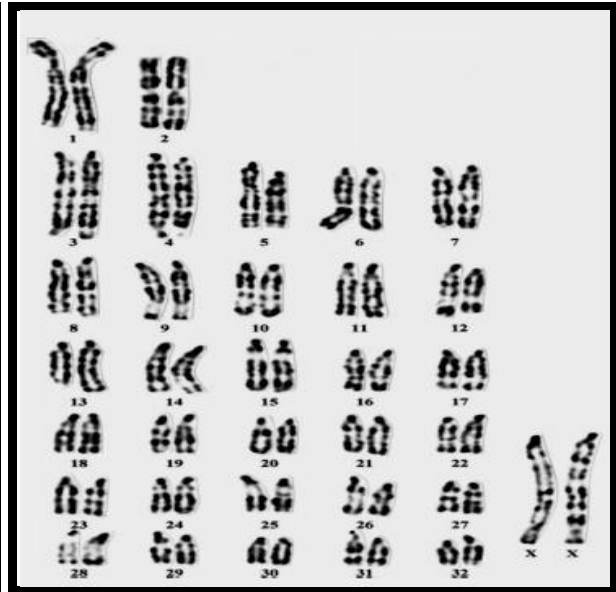


Figure 25: Caryotype en bandes R du *Axis axis* ( $2n=66$ ) (Bonnet *et al.*, 2003)

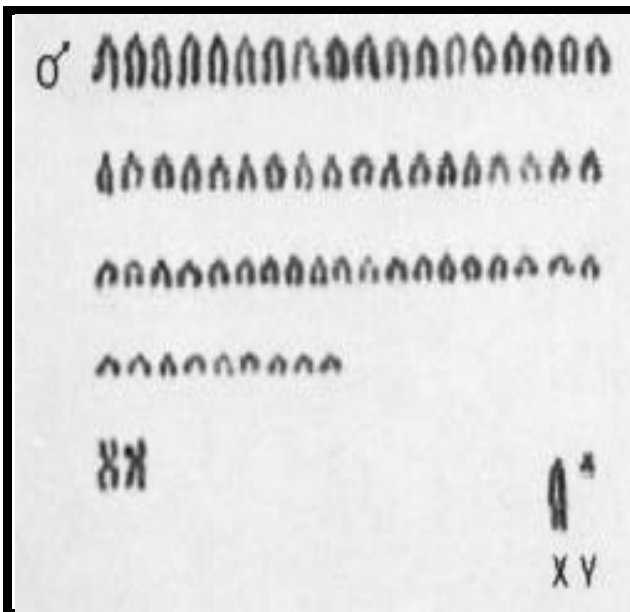


Figure 26: Caryotype en coloration conventionnelle de *Cervus elaphus* ( $2n=68$ ) (Gustavsson et sundt, 1968)

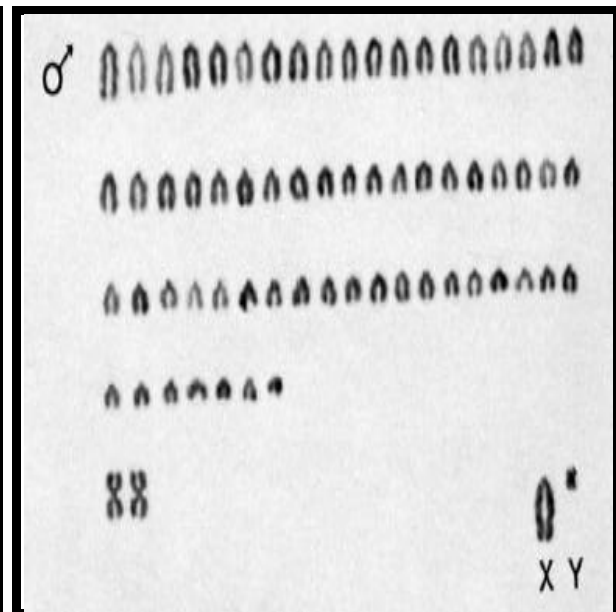


Figure 27: Caryotype en coloration conventionnelle du *Dama dama* ( $2n=68$ ) (Gustavsson et sundt, 1968).



population de cerfs de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* en Algérie. Les résultats auront des répercussions intéressantes et positives sur le programme de gestion à l'état naturel.

### 2.7. Génomique et cartographie génique

#### a-Carte génétique

La carte génétique (de liaison) repose sur l'évaluation des distances relatives séparant des caractères héréditaires ou marqueurs génétiques. Les cartes de liaisons génétiques des cervidés ont été construites en utilisant des marqueurs microsatellites, des marqueurs AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RFLV (Restriction Endonuclease Fragment Length Variations) et ESTs (Expressed Sequence Tags) (Barendse *et al.*, 1994; Bishop *et al.*, 1994; Crawford *et al.*, 1995; Kappes *et al.*, 1997). Au total 621 marqueurs ont été cartographiés comme 229 AFLPs, 153 microsatellite, 150 RFLVs, 73 ESTs et 16 protéines (Figures 28 et 29) (Hall, 2009; Slate *et al.*, 2002a). Des régions du génome du cerf élaphe *Cervus elaphus* contenant un polymorphisme impliqué dans la variation d'un caractère quantitatif QTL (Quantitative Traits Locus) ont été cartographiées, il s'agit d'une zone chromosomique contenant un ou plusieurs gènes ayant un effet sur un caractère et identifiée par sa co-ségrégation avec un ou plusieurs marqueurs génétiques (Goosen *et al.*, 2000; Tate *et al.*, 1998). La taille génétique du génome du cerf élaphe est estimée à 2532.3 cM. La taille de la région pseudo-autosomale du chromosome Y est de 18.4 cM et contient 8 marqueurs (Slate *et al.*, 2002a; Hall, 2009).

#### b-Carte physique

La localisation des différents marqueurs selon leur distance physique réelle, exprimée en paires de bases (pb) ou en kilos de paires de bases (kb), sur la molécule d'ADN, correspond à la carte physique moléculaire. La taille physique du génome mitochondrial du *Cervus elaphus* est de 16.357 paires de bases, contenant 13 gènes codant pour des protéines 12S RNAr, 16S RNAr, 22RNAt, et D-loop, retrouvés chez la plupart des mammifères (Wada *et al.*, 2010).

#### c-Cartographie comparée

La carte de liaison autosomique du *Cervus elaphus* (2532cM) est plus courte que celle du génome des bovins (2990cM) et des ovins (3063cM) et de longueur similaire à celle de la chèvre (2500cM) (Vaiman *et al.*, 1996; Kappes *et al.*, 1997). Il est possible que les taux de recombinaison soient plus faibles chez les hybrides interspécifiques du cerf par rapport aux autres populations de ruminants. Un phénomène similaire a été suggéré chez les bovins et des hybrides interspécifiques de la souris (Slate *et al.*, 2002; Yang et Womack, 1998). Les microsatellites sont conservés entre les bovins, ovins, caprins, cervidés et d'autres ruminants (Pepin *et al.*, 1995; Slate *et al.*, 1998).



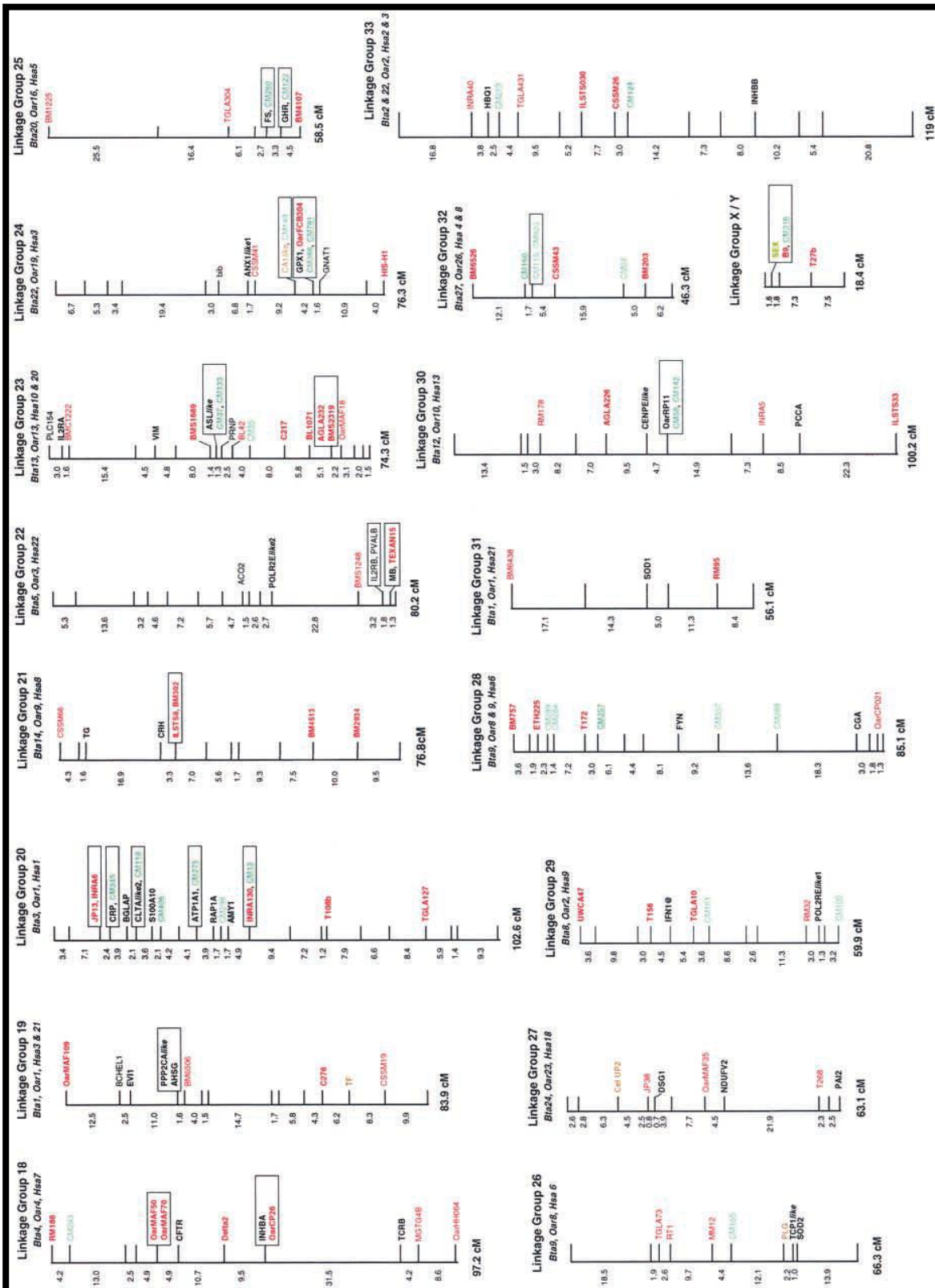


Figure 28: Suite de la carte génétique du *Cervus elaphus*. Les marqueurs RFLV (Restriction Endonuclease Fragment Length Variations) sont présentés en noir, les EST (Expressed Sequence Tags) en vert, les microsatellite en rouge et les protéines en marron (Slate *et al.*, 2002a).

# Objectif du travail

Le cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* est une espèce menacée de disparition endémique de l'Algérie et de la Tunisie. Aucune étude génétique n'a été entreprise à ce jour, en Algérie sur cet individu.

Le but de ce travail est d'entamer la description du génome du cerf de Berbérie par l'établissement de son caryotype, pour la première fois en Algérie. Ceci afin de décrire avec précision les chromosomes de cette espèce pour pouvoir détecter d'éventuelles anomalies de nombre ou de structure qui seraient responsable de mortalités embryonnaire précoces.

Par ailleurs, nous mettons en place une base de données génomique (cellulaire, chromosomique, et d'A'DN) pour cet ongulé et pour d'autres espèces menacées étudiées au Laboratoire de Génétique du Développement.

Une cartographie chromosomique comparée sera établie avec le cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus*.

Des homologies ainsi que des différences seront mises en évidences entre ces deux sous-espèces.

Pour atteindre cet objectif, des cultures de lymphocytes sont effectuées. Les cellules issues des cultures de lymphocytes sont synchronisées avec de la thymidine en excès. Ensuite, des marquages chromosomiques sont réalisés en bandes structurales GTG et en bandes dynamiques RBG. Des caryotypes dits « à hautes résolution » avec des chromosomes allongés seront établis. Ainsi, des homologies et des différences entre le caryotype du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* et le cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus* ont été détectés dans cette étude.

# Chapitre 2

## Matériel et Méthodes



## 1. Matériel biologique

Notre matériel biologique a été obtenu du Centre Cynégétique de Zéralda et du Parc Zoologique de Ben Aknoun grâce aux collaborations respectives avec le Professeur Belhamra et du Docteur Zerouki. En effet, le Professeur Blhamra nous a suggéré d'analyser les caryotypes du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus*. Les prélèvements sanguins ont été effectués sur un cerf de Berbérie de sexe mâle du Parc Zoologique de Ben Aknoun (Figure 30) et sur un autre mâle de la réserve de chasse de Zéralda qui, morphologiquement ressemble au cerf d'Europe (Figure 31). Ces prélèvements ont été difficiles à obtenir à cause de la rareté de l'animal et la non disponibilité du produit anesthésiant. Le prélèvement du cerf de Zéralda a été effectué par contention de l'animal et celui de Ben Aknoun en utilisant un produit anesthésiant.

L'étude expérimentale a été effectuée au sein du Laboratoire de Génétique du Développement (FSB, USTHB) en adaptant le protocole de culture des lymphocytes des Bovidés (Dutrillaux et Courturier, 1981; Lebdioui, 2010; Galleze, 2010; Abdoun, 2011), dans des conditions stériles dans une pièce de culture cellulaire équipée d'une Hotte à Flux Laminaire vertical (Polaris72, N°19311).

## 2. Méthodes

Le caryotype peut être établi après la mise en culture de différents types cellulaires (lymphocytes et fibroblastes) après les avoir prélevés sur un embryon ou un animal adulte. Il nous a été impossible d'effectuer des biopsies pour la mise en culture des fibroblastes. Nous avons tout de même souhaité détailler les deux techniques de cultures (fibroblastes et lymphocytes) afin de donner toutes les possibilités de mise en culture des cellules de cette espèce.

### 2.1. Culture de fibroblastes

#### Principe

Les cultures cellulaires primaires peuvent être réalisées à partir de tissus prélevés directement sur des animaux adultes (biopsies) ou sur des fœtus (issus d'avortements spontanés). Les cultures embryonnaires ou fœtales ont un indice mitotique élevé et un potentiel de générations plus grand. Environ 50 générations sont obtenues pour les cultures d'origine fœtales contre 20 générations pour les cultures de cellules de tissus adultes (Hayes, 1993; Ladjali, 1994).

#### Protocole

Des fragments de tissus musculaires et du derme sont prélevés et placés dans un flacon stérile contenant du milieu de culture RPMI 1640 supplémenté de 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF). Sous une hotte à flux laminaire vertical (Polaris72 N°19311), les fragments sont dilacérés sous agitation magnétique pendant 10 min dans une fiole contenant 10mL d'une solution de trypsine à 0,05%, préalablement chauffée à 37C. Après décantation, le surnageant est transféré délicatement dans un tube de 15mL et centrifugé à 2000rpm pendant 5 min. Le culot est suspendu délicatement dans 4mL de milieu de culture additionné de 10% de SVF. La suspension estensemencée dans une boîte de culture de 25cm<sup>2</sup> et mise dans une étuve à 37C°. Quelques heures après, les cellules sont observées à l'aide d'un microscope inversé (Zeiss Axiovert40C) pour s'assurer du début d'adhésion des cellules au fond de la boîte. Le lendemain, le milieu de culture devenu jaune est éliminé pour



Figure 30: Cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* de sexe mâle en captivité au Parc Zoologique de Ben Aknoun (Laboratoire de Génétique du Développement).



Figure 31: Cerf élaphe *Cervus elaphus* de sexe mâle. Réserve de Chasse de Zéralda (Laboratoire de Génétique du Développement).



enlever les toxines, les débris organiques et les cellules non adhérentes. Les cellules sont lavées avec du milieu de culture, puis sont incubées dans 4mL de milieu RPMI enrichi avec 10% de SVF. L'opération de lavage est effectuée autant de fois que cela est jugé nécessaire. La couleur du milieu de culture est un bon indicateur de l'activité cellulaire. Lorsque le milieu devient jaune, cela indique une forte activité cellulaire, il faut alors changer le milieu.

### Remarque

La culture de fibroblaste donne des résultats meilleurs que la culture de lymphocyte car on peut facilement contrôler l'état de division des cellules après leur observation au microscope inversé. Elle peut aussi être réalisée à partir de prélèvement juste après la mort de l'animal (post mortem).

### Solutions nécessaires

#### Milieu de culture complet RPMI 1640 (Gibco)

- Milieu RPMI 1640 + 20mM HEPES – L-Glutamine (Gibco Réf : 22409-031, lot : 305511).
- Sérum de Veau Fœtal (Gibco Réf : 15160-047, lot : 3086587) : 10%
- L-Glutamine 200mM (Sigma) : 1%
- Pénicilline et Streptomycine (Sigma) : 1%
- Fungizone (Sigma): 1%

#### Milieu pour le lavage des cellules

- Milieu RPMI 1640–L-Glutamine avec NaHCO<sub>3</sub> sans HEPES (Eurobio Réf: CM1RPM000U lot : 651528)

#### Trypsine à 0,05%

Dissoudre 0,05g de trypsine (Sigma) en poudre dans 100 mL de PBS<sup>-</sup> puis filtrer avec un filtre de 0,45µm.

#### Solution PBS<sup>-</sup> (Dulbecco's phosphate buffered saline) sans Ca<sup>2+</sup> et sans Mg<sup>2+</sup>

- NaCl (137mM): 8 g
- KCl (5,4mM): 0,2 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (8mM): 2,89 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,47mM): 0,2 g
- Eau distillée qsp 1 litre.

La solution finale (pH = 7,2) est autoclavée et conservée à +4°C.

## 2.2. Culture de lymphocytes

### Principe

Le sang qui est souvent facile à prélever, constitue la source de cellules la plus utilisée en cytogénétique humaine. Chez les mammifères, les lymphocytes B et T sont les seules cellules du sang susceptibles d'être transformées en cellules actives et proliférantes. Cette transformation de



lymphoblastes, induite *in vivo* par des antigènes, peut être stimulée *in vitro* par des lectines (Sharon et Lis, 1989). Les lectines les plus couramment employées pour la transformation des lymphoblastes sont la Phytohémagglutinine (PHA) et la Concanavoline A (Con A). Ces deux agents mitogènes activent préférentiellement les lymphocytes T. Ces derniers peuvent être mis en culture soit à partir du sang total, soit après séparation par centrifugation en gradient de densité (Moorhead *et al.*, 1960; Boyum, 1968). Seul le protocole de mise en culture à partir du sang total a été utilisé pour réaliser ce travail.

### 2.2.1. Mise en culture

#### Protocole

Après désinfection soigneuse à l'aide d'une compresse imbibée d'alcool chirurgical (70%), le sang (5 à 10 mL) est prélevé de la veine jugulaire dans un tube stérile contenant de l'héparine de sodium (Figure 32). Les tubes sont agités pour éviter la coagulation et sont immédiatement placés à 4°C. La mise en culture peut être effectuée immédiatement ou pendant la semaine sans affecter le résultat final. Les cultures sont effectuées dans un tube Falcon de 15 mL contenant 1 mL de sang total, 10 mL de milieu de culture RPMI 1640 supplémenté avec 15% de SVF et 50 mL de Concanavoline A (10µg/mL) (Figure 33). Cette dernière est un agent mitogène activant de préférence la division des lymphocytes T (Dutrillaux et Courturier, 1981). Les tubes sont ensuite incubés durant 72h dans une étuve à 37°C avec agitation des tubes plusieurs fois par jour.

#### Solutions nécessaires

##### Concanavoline A

Une quantité de 5 mg de Concanavoline A (Sigma) est dissoute dans 5 mL d'eau distillée. Cette solution est filtrée (0,20µm) et conservée à -20°C.

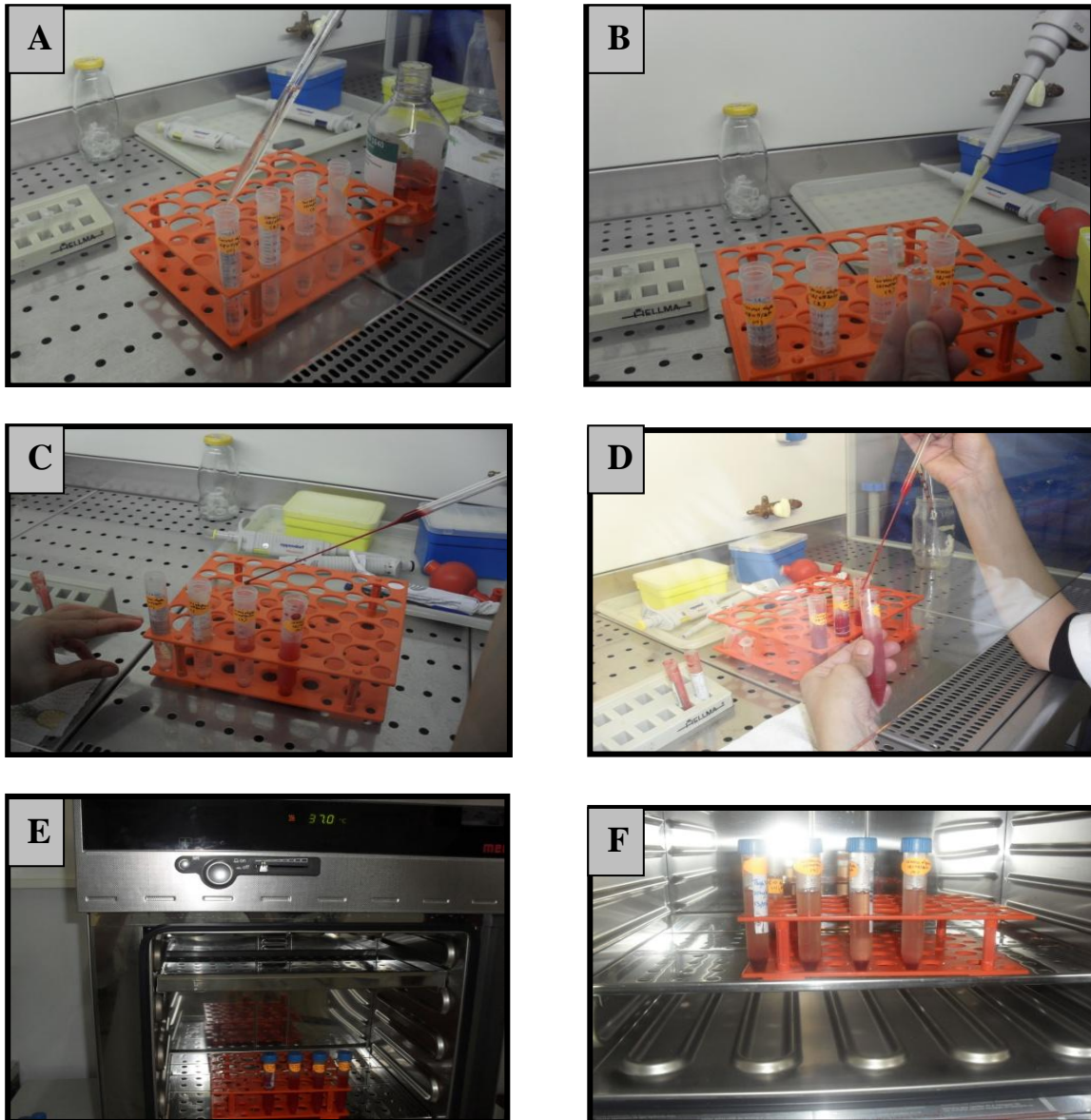
### 2.2.2. Synchronisation des cellules

#### Principe

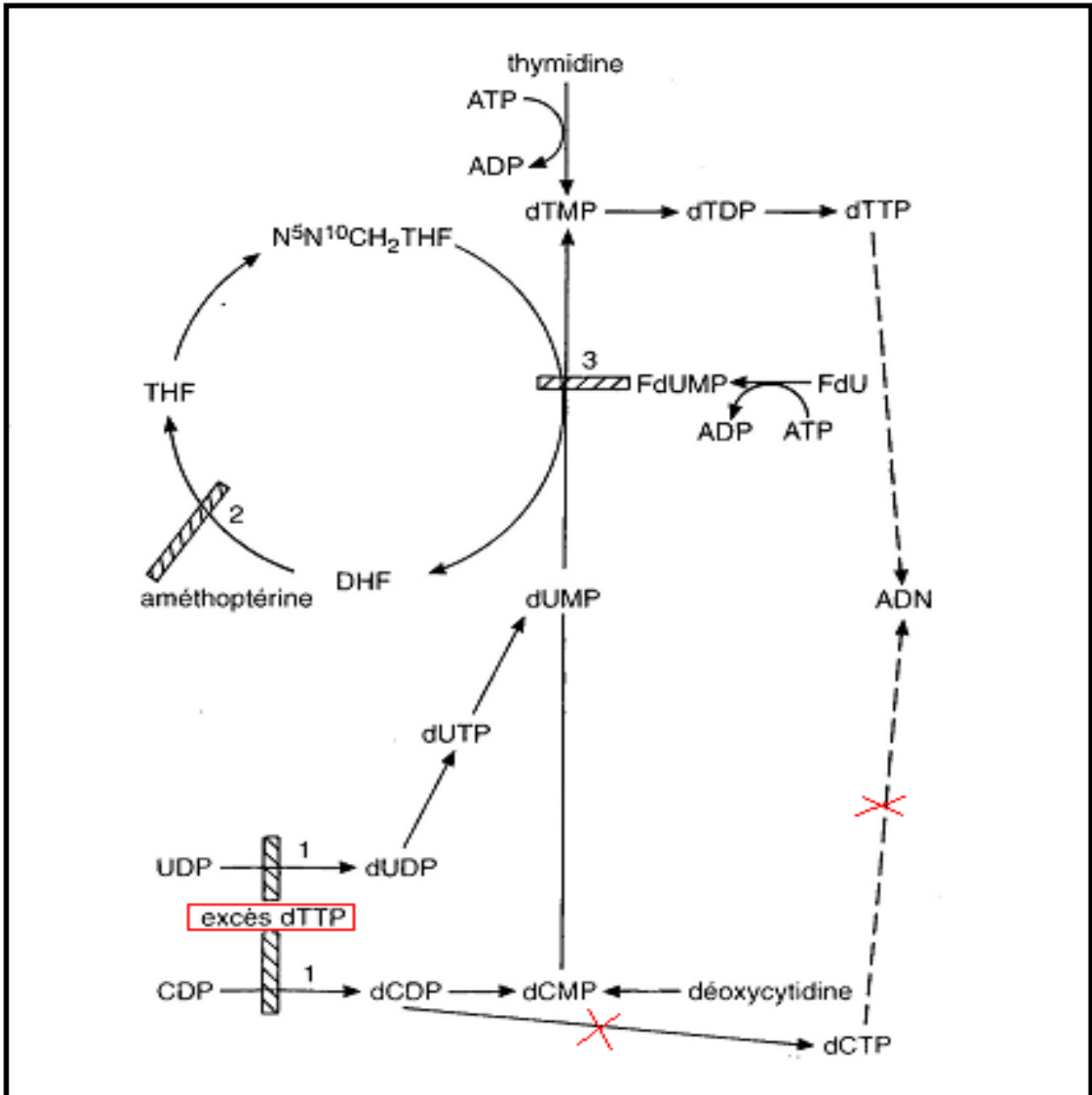
La synchronisation du cycle cellulaire à l'aide d'agents tels que la thymidine (précurseur de la thymine), l'améthoptérine, l'aminoptérine et le 5-Fluoro-2'-déoxyUridine (FdU) permet d'accumuler le maximum de cellules au stade de prométaphase. La thymidine provoque le blocage du cycle cellulaire d'une façon réversible pendant la phase S de synthèse de l'ADN. En effet, la thymidine ajoutée en excès au milieu de culture pénètre dans les cellules et inhibe la voie de synthèse de la désoxycytidine triphosphate (dCTP), un des quatre désoxyribonucléotides indispensables à la réplication de l'ADN (Figure 34) (Dutrillaux et Courturier, 1981). Les chromosomes obtenus par cette technique sont dits à haute résolution car ils sont très allongés et leur traitement par des techniques de marquages chromosomiques produit des bandes avec une bonne définition.



**Figure 32: Les différentes étapes du prélèvement de sang du cerf élaphe *Cervus elaphus* de sexe mâle de la veine jugulaire, Réserve de Chasse de Zéralda (Laboratoire de Génétique du Développement).**



**Figure 33:** Étapes de mise en culture des lymphocytes du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* sous une hotte à flux laminaire. **A et B :** Ajout de 10 mL de milieu de culture RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF et 50 mL de Concanavalline A (10 $\mu$ g/mL). **C et D :** Ajout de 1 mL de sang total. **E et F :** Incubation des tubes à 37°C pendant 72h.



**Figure 34 : Mécanisme de blocage de la synthèse de l'ADN par de la thymidine en excès utilisée pour la synchronisation des cellules.**

La thymidine ajoutée au milieu de culture (en excès) pénètre dans les cellules et se transforme rapidement en désoxythymidine triphosphate (dTTP). Ce dernier est un inhibiteur allostérique de la ribonucléotide réductase dans la réduction de la cytidine diphosphate (CDP) et de l'uridine diphosphate (UDP) en dCDP et dUDP. Ainsi, la présence de la thymidine en excès bloque de manière réversible la synthèse de l'ADN en diminuant la quantité de dCTP synthétisée (Hayes, 1993)



### Protocole

#### 1er jour: Blocage des cellules à la thymidine (simple synchronisation)

Un volume de 150µL d'une solution de thymidine stérile (concentration finale: 1 mg/mL) est ajouté au milieu de culture (10mL). Les cellules sont incubées à 37°C. Ce blocage est réalisé pendant 18h. Cette étape est effectuée vers 14 heures.

#### 2ème jour : Levée du blocage

Le lendemain, vers 8 heures du matin, le milieu de culture est aspiré et éliminé. Les cellules sont lavées 3 fois pendant 15 minutes avec 8 mL d'une solution de BSS<sup>+</sup> préalablement chauffée à 37°C. Ensuite, les cellules sont incubées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté de 10% SVF auquel sont ajoutés 33µL de 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU) (concentration finale: 14,4µg/mL). Le BrdU est un analogue structural de la thymidine. Il est incorporé lors de la réplication de l'ADN (Zakharov et Egolina, 1968; Ladjali *et al.*, 1995). Pour augmenter le rendement de l'action du BrdU, un volume de 100 µL d'une solution de 5-fluoro-2'-déoxyuridine (FdU) (concentration finale de 1,07µg/mL) est ajouté au milieu de culture. Les cellules sont incubées pendant 6 à 7h à 37°C.

#### Remarque

-Le temps nécessaire entre la levée du blocage et la récolte des cellules varie selon l'espèce. Il faut donc effectuer plusieurs essais pour obtenir les conditions optimales. Dans cette étude, l'intervalle de temps a été estimé à 6-7 heures pour les cellules du cerf de Berbérie.

- Pour la double synchronisation, les mêmes étapes de la simple sont appliquées après la levée du blocage.

### Solutions nécessaires

#### Solution de thymidine 1X

Une quantité de 100 mg de thymidine Sigma (41,13mM) est dissoute dans 10 mL de milieu RPMI 1640 (Gibco). La solution est filtrée à l'aide d'un filtre de 0,22µm et utilisée extemporanément ou conservée à -20°C.

#### Solution de BSS<sup>+</sup> (Hank's Balanced Salt Solution) avec Ca<sup>++</sup>

NaCl (137mM): 8 g  
KCl (5,4mM): 0,4g  
MgSO<sup>4</sup>·7H<sub>2</sub>O (0.81mM): 0,2 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sup>4</sup>·12H<sub>2</sub>O (0.33mM): 0,12 g  
KH<sub>2</sub>PO<sup>4</sup> (0,44mM): 0,06 g  
Eau distillée qsp 1 litre

La solution préparée est autoclavée. Ensuite, un volume de 6 mL d'une solution de NaHCO<sub>3</sub> à 5,6% et 2 mL d'une solution de CaCl<sub>2</sub> (1M) sont ajoutés stérilement à la préparation. Le pH de la solution finale est de 7,2 – 7,7.



### Solution de BrdU

Une quantité de 30,7 mg de BrdU (Sigma) est dissoute dans 10mL de PBS<sup>-</sup>, le mélange ainsi obtenu est filtré sur une membrane de 0,22µm et est conservé en fractions de 1 mL à -20°C.

### Solution de FdU

Une quantité de 7,5 mg de FdU (Sigma) est dissoute dans 10 mL de PBS<sup>-</sup>. Cette solution est conservée à -20°C par fraction de 1mL 10X (3mM).

Pour une solution de travail de 1X, 1 mL d'une solution 10X est dilué dans 9 mL de PBS<sup>-</sup>. Le mélange est ensuite filtré sur membrane 0,22µm et conservé en fraction de 1 mL.

## 2.2.3 La Récolte des cellules et Préparation des étalements chromosomiques

Pour obtenir des préparations chromosomiques, il faut récolter les cellules aux stades de prophase et de prométaphase. Ensuite les cellules sont gonflées par un traitement hypotonique, elles sont fixées puis étalées sur des lames.

### Protocole

#### Traitement à la colchicine

Après 7h à 8h d'incubation des lymphocytes, on ajoute 25 µL de colchicine 1X, pour inhiber la polymérisation du fuseau de division, ainsi les chromosomes restent bloquées sur la plaque équatoriale. La suspension cellulaire est alors centrifugée pendant 10 min à 1400 rpm.

#### Choc hypotonique

Le culot obtenu après centrifugation est remis en suspension dans 10 mL d'une solution hypotonique (KCl 0,075M) puis incubé à 37°C dans un bain marie pendant 15 min.

#### Fixation

Une préfixation est réalisée par l'addition de 1 ml de fixateur directement dans le milieu hypotonique pendant 5 min à 37°C. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée pendant 10 min à 1200 rpm. Le surnageant est alors éliminé délicatement. Le culot obtenu est repris dans 10 mL de fixateur et remis à 37°C pendant 5 min. Le fixateur est éliminé après centrifugation du tube pendant 10 min à 1200 rpm. Ensuite, le culot obtenu est repris dans 5 mL de fixateur. Il est mis à 4°C pendant 15 min. Puis, le culot est dissous dans 4 mL de fixateur. Une dernière fixation est réalisée pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, le tube est centrifugé pendant 10 min à 1200 rpm. Ensuite, 1 à 2 mL de fixateur sont rajoutés au culot.

#### Etallement

La suspension cellulaire est déposée sur les lames, préalablement lavées et conservées dans de l'eau distillée glacée. On laisse tomber une goutte d'une hauteur d'environ 10 cm sur chaque lame froide et recouverte d'un fin film d'eau. L'excès d'eau autour de la goutte déposée est tamponné et



les lames sont laissées sécher à l'air libre, puis congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation (Hayes, 1993; Ladjali, 1994). Les lames non colorées sont observées au microscope (Zeiss Primostar) en contraste de phase. Un indice mitotique d'environ 10 métaphases par champ de vision (GX10) des chromosomes bien regroupés et non dispersés sont des critères pour évaluer les résultats de la synchronisation.

### Solutions nécessaires

#### Solution de colchicine 10X (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Une quantité de 0.4 mg de colchicine est dissoute dans 10 mL de solution de PBS<sup>-</sup>. La solution est conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Solution hypotonique de KCl (0.075 M)

Une quantité de 5.6 g de KCl est dissoute dans 1 L d'eau distillée. Cette solution est chauffée à  $37^{\circ}\text{C}$  avant son utilisation.

#### Fixateur

Pour la préparation de 100 mL de fixateur, 75 mL d'éthanol sont mélangés avec 25 mL d'acide acétique.

### 3. Techniques de marquages chromosomiques

Les techniques de cytogénétique ont été développées pour étudier la structure interne des chromosomes en révélant une série de bandes séquentielles appropriées aux différents stades de contractions. Un code spécifique composé de trois lettres a été adopté pour caractériser la méthodologie utilisée distinguant la technique cytogénétique des motifs de bandes révélées. Ainsi, la première lettre correspond au type de bande, la seconde à la nature de la technique et la troisième au colorant utilisé. Dans ce chapitre, ne seront décrites que les techniques qui ont été utilisées dans cette étude.

#### 3.1. Coloration conventionnelle au Giemsa

C'est la coloration la plus utilisée. Elle permet d'avoir une idée précise de la morphologie générale des chromosomes (Ladjali, 1994).

##### Principe

Il existe des colorants qui permettent de visualiser la chromatine grâce à leur affinité pour l'ADN et les protéines qui lui sont associées. Le plus couramment utilisé est le Giemsa qui est un mélange complexe de six groupes de colorants, principalement des thiazines, chargées positivement, qui interagissent avec les groupements phosphate de l'ADN. Ceci induit une diminution de la longueur d'onde d'absorbance du colorant qui passe du bleu pâle au bleu foncé (Comings, 1978; Ladjali *et al.*, 1995).



### Protocole

Les lames sont plongées dans la solution de coloration pendant 20 mn à température ambiante. Puis les lames sont rincées abondamment à l'eau courante et à l'eau déminéralisée. Les lames sont séchées à l'air et observées au microscope en lumière normale (Grossissement GX40, GX100) avec un filtre vert. Les métaphases colorées sont prises en photos (Canon Powershot A640 digital camera 10.0 megapixels).

### Solution nécessaires

#### Solution de coloration de Giemsa à 6%

Pour un volume de 25 mL, mélanger 1,5 mL de colorant Giemsa (Sigma Aldrich) avec 23,5mL de tampon phosphate.

#### Tampon phosphate

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ : 2,9 g.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 0,2 g.

NaCl : 8 g.

KCl : 0,2 g.

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

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

### Remarques

La coloration au Giemsa permet de distinguer la morphologie générale des chromosomes. Pour identifier spécifiquement chaque paire chromosomique, on utilise des techniques de marquages particulières qui permettent d'obtenir une coloration hétérogène des chromosomes. Cette coloration met en évidence une succession de bandes présentant des propriétés fonctionnelles et structurales particulières, caractérisant chaque paire chromosomique. Ces techniques sont basées sur des réactions biochimiques faisant intervenir les composants des chromosomes (ADN et protéines), la réplication de l'ADN et la condensation des chromatides. La succession de bandes sombres et claires le long d'un chromosome, est identique chez tous les individus d'une même espèce pour un chromosome donné, ce qui permet son identification précise (Coming, 1978; Hayes, 1993; Ladjali, 1994; Ladjali *et al.*, 1995).

## 3.2. Coloration chromosomique en bandes structurales et dynamiques

### a. Technique révélant les bandes structurales

#### Les Bandes G -Trypsine - Giemsa (GTG)

#### Principe

Le principe de la mise en évidence des bandes est basé sur une digestion enzymatique avec protéolyse selon la technique de Seabright (1971) modifiée (Ladjali *et al.*, 1995).



### Protocole

Les lames vieilles de 3 à 10 jours sont plongées pendant 7 à 10 secondes dans une solution de trypsine (0,25%) préparée extemporanément à température ambiante. Puis les lames sont lavées dans deux bains successifs de PBS<sup>-</sup> pour inactiver l'action de la trypsine. Les lames sont ensuite colorées avec une solution de Giemsa à 6% pendant 20 minutes. Elles sont rincées abondamment à l'eau courante puis laissées sécher à l'air libre. Les métaphases colorées sont observées au microscope en lumière normale avec un filtre vert (Grossissement X40, X100) et prises en photos (Canon Powershot A640 digital camera 10.0 megapixels).

### Solutions nécessaires

**Giemsa :** Pour 25 mL d'une solution préparée extemporanément :

- Solution de Giemsa L : 1,5 mL
- Tampon phosphate (pH 7,15) : 0,75 mL
- Eau distillée : 23,75 mL.

**Tampon phosphate :** Pour 500 mL

- Phosphate dissodique  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  : 1,45g
- Phosphate monopotassique  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 0,1g
- Chlorure de sodium NaCl : 4g
- Chlorure de potassium KCl : 0,1g

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

### Remarque

Les lames séchées à l'air libre peuvent être utilisées après 3 à 10 jours. Les lames congelées peuvent être utilisées juste après leur décongélation.

### b. Technique révélant les bandes dynamiques Bandes R- BrdU- Giemsa (RBG)

#### Principe

La technique révélant les bandes dynamiques RBG s'applique sur des préparations chromosomiques dont l'ADN a été modifié *in vitro* durant la culture cellulaire par l'incorporation d'un analogue structural de la thymidine qui est le BrdU (Zakharof et Egolina, 1968; Ladjali, 1994; Ladjali *et al.*, 1995). L'addition du BrdU durant les dernières heures avant la fin de la culture cellulaire, permet à l'ADN chromosomique de contenir le BrdU dans les régions correspondant à l'euchromatine qui se répliquent tardivement. Après le traitement approprié, ce sont les bandes R (réplication précoce) qui seront visualisées. Le rendement de l'action du BrdU peut être augmenté par l'ajout du 5-fluoro-2'-déoxyuridine (FdU) (Bell et Wolff, 1966). L'incorporation du BrdU est à peu près équivalente dans toutes les cellules récoltées. Ce type de méthode est appliqué sur des cultures synchronisées pour lesquelles, la majorité des cellules sont au même stade du cycle cellulaire. Grâce aux propriétés de photo-décomposition des segments chromosomiques ayant incorporé le BrdU, plusieurs méthodes ont été développées permettant de colorer de manière différentielle ces régions. Le dessin des bandes ainsi obtenu est reproductible et caractéristique du stade pendant lequel le BrdU est ajouté et de la durée de son incorporation (Ladjali *et al.*, 1995).



### Coloration Fluorochrome – Photolyse – Giemsa (FPG)

Les lames sont plongées pendant 20 min dans une solution de Hoeschst 33258 (1X). Après avoir rincé les lames à l'eau du robinet puis à l'eau purifiée, ces dernières sont déposées à plat dans des boîtes en plastique recouvertes d'une solution de SSC 2X et sont exposées à une lumière noire pendant 90 min à une distance de 15 cm. Les lames sont rincées et plongées pendant 10 min dans une solution de Earle 1X sans bicarbonate à 87°C dans le bain marie. Les lames sont ensuite lavées et colorées au Giemsa à 6% pendant 24h. Les lames sont lavées et séchées et observées au microscope photonique en lumière blanche avec un filtre vert (Grossissement X10, X100) et prises en photos (Canon PowershotA640 digital camera 10.0 M).

### Solutions nécessaires

#### Solution de Hoechst

Une quantité de 100mg Hoechst 33258 (Sigma) est dissoute dans 100mL d'eau distillée. Cette solution est conservée par fraction de 1 mL à -20°C. Elle est concentrée 100X. Au moment du traitement, 1mL de la solution 100X est diluée dans 99 mL de H<sub>2</sub>O.

#### Earle 10X sans bicarbonate

- NaCl (1,16): 68g
- KCl (0,054): 4g
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0,01mM): 1,4g
- MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (8.1mM): 2g
- Glucose (0.055 M): 10g
- CaCl<sub>2</sub> (18mM): 2g
- Rouge de phénol: une pincée
- Eau distillée : qsp 1 litre

La solution est filtrée et conservée à 4°C. Le jour de l'utilisation la solution mère 10X est diluée pour obtenir une solution 1X. Le pH est ajusté avec une solution saturée de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O.

#### Solution SSC20X (Standard Saline Solution)

- NaCl (3M): 175,2g
- Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> ·2H<sub>2</sub>O (0.3 M): 88,2g
- H<sub>2</sub>O: qsp 1 litre

La solution est autoclavée et conservée à 4°C.

#### Remarque

Pour avoir une dénaturation correcte, il est préférable de mettre au bain-marie la solution de Earle pendant 20 minutes avant de plonger les lames pour que la température de la solution atteigne 87°C.



#### **4. Classification des chromosomes et établissement des caryotypes**

Les lames colorées sont observées dans un premier temps à l'objectif GX40 pour une vision générale de la métaphase. Lorsqu'une métaphase présente des chromosomes allongés et non chevauchants avec des bandes chromosomiques visibles, on passe alors à l'objectif GX100. Une goutte d'huile d'immersion est déposée sur une lamelle qui recouvre la lame. Après la prise de photos, les chromosomes sont découpés à partir des photos prises avec le logiciel Adobe Photoshop 8.0. Ensuite, les chromosomes sont classés par paire, en fonction de leur taille (par convention, les chromosomes sont classés du plus grand au plus petit) et selon la position du centromère.

# Chapitre 3

## Résultats



# Résultats

## 1. Matériel biologique

Pour la réalisation de cette partie expérimentale, nous avons rencontré des difficultés pour obtenir le matériel biologique (très rare) et pour prélever les animaux. En effet, le produit anesthésiant (Immobilon) adapté aux espèces sauvages maintenues en captivité n'était pas disponible au Parc Zoologique de Ben Aknoun. Alors nous avons utilisé un autre produit anesthésiant l'Hellaburum. Un deuxième prélèvement a été effectué dans la Réserve de Chasse de Zéralda après une capture par les agents d'un jeune cerf âgé d'un mois et demi. Ce dernier a été prélevé une deuxième fois, une année plus tard sans l'anesthésier.

A chaque fois un volume de 10 ml de sang est prélevé de la veine jugulaire. Les prélèvements peuvent être conservés pendant une semaine à 4°C avant la mise en culture. Toutes les techniques réalisées dans cette étude sont adaptées au cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* à partir de protocoles établis chez les bovidés et mis au point au Laboratoire de Génétique du Développement (Lebdioui, 2010; Galleze, 2010; Abdoun, 2011). La culture cellulaire a été réalisée stérilement dans une pièce de culture cellulaire équipée d'une Hotte à Flux Laminaire vertical (Polaris72 N°19311).

## 2. Culture cellulaire

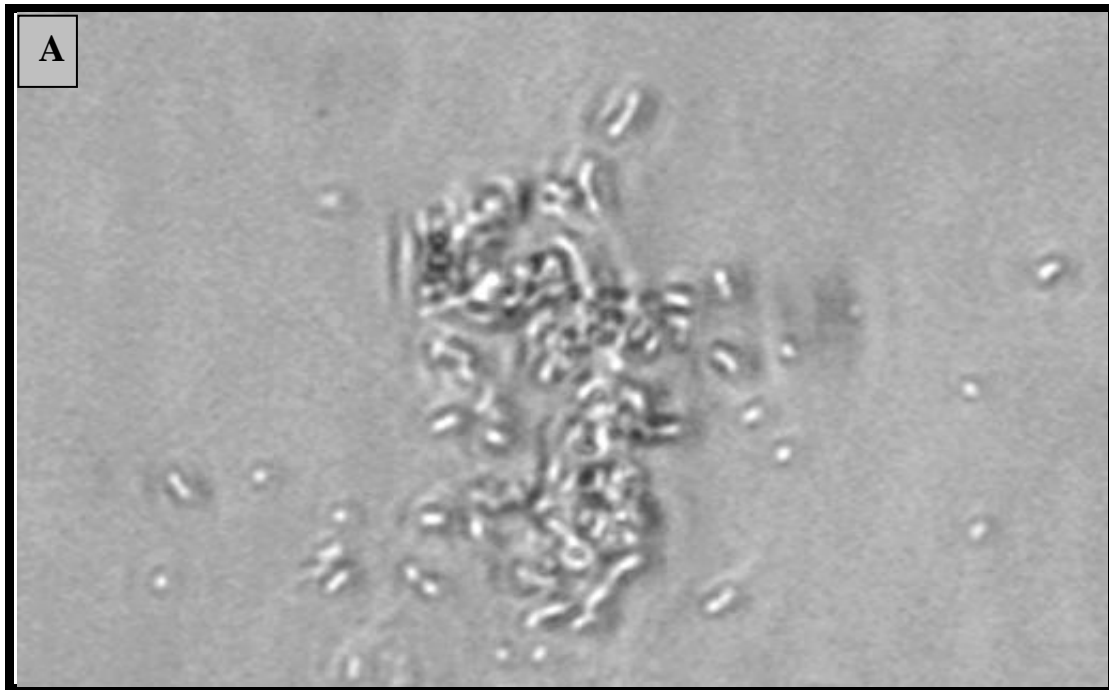
Pour l'obtention de chromosomes allongés, seule la culture de lymphocytes à partir du sang total a été réalisée. En effet, des difficultés ont été rencontrées lors de la réalisation des biopsies sur le cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* et ceci nous a empêché d'effectuer des cultures de fibroblastes.

La culture de lymphocytes a été effectuée à partir du sang total dans des conditions stériles avec du RPMI 1640 (Gibco) enrichi de 10% de sérum de veau fœtal (Gibco). Ce dernier, contient des facteurs de croissances nécessaires pour la prolifération cellulaire. Environ, 10 ml de sang ont été prélevés à chaque fois et mis en culture en deux étapes pour éviter les contaminations. Les lymphocytes ont été stimulés avec de la Concanavaleine A (ConA). Environ huit cultures ont été entreprises pour chaque prélèvement. Ces différentes cultures ont été traitées dans les mêmes conditions, sous une hotte à Flux Laminaire vertical (Polaris72 N°19311) et incubés à 37°C. Deux cultures de sang ont été réalisées à partir du cerf installé à la réserve de chasse de Zéralda et une culture de sang a été réalisée à partir du cerf de Berbérie installé au Parc Zoologique de Ben Aknoun.

Après 72h de culture, des culots de lymphocytes ont été obtenus. En effet, la stimulation avec la Concanavaleine A a été réalisée avec succès dans cette étude. Ensuite, les cellules en division ont été synchronisées pour l'obtention de chromosomes allongés dits « à haute résolution ».

## 3. Synchronisation des cellules et obtention de chromosomes allongés

La synchronisation du cycle cellulaire du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* a été réalisée à partir du protocole expérimental adapté aux mammifères (Lebdioui, 2010; Abdoun, 2011; Galleze, 2010). Les cellules ont été bloquées par de la thymidine en excès pendant 18h. Ce blocage a permis de synchroniser les divisions des lymphocytes et de récolter les chromosomes en prométaphase (Figure 35). La levée d'inhibition a été réalisée par une série de lavages des cellules avec une solution de BSS<sup>+</sup>. L'intervalle de temps nécessaire pour qu'un nombre maximal de



**Figure 35:** (A): Métaphase des chromosomes du cerf de Berbérie observés en contraste de phase (GX10). (B): Chromosomes en prométaphase allongés marqués en bandes GTG (GX100).



cellules soit au stade de prométaphase au moment de la récolte varie selon les espèces. Les cellules ont été récoltées à différents intervalles de temps (6, 7 et 8 heures) après la levée du blocage. Nous avons récolté les chromosomes après une simple et une double synchronisation à la thymidine afin d'obtenir des chromosomes allongés en prométaphase. Environ douze synchronisations ont été réalisées. Les chromosomes que nous avons obtenus après une double synchronisation ont montré une insuffisance résolution des bandes. De plus, les chromosomes étaient très contractés (Figure 35). Une incubation des cellules pendant 6h après la levée du blocage et après une simple synchronisation, nous a permis d'obtenir des chromosomes allongés à haute résolution. Quelques minutes avant de récolter les cellules, la colchicine a été rajoutée au milieu de culture pour inhiber la formation des fibres du fuseau mitotique. Pour chaque prélèvement, les culots issus de toutes les cultures ont été rassemblés en quatre tubes différents. Pour chaque tube, une cinquantaine de lames ont été étalées.

#### 4. Marquages chromosomiques et première description des chromosomes du cerf de Berbérie en bandes structurales GTG

Avant la coloration, les lames ont été observées au microscope photonique (Zeiss Primostar) en contraste de phase aux grossissements 10 et 40. Environ 40 à 50 lames ont été analysées dans cette étude, avec en moyenne 20 métaphases par lame. Seules les lames riches en métaphases et qui présentaient des chromosomes non contractés ont été sélectionnées pour effectuer un marquage chromosomique mettant en évidence les bandes morphologiques GTG et RBG. En effet, la plupart des métaphases obtenues se sont avérées incomplètes car l'utilisation d'une centrifugeuse à rotor angulaire (Sigma 2-16P, rotor 12151) lors des récoltes cellulaires a conduit à la dispersion des chromosomes après l'éclatement des cellules. Toutefois, des chromosomes allongés ont été obtenus et ont permis d'établir le caryotype du cerf de Berbérie pour la première fois en Algérie.

Les bandes structurales GTG ont été obtenues par l'action de la trypsine qui hydrolyse les régions associées à des protéines particulières, le long des chromosomes (Dutrillaux et Couturier, 1981; Ladjali *et al.*, 1995). Les lames ont été incubées pendant 8 secondes dans de la trypsine à 0.05%. Elles ont été ensuite colorées avec le Giemsa à 6%. Le temps de coloration par le Giemsa a été allongé de 20 minutes à 48 heures en raison de la faible imprégnation des chromosomes par ce colorant (Ladjali, 1994).

Nous avons établi les caryotypes en bandes GTG du cerf de Berbérie du Parc Zoologique de Ben Aknoun et du cerf élaphe (Cerf d'Europe) installé à la réserve de chasse de Zéralda. L'identification individuelle et la classification des chromosomes ont été réalisées selon le caryotype en bande GTG du cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus* qui nous a servi de référence, mais qui présente des chromosomes non classés (Rubini *et al.*, 1990). Nous avons alors proposé une classification des chromosomes du cerf de Berbérie, pour la première fois selon le caryotype standard des bovins (ISCNDA, 1989).

Nous avons estimé le nombre diploïde de chromosomes du cerf de Berbérie à 68 chromosomes, avec 30 paires d'autosomes et une paire de chromosomes sexuels. Le caryotype est composé de 64 autosomes acrocentriques et deux chromosomes métacentriques, en plus, d'un chromosome sexuel X acrocentrique et un chromosome sexuel Y sub-métacentrique. Les métaphases sont recherchées au faible grossissement GX40. Ensuite, elles sont analysées à l'immersion au GX100 et photographiées (Canon Powershot A640 digital camera 10.0 megapixels). Après le découpage des chromosomes avec le logiciel Adobe Photoshop 8.0 les caryotypes sont établis.

Le caryotype en bandes GTG du *Cervus elaphus barbarus* de Ben Aknoun est décrit pour la première fois ci-dessous (Figure 36):

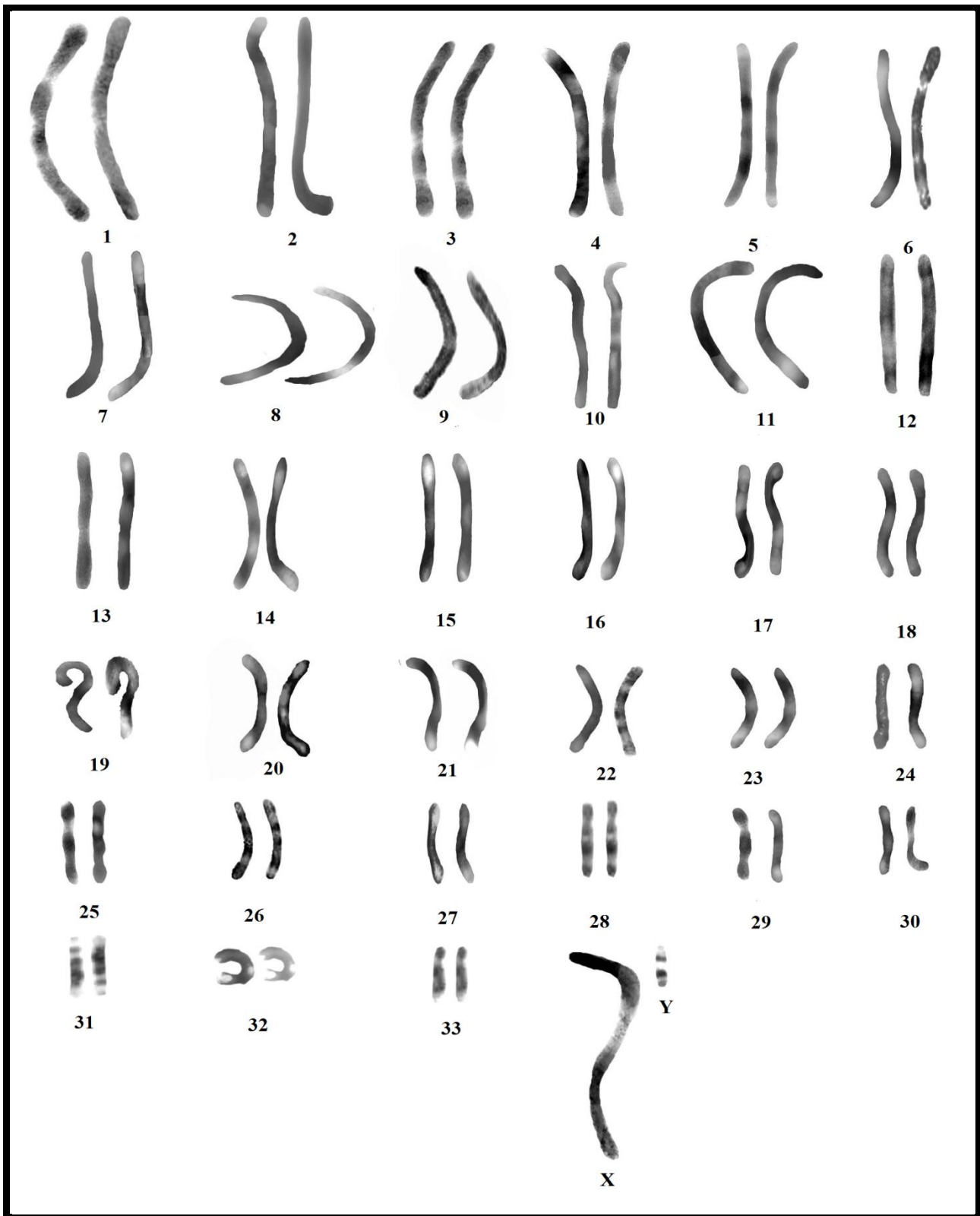


Figure 36: Caryotype en bandes GTG du cerf *Cervus elaphus barbarus* de sexe mâle du Parc Zoologique de Ben Aknoun.



**Le chromosome 1** est métacentrique. Le bras court p présente 2 bandes positives et 1 bande négative. Le bras long q présente 3 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 2** est acrocentrique. Il présente 4 bandes positives et 5 bandes négatives.

**Le chromosome 3** est acrocentrique. Il présente 5 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 4** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 5** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 6** est acrocentrique. Il présente 4 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 7** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 8** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 2 bandes négatives.

**Le chromosome 9** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 2 bandes négatives.

**Le chromosome 10** est acrocentrique. Il présente 4 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 11** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 2 bandes négatives.

**Le chromosome 12** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 13** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 14** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 15** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 16** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 17** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 2 bandes négatives.

**Le chromosome 18** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 19** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 20** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 21** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 22** est acrocentrique. Il présente 4 bandes positives et 5 bandes négatives.

**Le chromosome 23** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 24** est acrocentrique. Il présente 1 bande positive et 2 bandes négatives.

**Le chromosome 25** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 2 bandes négatives.

**Le chromosome 26** est acrocentrique. Il présente 4 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 27** est acrocentrique. Il présente 1 bande positive et 2 bandes négatives.

**Le chromosome 28** est acrocentrique. Il présente 4 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 29** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 2 bandes négatives.

**Le chromosome 30** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 31** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 32** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 2 bandes négatives.

**Le chromosome 33** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 2 bandes négatives.

**Le chromosome X** est acrocentrique. Il présente 4 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome Y** est submétacentrique. Le bras court présente 1 bande positive et 1 bande négative. Le bras long présente 1 bande positive et 2 bandes négatives.

Le caryotype en bandes GTG du cerf de Zéralda *Cervus elaphus* est décrit ci-dessous (Figure 37) :

**Le chromosome 1** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 4 bandes négatives

**Le chromosome 2** est acrocentrique. Il présente 4 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 3** est acrocentrique. Il présente 4 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 4** est acrocentrique. Le bras long (q) présente 3 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 5** est acrocentrique. Le bras long (q) présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 6** est acrocentrique. Le bras long (q) présente 2 bandes positives et 2 bandes négatives.

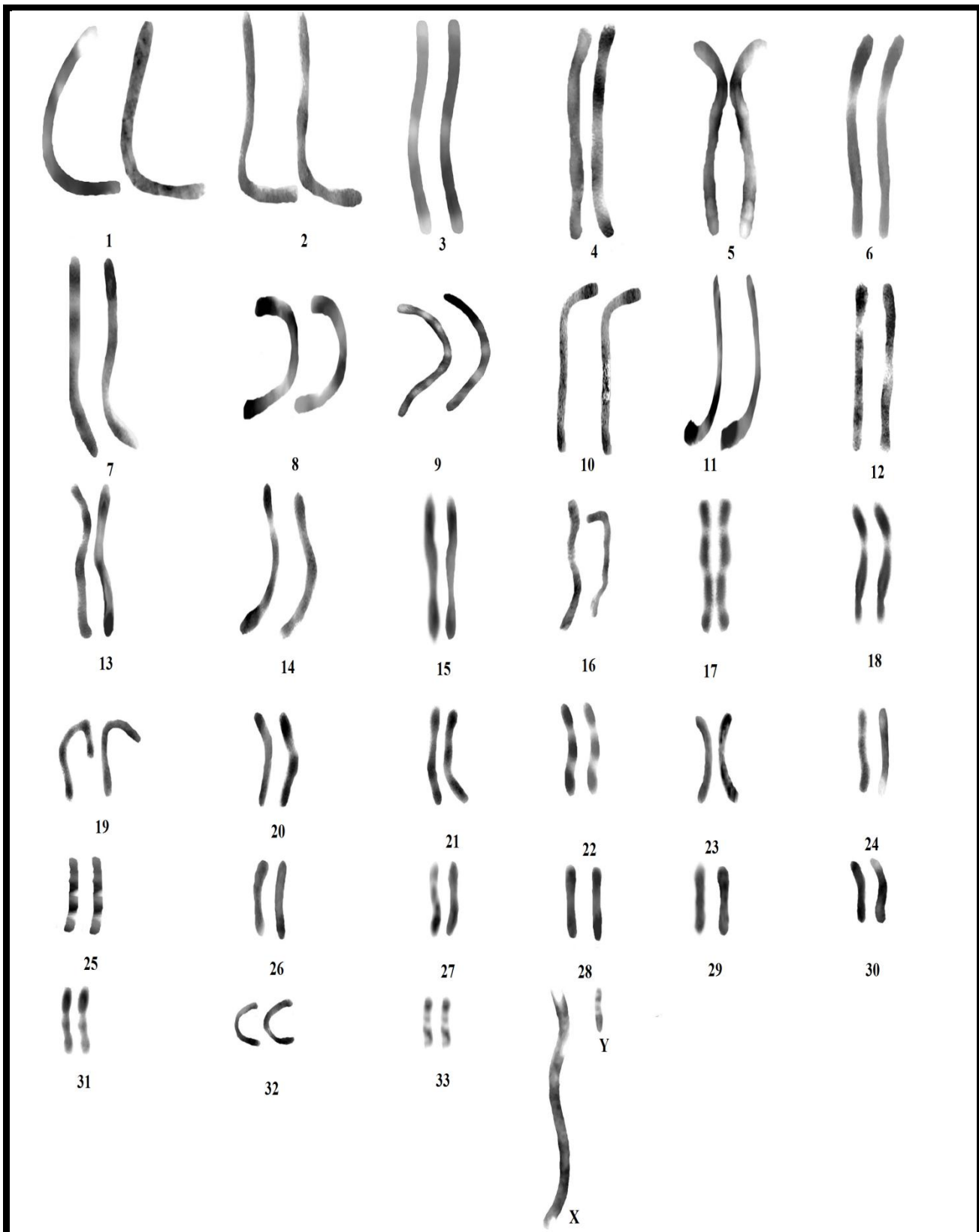


Figure 37: Caryotype en bandes GTG du cerf *Cervus elaphus* de sexe mâle de la Réserve de Chasse de Zéralda.



**Le chromosome 7** est acrocentrique. Il présente 4 bandes positives et 3 bandes négatives.  
**Le chromosome 8** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 2 bandes négatives.  
**Le chromosome 9** est acrocentrique. Il présente 7 bandes positives et 8 bandes négatives.  
**Le chromosome 10** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 2 bandes négatives.  
**Le chromosome 11** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 2 bandes négatives.  
**Le chromosome 12** est acrocentrique. Il présente 4 bandes positives et 4 bandes négatives.  
**Le chromosome 13** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 2 bandes négatives.  
**Le chromosome 14** est acrocentrique. Il présente 4 bandes positives et 3 bandes négatives.  
**Le chromosome 15** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 1 bande négative.  
**Le chromosome 16** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 2 bandes négatives.  
**Le chromosome 17** est acrocentrique. Il présente 4 bandes positives et 3 bandes négatives.  
**Le chromosome 18** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 1 bande négative.  
**Le chromosome 19** est acrocentrique. Il présente 4 bandes positives et 3 bandes négatives.  
**Le chromosome 20** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 1 bande négative.  
**Le chromosome 21** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 2 bandes négatives.  
**Le chromosome 22** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 2 bandes négatives.  
**Le chromosome 23** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 1 bande négative.  
**Le chromosome 24** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 1 bande négative.  
**Le chromosome 25** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.  
**Le chromosome 26** est acrocentrique. Il présente 1 bande positive et 1 bande négative.  
**Le chromosome 27** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 1 bande négative.  
**Le chromosome 28** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 1 bande négative.  
**Le chromosome 29** est acrocentrique. Il présente 1 bande positive et 1 bande négative.  
**Le chromosome 30** est acrocentrique. Il présente 1 bande positive et 2 bandes négatives.  
**Le chromosome 31** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 2 bandes négatives.  
**Le chromosome 32** est acrocentrique. Il 3 bandes positives et 2 bandes négatives.  
**Le chromosome 33** est sub-métacentrique. Le bras court p présente 1 bande positive et 1 bande négative. Le bras long q présente 1 bande positive et 1 bande négative.  
**Le chromosome X** est acrocentrique. Il présente 5 bandes positives et 6 bandes négatives.  
**Le chromosome Y** est sub-métacentrique. Le bras court p présente 1 bande positive et 1 bande négative. Le bras long q présente 1 bande positive et 1 bande négative.

## 5. Marquages chromosomiques et première description des chromosomes du cerf de Berbérie en bandes dynamiques RBG

Nous avons appliqué la technique qui révèle les bandes dynamiques RBG sur des préparations chromosomiques dont l'ADN a été modifié durant la culture cellulaire par l'incorporation du BrdU (5-bromo-2'-déoxyuridine), qui est un analogue structurale de la thymidine. Du 5-Fluoro-2'-déoxyUridine (FdU) a été administré pour favoriser l'incorporation du BrdU. Une coloration par la technique FPG (Fluorochrome-Photolyse-Giemsa) qui consiste à traiter les préparations chromosomiques au colorant photo-sensible Hoechst 33258, qui se fixe sur l'ADN a été effectuée. Les lames sont ensuite exposées à la lumière noire dont le domaine d'excitation correspond à celui du Hoechst 33258. Cela entraîne la photolyse du BrdU incorporé dans l'ADN ainsi qu'une série de réactions radicalaires réduisant l'affinité des régions chromosomiques riches en BrdU pour le Giemsa. Un traitement thermique à 87°C pendant 10 mn dans une solution de Earle améliore le marquage chromosomique. Seules les régions sans BrdU apparaîtront colorées et les bandes R, à réplication précoce, sont visualisées. Environ 20 lames par tubes ont été étalées. Les métaphases sont recherchées au faible grossissement GX40. Ensuite, elles sont analysées à l'immersion au



GX100 et photographiées (Canon Powershot A640 digital camera 10.0 megapixels). Après le découpage des chromosomes avec le logiciel Adobe Photoshop 8.0 les caryotypes sont établis.

Le caryotype en bandes RBG du *Cervus elaphus barbarus* de Ben Aknoun est décrit pour la première fois ci-dessous (Figure 38):

**Le chromosome 1** est métacentrique. Le bras court p présente 1 bande positive et 2 bandes négatives. Le bras long q présente 3 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 2** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 3** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 4** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 5** est acrocentrique. Il présente 4 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 6** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 2 bandes négatives.

**Le chromosome 7** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 8** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 1 bande négative.

**Le chromosome 9** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 10** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 11** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 12** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 13** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 2 bandes négatives.

**Le chromosome 14** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 15** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 2 bandes négatives.

**Le chromosome 16** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 17** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 18** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 19** est acrocentrique. Il présente 5 bandes positives et 6 bandes négatives.

**Le chromosome 20** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 21** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 2 bandes négatives.

**Le chromosome 22** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 2 bandes négatives.

**Le chromosome 23** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 24** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 25** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 4 bandes négatives.

**Le chromosome 26** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 27** est acrocentrique. Il présente 1 bande positive et 2 bandes négatives.

**Le chromosome 28** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 29** est acrocentrique. Il présente 1 bande positive et 1 bande négative.

**Le chromosome 30** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 2 bandes négatives.

**Le chromosome 31** est acrocentrique. Il présente 2 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome 32** est acrocentrique. Il présente 1 bande positive et 1 bande négative.

**Le chromosome 33** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 2 bandes négatives.

**Le chromosome X** est acrocentrique. Il présente 3 bandes positives et 3 bandes négatives.

**Le chromosome Y** est sub-métacentrique. Le bras court présente 1 bande positive et 1 bande négative. Le bras long présente 1 bande positive et 1 bande négative.

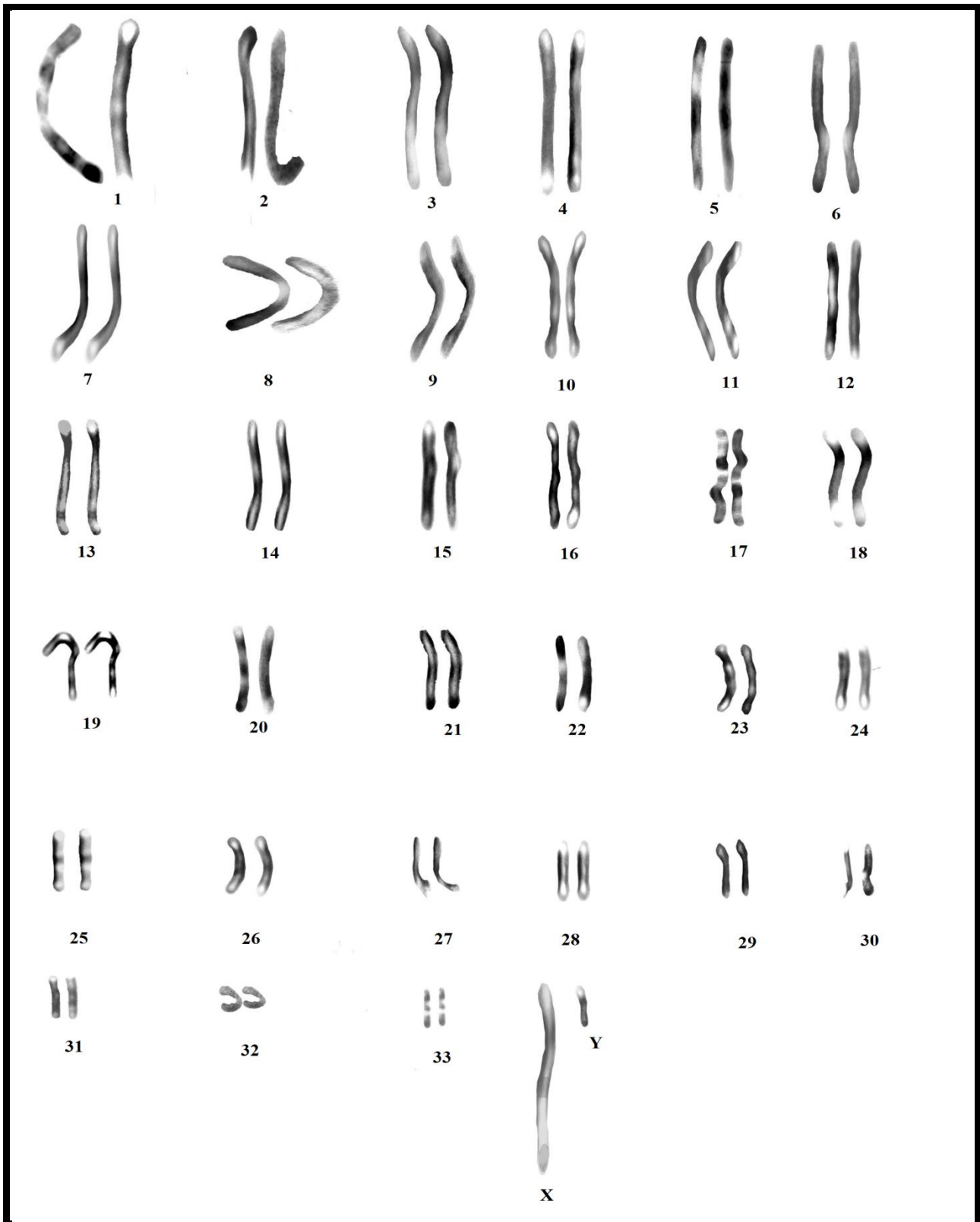


Figure 38: Caryotype en bandes RBG du cerf *Cervus elaphus barbarus* de sexe mâle du Parc Zoologique de Ben Aknoun.



# Chapitre 4

## Discussions



---

## Discussions

### 1. Cultures cellulaires

Le prélèvement de grands mammifères en captivité est difficile. Pour cela, les analyses cytogénétiques ne peuvent être entreprises que sur un nombre extrêmement limité d'individus et à partir de cultures de lymphocytes. En effet, un seul prélèvement a été effectué sur le cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* installé au Parc Zoologique de Ben Aknoun après avoir anesthésié l'animal. Deux prélèvements ont été effectués à partir du cerf élaphe d'origine inconnu installé à la réserve de chasse de Zéralda.

Dans le présent travail, nous avons eu recours à la culture des lymphocytes pour obtenir des chromosomes à haute résolution du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus*, pour la première fois en Algérie. Les techniques appliquées ont été adaptées à cette espèce à partir de protocoles mis au point chez l'Homme et les mammifères domestiques (Dutrillaux et Courturier, 1981; Lebdioui, 2010; Galleze, 2010; Abdoun 2011). Nous avons stimulé la prolifération des lymphocytes avec de la Concanavaleine A. De bons résultats puisque nous avons obtenu un culot important après 72h de culture.

Les cellules en division ont été synchronisées par un blocage avec de la thymidine, en excès, pour le cerf de Berbérie et le cerf élaphe de Zéralda. La durée la plus longue de blocage (18h) a permis d'obtenir des chromosomes très allongés. Nous avons réalisé un simple et un double blocage avec de la thymidine. Cette démarche nous a permis de comparer les résultats obtenus avec la simple et la double synchronisation. Nous avons obtenu de meilleurs résultats avec la simple synchronisation puisque un nombre important de métaphases a été obtenu. L'intervalle de temps nécessaire après la levée du blocage pour que les cellules soient au stade de prométaphase varie selon les espèces (en moyenne de 6 à 9h). Au cours de notre étude, nous avons récolté les lymphocytes à 6,7 et 8h après la levée du blocage. Il s'est avéré que le temps optimal était de 6h où les chromosomes obtenus étaient allongés avec une bonne incorporation du BrdU.

### 2. Marquages chromosomiques

Pour la réalisation de ce travail, des marquages chromosomiques en bandes morphologiques GTG et dynamiques RBG ont été effectués. Ils nous ont permis de proposer, pour la première fois, les caryotypes du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* après des cultures de lymphocytes. Nous avons aussi proposé le caryotype en bandes GTG du cerf élaphe *Cervus elaphus*. Les bandes structurales GTG ont été révélées après digestion enzymatique et protéolyse des chromosomes. Nous avons fait varier la durée d'incubation des lames dans la trypsine. Nous avons d'abord incubé les chromosomes pendant 11 à 13 secondes dans la trypsine à forte concentration. Les chromosomes n'étaient pas bien colorés et paraissaient trop digérés. Alors nous avons réduit le temps de digestion à 8 secondes. Les chromosomes obtenus étaient moyennement digérés. Ensuite, les chromosomes ont été colorés pendant 48 à 72h par le Giemsa. L'analyse des métaphases a permis d'établir le caryotype en bandes GTG pour le cerf de Berbérie du Parc Zoologique de Ben Aknoun et pour celui de la réserve de chasse de Zéralda. Les caryotypes en bandes G du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* de la Tunisie (Figure 39) et du cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus* (Figure 40) déjà établis dans la littérature nous ont servi de référence pour identifier les chromosomes (Fontana et Rubini, 1991; Hajji *et al.*, 2008). Le marquage en bandes G des chromosomes du caryotype déjà établi pour le cerf de Berbérie de Tunisie n'est pas d'une bonne

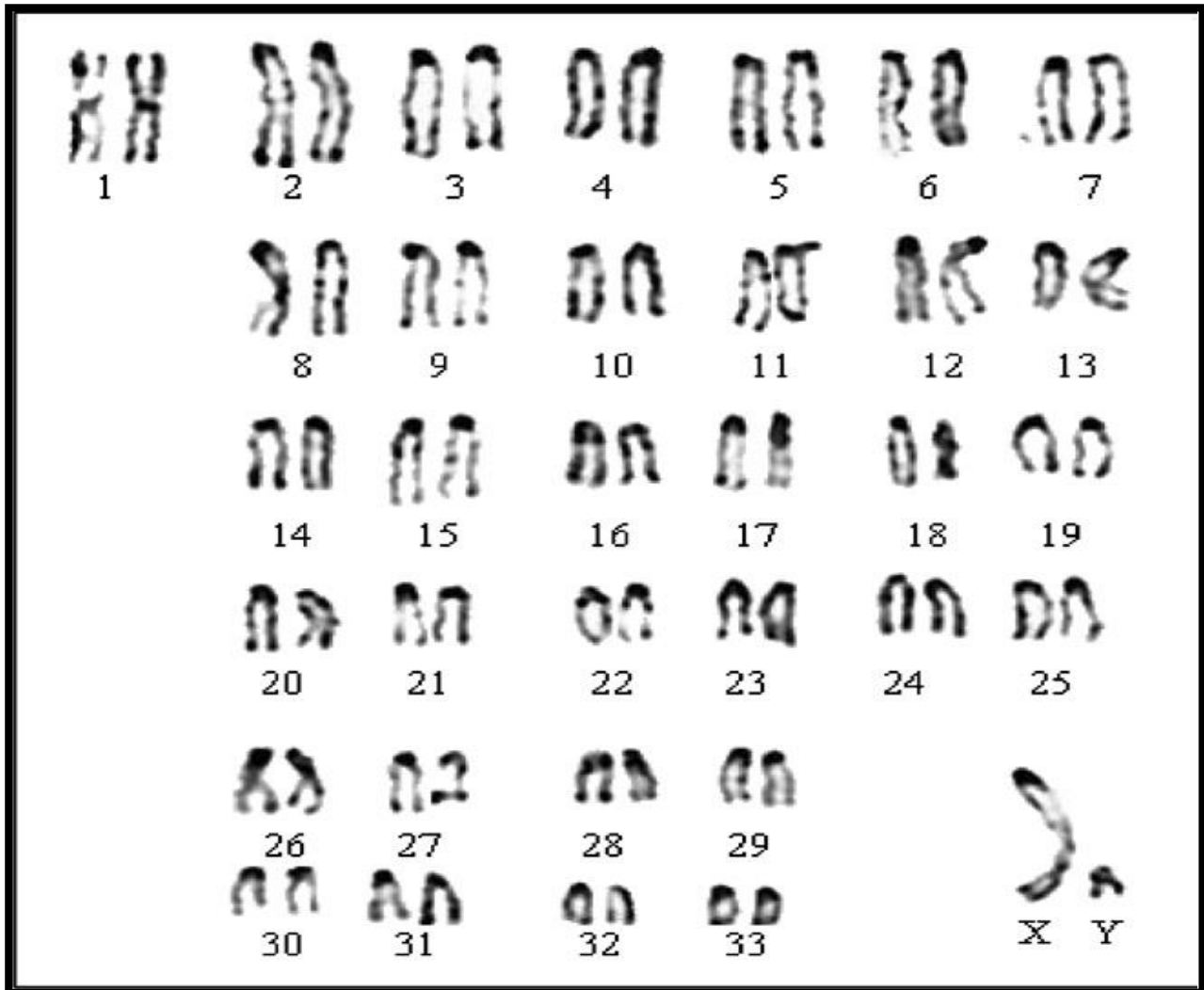


Figure 39: Caryotype en bande G du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* de la réserve de Ain Beccouch de la Tunisie (Hajji *et al.*,2008).

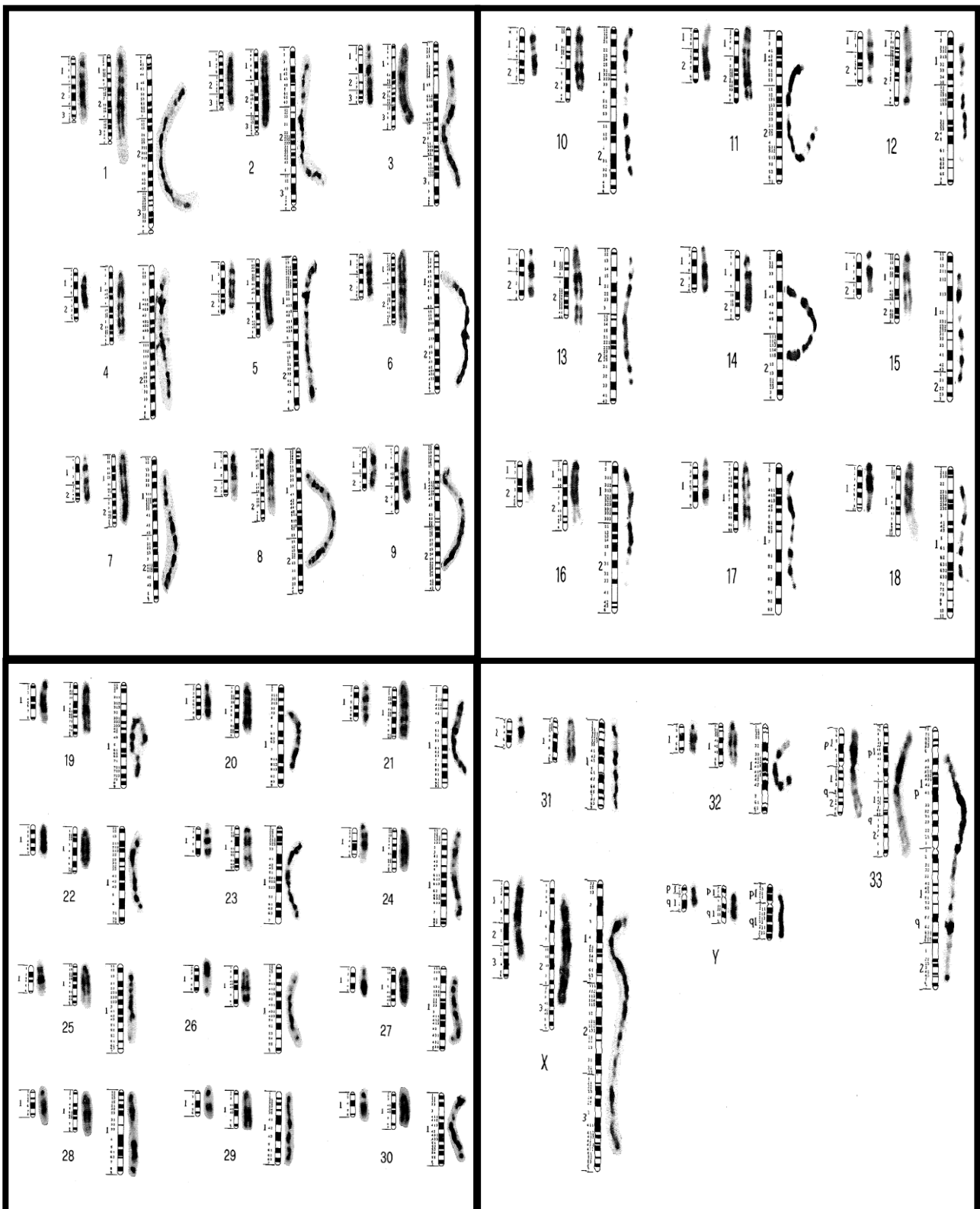


Figure 40: Caryotype en bandes G du cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus*. Différents stades de condensation des chromosomes sont représentés (Rubini *et al.*, 1991).



résolution. De plus, les chromosomes ne sont pas allongés. Par ailleurs, le caryotype proposé par Rubini *et al* en 1991, pour le cerf d'Europe ne présentait pas des chromosomes classés.

Nous avons proposé dans cette étude le caryotype en bandes GTG du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus*. Les chromosomes ont été classés selon le caryotype standard des bovins (ISCNDA, 1989) puisqu'il n'existe pas de caryotype standard pour le cerf de Berbérie.

Les bandes dynamiques RBG ont été réalisées en modifiant l'ADN *in vitro* par l'incorporation du BrdU durant la culture cellulaire (Dutrillaux, 1973; Ladjali *et al.*, 1995). Ceci nous a permis de décrire les chromosomes du cerf de Berbérie en bandes RBG, pour la première fois puisque ce type de bandes n'a jamais été appliqué chez cette espèce menacée. Cependant, les bandes RBG que nous avons obtenu dans cette étude sont de qualité moyenne et nous devons améliorer.

Les deux types de marquages chromosomiques obtenus (GTG et RBG) ne sont pas complémentaires, car les bandes G sont morphologiques et les bandes R sont dynamiques.

Les caryotypes obtenus dans cette étude nous ont permis d'évaluer le nombre de chromosomes du cerf de Berbérie à  $2n=68$  chromosomes, ce qui correspond au nombre de chromosomes de la plus part des espèces du même ordre et d'ordres apparentées (Fontana et Rubini 1990; Gustavsson et Sundt, 1968).

### 3. Cartographies Chromosomiques Comparées

#### 3.1. Comparaisons du caryotype du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* du Parc Zoologique de Ben Aknoun avec le caryotype du cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus*

Les chromosomes en bandes GTG du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* du Parc Zoologique de Ben Aknoun obtenus ont été comparés avec les chromosomes du cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus*, espèce endémique de la Sardaigne (Italie), classée en danger d'extinction par l'UICN en 2007 (Wemmer, 1998) (Figure 41). Des similitudes ont été observées entre les autosomes et les chromosomes sexuels. Cependant, on a observé quelques différences. En effet, le chromosome 1 du cerf de Berbérie du Parc Zoologique de Ben Aknoun est métacentrique alors qu'il est acrocentrique chez le cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus* (Rubini *et al.*, 1991). Le chromosome 33 du cerf de Berbérie est acrocentrique, alors qu'il est sub-métacentrique chez le cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus*. Cette différence au niveau de la position du centromère pourrait être expliquée par une translocation Robertsonienne qui a pu se produire durant l'évolution de ces deux sous-espèces.

#### 3.2. Comparaisons du caryotype du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* du Parc Zoologique de Ben Aknoun avec le caryotype du cerf de la réserve de Ain Beccouch de Tunisie.

La comparaison des chromosomes du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* avec ceux du cerf de Berbérie de la Tunisie (Figure 42) nous a révélé la présence de similitudes entre les autosomes et les chromosomes sexuels. En effet, le nombre de chromosomes obtenus est le même ( $2n=68$  chromosomes). Aussi, les autosomes sont tous acrocentriques, sauf le chromosome 1 qui est métacentrique. Le chromosome X est acrocentrique et le chromosome Y est sub-métacentrique. Cependant, la qualité des chromosomes et des bandes du caryotype du cerf de la réserve de Ain Beccouch de Tunisie n'est pas bonne. Ceci ne nous a pas permis de comparer les marquages chromosomiques.

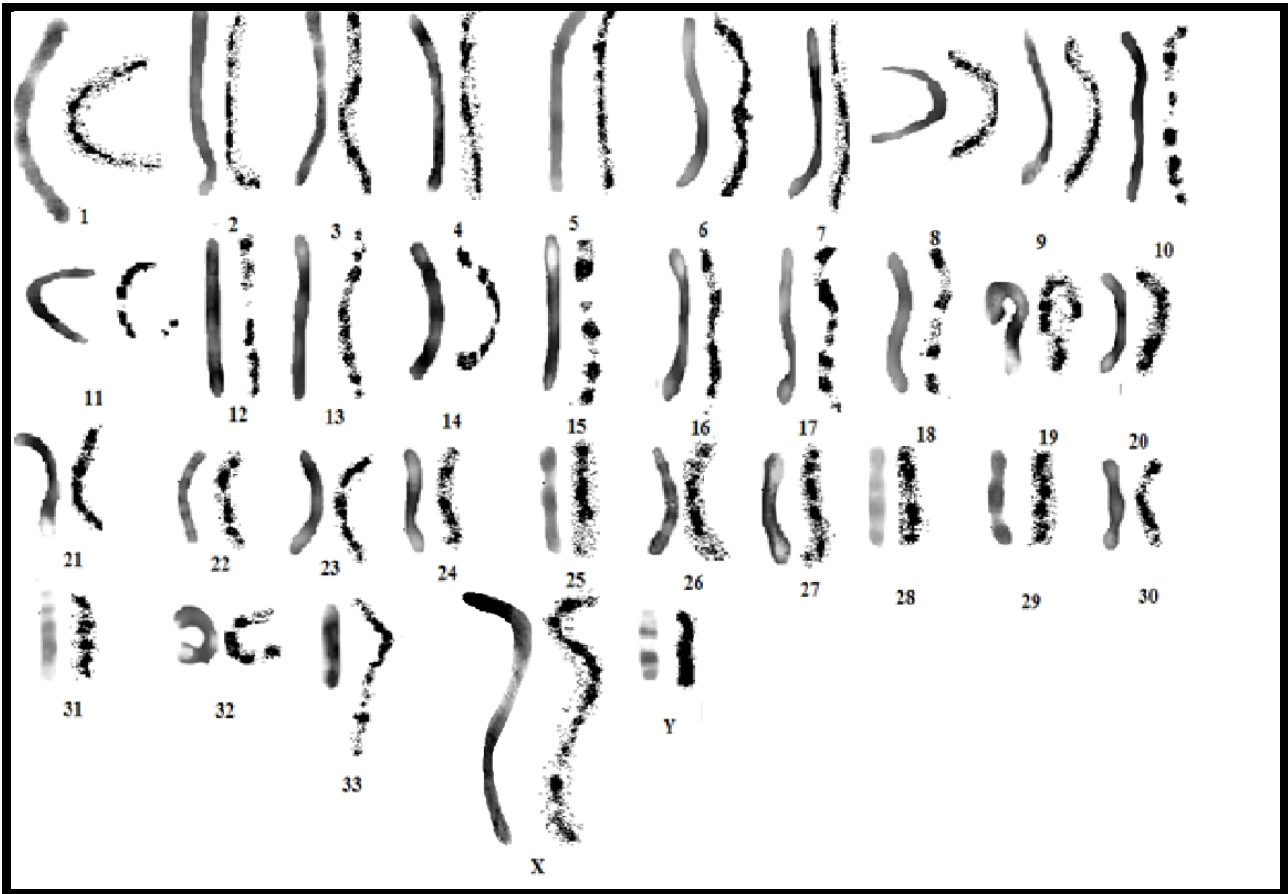


Figure 41: Comparaison des chromosomes en bandes GTG du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* (à gauche) avec les chromosomes du cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus* (à droite) (Rubini *et al.*, 1991). Des différences sont observées pour les chromosomes 1 et 33.

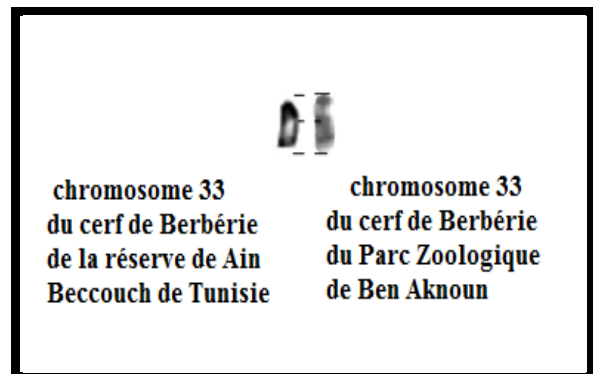
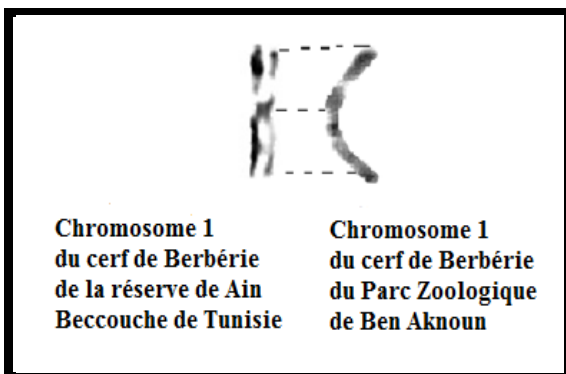


Figure 42 : Comparaison des chromosomes 1 et 33 en bandes GTG du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* (à droite) avec les chromosomes du cerf de Berbérie de la réserve de Ain Beccouch de Tunisie (à gauche) (Hajii *et al.*, 2008).



### 3.3. Comparaisons des caryotypes du cerf issu de la réserve de chasse de Zéralda *Cervus elaphus* et du cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus*

Les chromosomes du cerf de la réserve de chasse de Zéralda dont l'origine est inconnue et qui morphologiquement ressemble au cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus* ont été comparés avec les chromosomes du cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus*. Ceci nous a permis de mettre en évidence des homologies entre les autosomes et les chromosomes sexuels. En effet, les chromosomes sont identiques du point de vue morphologique (Figure 43). En plus, le chromosome 1 est acrocentrique chez le cerf élaphe de Zéralda comme pour le cerf d'Europe. Le chromosome 33 est sub-métacentrique chez ces deux sous-espèces. D'après ces similitudes, on peut penser que le cerf de Zéralda est un cerf d'Europe. Cependant, d'autres analyses moléculaires sont nécessaires pour différencier la sous-espèce.

### 3.4. Comparaison du chromosome 33 de différentes espèces de cervidés

La comparaison du chromosome 33 de différentes espèces de cervidés (*Dama dama*, *Cervus elaphus* et *Cervus nippon nippon*) montre qu'il est métacentrique pour ces trois caryotypes (Gustavon et sundt, 1968) (Figure 44). En effet, le caryotype ancestral des cervidés comprendrait 70 chromosomes acrocentriques. Durant l'évolution de cette famille plusieurs types de réarrangements chromosomiques auraient pu se dérouler. La translocation Robertsonienne serait le principal réarrangement chromosomique de la famille des cervinés qui aurait abouti à la formation d'une paire de chromosome métacentrique (Neitzel, 1982; Herzog 1987; Fontana et Rubini, 1990; Bonnet *et al* 2003) (Figure 47). Une translocation impliquant les chromosomes 33 et 34 d'un caryotype ancestral des cervidés serait à l'origine de la formation du chromosome 33 métacentrique des cervidés (Fontana et Rubini, 1990). Cependant, ce chromosome est acrocentrique chez le cerf de Berbérie du Parc Zoologique de Ben Aknoun et chez le cerf de la réserve de Ain Beccouch de Tunisie et il est sub-métacentrique chez le cerf d'Europe. Le cerf de Berbérie aurait pu diverger avant le cerf d'Europe durant l'évolution des cervidés.

Le caryotype en bande CTG est nécessaire pour confirmer la position des centromères chez le cerf de Berbérie.

### 3.5. Comparaison du caryotype du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* de Ben Aknoun avec le caryotype de *Mazama gouzoubira*

Le caryotype du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* a été comparé avec le caryotype de *Mazama* qui est une espèce appartenant à la famille des Capreolinés (famille proche de la famille des Cervinés). Plusieurs auteurs considèrent que le caryotype de *Mazama* est proche du caryotype ancestral des Cervidés (Neitzel, 1987; Bonnet *et al.*, 2003; Ling *et al.*, 2006). Le caryotype de l'espèce *Mazama gouzoubira* comprend généralement 70 chromosomes acrocentriques. Cependant, un caryotype de l'espèce *mazama gouzoubira* établi par Duarte et Jorge en 1996 a révélé la présence d'un caryotype à 69 chromosomes pour deux animaux sur 14 étudiés, avec une paire de chromosome métacentrique (Figure 45) qui a pu résulter d'une fusion centrique. La comparaison du caryotype du cerf de Berbérie avec le caryotype ancestral des cervidés nous montre l'évolution chromosomique probable de cette famille. En effet, le caryotype des cervidés est constitué de 68 autosomes acrocentriques, un chromosome X acrocentrique et un chromosome Y sub-métacentrique (Fontana et Rubini, 1990). Alors que le caryotype du cerf de Berbérie comprend 68 chromosomes avec une paire de chromosomes métacentriques, un chromosome X acrocentrique et un chromosome Y sub-métacentrique. Cependant, on révèle la présence de similitude entre ces deux caryotypes (Figure 46).

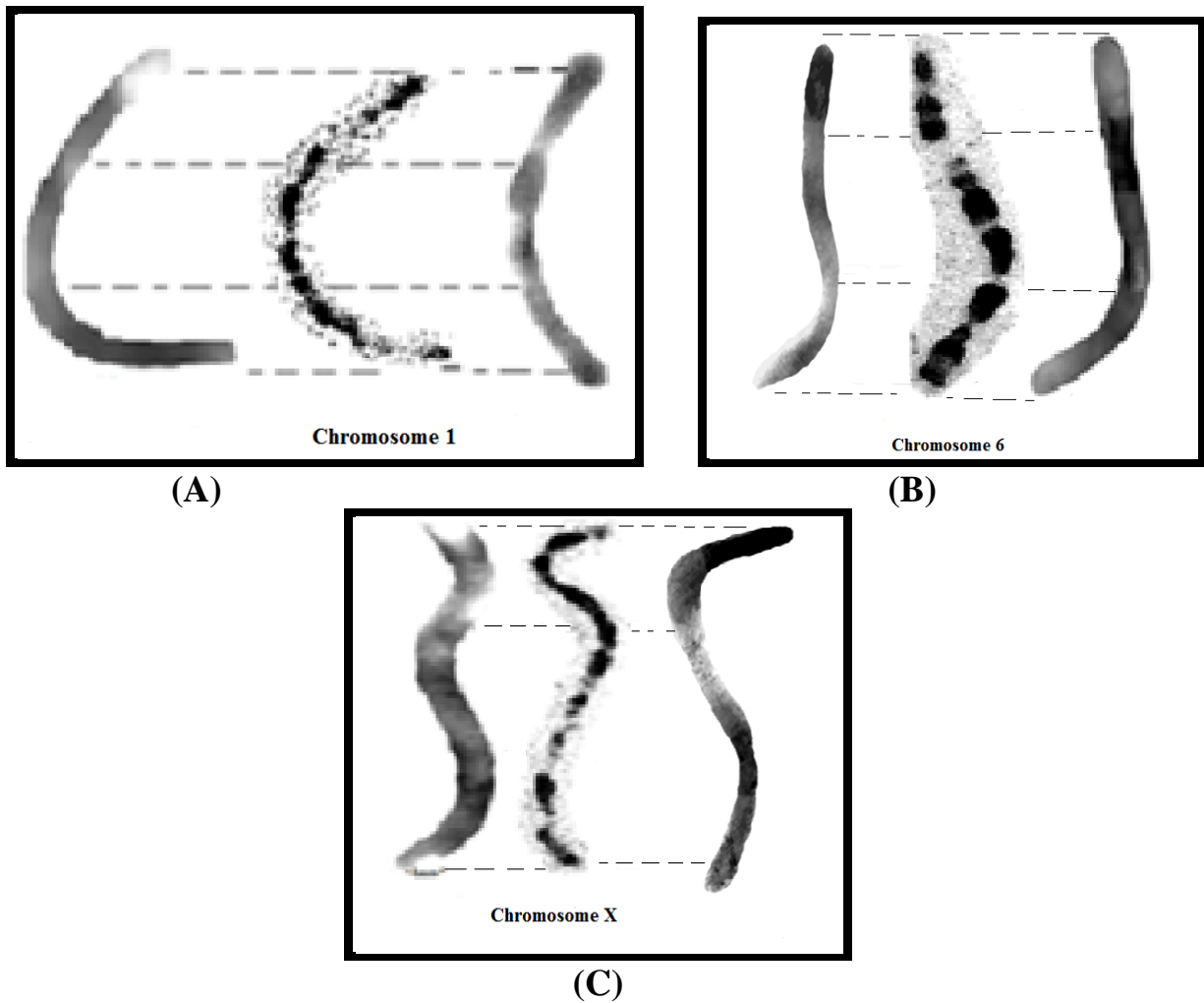


Figure 43: Comparaison des chromosomes du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* (à gauche) dans A, B et C en bandes GTG avec les chromosomes du cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus* (au milieu) et les chromosomes du cerf de la réserve de chasse de Zéralda *Cervus elaphus* (à droite).

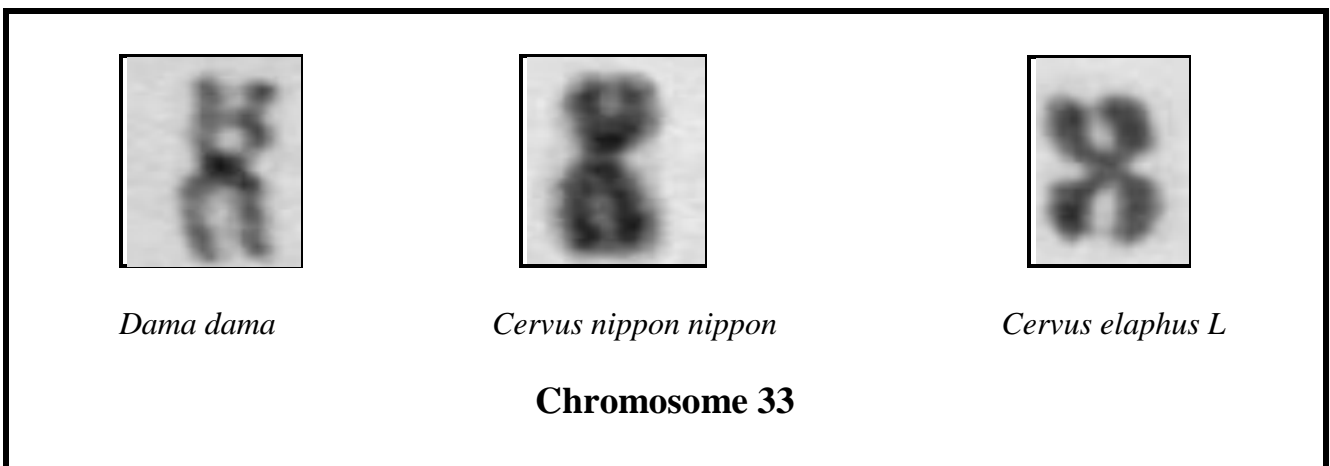


Figure 44 : Comparaison du chromosome 33 de différentes espèces de cervidés (*Dama dama*, *Cervus nippon nippon* et *Cervus elaphus L* (Gustavon et sundt, 1968).

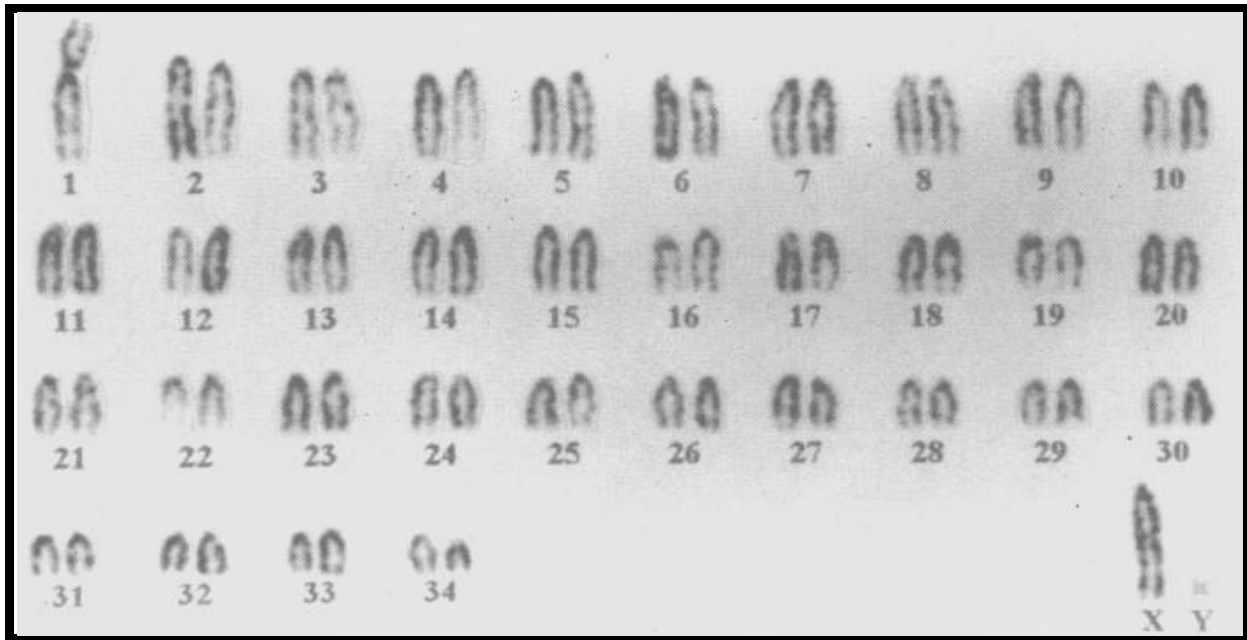


Figure 45: Caryotype de *Mazama gouzoubira* ( $2n=69$ ). On note la présence d'un chromosome 1 métacentrique qui aurait pu résulter d'une fusion centrique (Duarte et Jorge, 1996).

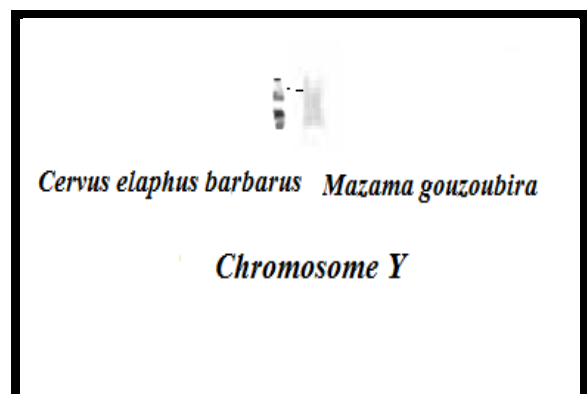
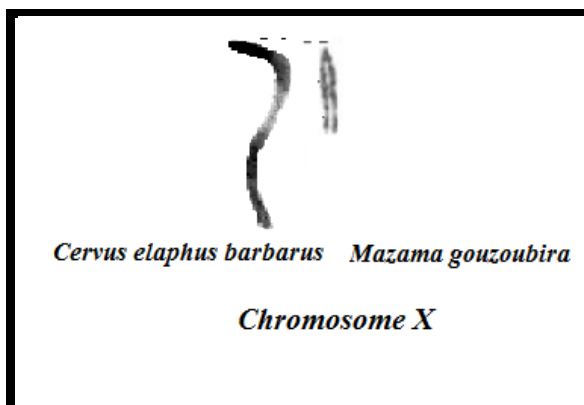
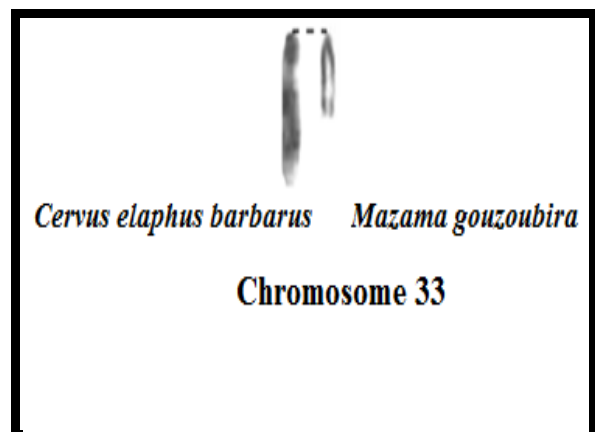
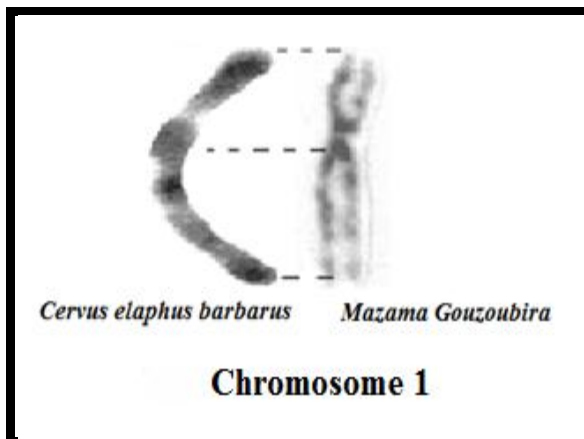


Figure 46 : Comparaison des chromosomes du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* avec les Chromosomes de *Mazama gouzoubira*.

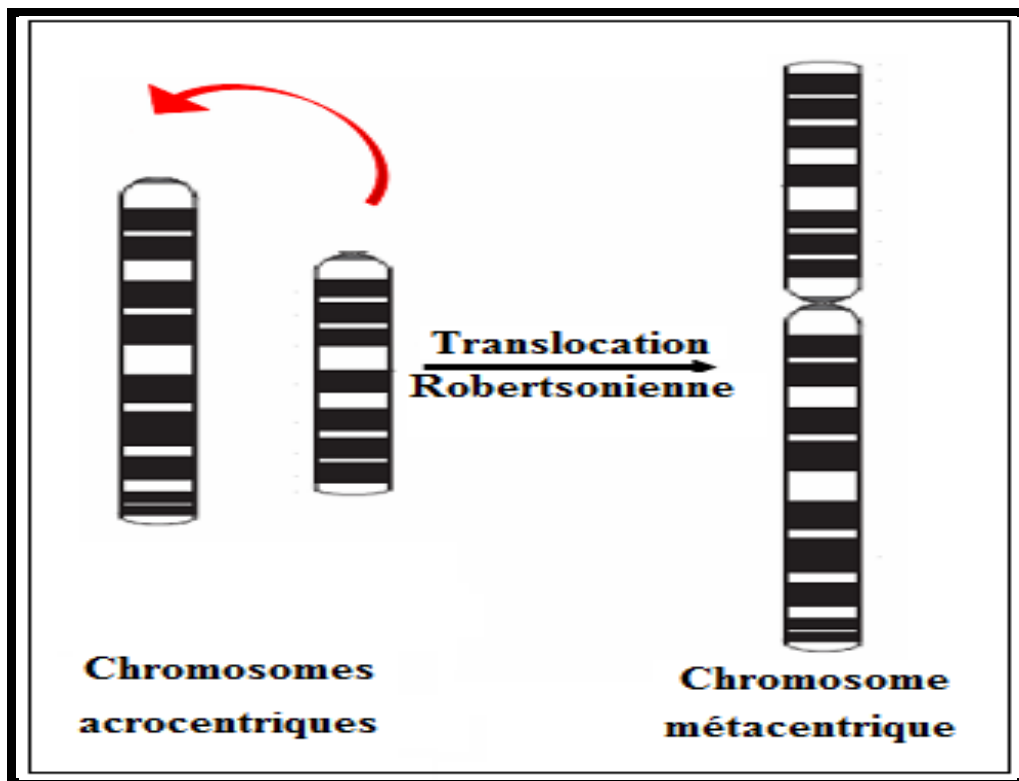


Figure 47 : Eventuel réarrangement chromosomique à l'origine de la formation du chromosome 33 qui est chez les cervidés

# **Conclusions et Perspectives**

## Conclusions et Perspectives

Ce travail, consacré à la description des chromosomes d'une espèce menacée de disparition *Cervus elaphus barbarus*, nous a permis d'apporter des informations fondamentales pour la connaissance du génome du cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* en Algérie très peu étudié. Ainsi, nous proposons pour la première fois en Algérie, un caryotype en bandes GTG et RBG de cette espèce. La comparaison avec le caryotype du cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus* nous a facilité l'identification des chromosomes.

Nous avons également réalisé un caryotype en bandes GTG du cerf élaphe installé au niveau de la réserve de chasse de Zéralda et dont l'origine est inconnue mais qui serait un cerf d'Europe.

Nous avons également montré, après la comparaison individuelle des chromosomes du cerf de Berbérie et du cerf élaphe de la réserve de chasse de Zéralda, la présence du même nombre de chromosomes et des similitudes de morphologie, surtout entre les chromosomes du cerf élaphe *Cervus elaphus* de Zéralda et du cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus* décrit dans la littérature.

Cependant quelques différences ont été observées entre les chromosomes du cerf de Berbérie et les chromosomes du cerf d'Europe.

Cette description des chromosomes du cerf de Berbérie est une première approche pour la connaissance du génome de cette espèce et permet l'établissement d'une base de données génomique. Pour poursuivre notre étude, nous proposons de confirmer nos résultats par l'utilisation d'autres animaux. Une description plus précise des chromosomes pourra être apportée en réalisant un marquage en bandes CBG.

Il serait également intéressant de réaliser une étude génomique utilisant des marqueurs moléculaires spécifiques afin de comparer le cerf de Berbérie *Cervus elaphus barbarus* et le cerf d'Europe *Cervus elaphus corsicanus* et d'éclaircir leur relation phylogénétique. Ensuite, il nous sera possible de détecter les animaux hybrides.

# Références Bibliographiques



- 1-Abdoun F. (2011). Description des caryotypes des races caprines locales en vue de l'établissement d'une base de données génomique. Thèse de Magister. USTHB.
- 2-Amadou O. (2002). Le cerf de Berbérie (*Cervus elaphus barbarus*, Bennet 1833) dans la réserve de Mhebès, régime alimentaire, recensement de la population dans la réserve de Mhebès, mesure des bois et répartition dans les Mogods. Mémoire de DEA, Fac. Sci. Bizerte, 127 pp.
- 3-Barendse W., Armitage S.M., Kossarek L.M., Shalom A. et Kirkpatrick B.W. (1994). A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat. Genet.* 6:227–235.
- 4-Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T. et Sunden S.L.F. (1994). A genetic linkage map of cattle. *Genetics.* 136: 619–639.
- 5-Bloom S.E. et Goodpasture C. (1976). An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Hum. Genet.* 34: 199-206.
- 6-Bonnet G. et Klein F. (1991). Le Cerf. *Ed. Hâtier. Paris.* 260 p.
- 7-Bonnet-Garnier A., Claro F., Thevenon S., Gantier M. et Hayes H. (2003). Identification by R-banding and FISH of chromosome arms involved in Robertsonian translocations in several deer species. *Chromosome Res.* 11: 649–663.
- 8-Boyum A. (1968). Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scand.J. Clin. Lab. Invest.* 21: 31-40.
- 9-Bubenick A.B. (1989). Sociobiological versus Hunter's Viewpoints on Antlers and Horns-In TRENSE, WERNER - Big Game of the World - Paul Parey, Hambourg. 355-380.
- 10-Burthey F., Burthey A., Sennaoui F. et Bensafia N. (1990). La sauvegarde du cerf de Berbérie (*Cervuselaphus barbarus*) en Algérie: Bilan et perspectives. *Bull. Mens. Off. Natl chasse.* 162: 37-44.
- 11-Burthey A. (1991). Etude du régime alimentaire du cerf de Berbérie par analyse des Fèces. Mém. Dip. De l'E.P.H.E. Université. Montpellier. 90p.
- 12-Carlenius C., Rytman H., Tegelström H. et Jansson H. (1981). R, G and C-banded chromosomes in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Hereditas.* 94: 61-66.
- 13-Caspersson T., Zech L. et Johansson C. (1970). Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA binding fluorescent agents. *Exp. Cell Res.* 62: 490-495
- 14-Clément G., Anne R. et Alexandre H. (2006). Mitochondrial and nuclear phylogenies of cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology and biogeography. *Molecular and phylogenetics and evolution.* 40: 101-117.



- 16-Comings D.E. (1973). Biochemical mechanisms of chromosome banding and color banding with acridine orange. In: Casperson T, Zech L (eds) Nobel Symposium: Chromosome identification techniques and application in biology and medicine. *Academic Press, NewYork*. 23: 293-299.
- 17-Comings D.E. (1978). Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Ann Rev Genet*. 12: 25-46.
- 18- Couturier J., Dutrillaux B. et Lejeune J. (1973). Etude de fluorescences spécifiques des bandes R et des bandes Q des chromosomes humains: C. R. *Acad. Sci. Paris*. 2767: 339-342.
- 19-Crawford, A.M., Dodds K.G., Ede A.J., Pierson C.A. et Montgomery G.W. (1995). An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics*. 140: 703-724.
- 20-Crigel M.H., Balligand M. et Heinen E. (2001). Les bois de cerf. *Ann.Méd. Vét.*145: 25-38.
- 21-Crown I. et McHolloway C.W. (1973). Threatened deer of the world: conservation status. *Biol. Conserv*. 5:243-250.
- 22-De Sario A. et Bernardi G. (1995). Structure moléculaire de bandes chromosomiques et distribution des gènes chez l'homme. Molecular structure of human chromosome bands and gene distribution. Thèse de doctorat. 156 p.
- 23-Dhouib S. (1998). Contribution à l'étude du cerf de Berbérie (*Cervus elaphus barbarus*, Bennet, 1833), espèce préservée du Parc National de El Feidja: régime alimentaire et recensement de la population. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies Sciences de l'Environnement. Université de Tunis II. Faculté des Sciences de Bizerte. 156 pp.
- 24-Di Berardino D. et Iannuzzi L. (1982). Detailed description of R-banded bovine chromosomes. *J. Hered*. 73: 434-438.
- 25-Di Meo G.P., Iannuzzi L., Ferrara L. et Rubino R. (1991). Identification of nucleolus organizer chromosomes in goat (*Capra hircus*). *Caryologia*. 44: 309-316.
- 26-Dolan J.M. (1988). A deer of many lands: A guide to the subspecies of the red deer *Cervus elaphus*. *L. Zoonooz*. 62. (10): 4-34.
- 27-Douzery E.J.P. et Randi E. (1997). The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content. *Mol. Biol. Evol*. 14: 1154-1166.
- 28-Drion P.V., Hanzen C., Wirth D., Beckers J.F., Leboeuf B., Balligand M., Bauvir E., Ropstad E., Gabriel A. et Collin B. (2003). Physiologie de la reproduction et endocrinologie chez les cervidés. *Ann. Med. Vet.*147: 291-313.
- 29-Duarte J.M.B et Jorge W. (1996). Chromosomal polymorphism in several population of Deer (Genus *Mazama*) from Brazil. *Arch. Zootech*. 45: 281-287.



- 30-Dutrillaux B., Grouchy J., Finaz C. et Lejeune J. (1971). Mise en évidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (pronase en particulier). *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 278 : 587-588.
- 31-Dutrillaux B. et Lejeune J. (1971). Sur une nouvelle technique du caryotype humain. *C.R. Acad. Sci.* 272 : 2638-2640.
- 32-Dutrillaux, B. (1973). Nouveau système de marquage chromosomique: les bandes T. *Chromosoma*. 41: 395-402.
- 33-Dutrillaux B. et Covic M. (1974). Etude de facteurs influençant la dénaturation thermique ménagée des chromosomes. *Exp. CellRes.* 85: 143 153.
- 34-Dutrillaux B. et Couturier J. (1981). La pratique de l'analyse chromosomique. *Masson Ed, Paris*.
- 35-Evans H.J., Buckland R.A. et Sumner A.T. (1973). Chromosome homology of heterochromatin in goat, sheep and ox studied by banding techniques. *Chromosoma*. 42: 383-402.
- 36-Fichant R. (1976). L'organisation sociale des hardes de biches. *Plaisirs de la chasse*. 84:71-76.
- 37-Fontana F. et Rubini M. (1990). Chromosomal evolution in cervidae. *Biosystems*. 24:157-174
- 38-Galleze A. (2010). Contribution à la préservation d'une espèce locale menacée de disparition : Établissement du caryotype de la gazelle dorcas *Gazella dorcas*. Thèse de Magister. USTHB
- 39-Geist V. (1998). Deer of the World, their Evolution, Behaviour and Ecology. *Ed Stackpole Books*. 421p.
- 40-Genevieve B., Geraads D. et Jehenne Y. (1989). Nouvelles données relatives à la classification des cervidés (Artiodactyla, Mamalia). *Zool. Anz.* 223: 82-90.
- 41-Goldonie D., Rubini M. et Fontana F. (1984). Cytogenetic studies on *Cervus elaphus L.* Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions. *Caryologia*. 37: 439-443.
- 42-Goosen, G.J.C., Dodds K.G., Tate M.L. et Fennessey P.F. (2000). QTL for pubertal and seasonality traits in male Pere David's x red deer interspecies hybrids. *J. Hered.* **91**: 397-400.
- 43-Gouichiche M. (2006). La réintroduction du cerf de Berbérie dans l'Akfadou (*Cervus elaphus barbarus*, Bennett, 1833). *Bulletin d'information et vulgarisation*. 3: 7-14.



- 44- Graphodatsky A., Sharshov A. et Shutov V. (1990). Karyotypic relationships between Cervidae. *Zool. Zh.* 69: 101–114.
- 45-Gustavsson I. et Sundt C.O. (1968). Karyotype in five species of deer (*Alces alces*, *Capreolus capreolus* L., *Cervus elaphus* L., *Cervus nippon nippon* and *Dama dama* L.). *Hereditas.* 60: 233-248.
- 46-Gustavsson L., Hageltorn M. et Zech L. (1976). Identification of the 1/29 translocation in the Swedish Red and White (SRB) cattle breed by utilization of new staining techniques. *Hereditas.* 82: 260-262.
- 47-Gyurján I.J., Molnár A., Borsy A., Stéger V., Hackler L.Jr., Zomborszky Z., Papp P., Duda E., Deák F., Lakatos P., László G., Puskás. Et Orosz L. (2007). Gene expression dynamics in deer antler : mesenchymal differentiation toward chondrogenesis. *Mol Genet Genomics.* 277: 221–235.
- 48-Haigh J.C., Cates W.F., Glover G.J., Rawlings N.C. (1984). Relationships between seasonal changes in serum testosterone concentrations, scrotal circumference and sperm morphology of male wapiti (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fertil.* 70, 413-418.
- 49-Hajji G.M., Zachos F.E., Charfi-Cheikrouha F., Hartl G.B. (2007). Conservation genetics of the imperilled Barbary red deer in Tunisia. *Anim. Conserv.* 10: 229–235.
- 50-Hajji G.M., Charfi-Cheikrouha F. et Chaabouni H. (2008). Cytogenetic analysis of Tunisian Barbary deer (*Cervus elaphus barbarus*). *Mamm. biol.* 73: 396–398.
- 51-Hajji G.M., CharW-Cheikrouha F., Lorenzini R., Vigne J.D., Hartl G.B. et Zachos F.E. (2008). Phylogeography and founder effect of the endangered Corsican red deer (*Cervus elaphus corsicanus*). *Biodivers. Conserv.* 17: 659–673.
- 52-Hall R. (2009). Deer. *Genome Mapping and Genomics.* 3: 47-74.
- 53-Hammer M. F., Schimentiand L.M. et Silver. (1989). Evolution of mouse chromosome 17 and the origin of inversions associated with T haplotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3261–3265.
- 54-Hansen K.M. (1973b). Q-band karyotype of goat (*Copra hircus*) and the relation between goat and bovine Q-bands. *Hereditas.* **75**: 119-130.
- 55-Hayes H., Petit E. et Dutrillaux B. (1991). Comparisons of RBG-banded karyotypes of cattle, sheep, and goats. *Cytogenet Cell Genet.* 57: 51-55.



- 56-Hayes H. (1993). Analyse caryotypique et cartographie génique comparées chez les trois principaux bovidés domestiques, le boeuf (*Bostaurus*L.), le mouton (*Ovisaries*L.) et la chèvre (*Capra hircus*L.). Thèse de Doctorat. Université Paris. 187p.
- 57- Hassanin A. et Douzery E.J.P. (2003). Molecular and morphological phylogenies of Ruminantia and the alternative position of the moshidae. *Sys. Biol.* 52: 206-228.
- 58-Herzog S. (1987). The Karyotype of the red deer (*Cervus elaphus* L ). *Caryologia.* 40: 299-305.
- 59-Herzog S, et Harrington. (1991). The role of hybridation in the Karyotype evolution of deer ( Cervidae; Artiodactyla; Mammalia ). *Theo Appl Genet.* 82: 425-429.
- 60-Hofmann R.R. (1989). Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive systems. *Oecologica.* 78: 443-457.
- 61-Hsu T.C. (1952). Mammalian chromosomes in vitro. The karyotype of man. *J.Hered.* 43: 167–72.
- 62-ISCNDA. (1989). International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals (eds. Bernardino D., Hayes H., Fries R. et Long S.). *Cytogenel. Cell. Genet.* 53: 65-79.
- 63- Kacem S.B. (1986). Le Cerf de Berbérie en Tunisie. *Rotwild–Cerf Rouge–Red Deer.* pp: 207-212.
- 64-Kacem S.B. et Muller H.P. (1994). Gestion de la faune sauvage et des Parcs Nationaux en Tunisie. Réintroduction, Gestion et aménagement. GTZ/DGF. 305 P.
- 65-Kapes S.M., Keeler J.W., Stone R.T., McGraw R.A. et SonsteGard T.S. (1997). A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.* 7: 235–249.
- 66-Kierdorf G.U. et Kierdorf H.H. (2001). Unilateral antlers growth in a red deer stag (*Cervus elaphus*). *Jagdwiss.*47: 275.279.
- 67-Kurten A. (1968). Pleistocene Mammals of Europe. Weidenfeld and Nicolson. London.
- 68-Kuwayama R. et Ozawa T. (2000). Phylogenetic Relationships among European Red Deer, Wapiti, and Sika Deer Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 115-123
- 69-Kuznetsova M.V., Kholodova M.V. et Danilkin A.A. (2005). Molecular phylogeny of deer (Cervidae: Artiodactyla). *Genetics.* 41. (7): 910.918.



- 70-Lahmar B. e Gouichiche M. (2004). Bilan du projet cerf en Algérie. Document interne, Centre Cynégétique de Zéralda. 44p.0
- 71-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.
- 72-Ladjali K., Bordas A., Crihiu E.P. et Tixier-Boichard M. (1995). 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.
- 73-Ladjali-Mohammedi 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.
- 74-Leakey R. et Lewin R. (1999). The sixth extinction, biodiversity and its survival. Londres. Royaume Uni.
- 75-Lebdioui R. (2010). Description des Chromosomes de la Gazelle Leptocère *Gazella leptoceros*: Espèce menacée de disparition. Thèse de Magister.
- 76-Lee C. et Lin C.C. (1996). Conservation of a 31 b-p bovine subrepeat centromeric satellite DNA monomers of *Cervus elaphus* and other cervid species. *Chromosome research.* 4: 427-435.
- 77-Li Y.C., Lee C., Hsu T.H., Li S.Y. et Lin C.C. (2000). Direct visualization of the genomic distribution and organization of two cervid centromeric satellite DNA families. *Cytogenet Cell Genet.* 89:192-198.
- 78-Ling H., Chi J., Nie W., Wang J. et Yang F. (2006). Phylogenomics of several deer species revealed by comparative chromosome painting with Chinese muntjac paints. *Genetica.* 127: 25-33.
- 79-Lister A.M. (1984). Evolutionary and ecological origins of British deer. *Proc Royal Soc Edinburgh.* 82: 205-229.
- 80-Lister A. M. (1990). Critical appraisal of the middle Pleistocene deer species "*Cervus*" *elaphoides* Kahlke. *Quaternary.* 3(4): 75-192.
- 81-Lister A. M. (1993). The stratigraphical significance of deer species in the Cromer Forest bed formation. *J Quat Sci* 8: 95-108.
- 82-Locatelli Y. et Mermillod P. (2005). Caractéristiques et maîtrise de la fonction de reproduction chez les cervidés. *INRA Prod Anim.* 18 (1): 3-25.



- 83-Lovari S., Herrero J., Conroy J., Maran T., Giannatos G., Stubbe M., Aulagnier S., Jdeidi T., Masseti M., Nader I., de Smet K. et Cuzin F. (2009). *Cervus elaphus*. In: IUCN 2009. *IUCN Red List of Threatened Species*.
- 84-Ludt C.J., Schroeder W., Rottmann O. et Kuehn R. (2004). Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus Elaphus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 31:1064-1083.
- 85-Mahmut H., Masuda R., Onuma M., Takahashi M., Nagata J., Suzuki M. et Ohtaishi N.(2002). Molecular phylogeography of the red deer (*Cervus elaphus*) populations in Xinjiang of China: Comparison with other Asian, European, and North American populations. *Zoolog Sci*. 19 (4): 485-495.
- 86-Matthee C.A. et Davis S.K. (2001). Molecular insights into the evolution of the family Bovidae. A nuclear DNA perspective. *Mol. Biol. Evol.*18:1220-1230.
- 100-Matthey R. (1973). Cytotaxonomy and vertebrate evolution. *Academic Press*.11:47-52.
- 87-Molnár A., Gyurján I., Korpos E., Borsy A., Stéger V., Buzás Z., Kiss L., Zomborszky Z., Papp P., Deák F. et Orosz L. (2007). Identification of differentially expressed genes in the developing antler of red deer *Cervus elaphus*. *Mol Genet Genomics*. 277: 237–248.
- 88-Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J., Battips D.M. et Hungerford D.A. (1960). Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res*. 20: 613.
- 89-Muller H.P. et Hajib S. (1996). La réintroduction du cerf de Berbérie au Maroc. *Terre et vie*.
- 90-Niedziałkowska M., Jędrzejewska B., Honnen A.C., Otto T., Vadim E., Sidorovich., Perzanowski K., Skog A., Günther B., Hartl., BorowikT., Aleksei N., Bunevich., Lang J., Zachos F.E. (2011). Molecular biogeography of red deer *Cervus elaphus* from Eastern Europe: insights from mitochondrial DNA sequences. *Acta Theriol*. 56:1–12.
- 91-Neitzel H. (1987). Chromosome evolution of Cervidae: Karyotypic and molecular aspects. *Cytogenetics-Basic and Applied Aspectsin. Ed. Springer*.90–112.
- 92-Novak R.M. (1991). *Artiodactylia: Family Cervidae*”. Walker’s Mammals of the World. The John Hopkins University Press, Baltimore and London. 2:362-1400.
- 93-Ohtaishi N. et Gao Y. (1990). A review of the distribution of all species of deer (Tragulidae, Moschidae and Cervidae) in China. *Mammal Rev*. 20: 125–144.
- 94-Oumani A., Murgia C., Antonelli F. et Aissa P. (2004). Compared antler developments in Barbary deer (*Cervus elaphus barbarus*) of two Tunisian reserves. *Game and Wildlife Science*. 21 (1): 41-53.



- 95-Oumani A. (2006). Écobiologie du cerf de Barbarie (*Cervus elaphus Barbarus*, Bennet, 1833) en Kroumirie-Mogods. Thèse de doctorat, Fac. Sci. Bizerte, 213 p.
- 96-Oumani A. et Aissa P. (2007). Comportement grégaire des cerfs de Barbarie (*Cervus elaphus barbarus*, Bennett, 1833) présents dans la réserve de Mhebès (Tunisie). *Ecologia mediterranea*. 33: 95-99.
- 97-Pepin L., Amigues Y., Lepingle A., Berthier J.L., Bensaid A. et Vaiman D. (1995). Sequence conservation of microsatellites between *Bostaurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity*. 74 (Pt 1):53–61
- 98-Pitra C., Fickel J., Meijaard E. et Groves P.C. (2004). Evolution and phylogeny of old world deer. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33: 880–895.
- 99-Pollock D.L. et Fechheimer N.S. (1976). The chromosome number of *Gallus domesticus*. *Br.Poult. Sci.* 17: 39-42.
- 100-Polziehn R.O. et Strobeck. (1998). Phylogeny of Wapiti, Red deer, Sika Deer, and Other North American cervids as Determined from Mitochondrial DNA. *Mol. phylogenet.Evolution*. 10. (2): 249-258.
- 101-Polziehn R.O. et Strobeck C.A. (2002). Phylogenetic comparison of red deer and wapiti using mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 22. (3): 342-356.
- 119-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.
- 102-Popescu C.P. (1990). Conséquences des anomalies de la structure chromosomique chez les animaux domestiques. *Reprod Nutr Dev.* 1: 105-116.
- 103-Randi E., Mucci N., Pierpaoli M. et Douzery E. (1998). New phylogenetic perspectives on the Cervidae (*Artiodactyla*) are provided by the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Proc. R. Soc.Lond. ser.* 265: 793–801.
- 104-Randi E., Mucci N., Françoise C.H., Amélie B. et Douzery E.J.P. (2001). A mitochondrial DNA control region phylogeny of the Cervinae: Speciation in *Cervus* and implications for conservation. *Anim. Conserv.* 4: 1–11..
- 105-Roger F. (2003). Le cerf: Biologie, comportement, gestion. *Ed. Gerfaut. Paris.* 248p.
- 106-Rolland M. (2003). Le statut du cerf élaphe (*Cervus elaphus*) dans le département des Alpes Maritimes. PhD. Ecole vétérinaire. Toulouse. 186p.
- 107-Rubini M., Giunta C. et Fontana F. (1991). High-resolution G-banded Karyotype of *Cervuselaphuscorsicanus*. *Caryologia*. 44. (3):75-381.



- 108- Salez M. (1959). Notes sur la distribution et la Biologie du cerf de Barbarie (*Cervus elaphus barbarus*). *Mammalia*. 23:133–138.
- 109- 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.
- 110-Seabright M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet II*: 971-972.
- 111-Shi L., Ye Y. et Duan X 1980. Comparative cytogenetics studies on red munjtac, Chinese munjtac and their F1 hybrid. *Cytogenet. Cell. Genet.* 26:22-27.
- 112- Shnedl W. et Czaker R. (1974). Centromeric heterochromatin and comparison of G-banding in cattle, goat, and sheep chromosomes (Bovidae). *Cytogenet. Cell. Genet.* 13: 246-255.
- 113- Slate J., Coltman D.W., Goodman S.J., MacLean I., Pemberton J.M. et Williams J.L. (1998). Bovine microsatellite loci are highly conserved in red deer (*Cervuselaphus*), sika deer (*Cervus nippon*) and Soay sheep (*Ovis aries*). *Animal Genetics*. 29: 307-315.
- 114- Slate J., Van Stijin T.C., Anderson R.M., McEwan K.M., Maqbool N.J.N., Mathis H.C., Bixely M.J., Stevens D.R., Molenaar A.J., Beever J.E., Galloway S.M. et Tata M.L. (2002). A Deer (Subfamily Cervinae) Genetic Linkage Map and Evolution of Ruminant Genomics. *Genetics*. 160:1587-1597.
- 115- Sumner A.T., Evans H.J. et Buchland R.A. (1971). A new technique for distinguishing between human chromosomes. *Nat. New. Biol.* 232:31–32.
- 116- Sumner A.T. (1972). A simple technique for demonstratin centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res.* 75: 304–306.
- 117- Suttie J.M., Gluckman P.D., Butler J.H., Fennessy P.F., Corson I.D. et Laas F.J. (1985). Insulin-Like growth factor 1 (IGF-1) antler stimulating hormone. *Endocrinology*. 116:846-848.
- 118- Suttie J.M., Fennessy P.F., Corson I.D., Laas F.J., Elgar H.J. et Lapwood K.R. (1989). LH and testosterone responses to GnRH in red deer (*Cervuselaphus*) stags kept in a manipulated photoperiod. *J. Reprod. Fertil.* 85: 213-219.
- 119- Suttie J.M., Fennessy PF., Lapwood K.R. et Corson I.D. (1995a). Role of steroids in antler growth of red deer stags. *J Exp Zool.* 271: 120-130.
- 120- Tate M.L., Anderson R.M., McEwan K.M., Goosen G.J., Pearse A.J. (1998). Genetic analysis of farmed deer hybrids. *Acta Vet Hung.* 46:329–340
- 121- Tjio JH. et Levan A. (1956). The chromosome number of man. *Hereditas*. 42: 1-6.



- 122- Ueckermann E. (1987). Managing German red deer (*Cervus elaphus*L.) populations. In "Biology and Management of the Cervidae" Ed CM Wemmer, Smithsonian Inst Press, Washington D.C. 505–516.
- 123-Vaiman D., Billault A., Tabet-Aoul K., Schinler L., Vilette D., Oustry-Vaiman A., Soravito C. et Crihiu E. P. (1999b). Construction and characterization of a sheep BAC library of three genome equivalents. *Mamm. Genome* **10**: 585-587.
- 124- Vassart M., Séguéla A. et Hayes H. (1995). Chromosomal Evolution in Gazelles. *The Journal of Heredity*.86 (3): 216-227.
- 125-Viegas-Pequignot E. et Dutrillaux B. (1978). Une méthode simple pour obtenir des prophases et des prométaphases. *Ann. Génét.* **21**: 122-125.
- 126- Vislobokova I.A. (2008). The major Stages in the Evolution of Artiodactyl Communities from the Pliocene-Early of Northern Eurasia. *J. Paleontological*. 425 (3): 297-312.
- 127-Wada K., Okumura K., Nishibori M., Kikkawa Y. et Yokohama M. (2010). The complete mitochondrial genome of the domestic red deer (*Cervuselaphus*) of New Zealand and its phylogenetic position within the family cervidae. *J.Anim Sci.* 81(5): 551-557.
- 128- Wang, W. et Lan H. (2000). Rapid and parallel chromosomal number reductions in Muntjac deer inferred from mitochondrial DNA phylogeny. *Mol. Biol. Evol.*17(9):1326–1333.
- 129- Webster J.R., Corson I.D., Littlejohn R.P., Stuart S.K. et Suttie J.M. (1999). Effects of photoperiod on the cessation of growth during autumn in male red deer and growth hormone and insulin-like growth factor-I secretion. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 464-477.
- 130- Wemmer C. (1998). Deer. Status survey and conservation action plan. IUCN/SSC Deer Specialist Group. Gland. Cambridge.
- 131-Wurster D.H. et Benirschke K. (1970). Indian muntjac, *Muntiacusmuntjak*: A deer with a low diploid chromosome number. *Science*. 168: 1364–1366.
- 132-Wurster D. H. et Atkin N. B. (1972). Munjtac chromosomes : A new Karyotype for *Muntiacus munjtac*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **28** (8): 972-973.
- 133- Yang F., O'Brien P.C.M., Wienberg J. et Fergusonsmith M.A. (1997b). A reappraisal of the tandem fusion theory of karyotype evolution in the Indian muntjac using chromosome painting. *Chromosome Res.* 5(2): 109–117.
- 134-Yang, Y.P. et Womack J.E. (1998). Construction of a bovine chromosome 19 linkage map with an interspecies hybrid backcross. *Mamm. Genome*. **8**: 262–266.
- 135-Zakharov A.F. et Egolina N.A. (1968). Asynchrony of DNA replication and mitotic spiralization along heterochromatic portions of Chinese hamster chromosomes. *Chromosoma*.23: 365-385.
- 136- Zhang W.Q. et Zhang M.H. (2012). Phylogeny and evolution of Cervidae based on complete mitochondrial genomes. *Genetics and Molecular Research*. 11 (1): 628-635.

## **Abstract**

The Barbary deer *Cervus elaphus barbarus* is an endemic species of North Africa, whose range is now limited to the north east of Algeria and the north east of Tunisia. This regression is under the influence of several threats such as poaching, deforestation causing habitat fragmentation and natural disasters such as fires can lead to the disappearance of the species. In Algeria, several attempts to conserve the Barbary deer *Cervus elaphus barbarus* were implemented with the creation of protected areas like El Kala National Park and Zoological Park of Ben Aknoun. Also, the people building programs such as the Center Hunting of Zéralda in order to reintroduction of this species in its natural habitat were initiated such as forests Akfadou of Bejaia and Collo of Skikda. In order to begin the description of the genome of the Barbary deer, a cytogenetic study was undertaken for the first time in Algeria in order to detect any chromosomal abnormalities and a comparison with other species of deer as *Cervus elaphus corsicanus*. We have karyotyped by GTG banding and RBG from lymphocyte cultures. The applied techniques were adapted to this species from protocols developed in humans and domestic mammals. Of the cell cycle synchronization with the incorporation of BrdU, which is a structural analogue of thymidine, during replication of DNA, were carried out. This allowed us to obtain high-resolution chromosomes very elongated. The diploid chromosome number was estimated at 68 chromosomes, as for most species in this family. The comparison of individual chromosome pairs of autosomes and sex chromosomes XY chromosome of Barbary red deer *Cervus elaphus barbarus* and deer of Zéralda *Cervus elaphus* with the chromosomes of European red deer *Cervus elaphus corsicanus*, revealed homologies and differences for chromosome 1 and chromosome 33 of the both subspecies.

**Keywords:** Barbary deer *Cervus elaphus barbarus*, endangered species, genome, band GTG and RBG, karyotype, chromosomes at high resolution.

## **ملخص**

الأيل البربري هو حيوان خاص بمنطقة شمال إفريقيا يمتد مركزه في وقتنا الحالي إلى الشمال الشرقي في الجزائر و الشمال الغربي في تونس. يعود هذا التراجع إلى عدة عوامل و تهديدات أهمها الصيد و إزالة الغابات التي ساهمت بشكل كبير في انقراضه. قامت الجزائر بعدة محاولات للمحافظة على الأيل البربري بإقامة عدة محميات من بينها الحظيرة الوطنية بالقالة و حديقة الحيوانات بين عكنون إضافة إلى العديد من البرامج التي تهدف لتكثيف هذه السلالة كمركز الصيد و إعادة التأهيل بزرالدة و هذا من أجل إعادة ادماج هذا الحيوان في بيئته الطبيعية في غابات اكفادو ببجاية و كولو بسكيكدة. من أجل الشروع في و صف جينات الأيل البربري قمنا بدراسة جينية لأول مرة في الجزائر بهدف الكشف عن أي شذوذ في الكروموزومات و مقارنتها مع أنواع أخرى من الأيائل مثل الأيل الأوروبي. قمنا باقتراح النمط النووي بالأشرطة الورفولوجية و الدينامية المتحصل عليها بعد استنبات الكريات الدموية البيضاء التقنيات المستعملة لهذا النوع تم تكييفها ابتداء من بيوتوكولات مضبوطة عند الانسان و الثدييات الأليفة. قمنا بمزامنة الدورة الخلوية و هذا ما مكننا من الحصول على صبغيات عالية الدقة. قدر عدد الصبغيات المتحصل عليها ب 68 صبغي كغالبية من السلالات المنتمة إلى نفس العائلة. المقارنة الفردية لكروموزومات الأيل البربري و الأيل المتواجد بمركز الصيد بزرالدة مع كروموزومات الأيل الأوروبي اظهر لنا و جود تشابه و اختلاف بين الكروموزوم 1 و الكروموزوم 33 لهذين الأيلين.

**كلمات المفتاح:** الأيل البربري – حيوان مهدد بالانقراض-جينوم – الأشرطة المرفلوجية و الدينامية – الطابع النووي – الصبغيات.

