

République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem
Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie
Département de Biologie



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

Mémoire
Présenté pour l'obtention du diplôme de
MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Génétique fondamentale et appliquée

Par
TOUBAL Larbi-Youcef

Thème :

Extraction d'ADN à partir du sang total de trois espèces eucaryotes par la technique du "Salting Out"

Soutenue le 21/06/2023 devant le jury composé de :

Président	CHIBANI Abdelwaheb	Pr	Université de Mostaganem
Encadreur	DAHMANI Chahinez Amira	MCB	Université de Mostaganem
Examinatrice	DALACHE Fatiha	Pr	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné le courage, la patience et la force d'accomplir cet humble travail et que sans son aide tout cela ne serait point été fait.

J'adresse mes plus vifs remerciements aux membres du jury ;

Monsieur le président **Pr. CHIBANI ABDELWAHEB-MOHAMED** pour sa disponibilité et le bien qui m'a apporté durant mon parcours universitaire.

Je réitère mes sincères remerciements et ma gratitude à Madame l'examinatrice **Pr. DALACHE FATIHA** pour son soutien, le partage de ses compétences scientifiques, son honnêteté et sa gentillesse.

Je voudrais adresser un merci tout particulier à mon encadreur de recherche de ce mémoire Madame **DAHMANI CHAHINEZ AMIRA.**, pour son aide précieuse, ses judicieux conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion et pour le temps qu'elle m'a consacré.

Durant ces cinq années, j'ai eu l'occasion de rencontrer un grand nombre d'enseignants qui ont pris le temps d'échanger avec moi et de m'aider, je les remercie de tout mon cœur.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aussi aux personnes suivantes, pour leur aide dans la réalisation de ce mémoire :

- Monsieur **BOUDJEMA ABDELLAH** ; directeur du laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire à l'Université Mohamed-Boudiaf d'ORAN (USTO-MB) pour l'autorisation d'accès au laboratoire afin de réaliser les différentes manipulations de ce travail de mémoire ainsi que son accueil chaleureux.
- Madame **SIFI LAYLA** pour sa confiance et autorisation des prélèvements sanguins au laboratoire médical EL AMINE à Mostaganem.
- Madame **BENSMAIL NAWEL** et Madame **BENYAKHO NABILA** pour leur encouragement de près et de loin.
- Madame la technicienne du laboratoire de Biochimie 1 à l'université de Mostaganem.
- Mesdemoiselles **HENDI ILHEM** et **HENDI NASSIMA** pour leur bonneté.

Dédicace

A ma très chère mère

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier
comme il se doit.*

*Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence
à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les
différents obstacles.*

*A mon très cher père tu as toujours été à mes côtés pour me
soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et
mon affection*

A mes très chers frères Toufik et Nadhir

A tous mes autres ami(e)s

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment

*Puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout
réussite*

Résumé

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont des étapes importantes dans la plupart des recherches en biologie moléculaire. L'objectif de ce travail était d'isoler l'ADN par la technique du *Salting-out*, pour cela, nous nous sommes intéressés à son extraction à partir du sang des espèces : Humaine, Volaille et Bovine. Nous avons collecté dans différentes structures à Mostaganem, 7 prélèvements de sang sur des tubes EDTA à partir des trois espèces étudiées. Afin de mettre en œuvre un protocole idéal pour chaque espèce, nous avons réalisé les extractions d'ADN en utilisant un protocole standard disponible au sein du Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire à l'Université des Sciences et de la Technologie d'Oran. Ensuite, un dosage optique a été fait au laboratoire de Biochimie 1 à l'Université de Mostaganem pour analyser la qualité et la quantité des ADNs extraits. Les résultats d'extraction de l'ADN à partir des 3 espèces sélectionnées nous ont permis d'observer des méduses de qualité différentes. Le degré de pureté des ADNs extraits variait entre 0.2 et 2.65 et la concentration d'ADN variait entre 0,2 et 0,7 ug/ul. En perspectives, il serait intéressant de revoir certaines étapes de l'extraction d'ADN afin d'améliorer la qualité des méduses retrouvées et le rapport de pureté.

Mot clés : extraction d'ADN, sang, *Salting-out*, électrophorèse, densité optique.

Abstract

The extraction and purification of nucleic acids are important steps in most research in molecular biology. The objective of this work was to isolate DNA by the Salting-out technique, for this, we were interested in its extraction from the blood of the species: Human, Poultry and Bovine. We collected in different structures at Mostaganem, 7 blood samples of EDTA tubes from the three species studied. In order to implement an ideal protocol for each species, we carried out the DNA extractions using a standard protocol available within the Molecular and Cellular Genetics Laboratory at the University of Science and Technology of Oran. Then, an optical assay was made at the laboratory of Biochemistry 1 at the University of Mostaganem to analyze the quality and the quantity of the DNA extracted. The DNA extraction results from the 3 selected species allowed us to observe different quality jellyfish like cloud. The degree of purity of the DNA extracted varied between 0.2 and 2.65 and the DNA concentration varied between 0.2 and 0.7 ug / ul. In perspective, it would be interesting to review certain stages of DNA extraction in order to improve the quality of the redacted jellyfish and the purity ratio.

Keywords: DNA extraction, blood, *Salting-out*, electrophoresis, optical density.

ملخص

يعد استخراج وتنقية الأحماض النووية خطوات مهمة في معظم الأبحاث في علم الأحياء الجزيئي، وخاصة البحث الجيني. كان الهدف من هذا العمل هو استخلاص الحمض النووي من خلال تقنية التمليح، لذلك كنا مهتمين باستخراجه من دم الأنواع: الإنسان والدواجن والبقر. قمنا بجمع العينات من أماكن مختلفة في مستغانم، 7 عينات دم في أنابيب EDTA من الأنواع الثلاثة المدروسة. من أجل تنفيذ بروتوكول مثالي لكل نوع، قمنا باستخراج الحمض النووي باستخدام بروتوكول قياسي متاح داخل مختبر علم الوراثة الجزيئي والخلوي في جامعة العلوم والتكنولوجيا في وهران. بعد ذلك، تم إجراء فحص ضوئي في مختبر الكيمياء الحيوية 1 في جامعة مستغانم لتحليل جودة وكمية الحمض النووي المستخرج. سمحت لنا نتائج استخراج الحمض النووي من الأنواع الثلاثة المختارة بمراقبة كتلة هلامية ذات الجودة المختلفة. تراوحت درجة نقاء الحمض النووي المستخرج بين 0.2 و 2.65 وتفاوت تركيز الحمض النووي بين 0.2 و 0.7 ميكروغرام / ul. من حيث المنظور، سيكون من المثير للاهتمام مراجعة مراحل معينة من استخراج الحمض النووي من أجل تحسين جودة قنديل البحر المنقح ونسبة النقاء.

الكلمات الرئيسية: استخراج الحمض النووي، الدم، التمليح، الرحلان الكهربائي، الكثافة البصرية.

Table des matières

Remerciements	II
Dédicace	III
Résumé.....	IV
Abstract.....	V
ملخص	VI
Liste des tableaux.....	VII
Liste des figures.....	VIII
Liste des abréviations	IX
Introduction.....	1

CHAPITRE I : LA CELLULE EUCARYOTE

1 La cellule eucaryote	2
1.1 Organisation générale.....	2
1.2 Structure et organites types d'une cellule eucaryote.....	3
1.3 Caractéristique de la cellule eucaryote.....	5
2 Fonctions de la cellule eucaryote.....	5
3 Types de cellules eucaryotes	6
3.1 Cellule protiste	6
3.2 Cellule fongique	6
3.3 Cellule végétale	6
3.4 Cellule animale.....	6

CHAPITRE II : LA MOLECULE D'ADN

1 Structure de l'ADN.....	7
1.1 Désoxyribose	7
1.2 Groupement phosphate.....	8
1.3 Les bases	8
1.4 Les nucléosides et nucléotides	9
1.5 Les acides nucléiques	9
2 Propriétés physico-chimiques de l'ADN.....	10
2.1 Propriétés chimiques	10
2.1.1 Solubilité.....	10
2.1.2 Hydrolyse.....	10

2.2	Propriétés physiques.....	10
2.2.1	Température de fusion	10
2.2.2	Absorption de la lumière ultraviolette	11

CHAPITRES III : LE SANG

1	Le sang	12
1.1	Composant du sang	12
1.1.1	Les globules rouges.....	12
1.1.2	Les globules blancs	13
1.1.3	Les plaquettes.....	13
1.1.4	Le plasma	13
2	Sang de volaille (gallus gallus domesticus).....	13
2.1	Plasma	14
2.2	Lignée rouge (Erythrocytes).....	14
2.3	Lignée blanche	14
2.3.1	Polynucléaires	14
2.3.2	Lymphocytes.....	14
2.3.3	Monocytes.....	15
2.4	Lignée plaquettaire	15

CHAPITRES IV : LES METHODES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION D'ADN

1	Les étapes principales de l'extraction d'ADN	16
1.1	Lyse des cellules.....	16
1.1.1	Lyse mécanique	16
1.1.2	Lyse chimique	17
2	Extraction d'ADN à partir du sang	17
3	Les différentes méthodes d'extraction d'ADN	17
3.1	Méthodes utilisant des solvants organiques	18
3.2	Méthode de fixation sur la silice	18
3.3	Méthodes utilisant des solvants non organiques	19
3.4	Méthodes basées sur l'utilisation de colonnes résines échangeuses d'ions	19
3.5	Méthode de la chromatographie échangeuse d'anions.....	19
3.6	Méthode de la séparation magnétique	20
3.7	Extraction d'ADN automatisé.....	21
4	Comparaison entre différentes méthodes d'extraction et de purification de l'ADN.....	21

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

1	Matériel.....	23
1.1	Prélèvements sanguins	23
1.1.1	Echantillon humain	23
1.1.2	Echantillon animal	23
1.2	Le matériel utilisé pour l'extraction d'ADN	23
1.2.1	Produits et solutions utilisés.....	23
1.3	Matériel utilisé pour l'électrophorèse	24
1.3.1	Produit utilisé pour l'électrophorèse	24
1.4	Matériel utilisé pour le dosage spectrophotométrique	24
2	Méthodes.....	24
2.1	Extraction de l'ADN par la technique au NaCl « <i>Salting-out</i> »	24
2.2	Préparation des échantillons.....	24
2.3	Lyse des globules rouges.....	25
2.4	Lyse des globules blancs	25
2.5	Précipitation de l'ADN.....	25
2.6	Récupérations des méduses	26
3	Electrophorèse sur gel d'agarose	26
3.1	Préparation d'un gel agarose à 0.8%	26
3.2	Chargement des échantillons sur le gel	27
3.3	Migration électrophorétique et visualisation.....	27
4	Evaluation de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait	27
4.1	Dosage spectrophotométrique de l'ADN	27
4.2	Estimation de la pureté de l'ADN.....	28
4.3	Evaluation de la concentration des ADN.....	28

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1	Résultats de l'échantillonnage	29
2	Résultats de l'extraction des ADN.....	30
2.1	La lyse des globules rouges.....	30
2.2	La lyse des globules blancs	30
2.3	Précipitation de l'ADN.....	31
3	Résultats du test de présence des ADN.....	32
4	L'estimation du degré de pureté des échantillons d'ADNs	33
4.1	Concentration des ADN extraits	34

Conclusion et perspectives	35
Bibliographie	36

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des organites de la cellule eucaryote -----	3
Tableau 2 : Avantages et inconvénients des méthodes d'extraction et de purification de l'ADN.-----	22
Tableau 3 : Les différents prélèvements réalisés à Mostaganem pour l'extraction d'ADN à partir du sang total de trois espèces. -----	29
Tableau 4 : Les cinq échantillons sélectionnés pour l'extraction d'ADN à partir du sang total de trois espèces. -----	29
Tableau 5 : L'estimation de la pureté et la concentration des échantillons d'ADN. -----	33

Liste des figures

Figure 1 : La structure d'une cellule eucaryote animale -----	4
Figure 2 : La structure d'une cellule eucaryote végétale -----	4
Figure 3 : Sucre (Pentose) -----	8
Figure 4 : Représentation moléculaire des bases puriques et pyrimidines -----	9
Figure 5 : Structure d'un nucléotide -----	9
Figure 6 : Courbe de séparation des brins d'ADN en fonction de la température -----	11
Figure 7 : Détermination de la concentration des acides nucléiques par absorbance de la lumière ultraviolette-----	11
Figure 8 : Différents composants du sang-----	12
Figure 9 : Attachement de l'ADN au support de chromatographie -----	20
Figure 10 : Isolation de l'ADN par chromatographie échangeuse d'anions -----	20
Figure 11 : (A) récupération d'une méduse, (B) dépôt des échantillons dans un bain-marie.	26
Figure 12 : la collecte de différentes méduses d'ADN.-----	31
Figure 13 : la visualisation des bandes d'ADN par électrophorèse.-----	32

Liste des abréviations

(A) : Adénosine

(C) : Cytidine

(G) : Guanosine

(T) : Thymidine

[C] : Concentration

°C : Celsius

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

BET : Bromure d'ethidium

Cm : centimètre

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DEAE cellulose : di-éthyl-amino-éthyl cellulose

DO : Densité Optique

EDTA : Éthylène diamine tétra-acétique

g : pesanteur artificielle

HCl : Acide chlorhydrique

Kb : Kilobase

Kcal : Kilocalorie

Kda : Kilo dalton

M : Molaire

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium

mM : Millimolaire

NaCl : Chlorure de Sodium

nm : nanomètre

OH : Hydroxyde

pH : Potentiel d'hydrogène

PK : Proteinase K

R = A260nm / A280nm : Rapport de densité optique

H₃PO₄ : Acide phosphorique

RNase : Ribonucléase

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SLB : La Solution de Lyse des globules Blancs

TBE : Tris Borique EDTA

TE : Tris – EDTA

TLR : Toll-Like Receptor

Tm : Température de fusion

Tr : Tour

Tris : Tris aminométhane

UV : ultraviolet

Vs : versus

μl : Microlitre

μM : Micromolaire

Introduction

La doctrine de la biodiversité, procaryote ou eucaryote animal ou végétal ainsi que l'homme exige une auscultation de son patrimoine génétique par de distinctes techniques de biologie moléculaire, cette dernière comme toute autre discipline scientifique a connu une vaste expansion des technologies.

L'extraction de l'ADN et la purification des acides nucléiques sont une étape éminente dans la plupart des études de biologie moléculaire particulièrement la génétique. Différents tissus peuvent être utilisés selon l'objectif à atteindre mais en tout premier lieu, le sang est favorisé car il est le plus simple à prélever concernant l'humain et l'animal.

Le processus d'extraction de l'ADN à partir du sang total est très simple, différents protocoles opératoires sont possibles et plusieurs produits sont nécessaires tels que : la protéinase K. Cette étape de biologie moléculaire est devenue une technique de routine dans les laboratoires de recherches depuis l'utilisation des méthodes des solvants non organiques principalement la « Méthode du *Salting-out* ». L'extraction d'ADN par le phénomène biochimique du « *salting-out* » a permis de réduire le coût et surtout éviter d'éventuels dangers retrouvés par exemple dans la méthode d'extraction au phénol-chloroforme.

Dans ce travail, nous avons essayé d'isoler l'ADN à partir de trois espèces eucaryotes différentes ; Humaine, Volaille et Bovine ; afin d'établir un protocole d'extraction d'ADN idéal à chaque espèce. Dans cette perspective, nous avons commencé la partie pratique de ce mémoire par les prélèvements des échantillons sanguins à partir des trois espèces citées dans la wilaya de Mostaganem. Ensuite, nous avons procédé à l'extraction d'ADN par la technique du « *salting-out* » suivie par une électrophorèse, ces deux étapes ont été réalisées au laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire (LGMC) de l'université d'USTO-MB. Nous avons clôturé la partie pratique par un dosage optique des ADNs extraits en utilisant un spectrophotomètre au laboratoire de Biochimie 1 à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Mostaganem. Un test de qualité a été appliqué à tous les ADNs extraits dans ce travail, puis nous avons estimé la concentration de ces molécules d'ADN.

CHAPITRE I

LA CELLULE EUCARYOTE

La cellule est une entité microscopique, distincte et séparable, définie par une limite physique, une frontière qui la sépare des autres cellules ou du milieu environnant, et définie par un schéma d'organisation interne précis. C'est l'assemblage ordonné de certains composés organiques qui sert de support à cette architecture.

Une cellule est l'unité de vie dont l'activité conduit à l'exécution d'un certain nombre de fonctions, qui s'exercent de manière autonome, mais toujours en étroite collaboration avec le milieu environnant (**Cornec, 2014**).

1 La cellule eucaryote

La cellule eucaryote, une fois apparue, a connu un grand succès au cours de l'évolution et s'est diversifiée dans une myriade d'organismes ayant des tailles similaires à celle des cellules bactériennes (1-2 μm) jusqu'à des organismes aussi massifs que les baleines, les séquoias géants ou les armillaires, champignons communs dont les mycéliums peuvent peser jusqu'à 2 000 tonnes (**Silar, 2016**).

Les cellules eucaryotes sont encore plus complexes. De plus, comparées aux cellules procaryotes, elles présentent une diversification fantastique au niveau morphologique et au niveau de l'organisation qu'elles adoptent : cellules isolées, coloniales ou intégrées et différenciées dans un organisme pluricellulaire (**Silar, 2016**).

1.1 Organisation générale

Les eucaryotes dont les cellules de taille comprise entre 10 et 100 μm en général sont beaucoup plus volumineuses que les cellules procaryotes et présentent un cytoplasme hautement structuré, contenant une grande diversité d'organites tels que : le noyau (**Allaoui, 2022**).

Dans le cas d'organismes multicellulaires, chaque cellule est une entité vivante qui fonctionne de manière autonome, mais coordonnée avec les autres cellules. Sans oublier que l'architecture fondamentale de toutes les cellules eucaryotes comprend les membranes, les organites et le cytosol, chaque type de cellule présente une forme caractéristique ainsi qu'un rôle physiologique bien précis (**Allaoui, 2022**).

1.2 Structure et organites types d'une cellule eucaryote

La cellule désigne l'unité fondamentale pour la majorité des êtres ou organisme vivant. A la différence des cellules procaryotes les cellules eucaryotes ont un noyau. Liées à une caractérisation structurale bien définie de leur fonction présentée en (**Figure 1 et 2**) Néanmoins, les cellules eucaryotes partagent de nombreux points communs qui permettent de définir un modèle de cellule eucaryote. Dont on cite les principaux organites cellulaires présentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Résumé des organites de la cellule eucaryote (Bresnick *et al.*, 2004).

Organite	Description	Fonction
Noyau	Organite volumineux entouré par une double membrane percée de pores ; contient les chromosomes (ADN et histones)	Stockage et transfert de l'information
ADN	Chromosomes multiples, linéaire, associés à des protéines histones ; habituellement présents sous forme dispersée (chromatine)	Matériel héréditaire
Lysosomes	Sacs membranaires contenant des enzymes hydrolytique	Digestion, recyclage des organites
Mitochondries	Limitées par une double membrane dont l'interne possède de nombreux replis	Respiration cellulaire (production d'ATP)
Vacuoles / Vésicules	Sacs membranaire (de taille et de composition diverses)	Transport, réaction chimiques, équilibre de l'eau prise d'aliments
Réticulum endoplasmique RE (rugueux ou lisse)	Sacs et tubules membranaire	Fabrication des protéines, sécrétées, des protéines membranaires et des lipides
Ribosome	Deux sous-unités faites d'ARN et de protéine ; libres dans le cytoplasme ou fixés à la membrane de RE	Synthèse des protéines
Appareil de Golgi	Sacs membranaire aplatis et empilés	Modification, emballage et transport des produits
Membrane plasmique	Bicouche de phospholipides associés à des protéines du cholestérol et des glucides	Echange sélectifs avec l'environnement
Cytosquelette	Réseau complexe de trois types de filaments	Support structural, forme, mouvement
Cils et flagelles	Extensions cytoplasmiques ayant des microtubules organisés en 9 paires (doublets) périphérique et 2 microtubules centraux	Mobilité cellulaire
Centrioles	Structures microtubulaire s'autorépliquant	Division cellulaire

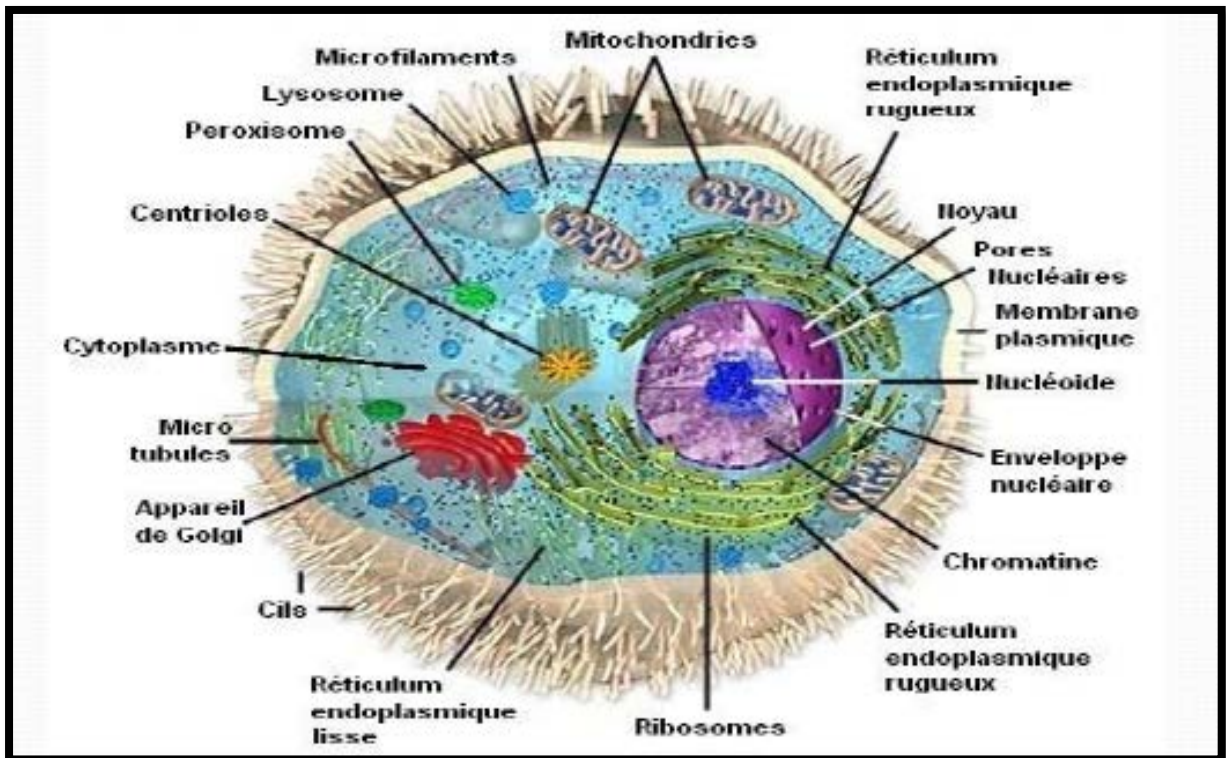


Figure 1 : La structure d'une cellule eucaryote animale (Audesirk, 1998).

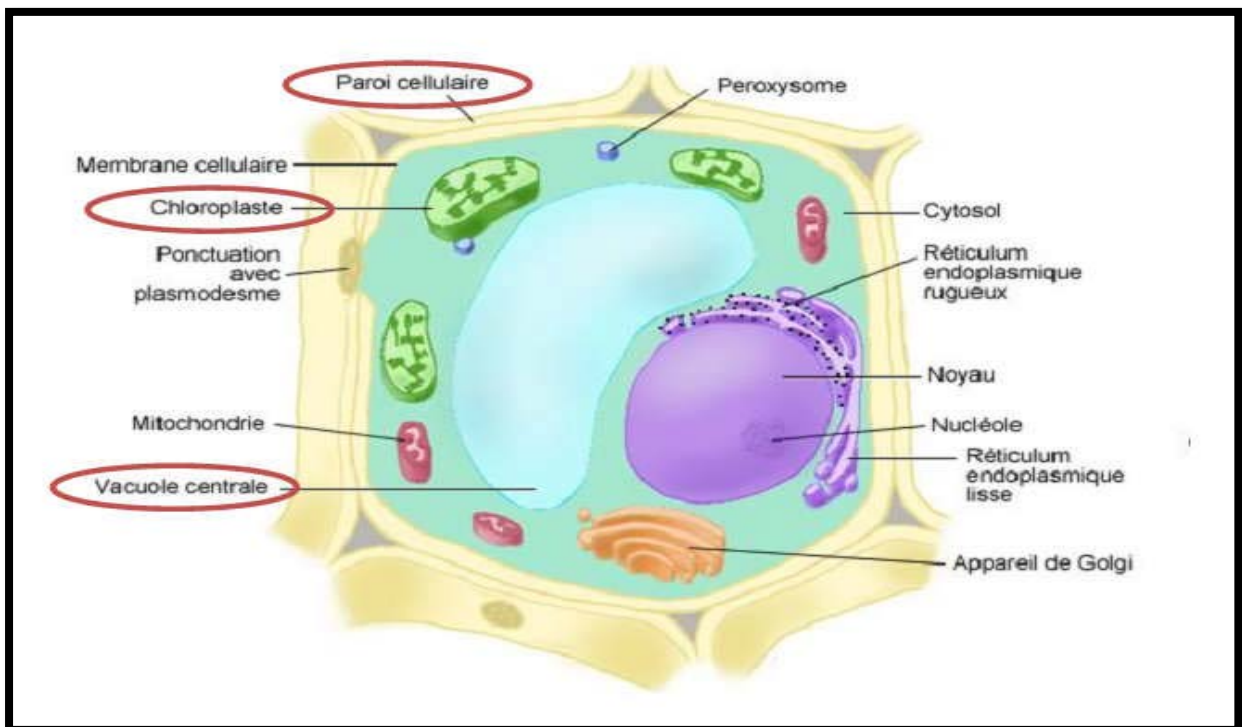


Figure 2 : La structure d'une cellule eucaryote végétale (Zeghad, 2018).

1.3 Caractéristique de la cellule eucaryote

La cellule eucaryote a plusieurs caractéristiques essentielles différentes des cellules procaryotes, les cellules eucaryotes ont :

- Un noyau avec une membrane nucléaire, c'est-à-dire une cavité centrale délimitée par une membrane, qui renferme le matériel génétique de la cellule.
- Un ensemble d'organites délimités par une membrane, qui sont des compartiments aux fonctions spécialisées flottants dans le cytosol. (Organite veut dire "petit organe", ce qui reflète le fait que les organites, comme les organes du corps, ont des fonctions uniques et font partie d'un système plus grand).
- Plusieurs chromosomes linéaires, par opposition au chromosome circulaire unique d'une cellule procaryote (**Raven *et al.*, 2014**).

2 Fonctions de la cellule eucaryote

La principale fonction de la cellule eucaryote est de maintenir l'organisme en vie. Pour ce faire, toutes les fonctions doivent être accomplies dans des conditions définies, ces fonctions sont :

- **Respiration** : se produit dans la mitochondrie et grâce à ce processus qui procure l'énergie nécessaire aux autres mécanismes.
- **Synthèse de protéines** : ceci se produit grâce aux ribosomes qui sont insérés sur le réticule.
- **Synthèse des lipides et élimination de toxines** : pour que la cellule reste fonctionnelle, elle a besoin d'un système qui élimine les déchets qui peuvent être potentiellement dangereux. Cela se produit dans le réticulum endoplasmique lisse.
- **Transport des produits manufacturés** : les produits issus du réticulum endoplasmique rugueux sont déplacés par l'appareil de Golgi, qui les conditionne en vésicules facilement transportables.
- **Traitement des molécules** : se produit dans les lysosomes et dans les peroxyosomes. Ces derniers sont spécialisés dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène résultant de l'oxydation.
- **Expression des gènes** : tous les gènes codant l'information génétique des individus sont stockés à l'intérieur du noyau cellulaire. C'est donc là que se déroule cet important processus.

- **Reproduction** : comme toutes les unités vivantes, les cellules ont la capacité de se reproduire (**Angulo et al., 2009**).

3 Types de cellules eucaryotes

La cellule eucaryote se décline en un grand nombre de groupes, et chacun d'eux présente certaines modifications pour répondre à ses besoins particuliers. Ces types de cellules sont :

3.1 Cellule protiste

Les protistes sont des organismes simples, comme les protozoaires, les algues ou les organismes amiboïdes.

3.2 Cellule fongique

Les champignons sont caractérisés par des cellules qui peuvent former des hyphes. Ce sont de fines structures qui forment le mycélium ou le corps végétatif caractéristique des champignons.

3.3 Cellule végétale

Les organismes végétaux n'ont pas de squelette, mais ils ont tout de même besoin d'un support. Les cellules adultes des plantes terrestres ont des caractéristiques communes, convergentes avec celles d'autres organismes sessiles, aussi une alimentation par (digestion, phagotrophie), comme c'est le cas des champignons, des pseudo-champignons et de nombreuses algues.

3.4 Cellule animale

Les organismes animaux sont dépourvus de paroi cellulaire ils ont seulement une membrane cellulaire. Ainsi ils représentent une organisation en tissu en formant des organes spécialisés.

Les types de cellules animales qui existent sont les cellules musculaires, nerveuses, sanguines et épithéliales (**Angulo et al., 2009**).

CHAPITRE II

LA MOLECULE D'ADN

Acide Désoxyribo Nucléique (ADN), c'est le nom d'un ingrédient clé de la vie sur Terre. En effet, la molécule d'ADN porte l'information génétique autrement dit le génome. Cette macromolécule est l'élément central et fondamental autour duquel s'articule tous les processus liés à l'activité cellulaire (**Annaël, 2015**).

La molécule d'ADN, communément représentée et connue sous la forme d'une double hélice, est un biopolymère possédant une grande variabilité structurale qui influe sur de nombreux processus biologiques comme les phénomènes d'expression et de régulation des gènes, ou encore lors de la compaction de l'ADN dans le noyau cellulaire chez les eucaryotes (**Annaël, 2015**).

L'ADN code toutes les informations importantes et nécessaires à la synthèse et à l'arrangement hiérarchique multi-échelles, qu'elles soient spatiales ou temporelles, de toutes les cellules qui composent l'être vivant.

1 Structure de l'ADN

L'ADN est une très grande molécule composée de deux chaînes polynucléotidiques enroulées l'une autour de l'autre pour former une double hélice régulière. Dont cette dernière est composée d'une succession de nucléotides accrochés les uns aux autres par des liaisons phosphodiester des bases. Il existe quatre bases différentes : l'adénosine (A), la cytidine (C), la guanosine (G) et la thymidine (T) s'apparient entre eux. Le (A) s'apparie au (T) par deux liaisons hydrogène, et (G) s'apparie au (C) par trois liaisons hydrogène formant une complémentarité dont l'ordre d'enchaînement est très précis et correspond à l'information génétique. Les deux brins nucléotidiques sont parallèles mais dans des directions opposées (Antiparallèles). La stabilisation de la double hélice s'effectue par des liaisons chimiques faibles et non covalentes à la fois internes et externes : des liaisons d'hydrogènes entre les bases, des interactions hydrophobes et électroniques entre les bases et des interactions des groupements sucres et phosphate avec le milieu aqueux (**Simon, 2016**).

1.1 Désoxyribose

L'ADN est un polymère (une grande molécule qui contient des unités répétitives) composé d'un 2' désoxyribose (un sucre à cinq carbones) (**Figure 3**), d'un acide phosphorique et de 4 bases azotées notés A, T, G et C. Les structures chimiques des bases sont indiquées ci-dessous. Notez que deux des bases ont une structure à double anneau appelées purines. Les deux autres

bases ont une structure à anneau unique, celles-ci sont appelées pyrimidines (Abdolmohammadi, 2015).

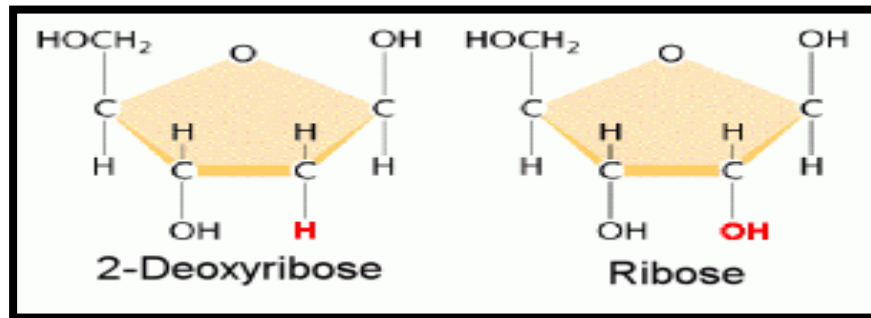


Figure 3 : Sucre (Pentose) (Abdolmohammadi, 2015).

1.2 Groupement phosphate

Dans les acides nucléiques et les nucléotides, les groupements phosphates sont sous forme soit de monophosphate H_3PO_4 (un atome de P), soit de diphosphate (2) soit de trois (3).

1.3 Les bases

Les bases azotiques sont les molécules aromatiques, dont le noyau est soit une purine soit de pyrimidine.

A Les bases puriques

Les bases puriques sont de nombre de deux : Adénine et Guanine, elles présentent un noyau purine composé à gauche de 4 carbones et 2 N et à droite un cycle pentagonal représenté dans la (Figure 4).

- **Adénine** : Elle est constituée d'un noyau purine dans le carbone n° 6 est substitué par une fonction amine.
- **Guanine** : Pour la guanine le carbone n° 2 est substitué par une fonction amine et le carbone n° 6 par une fonction cétone $C=O$.

B Les bases pyrimidiques

- **Cytosine** : Est constitué d'un noyau pyrimidine, dont le carbone n° 4 est substitué par une fonction amine et le carbone n° 2 est substitué par une fonction cétone $C=O$.
- **Uracile** : Dont le carbone n° 2 et le carbone n° 4 portent des fonctions cétone $C=O$.
- **Thymine** : Dont le carbone n° 2 et 4 portes des fonctions cétones $C=O$, mais le carbone n° 5 est substitué par un méthyle.

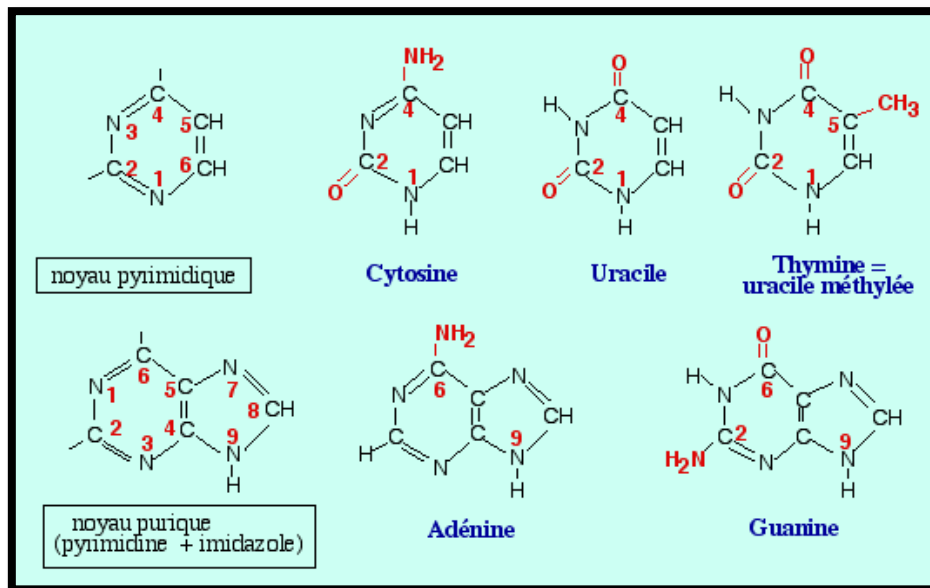


Figure 4 : Représentation moléculaire des bases puriques et pyrimidines (Denoulet *et al.*, 2008).

1.4 Les nucléosides et nucléotides

Les nucléosides sont des molécules composées d'un pentose lié à une base azotique par une liaison équivalente : « N-Osidique ». Cependant, les nucléotides sont des esters phosphoriques des nucléosides (1 nucléoside + 1 acide phosphorique) (Figure 5).

1.5 Les acides nucléiques

Les acides nucléiques sont des molécules résultant de la condensation de nombreux nucléotides liés par liaisons « Phosphodiester » (Ameur Ameur, 2016).

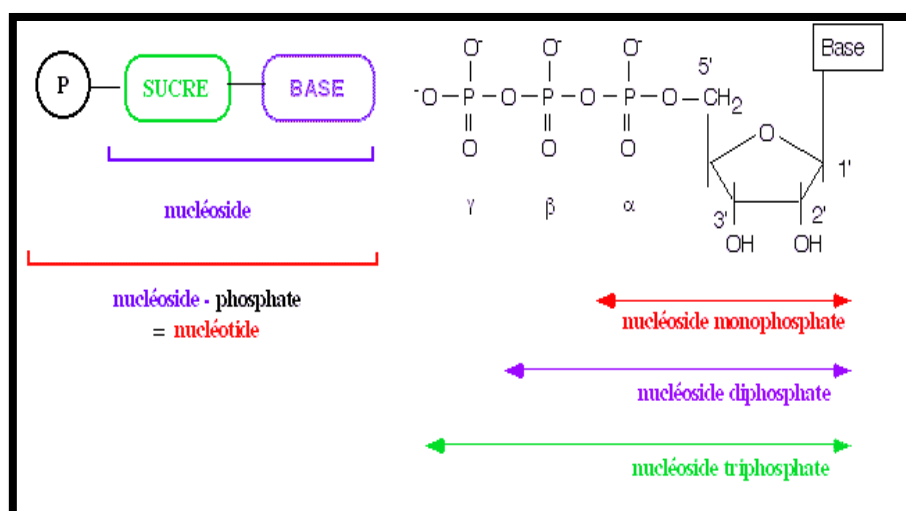


Figure 5 : Structure d'un nucléotide (Denoulet *et al.*, 2008).

2 Propriétés physico-chimiques de l'ADN

2.1 Propriétés chimiques

2.1.1 Solubilité

Les acides nucléiques sont considérés comme des macromolécules chargées négativement en raison des groupements phosphate ionisés, ce qui les rend solubles dans l'eau sous forme de sels de sodium constituant ainsi des solutions aqueuses avec une viscosité élevée.

Cependant les acides nucléiques se précipitent dans l'éthanol en présence de sel de sodium (neutralise charges -) (**Durliat, 1999**).

2.1.2 Hydrolyse

A Hydrolyse Alcaline

Le traitement acide de l'ARN (pH=11 ; 37°C) provoque une hydrolyse rapide et totale cela est due à la présence du 2'OH libre sur le ribose. Cependant l'ADN est résistant à ce traitement (absence du 2'OH désoxyribose) (**Durliat, 1999**).

B Hydrolyse Acide

Le traitement acide de l'ADN (HCl à faible concentration) provoque le clivage de la liaison N-glycosidique entre les purines (N9) et le 2' désoxyribose (C1') ce qui induit la formation d'une molécule ADN dépourvue de purines (ADN apurique). Mais l'ARN est résistant au traitement acide (**Durliat, 1999**).

2.2 Propriétés physiques

2.2.1 Température de fusion

Les liaisons d'hydrogènes et les interactions hydrophobes qui maintiennent la structure en double hélice sont des forces faibles. Des quantités relativement petites d'énergie peuvent séparer les deux brins induisant un processus de dénaturation. La dénaturation et la renaturation des brins d'ADN en solution sont des reconstitutions critiques pour diverses fonctions biologiques normales (réplication ; transcription ...etc.). Si une solution d'ADN est chauffée, à une certaine température, les liaisons d'hydrogène qui assurent la cohésion des 2 brins appariés se rompent. On parle de fusion de l'ADN caractérisée par la température de fusion (**Figure 6**) (T_m : melting temperature) qui désigne la température appropriée à la séparation de 50% des deux brins d'ADN (**Durliat, 1999**).

Remarque :

- Les régions riches en A et T s'ouvrent plus rapidement à celles riches en C et G.

- La T_m augmente avec l'augmentation du pourcentage des C et G

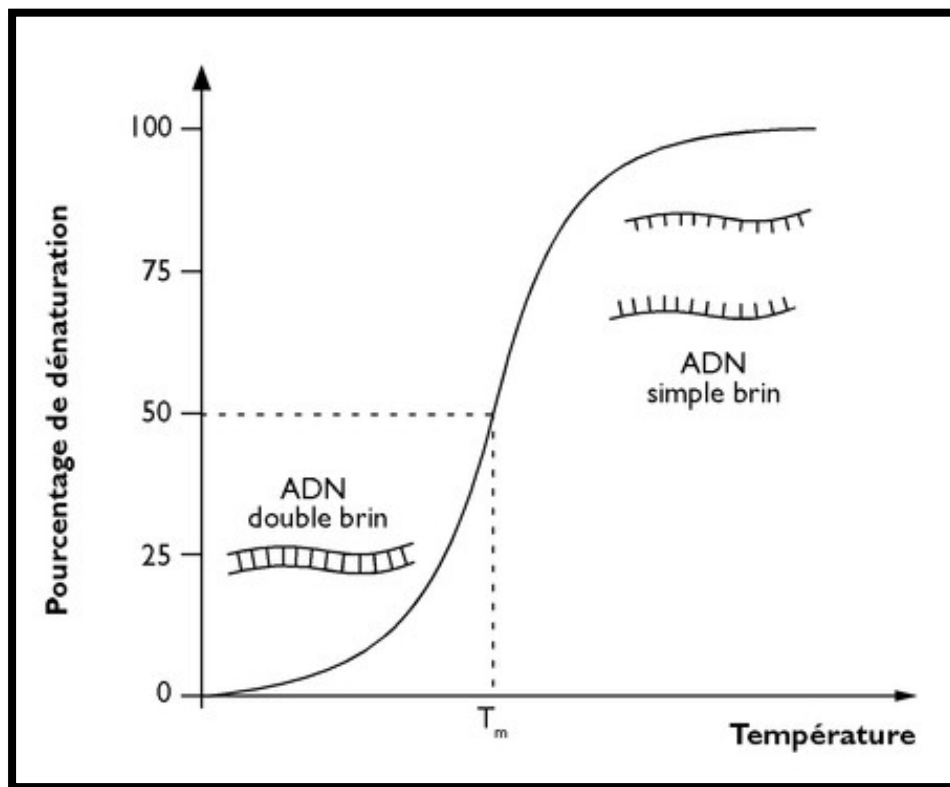


Figure 6 : Courbe de séparation des brins d'ADN en fonction de la température (Joëlle et Martin, 2007).

2.2.2 Absorption de la lumière ultraviolette

Les purines et pyrimidines qui entrent dans la composition des acides nucléiques (ADN et l'ARN) absorbent les UV, avec une absorption autour de 260 nm à un maximum de 280 nm (Figure 7) (Durliat, 1999).

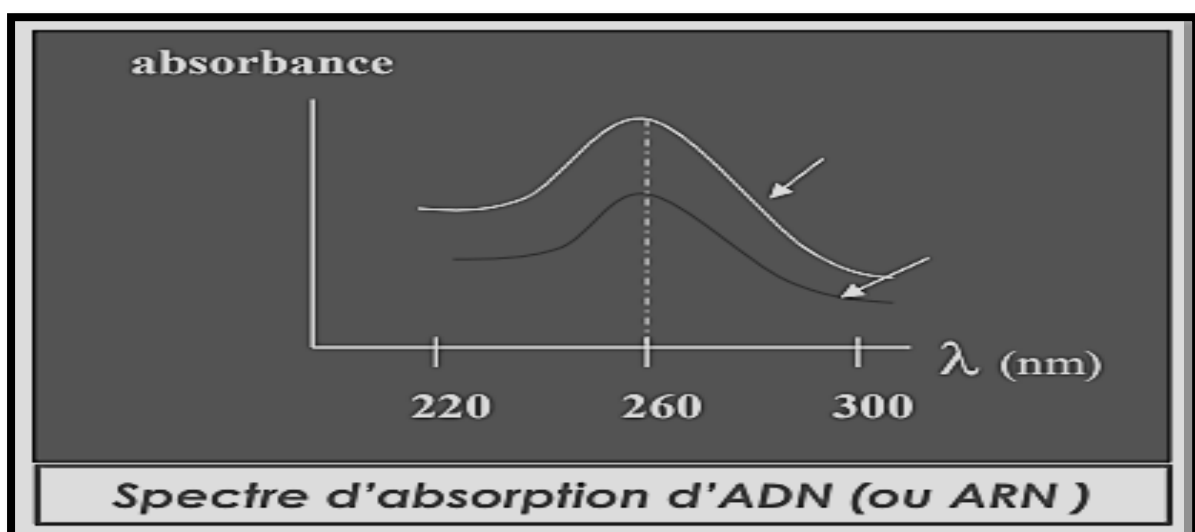


Figure 7 : Détermination de la concentration des acides nucléiques par absorption de la lumière ultraviolette (Mouffok, 2019)

CHAPITRE III

LE SANG

1 Le sang

Le sang veineux, quant à lui, reste la source d'ADN majeure et la plus efficace. Il est composé de cellules sanguines en suspension dans le plasma. L'ensemble est contenu dans les vaisseaux sanguins, dont il existe plusieurs types cellulaires : les globules rouges ou hématies, les globules blancs et les plaquettes. Les leucocytes représentent les cellules nucléées utilisées pour l'obtention de l'ADN génomique (Kachi, 2021).

D'un autre côté le sang est le fluide vital circulant dans les artères pour nourrir les organes et repart de ceux-ci par les veines chargées de déchets ; dont le rôle est de transporter l'oxygène des poumons à destination des organes et de défendre l'organisme contre les infections (Kohle, 2011).

1.1 Composant du sang

Le sang est constitué d'un milieu liquide (le plasma 55% du volume de sang) dans le quel baignent les différents types de cellules sanguines et aussi les protéines comme l'albumine et les immunoglobulines (Figure 8) (Kohle, 2011).

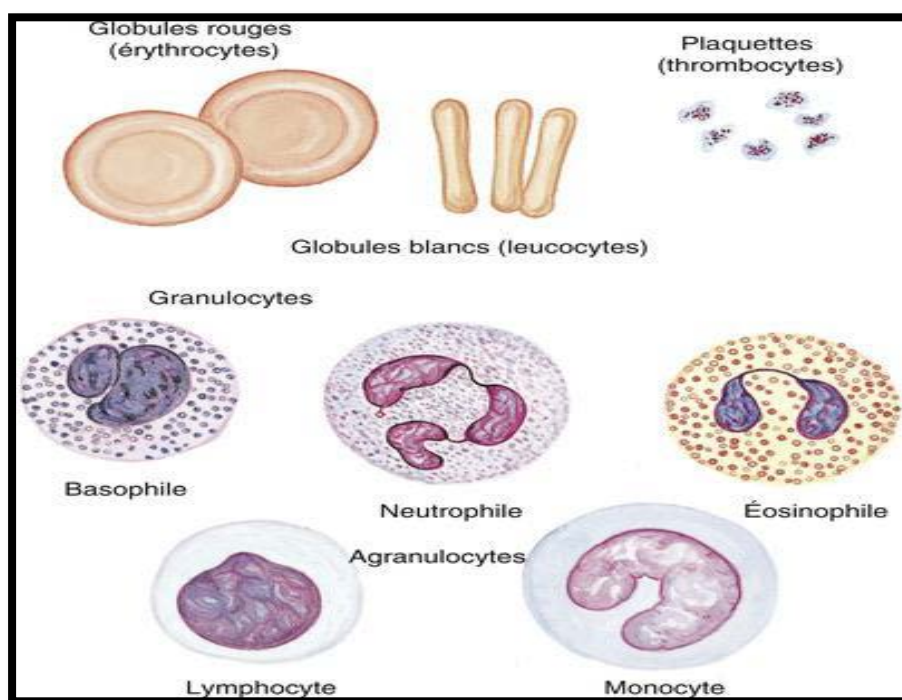


Figure 8 : Différents composants du sang (Kohle, 2011).

1.1.1 Les globules rouges

Les globules rouges, encore appelées « hématie ou érythrocytes », sont des cellules énucléées, c'est la composante principale du sang et présentent presque $5.106/mm^3$.

Le globule rouge, se présente comme un disque biconcave qui possède une

capacité de déformation lui permettant de circuler jusqu'au capillaires sanguins, tout en concevant son rôle de transporteur d'oxygène des poumons vers les tissus (**Gilles et Anctil., 2006**).

1.1.2 Les globules blancs

Les globules blancs ou les leucocytes, sont des cellules nucléées, comprenant les polynucléaires (neutrophiles, basophiles), les lymphocytes et les monocytes. Les globules blancs interviennent dans la réaction immunitaire principalement dans la lutte contre les agents infectieux (**Kubab et al., 2014**).

1.1.3 Les plaquettes

Les plaquettes sanguines ou thrombocytes, sont des cellules anucléées qui jouent un rôle majeur dans l'hémostase primaire. Parmi les nombreux récepteurs présents à leur surface, les plaquettes expriment les « *Toll-Like Receptor* » (TLR), récepteur clés de l'interaction entre l'immunité innée et adaptative. La réponse plaquettaire est variable en fonction de l'activation par un stimulus hémostatique (**Berthet, 2011**).

1.1.4 Le plasma

Il représente à lui seul 55 % du volume sanguin. Composé à 90 % d'eau chargée de sels, il est également très riche en protéines, notamment en albumine et immunoglobulines. Il contient aussi des facteurs de coagulation. Congelé à -25°C, il se conserve durant un an.

De nombreux médicaments sont fabriqués à partir du plasma. Ils peuvent agir sur la coagulation et traiter des pathologies chez des patients, notamment celles qui altèrent les défenses immunitaires (**Frémy, 1895**).

2 Sang de volaille (*gallus gallus domesticus*)

L'hématologie des oiseaux domestiques est étudiée depuis le début du siècle, mais elle ne présentait pas beaucoup d'intérêt clinique chez ces espèces auxquelles un diagnostic post-mortem est préféré (**Fromont, 1993**). Les normes hématologiques des oiseaux ne sont pas comparables à celles des mammifères, pour une espèce, existent de nombreuses valeurs de référence en fonction de facteurs internes (âge, sexe, état physiologique) et externes (environnement, mois, heure) (**Harrison et Harrison, 1986**).

2.1 Plasma

La couleur du plasma est facilement observée après centrifugation, il est normalement transparent à jaune (**Fromont, 1993**).

2.2 Lignée rouge (Erythrocytes)

Comme chez tous les oiseaux les érythrocytes sont nucléés ; leur forme est ovale à elliptique de même que leur noyau, central (**Harrison et Harrison, 1986**). La lignée rouge comporte : Des proérythroblastes et érythroblastes basophiles : grandes cellules généralement rondes à chromatine en réseau et pourvues d'un nucléole. Le cytoplasme est basophile. -Des érythroblastes polychromatophiles : plus petits, ronds à faiblement ovales, leur noyau rond contient des mottes de chromatine. Le cytoplasme est gris à rose (**Fromont, 1993**). -Des érythroblastes orthochromatophiles : ce sont les formes jeunes qui sont les plus observées, leur noyau est plus grand que celui de la cellule mature et son réseau chromatinien est uniforme. Le cytoplasme est éosinophile (**Fromont, 1993**).

2.3 Lignée blanche

La présence d'hématies nucléées constitue un obstacle technique majeur pour l'étude de la lignée blanche des oiseaux : la numération blanche en particulier ne peut être évaluée que par des méthodes manuelles demandant un certain entraînement, ce qui explique qu'elle soit moins souvent évaluée que les autres paramètres. Ces raisons expliquent que la numération blanche et ses variations restent peu connues chez les oiseaux (**Fromont, 1993**).

2.3.1 Polynucléaires

Ce sont des cellules rondes à noyau lobé, à chromatine en mottes, dont le cytoplasme transparent contient des granules. Les fonctions de ces cellules sont peu connues sinon la phagocytose (**Fromont, 1993**).

2.3.2 Lymphocytes

Les lymphocytes sont des cellules habituellement rondes, mais montrant parfois des irrégularités dues à la réalisation du frottis. Le noyau est généralement rond ou légèrement dentelé et central ou assez souvent excentré, la chromatine y est densément mottée ou réticulée. Le cytoplasme est homogène, faiblement basophile et étroit (**Lucas et Jamroz, 1961**). Les lymphocytes sont capables de sécréter des immunoglobulines et des cytokines. Elles sont principalement impliquées dans la réponse immunitaire (**Fromont, 1993**).

2.3.3 Monocytes

Ce sont des cellules de grande taille (diamètre : 2microns) qui peuvent être distinguées des lymphocytes par leur cytoplasme bleu gris parfois vacuolisé (contenant occasionnellement une granulation fine sous forme de poussières orangées), leur rapport nucléoplasmique faible, leur noyau largement échancré et leur chromatine peu motté (**Fromont, 1993**).

2.4 Lignée plaquettaire

Les thrombocytes sont de petites cellules nucléées, de forme ronde à ovale, de diamètre de 7 à 10 microns. Le cytoplasme est très clair mais peut apparaitre réticulé, il contient souvent un ou plusieurs granules violets, contenant de la sérotonine, aux pôles de la cellule. Le noyau est sombre et la chromatine en mottes (Campbell, 1988). Les thrombocytes seraient également impliqués dans la fonction de phagocytose (**Fromont, 1993**).

CHAPITRE IV

LES METHODES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION

Au cours de ces dernières années, la biologie moléculaire a modifié considérablement le diagnostic de routine des maladies infectieuses, génétiques et néoplasiques. Toute étude de génétique moléculaire implique la disposition d'échantillon d'acides nucléiques.

En effet ces techniques d'extraction sont simples à faire, il suffit juste d'éviter la destruction enzymatique ou mécanique car l'ADN n'est plus stable et devient vulnérable une fois la cellule est lysée.

Au cours de ces vingt dernières années, de très nombreux procédés d'extraction des acides nucléiques ont été décrits, et des kits sont actuellement proposés par un certain nombre d'industriels. L'objectif de ces méthodes de purification est notamment d'éliminer les contaminants qui pourraient perturber l'analyse d'ADN. C'est la raison pour laquelle il est préférable de prélever stérilement le sang frais sur un anticoagulant du type EDTA (**Bienvenu et al., 1999**).

1 Les étapes principales de l'extraction d'ADN

Les principales étapes pour l'extraction d'ADN sont : la lyse des cellules, l'élimination des protéines, des lipides et enfin l'élimination d'un acide nucléique donné. Par exemple « un extrait d'acides nucléiques brut » contient un mélange de l'ARN, ADN génomique et ADN plasmidique pour les bactéries (**Kamoun et al., 2003**).

1.1 Lyse des cellules

Il existe une multitude de techniques pour lyser les cellules et préparer leur contenu pour l'analyse. Des techniques douces sont généralement utilisées lorsque l'échantillon est constitué de cellules sanguines ou ADN aisé à lyser. À l'inverse, des méthodes plus vigoureuses sont employées pour rompre les cellules plus coriaces comme les cellules bactériennes ou végétales, ou encore les cellules de mammifères incluses dans du tissu conjonctif.

On aura donc deux méthodes :

- ❖ En utilisant des procédés mécaniques.
- ❖ En utilisant des procédés chimiques.

1.1.1 Lyse mécanique

Pour la lyse mécanique, on utilise de préférence des méthodes ou systèmes qui ne cassent pas les molécules d'ADN. Il faut donc que la méthode utilisée ne génère pas trop de forces de cisaillement (**Ould Ahmed et al., 2010**).

On utilise donc :

- **Lyse par congélation / décongélation**

Cette technique peut être utilisée sur des suspensions de cellules de mammifères ou de cellules bactériennes. La suspension cellulaire est congelée rapidement dans de l'azote liquide. L'échantillon est ensuite décongelé et remis en suspension dans un tampon de lyse à l'aide d'une pipette ou par un mélange délicat au vortex, l'opération étant répétée plusieurs fois. Entre deux cycles, l'échantillon est centrifugé et le surnageant contenant les protéines solubles est conservé.

- **Choc osmotique**

Cette méthode très douce peut être suffisante pour la lyse de cellules bactériennes ou de cellules de mammifères en suspension sans utilisation de détergent. Souvent associée à une fragmentation mécanique.

1.1.2 Lyse chimique

Idéal pour les cellules procaryotes. Leurs parois sont le principal obstacle à la lyse cellulaire. Cette approche l'affaiblit, démantelant efficacement la membrane plasmique à l'aide de détergents tel que le SDS (Malek, 2013).

2 Extraction d'ADN à partir du sang

Le matériel biologique de base est constitué de sang collecté dans des tubes EDTA. Un certain nombre de méthodes ont été décrites pour l'extraction de l'ADN génomique à partir du sang total (Pochi *et al.*, 2002). Elles diffèrent dans le nombre d'étapes des produits utilisés et leurs concentrations, cependant elles se caractérisent toutes par trois étapes essentielles :

- a. Lyse des globules rouges.
- b. Lyse des globules blancs et élimination des protéines.
- c. Précipitation de l'ADN (Pochi *et al.*, 2002).

3 Les différentes méthodes d'extraction d'ADN

Les méthodes d'extraction d'ADN se divisent en trois grandes classes liées aux principes dont elles font appel :

Les méthodes utilisant des solvants organiques, les méthodes utilisant des solvants non organiques et les méthodes basées sur l'utilisation de micro-colonnes de résines échangeuses d'ions.

Pour toutes les méthodes d'ADN utilisées à partir du sang frais recueilli ou décongelé. Il faudra faire éclater les globules rouges du sang par un choc osmotique en le mélangeant à une solution hypotonique. Les solutions de lyse des globules rouges utilisées sont nombreuses et

variées. Par exemple : Tris 10 mM/MgCl₂ 10 mM/NaCl 10 mM, sous une température de 4 °C pendant 20 à 30 minutes.

Le lysat est centrifugé (15 min, 1500 g) et après élimination du surnageant, le culot cellulaire contenant les leucocytes (0,3 % des cellules circulantes) est repris dans une solution saline (NaCl 0,15 M/EDTA 0,1 M pH 10,5, par exemple) et traité par une solution de lyse des globules blancs. Il existe un grand nombre de solutions de lyse en fonction de la nature de détergent anionique utilisé, dont on cite à titre d'exemple deux solutions aqueuses suivantes : **a)** TPNS (*tri-iso-propyl-naphtalene-sulfonique acid*) 6 %/butanol-2 8 %/SDS (*sodium dodecyl sulfate*) 3 %, **b)** Tris 10 mM pH 7,4/EDTA 10 mM pH 8/NaCl 50 mM/Sarcosyl 2 %.

L'ADN nucléaire libéré dans le milieu est alors le plus souvent traité par une protéinase très active, la protéinase K, qui a pour but de digérer les protéines qui lui étaient associées. En fonction des protocoles, le traitement par la protéinase K (10 mg/ml) est effectué 1 à 2 h à 65 °C ou 30 min à 1 h à 55 °C ou 3 à 18 h à 37 °C (**Bienvenu *et al.*, 1999**).

3.1 Méthodes utilisant des solvants organiques

La méthode d'extraction des acides nucléiques utilisant des solvants organiques a été initialement développée en 1977 dans le but d'extraire de l'ARN en utilisant de l'isothiocyanate de guanidium. Elle a ensuite été modifiée par Chomczynski et Sacchi qui ont développé en 1987 un protocole utilisant le guanidium thiocyanate – phénol – chloroforme et une centrifugation beaucoup plus courte, permettant d'isoler l'ARN, l'ADN et les protéines. Mais, ce n'est qu'en 1998, grâce aux travaux de Barker et de ses collaborateurs, que le guanidium thiocyanate fut remplacé par l'alcool isoamylique et que la méthode d'extraction au phénol-chloroforme utilisée quotidiennement dans tous les laboratoires du monde est née. Grâce aux résultats obtenus, cette technique devient une référence célèbre dans le domaine d'extraction d'ADN (**Pillon, 2020**).

L'extraction au phénol-chloroforme est un procédé d'extraction liquide – liquide utilisé pour isoler les acides nucléiques (ADN comme ARN) en les séparant des protéines. Ce procédé de séparation repose sur la différence de solubilité des acides nucléiques et des protéines dans une émulsion à deux phases : une phase aqueuse et une phase organique (**Pillon, 2020**).

3.2 Méthode de fixation sur la silice

Le principe consiste à traiter le lysat cellulaire obtenu par une solution d'un agent chaotrope, tel que le chlorhydrate de guanidine, l'isothiocyanate de guanidine, l'iodure de sodium, et le perchlorate de sodium (**Duncan *et al.*, 2003**). En effet, les agents chaotropes perturbent la couche d'hydratation qui se forme autour des acides nucléiques, ce qui permet la

formation de liaisons hydrogène entre les acides nucléiques et la surface de la silice (**Salgado et Hussain, 2013**).

Le tampon de lyse est choisi de sorte que les débris cellulaires, les protéines et les molécules indésirables restent en solution alors que l'ADN se fixe sur la silice. Après lavage de la colonne, l'ADN est élué par un tampon à basse force ionique (**Abhilasha et Shilpa, 2015**).

La taille moyenne de l'ADN isolé est de 20 à 50 kb (**Duncan et al., 2003**).

3.3 Méthodes utilisant des solvants non organiques

Dans ces méthodes, le principe consiste à traiter uniquement le lysat cellulaire par une solution saline, dont l'objectif est d'éliminer par précipitation sélective les protéines. En fonction des protocoles, des étapes de prétraitement par la RNase sont proposées. Différentes solutions salines ont été préconisées : par exemple, le NaCl (**Bienvenu et al., 1999**).

3.4 Méthodes basées sur l'utilisation de colonnes résines échangeuses d'ions

Ces méthodes d'extraction et de purification des acides nucléiques sont les dernières récemment apparues. Elles sont basées sur la propriété des particules de silice et de leur adsorption sélective des acides nucléiques. Les solutions de lavage permettent de se débarrasser des contaminants tels que l'hémoglobine, les protéines plasmatiques ou les ions Fe^{2+} .

Quelle que soit la méthode utilisée pour l'extraction et la purification des acides nucléiques, la récupération de ces derniers se fait en général par une élution, puis par une précipitation (**Bienvenu et al., 1999**).

3.5 Méthode de la chromatographie échangeuse d'anions

La chromatographie par échange d'anions est basée sur l'interaction entre les charges négatives des groupements phosphates de l'ADN et les charges positives du support de chromatographie (**Figure 9**) par exemple, *di-éthyl-amino-éthyl* cellulose (DEAE cellulose).

Après dépôt du lysat sur la colonne de chromatographie dans des conditions de basse concentration en sels, l'ADN se fixe à la colonne à l'aide de liaisons ioniques. Ensuite, à l'aide d'un tampon moyennement chargé en sels, l'ADN est finalement élué à l'aide d'un tampon à haute force ionique. Afin d'éliminer les sels, l'ADN est précipité avec l'alcool (**Figure 10**) (**Duncan et al., 2003 ; Ameziane et al., 2006 ; Abhilasha et Shilpa, 2015**).

Les Protéines, les débris cellulaires et les autres molécules en solution sont éliminés par un lavage. L'ADN isolé par cette procédure peut atteindre une taille moyenne de 150 kilobases (kb) de long (**Duncan et al., 2003 ; Ameziane et al., 2006 ; Abhilasha et Shilpa, 2015**).

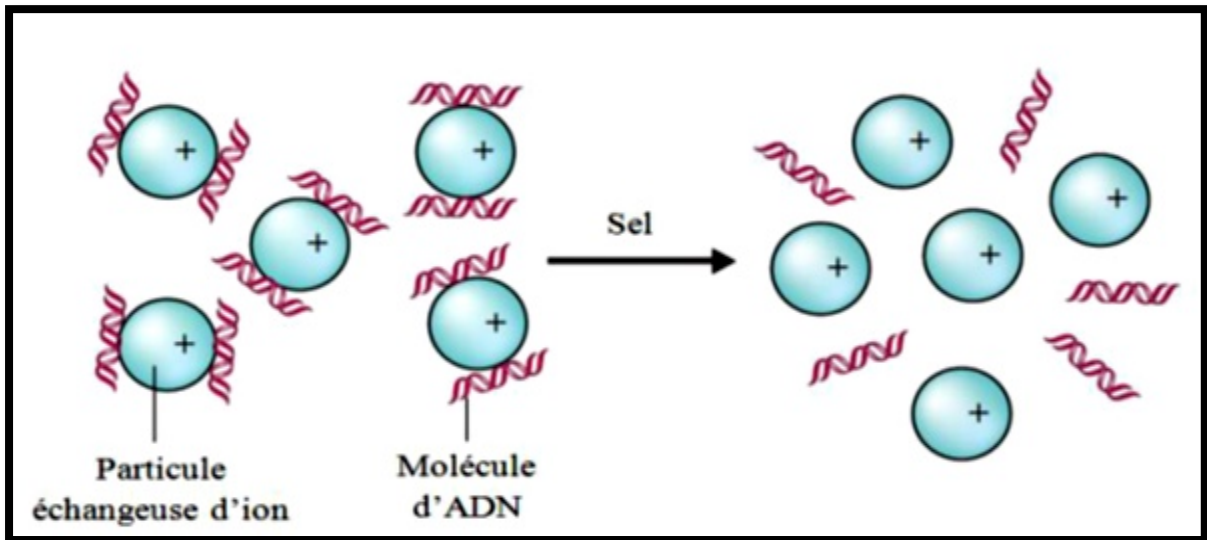


Figure 9 : Attachement de l'ADN au support de chromatographie (Brown, 2010).

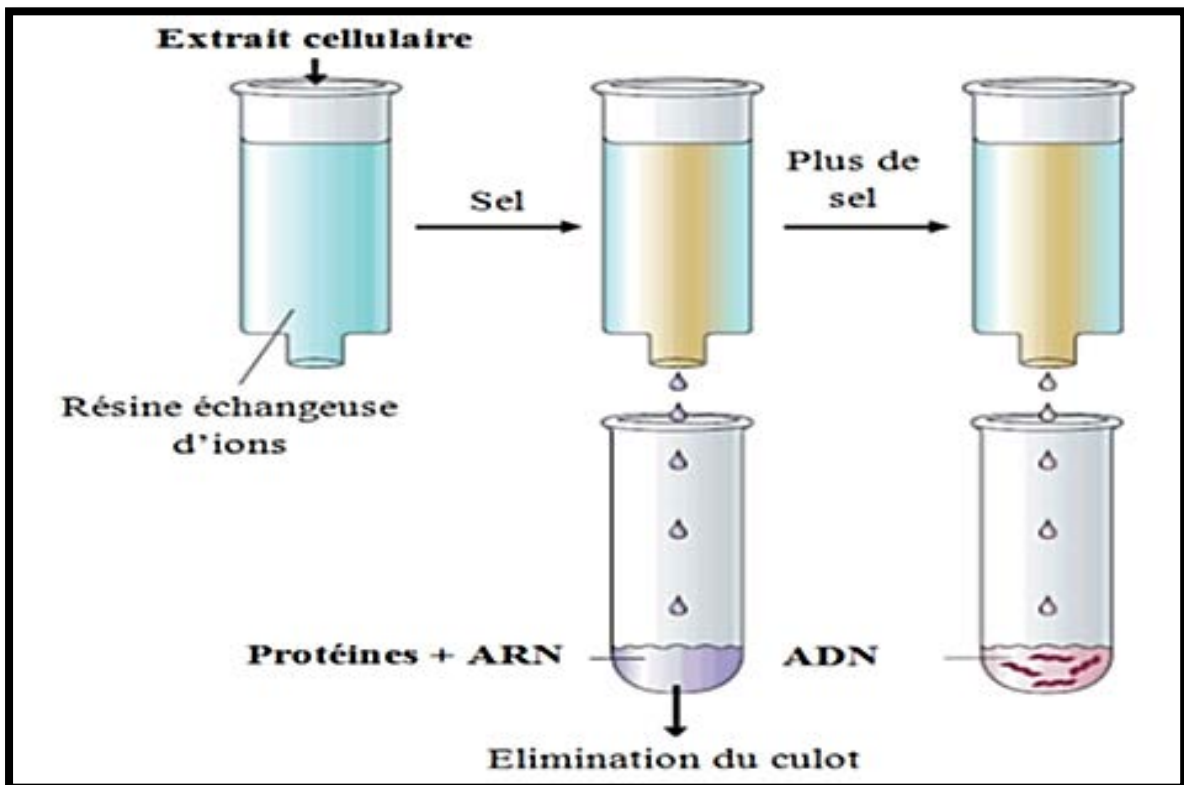


Figure 10 : Isolation de l'ADN par chromatographie échangeuse d'anions (Brown, 2010).

3.6 Méthode de la séparation magnétique

Cette méthode est basée sur la liaison réversible de l'ADN à une surface solide (billes ou particules magnétiques) préalablement recouverte d'anticorps liant l'ADN ou d'un groupe fonctionnel qui interagit spécifiquement avec celui-ci. Après liaison de l'ADN, les billes sont séparées des autres composants cellulaires contaminants puis lavées. L'ADN est finalement

purifié est élué par extraction à l'éthanol (**Anandika, 2013**).

3.7 Extraction d'ADN automatisé

Ces dernières années, l'évolution des techniques d'extraction a été repoussée jusqu'à la mise au point de l'extraction automatisée dans le but de simplifier encore l'isolement des acides nucléiques, réduire le temps de manipulation, d'accroître la sécurité, la reproductibilité et la qualité des résultats. Ce système est utilisé dans les laboratoires de grande taille et reste coûteux. La vitesse, la précision et la fiabilité de l'extraction sont maximales avec ce procédé et le risque de contamination croisée est minimisé (**Pillon, 2020**).

Plusieurs automates ont été développés tel que l'automate Maxwell 16 (Promega, Lyon, France). Cet automate utilise une technologie innovante de capture par billes magnétiques, sans distribution, filtration, ni aspiration de réactifs, limitant le temps de manipulation et les risques d'erreurs.

4 Comparaison entre différentes méthodes d'extraction et de purification de l'ADN

Le premier maillon de la génétique moléculaire et celui dont dépend la réussite d'extraction d'ADN en termes de concentration et pureté de ce dernier, toutefois ces deux paramètres se rattachent au choix comparatif en fonction des avantages et des inconvénients cités ci-dessous (**Tableau 2**). Des méthodes d'extractions utilisées telles que les méthodes classiques ; la méthode saline et la méthode Phénol Chloroforme, les méthodes basées sur l'utilisation des colonnes résines échangeuse d'ions, la chromatographie échangeuse d'anions, la méthode de séparation sur la silice, la méthode de séparation magnétique et les méthodes récentes en utilisant des kits commercialisés (**Ghada Jebah et al., 2013**).

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des méthodes d'extraction et de purification de l'ADN.

Méthode	Avantages	Inconvénients
Séparation magnétique	- Agile et adaptable à l'automatisation (Anandika, 2013).	- Plus coûteuse par rapport aux autres méthodes (Anandika, 2013).
Chromatographie échangeuse d'anions	- Isolement de l'ADN de haute pureté, ne prend pas du temps et évite l'utilisation des substances toxiques (Duncan et al., 2003 ; Ameziane, 2006 ; Abhilasha et Shilpa, 2015).	- Coûteuse
Méthode utilisant des solvants non organique (Salting out)	- Rapide, simple et non coûteuse (Suguna et al., 2014).	- L'inefficacité d'éliminer les protéines et d'autres contaminants. - Le traitement avec la Ribonucléase (RNase), la dialyse et / ou une précipitation répétée à l'alcool sont souvent nécessaires (Duncan et al., 2003).
Fixation sur la silice	- Simple à mettre en œuvre, fiable, rapide et peu coûteuse (Duncan et al., 2003).	- Nocive
Méthode au phénol-chloroforme	- La simplicité du protocole, - La dénaturation rapide des nucléases et la stabilisation des acides nucléiques.	- L'utilisation de produits chimiques toxiques et le risque de contamination est accru du fait du transfert de l'ADN entre plusieurs tubes
Kits commercialisés (exemple le kit Promega)	- Rapidité et reproductivité. - L'absence d'utilisation de solvants toxiques.	- Les kits utilisés coûtent 2,5 voire 5 fois plus cher que les méthodes classiques (Ghada Jebah et al., 2013)

PARTIE

EXPÉRIIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

1 Matériel

1.1 Prélèvements sanguins

Nous avons réalisé des prélèvements de sang différents à partir de l'humain et de l'animal (Poule, Bovin) afin d'extraire les molécules d'ADN correspondantes. Tout prélèvement fait, a été exécuté dans des conditions qui favorisent la non coagulation du sang et les échantillons ont été maintenus à une température de -20 °C en attendant l'étape d'extraction.

1.1.1 Echantillon humain

En premier lieu, nous avons réalisé une collecte de sang humain via deux donneurs volontaires effectuée au sein du laboratoire d'analyse médicale « EL Amine » à Mostaganem.

1.1.2 Echantillon animal

En second lieu, on a procédé à une collecte de sang à partir de deux types d'animaux dans des abattoirs différents.

A Espèce de volaille (*Gallus gallus*)

Nous avons prélevé la quantité nécessaire de sang frais à partir de la saignée d'une poule dans l'abattoir de volailles, « Benfriha Abdelghani » à Sidi Fellag -Sayada- Mostaganem.

B Espèce bovine (*Bos taurus*)

Nous avons prélevé encore une fois le sang à partir d'une saignée de deux bœufs dans un abattoir de bovin « Abattoir municipal » situé à Tigditt – Mostaganem.

1.2 Le matériel utilisé pour l'extraction d'ADN

Pour l'extraction de l'ADN, plusieurs verreries et consommable ont été utilisés :

- Tubes EDTA
- Tubes falcons
- Pipettes pasteur
- Eppendorf
- Micropipette

1.2.1 Produits et solutions utilisés

- TE [Tris EDTA, ph=8] 10/10
- TE [Tris EDTA, ph=8] 10/1
- Protéinase K [30mg /ml]
- SLB [SDS + EDTA]
- NaCl [chlorure de sodium 5M]

- Éthanol absolue [éthanol 70%, éthanol 100%]

1.3 Matériel utilisé pour l'électrophorèse

- Eprouvette Graduée 1L
- Micropipettes
- Tube Eppendorf
- La Cuve à Electrophorèse

1.3.1 Produit utilisé pour l'électrophorèse

- Agarose
- TBE [Tris Borate EDTA] 1X (0,089 M de base tris, 0,089 M de borate et 0,002 M d'EDTA, du sel disodique, du dihydrate avec un pH final de 8,3.)
- Bleu de bromophénol
- Golden view

1.4 Matériel utilisé pour le dosage spectrophotométrique

- 05 Echantillon d'ADN
- H₂O distillée stérile
- Cuves quartz de 2ml de volume et 1cm de largeur

2 Méthodes

2.1 Extraction de l'ADN par la technique au NaCl « *Salting-out* »

Le principe de l'extraction d'ADN par NaCl se définit en un protocole de purification de l'ADN par précipitation de protéines à haute teneur en sel impliquant une perturbation initiale des cellules et une digestion par un détergent SDS et une protéase K, suivie de l'ajout de fortes concentrations de sel du chlorure de sodium. Le mélange est ensuite centrifugé pour précipiter les protéines, laissant l'ADN dans le surnageant. L'ADN est ensuite précipité avec de l'éthanol froid ou de l'isopropanol de la même manière que la méthode au solvant organique puis solubilisé en phase aqueuse (Dahm, 2005), (Tan et Yiap, 2009).

Dans ce travail, nous nous sommes basés sur le protocole d'extraction d'ADN standard disponible au laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire (Université d'USTO-MB) détaillé ci-dessous. Après quelques essais, nous avons adapté le même protocole en modifiant quelques paramètres et volumes pour chaque espèce.

2.2 Préparation des échantillons

Notre protocole opératoire a débuté par une première étape de décongélation des tubes de sang au bain-marie à 37°C.

Afin de réaliser l'étape de l'extraction d'ADN à partir des échantillons collectés, nous avons ensuite étiqueté et numéroté 6 tubes falcons vides avant de transférer nos 6 échantillons de sang prélevé à partir des trois espèces (Humaine, Volaille et Bovine).

2.3 Lyse des globules rouges

Après l'étape de la décongélation au bain marie, nous avons commencé les lavages par la dilution du sang avec la solution hypotonique TE 10/10 en agitant doucement puis nous avons incubé les tubes remplis dans la glace pendant 30 minute. Par la suite, nous avons centrifugé à 2500 T/min pendant 15 min afin d'éliminer le surnageant et conserver le culot leucocytaire.

Après le premier lavage, un deuxième est effectué en mettant le tube dans la glace pendant 10 minutes cette fois-ci et puis centrifuger 15min à 2500Tr/min.

Ces étapes comprennent l'élimination des globules rouges et de toutes les impuretés du milieu extracellulaire. Une répétition de ces étapes est demandée jusqu'à l'obtention des particules translucides. La centrifugation sépare les globules blancs et les débris des globules rouges. Dans notre étude, nous avons répété les lavages des globules rouges différemment selon chaque tube et/ou espèce.

2.4 Lyse des globules blancs

Après l'obtention d'un culot blanchâtre dans l'étape précédente, on a ajouté une solution de lyse des globules blancs (SLB) et l'enzyme protéinase K (pK). Cette solution forte de détergent est capable de déstabiliser la membrane des globules blancs et celle du noyau de la cellule.

Etant donné que la quantité du sang de départ était différente entre nos 6 échantillons, nous avons rajouté des volumes différents de la solution SLB (entre 0.2 ml et 1 ml).

Pour l'enzyme Protéinase K, nous avons rajouté plutôt entre 80 à 100 µl pour dégrader les protéines.

Finalement, nous avons incubé les tubes durant toute la nuit dans un bain-marie sous agitation douce à 37°C.

2.5 Précipitation de l'ADN

Nous avons ajouté cette fois-ci des volumes légèrement variables du NaCl dans chacun des tubes puis une centrifugation à 4000 Tr/min pendant 10 minute a été faite.

Après, avec une micropipette, nous avons récupéré le surnageant sachant que la précipitation dans les solutions salines est l'une des propriétés chimiques de l'ADN.

2.6 Récupérations des méduses

Afin de récupérer la méduse d'ADN, nous avons ajouté deux volumes d'éthanol absolu froid dans chaque tube des surnageants récupérés. On a pu procéder à leur récupération à l'aide d'une pipette pasteur scellée en la rinçant à l'éthanol à 70% puis à 100% afin d'éliminer les traces de sel (**Figure 11**).

Par la suite, les méduses ont été placées dans des tubes Eppendorf et procéder au séchage à l'air libre.

Pour conserver l'ADN extrait on a rajouté à chaque méduse un tampon TE 10 /1.

Afin de conserver les méduses dans le tampon, il est nécessaire de parafilmer les Eppendorf en les laissant sous une agitation douce au bain-marie pendant une semaine (**Figure 11**), puis nous avons pu les récupérer et conservées au congélateur à (-20 °C).

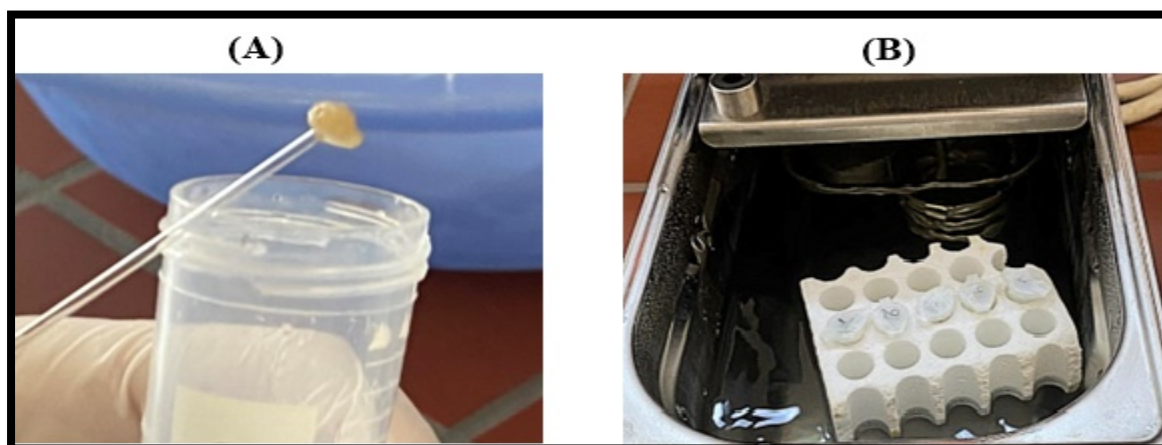


Figure 11 : (A) récupération d'une méduse, (B) dépôt des échantillons dans un bain-marie.

3 Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse est une technique utilisée en biochimie et en biologie moléculaire afin de séparer plusieurs molécules (ADN, ARN et les protéines) selon leur poids moléculaire. Les molécules de petites tailles se déplacent plus rapidement et plus loin que les molécules de tailles supérieures.

Également, cette méthode s'appuie sur l'isolement des acides nucléiques chargés négativement sous l'action d'un champ électrique. Sachant que l'ADN est une molécule chargée négativement à pH proche de la neutralité ce qui permet une séparation en fonction de la taille par migration électrophorétique du pôle négatif vers le pôle positif.

3.1 Préparation d'un gel agarose à 0.8%

Nous avons pesé 0.5g de poudre d'agarose dans un volume de 50 ml de Tris/Borate/EDTA (TBE1X) puis on a fait fondre l'agarose aux micro-ondes.

Ensuite, nous avons ajouté 0.5 µl de *Golden View*, ce dernier est un agent intercalant capable de s'insérer dans la double hélice de l'ADN et non toxique contrairement au BET (Bromure d'Ethidium). Ceci nous a permis d'observer l'ADN en exposant le gel à un rayonnement ultraviolet. Pour finir, on a versé le gel dans la cuve de l'électrophorèse en plaçant délicatement un peigne dans la fente du socle de coulage. Nous avons attendu que le gel se soit solidifié pendant une demi-heure et une fois qu'il a été opaque, on a retiré soigneusement le peigne.

3.2 Chargement des échantillons sur le gel

En retirant délicatement le plateau de coulée contenant le gel d'agarose durci, on a rempli l'appareil avec le tampon d'électrophorèse pour couvrir le gel. Par la suite, nous avons mélangé le colorant bleu avec l'ADN et pipeté le mélange avec une micropipette ajustée au volume approprié en changeant la pointe à chaque fois.

Lorsque le gel commence à se recouvrir, on a versé le pot de tampon TBE très doucement et très lentement pour éviter les fuites d'ADN dans le tampon en faisant attention à ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette. Nous avons placé le support rempli de gel dans la cuve de l'électrophorèse avec les puits du côté cathode (électrodes noir).

3.3 Migration électrophorétique et visualisation

Après avoir chargé les échantillons dans les puits du gel d'agarose, nous avons placé le couvercle sur la cuve et brancher les extrémités des électrodes (-) et (+) dans les fiches sur le côté du bloc de l'alimentation. Nous avons lancé une migration des ADN pendant 30 minutes à 100V-120V.

Après les 30 minutes de migration, nous avons déplacé le gel d'agarose sur un transilluminateur et on l'a exposé sous une lampe UV pour que les bandes d'ADN apparaissent.

4 Evaluation de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait

4.1 Dosage spectrophotométrique de l'ADN

La zone d'absorbance maximale des acides nucléiques se situe à 260 nm. Les protéines, principaux contaminants des solutions d'acides nucléiques, absorbent à 260 nm mais présentent un maximum d'absorption autour de 280 nm par les acides aminés aromatiques. La mesure du rapport de DO 260/280 permet donc de contrôler la pureté des échantillons d'ADN obtenus en évaluant la présence des contaminants (solvants organiques, ARN, protéines résiduelles) dans la solution d'ADN (**Plateforme de Ressources Biologiques, 2018**).

Pour cela nous avons réalisé un dosage des ADN par la spectrophotométrie d'un aliquot

dilué au 1/100 (10µl d'ADN + 990µl d'eau distillé stérile) sur un total de 5 ADN appartenant aux 3 espèces différentes étudiées. Le dosage spectrophotométrique a été effectué à deux longueurs d'onde différentes (260nm / 280nm) au niveau du laboratoire de Biochimie 1 (Faculté des S.N.V) à l'université de Mostaganem -Abdelhamid Ibn Badis-. Nous avons utilisé le spectrophotomètre JENWAY.

4.2 Estimation de la pureté de l'ADN

Initialement en 1942, Warburg et Christian avaient publié un rapport expliquant l'intérêt de l'utilisation du ratio A260 nm/280 nm pour détecter la contamination d'acides nucléiques présente dans une solution de protéines (**Warburg et Christian, 1942**). Maintenant, ce ratio est plus souvent utilisé pour évaluer la contamination de protéines dans une solution d'acides nucléiques.

D'une manière générale, la pureté d'une solution d'acide nucléique est considérée comme acceptable lorsque le ratio A260 nm/A280 nm est compris entre 1,8 – 2,0 pour l'ADN et entre 2,0 – 2,2 pour l'ARN. Comme ce ratio varie significativement en fonction du pH et de la force ionique. (**William et al., 1997**), il est important de prendre en compte ces paramètres pour interpréter ce ratio.

4.3 Evaluation de la concentration des ADNs

Par ailleurs, nous avons pu réaliser l'évaluation de la concentration de chaque ADN en utilisant la formule de BEER LAMBERT suivante :

$$\frac{\text{DO}_{260} \times \text{■} \times \text{■}}{1000} = \text{la concentration de l'ADN en } \mu\text{g}/\mu\text{l}.$$

■ 1U DO = 50 µg/ml d'ADN

■ Facteur de dilution de l'ADN (1/100)

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1 Résultats de l'échantillonnage

Nous avons réalisé des collectes de sang différentes au niveau de trois secteurs à Mostaganem concernant trois espèces eucaryotes : Humaine, Volaille et Bovine comme détaillé dans la partie Méthode. Cette collecte nous a permis d'obtenir comme détaillé dans le **Tableau 3**, du sang humain prélevé à partir de deux individus, du sang de volaille à partir d'une seule poule et du sang de Bovin à partir de deux bœufs.

Tableau 3 : Les différents prélèvements réalisés à Mostaganem pour l'extraction d'ADN à partir du sang total de trois espèces.

Numéro	Nombre de Tubes EDTA	Espèce	Volume initial prélevé
1	4	Humaine	4ml x 4
2	1	Volaille	4ml
3	2	Bovine	4ml x 2

Après décongélation totale des tubes de prélèvement au bain-marie, nous avons remarqué d'abord la coagulation d'un tube de sang Bovin que nous avons éliminé directement. De ce fait, nous avons organisé les tubes pour l'extraction comme expliqué dans le **Tableau 4** :

Tableau 4 : Les cinq échantillons sélectionnés pour l'extraction d'ADN à partir du sang total de trois espèces.

Numéro	Tube Falcon	Espèce	Volume
1	H1	Humaine	8ml
2	H2	Humaine	4ml
3	P1	Volaille	1ml
4	P2	Volaille	3ml
5	B1	Bovine	4ml

Nous avons mis les deux tubes EDTA (4ml x 2) prélevé à partir du premier volontaire Humain dans le tube 1 « H1 ». Le tube 2 représente un seul tube prélevé à partir du deuxième individu (4 ml). Le tube 3 « P1 » représente le sang de volaille dilué (1 ml de sang + 9 ml H₂O). Le tube 4 « P2 » a été rempli par du sang de volaille sans dilution (3 ml). Et enfin, le tube 5 « B1 » était tout simplement le sang prélevé sur l'espèce bovine (4 ml).

2 Résultats de l'extraction des ADNs

Pour l'obtention d'une molécule d'ADN isolée et purifiée, il y a plusieurs méthodes utilisées dont l'une d'elles a été abordé dans ce travail, c'est la méthode utilisant des solvant non organiques en outre appelée le *Salting-out*.

Le principe de cette méthode se déduit à traiter le lysat cellulaire par une solution saline, son but est d'éliminer les protéines par l'utilisation du pk. Selon le protocole montré dans le chapitre précédent, les solution salines ont été recommandées tel que le NaCl.

2.1 La lyse des globules rouges

Quelle que soit la méthode d'extraction des acides nucléiques utilisée à partir du sang fraîchement recueilli ou décongelé, le sang doit être initialement vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges (**Bienvenu et al., 1999**) c'est à dire à partir des globules blancs (leucocytes), ce qui signifie que les globules rouges doivent être éliminés. Donc, nous avons utilisé un tampon tris HCl/EDTA. L'EDTA permettra de chélater les ions divalents (nécessaires de les piéger pour inactiver les nucléases) et déstabiliser aussi la paroi cellulaire.

Suite aux résultats obtenus nous constatons que :

- Concernant les échantillons extraits à partir du sang prélevé sur l'humain après 3 lavages, on a acquis un culot transparent.
- Concernant les échantillons extraits à partir du sang prélevé sur le bovin après 4 lavages, nous avons obtenu un culot légèrement moins clair.
- Concernant les échantillons extraits à partir du sang prélevé sur la poule après 4 lavages, on a eu un culot plus ou moins transparent.

2.2 La lyse des globules blancs

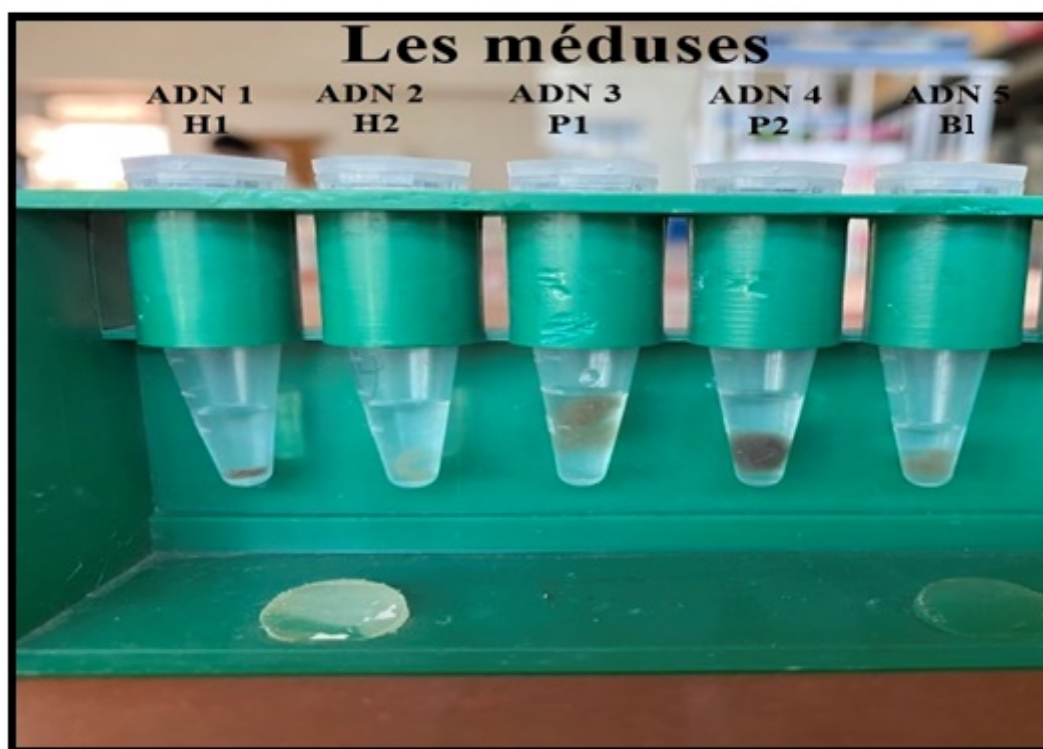
Cette phase cible les leucocytes après élimination du surnageant, le culot cellulaire contenant les leucocytes est repris dans une solution saline et est traité par une solution de lyse des globules blancs (**Bienvenu et al., 1999**) après avoir été séparés des constituants du sang total afin de lyser tous ces derniers en ajoutant la solution de lyse et une incubation pendant une nuit à 37°C. La lyse des globules blancs a nécessité l'utilisation de l'EDTA, le SLB, une protéase K et le NaCl. La protéinase K favorise l'élimination des protéines liées à l'ADN. Le SLB est un détergent responsable de la lyse des membranes cellulaires et de la dissociation, dénaturation des histones liées à l'ADN, ainsi que de la dissolution des lipides membranaires ce qui résume que l'effet du tampon de lyse agit sur le lysat en libérant l'acide

désoxyribonucléique dans le milieu ainsi qu'une dénaturation des protéines.

2.3 Précipitation de l'ADN

Le chlorure de sodium (NaCl) aide à maintenir les protéines dissoutes dans la couche d'eau afin qu'elles ne précipitent pas avec l'ADN dans l'alcool (Carpí *et al.*, 2011). La libération et l'élimination des différentes protéines se fait grâce à la précipitation au NaCl, le surnageant récupéré possède uniquement de l'ADN.

Après une centrifugation à 4000 tr/min nous avons ajouté 2 fois le volume d'éthanol absolu froid au surnageant récupéré précédemment afin d'obtenir une structure filamenteuse « méduse » (Figure 12).



H1, H2 : ADN extraits à partir du sang de l'humain **P1, P2** : ADN extraits à partir du sang de la poule. **B1** : ADN extrait à partir du sang de bovin.

Figure 12 : la collecte de différentes méduses d'ADN.

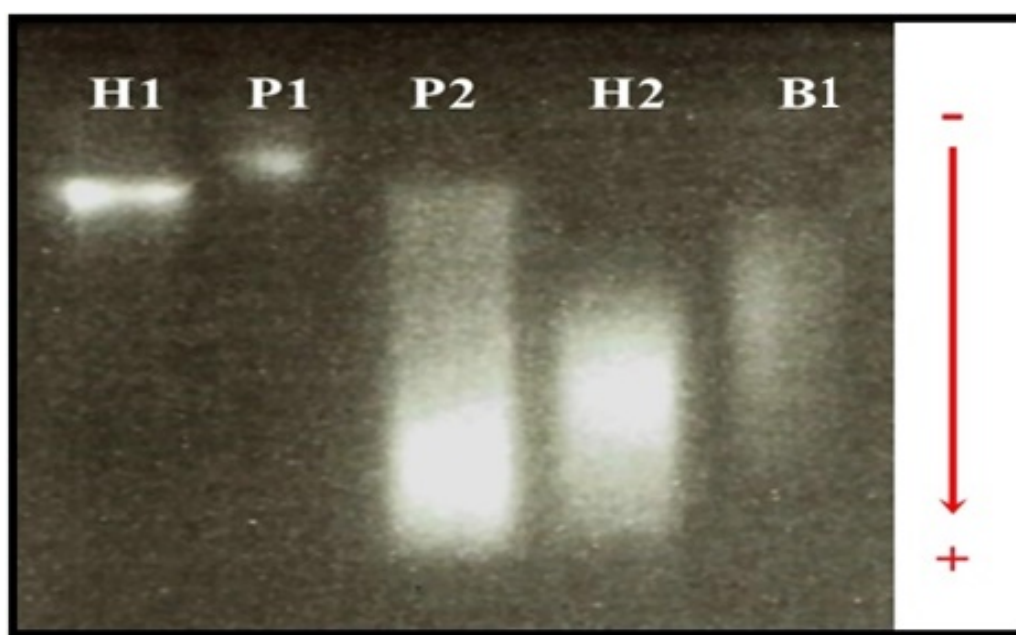
Nous avons obtenu finalement cinq méduses de taille et qualité différentes extraites à partir des 5 échantillons prélevés sur les trois espèces eucaryotes. Comme mentionné sur la (Figure 12), nous avons constaté que les méduses formées à partir de l'espèce Humaine sont plutôt de bonne taille et de bonne qualité par rapport aux méduses obtenues à partir des deux autres espèces. En effet, les méduses formées sur le tube 3 et 4 (P1 et P2) représentent les ADNs extraits à partir des volailles avec une taille assez grande et une qualité pas très satisfaisante. Ce résultat ne reflète que la réalité car il est connu le sang des poules est très concentré par la présence des molécules d'ADN au niveau des deux constituants : les globules

rouges Comme chez tous les oiseaux (volaille) les érythrocytes sont nucléés ; leur forme est ovale à elliptique de même que leur noyau, central (**Harrison et Harrison, 1986**) et les globules blancs. Pour cette raison-là, on nous a été conseillé de tenter l'extraction d'ADN sur un sang dilué comme nous avons fait sur le tube 3 (P1). Cette dilution nous a permis d'obtenir une méduse beaucoup plus intéressante que celle obtenue à partir du sang total non dilué comme sur le tube 4 (P2). Cependant, nous avons pu obtenir une méduse de taille moyenne et de qualité plus ou moins acceptable à partir du sang total du Bovin (Tube 5, B1).

3 Résultats du test de présence des ADNs

Les résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose à 1% nous ont permis d'observer les profils de migration mentionnés dans la figure ci-dessous (**Figure 13**).

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet d'estimer la taille des molécules d'ADN extraites. L'ADN de haut poids moléculaire peut être considéré comme une seule bande nette bien visible, alors que l'ADN dégradé qui a été fragmenté lors de l'extraction apparaît comme une tache étalée (*smear*) rendant les comparaisons aux marqueurs d'ADN difficile.



H1, H2 : ADN extraits à partir du sang de l'humain **P1, P2** : ADN extraits à partir du sang de la poule. **B1** : ADN extrait à partir du sang de bovin.

Figure 13 : la visualisation des bandes d'ADN par électrophorèse.

Sur l'électrophorèse nous avons observé que tous les ADNs ont un poids moléculaire lourd. Les fragments d'ADN après digestion par la protéinase K leurs migration Dans le gel, dépendent de la taille du fragment plus que de la charge de celui-ci. Plus le fragment a une taille élevée, moins la migration électrophorétique par rapport au puits d'inclusion sera importante. A l'opposé les fragments de petite

taille auront une distance de migration la plus élevée (**Kirkpatrick,1991**).

Le test de présence des ADNs a montré la présence de trois *smears* concernant les échantillons H2, P2 et B1 ce qui semble que leurs ADNs ont été dégradés.

- Pour les deux autres ADNs des échantillons H1 et P1, nous avons observé plutôt deux bandes bien visibles sur le gel, ce qui indique que les ADNs n'ont pas été dégradés.

4 L'estimation du degré de pureté des échantillons d'ADNs

Nous avons évalué la qualité des molécules d'ADN extraites afin de juger l'efficacité du protocole d'extraction d'ADN utilisé. Les résultats du dosage optique des ADNs à 260nm et à 280nm ainsi que le rapport de pureté ont été résumés dans le **Tableau 5**.

Cette étape a été réalisée après avoir fait une dilution des cinq ADNs extraits avec un facteur de dilution de 1/100.

Tableau 5 : L'estimation de la pureté et la concentration des échantillons d'ADN.

Les N° échantillons	DO (260 nm)	DO (280 nm)	DO (260nm) / DO (280nm)	Concentration de l'ADN µg/ µl
H1	0.061	0.036	1.7	0.3
H2	0.061	0.023	2.65	0.3
P1	0.121	0.06	2	0.6
P2	0.14	0.84	0.2	0.7
B1	0.05	0.09	0.5	0.2

H : Humain, P : Poule, B : Bovin. 1,2 : numéro d'échantillons. Nm : nanomètre. DO : Dosage optique.

D'après le tableau 5 nous pouvons conclure que selon le rapport DO260/DO280 :

ADN H1 : présente un rapport très **proche de 1,8**, ce qui peut indiquer une contamination très faible de l'ADN H1 par les protéines. En pratique, cette contamination, souvent, n'affecte pas les étapes post-extraction d'ADN.

ADN H2 : présente un rapport **R > 2** ce qui signifie qu'une possible contamination par les ARNs avec les sels a eu lieu lors de l'extraction de l'ADN H2.

ADN P1 : présente un rapport **1,8 ≤ R ≤ 2**, ceci indique que l'ADN de poule dilué présente une bonne qualité.

ADN P2 : présente un rapport **R < 1,8**, ce qui suppose une contamination par les protéines.

ADN B1 : présente aussi un rapport $R < 1,8$, ce qui indique une contamination par les protéines également.

D'après les valeurs du rapport DO260/DO280 des 5 ADN appartenant aux trois espèces ; volaille, bovine et humaine ; Les échantillons P2 et B1 ont un rapport $R < 1,8$, ce qui signifie que nous sommes en présence d'une contamination par les protéines due peut-être à une digestion incomplète par la protéinase K ou SLB.

Les échantillons ayant un rapport entre 1.8 et 2 démontrent que l'étape de purification des ADNs est satisfaisante et aucune contamination n'a été détectée tel est le cas pour le H1 et P1.

Par ailleurs, l'échantillon H2 a eu un rapport supérieur à 2 cela révèle une présence d'une contamination par des sels lors de l'étape d'extraction due peut-être à un lavage insuffisant de la méduse correspondante par l'éthanol absolu.

A partir de ces derniers résultats nous pouvons conclure que pour réaliser une bonne extraction d'ADN à partir de l'espèce Humaine et Bovine, il suffit de suivre le protocole standard au NaCl en modifiant quelques volumes selon la quantité de sang prélevée initialement. Cependant, pour réaliser une extraction d'ADN idéale à partir du sang total de la poule, il est nécessaire de faire une dilution du sang au préalable car la présence de l'ADN au niveau des GR et GB des volailles compliquent les étapes de purification.

Vu la mauvaise qualité du sang qui a été prélevé à partir du bovin (Tube 5), il est préférable aussi que le protocole d'extraction d'ADN soit réalisé sur du sang de bonne qualité ou frais.

4.1 Concentration des ADNs extraits

Selon les résultats du dosage spectrophotométrique résumé sur tableau 5, nous avons observé que la concentration de nos ADNs extraits variait entre 0.2 et 0,7 ug/ul. Par conséquent, nous n'avons pas trouvé une relation proportionnelle entre la quantité d'ADN estimée en ug/ul et le volume du sang initial en ml. Par ailleurs, la concentration des ADNs extraits à partir de la poule était souvent plus intéressante que celle des deux autres espèces à savoir l'Humain et le Bovin (0.6-0.7 vs. 0.2-0.3, respectivement). Ces résultats sont expliqués par la densité du sang des volailles qui est connu comme très concentré en ADN. Cette molécule est présente dans les deux constituants du sang de volaille : globules blancs et globules rouges.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Toute étude de Biologie Moléculaire implique la manipulation des échantillons d'acide nucléique. Les techniques d'extraction des acides nucléiques en utilisant la méthode des solvants non organique telles que le « *salting-out* » sont relativement simples et rapides.

Ce mémoire a pour intérêt de nous initier aux techniques de biologie moléculaire de base telle que l'extraction d'ADN. Dans notre travail, nous avons tenté d'extraire l'ADN à partir du sang total de trois espèces eucaryotes différentes (humaine, volaille et bovine). En premier lieu, nous avons fait plusieurs prélèvements de sang dans la wilaya de Mostaganem. En second lieu, nous avons extraits les molécules d'ADN par la technique du *salting-out* au Laboratoire LGMC de l'université USTO-MB. En dernier lieu, un dosage spectrophotométrique des ADNs nous a permis d'estimer le degré de pureté par le calcul des ratios $DO_{260nm}/280nm$ ainsi que leurs concentrations respectives.

Les résultats de l'extraction d'ADN des échantillons prélevés sur les trois espèces eucaryotes ont montré des méduses de taille et de qualité différentes concernant les 5 ADNs extraits. Le test de présence d'ADN a mis en évidence deux ADNs avec un haut poids moléculaire présentés par une bande bien visible sur le gel d'agarose à 1% et trois ADNs dégradés ou mal digérés présentés par des « *smear* ». Par la suite, ces observations ont été confirmées par le dosage optique qui nous a permis de calculer les concentrations des molécules d'ADN extraites et d'estimer leurs degrés de pureté. En effet, les deux ADNs visibles sur l'électrophorèse ont présenté un bon rapport de pureté. Ces deux ADNs sont celui extrait à partir d'un tube de sang (espèce humaine) de 8ml et celui d'un tube sanguin dilué (espèce volaille). Par conséquent, nous n'avons pas trouvé une relation proportionnelle entre la quantité d'ADN et le volume du sang initial. Par contre, comme prévu, la concentration des ADNs extraits à partir de la poule était plus intéressante que celle des deux autres espèces à savoir l'Humain et le Bovin.

Nous pouvons conclure que le protocole standard de l'extraction d'ADN au NaCl peut être appliqué à plusieurs espèces. Cependant, il serait préférable d'optimiser le protocole selon plusieurs paramètres tels que le volume initial du sang prélevé et le type de l'espèce étudiée.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Bibliographie

- Abdolmohammadi, A.** (2015). *Chapitre 2 : la composition chimique de l'ADN 2ème année, Biologie*. Borzuya university: Disponible sur : URL <http://brussels-scientific.com/>.
- Abhilasha , S., & Shilpa , S.** (2015). *Bioanalytical Techniques*. New Delhi.: Ed The Energy and Resources Institute (TERI).
- Allaoui, A.** (2022). *La cellule : ses organites et leurs fonctions*. Université Constantine.
- Ameur Ameer, A.** (2016). *Génétique générale*. Edition eldjazair.
- Ameziane , N., Bogard , M., & Lamoril , J.** (2006). *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique*. Paris: Ed Elsevier Masson.
- Anandika , D.** (2013). *Extraction et purification de l'ADN*. USA: in <http://www.labome.fr/method/DNA-Extraction-and-Purification.html>.
- Angulo Rodríguez, A., Galindo Uriarte, A., & Pérez Angulo, C.** (2009). *Biología celular. (Traduit par Decrouyi. A)*. Coahuila: Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Annaël , B.** (2015). *Étude à l'échelle de la molécule unique des changements conformationnels de la molécule d'ADN : Influence de la présence de défauts locaux présents sur l'ADN et de paramètres physico-chimiques de la solution environnante*.
- Audesirk , T., & Audesirk , G.** (1998). *Biology: Life on Earth*. Fifth Edition.
- Berthet, J.** (2011). *Les plaquettes sanguines : cellules inflammatoires de l'immunité*. Édition Broché.
- Bienvenu, T., Meunier, C., Bousquet, S., Chiron, L., Richard, A., & Gautheret Dejean, J.** (1999). *Annales de Biologie Clinique. Volume 57, numéro 1*.
- Bresnick, S., Delorme, P., Bouharmont, J., & Evrard, C.-M.** (2004). *Biologie*. DE BOECK SUP; 1er édition.
- Brown , T.** (2010). *Gene Cloning and DNA Analysis : An Introduction 6th edition*. USA.: Ed, John Wiley and Sons.
- Carpi , F., Di Pietro , F., Vincenzetti , S., Mignini , F., & Napolioni , V.** (2011). *Human DNA extraction methods patents and applications Recent Pat Dna Gene Seq 5 (1) 1-7*.
- Cornec, J.-P.** (2014). *La cellule eucaryote 1er édition*. Paris: de boeck sup.
- Dahm , R.** (Février 2005). Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology, vol. 278, n° 2, p.274-288*.
- Denoulet , P., Benlot , C., Blanchouin , N., Boucher , D., Maurel , M., & Sobczak , T.** (2008). *Structure des acides nucléiques*. BioMedia-UPMC.
- Douaoudi, H.** (2019). *Extraction de l'ADN à partir de sang de mouton*. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem Algérie.

- Duncan , E., Setzke , E., & Lehmann , J.** (2003). *Isolation of Genomic DNA. In Nucleic Acids Isolation Methods.* USA: Ed, American Scientific Publishers.
- Durliat.** (1999). *Biochimie structurale I.* Diderot multimédia.
- Frémy, E.** (1895). *Encyclopédie chimique.* P. Vicq-Dunod & Cie.
- Fromont E.** (1993). Hématologie et parasites sanguins des rapaces, Etude chez les oiseaux en réhabilitation. Thèse Doctorat Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. France. n° 19. p4-39.
- Gilles , R., & Anctil, M.** (2006). *Physiologie animale, chapitre 2 circulation sanguine – sang.* France: De Boeck Supérieur.
- Harrison G.J., H. L.** (1986). *Clinical avian medicine and surgery.* Philadelphia, WB Saunders Company. . P67-84, 174-191, 327-355, 472-485.
- <https://tp-svt.pagesperso-orange.fr/adn.htm>. (2007).
- <https://www.fishersci.com/shop/products/promega-maxwell-16-purification-kits-8/PRAS1140>. (s.d.).
- Joëlle , B., & Martin, T.** (2007). *Biologie moléculaire : concepts, techniques, applications.* Centre collégial de développement de matériel didactique (CCDMD).
- Kachi, M.** (2021). *Thèse Comparaison des méthodes d'extraction d'ADN génomique du dromadaire et étude phénotypique.* Université Kasdi Merbah Ouargla.
- Kamoun.** (2003). *Biochimie et biologie moléculaire .* Médecine-Sciences Flammarion, pp122-130.
- Khouaja, F.** (2020). *Support de cours Stabilité Variabilité Génétique Chapitre 3 : Structure du Support de l'Information Génétique.*
- Kirkpatrick, F. H.** (1991). Aperçu des propriétés du gel d'agarose. Électrophorèse de grosses molécules d'ADN: théorie et applications. 9-22.
- Kohle , C.** (2011). *Les cellules sanguines.* Université médicale virtuelle francophone.
- Kubab , N., Hakawati , L., & Alajati , S.** (2014). *Guide des examens biologiques.* 6 éditions.
- Lucas, A., & Jamoz , C.** (1961). *Atlas of avian hematology. Monograph n°25, Washington DC, US, Department of Agriculture.* p271.
- Malek , F.** (2013). *Le biofilm en industrie laitière : caractérisation facteurs de développement et élimination.* Thèse de doctorat de Tlemcen.
- Mouffok.** (2020). *Cours de Licence Biologie et physiologie végétale - Chapitre 01 génétique moléculaire.* Université Batna 2.
- Ould Ahmed, F., Ben Salem, S., Bedhiaf , & Djemali , M.** (2010). *Analyse moléculaire de la diversité génétique des dromadaires (Camelus dromedarius) , pp400.* Tunisie.

- Pillon , M.** (2020). *Mise Au Point De La Methode D'extraction De L'ADN Bacterien De Biopsies Cutanees Canines Fixees Par Le Formol Puis Incluses En Paraffine Pour Identification*. Par Qpcr L'universite Claude-Bernard Lyon I.
- Plateforme de Ressources Biologiques.** (s.d.). *Récupéré sur des Hôpitaux Universitaires Henri Mondor 51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny 94000 Créteil. France Lien <https://chu-mondor.aphp.fr/wp-content/blogs.dir/141/files/2018/05/Extraction-dADN-Plateforme-de->*
- Pochi , R., Subbarayan , & Malancha .** (2002). *Isolation of from Human Whole Blood. BioTechniques December SRC - GoogleScholar:1231-4.*
- Raven, P. H., Johnson, G., Mason, K., Losos, J., & Singer, S.** (2014). Cell structure In Biology. *New York, NY: McGraw-Hill, (10th ed., AP ed., p. 63).*
- Salgado , C., & Hussain, W.** (2013). *The Extraction and Purification of Nucleic Acids for Analysis by PCR. In Real-Time PCR: Advanced Technologies and Applications.* UK: Ed Caister Academic Press.
- Silar, P.** (2016). *Protistes Eucaryotes : Origine, Evolution et Biologie des Microbes Eucaryotes.* HAL Id: al-01263138.
- Simon, B.** (2016). *Biologie moléculaire-Génétique UE1 PACES - 4e éd. - Manuel, cours + QCM corrigés.* Broché Editeur Ediscience.
- Suguna , S., Nandal , D., Kamble , S., Bharatha , A., & Kunkulol , R.** (2014). Genomic DNA Isolation from Human Whole Blood Samples by Non Enzymatic Salting Out Method. *In International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences , 6.* pp 198-199.
- Tan , S., & Yiap , B.** (2009). DNA, RNA, and Protein extraction : the past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology, vol. 2009, p.1-10.*
- Warburg, O., & Christian, W.** (1942). Isolation and crystallization of enolase. *Biochem. Z. 310:384-421.*
- William , W., Wilfinger, Karol , M., & Piotr , C.** (1997). Effect of pH and Ionic Strength on th spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques, 22:474-481.*
- Zeghad, N.** (2018). *Cours biologie vegetale Chapitre I : Organisation cellulaire des végétaux .* Universite constantie.