



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



UNIVERSITÉ
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Génétique fondamentale et appliquée

Par

CHAREF AISSA Fatima Zohra

&

OGAL Salima

Thème :

**Extraction d'ADN à partir d'oignon (*Allium fistulosum*):
différentes méthodes de révélations.**

Soutenue le 13-06-2024 devant le jury composé de :

Président	CHIBANI. A	Pr	Université de Mostaganem
Encadrante	BENSLIMANE. S	MAB	Université de Mostaganem
Examinatrice	ABBASSENE F	MCA	Université de Mostaganem
Co-encadrante	DALACHE. F	Pr	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2023/2024

Extraction d'ADN à

partir d'oignon

(Allium fistulosum):

différentes méthodes

de révélations)

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadrante Pr DALACHE Fatiha pour le Privilège qu'elle nous a fait en acceptant de diriger ce travail.

Sa gentillesse, sa patience, ses précieux conseils, sa disponibilité et l'accueil cordial quelle nous a toujours réservé.

Mais le destin a voulu qu'elle nous quitte pour des raisons de santé, alors nous prions pour son rétablissement et sa bonne santé.

Egalement, Mme. BENSLIMANE Sabria, qui nous a accompagné jusqu'à la fin, nous la remercions pour sa gentillesse et ses conseils pour mener à bien ce travail.

Nos remerciements s'adressent également aux membres du jury Mme ABBASSENE. F et Mr CHIBANI. A qui ont accepté d'évaluer ce travail et pour toutes leurs remarques et critiques.

Enfin, un grand merci à nos parents, à nos familles et à tous ceux qui nous ont soutenu et encouragé tout au long de ce parcours.



Dédicace

D'abord je dis merci ALLAH pour le courage, la volonté que tu nous as donné pour achever ce travail.

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tout simplement que je dédie ce mémoire de fin d'études à :

À ma tendre mère qui a travaillé durement pour s'assurer que ses enfants suivent le bon chemin, et pour les encouragements que vous m'avez donnés pour terminer mes études.

À mon très cher père, que je respecte et que j'apprécie pour son dévouement à m'apporter bien-être et éducation. Ce travail est le résultat des sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation au cours de ces années.

A mes frères ILYES, ZINEB et AMINA, que Dieu les protège et leur donne le bonheur.

À mes camarades qui m'ont accompagné tout au long de mon parcours académique.

A tous mes professeurs qui m'ont accompagné de l'école primaire à l'université.

Tous mes remerciements et respect à mon professeur pour les efforts qu'elle a déployé pour réaliser ce travail.

FATIMA ZOHRA



Dédicace

Je remercie Dieu pour les bénédictions qu'il nous a donné et pour la sagesse qu'il nous a léguée.

Ce travail est un effort que je dédie à la source du don et de la tendresse, la mère généreuse qui m'a élevé avec des bénédictions.

À l'idéal le plus élevé de ce monde, mon père, que Dieu le protège et prolonge sa vie.

A mes frères et sœurs : MALIKA, FATIHA, FADILA, HAMID, KHALED.

Au phare des idées et à la langue des conseils, la respecté professeur DALACHE Fatiha.

Je tiens à remercier mes fidèles amies AMINA et SOUMIA
Pour leur soutien et je demande à Dieu de les protéger pour moi.

SALIMA



Résumé

Dans notre travail, nous avons isolé l'ADN à partir d'oignon blanc (*Allium fistulosum* L.), puis nous avons soumis la méduse d'ADN à des observations macroscopiques et microscopiques avec et sans coloration au vert de méthyle. Les résultats de l'observation microscopique ont été très concluants puisque nous avons pu observer des fibres d'ADN. Ensuite nous avons quantifié l'ADN et évalué son degré de pureté dans une solution en réalisant des lectures au spectrophotomètre sous ultraviolets aux longueurs d'ondes 260 nm et 280 nm. Les résultats obtenus étaient de 38,2 µg/ml pour la quantité d'ADN et 0,93 pour le rapport de pureté ce qui indique que la quantité d'ADN est assez réduite dans nos solutions de plus nous avons une grande contamination aux protéines. Les méduses d'ADN ont été conservées d'une part dans l'éthanol à 96% et d'autre part séchées et maintenues en l'état.

Mots clés: extraction d'ADN, oignon, lyse cellulaire, broyage, vert de méthyle

Abstract

In our work, we isolated DNA from white onion (*Allium fistulosum* L.), then subjected the DNA jellyfish to macroscopic and microscopic observations with and without methyl green staining. The results of the microscopic observations were very conclusive, as we were able to observe DNA fibres. We then quantified the DNA and assessed its degree of purity in solution by taking ultraviolet spectrophotometer readings at wavelengths of 260 nm and 280 nm. The results obtained were 38.2 µg/ml for the quantity of DNA and 0.93 for the purity ratio, which indicates that the quantity of DNA is fairly small in our solutions and that we have a high level of protein contamination. The DNA jellyfish were preserved in 96% ethanol and then dried and kept as is.

Key words: DNA extraction, onion, cell lysis, grinding, methyl green

ملخص

في عملنا، قمنا بعزل الحمض النووي من البصل الأبيض (*Allium fistulosum* L.)، ثم أخضعنا قناديل الحمض النووي للملاحظة العيانية والمجهرية مع تلوين أخضر الميثيل وبدونه. كانت نتائج الملاحظة المجهرية قاطعة للغاية، حيث تمكنا من ملاحظة ألياف الحمض النووي. ثم قمنا بعد ذلك بتحديد كمية الحمض النووي وتقييم درجة نقائه في المحلول من خلال أخذ قراءات مقياس الطيف الضوئي فوق البنفسجي عند أطوال موجية 260 نانومتر و280 نانومتر. وكانت النتائج التي تم الحصول عليها 38.2 ميكروجرام/مل لكمية الحمض النووي و0.93 لنسبة النقاء، وهو ما يشير إلى أن كمية الحمض النووي قليلة إلى حد ما في المحاليل التي لدينا وأن لدينا مستوى عالٍ من التلوث بالبروتين. حُفظ لقناديل الحمض النووي في إيثانول بنسبة 96% ثم جُفِّف واحتُفظ به كما هو.

الكلمات المفتاحية: استخلاص الحمض النووي، البصل، تحليل الخلايا، الطحن، الميثيل الأخضر

Liste des abréviations

- ADN:** Acide désoxyribonucléique
- ARN:** Acide ribonucleique
- AA:** Acide Aminé
- CTAB:** Bromure-diamine-tetra-acetic acide
- PCR:** Polymerase Chain Reaction
- EDTA:** Ethylene-diamine-tetra-acetic acid
- PAGE:** électrophorèse sur gel de polyacrylamide
- BrEt:** Bromure d'éthidium
- ME:** Microscope Electronique
- VM:** Vert de Méthyle
- BM:** Bleu de méthylène
- TE:** Tris-EDTA
- UV:** Ultra Violet
- DO:** Densité Optique
- ON :** Ouverture Numérique
- Kb:** Kilo base
- nm:** nano mètres
- Cm:** centimètres
- mM:** Millimètre
- g:** Gramme
- M:** Molaire
- µl:** micro-litres
- µg:** micro- grammes
- cm 3:** centimètres cube

Liste des figures

Figure 1: Composants de l'ADN.....	2
Figure 2: Structure des bases azotées de l'ADN.....	3
Figure 3: Liaisons hydrogène formées entre les bases azotées.....	3
Figure 4: Structure d'un nucléotide et d'un nucléoside.....	4
Figure 5: Lyse cellulaire utilisant un détergent.....	6
Figure 6: Schéma d'une cellule bactérienne.....	10
Figure 7: Schéma de la paroi d'une bactérie. a: bactéries Gram positives. b: bactéries Gram négatives.....	11
Figure 8: Représentation schématique de la structure de la membrane plasmique	12
Figure 9: Représentation schématique de cellules végétales et de leurs parois (A) et interface entre deux cellules Végétales (B).....	13
Figure 10: Structure chimique du Bleu de Méthylène.....	17
Figure 11: Intercalation du bromure d'éthidium dans une molécule d'ADN.....	18
Figure 12: Allium fistulosum (oignon vert).....	20
Figure 13: les étapes d'extraction d'ADN.....	21
Figure 14: précipitation de l'ADN.....	24
Figure 15: Etape de formation de la méduse d'ADN.....	25
Figure 16: Méduse de l'ADN.....	26
Figure 17: Observation microscopique d'une méduse de l'ADN (grossissement $\times 1000$) sans coloration.....	27
Figure 18: Méduse de l'ADN colorée avec le vert de méthyle (A) et le bleu de méthylène (B)	27
Figure 19: Méduse d'ADN après lavage.....	28
Figure 20: Observation microscopique de l'ADN (grossissement $\times 400$).....	29

Figure 21: Observation microscopique de l'ADN (grossissement $\times 1000$).....	29
Figure 22: Observation microscopique de l'ADN (grossissement $\times 1600$).....	29
Figure 23: conservation de l'ADN.....	32

Liste des tableaux

Tableau 1: Résultats Spectrophotométriques	30
---------------------------------------------------------	----

Résumé.....	I
Abstract	II
ملخص	III
Liste des abréviations	IV
Liste des figures	V
Liste des tableau	VI
INTRODUCTION	1
1. L'acide désoxyribonucléique (ADN)	2
1.1. Définition	2
1.2. Structure.....	2
2. Extraction d'ADN	5
2.1. Les principales étapes de l'extraction d'ADN.....	5
2.1.1. Lyse des cellules	5
2.1.1.1. Lyse mécanique.....	6
2.1.1.2. Lyse non mécanique	6
• Lyse chimique	6
2.1.2. Précipitation et élimination des protéines.....	7
2.1.3. Précipitation, récupération et conservation de l'ADN	8
2.2. Méthodes d'extraction d'ADN.....	8
2.2.1. Méthode phénol-chloroforme	8

2.2.2.	Méthode salting out.....	9
2.2.3.	Méthode d'extraction au CTAB (Cétyltriméthyl ammonium bromure).....	9
2.2.4.	Kit commercial d'extraction	9
2.3.	L'ADN chez les cellules procaryotes	10
2.3.1.	Les cellules bactériennes.....	10
2.3.2.	Composition de la paroi des bactéries.....	10
2.3.3.	Le génome de cellule bactérienne	11
2.3.3.1.	ADN chromosomique	11
2.3.3.2.	ADN plasmidique.....	11
2.4.	L'ADN chez les cellules eucaryotes	11
2.4.1.	Cellules animales	12
2.4.1.1.	ADN mitochondrial	12
2.4.2.	Cellules végétales.....	13
2.4.2.1.	ADN mitochondrial	13
2.4.2.2.	ADN chloroplastique	14
2.4.2.3.	Noyau	14
3.	Techniques d'analyses de l'ADN	15
3.1.	L'électrophorèse	15
3.1.1.	Principe	15
3.1.2.	Types d'électrophorèse	15
3.1.2.1.	Électrophorèse sur gel d'agarose.....	15
3.1.2.2.	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	16
3.2.	Spectrophotométrie	16

3.2.1. Principe	16
3.3. Les colorants des acides nucléiques	17
3.3.1. Vert de méthyle.....	17
3.3.2. Bleu de méthylène.....	17
3.3.3. Bromure d'éthidium.....	17
3.4. Microscopie	18
3.4.1. Microscopie optique	18
3.4.2. Microscopie électronique.....	19
1. Matériel biologique	20
2. Isolement de l'ADN.....	20
2.1. Solutions et tampons.....	20
2.2. Protocole d'extraction De l'ADN	21
2.2.1. Lyse cellulaire	21
2.2.2. Précipitation et récupération des méduses d'ADN	21
3. Révélation de l'ADN	22
3.1. Sans coloration.....	22
3.1.1. Visualisation à l'œil nu.....	22
3.1.2. Visualisation au microscope photonique.....	22
3.2. Avec coloration	22
3.2.1. Visualisation à l'œil nu.....	22
3.2.2. Visualisation au microscope photonique.....	22
4. Quantification et qualité de l'ADN extrait	23
5. Conservation de l'ADN	23

6. Précipitation et récupération	24
7. Résultats de la révélation de la présence de l'ADN	26
7.1. Observation de la méduse d'ADN sans coloration	26
7.2. Observation de la méduse d'ADN avec coloration	27
7.2.1. Observation à l'œil nu de la méduse d'ADN.....	27
7.2.2. Observation au microscope optique de la méduse d'ADN	28
8. Quantification et qualité de l'ADN extrait	30
8.1. Mesure de la concentration d'ADN	31
8.2. Mesure du degré de pureté de l'ADN	31
9. Résultat conservation de l'ADN	32
Conclusion	33

Introduction

INTRODUCTION

L'extraction des acides nucléiques est le point de départ de toute étude en génomique et est donc considérée comme un processus crucial. La première extraction brute d'ADN a été réalisée par le médecin suisse Friedrich Miescher en 1869. Il avait accidentellement purifié l'ADN du noyau alors qu'il étudiait les protéines des leucocytes. Il a découvert, que la propriété de cette substance était fondamentalement différente de celle des protéines. D'où le terme "nucléine" (**Dahm, 2005**).

L'ADN peut être extrait de sources aussi diverses que des échantillons cliniques tels que les fluides corporels et les biopsies ; les échantillons médico-légaux tels que les taches de sang séché, les prélèvements buccaux et les empreintes digitales ; le sol, les tissus végétaux et animaux, les insectes, les protozoaires, les bactéries et les levures. (**Dhaliwal, 2013**)

Le principe de l'extraction de l'ADN comprend les étapes suivantes : (1) rupture des parois ainsi que des membranes cytoplasmiques et nucléaires ; (2) séparation et purification de l'ADN des autres composants du lysat cellulaire tels que les lipides, les protéines et les autres acides nucléiques.

Au moment de choisir la méthode d'extraction de l'ADN, il est essentiel de s'assurer de la qualité de l'ADN isolé pour mener à bien les applications prévues en aval. D'autres facteurs doivent être pris en considération afin d'optimiser la méthode d'extraction de l'ADN. Il s'agit du coût, les toxicités potentielles, le temps, le rendement, l'équipement de laboratoire et l'expertise requise, ainsi que la quantité d'échantillon nécessaire pour le protocole. Au fil du temps, différentes méthodes d'isolement ont évolué (**Preetha, 2020**), laissant un vaste choix aux manipulateurs, en ce qui concerne les produits d'extraction, le temps imparti, le matériel nécessaire et enfin les moyens de visualisation de l'ADN extrait.

Dans notre étude, nous nous sommes fixés les buts suivants :

1. L'extraction d'ADN à partir d'oignon blanc en utilisant un protocole court, simple et n'impliquant aucun produit dangereux.
2. Utiliser le microscope optique et des colorants pour la révélation de la présence d'ADN.
3. Evaluer la quantité et le degré de pureté de l'ADN obtenu.

Partie

bibliographique

Chapitre I :

ADN

1. L'acide désoxyribonucléique (ADN)

1.1. Définition

La molécule de l'acide désoxyribonucléique est présente dans les cellules de tous les êtres vivants. Elle contient l'information génétique utilisée dans le développement et le fonctionnement de tous les organismes vivants et qui se transmet de génération en génération. (Bello *et al.*, 2017).

1.2. Structure

L'ADN contient principalement trois composants : un sucre pentose (le désoxyribose), une base azotée et un groupe phosphate (**Fig. 1**). Cette molécule est composée de deux brins antiparallèles enroulés l'un autour de l'autre, formant une structure en double hélice. Comme les deux brins sont formés d'unités monomères appelées nucléotides, le brin d'ADN est appelé un polynucleotide. (Ambekar *et al.*, 2017)

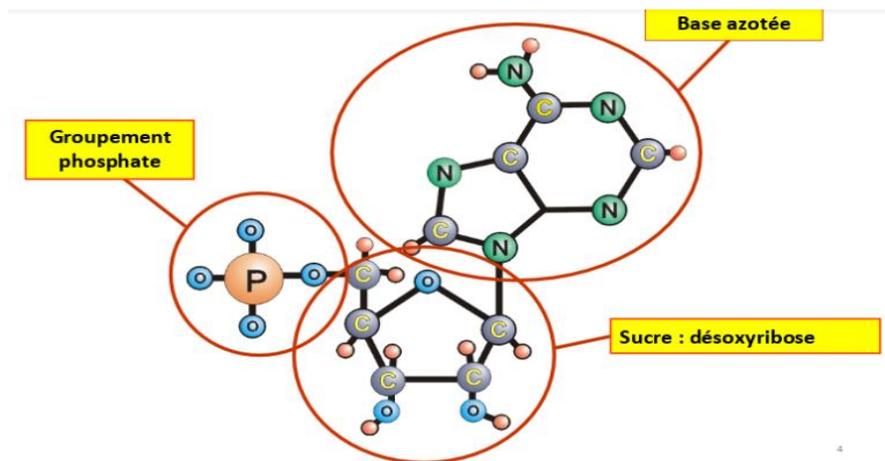


Figure 1: Composants de l'ADN (Ambekar *et al.*, 2017)

➤ Les bases azotées

La double hélice de la molécule d'ADN est maintenue par des interactions de liaisons hydrogène entre des paires de bases complémentaires : adénine (A), thymine (T), guanine (G) et cytosine (C), où il est possible d'observer des interactions CG et TA. A et G étant des bases puriques, tandis que T et C des bases pyrimidiques (**Fig. 2**). (Brenno *et al.*, 2009)

Les paires de bases AT sont reliées par deux liaisons hydrogène et les paires de bases GC sont reliées par trois liaisons hydrogène (**Fig.3**). Par conséquent, les paires GC sont plus stables

et nécessitent plus d'énergie pour être séparées que les paires AT. La composition globale des bases de l'ADN varie d'un organisme à l'autre, ce qui constitue le message génétique. (Bhagavan *et al.*, 2011)

Bases azotées

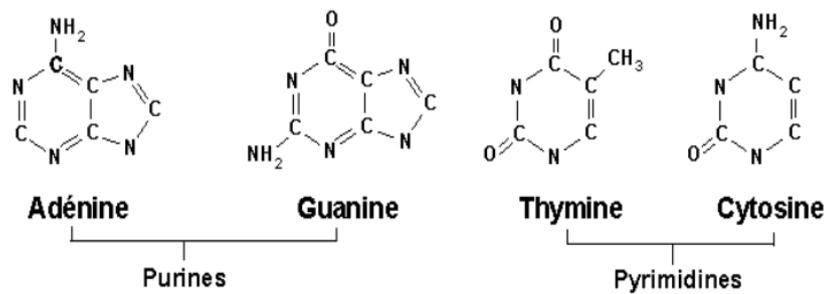


Figure 2: Structure des bases azotées de l'ADN (Brenno *et al.*, 2009)

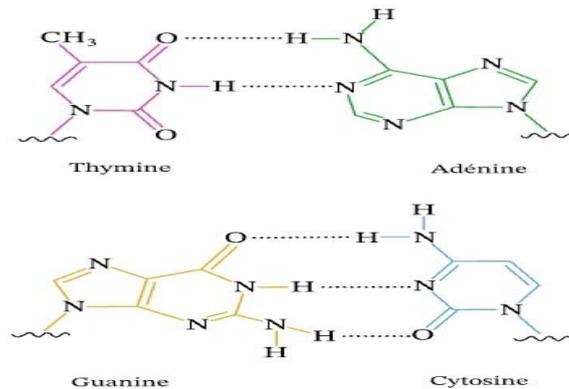


Figure 3: Liaisons hydrogène formées entre les bases azotées (Bhagavan *et al.*, 2011)

➤ Nucléosides

Les nucléosides sont constitués d'une base purique ou pyrimidique et d'un sucre désoxyribose reliés par une liaison β -glycosidique. (Sparkman *et al.*, 2011)

➤ Nucléotides

La structure primaire de l'acide désoxyribonucléique est un polymère de nucléotides, contenant principalement cinq bases hétérocycliques, un D-désoxyribose

attaché au N-9 des purines ou au N-1 des pyrimidines, et un groupe phosphate attaché à la position 3 ou à la position 5 du pentose. (Ts'o, 2012)

Les nucléosides ont une structure très similaire à celle des nucléotides, ainsi, un nucléotide peut également être appelé phosphate de nucléoside. (Fig. 4) (Bowater, 2005)

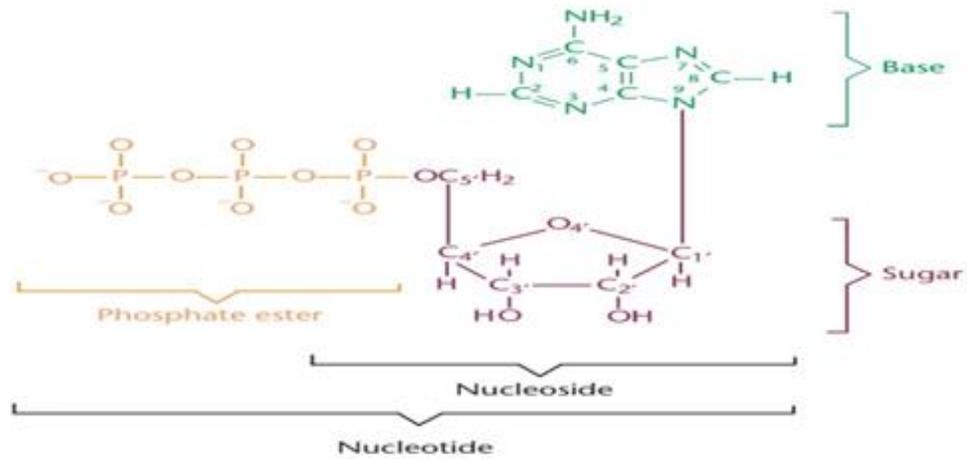


Figure 4: Structure d'un nucléotide et d'un nucléoside (Bowater, 2005)

Chapitre II :

Extraction d'ADN

2. Extraction d'ADN

L'extraction de biomolécules, telles que l'ADN et l'ARN (acide ribonucléique), à partir d'une variété de matériaux biologiques de départ, destinées à être utilisées dans des applications en aval et à d'autres fins analytiques ou préparatoires, est la première étape la plus importante de la biologie moléculaire. Différentes méthodes existent, et qui ont des effets variés sur l'extraction de l'ADN, une technique d'extraction idéale doit optimiser le rendement de l'ADN, minimiser sa dégradation et être efficace en termes de coût, de temps, de main-d'œuvre et de fournitures. Elle doit également permettre l'extraction de plusieurs échantillons et générer un minimum de déchets dangereux. (Chen *et al.*, 2010)

Les méthodes d'isolement d'ADN largement utilisées peuvent être divisées en :

- Méthodes utilisant des solvants organiques (phénol-chloroforme)
- Méthodes utilisant des solvants non organiques (salting out)
- Méthodes basées sur l'utilisation de colonnes de résines échangeuses d'ions
- Méthodes des kits. (Grigorov *et al.*, 2021)

2.1. Les principales étapes de l'extraction d'ADN

2.1.1. Lyse des cellules

L'information génétique est contenue à l'intérieur des cellules, chez les procaryotes, l'ADN est présent dans le nucléoïde, qui est une partie du cytoplasme, et dans les plasmides, tandis que chez les eucaryotes l'ADN est localisé dans le noyau, la mitochondrie (les chromosomes) et le chloroplaste (uniquement chez les plantes). La perturbation ou la destruction de la membrane cellulaire et selon l'organisme d'une autre membrane (nucléaire, mitochondriale ou chloroplastique) sont donc nécessaires pour accéder à la molécule d'ADN. De plus, les cellules des organismes pluricellulaires sont organisées en tissu et doivent être dissociées pour accéder à l'ADN. (Shehadul *et al.*, 2017)

Un certain nombre de méthodes, ont été mises au point pour lyser les cellules à l'échelle macroscopique et microscopique et ces méthodes peuvent être classées principalement en techniques mécaniques et non mécaniques. (Shehadul *et al.*, 2017)

2.1.1.1. Lyse mécanique

Dans la lyse mécanique, la membrane cellulaire est brisée par une force physique. La technique consiste à endommager directement la structure cellulaire pour libérer les composants intracellulaires nécessaires. Par exemple un broyeur à billes, homogénéisateur haute pression et la lyse hypotonique. (Shehadul *et al.*, 2017)

2.1.1.2. Lyse non mécanique

- **Lyse chimique**

Les méthodes chimiques utilisent des tampons de lyse pour perturber la membrane cellulaire. Des détergents peuvent également être ajoutés aux tampons de lyse cellulaire pour solubiliser les protéines membranaires et rompre la membrane cellulaire afin d'en libérer le contenu (Fig. 5). La lyse chimique peut être classée en lyse alcaline et lyse détergente (Grigorov *et al.*, 2021)

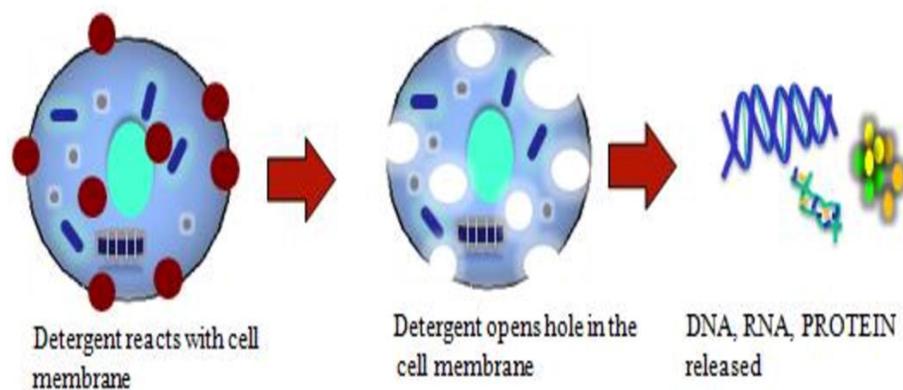


Figure 5: Lyse cellulaire utilisant un détergent (Shehadul *et al.*, 2017)

- **Lyse physique**

La perturbation physique est une méthode sans contact qui utilise une force externe pour rompre la membrane cellulaire. Les différentes forces comprennent la chaleur, la pression et l'énergie sonore. Elles peuvent être classées en trois catégories : lyse thermique, cavitation et choc osmotique. (Shehadul *et al.*, 2017)

- **Lyse enzymatique**

La lyse enzymatique est une méthode de lyse cellulaire biologique dans laquelle des enzymes telles que le lysozyme, la lysostaphine, la zymolase, la cellulase, la protéase ou la

glycanase sont utilisées. La plupart de ces enzymes sont disponibles dans le commerce et peuvent être utilisées pour la lyse à grande échelle. L'un des avantages de la lyse enzymatique est sa spécificité. Par exemple, la chitinase peut être utilisée pour la lyse des cellules de levures et les pectinases sont utilisées pour la lyse des cellules végétales, tandis que les lysozymes sont utilisés pour la lyse des cellules bactériennes. **(Shehadul *et al.*, 2017)**

Le lysozyme réagit avec la couche de peptidoglycane et rompt la liaison glycosidique. C'est pourquoi les bactéries à Gram positif peuvent être directement exposées au lysozyme, mais la membrane externe des bactéries à Gram négatif doit être retirée avant d'exposer la couche de peptidoglycane à l'enzyme. Le traitement au lysozyme est généralement effectué à un pH de 6 à 7 et à une température de 35 °C. Pour les bactéries Gram négatives, le lysozyme est utilisé en combinaison avec des détergents pour briser la paroi cellulaire et la membrane. **(Andrews *et al.*, 1987; Salazar, 2007; Shehadul *et al.*, 2017)**

2.1.2. Précipitation et élimination des protéines

Le lysat obtenu peut parfois contenir des contaminants tels que des protéines, des polysaccharides et des polyphénols. Une méthode efficace pour éliminer les protéines contaminantes est la digestion de l'échantillon à l'aide de la Protéinase K (cellules, tissus animales) ou du Lysozyme (bactérie). **(Gautam, 2022)**

La précipitation d'une protéine donnée à partir d'un mélange est fonction de ses propriétés physicochimiques. Les protéines sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les solutions salines, l'insolubilité maximale dans l'eau se produit au point isoélectrique de la protéine. Un certain nombre de polymères non chargés, solubles dans l'eau et de poids moléculaire variable ont été utilisés pour la précipitation des protéines. Les alcools, l'acétone, l'éther et d'autres réactifs organiques miscibles à l'eau ont été utilisés par les chimistes analytiques pour précipiter les protéines depuis le début du siècle dernier. **(Rothstein, 2019)**

Le NaCl peut également être utilisé, pour solubiliser et précipiter les protéines. La précipitation se produit par neutralisation des charges de surface par le sel, par réduction de l'activité chimique de la protéine et par diminution de la concentration effective de l'eau. C'est ce qu'on appelle le "relargage" des protéines (salting out). La concentration de tout sel nécessaire pour provoquer la précipitation d'une protéine particulière est liée au nombre et à la distribution des charges et des groupes polaires non ioniques à la surface de la protéine, ainsi qu'au nombre et à la distribution des résidus hydrophobes exposés et rendus dominants au fur et à mesure que les charges sont neutralisées. De plus, la taille et la forme de la protéine

contribuent à la facilité relative de précipitation. (**Englard *et al.*, 1990**)

2.1.3. Précipitation, récupération et conservation de l'ADN

La précipitation de l'ADN par l'éthanol est l'une des procédures les plus utilisées en biologie moléculaire. Les protocoles les plus couramment utilisés nécessitent d'ajouter des ions sodium et de l'éthanol à la solution d'ADN pendant quelques minutes pour le précipiter et le récupérer. Il est impératif de procéder au séchage du précipité afin de supprimer l'éthanol qui pourrait entraver sa dissolution ultérieure. (**Zeugin *et al.*, 1985**).

Le stockage dans un congélateur semble être le moyen le plus approprié pour la conservation à long terme de l'ADN, car le stockage dans l'azote liquide entraîne la formation d'amas d'ADN. Les différentes conditions de stockage (-20°C et -80°C) n'ont pas altéré de manière significative la pureté ou la qualité de l'ADN. (**Safarikova *et al.*, 2021**)

2.2. Méthodes d'extraction d'ADN

Il existe plusieurs méthodes d'extraction d'ADN, dans la plupart des cas, il est nécessaire d'adapter la technique d'extraction au type d'échantillon biologique, à la nature du génome, au nombre de copies dans l'échantillon et aux méthodes de biologie moléculaire utilisées ultérieurement.

2.2.1. Méthode phénol-chloroforme

La méthode phénol-chloroforme est une technique couramment utilisée pour l'extraction de l'ADN. Elle peut être utilisée par exemple pour extraire l'ADN du sang, d'une culture en suspension ou d'un homogénat de tissu. (**Dairawan *et al.*, 2020**)

Cette technique consiste en premier lieu à ajouter au lysat cellulaire du phénol qui est un excellent agent dénaturant des protéines. Après une étape de centrifugation, l'émulsion se sépare en deux phases : la phase aqueuse supérieure composée d'ADN dissous dans l'eau et la phase organique inférieure contenant des solvants organiques et des composants cellulaires hydrophobes, notamment des protéines (**Fig.6**). Le phénol est ensuite éliminé par l'ajout du chloroforme qui va augmenter la densité de la phase organique, empêchant le phénol de s'inverser dans la phase aqueuse, le chloroforme est donc utilisé pour empêcher l'ADN d'être dégradé par le phénol. (**Green et Sambrook, 2017**)

Toutefois, la nature toxique du phénol et du chloroforme nécessite l'utilisation de hottes et constitue de ce fait une limitation majeure de cette méthode. Les échantillons d'ADN extraits sont d'une plus grande pureté que ceux obtenus par d'autres méthodes conventionnelles, mais

moins que ceux obtenus à l'aide de méthodes basées sur les colonnes. (**Dairawan *et al.*, 2020**)

2.2.2. Méthode salting out

L'extraction de l'ADN par salting out qui est un processus non toxique, utilise le concept de précipitation de l'ADN en ajoutant une forte concentration de sel à l'échantillon. Cette technique implique l'ajout d'une solution saline, telle que le sulfate d'ammonium, à l'échantillon, ce qui provoque la précipitation de l'ADN. L'ADN précipité peut ensuite être collecté par centrifugation et traité ultérieurement pour analyse. Cette méthode s'est avérée efficace, peu coûteuse et rapide, ce qui la rend adaptée à l'extraction d'ADN à grande échelle à partir d'échantillons tels que des taches de sang séché. Le salting out est largement utilisé dans les laboratoires en raison de sa capacité à produire un ADN de haute qualité pour diverses analyses génétiques, notamment la PCR et le séquençage. (**Lab et zafar, 2020; Hanke *et al.*, 2022**)

2.2.3. Méthode d'extraction au CTAB (Cétyltriméthyl ammonium bromure)

Cette technique a été introduite par **Doyle *et al.* (1990)**, où les échantillons contenant de l'ADN sont ajoutés à 2 % de CTAB à un pH alcalin. Dans une solution de faible force ionique, le tampon d'extraction précipite l'ADN et les polysaccharides acides du reste des composants cellulaires. Des solutions à forte concentration en sel sont ensuite utilisées pour séparer l'ADN des polysaccharides acides qui forment un précipité avec le CTAB. Cette méthode est donc particulièrement utile pour l'extraction de l'ADN à partir des plantes et des bactéries qui produisent de grandes quantités de polysaccharides. L'ADN est ensuite purifié à l'aide de divers solvants organiques, y compris des agents toxiques tels que le phénol et le chloroforme. Les principales limites de cette méthode sont l'utilisation de réactifs toxiques et un protocole qui prend beaucoup de temps. (**Dairawan *et al.*, 2020**)

2.2.4. Kit commercial d'extraction

Les kits commerciaux d'extraction d'acides nucléiques constituent un moyen économique, efficace et pratique pour isoler l'ADN. (**Metcalf *et al.*, 2012**)

Les fabricants se battent sur le marché mondial afin de prouver la qualité de leurs produits, en offrant divers avantages tels que l'efficacité, la rapidité, la sécurité et bien évidemment le prix. Néanmoins, il est primordial de garantir l'obtention d'un ADN purifié, sans aucun contaminant ni inhibiteur d'enzyme, afin qu'il puisse être utilisé directement dans les différentes applications courantes de biologie moléculaire telles que la digestion enzymatique, la PCR et le marquage. (**Brown, 2010**)

2.3. L'ADN chez les cellules procaryotes

2.3.1. Les cellules bactériennes

Les bactéries sont des organismes unicellulaires, dépourvus de noyau, elles constituent la forme de vie la plus ancienne sur Terre. Parmi toutes les espèces connues, deux types de morphologie prédominent. Les bactéries de forme ronde appelées coques et les bactéries en forme de bâtonnets appelées bacilles (**Fig. 6**). Une autre façon de classer les bactéries consiste à les distinguer sur la base de la structure de leur paroi à l'aide d'une coloration de Gram. Les bactéries sont ainsi classées en deux catégories : Gram négatif et Gram positif. (**Cibot, 2015**)

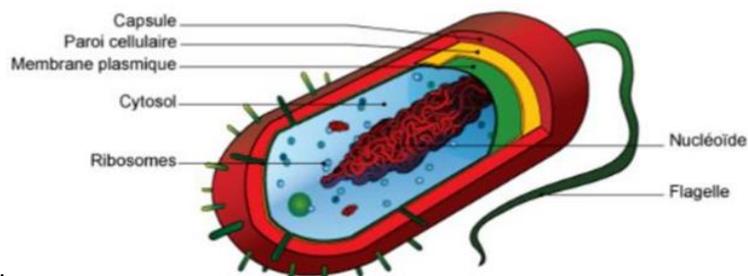


Figure 6: Schéma d'une cellule bactérienne (**Gullaume, 2023**)

2.3.2. Composition de la paroi des bactéries

Les bactéries Gram positives possèdent une paroi composée d'une épaisse couche de peptidoglycane (20-80 nm), dans laquelle sont inclus des fragments d'acides téichoïques et d'acides lipotéichoïques. Le peptidoglycane est un polymère d'acides aminés et de sucres plutôt hydrophile, qui forme une macrostructure qui dessine la paroi de la bactérie. Cette paroi permet donc à la bactérie de résister aux tensions mécaniques (notamment la pression osmotique).

Les bactéries à Gram négatif possèdent une seule et fine couche de peptidoglycane située dans l'espace périplasmique, qui est entourée d'une structure membranaire appelée membrane externe, qui contient des lipopolysaccharides, des protéines et des phospholipides. (**Le Gouellec, 2008 ; Cibot, 2015**) (**Fig. 7**).

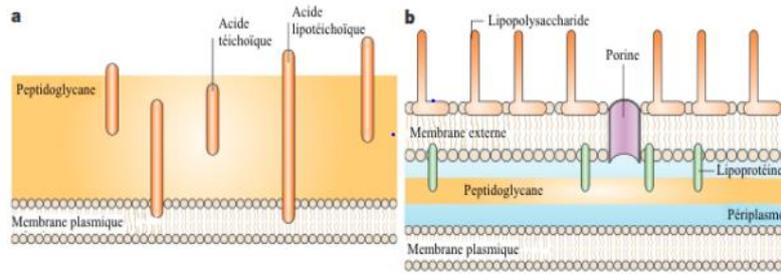


Figure 7: Schéma de la paroi d'une bactérie. a: bactéries Gram positives. b: bactéries Gram négatives (Franche, 2019)

2.3.3. Le génome de cellule bactérienne

2.3.3.1. ADN chromosomique

La plupart des cellules bactériennes ont leurs gènes disposés dans un seul cercle d'ADN. Le cercle d'ADN et quelques protéines qui y sont attachées sont appelés chromosomes bactériens. La molécule d'ADN d'un chromosome décondensé a toujours une taille supérieure au volume de la cellule. Elle doit donc être compactée tout en restant fonctionnelle pour les grandes fonctions cellulaires telles que l'expression des gènes, la réplication et la ségrégation des chromosomes. On sait maintenant que plusieurs facteurs coopèrent pour condenser l'ADN en un assemblage hautement dynamique de boucles super-enroulées. A l'échelle moléculaire, le chromosome est maintenu sous une forme surenroulée négative par deux types de surenroulement, l'un « contraint » par la fixation de protéines à l'ADN formant le nucléoïde, et l'autre « libre », diffusible le long du chromosome. (Thanbichler et Shapiro, 2006; Cibot, 2015)

2.3.3.2. ADN plasmidique

Un plasmide est un fragment circulaire d'ADN extra-chromosomal n'exprimant à priori pas de fonctions essentielles à la bactérie. Cependant, les plasmides peuvent conférer à leurs hôtes des aptitudes qui dans certains cas leur donnent un avantage sélectif. Cet avantage sélectif peut provenir d'une résistance à un antibiotique ou encore de la possibilité d'utiliser une nouvelle voie métabolique. (Wong, 2010)

2.4. L'ADN chez les cellules eucaryotes

Eucaryote, toute cellule ou organisme possédant un noyau clairement défini, ce dernier

est entouré par une membrane nucléaire. Les eucaryotes sont des cellules présentes dans les organismes multicellulaires, comme les plantes et les animaux, mais peuvent aussi être présentes dans des organismes unicellulaires, comme certains champignons et les protistes. La cellule est délimitée par la membrane plasmique qui constitue une barrière pour la vectorisation intracellulaire de molécules (**Fig.8**). Les organites des cellules eucaryotes tels que le noyau, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et les endosomes possèdent des membranes de structure semblable à celle de la membrane plasmique mais qui peuvent différer au niveau de leurs composants, certains de ces organites contiennent des molécules d'ADN. (**Baluska, 2004; Mathilde, 2022**)

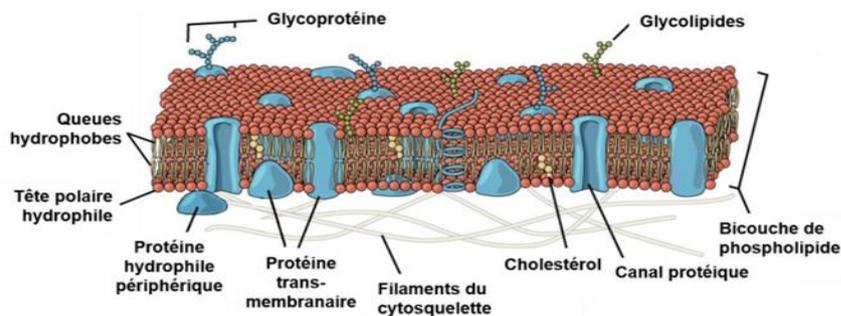


Figure 8: Représentation schématique de la structure de la membrane plasmique (**Mathilde, 2022**)

2.4.1. Cellules animales

2.4.1.1. ADN mitochondrial

Chaque cellule contient des centaines, voire des milliers de mitochondries, situées dans le cytoplasme. Bien que la majeure partie de l'ADN soit conditionnée dans les chromosomes du noyau, les mitochondries possèdent également une petite quantité de leur propre ADN. Ce matériel génétique est connu sous le nom d'ADN mitochondrial ou ADNmt. Chez l'homme, l'ADN mitochondrial comprend environ 16 500 éléments constitutifs de l'ADN (paires de bases), ce qui représente une petite fraction de l'ADN total des cellules. (**Mainieri, 2009**)

2.4.1.2. Noyau

Les fonctions principales du noyau sont de stocker l'ADN de la cellule, de maintenir son intégrité et de faciliter sa transcription et sa réplication. Le contenu nucléaire, qui comprend le matériel génétique et les nombreuses protéines nécessaires à son traitement, est enfermé dans une double membrane appelée enveloppe nucléaire, mais reste fonctionnellement connecté au cytoplasme via des pores nucléaires. Une cellule animale contient environ 1 mètre du polymère linéaire d'ADN double brin. L'ADN est biodégradable, en dehors de son compartiment, il est dégradé en quelques minutes par des nucléases. (Zuber, 2004; Oth et John, 2020)

2.4.2. Cellules végétales

Les végétaux sont constitués de cellules de formes et de fonctions variées. Une cellule végétale se distingue des cellules animales par la présence d'une paroi l'entourant et qui permet de fournir une résistance mécanique élevée aux tissus végétaux. Une paroi primaire est formée au moment de la division cellulaire au niveau de la membrane plasmique. Elle est séparée de la paroi des cellules adjacentes par la lamelle moyenne (Fig. 9). La paroi primaire évolue au cours de la croissance végétale. (Touzard, 2016)

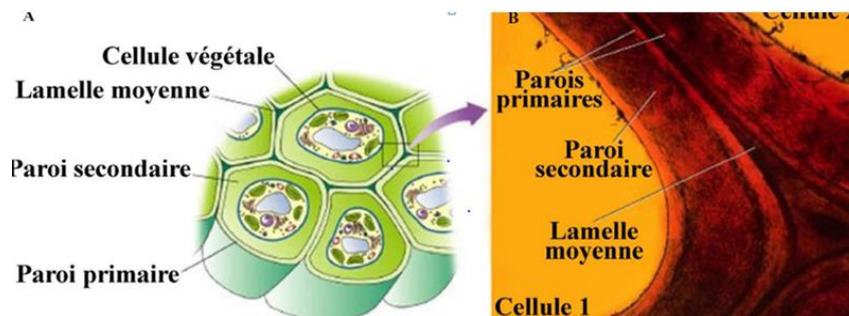


Figure 9: Représentation schématique de cellules végétales et de leurs parois (A) et interface entre deux cellules Végétales (B) (Touzard, 2016)

2.4.2.1. ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial est situé à la surface de la membrane mitochondriale interne, de sorte qu'il n'est pas réparti de manière homogène dans les mitochondries, mais est concentré dans des structures appelées nucléoïdes. Ces structures apparaissent avant la phase S de la méiose et ont des points d'ancrage dans la membrane mitochondriale interne. (Velours, 2009)

2.4.2.2. ADN chloroplastique

Le génome du chloroplaste n'est pas libre dans le stroma. Il est contenu dans des complexes appelés nucléoïdes. Au début de la transition des protoplastes aux chloroplastes, les nucléoïdes du jeune stade chloroplastique ont un aspect très diffus et sont constitués de petites fibres qui ne sont que faiblement reliées entre elles. Les nucléoïdes sont un composé de poids moléculaire élevé formé à partir de l'ADN circulaire des chloroplastes. Ce composé peut être purifié à partir des chloroplastes. **(Baudry, 2019)**

2.4.2.3. Noyau

L'information génétique détermine les caractères de la plante, les parents la transmettent à leurs descendants. Le génome du noyau, appelé génome nucléaire, constitue 95% de l'ensemble des informations génétiques indispensables à la formation et au fonctionnement de la cellule végétale. En effet, il a été prouvé qu'au sein des cellules végétales, trois génomes coexistent : le génome nucléaire, le génome mitochondrial (environ 1 %) et le génome chloroplastique (environ 4 %). **(Fleury *et al.*, 2012)**

Chapitre III :

Techniques d'analyses de

l'ADN

3. Techniques d'analyses de l'ADN

3.1. L'électrophorèse

L'électrophorèse est une technique séparative, qui permet la migration et la séparation de particules chargées (ADN, ARN et protéine) sous l'influence d'un champ électrique. Le principe c'est qu'un mélange de molécules soit soumis à un champ électrique, ce qui provoque la migration des molécules chargées, selon divers paramètres tels que la charge, la masse, la forme, la nature du support et les conditions physico-chimiques. La variation de la vitesse de migration va faciliter la séparation des molécules (**Fritsch et Krause, 2003 ; Feltes *et al.*, 2023**)

3.1.1. Principe

L'électrophorèse est basée sur la nature chimique et le poids de la particule à étudier, pour la charge, les molécules chargées positivement migrent vers la cathode et les molécules chargées négativement migrent vers l'anode, alors que celles dont la charge est neutre ne migrent pas. Pour le poids moléculaire, les molécules avec un poids moléculaire élevé se déplacent lentement sur le gel contrairement à ceux avec un poids léger qui migrent plus rapidement. (**Benaissa, 2008**)

3.1.2. Types d'électrophorèse

3.1.2.1. Électrophorèse sur gel d'agarose

Electrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée pour séparer l'ADN, l'ARN ou les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Cette technique est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique qui vont migrer vers l'anode. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose : les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures. (**Labidi, 2020**)

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode simple et très efficace pour séparer, identifier et purifier des fragments d'ADN de 0,5 à 25 kb. Le protocole peut être divisé en étapes suivantes :

- Un gel est préparé avec une concentration d'agarose adaptée à la taille des fragments d'ADN à séparer.
- Les échantillons d'ADN sont chargés dans les puits d'échantillonnage et le gel est soumis à une tension et à une durée permettant d'obtenir une séparation optimale.
- Le gel est coloré ou, si du bromure d'éthidium a été incorporé dans le gel et le tampon d'électrophorèse, visualisé directement sous l'effet de la lumière UV. (**Voytas, 2000**)

3.1.2.2. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) est une méthode polyvalente et à haute résolution pour le fractionnement et la caractérisation physico-chimique des molécules en fonction de leur taille, de leur conformation et de leur charge. (Chrambach *et al.*, 1971)

Cette technique est simple, rapide à mettre en œuvre et capable de séparer des fragments d'ADN qui ne peuvent être séparés de manière adéquate par d'autres procédures, telles que la centrifugation en gradient de densité. L'emplacement des bandes d'ADN dans le gel peut être déterminé directement par coloration avec de faibles concentrations de colorants intercalants fluorescents, tels que le bromure d'éthidium par examen direct du gel à la lumière ultraviolette (UV). (Green et Sambrook, 2019)

Les gels de polyacrylamide sont plus efficaces pour séparer les petits fragments d'ADN (5-500 pb). Les fragments d'ADN dont la taille ne diffère que de 1 pb ou de 0,1 % de leur masse peuvent être séparés les uns des autres. (Green et Sambrook, 2019)

3.2. Spectrophotométrie

La spectroscopie est l'étude de l'interaction de la lumière avec la matière. Grâce à la réflexion, à la diffusion élastique, l'absorption et la diffusion inélastique, il est possible de déterminer quelles longueurs d'onde de la lumière interagissent avec les atomes et les molécules, et quelle quantité de lumière est absorbée, réfléchi, diffusée ou émise à une longueur d'onde donnée. Cette unité décrit le contexte et les principes de base de la spectrophotométrie pour étudier les propriétés de réflexion ou de transmission d'un matériau en fonction de la longueur d'onde. (Morris, 2015)

3.2.1. Principe

A la fin d'une extraction d'ADN, il est essentiel de quantifier et d'analyser la pureté des acides nucléiques extraits. La technique la plus répandue est la spectrophotométrie qui mesure l'absorbance des acides nucléiques à 260 nm. D'autres composés présents lors de l'extraction absorbent à des longueurs d'ondes proches de celles des acides nucléiques ; les protéines à 280 nm et les solvants à 230 nm. En plus de la concentration en acides nucléiques, l'appareil donne ainsi 2 rapports : les rapports 260 nm/280 nm et 260 nm/230 nm donnant une idée de la qualité des acides nucléiques. Le rapport 260 nm/280 nm est utilisé pour évaluer la contamination en protéines de la solution d'acides nucléiques. On considère une solution pure lorsque le ratio 260/280 est compris entre 1,8 et 2. Le rapport 260 nm/230 nm est le deuxième indicateur de

pureté en indiquant la contamination en solvants comme le phénol, d'EDTA etc. (Pillon, 2020)

3.3. Les colorants des acides nucléiques

3.3.1. Vert de méthyle

Le colorant vert de méthyle est un fluorophore très efficace qui produit une couleur verte lorsqu'il est lié à l'ADN. Il peut être utilisé pour détecter l'ADN par microscopie, ou électrophorèse sur gel. Il est plus sûr que le bromure d'éthidium car c'est un colorant qui n'interfère pas et qui ne peut pénétrer dans les cellules que si l'intégrité de la membrane est compromise, ce qui est la base de son application en tant que biopigment. (Prieto *et al.*, 2017)

3.3.2. Bleu de méthylène

Le bleu de méthylène (MB) est un colorant largement utilisé comme indicateur optique d'oxydoréduction en chimie analytique, dont le changement de couleur est également affecté par le pH. (Dante, 2019). Il est utilisé comme colorant d'acide nucléique pour sa capacité à se lier à l'ADN et à l'ARN, en raison du fait que le MB agit comme un colorant cationique qui forme des liaisons électrostatiques avec des fragments chargés négativement (Fig.10). Il est moins spécifique que le bromure d'éthidium car il ne s'intercale pas dans les polynucléotides ; ce qui le rend aussi moins toxique que ce dernier. (García-González, 2014 ; Nedu *et al.*, 2020)

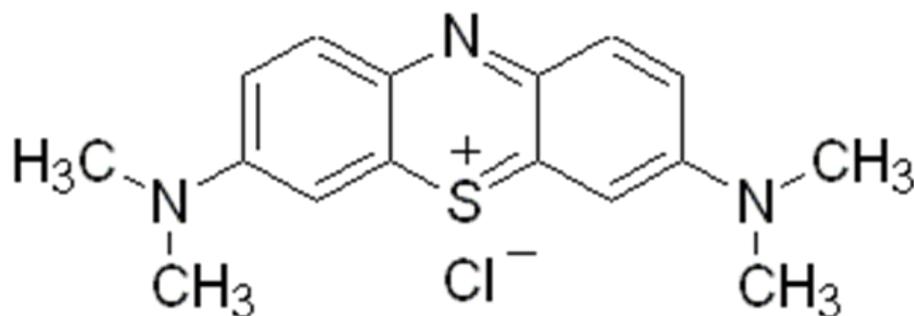


Figure 10: Structure chimique du Bleu de Méthylène (Djelloul *et al.*, 2013)

3.3.3. Bromure d'éthidium

Le bromure d'éthidium (BrEt) est un agent intercalant, sa structure lui permet de s'insérer entre les paires de bases des acides nucléiques comme schématisé ci-dessous (Fig.

11). Donc les molécules d'ADN sont détectées grâce au bromure d'éthidium et visualisées sous radiation UV avec un dispositif pour prise de photos UV. **(Benchohra *et al.*, 2020)**

Utilisé comme colorant fluorescent pour visualiser les acides nucléiques dans les gels d'agarose et de polyacrylamide. BrEt absorbe la lumière UV $\lambda \approx 300$ nmol d'ADN. Les autres colorants actuellement disponibles sont le SYBR Green, qui est également très sensible, et le SYBR Safe, dont la sensibilité est similaire à celle du BrEt. Il existe deux façons différentes de procéder à la coloration de l'ADN : Préparer le gel avec le BrEt incorporé et colorer le gel après l'électrophorèse avec une solution de BrEt. **(Fierro, 2014)**

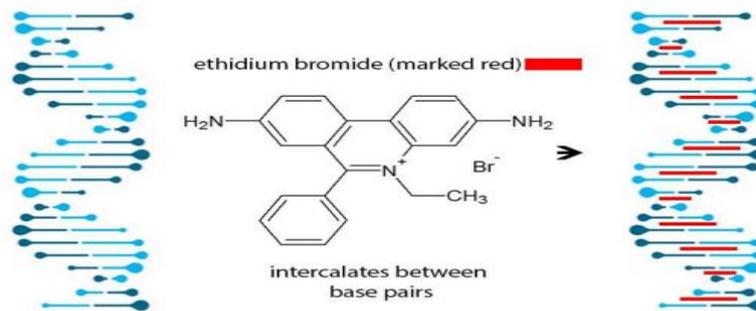


Figure 11: Intercalation du bromure d'éthidium dans une molécule d'ADN **(Labidi *et al.*, 2022)**

3.4. Microscopie

Deux types d'imagerie sont couramment utilisés dans les laboratoires de biologie cellulaire et moléculaire pour observer les cellules : La microscopie optique et la microscopie électronique. La microscopie optique et la microscopie électronique sont deux méthodes qui utilisent des sources lumineuses de différentes longueurs d'onde, photons ou électrons. **(Marine *et al.*, 2023)**

3.4.1. Microscopie optique

En microscopie optique, les longueurs d'onde monochromatiques correspondent aux longueurs d'onde qui composent la lumière blanche (400 nanomètres à 800 nanomètres). Lorsque ces ondes traversent une ouverture, elles se dispersent et créent une tache lumineuse appelée « air spot », spécifique à chacune des longueurs d'onde utilisées. Ce qui crée une image observable. **(Marine *et al.*, 2023)**

Si une molécule est convenablement colorée avec des colorants fluorescents, sa forme

peut être observée directement au microscope optique. Les brins d'ADN sont un exemple unique de molécules ultralongues qui peuvent être observées. **(Brochard, 1995)**

3.4.2. Microscopie électronique

La microscopie électronique, repose sur l'utilisation d'une source d'électrons dont la longueur d'onde peut atteindre quelques picomètres (pm). Néanmoins, requiert que l'échantillon soit fixé chimiquement, enrobé dans un polymère résistant aux électrons, puis coupé en fines sections, et, enfin, coloré avec des colorants aspécifiques, tels que le sel d'uranium et l'osmium. Dans ces conditions de préparation, qui peuvent affecter l'organisation nanométrique des biomolécules, la résolution effective de la microscopie électronique cellulaire est d'environ 5 à 10 nm. **(Marine et al., 2023)**

L'examen au microscope électronique a révélé que l'ADN se présentait sous la forme d'un fil allongé. **(Brack et Griffith, 1981)**. Les micrographies d'ADN sont prises au microscope électronique avec un grossissement de 3 000 à 10 000, en utilisant la méthode de Kleinschmidt de monocouche de protéines pour étendre la molécule d'ADN (structure tridimensionnelle) en une structure bidimensionnelle. Les micrographies électroniques de l'ADN fournissent diverses informations sur l'ADN, telles que la forme, la longueur, la taille, la configuration des nucléotides et d'autres structures internes. La longueur du brin d'ADN est particulièrement importante pour déterminer le poids moléculaire de l'ADN et elle est également utile pour garantir le contexte physique des cartes génétiques. **(Ito et Sato, 1976)**

Partie pratique

Chapitre IV:

Matériel et Méthodes

La partie expérimentale a été réalisée au niveau des laboratoires pédagogiques du département des sciences biologiques de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

1. Matériel biologique

Les échantillons utilisés dans notre travail, sont des oignons verts (*Allium fistulosum* L.) (Fig. 12), appartenant au sous-genre *Cepa*, au genre *Allium* et à la famille des *Liliaceae* et sont communément connus sous le nom d'oignons de printemps, d'oignons gallois et d'oignons japonais. (Fatimah, 2021)



Figure 12: *Allium fistulosum* (oignon vert)

2. Isolement de l'ADN

Nous avons utilisé une méthode simple permettant d'extraire et de visualiser facilement les filaments ADN. Dans ce travail nous avons extrait l'ADN en utilisant un détergent ménager, une très faible concentration en NaCl et de l'éthanol à 96%.

2.1. Solutions et tampons

- Solution de NaCl 5M.
- Composition de la solution de vert de Méthyle selon un volume de 10ml a été préparé. Dissoudre 0,001g de vert de Méthyle dans un mélange de 5,5ml eau distillée et 4,5ml d'acide acétique.

2.2. Protocole d'extraction De l'ADN

Le protocole que nous avons utilisé comporte différentes étapes et qu'on peut résumer comme ce qui suit :

- La lyse cellulaire qui comporte la cassure des parois cellulaires par broyage et la digestion des membranes plasmiques.
- Précipitation et récupération de l'ADN.

2.2.1. Lyse cellulaire

- 50g d'oignons ont été pelés puis hachés en petits dés.
- Ensuite dans un mortier, l'oignon a été broyé à l'aide d'un pilon en présence de 0,79 g de NaCl pendant quelques minutes, afin de casser les parois cellulaires.
- Puis nous avons rajouté une goutte de détergent (liquide vaisselle), pour dissoudre les membranes cytoplasmiques ainsi que 10 ml d'eau distillée. Nous avons continué le broyage pendant encore 2 minutes. Cette étape a pour but de lyser les cellules.
- Le broyat a été filtré en utilisant un filtre à café et du coton hydrophile, puis pressé pour obtenir un maximum de lysat. (**Fig.13**)



Figure 13: Les étapes d'extraction d'ADN

2.2.2. Précipitation et récupération des méduses d'ADN

- Un double volume d'éthanol à 96% froid a été ajouté, délicatement contre la paroi du tube, à un volume de lysat. Cette étape a pour but de faire précipiter l'ADN.
- Ensuite nous avons soigneusement recueilli et transféré l'ADN dans un nouveau tube contenant de l'éthanol à 96%.

3. Révélation de l'ADN

La révélation de la présence d'ADN a été réalisée avec ou sans coloration, à l'œil nu ou au microscope optique.

3.1. Sans coloration

La méduse d'ADN a été observée telle quelle s'est présentée. Nous avons utilisé deux types de visualisation, comme décrit ci-dessous :

3.1.1. Visualisation à l'œil nu

La méduse a été récupérée et déposée dans un verre de montre.

3.1.2. Visualisation au microscope photonique

Nous avons observé, au microscopique optique, l'ADN obtenu par extraction.

- Une méduse d'ADN a été déposée sur une lame puis recouverte par une lamelle, en évitant les bulles d'air.
- Nous avons observé rapidement au grossissement $\times 1000$ en présence d'huile d'immersion.

3.2. Avec coloration

Deux colorants ont été utilisés, il s'agit du vert de méthyle et du bleu de méthylène. Dans ce cas aussi, nous avons procédé par observation à l'œil nu et au microscope optique.

3.2.1. Visualisation à l'œil nu

L'ADN a été récupéré, déposé sur verre de montre puis coloré séparément avec le vert de méthyle et le bleu de méthylène.

3.2.2. Visualisation au microscope photonique

- L'ADN a été enroulé au bout d'une pipette Pasteur et déposé dans un verre de montre contenant le vert de méthyle acétique. La méduse doit être bien étalée pour permettre une coloration homogène. La coloration est très rapide quelques secondes suffisent.
- Avec une pince fine, la méduse d'ADN a été déplacée dans un deuxième verre de montre contenant de l'eau pour le rinçage. Cette dernière opération peut être réalisée une ou plusieurs fois si nécessaire.
- Puis la méduse d'ADN a été déposée sur la lame puis recouverte d'une lamelle.
- Nous avons observé rapidement au grossissement $\times 400$ et au grossissement $\times 1000$ en présence d'huile d'immersion.

4. Quantification et qualité de l'ADN extrait

La quantité et la qualité en ADN sont des facteurs importants pour une observation ou une opération ultérieure. Parmi les méthodes permettant de mesurer la quantité d'ADN isolé, la spectrophotométrie était la méthode utilisée dans cette étude.

La quantité d'ADN extrait a été évaluée en utilisant le spectrophotomètre à la longueur d'onde 260 nm, en tenant compte du fait que: 1 unité de DO à 260 nm équivaut à 50 µg/ ml d'ADN.

La DO d'une dilution au 1 /50 de la solution mère est donc mesurée à 260 nm (**Brodeur et Toussaint, 2015**). La concentration de l'ADN est calculée en utilisant la formule suivante :

$$\text{Concentration de l'ADN } (\mu\text{g/ml}) = 50 (\mu\text{g/ml}) \times (\text{facteur de dilution}) \times \text{DO}_{260 \text{ nm}}$$

Dans notre cas nous avons quantifié l'ADN dans une solution diluée 4 fois.

Pour évaluer la pureté de notre ADN, nous avons mesuré l'absorbance aux longueurs d'ondes 260 nm et 280 nm. Puis le rapport $\text{DO}_{(260 \text{ nm})}/\text{DO}_{(280 \text{ nm})}$ a été calculé.

5. Conservation de l'ADN

La Méduse d'ADN a été récupérée et conservée dans un tube contenant de l'alcool à 96% et sous une forme sèche.

Pour la forme séchée, l'ADN a été retiré de l'éthanol, séché et maintenu tel quel dans un tube eppendorf.

Chapitre V:

Résultats et Discussion

6. Précipitation et récupération

L'extraction de l'ADN qui a été réalisée à partir d'oignon par une méthode simple utilisant seulement un détergent ménager, du NaCl et l'éthanol à 96%, nous a permis d'obtenir les résultats suivants.

Le rajout de l'éthanol délicatement, contre la paroi du tube, entraîne la formation de deux phases. (**Fig. 14**)

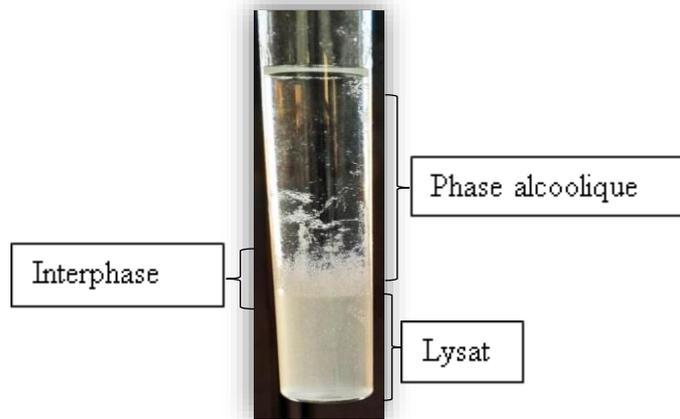


Figure 14: Précipitation de l'ADN

La densité de l'éthanol à 96% est de $0,81 \text{ g/cm}^3$ c'est à dire plus faible que celle du lysat. Pour cela dans le tube, on observe la présence de deux phases, une phase inférieure correspondant au lysat et une phase supérieure correspondant à la phase alcoolique.

L'ADN qui précipite sous l'action de l'éthanol se présente sous la forme de filaments enchevêtrés, regroupés en ce qu'on appelle méduse d'ADN. La méduse d'ADN va se former en interphase et monter jusqu'à la surface de la phase alcoolique. (**Fig. 15**)



Figure 15: Etape de formation de la méduse d'ADN

Lors du processus de lyse, les interactions entre les molécules qui composent la paroi, la membrane cellulaire et la membrane nucléaire sont modifiées ou détruites, permettant la libération des acides nucléiques. Les solutions basiques, les détergents ou les agents chaotropiques permettent de dissoudre la membrane cellulaire (**Sambrook *et al.*, 1989**). Dans notre cas nous nous sommes basés sur la présence d'un détergent ménager et une très faible concentration en NaCl.

Une fois qu'une partie des lipides et des protéines soit éliminée, l'ADN est récupéré. Pour ce faire, de l'éthanol est ajouté au lysat ce qui réduit les forces répulsives entre les chaînes et permet à l'ADN de se replier sur lui-même, le rendant insoluble. (**Loura *et al.*, 2014**)

La précipitation des protéines est réalisée à haute force ionique par ajout de NaCl (**Harry *et al.*, 1998**). Or dans notre cas la concentration en NaCl est très faible puisqu'elle est de 13,5 mM au lieu des 5 M prévus dans ce type de manipulations, donc incapable de faire précipiter toutes les protéines. La faible concentration en NaCl n'a pas permis non plus d'éliminer les polysaccharides qui sont à une concentration élevée dans l'oignon. Ces molécules sont connues pour précipiter avec l'ADN ce qui diminue la pureté de ce dernier. Pour une élimination totale des polysaccharides, la concentration en NaCl doit être d'au moins 0,5 M (**Fang *et al.*, 1992 ; Ripoll *et al.*, 2011**).

Il existe différents matériels pour broyer les tissus végétaux, mais pour obtenir une bonne granulométrie sans altération des tissus, le broyage dans un mini-mortier et au pilon dans l'azote liquide est la méthode la plus fiable. Il faut obtenir une poudre fine sans que l'échantillon subisse une décongélation. La qualité du broyage est essentielle car trop broyés, les tissus sont

dégradés, et pas assez broyés, ils ne permettent pas un accès optimum au tampon d'extraction (Benedit *et al.*, 2018)

7. Résultats de la révélation de la présence de l'ADN

La révélation de la présence d'ADN a été réalisée avec ou sans coloration, à l'œil nu ou au microscope optique.

7.1. Observation de la méduse d'ADN sans coloration

La méduse a été récupérée à partir de l'éthanol et déposée dans un verre de montre. L'observation à l'œil nu a permis d'obtenir le résultat présenté en (Fig.16)



Figure 16: Méduse de l'ADN

Ensuite, une observation au microscope optique a été réalisée. La méduse doit être examinée rapidement pour éviter le dessèchement afin que l'observation soit nette. (Fig. 17)

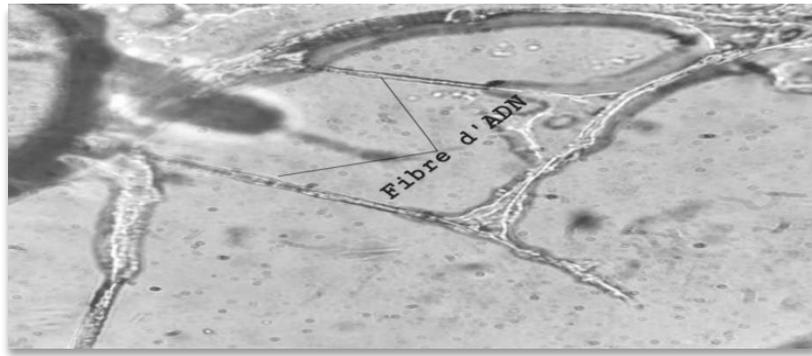


Figure 17: Observation microscopique d'une méduse de l'ADN (grossissement $\times 1000$) sans coloration

En réalité ce que nous observons c'est des fibres constituées très probablement d'ADN, de protéines et de polysaccharides. Une coloration avec des colorants spécifiques nous permettra de confirmer la présence d'ADN.

7.2. Observation de la méduse d'ADN avec coloration

7.2.1. Observation à l'œil nu de la méduse d'ADN

Nous avons coloré la méduse d'ADN en utilisant deux colorants : le vert de méthyle et le bleu de méthylène. (**Fig. 18**)

La coloration avec le bleu de méthylène et le vert de méthyle nous a permis d'observer les résultats suivants :

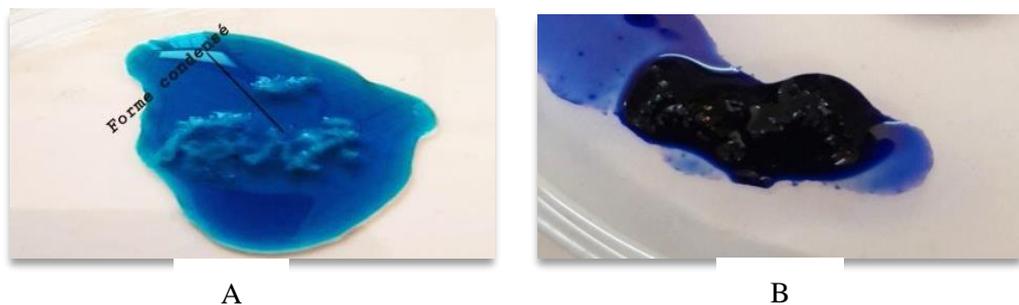


Figure 18: Méduse de l'ADN colorée avec le vert de méthyle (A) et le bleu de méthylène (B)

- La coloration de la méduse avec le vert de méthyle indique la présence d'ADN.

Dans une réaction entre l'ADN et le vert de méthyle, en l'absence de toute autre substance susceptible de réagir ou d'interférer, on pourrait s'attendre à une proportion stœchiométrique, car les groupes basiques du colorant seraient vraisemblablement liés aux groupes phosphoriques de l'ADN. (Johan *et al.*, 1965)

- La coloration de l'ADN est due au fait qu'il a une charge négative et que le vert de méthyle a une charge positive. De plus ce colorant entraîne une condensation des molécules d'ADN. Le vert de méthyle a la particularité, parmi les colorants cationiques (basiques), de posséder deux charges positives sur le cation. (Johan *et al.*, 1965)

L'observation de la méduse après coloration au vert de méthyle et lavage à l'eau nous a permis d'observer une méduse plus condensée et ayant retenu le colorant (**Fig. 19**).



Figure 19: Méduse d'ADN après lavage

- Le bleu de méthylène chargé positivement interagit électrostatiquement avec les phosphates du squelette chargés négativement de l'ADN (Farjami *et al.*, 2010). Ce phénomène a permis la coloration de la méduse d'ADN par le bleu de méthylène également.

7.2.2. Observation au microscope optique de la méduse d'ADN

Une observation au microscope optique, de la méduse d'ADN, a été réalisée après coloration au vert de méthyle. L'échantillon doit être examiné rapidement pour éviter le dessèchement afin de garantir une observation nette.



Figure 20: Observation microscopique de l'ADN
(grossissement $\times 400$)

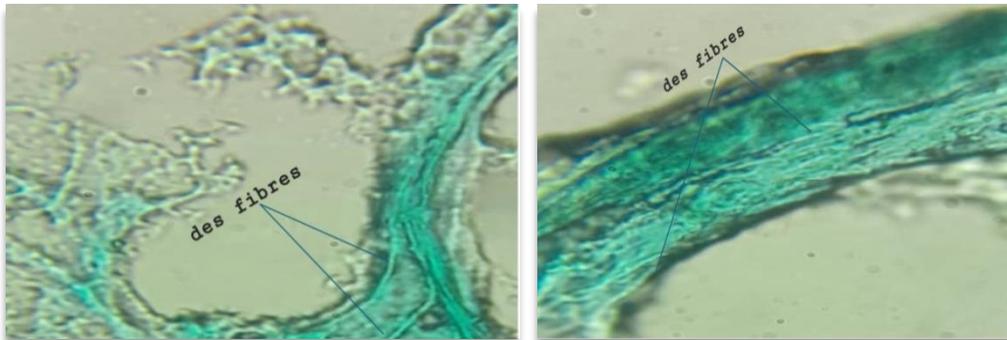


Figure 21: Observation microscopique de l'ADN (grossissement $\times 1000$)



Figure 22: Observation microscopique de l'ADN
(grossissement $\times 1600$)

Les résultats obtenus après l'observation au microscope photonique (**Fig. 17, 20, 21, et 22**) nous permettent de dire que des fibres d'ADN apparaissent clairement. Mais ces fibres correspondent très probablement à de l'ADN et des protéines. Une longue molécule d'ADN d'un diamètre de 2 nm est enroulée autour de l'octamère d'histone central, qui se compose des protéines d'histone H2A, H2B, H3 et H4, et forme un "nucléosome", qui est l'ensemble le plus élémentaire de l'ADN. (**Kazuhiro *et al.*, 2008**). Cette structure ne peut être observée au microscope optique quelques soit la résolution de l'appareil.

En effet, les molécules d'ADN ne peuvent être observées qu'au microscope électronique (ME), appareil qui permet une observation à haute résolution des caractéristiques de l'ADN, par exemple Taille, structure et distribution des bases. (**Jin *et al.*, 2023**)

En microscopie photonique, il est possible de déterminer la résolution atteignable en divisant la longueur d'onde par l'ouverture numérique (ON), ce qui donne une résolution maximale de 160 à 200 nm selon les paramètres optiques utilisés. Il est donc difficile de visualiser une grande majorité des structures cellulaires dont la taille se situe en dessous de la limite de résolution de la microscopie photonique, telles que les organites (moins de 500 nm) ou les protéines (environ 10 nm). La microscopie électronique est quant à elle 20 à 40 fois plus résolutive. (**Marine *et al.*, 2023**)

8. Quantification et qualité de l'ADN extrait

La quantité et la qualité de notre solution d'ADN ont été évalués au spectrophotomètre, en utilisant les longueurs d'ondes 260 nm et 280 nm. La solution d'ADN a été diluée 4X. Les résultats obtenus sont les suivants :

Tableau 1: Résultats Spectrophotométriques

Longueur d'onde	260nm	280nm
Absorbance	0,191	0,204

8.1. Mesure de la concentration d'ADN

Le dosage de la quantité d'ADN dans nos échantillons a été effectué en mesurant l'absorbance à 260 nm. La concentration d'ADN a été calculée grâce à la formule suivante :

$$\text{Concentration de l'ADN } (\mu\text{g/ml}) = 50 (\mu\text{g/ml}) \times 4 \times 0,191 = 38,2 \mu\text{g/ml}$$

Nous constatons que la quantité d'ADN est assez réduite. Alors que dans notre cas, l'échantillon constitué de 50 g d'oignon a été broyé pendant 2 à 3 minutes mais cela ne nous a pas permis de récupérer beaucoup d'ADN, car il est très probable que les cellules de la totalité de l'échantillon d'oignon n'ont pas été lysées. Un broyage en présence de sable ou de billes de verre pourrait améliorer la lyse mécanique de nos cellules. Le lysat cellulaire pourrait être plus riche en ADN si l'échantillon est congelé avant la lyse mécanique. Dans notre cas nous avons en réalité combinés une lyse mécanique (broyage) et une lyse chimique (détergent ménager et le NaCl).

8.2. Mesure du degré de pureté de l'ADN

La pureté de notre échantillon d'ADN a été évaluée en mesurant les absorbances aux longueurs d'ondes 260 nm et 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible.

$$\text{Le rapport } R = A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$$

$$\text{Le rapport: } R = 0,191/0,204 = 0,93$$

Le rapport des densités optiques de notre échantillon est de 0,93, ce qui est considérablement faible, car pour une solution d'ADN pure, le rapport devrait être de 1,8. Par conséquent, l'ADN n'est pas pur. Un ratio inférieur à 1,8 indique une contamination de l'échantillon par une grande concentration de protéines (**Babadi et al., 2022**). Il s'agit très probablement de protéines histones et non histones.

Généralement, l'intensité de l'absorbance sous UV de solutions d'ADN aux longueurs d'onde de 260 nm et 280 nm indique la pureté de l'ADN. L'ADN absorbe la lumière UV à 260 nm et 280 nm, tandis que les protéines aromatiques absorbent les UV à 280 nm.

L'évaluation du rapport $DO_{260\text{nm}}/DO_{280\text{nm}}$ indique que l'utilisation de détergent ménager et du NaCl, mais à une très faible concentration, n'a pas permis d'obtenir un ADN pur. En effet de nombreux protocoles recommandent des extractions au NaCl 5 ou 6 M ou au phénol saturé, pour éliminer toutes les protéines et autres contaminants. C'est seulement dans ces conditions que les protéines pourront être séparées des molécules d'ADN.

Pour des études de génomique les méduses d'ADN ne peuvent être utilisées, pour cela il faut décontaminer l'hélice d'ADN de toutes les macromolécules qui l'accompagnent que ce soit protéines ou les éventuels polysaccharides puisque dans notre cas, la plante qui est de l'oignon en est très riches.

9. Résultat conservation de l'ADN

La Méduse d'ADN a été conservée dans un tube contenant de l'alcool à 96% et sous une forme sèche. Dans le premier cas la méduse a été récupérée puis remise dans l'éthanol à 96%. Pour l'ADN séché, la méduse a été récupérée puis séchée et conservée dans un tube eppendorf fermé. Voir (**Fig. 23**)

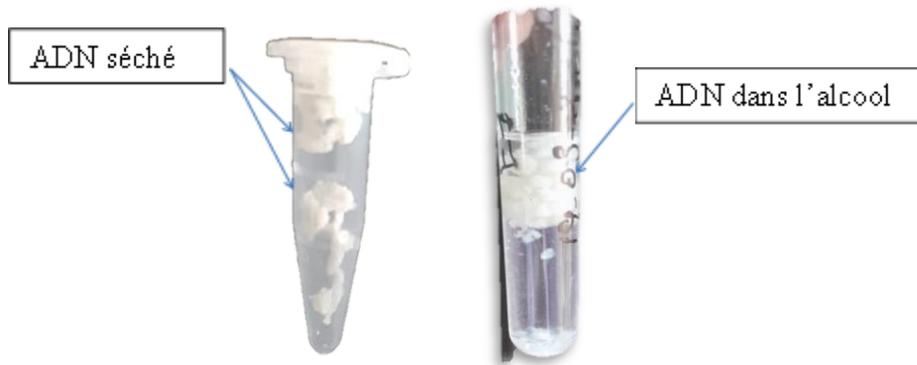


Figure 23: conservation de l'ADN

Conclusion

Conclusion

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont essentielles, pour un grand nombre d'études génomiques. Cependant beaucoup de protocoles utilisent des produits qui sont plus ou moins dangereux pour le manipulateur. Pour cela nous avons opté pour une méthode très simple et en même temps sans danger pour le manipulateur.

Dans notre protocole, nous avons tout d'abord effectué la lyse des cellules de l'oignon (*Allium fistulosum*), puis l'ADN a été récupéré et précipité à l'éthanol 96%. La quantité d'ADN obtenue est très faible, s'élevant à 38,2 µg/ml. Ceci est vraisemblablement dû à la lyse des cellules et notamment l'étape de broyage. En effet nous pensons que cette étape est cruciale pour garantir un bon rendement en ADN. Notre solution d'ADN était fortement contaminée par les protéines, comme en témoigne le rapport DO_{260}/DO_{280} qui est égal à 0,93.

L'observation au microscope optique, des méduses d'ADN coloré au vert de méthyle et non coloré a permis de mettre en évidence des fibres nettes aux grossissements $\times 1000$ et $\times 1600$. Cependant, ces fibres correspondent très probablement à l'ADN combiné à des protéines. En effet puisque l'ADN est coloré par le vert de méthyle et que les molécules d'ADN seul ne peuvent pas être observées par le microscope optique, nous pouvons conclure que les structures révélées ne sont pas constituées d'ADN seulement mais aussi de protéines puisque le rapport de pureté a révélé la présence d'une proportion assez élevée.

L'ADN ainsi extrait ne peut être utilisé pour des études ultérieures en Biologie moléculaire (PCR, Séquençage...)

Pour garantir un bon rendement en ADN, il est préférable que l'extraction se fasse dans les conditions suivantes :

- ✓ Exploitation totale de toutes les cellules de l'échantillon, en utilisant des moyens de lyse des cellules performants notamment le broyage en combinaison avec d'autres moyens comme la congélation.
- ✓ Utiliser d'autres méthodes, pour extraire de l'ADN, comme le Salting-out ou les kits généralement sans danger. L'ADN doit être débarrassé de toutes les protéines pour être utilisé en génomique
- ✓ Notre travail pourrait être poursuivi par : l'élaboration de moyens pour la purification de l'ADN à partir des méduses.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Ambekar S. S., Shanta S.H and Prajakta B. B., 2017-** DNA: Damage and Repair Mechanisms in Humans, *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 3, 1-8.
2. **Andrews, B.A.; Asenjo, J.A., 1987-** Enzymatic lysis and disruption of microbial cells. *Trends Biotechnol.* 5, 273–277.
3. **Babadi Z. K., Narmani A., Ebrahimipour G. H., & Wink, J, 2022-** Combination and improvement of conventional DNA extraction methods in Actinobacteria to obtain high-quantity and high-quality DNA, *Iranian journal of microbiology*, 14(2), 186–193.
4. **BALUsKA, F, 2004-** Eukaryotic Cells and their Cell Bodies: Cell Theory Revised. *Annals of Botany*, 94(1), 9–32
5. **Baudry K., 2019-** L'éditosome du chloroplaste questions, éléments de réponses et digressions, Thèse de doctorant, université de l'Université Paris-Saclay, 324p
6. **Bello H and Gbolagade K, 2017-** *A Survey of Human Deoxyribonucleic Acid.* *British Journal of Applied Science & Technology*, 21 (5). 1-10.
7. **Benaissa keltoum, 2008-** caractérisation moléculaire de quelques espèces légumières, Mémoire de Magister, université de Saad Dahlabde Blida, 129p
8. **Benchohra A., Adda A., Sahnoune S., Chouhim K., 2020-** Amélioration de la méthode d'extraction d'ADN au CTAB appliquée au feuilles d'Armoise blanche « région de Tiaret », Université Ibn Khaldoun – Tiaret. 4-3
9. **Benedit S., Barret P, 2018-** Technique d'extraction d'ADN génomique de végétaux permettant l'amplification de longs fragments à partir d'une petite quantité de matériel, *Cahier des Techniques de l'INRA*, 95.
10. **Bhagavan N. V., Chung-Eun Ha., 2011-** Structure and Properties of DNA *In: Essentials of Medical Biochemistry*, ed. Academic Press, 275-286
11. **Bowater R. P, 2005** -Nucleotides: Structure and Properties, *Encyclopedia of life sciences*, 1-9
12. **Brack, C., & Griffith, J.D, 1981-** DNA electron microscopy. *CRC critical reviews in biochemistry*, 10 2, 113-69
13. **Brenno A. D. Neto, & Alexandre A. M. Lapis, 2009-** Recent Developments in the Chemistry of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Intercalators: Principles, Design, Synthesis, Applications and Trends, *Molecules*, 14, 1725-1746.
14. **Brochard, F, 1995-** DNA: observing stems and flowers. *Physics World*, 8, 24-25.

15. **Brown T, 2010-** Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction 6th edition. Ed, John Wiley and Sons. USA2.
16. **Chen H., Rangasamy M., Tan S. Y., Wang H., & Siegfried B. D, 2010-** Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS one*, 5(8), 1-6 e11963.
17. **Chrambach A., & Rodbard D, 1971-** Polyacrylamide gel electrophoresis, *Science*, 172(3982), 440-451.
18. **Christophe VELOURS, 2009-** REPLICATION DE L'ADN MITOCHONDRIAL Identification d'une seconde activité ADN polymérase dans la mitochondrie de *S.cerevisiae* et Contribution à l'étude du réplisome mitochondrial, thèse de doctorat, L'université Bordeaux 2, 326p
19. **Cibot C. , 2015-** Etude du surenroulement diffusible de l'ADN chromosomique chez les bactéries *Escherichia coli*, thèse de doctorat, université paris-sud, 238P
20. **Dahm R., 2005-** Friedrich Miescher and the discovery of DNA, *Developmental Biology*, 278(2): 274-288
21. **Dairawan M., & Shetty P. J, 2020-** The evolution of DNA extraction methods. *Am. J. Biomed. Sci. Res*, 8(1), 39-45.
22. **Dante, R.C., Trakulmututa, J., Meejoo-Smith, S., Martín-Ramos, P., Chamorro-Posada, P., Rutto, D., & Sánchez-Arévalo, F.M, 2019-** Methylene blue-carbon nitride system as a reusable air-sensor. *Materials Chemistry and Physics*.
23. **Dhaliwal A., 2013-** DNA Extraction and Purification. *Materials and Methods* p. 3.
24. **Djelloul, Chawki & Hasseine, Abdelmalek, 2013-** Ultrasound-assisted removal of methylene blue from aqueous solution by milk thistle seed. *Desalination and Water Treatment*. 51. 5805-5812
25. **Englard S., & Seifter S, 1990-** [22] Precipitation techniques. In *Methods in enzymology* (Vol. 182, pp. 285-300). Academic Press.
26. **Fang G., Hammer S. & Grumet R., 1992-** A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques*, 13, 52-57.
27. **Farjami E., Clima L, Kurt V. Gothelfa and Elena E., 2010-** DNA interactions with a Methylene Blue redox indicator depend on the DNA length and are sequence specific, *The Royal Society of Chemistry*, 135, 1443–1448.
28. **Fatimah K., Arifullah M., Ahmed M.I., 2021-** Spring Onion (*Allium fistulosum* L.) Breeding Strategies, In: *Advances in Plant Breeding Strategies: Vegetable Crops*, ed. Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland, 135-182

29. **Feltes, G., Steffens, J., Paroul, N., & Steffens, C,** 2023- Organic electronic nose applied to food traceability, adulteration, and authenticity
30. **Fierro F. F,** 2014- Electroforesis de l'ADN. *In : Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, Delegación Tlalpan, México, 27-51
31. **Fleury, D., Baumann, U., & Langridge, P,** 2012- Plant genome sequencing. *Plant Biotechnology and Agriculture*, 83–97.
32. **Franché A,** 2019- amphiphiles azobenzéniques: potentiel et relations structure -activité pour lyse cellulaire, thèse de doctorat, université de liège – gembloux agro-bio tech, 227p
33. **García-González, R., Costa-García, A., & Fernández-Abedul, M.T,** 2014- Methylene blue covalently attached to single stranded DNA as electroactive label for potential bioassays. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, 191, 784 - 790.
34. **Gautam A,** 2022- DNA Isolation by Lysozyme and Proteinase K, *Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert*, 85–88
35. **Green, M. R., & Sambrook, J,** 2017- Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(4).
36. **Green, M. R., & Sambrook, J,** 2019- Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(1), pdb-top100388.
37. **Grigorov E., Kirov B., Marinov M. B., & Galabov V,** 2021- Review of microfluidic methods for cellular lysis. *Micromachines*, 12(5), 498.
38. **Gullaume H,** 2023- les communautés bactériennes d'environnements radioactifs naturels et anthropisés: discrimination des facteurs environnementaux les structurant et caractérisation des mécanismes d'interaction d'isolats indigènes avec l'uranium, thèse de doctorant, université de Bordeaux, 273P
39. **Hanke M., Hansen N., Chen R., Grundmeier G., Fahmy K., and Keller A.,** 2022- “Salting-Out of DNA Origami Nanostructures by Ammonium Sulfate,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 5, p. 2817
40. **Ito, T., & Sato, K,** 1976- Computer Processing of Electron Micrographs of DNA.
41. **Jin X., Kannappan S., Hapsari N. D., et al,** 2023- Toward Visualizing Genomic DNA Using Electron Microscopy via DNA Metallization. *Small Structures*, 4(8), 2200361.
42. **John R., baker and elizabeth g. m. william.,** 1965- the use of methyl green as a histochemical reagent, *journal of cell science*, 73, 3-13.
43. **Lab S. and Zafar F.,** 2020- “DNA extraction from whole blood using simple salting out procedure v1

44. **Labidi A, 2020-** Extraction et Analyse des Protéines et des Acides à partir de cellules d'Escherichia coli, université de PSL, paris, France, 18,12P
45. **Labidi A, Bejaoui T, 2022-** Extraction et Analyse des Protéines et des Acides Nucléiques à partir de Cellules d'Escherichia coli, Université PSL, Paris, France, 4-20
46. **Laura A. P Velázquez., Aragón Martínez M. C., Cornejo Romero A., 2014-** Extraction et Purification de l'ADN, In: Outils moléculaires appliqué en écologie : aspects théoriques et pratiques, ed. Institut National de l'Ecologie et du Changement Climatique (INECC- Semarnat), Mexique, 1-25
47. **Le Gouellec A., 2008-** Etude d'un complexe de trois protéines centrales de la division du pneumocoque : DivIB, DivIC et FtsL. Cible thérapeutique ? Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I. Français.
48. **Mainieri A, 2009-** Mitochondrial DNA, *Mitochondrial DNA*, 20, 139 - 144.
49. **Marine H. L., Éloïse B., Virginie H., Paul G., 2023-** L'organisation native de la cellule révélée grâce à la cryo-microscopie à expansion, *médecine/sciences*, 39, 351-8
50. **Mathilde L. J., 2022-**Fonctionnalisation de nanoparticules magnétiques par des peptides cationiques : vers un accès au cytosol, Thèse de doctorat, Ecole doctorale : chimie physique et chimie analytique de Paris Centre, 238P
51. **Metcalf D., J. Scott Weese., 2012-**Evaluation of commercial kits for extraction of DNA and RNA from Clostridium difficile, *Anaerobe*, 18, 608-613
52. **Morris R, 2015-** Spectrophotometry, *Curr. Protoc. Essential Laboratory techniques*, 11,2.1.1-2.1.30
53. **Nedu, M.-E., Tertis, M., Cristea, C., & Georgescu, A. V, 2020-** Comparative Study Regarding the Properties of Methylene Blue and Proflavine and Their Optimal Concentrations for In Vitro and In Vivo Applications. *Diagnostics*, 10(4), 223.
54. **Oth, G., & John, Y, 2020-** The Discovery and History of Animal and Human Physiology. *Journal La Lifesci*, 1(6), 19–27
55. **Pillon M, 2020-** Mise au point de la méthode d'extraction de l'ADN bactérien de biopsies cutanées canines fixées par le formol puis incluses en paraffine pour identification par pPCR, Thèse de Doctorat, Université de Claude-Bernard - Lyon I, 133p
56. **Preetha S., 2020-** The Evolution of DNA Extraction Methods. *American Journal of Biomedical science & research*. 8(1): 39-45

57. **Prieto D. et al, 2017-** Application of the DNA-Specific Stain Methyl Green in the Fluorescent Labeling of Embryos, 1 Institut Pasteur de Montevideo 2 Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 7-7
58. **R.J. Fritsch, I. Krause, 2003-** Electrophoresis. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition).
59. **Ripoll J., Marie-Claude B., Walker J, 2011-** Optimisation de l'extraction d'ADN génomique de la morelle jaune (*Solanum elaeagnifolium* Cav.), une plante invasive des milieux cultivés en région méditerranéenne. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 15(1), 95-100 B A S E.
60. **Rothstein F, 2019-** Differential precipitation of proteins: science and technology, *Protein purification process engineering*, 115-208.
61. **Safarikova M., Kubena A. A., Frankova V., Zima T., & Kalousova M, 2021-**The effects of different storage conditions and repeated freeze/thaw cycles on the concentration, purity and integrity of genomic DNA, *Folia Biologica*, 67(1), 10-15.
62. **Salazar, O.; Asenjo, J.A, 2007-** Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnol. Lett.* 29, 985–994.
63. **Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. 1989-** Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
64. **Shehadul I.M., Aryasomayajula A., & Selvaganapathy, P. R, 2017-** A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines*, 8(3), 83.
65. **Sparkman O. David, Penton Zelda E., Kitson Fulton G., 2011-** Chapter 27 - Nucleosides (TMS Derivatives) *In: Gas Chromatography and Mass Spectrometry* (Second edition) ,Gas Academic Press 369-371.
66. **Thanbichler M. Shapiro L, 2006-** Chromosome organization and segregation in bacteria. *J. Struct. Biol.*156: 292-303
67. **Touzard M., 2016-** Matériaux biomimétiques de la paroi cellulaire végétale et modifications enzymatiques, Thèse de do Doctorat ; université de Grenoble Alpes, 217P
68. **Ts'o, P. O., 2012-** Bases, nucleosides and nucleotides. *Basic principles in nucleic acid chemistry, 1*, 453-584.
69. **Velours C., 2009-** Réplication de l'ADN mitochondrial identification d'une seconde activité ADN polymérase dans la mitochondrie de *S.cerevisiae* et Contribution à l'étude du réplisome mitochondrial, Thèse de doctorat, l'université Bordeaux 2, 326p
70. **Voytas D, 2000-** Agarose gel electrophoresis, *Current protocols in molecular biology*, 51(1), 2-5.

71. **Wong J. , 2010**-Variation du nombre de copies de plasmides au sein populations monoclonales de bactéries, Thèse de doctorat, université de Pierre et Marie Curie, 131P
72. **Zeugin J. A., & Hartley J. L, 1985**- Ethanol precipitation of DNA, *Focus*, 7(4), 1-2.
73. **Zuber G., 2004**- Nanoparticules d'AND, *Biofutur*, 46, 245-253.