

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE VEGETALE

N°...../SNV/2015

MÉMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité:

GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE ET GÉNOMIQUE DES MICROORGANISMES

Thème réalisé au Laboratoire de Biochimie

THÈME

Extraction d'ADN à partir de sang de mouton

Présenté par

Begloul Fatima Zahra & Belarbi Fouzia

DEVANT LE JURY

Président : Pr. Djibaoui R.

U. Mostaganem

Encadrante : Pr Dalache.F.

U. Mostaganem

Examineur : Pr. CHIBANI A.

U. Mostaganem

Soutenue publiquement le .04/07/2017

Remerciements

Premièrement, nous remercions Allah, le bon Dieu, qui nous a donné l'ambitieux, le défi, la santé et le courage pour terminer ce mémoire.

Nous tenons aussi à présenter nos sincères remerciements à notre encadrante le Professeur *Dalache.Fatima* pour la confiance qu'elle nous a accordée en

Acceptant cet encadrement

Pour sa disponibilité tout au long de l'élaboration de ce mémoire, pour son aide, Ses critiques et ses suggestions, et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire.

Nous remercions Pr. *Djibaoui R.* d'avoir accepté la présidence du jury de la soutenance.

Nous remercions Pr *CHIBANI A.* qui a accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous voulons remercier aussi les techniciens du laboratoire de biochimie *Mme AMIR*, les techniciens du laboratoire de microbiologie *Djillali, Mohamed*, et particulièrement *Hafida* pour sa patience, son aide précieuse et ses conseils.

Finalement, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand Merci

B. Fatima.Z

B. Fouzia



Dédicace

Je dédie ce travail à toute ma famille, mon cher père qui m'a encouragé et soutenu pendant mes longues années d'études, à ma chère mère qui m'a donné de l'amour et soins et à mes sœurs Hanane, Mamia et Somia.

Et à tous mes amis, Warda, Zineb et Ibrahim.

Fatima Zahra



D é d i c a c e

Je dédie ce travail à mon mari qui m'a
aidé, encouragé et soutenu et qui me
pousse toujours à aller de l'avant ainsi
que ma belle-famille

Ce travail est spécialement dédié à mon
père et ma mère, qui étaient mon pilier
dans ma scolarité et ma vie, et sans
oublier tous mes frères Yassine,
Mohammed, charéf, Osama, Ahmed, Reda,
Siham, Fatiha, Naima, Yasmin et mes amis
hajer et warda.

Belarbi

fouzia

Liste des abréviations

A260/A280 : rapport de densité optique

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNg: ADN génomique

ADsNm: ADN mitochondrial

ADNn: ADN nuclear

ARN: acide ribonucléique

BET: Bromure d'éthidium

C: Concentration

CCC: covalently closed-circular

Cm³ : centimètre cube

CsCl: chlorure de césium

CTAB : Cetyl trimethyl ammonium bromide

DO: Densité Optique

E. coli : *Escherichia coli*

EDTA: Acide éthylène-diamine-tétraacétique

EtBr : bromure d'éthidium

F : Facteur de dilution

g: Gramme

Gb: Giga base

GR : globules rouges

H : heure.

K +: potassium

Kb: Kilobase

Kg: Kilogramme

L: Litre

LB: Luria Broth

LPS : Lipopolysaccharides

M : molaire

Mb : mégabase

Mg: milligramme

MGG: May Grünwald Giemsa

ml : millilitre

mM : millimolaire

Na⁺ sodium:

NaCl : Chlorure de sodium

NAG : N-acétyl-glucosamine

NAM: acide N-acétyl-muramique

ND: NanoDrop

nm: nanomètre

Oc: open-circular

pb: Paires de bases

P/C: phénol et chloroforme

PCR: Polymerase Chain Reaction = Réaction de polymérisation en chaîne

pH : Potentiel d'hydrogène

p/v: Poids/volume

Qsp : quantité suffisante pour

R : rapport

Tmp : tour par minute

SDS : dodécyl sulfate de sodium

TAE: Tris Acétate EDTA

TE : Tris - EDTA

Tm : Température de fusion

Tris: tris (hydroxyméthyl) aminométhane

UV : ultraviolet

v/v: Volume/volume

µg : microgramme

µl: micro litre

μM : micromolaire

% : Pourcentage.

$^{\circ}\text{C}$: Degré Celsius

Liste des Figures

Figure01 : Paroi d'une cellule végétale (X 45 000) Racine de plant.....	05
Figure02 : La représentation schématique montrant les différentes structures bactériennes	07
Figure03 : Détails structurels d'une deux cellule procaryote typique. Composition de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatives et positives	08
Figure04 : Préparation de l'ADN génomique.....	15
Figure05 : Séparation de l'ADN plasmidique sur la base de la taille.....	19
Figure06 : Séparation de l'ADN plasmidique par la méthode de dénaturation alcaline	20
Figure07 : La phase de lyse des globules rouges.....	26
Figure08 : Lysat clair.....	27
Figure09 : Extraction au phénol.....	28
Figure10 : Extraction au chloroforme.....	29
Figure11 : La méduse d'ADN.....	30

Liste des tableaux

Tableau 01 : les Tailles et poids moléculaires de divers ADN génomiques.....	02
---	----

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste d'abréviation

Résumé

Abstract

Chapitre II :Extraction d'ADN à partir de procaryotes et eucaryotes

Matériels et méthodes

Résultats et discussion

Discussion

Conclusion et perspective

Références bibliographiques

Résumé

Le but de ce travail était d'isoler l'ADN à partir du sang de mouton et d'analyser les solutions obtenues par spectrophotométrie sous UV. Ainsi, nous avons collecté le sang de mouton à l'abattoir de Mostaganem dans des tubes avec l'EDTA. Pour réaliser l'extraction de l'ADN, nous avons effectué les étapes suivantes: lyse des globules rouges, lyse des globules blancs, l'extraction au phénol, l'extraction au chloroforme et précipitation de l'ADN. Le calcul de la quantité d'ADN et l'évaluation de son degré de pureté, nous a permis d'obtenir respectivement les résultats suivants, 6,3 µg/ml et 0,78.

Mots clés : Extraction d'ADN - sang de mouton - EDTA - Lyse - phénol.

Abstract

The aim of this work was to isolate the DNA from the sheep blood and to analyze the DNA by spectrophotometry UV. We first collected the sheep blood at the Mostaganem slaughterhouse in EDTA tubes. To carry out the extraction of the DNA, we did the following steps: red cell lysis, white blood cell lysis, phenol extraction, chloroform extraction and DNA precipitation. The calculation of the amount of DNA and the evaluation of its degree of purity, allowed us to obtain respectively the following results, 6.3 $\mu\text{g} / \text{ml}$ and 0.78.

Key words: DNA extraction - Blood sheep - EDTA tube - Lysis - Phenol.

introducción

Introduction général

L'extraction d'ADN est la première étape dans la plupart des études de biologie moléculaire. L'isolement du matériel génétique (ADN) à partir des cellules eucaryotes et procaryotes requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité des débris cellulaires. La procédure de lyse idéale est souvent un compromis de techniques et doit être suffisamment rigoureuse pour briser le matériau de départ qui peut être complexe (par exemple, le tissu des cellules végétales), mais suffisamment douce pour préserver l'acide nucléique cible. Les procédures de lyse courantes sont les suivantes :

- Le rupture mécanique (ex. : broyage ou lyse hypotonique),
- Le traitement chimique (ex.: lyse détergente (SDS), agents chaotropiques,.....)
- La digestion enzymatique (ex.: protéinase K).

La rupture de la membrane et l'inactivation des nucléases intracellulaires peuvent être combinées. À titre d'exemple, une solution simple peut contenir des détergents pour solubiliser les membranes cellulaires et des sels chaotropiques puissants pour inactiver les enzymes intracellulaires. Après la lyse cellulaire et l'inactivation des nucléases, les débris cellulaires peuvent être aisément retirés par filtrage ou par précipitation.

Les échantillons de sang total sont l'une des principales sources utilisées pour obtenir de l'ADN, et il existe de nombreux protocoles différents disponibles pour effectuer l'extraction des acides nucléiques sur de tels échantillons. Le processus d'extraction de l'ADN à partir de sang est simple et nécessite l'utilisation des nombreux produits, mais cela a été simplifié grâce à l'utilisation des kits commerciaux qui ont aussi permis d'écourter le temps nécessaire à cette extraction.

Le but de notre travail est d'extraire l'ADN à partir de sang de mouton en utilisant une méthode simplifiée puis de le quantifier et enfin de vérifier son degré de pureté.

Chapitre I : ADN et organismes vivants

1. Introduction

Les multiples applications scientifiques et technologiques impliquant l'étude de l'ADN font appel à différentes techniques. Parmi elles, l'extraction d'ADN est une des plus communément utilisées.

Diverses techniques d'isolement d'ADN ont été élaborées. Outre les méthodes classiques, des méthodes d'extraction commercialisées sous forme de kits prêts à l'emploi ont surgit récemment.

L'ADN a d'abord été isolé par Friedrich Miescher qui a découvert une substance appelée "nucléine" en 1869 (1). Extraction d'acide désoxyribonucléique (ADN) C'est la première étape requise pour plusieurs des applications disponibles utilisées dans le domaine de la biologie moléculaire.

Il existe de nombreux protocoles pour simplement extraire l'ADN de différents organismes vivants, une expansion rapide de l'analyse de l'ADN dans les recherches médicales, biotechnologiques et de base a créé la nécessité de méthodes commerciales simples et efficaces pour isoler l'ADN génomique. Les méthodes traditionnelles d'isolement de l'ADN basées sur l'extraction du phénol, la digestion des protéinases ou l'adsorption de l'ADN (2). Les méthodes d'isolement d'ADN avec le meilleur potentiel de simplicité et d'efficacité sont les méthodes utilisant des agents chaotropiques (3,4).

Bien que plusieurs méthodes aient existé pour l'extraction de l'ADN génomique à partir de sang, des échantillons de tissus animaux ou végétaux traditionnellement, la plupart de ces méthodes sont longues et utilisent des produits chimiques coûteux tels que la protéinase K et un solvant organique toxique tel que le phénol.

Le sang est la principale source d'ADN pour les études liées aux génotypes chez l'homme. Pour cela la mise au point d'une méthode rapide, efficace et rentable pour l'isolement de l'ADN génomique à partir du sang total est nécessaire pour le dépistage d'un grand nombre d'échantillons (5,6).

Une méthode très simple et rapide pour extraire l'ADN génomique à partir de bactéries Gram-négatives, bactéries Gram-positives est aussi indispensable surtout que de nos jours la détection de certaines bactéries pathogènes passe par des techniques de Biologie Moléculaire comme la polymérase chain reaction (PCR). Les méthodes antérieures pour l'extraction

d'ADNg des bactéries prennent plusieurs heures pour se terminer. L'extraction d'ADN du génome à partir de bactéries comprend l'utilisation du SDS / CTAB et la protéinase K (7), SDS lysis (8), lysozyme / SDS (9) et lysozyme / SDS / protéinase K (10).

2.1. Qu'est-ce que l'ADN chez tous les êtres vivants?

L'ADN génomique constitue l'information génétique totale d'un organisme. Les génomes de presque tous les organismes sont l'ADN, les seules exceptions étant certains virus qui ont des génomes ARN. Les molécules d'ADN génomique sont généralement longues, et dans la plupart des organismes sont organisés en complexes ADN-protéines appelés chromosomes. La taille, le nombre de chromosomes et la nature de l'ADN génomique varient selon les différents organismes (**voir tableau 1**). Les génomes de l'ADN viral sont relativement faibles et peuvent être simples ou bicaténaires, linéaires ou circulaires. Tous les autres organismes ont des génomes d'ADN double brin. Les bactéries ont un seul chromosome circulaire. Dans les eucaryotes, la plupart des ADN génomiques sont situés dans le noyau (ADN nucléaire) en tant que chromosomes linéaires multiples de différentes tailles. Les cellules eucaryotes contiennent en outre de l'ADN génomique dans les mitochondries et, dans les plantes les chloroplastes. Cet ADN est généralement une molécule circulaire et est présent sous forme de copies multiples au sein de ces organelles.

Tableau 1. les Tailles et poids moléculaires de divers ADN génomiques (11)

Organisme	Paires de bases par génome haploïde	Poids moléculaire du génome (daltons)	Nombre de chromosomes
SV40	5243	3.4×10^6	–
174	5386	3.5×10^6	–
<i>Adenovirus 2</i>	35,937	2.3×10^7	–
<i>Lambda</i>	48,502	3.2×10^7	–
<i>Escherichia coli</i>	4.7×10^6	3.1×10^9	x = 1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.5×10^7	9.8×10^9	2x = 32
<i>Dictyostelium discoideum</i>	5.4×10^7	3.5×10^{10}	x = 6
<i>Arabidopsis thaliana</i>	7.0×10^7	4.6×10^{10}	2x = 10
<i>Caenorhabditis elegans</i>	8.0×10^7	5.2×10^{10}	2x = 12
<i>Drosophila melanogaster</i>	1.4×10^8	9.1×10^{10}	2x = 8
<i>Gallus domesticus</i> (chicken)	1.2×10^9	7.8×10^{11}	2x = 78
<i>Mus musculus</i> (mouse)	2.7×10^9	1.8×10^{12}	2x = 40
<i>Rattus norvegicus</i> (rat)	3.0×10^9	2.0×10^{12}	2x = 42
<i>Xenopus laevis</i>	3.1×10^9	2.0×10^{12}	2x = 36
<i>Homo sapiens</i>	3.3×10^9	2.1×10^{12}	2x = 46

<i>Zea mays</i>	3.9×10^9	2.5×10^{12}	$2x = 20$
<i>Nicotiana tabacum</i>	4.8×10^9	3.1×10^{12}	$2x = 48$

2.2. Isolation et purification de l'ADN génomique

L'ADN génomique se trouve dans le noyau de toutes les cellules vivantes. L'isolement de l'ADN génomique diffère chez les animaux et les cellules végétales. L'isolement d'ADN des cellules végétales est difficile en raison de la présence de paroi cellulaire, par rapport aux cellules animales. En fait la quantité et la pureté, de l'ADN extrait, dépend de la nature de la cellule. L'extraction de l'ADN à partir du sang est plus facile et ne nécessite pas de moyens très élaborés de plus il existe des protocoles assez court.

2.3. Caractérisation des cellules eucaryotes

2.3.1. Dans la cellule animale

2.3.1.1. Étude de génomes humains

Les cellules sont les éléments constitutifs de tous les êtres vivants. Le corps humain est composé d'environ un trillion de cellules. Chaque cellule a un noyau et d'autres organites majeurs comme le cytoplasme, les mitochondries, la membrane plasmidique, etc. Dans un noyau, la molécule d'ADN est emballée dans des structures en forme de fil appelées chromosomes. Chaque chromosome est constitué d'ADN et de protéines appelées histones. L'ADN (acide désoxyribonucléique) est le matériel héréditaire dans presque tous les organismes vivants et contient les instructions nécessaires pour qu'un organisme se développe, survit et se reproduise. Toutes les cellules contiennent des noyaux sauf les globules rouges dans un corps animal. Les cellules animales ont de l'ADN nucléaire (ADNn) et de l'ADN mitochondrial (ADNmt). L'ADN mitochondrial contient seulement un petit nombre de gènes, mais puisque chaque cellule contient des milliers d'exemplaires, l'ADN mitochondrial est souvent bien conservé et disponible pour l'analyse médico-légale (12).

Le sang est composé de cellules sanguines suspendues dans le plasma. L'ensemble est contenu dans les vaisseaux sanguins. Le volume sanguin total d'un adulte humain est de 5 litres. Les cellules en suspension représentent 45% du volume total, ce qui correspond à l'hématocrite. Leur morphologie peut être étudiée sur un frottis coloré à May Grünwald Giemsa (MGG). Il existe plusieurs types de cellules:

- Cellules rouges ou globules rouges.
- Les globules blancs ou les leucocytes qui sont à leur tour divisés en:
 - Polynucléaires ou granulocytes
 - Monocytes
 - Lymphocytes

Dans la plupart des études de routine en médecine, les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN pour les études de Biologie Moléculaire et pour faire l'extraction d'ADN. Les autres sources cellulaires peuvent être des biopsies (biopsie de villosités choriales...) ou des cultures de cellules (amniocytes, fibroblastes, lignées lymphoblastiques...).

Les leucocytes peuvent être obtenus à partir de sang total et de divers tissus, tels que la rate, le ganglion lymphatique, la moelle osseuse et le thymus.

2.3.2. Dans les cellules végétales

2.3.2.1. Les génomes des plantes

Le génome et la morphologie des végétaux sont plus complexes que d'autres génomes eucaryotes. De plus elles possèdent plusieurs organites comme les chloroplastes et les mitochondries qui contiennent de l'ADN. Les chloroplastes végétaux ont leur propre ADN spécifique, qui est distinct de celui présent dans le noyau (**13**). Les mitochondries sont des organelles trouvées dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Ils sont l'une des seules organelles à posséder leur propre génome. La taille des génomes mitochondriaux des plantes est très variable (**14**).

2.3.2.2. Morphogenèse des plantes

2.3.2.2.1. La paroi de la plante

2.3.2.2.2. La structure de la paroi

L'étude de la formation de la paroi cellulaire et l'analyse de sa structure ont conduit à distinguer dans cette paroi deux parties principales se formant successivement (**15**).

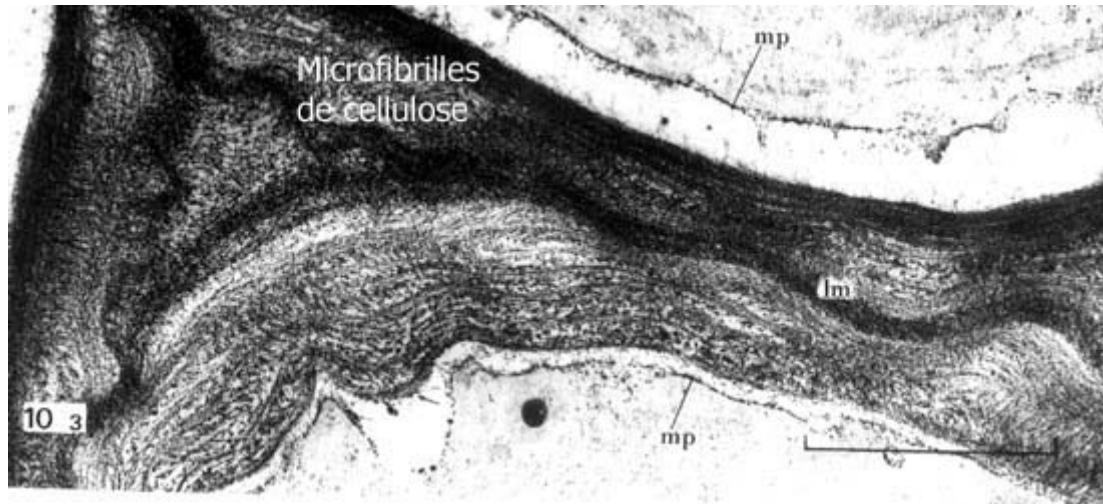


Figure 1. Paroi d'une cellule végétale (X 45 000) Racine de plant. (16)

Mp : la membrane plasmidique.

Lm : lamelle moyenne

❖ La paroi primaire

Elle est plastique de 1 à 3 μm d'épaisseur, comprenant de la cellulose, des hémicelluloses et des composés pectiques. Dans cette paroi primaire, les microfibrilles sont disposées sans ordre (texture dispersée) formant ainsi un réseau dans les mailles duquel se trouve la matrice amorphe. La paroi primaire est la première formée et la seule pour les cellules indifférenciées. Elle est capable de croître en longueur et en épaisseur (17).

❖ La paroi secondaire

Elle est rigide et pouvant atteindre une épaisseur considérable dans certains tissus de soutien. Elle est appliquée contre la paroi primaire et à l'intérieur de celle-ci. Sa rigidité ne permet plus la croissance cellulaire.

Elle est formée de microfibrille de cellulose et d'une matrice comme la paroi primaire mais les microfibrilles sont disposées de façon régulière décrivant des hélices très redressées par rapport au grand axe de la cellule. Ces microfibrilles ont été disposées en strates successives pour lesquelles le sens d'enroulement des hélices change brusquement d'une strate à l'autre.

2.3.2.2.3. Les constituants

Trois groupes de glucides constituent les parois cellulaires végétales

- les pectines
- les hemicelluloses
- la cellulose

De plus les parois renferment des protéines. La cellulose est un β -1-4 glucane. Elle est insoluble dans la plupart des solvants.

2.4. Caractérisation des cellules procaryotes

2.4.1. Les Cellules bactériennes

Les bactéries sont des procaryotes, ce qui signifie qu'elles ne contiennent pas de noyau. Bien qu'ils prolifèrent souvent en groupes où les bactéries adhèrent l'une à l'autre, les procaryotes sont composés d'une seule cellule. On appelle ces groupes de bactéries des colonies. Le génome bactérien comprend une grande molécule circulaire d'ADN bicaténaire située dans le cytoplasme cellulaire. Cette grande molécule d'ADN, le chromosome bactérien, contient la plupart des gènes bactériens. Outre cette grande molécule d'ADN, les bactéries renferment souvent de petites molécules d'ADN circulaires appelées plasmides. Ces plasmides contiennent également des gènes, mais contrairement au grand chromosome circulaire, ils sont extrêmement mobiles. Ils peuvent passer facilement d'une bactérie à l'autre, et, de cette façon, les gènes sont transmis entre bactéries. Les molécules de plasmide, une fois dans la cellule bactérienne hôte, peuvent s'intégrer en permanence au grand chromosome bactérien.

La capacité des plasmides à pénétrer dans les cellules bactériennes et à s'intégrer au chromosome de ces cellules en fait des outils très utiles pour insérer un gène dans une cellule bactérienne. En 1884, un médecin danois, Christian GRAM a fait la distinction entre deux types de bactéries à coloration de Gram (Gram+ et Gram-).

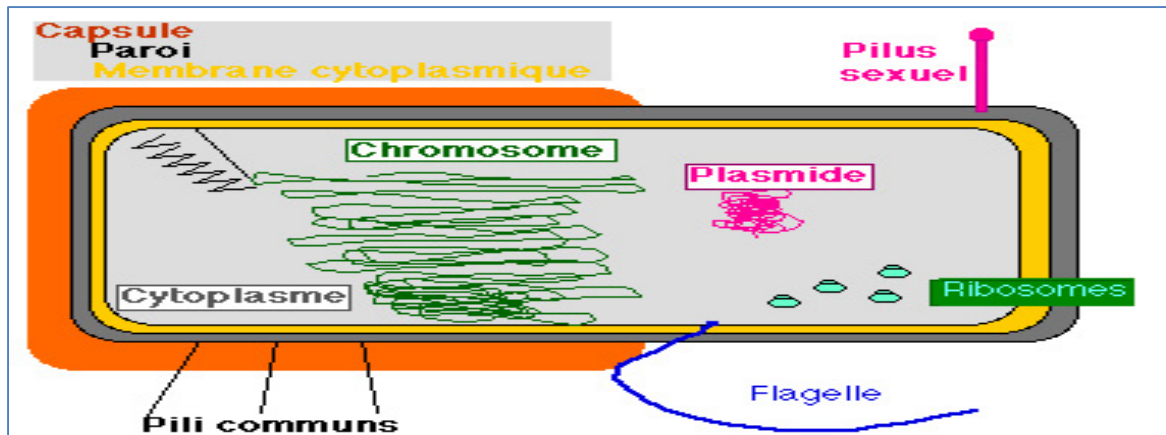


Figure 2. La représentation schématique montrant les différentes structures bactériennes(18).

2.4.2. Composition de la paroi des bactéries

La composition de la paroi dans les bactéries à Gram négatif et à Gram positif est différente. La paroi cellulaire bactérienne a des constituants différents qui la rendent plus ou moins facile à dégrader.

- La couche de peptidoglycane: elle est épaisse dans les bactéries à Gram+ et mince dans les bactéries à Gram-. Le peptidoglycane est un polymère de NAG (N-acétylglucosamine) et NAM (acide N-acétylmuramique) lié par une liaison $^2-(1,4)$. Le polymère de sucre est attaché à une chaîne peptidique composée d'acides aminés, de L-alanine, d'acide D-glutamique, de L-lysine et de D-alanine. La chaîne peptidique est présente dans une couche et est reliée à la couche suivante pour former un réseau qui sera responsable de la résistance physique de la paroi cellulaire. La synthèse de peptidoglycane est altérée par des antibiotiques (la pénicilline) ou le lysozyme qui dégrade la couche de peptidoglycane par clivage de la liaison glycosidique reliant NAG-NAM pour former un polymère.
- Acides lipoteichoïques: Cet acide ne se trouve que dans la paroi cellulaire des bactéries Gram positives et c'est un déterminant antigénique important.
- Les lipopolysaccharides (LPS) ne se retrouvent que dans la paroi cellulaire bactérienne Gram négative et c'est aussi un déterminant antigénique important.

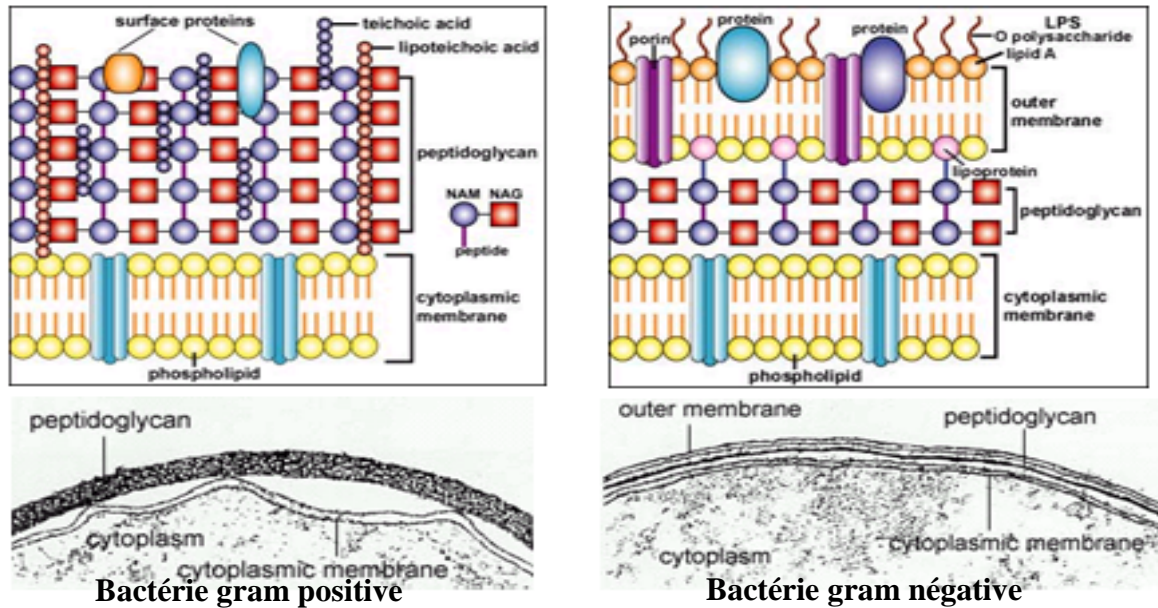


Figure 3. Détails structurels d'une deux cellules procaryote typique. Composition de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatives et positives(19).

2.4.3. Le génome de cellule bactérienne

2.4.3.1. ADN chromosomique

Les bactéries ont un seul chromosome circulaire. De nombreuses cultures cellulaires bactériennes peuvent être lysées efficacement à l'aide d'un tampon de lyse et d'une protéase ou d'une protéinase K. Certaines bactéries, en particulier des bactéries Gram-positives, nécessitent une pré-incubation avec des enzymes spécifiques (par exemple lysozyme ou lysostaphine) qui vont digérer la paroi cellulaire rigide et multicouche.

L'ADN bactérien peut également être isolé d'une grande variété d'échantillons cliniques. Les cellules bactériennes doivent être collectées à partir de fluides biologiques et l'ADN pourra être extrait comme pour les cultures cellulaires bactériennes. Les échantillons collectés à l'aide d'un écouvillon doivent être prétraités avec un fongicide avant la centrifugation des cellules bactériennes.

2.4.3.2. ADN plasmidique

Les plasmides bactériens sont des molécules circulaires fermées d'ADN bicaténaire qui ont une taille de 1 à 200 kb. Ils se trouvent dans une variété d'espèces bactériennes, où ils

se comportent comme unités génétiques supplémentaires héritées et répliquées indépendamment du chromosome bactérien. Cependant, ils dépendent des enzymes et des protéines fournies en majorité par l'hôte pour leur transcription et leur répllication réussies.

Les plasmides contiennent souvent des gènes qui codent pour des enzymes qui peuvent être avantageuses pour la cellule hôte dans certaines circonstances. Les enzymes codées peuvent être impliquées dans la résistance ou la production d'antibiotiques, la résistance aux toxines trouvées dans l'environnement (par exemple, les composés organiques complexes) ou la production de toxines par la bactérie elle-même.

Une fois purifié, l'ADN plasmidique peut être utilisé dans une grande variété d'applications en aval telles que le séquençage, la PCR, l'expression de protéines, la transfection et la thérapie génique.

2.5. Intérêt de l'extraction d'ADN chez tous les êtres vivants

L'extraction des acides nucléiques permet d'utiliser des indices de présence comme des poils ou des empreintes comme source d'ADN. Selon la quantité de matériel disponible, l'identification des individus selon leur génotype permettra d'étudier les mouvements individuels, les limites de territoires, l'estimation de la taille des populations, mais aussi les relations de parenté entre individus et l'histoire récente ou plus ancienne de ces populations...(20).

L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage (21).

Chapitre II : Extraction d'ADN à partir de procaryotes et eucaryotes

2.6. Introduction

L'ADN porte dans sa structure moléculaire l'information génétique pour le développement et le comportement des cellules. Par conséquent, toutes les cellules vivantes contiennent de l'ADN. L'isolement du matériel génétique (ADN) à partir de cellules (bactériennes, végétales ou animales) et virus, c'est-à-dire de procaryotes ou eucaryotes implique trois étapes de base:

- Rupture de la membrane cellulaire pour libérer les composants cellulaires et l'ADN
- Séparation des acides nucléiques d'autres composants cellulaires
- Purification des acides nucléiques

2.7.1. Isolement de l'ADN à partir de cellules végétales (*Allium cepa*)

La méthode simplifiée d'extraction de l'ADN nécessite le végétal (*Allium cepa*), un détergent ménager et de l'eau salée. Les oignons sont le meilleur matériau à utiliser car leurs cellules contiennent une quantité relativement importante d'ADN (1C = 415 Mb). Ils sont bon marché et disponibles tout au long de l'année, et contrairement à certains matériaux végétaux, il est très peu susceptible de provoquer des réactions allergiques.

L'isolement de l'ADN est devenu une activité populaire dans les laboratoires scolaires au cours des 30 dernières années. Bien que des protocoles pratiques similaires aient été décrits précédemment (22), ceux-ci n'ont pas été largement adoptés en raison de la complexité des procédures impliquées et de la nature dangereuse de plusieurs solvants requis (23).

Ces premières méthodes d'isolement de l'ADN proviennent du travail de Julius Marmur (1961) (24), qui a été développé à partir du travail classique d'Oswald Avery, Maclyn McCarty et Colin MacLeod (qui a d'abord montré que l'ADN était le matériel génétique dans les Années 1940).

2.7.2. Principales étapes d'extraction de l'ADN

Quelque soit la méthode d'extraction et le type cellulaire on doit nécessairement exécuter les mêmes trois étapes suivantes :

- La lyse des cellules.
- Dénaturation et élimination de toutes les macromolécules autres que l'ADN.
- Précipitation et récupération de l'ADN

Dans le procédé d'extraction de l'ADN provenant de l'oignon, un mélangeur de cuisine sert à ouvrir les parois cellulaires. Le détergent détruit les membranes phospholipidiques entourant les noyaux, libérant ainsi l'ADN. Le détergent, combiné au chauffage, dégrade les histones associées à l'ADN en détruisant leurs structures secondaires et tertiaires. Cela permet à une protéase d'hydrolyser les histones en peptides et acides aminés. Dans les protocoles d'extraction d'ADN répondant à un certain degré de pureté, la protéinase K (une protéase obtenue à partir du champignon *Engyodontium album*) est souvent utilisée pour hydrolyser les protéines. Elle est active sur une large gamme de pH même en présence du dodécyl sulfate de sodium (SDS) qui est un détergent.

Une fois que les histones ont été dégradées, l'ADN est précipité dans de l'éthanol glacé. Lorsqu'il est dissous dans l'eau, les groupes phosphate à charge négative de l'ADN sont entourés d'un revêtement de molécules d'eau. L'éthanol, ajouté à une solution aqueuse d'ADN, perturbe les interactions électrostatiques entre l'eau et les molécules d'ADN, ce qui provoque l'évacuation de l'ADN de la solution. Les ions de sodium (du sel utilisé dans la solution d'extraction) perturbent également les interactions ADN-eau, améliorant ainsi la précipitation de l'ADN.

L'ADN peut encore être purifié par traitement avec du phénol et du trichlorométhane (chloroforme) séparément ou ensemble. Le phénol et, dans une certaine mesure, le trichlorométhane dénature les protéines, et les produits de dénaturation sont solubles dans le phénol. Parfois, l'alcool isoamylique est ajouté au mélange de solvants, ce qui réduit la tendance des protéines dénaturées à mousser.

2.8.1. Isolement de l'ADN à partir d'une cellule animale (cellule humaine)

Un certain nombre de méthodes ont été décrites pour l'extraction de l'ADN génomique à partir du sang total (25). Elles diffèrent dans le nombre d'étapes les produits utilisés et leurs concentrations cependant elles se caractérisent toutes par trois étapes essentielles:

- 1- Lyse des globules rouges
- 2- lyse des globules blancs et élimination des protéines.
- 3- Précipitation de l'ADN.

Le tissu le plus facile à collecter chez l'homme est le sang, pour cela nous aborderont dans cette partie l'extraction d'ADN à partir de sang total

2.8.2. Collecte de sang

La collecte de sang doit être réalisée dans des tubes contenant un anticoagulant, ce sera l'héparine pour les échantillons de sang destinés aux analyses cytogénétiques et éthylène diamine tétra acétique (EDTA) pour les applications de génétique moléculaire (26). L'EDTA est le meilleur anticoagulant et est le meilleur pour isoler l'ADN et l'ARN, en effet l'héparine entraîne la formation de complexes avec l'ADN. Dans les tubes avec EDTA, les échantillons de sang peuvent être transportés dans les 12 heures de la zone de terrain (25°C) à 4°C pour le stockage, dans ces conditions aucune altération ne touchera le sang ou l'ADN. En présence de cet anticoagulant, le sang peut être conservé pendant plus de 5 ans à 4°C. Comme tous les fluides corporels, le sang représente un risque biologique potentiel, pour cela il faut beaucoup de précaution pendant toutes les étapes nécessitant sa manipulation. Si le sujet provient d'une catégorie connue à haut risque, des précautions supplémentaires peuvent être nécessaires. Les échantillons de sang pourront être stockés à température ambiante pour l'extraction de l'ADN au cours du même jour de travail ou conservés au froid pour une utilisation ultérieure (27).

2.8.3. La lyse des globules rouges (GR)

Pour la lyse des globules rouges, un grand volume d'une solution de lyse sera utilisé (Tris/EDTA). Des lavages, avec cette solution de lyse, seront répétés jusqu'à la disparition de la couleur rouge qui signifie une élimination totale des globules rouges. En ce qui concerne le deuxième lavage et les suivants éventuellement, une petite quantité de la solution de lyse sera utilisée. A l'issue de cette étape, on doit obtenir un culot de globules blancs (leucocytes) après la dernière centrifugation (28).

2.8.4. La lyse de globule blanc

Les leucocytes seront lysés avec un tampon de lyse (Tris-HCl, NaCl et EDTA) auquel sera ajouté du sulfate dodécyle soduim (SDS) appelé aussi laurylsulfate de sodium qui est un détergent qui solubilisera les lipides membranaires sous forme de micelles. Cela permet de créer des pores membranaires suffisamment grands pour permettre la libération du contenu du cytoplasme hors des cellules. En fonction de leur force (chargé ou pas), le détergent pourra plus ou moins dénaturé les protéines membranaires (29).

Le chlorure de sodium (NaCl) aide à éliminer les protéines liées à l'ADN. Il aide également à maintenir les protéines dissoutes dans la couche aqueuse de sorte qu'elles ne précipitent pas dans l'alcool avec l'ADN.

2.8.5. Dénaturation / Hydrolyse des protéines

La présence de détergents dans le tampon d'extraction est responsable de la lyse des membranes cellulaires et de la dissociation et de la dénaturation des protéines histoniques qui sont étroitement liées à l'ADN. Les détergents détruisent les structures secondaires et tertiaires des protéines ce qui va entraîner la réduction de leur solubilité en solution aqueuse et donc accroître leur susceptibilité à l'activité hydrolytique des enzymes protéolytiques. Le détergent couramment utilisé est le dodécylsulfate de sodium (SDS). La protéinase K (30) est aussi largement utilisée dans les procédures d'isolement de l'ADN comme outil efficace pour l'hydrolyse des protéines histoniques. Cette enzyme est active dans une large gamme de pH mais aussi en présence de SDS (en fait, son activité est améliorée) et elle n'est pas affectée par des chélateurs de métaux comme l'EDTA.

2.8.6. Élimination des produits de dénaturation

Les protéines dénaturées peuvent être éliminées efficacement de la solution d'extraction par traitement avec du phénol et du chloroforme. Le phénol, et dans une certaine mesure le chloroforme, est un dénaturant protéique efficace. En outre, les produits de dénaturation et de protéolyse sont solubles dans le phénol (31). Certaines procédures de récupération exigent l'utilisation de mélanges de phénol et de chloroforme, tandis que d'autres utilisent le phénol d'abord suivi d'un ou plusieurs traitements avec du chloroforme pour assurer l'élimination complète du phénol. L'alcool isoamylique est inclus dans les mélanges de phénol et de chloroforme pour réduire la tendance des protéines à mousser lorsqu'elles sont dénaturées lors de l'agitation avec les solvants organiques (32). Dans cette étape, on procède par extraction/précipitation dans le cas de chaque solvant utilisé.

2.8.7. Précipitation de l'ADN

L'ADN est ensuite précipité en utilisant de l'éthanol ou de l'isopropanol de la même manière que pour les étapes utilisant l'extraction aux solvants organiques (33). Le chloroforme est ensuite utilisé pour faciliter l'élimination du phénol. L'ADN est ensuite concentré et purifié par précipitation dans un mélange froid de sel et d'éthanol. Enfin l'ADN pourra être re-solubilisé dans du tampon TE (Tris-EDTA) (31, 32).

2.8.8. Quantification de l'ADN et mesure de sa pureté

La concentration et la pureté de l'ADN génomique sont déterminées en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm et le rapport d'absorbance et A260/A280 respectivement, en utilisant un spectrophotomètre. Le rapport de pureté 260/280 doit être compris entre 1,7 et 1,8 pour démontrer un degré de pureté satisfaisant (34).

La lecture de la densité optique à 260 nm permet de quantifier les acides nucléiques grâce aux paramètres suivants :

- Dans le cas de l'ADN double brins : pour une DO = 1, la quantité d'ADN est 50 µg/ml.
- Pour de l'ADN simple brin et une DO = 1, la quantité est de 37 µg/ml.
- Pour de l'ARN, une DO = 1 implique que la quantité est de 40 µg/ml.

2.9. L'isolement de l'ADN génomique d'une bactérie

Les bactéries sont à Gram positif ou à Gram négatif, ce caractère donne une information sur l'épaisseur de leurs parois. Les bactéries à Gram positif ont une paroi beaucoup plus épaisse que les bactéries Gram négatives, elles seront donc par conséquent beaucoup plus difficiles à lyser. En plus des étapes d'extraction de l'ADN communes aux deux types de bactéries, l'utilisation de produits spécifiques de digestion de la paroi est nécessaire, dans le cas des bactéries Gram positives.

La méthode d'isolement de l'ADN génomique provenant d'une bactérie qu'elle soit Gram positive ou négative comprend les étapes suivantes (Figure 4) :

1. Culture bactérienne et collecte des cellules.
2. Rupture de la paroi cellulaire et préparation de l'extrait cellulaire.
3. Purification de l'ADN à partir de l'extrait cellulaire
4. Concentration de la solution d'ADN.

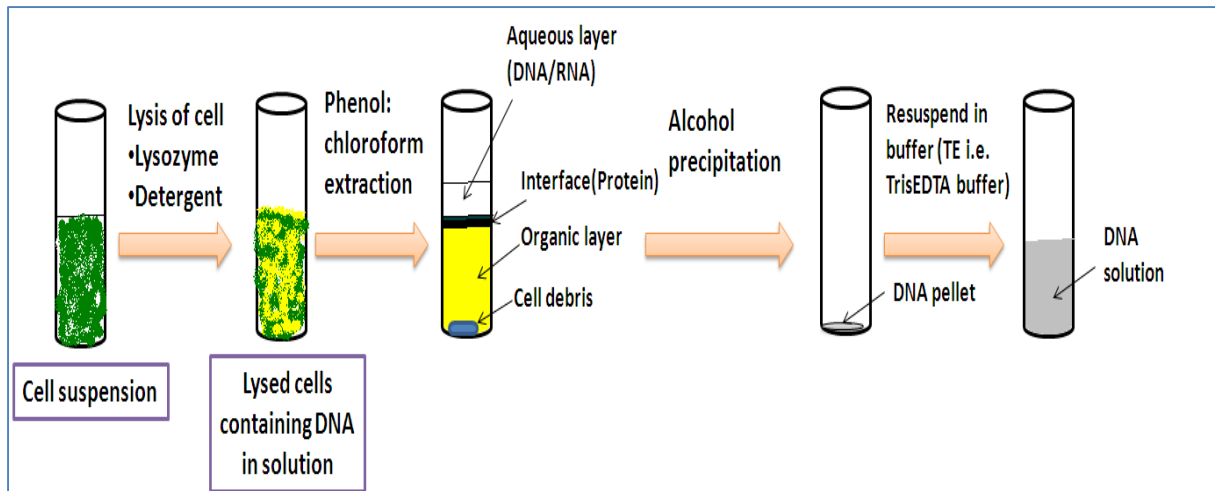


Figure 4. Préparation de l'ADN génomique (35)

2.9.1. Croissance et collecte des cellules bactériennes

La culture des bactéries est plus pratique que celle de n'importe quel autre cellule, car elle ne nécessite que du milieu liquide (bouillon) contenant des nutriments essentiels à des concentrations optimales, pour la croissance et la division cellulaire. Les cellules bactériennes sont généralement cultivées sur un milieu complexe optimal pour la croissance de la bactérie étudiée. Ensuite, les cellules sont séparées de leur milieu de culture par centrifugation et remises en suspension dans du tampon à 1% ou moins du volume de culture initial.

2.9.2. Préparation de l'extrait cellulaire

La cellule bactérienne est entourée d'une couche supplémentaire appelée paroi cellulaire en plus de la membrane plasmique. Cette paroi nécessite un traitement spécifique pour sa digestion. Ce traitement peut être réalisé selon les étapes suivantes :

- Méthode physique : ultrasons.
- Méthode chimique : elle est effectuée par des agents chélateurs métalliques (EDTA), des tensioactifs comme le SDS ou des enzymes, par exemple le lysozyme. Ce dernier est très utilisé pour la digestion des parois chez les bactéries à Gram positif, puisqu'il catalyse la dégradation de la couche de peptidoglycane.

L'utilisation de l'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) est nécessaire pour déstabiliser l'intégrité de la paroi cellulaire et inhiber les enzymes cellulaires qui dégradent l'ADN.

Le SDS (dodécylsulfate de sodium) aide à éliminer les molécules lipidiques et à la dénaturation des protéines membranaires.

Généralement, un mélange d'EDTA et de lysozyme est utilisé. La lyse cellulaire est suivie d'une centrifugation pour éliminer les parois cellulaires dans le culot et récupérer l'ADN dans le lysat clair qui est le surnageant.

2.9.3. Purification de l'ADN

En plus de l'ADN, un extrait cellulaire contient des quantités importantes de protéines et d'ARN. Ces deux derniers sont les contaminants essentiels des solutions d'ADN. Pour obtenir seulement de l'ADN plusieurs opérations d'extraction/précipitation en présence de solvants organiques seront réalisées.

2.9.3.1. Extraction organique et digestion enzymatique pour l'élimination des contaminants

Cette étape implique l'addition d'un mélange de phénol et de chloroforme (1: 1) au lysat cellulaire pour la séparation des protéines. Les protéines s'accumulent sous la forme d'une masse blanche entre la phase aqueuse contenant de l'ADN et de l'ARN et la couche organique. Le traitement du lysat avec une pronase ou une protéase, en plus du phénol/chloroforme, assure l'élimination complète des protéines de l'extrait. L'ARN peut être éliminé efficacement en utilisant de la ribonucléase, une enzyme qui dégrade rapidement l'ARN dans ses sous-unités ribonucléotidiques. L'extraction répétée au phénol n'est pas souhaitable car elle endommage l'ADN.

2.9.3.2. Utilisation de la Chromatographie par échange d'ions

Cette méthode permet la séparation des ions et des molécules polaires (protéines, petits nucléotides et acides aminés) en fonction de leur charge. L'ADN portant une charge négative se lie à la résine cationique ou à la matrice et peut être élué de la colonne par un gradient de sel. L'augmentation graduelle de la concentration de sel détache les molécules de la résine l'une après l'autre.

2.9.3.4. Concentration d'échantillons d'ADN

La concentration de l'ADN peut être effectuée en utilisant de l'éthanol avec des sels tels que l'acétate de sodium, l'acétate de potassium, etc. Ces sels fournissent des ions métalliques comme les ions sodium (Na^+), les ions potassium (K^+) qui contribuent à l'agrégation et donc à la précipitation des molécules d'ADN.

L'avantage de ce traitement est qu'il laisse en solution des composants d'acides nucléiques à chaîne courte et monomère. Les ribonucléotides produits par le traitement à la ribonucléase sont séparés de l'ADN.

2.9.4. Isolement et purification de l'ADN plasmidique

En plus de leur ADN génomique, les bactéries possèdent, des petites molécules d'ADN nommées plasmides qui leur apportent un avantage sélectif.

Les plasmides sont des molécules d'ADN cellulaires extrachromosomique à double brin circulaires et les plus couramment utilisées dans la technologie de l'ADN recombinant. La différence de taille entre l'ADN génomique et l'ADN plasmidique fait qu'à partir de l'étape de lyse bactérienne on doit procéder de manière différente selon l'ADN qu'on veut extraire. L'isolement de l'ADN plasmidique comporte trois étapes majeures:

1. Croissance de la cellule bactérienne.
2. Récolte et lyse des bactéries.
3. Purification de l'ADN plasmidique.

2.9.4.1. Croissance de la cellule bactérienne

Cela implique la croissance des cellules bactériennes dans un milieu contenant des nutriments essentiels. Dans certains cas, on peut utiliser des conditions de culture sélectives, pour amplifier le nombre de copies des plasmides / cellule.

2.9.4.2. Collecte et lyse des bactéries

La lyse des bactéries entraîne la précipitation de l'ADN et des protéines cellulaires. L'addition d'un tampon de neutralisation contenant de l'acétate conduit à la précipitation de l'ADN et des protéines chromosomiques de grande taille, laissant les petits plasmides d'ADN

bactérien en solution. Le fait que l'ADN chromosomique soit d'un degré de super-enroulement plus faible aide aussi à cette séparation.

2.9.4.3. Purification de l'ADN plasmidique

Cette étape est identique à la fois pour le plasmide et l'ADN génomique, mais le premier implique une étape supplémentaire, c'est-à-dire la séparation de l'ADN plasmidique du grand ADN chromosomique bactérien.

2.9.4.3.1. Méthodes de séparation de l'ADN plasmidique

La séparation de l'ADN plasmidique est basée sur les différentes caractéristiques telles que la taille et la conformation de l'ADN plasmidique et de l'ADN chromosomique. Les plasmides sont beaucoup plus petits que les chromosomes principaux bactériens, les plus grands plasmides ne représentant que 8% de la taille du chromosome chez *E. coli* par exemple. La séparation, des petites molécules (c'est-à-dire des plasmides) des plus grands (c.-à-d. Le chromosome bactérien), est basée sur le fait que les plasmides et les chromosomes bactériens sont circulaires mais les chromosomes bactériens se brisent en fragments linéaires lors de la préparation de l'extrait cellulaire, ce qui entraîne la séparation des plasmides purs (36). Les procédés de séparation de l'ADN plasmidique sont décrits ci-dessous.

2.9.4.3.1.1. Séparation basée sur la différence de taille

- La lyse des cellules est réalisée avec du lysozyme et de l'EDTA en présence de saccharose qui empêche l'éclatement immédiat des cellules.
- A ce stade, des cellules avec des parois cellulaires partiellement dégradées sont formées, mais elles conservent une membrane cytoplasmique intacte appelée sphaeroplasts.
- La lyse cellulaire est alors induite par l'addition d'un détergent non ionique (par exemple Triton X-100) ou des détergents ioniques (par exemple SDS) provoquant aussi des cassures de l'ADN génomique.
- Le chromosome bactérien attaché à la membrane cellulaire sera éliminé avec les débris cellulaires.
- Un lysat constitué presque entièrement d'ADN plasmidique est alors formé. Cet ADN comportera très peu de cassures grâce à sa petite taille (**Figure 5**).

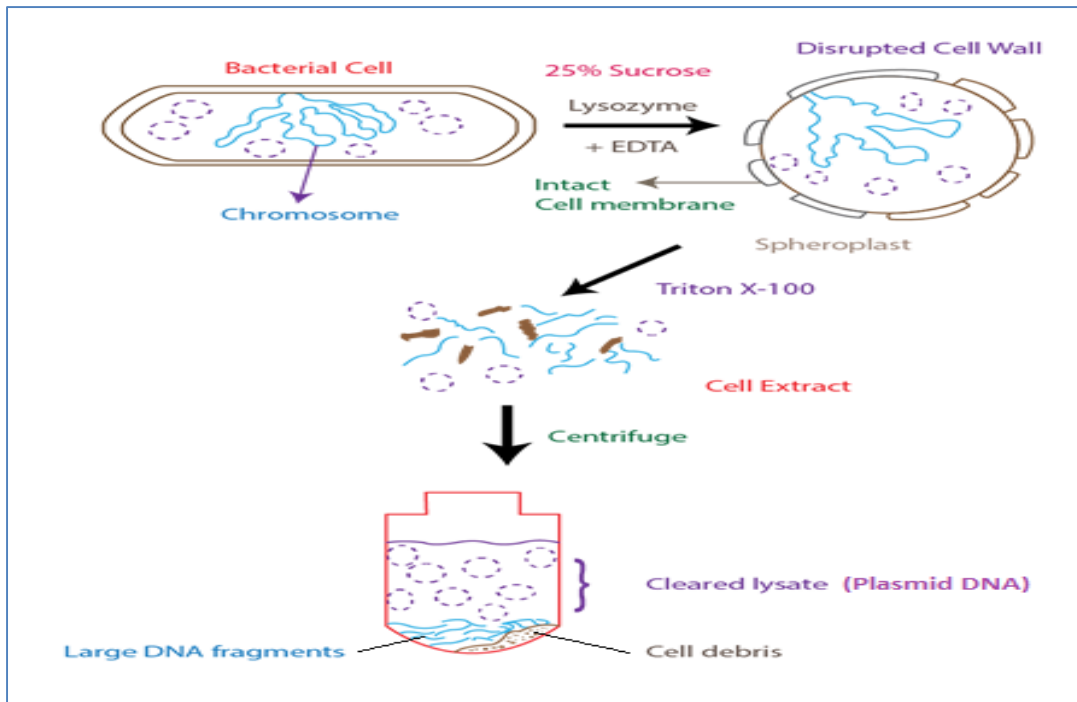


Figure 5. Séparation de l'ADN plasmidique sur la base de la taille(37).

2.9.4.3.1.2. Séparation basée sur la conformation

Les plasmides sont des molécules super-enroulées formées par des enzymes appelées topoisomérases. La conformation super-enroulée peut être maintenue lorsque les deux brins polynucléotidiques sont intacts, cette forme est appelée ADN circulaire (CCC) covalent. Si l'un des brins polynucléotidiques est cassé, la double hélice passe à un état détendu normal en prenant une conformation alternative, appelée circulaire ouverte (oc). Le super-enroulement est important dans la préparation des plasmides en raison de la séparation facile des molécules super-enroulées des non superenroulées.

Les méthodes de séparation couramment utilisées en fonction de la conformation sont les suivantes:

2.9.4.3.1.3 Méthode de dénaturation alcaline

Cette méthode est basée sur l'état de la molécule d'ADN plasmidique c'est-à-dire si elle est super-enroulée ou relâchée.

- Elle est plus précisément basée sur le maintien d'une plage de pH très étroite pour la dénaturation de l'ADN non super-enroulé mais pas le plasmide qui est super-enroulé (**Figure 6**) (38).

- L'addition d'hydroxyde de sodium à l'extrait cellulaire ou au lysat (pH 12.0-12.5) entraîne une perturbation des liaisons hydrogène des molécules d'ADN non super-enroulées. En conséquence, la double hélice se déroule et les deux brins d'ADN se séparent.
- Si en plus on ajuste le pH à des valeurs acides, ceci provoque l'agrégation des brins d'ADN en une masse enchevêtrée qui peut être éliminée dans le culot après centrifugation, laissant l'ADN plasmidique dans le surnageant.

L'avantage de cette méthode est que la majeure partie de l'ARN et des protéines sera éliminée dans les conditions définies (en particulier la lyse cellulaire par SDS et la neutralisation avec de l'acétate de sodium) par simple centrifugation. De plus cette technique ne nécessite aucune exigence d'extraction organique.

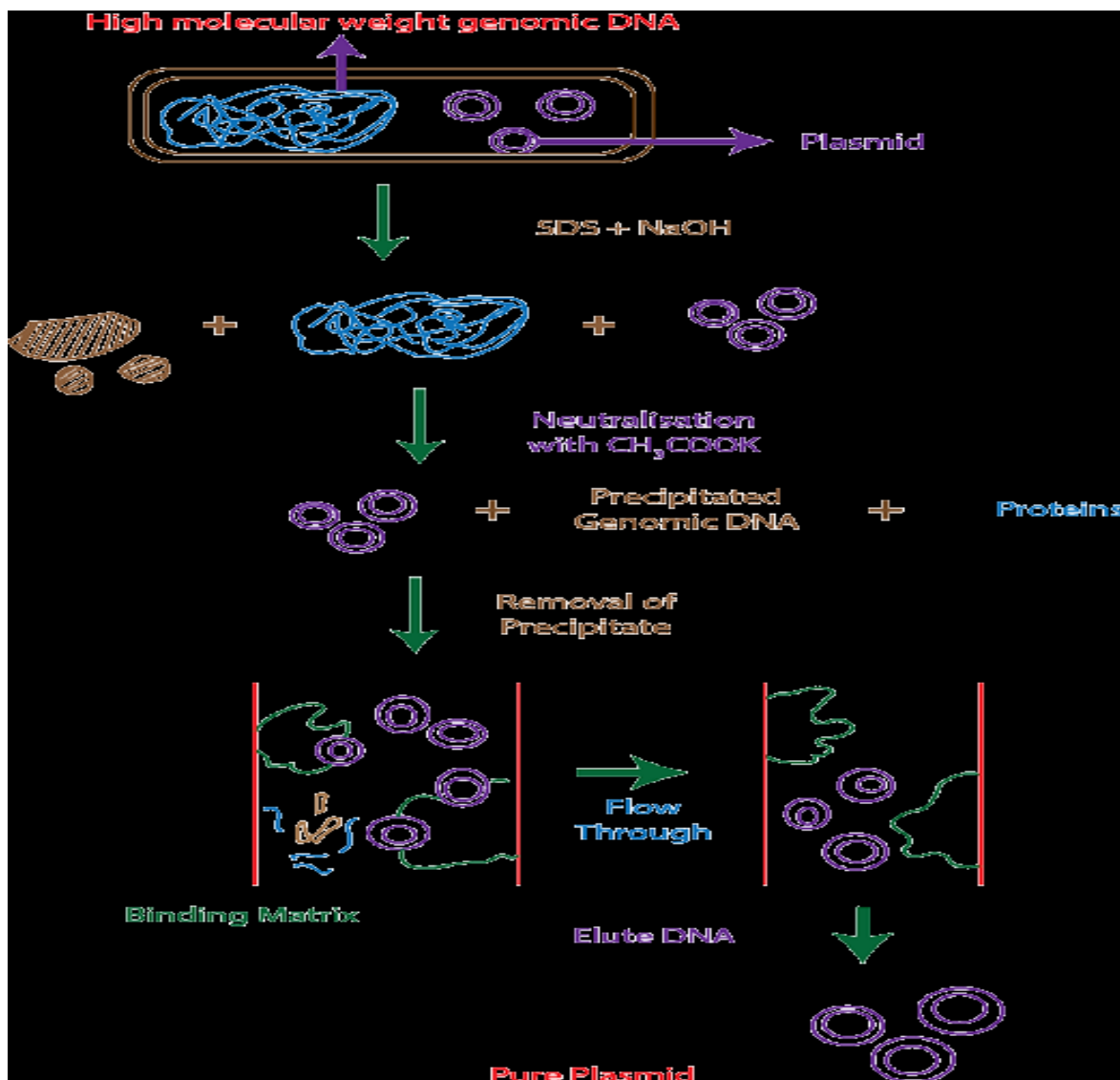


Figure 6. Séparation de l'ADN plasmidique par la méthode de dénaturation alcaline (38).

2.9.4.3.1.4. Centrifugation par gradient de densité de chlorure de césium

La centrifugation en gradient de densité peut séparer l'ADN, l'ARN et les protéines. C'est une méthode très efficace pour l'obtention un ADN plasmidique pur.

- Un gradient de densité est produit en centrifugeant une solution de chlorure de césium à une vitesse très élevée qui tire les ions CsCl vers le bas. Ce procédé est appelé centrifugation isopycique.
- L'ADN migre à la position du gradient qui correspond à une densité de $1,7 \text{ g / cm}^3$, densité qui correspond à celle de l'ADN.
- En revanche, les molécules de protéines ayant des densités de flottaison inférieures flottent au sommet du tube, alors que l'ARN se dépose au fond du tube.

La centrifugation en gradient de densité en présence de bromure d'éthidium (BrEt) peut être utilisée pour séparer l'ADN super-enroulé des molécules non super-enroulées. Le bromure d'éthidium est un colorant intercalaire qui se lie aux molécules d'ADN provoquant un déroulement partiel de la double hélice. L'ADN super-enroulé a très peu de liberté de se détendre en raison de l'absence d'extrémités libres et se lie à une quantité limitée d'EtBr, ce qui entraîne une diminution très faible de la densité de flottaison par rapport à celle de l'ADN linéaire. En conséquence, il forme une bande distincte séparée de l'ADN bactérien linéaire. Le BrEt lié à l'ADN est ensuite extrait par du n-butanol et le CsCl est éliminé par dialyse.

MÁGICA ALMAMOS

3. Matériels et Méthodes

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Biochimie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, (Algérie).

3.1. Matériel biologique

Les échantillons utilisés dans notre travail étaient du sang de mouton collecté dans des conditions qui défavorisent sa coagulation. Le sang a été recueilli dans des tubes grâce à l'aimable aide des maquignons de l'abattoir, de Mostaganem (Tijdit).

3.2. Les solutions utilisés

Deux solutions de lyse ont été utilisées au cours de ce travail, la solution de lyse I et la solution de lyse II ainsi que d'autres solutions.). La stérilisation des solutions est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20 min (Tris, EDTA, NaCl et L'eau distiller).

Composition des solutions d'extraction de l'ADN

➤ **Solution de lyse I : solution de lyse des Globules Rouges :**

1. Composition :

Tris 10 mM pH 7.4

EDTA 10 mM pH8.0

➤ **Solution de lyse II : solution de lyse des Globules Blancs.**

2. Composition :

Tris 0,5M pH 8.0

EDTA 0,5M pH8.0

SDS 10%

NaCl 3M

L'eau distiller 600 µl

Enzyme pepsine 10 mg/ml

➤ **Autres Solutions**

Enzyme pepsine à 10 mg/ml

Phénol/chloroforme (24/1, v/v)

3.3. Méthodes

3.3.1. Echantillonnage

Le sang a été prélevé chez des moutons, à raison de 4 ml par échantillon, en utilisant de l'EDTA comme anticoagulant. Les échantillons de sang sont maintenus à température ambiante, pour l'extraction de l'ADN dans les 24 heures ou conservés au congélateur, pour une utilisation ultérieure.

3.3.2. Extraction de l'ADN à partir du sang total

Ce protocole décrit la méthode la plus utilisée pour extraire l'ADN à partir de sang total. Il comporte plusieurs étapes dont deux de lyse cellulaire, deux étapes d'extraction et une étape de précipitation de l'ADN.

✓ **La lyse des globules rouges**

Prendre 2 ml de sang total, ajouter 3 ml de la solution de lyse I et mettre dans la glace pendant 10 minutes, puis centrifuger pendant 10 min à 2500 rpm. Ensuite éliminer le surnageant, et ajouter 2.5 ml d'une solution de lyse I remettre en suspension le culot puis centrifuger dans les mêmes conditions. La remise en suspension du culot cellulaire dans la solution de lyse I puis la centrifugation et l'élimination du surnageant représentent un lavage. Plusieurs lavages sont effectués jusqu'à l'obtention d'un culot blanc.

✓ **Lyse des globules blancs**

Au culot blanc, on ajoute la solution de lyse II. Ensuite 20 μ l d'une solution de pepsine (10 mg/ml) sont ajoutés et une incubation est réalisée à 37°C. Puis on homogénéise le culot.

✓ **Extraction au phénol**

Ajouter un volume de phénol égal au volume de lysat et bien émulsionner par agitation au vortex pendant 5 min, puis centrifuger 10 min à 6000 rpm.

✓ **Extraction au chloroforme**

Prendre la phase aqueuse et ajouter le même volume de chloroforme (24/1, v/v) que le surnageant, et agiter manuellement pendant 5 min, puis centrifuger 10 min à 6000 rpm.

✓ **Phase de précipitation de l'ADN**

Récupérer soigneusement la phase aqueuse contenant l'ADN et la transférer dans un nouveau tube, puis ajouter 100 μ l de chlorure de sodium 3M. Mélanger brièvement par vortex, puis ajouter 2 V d'éthanol à 95% froid. On voit apparaître la méduse d'ADN. Centrifuger pendant 20 min à 6000 rpm. éliminer le surnageant, l'ADN se trouve alors dans le culot et sécher le culot pendant 2 heures pour éliminer toute trace d'alcool.

3.3.3 Conservation de l'ADN

L'ADN a été conservé de deux manières dans un tampon (10Mm Tris pH=8) additionné d'EDTA (1mM) à 4°C. Mais aussi à sec dans un tube eppendorf après l'étape de séchage qui a suivie la précipitation à l'éthanol, dans ce cas la conservation a été réalisée à température ambiante.

3.3.4. Dosage et contrôle de la qualité de l'ADN

La vérification du degré de pureté et le dosage de nos échantillons en ADN ont été réalisés par mesure des DO à 260 et 280 nm au spectrophotomètre.

Le dosage de la quantité d'ADN dans nos échantillons a été réalisé grâce à l'absorbance à 260 nm. En effet, une unité d'absorbance à 260 nm (DO lue au spectrophotomètre) correspond à une solution d'ADN double brins à 50 µg/ml.

$$C (\mu\text{g/ml}) = (\text{DO échantillon} - \text{DO eau}) \times 50 \times F$$

C : Concentration de l'ADN (µg/ml)

F : Facteur de dilution

DO : densité optique

La pureté de notre échantillon d'ADN a été évaluée par le rapport suivant :

$$R = \text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$$

Pour la lecture des résultats les indications suivantes ont été prises en compte :

- ✓ Si ce rapport est compris entre 1,8 et 2,0, l'absorption est probablement due à des acides nucléiques.
- ✓ Un ratio inférieur à 1,8 indique qu'il ya peut être des protéines et/ou d'autres absorbeurs d'UV dans l'échantillon, dans ce cas il est conseillé de reprécipiter l'ADN.
- ✓ Un rapport supérieur à 2,0 indique que l'échantillon peut être contaminé par le chloroforme ou le phénol et devrait être reprécipité avec de l'éthanol.

4. Résultats et discussion

4.1. Collecte de sang

Nous avons collecté le sang des moutons dans des tubes de 4 ml contenant l'EDTA comme anticoagulant(39). L'EDTA est le meilleur anticoagulant et pour isoler l'ADN et l'ARN. Nos échantillons de sang ont été maintenus à des conditions de congélation avant leur utilisation.

4.2. Extraction d'ADN

4.2.1. Lyse des globules rouges

L'extraction de l'ADN à partir de sang se fait en réalité à partir de globule blancs ce qui implique qu'il faut éliminer les globules rouges. Pour cela, nous avons utilisé un tampon contenant du TRIS et de l'EDTA. L'EDTA permettra de chélater les ions divalents (nécessaires de les piéger pour inactiver les nucléases), il va aussi déstabiliser la paroi cellulaire et empêcher la croissance des microorganismes (40). Les différents lavages avec la solution de lyse I vont permettre d'éliminer progressivement les globules rouges (**figure 7**).

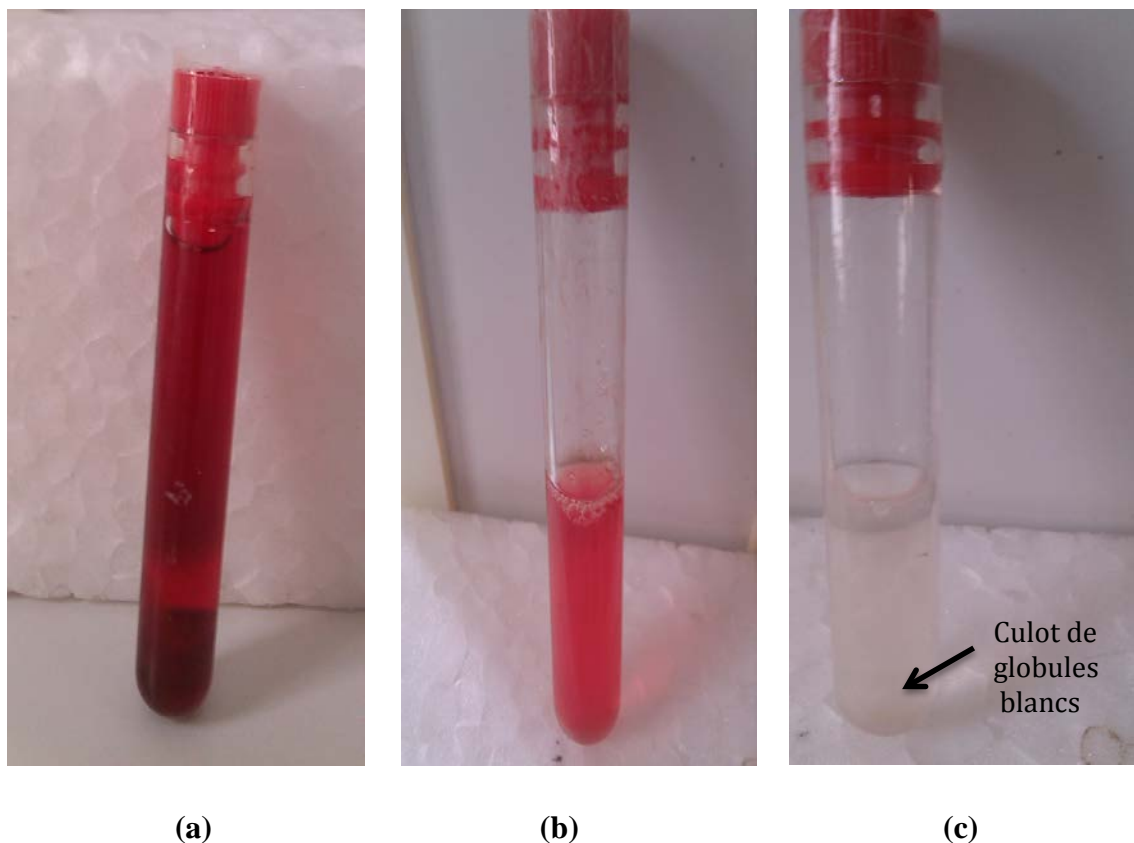


Figure 7 : La phase de lyse des globules rouges

Résultats et Discussion

Après le premier lavage des globules rouges et la centrifugation on obtient un rouge un peu clair avec la précipitation des globules rouges d'une couleur rouge foncé **(a)**.

Et après le deuxième lavage des globules rouges on obtient une couleur rouge claire avec la précipitation d'un culot blanc (le culot lymphocytaire) **(b)**.

Le troisième lavage permet d'obtenir un surnageant de couleur transparente signe que les globules rouges ont été totalement éliminés et un culot blanc **(c)**.

4.2.2. Lyse des globules blancs

La lyse des globules blancs est obtenue après l'ajout de la solution de lyse II et une incubation pendant une nuit à 37°C. Le lysat obtenu est d'une couleur transparente et visqueux **(figure 8)**. La lyse des globules blancs a nécessité l'utilisation de l'EDTA, le SDS, une protéase (pepsine) et le NaCl. La pepsine est une enzyme qui aide à la digestion des les protéines **(41)** et le chlorure de sodium permet d'éliminer les protéines liées à l'ADN**(42)**. Le SDS est un détergent responsable de la lyse des membranes cellulaires et de la dissociation et de la dénaturation des protéines histoniques qui sont étroitement liées à l'ADN et aussi à solubiliser les lipides membranaires **(43)**.



Figure.8. Lysat clair

4.2.3. Extraction au phénol

Cette étape correspond à la précipitation des protéines par le phénol et leur l'élimination après centrifugation (**figure 9**)

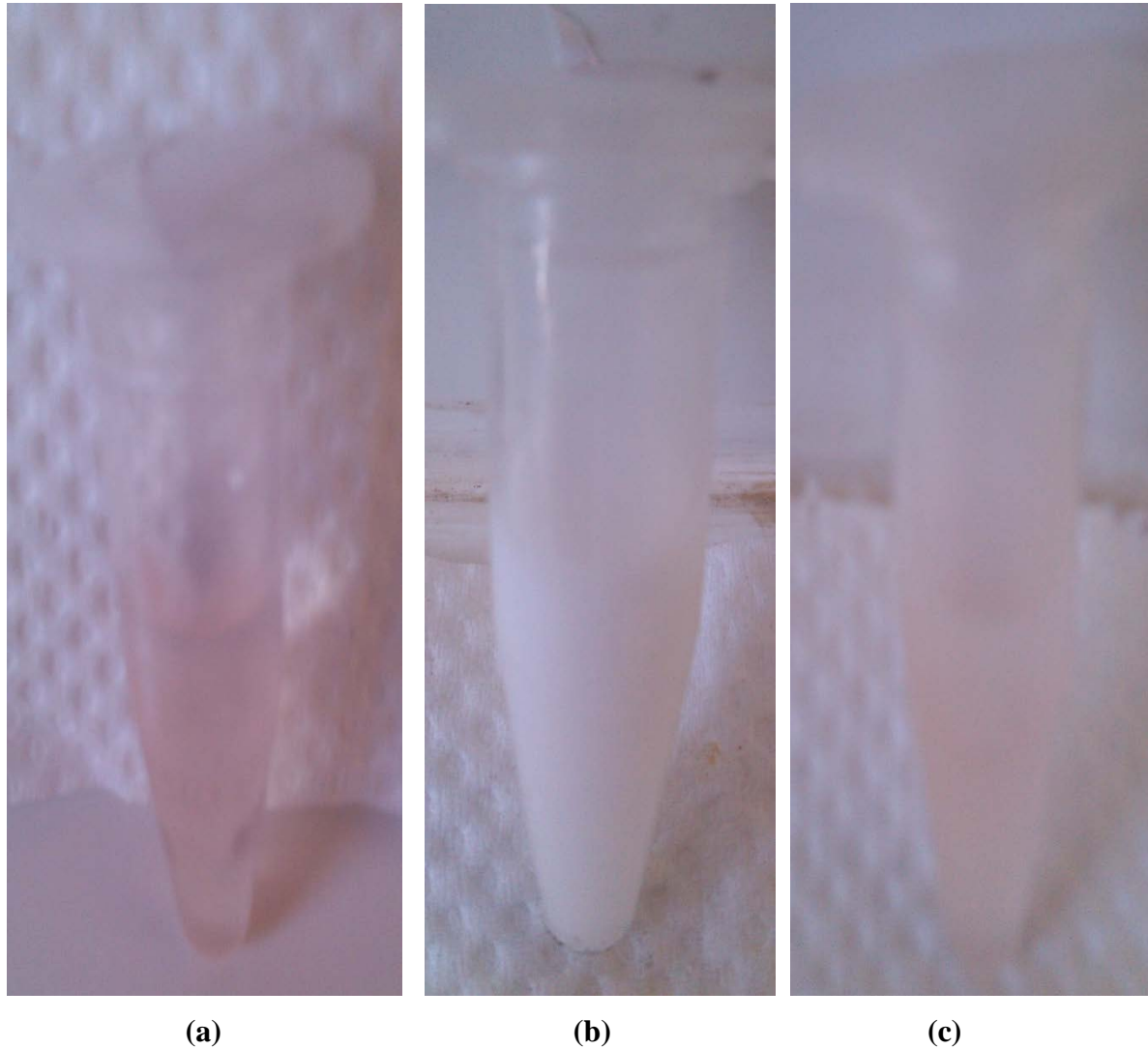


Figure.9. Extraction au phénol

Après émulsion du lysat avec le phénol on obtient une couleur blanche crémeuse (**b**).

Et après la centrifugation on obtient deux phases (**c**), une phase supérieure aqueuse qui contient l'ADN et l'autre phase inférieure qui est la phase phénolique.

Normalement le phénol doit être saturé dans un tampon TRIS/EDTA dans notre cas nous l'avons utilisé sans le saturé.

4.2.4. Extraction au chloroforme

A la phase aqueuse obtenue après l'extraction phénolique, nous avons rajouté un même volume de chloroforme **(a)**. Après agitation et centrifugation on retient la phase aqueuse. Le rôle du chloroforme est d'éliminer toute trace de phénol **(figure 10)**. Après la centrifugation on obtient deux phases **(c)**. L'ADN est présent dans la phase aqueuse c'est-à-dire la phase supérieure.

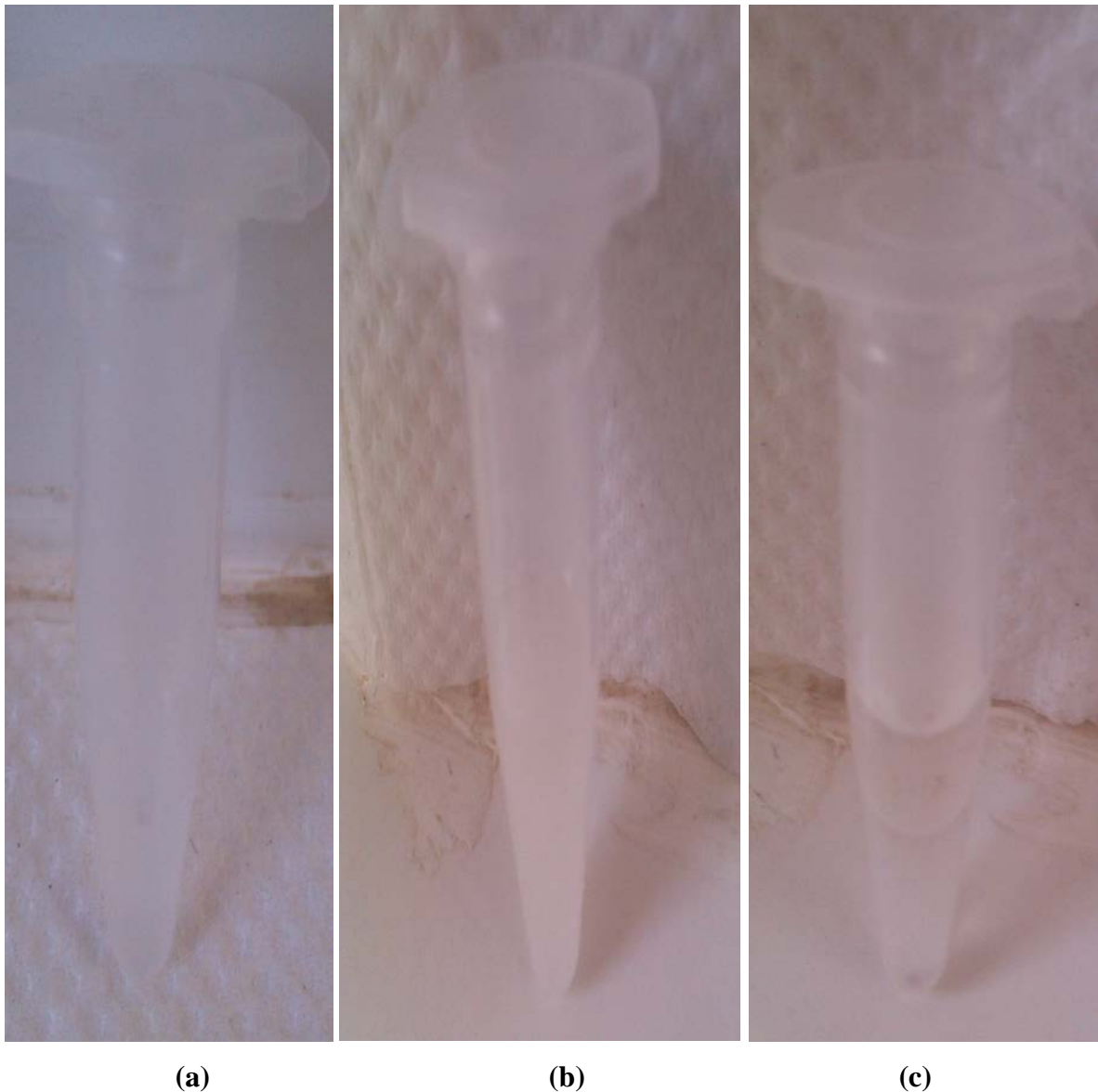


Figure.10. Extraction au chloroforme

4.2.5. Phase de précipitation de l'ADN

A la phase aqueuse obtenue après l'extraction au chloroforme du NaCl et d'éthanol froid (44) ont été rajoutés. La précipitation de l'ADN s'est exprimée par la formation de la méduse (voir figure 11).

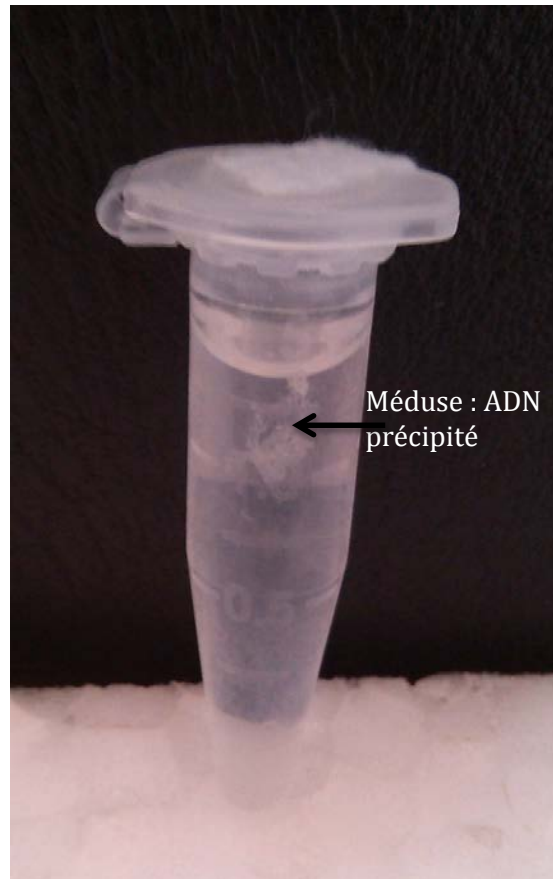


Figure 11. La méduse d'ADN

4.2.6. Solution d'ADN

Après centrifugation et élimination du surnageant. Le culot d'ADN a été séché puis remis en solution dans 100 μ l de tampon Tris/EDTA (45).

4.3. Conservation de l'ADN

L'ADN a été conservé dans un tampon TE (TRIS/EDTA) à 4°C et à pH8, la dégradation de l'ADN est notablement plus faible qu'à pH7.

4.4. Dosage et degré de pureté de l'ADN

4.4.1. Mesure de la concentration d'ADN

Le dosage de la quantité d'ADN dans nos échantillons a été réalisé grâce à l'absorbance à 260 nm.

On a calculé la concentration d'ADN avec cette équation

- Dans le cas de l'ADN double brins : pour une DO = 1, la quantité d'ADN est 50 µg/ml.

Donc :

$$\begin{array}{ccc} \text{On a } 1 & \longrightarrow & 50 \mu\text{g/ml} \\ 0,126 & \longrightarrow & x \end{array}$$
$$x = \frac{0,126 * 50}{1} \quad \rightarrow \quad x = 6,3 \mu\text{g/ml}$$

Donc la concentration d'ADN dans l'échantillon analysé est de 6,3 µg/ml, le rendement est très faible. Ceci est du au fait que l'enzyme utilisée est la pepsine au lieu de la protéinase K ce qui a conduit probablement à l'élimination d'une grande partie de notre ADN avec les protéines. Nous constatons que cette étape est la plus délicate pour cela il faut l'effectuer en utilisant les produits et les conditions qui permettent son bon déroulement.

4.4.2. Mesure du degré de pureté de l'ADN

La vérification du degré de pureté de notre échantillon d'ADN a été réalisée par mesure des DO à 260 et 280 nm au spectrophotomètre.

Les mesures obtenues sont :

- DO à 260 nm = 0,126
- DO à 280 nm = 0,162

$$R = \frac{\text{DO}_{260 \text{ nm}}}{\text{DO}_{280 \text{ nm}}} \quad , \quad R = \frac{0,126}{0,162} \quad , \quad R = 0,78$$

Résultats et Discussion

Le rapport des densités optiques de notre échantillon est de 0,78 ce qui est très faible puisque pour une solution d'ADN pure le rapport doit être de 1,7 à 1,8. Donc l'ADN n'est pas pur parce que le degré de pureté de l'ADN est inférieur à 1,8.

Un ratio inférieur à 1,8 indique que notre échantillon est contaminé avec des protéines.

L'évaluation du rapport ($DO_{260}/DO_{280} = 0,78$), nous permet de dire que l'utilisation de la pepsine et du phénol non saturé dans un tampon (10 mM Tris, 1mM EDTA Tris à pH 8) ne nous a pas permis de réunir les bonnes conditions pour l'extraction optimale de l'ADN à partir de notre échantillon de sang. En effet, la pepsine agit de façon optimale en milieu acide et à 37°C (46). Certains auteurs ont décrit l'obtention de solutions d'ADN d'une pureté élevée en utilisant la protéinase K (47, 48,49) et du phénol saturé (50) dans ces conditions le rendement était de 116 µg/ml et le rapport évaluant la pureté de la solution d'ADN à 1,75.

CONCLUSION

Conclusion

Conclusion

L'étude de tous les êtres vivants sur le plan moléculaire passe par leur ADN. L'extraction de ce dernier implique des protocoles qui varient selon le type cellulaire dans notre cas nous avons réalisé l'extraction d'ADN à partir des globules blancs de moutons.

Dans notre protocole nous avons d'abord lysé les globules rouges pour les éliminer, puis les globules blancs ont été lysés et l'ADN récupéré après différentes extractions au phénol et au chloroforme puis précipitation à l'éthanol. La quantité d'ADN obtenue est très faible puisqu'elle est de 6.3 µg/ml, ceci est sûrement dû à la qualité des produits comme l'utilisation de la pepsine au lieu de la protéinase K ce qui a eu pour résultat l'obtention d'une solution d'ADN très contaminée par les protéines puisqu'elle présente pour le rapport DO260/DO280 une valeur égale à 0.78.

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

- Utiliser du sang prélevé à la jugulaire.
- Utiliser la protéinase K au lieu des autres enzymes protéolytiques.
- Utiliser du phénol saturé.
- Et renforcer les solutions de lyse par du KCl et du MgCl₂.

Il existe aujourd'hui des Kits commerciaux permettant de réaliser rapidement l'extraction et la purification à l'aide de réactifs prêts à l'emploi.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les objectifs de ce travail ont été :

- ❖ Extraction d'ADN à partir de sang de mouton
- ❖ Analyse de l'ADN par spectrophotométrie

Références

- 1. Dahm R** (2005). **Friedrich Miescher** and the discovery of DNA. *Dev Biol.* 278(2):274–288.
- 2. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl (Eds.)**. (1994). Preparation of genomic DNA p. 2.1.1-2.2.2. *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol.1. John Wiley & Sons, New York.
- 3. Botwell, D.D.L.** (1987). Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Anal. Biochem.* 162:463-465.
- 4. Xu, H., A.M. Jevnikar and V.E. Rubin-Kelly.** (1990). A simple method for the preparation of chromosomal DNA from cell culture. *Nucleic Acids Res.* 18:4943.
- 5. Albarino CG. V. Romanowski.** Phenol extraction revisited: a rapid method for the isolation and preservation of human genomic DNA from whole blood. *Mol Cell Probes* (1994); 8:423-7.
- 6. J Pathol.** (1978 Mar). Whole blood storage in citrate and phosphate solutions containing half-strength trisodium citrate: cellular and biochemical studies, 124 (3):125-39.
- 7. Wilson K** (1990) Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel FM & Brent R eds. *Current Protocols in Molecular Biology, New York: Greene Publ. Assoc. And Wiley Interscience*, pp. 241–245.
- 8. Syn CK, Swarup S** (2000) A scalable protocol for the isolation of large-sized genomic DNA within an hour from several bacteria. *Anal. Biochem.* 278: 86–90.
- 9. Flamm RK, Hinrichs DJ, Thomashow MF** (1984) Introduction of pAMb1 into *Listeria monocytogenes* by conjugation and homology between native *L. monocytogenes* plasmids. *Infect. Immun.* 44: 157–161.
- 10. Neumann B, Pospiech A, Schairrer HU** (1992) Rapid isolation of genomic DNA from Gram-negative bacteria. *Trends Genet.* 8: 332–333.
- 11.** (<https://www.qiagen.com/us/resources/molecular-biology-methods/dna/#Sizesandmolecularweights>) of various genomic DNAs).
- 12. Butler JM and Levin BC** (1998), *Trends Biotechnol* ,Forensic applications of mitochondrial DNA. Apr;16(4):158-62.

Références

13. **Sasaki Y, Sekiguchi K, Nagano Y, Matsuno R** (1993). Chloroplast envelope protein encoded by chloroplast genome. *FEBS Lett* 316: 93–98.
14. **Bendich, A. J.** (1993). Reaching for the ring : the study of mitochondrial genome structure. *Current Genetics*, 24 :279–290.
15. **D. Robert et J.-C. Roland Ed DOIN.** (1989). *Biologie végétale caractéristiques et stratégie évolutive des plantes Tome 1 Organisation cellulaire*
16. **J.-C. Roland, A. et D. Szollosi Ed MASSON** 2e édition 1979 *Atlas de biologie cellulaire.*
17. **Meyer S., Reeb C. & Bosdeveix R** (2004). *Botanique : biologie et physiologie végétale.* Maloine éd.
18. www.ucam.ac.ma/fssm/biologie/cours_td/.../STRUCTURE%20BACTERIENNE.pdf.
19. **L. M. Prescott, J. P. Harley, D. A. Klein,** (2000) *International microbiology official journal of the Spanish Society for Microbiology* ,ISSN 1139-6709, Vol. 3, N°. 3, , págs. 198-199.
20. **R. Guthrie and A. Susi,** (1963) “A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants,” *Pediatrics*, vol. 32, pp. 338-343,.
21. **Mendum TA, Sockett RE, Hirsch PR** (1998) .The detection of Gram-negative bacterial mRNA from soil by RT-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.*, 164: 369-373.
22. **Sands, M. K. [Ed]** (1970) *Nuffield Advanced Science Laboratory Guide.* London; Longman.
23. **Falconer, A. C. and Hayes, L. J.** (1986). The extraction and partial purification of bacterial DNA as a practical exercise for GCE Advanced level students. *Journal of Biological Education* 20 (1) 25–26.
24. **Marmur, J.** (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* 3, 208–218.
25. **Pochi R,** Genomic DNA. Subbarayan, Malancha (et al) Isolation of from Human Whole Blood. *BioTechniques* December 2002;33 SRC - *GoogleScholar*:1231-4.

Références

26. **Boeynaems JM, De Leener A, Dessars B, Villa-Lobos HR, Aubry JC, Cotton F, Thiry P.** (2004) Evaluation of a new generation of plastic evacuated blood-collection tubes in clinical chemistry, therapeutic drug monitoring, hormone and trace metal analysis. *Clin Chem Lab Med*; 42:67–71.
27. **Tan SC, Yiap BC** (2009). DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol*; 574398.
28. **Sambrook J, Russell DW** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
29. **Carpi FM, 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.
30. **Ebeling W et al. (1974)**, *Eur J Biochem*; Vol. 47, pp. 91-97.
31. **Kirby KS. 1957.** A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: Evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. *Biochem. J.* 66:495-504.
32. **Yagi N, Satonaka K, Horio M, Shimogaki H, Tokuda Y, Maeda S** (1996). "The role of DNase and EDTA on DNA degradation in formaldehyde fixed tissues". *Biotechnic & Histochemistry.* 71 (3): 123–129.
33. **Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, McKee R, Turck A, Eisenberg A** (1989). A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* 17 (20):8390.
34. **Price CW, Leslie DC, Landers JP** (2009). Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip. *Lab Chip.* 9 (17):2484–2494.
35. **Herzer S. DNA purification.** *Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide.* New York: John Wiley & Sons, Inc. (2001): 167–196.
36. **Chacon-Cortes D, Haupt L, Lea R, Griffiths L** (2012). Comparison of genomic DNA extraction techniques from whole blood samples: a time, cost and quality evaluation study. *Mol Biol Rep.* 39:5961–5966.
37. **Birnboim, H. C., and J. Doly. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513.

Références

38. **Kado, C. I., and S. T. Liu. (1981).** Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145:1365- 1373.
39. **T. Bienvenu, C. Meunier, S. Bousquet, S. Chiron, L. Richard, A. Gautheret-Dejean, J.-F. Rouselle, D. Feldmann(1999),** Laboratoire de biochimie et génétique moléculaire, Hôpital Cochin, 123, boulevard de Port-Royal, 75014 Paris, 77-84.
40. **Bahi, A and Pfenninger, M. (1996).** A rapid method of DNA isolation using laundry detergent. *Nucleic Acids Research.* 7: 1587-1588.
41. **Hirsch-Marie H., Conte M (1967).** Etude des protéases acides du liquide séminal humain. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 49, 174-155.
42. https://www.cedarlanelabs.com/Reagents/Listing/Lympholyte_Special).
43. **Colette, Galet, et al (2013).** Extraction et purification de l'ADN. Matériaux et des méthodes.
44. **Delpech M, Bienvenu T, Meunier C, Bousquet S, Chiron S, Richard L. (1999).** Les techniques d'extraction de L'ADN à partir d'un échantillon sanguin. *Annals de biologie clinique*, 57 (1): 77-84.
45. SOCIETE SIGMA ALDRICH, Référence catalogue : 93283
46. **Pr. A. Raisonnier .(21 janvier 2004) .**Digestion - Détoxification 65/163.
47. Qiagen Inc. (2005) Proteinase K Reference Sheet. www.qiagen.com (accessed 2010).
48. **Ebeling, Il'., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D. and Lang, H. (1974)** Proteinase K from Tritirachium album limber, *Eur. J. Biochem.* 47:91-97.
49. **Jeanpierre, M. (1987).** A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* 15:9611.
50. **RF Boyer (1986)** Modern experimental biochemistry, Addison-Wesley Publishing Co, Reading (Mass., USA) p. 248-50 [discussion des méthodes de précipitation].