

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



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE VEGETALE

N°...../SNV/2015

## MÉMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de

## MASTER EN BIOLOGIE

**Spécialité:**

**GÉNÉTIQUE FONDAMENTALE ET APPLIQUÉE**

*Thème réalisé au Laboratoire de Biochimie*

## THÈME

**Extraction de l'ADN à partir de sang de mouton**

Présenté par

**DOUAOUDI Halima**

DEVANT LE JURY

<i>Président</i>	: Pr. CHIBANI A.	U. Mostaganem
<i>Encadrante</i>	: Pr. Dalache.F.	U. Mostaganem
<i>Examineur</i>	: Dr ABBASSENE F.	U. Mostaganem

Soutenue publiquement le .11/07/2019

# Remerciements

*Tout d'abord, je voudrais remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce travail*

*En second lieu, je tiens à remercier mon encadreur.*

*Pr DALACHE. F pour son attention de tout instant sur mon travail, pour ses conseils avisés, son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de ce travail.*

*Mon vif remerciement au Pr CHIBANI. A pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*Au Dr ABBASSENE F. d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail*

*Je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont aidé pendant la réalisation de mon projet.*

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à :*

- ✓ *Ma mère et mon père.*
  
- ✓ *A mes sœurs et mon frère.*
  
- ✓ *Tous mes ami(e) s les plus chers.*

## **Résumé**

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'extraction d'ADN à partir de sang de mouton. Nous avons procédé selon la méthode de salting-out. 14 échantillons ont été soumis à l'extraction d'ADN. Parmi l'ensemble des échantillons 8 ont montré une concentration d'ADN plus ou moins grande. Cependant un seul échantillon a montré un degré de pureté convenable. L'électrophorèse a permis d'observer la présence d'ADN dans seulement 5 échantillons. Un échantillon a montré une smear synonyme d'une dégradation de l'ADN alors que pour les quatre autres une seule bande était présente ce qui signifie que l'ADN a été récupéré en bon état.

**Mots clés :** Le sang, la lyse, salting-out, extraction de l'ADN, électrophorèse

## **Abstract**

In our work, we have been interested in the extraction of DNA from sheep blood. We proceeded according to the salting-out method. 14 samples were subjected to DNA extraction. Among all the samples, 8 should more or less concentration of DNA. However, only one sample showed a suitable degree of purity. Electrophoresis revealed the presence of DNA in only 5 samples. One sample showed a smear synonymous of DNA degradation, while for the other four, a single band was present meaning that the DNA was recovered in good state.

**Key words:** blood, lysis, salting-out, DNA extraction, electrophoresis.

## ملخص

في عملنا ، قمنا باستخراج الحمض النووي من دم الغنم. تابعنا وفقاً لطريقة التمليح. تعرضت 14 عينة لاستخراج الحمض النووي. من بين جميع العينات أظهرت 8 عينات تركيز الحمض النووي أكثر أو أقل. ومع ذلك ، أظهرت عينة واحدة فقط درجة مناسبة من النقاء. سمحت الهجرة الكهربائية بملاحظة وجود الحمض النووي في 5 عينات فقط. أظهرت إحدى العينات وجود لطخة مرادفة لتدهور الحمض النووي بينما كانت هناك قطعة مفردة بالنسبة للأربعة الأخرى وهذا يعني أن الحمض النووي في حالة جيدة .

**الكلمات المفتاحية:** الدم ، التحلل ، التمليح ، استخراج الحمض النووي ، الهجرة الكهربائية

# SOMMAIRE

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations.....	i
Liste des figures.....	iii
Liste des tableaux.....	iv
Introduction générale.....	01
1. Partie bibliographique.....	02
1.1.L'ADN et la cellule chez les êtres vivants.....	03
1.1.1. Introduction.....	03
1.1.2. La cellule.....	03
1.1.3. La cellule eucaryote.....	03
1.1.3.1. La membrane plasmique.....	04
1.1.4. Définition de l'acide désoxyribonucléique : ADN.....	05
1.1.5. Localisation de l'ADN dans la cellule.....	05
1.1.6. Structure de l'ADN.....	05
1.1.7. Conservation des acides nucléiques.....	06
1.1.7.1 Conservation de l'ADN.....	06
1.1.7.2. Conservation de l'ARN.....	08
1.1.8. Dénaturation de l'ADN (Fusion de l'ADN).....	08
1.2. Le sang.....	08
1.2.1. Les composants du sang.....	09
1.2.1.1. Le plasma.....	09
1.2.1.2. Les globules rouges.....	09
1.2.1.3. Les plaquettes.....	10
1.2.1.4. Les globules blancs.....	10
1.2.2. Collecte de sang.....	11
1.2.2.1. Les différents tubes de prélèvement.....	11
1.3. L'extraction d'ADN.....	11
1.3.1. Introduction.....	11

1.3.2. Lyse des cellules.....	12
1.3.2.1. Lyse mécanique.....	12
1.3.2.2. Lyse chimique.....	13
1.3.3. Extraction de l'ADN à partir d'une cellule animale.....	14
1.3.3.1. Elimination des globules rouges.....	14
1.3.3.2. Lyse des globules blancs.....	14
1.3.3.3. Précipitation et élimination des protéines.....	15
1.3.3.4. Précipitation et récupération de l'ADN.....	16
1.3.4. L'extraction au phénol-chloroforme.....	16
1.3.4.1. L'extraction phénolique.....	16
1.3.4.2. L'extraction au chloroforme.....	17
1.3.5. Précipitation à l'alcool éthylique .....	17
1.3.6. Précipitation à l'isopropanol.....	17
1.3.7 Extraction de l'ADN plasmidique bactérien.....	17
1.3.8. Séparation ADN/ARN par centrifugation isopycnique sur gradient de chlorure de césium.....	18
1.4.1. Quantification de l'ADN.....	18
1.4.2. Dosage des acides nucléiques.....	19
1.5. Electrophorèse.....	19
1.5.1. Définition d'électrophorèse.....	19
1.5.2. Les différents types d'électrophorèses .....	20
1.5.3. Les différentes interactions établies et leurs conséquences sur la densité des macromolécules nucléiques .....	23
1.5.4. Tampon de charge.....	24
1.5.5. Migration électrophorétique et visualisation des fragments d'ADN.....	24
2. Matériels et méthodes.....	26
2.1 Matériels.....	27
2.2 Méthodes.....	29
2.2.1 Extraction d'ADN.....	29
2.2.1.1 Lyse des globules rouges.....	30
2.2.1.2 La lyse des globules blancs et élimination des protéines.....	30
2.2.1.3. Précipitation de l'ADN.....	31
2.2.2. Conservation de l'ADN.....	31
2.2.3. Dosage et évaluation de la pureté des échantillons d'ADN.....	31

2.2.4. Electrophorèse des échantillons d'ADN.....	32
3. Résultats et discussions.....	33
3.1. Collecte de sang des moutons.....	34
3.2. Extraction de l'ADN.....	34
3.2.1. La lyse des globules rouges.....	34
3.2.2. La lyse des globules blancs.....	35
3.2.3. Précipitation et élimination des protéines.....	35
3.2.4. Précipitation de l'ADN.....	35
3.3. Dosage et pureté des solutions d'ADN.....	36
3.3.1 Le dosage de l'ADN dans les échantillons.....	37
3.3.2 Evaluation du degré de pureté des échantillons d'ADN.....	39
3.4. Electrophorèse des échantillons d'ADN.....	40
Conclusion.....	43
Références bibliographiques.....	46

## Liste des abréviations

**A** : Adénine  
**A260/A280** : rapport de densité optique  
**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**ADNg**: ADN génomique  
**ANDases**: Nucléase de l'ADN  
**ADNn**: ADN nuclear  
**ARN**: acide ribonucléique  
**BET**: Bromure d'éthidium  
**[C]**: Concentration  
**C**: Cytosine  
**CsCl**: chlorure de césium  
**DO**: Densité Optique  
**DF** : Facteur de dilution  
**EDTA**: Acide éthylène-diamine-tétraacétique  
**G**: Guanine  
**GR** : globules rouges  
**H** : Hydrogène  
**HCl**: Acide chlorhydrique  
**K +**: potassium  
**Kb**: Kilobase  
**Kr**: Coefficient de retardement dû au gel  
**Log  $\mu$ o** : La mobilité de la molécule en milieu liquide  
**M** : molaire  
**Mb** : mégabase  
**mM** : millimolaire  
**Na+** : sodium  
**NaCl** : Chlorure de sodium  
**NaOH** : hydroxyde de sodium  
**ng**: nanogramme  
**nm**: nanomètre  
**P** : puretés

**pb:** Paires de bases

**pH:** Potentiel d'hydrogène

**RNases:** Nucléase de l'ARN

**Rpm :** round tour par minute

**T:** Thymine

**SDS :** dodecyl sulfate de sodium

**SDS-PAGE:** dodecyl sulfate de sodium polyacrylamide gel electrophoresis

**TBE:** Tris borique EDTA

**TE :** Tris – EDTA

**Tm :** Température de fusion

**Tris:** tris aminométhane

**UV :** ultraviolet

**V :** volume

**v:** voltage

**μM:** micromolaire

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : La structure de la membrane cellulaire.....	04
<b>Figure 2</b> : La structure de l'ADN.....	06
<b>Figure 3</b> : Rupture de la membrane cellulaire et extraction de l'ADN génomique.....	15
<b>Figure 4</b> : Mécanisme proposé pour la séparation de fragments d'ADN par électrophorèse en champ pulsée.....	23
<b>Figure 5</b> : Premier lavage.....	34
<b>Figure 6</b> : Deuxième lavage.....	34
<b>Figure 7</b> : Troisième lavage.....	34
<b>Figure 8</b> : Précipitation et élimination des protéines.....	35
<b>Figure 9</b> : Résultat de la précipitation de l'ADN.....	36
<b>Figure 10</b> : Résultat d'électrophorèses des échantillons.....	41

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Dosage de l'ADN dans les échantillons.....	38
<b>Tableau 2:</b> Les densités et rapport de l'évaluation de la pureté des échantillons d'ADN.....	39
<b>Tableau 3:</b> les résultants des électrophorèses des tous échantillons.....	41

# Introduction générale

# Introduction générale

---

## Introduction

La connaissance de tout être vivant, procaryote ou eucaryote animal ou végétal, nécessite l'exploration de son patrimoine génétique par différentes techniques de biologie moléculaire. Comme toute autre discipline scientifique, la génétique moléculaire a connu une inflation des technologies. De nouvelles issues sont alors apparues présentant de nouveaux avantages: facilité d'utilisation, meilleurs résultats (concentration et pureté de l'ADN extrait) et gain de temps. Tous ces paramètres répondent à une demande accrue et diversifiée. (Nouaïria, 2010). L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire. Différents tissu peuvent être utilisés selon le but à atteindre mais de manière générale le sang est privilégié, car il est le plus facile à prélever en ce qui concerne les animaux. L'extraction de l'ADN, consiste en l'isolement de leucocytes qui sont des cellules nucléées du sang total, après la lyse hypotonique des globules rouges. Puis des traitements par un détergent (SDS) et la protéinase K permettront de dégrader les membranes plasmiques des globules blancs. L'ADN nucléaire ainsi libéré est associé aux différentes protéines qui seront digérées et éliminées par un des traitements suivants :

- ✓ Les solvants organiques (Méthode au phénol-chloroforme).
- ✓ Les solvants non organiques (Méthode au NaCl).
- ✓ Les micro-colonnes de résines échangeuses d'ions.
- ✓ les kits

Les méthodes d'extraction se différencient aussi par leur coût et surtout la dangerosité des produits utilisés.

Dans cette optique, Nous nous sommes intéressées dans notre travail à :

- ✓ L'extraction de l'ADN, à partir de sang de mouton, par le NaCl.
- ✓ Le dosage et l'évaluation du degré de pureté de l'ADN extrait.
- ✓ Electrophorèse des échantillons d'ADN.

# Partie bibliographique

# Partie bibliographique

---

## 1.1. L'ADN et la cellule chez les êtres vivants

### 1.1.1. Introduction

L'organisation de cellules appartenant aux organismes vivants présente des ressemblances, malgré leurs différences d'origine, de taille et de forme. Certains organismes sont constitués de cellules dont le noyau n'est pas séparé du cytoplasme par une frontière individualisée : ce sont les procaryotes. D'autre au contraire ont un noyau nettement individualisé : ce sont les eucaryotes (**Durand et al., 1967**). Tous les organismes vivants contiennent le support de l'information génétique, un acide nucléique qui est à l'origine de toutes leurs caractéristiques. Cet acide nucléique est dans presque tous les cas un acide désoxyribonucléique.

### 1.1.2. La cellule

La cellule est l'unité de base structurale et fonctionnelle qui constitue tous les êtres vivants. La cellule est de petite taille, elles se différencient pour répondre à une fonction particulière, les organites qu'elle contient sont plus petits encore; aussi est t-on obligé d'utiliser des appareils grossissants pour les observer. Les études morphologiques de la cellule ont commencé avec l'emploi du microscope photonique (**Durand et al., 1967**).

### 1.1.3. La cellule eucaryote

La cellule d'eucaryote est en générale beaucoup plus volumineuse, jusqu'à mille fois plus que la cellule de procaryote (**Gooffrey, 1999**). La cellule eucaryote est bordée d'une membrane plasmique, mais elle est beaucoup plus complexe car elle contient aussi un noyau, toute une série d'organites cytoplasmiques ainsi qu'un cytosquelette.

Le noyau est bordé d'un système de deux membranes concentriques, appelées membranes nucléaires, interne et externe. La membrane externe prolongeant le réticulum endoplasmique (**Geoffrey, 1999**). Les membranes nucléaires interne et externe, se soudent au niveau des complexes du pore nucléaire, seuls tunnels par lesquels les petites molécules

## Partie bibliographique

polaires et les macromolécules transitent entre le nucléoplasme et le cytoplasme (Geoffrey, 1999).

### 1.1.3.1. La membrane plasmique

La membrane cellulaire joue un rôle de protection, elle assure les échanges entre la cellule et son milieu, elle délimite le compartiment cellulaire et le sépare du milieu environnant. Elle assure un rôle de barrière en empêchant les molécules cellulaires de partir et les molécules extérieures d'entrer librement. La membrane est un assemblage de phospholipides et de protéines avec une épaisseur totale d'environ 10 nm (Robert *et al.*, 1994). La bicouche lipidique est imperméable à la diffusion des macromolécules (Figure 1), des solutés organiques polaires et des ions-organiques. Cette membrane contrôle les échanges entre le milieu intérieur et le milieu extérieur. Elle assure donc l'approvisionnement de la cellule et l'élimination des déchets (Alberts *et al.*, 1994). D'où la perméabilité sélective de la membrane plasmique. En effet, les molécules liposolubles et les gaz passent facilement au travers tandis que, l'existence de la partie apolaire au centre de la bicouche bloque le passage des ions inorganiques ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ ), des grosses molécules neutres et des solutés organiques polaires (sucres, acides aminés ...) (Shechter, 1997). D'où la nécessité de transporteurs spécifiques pour assurer la diffusion à travers la membrane. La présence de protéines membranaires (protéines périphériques et transmembranaires) rend possible ce passage (Raven *et al.*, 2003).

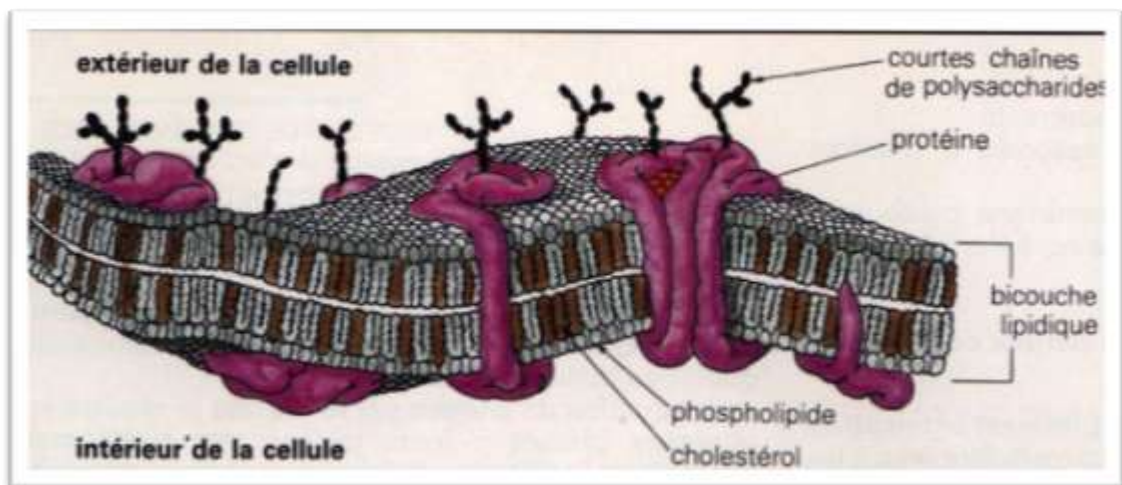


Figure 1: La structure de la membrane cellulaire (Robert *et al.*, 1994).

# Partie bibliographique

---

## 1.1.4. Définition de l'acide désoxyribonucléique : ADN

L'ADN est le support de l'information génétique chez presque tous les êtres vivants. (Avery *et al.*, 1944). L'existence d'un code génétique permettant de traduire l'information contenue dans l'ADN en une séquence d'acides aminés a été décrite par Nirenberg et Khorana en 1961 (Khorana, 1961; Nirenberg *et al.*, 1961). En effet, tous les organismes vivants que ce soit les animaux, les végétaux, les bactéries ou la plupart des virus, sont unifiés par une structure de base qui est à l'origine de toutes leurs caractéristiques, il s'agit de l'ADN. L'étude de toute forme de vie passe donc par l'étude structurale et fonctionnelle de cette molécule (Griffith *et al.*, 2001).

## 1.1.5. Localisation de l'ADN dans la cellule

Chez les êtres procaryotes, tels que les bactéries et la plupart des virus, l'ADN est libre dans le plasma de la cellule. La molécule d'ADN est continue et se trouve dans le même état à tout moment de la vie de la cellule.

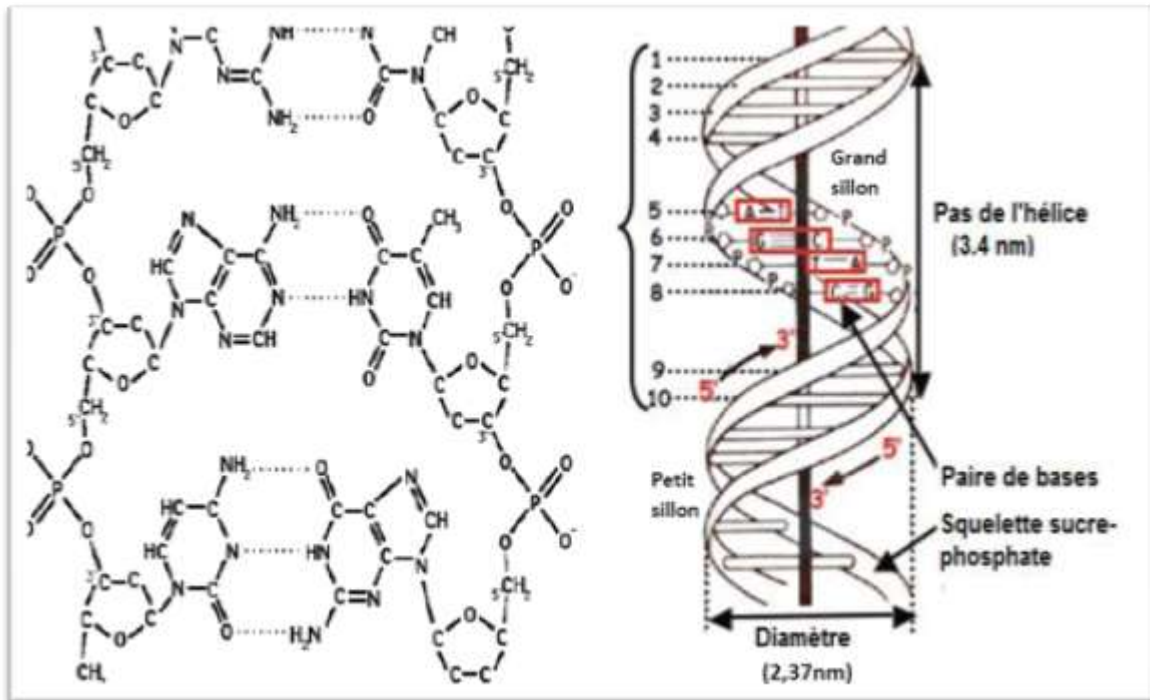
Chez les êtres eucaryotes, qui sont dans leur majorité pluricellulaires, les cellules des organismes s'organisent en tissu. Le tissu est un ensemble de cellules de même structure et fonction. L'ADN se trouve séparé du reste de la cellule par une paroi dite nucléaire, ainsi se forme le noyau de la cellule. L'ADN se trouve alors suspendu dans le noyau pendant la phase de repos de la cellule. C'est la chromatine, elle est enroulée autour de molécules de protéines nommées histones qui servent de support et permettent le fonctionnement de certains gènes (Lacan, 2011) Lors de la division cellulaire, l'ADN s'organise sous forme très condensée qui s'appelle chromatine. L'ADN est donc sous forme séparée en un nombre déterminé de chromosomes. Chaque chromosome est formé par une molécule d'ADN (Fontaine, 2003).

## 1.1.6. Structure de l'ADN

Les acides désoxyribonucléiques sont de très grandes molécules composées de deux chaînes poly-nucléotidiques enroulées l'une autour de l'autre pour former une double hélice régulière (Aouf, 2015), les deux chaînes étant complémentaires. L'ADN est présent dans toutes les cellules (Pierre, 2000) et qui comporte trois types de composants chimiques : du phosphate, un sucre dit désoxyribose et quatre bases azotées : l'Adénine (A), la Thyminine (T),

## Partie bibliographique

la Cytosine (C) et la Guanine (G) (Karp, 2004). Chaque base est fixée sur un 2-désoxyribose par une liaison *N*-glycosidique pour former un nucléoside. Lorsqu'un nucléoside est lié à un ou plusieurs phosphates, il constitue un nucléotide. A et G sont appelées bases puriques et forment de grandes briques, alors que C et T prennent le nom de bases pyrimidiques formant de petites briques (Voet *et al.*, 2005). Les bases sont généralement référencées par leurs premières lettres. (Griffith *et al.*, 2001). La figure 2, montre la structure de l'ADN.



### 1.1.7. Conservation des acides nucléiques

L'ADN est une molécule très robuste puisqu'elle est très protégée dans les cellules et en même temps très fragile en dehors. En effet, une fois en dehors de la cellule, elle peut être sujette à différentes attaques causées par les paramètres physico-chimiques.

#### 1.1.7.1 Conservation de l'ADN

L'ADN peut être conservé dans un tampon (10mM Tris pH=8) additionné d'EDTA (1mM) à 4°C. A pH 8, la dégradation de l'ADN est notablement plus faible qu'à pH 7.

L'ADN peut être également conservé à -20°C dans le même tampon mais des cycles successifs de congélation/décongélation entraînent des cassures des acides nucléiques de

## Partie bibliographique

---

grande taille. D'où la nécessité de réaliser des fractions aliquotes pour la conservation si nécessaire (**Kamoun, 2003; Ameziane et al, 2005**).

Dans l'extraction de l'ADN, il faut éviter les hautes températures, la présence des agents dénaturants et la présence d'une force électrique. Les nucléases doivent être détruites pour éviter la dégradation de l'ADN.

### ❖ La température

Si elles sont soumises à des températures élevées, les molécules d'ADN sont désappariées ou dénaturées. En effet, l'apport en énergie thermique commence à rompre les liaisons hydrogène inter-brins. Cette température dépend de la quantité de liaisons hydrogènes présent. Les appariements A-T (deux liaisons hydrogènes) sont plus sensibles que G-C (trois liaisons), et sont donc rompus les premiers. La température de dénaturation dépend par conséquent du pourcentage de base (G+C), de la taille de l'ADN, et de la salinité du milieu. En général, la température de dénaturation de l'ADN est autour de 94°C. Les conditions d'extraction de l'ADN et les différentes incubations au cours du protocole d'extraction doivent être considérablement loin de cette température extrême. (**Griffith et al., 2001**)

### ❖ Les enzymes

Les nucléases sont présentes naturellement dans les cellules vivantes dans le but de faire le ménage pendant le métabolisme des acides nucléiques. Les nucléases sont des phosphodiesterases et elles catalysent l'hydrolyse des liaisons phosphodiester entre les nucléotides. Certaines enzymes clivent spécifiquement l'ADN (des ADNases) ou de l'ARN (RNases) mais d'autres ne sont pas spécifiques et sont appelées tout simplement nucléases (**Griffith et al., 2001**).

### ❖ Autres

Le pH, la force ionique et les agents dénaturants tels que l'urée et le formamide peuvent influencer la force de stabilisation des liaisons hydrogènes.

# Partie bibliographique

---

## ❖ Les principes de manipulation et conservation de l'ADN

Des précautions sont à prendre de manière générale lors des manipulations de l'ADN, parmi elles nous pouvons citer :

- Eviter les pipetages vigoureux.
- Utiliser le matériel conçu pour les manipulations de génétique moléculaire.
- Tout le matériel doit être autoclavé au préalable.
- Stockage de l'ADN à -20°C.
- Mettre l'ADN dans une solution tampon, la faire passer sur toutes les parois du tube. Laisser une nuit à 4°C avant toute utilisation.
- Ne pas vortexer l'ADN génomique car des cassures mécaniques peuvent se produire.

### 1.1.7.2. Conservation de l'ARN

Du fait de la très faible stabilité des ARN, les échantillons sont stockés à -80°C après addition de 3 vol d'éthanol. En l'absence de sels, ils restent en solution. Une aliquote représentative peut être prélevée après agitation puis ajustée avec l'acétate de sodium 0,3M à pH 5,2 ce qui provoque la précipitation de l'ARN brièvement à -20°C. La centrifugation de la préparation permettra de collecter l'ARN. (**Kamoun, 2003**)

### 1.1.8. Dénaturation de l'ADN (Fusion de l'ADN)

Lorsque l'ADN double brin est chauffé à une température dite de fusion ou  $T_m$ , les deux brins se séparent suite à la rupture des liaisons H qui les maintiennent appariés. La  $T_m$  est la température où 50 % de l'ADN est déroulé (**Basdevant, 2003; Cao, 2004**). La double hélice se défait, il y a perte de la structure secondaire, on dit que l'ADN est dénaturé. Cette dénaturation peut être évaluée par spectrophotométrie à 260 nm. Le chauffage généralement est réalisé de 10 à 15 minutes de 90°C à 95°C (**Muller, 2002**).

## 1.2. Le sang

Le sang est une suspension de cellules dans une solution aqueuse d'électrolyte, de protéines et de molécules organiques diverses. Il est composé de plasma, 45% de globules rouges, le reste étant partagé entre les leucocytes et les plaquettes (**Fung, 1993**). Le sang est

# Partie bibliographique

---

un produit de santé naturel, labile et à très haut risque. C'est un produit qui combine en fait trois risques de nature très différente : la qualité propre du produit (accidents de transmissions d'agents pathogènes), son administration, et les accidents de surcharge volumique liés à l'indication thérapeutique. (**Amalberti, 2009**)

## 1.2.1. Les composants du sang

Le sang est composé d'une phase liquide: le plasma, et de composants solides: les globules rouges, qui transportent l'oxygène; les globules blancs, qui préviennent ou combattent les infections; et les plaquettes, qui aident à empêcher les saignements (**Raetz, 2017**).

### 1.2.1.1. Le plasma

Le plasma est composé en grande partie d'eau (d'environ 90%), dans laquelle sont dissoutes de nombreuses substances chimiques, dont les suivantes:

Protéines par exemple les protéines de coagulation sanguine représentent 7% de la totalité des protéines, hormones, minéraux, vitamines, électrolytes et anticorps.

Les cellules en suspension dans le plasma comprennent les globules rouges, les plaquettes et les globules blancs (neutrophiles, monocytes, éosinophiles, basophiles et lymphocytes).

Le plasma est une phase liquide, donc de densité inférieure à celle des éléments solides et il est donc séparable de ceux-ci par simple centrifugation (**Raetz, 2017**).

### 1.2.1.2. Les globules rouges

Les globules rouges ont une durée de vie de 120 jours et sont surtout constitués d'hémoglobine (**Marieb, 2009**). Il s'agit d'une molécule comprenant deux parties : la partie hème constituée de fer et la partie globine, une composante protéique (**Wilson et al., 2010**).

Un globule rouge est une petite quantité de solution d'hémoglobine encapsulée par une membrane visco-élastique spécifique (**Mohandas et al., 1994**). Parmi les cellules sanguines adultes, les globules rouges (GR), ou érythrocytes, ou encore hématies, sont de loin les plus nombreux (environ 5 millions par mm<sup>3</sup> de sang). Ils se présentent sous la forme de petits disques biconcaves d'un diamètre d'environ 8 µm.

## Partie bibliographique

---

Les globules rouges sont des cellules anucléées qui forment la majeure partie des cellules sanguines, et 45% du volume sanguin total.

Etant dépourvues de noyaux, les globules rouges ne sont pas utiles pour l'extraction de l'ADN. On élimine ces éléments au début de l'extraction (**Dupire, 2012**). La coloration rouge des hématies est indicatrice de leur présence. Dès qu'on obtient une coloration blanchâtre, on s'assure de l'élimination des globules rouges.

### 1.2.1.3. Les plaquettes

Les plaquettes sont des petits fragments cellulaires de forme irrégulière qui circulent librement dans le sang. Les plaquettes sanguines ou thrombocytes sont des particules cytoplasmiques sans noyau comme les globules rouges. Elles sont plus petites que ces derniers et mesurent de 2 à 4 micromètres. Mais contrairement aux globules rouges, elles contiennent des mitochondries, c'est à dire qu'elles sont capables de respirer et de produire une grande quantité d'énergie. Elles contiennent de nombreux enzymes. Les plaquettes ont une durée de vie de sept à dix jours. Elles jouent un rôle essentiel dans l'hémostase. (**Alberts et al., 2007**).

### 1.2.1.4. Les globules blancs

Les globules blancs viennent de la moelle osseuse, une cellule souche se divisera pour donner les différents leucocytes. Il existe trois types de globules blancs : les lymphocytes, les monocytes et les granulocytes. Les globules blancs, appelés aussi leucocytes, ont pour rôle de protéger et de défendre l'organisme contre les bactéries, les substances étrangères, les virus, les parasites, les toxines et les cellules tumorales (**Marieb, 2009**).

La numération des globules blancs indique leur nombre dans un échantillon sanguin de 1 mm<sup>3</sup>. Elle est donc établie en fonction du volume. Les lymphocytes constituent la principale source d'ADN à partir du sang (**Cloutier et al., 2014**). Chez les animaux et l'homme le sang est le tissu le plus facile à collecter.

# Partie bibliographique

---

## 1.2.2. Collecte de sang

Certaines analyses nécessitent des conditionnements contenant au préalable un anticoagulant bien spécifique et d'autres pas; il faut donc bien s'assurer que les tubes sélectionnés correspondent aux analyses demandées et que les volumes correspondants soient suffisants et adéquats. On veillera à une bonne homogénéisation, prudente, du sang dans les tubes pour une répartition correcte de l'adjuvant présent dans les tubes.

### 1.2.2.1. Les différents tubes de prélèvement

Selon les analyses ultérieures auxquelles sera soumis l'échantillon de sang différents adjuvants peuvent être ajoutés :

**Les tubes sans anticoagulant :** le tube sec sans additif doit être prélevé en première position

**Les tubes avec anticoagulants :** le tube à citrate de sodium, le tube à héparinate de lithium ou de sodium, le tube à fluorure de sodium et les tubes EDTA (anticoagulant et inhibiteur des nucléases, permettant ainsi à l'ADN de rester intact et de ne pas se dégrader), ont permis de constituer une banque d'ADN.

- Si le tube est trop rempli, risque de concentration du sang ou de début de coagulation.
- Si le tube n'est pas assez rempli, risque de dilution du sang.

Le prélèvement sanguin préconisé pour l'extraction d'ADN nécessite l'utilisation des tubes avec un anticoagulant EDTA qui est un chélateur ou un inhibiteur de l'action des enzymes DNase ou nucléase (**Cussenot, 1999**).

**Transport :** Les conditions de transport (chaleur élevée ou trop basse) et les délais d'acheminement trop longs interfèrent dans la qualité des prélèvements.

## 1.3. L'extraction d'ADN

### 1.3.1. Introduction

Au cours de ces dernières années, la biologie moléculaire a modifié considérablement le diagnostic de routine des maladies infectieuses, génétiques et néoplasiques. Toute étude de

## Partie bibliographique

---

génétiq ue moléculaire implique la disposition d'échantillon d'acides nucléiques. Les techniques d'extraction d'acides nucléiques sont relativement simples. Il convient simplement d'éviter toute destruction enzymatique ou mécanique. En effet les acides nucléiques qui sont stables dans la cellule intacte, deviennent très vulnérables à la digestion par les nucléases endogènes une fois la cellule lysée. (Aouf, 2015)

En 1869: Fredrich Micher utilisa une protéase (pepsine: découverte en 1836) pour séparer le noyau du cytoplasme. Il a observé une petite tache de poudre grise qui s'était détachée d'un liquide claire jaunâtre (cytoplasme). Il l'appela nucléine. L'extraction d'acides nucléiques d'un matériau biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité des débris cellulaires.

Les principales étapes pour l'extraction d'acide nucléique

- ❖ Lyse des cellules
- ❖ Elimination des protéines et des lipides
- ❖ Elimination d'un acide nucléique donné : en effet, un « extrait acides nucléiques » brut contient en mélange ARN, ADN génomique et ADN plasmidique pour les bactéries. (Kamoun, 2003)

### 1.3.2. Lyse des cellules

Pour lyser les cellules on peut utiliser soit un système mécanique soit un système chimique suivant le type de cellules concerné.

#### 1.3.2.1. Lyse mécanique

Pour la lyse mécanique, on utilise de préférence des méthodes ou systèmes qui ne dénaturent pas l'ADN, c'est-à-dire qui ne « cassent » pas les molécules d'ADN. Il faut donc que la méthode utilisée ne génère pas trop de forces de cisaillement: on utilise le choc thermique (cycles de congélation/ décongélation) ou le choc osmotique, On délaisse les méthodes d'agitation ; on délaisse aussi l'emploi des ultra-sons. Par exemple élimination des globules rouges, après une décongélation du sang, on fait éclater les globules rouges du sang par choc osmotique en les mélangeant à une solution hypotonique ou solution de lyse des globules rouges (Ould Ahmed *et al.*, 2010).

## Partie bibliographique

---

Ces méthodes ne sont pas adaptées à l'extraction d'ADN à partir des cellules procaryotes. En effet, les traitements mécaniques utilisés pour casser des cellules procaryotes doivent être beaucoup plus draconiens que ceux utilisés pour les cellules eucaryotes: les bactéries, cellules de petite taille peuvent se glisser entre les faisceaux de forces de cisaillement et sont donc parfois très difficiles à lyser mécaniquement. Les traitements mécaniques employés pour les procaryotes sont donc trop dénaturant pour l'ADN. La lyse mécanique est préférentiellement réservée aux cellules eucaryotes. (**Kamoun, 2003**)

### 1.3.2.2. Lyse chimique

Pour les cellules procaryotes on préférera une lyse chimique. Fragilisation enzymatique des parois de cellules bactériennes, végétales et fongiques. La paroi est un obstacle majeur à la lyse cellulaire. Pour rendre efficace la désorganisation de la membrane plasmique, des hydrolases spécifiques peuvent être employées :

Ce traitement crée des brèches dans la paroi. Avec la perte de protection assurée par la paroi contre la forte pression osmotique intracellulaire, la cellule gonfle jusqu'à rupture de la membrane plasmique (**Malek, 2013**).

On réalisera obligatoirement une lyse chimique pour extraire sélectivement les plasmides des bactéries. Les conditions de cette lyse chimique permettent de récupérer dans le lysat uniquement les plasmides sans l'ADN génomique, on parle alors de lysat clair. Pour arriver à cette extraction sélective la lyse chimique est obligatoire, la lyse mécanique ne permet d'obtenir qu'un lysat brut c'est-à-dire qui contient à la fois ADN génomique et plasmides.

La désorganisation des membranes par des détergents et solubilisation des lipides membranaires Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) appelé aussi laurylsulfate de sodium, sarcosyl sont des détergents qui vont solubiliser les lipides membranaires sous forme de micelles. Cela permet de créer des pores membranaires suffisamment larges pour libérer le contenu du cytoplasme hors des cellules. Suivant leur force (chargés ou pas), les détergents vont aussi plus ou moins dénaturer les protéines membranaires. La dénaturation des protéines de la membrane plasmique contribue également à la lyse de la cellule (**Ameziane, 2005**).

## Partie bibliographique

---

### 1.3.3. Extraction de l'ADN à partir d'une cellule animale

Le matériel biologique de base est constitué du sang collecté dans des tubes EDTA. Un certain nombre de méthodes ont été décrites pour l'extraction de l'ADN génomique à partir du sang total (**Pochi, 2002**). Les leucocytes (globules blancs) sanguins représentent la source majeure des acides nucléiques dans le sang. L'extraction de l'ADN génomique peut être faite à partir de ce sang entier et congelé (**Ould Ahmed, 2010**). La préparation d'ADN consiste en une digestion des membranes cellulaire et nucléaire des cellules pour libérer l'ADN et le solubiliser. Plusieurs protocoles utilisent la dégradation enzymatique des protéines par la protéinase K dans un tampon contenant du sodium dodécyl sulfate (SDS) dont le rôle est d'affaiblir les membranes (**Miller, 1988**).

Les différentes étapes pour l'extraction de l'ADN génomique à partir du sang total :

1. Elimination des globules rouges
2. lyse des globules blancs
3. Précipitation et élimination des protéines
4. Précipitation et récupération de l'ADN

#### 1.3.3.1. Elimination des globules rouges

L'utilisation de la méthode congélation et décongélation du sang total pour la lyse des globules rouges. Puis des lavages, avec un grand volume d'une solution de lyse (Tris/EDTA), 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 (**Sambrook et al., 2001**).

#### 1.3.3.2. Lyse des globules blancs

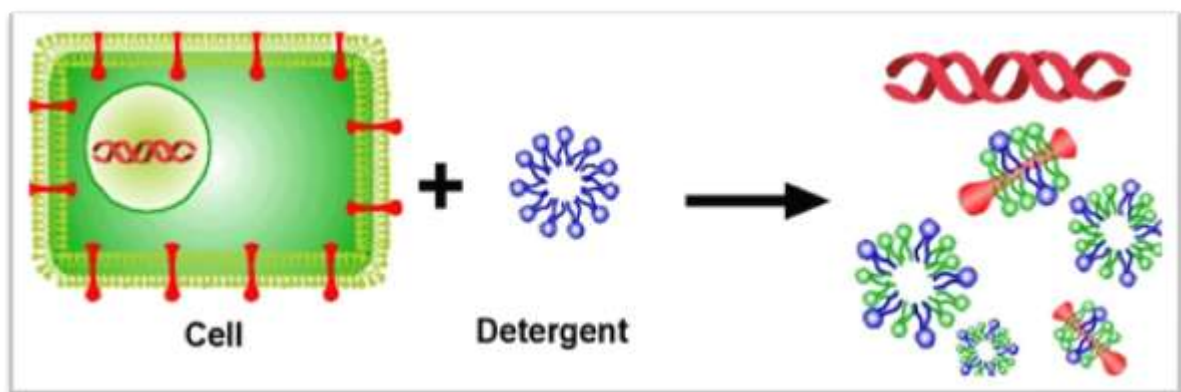
Le culot leucocytaire est repris dans un tampon de lyse des globules blancs (Tris/HCl; EDTA; SDS; pH = 8). L'action simultanée de ces trois produits est complétée par la protéinase K pour déprotéiniser l'ADN. La protéinase K est une endopeptidase capable des

## Partie bibliographique

digérer les protéines, permettant ainsi de libérer les molécules d'ADN des différentes protéines de structures comme les histones, ou toute autre protéine liée à l'ADN pouvant gêner l'amplification in vitro. (Lacan, 2011).

Après homogénéisation à l'aide du vortex, le mélange est incubé au bain marie à 37°C sous agitation lente pendant une nuit.

Le dodécylsulfate de sodium ou laurylsulfate de sodium ou SDS [ $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{11} - \text{SO}_3 - \text{Na}^+$ ], est un détergent anionique utilisé en biologie. Il entre dans la composition des tampons de lyse ou sert à la dénaturation de protéines en vue de leur séparation par SDS-PAGE. Le SDS est un solide blanc inflammable, il peut être commercialisé sous la forme solide ou sous forme de solution aqueuse contenant généralement 10 à 20% de SDS. Le SDS est un produit toxique qui requiert une attention spéciale pour une manipulation et une disposition sécuritaire. Ce détergent est utilisé pour solubiliser la protéine membranaire et les lipides, (Carpi, 2011; Senicourt, 2016) c'est à dire la rupture de la membrane cellulaire, autorisant ainsi la libération de l'ADN génomique. (Figure 3)



**Figure 3:** Rupture de la membrane cellulaire et extraction de l'ADN génomique. (Somma, 2017)

### 1.3.3.3. Précipitation et élimination des protéines

Le NaCl va provoquer une déshydratation des protéines, entraînant une interaction hydrophobe entre elles et leur précipitation (Jeannesson, 2007). Le principe est celui d'un « salting out », c'est à dire d'une déshydratation suivie d'une précipitation des protéines par une

## Partie bibliographique

---

solution de chlorure de sodium saturée. Après précipitation des protéines, l'ADN est précipité par de l'éthanol puis repris en suspension. (Jeannesson, 2007)

### 1.3.3.4. Précipitation et récupération de l'ADN

La précipitation est réalisée par addition de l'éthanol moins polaire que l'eau. Il faut ajouter à un volume de solution, au moins deux volumes d'éthanol. Pour faciliter sa récupération (Aouf, 2015). Puis le précipité est séché. Le séchage est obligatoire pour éliminer l'éthanol qui pourrait empêcher la dissolution ultérieure du précipité.

### 1.3.4. L'extraction au phénol-chloroforme

Les acides nucléiques sont souvent extraits du sang total (Pochi, 2002). Le procédé classique est l'extraction par le couple phénol-chloroforme. Le phénol est un excellent agent dénaturant des protéines et il permet de séparer efficacement les protéines et les acides nucléiques. Il est ensuite éliminé par l'extraction avec du chloroforme (non miscible avec l'eau). La séparation des phases aqueuse et organique peut se faire par centrifugation. La phase aqueuse contient les acides nucléiques (Kirby, 1957).

#### 1.3.4.1. L'extraction phénolique

Elle est utilisée pour séparer les acides nucléiques des protéines dans la phase aqueuse après la centrifugation car le phénol est un déprotéinisant puissant dans lequel les acides nucléiques ne sont pas solubles (Kirby, 1957). Les protéines précipitent, elles sédimentent au fond de la phase aqueuse mais restent à l'interphase c'est-à-dire qu'elles restent à la surface de la phase phénolique qui est une phase hydrophobe. Les débris membranaires lipidiques vont aller dans la phase phénol hydrophobe (Yagi, 1996).

Le phénol doit être très pur et saturé en tampon (pH 8 pour extraire l'ADN). L'inconvénient du phénol réside dans son caractère très corrosif, c'est donc un produit à manipuler avec précaution.

## Partie bibliographique

---

### 1.3.4.2. L'extraction au chloroforme

Elle complète toujours l'extraction précédente pour éliminer toutes traces de phénol aqueux. Toute trace de phénol doit être éliminée pour permettre l'action ultérieure d'enzyme (de restriction par exemple) sur l'acide nucléique extrait. Le chloroforme est additionné d'alcool isoamylique 3-méthyl-1-butanol =  $[(CH_3)_2C_2H_3CH_2OH]$  qui est un agent anti mousse stabilisant la séparation des phases (agent déstabilisant de l'émulsion) (Yagi, 1996).

### 1.3.5. Précipitation à l'alcool éthylique

Avant l'ajout du solvant alcool il est impératif d'ajouter, à la solution d'acides nucléiques, une quantité importante de cations, on travaille à haute force ionique. Les cations  $Na^+$  neutralisent les groupements  $PO_4^-$  répartis tout le long de l'ADN ou de l'ARN et forment un écran protecteur de contre-ions autour de la double hélice, l'acide nucléique devient moins soluble car il établit moins d'interactions avec l'eau. On récupère les acides nucléiques sous forme solide après centrifugation. Le précipité est lavé avec de l'éthanol à 70 % pour se débarrasser des sels qui passent en solution dans les 30 % de la phase aqueuse de l'éthanol de lavage. Après le séchage obligatoire, les acides nucléiques pourront être resolubilisés dans un tampon adéquat, souvent tampon TE = Tris-EDTA pH 8.

### 1.3.6. Précipitation à l'isopropanol

Le principe est le même que précédemment sauf que le sel n'est pas nécessaire et que les petits fragments d'ADN sont éliminés car non précipités. Dans ce cas, on procède à un mélange volume à volume. Le précipité sera également lavé pour éliminer les traces d'isopropanol puis séché.

### 1.3.7. Extraction de l'ADN plasmidique bactérien

La préparation d'ADN plasmidique à partir de bactéries est l'une des techniques les plus courantes de la biologie moléculaire.

## Partie bibliographique

---

Le principe de l'extraction est connu sous le nom de lyse alcaline. Cette méthode permet de préparer sélectivement l'ADN du plasmide contenu dans les bactéries, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien en intervenant sur le pH. Le pH du lysat cellulaire sera ajusté à 12,4 ce qui va entraîner la dénaturation des ADN génomique et plasmidique. Puis les préparations obtenues seront ramenées à pH neutre, ceci va renaturer seulement l'ADN plasmidique. L'ADN génomique quant à lui, il ne pourra pas se renaturer correctement et pourra être éliminé avec les protéines à l'étape suivante. (**Kado et al., 1981**).

### 1.3.8. Séparation ADN/ARN par centrifugation isopycnique sur gradient de chlorure de césium

Une solution de chlorure de césium (CsCl) de densité donnée soumise à une force de gravité intense forme spontanément un gradient de densité continu. La résolution de tels gradients atteint le centième d'unité de densité. Les molécules ajoutées à la solution de CsCl et BET vont se placer, au cours de la migration, dans la zone du gradient dont la densité est la même que la leur. L'ARN monocaténaire lie davantage des molécules de chlorure de césium que l'ADN génomique bicaténaire, l'ARN présente alors une densité supérieure. En raison de sa densité, seul l'ARN peut traverser les coussins de CsCl et être récupéré dans le culot. L'ARN est ensuite lavé dans l'acétate de sodium et précipité à l'alcool (**Kamoun, 2003**).

Dans le cas d'un lysat bactérien et lors de l'extraction des acides nucléiques, le chromosome très grand est cassé et les fragments linéaires prennent une forme relâchée, les plasmides beaucoup plus petits sont préservés et conservent une structure surenroulée (**Senicourt, 2016**).

### 1.4.1. Quantification de l'ADN

La quantification de l'ADN ainsi que la vérification de sa qualité peuvent être faites par observation sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium, par comparaison à la fluorescence d'un autre ADN de concentration connue et par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260 puis à 280 nm pour en déduire le rapport DO260/DO280 (rapport estimant la pureté de l'ADN) (**Senicourt, 2016**).

La quantification est effectuée par spectrophotométrie, les bases puriques et pyrimidiques absorbant fortement dans l'ultraviolet à 260 nm. La mesure de l'absorbance à 260 nm est une

## Partie bibliographique

---

méthode précise si l'ADN est pur et natif. Cette méthode est peu sensible, et ne peut pas être utilisée pour des concentrations inférieures à 250 ng / ml.

### 1.4.2. Dosage des acides nucléiques

Les pyrimidines et les purines absorbent fortement les UV à 260nm. Une unité de densité optique à 260 nm correspond à:

- Une solution de DNA double brin à 50µg/ml
- Une solution de DNA simple brin ou RNA à 25µg/ml

$$C = A_{260} * F * 100$$

Ces valeurs s'appliquent à des acides nucléiques parfaitement purs et en solution homogène.

Pour vérifier la pureté de l'ADN il faut calculer : P (pureté) =  $A_{260} / A_{280}$  Une solution d'ADN est considérée pure si :  $1.7 \leq P \leq 2$

Parmi les techniques les plus utilisées pour la séparation des acides nucléiques selon leur taille est l'électrophorèse (Aouf, 2015).

## 1.5. Electrophorèse

### 1.5.1. Définition d'électrophorèse

C'est une technique de bioséparation permettant la séparation des biomolécules selon leur charge et leur taille (ADN, ARN, protéines). Le terme électrophorèse vient de : électroce qui signifie énergie électrique et de phoresis (photo en grec) qui veut dire porter, avoir en soi.

Les acides nucléiques en solution portent une charge négative à cause de l'ionisation de leurs groupements phosphate à pH 8. Ils se déplacent donc vers l'électrode (+). Toutes les séquences d'acides nucléiques ont un rapport charge/masse à peu près identique, quelle que soit leur longueur (Aouf, 2015).

Suivant les théories de l'électrophorèse, la mobilité  $\mu$  dans un champ électrique au sein d'un gel doué de pouvoir de filtration est:  $[\text{Log } \mu = \text{Log } \mu_0 - K_r \cdot C]$

Log  $\mu_0$  : La mobilité de la molécule en milieu liquide

C: Concentration du gel

Kr: Coefficient de retardement dû au gel

# Partie bibliographique

---

## 1.5.2. Les différents types d'électrophorèses

### 1.5.2.1. Électrophorèse en veine liquide

La migration dans ce type d'électrophorèse s'effectue au sein d'un liquide de composition déterminée soumis à un champ électrique de courant continu. Cette méthode permet la détermination des mobilités électrophorétiques des différents constituants d'un mélange, cependant elle est très coûteuse (Atcha, 2015).

### 1.5.2.2. Électrophorèse de zones

Les principales applications utilisent un support poreux stabilisant la phase liquide : on parle alors d'électrophorèse sur support ou d'électrophorèse de zones. Le mélange à séparer est déposé sur un support convenable, poreux et imprégné de tampon (papier, dérivés de cellulose, polyoside « agarose », polyacrylamide...). Le support doit être homogène, poreux et inerte. Cependant, la condition d'inertie n'est jamais respectée et le support joue un rôle plus ou moins important dans la séparation.

Les différents types d'électrophorèses de zones sont souvent nommés en fonction du type de support :

#### 1.5.2.2.1. Électrophorèse sur gel d'agarose

L'agarose est une substance similaire à l'amidon, qui est extraite d'algues. Comme la gélatine alimentaire, l'agarose est facile à dissoudre à chaud. L'agarose exerce un très bon effet de tamisage qui permet de très commodes séparations selon la taille. (Coquoz *et al.*, 2013).

Le gel d'agarose est le support le plus utilisé. Les tailles de fragments qu'il est possible de séparer sont comprises entre 0,1 et 30 kb. La migration s'effectue en position horizontale.

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer les protéines, l'ADN, l'ARN en fonction de leurs poids moléculaires. L'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose est une technique qui permet de séparer et d'identifier des fragments d'ADN, afin d'en déterminer la taille. Elle est basée sur

## Partie bibliographique

---

la séparation des acides nucléiques, en fonction de leur taille et de leur conformation (Senicourt, 2016).

### 1.5.2.2.2. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Le polyacrylamide est un polymère synthétique réticulé formé par la polymérisation de l'acrylamide et N,N-méthylène bisacrylamide. Il fournit une masse gélatineuse ayant un effet de tamisage d'une qualité encore supérieure à celle de l'agarose. (Coquoz *et al.*, 2013).

Le gel de polyacrylamide est utilisé pour la séparation des petits fragments d'acides nucléiques (taille <1000 pb). Le gel est coulé entre deux plaques de verre à l'abri de l'oxygène. La migration est verticale. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est une méthode d'analyse plus résolutive car on peut séparer les fragments d'ADN à une base près. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est utilisée pour la séparation des produits du séquençage de l'ADN (barani, 2007).

Les gels sont obtenus par polymérisation d'un mélange d'acrylamide [ $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ] et N, N' -méthylène de bisacrylamide [ $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH} = \text{CH}_2$ ], ce qui aboutit à la formation d'un réseau réticulé. Les concentrations en acrylamide et le ratio acrylamide/bisacrylamide déterminent la taille des pores et donc les capacités résolutes du gel. Ces techniques peuvent être utilisées pour séparer des protéines ou bien des acides nucléiques (de courte séquence en général) en condition native ou dénaturante. L'électrophorèse est réalisée à l'aide d'un montage vertical, les échantillons étant déposés dans des puits localisés au sommet du gel.

Les fragments d'ADN obtenus sont séparés selon leur longueur par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Le polyacrylamide forme un maillage qui va être soumis à un courant électrique. Les fragments d'ADN vont migrer du négatif vers le positif. Plus ils sont gros, plus ils vont être long à traverser le réseau de polyacrylamide. Ces fragments sont ensuite révélés sous UV après addition de bromure d'éthidium, un intercalant de l'ADN qui fluoresce sous UV (Atcha, 2015).

## Partie bibliographique

---

### 1.5.2.2.3. Electrophorèse sur Capillaire

C'est une technique récente qui commence à se développer et qui offre essentiellement les avantages de la rapidité, de la très grande résolution et de la très grande sensibilité de la détection. L'électrophorèse utilise un capillaire de silice de diamètre d'environ 50nm et de longueur 1 m (rempli de tampon ou de gel), et des voltages élevés (15 à 30 kV). Ceci aboutit à des vitesses de migration très rapides des composés dans les capillaires et ceux-ci sont détectés par absorption U.V., fluorimétrie ou conductimétrie directement sur le capillaire, donc dans un volume très faible. Ceci fournit donc une sensibilité particulièrement élevée. Les domaines d'application sont a priori nombreux : analyse de peptides, d'acides aminés, d'oligonucléotides. La technique peut également s'appliquer à des molécules non ionisées en présence de micelles de détergents appropriés (**Atcha, 2015**).

### 1.5.2.2.4. Electrophorèse en champs pulsé

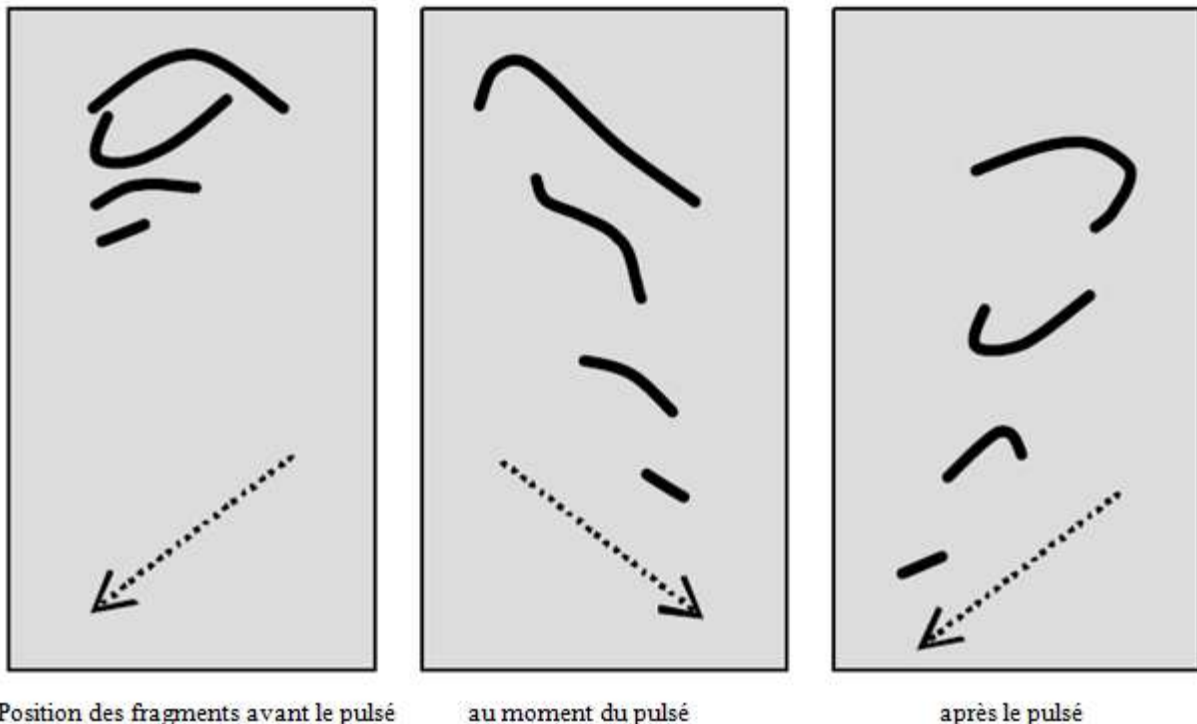
Ce type d'électrophorèse permet en effet de séparer des molécules d'ADN de grandes tailles avec une très bonne résolution, permettant l'établissement de cartes précises de régions importantes de chromosomes à l'échelle du mégabase.

Les techniques classiques d'électrophorèse sont fondées sur l'effet tamisant des supports solides utilisés (gels d'agarose ou d'acrylamide). En effet, comme la charge de l'ADN (conférée par la présence des groupes phosphates [H3 P04-]) est proportionnelle à sa taille, la densité de charge est constante et les fragments d'ADN linéaires migrent à la même vitesse dans un champ électrique constant, quelle que soit leur taille. C'est au contraire l'effet tamisant du support solide utilisé qui joue le rôle de différentiel de migration, les molécules d'ADN étant d'autant plus freinées qu'elles sont plus grandes (**Godon et al., 1997**).

L'électrophorèse en champ électrique pulsé fractionnement des molécules d'ADN de taille comprise entre 50 et 9 000 kb (**Barani, 2007**). Cependant, au delà de 50 000 paires de bases, la taille des fragments d'ADN est supérieure au diamètre des plus larges pores des supports d'électrophorèse, annulant tout effet de tamisage différentiel. L'utilisation de supports à pores plus larges a permis de reculer légèrement la limite supérieure de séparation, mais les gels correspondants sont extrêmement fragiles et de maniement délicat (**Godon et al., 1997**).

## Partie bibliographique

Ce type d'électrophorèse se base sur le changement d'orientation et/ou polarité du champ, alternativement au cours du temps. L'électrophorèse pulsée utilise deux champs d'orientations différentes, appliqués de façon alternative (Eddé, 1988) (Figure 4).



**Figure 4 :** Mécanisme proposé pour la séparation de fragments d'ADN par électrophorèse en champ pulsée. (barani, 2007).

### 1.5.3. Les différentes interactions établies et leurs conséquences sur la densité des macromolécules nucléiques

L'ADN chromosomique établit alors des liaisons avec les ions Cs seulement au niveau des groupements ionisés externes, par contre il établit beaucoup de liaison avec le BET, il est allégé. L'ADN plasmidique établit lui aussi des liaisons avec les ions Cs seulement au niveau des groupements ionisés externes, par contre il établit peu de liaisons avec le BET en raison de sa configuration surenroulée, il n'est pas allégé. Il en résulte que l'ADN plasmidique est alors nettement plus dense que l'ADN chromosomique en condition saturante de BET. L'ARN n'établit pas de liaison avec le BET car il est monocaténaire, par contre il établit beaucoup de liaisons avec les ions Cs, car tous les groupements ionisés sont accessibles, ce qui, en raison de la densité des ions césium, l'alourdit. L'emploi de bromure d'éthidium

## Partie bibliographique

---

permet d'augmenter la différence de densité entre l'ADN super-enroulé et l'ADN relâché/linéaire et d'obtenir une séparation optimale (**Kamoun, 2003**).

### 1.5.4. Tampon de charge

Les échantillons mélangés à 2 colorants (tampon de charge) avant dépôt dans le gel

- Bleu de bromophénol dont la migration est comparable à un fragment d'ADN de 300pb ce qui correspond à un tout petit fragment de migration très rapide.
- Xylène cyanol dont la migration est comparable à un fragment d'ADN de 4000pb: très gros fragment et la migration la plus lente (**barani, 2007**).

### 1.5.5. Migration électrophorétique et visualisation des fragments d'ADN

L'électrophorèse consiste à séparer des fragments d'ADN, qui migre dans un gel soumis à un champ électrique, en fonction de leur taille; plus la taille est élevée et moins le fragment migrera loin dans le gel et inversement, les plus petits fragments auront la distance de migration la plus importante; et de la concentration d'agarose ou d'acrylamide du gel (**Senicourt, 2016**). Ceci est possible car la molécule d'ADN est chargée négativement, elle se déplacera donc vers le pôle positif de la cuve de migration. Les acides nucléiques sont visualisés par coloration du gel au bromure d'éthidium (BET) qui est une molécule cationique et agent chimique qui s'intercale entre les paires de bases de l'ADN et émettant une fluorescence UV, lorsqu'il est éclairé par des UV courts (200-300nm) (**Lian ma, 2010**). Les UV excitent le colorant qui émet alors une fluorescence rose/orange. Le BET s'intercale entre les bases de l'ADN en proportions différentes selon le type d'ADN: les fragments linéaires de l'ADN chromosomique incorporent beaucoup de BET et l'ADN plasmidique surenroulé n'incorpore au contraire que peu de BET.

La migration et la séparation des fragments d'ADN vont être réalisées dans un gel d'agarose ou d'acrylamide selon la résolution souhaitée (**Marié, 2001**). Un extrait d'ADN génomique non dégradé doit présenter, sur gel, une seule bande de haut poids moléculaire. Si l'ADN est dégradé, on observera des bandes supplémentaires de plus petit poids moléculaire.

En effet, plus une molécule d'ADN est grosse, plus elle sera ralentie dans les mailles du gel et migrera donc moins loin qu'une molécule plus petite. Cependant, la conformation spatiale de l'ADN joue également un rôle important dans la migration. Pour une molécule d'ADN de

## Partie bibliographique

---

même taille, un ADN relâché va migrer moins loin qu'un ADN linéaires, qui lui-même va migrer moins loin qu'un ADN surenroulé (**Senicourt, 2016**).

# Matériels et méthodes

# Matériels et méthodes

---

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Matériels

#### ❖ Matériels biologiques

Le sang de mouton a été collecté au niveau de l'abattoir de la daïra de Mostaganem. Cette opération a été effectuée lors du sacrifice des animaux dans des tubes contenant comme anticoagulant l'EDTA. Le sang a été transporté au laboratoire et congelé à -20 °C jusqu'à l'utilisation.

#### ❖ Les solutions et tampons utilisés dans l'extraction d'ADN

##### \*La solution de NaOH 10 M

NaOH	20 g
Eau distillée	50 ml

##### \*Les solutions mères

##### La solution EDTA 0,5 M

EDTA	14,6 g
Eau distillée	100ml

Ajustez le pH à 8 avec NaOH. 10 M

##### La solution tris 1 M

Tris	12,14 g
Eau distillée	100 ml

Ajustez le pH à 8 en ajoutant du HCl concentré

##### \*Tampon de lyse des globules rouges

##### Solution tris EDTA (10/10 mM)

Tris 1M	1 ml
---------	------

## Matériels et méthodes

---

EDTA 0,5 M	2 ml
------------	------

L'eau distillée	97 ml
-----------------	-------

Ajustez le pH à 8 en ajoutant du HCl concentré

### **\*Tampon de lyse des globules blancs**

#### **Solution de TE (10/5 mM)**

Tris 1M	1 ml
---------	------

EDTA 0,5 M	1 ml
------------	------

L'eau distillée	98 ml
-----------------	-------

Ajustez le pH à 8 en ajoutant du HCl concentré.

#### **Solution de NaCl 5 M**

NaCl	14,61 g
------	---------

Eau distillée	50 ml.
---------------	--------

Stérilisez et conservez à température ambiante.

#### **Solution de SDS à 10%**

SDS	1 g
-----	-----

Eau distillée	10 ml
---------------	-------

#### **Solution de pepsine**

Pepsine	10 mg
---------	-------

Eau distillée	1 ml
---------------	------

### **\*Pour l'électrophorèse**

#### **Tampon TBE**

Tris 1 M	9 ml
----------	------

EDTA 0,5 M	0,560 ml
------------	----------

# Matériels et méthodes

---

Acide borique 61,83 M	0,556 g
Eau distillée	100 ml

Ajustez le pH à 8 en ajoutant du HCl concentré.

## Préparation du gel d'agarose

Etant donné que nos échantillons contiennent de l'ADN de haut poids moléculaire, nous avons opté pour un gel d'agarose à 0,7%. Pour un gel dont les dimensions sont 9 cm de longueur, 7 cm de largeur et 1 cm d'épaisseur. Nous avons réalisé la préparation suivante :

Tampon TBE	65ml
L'agarose	0,46g

Mettre au bain marie ou sur la plaque chauffante (150°C) pour faire fondre l'agarose. Laisser quelques minutes hors de la source de chaleur. Puis couler dans la cuve, une fois le gel solidifié, retirer les cales et le peigne puis déposer les échantillons d'ADN.

## Tampon de charge

Bleu de bromophénol	0,25%
Saccharose	40%
Glycérol	30%

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Extraction d'ADN

Certains échantillons de sang ont été utilisés dès l'arrivée au laboratoire alors que d'autres ont été congelés. Pour ces derniers une étape de décongélation est nécessaire à 37°C pendant 1h.

La technique d'extraction d'ADN par le NaCl a été choisie en raison de sa rapidité, sa facilité ainsi que l'absence du risque d'intoxication par des produits dangereux tels que le phénol.

(Ghaffour, 2017 ; Bemoussat, 2017).

# Matériels et méthodes

---

**Plusieurs étapes ont été effectuées pour extraire l'ADN :**

- Lyse des globules rouges
- Lyse des globules blancs
- Précipitation et élimination des protéines
- Précipitation et récupération de l'ADN

## **2.2.1.1. Lyse des globules rouges**

Prendre 2 ml de sang total dans un tube à hémolyse, ajouter 6ml de TE 10/10 mM pH 8 et mettre les tubes à 4°C au réfrigérateur pendant 10 min. Puis une centrifugation a été réalisée à 4000 rpm pendant 10 min à 4°C. Ensuite le surnageant a été éliminé délicatement. Cette opération doit être Répétée plusieurs fois jusqu'à obtention d'un culot blanc, qui correspond aux globules blancs.

## **2.2.1.2. La lyse des globules blancs et élimination des protéines**

Après le dernier lavage le culot a été resuspendu dans 1 ml de TE 10/10 mM dans un tube eppendorf, Puis centrifuger à 4000 rpm pendant 10 min à 4°C. Ensuite le surnageant est éliminé. Prendre 1ml de tampon de lyse de globule blanc (500 µl de TE10/5 mM, 100 µl de SDS à 10%, 400 µl de NaCl 5M). Ensuite ajouter 5µl d'une solution de pepsine à 10 mg/ml. Cette opération permettra de libérer l'ADN nucléaire dans le milieu et la digestion des protéines qui lui sont associées.

L'EDTA est un chélateur d'ions bivalents inhibant l'activité des DNases. Les DNases sont des enzymes présentes dans les lysats cellulaires et qui sont capables de dégrader l'ADN.

Le SDS est un détergent qui permet la digestion des couches phospholipidiques c'est à dire qu'il détruit les membranes de la cellule et du noyau. Il permet aussi de dissocier l'ADN des protéines (histones et non histones) (**Carpi, 2011**).

La protéinase k ou pepsine sont des enzymes qui dégradent les protéines associées à l'ADN. Elles hydrolysent les protéines soit des membranes plasmiques, soit les protéines qui entourent la molécule d'ADN plus précisément les histones et d'autre protéines.

# Matériels et méthodes

---

L'ajout des sels (le NaCl dans notre cas) permet d'augmenter la force ionique et donc de faciliter la précipitation de l'ADN.

Dans le lysat, l'ADN nucléaire ainsi libéré est associé aux différentes protéines qui seront digérées et éliminées par précipitation au NaCl. (Djamaa, 2013 ; Bemoussat, 2017).

La préparation, ainsi obtenue, est incubée à 37°C toute la nuit ou 3 heures à 65°C.

## 2.2.1.3. Précipitation de l'ADN

Après centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min à 4°C. Prendre 500 µl de surnageant dans un autre tube eppendorf, en évitant le précipité. A 1V de lysat, ajouter 2V d'éthanol froid, laisser 10 min, agiter délicatement de temps en temps. Pendant les 10 min l'ADN précipite en formant une méduse qui correspond à l'ADN précipité. Centrifuger à 14800 rpm pendant 10 min, l'ADN sédimente et se retrouve dans le culot. Le surnageant est éliminé.

Le culot est séché pour éliminer toute trace d'alcool. Ces réactifs permettent de précipiter l'ADN à basse température pour le séparer des constituants cellulaires donc le purifier.

## 2.2.2. Conservation de l'ADN

L'ADN a été conservé soit dans la glace à -20°C pendant une période longue après le séchage des tubes eppendorf ou au réfrigérateur à 4°C pour une courte période.

## 2.2.3. Dosage et évaluation de la pureté des échantillons d'ADN

Le dosage et l'évaluation de la pureté de nos échantillons d'ADN sont effectués par la mesure de la densité optique par spectrophotométrie. A l'ADN précipité et séché on ajoute 1,5 ml de TE 10/10 mM pour le redissoudre, on mélange bien puis on fait la lecture de la manière suivante :

☞ Une première lecture à une longueur d'onde de 260 nm nous permet d'estimer la densité optique des acides nucléiques.

☞ Une seconde lecture est effectuée à une longueur d'onde de 280 nm afin d'estimer la densité optique des protéines.

## Matériels et méthodes

---

Le dosage de l'ADN dans les différents échantillons est effectué grâce à la lecture au spectrophotomètre à la longueur d'onde 260 nm. Pour une DO égale à 1, nous avons 50 µg/ml d'ADN.

Pour le degré de pureté des échantillons d'ADN, Le rapport  $DO_{(260nm)}/DO_{(280nm)}$  est calculé. Lorsque le rapport est de 1,8 l'ADN est considéré comme pur. Mais si la valeur est inférieure à 1,8, il s'agit d'une contamination par les protéines, et si cette valeur est supérieure à 1,8, nous avons une contamination par l'ARN.

### 3.2.4. Electrophorèse des échantillons d'ADN

L'électrophorèse est une technique de séparation selon la charge, la taille et la conformation (Senicourt, 2016). L'ADN est une molécule chargée négativement à pH proche de la neutralité, ce qui permet une séparation en fonction de la taille par migration électrophorétique du pôle négatif vers le pôle positif.

Prendre l'ADN précipité et séché puis ajouter 40 µl de TE 10/10 mM et 10 µl le tampon de charge puis centrifuger à 12000 rpm pendant 2 min à 4°C, le bleu de bromophenol indique le front de migration puisqu'il se comporte comme un ADN dont la taille est de 500 pb.

Une fois que le gel d'agarose s'est solidifié les échantillons ont été déposés ainsi que le marqueur de taille. L'électrophorèse a été réalisée à 80v pendant 2h.

L'observation des résultats a été faite sous ultraviolets (254 nm) en présence de bromure d'éthidium.

# Résultats et discussions

# Résultats et discussions

## 3. Résultats et discussions

### 3.1. Collecte de sang des moutons

La collecte de sang a été faite dans des tubes de 4ml contenant comme anticoagulant l'EDTA qui est en plus un inhibiteur des nucléases, permettant ainsi à l'ADN de rester intact c'est-à-dire de ne pas être dégradé. Les échantillons non utilisés le même jour ont été congelés à -20°C.

### 3.2. Extraction de l'ADN

#### 3.2.1. La lyse des globules rouges

A partir de sang total, on fait l'extraction de l'ADN à partir des cellules lymphocytaires, c'est-à-dire les globules blancs. Pour cela On doit éliminer les globules rouges. On utilisant un tampon tris/EDTA. L'EDTA permettra de chélater les ions bivalents (nécessaires de les piéger pour inactiver les nucléases), il va aussi déstabiliser la paroi cellulaire (**Bahi et al., 1996**). Les résultats des lavages successifs, qui nous ont permis la réalisation de la lyse et élimination des globules rouge, sont montrés dans les **Figures (5, 6 et 7)**



**Figure 5:** premier lavage



**Figure 6:** deuxième lavage



**Figure7:** troisième lavage

## Résultats et discussions

---

### 3.2.2. La lyse des globules blancs

Dans cette étape, on lyse les membranes cellulaires et nucléaires par le SDS qui est un détergent du tampon de lyse. Le SDS permet aussi de dissocier l'ADN des protéines histoniques et non histoniques, cette action est aussi obtenue par l'utilisation d'une protéase, dans notre cas nous avons utilisé la pepsine. On peut donc dire que l'action du tampon de lyse sur le lysat cellulaire est de permettre la libération de l'ADN nucléaire dans le milieu et la dénaturation des protéines.

### 3.2.3. Précipitation et élimination des protéines

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. (Carpi *et al.*, 2011)

La précipitation au NaCl participe aussi à libérer, digérer et éliminer les différentes protéines. Le surnageant récupéré contient l'ADN (**Figure 8**).

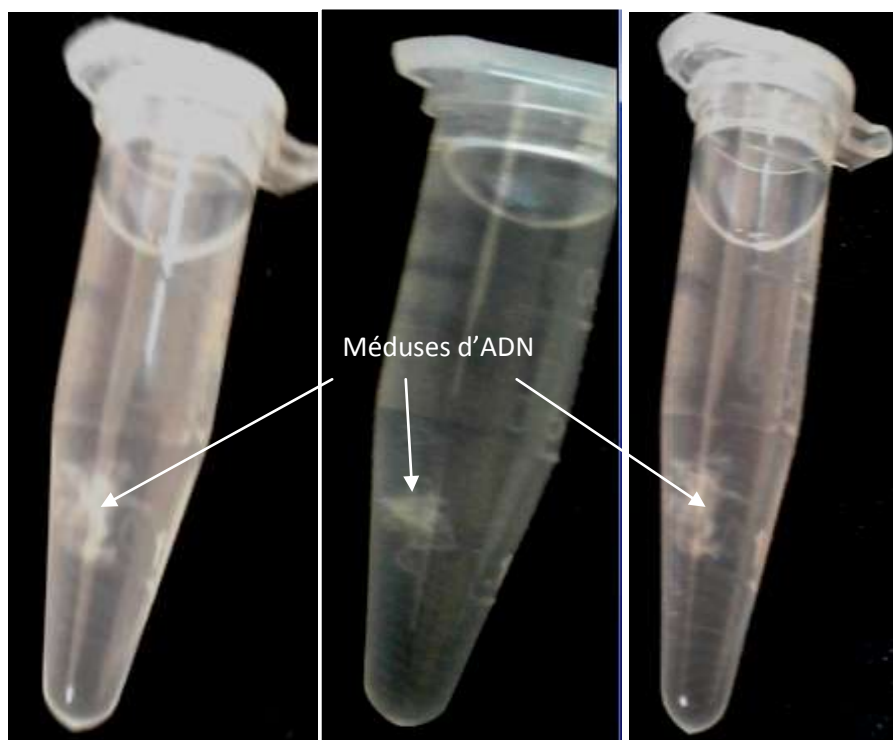


**Figure 8:** Précipitation et élimination des protéines

### 3.2.4. Précipitation de l'ADN

Après la centrifugation de 10 min à 4000 rpm, le surnageant contenant l'ADN est transféré dans un autre tube et est précipité avec 1ml d'éthanol absolu froid, après agitation douce, l'ADN est visible à l'œil nu, sous forme de filaments formant une méduse (**Figure 9**).

## Résultats et discussions



**Figure 9:** Résultat de la précipitation de l'ADN

**-Lavage :** l'utilisation de l'éthanol absolu permet d'éliminer les sels. L'ADN est récupéré par centrifugation.

**-Séchage:** cette étape permet l'élimination totale de l'éthanol

### 3.3. Dosage et pureté des solutions d'ADN

La concentration et la pureté des échantillons d'ADN sont déterminées par dosage spectrophotométrique qui s'effectue sous ultra-violets aux longueurs d'ondes 260 nm et 280 nm. Cette dernière longueur d'onde permet d'estimer la contamination éventuelle de l'extrait par des protéines c'est-à-dire d'évaluer le degré de pureté de nos échantillons d'ADN. Le dosage quant à lui, nécessite seulement la mesure de la densité optique à la longueur d'onde 260 nm. L'absorption se définit par l'unité de densité optique mesurée à 260 nm. Une unité de densité optique à 260 nm correspond à l'absorption d'une solution d'ADN double brin à la concentration de 50 µg/ml (Nouairia, 2010)

## Résultats et discussions

Malgré l'utilisation d'un même protocole pour l'extraction d'ADN, nous avons été contraintes de pratiquer des paramètres différents dans l'étape de lyse. Les différences usitées sont les suivantes :

Dans le protocole suivi, l'étape de lyse est réalisée soit à 4°C pendant une nuit ou 72 h ou à 65°C pendant 3 h

- **Les échantillons 1, 9 et 11** ont été chauffés pendant 03 heures à 65°C après une nuit à 4°C. Les solutions d'ADN 1 et 9 après le rajout du tampon de charge sont plus claires par rapport aux autres échantillons.
- **Les échantillons 12, 13 et 14** : ont aussi été chauffés pendant 03 heures à 65°C après une nuit à 4°C.
- **Les échantillons 5, 6, 7 et 8**: l'étape de lyse a été réalisée au réfrigérateur à 4°C pendant 72 h.
- **L'échantillon 10** : la lyse des globules blancs a été faite pendant 24 h à 4°C suivi d'un chauffage à 65°C pendant 10 min.
- **Les échantillons 2, 3 et 4**: le pH du tampon de lyse des globules était supérieur à 8 ce qui a entraîné l'élimination des globules blancs et par conséquent l'ADN.

### 3.3.1 Le dosage de l'ADN dans les échantillons

La concentration en ADN a été évaluée par la densité optique mesurée à 260 nm, en nous basant sur la formule : Pour une DO de 1 la concentration est de 50 µg/ml (voir tableau 1).

**Exemple** : On a pour : DO= 1       $\longrightarrow$       50µg/ml

0,284       $\longrightarrow$       X

$X = (0,284 \times 50) / 1$        $\longrightarrow$        $x = 14,2 \mu\text{g/ml}$

En prenant en considération le facteur de dilution :

1  $\longrightarrow$  50µl

x  $\longrightarrow$  2000µl

**X=40**

## Résultats et discussions

Exemple pour l'échantillon 5

$$0,017 \times 40 = 0,680$$

**Tableau 1** : Dosage de l'ADN dans les échantillons

Les échantillons	DO <sub>(260 nm)</sub>	Concentration en ADN (µg/ml)
1	0,284	14,2
2	0,040	2
3	0,040	2
4	0,040	2
5	0,680	34
6	0,760	38
07	0,600	30
8	0,660	33
9	0,733	36,65
10	0,920	46
11	0,658	32,9
12	0,463	23,15
13	0,109	5,45
14	0,233	11,65

Nous avons débuté l'extraction d'ADN à partir de 2 ml de sang pour chaque échantillon, ce qui donc attendu, c'est des concentrations en ADN égales ou très proches. Or nous avons observé des différences importantes qui peuvent être dues au changement des paramètres des étapes de lyse des globules blancs et la précipitation des protéines.

L'échantillon qui est le plus concentré en ADN est 10, le traitement à la chaleur pendant la lyse des globules blancs dans ce cas a été effectuée pendant seulement 10 min. Les échantillons ayant subi un traitement de 3 h à 65°C sont ceux qui ont montré la concentration la plus faible. Tous les échantillons pour lesquels l'étape de lyse a été réalisée à 4°C pendant 72h ont montré une concentration d'ADN plus ou moins grande.

## Résultats et discussions

### 3.3.2 Evaluation du degré de pureté des échantillons d'ADN

L'évaluation du degré de pureté des solutions d'ADN est très importante car elle permet de juger de l'efficacité du protocole de l'extraction d'ADN pratiqué surtout que dans notre cas, nous avons réalisé la précipitation des protéines au NaCl et non pas au phénol.

Le calcul du rapport  $DO_{(260nm)}/DO_{(280nm)}$  montre que 12 échantillons ADN parmi les 14, sont contaminés par les protéines et 2 échantillons par les ARN.

Les densités optiques et le rapport obtenus pour chaque échantillon d'ADN sont présentés dans le tableau suivant.

**Tableau 2** : Les densités et rapport de l'évaluation de la pureté des échantillons d'ADN

Les échantillons	DO (260 nm)	DO (280 nm)	DO <sub>(260nm)</sub> /DO <sub>(280nm)</sub>
1	0,284	0,339	0,84
2	0,040	0	0
3	0,040	0	0
4	0,040	0	0
5	0,680	0,800	0,85
6	0,760	0,893	0,851
7	0,600	0,620	0,967
8	0,660	0,680	0,970
9	0,733	0,126	5,81
10	0,920	0,880	1,045
11	0,658	0,383	1,7
12	0,463	3	0,154
13	0,109	0,239	0,45
14	0,233	0,602	0,3

Aucun échantillon d'ADN ne s'est avéré pur, en effet la plupart présentent une contamination par les protéines plus ou moins grande.

## Résultats et discussions

---

L'échantillon 11 est le seul dont le degré de pureté (1,7) se rapproche de celui d'une solution d'ADN pure (1,8).

Les densités optiques obtenues à la longueur d'onde de 260 nm montrent des différences très importantes, alors que le volume de sang est le même. Certains échantillons expriment une quantité d'acides nucléiques assez importante alors que pour d'autres, les acides nucléiques semblent totalement absents. De même que les protéines semblent être très présentes, en effet certains auteurs décrivent que l'hydratation et la précipitation des polypeptides hydrolysés avec la protéinase K par une solution saturée en sel (Miller 1988, Dykes 1988, Laitinen *et al.*, 1994) donne un l'ADN de mauvaise qualité (Bourgoin *et al.* 1997). Aussi, Selon Comey et ses coauteurs (1994), la méthode organique (au phénol chloroforme) s'avère donner des rendements en ADN supérieurs en plus d'être la plus sûre pour obtenir de l'ADN génomique.

De plus dans notre travail, nous avons utilisé la pepsine qui est une protéase moins efficace que la protéinase K.

### 3.4. Electrophorèse des échantillons d'ADN

L'électrophorèse consiste à séparer des fragments d'ADN, qui migrent dans un gel soumis à un champ électrique, en fonction de leur taille (plus la taille est élevée et moins le fragment migrera loin dans le gel et inversement, les plus petits fragments auront la distance de migration la plus importante) (Aouf, 2015). **Figure 10** montre un aspect des résultats obtenus après électrophorèse, et le **tableau 3** résume les résultats obtenus.

Les puits m montrent le marqueur de taille et les autres puits montrent les 14 échantillons.

## Résultats et discussions

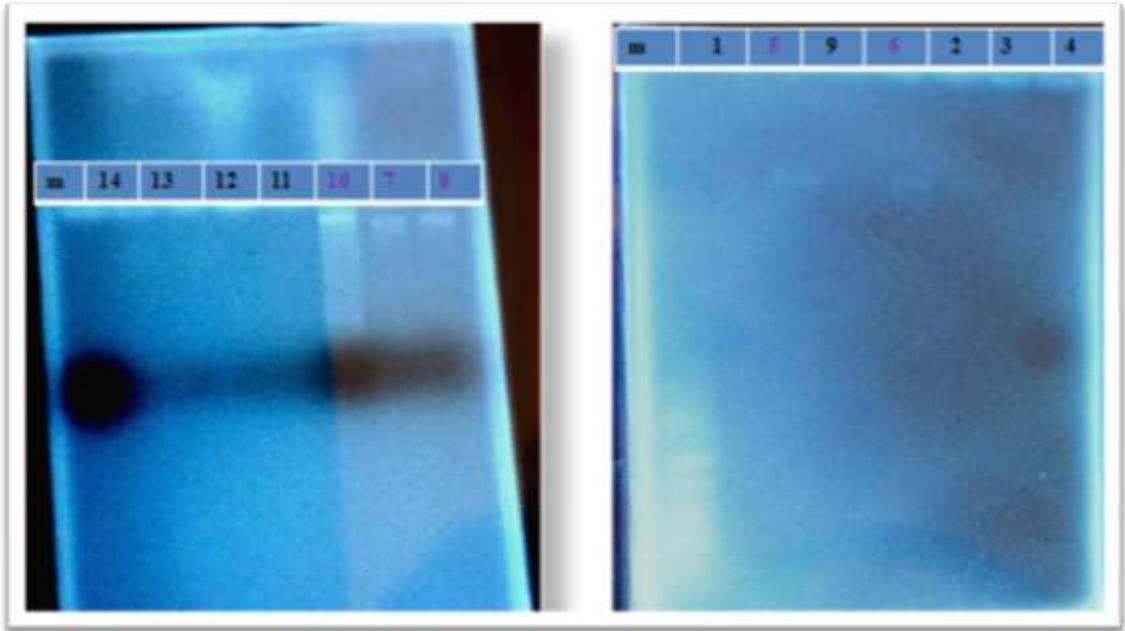


Figure 10 : Résultat d'électrophorèses des échantillons.

Tableau 3: les résultats des électrophorèses des tous échantillons

Les échantillons	DO (260 nm)	Electrophorèses
1	0,284	Aucun
2	0,040	Aucun
3	0,040	Aucun
4	0,040	Aucun
5	0,680	une seule bande
6	0,760	une seule bande
7	0,600	une seule bande
8	0,660	une seule bande
9	0,733	Aucun
10	0,920	Smear
11	0,658	Aucun
12	0,463	Aucun
13	0,109	Aucun
14	0,233	Aucun

## Résultats et discussions

---

La persistance d'une grande concentration de protéines pourrait expliquer les résultats de l'électrophorèse en effet les protéines peuvent masquer l'ADN et le rendre invisible.

Tous les échantillons ayant une DO à 260 nm appréciable ont montré la présence d'ADN par électrophorèse sauf l'échantillon 9. Pour l'échantillon 11, on attendait un bon résultat au vu de son rapport de pureté qui était de 1,7 or aucune bande d'ADN n'a été observée dans ce cas.

Nous avons utilisé la méthode d'extraction de l'ADN au NaCl pour sa facilité d'utilisation mais aussi parcequ'elle ne nécessite pas l'utilisation de produits toxiques (phénol et chloroforme). Cependant, la bibliographie montre l'énorme différence entre les deux méthodes. En effet, la pureté de l'ADN, à partir de 2ml de sang total par la méthode au Phénol-Chloroforme, est meilleure puisqu'elle donne une bonne concentration en ADN pur. **(Nouairia, 2010).**

Les échantillons d'ADN ayant présenté des bandes ont montré une assez faible intensité ceci est dû à la faible concentration en ADN dans tous les échantillons.

# Conclusion

# Conclusion

---

## 4. Conclusion

Pour toute étude génétique d'un organisme vivant, il faut disposer du génome. Pour cela différentes méthodes d'extraction ont été mises au point. Pour les animaux et l'homme, le tissu qui est le plus facile à collecter est le sang. Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'extraction d'ADN à partir de sang de mouton. Le sang a été collecté dans des tubes contenant l'EDTA pour éviter toute dégradation enzymatique. L'extraction a été réalisée sur 14 échantillons de 2 ml de sang chacun. C'est la méthode de salting-out qui a été adoptée. Pour la protéase nous avons utilisé la pepsine au lieu de la protéinase K. Les paramètres de l'étape de lyse ont été différents en effet le temps d'incubation et les températures pratiquées ne sont pas les mêmes.

Sur les 14 échantillons, un seul a présenté un rapport proche de la pureté et 8 échantillons ont montré une concentration en ADN plus ou moins appréciable. Cependant tous ces échantillons ont présenté un niveau de contamination assez élevé en protéines. Ces mêmes échantillons ont subi lors de l'étape de lyse un traitement à 4°C pendant 72h. Pour le reste des échantillons, nous constatons que les fortes températures ne favorisent pas la récupération de l'ADN à une concentration convenable et en bon état.

La méthode d'extraction de l'ADN par salting-out est sans danger mais pas performante puisque l'ADN reste assez contaminé par les protéines et les quantités extraites restent faibles. Cette méthode reste intéressante car elle nous a permis de récupérer l'ADN en bon état c'est-à-dire non cassé, puisque pour 4 échantillons sur 5, l'ADN a présenté par électrophorèse des bandes démontrant l'absence de dégradation.

A l'issue de ce travail, nous pouvons conclure que certains paramètres doivent être respectés comme :

- ✓ Le pH de toutes les solutions tampons.
- ✓ La température pratiquée pendant la lyse ne doit pas être haute. De même que la durée du traitement ne doit pas dépasser une nuit.
- ✓ Veiller, à éviter la coagulation du sang en respectant strictement la concentration de l'anticoagulant par rapport au volume de sang.
- ✓ Le prélèvement sanguin doit être réalisé au niveau de la veine à l'aide d'une seringue stérile.
- ✓ Il serait aussi préférable de transporter le sang à une basse température 4°C.

## Conclusion

---

- ✓ L'ADN doit être extrait le même jour que celui de la collecte de sang.
- ✓ Il serait préférable d'utiliser la protéinase K qui est recommandée par tous les travaux.  
En effet cette enzyme permet de mieux débarrasser l'ADN des protéines qui l'accompagnent comme les histones.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

---

### A

**Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J.D.**(1994). *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, *Garland Publishing*, New York.

**Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter** (2007). *Molecular Biology of the Cell*, 5eme edition, New York, *Garland Science*, pp1392.

**Amalberti R** (2009), *Transfusion Clinique et Biologique*, La-Plaine-Saint-Denis cedex, France 2009 Elsevier Masson SAS, pp16, 80–85

**Ameziane Nedjma, Marc Bogard, Jérôme Lamoril** (2005). *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique*.

**Aouf Abdelhakim** (2015). *Cours de Biologie Moléculaire et Génie Génétique*, Université Ferhat Abbas-Sétif 1, pp96-100.

**ATCHA Daniel** (2015). *Etude et apport d'un protocole de maintenance de l'automate d'électrophorèse minicap flex piercing*, diplôme de licence professionnelle université d'Abomey-Clavi, pp24-26.

**Avery OT, McLeod CM, McCarthy M** (1944). Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III. *Journal of Experimental Medicine*, 79, pp. 137-158.

### B

**Bahi A and Pfenninger M.** (1996). A rapid method of DNA isolation using laundry detergent. *Nucleic Acids Research*. 7: 1587-1588.

**Bemoussat Fatima Zohra** (2017). *Caractérisation épidémiogénétique de la maladie de Parkinson dans la population de Tlemcen. Analyse comparative à l'échelle nationale et méditerranéenne*, mémoire de master de l'université de Tlemcen, pp 18-49.

**Barani Aude** (2007). *Les méthodes d'électrophorèse : l'essentiel*, Premier Cycle d'Etudes Médicales Faculté de médecine Jacques Lisfranc université Jean Monnet, pp9-10.

**Basdevant N** (2003). « Un modèle de solvation semi-implicite pour la simulation des macromolécules biologiques », Thèse de Doctorat de l'Université d'Evry-Val- d'Essonne, P 28.

**Bourgoin S., Bergeron J., Sarafian V., Jolicoeur C., d'Auteuil M.L., Linard C., Maily F.** (1997). *Extraction d'ADN et amplification de sites STR sur des échantillons de type judiciaire*. Présenté au 65<sup>e</sup> Congrès de l'ACFAS, Université du Québec Trois-Rivières.

## Références bibliographiques

---

### C

**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.

**Cao H** (2004), « Probe oxidative damage in DNA charge transfer process » Thèse de Doctorat (Ph.D) de l'institut de Technologie de Georgia, pp 6.

**Cloutier Lyne, René Amélie, Jutras Annick** (2014). La formule sanguine complète, vol. 11 / n° 1, pp 2-5.

**Coumey C.T., Koons B.W., Presley K.W., Smerick IB., Sobieralski C.A., Stanley D.M., Baechtel F.S.** (1994). DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *J Forensic Sci.* 39, 1254-1269.

**Coquoz Raphael, Jennifer comte, Diana Hall, Tacha Hicks, Franco Taroni** (2013). Prevue par l'ADN la génétique au service de la justice, pp 40.

**Cussenot Michelle** (1999). Principes des techniques de biologie moléculaire. *Denis TAGU*.

### D

**Djamaa Ines** (2013). Mise au point de la DGGE en vue du diagnostic des bêta thalassémies et Drépanocytose, mémoire de magistère de université Tlemcen, PP 50-51.

**Dupire Jules** (2012). «Dynamique de Cellules Sanguines dans des Microécoulements», thèse de Doctorat de l'université d'Aix-Marseille.

**Durand. M, Favard. P.** (1967). La cellule, 1<sup>er</sup> édition, Hermann Paris, pp11, 41.

**Dykes.D** (1988). The use of biotinylated DNA probes in parentage testing: non-isotopic labeling and non-toxic extraction. *Electrophoresis* 9, 359-368.

### E

**Eddé B.** (1988) b. Électrophorèse d'ADN en champs pulsés. *Biofutur*, 65, Supplément n° 17: 3-7.

### F

**Fontaine S** (2003). Les apports de la biologie moléculaire aux vétérinaires. In : Journées portes ouvertes de l'Association Régionale de Santé et d'Identification Animales, Paris, France, pp6.

**Fung Y** (1993). *Biomechanics*. Springer, New York.

## Références bibliographiques

---

### G

**Ghaffour Amina(2017)**. Contribution à la construction d'une biothèque d'ADN de patients et résistants à la brucellose et conception des amorces du gène TNF alpha, mémoire de master d'université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen, pp44.

**Geoffrey M Cooper** (1999). La cellule une approche moléculaire, pp9, 316.

**Godon B, LOISEL W** (1997). Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales, lavoisier TEC DOC, électrophorese, J.-C. AUTRAN, M.-H. MOREL, *Analyses de caractérisation macromoléculaire* PP209, 239.

**Griffith A, Gelbart W, Miller J et Lewontin R** (2001). Analyse Génétique Moderne. De Boeck, Paris, France, pp329.

### J

**Jeannesson Elise** (2007). «Profils génétiques de lignées cellulaires humaines modèles en physiopathologie et pharmacotoxicologie cardio-vasculaires», Thèse de Doctorat de université de Lorraine «université Henri Poincare – Nancy », pp 27-39.

### K

**Kado C. I and S. T. Liu.** (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145:1365- 1373.

**Kamoun** (2003). « Biochimie et biologie moléculaire », Médecine-Sciences Flammarion, pp122-130.

**Karp G** (2004). « Biologie cellulaire et moléculaire », 2ème édition, Paris, P 79.

**Khorana HG** (1961). Some recent developments in the chemistry of phosphate esters of biological interest. Wiley, New York.

**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.

## Références bibliographiques

---

### L

**Lacan Marie** (2011). La Néolithisation du bassin méditerranéen : Apports de l'ADN ancien, thèse de l'université de Toulouse.

**Laitinen J., Samarut J., Holtta E.** (1994), A nontoxic and versatile protein salting-out method for isolation of DNA. *BioTechniques* 17, 316-322.

**LIAN MA PEI** (2010). Formation et caractérisation physico-chimique des complexes ADN/chitosane pour la thérapie génique, thèse de doctorat d'université de Montréal, pp5-18.

### M

**Malek Fadila** (2013). Le biofilm en industrie laitière : caractérisation facteurs de développement et élimination, thèse de doctorat de Tlemcen.

**Marié L. J.** (2001). Tiré à part de Documents pour le Médecin du Travail, 1<sup>er</sup> trimestre, n° 85-TC 81-300 ex. N CPPAP 2094 AD/PC/DC du 16/04/87. Directeur de la publication : J.L. Marié - ISSN 0339-6517 - ISBN 2-7389-0980 - 9. INRS, Institut national de recherche et de sécurité, 30 rue Olivier-Noyer 75 680 Paris cedex 14.

**Marieb E.N** (2009). *Essentials of Human Anatomy and Physiology* (9ème édition), San Francisco (CA), Pearson/Benjamin Cummings, pp 632.

**Miller S.A.** (1988), a simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215.

**Mohandas N and Evans E** (1994), Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects, *biophysics and bimolecular structure*, pp 787-818.

**Muller E** (2002). « Synthèse d'oligonucléotides modifiés pour l'étude de la réparation et de la réplication de lésions radio-induites simples et doubles de l'ADN », Thèse de Doctorat d'université Joseph Fourier Grenoble I, pp10.

## Références bibliographiques

---

### N

**Nirenberg MW, Matthaei JH** (1961), the dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47, pp. 1588-602.

**Nouairia Ghada** (2010). Comparaison de méthodes d'extraction de l'ADN de lapin à partir du sang: Fiabilité et Coût, projet de fin d'études Institution de la recherche et de l'éducation supérieure agricole (Iresa) de Tunisie, pp53-55.

### O

**OULD AHMED M.** (2009). «Caractérisation de la population des Dromadaires (*Camelus dromadarius*) en Tunisie». Thèse de Doctorat, Institut national Agronomique de Tunisie.

**Ould Ahmed Mohamed, Farhat Ben Salem, Sonia Bedhiaf, Djemali M'Naouer** (2010). Analyse moléculaire de la diversité génétique des dromadaires (*Camelus dromedarius*) en Tunisie, pp400

### P

**Pierre J-P** (2000). « Effet du rayonnement ionisant sur l'ADN cellulaire : mesure des bases puriques et pyrimidiques modifiées », Thèse de Doctorat de l'Université Paris XI, pp12.

**Pochi R** (2002). Genomic DNA. Subbarayan, Malancha Isolation of from Human Whole Blood. *BioTechniques* December; 33 SRC - *GoogleScholar*:1231-4.

### R

**Raetz M. D. Elizabeth** (2017). La leucémie lymphoblastique aiguë, Université de l'Utah Huntsman Cancer Institute Primary Children's Hospital Salt Lake City, Utah, société de leucémie lymphome de Canada, pp37-41.

## Références bibliographiques

---

**Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E., & Bouharmont J.** (2003). *Biologie végétale*. Traduction de la 6ème édition par Jules Bouharmont avec la collaboration scientifique de Charles-Marie Evrad.

**Robert D., & Vian B.** (1994). *Eléments de biologie cellulaire*. Paris France: Doin Editions, pp428.

### S

**Sambrook J, Russell DW** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Senicourt Lucile** (2016). *Études des protéines membranaires TSPO*, Thèse de doctorant université Pierre et Marie Curie, pp 86-134

**Shechter, E.,** (1997). *Biochimie et biophysique des membranes*, Paris : Dunod, pp481.

**Somma M.** (2007). *Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés*. « Module 4 : Extraction et purification de l'ADN » : pp3-12.

### V

**Voet D, J. Voet** (2005). *Biochimie*, 2ème édition, Paris, P 161.

### W

**Wilson D.D., S. Lahaye J. Courchesne et E. Prégent** (2010). *Examens paracliniques*, Montréal, Chenelière/McGraw-Hill, pp 696.

### Y

**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 tissue. *Biotechnic & Histochemistry*. **71** (3): 123–129.

<http://www.john-libbey-eurotext.fr/articles/abc/57/1/77-84/>