

République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie

Département de Biologie



Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE

Spécialité : Génétique fondamentale et appliquée

Par

SI KEBIR ABDELKRIM

Thème :

Extraction d'ADN à partir de sang de mouton par salting-out

Soutenu le 25 juin 2023 devant le jury composé de :

Président Chibani Abdelouaheb

Prof Université de Mostaganem

Encadreur Dalache Fatiha

Prof Université de Mostaganem

Examinateur Abbassene Fatiha

MCA Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements

Premièrement, je remercie Allah, qui m'a donné l'ambition, le défi, la santé et le courage pour terminer ce mémoire.

J'aimerais exprimer mon respect et mes remerciements à Mr CHIBANI A. (professeur) et Mme Abbassene F. (MCA)

Je tiens aussi à présenter mes sincères remerciements à mon encadrante, Professeure DALACHE Fatiha pour la confiance qu'elle m'a accordée en Acceptant mon 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.

Je voudrais aussi, remercier la technicienne du laboratoire de biochimie Mme Mokhtaria,

Pour toute l'aide que j'ai eu, je remercie tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand Merci.

Dédicace

Je dédie ce travail à toute ma famille,
À Mon cher père qui m'a encouragé et soutenu
pendant mes longues années d'études,
À ma chère mère (biti) qui m'a donné amour et
soins

À ma sœur Noua et son marie Nabil
À mon grand-père (papa) et ma tante Zahira
Ainsi qu'à mes cousins Rim et Sid Ahmed.

Si Kebir Abdelkrim

Liste des abréviations

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique
NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
OMS : organisation mondiale de la santé.
GeDI : Genomic DNA isolation.
SDS : sodium dodécyl sulfate.
ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
C : Concentration
EtBr : bromure d'éthidium
GR : globules rouges.
GB : globules blancs.
M : molaire.
V : volume.
NaCl : Chlorure de sodium.
Pb : Paires de bases.
PH : Potentiel d'hydrogène.
R : rapport
Trs : tours
TAE : Tris Acétate EDTA
TBE : tris borate EDTA
TE : Tris - EDTA
Tris : tris (hydroxy-méthyl) aminométhane
UV : ultraviolet
ADNases : Nucléase de l'ADN
HCl : Acide chlorhydrique
K + : potassium
NaOH : hydroxyde de sodium
Na+ : sodium

Liste des figures

Figure 01 : Aire d'expansion de la race Ouled Djellal (selon la délimitation de Chellig, 1992). Page : 02

Figure 02 : Les échantillons de sang dans des tubes EDTA. Page : 25

Figure 03 : résultat de la lyse des globules rouges 1^{er} lavage. Page : 26

Figure 04 : Résultats de la lyse des globules rouges après le 3^{ème} lavage. Page : 26

Figure 05 : Résultat représentant les culots de lymphocytes. Page : 27

Figure 06 : Aspect des résultats après ajout de la solution hémolysante II et le SDS. Page : 27

Figure 07 : après rajout du NaCl et agitation. Page : 28

Figure 08 : Résultat après la centrifugation. Page : 28

Figure 09 : Résultats après la formation de la méduse (pronas E). Page : 29

Figure 10 : résultat directement sur la plaque UV. Page : 30

Figure 11 : Résultat obtenu par le scanner informatisé de la plaque UV. Page : 31

Sommaire

Résumé

Liste des abréviations i

Liste des figures ii

Introduction générale 01

1. Généralités

1.1 Choix de l'espèce mouton 02

1.1.1 Race Ouled Djellal 02

1.1.2 Aire d'expansion 02

1.2 Sang 03

1.2.1 Quels anticoagulants utiliser ? 03

1.2.2 Sang total 03

1.2.3 Plasma 03

1.2.4 Sérum 04

1.2.5 Anticoagulants 04

1.2.5.1 EDTA 04

1.2.5.2 Citrate 04

1.2.5.3 Héparinates 05

1.2.5.4 Hirudine 05

1.2.6 Étude comparative de l'influence de l'EDTA et de l'héparine sodique sur le stockage à long terme des médicaments 06

1.3 Prélèvement sanguin chez les animaux 06

1.3.1 Veine céphalique.....	07
1.3.2 Veine jugulaire.....	07
1.3.3 Le volume de sang.....	08
2 L'ADN	
2.1 Définition.....	09
2.2 Sources de l'ADN.....	09
2.3 Activités enzymatiques.....	10
2.3.1 Définition.....	10
2.3.2 Quelques enzymes utilisables dans l'extraction d'ADN.....	10
2.4 Méthodes d'extraction de l'ADN.....	11
2.4.1 Extraction d'ADN à partir de sang.....	12
2.4.1.1 La méthode saline (salting out) et au phénol.....	12
2.4.1.1.1 Lyse des globules rouges.....	12
2.4.1.1.2 Lyse des globules blancs.....	13
2.4.1.1.3 Elimination des protéines et de l'ARN.....	13
2.4.1.1.4 Précipitation, récupération et conservation de l'ADN.....	14
2.4.2 Autres méthodes d'extraction de l'ADN.....	14
2.4.2.1 Chelex 100.....	15
2.4.2.2 Le gel de silice.....	15
2.4.2.3 La méthode CTAB.....	16
2.4.3 Méthodes par les kits.....	16

2.4.3.1 Principe général.....	16
2.4.3.2 Kit Universel d'extraction d'ADN génomique.....	16
2.4.3.2.1 Partie I : lyse cellulaire.....	16
2.4.3.2.2 Partie II Précipitation de l'ADN	17

3 Matériels et méthodes

3.1 Collecte des échantillons de sang.....	19
3.2 Matériels chimiques et biochimiques.....	19
3.2.1 Tampons et solutions utilisées.....	19
3.2.2 Autres solutions.....	20
3.2.3 Préparation du gel d'agarose.....	21
3.3 Méthodes.....	21
3.3.1 Extraction de l'ADN à partir de sang total par la méthode du salting-out.....	21
3.3.2 Principe de la méthode du salting-out.....	22
3.3.3 Mode opératoire.....	22
3.3.3.1 Lyse préférentielle des globules rouges.....	22
3.3.3.2 Lyse des globules blancs et élimination des protéines.....	23
3.3.3.3 Précipitation et récupération de l'ADN.....	23
3.3.3.4 Electrophorèse des échantillons d'ADN.....	24

4 Résultat et Discussion

4.1 Utilisation des échantillons de sang.....	25
4.2 Extraction de l'ADN à partir de sang total par la méthode du salting-out	25

4.2.1 Résultats de la lyse préférentielle des globules rouges	25
4.2.2 Résultats de la lyse des globules blancs et élimination des protéines.....	27
4.2.3 Résultats de la précipitation et récupération de l'ADN.....	29
4.2.4 Mesure de la concentration d'ADN.....	29
4.2.5 Résultats de l'électrophorèse des échantillons d'ADN.....	30
5 Conclusion.....	32
6 Références bibliographiques.....	A
Annexes	33

Résumé

De nos jours, La génomique est devenue incontournable dans l'étude de tout organisme vivant. Pour cela l'extraction de l'ADN, en bonnes, qualité et quantité est d'une importance capitale.

Le but de ce travail est d'isoler l'ADN à partir du sang de mouton en essayant d'éviter les contraintes de matériel sophistiqué et de produits chimiques dangereux (le phénol).

Ainsi, nous avons collecté le sang de mouton à l'abattoir de Sidi Lakhdar dans des tubes qui contiennent l'anticoagulant EDTA. Pour réaliser l'extraction de l'ADN, nous avons effectué les étapes suivantes : lyse des globules rouges, lyse des globules blancs, digestion par des enzymes protéolytiques en présence de SDS, le salting-out et enfin précipitation de l'ADN. La méduse d'ADN a été obtenue seulement dans le cas de la pronase E et l'estimation de la concentration d'ADN, est de 16,35 $\mu\text{g/ml}$.

mots clés

المخلص

في الوقت الحاضر، أصبح علم الجينوم ضروريًا في دراسة أي كائن حي. لهذا، فإن استخراج الحمض النووي، بنوعية وكمية جيدة، له أهمية قصوى. كان الهدف من هذا العمل هو عزل الحمض النووي من دم الأغنام في محاولة لتجنب قيود المعدات المتطورة والمواد الكيميائية الخطرة (الفينول) وهكذا قمنا بجمع دم الأغنام في مسلخ سيدي لاضر في أنابيب تحتوي على مضاد التخثر (EDTA). ولاستخلاص الحمض النووي قمنا بالخطوات التالية: تحلل خلايا الدم الحمراء، تحلل خلايا الدم البيضاء، الهضم بواسطة الإنزيمات المحللة للبروتين و SDS والتمليح وأخيرًا ترسيب الحمض النووي. تم الحصول على تكتل من الأحماض النووية فقط في حالة (Pronase E) ويقدر تركيز هذه الأحماض بـ 16.35 ميكروغرام / مل.

الكلمات المفتاحية

Abstract

Nowadays, genomics has become essential in the study of any living organism. So, DNA extraction, of good quality and quantity, is of utmost importance.

The aim of this work is to isolate DNA from sheep blood in an effort to avoid the limitations of sophisticated equipment and hazardous chemicals (phenol).

Thus, we collected sheep blood in the abattoir of Sidi Lakhdar in tubes containing anticoagulant. (EDTA)

To extract DNA, we performed the following steps: lysis of red blood cells, lysis of white blood cells, digestion by proteolytic enzymes and SDS, Salting out and finally DNA precipitation.

A cluster of nucleic acids was obtained only in the case of (Pronase E) and the concentration of these acids was estimated at 16.35 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Introduction

généralee

Introduction générale

La connaissance de tout être vivant, procaryote ou eucaryote, nécessite l'exploration de son patrimoine génétique (ADN). (Nouairia G. 2010).

En biologie moléculaire, la première étape dans la plupart de ces études est l'extraction d'ADN.

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.

Les procédures de lyse courantes sont les suivantes :

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

L'ADN nucléaire ainsi libéré est associé aux différentes protéines qui seront digérées et éliminées par des méthodes nous en mentionnons deux comme suit :

- Des solvants organiques (Méthode au phénol chloroforme).
- Des solvants non organiques (Méthode au salting out).

La pureté de l'ADN extrait peut être évaluée par spectrophotométrie mais aussi par électrophorèse. Cette pureté est primordiale surtout si on veut utiliser l'ADN pour poursuivre le travail par des techniques plus sophistiquées en génomique.

Les objectifs de notre étude sont de réaliser :

- L'extraction de l'ADN à partir du sang de mouton selon la méthode du salting-out.
- Mise en évidence de l'efficacité de digestion de trois enzymes protéolytiques.
- Calcul de la concentration d'ADN par spectrophotométrie.
- La vérification de l'intégrité de l'ADN extrait sera faite par une électrophorèse, sur un gel agarose avec visualisation sous UV en présence de bromure d'éthidium.

ref????????????????

Généralités

1. généralités

1.1 Choix de l'espèce mouton

1.1.1 Race Ouled Djellal

C'est la race typique de la steppe et des hautes plaines. L'effectif total est d'environ 11.340.000 têtes, ce qui représente 63% de l'effectif ovin total.

Le mouton Ouled Djellal est décrit par plusieurs auteurs, qui sont unanimes pour le classer comme un véritable mouton de la steppe et le plus adapté au nomadisme (Feliachi **K.**, 2003).

- La race Ouled Djellal proprement dite ou Djellalia, peuple les régions de Zibans, Biskra et Ouled Djellal. Sagne (1950) rapporte que ces moutons sont des sahariens d'élite formant un troupeau très homogène, exploité par les Ouled Zekri, les Bouazid et les Ouled Sidi Khaled.

1.1.2 Aire d'expansion

De son berceau à l'Est algérien, la race Ouled Djellal a gagné du terrain (figure 01). Elle occupe une vaste zone allant de Oued Touil (Wilaya de Tiaret et de Laghouat) à la frontière tunisienne (Chellig, 1992)

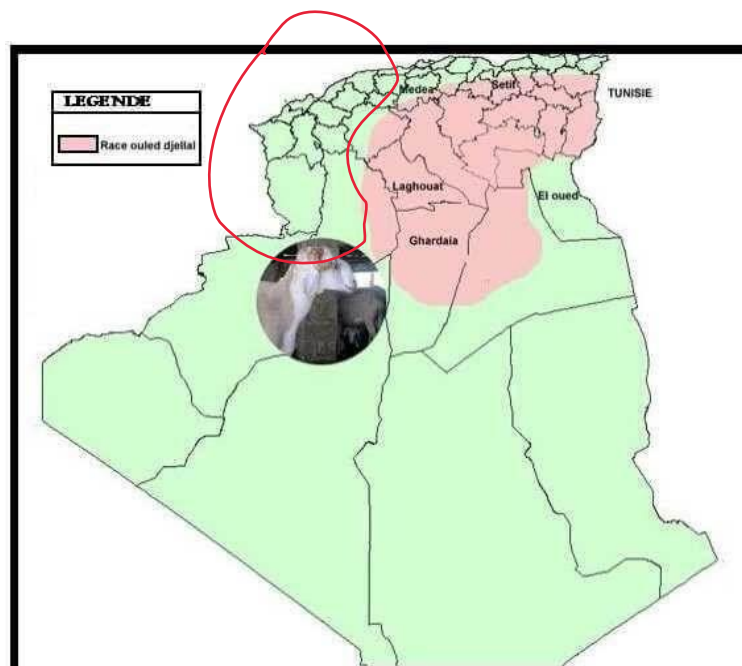


Figure 01: Aire d'expansion de la race Ouled Djellal (selon la délimitation de Chellig, 1992).

1.2 Sang

1.2.1 Quels anticoagulants utiliser ?

Il est impératif que l'état in-vivo d'un constituant reste inchangé après son retrait du liquide corporel d'un patient afin d'obtenir un résultat de laboratoire médical valide. Cependant, cela n'est pas toujours possible lors de la mesure des composants extracellulaires et cellulaires du sang. Les plaquettes et les facteurs de coagulation sont activés lorsque les vaisseaux sanguins sont ponctionnés et leur activation se poursuit dans les récipients d'échantillons qui ne contiennent pas d'anticoagulants.

Historiquement, le sérum était le matériau d'essai préféré pour déterminer les concentrations extracellulaires des constituants du sang. Aujourd'hui, le plasma est préféré pour de nombreux examens de laboratoire, mais pas tous parce que les constituants du plasma reflètent mieux la situation pathologique d'un patient que ceux du sérum.

Certains changements de constituants peuvent être évités par l'utilisation d'anticoagulants.

Les types et les concentrations d'anticoagulants utilisés dans les échantillons de sang veineux ont été définis dans le mode opératoire normalisé - **DMP-MON-05B**.

Les anticoagulants normalisés sont maintenant utilisés pour préparer des échantillons de plasma normalisés pour les examens de laboratoire dans le monde entier. (Banfi,et al,2002)

1.2.2 Sang total :

Le sang total représente un échantillon de sang veineux, artériel ou capillaire dans lequel les concentrations et les propriétés des constituants cellulaires et extracellulaires restent relativement inaltérées par rapport à leur état **in vivo**.

L'anticoagulation in vitro stabilise les constituants d'un échantillon de sang total pendant un certain temps. (Banfi,et al,2002)

1.2.3 Plasma :

Le surnageant pratiquement exempt de cellules du sang contenant l'anticoagulant, obtenu après centrifugation. (Banfi,et al,2002)

plasma vs sérum ??????????

1.2.4 Sérum

Le sérum est obtenu après centrifugation d'un sang coagulé obtenu dans un tube sec. Ce qui signifie que dans ce cas aucun anticoagulant n'est utilisé. (Banfi,et al ,2002)

1.2.5 Anticoagulants

Les anticoagulants sont des additifs qui empêchent le sang et/ou le plasma de coaguler, en veillant à ce que le constituant à mesurer ne subisse pas de modifications significatives avant la mesure.

L'anticoagulation se produit en liant les ions calcium (EDTA, citrate) ou en inhibant l'activité de la thrombine (héparinates, hirudine).

Les anticoagulants solides ou liquides suivants sont mélangés au sang immédiatement après le prélèvement de l'échantillon, leur présence est même ultérieure à la collecte du sang dans les tubes. (Banfi,et al ,2002)

1.2.5.1 EDTA

Il s'agit d'un sel de l'acide éthylène diamine tétra-acétique. Dipotassique (K²), tripotassique (K³) et disodique (Na²). Ils sont utilisés ; aux concentrations : 1,2 à 2,0 mg/ml de sang (4,1 à 6,8 mmol/l de sang) sur la base de l'EDTA anhydre. (Banfi,et al ,2002)

1.2.5.2 Citrate

Le citrate trisodique avec 0,100 à 0,136 mol/L d'acide citrique. Le citrate tamponné avec un pH de 5,5 à 5,6 :84 mmol/L de citrate trisodique avec 21 mmol/L d'acide citrique. Des différences ont été observées entre les citrates à 3,2 % et à 3,8 % (v/v) lors de la présentation des résultats dans l'INR.

dans quoi?????

L'organisation mondiale de la santé (OMS) et le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recommandent 0,109 mol/L (3,2 %) d'acide citrique. La Société internationale de thrombose et d'hémostase (ISTH) recommande l'utilisation de citrate tamponné à l'Hepes pour toutes les investigations des fonctions hémostatiques.

✓ Un mélange d'une part de citrate et de neuf parts de sang est recommandé pour les tests de coagulation (86, 136).

✓ Un volume de citrate mélangé à quatre volumes de sang est recommandé pour déterminer la vitesse de sédimentation des érythrocytes (86). (Banfi,et al ,2002)

1.2.5.3 Héparinates

Concernant les héparinates, une concentration de 12 à 30 UI/ml de sel de sodium, de lithium ou d'ammonium **non fractionné d'héparine d'une masse moléculaire de 3 à 30 kD** sont recommandés pour obtenir une héparine standardisée. ?

L'héparine titrée au calcium à une concentration de 40 à 60 UI/ml de sang (héparinisation sèche) et de 8 à 12 IU/ml de sang (héparinisation liquide) est recommandée pour la détermination du calcium ionisé (22). (Banfi,et al ,2002)

1.2.5.4 Hirudine

L'hirudine est une antithrombine extraite de sangsues ou préparée par génie génétique. L'hirudine inhibe la thrombine en formant un complexe hirudine-thrombine 1:1. L'hirudine est utilisée à une concentration de 10 mg/L. (Banfi,et al ,2002)

Les codes de couleur des anticoagulants décrits dans l'ISO/DIS 6710 sont les suivants :

EDTA = mauve

Citrate 9 +1 = bleu clair

Citrate 4 + 1 = noir

Hépariné = vert

Pas d'additifs (pour le sérum) = rouge. (1)

1.2.6 Étude comparative de l'influence de l'EDTA et de l'héparine sodique sur le stockage à long terme des médicaments.

Le prélèvement du sang est effectué dans des tubes d'héparine pour les applications cytogénétiques et dans des tubes d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) pour les applications de génétique moléculaire.

- Si des échantillons de sang sont nécessaires pour la cytogénétique et l'analyse de l'ADN, deux échantillons sont généralement prélevés sur chaque animal, ce qui entraîne une perte de temps et d'argent.
- De nos jours les études tentent d'explorer les possibilités de collecter un seul échantillon de sang dans un tube hépariné en vue d'une utilisation dans le cadre d'un projet de recherche sur l'ADN.
- Deux échantillons de sang ont été prélevés sur les mêmes animaux, l'un dans un tube hépariné et l'autre dans un tube EDTA. L'ADN a été extrait et conservé à la même température et pour les mêmes durées.
- Les études comparatives ont révélé que les échantillons d'ADN extraits du sang à l'aide de ces deux coagulants différents donnent plus ou moins la même qualité de résultats, en particulier pour les applications basées sur la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) chez les bovins.
- La possibilité d'utiliser du sang hépariné pour les études chromosomiques ainsi que pour la biologie moléculaire a été établie. Une telle pratique permettra évidemment d'économiser du temps et de l'argent en collectant des échantillons en double. (Kotikalapudi, 2015)

1.3 Prélèvement sanguin chez les animaux

L'identification de l'animal doit être vérifiée et l'état général de l'animal observé avant de commencer. Toute anomalie observée doit être notée.

- Procédure générale pour les prélèvements sanguins : une consultation doit être réalisée pour connaître les volumes sanguins maximaux, les périodes de récupération à respecter ainsi que les signes cliniques à vérifier lors de ces prélèvements.
- Le nombre d'essais (ponctions) devrait se limiter à trois, après quoi l'assistance d'une personne expérimentée doit être demandée.

- Les seringues et aiguilles utilisées doivent être disposées immédiatement dans un contenant biodégradable pour objets piquants et tranchants, sans avoir remis le capuchon.
- Il faut s'assurer de l'arrêt du saignement avant de retourner l'animal dans son enclos.
- Avant de quitter la pièce, l'état des animaux doit être vérifié après les prélèvements.

Le prélèvement sanguin chez les petits ruminants peut se faire à la veine jugulaire et à la veine céphalique. Pour des volumes de 2 ml et plus, privilégier la veine jugulaire. (Matthew et al, 1999)

1.3.1 Veine céphalique

Dans ce cas la procédure est la suivante :

- Décoller le piston de la seringue avant de faire le prélèvement.
- Raser le site de prélèvement pour visualiser la veine.
- Lorsque le site est rasé, passer un tampon d'alcool sur le site de prélèvement.
- Immobiliser le membre antérieur en bloquant l'articulation. Effectuer un garrot pour faire gonfler la veine.
- Utiliser une aiguille selon la grosseur de l'animal. Une aiguille 20 à 25G est recommandée pour les agneaux et les chevreaux, 16 à 20G pour les adultes et de 1 pouce maximum.
- Insérer l'aiguille biseau vers le haut dans un angle de 30 degrés puis redresser parallèlement à la veine pour y accéder.
- Soutirer le volume de sang désiré, relâcher le garrot et le piston, puis retirer l'aiguille et effectuer une pression pour arrêter le saignement. (Matthew et al, 1999)

1.3.2 Veine jugulaire

Pour les prélèvements dans la veine jugulaire, on procède de la manière suivante :

- Décoller le piston de la seringue avant de faire le prélèvement.
- Raser le site de prélèvement pour visualiser la veine.
- Lorsque le site est rasé, passer un tampon d'alcool sur le site de prélèvement.

- Un animal docile nécessitera peu de contention. Pour un animal plus stressé, conventionner l'animal en l'asseyant. Soulever la tête de l'animal à un angle d'environ 30 degrés et effectuer un garrot pour faire gonfler la veine.
- Utiliser une aiguille selon la grosseur de l'animal. Une aiguille 20 à 25G est recommandée pour les agneaux et les chevreaux, 16 à 20G pour les adultes et de 1 pouce maximum.
- Insérer l'aiguille biseau vers le haut dans un angle de 30 degrés puis redresser parallèlement à la veine pour y accéder.
- Soutirer le volume de sang désiré, relâcher le garrot et le piston, puis retirer l'aiguille et effectuer une pression pour arrêter le saignement. (Matthew et al, 1999)

1.3.3 Le volume de sang

Le volume de sang approximatif collecté dépend du site de ponction et vis-versa (Matthew et al, 1999) par exemple :

- ❖ Veine céphalique 5 à 10 ml.
- ❖ Veine jugulaire 10 à 30 ml.

L'ADN

2. L'ADN

2.1 Définition

L'ADN ou l'Acide Désoxyribonucléique est le support de l'information génétique chez tous les êtres vivants. 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 : l'ADN. L'étude de toute forme de vie passe donc par l'étude structurale et fonctionnelle de cette molécule. (Gelbart **W** et al. 2001)

2.2 Sources de l'ADN :

On peut extraire l'ADN de tout liquide ou tissu contenant des cellules nucléées. Particulièrement, le sang (contenant les globules) et le sperme (contenant les spermatozoïdes à n chromosomes) représentent des bonnes sources et sont faciles à collecter.

Les tissus, y compris les os, sont aussi des bonnes sources mais demandent une altération de l'intégrité de l'organisme.

Les fèces présentent aussi une source d'ADN. En effet, lors du passage des aliments dans l'intestin, des cellules épithéliales se détachent de la paroi intestinale et seront éjectées et se retrouvent sur la couche superficielle des excréments. Mais un échantillon de fèces contient des ADN de différentes sources : bactéries de la flore intestinale, proies si l'animal est carnivore, etc.

Pour identifier l'ADN de l'animal étudié, il faut utiliser des marqueurs génétiques propres à l'espèce : l'ADN mitochondrial. En effet, l'ADN mitochondrial (qui se trouve dans la mitochondrie) est transmis uniquement par la mère (haploïde, un seul type par individu). Ainsi l'ADN mitochondrial devient caractéristique de chaque espèce, offrant ainsi un pouvoir de résolution faible entre les différentes espèces, même celles étroitement apparentées. La digestion enzymatique du segment d'ADN mitochondrial, qui génère des fragments d'ADN d'une longueur propre à chaque espèce, permet ainsi de déterminer avec certitude l'appartenance d'un échantillon à une espèce donnée.

La salive, les sécrétions nasales et les urines présentent des cellules somatiques rejetées qui favorisent le renouvellement de l'organisme. Cependant, les cavités buccale, nasale, vaginale et/ou les canaux urinaires sont en contact direct avec l'air et les sécrétions peuvent contenir des cellules d'origine bactérienne (voire virale dans le cas d'une infection).

Dans le cas des poils, ces derniers renferment dans leurs racines des cellules logées dites follicules qui contiennent l'ADN. L'observation d'un poil coupé ou tombé qui ne contient pas de follicules montre qu'il peut être dépourvu d'ADN. Pour cela, cette source est très variable voire mauvaise. (Mainguy et Bernatchez **L**, 2007)

2.3 Activités enzymatiques

2.3.1 Définition

Les nucléases sont présents 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 (ARNases) mais d'autres ne sont pas spécifiques et sont appelées tout simplement nucléases. (Griffith **A**, et al, 2001)

2.3.2 Quelques enzymes utilisables dans l'extraction d'ADN

Différentes protéases peuvent être utilisées, leur rôle sera de débarrasser l'ADN des protéines, essentiellement les histones, qui constituent 50% du total des molécules constituant les chromosomes dont la composition est 50% d'ADN et 50% de protéines.

- **La pronase E** est le meilleur agent protéolytique actuellement disponible pour la dispersion des lignées cellulaires fibroblastiques. Elle est supérieure à la trypsine non seulement pour séparer les monocouches de leur substrat mais aussi pour produire des suspensions de cellules individuelles. (John **F** et al, 1975)
- **La trypsine** a été découverte en 1876 par Wilhelm Kühne et a été nommée d'après le mot grec ancien désignant le frottement puisqu'elle a été isolée pour la première fois en frottant le pancréas avec de la glycérine. (Kühne, 1876)

C'est une enzyme de la première section de l'intestin grêle qui commence la digestion des molécules de protéines en coupant de longues chaînes d'acides aminés en plus petits fragments (peptides). Il s'agit d'une sérine protéase de la superfamille du clan PA,

présente dans le système digestif de nombreux vertébrés, où elle hydrolyse les protéines. (Rawlings **et al.**, 1994)

La trypsine se forme dans l'intestin grêle lorsque sa forme pro-enzymatique, le trypsinogène produit par le pancréas, est activée. La trypsine coupe les chaînes peptidiques principalement du côté carboxyle des acides aminés lysine ou arginine. Elle est utilisée pour de nombreux procédés biotechnologiques. Le processus est communément appelé protéolyse à la trypsine ou trypsinisation, et les protéines qui ont été digérées/traitées avec de la trypsine sont censées avoir été trypsinisées. (Engelking, 2015)

- **La protéinase K** est une enzyme de la famille des protéases à sérine. Elle est communément utilisée en biologie moléculaire pour digérer les protéines et donc éliminer les contaminants protéiques des préparations des acides nucléiques. Elle permet de digérer les cellules et d'extraire les acides nucléiques (ADN ou ARN) à partir de cellules de mammifères ou de micro-organismes. Elle peut aussi inactiver les ADNases et ARNases et peut modifier les protéines de surface des cellules. La protéinase K est une endopeptidase qui coupe les liaisons peptidiques de préférence au niveau du carboxyle d'un acide aminé à chaîne latérale hydrophobe ou aromatique. Son activité est stimulée par les agents dénaturants comme le sodium dodécyl sulfate (SDS). (Betz et al, 1993)

2.4 Méthodes d'extraction de l'ADN

Depuis que la biologie moléculaire est née, beaucoup de techniques d'extraction des acides nucléiques ont vu le jour et notamment en ce qui concerne l'ADN. L'ADN peut être extrait à partir de toutes les cellules dont le génome est de l'ADN qu'elles soient procaryotes ou eucaryotes.

Dans tous les cas trois grandes étapes se répètent :

- ✓ Lyse des cellules
- ✓ Extraction et élimination des protéines
- ✓ Extraction et récupération de l'ADN

Cependant selon le type cellulaire, certaines modifications sont introduites.

2.4.1 Extraction d'ADN à partir de sang

2.4.1.1 La méthode saline (salting out) et au phénol

Cette méthode est une méthode chimique largement utilisée. L'extraction de l'ADN est réalisée par des ajouts de solutions à différents rôles.

Pour notre cas, c'est-à-dire l'extraction de l'ADN à partir du sang :

Dans le cas des animaux ou de l'homme l'extraction de l'ADN se fait préférentiellement à partir du sang pour la facilité qu'offre ce tissu à être récupéré.

L'ADN sera extrait à partir des seules cellules nucléées c'est-à-dire les globules blancs. En effet les globules rouges et les plaquettes ne possèdent pas de noyaux. Pour cela la première étape qui sera réalisée, dans l'extraction d'ADN à partir de sang, sera l'élimination des globules rouges qui constituent 97,77% de la partie cellulaire. (Jemmali, 2007)

2.4.1.1.1 Lyse des globules rouges

On ajoute une solution d'hémolyse qui est hypertonique (généralement saline) qui provoque l'éclatement des globules rouges suite à un phénomène d'osmose.

La lyse sélective se base sur la propriété des hématies qui contiennent des hémoglobines. Cette étape est réalisée grâce à une solution préparée dite d'hémolyse. Les composants de cette solution diffèrent selon le protocole.

Cette opération provoque la lyse des globules rouges seulement. Les débris d'hématocytes sont ensuite éliminés par une centrifugation.

Les globules blancs, se retrouve dans ce qui a sédimenté c'est-à-dire dans le culot sous l'effet de la centrifugation (séparation par densité des éléments physiques : lymphocytes, de la solution contenant les débris des hématies).

Cette étape sera répétée jusqu'à ce qu'on obtient un culot blanc constitué exclusivement de globules blancs. (Jemmali, 2007)

2.4.1.2 Lyse des globules blancs

Au cours de cette étape, on ajoute une solution saline contenant l'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tetraacétique) qui provoque la cassure des membranes cellulaires externes et inhibe les enzymes qui peuvent dégrader l'ADN (ADNase, nucléase...). Cette solution contient aussi un détergent anionique, le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) qui va dénaturer les lipoprotéines membranaires et les enzymes lysosomiales, libérant ainsi l'ADN tout en préservant sa structure.

Dans cette étape, les lipides structuraux de la membrane forment un complexe avec la solution détergente. Ainsi les membranes seront déstructurées et on obtient le lysat qui correspond à un mélange de molécules et de débris cellulaires. Une centrifugation élimine ces complexes lipidiques en solution.

Elimination des protéines et ARN et obtention de l'ADN

Afin d'obtenir seulement l'ADN, différentes étapes seront réalisées :

- Digestion et élimination des protéines
- Elimination de l'ARN
- Précipitation et récupération de l'ADN. (Jemmali, 2007)

2.4.1.3 Elimination des protéines et de l'ARN

Les protéines vont être soumises à l'action de la protéinase K, une enzyme (champs d'activité entre 37°C et 56°C) qui sert à éliminer les différents types de protéines (surtout les métalloprotéines). Au cours de cette étape qui peut durer plusieurs heures, l'enzyme va « digérer » les protéines contenues dans la cellule, et notamment celles qui sont liées à l'ADN c'est-à-dire les histones. Dans certains protocoles on ajoute aussi la RNase, pour éliminer en même temps les ARNs. Pendant cette étape on peut réaliser des extractions en présence de réactifs inorganiques (NaCl) ou organiques (phénol).

- Les protéines peuvent être précipitées par le NaCl à 5 ou 6 M. On extrait l'ADN grâce au chloroforme seul.
- Dans d'autres protocoles, la purification de l'ADN se fait par l'ajout du phénol. Le Phénol est un solvant organique utilisé dans la purification de l'ADN en le séparant des autres constituants comme les débris cellulaires. Ainsi, on obtient deux phases : le phénol, plus dense, se trouve à la phase inférieure, une phase aqueuse supérieure contenant l'acide nucléique et une interphase qui contient les protéines. (Jemmali B., 2007)

2.4.1.4 Précipitation, récupération et conservation de l'ADN

La précipitation de l'ADN se fait sous l'action d'un alcool fort et froid (éthanol ou isopropanol à -20°C). On obtiendra finalement l'ADN précipité sous la forme de filaments blanchâtres appelée aussi « Méduse d'ADN ».

La méduse d'ADN sera récupérée puis séchée. L'ADN pourra être conservé, en l'état, pendant une longue période à -20°C ou pendant une période plus courte à 4°C. Cependant si l'ADN est conservé dans cet état à température ambiante, il sera dégradé.

Afin de visualiser l'état de l'ADN, on le ré-dissout dans une solution tampon TE (tampon Tris-EDTA). Puis la solution d'ADN pourra être soumise à une électrophorèse.

L'ADN remis en solution pourra aussi être conservé en l'état à -20°C ou à 4°C pendant des périodes plus ou moins longues et sans subir de dégradation. (Jemmali, 2007)

2.4.2 Autres méthodes d'extraction de l'ADN

D'autres méthodes d'extraction d'ADN existent. Mais nous citerons que trois exemples.

2.4.2.1 Chelex 100

Cette méthode est rapide et évite l'utilisation de solvants organiques contrairement à la méthode saline. En effet, le Chelex est une résine sous forme de perles qui lie les ions en métal comme le magnésium.

- Après un traitement de lyse des cellules, on introduit la résine qui possède une affinité élevée pour les ions polyvalents en métal. Puis, en enlevant ces derniers de la solution, la résine empêche l'action des enzymes pouvant dégrader l'ADN.
- **On peut procéder ensuite par un lavage en ajoutant de la protéinase K.**
- Après, la solution est bouillie afin de détruire les membranes et les protéines. Cette opération permet aussi la dénaturation de l'ADN.
- L'élimination des billes ou perles de Chelex (résines) est faite par centrifugation ; les billes tombent au fond du tube et l'ADN demeure dans le surnageant qui sera récupéré dans un nouveau tube eppendorf.

L'ADN ainsi extrait est moins susceptible de contenir des inhibiteurs de la réaction de PCR, principalement des ions métalliques.

Cependant cette méthode d'extraction ne permet pas une conservation à long terme de l'extrait (quelque mois au maximum). (Lerouxel, 2006)

2.4.2.2 Le gel de silice

Les matrices de silice ont des propriétés uniques pour la liaison à l'ADN. Elles sont chargées positivement et ont donc une grande affinité pour l'ADN. Conditions salines élevées et pH sont réalisés en utilisant des cations sodium, qui se lient étroitement à l'oxygène chargé négativement dans le squelette phosphaté de l'ADN.

Les contaminants sont éliminés par une série d'étapes de lavage, suivie d'une élution d'ADN sous faible force ionique (pH = 7), par utilisation de tampon TE ou d'eau distillée stérile. Dans ces protocoles, les échantillons de sang sont incubés quelques minutes avec un tampon de lyse. La plupart des protocoles durent environ 40 minutes à 1 heure de temps et permettent d'obtenir un rendement en ADN élevé avec une contamination minimale. (Carpi FM et al, 2011)

Une substance qui contient de grandes quantités de silice (jusqu'à 94%) connu sous le nom de kieselguhr, diatomite ou terre de diatomées a également été utilisée pour la purification de l'ADN. elle lie l'ADN en présence d'agents chao-tropes, suivi d'un lavage avec un tampon contenant de l'alcool et enfin l'ADN est élué dans tampon faible en sel ou eau distillée stérile. (Price CW et al. 2009)

Les kits d'extraction d'ADN ont également évolué, et ils sont incorporé dans des équipements semi et entièrement automatisés capables d'effectuer des protocoles de lyse des échantillons en aval de certaines applications comme la réaction en chaîne par polymérase (PCR), telles que BioRobot EZ1 * Avancé (QIAGEN) et Biomek * 4000

Ces dispositifs présentent certains avantages comme un moindre risque d'erreur de pipetage, une réduction du nombre de transferts d'échantillons et une réduction du temps de réalisation du protocole. Cependant, ils devraient être soigneusement examinés, étant donné le coût élevé de certains des choix d'équipements disponibles.

Ils ont également été incorporés dans un système d'analyse chimique totalement miniaturisé, qui sont des micro-puces en silicium, où la purification de l'ADN, la séparation et la détection sont réalisées. (Price CW et al. 2009)

2.4.2.3 La méthode CTAB

Cette méthode est privilégiée lorsqu'il s'agit des extractions d'ADN à partir de plantes. A l'inverse du SDS ce produit confère une charge positive aux protéines. (Benbouza **H** et al, 2006)

2.4.3 Méthodes par les kits

2.4.3.1 Principe général

Un kit d'extraction est un paquet commercialisé qui contient tous les réactifs (solutions) prêt à l'emploi et/ou matériels (tubes, colonnes, fioles de solutions, rack magnétique...) permettant de réaliser l'extraction de l'ADN de façon rapide. En effet, un kit est une solution commerciale proposée par un fabricant pour simplifier l'usage d'outils de biologie moléculaire. Un kit sert à être utilisé sur un grand nombre d'échantillons (indiqué par le fabricant). (Caron et al, 2004)

Les kits trouvés aujourd'hui sur le marché sont spécifiques à l'espèce ou au type de l'organisme étudié (procaryote, eucaryote, ruminant, règne animal ou végétal, espèce, etc.), au type de source de l'ADN (plantes, sang, tissus, fèces, etc.), au type d'acide nucléique qu'on veut extraire (ARN, ADN génomique, ADN mitochondrial...) et à la méthode d'extraction (kits manuels et kits pour les extracteurs automatiques qui contiennent juste les tampons de lyse, d'élution...). (Caron et al, 2004)

2.4.3.2 Kit Universel d'extraction d'ADN génomique :

La méthode est basée sur la précipitation des acides nucléiques d'un lysat cellulaire avec de l'éthanol. L'échantillon est homogénéisé et lysé dans une solution GeDI (genomic DNA isolation)

L'échantillon est homogénéisé et lysé dans une solution GeDI spécialement composée (qui ne contient pas de solvants organiques tels que le phénol) et, après ajout d'éthanol, l'ADN est précipité de manière sélective.

Le culot solubilisé dans un tampon ResSol spécial peut être appliqué sur une mini colonne avec des membranes en silice. Cela permet d'augmenter la pureté de l'ADN isolé et d'obtenir du matériel de haute qualité.

Le précipité peut également être dissous dans 8 mM NaOH et après neutralisation, directement utilisé pour des applications moléculaires et biotechnologiques standard telles que : PCR, clonage moléculaire, RFLP, Southernblotting, etc.

Le réactif universel d'isolation de l'ADN (GeDI) est disponible séparément (E3760) ou sous forme de kit (E3765) qui contient des colonnes de silice, la solution ResSol et des réactifs pour une purification supplémentaire de l'échantillon.(2)

2.4.3.2.1 Partie I : lyse cellulaire

Le réactif GeDI peut être utilisé pour isoler l'ADN des leucocytes. La quantité maximale de sang humain est de 1 ml pour 1 ml de réactif GeDI. Ajouter 4 volumes de tampon de Lyse RBC (E0326) à un sang entier. Mélanger en inversant le tube.

Garder à 4°C pendant 10 minutes pour lyser les érythrocytes. Mélanger deux fois en retournant le tube. Centrifuger à 1000 x g pendant 5 minutes à 4°C, et décanter soigneusement le surnageant.

Ajouter le réactif GeDI au culot de leucocytes. Mélanger soigneusement en pipetant pour homogénéiser.(2)

2.4.3.2.2 Partie II Précipitation de l'ADN :

1. Incuber l'échantillon homogénéisé à 70°C pendant 15 minutes.
2. Agiter l'échantillon à la main ou à l'aide du vortex pendant 5 secondes.
3. Centrifuger l'échantillon à température ambiante pendant 2 min à 10 000 x g.

Les débris cellulaires et les fragments de tissus non homogénéisés seront déposés.

Pour l'étape d'isolement suivante, prélever un surnageant clair.

4. Transférer le surnageant dans un nouveau tube et ajouter 1 ml d'alcool éthylique (95-100% v/v).

Dans le cas d'une homogénéisation avec Bead Tube Dry, ajouter un volume d'éthanol égal au volume du surnageant recueilli.

Laisser à température ambiante pendant 3 à 5 minutes.

L'ADN doit devenir visible sous la forme d'un précipité trouble. L'ADN précipité ne sera pas visible si la concentration est faible (<10 µg) ou si l'ADN est fragmenté.

Dans certains cas, il est possible d'enrouler l'ADN précipité en le faisant tourbillonner sur une pointe de pipette et de transférer l'ADN dans un tube propre. Rincer ensuite le culot d'ADN avec de l'éthanol à 75 %, éliminer l'éthanol, sécher le précipité et suspendre l'ADN dans le tampon approprié. S'il n'est pas possible d'enrouler l'ADN, poursuivre les étapes suivantes du protocole.

5. Centrifuger l'échantillon à température ambiante pendant 2 minutes à 10 000 x g. Jeter le surnageant, en veillant à ce que tout le liquide soit éliminé.

6. En fonction des besoins, passer à la partie suivante du protocole (Purification de l'ADN sur colonne), ou suivre les points ci-dessous.

7. Laver une fois le culot avec 1 ml d'éthanol à 75 % et agiter brièvement l'échantillon au vortex. Centrifuger l'échantillon à température ambiante pendant 2 min à 10 000 x g. Jeter le surnageant en veillant à ce que tout le liquide soit complètement éliminé.

8. Sécher à l'air le culot et le dissoudre dans du NaOH 8 mM. Utiliser le volume adéquat en fonction des besoins. Incuber les échantillons pendant 5 minutes à température ambiante. Bien mélanger. Si nécessaire, chauffer brièvement l'échantillon à 55°C et mélanger à nouveau soigneusement. Pour éliminer le matériel insoluble, centrifuger l'échantillon à température ambiante pendant 2 minutes à 10 000 x g.

Transférer le surnageant nettoyé dans un nouveau tube et le neutraliser avec une quantité appropriée de 1 Ml de HEPES 1 M.(2)

Matériel et méthodes

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.

➤ **Tampon pour remettre en solution l'ADN**

Solution de TE (10/1 mM)

—
—

➤ **Tampon TBE (tris/borate/EDTA)** : Pour l'électrophorèse

Tris 89 mM

EDTA 2 mM

Acide borique 89 mM

Eau distillée 1 l

Ajustez le pH à 8 en ajoutant du HCl concentré

➤ **Tampon de charge**

Bleu de bromophénol 25 mg

Saccharose 4 g

Eau distillée 10 ml

3.2.2. Autres solutions

☞ **NaCl 6 M** : cette solution nous permettra de réaliser le salting-out (Miller et al., 1988).

☞ **Solution de SDS à 20%** Pour la digestion des membranes et dénaturation des protéines.

☞ **Solutions enzymatiques** : Quatre enzymes protéolytiques ont été testées : trypsine, pepsine, pronase E et la protéinase K (seulement pour le deuxième prélèvement). Toutes ces enzymes ont été préparées à une concentration de 10 mg/ml.

☞ **Ethanol** : à 96° à -20°C. Pour la précipitation de l'ADN.

3.2.3. Préparation du gel d'agarose

Nous avons opté pour un gel d'agarose à 1% (Brody **JR**, et al ,2004) dont le mode préparatoire est le suivant :

Tampon TBE 60 ml

L'agarose 0,6g

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.

3.3. Méthodes

Lors de l'extraction d'ADN à partir du sang et quel que soit la méthode utilisée, quatre étapes doivent être effectuées et qui sont :

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

Dans notre travail, nous avons opté pour la méthode du salting-out afin d'éviter d'utiliser des produits nocifs comme le phénol.

3.3.1. Extraction de l'ADN à partir de sang total par la méthode du salting-out

Différentes techniques, d'extraction de l'ADN, existent. Certaines utilisent des produits organiques et d'autres des produits inorganiques. Dans notre travail, nous avons choisi la technique du **Salting-out** qui n'utilise pas de produits dangereux (comme le phénol) (**Ghaffour, 2017**). De plus nous avons adopté d'autres protocoles qui ne nécessitent pas de vitesses de centrifugation élevées.

Le but de l'extraction va être d'isoler l'ADN des autres composés de la cellule (protéines et acides nucléiques autres que l'ADN tels que l'ARN etc.)

Les techniques d'extraction des acides nucléiques relativement simples, permettent d'obtenir un ADN de pureté élevée et de quantité importante. Elles ont pour but de récupérer les acides nucléiques en suspension et de les solubiliser dans un tampon adéquat. Il

convient simplement d'éviter, le plus possible, toute destruction enzymatique ou mécanique de l'ADN.

3.3.2. Principe de la méthode du salting-out

qui précipite qui ???????

Le salting-out correspond à une déshydratation suivie d'une précipitation des protéines par une solution de chlorure de sodium saturée. Après précipitation des protéines, l'ADN est précipité par de l'éthanol puis repris en suspension.

3.3.3. Mode opératoire

Après ponction des moutons, le sang a été récupéré dans des tubes contenant majoritairement l'anticoagulant, EDTA.

Les échantillons de sang ont été conservés au congélateur à une température de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, jusqu'au moment de leur utilisation pour l'extraction d'ADN.

L'ADN qui doit être récupéré sera extrait à partir des globules blancs.

3.3.3.1. Lyse préférentielle des globules rouges

Afin de réaliser la lyse des globules rouges, nous avons procédé de la manière suivante :

Sortir les échantillons de sang et les mettre dans une étuve à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour les décongeler.

Ensuite les incubés à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ au réfrigérateur.

L'hémolyse des globules rouges a été obtenue en rajoutant, au volume de la suspension globulaire, 2 à 5 fois en volume de la solution de lyse des G.R c'est-à-dire de la solution TE (10/10 mM). Après agitation au vortex, les échantillons ont été incubés à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 10 min.

Après centrifugation à 4000 tours/min pendant 10 min, le surnageant a été éliminé et le culot retraité comme précédemment. Cette opération doit être répétée jusqu'à obtention d'un culot blanc c'est-à-dire d'un culot constitué de globules blancs seulement.

A cette étape, le protocole peut être interrompu en conservant le culot des globules blancs au congélateur à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A ce stade la précaution à prendre est de ne jamais décongeler les échantillons de globules blancs avant leur utilisation pour l'extraction d'ADN.

3.3.3.2. Lyse des globules blancs et élimination des protéines

Les culots de globules blancs ont été soumis au traitement suivant :

Les culots de globules blancs ont été décongelé et immédiatement remis soigneusement en suspension dans du tampon TE (10/5 mM) par pipetages successifs. A chaque échantillon, nous avons rajouté 200 µl de la solution de SDS.

A ce stade, nous disposons de trois échantillons. Dans chacun, 5 µl d'une des enzymes protéolytiques (pronase E, trypsine et pepsine) ont été rajoutés. Une incubation a été réalisée à 37°C toute la nuit.

Pour la pronase E la digestion a été **prolongée** de 1 h à 65°C.

Pour certains échantillons, nous avons utilisé comme enzyme protéolytique la protéinase K.

Cette étape a été achevée par le rajout d'un volume de 1,5 ml de la solution de NaCl à 6M. Puis nous avons agité vigoureusement et centrifugé à 4000 trs/min pendant 20 minutes.

3.3.3.3. Précipitation et récupération de l'ADN

Après centrifugation, les surnageants (lysats) ont été récupérés dans de nouveaux tubes. 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. Les méduses ont été récupérées remises dans de nouveaux tubes puis séchées pendant toute une nuit, afin d'éliminer toute trace d'éthanol.

L'ADN a été remis en suspension dans du tampon TE (10/1 mM) et nous avons réalisé un dosage par lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260 nm afin d'estimer la concentration en ADN de notre solution.

3.3.3.4. Electrophorèse des échantillons d'ADN

Dans un pH proche de la neutralité, l'ADN est chargé négativement ce qui permet de réaliser l'électrophorèse du pôle négatif vers le pôle positif. L'électrophorèse a été réalisée dans un gel d'agarose à 1%.

Les échantillons d'ADN ont été préparés comme suit :

A 70 μ l de la solution d'ADN, on rajoute 35 μ l de tampon de charge et 5 μ l d'une solution de **bromure d'éthidium**. Puis à partir de ce mélange, on dépose 15 μ l/puits du gel d'agarose.

L'électrophorèse a été réalisée à 80v pendant 2h.

L'observation des résultats a été faite sous ultraviolets (254 nm).

Résultats et discussions

4.1 Utilisation des échantillons de sang

Nous avons collecté le sang des moutons dans des tubes de 4 ml contenant l'EDTA comme anticoagulant.

L'EDTA est décrit comme étant le meilleur anticoagulant pour isoler l'ADN et l'ARN car il est aussi un inhibiteur des nucléases, raison pour laquelle il est utilisé dans toutes les solutions tampon des protocoles d'extraction de l'ADN (C Meunier et al ,1999).

Certains de nos échantillons de sang ont été utilisés frais et d'autres après congélation à -20°C.



Figure 02 : Les échantillons de sang dans des tubes EDTA

4.2 Extraction de l'ADN à partir de sang total par la méthode du salting-out :

4.2.1 Résultats de la lyse préférentielle 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. Le sang est constitué de 55% de plasma et 45% de cellules (globules rouges, globules blancs et plaquettes). Parmi l'ensemble des cellules, les globules rouges constituent une masse de 97% et les globules blancs seulement 2,2%. Pour cela l'étape de lyse des globules rouges nécessite plusieurs lavages.

Pour l'élimination des globules rouges, nous avons utilisé un tampon contenant du **TRIS** et de l'EDTA (solution hémolysante (I)).

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. (Pfenninger et al. ,1996)

Les différents lavages avec la solution hémolysante (I) vont permettre d'éliminer progressivement les globules rouges (figure 03).



Figure 03 : résultat de la lyse des globules rouges 1^{er} lavage.

Après le premier lavage des globules rouges et la centrifugation, on obtient une coloration rouge claire à cause de la lyse des globules rouges alors que la coloration avant ce premier lavage était d'une couleur rouge foncée (Figure 04).



Figure 04 : Résultats de la lyse des globules rouges après le 3^{ème} lavage.

A chaque lavage, la lyse touche de plus en plus de globules rouges et la couleur s'éclaircie de plus en plus, laissant apparaître un culot blanc après chaque centrifugation.

Le culot blanc correspond aux globules blancs.

Le dernier lavage (5^{ème} lavage) permet d'obtenir un surnageant de couleur transparente signe que les globules rouges ont été totalement éliminés et un culot blanc (Figure 5)



Culot de lymphocytes

Figure 05 : Résultat représentant les culots de lymphocytes.

4.2.2 Résultats de la lyse des globules blancs et élimination des protéines

La lyse des globules blancs est obtenue après l'ajout de la solution hémolysante (II) et du SDS 20%. A cette étape nous obtenons une solution de couleur transparente et visqueuse (figure 06).

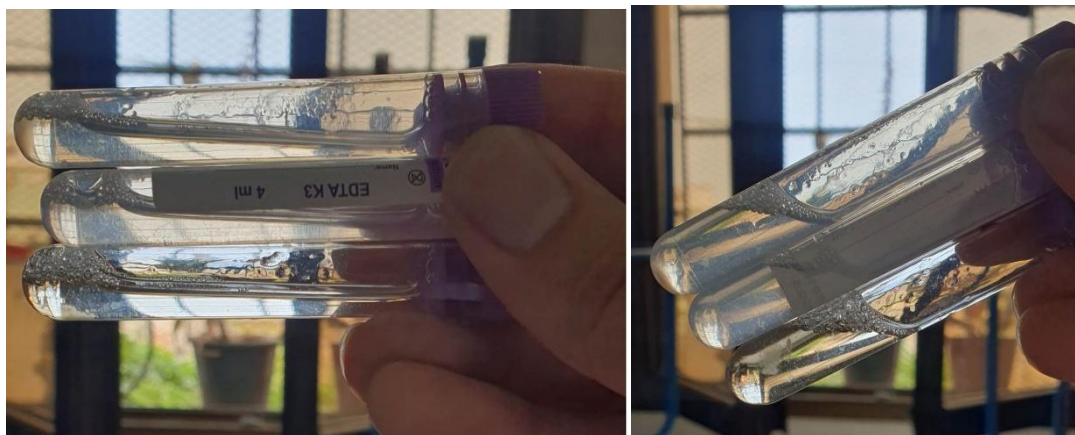


Figure 06 : Aspect des résultats après ajout de la solution hémolysante II et le SDS

La lyse des globules blancs a nécessité l'utilisation aussi de l'enzyme (trypsine, pepsine ou protéinase k) et une incubation à 37°C pendant une nuit.

Pour l'enzyme pronase E on a incubé seulement 1 h.

Après l'incubation et l'ajout de NaCl (6M) et l'agitation vigoureusement on obtient une couleur blanche crémeuse (Figure 07).



Figure 07 : après rajout du NaCl et agitation

Après la centrifugation on obtient un culot blanc et le surnageant qui contient l'ADN (Figure 08).

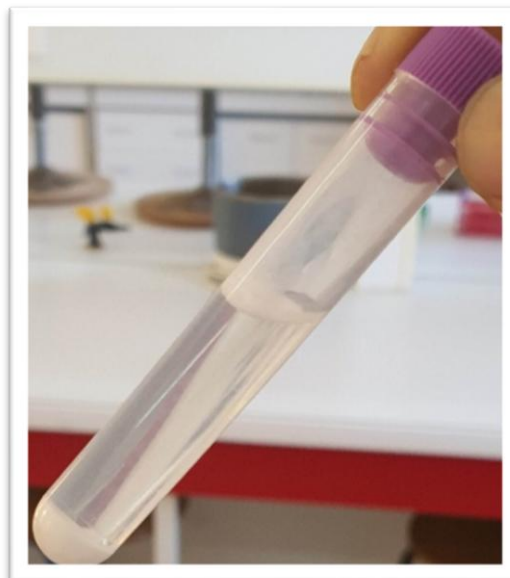


Figure 08 : Résultat après la centrifugation.

4.2.3. Résultats de la précipitation et récupération de l'ADN

Après émulsion du lysat avec l'éthanol froid, la précipitation de l'ADN a eu lieu par la formation de la méduse (voir figure 09).

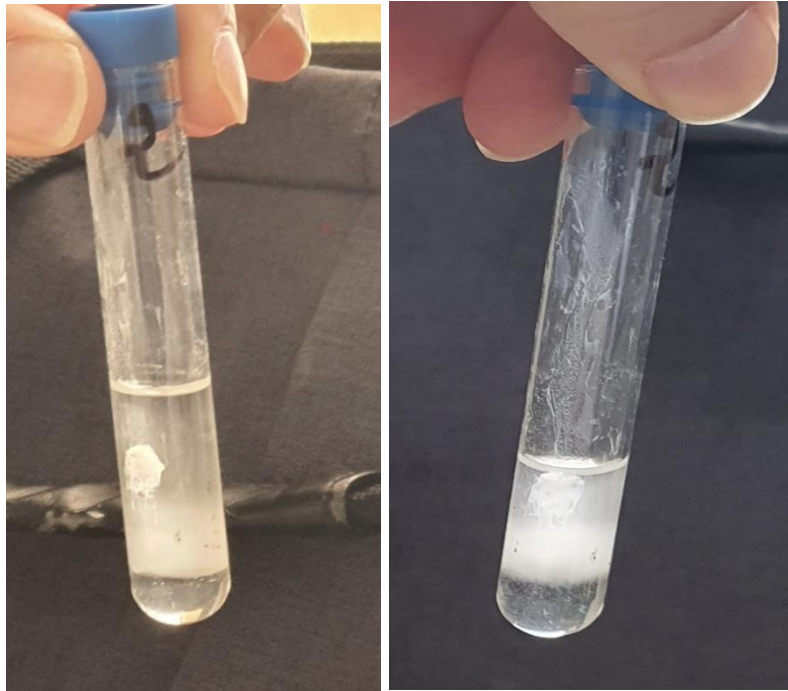


Figure 09 : Résultats après la formation de la méduse (pronas E)

La méduse a été récupérée et mise dans un nouveau tube. Après une étape de séchage toute une nuit, l'ADN a été remis en solution dans 100 μ l de tampon TE (10/1 mM).

4.2.4. Mesure de la concentration d'ADN

Le dosage de la quantité d'ADN dans nos échantillons a été réalisé par spectrophotométrie à la longueur d'onde 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 μ g/ml.

Donc :

L'absorbance de notre solution d'ADN est de 0,327, ce qui correspond à une concentration de 16,35 μ g/ml. Donc la concentration d'ADN dans l'échantillon analysé est de

16.35 µg/ml, le rendement est très faible. Ceci est dû au fait que l'enzyme utilisée est la pronase E 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.

4.2.5. Résultats de l'électrophorèse des échantillons d'ADN

Le bromure d'éthidium est le réactif le plus couramment utilisé pour colorer l'ADN dans des gels d'agarose, mais la visualisation se fait toujours sous ultra-violets (Figure 10). Lorsqu'ils sont exposés à la lumière UV, les électrons dans le noyau aromatique de la molécule d'éthidium sont activés, ce qui conduit à la libération de l'énergie (la lumière) qui permettra de visualiser les molécules d'ADN. Le bromure d'éthidium s'intercale dans la molécule d'ADN d'une manière dépendante de la concentration. Cela permet une estimation de la quantité d'ADN dans une bande d'ADN notamment en fonction de son intensité. (Sharp, P et al ,1973)



Figure 10 : résultat directement sur la plaque UV

Les résultats de l'électrophorèse ne se sont pas avérés satisfaisants car leur interprétation s'est révélée problématique. En effet, ce que nous avons observé au niveau du gel est très différent des bandes d'ADN attendues.

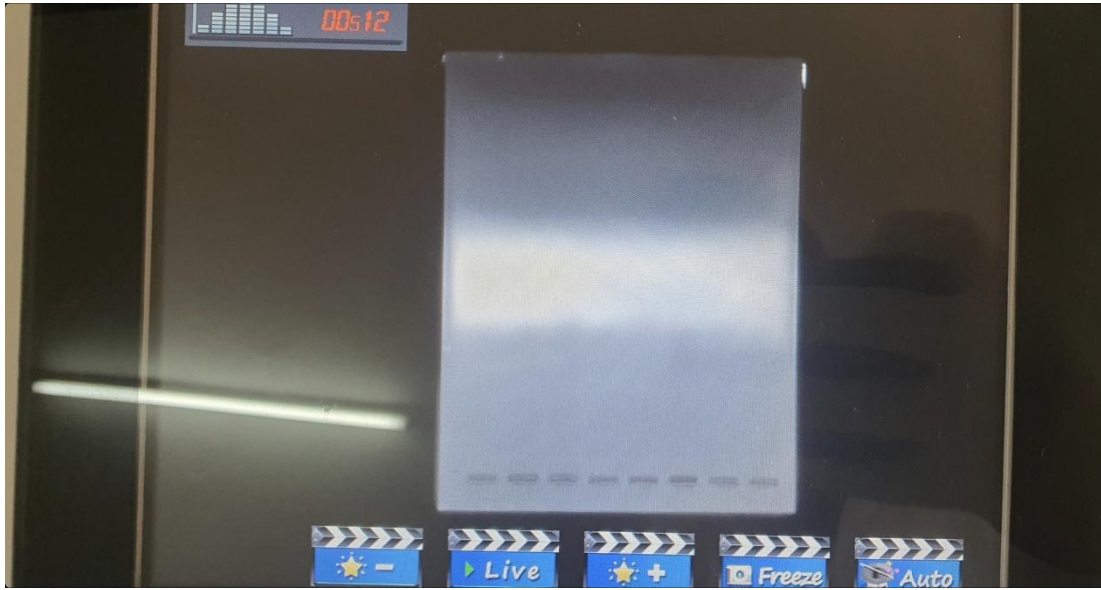


Figure 11 : Résultat obtenu par le scanner informatisé de la plaque UV.

Remarque :

EtBr est un mutagène et cancérigène suspect, donc il faut faire preuve de prudence lors de la manipulation des gels d'agarose qui en contiennent. (Sharp, P et al ,1973)

D'autres extractions d'ADN doivent être envisagées afin d'optimiser les conditions de travail pour obtenir des résultats corrects.

Conclusion

Conclusion

Tous les êtres vivants sur le plan moléculaire sont étudiés principalement par leur ADN (génomique) et selon les études par les produits qui en découlent transcrits (transcriptomique) et protéines (protéomique).

De l'ADN implique des protocoles selon le type cellulaire et dans notre cas nous avons réalisé l'extraction d'ADN à partir du sang 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 récupérer après l'extraction par salting-out et précipitation à l'éthanol.

Nous avons décidé d'utiliser le salting-out pour la sécurité qu'offre cette méthode d'extraction de l'ADN.

Parmi les enzymes protéolytiques testées (pepsine, pronase E, trypsine et protéinase K) seule la pronase E a permis d'obtenir une méduse d'ADN après précipitation à l'éthanol.

La quantité d'ADN obtenue est très faible puisqu'elle est de 16.35 µg/ml, ceci est sûrement dû à la qualité des produits comme l'utilisation de la trypsine, la pronase E et 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. Une autre raison à la faible concentration d'ADN est peut-être sa dégradation.

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 pour une qualité de sang pure.
- Utiliser la protéinase K au lieu des autres enzymes protéolytiques.
- Maintenir les **Ph** des tampons et les solutions hémolysantes.
- Et renforcer les solutions de lyse par du KCl et du MgCl₂.
- L'Utilisation de sulfate d'ammonium ou de sulfate de sodium ainsi qu'un lavage avec de l'éthanol à 70° permettrait d'éliminer toute trace de sel et donc d'obtenir de l'ADN pur,
- Utilisation des kits d'extraction d'ADN,
- Le contrôle de la qualité doit être maintenu.

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

Références bibliographiques

Reference :

- ✓-Nouairia G, (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
- ✓-FELIACHI k. (2003). Rapport National sur les ressources génétiques animales, **république Algérienne démocratique et populaire** ministère de l'a agriculture et du développement rural. Algérie. P : 30, 56.
- SAGNE J., (1950), L'Algérie pastorale, ses origines, sa formation, son passé, son présent, son avenir, éditions Fontana, Alger, 267p.
- ✓-CHELLIG, R., (1992). Les races ovines algériennes. O.P.U. Alger, p80
- G. Banfi, Milan, Italy H. Kitta, Usingen, Germany K. Bauer, Vienna, Austria D. Klahr, Tuttlingen, Germany, W.Brand, Nümbrecht, Germany D. Kolpe, Nümbrecht-Elsenroth, Germany. M.Buchberger, Kremsmünster, Austria J. Kukuk, Limburg, Germany A. Deom, Geneva, Switzerland T. Kunert-Latus, Leuven, Belgium W.Ehret, Augsburg, Germany M.Lammers, Marburg, Germany W.D. Engel, Mannheim, Germany E.A. Leppänen, Helsinki, Finland F. da Fonseca-Wollheim, Berlin, Germany P. Mikulcik, Fernwald, Germany C.G. Fraser, Dundee, Scotland ,S. Narayanan, New York, USA V.J. Friemert, Deisenhofen, Germany M. Neumaier, Hamburg, Germany, S.Golf, Giessen, Germany M.A. Peça Amaral Gomes, Lisbon, Portugal H.Gross, Hanau, Germany R. Probst, Munich, Germany W.G. Guder, München ,Germany Y. Schmitt Darmstadt, Germany G. Gunzer, Clare, Ireland O.Sonntag, Neckargemünd, Germany P. Hagemann, Zürich, Switzerland G. Töpfer, Görlitz, Germany W. Heil, Wuppertal, Germany R. Weisheit, Penzberg, Germany J. Henny, Nancy, France H. Wisser, Stuttgart, Germany R.Hinzmann, Krefeld Germany B. Zawta, Mannheim, Germany P. Hyltoft Persen, Odense, Denmark R. Zinck Mannheim, Germany G. Hoffmann, Grafrath, Germany (2002). USE OF ANTICOAGULANTS IN DIAGNOSTIC LABORATORY INVESTIGATIONS. WHO : 5
- Kotikalapudi R, Patel RK. (2015). Comparative study of the influence of EDTA and sodium heparin on long term storage of cattle DNA. Cell J. ; 17(1): 181-186
- Allen, Matthew J. et Borkowski, Gary L. (1999). The laboratory small ruminant, 101-105 p.

- Jemmali B., (2007). Caractérisation moléculaire des variantes de la caséine Kappa chez les caprins en Tunisie. Mémoire de Mastère. INAT, Tunisie : 87p.
- Benbouza H., Jacquemin JM., Baudoin JP., Mergeai G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10 (2), p. 77–81.
- Griffith A, Gelbart W, Miller J et Lewontin R, (2001). *Analyse Génétique Moderne*. De Boeck, Paris, France : 329p
- Mainguy J., Bernatchez L., (2007). L'analyse de l'ADN sans manipulation des animaux : un outil incontournable pour la gestion et la conservation des espèces rares ou élusives. *Le naturaliste canadien* : p55-58,
- Lerouxel A., (2006). Participation à l'établissement d'une phylogénie moléculaire de requins d'eau profonde de l'ordre des squaliformes. Mémoire de mastère, Université de Nantes Faculté des Sciences et Techniques, France : 44p.
- Rawlings ND, Barrett AJ (1994). "Families of serine peptidases". *Methods in Enzymology*. 244 :(19–61).
- C. Betzel, T. P. Singh, M. Visanji, K. Peters, S. Fittkau, W. Saenger et K. S. Wilson, « *Structure of the complex of proteinase K with a substrate analogue hexapeptide inhibitor at 2.2-Å resolution* », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, 25 July 1993, p. (15854-15858)
- Engelking LR (2015-01-01). "Chapter 7 - Protein Digestion". *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Ed.)*. Boston : Academic Press. P. (39–44)
- John F. Foley, Byron Th. (1973). *Tissue Culture "Methods and Applications"* Boston: Academic Press. P (185-188)
- Kühne W (March 6, 1876). "Ueber das Trypsin (Enzym des Pankreas)" [About trypsin (enzyme of the pancreas)]. In *Naturhistorisch-medizinischen Verein (ed.)*. *Verhandlungen des Naturhistorisch-medizinischen Vereins zu Heidelberg [Negotiations by the Natural History Medical Association in Heidelberg]* (in German). Heidelberg, Germany : Carl Winter's Universitätsbuchhandlung (published 1877). p. 194–8
- Gelbart W, Griffith A, Miller J et Lewontin R, 2001. *Analyse Génétique Moderne*. De Boeck, Paris, France : 335p.

-Price CW , Leslie DC ,Lander JP. Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip. Lab Chip. 2009 ;28(3) .P(495-503).

-Carpi FM, Di Pietro F, Vincenzetti S, Meghini F, Napolioni V. Human DNA extraction methods : patents and applications . Recent Pat DNA Gene Seq. 2011; 5(1):1-7.

-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.

- Caron , Chadli M., Koeck J L., Maslin J., Nicand E., Nizou J. Y. et Buisson Y.,2004. Diagnostic biologique rapide en contexte épidémique: état des lieux, perspectives.Médecine et maladies infectieuses p368.

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

- Ghaffour Amina (2017). Contribution à la construction d'une bibliothèque 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

- S.A.Miller, D.D.Dykes and H.F.Polesky. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research. Volume 16 Number 3 1988. Volume 16 Number 3

-Brody JR, Calhoun ES, Gallmeier E, Creavalle TD, Kern SE (2004). Électrophorèse ultra-rapide à haute résolution sur agarose de l'ADN et de l'ARN à l'aide de milieux conducteurs de faible molarité. Biotechnique. 37:598-602.

-Sharp, P. A., Sugden, B., Sambrook, J. Detection of two restriction endonuclease activities in H. parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. Biochemistry. 12, 3055-3063 (1973)

Site web:

1- <https://vacutube-dz.com/services/>

2-<https://www.dutscher.com/article/220286>

Annexe

1-les étapes de préparation des solutions mères.

Pour faire une extraction d Adn par salting out.

Préparation des solutions :

Produit utilisée :

EDTA 0.5M PH 8.0

TRIS (HCL) 1M

SDS (20%)

NACL 6M

NAOH 3M

Ethanol

Agarose

TBE

Enzymes:

Trypsine

Pepsine

Proteinase k

Pronase E

Remarque :

Il faut stérilise tous les flacons et le matériel pour éviter la contamination

Il faut port toujours des gants pour éviter la contamination des ADNase des mains et pour éviter le risque des produits chimiques.

Préparation EDTA : 0.5 M, PH=8

EDTA =C₁₀H₁₆N₂O₈= (12×10) +16+28+ (16×8)

$m=c.M.v=292.24 \times 0.1 \times 0.5$

m=14.612g pour 100 ml

$m=29.2\text{g}$ pour 200 ml.

Réglage du **PH** jusqu'à 8 a une température $t=20^{\circ}\text{C}$ par NaOH (3M).

Préparation de TRIS (HCl) :1M

TRIS = $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ $=121\text{ g/l}=24.2\text{g}/200\text{ml}$.

-dissoudre le TRIS dans l'eau distillé :

1-dissoudre pour attendre 1/3 du volume final requis.

2-mélanger le HCl jusqu' a ce que le **PH** mètre fournisse le ph requis pour la solution tampon TRIS.

3-déluer le tampon avec **H₂O** pour attendre le volume final.

Préparation de SDS (20%) sodium dodecyl du sulfate :

1g de poudre et compléter le volume a 5 ml a une température du 60°C , et conserver a (15°C - 20°C).

Préparation de NaCl : 58.44g/l :

Ajouter pour 100 ml $=5.844\text{g}$ (1M).

Pour 6 fois molaire $=34.8\text{g}$ pour 100 ml.

Et pour 50 ml de NaCl (6M) $=17.4\text{g}$.

Remarque : il faut ajouter le NaCl progressivement et sous l'effet de la barre magnétique pour éviter la sédimentation.

Préparation de NaOH (3M) : 40g/l

Pour préparer 100 ml $=4\text{g}/100\text{ml}$ (1M)

Pour (3M) $= 12\text{g}/100\text{ml}$.

Préparation des solutions de lyse :

Solution hémolysant des globules rouges TE10 :10	TRIS 10mM	TRIS 1ml
	EDTA 10Mm =pour 100 ml=	EDTA 2ml
	H ₂ O	97 ml
Solution de lyse des globules blancs TE10 :5	TRIS 10mM	TRIS 1ml
	EDTA 5 Mm =pour 100 ml=	EDTA 1 ml
	H ₂ O	98 ml

Préparation éthanol 70 % :

$$C1V1=C2V2$$

$$96\% V1= 70\%.100$$

$V1=(70/96).100=72.91$ ml d'éthanol 96% pour 100 ml de volume total.

Préparation des enzymes :

Pesez 10 mg d enzyme (trypsine, pronase Pepsine, protéinase k) avec 1 ml l'eau distillé dans un eppendorf et mettez dans le congélateur pour une concentration de 10 mg /ml.