

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ 8 MAI 1945 GUELMA

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA
TERRE ET DE L'UNIVERS

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité/Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Extraction d'ADN à partir de sang humain par trois méthodes différentes

Présenté par :

KHARCHICHE Khawla

HARRAT Chayma

BELKHAROUCHÉ Chourouk

Membres de jury :

Président : Mr. MOKHTARI A

MCB, université 08 Mai 1945

Examinatrice : Mme. TABET M

MAB, université 08 Mai 1945

Encadreur : Mme. ABDAOUI W

MAA, université 08 Mai 1945

Septembre 2020

Remerciements

Nous remercions en premier lieu, DIEU, tout puissant pour nous accorder la puissance et la volonté de terminer ce modeste travail.

*Nous remercions profondément **Mme ABDAOUI Wissem** pour avoir accepté de diriger ce travail, pour son suivi, sa patience, sa disponibilité, ses orientations et ses remarques pertinentes qui nous ont apporté aide et soutien pour la réalisation de ce modeste travail.*

J'adresse aussi ma gratitude aux membres de jury qui nous fait l'honneur d'évaluer ce modeste travail.

Nous tenons à remercier aussi tous nos enseignants qui ont participé à notre formation tous au long de notre cursus...

Khawla, chourouk

et chaimaa

Dédicace

A celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation et de ses dévouements

A ma chère mère Atika

A celui qui s'est changé la nuit en jour pour m'assurer les bonnes conditions

A mon cher père Layachi

A ma petite famille qui m'a toujours soutenue

A tous mes collègues et amis

Je dédie ce modeste travail

Khawla.

Dédicace

Je dédie ce mémoire

*A mes chers parents ma mère et mon père pour leur
patience, leur amour, leur soutien et leur encouragement.*

A mon frère « Karim »

A mes amies et mes collègues.

*Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du
moyen, de secondaire ou de l'enseignement supérieur.*

CHOUROUK

Dédicace

A mes très chères parents AZOUZ et DALILA ;

A mon frère YAHIA et mes sœurs MERIEM, KHAOULA, et LOUBNA ;

Tout particulièrement à mon fiancé ABBES ;

A toute ma famille et à tous mes amis.....

CHAIMAA.

Résumé

Le but de ce travail est d'isoler l'ADN à partir du sang humain. Nous avons procédé à l'extraction de ce dernier selon 3 méthodes : La méthode phénol/chloroforme, Salting out et les kits commercialisés. Pour cela, la collection du sang était réalisée dans des tubes EDTA (pour éviter la coagulation du sang). Pour réaliser l'extraction de l'ADN par la méthode phénol/chloroforme, les principales étapes étaient la lyse des globules rouges, lyse des globules blancs, l'extraction au phénol, l'extraction au chloroforme et précipitation de l'ADN. Pour la méthode salting out, les étapes sont les mêmes que celles de phénol/chloroforme (sans l'utilisation de phénol ou de chloroforme). L'utilisation du kit QIAamp DSP DNA Blood Min ne nécessite pas la séparation des leucocytes au préalable. Les procédures n'impliquent pas d'extraction au phénol/chloroforme ni de précipitation par l'éthanol. Aussi, la préparation des échantillons à l'aide du QIAcube suit les mêmes étapes que la procédure manuelle (c'est-à-dire lyser, lier, laver et éluer). Les méthodes d'extraction d'ADN doivent être validées afin de générer un ADN pur de bonne qualité et de quantité suffisante pour établir un profil génétique interprétable. À la fin, deux critères ont été évalués, la quantité d'ADN et le degré de son pureté.

Mots clés : Extraction d'ADN, le sang, la lyse, kits, phénol /chloroforme, salting out.

Abstract

The aim of this work is to isolate DNA from human blood. We proceeded to the extraction of the latter according to three methods: the phenol/chloroform method, salting out and the kits marketed. For this, the blood collection was carried out in EDTA tubes (to prevent blood clotting). To perform DNA extraction by phenol chloroform method, the main steps were lysis of red blood cells, lysis of white blood cells, phenol extraction, chloroform extraction and DNA precipitation. For the salting out method, the steps are the same as for phenol/chloroform (without the use of phenol or chloroform). The use of the QIAamp DSP DNA blood Min kit does not require the separation of leukocytes first. The procedures do not involve extraction with phenol chloroform or precipitation with ethanol. Also, sample preparation using the QIAcube follows the same steps as the manual procedure (i.e. lysis, bind, wash and elute). DNA extraction methods must be validated in order to generate pure DNA of good quality and sufficient quantity to establish an interpretable genetic profile. At the end, two criteria were evaluated, the quantity of DNA and the degree of its purity.

Key words: DNA extraction, The blood, Lysis, Kits, Phenol/chloroform, Salting out.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو عزل الحمض النووي من دم الإنسان. شرعنا في استخلاص الأخير وفقاً لثلاث طرق: طريقة الفينول / الكلوروفورم، التلميح و kits. لهذا، تم إجراء جمع الدم في أنابيب EDTA (لمنع تخثر الدم). لإجراء استخلاص الحمض النووي بطريقة الفينول كلوروفورم، كانت الخطوات الرئيسية هي تحلل خلايا الدم الحمراء، تحلل خلايا الدم البيضاء، استخلاص الفينول، استخلاص الكلوروفورم وترسيب الحمض النووي. بالنسبة لطريقة التلميح، فإن الخطوات هي نفسها المستخدمة في حالة الفينول كلوروفورم (بدون استخدامه). لا يتطلب استخدام مجموعة QIAamp DSP DNA blood Min فصل الكريات البيضاء أولاً. ولا تتضمن الإجراءات الاستخلاص باستخدام الفينول كلوروفورم أو الترسيب بالإيثانول. أيضاً. يتم تحضير العينة باستخدام QIAcube حيث يتبع نفس خطوات الإجراء اليدوي (مثل التحلل، والربط، والغسيل، والتصفية). يجب التحقق من صحة طرق استخراج الحمض النووي من أجل توليد DNA نقي ذي نوعية جيدة وكمية كافية لإنشاء ملف جيني قابل للتفسير. في النهاية يتم تقييم معيارين هما كمية الحمض النووي ودرجة نقاوته.

كلمات مفتاحية: استخلاص الحمض النووي، الدم، تحلل، Kits ، الفينول كلوروفورم، التلميح.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....01

Chapitre 1 : Généralités sur l'ADN et le sang humain

1. Cellule eucaryote	02
1.1. Définition.....	02
1.2. Constituants de cellule.....	03
1.2.1. Membrane plasmidique	03
1.2.2. Noyau.....	04
2. L'acide désoxyribonucléique: ADN.....	04
2.1. Localisation	04
2.2. Structure.....	05
2.3. Propriétés physicochimiques.....	06
2.3.1. Stabilisation d'acide nucléique : ADN.....	06
2.3.2. Dénaturation chimique.....	07
2.3.3. Viscosité.....	07
2.4. Propriétés thermiques et spectroscopiques.....	08
2.4.1. Absorption U.V.....	08
2.4.2. Quantification des acides nucléiques : ADN.....	08
2.4.3. Pureté de l'ADN.....	09
2.4.4. Dénaturation thermique.....	09
2.4.5. Renaturation	11
3. Le sang.....	11
3.1. Définition.....	11
3.2. Composants de sang.....	11
3.2.1. Origine des cellules sanguines.....	12

Chapitre 2 : Techniques d'extraction et purification d'ADN

1. Extraction d'ADN.....	14
1.1. Lyse des cellules.....	14
1.2. Extraction d'ADN à partir de cellule animal.....	15
2. Différentes méthodes de l'extraction d'ADN.....	16
2.1. Méthodes classiques d'extraction de l'ADN.....	16
2.1.1. Méthode du phénol chloroforme.....	16
2.1.2. Méthode saline ou Salting out.....	18
2.1.3. Extraction par colonne échangeuse d'ions.....	20
2.2. Kits commercialisés pour extraction d'ADN.....	21
2.3. Extraction d'ADN automatisé.....	24
3. Conservation de l'ADN.....	26
4. Contrôle de la pureté de l'ADN extrait.....	27

5.	Dosage quantitatif de l'ADN.....	28
5.1.	Dosage colorimétrique de l'ADN.....	28
5.2.	Dosage spectrophotométrique de l'ADN.....	28
5.3.	Dosage fluorométrique en présence de BET.....	28
5.4.	Dosage par PCR temps réel.....	29
6.	Electrophorèse de l'ADN extrait.....	30
6.1.	Historique d'électrophorèse.....	30
6.2.	Définition d'électrophorèse.....	30
6.3.	Principe d'électrophorèse.....	31
6.4.	Différents types d'électrophorèse.....	32
6.5.	Migration électrophorétique et visualisation des fragments d'ADN.....	34

Chapitre 03 : Matériel et méthodes

1.	Objectifs de l'étude.....	35
2.	Matériel	35
2.1.	Matériel biologiques.....	35
3.	Méthodes d'extraction.....	35
3.1.	Extraction de l'ADN par la technique Na Cl « salting out ».....	36
3.1.1.	Principe.....	36
3.1.2.	Protocole opératoire	37
3.2.	Extraction de l'ADN par la méthode du phénol /chloroforme.....	38
3.2.1.	Protocole opératoire.....	38
3.3.	Extraction de l'ADN en utilisant les kits.....	41
3.3.1.	Protocole opératoire.....	43
4.	Dosage et évaluation de la pureté des échantillons d'ADN.....	44
5.	Electrophorèse des échantillons d'ADN.....	45

Discussion.....46

Conclusion.....51

Références bibliographiques

Annexes

Glossaire

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

BET: Bromure d'éthidium

[C]: Concentration

C: Cytosine

DO: Densité Optique

EDTA: Acide éthylène-diamine-tétraacétique

G: Guanine

GR : globules rouges

H : Hydrogène

HCl: Acide chlorhydrique

K +: potassium

Kb: Kilobase

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

Rpm : round tour par minute

T: Thymine

SDS : dodecyl sulfate de sodium

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

Figure 1 : Diagramme schématique d'une cellule eucaryote typique.....	02
Figure 2 : La structure de la membrane cellulaire.....	03
Figure 3 : Structure des bases azotées de l'ADN.....	05
Figure 4 : Structure d'un nucléotide.....	06
Figure 5 : Etapes de la dénaturation de l'ADN à un pH élevé.....	07
Figure 6 : Représentation schématique de la séparation des brins de l'ADN duplex lors de sa dénaturation par la chaleur	10
Figure 7 : Courbe de fusion de l'ADN.....	10
Figure 8 : Schéma des différents éléments figurés de sang.....	12
Figure 9 : fixation d'ADN sur la colonne à l'aide de liaisons ioniques.....	20
Figure 10 : Isolation de l'ADN par chromatographie échangeuse d'anions.....	21
Figure 11 : Blood DNA Extraction Kit (5 mL or 10 mL).....	22
Figure 12 : Quick blood Genomic DNA purification kit.....	24
Figure 13 : l'extracteur automatique QIAGEN QIAcube.....	26
Figure 14 : Evolution de la quantité d'amplicons en fonction du nombre de cycle de PCR présentée en échelle linéaire.....	30
Figure 15 : Révélation de l'ADN par la coloration de bromure d'éthidium.....	35

Liste des tableaux

Tableau I : les valeurs acceptables du ratio (260/280) pour un ADN pur.....	09
Tableau II : la différence entre les trois techniques d'extraction d'ADN.....	49



Introducción

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 Na Cl), Les micro-colonnes de résines échangeuses d'ions et aussi Les kits.

Les méthodes d'extraction se différencient aussi par leur coût et surtout la dangerosité des produits utilisés. **(Douaoudi.,2019).**

L'objectif de notre étude est de réaliser l'extraction de l'ADN à partir du sang humain selon trois méthodes différentes : la méthode de Na Cl, la méthode par phénol-chloroforme, la méthode par les kits commerciaux. Ensuite une comparaison des trois méthodes est réalisée en fonction du rendement et de la pureté de l'ADN obtenus et du cout de la réalisation de la méthode. Une confirmation de la qualité et l'intégrité de l'ADN extraits sera faite par une électrophorèse de l'ADN extrait sur une gélose d'Agarose.



Chapitre 1

1. Cellule eucaryote

1.1. Définition

Dans un sens général, le terme eucaryote désigne l'ensemble des organismes unicellulaires ou multicellulaires dont les cellules sont dites « eucaryotes ». La cellule d'eucaryote est en générale beaucoup plus volumineuse, jusqu'à mille fois plus que la cellule de procaryote. 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. (**Figure 1**)

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

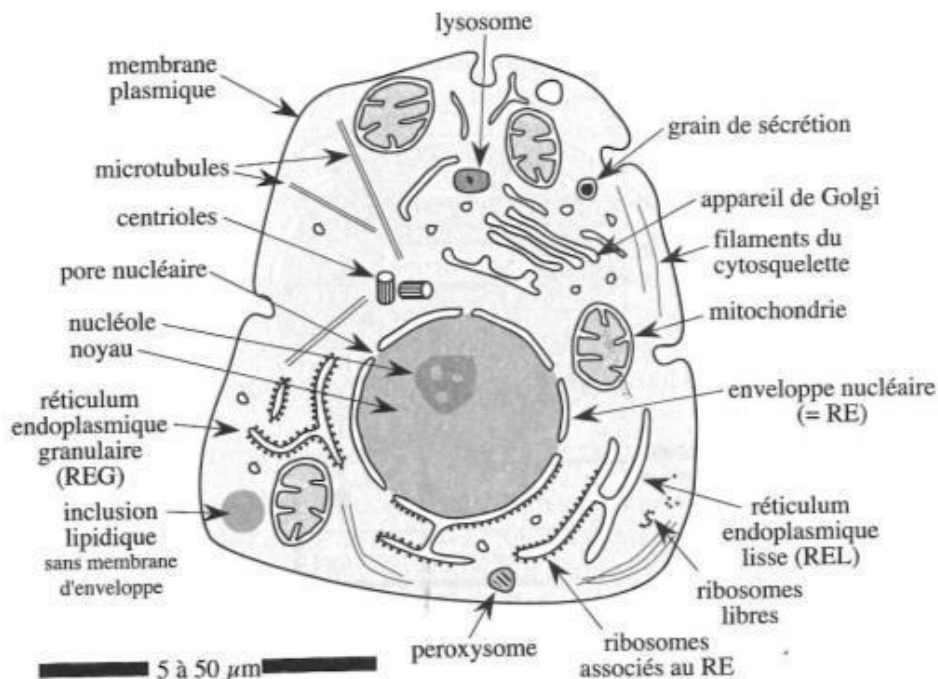


Figure 1 : Diagramme schématisé d'une cellule eucaryote typique (**Turner et al., 1999**).

1.2. Constituants de la cellule

Les cellules eucaryotes possèdent un noyau et des organites (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, plastes divers, mitochondries, etc.) délimités par des membranes.

1.2.1. 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 2**), 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 (Na^+ , K^+ , 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**).

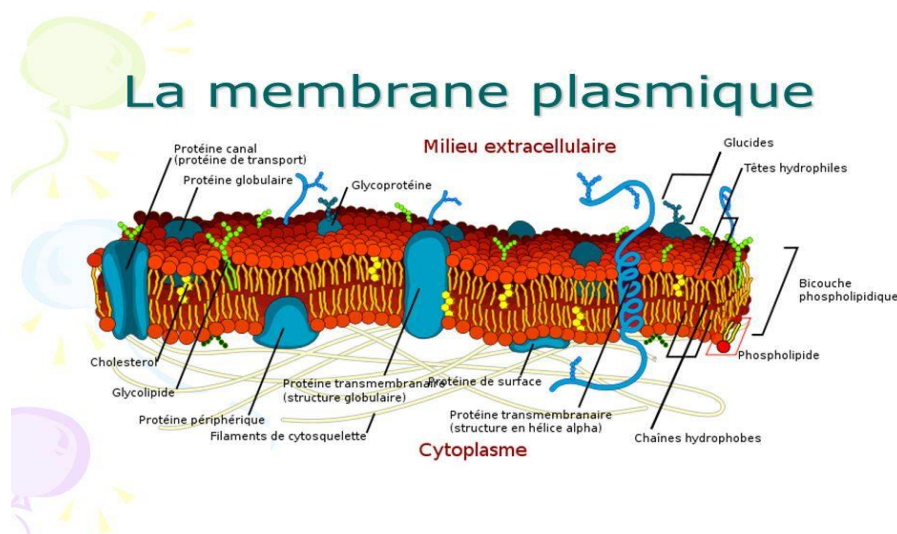


Figure 2: La structure de la membrane cellulaire (**Robert et al., 1994**).

1.2.2. Noyau

Le noyau eucaryote contient l'information génétique de la cellule répartie en plusieurs chromosomes, comprenant chacun une seule molécule d'ADN. Il est délimité par une double membrane de lipides appelée enveloppe nucléaire qui contient des pores permettant le passage de molécules assez grosses. Le noyau est le siège de la transcription de l'ARN ; ces molécules d'ARN traitées pénètrent dans le cytoplasme où elles seront traduites par les ribosomes. Les nucléoles trouvés dans le noyau sont le site de la synthèse de l'ARNr et de l'assemblage partiel des ribosomes (**Turner *et al.*, 1999**).

2. 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**).

2.1. Localisation

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**).

2.2. Structure

➤ Les bases azotées

Les bases d'ADN sont des anneaux aromatiques hétérocycliques contenant le carbone et l'azote, avec une variété de substituants. L'adénine (A) et la guanine (G) sont des purines qui présentent des structures bi cycliques (deux anneaux fondus) alors que la cytosine (C) et la thymine (T) sont des pyrimidines monocycliques (**Turner et al., 1999**).

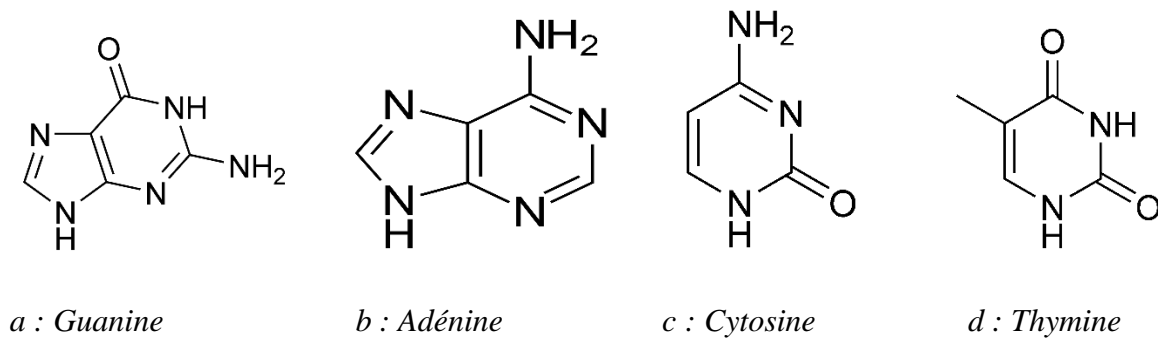


Figure 3 : Structure des bases azotées de l'ADN [1]

➤ Nucléosides

Un nucléoside est un élément constitutif des acides nucléiques, ADN et ARN. Du point de vue biochimique, c'est une glycosylamine associant deux éléments : une base azotée purine ou pyrimidine : adénine, guanine, cytosine, uracile ou thymine; un sucre : un ribose pour les nucléosides de l'ARN ou un désoxyribose pour les nucléosides de l'ADN.

Un nucléoside correspond donc à un nucléotide sans le groupement phosphate. La liaison entre le sucre et la base azotée est une liaison N-osidique. La liaison d'un nucléoside avec un groupement phosphate se fait par estérification et donne un nucléotide. Les nucléosides présents dans l'ADN, les désoxyribonucléosides, sont les suivants : la désoxyadénosine, la désoxyguanosine, la désoxycytidine et la désoxythymidine. Un nucléoside monophosphate est un nucléotide ; il existe aussi des nucléosides diphosphates (avec deux groupements de phosphate) ou triphosphates (avec trois groupements de phosphate) (**Turner et al., 1999**).

➤ Nucléotides

Un nucléotide est un nucléoside possédant un ou plusieurs groupements phosphoriques liés avec une liaison covalente à la position 3'-5'. Si le sucre est un désoxyribose, les composés sont alors appelés désoxynucléotides. Chimiquement ces composés sont des esters phosphoriques.

L'enchaînement des nucléotides détermine la succession des bases dans l'acide nucléique, ce qui constitue le message génétique. Dans l'ADN, les bases sont impliquées dans les liaisons hydrogène responsables de la formation de la double hélice (deux liaisons entre l'adénine et la thymine, et trois entre la guanine et la cytosine) (Turner *et al.*, 1999).

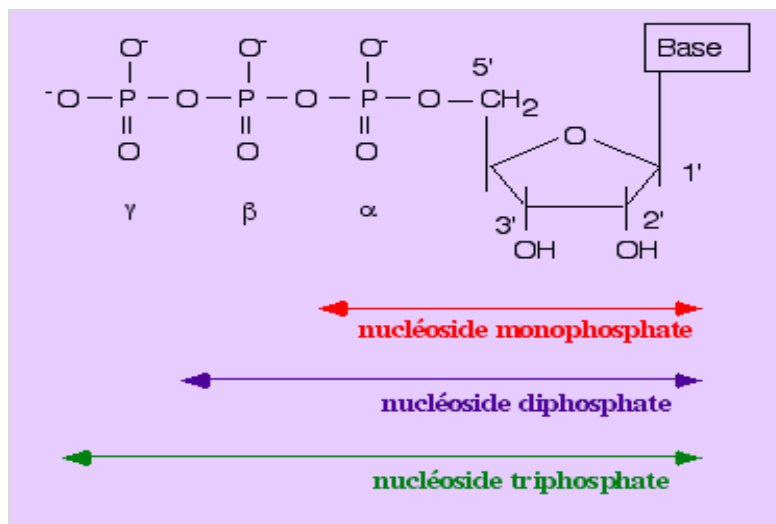


Figure 4 : Structure d'un nucléotide. [2]

2.3. Propriétés physicochimiques

2.3.1. Effet de l'alcali

L'augmentation du pH au-dessus de l'intervalle physiologique (pH 7-8) produit des effets plus subtils sur la structure de l'ADN. L'effet de l'alcali est de changer l'état tautomère des bases. Cet effet peut être observé en se référant au modèle composé, le cyclohexanone (fig. .5a). La molécule est en équilibre entre le cétoautomère et les formes énoles (1) et (2). À un pH neutre, le composé prédomine dans la forme céto (1). L'augmentation du pH produit un revirement à la forme énole (3) lorsque la molécule perd un proton, car la charge négative est

plus stable sur l'atome oxygène électronégatif. De la même façon, la structure de la guanine (**fig.5b**) s'est transformée aussi à la forme énole à un pH élevé et des revirements analogues prennent place dans les structures des autres bases. Ceci affecte la liaison hydrogène spécifique entre les paires de bases, en fractionnant la structure de l'ADN à double brin et en le dénaturant (**fig.5c**) (**Turner et al., 1999**).

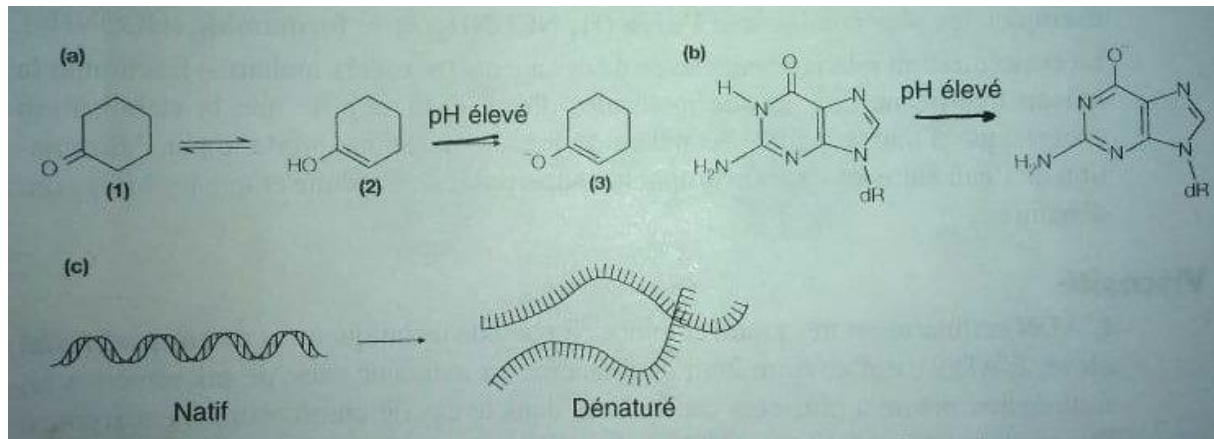


Figure 5: Etapes de la dénaturation de l'ADN à un pH élevé. (**Turner et al., 1999**).

(a) l'alcali transforme le rapport tautomère en forme énole ; (b) la transformation tautomère de la désoxyguanosine ; (c) la dénaturation de la double-hélice de l'ADN.

2.3.2. Dénaturation chimique

Plusieurs agents chimiques peuvent dénaturer l'ADN à un pH neutre, les exemples les plus connus sont l'urée (H₂HNOCN₂) et le formamide (HCONH₂). la concentration relativement élevée de ces agents (plusieurs molaires) fractionne la liaison hydrogène des grosses molécules d'eau. Cela signifie que la stabilisation énergétique d'une structure secondaire d'un acide nucléique produite par l'élimination de l'eau entre les bases hydrophobes superposée est réduite et que les brins sont dénaturés (**Turner et al., 1999**).

2.3.3. Viscosité

L'ADN cellulaire est très grand et mince ; il possède techniquement un rapport axial élevé. L'ADN est d'environ 2nm de diamètre, sa longueur varie de micromètres en millimètres même à plusieurs centimètres dans le cas de chromosomes eucaryotes. De manière savoureuse, si l'ADN possédait le même diamètre qu'un spaghetti, le chromosome d'E.coli (4,6 millions de paires de bases) devrait avoir une longueur d'environ 1 km. En plus,

l'ADN est une molécule relativement rigide. sa rigidité devrait être similaire à celle des spaghettis à moitié cuits, en utilisant la même analogie. Par conséquent les solutions d'ADN ont une viscosité élevée. Encore plus, les molécules d'ADN longues peuvent facilement être altérées par les forces de cisaillement, ou par la sonication (ultrasons à haute intensité), avec une réduction concomitante de la viscosité. la sensibilité au cisaillement est un problème, si les grosses molécules d'ADN doivent être isolées intactes, bien que la sonication puisse être utilisée pour produire un ADN d'une longueur moyenne spécifique. Noter que ni le cisaillement ni la sonication ne dénaturent l'ADN ; ils réduisent simplement la longueur des molécules à double brin dans la solution (**Turner et al., 1999**).

2.4. Propriétés thermiques et spectroscopiques

2.4.1. Absorption U.V

Les acides nucléiques absorbent les rayons UV grâce à la nature aromatique conjuguée de leurs bases ; le squelette du sucre phosphorique ne contribue pas sensiblement à l'absorption. La longueur d'onde de l'absorption maximale d'un rayon par l'ADN et l'ARN est de 260 nm ($\lambda_{\max} = 260$ nm) laquelle est, tout à fait, distincte de λ_{\max} de la protéine (280 nm). Les propriétés d'absorption des acides nucléiques peuvent être utilisées pour la détection, la quantification et l'évaluation de la pureté. (**Turner et al., 1999**).

2.4.2. Quantification des acides nucléiques : ADN

Plusieurs technologies permettent la quantification et l'analyse de la pureté des acides nucléiques.

a. La spectrophotométrie

C'est la méthode la plus répandue et évalue la quantité d'acides nucléiques par mesure de l'absorbance à 260 nm. Leur pureté est évaluée en mesurant l'absorbance à 280 nm et 230 nm. Le ratio 260/280 permet de détecter une contamination des acides nucléiques par des protéines. Sa valeur varie entre 1,8 et 2,0 pour de l'ADN et entre 2,0 et 2,2 pour de l'ARN. Le ratio 260/230 doit se situer entre 2,0 et 2,2. Lorsqu'il est plus faible cela indique la présence de contaminants comme le phénol, l'EDTA, guanidine HCL etc. Cependant, la spectrophotométrie ne permet pas de distinguer les ADN et ARN dans une même solution. Une concentration d'ADN peut donc être surestimée à cause de la présence d'ARN ou de contaminants absorbant à 260 nm (de même pour une solution d'ARN).

b. La quantification par fluorescence

Cette méthode est plus sensible et spécifique que la spectrophotométrie car non sensible à la présence de contaminants. Elle est également intéressante pour distinguer dans une même solution de l'ADN et de l'ARN. Cependant, elle ne permet pas d'analyser ni la pureté ni d'identifier des contaminants dans la solution. [3]

2.4.3. Pureté de l'ADN

Ratio	Valeur	Indication de pureté
260/280	1,8	ADN pur
	< 1,8	Présence de protéines, phénol et autres contaminants
	> 1,8	Contamination ARN
260/230	1,8 - 2,2	ADN pur
	< 1,8	Contaminants co-purifiés (solvants, sels, contaminants organiques)

Les valeurs minimales acceptables du ratio sont : $260/280 \geq 1,8$ et $260/230 \geq 1,6$

Tableau 1 : les valeurs acceptables du ratio (260/280) pour un ADN pur [4]

2.4.4. Dénaturation thermique

Lorsqu'une solution d'ADN duplex est chauffée progressivement au-dessus d'une certaine température, sa structure initiale disparaît parce que les deux chaînes complémentaires se séparent et prennent chacune une conformation aléatoire ondulante appelée enroulement au hasard (random coil) (**figure 6**). Pendant la dénaturation, l'absorbance s'accroît de près de 40% à toutes les longueurs d'ondes. Ce phénomène s'appelle l'effet d'hyperchromicité. La valeur de la température au point correspondant à 50% de la variation hyperchromicité, s'appelle la température de fusion ou T_m (m pour melting) (**figure 7**) (Voet & Voet., 2005). La T_m est en fonction du contenu G+C de l'ADN et varie de 80 °C à 100 °C pour les grosses molécules d'ADN (Alexander *et al.*, 2013).

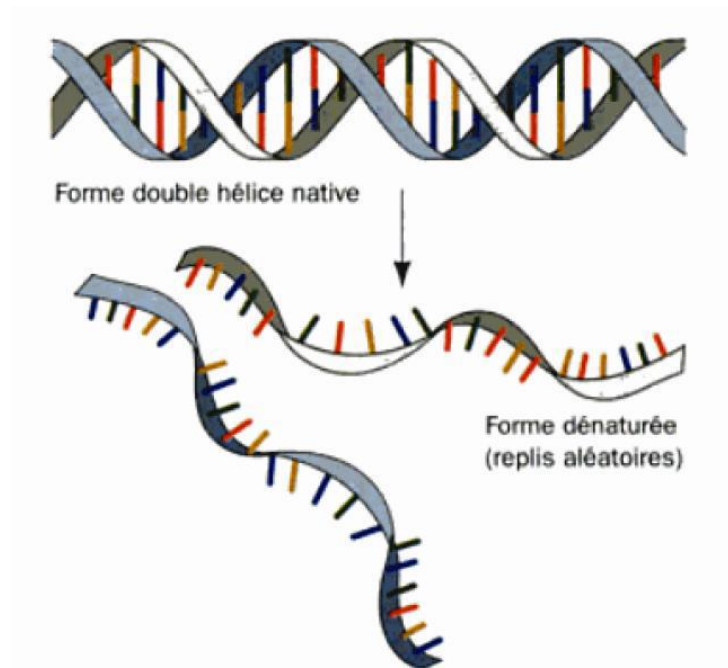


Figure 6 : Représentation schématique de la séparation des brins de l'ADN duplex lors de sa dénaturation par la chaleur (Voet & Voet., 2005).

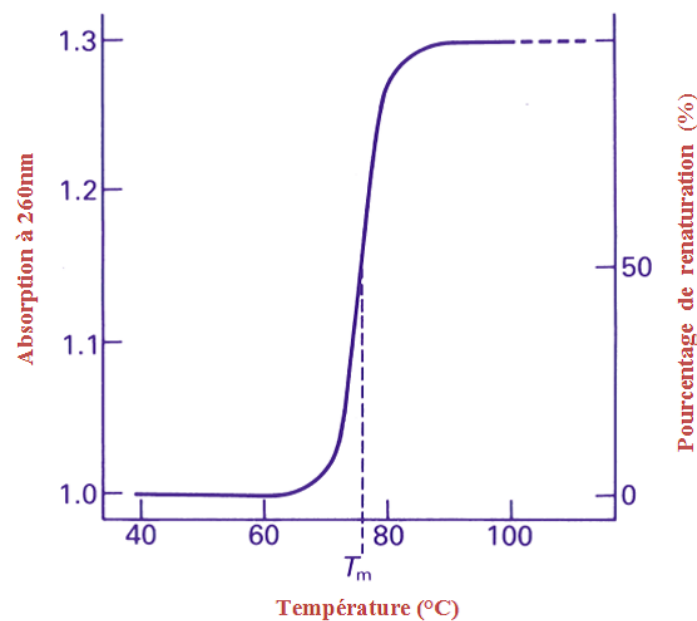


Figure 7 : Courbe de fusion de l'ADN (Wilson et Walker., 2005).

La température de fusion T_m est celle à laquelle on atteint 50% de l'accroissement maximal d'absorbance.

Si une solution d'ADN dénaturé est refroidie rapidement bien en dessous de sa T_m , l'ADN résultant ne sera que très partiellement apparié car les brins complémentaires n'ont pas assez de temps pour se réassocier complètement (Voet & Voet., 2005). Cependant, le

refroidissement lent laisse suffisamment de temps aux brins d'ADN complémentaire pour s'apparier, ainsi l'ADN peut devenir complètement bicaténaire et présenter la même adsorption qu'à l'origine (Alexander *et al.*, 2013).

2.4.5. Renaturation

La renaturation d'une protéine est le pendant du phénomène de dénaturation : lorsque le milieu contenant une protéine retourne à ses conditions normales (pH, température, etc.), la protéine dénaturée peut reprendre sa conformation initiale.

En effet, dans ces conditions, les interactions entre les molécules de la protéine se rétablissent et les chaînes polypeptidiques reprennent spontanément leurs structures tridimensionnelles (structure secondaire et tertiaire) [5]

3. Le sang

3.1. Définition

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

3.2. Composants du sang

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

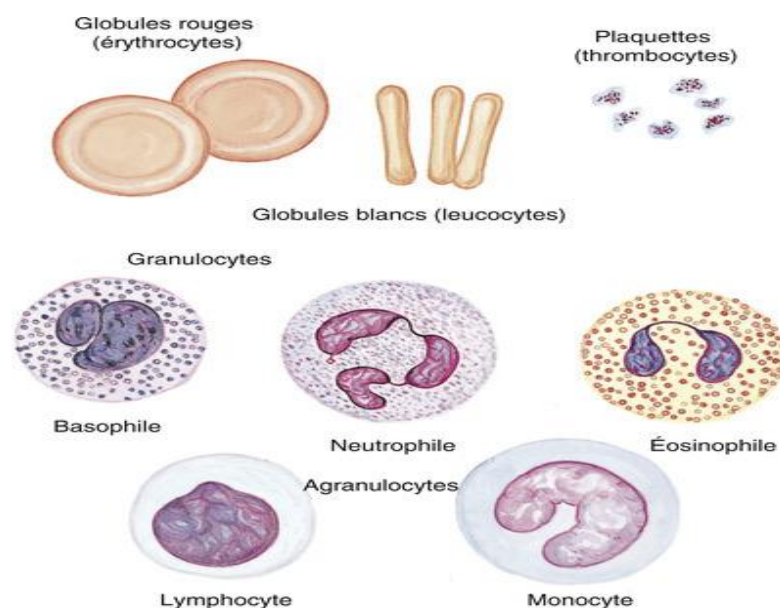


Figure 8: Schéma des différents éléments figurés de sang (Kohle., 2011).

3.2.1. Origine des cellules sanguines

Les cellules souches hématopoïétiques situées dans la moelle osseuse sont les cellules « mère » à l'origine de la formation des cellules sanguines. Ces cellules souches donnent naissance à différentes cellules précurseurs qui évolueront elles-mêmes, à terme en cellules matures ; globules rouges, globules blancs et les plaquettes sanguines (Kohle., 2011).

3.2.1.1. Globules rouges

Les globules rouges transportent l'oxygène des poumons vers les tissus et captent en retour le gaz carbonique afin de l'évacuer lors de l'expiration. Ce sont les cellules les plus nombreuses dans le plasma : de l'ordre de 5 millions par mm³ de sang. Également appelées érythrocytes ou hématies, ces cellules contiennent une protéine, l'hémoglobine, capable de fixer l'oxygène et qui donne au sang sa couleur rouge. Leur membrane est hérissée de protéines, les antigènes, qui déterminent l'appartenance aux différents groupes sanguins. Un manque de globules rouges ; appelé communément anémie, entraîne une forte fatigue. La transfusion de globules rouges peut être nécessaire lors d'une grave anémie ou d'une forte hémorragie [6].

3.2.1.2. Globules blancs

Les globules blancs sont principalement responsables de la défense de l'organisme contre les infections. Il existe cinq grands types de globules blancs. Les **neutrophiles** sont les plus nombreux ; ils protègent l'organisme des infections en tuant et en phagocytant les bactéries et les champignons, et en phagocytant les corps étrangers. Les **lymphocytes** sont composés de trois grands types : Les cellules T (lymphocytes T) et les lymphocytes naturel killer (cytotoxiques), qui contribuent à protéger des infections virales et peuvent reconnaître et détruire certaines cellules cancéreuses, et les cellules B (lymphocytes B) qui se transforment en cellules productrices d'anticorps. Les **monocytes** ingèrent les cellules mortes ou endommagées et contribuent à la défense contre de nombreux micro-organismes infectieux. Les **éosinophiles** tuent les parasites, détruisent les cellules cancéreuses et interviennent dans les réactions allergiques. Les **basophiles** interviennent également dans les réactions allergiques.

Certains globules blancs circulent librement à travers la circulation sanguine, mais la plupart adhèrent à la paroi des vaisseaux sanguins, voire la traversent pour pénétrer dans les tissus. Lorsque les globules blancs atteignent le site d'une infection ou d'une autre

affection, ils libèrent des substances qui attirent encore davantage de globules blancs. Les globules blancs constituent en réalité une sorte d'armée, qui monte la garde de manière dispersée dans tout l'organisme, mais reste prête à tout moment à se rassembler pour combattre un organisme envahisseur. Les globules blancs remplissent leur mission en ingérant et digérant les organismes et en produisant des anticorps qui se fixent sur les intrus, de sorte qu'ils puissent être plus facilement détruits.

Lorsque le nombre de globules blancs est trop bas (leucopénie), l'organisme est plus sensible aux infections. Un nombre de globules blancs supérieur à la normale (leucocytose) peut ne pas être directement à l'origine de symptômes, mais le nombre élevé de globules peut indiquer un trouble sous-jacent comme une infection, une inflammation ou une leucémie [7].

3.2.1.3. Plaquettes

Les plaquettes permettent d'arrêter les saignements, de prévenir ou de stopper les hémorragies. On en compte de 150 000 à 400 000 par mm³ de sang. En cas de rupture de la paroi d'un vaisseau, ces minuscules cellules se collent dessus et colmatent la brèche. Ensuite, différentes protéines du plasma vont renforcer ce « bouchon » grâce au processus de coagulation. La leucémie ou un traitement par chimiothérapie peuvent entraîner un déficit en plaquettes. La transfusion de plaquettes peut également être nécessaire lors de certaines interventions chirurgicales lourdes [6]

3.2.1.4. Le plasma

Il représente à lui seul 55 % du volume sanguin. Composé à 90 % d'eau chargée de sels, il est également très riche en protéines, notamment en albumine et immunoglobulines. Il contient aussi des facteurs de coagulation. Congelé à -25°C, il se conserve pendant un an. De nombreux médicaments sont fabriqués à partir du plasma. Ils peuvent agir sur la coagulation et traiter des pathologies chez des patients, notamment celles qui altèrent les défenses immunitaires [8].



Chapitre 2

1. L'extraction d'ADN

Au cours de ces dernières années, la biologie moléculaire a modifié considérablement le diagnostic de routine des maladies infectieuses, génétiques et néoplasiques. Toute étude de génétique moléculaire implique la disposition d'échantillon d'acides nucléiques. 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 sont la lyse des cellules, l'élimination des protéines et des lipides et enfin l'élimination 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)**

1.1. Lyse des cellules

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

1.1.1. 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. 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)**.

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**).

1.1.2. Lyse chimique

Pour les cellules procaryotes, on préférera une lyse chimique. Elle commence par une 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 alors que 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 ou 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**).

1.2. Extraction d'ADN à partir de 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 sont l'élimination des globules rouges, la lyse des globules blancs, la précipitation et l'élimination des protéines et la précipitation et la récupération de l'ADN.

2. Les différentes méthodes d'extraction d'ADN

Diverses techniques d'isolement de l'ADN ont été élaborées.

2.1. Méthodes classiques d'extraction d'ADN

Les différentes méthodes de l'extraction d'ADN sont des méthodes manuelles ou peuvent être semi automatisées (le vortex, la centrifugation ...), dont le principe général reste à peu près le même, et la différence entre eux se remarque par rapport aux détails des protocoles ainsi que les produits chimiques rajoutés lors des processus de l'extraction, et il y'a aussi le temps nécessaire pour l'obtention d'une molécule d'ADN pure. (**Brown., 2010**)

2.1.1. Méthode du 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**).

Dans cette méthode, un alcool (éthanol ou isopropanol) est utilisé pour précipiter l'ADN dans le culot qui va être suspendu à la concentration voulue dans un tampon tris : EDTA ou de l'eau. Les inconvénients majeurs de cette technique c'est qu'elle est lente, peut être toxique et elle doit être précédée par une étape de lyse cellulaire. (**Brown., 2010**).

2.1.1.1. 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 et al., 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.

2.1.1.2. 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 = [(CH₃)₂CHCH₂OH] qui est un agent anti mousse stabilisant la séparation des phases (agent déstabilisant de l'émulsion) (**Yagi et al., 1996**).

A. Lyse cellulaire

La première étape de l'extraction implique l'incubation des cellules dans un tampon de lyse contenant un détergent avec la protéinase K. Les détergents couramment utilisés sont le dodécyl sulfate de sodium (SDS), le Tween 20, Triton X-100 et le Nonidet P-40. Le tampon de lyse déstabilise les membranes cellulaires, ce qui conduit à la dégradation des structures cellulaires (**Goodwin et al., 2011**).

Certaines bactéries et champignons ont des parois cellulaires rigides qui doivent être détruites pour permettre la libération de l'ADN. Des enzymes comme le lysozyme, le zymolyase sont utilisés pour digérer la paroi cellulaire (**Buckingham et Flaws., 2007**). Les tissus frais ou congelés doivent être dissociés avant le démarrage des procédures d'isolement de l'ADN. Le broyage des tissus congelés dans l'azote liquide, leur homogénéisation, ou simplement leur hachage en utilisant un scalpel peut dissocier des tissus entiers (**Buckingham et Flaws., 2007**).

B. Extraction proprement dite

L'ADN contenu dans le lysat est séparé des protéines en appliquant la technique phénol-chloroforme. Le phénol étant un puissant agent déprotéinisant, son addition à une phase aqueuse a pour effet de dénaturer les protéines en solution dans le milieu. Après centrifugation, les protéines se retrouvent à l'interface entre la phase aqueuse (qui contient les acides nucléiques) et la phase organique. Après transfert de la phase aqueuse dans un autre tube, les acides nucléiques sont traités par un mélange chloroforme-alcool isoamylique. Ceci a

pour effet d'éliminer les traces du phénol, composé organique qui présente l'inconvénient d'être non seulement un produit toxique mais également un inhibiteur de certaines enzymes dont la Taq polymérase. A ce stade, après mélange, centrifugation et élimination de la phase organique, les acides nucléiques sont à l'état soluble dans la phase aqueuse (**Ameziane., 2006**).

C. Précipitation de l'ADN

Elle permet l'obtention d'ADN pur et concentré. La précipitation se fait soit à l'éthanol 100 % (dans ce cas, elle a lieu à -80 °C et en présence de sels tels que l'acétate de sodium), soit à l'isopropanol (le sel n'est pas nécessaire et la précipitation se fait alors à +4 °C). Un lavage ultérieur à l'éthanol 70 % est indispensable pour éliminer les sels. Le précipité est repris dans du tampon TE [Trihydroxyméthylaminométhane-HCl (tris-HCl) à 10mM, pH 8 ; Ethylène diaminetétra-acétique (EDTA) à 1mM, pH 8].

La technique phénol-chloroforme est considérée comme étant la méthode de référence. Cependant, depuis quelques années, le phénol étant un produit toxique et les manipulations correspondantes plus au moins longues et fastidieuses, d'autres techniques d'extraction ont été développées. D'une manière générale, toutes les méthodes passent par une étape de dislocation des cellules par rupture de leurs membranes suivies de lyse. Ensuite les protéines et autres molécules contaminants sont éliminées sous l'action de la protéinase K. les protéines dénaturées sont éliminées par salting out (précipitation en présence de sels), extraction organique ou liaison de l'ADN à un support (chromatographie par échange d'ions, adsorption sur silice). Enfin, l'ADN est généralement précipité par l'éthanol ou isopropanol (**Ameziane., 2006**).

2.1.2. La méthode saline " salting out "

Le principe d'un « salting out », c'est une déshydratation suivie d'une précipitation des protéines par une solution de chlorure de sodium saturée. Le Na Cl va provoquer une déshydratation des protéines, entraînant une interaction hydrophobe entre elles et leur précipitation. Après précipitation des protéines, l'ADN est précipité par de l'éthanol puis repris en suspension. (**Jeannesson., 2007**).

L'objectif de l'utilisation des solutions salines (solvant non organique) pour l'extraction de l'ADN est d'éliminer par précipitation sélective les protéines dans un lysat cellulaire.

(**Brown., 2010**). La technique de relargage par les sels ou « salting out » est une technique classique où les protéines et d'autres contaminants sont précipités à partir du lysat cellulaire en utilisant de hautes concentrations en sel tels que l'acétate de potassium et l'acétate d'ammonium. Les débris cellulaires et les enzymes sont éliminés par centrifugation. L'ADN est précipité par de l'alcool (**Ameziane., 2006**).

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. Cette technique comporte les étapes suivantes :

❖ Lyse des globules rouge

Après décongélation au bain marie à 37°C, la lyse des globules rouges est réalisée en complétant le volume de sang avec une solution hypotonique TE 10/10 (Tris/HCl 10mM et EDTA 10mM ; pH = 8,0). Après lavage, les tubes sont mis dans la glace pendant 30 minutes (l'action conjuguée du Tris et du froid provoque un choc hypotonique conduisant à l'éclatement des globules rouges ayant une membrane fragile.) puis centrifugés à 2500 tours/min pendant 15min. La centrifugation, quant à elle permet de séparer le surnageant qui contient les débris de globules rouges des globules blancs qui sont précipités au fond du tube formant un culot. Cette opération de lavage est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un culot blanchâtre qui correspond aux globules blancs. (**Ameziane., 2006**).

❖ Lyse des globules blancs

Le culot de leucocytes est traité par 5ml de solution de lyse des globules blancs (Tris / HCl 10mM ; EDTA 0,1M et SDS 0,5% ; pH = 8,0). 100µl de protéinase K à 20 mg/ml sont additionnés pour digérer les protéines associées à l'ADN nucléaire. Après homogénéisation, le mélange est incubé au bain-marie à 37°C pendant une nuit. L'EDTA est un chélateur d'ions bivalents inhibant l'activité des DNases et le SDS est un puissant détergent lysant les membranes cellulaires et dissociant les complexes d'acides nucléiques. (**Ameziane., 2006**).

❖ Précipitation 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

L'avantage de la technique est rapide, simple et non coûteuse (Suguna *et al.*, 2014). Alors que les inconvénients sont l'élimination des protéines et d'autres contaminants est inefficace et le traitement avec la Ribonucléase (RNase), la dialyse et / ou une précipitation répétée à l'alcool sont souvent nécessaires (Duncan *et al.*, 2003).

2.1.3. La colonne échangeuse d'ions

La colonne échangeuse d'ions est une technique de séparation des acides nucléiques en phase solide, où la solution contenant l'ADN peut être passée à travers une colonne chargée positivement ; qui agit comme un filtre en retenant l'ADN (chargé négativement) (figure 9) ; et en laissant passer les autres constituants. L'ADN fixé à la colonne est ensuite décroché en ajoutant une solution qui inverse les relations d'affinité de la colonne pour l'ADN. (Brown., 2010).

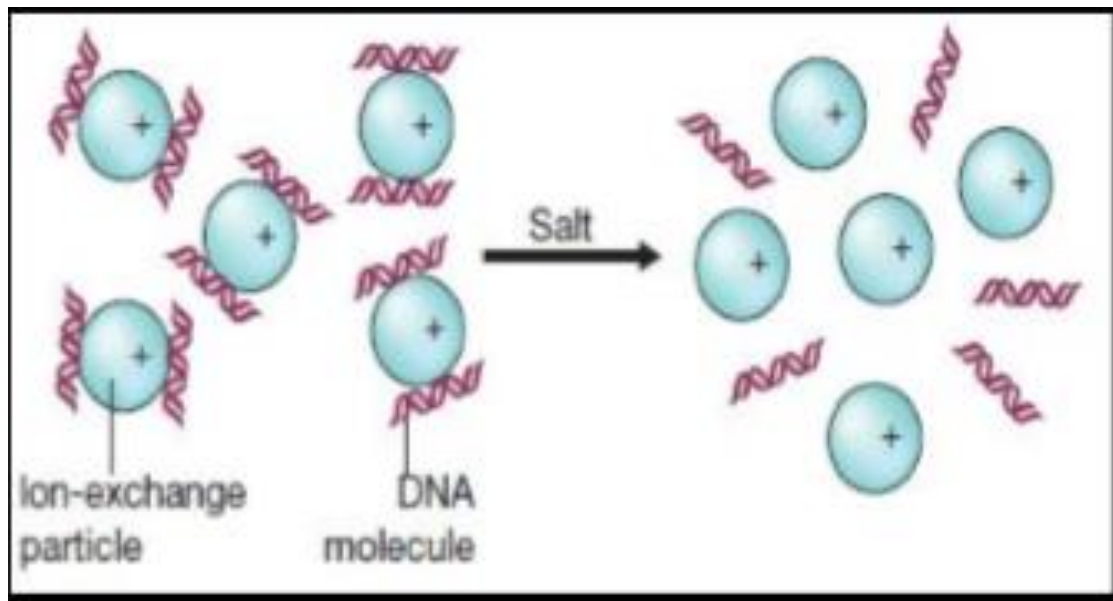


Figure 9 : Fixation d'ADN sur la colonne à l'aide de liaisons ioniques (Brown., 2010).

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

Après dépôt du lysat sur la colonne de chromatographie dans des conditions de basses concentrations en sels, l'ADN se fixe à la colonne à l'aide de liaisons ioniques. Ensuite, les protéines, les débris cellulaires et les autres molécules en solution sont éliminés par un lavage à l'aide d'un tampon moyennement chargé en sels. L'ADN est finalement élué à l'aide d'un

tampon à haute force ionique. Afin d'éliminer les sels, l'ADN est précipité avec l'alcool (Figure 10) (Duncan *et al.*, 2003).

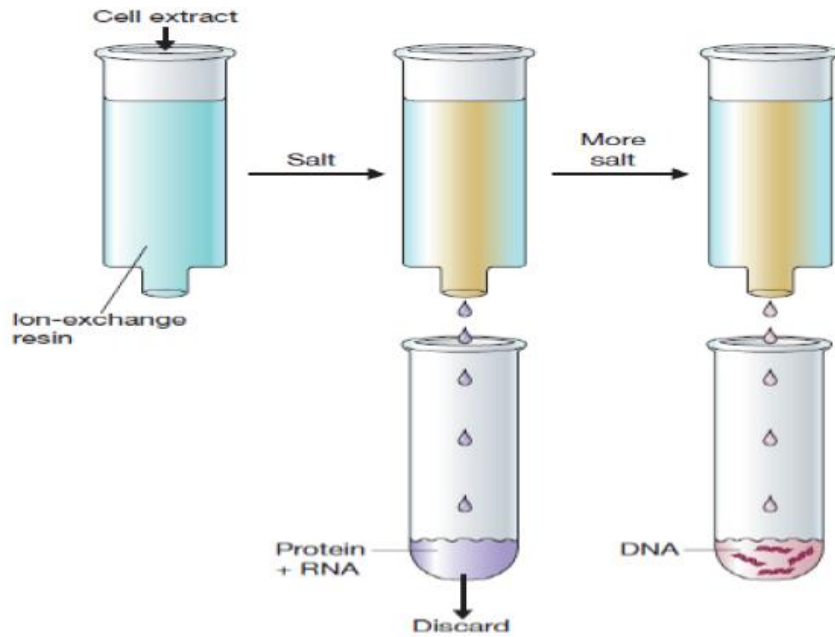


Figure 10 : Isolation de l'ADN par chromatographie échangeuse d'anions (Brown., 2010).

2.2. Kits commercialisés pour extraction d'ADN

Les kits industriels utilisés dans un laboratoire de biologie moléculaire pour l'extraction de l'ADN sont des collections qui rassemblent des réactifs et des tampons standardisés prêts à l'emploi, dont l'objectif est d'optimiser une meilleure extraction et purification de l'ADN.

Chaque fabricant de ces kits commercialisés offre une série des avantages qui tournent au tour : d'efficacité, la rapidité, la sécurité et bien évidemment le cout. Mais l'obtention d'un ADN purifié des contaminants et d'inhibiteurs d'enzyme et qui peut être directement utilise pour les applications courantes de biologie moléculaire (digestion enzymatique ; PCR ; marquage...) reste le critère le plus demandé. Chaque fabricant assure que les kits soient accompagnés d'un protocole qui lui est propre. (Brown., 2010).

2.2.1. Exemple des kits pour l'isolement simple d'ADN sans phénol/chloroforme

2.2.1.1. Blood Genomic DNA Extraction kit

Le Blood Genomic DNA Extraction Kit utilise la technologie de la membrane de gel de silice pour l'isolation simple et rapide de l'ADN génomique sans phénol-chloroforme. L'homogénéisation n'est pas nécessaire car les tissus sont directement lysés par la protéinase K. Le système tampon est optimisé pour permettre la liaison sélective de l'ADN à la membrane de gel de silice. Le protocole simple de centrifugation élimine complètement les contaminants tels que les protéines, les cations divalents, et les métabolites secondaires. L'ADN pur est ensuite élué dans l'eau ou dans un tampon pauvre en sel, puis est prêt à l'emploi. Le kit est approprié pour le sang coagulé. Le rendement pour 400 µl de sang total est de 3-10 µg d'ADN génomique pur. L'ADN purifié peut être utilisé dans des applications courantes telles que le séquençage, la digestion par des enzymes de restriction, etc. [9]



Figure 11: Blood DNA Extraction Kit (5 mL or 10 mL) [9]

❖ Caractéristiques

Rendement: 3-10 µg d'ADN génomique pour 400 µl de sang total

Pureté: L'ADN purifié est prêt pour des applications en aval comme la PCR, digestion de restriction

Sécurité: Pas d'extraction au phénol-chloroforme.

❖ Applications

L'ADN purifié est exempt de contaminants et d'inhibiteurs d'enzyme, a généralement un ratio A260/A280 entre 1,7 et 1,9, et est adapté pour des applications telles que:

- Digestion enzymatique

- Southern Blot
- PCR
- Marquage
- Construction de Banque

2.2.1.2. Quick blood Genomic DNA purification kit

Le Quick Blood Genomic DNA Purification Kit (**Figure12**) fournit une méthode simple et rapide pour la purification de qualité de l'ADN génomique dans le sang total. Comparé aux kits traditionnels d'extraction de l'ADN génomique sanguin, le système rapide fournit une méthode plus simple car il n'est pas nécessaire d'enlever les érythrocytes du sang total. Le système utilise la technologie de la membrane de gel de silice pour l'isolation simple et rapide de l'ADN génomique sans phénol-chloroforme. L'homogénéisation n'est pas nécessaire car les tissus sont directement lysés par la protéinase K. Le système tampon est optimisé pour permettre la liaison sélective de l'ADN à la membrane de gel de silice. Le protocole simple de centrifugation élimine complètement les contaminants tels que les protéines, les cations divalents, et les métabolites secondaires. L'ADN pur est ensuite élué dans l'eau ou dans un tampon pauvre en sel, puis est prêt à l'emploi. Le rendement typique est de 5 µg pour 200 µl de sang entier. L'ADN purifié est adapté à une utilisation directe dans toutes les applications courantes de biologie moléculaire: PCR, digestion enzymatique, clonage, séquençage de l'ADN et l'analyse par Southern. [9]



Figure 12: Quick blood Genomic DNA purification kit [9]

❖ Caractéristiques

Rapide: Le protocole prend seulement 30 min.

Simple: Pas besoin de retirer les érythrocytes du sang total

Efficace: 5 µg d'ADN pour 200 µl de sang total

Sécurité: Pas d'étape d'extraction au phénol.

Pure: L'ADN purifié est prêt pour une application en aval comme la PCR, ou la digestion enzymatique

❖ Applications

L'ADN purifié est exempt de contaminants et d'inhibiteurs d'enzyme, et a généralement un ratio A260/A280 entre 1,7 et 1,9, et est adapté pour des applications telles que:

- Digestion enzymatique
- PCR
- Marquage
- Construction de banque

2.3. Extraction D'ADN automatisé

Depuis le début les années 2000, le marché de l'instrumentation en biologie moléculaire. Notamment le domaine de l'extraction de l'ADN a connu de grandes innovations. Le lancement sur le marché d'extracteur automatique de l'ADN a contribué à une augmentation remarquable du nombre de laboratoire réalisant des analyses de biologie moléculaire. Vue les avantages qu'ils présentent citant : la simplicité de l'utilisation ; le gain du temps et le nombre des échantillons. Qui peut arriver jusqu' à 96 échantillons ; et même les multifonctions pour certaines machines.

La diversité des technologies appliquées par ces extracteurs automatiques, est la principale caractéristique en commun entre les fabricants :

- la technologie de centrifugation ; c'est l'automatisation complète de l'extraction avec le système des bras robotiques.

-la technologie de l'extraction par filtration sur une membrane poreuse très mince (80 µm), et c'est le principe des résines échangeuses d'anions sur un support de filtration.

- la technologie des (Rods) avec l'utilisation des tiges magnétiques.

-La technologie de (magtration) en utilisant les billes magnétiques (**Merel et al., 2007**).

2.3.1. Exemple extraction automatisée des acides nucléiques

2.3.1.1. L'extracteur automatique QIAGEN QIAcube

2.3.1.1.1. Définition

Le QIAcube (**Figure13**) effectue un traitement entièrement automatisé jusqu'à 12 échantillons. L'instrument contrôle les composants intégrés, notamment une centrifugeuse, un agitateur chauffé, un système de pipetage et une pince robotisée. Le QIAcube est préinstallé avec divers protocoles pour le traitement des colonnes rotatives QIAGEN pour la purification de l'ARN, de l'ADN génomique, de l'ADN plasmidique, des acides nucléiques viraux ou des protéines, ainsi que pour le nettoyage de l'ADN et de l'ARN. L'utilisateur sélectionne un protocole à l'aide de l'écran tactile et charge les articles en plastique, les échantillons et les réactifs sur la table de travail QIAcube. L'utilisateur ferme ensuite la porte de l'instrument et lance le protocole, qui fournit toutes les commandes nécessaires pour la lyse et la purification des échantillons à l'aide des colonnes rotatives QIAGEN. Un contrôle de charge entièrement automatisé permet de garantir un chargement correct de la table de travail.

2.3.1.1.2. Principe

La préparation des échantillons à l'aide du QIAcube suit les mêmes étapes que la procédure manuelle (c'est-à-dire lyser, lier, laver et éluer). Aucun changement dans la chimie de purification n'est nécessaire car vous continuez simplement à utiliser les kits de colonne rotative QIAGEN de confiance.

1. Les échantillons sont lysés dans l'agitateur orbital, qui peut être chauffé si le protocole l'exige.
2. Chaque lysat est transféré dans une colonne de rotation dans un adaptateur de rotor. Si le lysat doit être homogénéisé ou éliminé, il est d'abord transféré en position médiane de l'adaptateur de rotor.
3. Les acides nucléiques ou les protéines se lient à la membrane de silice ou à la résine de purification de la colonne de rotation QIAGEN et sont lavés pour éliminer les contaminants.
4. La colonne de rotation est transférée dans un tube de microcentrifugeuse pour l'élution d'acides nucléiques ou de protéines purifiés. [10]



Figure 13: l'extracteur automatique QIAGEN QIAcube [10]

3. Conservation de l'ADN

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. 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 grande taille. D'où la nécessité de réaliser des fractions aliquotes pour la conservation si nécessaire (**Kamoun., 2003**). 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 présentes. 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. (**Griffith et al., 2001**).

4. Contrôle de la pureté de l'ADN extrait

Le maximum d'absorption des acides nucléiques se situe à 260 nm. Les protéines, principaux contaminant des préparations absorbent aussi à 260 nm, mais avec maximum d'absorption qui se situe vers 280 nm à cause des acides aminés aromatiques.

Le rapport $R = A_{260nm} / A_{280nm}$ constitue alors un bon moyen pour apprécier une éventuelle contamination de la préparation d'ADN par les protéines ou par les ARN. Une contamination par les ARN se traduit par une augmentation du rapport R. Les ARN étant en simple brin, le coefficient moyen d'absorption d'un nucléotide est supérieur à celui du même nucléotide dans la double hélice à cause de l'hypochromisme.

$$R = A_{260nm}/A_{280nm}$$

- ADN pur : $1,8 < R < 2$
- ADN contaminé par les protéines : $R < 1,7$
- ADN contaminé par les ARN : $R > 2$

En absence d'impuretés l'absorbance de la solution d'ADN à 320 nm doit être autour de zéro.

Le système de rétention Nano Drop (Produits Thermo Scientific Nano Drop) combine les fonctions technologiques des fibres optiques et les propriétés naturelles de tension de surface pour capturer et retenir des quantités infimes d'échantillon indépendant de l'appareil de confinement traditionnel tel que les cuvettes ou capillaires.

Le système utilise la longueur des trajets plus courts, ce qui résulte dans une large gamme de mesures de concentration d'acide nucléiques, éliminant la nécessité d'effectuer des dilutions. Le volume réduit d'échantillon requis pour l'analyse spectroscopique facilite

également l'inclusion d'autres étapes de contrôle qualité tout au long de nombreux flux moléculaire, augmentant l'efficacité et conduisant finalement à une plus grande confiance dans les résultats en aval. [11]

5. Dosage quantitatif de l'ADN

5.1. Dosage colorimétrique de l'ADN

Il est basé sur la réaction spécifique des 2-désoxypentoses avec la diphénylamine. En milieu acide à chaud, le 2-désoxyribose des nucléotides puriques peut être libérés et former un composé bleu dont le maximum d'absorption se situe à 595 nm. C'est la méthode classique pour mesurer des quantités importantes de DNA (de l'ordre de quelques milligrammes). [11]

5.2. Dosage spectrophotométrique de l'ADN

A 260 avec un trajet optique de 1 cm, une unité d'absorbance correspond à une concentration d'ADN double brin de 50 µg / ml. Une unité d'absorbance correspond à 25 µg/ml de RNA ou d'ADN simple brin. Malheureusement, cette méthode est peu sensible pour manipuler des concentrations d'ADN inférieures à 250 ng/ml. [11]

5.3. Dosage fluorométrique en présence de BET

Le Bromure d'Ethidium (BET) interagit avec l'ADN en s'y intercalant et une fois intercalé, le rendement de fluorescence du colorant devient cent fois plus important. Le principe de la quantification consiste à comparer à l'œil nu (estimation), ou mieux après photographie, l'intensité de la fluorescence émise par l'ADN sur un gel d'électrophorèse. La quantification exacte consiste alors à établir une courbe d'étalonnage donnant l'intensité de fluorescence d'une solution de BET à laquelle on ajoute des quantités croissantes de DNA de concentration connue (Gamme d'étalonnage). Par cette méthode, on peut déceler des quantités de DNA de l'ordre de 50 ng/ml. [11]

5.4. Dosage de l'ADN par la PCR en temps réel

La PCR en temps réel permet de mesurer l'accumulation du produit de PCR à chaque cycle au cours de la réaction d'amplification. Le principe est d'utiliser un marquage fluorescent du produit de PCR. L'appareil de PCR en temps réel n'est autre qu'un

thermocycleur classique sur lequel vient s'ajouter un détecteur de fluorescence, il mesure l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles (Elyse., 2002).

5.4.1 Principe de la PCR en temps réel

La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps « en temps réel » le processus de PCR à l'aide de la fluorescence. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant générant une courbe de PCR pour chaque échantillon (Figure 14) (Elyse., 2002).

5.4.2. Les étapes de PCR en temps réel

5.4.2.1. La phase exponentielle

C'est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR. Une fluorescence est détectée et son augmentation est proportionnelle à l'augmentation du produit PCR. (Dougoud., 2008).

5.4.2.2. La phase linéaire

Après la phase exponentielle, la réaction d'amplification entre dans une phase linéaire où le taux d'amplification devient extrêmement variable, même au niveau du replica d'un même échantillon (Goodwin *et al.*, 2007).

5.4.2.3. La phase plateau

Le signal émis et le taux d'amplification décroît générant très peu d'amplicons et reste constant (Goodwin *et al.*, 2007).

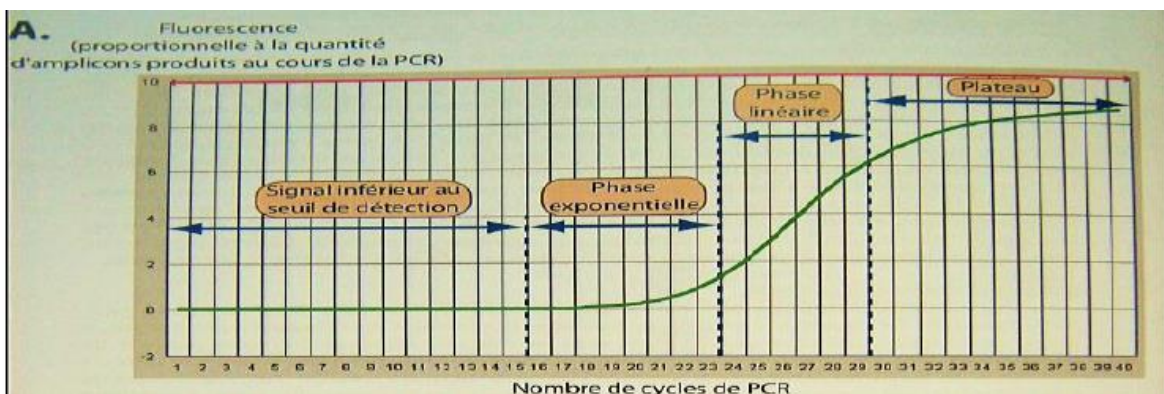


Figure 14 : Evolution de la quantité d'amplicons en fonction du nombre de cycle de PCR présentée en échelle linéaire (Pascal., 2007).

6. électrophorèse de l'ADN extrait

6.1. Historique

L'origine de cette technique a été imaginée par S.E. Linder et H. Picton en 1892. Ils se sont inspirés des études de Hermann Von Helmholtz menées sur l'électro-osmose. Celui-ci constate qu'il est possible, sous un champ électrique, de déplacer des particules chargées vers le pôle de signe opposé à leur charge. En 1937, Ame Wilhelm Kaurin Tiselius, met au point la première électrophorèse : l'électrophorèse libre. Cette technique lui a permis de séparer les protéines du sérum sanguin en appliquant un champ électrique. La solution est placée dans un tube en U de section carrée afin de réaliser des mesures optiques au travers du tube. Il a pu obtenir sur le pôle positif des protéines de charge très négative comme l'albumine et sur le pôle négatif des protéines de charge plus positive comme les globulines.

En 1939, P. König et D Von Klobusitzky ont séparé avec succès les composants du venin de serpent en élaborant la technique d'électrophorèse sur papier. En 1952, Pierre Grabar élabore, en collaboration avec C.A. Williams, une méthode d'analyse immuno-électrophorétique, qui permet d'analyser des mélanges très complexes d'antigènes. Dès la première application de cette méthode à l'analyse du sérum sanguin humain, il parvient à déceler dans le sérum plus de 30 constituants indépendants, alors que l'électrophorèse en veine liquide ou sur papier ne permettait d'isoler que 5 ou 6 groupes de protéines. En 1955, O. Smithies met au point l'électrophorèse en gel d'amidon.

En 1957, Joachim Kohn sépare les phénotypes de l'hémoglobine en élaborant la technique d'électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose. En 1969, Beber et Osborn introduisent l'agent dénaturant SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) pour séparer les différentes sous-unités protéiques. **(Benabdallah.,2015).**

6.2. Définition

C'est une des nombreuses techniques de séparation et d'analyse de particules chargées par migration différentielles sous l'action d'un champ électrique. Des particules chargées sont donc placées dans un champ électrique créé par une tension continue et se déplacent vers le pôle de signe opposé à leur charge à une vitesse proportionnelle à cette charge. Si on dépose une espèce anionique (chargée négativement), elle migrera vers l'anode (+) et une espèce cationique (chargée positivement) du côté de la cathode (-). **(Benabdallah.,2015)**

L'électrophorèse sur gel est une méthode de séparation des macromolécules en fonction de leur taille, de leur charge électrique et d'autres propriétés physiques. Le terme

«électrophorèse » décrit la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Le préfixe « électro » fait référence à l'électricité et la racine « phorèse » vient du grec phoros, qui signifie « porter d'un côté à l'autre ».

L'électrophorèse sur gel fait référence à une technique où les molécules sont obligées de traverser une couche de gel sous l'impulsion d'un courant électrique. L'énergie motrice de l'électrophorèse est la tension qui est appliquée à des électrodes placées de part et d'autre de la couche de gel. Les propriétés d'une molécule déterminent la rapidité avec laquelle un champ électrique peut traverser un milieu gélatineux.

Diverses macromolécules biologiques importantes (ex. : acides aminés, peptides, protéines, nucléotides et acides nucléiques) possèdent des groupes ionisables qui, à un pH donné, se transforment en espèces chargées électriquement sous forme tantôt de cations (+), tantôt d'anions (-). En fonction de la nature de la charge du réseau, les particules chargées migreront soit vers la cathode, soit vers l'anode. À titre d'exemple, lorsqu'un champ électrique traverse un gel de pH neutre, les groupes de phosphates chargés négativement de l'ADN provoquent la migration de celui-ci vers l'anode.

L'électrophorèse à travers l'agarose est une méthode utilisée de façon standard pour séparer, identifier et purifier des fragments d'ADN. La technique est simple et facile à réaliser et peut dissoudre des fragments d'ADN que d'autres procédures ne permettent pas de séparer correctement. La position de l'ADN dans le gel peut, par ailleurs, être déterminée en teignant celui-ci avec une faible concentration de bromure d'éthidium, un fluorochrome s'intercalant entre les bases de l'ADN.

6.3. Principe

L'électrophorèse est une technique permettant de déplacer des ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Ceux-ci migrent vers leur électrode respective : Les anions migrent vers l'anode et les cations migrent vers la cathode. Pour les molécules non chargées, il n'existe pas de migration. Du fait de leurs caractéristiques propres et des conditions de l'électrophorèse, la vitesse de migration et la distance parcourue dans la matrice par ces ions diffèrent, ce qui permet leur séparation. **(Benabdallah.,2015)**

6.4. Les différents types d'électrophorèse

6.4.1. 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). La mise en œuvre est longue et délicate. Les particules ne se séparent pas complètement mais ils se forment des frontières mises en évidence par des méthodes optiques telles que l'absorption ultra-violette pour les protéines.

6.4.2. Électrophorèse des 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 :

6.4.2.1. Électrophorèse sur papier

Assez peu résolutive, cette technique d'électrophorèse est surtout destinée à séparer des molécules de petite taille, dont les acides aminés. Des phénomènes d'interférence liés à la charge des acides aminés et de la cellulose du papier interviennent de façon notable. Une goutte de solution contenant l'échantillon à analyser est déposée sur une bande de papier, puis séchée. La bande de papier est humidifiée avec un tampon convenablement choisi, puis les deux extrémités de la bande sont plongées dans deux réservoirs contenant le tampon. Chaque réservoir est connecté à une électrode. Un champ électrique continu est appliqué, et les acides aminés se déplacent en fonction de leur charge nette. En fin d'électrophorèse, la bande de papier est séchée puis les acides aminés sont révélés par une réaction colorimétrique telle que celle à la ninhydrine. [12]

6.4.2.2. Électrophorèse sur acétate de cellulose

L'électrophorèse se fait dans des conditions proches de celles de l'électrophorèse sur papier. Les bandes d'acétate de cellulose sont fragiles, mais elles limitent la diffusion des molécules à séparer. La révélation des protéines se fait également par une réaction colorimétrique (rouge de ponceau par exemple). Cette technique, peu résolutive, permet de séparer grossièrement des groupes de protéines. Elle est peu coûteuse et permet une analyse rapide des protéines sériques. [12]

6.4.2.3. Électrophorèse sur gel d'amidon

L'électrophorèse sur gel d'amidon est particulièrement utile l'analyse et la séparation des isoenzymes. Le principe de la technique repose sur une séparation électrophorétique des protéines sur une matrice poreuse composée d'un gel d'amidon, de pH précis. Les enzymes présentes sont détectées en incubant le gel dans une solution contenant un substrat spécifique de l'enzyme donnant lieu à un produit coloré. Les profils obtenus sont désignés sous le nom de zymogrammes. [12]

6.4.2.4. Électrophorèse sur gel d'agarose

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. Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures. [12]

6.4.2.5. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les gels, formés entre deux plaques de verre, sont obtenus par polymérisation d'un mélange d'acrylamide ($\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) et de bisacrylamide ($\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH} = \text{CH}_2$), 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. [12]

6.5. 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) (**Figure 15**) (**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 même taille, un ADN relâché va migrer moins loin qu'un ADN linéaires, qui lui-même vami-grer moins loin qu'un ADN surenroulé (**Senicourt., 2016**).

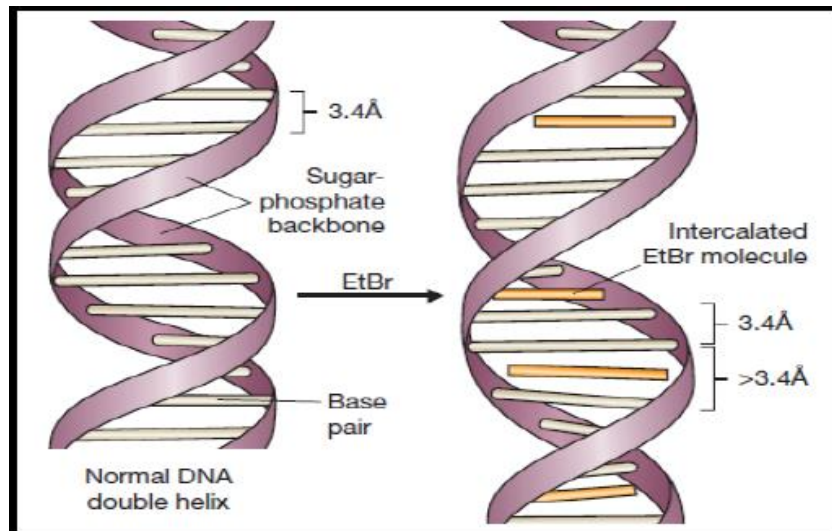


Figure 15 : Révélation de l'ADN par la coloration de bromure d'éthidium (Brown., 2010).



Chapitre 3

1. Objectif de l'étude

Cette méthode a pour but d'obtenir des acides nucléiques purifiés, l'ADN extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire.

Dans ce travail on extrait l'ADN par les trois techniques principales de l'extraction de l'ADN (Méthode au phénol chloroforme, Les kits et par la technique de Na Cl « salting out ») et après on va comparer ces trois méthodes selon leurs coûts et la quantité d'ADN obtenue dans chaque méthode.

2. Matériel

2.1. Matériel biologique

Les échantillons utilisés dans notre travail étaient du sang humain collecté dans des conditions qui défavorisent sa coagulation. Les échantillons de sang sont maintenus à températures ambiante. Pour l'extraction de l'ADN dans les 24 heures ou conservés au congélateur. Pour une utilisation ultérieure.

3. Méthodes d'extraction

3.1. Extraction de l'ADN par la technique Na Cl « salting out »

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 resuspendre dans un tampon adéquat. IL convient simplement d'éviter toute destruction enzymatique ou mécanique de l'ADN.

3.1.1. Principe

Le Principe est celui d'un « salting out », c'est à dire d'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.

3.1.2. Protocol opératoire

➤ **Lyse des globules rouges :**

La première étape consiste à diluer le sang avec environ 4 volumes de TE 10/10 avec agitation douce, et incubé dans la glace 30 min pour que la lyse des hématies ait lieu. On Centrifuge à 2500 T/min pendant 15 min, Après on Elimine doucement le surnageant et Remettre en suspension les cellules avec 15 ml de TE 10/10 avec agitation si nécessaire. Le culot doit être complètement dissocié, et compléter le tube à 45 ml de TE 10/10. Ensuite on met le tube dans la glace pendant 10 minutes, puis centrifuger 10 min à 3000 T/min.

Ces étapes consistent à éliminer les globules rouges (puisqu'elles ne contiennent pas d'ADN) et toutes les impuretés du milieu extra cellulaire. Et la centrifugation permet de séparer les globules blancs des débris de globules rouges. A la fin de la centrifugation, il apparaît au fond du tube un « culot » blanc (ce sont les restes de globules blancs) et un «surnageant » rouge (ce sont les débris de globules rouges) que l'on va retirer du tube.

Refaire cette étape jusqu'à ce que le culot soit translucide.

➤ **Lyse des globules blancs:**

Pour cette étape, on utilise une solution agressive de détergent (SLB) afin de déstabiliser la membrane des globules blancs et le noyau de la cellule. Ensuite, 125 µl de l'enzyme « Protéinase K » est ajoutée à la solution à 20 mg/ml, pour dégrader les protéines de la cellule. Le tube est incubé à 37°C dans un bain marie sous agitation douce, pendant le reste de la journée, et la nuit entière, afin d'avoir une activité optimale de la protéinase K.

➤ **Précipitation de l'ADN**

On reprend le travail le lendemain et on remarque que suite à cette étape, le tube contient un mélange d'ADN, et les restes de la cellule : fragments de protéines, résidus de la membrane de la cellule et toutes les molécules du cytoplasme.

Un volume de 2 ml de NaCl est ajouté au mélange, qui est ensuite agité vigoureusement et centrifugé à 4000 T/min pendant 10 min. Grâce à la précipitation, on peut séparer l'ADN du reste de la solution de lysat. Pour cela on récupère cette fois le surnageant dans un autre tube et ajouter

deux volumes d'éthanol absolu froid pour éliminer le maximum de la solution de lyse, c'est l'eau qui va solubiliser les impuretés autour de la pelote d'ADN (la méduse).

3.2. Extraction de l'ADN par la méthode du phénol /chloroforme

NOTE: Les volumes indiqués sont recommandés seulement et doivent être mis à l'échelle selon la taille de l'échantillon. Il est possible de garder le surnageant à 4° C entre chaque étape.

3.2.1. Protocole opératoire

1. Traiter le sang total comme potentiellement infectieux.
2. Le phénol et le chloroforme sont des solvants organiques et doivent être utilisés sous une hotte. Tous les déchets de phénol et de chloroforme doivent être éliminés dans des contenants appropriés aux solvants organiques.
3. L'extraction de l'ADN est effectuée par un technicien/assistant de recherche ou du personnel formé et désigné par la biobanque.
4. Resuspendre le culot de cellules blanches dans 2 ml de tampon de lyse en utilisant une pipette de transfert de 3 ml.
5. En utilisant cette même pipette, transférer les cellules et le tampon de lyse dans un tube de polypropylène à bouchon vissé de 14 ml. Si le culot est plus petit ou plus gros que celui généralement obtenu, ajuster le volume du tampon de lyse en conséquence.
6. Ajouter la solution de protéinase K de 20 ug/ml pour une concentration finale de 200 ug/ml. Pipetter de façon à faire monter et descendre le liquide en utilisant une pipette de transfert de 3 ml. Afin d'éviter des bris dans l'ADN génomique, ne pas vortexer pour mélanger.
7. Incuber 2 à 4 heures ou toute la nuit dans un bain d'eau à 60° C. Effectuer une inversion des tubes à toutes les 30 minutes si possible.
8. Ajouter un volume égal de TRIS saturé au phénol.
9. Mélanger le contenu des tubes par un mouvement d'avant-arrière sur une plaque basculante à un rythme de 70 bascules/minute pendant au moins 2 minutes.
10. Centrifuger à 900 g pendant 5 minutes à température de la pièce.
11. Étiqueter un nouveau tube de 14 ml.

12. En utilisant une pipette de 1 ml, transférer le surnageant (phase aqueuse contenant l'ADN) dans le nouveau tube de 14 ml en prenant soin de ne pas enlever la couche laiteuse de l'interphase.
13. Ajouter un volume égal de phénol:chloroforme/isoamyl 50 :50.
14. Mélanger le contenu des tubes par un mouvement d'avant-arrière sur une plaque basculante à un rythme de 70 bascules/minute pendant au moins 2 minutes.
15. Centrifuger à 900 g pendant 5 minutes à température de la pièce.
16. Étiqueter un nouveau tube de 14 ml.
17. En utilisant une pipette de 1 ml, transférer le surnageant (phase aqueuse contenant l'ADN) dans le nouveau tube de 14 ml en prenant soin de ne pas enlever la couche laiteuse de l'interphase.
18. Répéter les étapes 13 à 17 pour la deuxième extraction avec la solution de phénol:chloroforme/isoamyl 50 :50.
19. Répéter les étapes 13 à 17 une troisième fois si l'interphase est encore très épaisse et laiteuse.
20. Ajouter un volume égal de phénol:chloroforme/isoamyl 50 :50.
21. Mélanger le contenu des tubes par un mouvement d'avant-arrière sur une plaque basculante à un rythme de 70 bascules/minute pendant au moins 2 minutes.
22. Centrifuger à 900 g pendant 5 minutes à température de la pièce.
23. Étiqueter un nouveau tube de 14 ml.
24. En utilisant une pipette de 1 ml, transférer le surnageant dans le nouveau tube de 14 ml. Il devrait y avoir peu ou pas de couche laiteuse à l'interphase.
25. Faire une solution aqueuse d'ADN 1M en utilisant du NaCl 5M. Mélanger délicatement.
26. Ajouter 2.5 fois en volume d'éthanol 95% froid (solution gardée à -20° C) et laisser agiter sur la plaque oscillante pour précipiter l'ADN.
27. En utilisant une pipette de 1 à 3 ml, transférer l'ADN dans un tube à microcentrifugeuse de 1.5 ml.
28. Centrifuger à 180 000 x g pendant 1 minute dans une microcentrifugeuse à température de la pièce.
29. Éliminer le surnageant.
30. Ajouter 500 ul d'éthanol 70% froid et chiquenauder jusqu'à ce que le culot d'ADN se déloge du fond du tube.
31. Centrifuger à 180 000 x g pendant 1 minute dans une microcentrifugeuse à température de la pièce.

32. Éliminer le surnageant.
33. Ajouter 500 µl d'éthanol 70% froid et chiquenauder jusqu'à ce que le culot d'ADN se déloge du fond du tube
34. Centrifuger à 180 000 x g pendant 1 minute dans une microcentrifugeuse à température de la pièce. Éliminer le surnageant.
35. Resuspendre le culot d'ADN dans 500 µl d'une solution tampon TE. Ajuster le volume du tampon en fonction de la taille du culot d'ADN.
36. Transférer l'ADN dans un cryotube de 2 ml pour un entreposage de longue durée.
37. Afin de s'assurer que l'ADN est uniformément dissout, incuber dans un bain d'eau à 60 ° C avec agitation toute la nuit.
38. Entreposer l'ADN -80° C.
39. Éliminer tous les déchets de phénol et de chloroforme dans des contenants appropriés pour les déchets de solvants organiques.

3.3. Extraction de l'ADN en utilisant les kits

3.3.1. Préparation des réactifs et tampons

3.3.1.1. Préparation de la Protéase QIAGEN

Ajouter 1,2 ml de solvant de protéase (PS) dans le flacon de protéase QIAGEN (QP) lyophilisée et mélanger avec précaution. Pour éviter que le mélange ne mousse, mélanger en retournant plusieurs fois le flacon. Vérifier que la Protéase QIAGEN (QP) est entièrement dissoute.

Ne pas ajouter la Protéase QIAGEN (QP) directement sur le tampon de lyse (AL).

3.3.1.2. Préparation du tampon de lavage 1

À l'aide d'une éprouvette, ajouter 25 ml d'éthanol (96 à 100 %) dans le flacon contenant 19 ml de tampon de lavage 1 (AW1) concentré. Conserver le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué à température ambiante (15 à 25 °C).

Avant de commencer la procédure, toujours mélanger le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué en retournant plusieurs fois le flacon.

3.3.1.3. Préparation du tampon de lavage 2

À l'aide d'une éprouvette, ajouter 30 ml d'éthanol (96 à 100 %) dans le flacon contenant 13 ml de tampon de lavage 2 (AW2) concentré. Conserver le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué à température ambiante (15 à 25 °C).

Avant de commencer la procédure, toujours mélanger le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué en retournant plusieurs fois le flacon.

3.3.1.4. Préparation du tampon d'éluotion

Le kit comprend un flacon de tampon d'éluotion (AE). Afin d'éviter toute contamination du tampon d'éluotion (AE), il est fortement recommandé non seulement d'utiliser des cônes à filtre de protection contre les aérosols pour le pipetage du tampon d'éluotion (AE), mais également de refermer immédiatement le flacon.

Le tampon d'éluotion (AE) contient de l'azide de sodium comme agent de conservation. Son absorbance est de 260 nm. Par conséquent, vérifier que le blanc contient la même concentration d'azide de sodium que l'éluat lors de la quantification de l'ADN dans l'éluat par mesure de l'absorbance à 260 nm, lors de la détermination de la pureté de l'ADN dans l'éluat par mesures de l'absorbance à 260 nm et 280 nm ou lors du balayage de l'absorbance dans la plage de 220 nm à 350 nm. Par exemple, en cas de préparation de l'éluat pour une mesure de l'absorbance en diluant 50 µl d'éluat dans 100 µl d'eau, il convient de préparer le blanc en diluant 50 µl de tampon d'éluotion (AE) dans 100 µl d'eau. Pour les dilutions, utiliser de l'eau fraîche et distillée.

3.3.1.5. Manipulation des colonnes de centrifugation QIAamp Mini

En raison de la sensibilité des technologies d'amplification des acides nucléiques, il est nécessaire de prendre les précautions suivantes lors de la manipulation des colonnes de centrifugation QIAamp Mini afin d'éviter toute contamination croisée entre les préparations d'échantillons :

- ❖ Transférer avec précaution l'échantillon ou la solution vers la colonne de centrifugation QIAamp Mini. Déposer l'échantillon dans la colonne de centrifugation QIAamp Mini à l'aide d'une pipette sans mouiller le bord de la colonne.

- ❖ Toujours remplacer les cônes des pipettes entre chaque transfert de liquide. Il est recommandé d'utiliser des cônes à filtre de protection contre les aérosols.
- ❖ Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec le cône de la pipette.
- ❖ Après toutes les étapes d'homogénéisation par impulsions au vortex, centrifuger brièvement les tubes de microcentrifugation afin d'éliminer les gouttes présentes à l'intérieur des capuchons.
- ❖ Ouvrir une seule colonne de centrifugation QIAamp Mini à la fois et prendre garde à ne pas générer d'aérosols.
- ❖ Porter des gants pendant toute la procédure. En cas de contact des gants avec l'échantillon, les changer immédiatement.

1.3.1.6. Éluion de l'ADN génomique

Le volume d'ADN élué d'une colonne de centrifugation QIAamp Mini peut être inférieur de 20 µl maximum par rapport au volume de tampon d'éluion (AE) déposé sur la colonne. Le volume d'éluat récupéré dépend de la nature de l'échantillon. Amener le tampon d'éluion (AE) à température ambiante (15 à 25 °C) avant de le déposer sur la colonne. L'ADN élué est récolté dans les tubes d'éluion (ET). En cas de conservation de l'ADN pour une période maximale de 4 semaines, il est recommandé de le conserver à une température comprise entre 2 et 8 °C. Pour une conservation à long terme, il est conseillé de le conserver à -20 °C.

3.3.2. Protocole opératoire

1. Transférer à la pipette 20 µl de Protéase QIAGEN (QP) dans un tube de lyse (LT). Avant de l'utiliser, vérifier la date d'expiration de la protéase reconstituée.
2. Ajouter 200 µl d'échantillon de sang dans le tube de lyse (LT).

3. Ajouter 200 µl de tampon de lyse (AL) dans le tube de lyse (LT), fermer le capuchon et mélanger au moyen d'impulsions au vortex pendant 15 secondes.

Pour assurer une lyse efficace, il est essentiel de bien mélanger l'échantillon et le tampon de lyse (AL) afin d'obtenir une solution homogène.

Puisque le tampon de lyse (AL) présente une forte viscosité, s'assurer d'ajouter le bon volume de tampon de lyse (AL) en le déposant avec précaution au moyen d'une pipette ou en utilisant une pipette adaptée.

Ne pas ajouter la Protéase QIAGEN (QP) directement dans le tampon de lyse (AL).

4. Incuber pendant 10 minutes (± 1 minute) à 56 °C (± 1 °C).

5. Centrifuger pendant 5 secondes ou plus le tube de lyse (LT) à vitesse maximale pour éliminer les gouttelettes accumulées à l'intérieur du capuchon.

6. Ajouter 200 µl d'éthanol (96 à 100 %) dans le tube de lyse (LT), fermer le capuchon et bien mélanger pendant 15 secondes ou plus au moyen d'impulsions au vortex.

7. Centrifuger pendant 5 secondes ou plus le tube de lyse (LT) à vitesse maximale pour éliminer les gouttelettes accumulées à l'intérieur du capuchon.

8. Déposer avec précaution la totalité du lysat de l'étape 7 dans la colonne de centrifugation QIAamp Mini sans en mouiller le bord. Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec le cône de la pipette.

Pour le traitement de plusieurs échantillons, n'ouvrir qu'un tube de lyse (LT) à la fois.

9. Fermer le capuchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini et centrifuger à environ 6 000 x g pendant 1 minute. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube de lavage (WT) et mettre le tube contenant le filtrat au rebut.

Si le lysat n'est pas complètement passé à travers la membrane après la centrifugation à 6 000 x g (8 000 tr/min), centrifuger encore 1 minute à vitesse maximale (jusqu'à 20 800 xg).

10. Ouvrir la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec précaution et ajouter 500 µl de tampon de lavage 1 (AW1) sans mouiller le bord de la colonne. Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec le cône de la pipette.

11. Fermer le capuchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini et centrifuger à environ 6 000 x g pendant 1 minute. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube de lavage (WT) et mettre le tube contenant le filtrat au rebut.

12. Ouvrir la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec précaution et ajouter 500 µl de tampon de lavage 2 (AW2) sans mouiller le bord de la colonne. Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec le cône de la pipette.

13. Fermer le capuchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini et centrifuger à vitesse maximale (environ 20 000 x g ou 14 000 tr/min) pendant 1 minute. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube de lavage (WT) et mettre le tube contenant le filtrat au rebut.

14. Centrifuger pendant 3 minutes à vitesse maximale (environ 20 000 x g ou 14 000 tr/min) pour sécher la membrane complètement.

L'absence de centrifugation de séchage peut entraîner une inhibition de l'analyse en aval.

15. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube d'élution (ET) et mettre le tube de lavage (WT) contenant le filtrat au rebut. Ouvrir le capuchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec précaution et déposer au centre de la membrane 50 à 200 µl de tampon d'élution (AE). Fermer le capuchon et incubé à température ambiante (15 à 25 °C) pendant 1 minute. Centrifuger pendant 1 minute à environ 6 000 x g (8 000 tr/min) afin d'éluer l'ADN.

4. 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.

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 $DO_{(260nm)}/DO_{(280 nm)}$ 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.

5. 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 μ l de TE 10/10 mM et 10 μ l 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.



Discusión

Les méthodes d'extraction de l'ADN peuvent se classer en trois principales classes en fonction du principe auquel elles font appel : les méthodes utilisant des solvants organiques (Principalement la méthode Phénol/Chloroforme), les méthodes utilisant des solvants non organiques (Salting out), les méthodes basées sur l'utilisation de microcolonnes de résines échangeuses d'ions.

1. Méthode au Phénol/Chloroforme

La méthode d'extraction au phénol-chloroforme a été depuis de nombreuses années la méthode la plus largement utilisée pour l'extraction d'ADN (**Butler., 2010**). Cette méthode utilise la solubilité différentielle des molécules (acides nucléiques / contaminants comme les protéines et les lipides) entre deux phases non miscible.

La technique phénol-chloroforme est considérée comme étant la méthode de référence. Cependant, depuis quelques années, le phénol étant un produit toxique et les manipulations correspondantes plus au moins longues et fastidieuses, d'autres techniques d'extraction ont été développées (**Ameziane., 2006**).

2. Méthode de Na Cl (Salting out)

Dans cette méthode, le principe consiste à traiter uniquement le lysat cellulaire par une solution saline, dont l'objectif est d'éliminer par précipitation sélective les protéines. En fonction des protocoles, des étapes de prétraitement par la RNase sont proposées. Différentes solutions salines ont été préconisées : par exemple, Na Cl 2,5 M. ()

La technique de relargage par les sels ou « salting out » est une technique classique où les protéines et d'autres contaminants sont précipités à partir du lysat cellulaire en utilisant de hautes concentrations en sel tels que l'acétate de potassium et l'acétate d'ammonium. Les débris cellulaires et les enzymes sont éliminés par centrifugation. L'ADN est précipité par de l'alcool (**Ameziane., 2006**).

L'utilisation de la méthode d'extraction de l'ADN au NaCl est très facile et sécurisé parce qu'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. (**Nouaïria., 2010**).

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 (**Douaoudi, 2019**).

3. Extraction par les kits commercialisés

Un kit d'extraction permettant de réaliser l'extraction de l'ADN de façon rapide. Un kit est une solution commerciale proposée par un fabricant pour simplifier l'usage d'outil de biologie moléculaire. Un kit sert à être utilisé sur un grand nombre d'échantillons (indiqué par le fabricant) (**Chakour et al., 2003**).

Les kits commerciaux permettent une extraction plus rapide et efficace de l'ADN de bonne qualité, mais ils ont l'inconvénient d'être coûteux. Aussi, les kits séparent efficacement les macromolécules contaminants des acides nucléiques. Les polyphénols, les acides humiques ... peuvent être précipités sélectivement par diminution du pH, car elles deviennent insolubles en pH acide et peuvent être éliminées par la centrifugation (**Marsal et al., 2013**).

Outre leur coût élevé, les kits ont pour inconvénient le fait qu'on ne contrôle pas parfaitement la manipulation, puisque la plupart du temps on ne sait pas exactement la composition des tampons mis à disposition.

4. Comparaison entre les techniques d'extraction d'ADN

Quelle que soit la méthode d'extraction et de purification des acides nucléiques utilisée, tous les études ont obtenu de l'ADN en qualité et en quantité suffisantes pour réaliser des actes de biologie moléculaire. Le rendement moyen d'extraction était de 15 à 41 µg/ml de sang frais en fonction des méthodes. Cette quantité permet de réaliser au minimum une analyse par Southern-blot et plusieurs dizaines de réactions de PCR par ml de sang (**Bienvenu et al., 1999**).

En revanche, les concentrations en ADN sont nettement plus faibles avec les méthodes basées sur l'utilisation de colonnes de résine échangeuse d'ions par rapport aux méthodes utilisant des solvants organiques. Les concentrations en ADN obtenues avec les méthodes Qiagen Blood Kit Maxi[®] et Nucléobond AXG 100[®] sont en moyenne de 217 et 306 ng/µl. Ces concentrations, bien adaptées à la méthode PCR, ne sont pas adaptées à des expériences ultérieures de Southern-blot, nécessitant environ 10 µg dans un faible volume (10 à 30 µl). Il faut dans ces cas effectuer des concentrations par précipitation.

Le rapport de DO 260/280 nm a été notamment excellent avec la méthode Qiagen Blood Kit Maxi[®]. Les concentrations en ADN obtenues avec les méthodes Qiagen Blood Kit Maxi[®] et Nucléobond AXG 100[®] sont en moyenne de 217 et 306 ng/μl. Ces concentrations, bien adaptées à la méthode PCR, ne sont pas adaptées à des expériences ultérieures de Southern-blot, nécessitant environ 10 μg dans un faible volume (10 à 30 μl).

En termes de temps, la méthode testée la plus rapide a été la méthode Quiagen Blood Kit Maxi[®] permet d'obtenir un ADN en solution en 2 h 30 (dont 1 h 35 de travail effectif). Alors que les méthodes les plus longues sont celles utilisant les solvants organiques (6 h avec la méthode au chlorure de guanidium et 6 h avec la méthode au phénol-chloroforme (dont 5 h 20 de travail effectif, sans compter le temps de resuspension et d'homogénéisation de l'ADN en solution) (**Bienvenu et al.,1999**).

En termes de coût en matériel et réactifs, les méthodes conventionnelles (phénol-chloroforme, chlorure de guanidium) sont les moins coûteuses. Les méthodes Qiagen Blood Maxi[®] et Nucléobond AXG 100[®], plus simples et plus rapides que les méthodes conventionnelles, réduisent le coût en personnel et peuvent ainsi être des alternatives intéressantes dans certains laboratoires. La conservation des acides nucléiques n'a pas été testée dans cette étude. Il apparaît toutefois que pour des préparations d'ADN purs conservés à 20 °C, l'ADN se conserve plus de 10 ans (**Madison et al., 1987**).

L'objectif principal de toutes ces méthodes est de libérer un ADN de haute qualité qui peut être stocké pendant plusieurs années dans des conditions appropriées (**Das et Dash., 2015**). Les avantages et les inconvénients des techniques précédemment décrites sont montrés dans le **tableau II**.

Tableau II : la différence entre les trois techniques d'extraction d'ADN

Méthode	avantages	Inconvénients
Méthode d'extraction par phénol/chloroforme	Très utilisé, la pureté de l'ADN est meilleure (une bonne concentration en ADN pur)	Les inconvénients majeurs de cette technique c'est qu'elle est lente, peut être toxique et elle doit être précédés par une étape de lyse cellulaire. (Brown., 2010) . L'inconvénient du phénol réside dans son caractère très toxique et corrosif, c'est donc un produit qui nécessite un équipement particulier pour être manipulé (Hotte chimique, gants).
Méthode d'extraction par relargage de sel (ou salting out)	Rapide, simple et non coûteuse (Suguna et al., 2014) .	Elimination des protéines et d'autres contaminants est inefficace et le traitement avec la Ribonucléase (RNase), la dialyse et / ou une précipitation répétée à l'alcool sont souvent nécessaires (Duncan et al., 2003) .

<p>Méthode d'extraction par les kits QIAGEN</p>	<p>permet d'isoler et de purifier rapidement et en toute simplicité l'ADN génomique à partir de 200 µl de sang total.</p> <p>Il n'est pas nécessaire de séparer les leucocytes au préalable. Les procédures n'impliquent pas d'extraction au phénol/chloroforme ni de précipitation par l'éthanol.</p> <p>De plus, l'interaction avec l'utilisateur est minime, ce qui permet de manipuler les échantillons potentiellement infectieux en toute sécurité.</p>	<p>Coûteuse</p>
--	---	-----------------



Conclusión

Toute étude de génétique moléculaire implique la disposition d'échantillon d'acides nucléiques. Les techniques d'extraction d'acides nucléiques sont relativement simples. Dans notre travail, nous avons réalisés l'extraction d'ADN à partir du sang humain. Le sang a été collecté dans des tubes contenant l'EDTA pour éviter toute dégradation enzymatique.

Dans cette étude, l'objectif principal est de comparer trois méthodes d'extractions suivantes : méthode de phénol/chloroforme, la méthode « Salting out » et un kit commercialisé, pour isoler l'ADN. Cette étude comparative permet d'optimiser une méthode efficace pour obtenir un ADN pur et de bonne qualité et quantité.

La méthode d'extraction de l'ADN par salting-out est sans danger mais pas assez performante puisque l'ADN reste assez contaminé par les protéines et les quantités extraites restent faibles mais elle est moins cher.

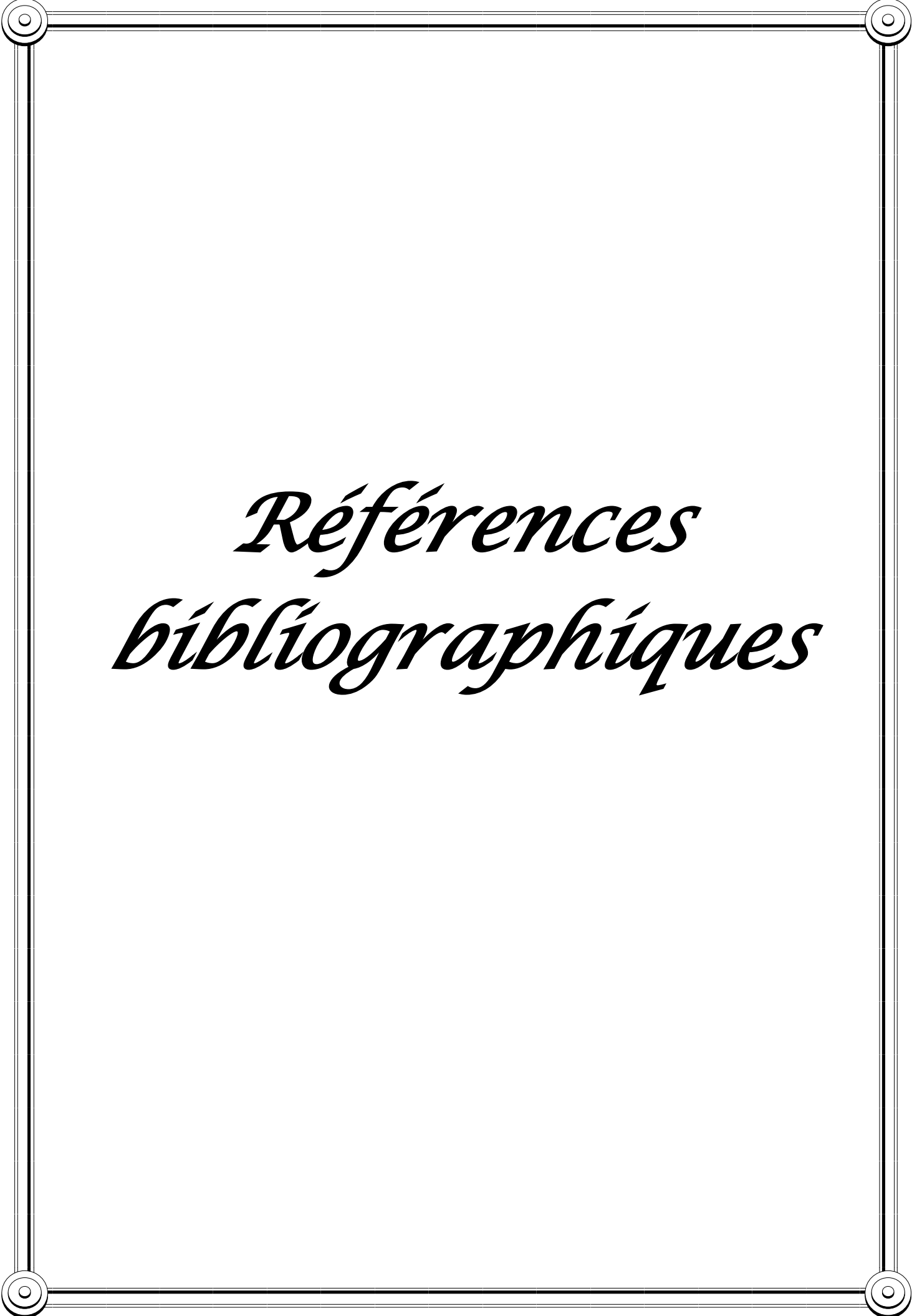
La méthode de phénol/chloroforme est considérée comme étant la méthode de référence, la pureté de l'ADN est meilleure (une bonne concentration en ADN pur) mais cette méthode est lente et les produits utilisés sont dangereux. D'autres techniques d'extraction ont été développées.

Il existe aujourd'hui des kits commerciaux permettant de réaliser rapidement l'extraction et la purification à l'aide de réactifs prêts à l'emploi. Dans notre travail, on a utilisé le kit QIAGEN QIAamp® DSP DNA Blood Mini. Cet instrument peut accueillir jusqu'à 12 échantillons simultanément et les traitant en pureté en moins d'une heure, avec avantage d'élimination des étapes de préparation du réactif, de pipetage et de centrifugation dans le cadre du flux de travail ordinaire avec un risque minimale de contamination.

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

Pour la continuité de notre travail expérimental nous proposons :

- ✓ Augmenter le nombre des échantillons pour faire une étude sur l'efficacité des méthodes d'extraction, ce qui va nous permettre d'en tirer des conclusions et dégager des recommandations, très utiles sur le protocole appliqué ;
- ✓ Utilisation d'autres techniques pour l'extraction d'ADN et faire la comparaison.
- ✓ Choisir un autre échantillon que de sang.



*Références
bibliographiques*

A

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

Alexander M ., Phil T & Andy B., (2013). Molecular Biology Fourth Edition. Ed, Garland Science. New York.

Ameziane N ., Marc B ., Jérôme L., (2005). Principes de biologie moléculaire en biologie clinique.

Ameziane N., Bogard M & Lamoril J., (2006). Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Ed, Elsevier Masson. Paris.

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

Atcha D., (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 ., (1994). Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus Type III. Journal of Experimental Medicine, 79, pp. 137-158.

B

Benabdallah H., (2015).cours techniques d'extraction et purification d'ADN. Université Ferhat Abbas de Sétif.

Bienvenu C., Meunier S., Bousquet S., Chiron L., Richard A., Gautheret-Dejean J., - Rouselle D., Feldmann. Les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin. Annales de Biologie Clinique. Volume 57, Numéro 1, 77-84, Janvier - Février 1999, Pratique quotidienne.

Brown T., (2010). Gene Cloning and DNA Analysis : An Introduction 6th edition. Ed, John Wiley and Sons. USA.

Buckingham L & Flaws ML., (2007). MOLECULAR DIAGNOSTICS : Fundamentals, Methods, & Clinical Applications. F.A. Davis Company. Philadelphia.

Butler J M .,(2010). Fundamentals of Forensic DNA Typing, Ed Elsevier. USA.

C

Chakour M., Koeck J L., Maslin J., Nicand E., Chadli M., Nizou J. Y. et Buisson Y., 2003. Diagnostic biologique rapide en contexte épidémique: état des lieux, perspectives.Médecine et maladies infectieuses 33(8):396-412.

D

Douaoudi H.,(2019). Extraction de l'ADN à partir de sang de mouton : Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem ; p.44.

Das S & Dash H R., (2015). Microbial Biotechnology: A Laboratory Manual for Bacterial Systems. Ed, Springer. India.

Dougoud N.,(2008). Comparaison de deux protocoles d'extraction dans le cadre d'un contrôle de qualité sur les affaires de mœurs ; Institut universitaire de médecine légale ; Laboratoire de génétique forensique ; p.14.

Duncan E., Setzke E & Lehmann J., (2003). Isolation of Genomic DNA. In Nucleic Acids Isolation Methods. Ed, American Scientific Publishers. USA.

E

Elyse P., Alain H .,(2002). La PCR en temps réels: principes et applications. Reviews in biology and biotechnology. Vol.2, canada. P2-11.

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.

G

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

Goodwin W., Linacre A., Hadi S.,(2007). An introduction to forensic genetics,hoboken,New jersey ; john wiley & sons Ltd, New jersey, USA. P 17-42.

Goodwin W., Linacre A & Hadi S., (2011). An Introduction to Forensic Genetics, Second Edition. Ed, Wiley-Blackwell. USA.

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

J

Jeannesson E., (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

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

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.

Kohle C.,(2011). Les cellules sanguines. Université médicale virtuelle francophone.

L

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

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

M

Madisen L., Hoar DL., Holroyd CD., Crisp M., Hodes ME. DNA banking: the effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *Am J Med Genet* 1987 ; 27 : 379-90.)

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

Marié LJ., (2001). Tiré à part de Documents pour le Médecin du Travail, 1^{er} 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

Marsal G., Boronat N., Canals J. M., Zamora F et Fort F., (2013). Comparison of the efficiency of some of the most usual DNA extraction methods for woody plants in different tissues of *Vitis vinifera* L. *OENO One* 47(4): 227-230.

Merel p.,(2007). Automatisation et biologie moléculaire : de l'extraction des acides nucléiques à la PCR temps réels. *Spectra biologie* .162 :p88-93

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

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 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.

O

Ould Ahmed., F Ben Salem., S Bedhiaf ., Djemali M., (2010). Analyse moléculaire de la diversité génétique des dromadaires (*Camelus dromedarius*) en Tunisie, pp400

P

Pascal M.,(2007). La PCR en temps réels, choix d'amorces et analyse des résultats. laboratoire de pharmacologie-toxicologie, INRA, Toulouse.

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

R

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

Senicourt L., (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

Suguna S., Nandal D. H., Kamble S., Bharatha A. & Kunkulol R., (2014). Genomic DNA Isolation from Human Whole Blood Samples by Non Enzymatic Salting Out Method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6. pp198-199.

T

Turner PC., A.G McLennan., A.D Bates & M.R.H White .l'essentiel en biologie moléculaire .école de sciences biologiques. Univesity of liverpool, liverpool, UK. ISBN : 2-911808-10-X , p 38-51.

V

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

W

Wilson K & Walker J., (2005). Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology sixth edition. Ed, Cambridge University Press. New York.

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.

Sites web

[1] <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/db/Adenine.svg/1200px-Adenine.svg.png> consulté le 19 mars 2020.

[2] <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/coursBC/ac.nucleiques/acnucl.html> consulté le 20 mars 2020.

[3] <https://www.promega.com/-/media/files/promega-worldwide/europe/promega-france/astuces/tech-tip-42-quantifieracidesnucliques.pdf?la=en> consulté le 13 mai 2020.

[4] <https://cit.ligue-cancer.net/bioresources/index.php/la-qualification/la-purete-de-lechantillon/> consulté le 26 mars 2020.

[5] <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-renaturation-6815/> consulté le 04 juillet 2020.

[6] <https://dondesang.efs.sante.fr/comprendre-quest-ce-que-le-sang/le-sang-et-ses-composants> consulté le 01 juin 2020.

[7] <https://www.msmanuals.com/fr/accueil/troubles-du-sang/biologie-du-sang/constituants-du-sang> consulté le 08 avril 2020.

[8] <https://www.hopital.fr/Vos-dossiers-sante/Ethique-et-bioethique/Don-de-sang/Les-differents-composants-du-sang> consulté le 03 mai 2020.

[9] <https://www.clinisciences.com/lire/extraction-d-039-adn-909/kit-d-039-extraction-d-039-adn-1303.html> consulté le 26.07.2020.

[10] https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjNwbSsmcHrAhUFtRoKHUxkC5EQFjAFegQIBBAB&url=https%3A%2F%2Fwww.qiagen.com%2Fjp%2Fresources%2Fdownload.aspx%3Fid%3Df7d77c6e-0479-4b2b-a2e0-5ca747114e34%26lang%3Den&usg=AOvVaw2JTQ3gHiNZ2QaH8RI4_Orl consulté le 28 aout 2020.

[11] https://elearning.univ-bejaia.dz/pluginfile.php/272159/mod_resource/content/0/Cours_AMIR%20Nadir_Techniques%20en%20Biologie%20Mol%C3%A9culaire.pdf consulté le 14 Juillet 2020.

[12] https://www.memoireonline.com/04/14/8834/m_Etude-comparative-de-l-electrophorese-sur-gel-et-l-electrophorese-sur-l-automate-capillary8.html consulté le 10 aout 2020.

Annexes

1. Extraction de l'ADN par la technique Na Cl « salting out »

*** Matériels, réactifs et appareils utilisés**

- Matériels: Seringues de 5 ml stériles, Gants, Tubes falcon, Eppendorfs, Embouts, Pipettes Pasteur, Pissettes, Bêchers, éprouvettes, Portoirs, Micropipettes.
- Réactifs: EDTA, Tris, NaOH, HCl, SDS, NaCl, Protéinase K, Ethanol 70%.
- Appareils: Appareil à glace, Centrifugeuse, Bain marie.

2. Extraction de l'ADN par la méthode du phénol /chloroforme

***Tampon de lyse**

5% Sarkosyl

10 mM TRIS-HCl pH 8.0

10 mM EDTA pH 8

75 mM NaCl

Glossaire

Adénine : une base de type purique qui s'apparie avec la thymine dans la double hélice d'ADN

ADN (acide désoxyribonucléique) : long polymère non ramifié composé de 4 types de nucléotides à désoxyribose, unis par des liaisons phosphodiester ; l'ADN est le dépositaire de l'information génétique. A l'état naturel, la molécule d'ADN est une hélice double formée de deux brins antiparallèles.

ARN (acide ribonucléique) : long polymère non ramifié, monocaténaire, composé de nucléotides ribosidiques unis par des liaisons phosphodiester ; il est issu de la transcription d'un ADN et, chez certains virus, par copie d'un ARN. Les trois types d'ARN cellulaire ARNm, ARNt, ARNr jouent chacun un rôle propre dans la synthèse des protéines.

ARNase (ribonucléase) : enzyme qui découpe un brin d'ARN, éventuellement jusqu'à hydrolyse complète, en donnant des ribonucléotides. Centrifugation : application de forces centrifuges élevées à la préparation ou la séparation de molécules, particules ou cellules en solution/suspension, basée sur une différence de masse, de forme ou de densité.

Double hélice : la structure de l'ADN, proposée pour la première fois par Watson et Crick, constituée de deux hélices entrelacées liées par des liaisons hydrogène entre les bases appariées.

Eucaryote : un organisme qui possède des cellules eucaryote.

Liaison phosphodiester : une liaison entre un groupement sucré et un groupement phosphate ; ce type de liaison se forme dans le squelette sucre-phosphate de l'ADN.

Nucléotide : une molécule composée d'une base azotée, d'un sucre et d'un groupement phosphate. L'unité élémentaire de construction des acides nucléiques.

pH : échelle d'acidité ou de basicité d'une solution ; c'est le cologarithme de la concentration d'ions H⁺ exprimée en mol / litre ; une solution de pH=7 est neutre, en dessous, elle est acide, au-dessus, elle est basique.

Purine : composé basique à deux noyaux hétérocycliques fusionnés présent dans les acides nucléiques. Les purines habituellement présentes dans l'ADN et l'ARN sont l'adénine et la guanine.

Pyrimidine : composé basique à un noyau hétérocyclique fusionné présent dans les acides nucléiques. Les pyrimidines courantes de l'ADN sont la cytosine et la thymine ; dans l'ARN, la thymine est remplacée par l'uracile.

Tampon : mélange des formes acide (HA) et basique (A-) d'une substance chimique choisie pour que le pH de la solution se modifie à peine quand on y'ajoute une petite quantité d'acide fort ou de base forte.

Thymine : une base pyrimidique qui s'apparie avec l'Adénine.