

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

Université de Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Option : Génétique et physiologie

Thème :

**Comparaison entre deux techniques d'extraction de l'ADN
(Manuelle et Automatisée)**

Présenté par :

CHETITAH ASMAA

OUAAD NOUR EL HOUDA

Soutenu le : 22-09-2018

Devant le jury:

Mme CHAABANE.D	MCB	USDB1	Présidente
Melle CHERRALLAH.A	MCB	USDB1	Examinatrice
Mme OTMANE.A	MAA	CHU(BEO)	Promotrice
Mme SOUR.S	MCB	USDB1	Co-promotrice

Promotion : 2017-2018

Remerciements

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

*Dans la gratitude, nous adressons un grand merci à notre promotrice le Docteur Mme **OTMANE.A**, le chef de l'unité de la Biologie Moléculaire au niveau de laboratoire central du CHU Bab El Oued, pour avoir accepté de diriger notre travail, malgré ses obligations.*

*Nous remercions profondément le Docteur Mme **SOUR.S**, notre Co-promotrice pour le temps qu'elle nous a accordé, sa gentillesse et son regard critique à la rédaction de ce manuscrit.*

*Nous tenons à remercier vivement les membres du jury ; le Docteur Melle **CHERRALLAH.A** et Docteur Mme **CHAABANE.D** pour l'intérêt qu'elles ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.*

*Nos remerciements s'adressent également aux ingénieurs de laboratoire de la Biologie Moléculaire Notamment Melle **AOUADI.M** pour ses précieux conseils, sa disponibilité et sa gentillesse.*

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

Dédicaces

A ceux qui m'ont indiqué la bonne voie ... à mes chers parents, que DIEU les protège.

.... J'espère que je serai toujours à la hauteur de vos espérances.

Ce Mémoire est l'aboutissement de vos efforts.

*A mes deux sœurs **KHADIDJA** et **KARIMA** pour leur soutien et leur amour.*

A toute la promotion Master Génétique 2017/2018 à qui je souhaite bonheur et réussite.

ASMAA.

Dédicaces

*Je dédie ce mémoire en premier à mon **Père**, tous les mots ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance pour ton dévouement et tes sacrifices, tu as toujours été à mes cotés pour me soutenir et m'épauler.*

*A ma chère **Mère**, tous les mots ne pourraient témoigner de ma gratitude aussi je te dédie ce mémoire comme fruit de ton dévouement de l'expression de mon profond amour.*

*A mes frères **MOUHAMED** et **ABDOU** et mes sœurs **AMINA** et **ASMAA**.*

*A mes **neveux** et **nièces**, merci d'être le bonheur de ma vie.*

A tous ceux qui m'ont aidé et encouragé.

NOURELHOUDA.

Résumé

Au cours de ces dernières années, la génétique moléculaire a modifié considérablement les protocoles et les techniques classiques d'extraction et de purification des acides nucléiques.

Les Kits commercialisés prêts à l'emploi sont l'exemple typique de cette modification, car ; ils sont devenus indispensables dans un laboratoire de Biologie Moléculaire.

Utilisés seuls ou combinés avec un automate reste un choix qui dépend de plusieurs paramètres.

La comparaison entre les deux approches (manuelle ou automatique) est l'objectif de cette étude.

Les résultats obtenus après les processus d'extraction d'ADN génomique du sang humain par un kit pour l'extraction manuelle (Wizard®Genomic DNA PurificationA1120), et les même échantillons extraits par un Kit pour l'utilisation automatique (Maxwell®16 Blood DNA Purification Kit AS1010) ; révèlent que chacune de ces deux méthodes fait gagner à l'opérateur certains avantages.

En effet, l'utilisation des kits manuels permet de gagner en termes de concentration de l'ADN obtenu dont la moyenne était de 504.28µg/ml ; alors que le point fort de la méthode automatique est sans doute la simplicité et rapidité de la manipulation, la concentration de l'ADN est de 228.87µg/ml ; mais aussi le volume du sang initial nécessaire pour l'extraction qui est de 400µl contre 3ml pour la première technique.

En terme de pureté ; plus de 80% des échantillons générés de l'extraction par les deux méthodes étaient contaminés par des protéines.

Mots Clés : extraction et purification des acides nucléiques ; Kits commercialisés ; automate d'extraction ; comparaison.

Abstract

In recent years; Molecular Genetics has significantly altered conventional protocols and techniques for the extraction and purification of nucleic acids.

The commercial Kits are a typical example of this modification; because they have become indispensable in a laboratory of Molecular Biology.

Used alone or combined with PLC remains a choice that responds to several parameters.

The results obtained after the extraction process of the genomic DNA of human blood, by a Kit for manual extraction (Wizard® Genomic DNA Purification A1120); and the same samples extracted by a kit for automatic extraction (Maxwell®16 Blood DNA Purification Kit AS1010); reveals that each of these two methods saves the operator on certain details; indeed, use of the manual Kit allows to gain in terms of concentration of DNA obtained whose average was from 504.28µg/ml ;while the highlight of the automatic method certainly is the simplicity and speed of the DNA extraction, the average of concentration of the DNA is of 228.87µg/ml .but also the volume of the initial blood necessary for the extraction which is 400µl against 300µl of the first technique.

In terms of purity, the percentage of contamination of DNA by proteins generated by the two methods exceeds 80% of samples.

Key words: Extraction and purification of nucleic acids; commercial Kits; PLC.

ملخص

في السنوات الأخيرة، غيرت الوراثة الجزيئية بشكل كبير التقنيات التقليدية المستخدمة لاستخراج وتنقية الأحماض النووية

العدّات الاختبارية التجارية الجاهزة للاستخدام هي مثال نموذجي لهذا التغيير حيث أنها أصبحت أساسية في مختبر البيولوجيا الخلوية .

تستخدم وحدها أو مجتمعة مع (PLC)، يظل اختيارها يخضع لعدة معايير .

لهذا فان مقارنة هاتين الطريقتين كمياً و نوعياً كان هدف هذه الدراسة .

النتائج التي تمّ الحصول عليها بعد عملية استخراج الحمض النووي الجيني من الدم البشري ، عن طريق عدّات اختبارية وحدها (Wizard®Genomic DAN Purification A1120) ، و نفس العينات تم استخراج الحمض النووي الجيني منها بواسطة عدّات اختبارية خاصة بجهاز الاستخراج (AS1010:Maxwell®16 Blood DNA Purification Kit)

تكشف أن لكل طريقة من هاتين الطريقتين توفر امتيازات مختلفة عن طريقة الأخرى للباحث ، و بالفعل فإن استخدام العدّات اليدوية يسمح بالحصول على معدل تركيز جيد من الحمض النووي حيث كان حوالي 504.28 ميكروجرام / ميلي لتر ، بحيث أن امتياز الطريقة الثانية الأوتوماتكية هو بدون شدّ البساطة و سرعة التجربة ، و معدّل تركيز هذه الطريقة حوالي 228.87 ميكروجرام / ميلي لتر ، لكن هناك أيضاً حجم الدم اللازم لاستخراج الحمض النووي فهو 400 ميكرو لتر في هذه التقنية مقابل 300 مليلتر في الطريقة الأولى . من حيث النقاء ، فإن نسبة التلوث بالبروتينات في الأحماض النووية الناتجة عن الطريقتين فقد تجاوزت % 80 من العينات .

الكلمات المفتاحية : استخراج و تنقية الأحماض النووية ؛ العدات الاختبارية التجارية؛مقارنة؛PLC

Liste des Figures.

Figure	Titre	Page
1	La structure de l'ADN	3
2	Différentes échelles de compaction de l'information génétique.	6
3	Localisation de l'ADN dans une cellule animale.	7
4	Les éléments figurés du sang.	8
5	Purification de l'ADN par l'extraction au phénol.	11
6	Une centrifugeuse.	12
7	Une ultracentrifugeuse.	12
8	L'attachement de l'ADN avec des particules échangeuse d'ions.	13
9	Purification de l'ADN par chromatographie échangeuse d'ions.	14
10	Principe de spectrophotomètre, les pièces essentielles.	16
11	L'électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose.	18
12	La révélation de l'ADN par coloration au Bromure d'Ethidium.	19
13	L'organisation du cartouche pur l'extraction automatique de l'ADN.	24
14	L'automate de l'extraction d'ADN Maxwell®16Mdx.	24
15	Le spectrophotomètre Eppendorf BioPhotometer plus.	27
16	Les résultats du ratio DO 260/280nm des échantillons extraits par le kit Wizard®.	32
17	Résultats du ratio DO 260/230nm des échantillons extraits par le kit Wizard®.	32
18	La photographie du gel d'électrophorèse des échantillons extraits par le kit Wizard®.	33
19	Résultats du ratio 260/280nm des échantillons extraits par l'automate Maxwell®16.	34
20	Résultats du ratio 260/230nm des échantillons extraits par l'automate Maxwell®16.	35
21	La photographie du gel d'électrophorèse des échantillons extraits par l'automate Maxwell®16.	35

Liste des Tableaux.

Tableau	Titre	page
1	Les marques des extracteurs automatiques de l'ADN les plus performants.	15
2	Comparaison entre le principe générale de l'extraction par les deux méthodes.	26
3	Pureté d'un échantillon d'ADN.	28
4	Résultats du dosage de la DO pour les échantillons extraits par le kit Wizard®.	
5	Résultats du dosage de la DO des échantillons extraits par l'automate Maxwell®16.	33
6	Résultats du test T de student	36
7	Résultats du test T de Student pour la comparaison des échantillons stockes et les échantillons fraîchement manipulés.	37
8	Comparaison des deux méthodes d'extraction et de purification de l'ADN génomique à partir du sang total.	38
9	Comparaison des différents procédés d'extraction d'ADN extrait par les deux méthodes.	39

Table des Matières

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse Bibliographique	
1. L'ADN	
1.1 Historique de la découverte de l'ADN	2
1.2 Définition.....	2
1.3 Structure de l'ADN.....	2
1.4 Propriétés physicochimiques de l'ADN	4
1.5 Fonctions de l'ADN	5
1.6 Localisation et sources de l'ADN	5
2. LE SANG	
2.1 Définition	7
2.2 Composants du sang	7
2.3 Origine des cellules sanguines	8
2.3.1. Le globule rouge	8
2.3.2. Les globules blancs	8
2.3.3. Les plaquettes sanguines	8
3. L'EXTRACTION DE L'ADN	
3.1. Le principe général de l'extraction de l'ADN	9
3.1.1. Une lyse cellulaire	10
3.1.2. Purification de l'ADN	10
3.2. Méthodes classiques d'extraction de l'ADN	12
3.2.1. La méthode du phénol chloroforme.....	12
3.2.2 .La méthode saline	13
3.2.3. La colonne échangeuse d'ions	13
3.3. La méthode des kits.....	14
3.4. La méthode automatique	14

4. CONTROL DE L'ADN PAR SPECTROPHOTOMETRIE	
4.1. Principe du dosage de l'ADN par spectrophotométrie.....	16
4.2. Résultats théoriques	16
4.3. Le dosage des acides nucléiques par NanoDrop.....	17
5. CONTROL DE L'ADN PAR L'ELECTROPHORESE	
5.1. Principe de migration sur gel	18
5.2. Electrophorèse sur gel d'agarose	18
5.3. Visualisation de l'ADN dans le gel d'électrophorèse.....	18
5.4. Résultats théoriques	19

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Objectifs.....	21
2. Etude	21
2.1. Matériel biologique.....	21
2.2. Méthodes.....	21
3.2.1. Extraction de l'ADN par le kitPromega.....	21
3.2.2. Extraction automatique d'ADN (instrument Maxwell®16 Mdx).....	24
3.2.3. Performances analytiques des deux méthodes d'extraction.....	25
3.2.4. Le rendement de l'extraction.....	27
3.2.4.1. la densité optique (Absorbance).....	27
3.2.4.2. La migration sur gel d'agarose.....	28
- La préparation du gel.....	29
- La préparation des échantillons.....	29
- Le chargement des puits.....	29
- La révélation des bandes d'ADN (analyse du gel).....	30

Chapitre III : Résultats

1 Résultats des échantillons extraits par le kit Promega.....	31
1.1 La densité optique.....	31
1.2. La migration sur gel d'agarose.....	32
2. Résultats des échantillons extraits par automate Maxwell ®16 Mdx.....	33

2.1. Le dosage de la densité optique.....	33
2.2. Migration sur gel d'agarose.....	35
3. Comparaison entre les deux méthodes d'extraction.....	35
Discussion générale.....	38
Conclusion.....	40
Références Bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Toute étude de génétique moléculaire implique la disposition d'échantillons d'acides nucléiques, pour cela leur extraction et purification sont essentielles et doivent être adaptées à l'échantillon biologique, à la nature du génome (cellulaire ou exogène), au nombre de copies dans l'échantillon et aux manipulations poste-extraction (PCR, Electrophorèse, Southerne blot...). **(Somma, 2007)**

Le rendement et la pureté des acides nucléiques sont deux éléments importants pour assurer l'efficacité et la fiabilité des analyses.

Ces deux critères font l'objectif ultime de nombreux procédés d'extraction des acides nucléiques, aussi bien les techniques conventionnelles que les Kits qui sont actuellement proposés par un certain nombre d'industriels ; que ça soit manuelles ou même automatiques.

Le moteur principal de l'évolution de différentes méthodes d'extraction et de purification des acides nucléiques étant la nécessité de produire plus et de diminuer le temps passé en manipulation. **(Ginot, 1995)**

Notre projet compare entre deux méthodes d'extraction d'ADN génomique à partir du sang humain ; l'une semi-automatique par le Kit (Wizard® Genomic DNA Purification A1120), et l'autre complètement automatique combinée avec le Kit (Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit AS1010+Maxwell® 16Mdx).

Il s'agit d'une comparaison qualitative (analyse de la pureté de l'ADN) et quantitative (estimation de la concentration de l'ADN)

1. Acide-Désoxyribo-Nucléique (ADN) :

1.1 Historique de la découverte de l'ADN :

C'est en **1869** que **Johann Friedrich Miescher** découvre dans le noyau des cellules vivantes une substance riche en phosphate « la nucléine » qui sera nommée au **XXème** siècle « ADN ». Par la suite, en **1882**, **Walther Flemming** met en évidence les chromosomes, constitués de molécules d'ADN, qui regroupent plusieurs gènes. Il décrit pour la première fois la mitose, phénomène par lequel les cellules se divisent et permettent la croissance et le renouvellement cellulaires. Enfin, c'est en **1928** que **Phoebus Levene** puis **Erwin Chargaff** déterminent la structure chimique de l'ADN avec sa composition en bases azotées (adénine A, thymine T, guanine G et cytosine C) alors que **James Watson** et **Francis Crick (1952)** ont établie la structure en double hélice de l'ADN, ce qui leur valut le prix Nobel de physiologie et de médecine en **1962**.(Giovannangeli *et al.*,2007).

1.2 Définition :

ADN est une grande molécule biologique qui contient l'ensemble de nos gènes (le génome).

Cette molécule est le support de notre information génétique, mais également celui de l'hérédité.

Tout les êtres vivants (les animaux, les végétaux, les bactéries ou la plupart des virus) partagent une même structure de base de cette molécule (l'ADN) ce qui fait appel a une étude structurale pour la comprendre.(Swynghedauw *et al.*,2008)

1.3 Structure de l'ADN :

Il fallait attendre jusqu'à **1953** pour avoir la vraie description de la structure de la molécule d'ADN qui a été présenté par **WATSON** et **CRICK**.

Selon eux l'ADN est une molécule linéaire composée de quatre types de sous-unités appelées nucléotides, chacune procédant une base azotée spécifique, soit Adénine (A), Thymine(T), Cytosine(C) ou bien Guanine(G).

L'ADN contient des bases qui peuvent être de deux natures ; soit les bases d'un cycle à cinq atomes de carbone dite : pyrimidiques (Cytosine et Thymine) ; et les bases de double cycle à cinq atomes de carbone dite : puriques (Adénine et Guanine).

Chaque base est liée à un sucre de cinq atomes de carbone (le désoxyribose) ; liée à son tour à un groupement phosphate ; l'enchaînement des nucléotides forme le brin d'ADN, et cet enchaînement se fait dans un sens qui est opposé à celui de l'autre brin : on parle des deux chaînes antiparallèles. (Oliver *et al.*, 2011; Swynghedauw *et al.*, 2008)

L'appariement des bases azotées des deux brins d'ADN se fait grâce à des liaisons hydrogènes suivant la loi de complémentarité qui veut que : face à une thymine se lie toujours une adénine par deux liaisons H, et que face à une cytosine se lie toujours une guanine par trois liaisons H pour des raisons d'affinité.

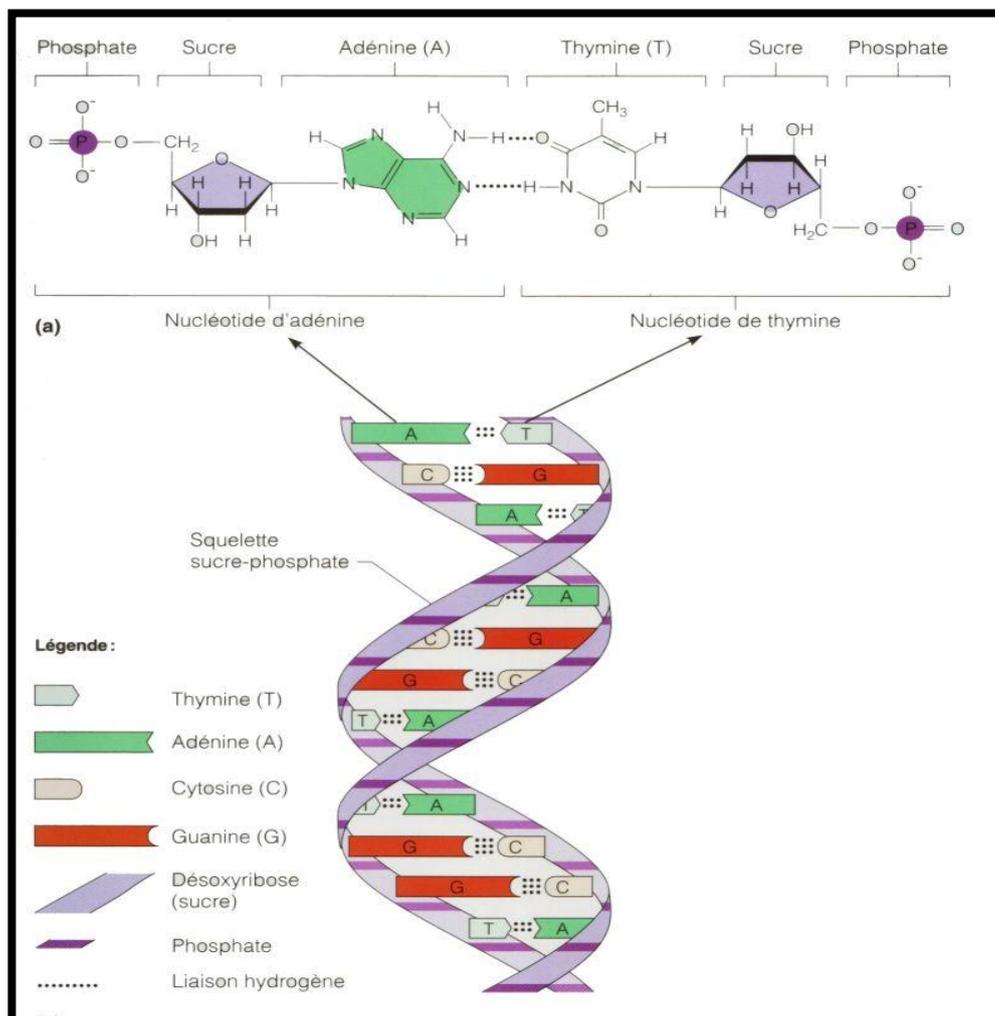


Figure 1 : La structure de l'ADN. (Saccoet *al.*, 2012)

1.4 Propriétés physicochimiques de l'ADN :

Dans des conditions environnantes que ce soit *in vivo*, ou bien *in vitro*, la molécule d'ADN montre une variété de propriétés physicochimiques qui lui sont propres, y compris :

1.4.1 Solubilité de l'ADN : les groupements phosphates donnent un caractère acide à l'ADN ; de ce fait, il est soluble dans les solutions, et surtout les solutions salines qui neutralisent les charges négatives des groupements phosphates, et provoquent la précipitation de l'ADN, ce qui facilite son purification et récupération au cours des manipulations. (Boumendjelet *al.*, 2010)

1.4.2 Dénaturation de l'ADN : la dénaturation de la molécule de l'ADN est la séparation des deux brins suite à une rupture des liaisons hydrogènes entre les bases azotées, et donc une perte de la structure secondaire de l'ADN.

Le formamide (CH_3NO) et l'urée ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) sont les principaux composés chimiques utilisés *in vitro* en vue de dénaturation de l'ADN, car ils déstabilisent les liaisons hydrogènes.

Entre outre, lorsque l'ADN double brin est chauffé à une température dite de fusion ou **TM** (melting température), les deux brins se séparent suite à la rupture des liaisons H. La TM est la température où 50% de l'ADN est déroulé : c'est une dénaturation thermique.

Cette dernière est réversible, c'est-à-dire, un refroidissement progressif de la solution qui contient l'ADN dénaturé va permettre aux brins d'ADN complémentaires de se rencontrer et reformer les liaisons d'hydrogènes. (Boumendjelet *al.*, 2010)

1.4.3 Absorption des bases azotées :

Grâce à la propriété des bases azotées d'absorber la lumière, la fusion de l'ADN peut être suivie à l'aide d'un spectrophotomètre en mesurant l'absorbance à 260nm ; et comme la double hélice d'ADN absorbe moins de la lumière ultraviolette que la somme des deux chaînes isolées en élevant la température, il est possible d'observer qu'à un certain point, il y a augmentation rapide dans la quantité de la lumière UV absorbée : c'est le phénomène d'hyperchrome.(Boumendjel *et al.*.,2010)

Grâce à la propriété des bases azotées d'absorber la lumière, la fusion de l'ADN peut être suivie à l'aide d'un spectrophotomètre en mesurant l'absorbance à 260nm ; et comme la double hélice d'ADN absorbe moins de la lumière ultraviolette que la somme des deux chaînes isolées en élevant la température, il est possible d'observer qu'à un certain point, il y a augmentation rapide dans la quantité de la lumière UV absorbée : c'est le phénomène d'hyperchrome.(Boumendjel *et al.*.,2010)

1.5 Densité

La densité des acides nucléiques est proportionnelle au pourcentage de C+G ; ceci est dû à la présence des trois liaisons hydrogène qui rendent la molécule plus compacte et donc plus dense.

1.6 Fonctions de l'ADN :

Comprendre les fonctions de l'ADN aide les scientifiques pour la recherche fondamentale ainsi que pour le domaine médical.

Selon les scientifiques on peut résumer le rôle de l'ADN en deux principales fonctions :

1.6.1 le transfert de l'information génétique ; est le fait que l'ADN est le plan qui contient les informations nécessaires à la construction des composants de cellules dans le corps ;mais également la transmission de cette information génétique qui doit être précédé toujours par un phénomène de la réplication qui est un processus de reproduction conforme qui donne deux cellules filles ,non seulement identiques entre elles mais a la cellule mère.

1.6.2 Biosynthèse des protéines : on dit que l'ADN est une molécule informative car elle porte l'information nécessaire pour la synthèse des protéines indispensables à la vie cellulaire.

En utilisant le brin d'ADN comme matrice, il y a formation de l'ARNm suite à une transcription qui est la première étape dans cette biosynthèse ; puis cette molécule monocaténaire est prise en charge par les ribosomes au cours de la traduction pour avoir en fin ce produit de gène qui est la protéine.

1.7 Localisation et sources de l'ADN :

Le corps humain est constitué de milliards de cellules comportant chacune un noyau ; ce noyau renferme presque toute l'information génétique propre à l'espèce humaine (environ 37 000 gènes sont localisés dans les mitochondries).celle-ci (l'information génétique) est contenue dans les chromosomes qui contiennent eux-mêmes l'ADN.

Pour extraire l'ADN on remarque cependant que toutes les sources d'ADN ne sont pas aussi riches les unes que les autres.(**Boumendjelet al .,2009**)

1.7.1 Parmi les liquides qui contiennent les cellules nucléées :

-le sang est considéré comme une bonne source, vue la quantité d'ADN qu'il dispose et la facilité de l'extraction.

-l'ADN spermatique est très utile pour la police scientifique même avec les cellules haploïdes (à n chromosome).

-l'exposition à l'air de la salive et les cellules de la cavité buccale leur font des mauvaises sources d'ADN quantitativement et qualitativement par la présence de l'ADN d'origine bactérienne.

1.7.2 Les poils et les cheveux renferment peu d'ADN, car on n'en trouve que dans les follicules.

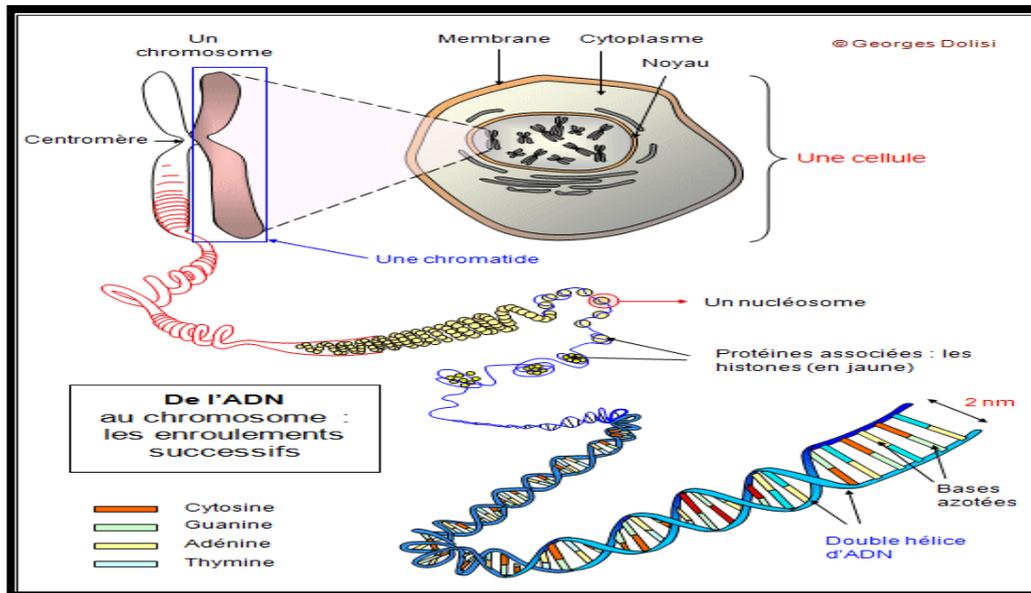


Figure 2 : Différentes échelles de compaction de l'information génétique animale.

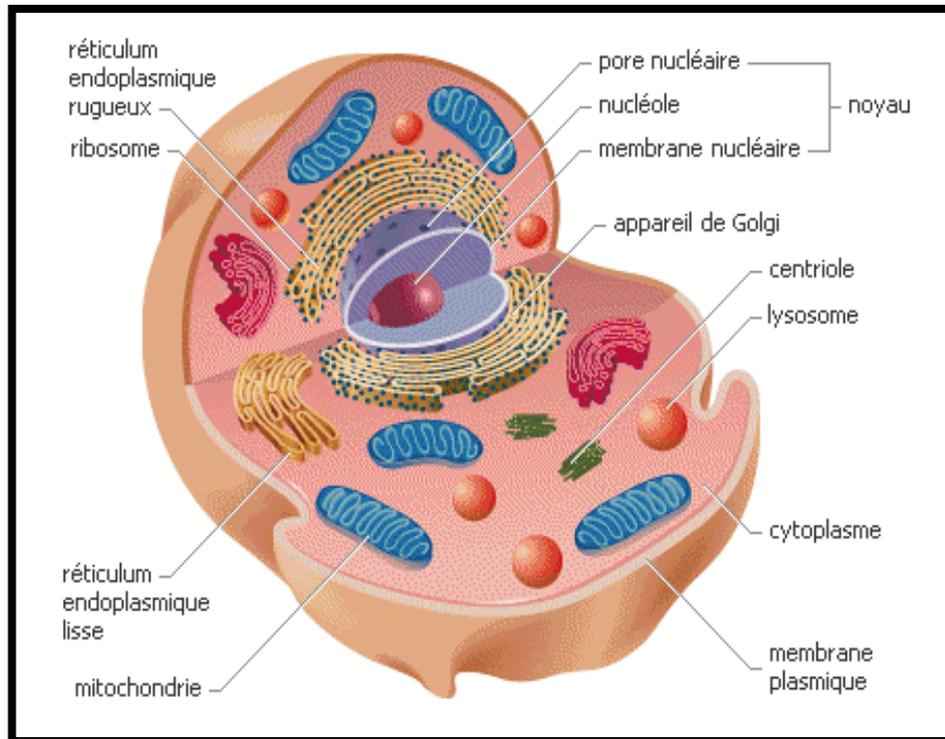


Figure 3 : localisation de l'ADN dans une cellule.

2. LE SANG

2.1 Définition :

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

2.2 Composants du sang :

Le sang est constitue d'un milieu liquide (le plasma 55% du volume de sang) dans le quel baignent les différentes type de cellules sanguines et aussi les protéines comme l'albumine et les immunoglobulines.(Kohler *et al* ., 2011).

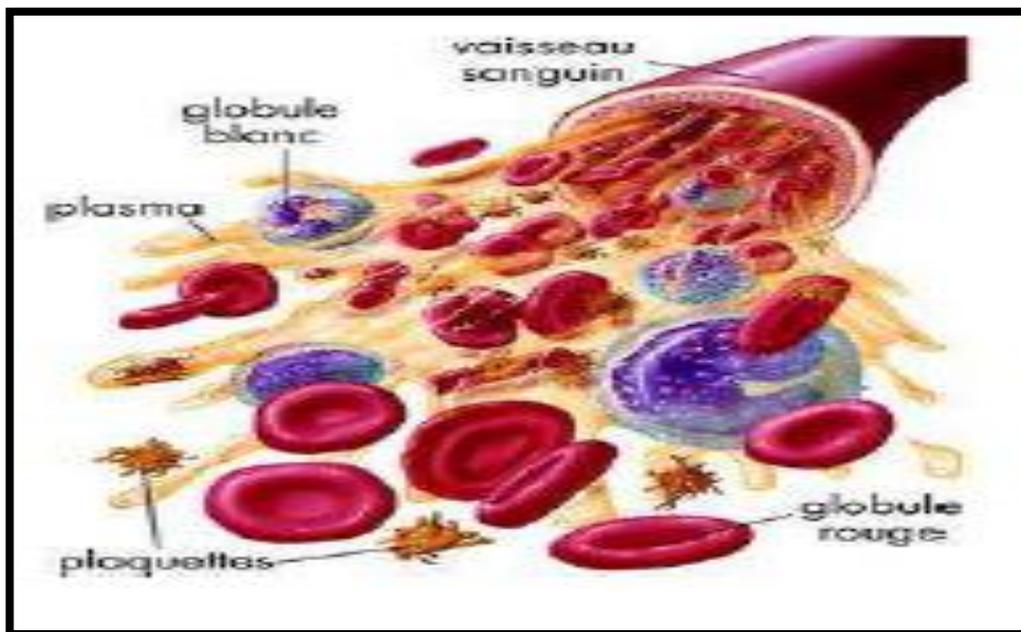


Figure 4 : Les éléments figurés du sang.(Merle *et al* ., , 2015).

2.3 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.

2.3.1 Le globule rouge :

Prend aussi le nom d'hématies d'érythrocyte, est une cellule sanguine biconcave dépourvue de noyau, qui lui permet d'accomplir son rôle de transport des gaz (l'oxygène et le gaz carbonique) entre les poumons et les organes ; et ça grâce à une protéine qu'il contient : l'hémoglobine qui possède le fer sur le quel se fixent ces gaz, et qui est à l'origine de la coloration rouge des hématies. (Kohler *et al.*, 2011)

2.3.2 Les globules blancs :

Egalement appelés leucocytes, qui se trouvent dans le sang, le système lymphatique ainsi que dans les organes lymphoïdes (les ganglions et la rate), car ils font partie des cellules du système immunitaire, et ils jouent un rôle indispensable dans la réponse immunitaire inné et adaptative. (Kohler *et al.*, 2011)

On distingue trois classes de globules blancs en fonction de leurs morphologies :

2.3.2.1 Les granulocytes :

Ou bien les polynucléaires ; sont des cellules sanguines avec des gros noyaux polylobes, et qui sont destinées à lutter spécifiquement contre les infections.

Les granulocytes sont des précurseurs de trois types de leucocytes :

Les neutrophiles possédant une fonction de phagocyte ; les basophiles qui synthétisent l'histamine (la protéine impliquée dans la réaction inflammatoire et les allergies) ; et les éosinophiles qui luttent contre les parasites en déversant les enzymes contenue dans les granules. (Kohler *et al.*, 2011)

2.3.2.2 Les monocytes : sont les cellules de la famille des globules blancs, de grande taille, dont le rôle est purement immunitaire, car ils sont les principaux acteurs de la phagocytose après leur transformation en macrophages.

2.3.2.3 Les lymphocytes : sont des cellules de petite taille, appartenant au groupe des GB ; ils jouent un rôle majeur dans la défense et la mémoire immunitaire ;

On distingue trois classes des lymphocytes : les lymphocytes T, les lymphocytes B et les lymphocytes NK. (Kohler *et al.*, 2011).

2.3.3 Les plaquettes sanguines :

Aussi appelées thrombocytes, sont des éléments trouvés dans la circulation sanguine dont la fonction est de déclencher la coagulation du sang lors d'une lésion vasculaire.

3. EXTRACTION DE L'ADN :

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la pluparts des études de biologie moléculaire.

3.1 Le principe général de l'extraction de l'ADN :

Malgré la diversité des méthodes d'extraction, le principe reste à peu près le même et qui repose sur :

3.1.1 Une lyse cellulaire :

Cette procédure de lyse de la membrane plasmique doit être suffisamment rigoureuse pour briser le matériel de départ ; suffisamment douce pour protéger l'acide nucléique cible.

Différentes procédures de lyse existent et son choix se fait en fonction : de type de cellule, l'équipement disponible, et même des critères technique comme la complexité de certaines méthodes.(Somma *et al.*, 2007)

3.1.1.1 La rupture mécanique :

Les échantillons peuvent être broyés à l'aide d'un mortier ou un pilon, cette méthode est moins en moins utilisée, car elle est longue et expose aux risques de la contamination des échantillons (surtout lorsqu'ils sont congelés à l'azote liquide).

Le broyage à billes en association avec le broyeur ou le vortex est une technique efficace et rapide. Le choc osmotique est un autre exemple de lyse, où la présence de la cellule dans un milieu hypotonique provoque une augmentation de son volume et conduit à son éclatement. La lyse ultrasonique est une méthode de destruction cellulaire pratique puisque l'intensité de la sonication optimale peut être réglée de très douce à très dure selon l'exigence de l'application. (Somma *et al.*, 2007)

3.1.1.2 Le traitement chimique :

Les détergents sont les principaux agents chimiques pour la désintégration des cellules dont le SDS (dodecylsulfate de sulfate) et le NaOH (l'hydroxyde de sodium) sont les plus utilisés. (Somma *et al.*, 2007)

3.1.1.3 L'inactivation des nucléases :

Les nucléases sont inactivées par les agents chaotrope (urée, chlorure de guanidine, thiocyanate de guanidine) et des chélateurs comme EDTA souvent inclus dans le tampon de lyse. (Somma *et al.*, 2007)

3.1.2 Purification de l'ADN :

Les méthodes de purification des acides nucléiques issus d'extraits cellulaires et qui visent à éliminer les protéines non digérées et ainsi que les lipides, sont généralement des combinaisons de deux ou plusieurs techniques.

3.1.2.1 Purification par un solvant organique :

Le mélange phénol-chloroforme permet la dénaturation des protéines, car il est non miscible à l'eau et de densité supérieure à celle des protéines ; l'ADN étant insoluble dans les solvants organiques reste dans le surnageant aqueux. (Brown, 2010).

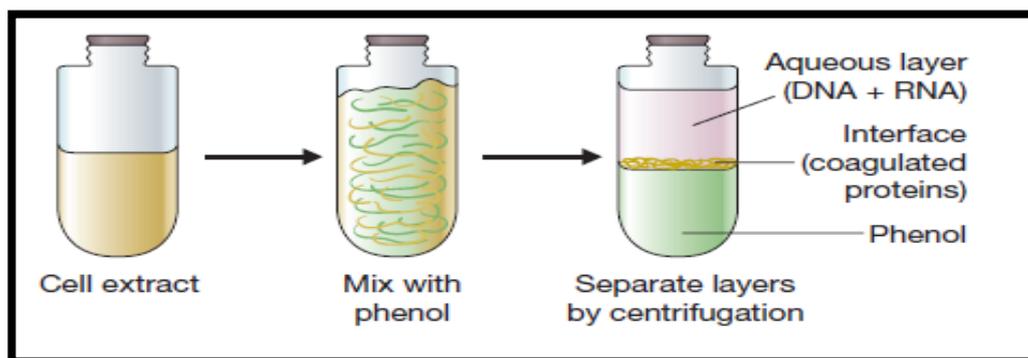


Figure 5 : Purification de l'ADN par l'extraction au phénol. (Brown *et al.*, 2010).

3.1.2.2 Les techniques chromatographiques :

La chromatographie est une méthode physico-chimique de séparation sélective, qui utilise plusieurs techniques en fonction de l'approche de séparation utilisée :

La chromatographie d'adsorption ; de partage ; d'échange d'ions ; et d'exclusion.

Le principe est basé sur la différence d'affinité des composés du mélange avec la phase stationnaire (le support, la colonne) et la phase mobile (la solution aqueuse). (Gillet, 2008)

3.1.2.3 La centrifugation :

C'est une méthode de purification très puissante des acides nucléiques selon leur densité ; qui peuvent être aussi purifiés par ultracentrifugation avec une vitesse de rotation qui dépasse les 20000 tours par minute, dont le but est de séparer les particules fines dispersées dans un liquide.

Afin de débarrasser l'ADN ou l'ARN des contaminants de plus petit format ; la centrifugation peut être combinée avec une autre méthode comme la chromatographie d'adsorption... (Brown *et al.*, 2010).



Figure 6 : Une centrifugeuse.



Figure 7 : Une ultracentrifugeuse.

3.2 Méthodes classiques d'extraction de l'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 et al.,2010).**

3.2.1 La méthode du phénol chloroforme :

Le principe de l'extraction de l'ADN par le mélange phénol chloroforme (solvant organique), se base sur la solubilité différentielle des molécules entre deux phases non miscibles. L'ADN est soluble dans la phase aqueuse, quant aux protéines et les lipides se trouvent dans la phase organique où ils sont dénaturés et solubilisés par le phénol.

Le chloroforme est utilisé pour éliminer les traces du phénol dans la phase aqueuse.

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 et al.,2010).**

3.2.2 La méthode saline :

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 et al.,2010).**

3.2.3 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) ; 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).

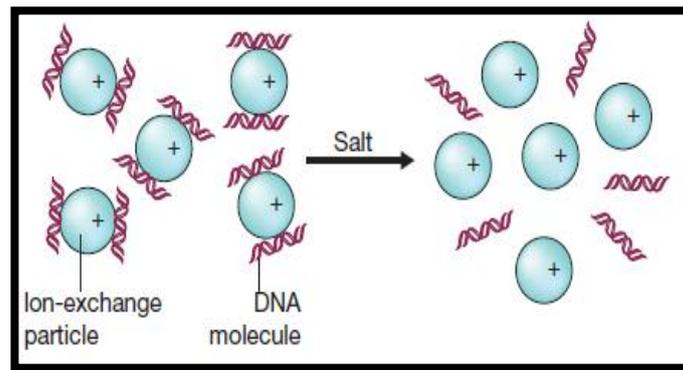


Figure 8 : L'attachement de l'ADN avec les Particules échangeuses d'ions.(Brown *et al.*, 2010).

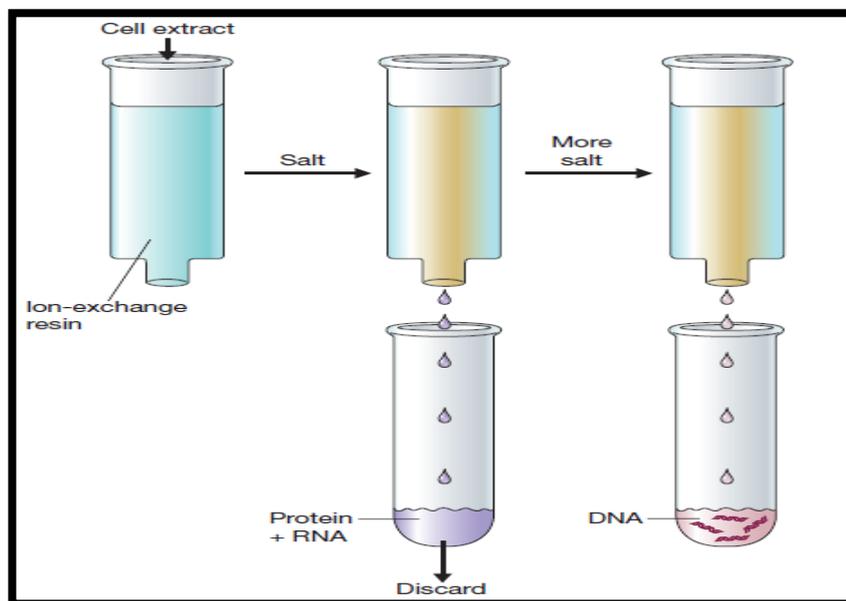


Figure 9 : Purification de l'ADN par chromatographie échangeuse d'ions.

3.3 La méthode des kits :

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 d'avantages qui tournent au tour : d'efficacité, la rapidité, la sécurité et bien évidemment le coût. 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.

3.4 La méthode automatique :

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.(**Merel et al.,2007**)

Le lancement sur le marché d'extracteurs automatiques 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 :(**Merel et al., 2007**)

-La technologie de centrifugation : est 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 (80µm), 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.

Le tableau suivant résume les marques d'extracteurs automatiques de l'**ADN** les plus performants :(**Merel et al ; 2007**).

Tableau1 : les marques des extracteurs automatiques de l'ADN les plus performants.

La société	L'instrument	Technologie	Nbr d'échantillon
AppliedBioSystems	ABI Prisme 6100	Filtration	96
Autogen	AutoGenflex 3000	Centrifugation	48
Bioer	Gen-Pure NPA-32	Magneticrod	32
GeneSystems	Gene Extract	Filtration	6
Genomic	Extra Gene	Centrifugation	48
Invitrogen	IBep	Magnétique /Magtration Cartouche de réactifs.	12
Mole	GeneMole	Magnétique / Cartouche de réactifs.	16
Promega	Maxwell 16	Magneticrod / Cartouche de reactifs.	16
Roche Diagnostics	MagNAPure LC	Magnétique /Magtration.	32
ThermoLabSysteme	King Fisher	Magneticrod	24

4. CONTROLE DE L'ADN PAR SPECTROPHOTOMETRIE :

Grâce à la propriété des acides nucléiques, notamment l'ADN d'absorber la lumière à une longueur d'onde déterminée, et grâce à la loi de Beer-Lambert ; l'analyse de la quantité et de la qualité de l'ADN s'est devenue une étape de routine dans les laboratoires de biologie moléculaire, qui se réalise à l'aide d'un spectrophotomètre ; un outil puissant et indispensable pour la quantification et même le contrôle de la pureté des échantillons d'ADN préalablement extraits. (Brown *et al.*, 2010).

4.1 Principe du dosage de l'ADN par spectrophotométrie :

Le principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre implique l'utilisation d'une source lumineuse qui est rendue monochromatique grâce à un prisme , et qui traverse une cuve contenant la solution a doser ; un photomultiplicateur placé juste après l'échantillon pour enregistrer le spectre de transmission T ($T=I/I_0$; I_0 :intensité de lumière incidente ; I :intensité transmise après le passage a travers la cuve) puis traite l'information de façon à donner l'absorbance ou bien la DO (la densité optique) qui sera affichée pour l'utilisateur. (Somma *et al.*, 2007)

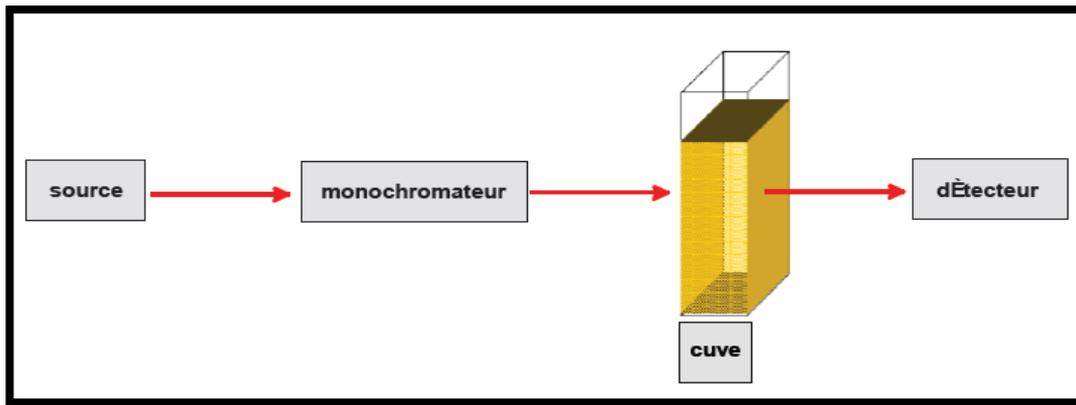


Figure 10 : Principe du spectrophotomètre ; les pièces essentielles.

4.2 Résultats théoriques :

Pour mesurer la concentration de l'ADN, il suffit de mesurer son absorbance (DO) à une longueur d'onde dans la zone de 260nm.

$$A = \log(I/I_0) = \epsilon \cdot l \cdot c$$

A : absorbance (DO) ; ϵ : coefficient d'extinction molaire spécifique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée (l/mol/cm) ; l : largeur de la cuve (cm) et c : la concentration des substances absorbantes.

Parallèlement, la pureté de la solution d'ADN peut être déterminée en mesurant la DO à 230nm et à 280nm.

-Le ratio A_{260nm} / A_{280nm} :

L'intérêt de l'utilisation de ce ratio est pour détecter la contamination par des protéines ; d'une manière générale, la pureté d'une solution d'ADN est considérée comme acceptable lorsque le ratio A_{260nm} / A_{280nm} est compris entre 1.8 et 2.0.

-Le ratio A_{260nm} / A_{230nm} :

Un deuxième rapport qui détermine la pureté, mais cela révèle la présence de contaminants absorbant à 230nm dans la solution tels que, le phénol, les peptides, l'acide humique, EDTA, les polysaccharides... ; ce ratio devrait être d'environ 2.2.

(Somma *et al.*, 2007).

4.3. Le Dosage des acides nucléiques par Nono Drop :

Le volume initial d'un échantillon d'ADN n'est plus un obstacle, avec l'utilisation du Nono Drop, un système qui sert à l'analyse qualitatif et quantitatif des biomolécules en général et l'ADN en particulier ; ce système de rétention combine la technologie des fibres optiques et les propriétés naturelles tension de surface pour capturer et retenir les quantités infimes des échantillons. (**Brown et al., 2010**).

Cette technologie a offert plusieurs avantages citant :

- L'élimination de la nécessité d'effectuer des dilutions, car le système utilise la longueur des trajets plus courts, ce qui résulte dans une gamme de mesures de concentration d'ADN.
- La Réduction de volume des échantillons.
- Facilité d'inclusion d'autres étapes de contrôle.
- Obtention des résultats plus précis en aval.

5. CONTROL DE L'ADN PAR L'ELECTROPHORESE :

5.1 Principe de migration sur gel :

L'électrophorèse sur gel est une méthode de séparation analytique de différentes macromolécules biologiques (telles que : acides aminés, peptides, protéines ; nucléotides, acides nucléiques) qui se fait en fonction de leur charge électrique et leur taille pour les charges identiques.

Cette technique est fondée sur le déplacement d'ions, sous l'effet d'un champ électrique ; où les molécules cationiques migrent vers la cathode, et les molécules anioniques se déplacent vers l'anode ; et puisque les acides nucléiques sont chargés négativement, ils migrent vers le pôle positif (l'anode) de la cuve de l'électrophorèse.

Le poids moléculaire de ces molécules fait que plus qu'elles sont de petite taille, plus elles se déplacent plus rapidement et migrent plus loin.

La vitesse de migration à travers le gel dépend aussi de : la concentration du gel ; la tension du courant ; le tampon et la température.

Le gel est constitué d'une matrice de polymère baignant dans un tampon, et les plus utilisés sont l'agarose et le polyacrylamide. (Gillet *et al.*, 2008)

5.2 Electrophorèse sur gel d'agarose :

L'électrophorèse à travers l'agarose est une méthode utilisée de façon standard pour purifier et analyser les acides nucléiques ; le gel contenant de 0.5à2% d'agarose, ce qui permet de séparer des fragments d'ADN de quelques centaines à plusieurs milliers de nucléotides. (Somma et Querci, 2007).

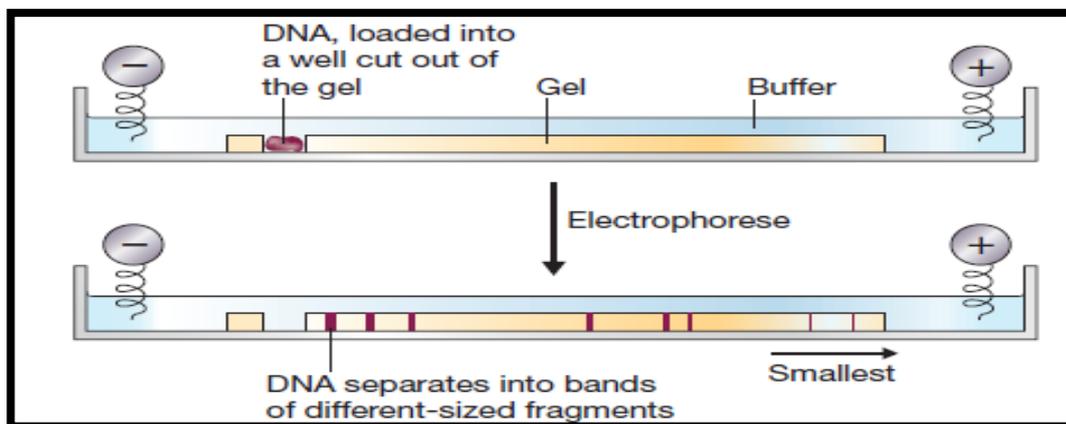


Figure11 : L'électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose. (Brown *et al.*, 2010)

5.2.1 Visualisation de l'ADN dans le gel d'électrophorèse :

La détection de l'ADN dans le gel peut être en colorant celui-ci avec des colorants, dont le plus utilisé est le Bromure d'Ethidium, molécule aromatique cationique planaire qui s'intercale entre les bases azotées, et les rend visibles (rouge orangée) par exposition aux rayons ultraviolets. (Gillet *et al.*, 2008)

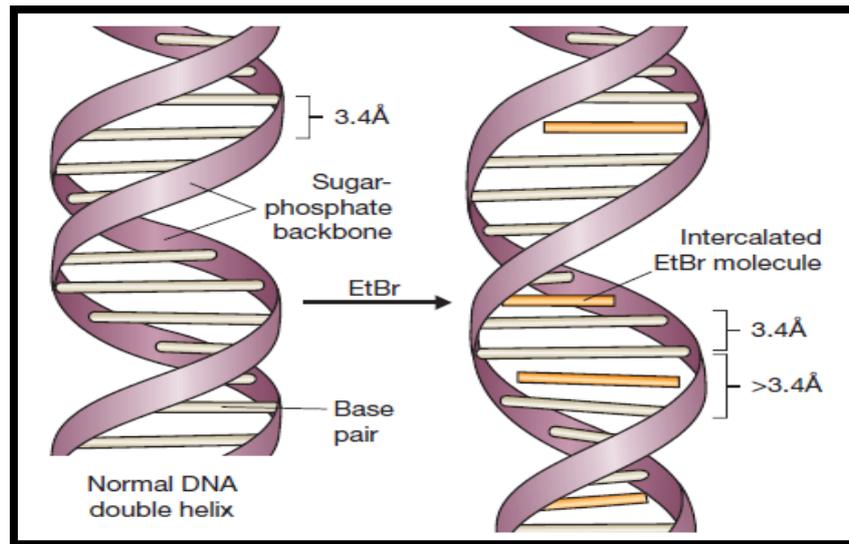


Figure12 : La révélation de l'ADN par la coloration au Bromure d'Ethidium

5.3 Résultats théoriques :

L'utilisation d'un marqueur de taille dont la taille et la concentration sont connues, va permettre de faire une évaluation de la quantité de l'ADN à doser en comparant l'intensité de ces deux fragments (ADN et le marqueur de taille) après migration.

Tandis que la qualité de cet ADN est évaluée en observant le profil de migration :

Un extrait d'ADN génomique non hydrolysé (dégradé) présente sur le gel une seule bande de masse moléculaire élevée ; contrairement à un ADN dégradé qui présente une multitude de bandes. (Gillet *et al.*, 2008).

I. Objectif :

L'objectif de ce travail est de faire une étude comparative entre deux méthodes d'extraction d'ADN génomique à partir du sang humain : une méthode manuelle en utilisant les kits commercialisés, et une méthode complètement automatique à l'aide d'un extracteur d'ADN.

II. Etude :

Cette étude comparative aborde l'aspect qualitatif, quantitatif ; et même le cout de chaque méthode utilisée.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Biologie Moléculaire, au niveau du CHU Bab El Oued ; pour une période de quatre mois, de Mars à juin 2018.

III. Matériel et Méthodes :

a. Matériel biologique :

Notre travail a porté sur l'étude de 201 échantillons sanguins prélevés sur tube EDTA-tri potassique, choisis aléatoirement (la taille, tranche d'âge, et le sexe), dont on a fait l'extraction de l'ADN pour environ 30% de ces échantillons, et récupérer le reste 70% à partir d'une banque DNA ; qui était déjà extrait et congelé à -40 et -80°C, pour une période entre 1mois-3 ans en amont.

Chaque prélèvement sanguin est accompagné d'un consentement éclairé, signé par la patient et par le médecin prescripteur (voir annexe 1).

b. Méthodes :

1. L'extraction d'ADN par le kit Promega :

1.1 Principe :

Le kit Wizard® Genomic DNA Purification A1120, est l'un des kits en solution proposé par la société Promega, pour l'extraction de l'ADN génomique à partir du sang total, qui est suffisant pour 100 échantillons de 300µl chacun.

Ce kit garde le principe général de l'extraction d'ADN basée sur quatre étapes : lyse cellulaire, lyse des globules blancs et leurs noyaux, la déprotéinisation et la précipitation de l'ADN par un alcool (isopropanol), et pour cela, différentes solutions (réactifs) sont fournies par le fabricant, dont la composition est inconnue :

Tableau 2 : Les réactifs de kit de purification d'ADN génomique Wizard® A1120.

Volume	La solution
100ml	Solution de lyse cellulaire
50ml	Solution de lyse nucléaire
25ml	Solution de précipitation des protéines
50ml	Solution de la réhydratation de l'ADN
250µl	Solution de RNase A

Ces réactifs sont accompagnés d'un protocole, pour faciliter la manipulation et garantir les bons résultats.

Selon le manuel technique de ce kit, l'ADN extrait est convenable pour les manipulations courantes de Biologie Moléculaire telles que : la PCR, la Digestion enzymatique par les endonucléases des restrictions, Southern blot, Dot blot...

En respectant le protocole de ce kit, on a remarqué nettement que la méthode des kits était pratique et facile, on a pu observer la méduse d'ADN pour la majorité des échantillons réalisés.

1.2 Mode opératoire :

Protocole expérimental d'extraction d'ADN par les Kit (Wizard® Genomic DNA Purification A1120).

Type de prélèvement : Sang total sur EDTA

- Protocole expérimental :

1-Dans un tube conique stérile de 15ml mettre 9ml de (cell lysis solution)

- 2- Ajouter 3ml de sang total ,agiter 5 a 6 fois puis incuber 10mn à température ambiante
- 3- Centrifuger à 2000 xg pendant 10mn à température ambiante
- 4- Eliminer délicatement le surnageant en veillant à garder le culot
- 5- Vortexer le tube pour détacher le cote puis ajouter 3ml de (nuclei lysis solution)
- N.B. : la solution doit être visqueuse si le manipulateur remarque la présence d'une masse cellulaire , incuber à 37°C pendant 1 heure , si la masse persiste ajouter 1ml de (nuclei lysis solution)
- 6- Etape facultative ajouter 15µl d'ARNase agiter le tube 2 à 5 fois et incuber 37°C pendant 15mn
- 7- Ajouter 1ml de (protein precipitation solution) et bien vortexer de fines particules marron vont apparaitre
- N .B. :dans de cas ou 1ml de (nuclei lysis solution) a été ajoute a N °05,ajoute 1,3ml de (protein precipitation solution) au niveau de cette étape au lieu de 1ml
- 8- Centrifuger à 2000 xg pendant 10 mn à température ambiante
- 9- Transférer le surnageant dans un tube stérile conique de 15ml contenant 3ml d'isopropanol à température ambiante ,agiter doucement jusqu' à l'apparition de la méduse
- 10- Centrifuger à 2000 xg pendant 1mn à température ambiante
- 11- Eliminer délicatement le surnageant puis effectuer 1à2 lavages en ajoutant l'éthanol à 70% à température ambiante, puis centrifuger à 2000 xg pendant 1mn après chaque lavage
- 12- Eliminer le reste de l'éthanol en inversant le tube sur le papier absorbant pendant 10 à 15 mn
- 13- Ajouter 250 µl de (DNA rehydratation solution), puis vortexer.

14-Incuber à 65°C pendant 1 heure ou laisser à température ambiante pendant 24h.

15-Stoker l'ADN entre 2 à 8 °C pour la conservation a court terme.

2. Extraction automatisée de l'ADN (instrument Maxwell® 16) :

La société Promega propose son automate d'extraction Maxwell®16, qui peut être combiné avec son kit de purification pour une meilleure extraction d'ADN génomique à partir du sang total, ou de la couche leuco-plaquettaire (Buffy coat).

Jusqu'à 16 échantillons de 50-400µl de volume peuvent être déposés à la fois dans l'extracteur, l'ADN sera extrait au bout de 30-40 minutes.

L'instrument Maxwell®16 purifie les échantillons en utilisant la technologie des Particules Paramagnétiques (PMPs).



Figure 13 :L'Automate de l'extraction d'ADN Maxwell®16MDx.

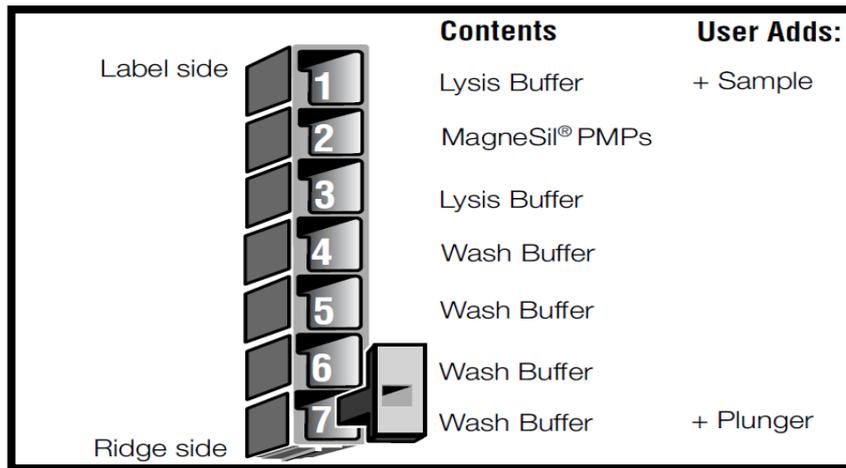


Figure 14 : L'organisation de cartouche l'extraction automatique de l'ADN.

Le Maxwell®16 Blood DNA Purification Kit est suffisant pour purifier l'ADN de 48 échantillons.

2.1 Protocole de purification de l'ADN sanguin avec L'appareil Maxwell® 16 :

Pour les applications cliniques utilisées avec le Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit (réf. AS3300) automatise la purification d'acides nucléiques jusqu'à 16 échantillons ceci par lyse cellulaire et liaison de l'ADN à des particules de silice magnétisées comme principe de séparation. L'ADN purifié est élué dans un volume de 300 µl.

2.2 Les étapes réalisées automatiquement par le système Maxwell® 16 :

- Lyse de l'échantillon en présence d'un agent chaotropique et de détergent.
- Liaison des acides nucléiques aux particules de silice magnétisées.
- Lavages des particules liées à l'ADN de manière à éliminer les autres composants cellulaires.
- Elution des acides nucléiques dans un tampon pouvant être directement ajouté à une PCR standard.

L'utilisateur sélectionne le protocole clinique indiqué par l'appareil Maxwell® 16, place les échantillons dans les cartouches de réactifs, elles-mêmes introduites sur la plate-forme de l'appareil, puis ferme la porte avant de démarrer l'appareil qui réalise automatiquement toutes les étapes du protocole.

3. Performances analytiques des deux méthodes d'extraction :

Les différentes performances analytiques des deux techniques utilisées dans notre travail sont présentées dans le tableau 3.

Tableau3 : Comparaison entre le principe général de l'extraction par les deux méthodes :

	Wizard® Genomic DAN Purification A1120.	Maxwell®16MDx AS3060.
Type d'extraction	Semi automatisée	Complètement automatisée
Matériel associé pour la manipulation	Centrifugeuse Etuve	Kit d'extraction automatique Maxwell®16 AS1010.
Volume nécessaire du sang.	3 ml	400µl
Agent anticoagulant	EDTA	EDTA/heparine/citrate
Principe d'extraction de l'AND	Extraction et purification par un alcool froid(isopropanol).	Manipulateur des particules paramagnétiques de silice.
Réactifs fournis par le fabricant	Solutions de lyse cellulaire, lyse nucléaire, précipitation, réhydratation et RNase.	Cartouches contenant : Solution de lyse, Solution de lavage, Et solution d'élution.
Le nombre d'échantillons	100 échantillons de 300µl	48 échantillons de 400µl
La durée d'extraction	Environ 90 minutes	Environ 35 minutes
Conservation de l'ADN	Par congélation à +8 puis à -40°C.	Par congélation à +8 puis à -40°C.
Le coût des Kits (PUHT)	27572.82 DZD	35392.00 DZD

4. Rendement de l'extraction :

4.1. Densité optique (DO) :

La concentration et la pureté de l'ADN extrait ont été estimées en mesurant la (DO) à 230nm ; 260nm et 280nm ; à l'aide d'un spectrophotomètre « **eppendorf Bio Photometer plus** », qui nous affiche à la fois les trois DOs ainsi que les rapports A260/280 ; A 260/230 et la concentration de l'ADN ; sans calculer les valeurs en utilisant les équations classiques ; facilitant de cette manière l'interprétation des résultats.

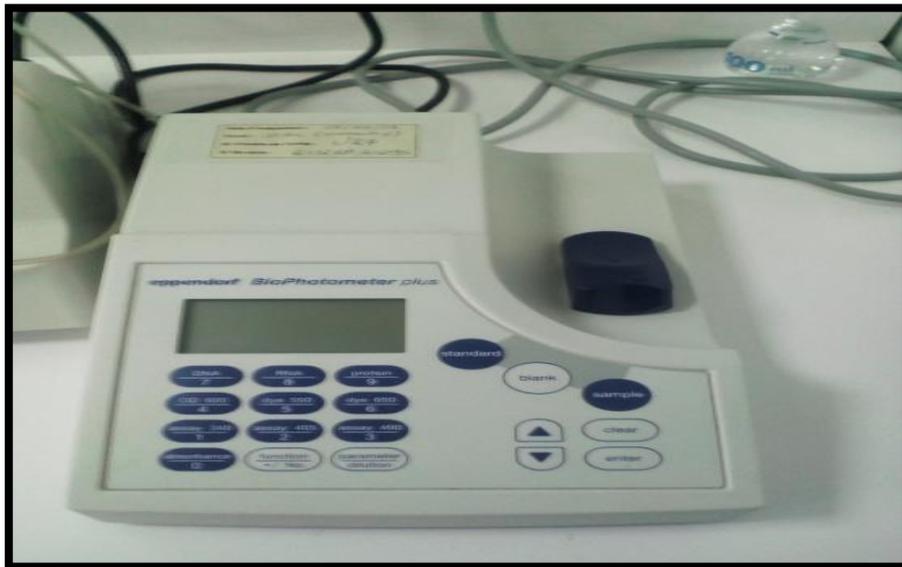


Figure15 : Le spectrophotomètre Eppendorf BioPhotometer plus.

-La préparation des échantillons à doser, se fait en diluant 5 μ l d'ADN dans 245 μ l de l'eau distillé ; puis bien vortexer les tubes pour homogénéiser la solution.

-Préparer un blanc de 250 μ l d'eau distillé.

-Régler les paramètres de spectrophotomètre : l'échantillon à doser (ADN double brin dans notre cas) ; le volume de l'échantillon et le diluant.

- Verser le blanc dans une cuvette et doser la DO, qui doit être égale à « 0 ».
- Verser les échantillons les uns après les autres dans la cuvette et doser l'absorbance (en aspirant à chaque fois l'échantillon précédent).
- Pour confirmer les valeurs ; on a effectué trois dosages par échantillon et garder la moyenne.
- Le rapport A260/280nm permet d'apprécier la pureté de l'ADN, et de détecter une éventuelle contamination par des protéines, et il doit être compris entre 1.8 et 2.0 :

Tableau4 : Pureté d'un échantillon ADN :

Ratio	Valeur	Indication de pureté
	1,8	ADN pur
260/280	< 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)

4.2. La migration sur gel d'agarose :

Une deuxième technique a été choisie pour le contrôle de l'ADN extrait avec les deux méthodes décrites précédemment ; il s'agit de l'électrophorèse sur gel d'agarose (1%).

La technique a été effectuée en quatre étapes essentielles :

a). La préparation du gel :

Le gel d'agarose est obtenu en mettant 1g de la poudre d'agarose dans un volume de 100ml de tampon Tris –Acétate-EDTA (TAE) ou Tris-Borate-EDTA (TBE) dont le pH est égal à 8.0 ; puis en faisant bouillir le mélange dans un micro-onde jusqu'à l'obtention d'une solution limpide.

Pour ne pas abimer la plaque de l'électrophorèse, il faut tiédir le liquide avant de le couler sur cette plaque dont les peignes sont déjà placés pour créer les puits.

La formation du gel se fait en laissant refroidir le mélange pendant 30mn à une température ambiante.

b). La préparation des échantillons :

Après avoir vortexer les tubes qui contiennent l'ADN ; on dépose 5µl de ceci avec 7µl du GelRed qui est un agent révélateur, dont la structure est très proche du Bromure d'Ethidium mais moins toxique.

Pour pouvoir surveiller le processus de migration ; le GelRed a été combiné avec un mélange de trois constituants :

-Le bleu de bromophénol qui révèle les fragments d'ADN de 500pb.

-Le xylène cyanole détectant les fragments de 4000pb.

-Et l'orange G pour les fragments de 50pb.

Il faut tapoter les tubes pour homogénéiser le mixte.

Remarque :

Le **GelRed** et les trois constituants ; forment un tampon de charge qui a pour objectif :

D'augmenter la densité de l'échantillon en faisant en sorte que les gouttes d'ADN tombent de façon harmonieuse dans le puits ; comme il ajoute la couleur à l'échantillon, qui permet de surveiller le bon déroulement de la migration (**Somma et al., 2007**).

c). Chargement des puits :

Après la polymérisation du gel, on retire les peignes, et on ajoute le même tampon qui a été utilisé pour la préparation du gel (TAE) ou (TBE).

Avec une micropipette on dépose dans chaque puits 10µl des échantillons préparés l'un après l'autre.

Ensuite on met en marche le générateur de courant et le régler (le voltage : 80V pendant environ deux heures).

On observe une migration au bout de 15 mn environ grâce aux colorants ajoutés.

d). Révélation des bandes d'ADN (analyse de gel) :

A la fin de la migration, on enlève le gel à partir de la plaque, après avoir coupé le courant, le mettre dans la chambre à UV (diaphanoscope) afin de visualiser les bandes d'ADN.

Cet instrument étant relié à un ordinateur permet l'enregistrement et d'édition les résultats obtenus.

Résultats

1. Résultats des échantillons extraits par le kit Promega.

1.1. Densité optique :

Les valeurs des concentrations ainsi que les ratios (A260/280 et A260/230) obtenues par le spectrophotomètre après avoir dosé les DOs des échantillons à trois longueurs d'ondes ; sont regroupés dans les tableaux. (Voir l'annexe).

Le tableau suivant résume les moyennes et les écarts types de la concentration et des deux ratios :

Tableau 5 : résultats du dosage de la DO pour les échantillons extraits par le kit Wizard® :

	La moyenne	L'écart type
La concentration	504.28	211.45
µg /ml		
A260/280	1.66	0.26
A260/230	1.3	0.34

Pour 3 ml du sang total utilisé pour effectuer l'extraction d'ADN par le kit Wizard® ; la moyenne de la concentration d'ADN est de 504.28µg /ml ou encore 50.85µg pour 300µl ; ce qui dépasse largement la valeur donnée par le fabricant (5-15µg pour 300µl d'échantillon) ; on remarque aussi les écarts important (211.45) qui se trouvent entre les échantillons.

75 sur 201 échantillons présentent un ratio A260/280 supérieur à 1.8 ; donc on peut conclure que plus de 60% des échantillons extraits par cette méthodes présentent des traces de protéines ;La contamination par les protéines est relativement faible et elle est probablement due à la manipulation ; car les valeurs du ratio varient entre 1.66 et 1.79 pour les échantillons contaminés. **(Figure 16)**

Parallèlement on trouve plus de 80% des échantillons présentent un ratio A260/230 inférieur à 1.8 ce qui révèle leur contamination par des ARNs. **(Figure 17)**

L'utilisation des RNase au cours de l'extraction était peut être nécessaire pour éviter la contamination.

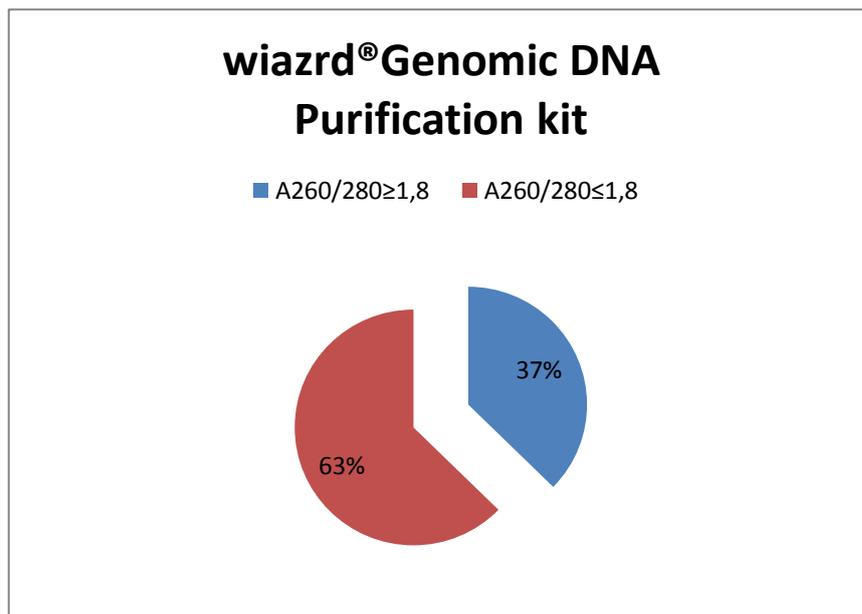


Figure 16 : Résultat du ratio 260/280.

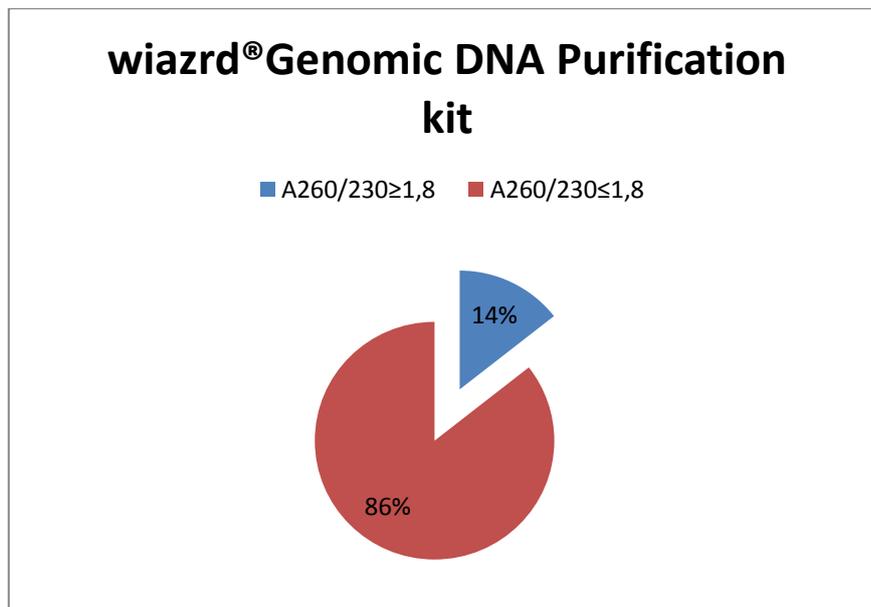


Figure 17 : Résultats du ratio 260/230.

1.2. Migration sur gel d'agarose :

Les contrôles réalisés par l'électrophorèse sur gel d'agarose ont permis d'apprécier la qualité des échantillons, sans préciser la quantité. Lorsqu'on n'utilise pas un marqueur de taille (sauf au cours de la migration grâce aux agents révélateurs ajoutés aux échantillons le Gel Red dans notre cas).

L'efficacité de l'extraction par ce kit (**Wizard®**) est de **86.07%** ; car la migration révèle l'absence de l'ADN dans certains échantillons (ou peut être du au erreurs lors de chargement des puits).

Les échantillons extraits par ce kit donnent une bonne concentration d'ADN par DO, cependant la migration révèle que la majorité des ADN sont dégradés.

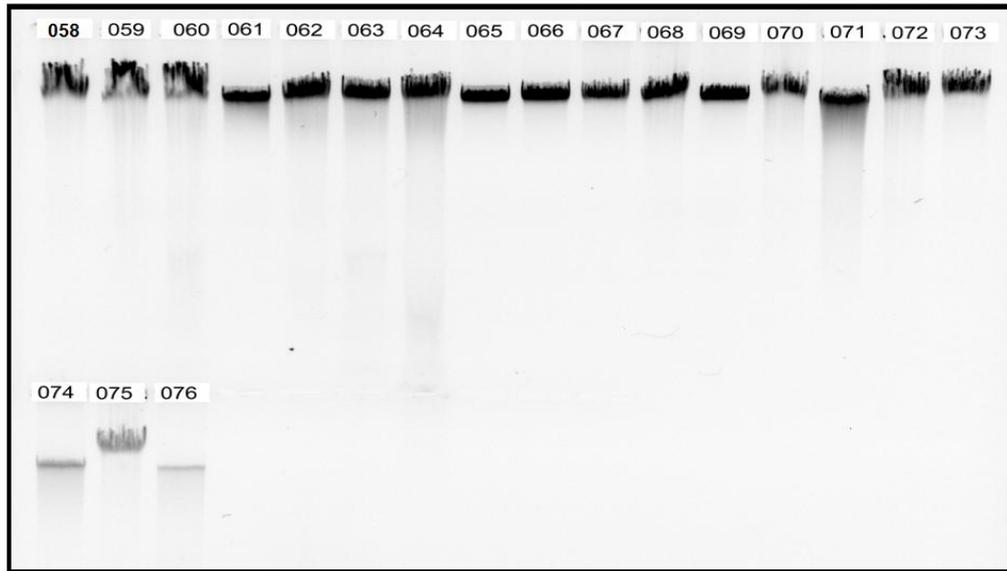


Figure 18 : la photographie du gel d'électrophorèse des échantillons extrait par le kit wizard®.

2. Résultats pour les échantillons extraits par l'automate Maxwell® 16

Mdx :

2.1. Densité optique :

Tableau 6: Résultats du dosage de la DO pour les échantillons extraits par l'Automate Maxwell®16 :

	La Moyenne	L'écart type
La concentration µg/ml	228.87	102.45
A260/280	1.39	0.25
A260/230	0.96	0.33

Pour les mêmes échantillons ; la moyenne des concentrations par la méthode automatique baisse à **228.87 $\mu\text{g/ml}$** ou encore **91.547 μg** pour **400 μl** du sang total initial, et ce qui dépasse la valeur donnée par le fabricant **5-15 μg** pour **400 μl** .

La pureté, appréciée en effectuant le rapport DO260/280nm, révèle que plus de **80%** des échantillons contiennent des traces de protéines ; alors que le rapport DO260/230nm indique que seulement **3%** des échantillons sont dépourvus des ARNs copurifiés.

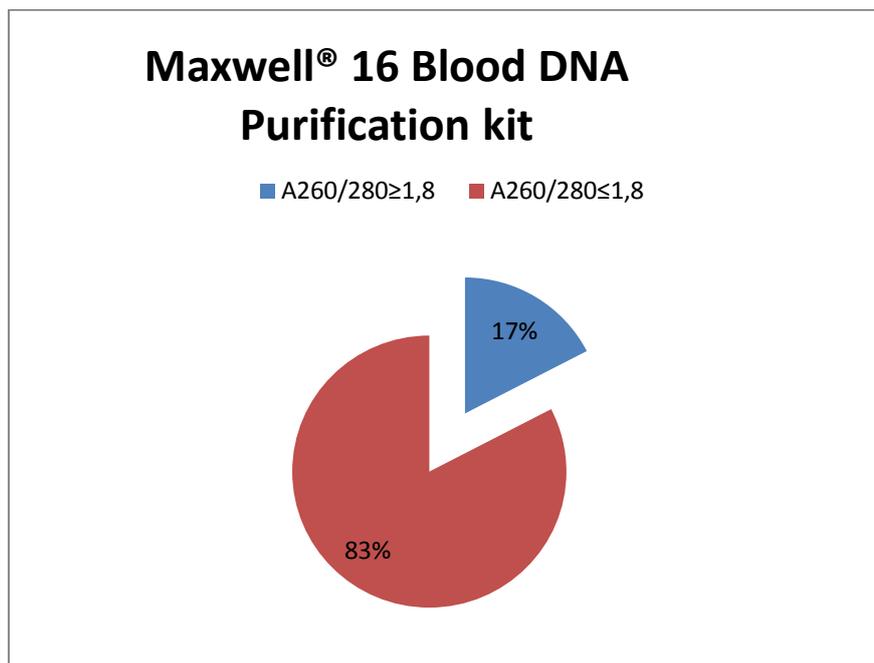


Figure 19 : Résultat du ratio 260/280 (automate maxwell).

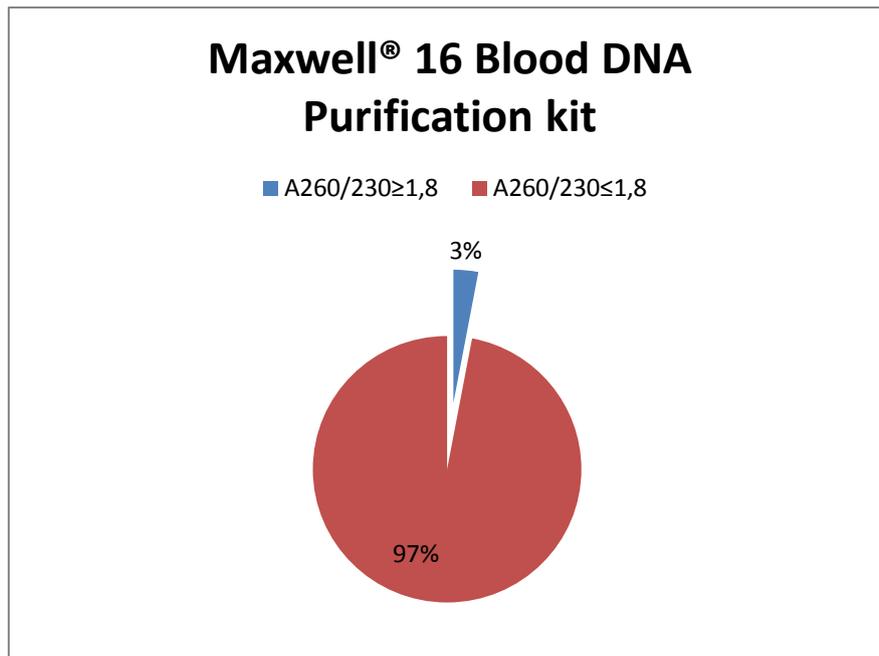


Figure 20 : Résultats du ratio 260/230(automate maxwell).

2.2. Migration sur gel d'agarose :

Sur un plan qualitatif, et d'après les résultats de la migration des échantillons extraits avec la méthode automatique, on remarque que l'extraction a été réalisée avec succès pour la quasi-totalité des ADNs ; avec une efficacité de 90%.

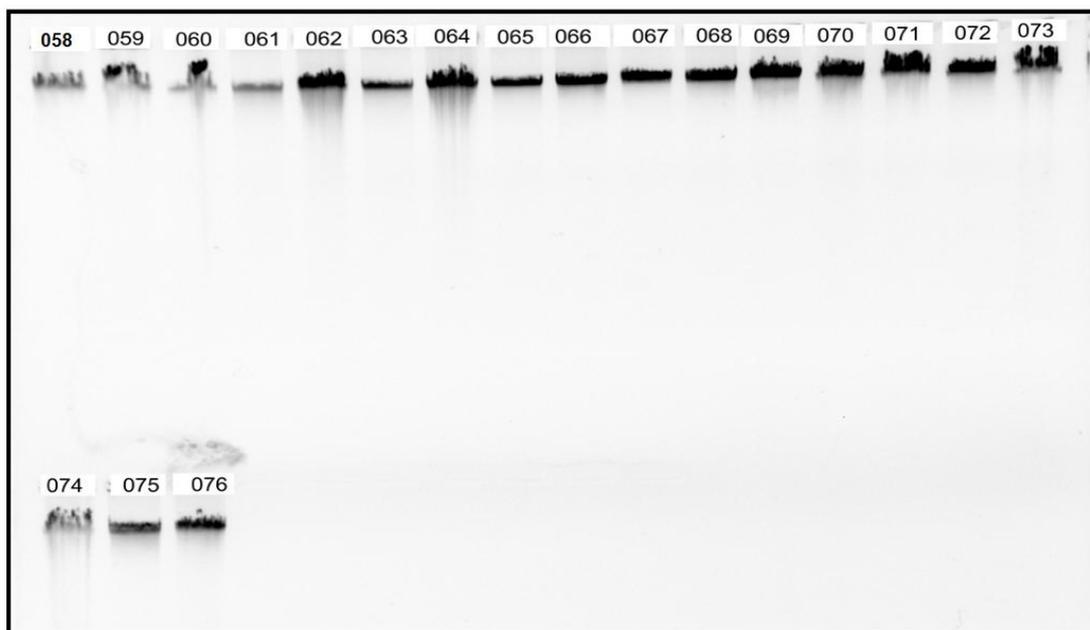


Figure 21 : la photographie du gel d'électrophorèse des échantillons extraits par l'automate (Maxwell®16).

3. Comparaison entre les deux méthodes d'extraction :

Pour comparer si les résultats obtenus par les deux techniques d'extraction présentent une différence significative ; on a effectué un test T de STUDENT ; puis qu'il s'agit des données paramétriques pour deux échantillons appariés ; voici un tableau qui démontre les résultats obtenus :

Tableau 6 : Résultats de l'analyse statistique test t de Student :

	Valeurs
l'effectif	201
ddl-1	200
A	0,05
la moyenne des concentrations	wizard 504,2802
	maxwell 228,8675
L'écartype	wizard 211,4506
	maxwell 102,4509
la moyenne des ratios 260/280	wizard 1,6604
	maxwell 1,3924
L'écartype des ratios 260/280	wizard 0,2625
	maxwell 0,2459
la moyenne des ratios 260/230	wizard 1,3045
	maxwell 0,9578
L'écartype des ratios 260/230	wizard 0,3393
	maxwell 0,3331
t (théorique)	1.963
t (observé pour la concentration)	1,926
t (observé pour le ratio 260/280)	1,1089
t (observé pour le ratio 260/230)	3,5667

D'après ces résultats, on peut déduire que, à un risque d'erreur alpha de 5% et à un ddl de 200 qu'il n'y a pas une différence statistiquement significative entre les concentrations des ADNs extraits par les deux techniques ; et on peut tirer la même déduction concernant les rapports de DO 260/280nm ; par contre pour les ratios de

DO260/230nm on remarque qu'il y a un écart significatif entre la distribution des valeurs pour les deux méthodes d'extraction.

Pour qu'on puisse dire qu'il y a une différence significative entre les concentrations des échantillons d'ADN extraits par ces deux méthodes il faut que la valeur de α soit égale ou supérieure de **0.1**, et entre les rapports de DO 260/280nm, α doit prendre une valeur égale ou supérieure de **0.3**.

Comparaison entre les échantillons frais et les échantillons stockés :

Pour confirmer qu'il n'y a pas une différence entre les concentrations ainsi que les rapports de pureté des échantillons congelés et les échantillons fraîchement traités, la réalisation d'un teste T de Student était nécessaire, et le tableau suivant résume les résultats obtenus :

Tableau7 : Résultats du test T de Student pour la comparaison des échantillons stockes et les échantillons fraîchement manipulés :

	Extraction wizard®		Extraction Maxwell®16	
	Echantillons congelés 70%	Echantillons frais 30%	Echantillons congelés 70%	Echantillons frais 30%
La moyenne de concentration	532.93	456.74	250.57	190.03
L'écartype de la concentration	329.37	211.031	89.63	112.58
La moyenne de A260/280nm	1.66	1.64	1.44	1.41
L'écartype A260/280nm	0.26	0.27	0.21	0.29
La moyenne de A260/230nm	1.25	0.38	0.9	1.01
L'écartype A260/230nm	0.34	0.33	0.33	0.33
t(théorique)	1.963		1.963	
t (observé) pour	0.014		0.0001	

la concentration		
t (observé) pour	0.46	0.58
A260/280nm		
t (observé) pour	0.01	0.029
A260/230nm		

Pour un ddl de $(201-2)=199$ et un risque d'erreur de $\alpha=5\%$ on remarque que les valeurs de t (observé) pour les échantillons congelés et les échantillons frais ainsi que pour les deux méthodes d'extraction ;qu'ils sont largement inférieures a la valeur de t (théorique) , ce qui permet de déduire qu'il n' y a pas une différence statistiquement significative entre les deux type des échantillons en terme de concentration ,mais aussi concernant la pureté de ces échantillons.

Pour la cohorte totale :

Tableau8 : Comparaison des deux méthodes d'extraction et de purification de l'ADN génomique à partir de sang total :

La méthode	Concentration $\mu\text{g/ml}$	Rapport DO260/280nm	Rapport DO260/230nm	L'efficacité de l'extraction
Kit Wizard®	504.28	1.66	1.3	86.07%
Automate Maxwell®16	228.87	1.39	0.96	90%

Tableau9 : Comparaison des différents procédés d'extraction d'ADN extrait par les deux techniques :

La méthode	La simplicité	La Rapidité	Praticabilité (toxicité et déchets..)
Kit Wizard®	complexe	lente	+++
Automate Maxwell®16	simple	rapide	+

Ces deux tableaux récapitulent les principales caractéristiques de chaque technique d'extraction de l'ADN génomique humain à partir du sang total ; sans prendre en considération la maîtrise de ces techniques et les erreurs éventuelles au cours des manipulations.

La diversité des kits d'extraction et de purification des acides nucléiques, que ça soit manuelle ou combinée avec des automates d'extraction fourni par la société Promega, et grâce aux avantages qu'ils présentent, en terme de temps, de simplicité et de sécurité ; a poussé les biologistes de réaliser des extraction à partir des différentes sources y compris le sang total.

Après l'exploitation de nos résultats qui concernent les deux méthodes d'extraction ; avec une efficacité d'extraction de 90% pour la technique automatique et une concentration de 91.547 μ g pour 400 μ l du sang ; et avec une efficacité de 86.07% pour la méthode manuelle et une concentration de 50.85 μ g pour 300 μ l.

En 2015, Mondor a réalisé l'extraction d'ADN génomique humain à partir des couches leuco plaquettaires, des tissus, urine et du sang total en utilisant l'automate Maxwell®16, il a montré que pour un volume du sang total de 400 μ l ; la concentration de l'ADN était supérieur à 50ng/ μ l, et des rapport de DO 260/280 nm supérieurs à 1.7.(Mondor, 2015)

En 2016, Le Fresne et ses collaborateurs ; ont utilisé l'automate pour l'extraction de l'ADN génomique humain, en comparant cette technique avec la méthode de phénol chloroforme ; ils ont montré que l'automatisation de l'extraction était réalisée avec succès en terme de temps et de simplicité, et avec 90% d'efficacité d'extraction. (Le Fresne et al, 2016)

Par contre, pour la méthode manuelle utilisant le kit Wizard® était la méthode adaptée par les scientifiques, beaucoup plus pour l'extraction d'ADN du tissu humain pour les diagnostics médicaux notamment le cas des cancers.

En 2010, Jebah, a utilisé le kit Wizard® pour l'extraction de l'ADN génomique de lapin de chair où elle a montré que la technique génère un ADN relativement pur, avec une efficacité d'extraction de 80%, et une concentration de 8.5 μ g pour un volume de 300 μ l du sang total.(Jebah, 2010)

L'analyse de l'ADN par spectrophotométrie classique s'est avérée être un outil très performant pour le contrôle qualitatif et quantitatif des acides nucléiques ; mais des alternatives existent, telles que le NanoDrop pour l'analyse des micro-volumes des biomolécules en l'occurrence l'ADN et avec une sensibilité remarquable facilitant ainsi la manipulation des acides nucléiques.

Nous avons choisi la technique d'électrophorèse pour le contrôle de la concentration et de la pureté des échantillons extraits par les deux méthodes et pour vérifier les résultats obtenus par l'analyse spectrophotométrique, l'utilisation d'un marqueur de taille aurait sans doute donné une précision sur la qualité ou la pureté des échantillons ; cependant les résultats obtenus montrent que les échantillons extraits par le kit Wizard16® présentent un ADN dégradé ou bien la quantité prise pour la manipulation d'électrophorèse était élevée, ce qui nécessite une dilution des échantillons pour avoir des résultats meilleurs.

L'étude comparative entre les résultats obtenus pour les échantillons frais et ceux obtenus pour les échantillons congelés montrent qu'il n'y a pas de différence entre les deux types d'échantillons en termes de pureté ou bien de concentration, ce qui confirme que la conservation des acides nucléiques (notamment la congélation) dans les conditions optimales joue un rôle indispensable lors des manipulations des biomolécules.

Conclusion

Depuis les années 2000, et grâce à l'effort conduits par les industriels ; les kits d'extraction des acides nucléiques prêts à l'emploi ainsi que les extracteurs automatiques sont devenus des incontournables dans un laboratoire de Biologie Moléculaire, et leur marche est toujours en pleine évolution.

Les résultats obtenus à partir de cette étude nous permettent de déduire que, le choix de la technique utilisée pour l'extraction d'ADN génomique dépend de plusieurs facteurs ; autres que la performance de la technique en elle-même, y compris le temps ; le volume initial de sang disponible, le coût et bien évidemment la maîtrise et la technicité de l'expérimentateur.

Toutefois, il est important de remarquer que peut être une utilisation de la solution de l'ARase au cours de l'extraction avec le kit Wizard®, pourrait donner des résultats meilleurs en terme de pureté de l'ADN.

Les deux méthodes décrites précédemment permettent une extraction des quantités d'ADN suffisantes pour les amplifications.

Statistiquement, il n'y a pas de différence significative entre les concentrations des deux méthodes, ni pour le rapport de pureté 260/280nm ; mais de manière pratique, pour les grands échantillons, l'usage de l'automate Maxwell®16 permettrait un gain notable de temps.

Cependant, une étude plus approfondie est proposée comme perspective, en effet, une comparaison entre les résultats obtenus par les deux méthodes d'extraction, en tenant compte de l'âge, du sexe et surtout de la pathologie des patients, car ces critères ont un impact sur la qualité ou bien la quantité des acides nucléiques, surtout lorsqu'il s'agit d'une extraction d'ADN génomique à partir du sang total.

Références Bibliographiques

- 1) Anandika, D.,(2013). DNA extraction and purification,Rutgers University, New Jersey.United State.ISSN :2392-5139.
- 2) Amrani,F., (2016) . Génétique moléculaire.L3BPA.
- 3) Bakhamis ,N .,(2010). The Analysis of DNA or RNA using Its Wavelengths: 230 nm, 260 nm, 280 nm.Laboratory one : general introduction to the nucleic acid. Msc prenatal genetics and fetal medicine.
- 4) Ben Ayed, L., Hassen, A., Gtari, M., Jedidi, N., Saidi, N., Jaoua, L., Murano.,F .,(2006). Evaluation de l'efficacité de trois méthodes d'extraction d'ADN de la biomasse microbienne totale du compost. Institut national de la recherche scientifique et technique. BP 95-2050, Hammam Lif,Tunisie.
- 5) Benslama,A., (2016). Les techniques de base de la biologie moléculaire.document de cours.
- 6) Boumendjel Messarah,A. ,(2011). Techniques générales de biologie moléculaire.cours.
- 7) Brown,T.A., (2010) .Gene cloning and DNA analysis, Sixth Edition. Wiley-Blackwell publication. p25-45.
- 8) Clark, W., Christopher, K., (2000). An introduction to DNA: Spectrophotometry, degradation, and the "Frankengel" experiment. Pages 81-99.
- 9) Clark,P.,(2006). Molecular Biology; Elsevier. p21-35.
- 10) Ganske,F.,2014.UV absorance DNA quantitation.BMG.labtech.
- 11) Gautheret ,D .,(2012). Biologie Moléculaire L2 (BIOL201).Faculté des sciences d'ORSAY.
- 12) Gillet,S .,D,Sc.,(2008). Note de laboratoire de chimie analytique : la chromathographie et l'electrophorese.p164-213.
- 13) Ginot,F. ,(1995). L'instrumentation automatique en biologie moléculaire .medecine /science ; 11 :455-64.
- 14) Giovannangeli,C.,(2008).Cibler l'ADN pour la comprehension du vivant.la chimie et la santé ;p41-57.
- 15) Glasel, J.A., (1995) Validity of Nucleic Acid Purities Monitored by A260/A280 Absorbance Ratios, Biotechniques 18:62-63.

Références Bibliographiques

- 16) Hitzler , JS., (2008). Canadian Tumour Repository Network. Procédures d'assurance qualité. Evaluation de la qualité des acides nucléiques.
- 17) Housset ,C . ; Raisonnier,A.,(2009). Biologie Moléculaire. Faculté de médecine Pierre et Marie Curie.
- 18) Irisson.J-O .,(2010). La première partie de l'AND à l'individu, cours de biologie.
- 19) Jebah Nouairia, G. ;(2010). Comparaison de méthodes d'extraction de l'ADN de lapin à partir du sang : Fiabilité et Coût. Mémoire. Institution de la recherche et de l'éducation supérieure agricole (IRESA).Tunisie .
- 20) Kalender,R., (2014). DNA isolation,Institute of Biotechnology.University of HELSINKI.
- 21) Kelly, A., Boesenberg.S.,PSM.,(2012). Assessment of DNA yield and purity : an overlooked detail of PCR troubleshooting.Elsevier.
- 22) Kohle, C.,(2011). Les cellules sanguines .Université Médicales Virtuelle Francophone.
- 23) Le Feresne,S.,Abouaita,J.,Fablet ,C.,Cuoc,P-O.,Schagat,T.,Carton,T., (2016). Automated Nucleic acid extraction using the Maxwell®16 instrument. Sample Prep for Microbiota studies. Biofortis Marieux NutriSciences,44800 Saint-Herblain,France.
- 24) Lemonnier, C. , (2015).Comparaison de trois techniques d'extraction d'ADN appliquées à l'étude des microorganismes marins. Université de Bretagne Occidentale Microbiologie Fondamentale et Appliquée .Master 2 recherche. Compte-rendu de stage méthodologique.
- 25) Maaroufi, Y., Ahoriz, N., Husson., Crokaert, F.,(2004). Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered Candida species and its quantitation by using Real-Based Assay .Journal of clinical Microbiology.
- 26) Manuel technique de l'appareil Maxwell® 16 pour la médecine légale ., (2015).
- 27) Merel, P.,(2007). Automatisation et biologie moléculaire : de l'extraction des acides nucléiques a la PCR temps réel. Spectra Biologie.162 :p88-93.

Références Bibliographiques

- 28) Merle, M., (2015). Les constituants du sang. - IFAS/IFSI LAON.
- 29) Mondor, H., (2015). Extraction d'ADN. Plateforme de Ressources Biologiques.
- 30) Oliver, B., Zephaniah, D., Alessandra, S., Kakoli, G., Andrea, S., (2011). Introduction to molecular biology and genetic engineering. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- 31) Paul, G., (2016). Using A260/A280 Ratios to Assess Purity of Nucleic Acids. News-Medical.
- 32) Promega., (2017). Technical manual ; Wizard® Genomic DNA Purification Kit. instructions for use of products A1120, A1123, A1125 and A1620.
- 33) Promega., (2017). Technical manual; Maxwell®16DNA Purification Kits. instructions for use of products AS1010, AS1020, and AS1030.
- 34) Somma, M., (2007). Organisation Mondiale de la Santé. Bureau Régional de l'Europe. Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés. « Module 4 : Extraction et purification de l'ADN » : p3-9. [18/05/2010].
- 35) Somma, M., Querci, M., (2007). Organisation Mondiale de la Santé. Bureau Régional de l'Europe. Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés. « Module 5 : Electrophorèse sur gel d'agarose. ».
- 36) Simon, M., (2008). Caractéristiques des acides nucléiques. Cours de pharmacie
- 37) Steffen, A., LeNoc, Y., (2010). Interpréter un résultat d'héogramme ; société française de documentation et de recherche en médecine générale. JNMG. Pris.
- 38) Swynghedauw, B. Silvestre, J-S., (2008). Aide-mémoire, Biologie et génétique moléculaire, 3e édition. Dunod, Paris.

Références Bibliographiques

- 39) Trigodet,F.,(2015). Analyse comparative de trois techniques d'extraction d'ADN à partir de biofilms d'aciers inoxydable. Rapport de Méthodologie Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E) Institut de la Corrosion. Bretagne occidentale.
- 40) Tinoco, K .,Sauer, J., Wang ,C.,(1995). Physical Chemistry: Principles Applications in Biological Sciences, 3è éd.
- 41) Vrielynck,N.,(2007).Chromatographie:synopsis de ses bases.
- 42) Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. & Losick, R., (2014). Molecular biology of the gene; 7th edition. Amsterdam, Addison-Wesley Longman.p77-107.
- 43) Yatawara.L.,(2016). DNAextraction methodes, Departement of MLS ,FAHS.

Annexes

Annexes

Annexe1 :

Le consentement éclairé du patient :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Attestation de consentement éclairé

Je, soussigné (e)

déclare, après les explications qui m'ont été fournies par le

Docteur

Travaillant dans le service

CHU, Hôpital

Consentir pleinement à participer aux recherches biologiques et génétiques qui seront éventuellement effectuées sur un échantillon de mon sang

Ces recherches génétiques ne seront menées que dans un but scientifique après accord du Dr/Pr.ou bien d'une autre personne qu'il aura dument autorisée.

DATE

Signature

Annexes

Annexe2 : les Résultats du dosage des deux méthodes d'extraction d'ADN :

Annexes

		Kit Wizard Genomic DNA Purification	Kit Maxwell 16 blood DNA Purification
1	Concentration	447,23	61,67
	R 260/280	1,84	1,31
	R 260/230	1,9	1,07
2	Concentration	417,8	55,26
	R 260/280	1,77	1,27
	R 260/230	1,66	1,77
3	Concentration	66,37	69,83
	R 260/280	1,18	1,31
	R 260/230	0,63	2,12
4	Concentration	769,87	91,93
	R 260/280	1,89	1,38
	R 260/230	1,69	1,65
5	Concentration	540,9	96,23
	R 260/280	1,82	1,44
	R 260/230	1,77	1,86
6	Concentration	117,57	259
	R 260/280	1,27	1,17
	R 260/230	0,85	1,48
7	Concentration	458,58	62,1
	R 260/280	1,81	1,12
	R 260/230	1,55	1,23
8	Concentration	436,73	363,7
	R 260/280	1,62	1,12
	R 260/230	1,24	1,36
9	Concentration	303,8	62,87
	R 260/280	1,74	1,04
	R 260/230	1,39	1,55
10	Concentration	366,96	133,77
	R 260/280	1,76	1,41
	R 260/230	1,42	0,73
11	Concentration	203,85	70,1
	R 260/280	1,76	1,08

Annexes

	R 260/230	1,68	0,6
12	Concentration	796,93	71,9
	R 260/280	1,8	1,1
	R 260/230	1,6	0,5
13	Concentration	321,77	90,67
	R 260/280	0,98	1,19
	R 260/230	0,78	0,56
14	Concentration	312,12	184,5
	R 260/280	1,8	1,47
	R 260/230	1,58	0,78
15	Concentration	487,63	261,1
	R 260/280	1,65	1,12
	R 260/230	1,16	0,77
16	Concentration	349,7	105,73
	R 260/280	1,54	1,21
	R 260/230	1,06	0,59
17	Concentration	678,73	153,8
	R 260/280	1,75	1,29
	R 260/230	1,54	0,89
18	Concentration	840,83	134,57
	R 260/280	1,3	1,28
	R 260/230	1,13	0,82
19	Concentration	410,3	171,7
	R 260/280	1,66	1,4
	R 260/230	1,02	1,006
20	Concentration	760,4	483,1
	R 260/280	1,84	1,73
	R 260/230	1,25	1,25
21	Concentration	465,12	335,4
	R 260/280	1,54	1,34
	R 260/230	1,1	0,85
22	Concentration	622,66	249,13
	R 260/280	1,74	1,6

Annexes

	R 260/230	1,21	1,04
23	Concentration	637,8	618,33
	R 260/280	1,8	1,18
	R 260/230	1,2	0,98
24	Concentration	633,1	167,2
	R 260/280	1,78	1,58
	R 260/230	1,24	1,1
25	Concentration	463,2	239,93
	R 260/280	1,35	1,58
	R 260/230	0,94	1,09
26	Concentration	632,2	380,73
	R 260/280	1,8	1,32
	R 260/230	1,32	0,82
27	Concentration	432,2	232,1
	R 260/280	1,85	1,6
	R 260/230	1,56	1,13
28	Concentration	579,6	154,16
	R 260/280	1,79	3,12
	R 260/230	1,6	0,89
29	Concentration	767,6	103,2
	R 260/280	1,79	2,17
	R 260/230	1,44	0,6
30	Concentration	205,1	79
	R 260/280	1,9	1
	R 260/230	1,67	0,56
31	Concentration	518,6	58,16
	R 260/280	1,79	1,26
	R 260/230	1,31	1,08
32	Concentration	287,5	98,36
	R 260/280	1,61	1,51
	R 260/230	1,12	1,22
33	Concentration	518,03	83,4
	R 260/280	1,72	1,5

Annexes

	R 260/230	1,44	1,42
34	Concentration	821,5	144,5
	R 260/280	1,86	1,66
	R 260/230	1,5	1,15
35	Concentration	342,1	184,16
	R 260/280	1,68	1,55
	R 260/230	1,09	1,23
36	Concentration	531,2	519,9
	R 260/280	1,75	1,21
	R 260/230	1,33	0,72
37	Concentration	619,2	194,5
	R 260/280	1,8	1,41
	R 260/230	1,35	0,95
38	Concentration	341,03	123,6
	R 260/280	1,74	1,6
	R 260/230	1,48	1
39	Concentration	600,3	307,3
	R 260/280	1,17	1,31
	R 260/230	1,08	0,93
40	Concentration	436,89	116
	R 260/280	1,23	1,85
	R 260/230	1,24	0,69
41	Concentration	119,8	90,6
	R 260/280	0,9	1,25
	R 260/230	0,76	1
42	Concentration	827,37	186,3
	R 260/280	1,88	1,59
	R 260/230	1,75	1,15
43	Concentration	632,2	201,9
	R 260/280	1,97	1,2
	R 260/230	2,03	0,98
44	Concentration	361,2	103,03
	R 260/280	1,93	1,47

Annexes

	R 260/230	2,1	1,14
45	Concentration	261,13	86,67
	R 260/280	1,13	1,25
	R 260/230	1,28	1,1
46	Concentration	300,6	187,23
	R 260/280	1,94	1,53
	R 260/230	2,01	1,05
47	Concentration	456,3	258,68
	R 260/280	1,16	1,02
	R 260/230	1,04	0,97
48	Concentration	410,26	291,1
	R 260/280	1,02	0,88
	R 260/230	0,92	0,94
49	Concentration	809,8	283,3
	R 260/280	1,9	1,65
	R 260/230	1,73	0,48
50	Concentration	847,97	160,97
	R 260/280	1,83	1,42
	R 260/230	1,42	0,85
51	Concentration	499,8	215,1
	R 260/280	1,71	1,57
	R 260/230	1,51	0,94
52	Concentration	419,7	220,43
	R 260/280	1,47	1,55
	R 260/230	1,29	0,86
53	Concentration	412,63	154,97
	R 260/280	1,84	1,28
	R 260/230	1,54	0,71
54	Concentration	758,17	210,03
	R 260/280	1,78	1,47
	R 260/230	1,55	0,79
55	Concentration	369,1	139,2
	R 260/280	1,11	1,29

Annexes

	R 260/230	0,99	0,67
56	Concentration	389,87	202,77
	R 260/280	1,75	1,27
	R 260/230	1,34	0,74
57	Concentration	686,9	385,67
	R 260/280	1,1	1,62
	R 260/230	0,81	0,85
58	Concentration	732,7	196,4
	R 260/280	1,94	1,66
	R 260/230	1,69	3,88
59	Concentration	798,9	341,2
	R 260/280	1,95	1,79
	R 260/230	1,86	1,21
60	Concentration	869,1	421,7
	R 260/280	1,98	1,79
	R 260/230	1,9	1,12
61	Concentration	520,5	151
	R 260/280	1,94	1,77
	R 260/230	1,73	0,76
62	Concentration	417,7	272,9
	R 260/280	1,89	1,82
	R 260/230	1,33	1,26
63	Concentration	900,3	136,9
	R 260/280	1,8	1,59
	R 260/230	1,29	1,15
64	Concentration	609,7	303,6
	R 260/280	2,91	1,78
	R 260/230	1,69	1,04
65	Concentration	702,01	150,8
	R 260/280	1,86	1,55
	R 260/230	1,54	0,87
66	Concentration	800,4	238,8
	R 260/280	1,84	1,55

Annexes

	R 260/230	1,57	1,02
67	Concentration	462,6	183,6
	R 260/280	1,79	1,67
	R 260/230	1,26	0,98
68	Concentration	702,8	241,3
	R 260/280	1,25	1,52
	R 260/230	1,18	0,96
69	Concentration	766,9	328,3
	R 260/280	1,12	1,79
	R 260/230	1,04	0,97
70	Concentration	705,06	185,04
	R 260/280	1,52	1,61
	R 260/230	1,13	1,56
71	Concentration	810,03	244,4
	R 260/280	1,26	1,63
	R 260/230	1,23	1,33
72	Concentration	813,73	128,4
	R 260/280	1,87	1,57
	R 260/230	1,48	1,28
73	Concentration	499,36	275,8
	R 260/280	1,71	1,66
	R 260/230	1,25	1,24
74	Concentration	349,7	393,5
	R 260/280	1,59	1,78
	R 260/230	0,85	1,2
75	Concentration	399,56	146,6
	R 260/280	1,81	1,55
	R 260/230	1,47	0,99
76	Concentration	150,06	148,7
	R 260/280	1,49	1,57
	R 260/230	0,74	1,27
77	Concentration	575,47	486
	R 260/280	1,94	1,123

Annexes

	R 260/230	1,69	1,02
78	Concentration	285,83	102,5
	R 260/280	1,91	0,99
	R 260/230	1,42	1,05
79	Concentration	400,93	239,1
	R 260/280	1,05	1,05
	R 260/230	1,06	1,02
80	Concentration	915,37	503,8
	R 260/280	1,94	1,93
	R 260/230	1,54	1,44
81	Concentration	422,23	269,17
	R 260/280	1,93	1,07
	R 260/230	1,58	1
82	Concentration	260,03	190,8
	R 260/280	1,75	1,42
	R 260/230	1,01	0,91
83	Concentration	844,87	665
	R 260/280	1,95	1,033
	R 260/230	1,76	0,95
84	Concentration	492,4	195,8
	R 260/280	1,04	0,98
	R 260/230	0,91	1,14
85	Concentration	485,96	196,8
	R 260/280	1,77	1,103
	R 260/230	1,36	0,98
86	Concentration	599,77	292,3
	R 260/280	1,92	1,72
	R 260/230	1,66	1,14
87	Concentration	212,6	440,63
	R 260/280	1,74	1,81
	R 260/230	0,85	1,17
88	Concentration	697,8	305,9
	R 260/280	1,33	1,72

Annexes

	R 260/230	0,9	0,98
89	Concentration	126,06	99,2
	R 260/280	1,58	1,04
	R 260/230	0,71	1,13
90	Concentration	799,39	336,67
	R 260/280	1,97	1,74
	R 260/230	1,92	0,93
91	Concentration	335,1	155
	R 260/280	1,94	1,53
	R 260/230	1,79	1,88
92	Concentration	404,5	179,8
	R 260/280	1,94	1,52
	R 260/230	1,78	0,98
93	Concentration	612,13	285,43
	R 260/280	1,78	1,68
	R 260/230	1,36	1,18
94	Concentration	599,6	192,4
	R 260/280	1,66	1,49
	R 260/230	1,26	0,94
95	Concentration	715,1	302,5
	R 260/280	1,85	1,55
	R 260/230	1,58	1,04
96	Concentration	365,4	260,24
	R 260/280	1,64	1,55
	R 260/230	1,25	1,02
97	Concentration	891,7	377,63
	R 260/280	1,89	1,39
	R 260/230	1,5	0,91
98	Concentration	523,9	237,66
	R 260/280	1,74	1,49
	R 260/230	1,18	0,94
99	Concentration	154,9	333,03
	R 260/280	1,55	1,23

Annexes

	R 260/230	0,87	0,6
100	Concentration	287,3	176,5
	R 260/280	1,72	1,27
	R 260/230	1,38	0,92
101	Concentration	265,4	131,4
	R 260/280	1,15	1,37
	R 260/230	1,94	0,9
102	Concentration	363,4	137,5
	R 260/280	1,04	1,38
	R 260/230	1,11	0,89
103	Concentration	242,7	55,1
	R 260/280	1,69	1,45
	R 260/230	1,59	1,14
104	Concentration	73,1	41,6
	R 260/280	1,29	1,32
	R 260/230	0,94	1,1
105	Concentration	118,3	143,1
	R 260/280	1,53	1,41
	R 260/230	1,39	0,9
106	Concentration	316	161,9
	R 260/280	1,63	1,47
	R 260/230	1,73	0,9
107	Concentration	219,2	156
	R 260/280	1,62	1,43
	R 260/230	1,63	0,91
108	Concentration	285,6	158,5
	R 260/280	1,67	1,78
	R 260/230	1,6	0,86
109	Concentration	396,4	173,7
	R 260/280	1,4	1,41
	R 260/230	1,14	0,88
110	Concentration	116,5	248,1
	R 260/280	1,3	1,18

Annexes

	R 260/230	0,78	0,66
111	Concentration	587,2	219,2
	R 260/280	1,62	1,44
	R 260/230	1,59	0,92
112	Concentration	321,7	190,4
	R 260/280	1,66	1,41
	R 260/230	1,42	0,86
113	Concentration	360,3	195,8
	R 260/280	1,48	1,4
	R 260/230	1,1	0,85
114	Concentration	549,166	152,8
	R 260/280	2,02	1,6
	R 260/230	1,65	0,86
115	Concentration	714,93	180,03
	R 260/280	2	1,64
	R 260/230	1,9	1,006
116	Concentration	561,22	182
	R 260/280	2,003	1,58
	R 260/230	1,94	0,92
117	Concentration	685,5	202,63
	R 260/280	1,99	1,66
	R 260/230	1,79	1,02
118	Concentration	696,65	248,2
	R 260/280	1,98	1,63
	R 260/230	1,89	1,04
119	Concentration	703,3	233,13
	R 260/280	1,98	1,61
	R 260/230	1,8	0,91
120	Concentration	639,99	217,7
	R 260/280	1,99	1,1
	R 260/230	1,78	1,123
121	Concentration	678,43	180,56
	R 260/280	1,89	1,85

Annexes

	R 260/230	1,69	1,53
122	Concentration	390,5	168,36
	R 260/280	1,78	1,82
	R 260/230	1,1	1,17
123	Concentration	391,23	204,43
	R 260/280	1,77	1,89
	R 260/230	1,04	1,26
124	Concentration	613,3	321,1
	R 260/280	1,93	1,55
	R 260/230	1,57	0,94
125	Concentration	830,7	293,26
	R 260/280	1,7	1,62
	R 260/230	1,25	1,08
126	Concentration	283,73	264,66
	R 260/280	1,68	1,72
	R 260/230	1,01	1,08
127	Concentration	506,06	190,03
	R 260/280	1,92	1,6
	R 260/230	1,57	0,94
128	Concentration	610,01	231,73
	R 260/280	1,97	1,61
	R 260/230	1,76	1
129	Concentration	304,93	292,76
	R 260/280	1,8	1,44
	R 260/230	1,05	0,91
130	Concentration	637,33	217,5
	R 260/280	1,89	1,62
	R 260/230	1,49	0,95
131	Concentration	739,9	245,46
	R 260/280	1,93	1,61
	R 260/230	1,833	0,97
132	Concentration	479,13	315,6
	R 260/280	1,84	1,72

Annexes

	R 260/230	1,24	0,93
133	Concentration	774,93	254,5
	R 260/280	1,89	1,65
	R 260/230	1,69	0,92
134	Concentration	267,4	195,8
	R 260/280	1,62	1,4
	R 260/230	1,25	0,73

Annexes

135	Concentration	371	188,8
	R 260/280	1,79	1,33
	R 260/230	1,2	0,62
136	Concentration	491,2	204,3
	R 260/280	1,76	1,39
	R 260/230	1,3	0,65
137	Concentration	307,2	195,3
	R 260/280	1,87	1,37
	R 260/230	1,45	0,61
138	Concentration	259,9	212,4
	R 260/280	1,82	1,38
	R 260/230	1,24	0,63
139	Concentration	591,2	200,3
	R 260/280	1,77	1,38
	R 260/230	1,63	0,61
140	Concentration	516,6	241,5
	R 260/280	1,83	1,45
	R 260/230	1,45	0,69
141	Concentration	350,5	199,7
	R 260/280	1,5	1,38
	R 260/230	1,23	0,68
142	Concentration	666,7	196,7
	R 260/280	1,86	1,37
	R 260/230	1,39	0,6
143	Concentration	388,3	268,2
	R 260/280	1,58	1,25
	R 260/230	1,24	0,66
144	Concentration	104	247,6
	R 260/280	1,28	1,42
	R 260/230	0,72	0,66
145	Concentration	417,1	267,5
	R 260/280	1,72	1,47
	R 260/230	1,32	0,7

Annexes

146	Concentration	425,8	259,6
	R 260/280	1,68	1,37
	R 260/230	1,17	0,65
147	Concentration	441,5	253,5
	R 260/280	1,4	1,37
	R 260/230	1,02	0,63
148	Concentration	377,4	268
	R 260/280	1,68	1,38
	R 260/230	1,19	0,65
149	Concentration	288,9	252,2
	R 260/280	1,54	1,35
	R 260/230	0,94	0,62
150	Concentration	472,9	288,7
	R 260/280	1,68	1,36
	R 260/230	1,23	0,63
151	Concentration	343,5	298,7
	R 260/280	1,42	1,36
	R 260/230	0,96	0,65
152	Concentration	286,1	281,3
	R 260/280	1,47	1,32
	R 260/230	0,86	0,61
153	Concentration	365,6	310,6
	R 260/280	1,47	1,38
	R 260/230	0,95	0,67
154	Concentration	473,6	285,5
	R 260/280	1,68	1,34
	R 260/230	1,13	0,61
155	Concentration	300,4	79
	R 260/280	1,37	1,55
	R 260/230	0,83	0,83
156	Concentration	467,2	73,5
	R 260/280	1,53	1,41
	R 260/230	0,94	0,69

Annexes

157	Concentration	306,3	115,2
	R 260/280	1,29	1,45
	R 260/230	0,7	0,83
158	Concentration	458,6	130,6
	R 260/280	1,49	1,37
	R 260/230	0,91	0,81
159	Concentration	512,02	160,4
	R 260/280	1,77	1,41
	R 260/230	1,47	0,81
160	Concentration	971,7	233,2
	R 260/280	1,72	1,39
	R 260/230	1,39	0,88
161	Concentration	484,8	156,1
	R 260/280	1,49	1,36
	R 260/230	0,95	0,75
162	Concentration	696,5	179
	R 260/280	1,6	1,43
	R 260/230	1,16	0,8
163	Concentration	458,3	179,9
	R 260/280	1,49	1,4
	R 260/230	0,92	0,81
164	Concentration	607,7	186,1
	R 260/280	1,56	1,38
	R 260/230	1,07	0,8
165	Concentration	506,2	172,2
	R 260/280	1,49	1,36
	R 260/230	0,95	0,75
166	Concentration	750,5	166,1
	R 260/280	1,62	1,32
	R 260/230	1,15	0,69
167	Concentration	696,7	240,5
	R 260/280	1,57	1,4
	R 260/230	1,06	0,83

Annexes

168	Concentration	515,4	245,8
	R 260/280	1,47	1,4
	R 260/230	0,93	0,83
169	Concentration	578,7	252,5
	R 260/280	1,5	1,39
	R 260/230	1	0,79
170	Concentration	390,7	246,8
	R 260/280	1,38	1,38
	R 260/230	0,77	0,75
171	Concentration	895,7	298,9
	R 260/280	1,66	1,44
	R 260/230	1,19	0,84
172	Concentration	767,5	249,5
	R 260/280	1,64	1,36
	R 260/230	1,14	0,77
173	Concentration	591,5	280,1
	R 260/280	1,52	1,36
	R 260/230	0,96	0,8
174	Concentration	733,4	277,8
	R 260/280	1,62	1,37
	R 260/230	1,08	0,78
175	Concentration	495,9	270,5
	R 260/280	1,47	1,4
	R 260/230	0,85	0,76
176	Concentration	694,4	308,5
	R 260/280	1,6	1,42
	R 260/230	1,05	0,81
177	Concentration	691,7	252,1
	R 260/280	1,56	1,36
	R 260/230	1,05	0,75
178	Concentration	761,2	359,4
	R 260/280	1,58	1,26
	R 260/230	1,08	0,8

Annexes

179	Concentration	593,6	313,4
	R 260/280	1,41	1,39
	R 260/230	0,87	0,8
180	Concentration	163,6	118,9
	R 260/280	1,85	1,37
	R 260/230	1,05	0,92
181	Concentration	156,6	236,4
	R 260/280	1,27	1,29
	R 260/230	0,64	0,83
182	Concentration	852,6	257,9
	R 260/280	1,35	1,33
	R 260/230	1,27	0,86
183	Concentration	196,8	242,9
	R 260/280	1,49	1,34
	R 260/230	0,92	0,8
184	Concentration	729,5	250
	R 260/280	1,14	1,26
	R 260/230	0,87	0,8
185	Concentration	428,9	248,2
	R 260/280	1,7	1,28
	R 260/230	1,24	0,78
186	Concentration	146,6	273,9
	R 260/280	1,36	1,34
	R 260/230	0,74	0,83
187	Concentration	503,65	267
	R 260/280	1,86	1,3
	R 260/230	1,87	0,78
188	Concentration	678,6	253,7
	R 260/280	1,65	1,29
	R 260/230	1,15	0,77
189	Concentration	456,4	327,4
	R 260/280	1,67	1,37
	R 260/230	1,44	0,77

Annexes

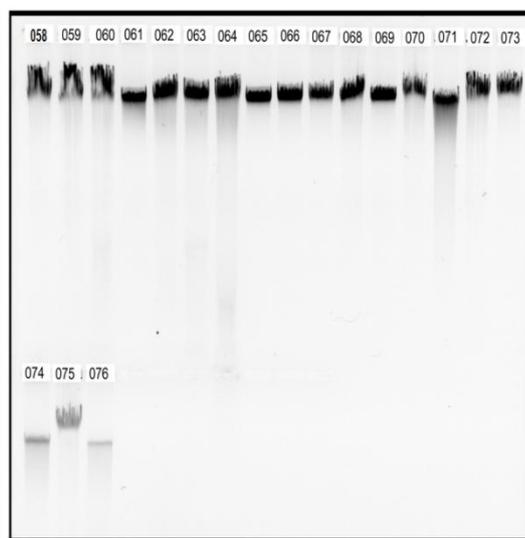
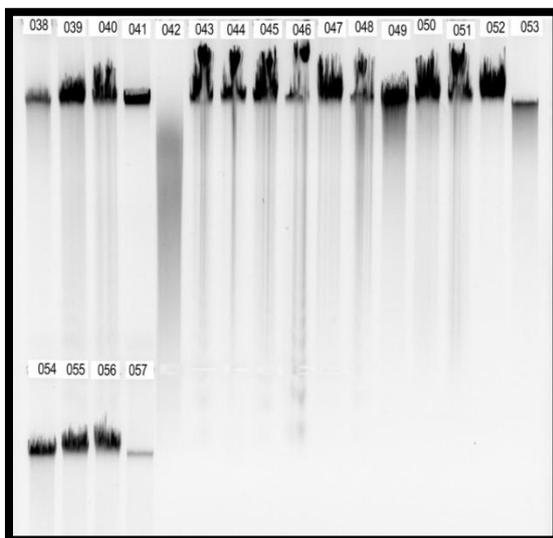
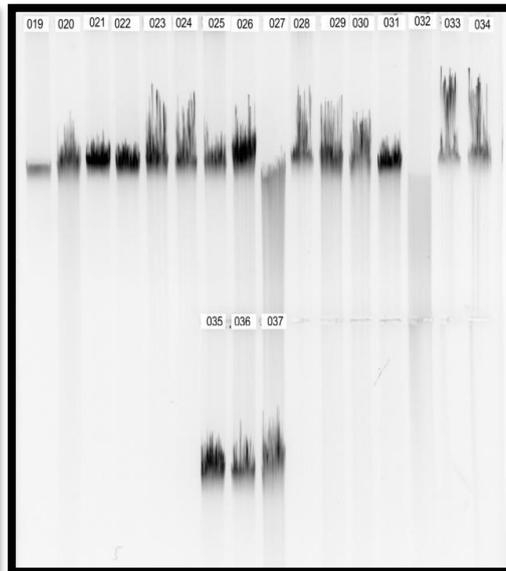
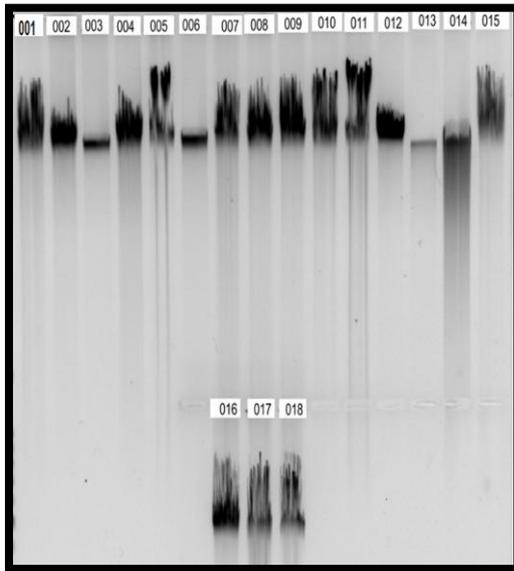
190	Concentration	170,9	271,9
	R 260/280	1,31	1,35
	R 260/230	0,73	0,77
191	Concentration	501	278
	R 260/280	1,71	1,32
	R 260/230	1,72	0,77
192	Concentration	624,6	292,3
	R 260/280	1,69	1,33
	R 260/230	1,4	0,78
193	Concentration	509,3	294,3
	R 260/280	1,67	1,31
	R 260/230	1,37	0,78
194	Concentration	534,9	299,2
	R 260/280	1,65	1,31
	R 260/230	1,26	0,77
195	Concentration	1252	350,2
	R 260/280	1,81	1,34
	R 260/230	1,7	0,77
196	Concentration	620,1	402,3
	R 260/280	1,8	1,22
	R 260/230	1,55	0,83
197	Concentration	680,4	344
	R 260/280	1,75	1,26
	R 260/230	1,44	0,75
198	Concentration	554,9	334,8
	R 260/280	1,72	1,26
	R 260/230	1,24	0,75
199	Concentration	484,9	339,3
	R 260/280	1,63	1,27
	R 260/230	1,14	0,78
200	Concentration	221,6	341
	R 260/280	1,34	1,27
	R 260/230	0,84	0,76

Annexes

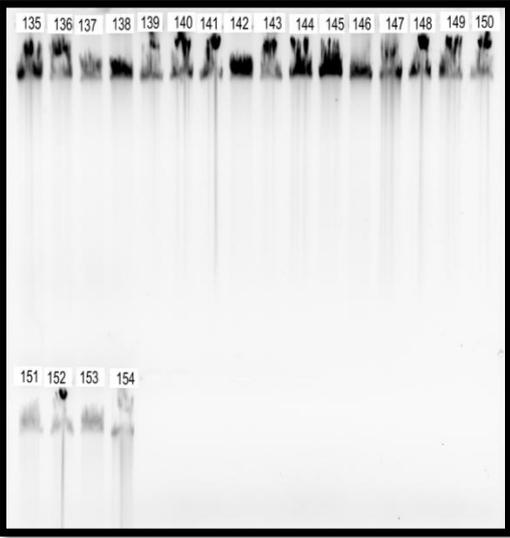
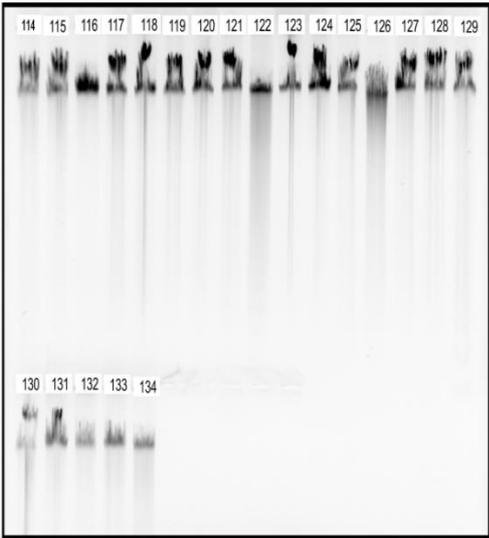
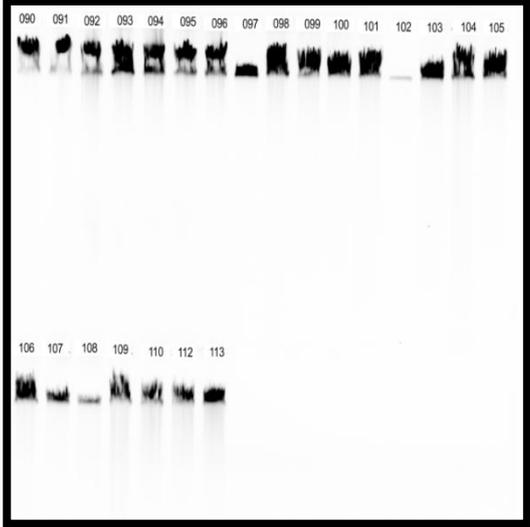
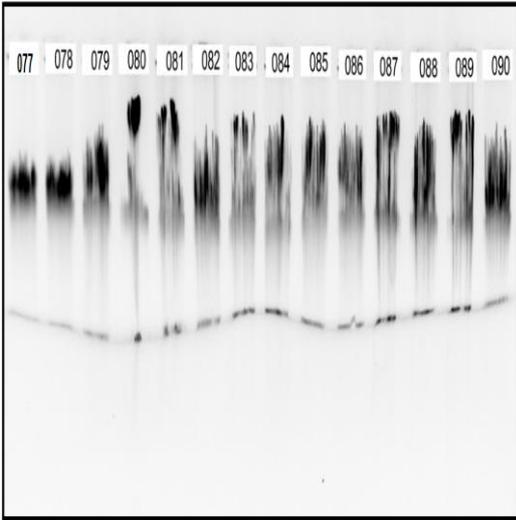
201	Concentration	292,3	319,7
	R 260/280	1,44	1,28
	R 260/230	0,96	0,77

Annexes

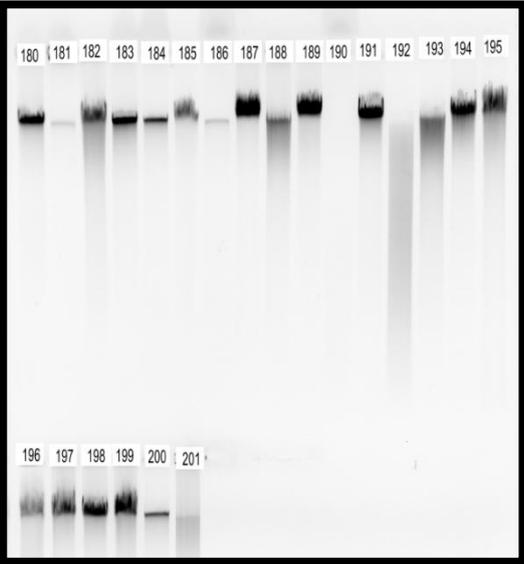
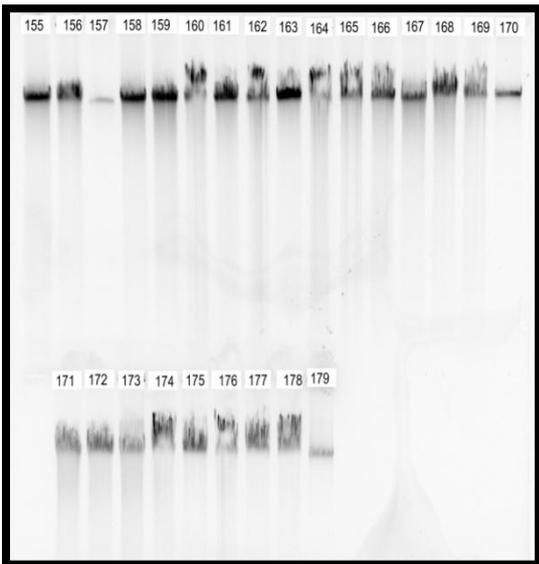
Annexe3 : les Résultats de la photographie du gel d'électrophorèse des échantillons extraits par la méthode Wizard®.



Annexes

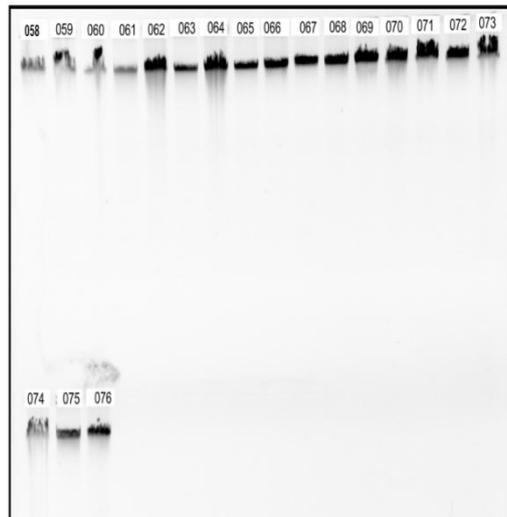
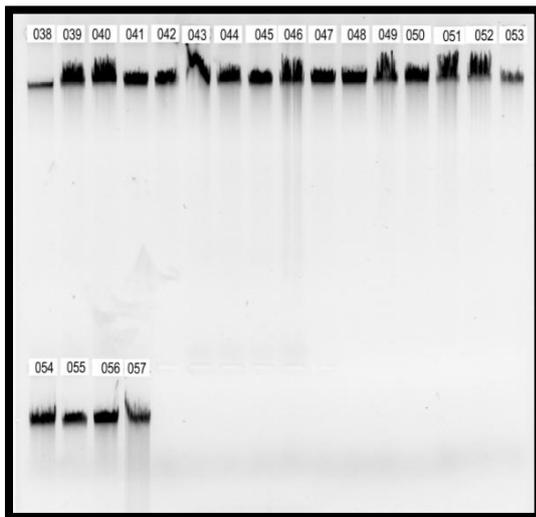
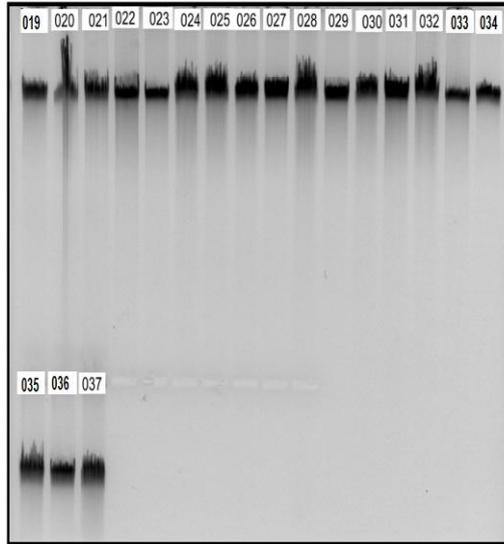
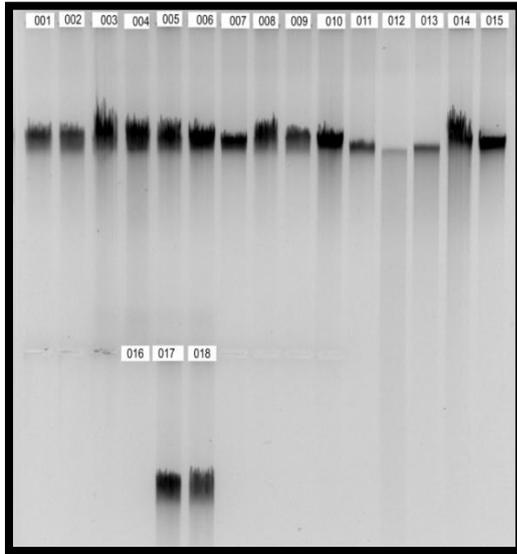


Annexes

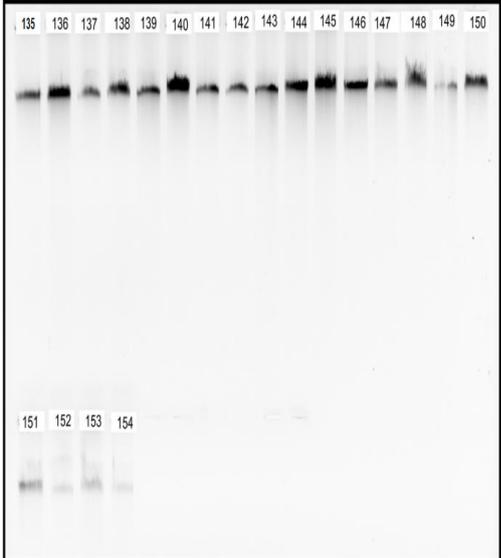
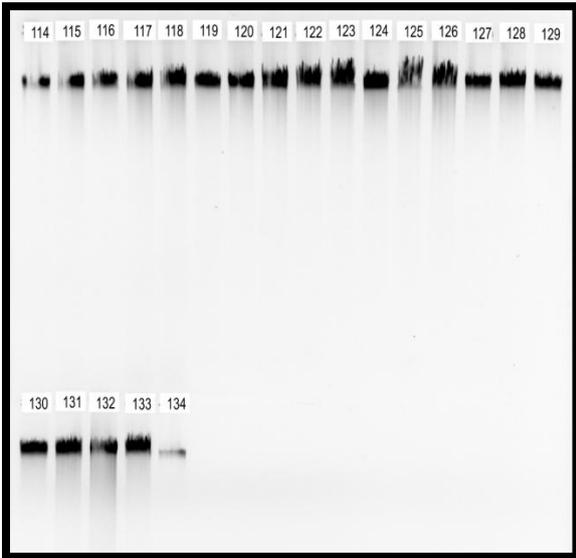
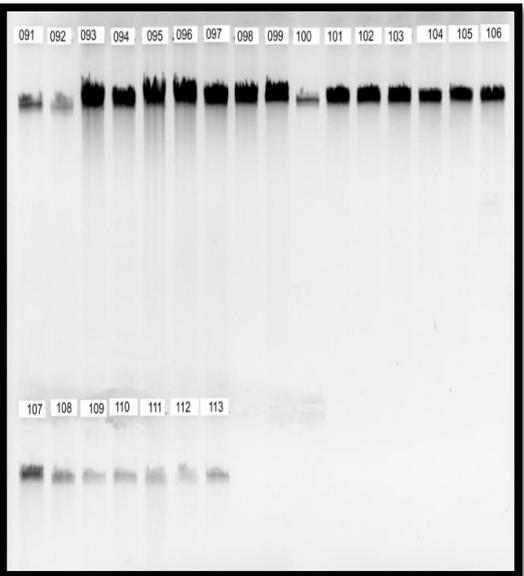
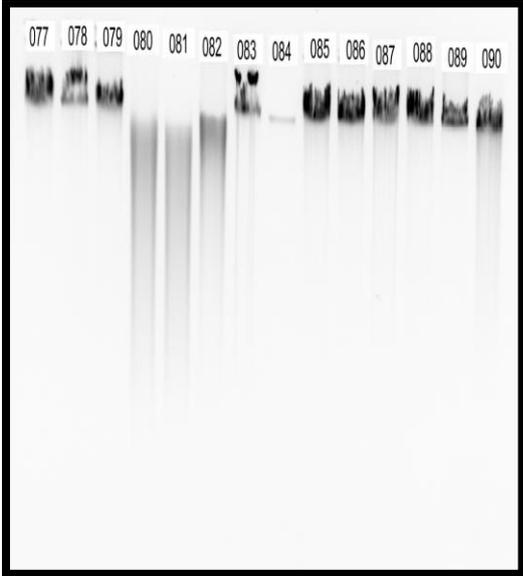


Annexes

Annexe 3 : Les Résultats de la photographie du gel d'agarose des échantillons extraits par l'instrument Maxwell®16.



Annexes



Annexes

