



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques

Référence / 2025

MÉMOIRE DE

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :
GHEZZAL Messaouda.....FARDJALLAH Anissa

Le : 02 Juin 2025

Evaluation de l'efficacité de trois protocoles d'extraction d'ADN total à partir de trois tissus animaux

Jury :

Mme.	Charifa GHLLATI	MAA	Université de Biskra	Président
Mme.	FatihaBENGUERAICHI	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Dr.	Hassina GHITI	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2024/2025

Remerciement

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre encadrent **Fatiha BENGUERAICHI** qui nous guide par sa rigueur scientifique et son soutien constant durant notre travail et reste patiente au dernier moment à toutes les étapes afin de son réalisation.

Nous tenons à exprimer nos sincères reconnaissances à **Madame GULLATI**, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant la présidence du jury de ce mémoire.

Sa présence et son engagement témoignent de l'intérêt qu'il porte à ce travail, et nous lui en somme très reconnaissant(e).

Nous souhaitons également adresser nos remerciements les plus respectueux à **Madame Dr.**

GHITI Hassina , pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Nous lui somme profondément reconnaissant(e) pour l'attention qu'elle a portée à notre travail et pour la pertinence de ses remarques.

A madame **Dr. GHITI Hassina**, aux messieurs **Pr. MOUSSI Abdelhamid** et **Dr. SOUDANI Abderrahmane**, avec un profond respect que nous nous adressons a vous pour votre soutien que vous nous avez apporté dans la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons notre sincère remerciement à tous les ingénieurs et les techniciens de services de laboratoire, spécialement **SAHRAOUI Abdallah** et **SOLTANI Alima**.

Nous adressons nos sincères remerciements aux **Monsieur CHEKARA BOUZIANI**

Mouhammed chef de Département des Sciences de la Nature et de la Vie.

Sans oublier nos remerciements les plus sincères vont au personnel administratif de Département des Sciences de la Nature et de la Vie, dont l'aide précieuse a grandement facilité la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire A mes chers parents

A mon père **FARDJALLAH Houssain**

A ma mère **LAABIDI Messaouda**

A mes **chers frères** et mes **chères sœurs**

pour leur patience, leur amour, leur soutien et leur encouragement.

A ma encadrent **BENGURAICHI Fatiha**, ma collègue et ma copine **GHEZZAL
Messaouda**

A toute ma famille

A mes amies et mes collègues.

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

FARDJALLAH Anissa

Dédicace

Je dédie mon travail à mes exceptions parents

Pour l'homme qui est tous du ma vie, mon soutien et ma force ; mon père

GHEZZAL Azzeddine

Pour la plus belle femme du monde et la plus proche de mon cœur ; ma mère

HAMMAMI Bariza

Pour mes chères sœurs **Sameh, Cilya, Zahia, Lamis** et mes chers frères **Salim** et

Khirreddine

Pour tous mes familles **GHEZZAL** et **HAMMAMI**

A ma encadrant et ma deuxième mère dans ma carrière universitaire **BENGURAICHI**

Fatiha, ma collègue et ma copine **FARDJALLAH Anissa**

A mes amies, mes collègues chacun avec son nom et tout le groupe de

ma promotion 2020-2025

tout mon amour et mes respects pour vous

“Dreams without goals, are just dreams”

Denzel WASHINGTON

GHEZZAL Messaouda

Table des matières

Remerciement	I
Dédicace.....	II
Dédicace.....	III
Table des matières.....	IV
Liste des tableaux	VIII
Liste des figures	IX
Liste des abréviations.....	X
Introduction	1

Première Partie

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1

Revue bibliographique

1.1. Généralité sur l'ADN	3
1.1.1. Structure de l'ADN.....	3
1.1.2. Propriétés physico-chimiques de l'ADN	4
1.1.2.1. Polarité	4
1.1.2.2. Dénaturation (fusion) et renaturation (hybridation)	4
1.1.2.3. Absorption de la lumière UV	4
1.1.2.4. Solubilité.....	4
1.1.2.5. Viscosité.....	5
1.1.2.6. Stabilité.....	5
1.1.3. Applications de l'ADN en recherche.....	5
1.2. Principes fondamentaux de l'extraction d'ADN.....	6
1.2.1. Etapes de l'extraction de l'ADN.....	6
1.2.1.1. Lyse cellulaire	6
1.2.1.2. Élimination des protéines	6
1.2.1.3. Précipitation de l'ADN.....	7
1.2.1.4. Lavage de l'ADN	7
1.2.1.5. Resuspension de l'ADN	7
1.2.2. Facteurs influençant la qualité et la quantité d'ADN	7
1.2.2.1. Type et nature du tissu biologique.....	7

1.2.2.2. Méthode d'extraction employée	8
1.2.2.3. Conditions de prélèvement et de stockage des échantillons.....	8
1.2.2.4. Présence d'inhibiteurs et de contaminants.....	8
1.3. Présentation des protocoles d'extraction d'ADN couramment utilisés	9
1.3.1. Méthodes basées sur les solvants organiques (Phénol-Chloroforme)	9
1.3.2. Méthodes basées sur la précipitation saline ou "salting out"	9
1.3.4. Kits commerciaux.....	9
1.4. Critères d'évaluation de la qualité de l'ADN extrait	10
1.4.1. Quantité d'ADN	10
1.4.2. Intégrité de l'ADN	10
1.4.3. Pureté de l'ADN (ratio A260/280 et ratio A260/230).....	10
1.4.4. Aptitude aux applications en aval.....	11

Deuxième partie

Partie expérimentale

Chapitre 2

Matériel et méthodes

2.1. Matériels biologiques	12
2.1.1.Échantillonnage	12
2.2. Méthode du travail	13
2.2.1. Préparation de tissu.....	13
2.2.2. Protocoles d'extraction d'ADN total.....	14
2.2.2.1. Protocole 1 : SDS-buffer/Salting-out (Aljanabi et Martinez, 1997)	14
2.2.2.2. Protocole 2 : SDS-buffer/Phénol-Chloroforme (Chen et al., 2010)	15
2.2.2.3. Protocole 3 : CTAB buffer/Phénol-Chloroforme (Chen et al., 2010).....	15
2.2.2.4. Extraction de l'ADN par KIT QIAGEN Fast DNA Tissue Kit (50)	16
2.3. Paramètres d'évaluation	16
2.3.1. Quantification de l'ADN	16
2.3.2. Évaluation de la Pureté de l'ADN	16
2.3.3. Évaluation de l'intégrité de l'ADN	16
2.3.4. Applications en Aval	17

Chapitre 3

Résultats et discussion

3.1. Résultats	19
----------------------	----

3.1.1. Quantité, pureté et qualité d'ADN obtenue pour chaque protocole	19
3.1.1.1. 1^{er}tissue : Sang	20
a. Quantité de l'ADN.....	20
b. Pureté de l'ADN.....	22
c. Qualité de l'ADN	25
3.1.1.2. 2^{ème}tissue : Les acridiens (Les criquets).....	27
a. Quantité de l'ADN.....	27
b. Pureté de l'ADN.....	30
c. Qualité de l'ADN	32
3.1.1.3. 3^{ème}tissue : les lombrics	34
a. Quantité de l'ADN.....	34
b. Pureté de l'ADN	35
c. Qualité de l'ADN	35
3.1.2. Applications en Aval	37
3.2. Discussion	38
3.2.1. Discussion de résultats expérimentaux.....	38
3.2.1.1. 1^{er} tissu : le sang humain.....	38
3.2.1.2. 2^{ème} tissu : tissu musculaire des criquets.....	39
3.2.1.3. 3^{ème} tissu : tissu musculaire des vers de terre	40
3.2.1.4. Applications en Aval	41
3.2.2. Discussion des résultats statistiques.....	42
3.2.2.1. Relation entre protocole et pureté.....	42
3.2.2.2.Relation entre tissu et pureté.....	43
3.2.2.3. Relation entre concentration, tissus et protocole.....	44
Conclusion.....	46

Liste des tableaux

Tableau 1. Préparation de mélange réactionnel de PCR.....	17
Tableau 2. Programme de PCR pour le gène hybride COI	18
Tableau 3. Les concentrations d'échantillons sanguins obtenues par le Nano Drop et les volumes correspondants utilisés pour l'extraction de l'ADN pour chaque protocole	25
Tableau 4. Les ratios (260/280 et 260/230) d'échantillons sanguins obtenues par le Nano Drop et les volumes correspondants utilisés pour l'extraction de l'ADN pour chaque protocole.	26
Tableau 5. Les concentrations d'échantillons des acridiens obtenues par le Nano Drop et les masses correspondants utilisés pour l'extraction de l'ADN pour chaque protocole.....	27
Tableau 6. Mesures spectrophotométriques (Nano Drop) de la pureté des extraits d'ADN de criquets obtenus selon trois protocoles d'extraction... Error! Bookmark not defined.	
Tableau 7. Les Concentrations d'ADN mesurées par Nano Drop et masses de tissus de lombrics utilisées pour l'extraction, selon les trois protocoles d'extraction	28
Tableau 8. Mesures spectrophotométriques de la pureté des extraits d'ADN des lombrics obtenus selon trois protocoles d'extraction..... Error! Bookmark not defined.	
Tableau 9. Analyse récapitulative des données d'extraction d'ADN sanguin générées par chaque méthode.....	38
Tableau 10. Analyse récapitulative des données d'extraction d'ADN des criquets générées par chaque méthode.....	39
Tableau 11. Analyse récapitulative des données d'extraction d'ADN des lombrics générées par chaque méthode.....	40

Liste des figures

Figure 1. Structure de l'acide désoxyribonucléique (Albert et al ., 2002).	3
Figure 2. Illustration des concentrations d'ADN extraites en fonction des volumes sanguin employés dans les trois protocoles.....	20
Figure 3. Représentation graphique des concentrations d'ADN extraites à partir des criquets en fonction des masses employés dans les trois protocoles.....	27
Figure 4. Graphe présente les concentrations d'ADN obtenues à partir de lombrics en utilisant trois protocoles d'extraction différents.....	34
Figure 5. Histogramme illustre la relation entre le protocole et la pureté.....	42
Figure 6. Histogramme illustre la relation entre le tissu et la pureté.....	43

Liste des photos

Photo 1. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait du sang humain selon le protocole SDS-buffer/Salting-out, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.	25
Photo 2. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait du sang humain selon le protocole SDS-buffer/Phénol-Chloroforme, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.	25
Photo 3. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait du sang humain selon le protocole CTAB buffer/ Phénol-Chloroforme, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.....	26
Photo 4. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait du sang humain par le kit QIAGEN, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.	26
Photo 5. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait des criquets selon le protocole SDS-buffer/Salting-out, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.	32
Photo 6. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait des criquets selon le protocole SDS-buffer/Phénol-Chloroforme, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.	32
Photo 7. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait des criquets selon le protocole CTAB buffer/ Phénol-Chloroforme, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.....	33
Photo 8. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait des criquets selon le protocole CTAB buffer/ Phénol-Chloroforme, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.....	33
Photo 9. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait des lombrics selon le protocole SDS-buffer/Salting-out, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.	35
Photo 10. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait des lombrics selon le protocole SDS-buffer/Phénol-Chloroforme, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.	36
Photo 11. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait des lombrics selon le protocole CTAB buffer/Phénol-Chloroforme, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.....	36
Photo 12. Photographie de profile électrophorétique représentant le produit de PCR correspondant au fragment cible de 669 pb du gène COI. Ces fragments ont été migrés sur gel d'agarose à 1% et visualisée sur UV après coloration au Safe Green. PM : marqueur de tai.	37

Liste des abréviations

A : Adénine.

ADN :Acide DésoxyriboNucléique.

ARN: AcideRiboNucléique

BET : Bromure d’Ethédium.

C : Cytosine.

CTAB: Cetyltrimethyl ammonium-bromide.

dNTP: désoxyribonucléotides triphosphates.

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid.

G : Guanine.

ITDAS : Institut technique de développement de l’agronomie saharienne.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

pH : Potentiel d’Hydrogène.

qPCR : PCR quantitative.

SDS: Sodium dodecyl sulfate.

T : Thymine.

TE : Tris-EDTA.

UV: rayonnements Ultra-violets.

Introduction

Introduction

L'acide désoxyribonucléique (ADN) constitue le support fondamental de l'information génétique chez tous les êtres vivants. Sa manipulation et son analyse sont devenues indispensables dans un large éventail de domaines de la biologie moderne, incluant : la génétique, la phylogénie, la génomique, la médecine légale, la conservation des espèces, la médecine vétérinaire et la biotechnologie. La réussite de toute étude moléculaire en aval, qu'il s'agisse de la réaction en chaîne par polymérase (PCR), du séquençage de nouvelle génération (NGS) ou d'autres techniques avancées, dépend intrinsèquement de la qualité de l'ADN initialement extrait, c'est-à-dire de sa quantité, de sa pureté et de son intégrité (Montgomery et Sise, 1990).

L'extraction de l'ADN, bien que semblant être une étape préliminaire simple, représente souvent un défi majeur en laboratoire. L'efficacité de l'extraction de l'ADN dépend de plusieurs facteurs, notamment la nature du tissu utilisé, l'état de conservation de l'échantillon, ainsi que la méthode d'extraction employée. Les tissus animaux, en particulier, présentent une grande hétérogénéité en termes de composition cellulaire, de présence d'inhibiteurs endogènes tels que les protéines, les lipides, les polysaccharides, ou l'hème dans le sang, et de susceptibilité à la dégradation enzymatique. Ces facteurs peuvent compromettre le rendement et la qualité de l'ADN obtenu, affectant directement la fiabilité et la reproductibilité des résultats expérimentaux. Face à cette complexité, de nombreux protocoles d'extraction ont été développés au fil des années, allant des méthodes traditionnelles (comme la méthode au phénol-chloroforme) aux kits commerciaux optimisés pour différents types de tissus. Toutefois, ces méthodes présentent chacune des avantages et des inconvénients en termes de rendement, de pureté, de coût, de sécurité, de rapidité et de complexité de mise en œuvre (Sambrook et Russell, 2001).

Dans ce contexte, il est essentiel de comparer différentes méthodes afin d'identifier celle qui permet d'extraire un ADN total de qualité optimale à partir de tissus animaux. Cette évaluation est particulièrement importante dans les laboratoires disposant de ressources limitées ou traitant une grande variété d'échantillons biologiques.

La présente étude de Master a pour objectif principal d'évaluer l'efficacité de trois protocoles distincts d'extraction d'ADN total à partir de tissus animaux. Nous nous attacherons à comparer de manière quantitative et qualitative l'ADN extrait par chaque méthode, en mesurant sa concentration, sa pureté, par les ratios spectrophotométriques, et son intégrité par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette évaluation comparative permettra d'identifier le(s) protocole(s) le(s) plus performant(s) et le(s) plus adapté(s) en fonction des

besoins expérimentaux et des contraintes du laboratoire. Ainsi, cette étude contribuera à orienter le choix des méthodes d'extraction dans les pratiques de routine, tout en tenant compte de l'efficacité, de la reproductibilité et des ressources disponibles.

Première Partie

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1

Revue bibliographique

1.1. Généralité sur l'ADN

1.1.1. Structure de l'ADN

L'ADN est une macromolécule biologique qui joue le rôle de support de l'information génétique. Ce qui la rend unique, c'est que sa structure reste globalement identique, peu importe les informations qu'elle renferme, tous les êtres vivants qu'il s'agisse des animaux, des plantes, des bactéries ou de la majorité des virus partagent cette molécule fondamentale qui constitue la base de leurs caractéristiques. Par conséquent, comprendre le vivant passe nécessairement par l'étude de la structure et du fonctionnement de l'ADN (Griffith et al., 2001).

Une molécule d'ADN est formée de deux chaînes complémentaires de nucléotides, également appelées brins d'ADN. Chaque brin est une longue chaîne polynucléotidique située de quatre types de nucléotides, qui diffèrent uniquement par leur base azotée : l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G) ou la thymine (T). Chaque nucléotide est composé de trois éléments : un sucre à cinq carbones (le désoxyribose), un groupe phosphate et une base azotée. Les nucléotides sont liés entre eux au sein d'un même brin par des liaisons covalentes entre le sucre d'un nucléotide et le phosphate du suivant. Cette structure forme une épine dorsale régulière alternant sucre et phosphate. Les deux brins d'ADN sont maintenus ensemble grâce à des liaisons hydrogène entre les bases azotées : l'adénine s'apparie avec la thymine (A-T) et la cytosine avec la guanine (C-G). Cette complémentarité permet à la molécule d'adopter une structure en double hélice stable. Comme seule la base varie parmi les quatre types de nucléotides, on peut comparer chaque brin d'ADN à un collier dont l'épine dorsale est le fil (sucre-phosphate), et les perles sont les bases A, C, G ou T. Ces lettres désignent à la fois les bases seules et les nucléotides complets (base + sucre + phosphate) (Albert et al., 2002).

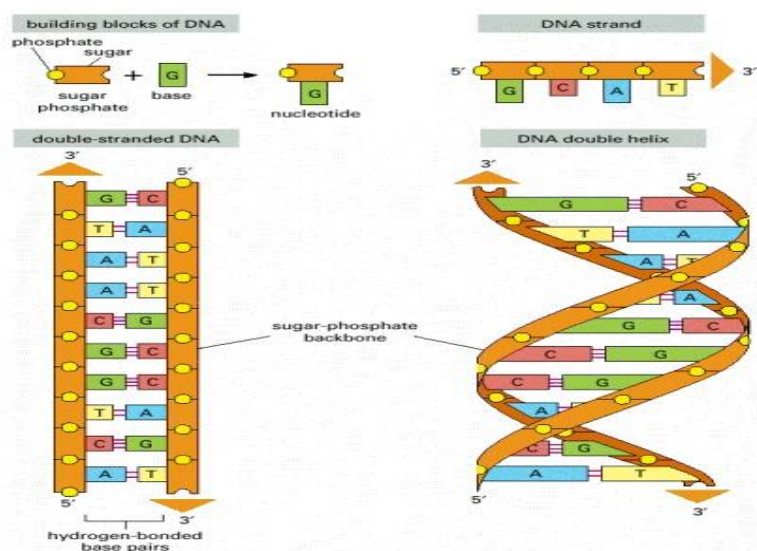


Figure 1. Structure de l'acide désoxyribonucléique (Albert et al ., 2002).

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une molécule présente dans toutes les cellules vivantes, ce qui en fait une molécule universelle. Chez les eucaryotes, l'ADN se trouve principalement dans le noyau, mais une petite quantité est également localisée dans les mitochondries et, chez les végétaux, dans les chloroplastes. En revanche, chez les procaryotes, l'ADN est situé directement dans le cytoplasme. Certains virus possèdent aussi de l'ADN, contenu à l'intérieur de leur capsid (Giovannangeli, 2010).

1.1.2. Propriétés physico-chimiques de l'ADN

L'ADN possède des propriétés physico-chimiques exploitées dans les techniques de laboratoire (Sambrook et Russell, 2006).

1.1.2.1. Polarité

La présence de groupements phosphate chargés négativement confère à l'ADN une charge nette négative, propriété fondamentale utilisée en électrophorèse pour séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille (Riquet et Pitel, 2000).

1.1.2.2. Dénaturation (fusion) et renaturation (hybridation)

La double hélice peut se dénaturer (se séparer en deux brins simples) sous l'effet de la chaleur (élévation de la température de fusion, T_m), d'un pH extrême ou de certains agents chimiques tels que l'urée. Ce processus est réversible, permettant la renaturation (réassociation des brins complémentaires) par refroidissement progressif. Cette propriété est fondamentale pour des techniques comme la PCR et l'hybridation (Sylvie et al., 2023).

1.1.2.3. Absorption de la lumière UV

Les bases azotées absorbent fortement la lumière ultraviolette à une longueur d'onde de 260 nm (A_{260}). Cette propriété est utilisée pour la quantification de l'ADN en solution et pour évaluer sa pureté à l'aide de spectrophotomètres (comme le Nano Drop), en calculant les ratios A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} pour détecter la contamination par des protéines ou des contaminants organiques (Wilfinger et al., 1997).

1.1.2.4. Solubilité

Sur le plan biochimique, l'ADN est soluble dans l'eau et les solutions tamponnées, mais il précipite en présence de sels (Na Cl, acétate de sodium) et d'alcool (éthanol ou isopropanol). Cette propriété est exploitée dans la plupart des protocoles d'extraction et de purification de l'ADN (GreenetSambrook, 2012).

1.1.2.5. Viscosité

En raison de la rigidité de sa double hélice et de sa grande longueur, l'ADN possède une viscosité élevée (Sylvie et al., 2023).

1.1.2.6. Stabilité

La stabilité de l'ADN dépend de plusieurs facteurs, notamment la température, le pH et la présence de nucléases. L'ADN est généralement stable à température ambiante dans des tampons légèrement basiques (pH ~8), tels que le Tris-EDTA. Cependant, sa dégradation peut être accélérée par des ADNases, en particulier en présence d'ions divalents comme Mg^{2+} . Pour une conservation à long terme, l'ADN est généralement stocké à -20°C ou -80°C (Sambrook et Russell, 2001).

1.1.3. Applications de l'ADN en recherche

L'extraction d'ADN est une étape de routine dans de nombreuses études biologiques, et compris l'identification moléculaire, l'inférence phylogénétique, la génétique et la génomique. De plus, l'extraction d'ADN est souvent utilisée dans les examens médicaux, les diagnostics cliniques et les investigations médico-légales. Par conséquent, une variété de méthodes a été établie pour isoler les molécules d'ADN des matériaux biologiques. L'ADN extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage (Chenet al., 2010).

- L'extrait peut être, servant de point de départ à diverses techniques telles que la PCR, la digestion par enzymes de restriction et le Southern blotting (Dhaliwal, 2013).
- L'ADN environnemental (ADNe) s'est imposé comme un outil précieux pour la détection des mammifères marins, permettant d'identifier non seulement les espèces communes, mais aussi celles qui sont rares, menacées ou difficiles à observer. En analysant les traces génétiques laissées dans l'eau, cette méthode non invasive offre une alternative efficace aux techniques traditionnelles de surveillance, souvent coûteuses et limitées en portée. Des études ont démontré que l'ADNe peut détecter jusqu'à 20 % de la faune marine locale attendue sur un site donné, y compris des espèces classées en danger critique d'extinction, comme le requin ange (Bohmann et al., 2014).
- L'analyse des acides nucléiques (ADN et ARN) est devenue un outil incontournable en botanique. Elle permet aux chercheurs d'explorer des domaines variés tels que la génétique des populations, la biogéographie, l'écologie, la biologie du développement, la microbiologie, la physiologie et la phylogénie. Ces analyses facilitent la compréhension

des relations évolutives entre les espèces, la diversité génétique au sein des populations végétales et les mécanismes d'adaptation aux changements environnementaux (Mitchell et al., 2023).

1.2. Principes fondamentaux de l'extraction d'ADN

L'extraction et la purification des acides nucléiques constituent les premières étapes essentielles dans la plupart des études en biologie moléculaire. La qualité et la pureté des acides nucléiques extraits sont des facteurs déterminants pour le succès des analyses, en particulier la PCR. Bien que plusieurs protocoles existent, ils reposent généralement sur les mêmes étapes fondamentales : lyse cellulaire, élimination des protéines, élimination des autres acides nucléiques, concentration de l'ADN et précipitation à l'alcool (Lawrie., 2014).

1.2.1. Etapes de l'extraction de l'ADN

1.2.1.1. Lyse cellulaire

La lyse cellulaire désigne la rupture de la membrane plasmique d'une cellule, entraînant la libération de son contenu intracellulaire. Ce processus peut être induit par des agents chimiques, physiques ou biologiques (Lu et al ., 2005)

Les procédures de lyse les plus courantes combinent plusieurs types de traitements, appliqués successivement ou simultanément :

Méthodes physiques : rupture mécanique à l'aide de billes de silice, lyse hypotonique (par osmose), choc thermique ou encore sonication.

Méthodes chimiques : utilisation de détergents ou tensioactifs pour dissoudre les membranes, d'acides ou de bases, de solvants organiques, d'agents chaotropiques pour dénaturer les protéines, ou encore de composés réducteurs pour briser les ponts disulfures.

Méthodes enzymatiques : recours à des enzymes comme le lysozyme, la protéinase K, la lysostaphine ou la lyticase, qui dégradent spécifiquement les parois ou les protéines cellulaires (Lawrie, 2014).

1.2.1.2. Élimination des protéines

Après la lyse cellulaire et l'inactivation des nucléases, il est crucial d'éliminer les débris cellulaires, les composants résiduels et les produits chimiques utilisés durant la lyse, et l'extraction par solvant est une méthode couramment employée pour purifier les acides nucléiques en éliminant efficacement les contaminants. Par exemple, un mélange de phénol et de chloroforme est utilisé pour dénaturer les protéines, facilitant ainsi leur séparation de l'ADN ou de l'ARN (Lawrie, 2014). Sinon la précipitation des protéines par ajout de chlorure de sodium

(Na Cl) saturé, cette méthode classique en biochimie exploite le fait qu'à des concentrations élevées en sel, la solubilité des protéines diminue, entraînant leur précipitation. Ce processus est utilisé pour séparer ou concentrer des protéines spécifiques en fonction de leur solubilité dans des solutions salines de différentes concentrations (Berenger, 2014).

1.2.1.3. Précipitation de l'ADN

La précipitation des acides nucléiques à l'aide de l'isopropanol ou de l'éthanol est couramment utilisée pour les concentrer et éliminer les sels. Lorsque la quantité d'acide nucléique est faible, des substances inertes comme le glycogène peuvent être ajoutées pour favoriser cette précipitation (Lawrie., 2014).

1.2.1.4. Lavage de l'ADN

Après la précipitation de l'ADN, le culot obtenu est lavé deux fois avec d'éthanol à 70 % pour éliminer les sels résiduels. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation permettant de séparer efficacement les contaminants (Chenet al., 2010).

1.2.1.5. Resuspension de l'ADN

Après la précipitation et le lavage, le culot d'ADN est séché pour éliminer les résidus de solvants tels que l'éthanol ou l'isopropanol. Il est essentiel de ne pas trop sécher le culot, car un séchage excessif peut rendre l'ADN difficile à resuspendre, en particulier pour l'ADN de haut poids moléculaire. Une fois le culot sec, l'ADN est remis en suspension dans un tampon approprié, qui maintient un pH légèrement basique et protège l'ADN contre la dégradation enzymatique. Pour une conservation optimale, l'ADN dissous dans le tampon TE peut être stocké à -20 °C ou -80 °C (Berenger, 2014).

1.2.2. Facteurs influençant la qualité et la quantité d'ADN

L'obtention d'un ADN de haute qualité et en quantité suffisante est une étape cruciale pour la réussite de toute analyse moléculaire en aval. Cependant, de nombreux facteurs peuvent influencer ces paramètres, depuis le moment du prélèvement de l'échantillon jusqu'au protocole d'extraction lui-même. Une compréhension approfondie de ces facteurs est essentielle pour optimiser les conditions d'extraction, selon la nature de l'échantillon et l'objectif expérimental, et garantir la fiabilité des résultats (Sambrook et Russell., 2006).

Les principaux paramètres à prendre en compte :

1.2.2.1. Type et nature du tissu biologique

Le type de tissu constitue un facteur déterminant (Aljanabi et Martinez, 1997) et le rendement en ADN dépend fortement du tissu utilisé (Kreader, 1996). Chaque type de tissu

animal présente des spécificités en termes de densité cellulaire, de présence de matrice extracellulaire, de teneur en lipides ou en polysaccharides, et de niveaux d'enzymes dégradantes (nucléases)(Buckley et al., 2008; Bellagamba et al., 2014). Par exemple, le muscle ou la peau, présentent une structure plus dense et plus difficile à lyser. Par ailleurs, certains tissus contiennent des composés potentiellement inhibiteurs (par exemple, l'hémoglobine dans le sang, les lipides dans le cerveau ou le tissu adipeux), qui peuvent interférer avec l'extraction ou les analyses en aval (Kreader, 1996 ;Aljanabi et Martinez, 1997). De plus, l'état physiologique de l'animal, son âge, et la présence de pathologies (l'apoptose, la nécrose ou le stress oxydatif) peuvent également affecter la qualité de l'échantillon (Montgomery et Sise, 1990 ; Buckley et al., 2008; Bellagamba et al., 2014).

1.2.2.2. Méthode d'extraction employée

Le choix de la méthode d'extraction influence directement le rendement et la pureté de l'ADN. Les méthodes traditionnelles, comme l'extraction au phénol-chloroforme, permettent souvent un bon rendement, mais peuvent laisser des résidus toxiques (Sambrook et Russell, 2001). Les kits commerciaux, quant à eux, offrent une standardisation des étapes, une plus grande rapidité et une meilleure reproductibilité, mais à un coût plus élevé (Boom et al., 1990 ; Sambrook et Russell, 2001 ; Green et Sambrook, 2012). L'efficacité des étapes de lyse, de purification et de précipitation est primordiale pour obtenir un ADN exempt de contaminants (Sambrook et Russell, 2001).

1.2.2.3. Conditions de prélèvement et de stockage des échantillons

Les conditions post-prélèvement sont critiques pour la préservation de l'intégrité de l'ADN. Les échantillons doivent être traités rapidement après le prélèvement ou conservés à -20°C , -80°C ou dans des milieux de stabilisation (RNAlater, éthanol absolu) pour éviter la dégradation enzymatique et bactérienne (Rohland et Hofreiter, 2007).

1.2.2.4. Présence d'inhibiteurs et de contaminants

Les inhibiteurs peuvent être co-extraits avec l'ADN et perturber les réactions enzymatiques en aval, notamment la PCR, la qPCR ou les étapes de ligation pour le séquençage. La présence de protéines, ARN, lipides, polysaccharides ou autres composés organiques peut altérer la qualité de l'ADN. Par exemple, l'hème, présent dans le sang, est un puissant inhibiteur de la Taqpolymérase. Ces contaminants sont souvent détectés par des ratios d'absorbance anormaux ($A_{260}/A_{280} < 1.8$ ou $A_{260}/A_{230} < 2.0$). Une

purification insuffisante peut également inhiber les réactions enzymatiques telles que la PCR (Wilson, 1997).

1.3. Présentation des protocoles d'extraction d'ADN couramment utilisés

1. 3.1. Méthodes basées sur les solvants organiques (Phénol-Chloroforme)

Considérée comme la méthode de référence pour l'extraction des acides nucléiques, elle repose sur un traitement du lysat cellulaire avec un volume égal de phénol. Après une centrifugation, la phase phénolique est éliminée. Le mélange restant est ensuite traité avec un mélange de chloroforme et d'alcool isoamylique (24:1), afin de retirer toute trace résiduelle de phénol, susceptible d'inhiber les réactions enzymatiques (Bienvenu et al., 1999). Cette méthode d'extraction d'ADN est rapide et facile à réaliser, offrent des rendements élevés et une pureté satisfaisante des extraits, tout en utilisant des réactifs nettement moins coûteux que ceux requis pour les systèmes automatisés (Amaury, 2016). Cependant, le principal inconvénient de cette méthode est l'utilisation de chloroforme, une substance reconnue pour sa toxicité et ses effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement. Le chloroforme est classé comme cancérigène possible pour l'homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC). Un autre inconvénient notable est le nombre élevé de manipulations nécessaires, notamment les transferts répétés entre différents tubes, ce qui augmente considérablement le risque de contamination des échantillons (Gérard, 2016).

1.3.2. Méthodes basées sur la précipitation saline ou "salting out"

Dans certaines méthodes d'extraction d'ADN, le lysat cellulaire est traité avec une solution saline, telle que du chlorure de sodium à 6 M, afin de précipiter sélectivement les protéines. Cette approche peut inclure une étape préalable de traitement à l'ARNase pour éliminer l'ARN (Bienvenu et al., 1999). La méthode d'extraction d'ADN salting out, est largement reconnue pour sa sécurité accrue par rapport à la méthode au phénol-chloroforme et pour son coût inférieur aux kits commerciaux. Cependant, les méthodes desalting out sont laborieuses et longues, et limiter son efficacité, notamment dans les applications nécessitant une haute pureté ou un débit élevé (Ghaheiri et al., 2016).

1.3.4. Kits commerciaux

Les kits commerciaux d'extraction d'ADN présentent de nombreux avantages qui les rendent populaires en laboratoire comme rapidité et efficacité, mais ils comportent également certaines limites comme le coût élevé (Ghaheiri et al., 2016).

1.4. Critères d'évaluation de la qualité de l'ADN extrait

1.4.1. Quantité d'ADN

Le Nano Drop est un spectrophotomètre UV-Visible à spectre complet, conçu pour mesurer des échantillons de très faible volume (0,5 à 2 µL) sans nécessiter de cuvettes ni de capillaires. Il utilise une lampe flash au xénon comme source lumineuse et un détecteur CCD linéaire pour capturer l'absorbance sur une gamme de longueurs d'onde de 190 à 840 nm. La technologie brevetée de rétention d'échantillon permet de maintenir la goutte entre deux fibres optiques grâce à la tension de surface, facilitant ainsi des mesures rapides et précises (Michele et al., 2013).

Le fluoromètreQubit est un instrument de laboratoire développé par Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) pour la quantification précise de l'ADN, de l'ARN et des protéines. Il utilise des colorants fluorescents spécifiques qui émettent une fluorescence uniquement lorsqu'ils sont liés à leur cible moléculaire, assurant ainsi une grande spécificité et sensibilité (Michele et al., 2013).

1.4.2. Intégrité de l'ADN

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique de laboratoire utilisée en biologie moléculaire pour séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille, sous l'effet d'un champ électrique, les molécules d'ADN, chargées négativement, migrent à travers le gel d'agarose vers l'anode. Les fragments plus petits se déplacent plus rapidement que les plus grands, permettant ainsi leur séparation. Pour visualiser les fragments d'ADN après migration, des agents intercalant fluorescents, tels que le bromure d'éthidium (BET), sont utilisés ces agents se lient à l'ADN et fluorescent sous lumière ultraviolette, rendant les bandes d'ADN visibles. Cette méthode est essentielle pour analyser les produits de digestion enzymatique, les résultats de PCR ou pour évaluer la qualité et la quantité d'ADN extrait (Beranger, 2014).

1.4.3. Pureté de l'ADN (ratio A260/280 et ratio A260/230).

En 1941, Otto Warburg et Walter Christian ont introduit une méthode spectrophotométrique basée sur les longueurs d'onde de 260 nm et 280 nm pour estimer la concentration en protéines et en acides nucléiques. Initialement, cette méthode visait à détecter la contamination par les acides nucléiques lors de la purification des protéines. Les acides nucléiques absorbent fortement à 260 nm, tandis que les protéines, en particulier les acides

aminés aromatiques absorbent à 280 nm. Le rapport A260/280 permet donc d'évaluer la pureté des échantillons d'acides nucléiques. Un rapport A260/280 d'environ 1,8 est généralement accepté comme indicatif d'un ADN pur, tandis qu'un rapport d'environ 2,0 est considéré comme représentatif d'un ARN pur (Wilfinge et al., 1997).

Le rapport d'absorbance A260/230 est un indicateur clé de la pureté des échantillons d'acides nucléiques, utilisé pour détecter la présence de contaminants organiques résiduels tels que le phénol, le Trizol, le chlorhydrate de guanidine et le thiocyanate de guanidine. Ces substances absorbent fortement à 230 nm, ce qui peut fausser les mesures de concentration en ADN ou ARN si elles ne sont pas éliminées correctement. Les rapports 260/230 généralement acceptables se situent entre 2,0 et 2,2. Des valeurs supérieures peuvent indiquer une contamination par les composés susmentionnés (Wilfinge et al., 1997).

1.4.4. Aptitude aux applications en aval

La véritable mesure de la qualité de l'ADN est sa capacité à fonctionner correctement dans les applications moléculaires pour lesquelles il est destiné. Un ADN peut sembler bon en quantité et en pureté sur NanoDrop, mais échouer dans une PCR si des inhibiteurs sont présents ou si l'intégrité est compromise (Alberts et al., 2014). La PCR et la qPCR sont des tests fonctionnels courants. La capacité à amplifier un fragment d'ADN cible avec succès démontre que l'ADN est exempt d'inhibiteurs et suffisamment intègre pour être polymérisé. L'absence d'amplification ou une amplification faible peut indiquer une faible quantité d'ADN, une dégradation de la région cible, ou la présence d'inhibiteurs (Green et Sambrook., 2012). Ainsi que, pour les applications du séquençage de Nouvelle Génération (NGS), l'intégrité et la pureté de l'ADN sont d'une importance capitale. L'ADN dégradé peut entraîner des bibliothèques de séquençage de mauvaise qualité, une couverture non uniforme ou des difficultés d'assemblage du génome. Les inhibiteurs peuvent également perturber les étapes de préparation des bibliothèques (Sims et al., 2014).

En évaluant conjointement ces quatre critères, il est possible d'obtenir une caractérisation complète de la qualité de l'ADN extrait et de déterminer son adéquation pour les analyses génétiques moléculaires subséquentes.

Deuxième partie

Partie expérimentale

Chapitre 2

Matériel et méthode

Dans le de ce mémoire, nous avons adopté une approche structurée en deux parties complémentaires : une partie théorique et une partie pratique .La première partie est consacrée à l'aspect théorique qui présente les notions de base sur l'ADN et les étapes d'extractions. Une partie pratique, qui décrit l'expérimentation l'analyse des résultats.

2.1. Matériaux biologiques

Ce chapitre détaille les matériaux biologiques utilisés ainsi que l'ensemble des procédures expérimentales mises en œuvre pour évaluer l'efficacité des trois protocoles d'extraction d'ADN total à partir de différents tissus animaux. L'objectif est de présenter une méthodologie rigoureuse et reproductible permettant une comparaison objective des rendements, de la pureté et de l'intégrité de l'ADN extrait.

2.1.1.Échantillonnage

Afin d'évaluer l'efficacité de différentes méthodes d'extraction d'ADN, nous avons collecté des échantillons animaux provenant de trois sources biologiques différentes : du sang humain, des acridiens (criquets) et des vers de terre (lombrics).

Ces échantillons ont été choisis pour représenter des matrices biologiques variées en termes de composition, de densité cellulaire et de complexité structurale.

L'extraction d'ADN à partir du sang est privilégiée pour de nombreuses applications en raison de sa facilité de prélèvement (moins invasive que la biopsie tissulaire) et de la richesse en leucocytes qui contiennent une quantité suffisante d'ADN génomique. L'ADN extrait du sang humain a un large éventail d'applications telles que les examens médicaux, les diagnostics cliniques et les investigations médico-légales.

L'ADN extrait des invertébrés est de plus en plus utilisé dans divers domaines de recherche scientifique, de surveillance environnementale et même en biotechnologie. De nombreux domaines nécessitent l'extraction d'ADN tels que : la phylogénie et la taxonomie moléculaire, la génétique des populations et la conservation, la biotechnologie et les biomatériaux, la recherche en parasitologie et l'entomologie médicale, les études écologiques et comportementales et la surveillance environnementale (bioindication).

Le sang humain a été collecté dans le laboratoire de l'hôpital de Tolga. Le sang a été prélevé par ponction veineuse et immédiatement transféré dans des tubes contenant de

l'EDTA spécifiquement comme anticoagulant. Les tubes sont ensuite transférés au laboratoire du département de biologie de l'Université Mohamed Khider, où le protocole de lyse des hématies est directement appliqué.

Des spécimens adultes des espèces d'Oedipodinae et d'Acridinae ont été collectés dans différents endroits répartis dans la Wilaya de Biskra et de la Wilaya d'Adrar. Les échantillons ont été capturés à la main ou par un filet fauchoir pendant la journée. Les spécimens de la wilaya d'Adrar ont été capturés par le Dr SOUDANI Abderrahmane le 05/09/2019 et les spécimens de la wilaya de Biskra ont été capturés par le professeur MOUSSI Abdelhamid le 26/09/2019. Les spécimens ont été conservés dans de l'éthanol absolu (100%) à 4°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

Les vers de terre ont été collectés par Mme GHITI Hassina au centre ITDAS, placés dans une boîte contenant du sol humide et transportés au laboratoire de l'Université Mohamed Khider pour les protocoles d'extraction d'ADN.

2.2. Méthode du travail

2.2.1. Préparation de tissu

➤ Lyse des hématies

L'hémolyse du sang consiste en l'isolement de leucocytes du sang total par une lyse hypotonique des globules rouges. La lyse est en général réalisée à 4 °C pendant 20 à 30 minutes selon les étapes suivantes :

- Ajouter 1 volume de solution de lyse des globules rouges par 1 volume de sang (1:1), incubé de 20 à 30 min à 4 °C ; (Solution de lyse des globules rouges (GR) : (NH₄Cl 155 mM ; NaHCO₃ 12 mM ; EDTA 0,1 mM), ensuite, centrifuger à 1500 g pendant 15 min à 4 °C ;
- Enlever le surnageant ;
- Ajouter 500 µL de tampon de lyse des globules rouges au culot, bien agiter par vortex et incubé 20 min à 4 °C ;
- Centrifuger dans les mêmes conditions, que précédemment ;
- Eliminer le surnageant et recueillir le culot ; sur ce culot, la même opération est effectuée une autre fois ;
- A la fin, laisser les tubes sécher 5 min à température ambiante (Benguerachi, 2015).

➤ **Criquets**

Le tissu musculaire de fémur postérieur ainsi que les muscles thoraciques des petits criquets, de chaque individu, a été placé dans un micro-tube pour l'extraction de l'ADN.

➤ **Lombrics**

Après dissection du lombric et ablation de l'appareil digestif, le tissu musculaire est fragmenté en petites portions puis réparti dans des micro-tubes de 1.5 ml.

2.2.2. Protocoles d'extraction d'ADN total

2.2.2.1. Protocole 1 : SDS-buffer/Salting-out (Aljanabi et Martinez, 1997)

La méthode repose sur le principe du « **salting out** », qui implique une déshydratation suivie de la précipitation des protéines à l'aide d'une solution saturée en chlorure de sodium. Une fois les protéines séparées, l'ADN est à son tour précipité à l'éthanol, puis resuspendu dans une solution aqueuse pour être utilisé dans les analyses ultérieures (Elise, 2007).

- Placer le tissu dans un tube approprié. Ajouter 400 µl de tampon d'homogénéisation salin stérile (Na Cl 0,4 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). Homogénéiser le mélange à l'aide d'un homogénéisateur Polytron pendant 10 à 15 secondes ;

Remarque : En l'absence d'un homogénéisateur de type Polytron dans notre laboratoire, l'homogénéisation des échantillons a été réalisée manuellement.

- Ajouter 40 µl de SDS 20 % (pour une concentration finale de 2 %) et 8 µL de protéinase K à 20 mg/ml (pour une concentration finale de 400 µg/ml). Bien mélanger le tout ;
- Incuber les échantillons à 55–65 °C pendant 1 heure, ou toute la nuit pour une digestion plus complète ;
- Ajouter 300 µL de Na Cl 6 M (solution saturée) et vortexer pendant 30 secondes à vitesse maximale. Ensuite, centrifuger pendant 30 minutes à 10 000g ;
- Transférer soigneusement le surnageant dans un nouveau tube ;
- Ajouter un volume égal d'isopropanol au surnageant à chaque tube et bien mélanger, incuber les échantillons à –20 °C pendant 1 heure ;
- Centrifuger les tubes à 10 000 g pendant 20 minutes à 4 °C ;

- Laver le culot avec 70 % d'éthanol et sécher ;
- Resuspendre le culot dans 300 à 500 µl d'eau distillée stérile.

Remarque : on a ajouté 50 µL d'eau bi-distillé stérile.

2.2.2.2. Protocole 2 : SDS-buffer/Phénol-Chloroforme (Chen et al., 2010)

Ici, l'ADN est extrait après lyse par SDS et digestion protéique, suivie d'une extraction organique au mélange phénol-chloroforme-isoamylalcool, puis précipitation à l'éthanol. Ce sont les étapes de ce protocole :

- Un tampon SDS a été préparé avec 0,5 % (w/v) de SDS dilué dans un mélange de 200 mM de Tris, 25 mM d'EDTA et 250 mM de Na Cl ;
- Dans un tube de 1,5 ml contenant 150 µL de tampon SDS, écraser les tissus individuellement à l'aide d'un pilon ;
- Ajouter 350 µL de tampon SDS et 5 µL d'ARNase (100 mg/ml) dans chaque, puis incubé à 37°C pendant 1 heure ;
- Ajouter 5 µL de protéinase K (20 mg/ml) et incubé à 50°C pendant 1 heure ;
- Ajouter 240 µL de phénol/chloroforme/alcool isoamyl (25:24:1), puis centrifuger à 12000 g pendant 10 minutes ;
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube de 1,5 ml. Pour précipiter l'ADN, ajouter 500 µL d'éthanol absolu refroidi, et centrifuger à 12 000 g pendant 15 minutes ;
- Laver le culot deux fois avec 500 µL d'éthanol à 70 % et centrifuger à la même vitesse pendant 3 minutes afin d'éliminer les sels résiduels ;
- Sécher le culot dans un EppendorfVacfuge™ à 37°C pendant 30 minutes ou à l'air libre à température ambiante pendant la nuit.

Remarque : à cause de l'absence EppendorfVacfuge™, on a séché à l'air libre à température ambiante pendant 1 heure.

2.2.2.3. Protocole 3 : CTAB buffer/Phénol-Chloroforme (Chen et al., 2010)

La méthode au bromure de cétyle-triméthyl ammonium (CTAB) est couramment utilisée pour l'extraction d'ADN de divers organismes. Le tampon CTAB permet de solubiliser les membranes et d'éliminer les polysaccharides. L'ADN est ensuite purifié par extraction au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol.

- Le tampon CTAB était composé de 2 % (p/v) de CTAB dilué dans 100 mM de Tris-HCl, 20 mM d'EDTA et 1,4 M de Na Cl ; 0,2 % (v/v) de β -mercaptoéthanol a été ajouté immédiatement avant utilisation ;
- Les étapes de lyse tissulaire, de traitement à la protéinase K et à l'ARNase A, d'isolement de l'ADN, de précipitation, de lavage et d'hydratation ont été réalisées comme décrit pour la méthode SDS (protocole 2).

2.2.2.4. Extraction de l'ADN par KIT QIAGEN Fast DNA Tissue Kit (50)

C'est un kit commercialisé pour la purification d'ADN. Le protocole a été extrait à partir de manuel de Kit utilisé (QIAMPfast DNA tissu Kit Handbook, for rapide purification of DNA from tissue samples .07/2015). On a appliqué selon les conditions du fabricant (Annexe 2)

2.3. Paramètres d'évaluation

2.3.1. Quantification de l'ADN

La concentration de l'ADN extrait a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop (IMPLEN N60 Touch). 2 μ L de chaque échantillon d'ADN ont été déposés sur la surface du NanoDrop. La concentration est exprimée en ng/ μ L.

2.3.2. Évaluation de la Pureté de l'ADN

La pureté de l'ADN a été évaluée par spectrophotométrie en calculant les ratios A260/A280 et A260/A230, également mesurés avec le NanoDrop.

- **Ratio A260/A280** : un ratio d'environ 1.8-2.0 est généralement considéré comme indiquant une pureté adéquate en ADN, <1.7 indique une contamination protéique.
- **Ratio A260/A230** : un ratio supérieur à 2.0 (idéalement 2.0-2.2), <2 indique une contamination par des sels, des polysaccharides ou des contaminants organiques comme le thiocyanate de guanidinium ou l'EDTA.

2.3.3. Évaluation de l'intégrité de l'ADN

L'intégrité de l'ADN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose.

- **Préparation du gel** : un gel d'agarose à 0.8 % a été préparé dans du tampon TAE 1X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) et supplémenté avec 0.4 μ L de Safe-Green™ (agent intercalant).

- **Chargement des échantillons** : pour chaque échantillon, 8 μ L d'ADN a été mélangé avec 3 μ L de tampon de charge et déposé dans les puits du gel.
- **Électrophorèse** : l'électrophorèse a été réalisée à 100V pendant 30 minutes dans du tampon TAE 1X.
- **Visualisation** : le gel a été visualisé sous lumière UV à l'aide d'un transilluminateur(VILBER LOURMAT) et les images ont été capturées par (SONY DOC-PRINT VX2). L'intégrité a été évaluée visuellement par la présence d'une bande unique de haut poids moléculaire et l'absence de "smearing" (tache diffuse indiquant une dégradation).

2.3.4. Applications en Aval

Pour valider l'aptitude fonctionnelle de l'ADN extrait, une réaction de PCR a été réalisée sur des échantillons sélectionnés.

- **Gène Cible** : amplification d'un fragment du gène Cytochrome Oxydase sous-unité I (COI) à l'aide des amorces (M. Husemann et al ., 2012).

COI-F COI CCATCTTACCGCAAA AATGAT

COI-R COI CTG GGTGWCCAAAGA ATCAAA

- **Conditions PCR** :

a. Préparation de mélange réactionnel de PCR

Le volume total est de 20 μ L.

Dans le tube témoin, l'ADN est remplacé par de l'eau distillée.

Tableau 1Préparation de mélange réactionnel de PCR.

Mix de PCR	Quantité (en μ L)
ADN	100 μ g (calculer en fonction de la concentration de l'ADN)
Tampon de <i>Taq</i>	5
<i>Taq</i> polymérase	0,5
Mix de dNTPs	2
Amorce sens	1
Amorce anti-sens	1
H ₂ O bi-distillé	QSP

b. Déroulement de la PCR**Tableau 2** Programme de PCR pour le gène hybride COI

Nombre de cycles	Etape	Température (°C)	Durée
	Dénaturation initiale	95	05 min
30 X	Dénaturation	94	01 min
	Hybridation	54	01 min
	Elongation	72	01 min
	Elongation finale	72	10 min
	Conservation	4	indéfiniment

Chapitre 3

Résultats et discussion

3.1. Résultats

Dans le domaine de l'extraction d'ADN, diverses techniques ont été développées pour isoler le matériel génétique de différents tissus. Bien que les kits commerciaux prêts à l'emploi aient gagné en popularité en raison de leur rapidité, de leur facilité d'utilisation et de la quantité, de la pureté et du rendement d'ADN qu'ils peuvent offrir, leur coût élevé reste un inconvénient majeur. En revanche, les protocoles classiques d'extraction d'ADN, bien que potentiellement plus longs, se révèlent souvent tout aussi efficaces et représentent une alternative privilégiée. Cependant, leur succès dépend fortement d'une adaptation rigoureuse à la nature spécifique de l'échantillon, afin de garantir l'obtention d'un ADN pur, de bonne qualité et en quantité suffisante pour les applications biomoléculaires ultérieures. Le présent travail vise précisément à décrire des méthodes classiques fiables pour l'extraction d'ADN à partir du sang humain, ainsi que des tissus musculaires de deux invertébrés : le criquet et le ver de terre.

3.1.1. Quantité, pureté et qualité d'ADN obtenue pour chaque protocole

Le spectrophotomètre NanoDrop permet de déterminer la concentration d'ADN ainsi que les ratios de densité optique A260/A280 et A260/A230, paramètres essentiels pour évaluer la pureté de l'ADN extrait. Cette évaluation de la pureté revêt une importance cruciale car elle conditionne directement la fiabilité des analyses moléculaires subséquentes. Le principe repose sur le fait que les acides nucléiques présentent un pic d'absorption maximale dans l'UV à 260 nm, avec une relation directement proportionnelle entre l'absorbance mesurée et la concentration en ADN ou ARN présent dans l'échantillon. Le ratio A260/A280 constitue un indicateur standard de pureté de l'ADN. Des valeurs situées entre 1,8 et 2,0 témoignent d'un échantillon relativement pur, exempt de contamination protéique significative. Parallèlement, le ratio A260/A230 révèle la présence éventuelle de contaminants organiques ou de sels résiduels issus des tampons d'extraction utilisés lors du processus de purification. Pour ce paramètre, des valeurs comprises entre 2,0 et 2,2 sont considérées comme satisfaisantes (Desjardins et Conklin, 2010).

Le gel d'agarose est une méthode courante pour évaluer la quantité et l'intégrité de l'ADN extrait.

Après coloration avec un agent intercalant comme le Safe Green, l'ADN migre du pôle négatif au pôle positif, les fragments plus grands se déplaçant plus lentement que les fragments plus petits.

Les tableaux ci-dessous (tableau 3 et 4) représentent les résultats obtenus à partir des trois méthodes d'extraction d'ADN plus le kit QIAGEN.

3.1.1.1. 1^{er} tissu : Sang

a. Quantité de l'ADN

La quantité de l'ADN extrait par les trois méthodes ont été répertoriés dans le tableau 3

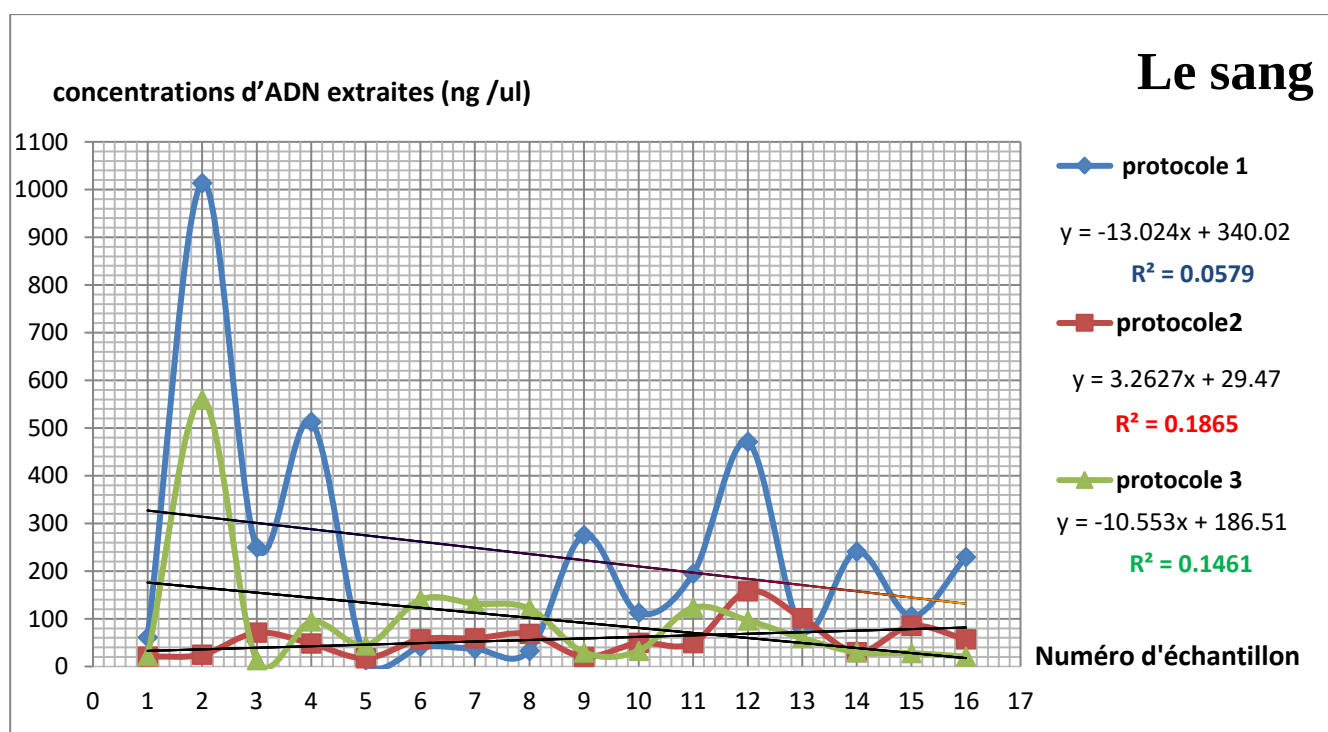


Figure 2. Illustration des concentrations d'ADN extraites en fonction des volumes sanguin employés dans les trois protocoles

On observe une très grande variabilité dans les concentrations d'ADN obtenues pour les trois méthodes. Très bonne concentration pour l'échantillon S2 de protocole1 se distingue par une concentration exceptionnellement élevée (1013.7 ng/μL) (tableau 3). Cependant, plusieurs échantillons ont des concentrations relativement faibles (inférieures à 100 ng/μL), ce qui pourrait poser problème pour certaines applications en aval nécessitant de grandes quantités d'ADN.

En générale, le protocole 1 présente une concentration moyenne d'ADN de 229,32 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, indiquant une d'extraction efficace. En revanche les protocoles 2 et 3 donnent des concentrations plus faibles que le premier protocole, témoignant d'un faible rendement d'extraction ou d'une perte d'ADN pendant les étapes de purification.

Des régressions linéaires entre le volume du sang (x : μL) et le rendement en ADN (y : ng) n'existaient pas pour les trois méthodes (R^2 est très faible) (figure2) Donc, Il n'y a pas de corrélation directe et systématique entre le volume de sang initial et la concentration finale d'ADN. Cela suggère que d'autres facteurs, comme la richesse cellulaire du sang (nombre de leucocytes) de chaque individu ou l'efficacité du protocole pour cet échantillon spécifique, ont eu un impact plus important que le volume de départ

b. Pureté de l'ADN

Afin d'évaluer la pureté de l'ADN extrait par les trois méthodes différentes, l'absorbance a été mesurée aux longueurs d'onde de 230, 260 et 280 nm, et le rapport de ces absorbances a été calculé pour estimer la pureté relative des échantillons d'essai. Les rapports A260/ A280 et A260/A230 sont résumés dans le tableau 4

Le ratio A260/A280 optimal pour l'ADN pur se situe entre 1,8 et 2,0. L'analyse des résultats révèle des performances variables selon les protocoles d'extraction utilisés.

Le protocole 1 démontre une efficacité satisfaisante avec un ratio moyen de 1,7554 (gamme : 1,66-1,81), où la majorité des échantillons atteignent ou approchent les valeurs de référence (Tableau 1). Cette performance confirme que la méthode SDS-buffer/Salting-out permet une élimination efficace des protéines, qui constituent le principal contaminant du sang.

En revanche, le protocole 2 présente des ratios considérablement inférieurs aux standards, avec des moyennes de 1,35 et 1,12 (tableau 5), suggérant une contamination substantielle par les protéines, les sels ou d'autres composés organiques.

Concernant le protocole 3, les résultats sont hétérogènes : seule une fraction des échantillons atteint les valeurs optimales, indiquant une purification variable mais acceptable des protéines, sels et autres contaminants organiques pour certains échantillons.

Ces différences de performance soulignent l'importance du choix du protocole d'extraction en fonction des exigences de pureté requises pour les applications en aval comme la PCR.

c. Qualité de l'ADN

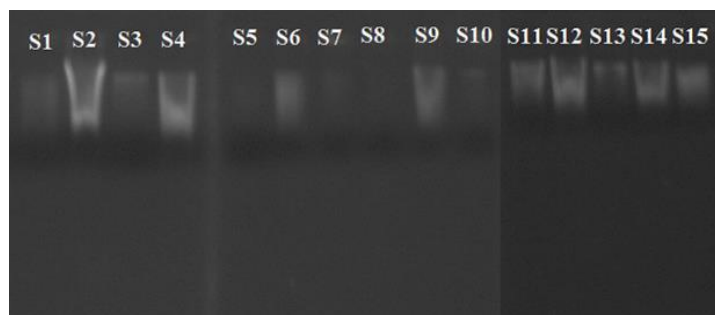


Photo1. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait du sang humain selon le protocole SDS-buffer/Salting-out, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.

L'analyse électrophorétique montre que l'ADN extrait selon le protocole SDS-buffer/Salting-out présente un ADN dégradé migrerait en une traînée diffuse vers le bas du gel des échantillons S2, S4, S6, S9, S11, S12 et S14. Dans les pistes S1, S5, S7, S8 et S10 aucune bande nette n'est visible. En revanche, les échantillons S3, S13 et S15 affichent un signal faible.

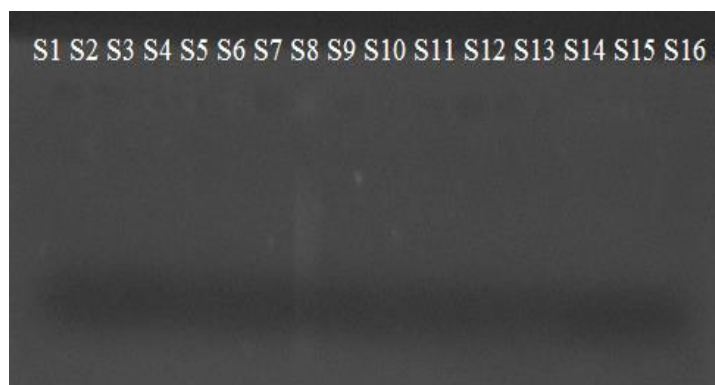


Photo 2. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait du sang humain selon le protocole SDS-buffer/Phénol-Chloroforme, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.

Pour la majorité des puits, de S1 à S16, aucune bande d'ADN n'est clairement visible. Le gel apparaît globalement noir et vide de fluorescence. Cette observation suggère que le protocole SDS-buffer/Phénol-Chloroforme, tel qu'appliqué à ces échantillons de sang, a donné un rendement d'extraction d'ADN extrêmement faible. Les quantités d'ADN, si elles existent, sont en dessous du seuil de détection visuelle du Safe Green sur ce gel.



Photo 3. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait du sang humain selon le protocole CTAB buffer/ Phénol-Chloroforme, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.

Présence de bandes d'ADN dans la majorité des puits, de nombreuses bandes d'ADN sont visibles sur ce gel, particulièrement de S2, S4 à S12 environ, et de façon plus faible jusqu'à S16. Les bandes d'ADN sont principalement localisées dans la partie supérieure du gel, indiquant haut poids moléculaire. Cela indique que l'ADN extrait est majoritairement intègre et peu dégradé. La présence de bandes distinctes et non de "smearing" (traînée diffuse) sur l'ensemble du puits confirme une bonne qualité de l'ADN extrait.

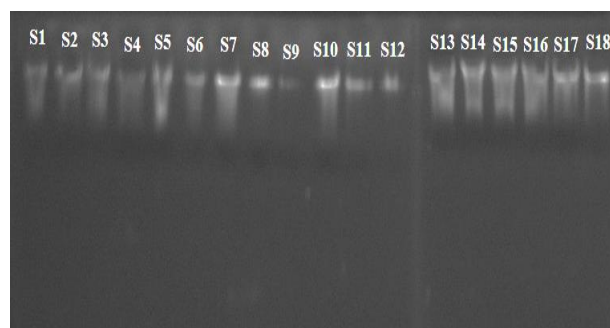


Photo 4. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait du sang humain par le kit QIAGEN, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.

Le profil montre la présence de bandes d'ADN dans la majorité des puits de S1 à S18, montre des bandes d'ADN visibles. Cela indique que le kit QIAGEN est efficace pour extraire l'ADN du sang humain. Bandes intenses et compactes en haut du gel, caractéristiques d'ADN génomique intact de haut poids moléculaire et donc très peu dégradé. La présence de bandes distinctes plutôt que de traînées diffuses (smearing prononcé) sur l'ensemble du puits confirme une bonne intégrité de l'ADN génomique. L'intensité des bandes est relativement uniforme et bonne à travers la plupart des échantillons (ex: S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8,

S10, S13, S14, S15, S16, S17, S18). Quelques puits (ex: S9, S11, S12) semblent avoir une intensité légèrement inférieure, suggérant un rendement un peu plus faible pour ces échantillons spécifiques, mais l'ADN reste visible. On observe très peu de smear (traînée) en dessous des bandes principales, ce qui indique une faible dégradation de l'ADN et une pureté acceptable.

3.1.1.2. 2^{ème} tissu : Les acridiens (Les criquets)

a. Quantité de l'ADN

La quantité de l'ADN extrait par les trois méthodes ont été répertoriés dans le tableau 5

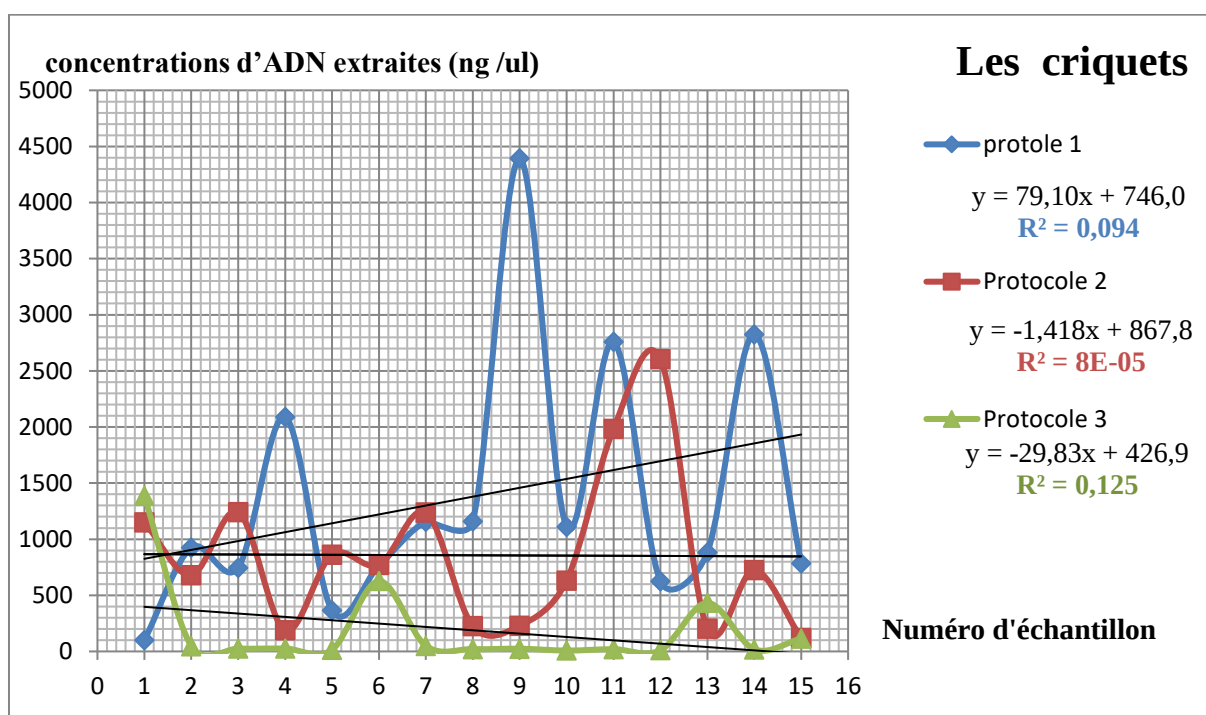


Figure 3 Représentation graphique des concentrations d'ADN extraites à partir des criquets en fonction des masses employés dans les trois protocoles

L'analyse des concentrations d'ADN extraites à partir d'échantillons de criquets, mesurées par le Nano Drop et regroupées dans le tableau 4, met en évidence des différences importantes entre les trois protocoles utilisés. Le protocole 1 (SDS-buffer / Salting-out) permet d'obtenir les concentrations les plus élevées en ADN pour la majorité des échantillons, avec une moyenne de concentration atteignant 1378,91 ng/μL. Certains échantillons, comme C9 et C14, présentent des valeurs exceptionnellement élevées (jusqu'à 4392,8 ng/μL). Cependant, cette méthode montre également une forte variabilité des résultats entre les échantillons, ce qui peut indiquer une sensibilité à la qualité biologique ou au traitement du matériel de départ. Le protocole 2 (SDS-buffer/Phénol-Chloroforme), bien que produisant une moyenne de concentration inférieure (856,51 ng/μL), présente une distribution plus homogène, avec quelques valeurs élevées (jusqu'à 2605,4 ng/μL). En revanche, le protocole 3 (CTAB-buffer/Phénol-Chloroforme) est globalement le moins performant, avec une moyenne de concentration nettement inférieure (188,34 ng/μL), malgré quelques exceptions ponctuelles (notamment C1 et C6).

Le graphe illustre les concentrations d'ADN obtenues à partir de des criquets selon trois protocoles d'extraction différents. Les coefficients de détermination (R^2) calculés pour les régressions linéaires associées à chaque protocole sont très faibles (0,094 pour le protocole 1, 0,00008 pour le Protocole 2 et 0,125 pour le Protocole 3) (figure 3), cela indique qu'il n'existe pas de relation linéaire significative entre les concentrations d'ADN extrait et le poids des échantillons analysés.

b. Pureté de l'ADN

L'analyse des ratios d'absorbance 260/280 et 260/230 obtenus pour les trois protocoles d'extraction d'ADN met en évidence des différences notables en termes de pureté des échantillons. Le protocole 1 présente les meilleurs résultats, avec des moyennes de valeurs 2,02 pour le ratio 260/280 et de 2,07 pour le ratio 260/230 (tableau 5). Ces ratios se situent dans la gamme optimale, attestant d'une pureté satisfaisante de l'ADN. À l'inverse, le protocole 2 présente des ratios plus faibles (1,67 pour 260/280 et 1,11 pour 260/230) (tableau 5), traduisant une contamination modérée, notamment par des solvants ou des sels résiduels. Le protocole 3 affiche les ratios les plus bas (1,48 pour 260/280 et 1,09 pour 260/230), ce qui révèle une contamination importante, à la fois protéique et organique.

c. Qualité de l'ADN

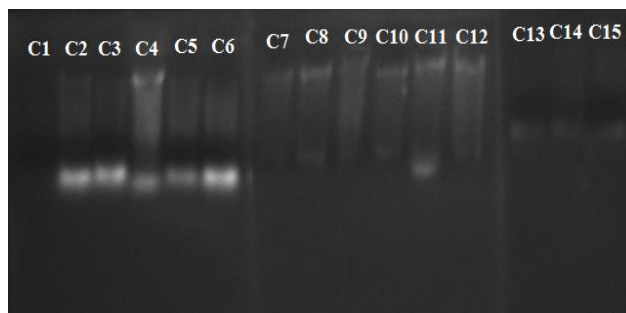


Photo 5. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait des criquets selon le protocole SDS-buffer/Salting-out, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.

Présence de bandes d'ADN dans quelques puits. De nombreuses bandes nettes sont visibles, à partir de C8 jusqu'à C12 et en particulier pour l'échantillon C4. L'absence de bande d'ADN dans le puits C1 et les puits restants montrent de l'ADN dégradé

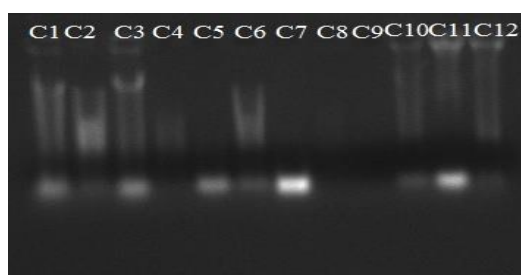


Photo 6. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait des criquets selon le protocole SDS-buffer/Phénol-Chloroforme, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.

Des bandes d'ADN sont visibles dans certains puits, en particulier pour les échantillons C1, C3, C10, C11 et C12, ce qui indique une extraction partiellement réussie avec le protocole SDS-buffer/Phénol-Chloroforme. Toutefois, une variation notable d'intensité est observée entre les autres échantillons, avec des signaux très faibles ou absents, suggérant une faible concentration en ADN et une dégradation partielle.

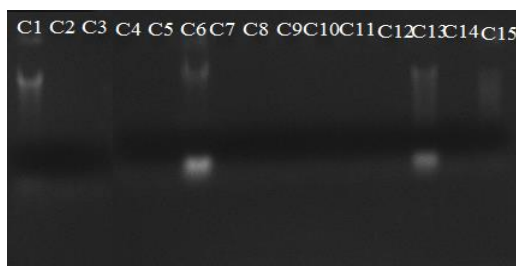


Photo 7. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait des criquets selon le protocole CTAB buffer/ Phénol-Chloroforme, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.

La majorité des puits présentent des bandes très peu intenses, voire absentes, traduisant une faible concentration ou une dégradation importante de l'ADN. Toutefois, Des bandes d'ADN sont observées dans quelques échantillons, notamment C1, C6, C11 et C13 et C15 ce qui suggère une extraction partiellement efficace du matériel génétique (ADN).

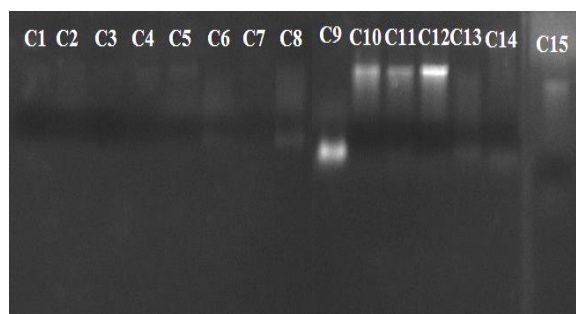


Photo 8. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait des criquets selon le protocole CTAB buffer/ Phénol-Chloroforme, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green

Le profil (photo 8) montre une hétérogénéité importante dans l'efficacité d'extraction entre les différents échantillons de criquets. Il y a une grande variabilité dans les rendements d'extraction. Certains échantillons (C1-C8) ont donné un très faible rendement, tandis que d'autres (C10-C12 et C15) ont eu de bons rendements. Pour les échantillons où l'ADN est bien visible (C10-C12 et C15), l'intégrité est globalement satisfaisante (ADN de haut poids moléculaire).

3.1.1.3. 3^{ème} tissu : les lombrics

a. Quantité de l'ADN

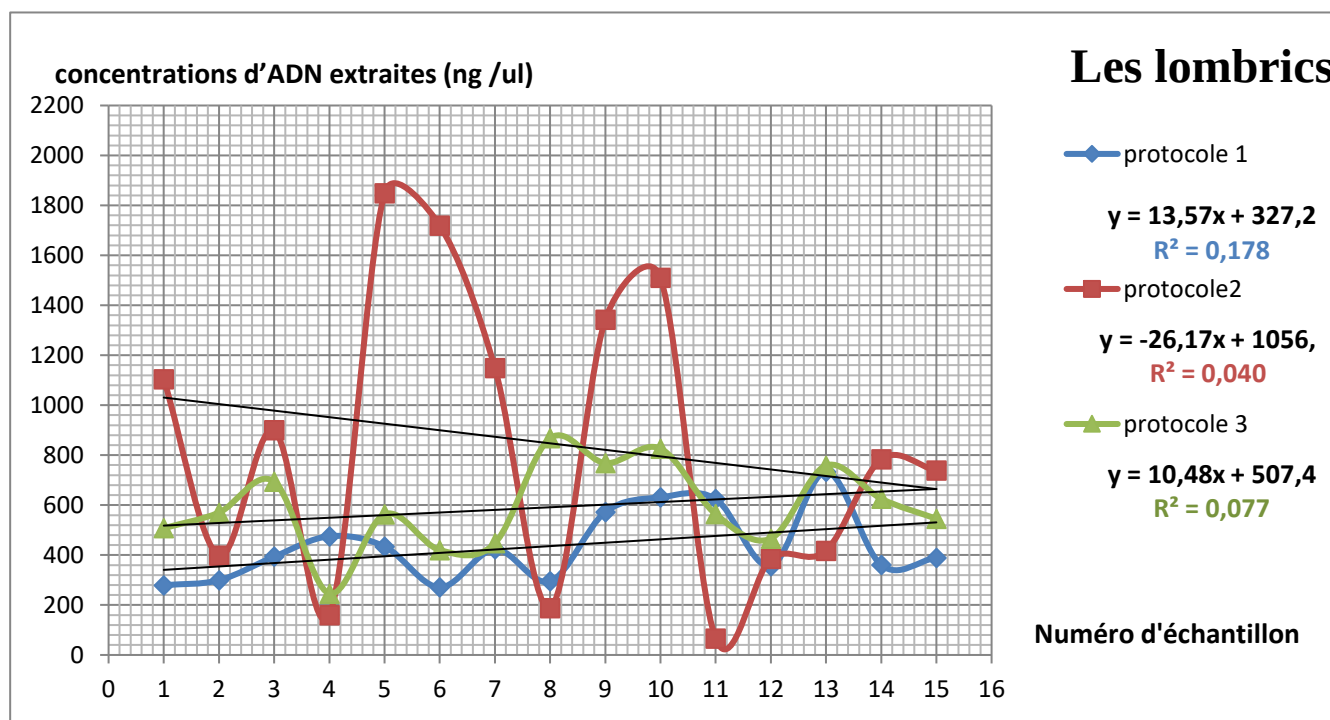


Figure 4. Graphe présente les concentrations d'ADN obtenues à partir de lombrics en utilisant trois protocoles d'extraction différents

L'analyse des concentrations d'ADN obtenues à partir des échantillons de lombrics met en évidence des différences notables selon le protocole d'extraction utilisé. Le protocole SDS-buffer/Salting-out montre une moyenne de la concentration la plus faible, avec 435,84 ng/μL, avec une variabilité relativement contenue (intervalle de 270,75 à 733,40 ng/μL) (tableau 4). En revanche, le protocole SDS-buffer/Phénol-Chloroforme se distingue par la meilleure performance en termes de concentration, avec une moyenne de concentration 847,38 ng/μL, et large un intervalle des valeurs de concentration (de 65,4 à 1849,2 ng/μL) selon les échantillons. Enfin, le protocole CTAB buffer/Phénol-Chloroforme affiche une moyenne de concentration 591,36 ng/μL, avec un intervalle de 245,85 à 867,90 ng/μL. Bien qu'il présente une meilleure régularité entre les échantillons, suggérant une extraction plus stable.

Le graphe de la figure 4 met en évidence les tendances de variation des concentrations d'ADN en fonction des poids des vers de terre utilisés dans les trois protocoles. Les équations de régression et les coefficients de détermination (R^2)

confirment ces observations : le protocole 1 montre une corrélation légèrement meilleure avec un R^2 de 0,178, suivi par le protocole 3 ($R^2 = 0,077$). En revanche, le protocole 2 présente une grande variabilité, illustrée par un R^2 très faible de 0,040, traduisant une irrégularité marquée dans les concentrations obtenues.

b. Pureté de l'ADN

Les résultats présentés dans le tableau 8 montrent les ratios d'absorbance 260/280 et 260/230, obtenus selon trois protocoles d'extraction. Le protocole 1 (SDS-buffer/Salting-out) montre des ratios optimaux (260/280 moyen de 1,833 et 260/230moyen de 2,025) témoigne de la pureté de l'ADN extrait. Ainsi que le protocole 2 (SDS-buffer/Phénol-Chloroforme) affiche une moyenne identique au protocole 1 pour le ratio 260/280 (1,833), mais avec une valeur inférieure pour le ratio 260/230 (1,324), signalant une contamination plus importante par des solvants organiques. Par ailleurs, le protocole 3 (CTAB buffer/Phénol-Chloroforme) présente les meilleurs résultats globaux, avec une moyenne de 1,996 pour le ratio 260/280, et une moyenne de 1,766 pour le ratio 260/230, révélant une contamination modérée par des composés organiques.

c. Qualité de l'ADN

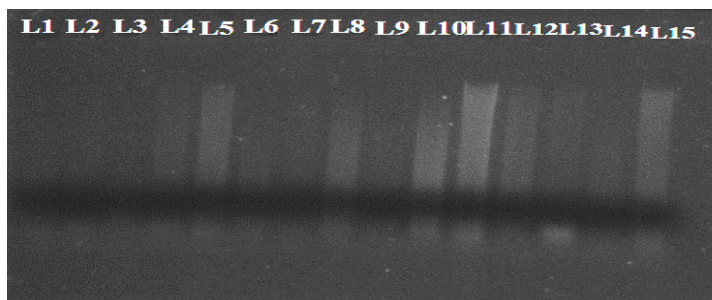


Photo 9. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait des lombrics selon le protocole SDS-buffer/Salting-out, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.

La photo 9 montre le profil électrophorétique des extraits d'ADN obtenus selon le protocole 1. Dans la majorité des puits (L1 à L15), les bandes observées sont très peu marquées, voire quasi invisibles, indiquant une faible intensité de fluorescence. Cette faible visibilité suggère que l'ADN extrait traduisant soit une faible concentration en ADN, soit une possible dégradation de celui-ci au cours du processus d'extraction.

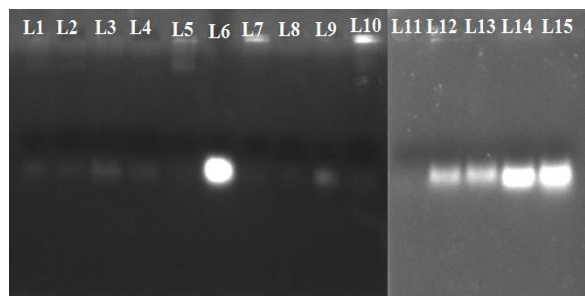


Photo 10. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait des lombrics selon le protocole SDS-buffer/Phénol-Chloroforme, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.

Le protocole SDS-buffer/Phénol-Chloroforme présente des performances variables en termes de rendement d'extraction. Certains échantillons (L6, L12-L15) génèrent des concentrations d'ADN satisfaisantes, tandis que d'autres (L1-L4, L9) affichent des rendements plus faibles (photo 10). Néanmoins, malgré ces variations quantitatives, l'intégrité de l'ADN constitue un problème majeur : l'ensemble de l'ADN extrait par cette méthode présente une dégradation complète, compromettant ainsi son utilisation pour les applications de biologie moléculaire ultérieures.

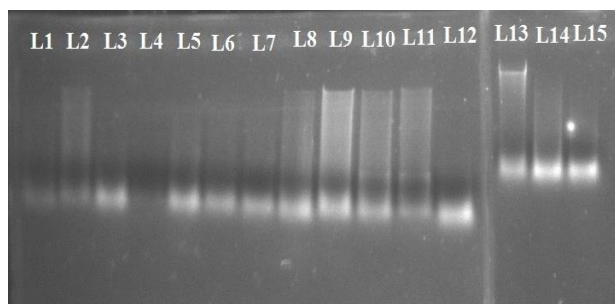


Photo 11. Profil électrophorétique de l'ADN total extrait des lombrics selon le protocole CTAB buffer/Phénol-Chloroforme, visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % coloré au Safe Green.

L'analyse électrophorétique (photo 11) révèle que l'ADN extrait à l'aide du protocole CTAB buffer/Phénol-Chloroforme est majoritairement dégradé, comme en témoigne la présence de traînées diffuses vers le bas du gel pour la plupart des échantillons L2,L5-L11 et L14. Les puits L1, L3, et L15 présentent des bandes indiquant une dégradation d'ADN. En revanche, l'échantillon L13 montre un signal faiblement visible.

3.1.2. Applications en Aval

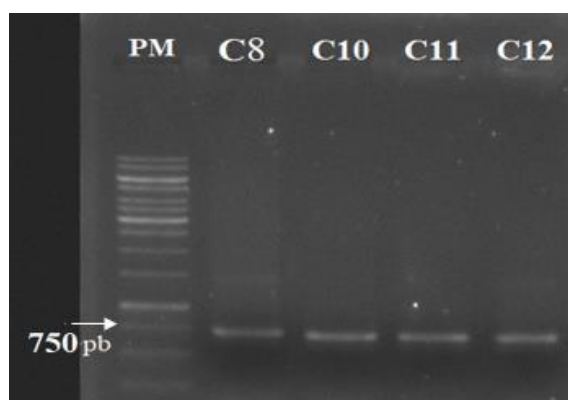


Photo 12. Photographie de profil électrophorétique représentant le produit de PCR correspondant au fragment cible de 669 pb du gène COI. Ces fragments ont été migrés sur gel d'agarose à 1% et visualisée sur UV après coloration au Safe Green. PM : marqueur de tai

Le gel d'agarose à 1% avec coloration au Safe Green présente le résultat de l'amplification PCR d'un fragment cible de 669 pb du gène COI (photo 12). Chacun de ces puits contient une bande unique, nette et bien définie. La position de ces bandes est légèrement en dessous de la bande de 750 pb du marqueur. Étant donné que le fragment cible attendu est de 669 pb, cette position est cohérente et attendue. L'intensité de la bande est bonne à très bonne pour tous ces échantillons (C8, C10, C11, C12 apparaît dans la photo 10 et (C3 de protocole 2, C10 de protocole1, C15 de protocole 3) non montré dans ce profil), ce qui indique un rendement d'amplification PCR élevé et réussi. L'absence de "smearing" (traînée diffuse) au-dessus ou en dessous de la bande cible indique une amplification spécifique et l'absence de produits de PCR non spécifiques ou de dégradation du produit. L'absence de "primer dimers" (bandes très faibles et rapides migrant en bas du gel, souvent autour de 50-100 pb) est un signe de bonne optimisation de la réaction PCR et d'une bonne concentration des amorces et de l'ADN cible.

3.2. Discussion

Une méthode efficace serait celle permettant d'extraire le rendement maximal d'ADN de manière constante sur des échantillons provenant d'un grand nombre d'individus, avec la plus grande pureté, en utilisant les matériaux les moins toxiques et dans les délais les plus courts. La rentabilité et la réduction de la charge de travail sont également des critères souhaitables pour le choix d'une méthode d'isolement idéale (Koshy L. et al., 2017).

Actuellement, plusieurs protocoles pour l'extraction d'ADN à partir de différents tissus sont disponibles, mais il est important de choisir un protocole qui nécessite peu de temps et de coût pour l'extraction d'ADN (Aljanabi & Martinez, 1997 ; M. Thomas et al., 2007 ; Chen et al., 2010).

3.2.1. Discussion de résultats expérimentaux

Le tableau 9 regroupe tous les critères : concentration, pureté (ratios 260/280 et 260/230) et intégrité de l'ADN extrait selon la méthode utilisée à partir du sang.

3.2.1.1^{er} tissu : le sang humain

Tableau 3. Analyse récapitulative des données d'extraction d'ADN sanguin générées par chaque méthode.

Méthode	Concentration moyenne (µg/µL)	Ratio 260/280	Ratio 260/230	Intégrité de l'ADN	Interprétation globale
SDS-buffer/Salting-out (Aljanabi et Martinez, 1997)	229,32	1,76	1,37	ADN dégradé	Bonne concentration, sans contamination protéique mais contamination importante des sels et des composés organiques. Dégradation marquée de l'ADN.
SDS-buffer/Phénol-Chloroforme (Chen et al., 2010)	57,20	1,35	1,11	ADN fortement dégradé	Faible concentration, pureté insuffisante, ADN très dégradé.
SDS-buffer/Phénol-Chloroforme (Chen et al., 2010)	11,49	1,25	0,50	ADN fortement dégradé	Très faible concentration, forte contamination, ADN inutilisable

CTAB buffer/Phénol- Chloroforme (Chen et al., 2010)	96,80	1,56	1,35	ADN Intact	Rendement modéré, contamination importante, ADN de bonne qualité.
QIAGEN Fast DNA Tissue Kit	745,67	1,84	1,68	ADN intact	Très bonne concentration, pureté élevée, ADN de haute qualité

Pour le sang, cette étude montre que le kit QIAGEN est le plus cher parmi les trois méthodes étudiées, mais le temps d'extraction requis est le plus court et c'est la méthode la plus sûre, l'ADN extrait par cette méthode est pur avec une concentration la plus élevée. Ce résultat est attendu et confirmé par un très grand nombre d'études telles que Chang et al. (2009), Lee et al. (2010), Koshy et al. (2017).

La méthode CTAB buffer/Phénol-Chloroforme donne ADN de bonne intégrité comparable de ce obtenu de kit, mais le problème est posé sur la pureté. De même, la méthode SDS-buffer/Salting-out produit de l'ADN pur mais en quantité et en intégrité insuffisantes. Donc, l'optimisation des différentes étapes peut conduire à améliorer ces méthodes pour produire de l'ADN répondant aux exigences des applications en aval.

Néanmoins, l'ADN extrait selon le protocole SDS-buffer/Phénol-Chloroforme s'avère incompatible avec les standards de qualité et de quantité requis pour les analyses de biologie moléculaire.

3.2.1.2.2^{ème} tissu : tissu musculaire des criquets

Tableau 4. Analyse récapitulative des données d'extraction d'ADN des criquets générées par chaque méthode.

Méthode	Concentration moyenne (ng/µl)	Ratio 260/280	Ratio 260/230	Intégrité de l'ADN	Interprétation globale
SDS- buffer/Salting- out (Aljanabi et Martinez, 1997)	1378,91	2,02	2,07	ADN intact pour la moitié des échantillons	Très bon concentration, pureté élevée, ADN qualité acceptable
SDS- buffer/Phénol- Chloroforme (Chen et al., 2010)	856,51	1,67	1,11	ADN dégradé	Bon rendement, pureté moyenne, ADN partiellement dégradé

CTAB buffer/Phénol- Chloroforme (Chen et al., 2010)	188,34	1,48	1,09	ADN est absent dans la plupart des échantillons	Rendement faible, pureté suboptimale, ADN de qualité variable
QIAGEN Fast DNA Tissue Kit	170,62	1,28	0,22	ADN de qualité variable	concentration modeste, forte contamination, ADN intact pour quelques échantillons

Concernant l'extraction d'ADN à partir du tissu musculaire de criquets, notre analyse comparative des quatre méthodes testées a mis en évidence la supériorité du protocole SDS-buffer/Salting-out. Ce dernier a permis l'obtention de rendements élevés en ADN, accompagné d'une pureté acceptable. Cependant, l'intégrité de l'ADN n'était optimale que pour la moitié des échantillons, soulignant le besoin d'optimisations additionnelles. Ces résultats sont particulièrement encourageants compte tenu de l'utilisation exclusive de réactifs non toxiques, préservant ainsi la sécurité sanitaire et environnementale.

La méthode CTAB buffer/Phénol-Chloroforme génère un ADN de qualité et de pureté médiocres, résultats concordant avec les observations de Karbo et Meghazi (2019). Contre toute attente et contrairement à ce que rapportent des études antérieures (Paxton et al., 1996 ; Chen et al., 2010), la méthode SDS-buffer/Phénol-Chloroforme a produit un ADN dont la concentration était acceptable, mais dont la pureté et l'intégrité étaient compromises par une contamination et une dégradation importantes. Les performances du kit commercial se sont également inattendues.

Les résultats obtenus avec le kit commercial et la méthode SDS-buffer/Phénol-Chloroforme se s'explique vraisemblablement par des conditions de conservation inadéquates des échantillons, particulièrement ceux prélevés dans la région d'Adrar, ayant probablement compromis l'intégrité de l'ADN avant l'extraction.

3.2.1.3.3^{ème} tissu : tissu musculaire des vers de terre

Tableau 5. Analyse récapitulative des données d'extraction d'ADN des lombrics générées par chaque méthode.

Méthode	Concentration moyenne (ng/μl)	Ratio 260/280	Ratio 260/230	Intégrité de l'ADN	Interprétation globale
SDS- buffer/Salting- out (Aljanabi et	435,84	1,83	2,02	ADN dégradé	Concentration satisfaisante, bonne pureté, mais ADN est dégradé

Martinez, 1997)					
SDS- buffer/Phénol- Chloroforme (Chen et al., 2010)	847,37	1,83	1,32	ADN dégradé	Concentration importante, contamination remarquable par résidus organiques et ADN fragmenté
CTAB buffer/Phénol- Chloroforme (Chen et al., 2010)	591,35	1,99	1,76	ADN dégradé	Concentration satisfaisante, pureté acceptable, ADN de bonne qualité mais dégradé

À notre connaissance, la présente étude est la première à évaluer spécifiquement des méthodes d'extraction d'ADN à partir des vers de terre. Nos résultats démontrent que les trois protocoles examinés (SDS-buffer/Salting-out, SDS-buffer/Phénol-Chloroforme, et CTAB buffer/Phénol-Chloroforme) sont capables de produire de l'ADN en concentrations suffisantes. Cependant, un défi majeur réside dans la fragmentation notable de l'ADN observé. En termes de pureté, le protocole SDS-buffer/Salting-out a montré les performances les plus prometteuses.

Bien que ces résultats préliminaires soient encourageants, une optimisation approfondie des trois protocoles s'avère nécessaire pour améliorer simultanément les trois critères de qualité : concentration, pureté et intégrité de l'ADN. Cette optimisation pourrait inclure des ajustements des temps d'incubation, des concentrations de réactifs, ou des étapes de purification supplémentaires adaptées aux spécificités tissulaires des annélides.

3.2.1.4. Applications en Aval

Afin de compléter l'évaluation des méthodes d'extraction, l'aptitude de l'ADN à être amplifié a été testée par PCR en ciblant un fragment de 669 pb du gène COI. Cette approche de validation fonctionnelle permet d'évaluer la qualité de l'ADN extrait par sa capacité à servir de matrice pour les réactions de PCR. Étant donné que les amorces utilisées sont spécifiques aux acridiens et qu'il n'existait pas d'autres paires d'amorces disponibles pour les autres espèces, cette PCR a été appliquée exclusivement aux échantillons d'ADN de criquets. Seuls les échantillons d'ADN présentant une intégrité satisfaisante, identifiés via les profils électrophorétiques initiaux, ont été sélectionnés pour cette amplification.

Le profil électrophorétique est très positif et indique une amplification PCR hautement réussie pour le fragment cible du gène COI (669 pb) pour les échantillons testés. Les résultats sont de qualité suffisante pour valider la qualité de l'ADN extrait qui a servi de matrice pour ces amplifications. Cette approche méthodologique permet ainsi de corrélérer directement la qualité de l'ADN extrait avec sa fonctionnalité en biologie moléculaire.

3.2.2. Discussion des résultats statistiques

À la suite de la présentation des résultats, des analyses statistiques et de la description des protocoles, une interprétation des données a été réalisée en lien avec les différentes méthodes d'extraction. Cette étude statistique a rigoureusement examiné l'impact de plusieurs variables clés sur la performance des extractions biologiques, en particulier en ce qui concerne la pureté et la concentration d'ADN extraits. Les analyses, comprenant des statistiques descriptives, le test de Mann-Whitney U, le test du Chi2 et des analyses de variance (ANOVA), ont mis en évidence des interactions complexes et des relations statistiquement significatives. Ces résultats sont essentiels pour orienter l'optimisation des protocoles en laboratoire et améliorer leur efficacité.

3.2.2.1. Relation entre protocole et pureté

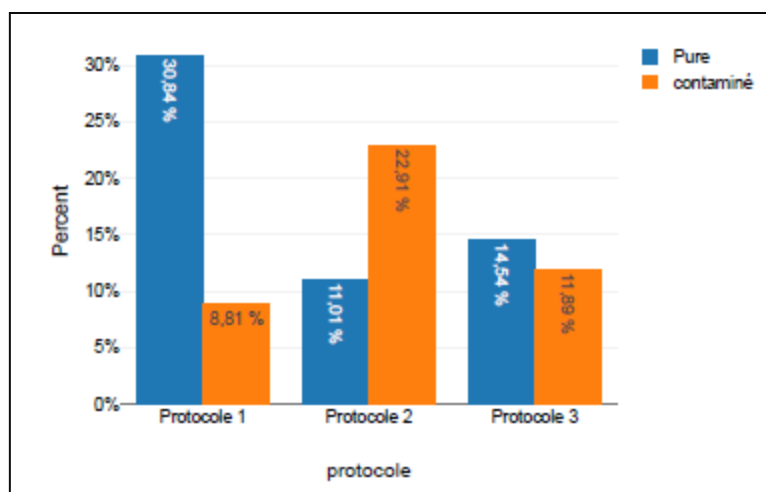


Figure 5. Histogramme illustre la relation entre le protocole et la pureté

Les résultats du test du Chi-carré ($\text{Chi}^2 = 34,71$, $\text{df} = 2$, $p < 0,001$) indiquent clairement que la **pureté est dépendante du protocole utilisé**. En examinant les statistiques descriptives pour "Protocole et Pureté".

Protocole 1, SDS-buffer/Salting-out, ce protocole a donné 70 (30,84 %) échantillons purs et seulement 20 (8,81 %) échantillons contaminés sur un total de 90 échantillons traités avec ce protocole. Cela suggère que le protocole 1 est très efficace pour obtenir des échantillons purs.

Par ailleurs, **le protocole 2, SDS-buffer / Phénol-Chloroforme**, a donné 25 (11,01 %) échantillons purs, mais un nombre considérablement plus élevé d'échantillons contaminés, 52 (22,91 %), sur un total de 77 échantillons. Cela suggère que le protocole 2 est moins efficace que le protocole 1 pour atteindre la pureté et est associé à une probabilité plus élevée de contamination. Tandis que **le protocole 3, CTAB buffer/Phénol-Chloroforme**, ce protocole a donné 33 (14,54 %) échantillons purs et 27 (11,89 %) échantillons contaminés sur un total de 60 échantillons. Bien que meilleur que le protocole 2 en termes de ratio pur/contaminé, il est toujours moins efficace pour produire des échantillons purs que le protocole 1

3.2.2.2 Relation entre tissu et pureté

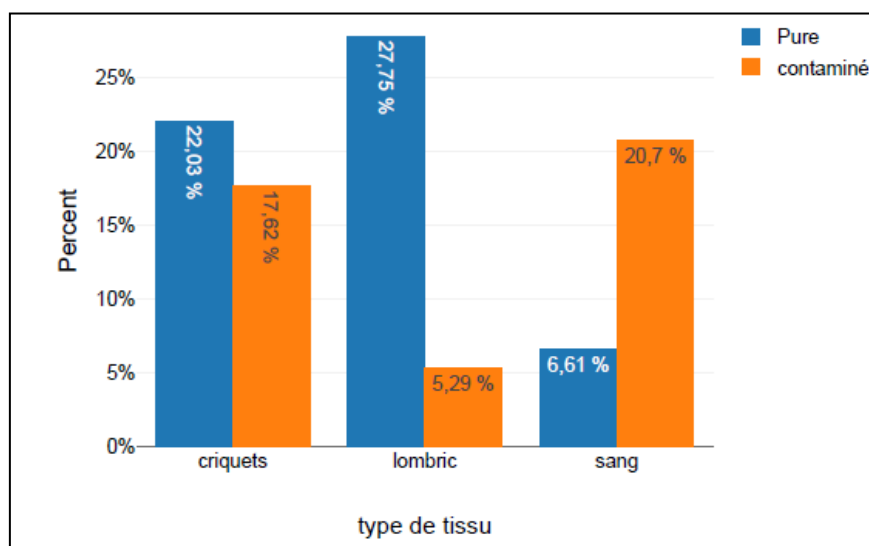


Figure 6. Histogramme en barres illustre la relation entre le tissu et la pureté

Sur 227 échantillons, 128 (56,39 %) étaient purs et 99 (43,61 %) étaient contaminés, les échantillons testé par Test de Mann-Whitney, ce test a montré qu'il existe une différence significative entre les groupes "pure" et "contaminé" en ce qui concerne le type de tissu (p -value exacte = 0,008). Cela signifie que la nature du tissu d'origine influence fortement si un échantillon sera pur ou contaminé.

Les échantillons de "lombric" avaient la plus forte proportion d'échantillons purs (63 purs contre 12 contaminés). Tant que les échantillons de "sang" montraient la tendance

inverse, avec une majorité d'échantillons contaminés (47 contaminés contre 15 purs). Alors que, les échantillons de "criquets" étaient plus équilibrés mais légèrement plus purs (50 purs contre 40 contaminés).

3.2.2.3. Relation entre concentration, tissus et protocole

Analyses ANOVA

Source	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F	p
Type de tissu	31 179 518,14	2	15 589 759,07	41,32	< 0,001
Résidu	84 508 028,35	224	377 267,98		
Total	115 687 546,49	226			

L'hypothèse alternative a été acceptée, ce qui signifie qu'il existe une différence significative dans la concentration en fonction du type de tissu. Autrement dit, la concentration de la substance extraite varie selon qu'elle provient de criquets, de lombric ou de sang.

Source	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F	p
Protocole	1 086 904,44	2	543 452,22	1,06	0,347
Résidu	11 460 0642,06	224	511 610,01		
Total	115 687 546,49	226			

Tandis qu'il n'y a pas d'effet du protocole sur la concentration (l'hypothèse nulle est acceptée). Cela signifie que les différents protocoles d'extraction ne conduisent pas à des concentrations significativement différentes de la substance extraite. Le choix du protocole n'impacte donc pas la quantité finale, mais seulement la pureté.

Conclusion

Conclusion

L'extraction et la purification des acides nucléiques représentent des étapes fondamentales dans les protocoles de biologie moléculaire. La concentration et la pureté des acides nucléiques extraits sont des critères déterminants pour assurer la sensibilité, la spécificité et la reproductibilité des analyses en aval, telles que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) ou le séquençage de l'ADN.

L'objectif de notre travail par cette approche, à mettre en place une méthodologie rigoureuse et reproductible, susceptible de fournir une base solide pour la comparaison objective des performances d'extraction en termes de rendement, de pureté et d'intégrité structurale de l'ADN. Les extractions réalisées selon les méthodes d'extraction SDS-buffer/Salting-out, SDS-buffer / Phénol-Chloroforme, CTAB buffer/Phénol-Chloroforme et kit QIAGEN ont été soumises à une évaluation comparative portant sur la quantité et la qualité de l'ADN génomique isolé. La validation fonctionnelle de l'ADN extrait a été assurée par amplification par PCR.

Alors que le kit QIAGEN est idéal pour le sang, le SDS-buffer/Salting-out est préférable pour le tissu musculaire des criquets. Les résultats obtenus avec les vers de terre indiquent que les protocoles nécessitent une optimisation pour améliorer l'intégrité de l'ADN. L'étude met en lumière l'importance d'adapter la méthode d'extraction aux caractéristiques du tissu pour obtenir un ADN de qualité et en quantité adéquate pour les applications en biologie moléculaire.

Bien que ce travail ait pu être mené à terme, il a été réalisé dans un délai relativement court, ce qui a limité la profondeur de certaines analyses. Malgré ces contraintes, les résultats obtenus sont encourageants et permettent d'envisager plusieurs perspectives intéressantes. Dans le but d'assurer la continuité du travail et de renforcer la fiabilité des résultats, nous suggérons les perspectives suivantes :

- **Optimiser les protocoles d'extraction d'ADN**, afin d'améliorer à la fois la qualité (pureté) et la quantité d'ADN obtenue
- **Explorer des applications en aval**, telles que le séquençage ou la création de banques génomiques, pour évaluer leur compatibilité et leur efficacité dans des contextes de biologie moléculaire appliquée.

- **Élargir le champ d'expérimentation** à un plus grand nombre d'échantillons et de matrices biologiques pour renforcer la robustesse des conclusions.

Annexe1

1.1 Matériels utilisés pour l'extraction d'ADN

➤ Equipements utilisé

Equipment	La marque
Bain Marie	memmert
Centrifuge	SIGMA
Centrifuge réfrigéré (4C°)	Hettich MIKRO200R
Congélateur (-20C°)	Haier
Vortex	Vortex
Cuved' électrophorèse	MAX FILL
Générateur	ELECTROPHORESIS POWER SUPPLY
Incubateur (37C°)	memmert
Micropipettes	Epindorf
Nano Drop	IMPLEN N60 Touch
Balance précise	KERN ABT 220-50M
Thermocycleure	Prime
Apparail photo	SONY DOC-PRINT VX2

➤ Matériels consommable

- Tubes EDTA6ml.
- Micro-tubes Epindorf de 1.5- 2 ml
- Micro cônes stériles (bleus, jaunes et blancs) de : • 1-10 µL • 20-200 µL • 100-1000 µL.

1.2.Produits et solutions utilisés

Produits	Marque
NH ₄ Cl : 155 mM	Honeywell Fluka
NaHCO ₃ : 12 mM	RIEDEL-DE HAEN AGSEELZE-HANNOVER
EDTA : 0,1 mM	SIGMA
Protéinase K (20 mg/ml)	SIGMA
Ethanol absolu, Ethanol 70%	BIOCHEM
Phenol / Chloroforme / alcool isoamyl	BIOCHEM
Agarose	SIGMA
Intercalent du gel	Safe Green

Annexe 2

Extraction de l'ADN par KIT QIAGEN Fast DNA Tissue Kit (50)

C'est un kit commercialisé pour la purification d'ADN. Le protocole a été extrait à partir de manuel de Kit utilisé (QIAMPfast DNA tissu Kit Handbook, for rapide purification of DNA from tissue samples .07/2015)

- Peser et couper l'échantillon de tissu à une taille appropriée (5 à 25 mg), puis placer dans le tube de perturbation des tissus. En général, il n'est pas nécessaire de couper le tissu en petits morceaux avant la perturbation. Pour des échantillons particulièrement résistants, tels que les queues de rongeurs ou tous les tissus stabilisés par la protection, cela peut augmenter l'efficacité de la perturbation pour couperle tissu en petits morceaux avant de procéder à la perturbation ;
 - Ajouter les tampons et enzymes suivants : 200 µL d'AVE, 40 µL VXL, 1 µL de réactif DX ,20 µL de protéinase K, 4 µL d'ARNase A (100 mg/ml). Fermez bien le couvercle et mélangez ;
 - Homogénéiseren utilisant l'une des trois options suivantes :
- a.**Vortex avec adaptateur de tube de 2 ml approprié : Pleine vitesse pendant 5 min
- b.**TissueLyser II avec adaptateur Tissue Lyser Jeu 2 x 24: 24 Hz pour 30 s
- c.**TissueLyser LT : 45 Hz pendant 2 min

Remarque : On a utilisé l'option **a**.

- Incuber dans un thermo mixeur à 1000 tr/min pendant 10 min à 56°C.
- Si le lysat est homogène après l'étape 4, procédez directement à l'étape 6. S'il reste encore du tissu résiduel après l'étape 4, répétez les étapes 3 et 4 une seule fois avec les mêmes réglages que pour la première homogénéisation. S'il reste du tissu résiduel après la répétition des étapes 3 et 4, augmentez le temps d'incubation jusqu'à 1 h (1 000 tr/minà 56 °C). Évitez les périodes d'incubation plus longues. Procédez à l'étape 6 même s'il reste du tissu résiduel après une incubation prolongée ;
- **Remarque :** On n'a pas un thermo mixeur, donc les échantillons ont été incubés dans bain marie 55°C pendant 1 heure.
- Ajoutez 265 µL de tampon MVL et mélangez par pipetage ou vortex ;

- Appliquez le mélange de l'étape 6 sur la mini colonne de rotation QIAAMP et centrifuger pendant 1 min. Placez la colonne QIAamp Mini Spin dans un tube de collecte propre de 2 ml et jetez le tube contenant le filtrat ;
- Ajoutez 500 µL de tampon AW1 à la colonne de rotation et à la centrifugeuse. Placez la colonne de rotation dans un nouveau tube de collecte de 2 ml ;
- Ajoutez 500 µL de tampon AW2 à la colonne de rotation et à la centrifugeuse. Placez la colonne de rotation dans un nouveau tube de collecte de 2 ml ;
- Centrifuger pendant 2 min. Placez la colonne de rotation dans un tube de micro-centrifugeuse propre de 1,5 ml. 11. Ajouter 50 à 100 µL de plats directement sur la membrane de la colonne de spin, incubé à température ambiante pendant 1 min, puis centrifuger pendant 1min.

Annexe 3

Tableau 6. Les concentrations d'échantillons sanguins obtenues par le Nano Drop et les volumes correspondants utilisés pour l'extraction de l'ADN pour chaque protocole

Protocole1 : SDS- buffer/Salting-out			Protocole 2 : SDS- buffer/Phénol-Chloroforme			Protocole 3 : CTAB buffer/ Phénol-Chloroforme			Protocole 4 : KIT QIAGEN Fast DNA Tissue		
E	V (µL)	[C] (ng/µL)	E	V (µL)	[C] (ng/µL)	E	V (µL)	[C] (ng/µL)	E	V (µL)	[C] (ng/µL)
S1	2945	61,15	S1	2000	20,7	S1	2000	22	S	2000	840,1
S2	2000	1013,7	S2	1365	24,9	S2	2000	559.95	S2	3000	1353,4
S3	2000	249,55	S3	2000	70,85	S3	2000	13.25	S3	2000	805,65
S4	1800	512,8	S4	2000	48,05	S4	3000	94.85	S4	2000	1125,7
S5	1000	13,55	S5	1980	17,5	S5	2000	44.35	S5	3000	529,6
S6	3000	41,45	S6	1940	56,75	S6	2000	140.45	S6	1000	409,85
S7	2450	37,15	S7	3000	59,15	S7	3000	131.6	S7	3000	789,7
S8	2000	33,1	S8	1920	68,05	S8	2000	121.5	S8	4000	1221,7
S9	2000	275,00	S9	1000	20,3	S9	3000	26 ,9	S9	2000	858,75
S10	1800	112,35	S10	2980	49,25	S10	2000	33.05	S10	2000	546,4
S11	2000	194,45	S11	1000	48,8	S11	1000	123.45	S11	2000	1111

S12	2000	470,95	S12	2000	157,8	S12	2000	96.8	S12	2000	394,55
S13	1500	78,3	S13	2000	101,2	S13	3000	59.35	S13	1000	500,65
S14	2400	240,95	S14	2000	30,05	S14	3000	29.9	S14	2000	489,3
S15	1825	105,4	S15	2805	85,05	S15	3000	28.2	S15	2000	452,35
						S16	3000	20.55	S16	3000	810,2
									S17	2000	749,8
									S18	3000	433,5
M		229,32			57.20			96.80			761,94
inte valle		13,55- 1013,7			17,5- 157,8			22- 559.95			394,55 – 1353,4

Tableau 7. Les ratios (260/280 et 260/230) d'échantillons sanguins obtenues par le Nano Drop et les volumes correspondants utilisés pour l'extraction de l'ADN pour chaque protocole.

Protocole1 : SDS- buffer/Salting-out			Protocole 2 : SDS- buffer/Phénol- Chloroforme			Protocole 3 : CTAB buffer/Phénol- Chloroforme			Protocole 4 : KIT QIAGEN Fast DNA Tissue		
V (µL)	260/280	260/230	V (µL)	260/280	260/230	V (µL)	260/280	260/230	V (µL)	260/280	260/230
2945	1.653	0.992	2000	1.562	0.981	2000	1.41	0.481	2000	1,878	2,130
2000	1.891	2.18	1365	1.233	1.124	2000	1.764	1.127	3000	1,885	2,210
2000	1.843	1.857	2000	1.401	1.243	2000	1.199	0.313	2000	1,866	1,361
1800	1.856	2.054	2000	1.406	1.414	3000	1.72	1.939	2000	1,879	2,137
1000	1.404	0.545	1980	1.259	0.696	2000	1.598	0.827	3000	1,862	1,875
3000	1.535	0.831	1940	1.4	1.486	2000	1.808	2.855	1000	1,844	0,481
2450	1.633	1.007	3000	1.291	0.413	3000	1.804	2.681	3000	1,646	1,431
2000	2.218	0.499	1920	1.361	1.033	2000	1.771	2.479	4000	1,879	2,209
2000	1.832	1.96	1000	1.201	0.749	3000	1.244	0.641	2000	1,872	2,027
1800	1.706	1.335	2980	1.34	1.182	2000	1.412	0.704	2000	1,861	1,968
2000	1.761	1.455	1000	1.356	1.1	1000	1.685	2.527	2000	1,883	2,018
2000	1.845	2.089	2000	1.396	1.418	2000	1.76	1.987	2000	1,847	1,604
1500	1.668	1.202	2000	1.39	1.359	3000	1.646	1.332	1000	1,855	0,901
2400	1.761	1.474	2000	1.279	0.962	3000	1.541	0.645	2000	1,874	2,168
1825	1,725	1.007	2805	1.374	1.416	3000	1.288	0.633	2000	1,836	1,661

									3000	1,86	1,845
									2000	1,849	1,365
									3000	1,816	1,008
M	1,755	1,365		1,350	1,116		1,564	1,352		1,849	1,688
inter valle	1,404 – 1,891	0.408 – 2.089		1,201 – 1,562	0,696 – 1,486		1,244 – 1,808	0,313 – 2,855		1,816 – 1,885	0,481 – 2,210

Tableau 5. Les Concentrations d’ADN mesurées par Nano Drop et masses de tissus de criquets utilisées pour l’extraction, selon les trois protocoles d’extraction

Protocole1 : SDS- buffer/Salting-out			Protocole 2 : SDS- buffer/Phénol-Chloroforme			Protocole 3 : CTAB buffer/Phénol-Chloroforme			Protocole 4 : KIT QIAGEN Fast DNA Tissue		
E	P (mg)	[C] (ng/μL)	E	P (mg)	[C] (ng/μL)	E	P (mg)	[C] (ng/μL)	E	P (mg)	[C] (ng/ μL)
C 1	6,13	99,55	C 1	37,36	1149,6	C 1	53,23	1385,9	C 1	52,85	278,95
C 2	15,91	925,15	C 2	38,25	680	C 2	39,02	47,25	C 2	31,77	149,3
C 3	6,28	746,3	C 3	69,26	1242,2	C 3	4,2	25,65	C 3	55,2	278,95
C 4	36,39	2087,9	C 4	22,32	187,3	C 4	6,81	25,75	C 4	56,56	279,7
C 5	9,85	365,35	C 5	4,43	861,75	C 5	7,07	15,65	C 5	8,43	97,1
C 6	17,4	763,55	C 6	21,43	770,8	C 6	8,09	626,7	C 6	2,24	9,75
C 7	8,4	1155,2	C 7	51,91	1237,1	C 7	3,99	49,85	C 7	10,42	143,7
C 8	6,25	1158,6	C 8	5,84	225,35	C 8	3,36	21	C 8	7,15	58,15
C 9	39,39	4392,8	C 9	7,86	229	C 9	13,6	24,05	C 9	5,66	16,15
C 10	16,42	1111,2	C 10	9,8	630,5	C 10	14,65	7,85	C 10	8,12	60,45
C 11	16,61	2759,3	C 11	13,47	1982,4	C 11	15,75	19,8	C 11	9,39	99,05
C 12	21,4	626,1	C 12	12,33	2605,4	C 12	7,48	10,4	C 12	71,1	368,45
C 13	8,47	881,35	C 13	13,77	733,4	C 13	19,13	432,6	C 13	8,45	115,2
C 14	27,6	2825,5	C 14	16,11	360,25	C 14	9,46	18,65	C 14	292,67	366,75
C 15	15,9	785,8	C 15	30,39	389,55	C 15	19,97	114	C 15	46,26	237,75
M		1378,91			856,51			188,34			173,96
Interv alle		99,55 - 4392,8			187,32- 605,4			7,85 - 1385,9			9,75 – 368,45

Tableau 8. Mesures spectrophotométriques (Nano Drop) de la pureté des extraits d'ADN de criquets obtenus selon trois protocoles d'extraction

Protocole1 : SDS- buffer/Salting-out			Protocole 2 : SDS- buffer/Phénol-Chloroforme			Protocole 3 : CTAB buffer/Phénol- Chloroforme			Protocole 4 : KIT QIAGEN Fast DNA Tissue		
P (mg)	260/280	260/230	P (mg)	260/280	260/230	P (mg)	260/280	260/230	P (mg)	260/280	260/230
6,13	2,105	1,990	37,36	1,911	1,504	53,23	1,871	1,748	52,85	0,789	0,143
15,91	1,974	2,004	38,25	1,731	1,184	39,02	1,514	1,121	31,77	0,715	0,207
6,28	2,050	2,211	69,26	1,828	1,319	4,2	1,279	1,264	55,2	0,789	0,143
36,39	2,034	1,989	22,32	1,739	1,054	6,81	1,614	0,592	56,56	0,938	0,144
9,85	1,985	1,985	4,43	1,924	1,919	7,07	1,283	0,798	8,43	1,807	0,497
17,4	1,994	2,147	21,43	1,863	1,282	8,09	1,997	1,687	2,24	1,318	0,142
8,4	2,055	2,070	51,91	1,819	1,478	3,99	1,435	1,475	10,42	0,814	0,074
6,25	2,069	2,145	5,84	1,707	0,977	3,36	1,239	1,066	7,15	1,06	0,16
39,39	2,095	2,148	7,86	1,330	1,005	13,6	1,296	1,046	5,66	2,466	0,257
16,42	1,977	2,000	9,8	1,182	0,419	14,65	1,377	0,543	8,12	1,765	0,438
16,61	2,087	2,185	13,47	1,354	0,344	15,75	1,336	0,683	9,39	1,214	0,317
21,4	1,751	1,953	12,33	1,747	0,843	7,48	1,253	0,768	71,1	1,67	0,194
8,47	2,017	2,071	13,77	2,033	2,194	19,13	1,915	1,561	8,45	1,673	0,315
27,6	2,098	2,208	16,11	1,828	2,218	9,46	1,235	1,060	292,67	1,242	0,192
15,9	2,019	2,036	30,39	1,819	2,082	19,97	1,591	1,025	46,26	0,964	0,124
M	2,02	2,07		1,67	1,11		1,48	1,09		1,281	0,223
Interv alle	1,751 - 2,105	1,953- 2,211		1,330 - 2,033	0,344 - 2,218		1,235 - 1,997	0,592 - 1,748		0,715 - 2,466	0,074 0,497

Tableau 9. Les Concentrations d'ADN mesurées par Nano Drop et masses de tissus de lombrics utilisées pour l'extraction, selon les trois protocoles d'extraction

Protocole1 : SDS-buffer/Salting-out			Protocole 2 : SDS-buffer/Phénol- Chloroforme			Protocole 3 : CTAB buffer/Phénol- Chloroforme		
E	P (mg)	[C] (ng/μL)	E	P (mg)	[C] (ng/μL)	E	P (mg)	[C] (ng/μL)
L 1	22,93	279,20	L 1	70,39	1103,7	L 1	10,95	507,50
L 2	17,53	299,25	L 2	37,33	397,65	L 2	5,67	570,15
L3	31,28	393,55	L 3	65,72	900,2	L 3	10,82	693,85
L 4	23,51	475,30	L 4	65,7	160,05	L 4	6,85	245,85
L 5	35,37	434,30	L 5	72,06	1849,2	L 5	8,15	563,2

L 6	29,06	270,75	L 6	95,44	1719,7	L 6	5,93	420,2
L 7	16,93	423,00	L 7	42,8	1148,8	L 7	4,43	447,8
L 8	20,28	295,10	L 8	87,06	188,1	L 8	10,41	867,9
L 9	23,65	572,05	L 9	47,21	1342,4	L 9	7,88	768,3
L10	29,58	631,30	L10	41,44	1510,5	L10	7,89	826,2
L11	27,38	624,45	L 11	7,40	65,4	L 11	5,15	563,9
L12	17,88	356,15	L 12	5,13	385,4	L 12	5,62	466,1
L13	11,46	733,40	L 13	7,04	417,75	L 13	4,16	758,5
L14	21,91	360,25	L 14	9,28	783,35	L 14	6,6	625,55
L15	18,18	389,55	L 15	5,95	738,45	L 15	7,00	545,35
M		435,85			847,376			591,356
intr eva lle		270,75 — 733,40			65,4 — 1719,7			420,2 — 867,9

Tableau 8. Mesures spectrophotométriques (Nano Drop) de la pureté des extraits d'ADN de criquets obtenus selon trois protocoles d'extraction

Protocole1 : SDS-buffer/Salting-out			Protocole 2 : SDS-buffer/Phénol-Chloroforme			Protocole 3 : CTAB buffer/Phénol-Chloroforme		
P(mg)	260/280	260/230	P (mg)	260/280	260/230	P (mg)	260/280	260/230
22,93	1,838	2,170	70,39	2,028	1,728	10,95	2,082	2,297
17,53	1,838	2,035	37,33	1,840	1,215	5,67	1,962	1,536
31,28	1,819	2,018	65,72	1,939	1,241	10,82	2,024	1,889
23,51	1,799	1,755	65,7	1,637	0,750	6,85	2,039	2,302
35,37	1,835	2,128	72,06	1,872	1,067	8,15	1,989	1,503
29,06	1,836	2,123	95,44	2,026	1,734	5,93	2,051	2,207
16,93	1,820	2,084	42,8	2,002	1,475	4,43	2,04	1,884
20,28	1,796	1,870	87,06	1,903	1,301	10,41	1,982	1,712
23,65	1,810	1,938	47,21	1,906	1,422	7,88	2,026	1,9
29,58	1,810	1,821	41,44	1,957	1,624	7,89	1,966	1,434
27,38	1,806	1,804	7,40	1,69	0,774	5,15	2,00	1,935
17,88	1,814	2,135	5,13	1,836	1,246	5,62	2,006	1,972
11,46	2,033	2,194	7,04	1,904	1,415	4,16	1,877	0,912
21,91	1,828	2,218	9,28	1,911	1,335	6,6	1,967	1,554
18,18	1,819	2,082	5,95	1,926	1,545	7,00	1,938	1,461
M	1,833	2,025		1,833	1,324		1,996	1,766
inter valle	1,796 — 2,033	1,755 — 2,218		1,690 — 2,028	0,750 — 1,734		1,877 — 2,082	0,912 — 2,302

Références

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell* (4th ed.). Garland Science.
- Beranger, M. (2014). SPV 1 : Extraction de la fraction d'ADN, libre de nucléosomes, contenant les gènes actifs du testicule ou du foie de verrat/SPV 2 : Contrôle de 16 couples d'amorces par PCR (Polymérase Chain Reaction).
- Bienvenu, T., Meunier, C., Bousquet, S., Chiron, S., Richard, L., Gautheret-Dejean, A., et Feldmann, D. (1999, January). Les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin. In *Annales de biologie clinique* (Vol. 57, No. 1, pp. 77-84).
- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T. P., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M. & De Bruyn, M. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in ecology & evolution*, 29(6), 358-367.
- Chacon-Cortes, D., & Griffiths, L. R. (2014). Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: Current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, 2, 1–9.
- Chen, H., Rangasamy, M., Tan, S. Y., Wang, H., & Siegfried, B. D. (2010). Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS ONE*, 5(8), e11963.
- Devaux, S., Kamel, S., Quignard, J. F., & Séronie-Vivien, S. (2023). *Biochimie-physiologie-physiopathologie;enseignement en fiches*. Elsevier Health Sciences, France.
- Dhaliwal, A. (2013). DNA extraction and purification. *Mater Methods*, 3, 191.
- Gérard, A. (2016). Conception et évaluation de méthodes de détection insectes dans les matrices alimentaires. Diplôme de master, université de Liège, Belgique, 107p.
- Ghaheri, M., Kahrizi, D., Yari, K., Babaie, A., Suthar, R. S., & Kazemi, E. (2016). A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. *Cellular and Molecular Biology*, 62(3), 120-124.
- Giovannangeli, C. (2010). Chapitre 2 : Cibler l'ADN : pour la compréhension du vivant. In *La chimie et la santé : Au service de l'homme* (pp. 41-58). Les Ulis : EDP Sciences. doi.org/10.1051/978-2-7598-0934-9.c005

- Griffith, A., Gelbart, W., Miller, J., & Lewontin, R. (2001). *Analyse génétique moderne*, macmillan, UK, 736p.
- Jeannesson, E. (2007). *Profils génétiques de lignées cellulaires humaines modèles en physiopathologie et pharmacotoxicologie cardio-vasculaires*. Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré, France.
- Koshy, L., Anju, A. L., Harikrishnan, S., Kutty, V. R., Jissa, V. T., Kurikesu, I., ... & Sudhakaran, P. R. (2017). Evaluating genomic DNA extraction methods from human whole blood using endpoint and real-time PCR assays. *Molecular biology reports*, 44, 97-108.
- Lee, J. H., Park, Y., Choi, J. R., Lee, E. K., & Kim, H. S. (2010). Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. *Yonsei medical journal*, 51(1), 104-110.
- Lu, H., Schmidt, M. A., & Jensen, K. F. (2005). A microfluidic electroporation device for cell lysis. *Lab on a Chip*, 5(1), 23-29.
- Mitchell, N., McAssey, E. V., et Hodel, R. G. (2023). Emerging methods in botanical DNA/RNA extraction. *Applications in Plant Sciences*, 11(3), e11530.
- Vingataramin, L. (2014). *Dépistage des infections du tractus urinaire par méthode moléculaire*. Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke, Québec, Canada, 114 p.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 22(3), 474-481. doi.org/10.2144/97223st01
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb-prot4455.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: Ch. 8. In Vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction* (Vol. 2). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Riquet, J., & Pitel, F. (2000). Les techniques de base de la génétique moléculaire. *INRAE Productions Animales*, 13(HS), 29-35.
- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*, 25(22), 4692-4693.

- Kreader, C. A. (1996). Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and environmental microbiology*, 62(3), 1102-1106.
- Montgomery, G. W., & Sise, J. (1990). Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 33(3), 437-441.
- Addessi, E., Bellagamba, F., Delfino, A., De Petrillo, F., Focaroli, V., Macchitella, L., ... & Paglieri, F. (2014). Waiting by mistake: Symbolic representation of rewards modulates intertemporal choice in capuchin monkeys, preschool children and adult humans. *Cognition*, 130(3), 428-441.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). A laboratory manual. *John Inglis*.
- Schlömer, S., Bruckner, T., Fulton, L., Hertwich, E., McKinnon, A., Perczyk, D., ... & Wiser, R. (2014). Annex III: Technology-specific cost and performance parameters. In *Climate change 2014: Mitigation of climate change: Contribution of working group III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 1329-1356). Cambridge University Press.
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (45), 2565.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., ... & Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *science*, 318(5858), 1917-1920.
- Hooper, C., Lee, Y. G., & Maskell, N. (2010). Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society Pleural Disease Guideline 2010. *Thorax*, 65(Suppl 2), ii4-ii17.
- Bellagamba, M., et al. (2014). DNA extraction from various animal tissues: A comparative study of three methods. *Journal of Applied Biotechnology*, 2(1), 1-8.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 495–503. doi: 10.1128/jcm.28.3.495-503.1990.
- Buckley, M., et al. (2008). Molecular analysis of DNA from archaeological bones. *Journal of Archaeological Science*, 35(1), 177-185.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

- Montgomery, G. W., & Sise, J. A. (1990). Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 33(3), 437–441. doi.org/10.1080/00288233.1990.10428440
- Rohland, N., & Hofreiter, M. (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*, 2(7), 1756–1762. doi: 10.1038/nprot.2007.247.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 3741–3751. doi: 10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997.

ملخص

يهدف هذا البحث إلى تقييم فعالية ثلاث طرق SDS-buffer/Salting-out, SDS-buffer/Phénol-Chloroforme, CTAB buffer/Phénol-Chloroforme لاستخلاص الحمض النووي الكلي من أنسجة حيوانية، مع التركيز على استخدام مجموعات الاستخلاص التجارية تمت معالجة عينات من الدم، وأنسجة الجراد، والديدان الأرضية باستخدام هذه البروتوكولات.

تم تحديد كمية ونوعية الحمض النووي المستخلص باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي وتقنية الهجرة الكهربائية كما تم تقييم قدرة المستخلصات على استخدامها كقوالب لتفاعل PCR

تشير النتائج إلى أن مجموعات QIAGEN توفر استخلاصًا مثاليًا لعينات الدم، حيث تنتج حمضًا نوويًا عالي الجودة وجاهزًا للاستخدام. أما طريقة SDS-buffer/Salting-out فقد أثبتت فعاليتها مع أنسجة الجراد، مقدمة توازنًا جيدًا بين العائد والنقاء. فيما يتعلق بالديدان الأرضية، فإن البروتوكولات الثلاثة تحتاج إلى تعديلات لتحسين سلامة الحمض النووي المستخلص.

الكلمات المفتاحية: QIAGEN ADN, kits, Salting-out, PCR, بروتوكولات الاستخلاص , جهاز الهجرة الكهربائية

Résumé

Ce mémoire vise à évaluer l'efficacité de trois méthodes d'extraction d'ADN total à partir de tissus animaux : les méthodes SDS-buffer/Salting-out, SDS-buffer/Phénol-Chloroforme, et CTAB buffer/Phénol-Chloroforme et l'utilisation de kits commerciaux. Des échantillons de sang, de tissus de criquet et de lombric ont été traités selon ces protocoles.

L'ADN extrait a été quantifié et qualifié à l'aide d'un spectrophotomètre Nano Drop et par électrophorèse sur gel d'agarose. La capacité des extraits à servir de matrice pour la PCR a également été évaluée.

Les résultats indiquent que les kits QIAGEN offrent une extraction optimale pour les échantillons sanguins, avec un ADN de haute qualité et prêt à l'emploi. La méthode SDS-buffer/Salting-out s'est révélée plus adaptée aux tissus de criquet, offrant un bon compromis entre rendement et pureté. Concernant les lombrics, les trois protocoles nécessitent des ajustements pour améliorer l'intégrité de l'ADN extrait.

Mots clés : ADN, électrophorèse, protocole d'extraction, PCR, Salting-out, kits QIAGEN.

Abstract

This thesis aims to assess the efficiency of three total DNA extraction methods from animal tissues: SDS-buffer/Salting-out, SDS-buffer/Phenol-Chloroform, and CTAB buffer/Phenol-Chloroform, along with the use of commercial kits. Samples of blood, grasshopper tissue, and earthworm tissue were processed using these protocols. The extracted DNA was quantified and qualified using a Nano Drop spectrophotometer and agarose gel electrophoresis. The suitability of the extracts for PCR was also evaluated.

The results indicate that QIAGEN kits provide optimal extraction for blood samples, yielding high-quality, ready-to-use DNA. The SDS-buffer/Salting-out method proved more suitable for grasshopper tissues, offering a good balance between yield and purity. For earthworms, all three protocols require adjustments to improve the integrity of the extracted DNA.

Keywords: DNA, electrophoresis, extraction protocol, PCR, Salting-out, QIAGEN kits



Déclaration de correction de mémoire de master 2025

Référence du mémoire N°: / 2025	PV de soutenance N°: / 2025
Nom et prénom(en majuscule) de l'étudiant (e) : GHEZZAL Mounouda / FARDJALLAH Anissa	L'élève et son nom (الطالب) : بنال مسعود / فراج الدانيس
La mention (التقدير) B	Note (العلامة) (./20) 16,5
L'intitulé de mémoire (المذكورة عنوان) Evaluation de l'efficacité de trois protocoles d'extraction d'ADN total à partir de trois tissus animaux.	

تصريح وقرار الأستاذ المشرف : Déclaration et décision de l'enseignant promoteur :

Déclaration : Je soussigné (e), (grade) à l'université de avoir examiné intégralement ce mémoire après les modifications apportées par l'étudiant. J'atteste que : * le document a été corrigé et il est conforme au model de la forme du département SNV * toutes les corrections ont été faites strictement aux recommandations du jury. * d'autres anomalies ont été corrigées	تصريح : أنا الممضي (ة) أسفله (الرتبة) بجامعة أصرح بأنني راجعت محتوى هذه المذكرة كليا مراجعة دقيقة وهذا بعد التصحيحات التي أجراها الطالب بعد المناقشة، وعليه أشهد بأن : * المذكرة تتوافق بشكلها الحالي مع النموذج المعتمد لقسم علوم الطبيعة والحياة. * المذكرة صحت وفقا لكل توصيات لجنة المناقشة * تم تدارك الكثير من الإختلالات المكتشفة بعد المناقشة
--	--

Décision : Sur la base du contenu scientifique, de degré de conformité et de pourcentage des fautes linguistiques, Je décide que ce mémoire doit être classé sous la catégorie	قرار : اعتمادا على درجة مطابقتها للنموذج ، على نسبة الأخطاء اللغوية وعلى المحتوى العلمي أقرر أن تصنف هذه المذكرة في الدرجة :												
<table border="1"> <tr> <td>acceptable مقبول</td> <td>ordinaire عادي</td> <td>bien حسن</td> <td>très bien جيد جدا</td> <td>excellent ممتاز</td> <td>exceptionnel متميز</td> </tr> <tr> <td>E</td> <td>D</td> <td>C</td> <td>B</td> <td>A</td> <td>A+</td> </tr> </table>	acceptable مقبول	ordinaire عادي	bien حسن	très bien جيد جدا	excellent ممتاز	exceptionnel متميز	E	D	C	B	A	A+	
acceptable مقبول	ordinaire عادي	bien حسن	très bien جيد جدا	excellent ممتاز	exceptionnel متميز								
E	D	C	B	A	A+								



الأستاذ المشرف
بشرف

التاريخ
2025/09/12/4

NB : Cette fiche doit être collée d'une façon permanente derrière la page de garde sur les copies de mémoire déposées au niveau de la bibliothèque universitaire