



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Mohamed Khider, Biskra

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département des Sciences Vétérinaires

Polycopié pédagogique

Biologie moléculaire

Destiné aux étudiants de
1^{ère} année en médecine vétérinaire

Responsable du module : Asma Amina FOUGHALI

Grade : Maître de conférences classe B

Email : asmaamina.foughali@univ-biskra.dz

Année universitaire : 2024-2025

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIERES	2
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS	7
PRÉAMBULE	8
INTRODUCTION	9
Travaux dirigés 1	10
ANALYSE D'ARTICLES SCIENTIFIQUES EN RELATION AVEC LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	
1. Article scientifique	10
1.1. Introduction	10
1.2. Revue scientifique (<i>Scientific journal</i> en anglais)	10
1.3. Article scientifique	11
1.3.1. Caractéristique d'un article de haute qualité	11
1.3.2. Structure d'un article scientifique	12
1.3.2.1. Titre d'un article scientifique	12
1.3.2.2. Les règles éditoriales (IMRED en français)	12
1.3.2.2.1. Introduction	12
1.3.2.2.2. Matériel et méthodes	12
1.3.2.2.3. Résultats	13
1.3.2.2.4. Discussion	14
1.3.2.3. Conclusion	14
1.3.2.4. Références	15
1.3.2.5. Remerciements	16
1.3.2.6. Financement	16
1.3.2.7. Résumé	16
2. Différents types d'articles (en anglais : <i>types of papers</i>)	16
2.1. Article de recherche (en anglais : <i>Original Research</i> ou <i>Original Paper</i>)	16
2.2. Article de synthèse ou revue bibliographique (<i>Review</i> en anglais)	17
2.3. Communication courte (<i>Short Communication</i> en anglais)	17
2.4. Lettre à l'éditeur (<i>Letter to the editor</i> en anglais)	18
2.5. Étude de cas (en anglais <i>Case report</i>)	19
TP 1 : RECOMMANDATIONS ET PRÉLÈVEMENTS DU MATÉRIEL BIOLOGIQUE POUR ANALYSE MOLÉCULAIRE	20
1. Introduction	20
2. Recommandations générales	20
3. Prélèvements pour la biologie moléculaire	27
3.1. Définition d'un prélèvement	27
3.2. Gestion éthique des prélèvements vétérinaires	27
3.3. Précautions à prendre	27
3.4. Caractéristique d'un prélèvement destiné à la biologie moléculaire	27

3.5.	Différents types de prélèvements destinés à la biologie moléculaire	28
3.5.1.	Échantillon sanguin	28
3.5.2.	Écouvillonnage nasal (prélèvement nasopharyngé)	29
3.5.3.	Prélèvement salivaire	29
3.5.4.	Écouvillonnage vaginal	30
3.5.5.	Prélèvements cellulaires et tissulaires	30
3.5.6.	Matière fécale (fèces)	30
3.5.7.	Lait	31
3.5.8.	Le sperme	32
3.5.9.	Plumes	32
3.5.10.	Cadavre (prélèvement <i>post-mortem</i>)	33
3.5.11.	Avortons	33
3.5.12.	Urine	33
3.6.	Non-conformité des échantillons	33
	TP 2 : VISITE DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	35
2.1.	Laboratoire de biologie moléculaire	35
2.2	Équipements	35
2.2.1.	Armoires de sécurité	35
2.2.2.	Réfrigérateurs et congélateurs	36
2.2.3.	Réservoirs d'azote liquide	36
2.2.4.	Autoclave	37
2.2.5.	Hotte de laboratoire	37
2.2.6.	Micropipettes	38
2.2.7.	Pipeteur automatique	40
2.2.8.	Agitateurs vortex	41
2.2.9.	Balance de précision électronique	41
2.2.10.	Thermocycleur	42
2.2.11.	Centrifugeuse avec température contrôlée	43
2.2.11.1.	Principe	43
2.2.11.2.	Entretien	43
2.2.12.	Bain-marie	43
2.2.13.	Distillateur	44
2.2.13.1.	Principe de la distillation	44
2.2.14.	Four à micro-onde	45
2.2.15.	Cuve d'électrophorèse horizontale	45
2.2.16.	Séquenceur	46
2.3.	Consommables	46
2.3.1.	Microtubes à centrifuger de 1,5 mL	46
2.3.2.	Autres consommables	47
2.3.3.	Verrerie	47
	TP 3 : EXTRACTION D'ADN	49
1.	Extraction des acides nucléiques	49
1.1.	Objectif de l'extraction des acides nucléiques	49
1.2.	Extraction d'ADN	49

1.2.1.	Principales étapes d'extraction d'ADN	49
1.2.2.	Extraction de l'ADN à l'aide de kits du commerce	51
1.2.3.	Purification de l'ADN	53
1.2.4.	Kits de purification de l'ADN	54
1.2.5.	Quantification et qualité des ADN	54
1.2.5.1.	Migration de l'ADN sur gel d'agarose (0,5 à 1%)	54
1.2.5.2.	Dosage spectrophotométrique	55
1.2.5.3.	Dosage fluorimétrique	55
1.2.5.4.	Bioanalyser	56
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	57

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Page internet de la revue " <i>Parasitology Research</i> ", dédiée à la publication d'articles scientifiques dans le domaine de la parasitologie et de la biologie moléculaire appliquée à la parasitologie	11
Figure 2	Photo illustrant une partie de la section résultats d'un article scientifique en biologie moléculaire, comprenant un diagramme légendé, un texte descriptif et des sous-titres permettant d'organiser la présentation des résultats	14
Figure 3	Photo montrant un article de recherche en parasitologie, infectiologie et biologie moléculaire, illustrant les différents constituants	16
Figure 4	Photo montrant un article de synthèse	17
Figure 5	Photo montrant un article de type "Communication courte"	18
Figure 6	Photo montrant un article de type " Lettre à l'éditeur "	18
Figure 1.1	Deux types de gants de laboratoire	21
Figure 1.2	Photo montrant un évier de laboratoire	22
Figure 1.3	Photos présentant des panneaux d'interdiction de fumer de manger ou de boire	22
Figure 1.4	Photo montrant la date de péremption des tubes EDTA	23
Figure 1.5	Photo montrant les différents types d'embouts de micropipettes	23
Figure 1.6	Photo montrant une aliquote de sang total destiné à la conservation	25
Figure 1.7	Photo montrant une personne effectuant un pipetage à bouche	26
Figure 1.8	Tube à prélèvement vacutainer Héparine de Lithium	28
Figure 1.9	Écouvillonnage nasal chez un cheval	29
Figure 2.1	Conteneur à azote liquide	36
Figure 2.2	Autoclave	37
Figure 2.3	Hotte de laboratoire	38
Figure 2.4	Jeu de micropipettes	39
Figure 2.5	Micropipette multicanaux	40
Figure 2.6	Pipeteur automatique	40

Figure 2.7	Agitateur vortex	41
Figure 2.8	Balance de précision électronique de laboratoire	42
Figure 2.9	Thermocycleur	43
Figure 2.10	Bain-marie	44
Figure 2.11	Schéma montrant les différents composants d'une cuve électrophorèse horizontale.	46
Figure 2.12	Différents types de Microtubes à centrifuger de 1,5 mL	47
Figure 2.13	Verrerie de laboratoire	48
Figure 3.1	Piston en verre	50
Figure 3.2	Photo montrant une pelote d'ADN	51
Figure 3.3	Kit commercial d'extraction d'ADN	52
Figure 3.4	Manuel d'utilisation d'un kit d'extraction d'ADN de la marque Promega	53
Figure 3.5	Photographie d'un gel d'agarose à 1% montrant la présence de bandes non spécifiques et la présence d'excès d'amorces	54
Figure 3.6	Photographie d'un gel d'agarose à 1,2%	54
Figure 3.7	Photographie montrant une migration de l'ADN sur un gel d'agarose	55
Figure 3.8	Photo d'un appareil NanoDrop de la marque Thermo Scientific	55
Figure 3.9	Photo d'un appareil de type Qubit	56

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
BET	: Bromure d'éthidium
°C	: Degré Celsius
DOI	: <i>Digital Object identifier</i>
dpi	: Dots Per Inch, signifiant « points par pouce »
EDTA	: Acide Éthylène Diamine Tétra-acétique
cm	: Centimètre
mL	: Millilitre
pb	: Paire de bases
PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne
RT-PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse
URL	: Localisateur Uniforme de Ressource
UV	: Ultraviolet

PRÉAMBULE

Ce support pédagogique du module de biologie moléculaire, des travaux dirigés et des travaux pratiques est destiné aux étudiants de première année en médecine vétérinaire.

Les travaux dirigés sont axés sur l'analyse des articles scientifiques en relation avec la biologie moléculaire. Dans ce TD, l'étudiant apprend des notions sur les articles scientifiques et leurs types, en donnant quelques exemples d'articles en relation avec la biologie moléculaire et en les discutant ensemble.

Les travaux pratiques du module de biologie moléculaire commencent par un TP dédié aux **recommandations et aux prélèvements de matériel biologique** pour l'analyse moléculaire. Ce premier TP permet aux étudiants de découvrir les bonnes pratiques et les protocoles essentiels à suivre pour garantir la qualité et la fiabilité des analyses. Ils apprennent à se comporter de manière rigoureuse et professionnelle en laboratoire, en respectant les règles d'hygiène et de sécurité. De plus, l'accent est mis sur les différents types de prélèvements destinés à la biologie moléculaire, comme les échantillons de sang, de salive, ou de tissus, en expliquant les spécificités de chacun et les conditions à respecter pour éviter toute contamination ou dégradation de l'ADN.

La **visite du laboratoire de biologie moléculaire** constitue un moment clé pour comprendre le fonctionnement des équipements utilisés dans l'analyse génétique, tels que les thermocycleurs pour la PCR et les centrifugeuses. Les étudiants auront l'opportunité de se familiariser avec les outils utilisés pour l'amplification, la séparation et la quantification de l'ADN. Enfin, l'**extraction d'ADN**, qui constitue une étape préalable indispensable pour toute analyse en biologie moléculaire, sera également abordée.

Introduction

La biologie moléculaire est une **discipline scientifique** largement utilisée en biologie médicale. Elle joue un rôle très important dans plusieurs domaines à savoir le diagnostic des maladies, l'épidémiologie, le pronostic, l'évaluation thérapeutique, la parasitologie, la mycologie, la virologie, la bactériologie, la médecine ambulatoire, la classification moléculaire des cancers (la caractérisation des altérations du génome des cellules tumorales), l'étude des microbiotes... De plus, la biologie moléculaire est au cœur de la production pharmaceutique, où elle permet la fabrication de plusieurs médicaments grâce au génie génétique. Elle contribue également à la médecine légale et à la criminologie, en fournissant des outils pour l'identification et l'analyse des preuves biologiques. Enfin, elle joue un rôle fondamental dans le conseil génétique, en permettant une meilleure compréhension des maladies génétiques, ainsi que dans la recherche scientifique, où elle ouvre de nouvelles voies pour l'étude des mécanismes biologiques et le développement de traitements innovants.

Travaux dirigés 1

ANALYSE D'ARTICLES SCIENTIFIQUES EN RELATION AVEC LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

1. Article scientifique

1.1. Introduction

La **publication** des résultats est **fondamentale** et nécessaire. Elle permet la diffusion de la technologie, le partage des connaissances et contribue à **l'avancement de la science**. La publication scientifique permet de se faire reconnaître en tant qu'**expert** dans un domaine **précis**.

Tout travail est publiable, du moment qu'il est correctement réalisé et qu'il apporte **un plus** à la communauté scientifique. Certains résultats négatifs sont également publiables. Ils permettent de démontrer par exemple l'inefficacité d'un traitement, l'absence de différences entre deux régions, l'absence d'un agent pathogène chez une espèce donnée ou une région donnée, l'absence de différences entre deux médicaments...

1.2. Revue scientifique (*Scientific journal* en anglais)

Une revue scientifique est un **support documentaire** à publication **périodique édité**, elle est **spécialisée** dans une discipline (domaine) mais certaines revues sont dites généralistes comme *Science* et *Nature*. Une revue scientifique sert à **diffuser** les nouveaux savoirs générés par les chercheurs et à partager des points de vue et des avis. Elle regroupe généralement des articles qui ont des intérêts **similaires**. Les revues scientifiques sont classées en **rang** selon différents critères. Ils sont organisés en **volume** (on compte en général un volume par an). Ce dernier peut contenir plusieurs **numéros** (*issue* en anglais).

The screenshot shows the Springer Link interface for the journal 'Parasitology Research'. At the top, there are navigation options like 'Find a journal', 'Publish with us', and 'Track your research'. The main banner includes the journal's cover image, title, and a 'Submit your manuscript' button. Below this, there are tabs for 'Editorial board', 'Aims and scope', and 'Journal updates'. The 'Overview' section describes the journal's focus on parasitology and lists various sub-fields covered. The 'For authors' section provides links to submission guidelines, language editing services, ethics and disclosures, and open access fees.

Figure 1 : Page internet de la revue "*Parasitology Research*", dédiée à la publication d'articles scientifiques dans le domaine de la parasitologie et de la biologie moléculaire appliquée à la parasitologie.

1.3. Article scientifique

Un article scientifique (Syn. publication scientifique) est un document **rédigé** qui peut être **imprimé** et/ou **électronique** portant sur une recherche ou un travail **original**. Il décrit les résultats obtenus par une équipe de recherche, **évalué** (examiné) par des **relecteurs anonymes** et un **éditeur et publié dans une revue scientifique**. Il sert de **référence bibliographique** pour d'autres recherches scientifiques et **contribue** à l'**avancée** de la **science**.

L'article doit être conçu de telle sorte qu'il peut être **imprimable en noir et blanc**.

1.3.1. Caractéristique d'un article de haute qualité

Un article de haute qualité **porte sur un seul axe**. Il se caractérise par une **méthodologie rigoureuse**, une **langue concise** assurant une bonne compréhension par les lecteurs, une structure **claire et logique**, un contenu **original**, des résultats **reproductibles** c'est-à-dire que d'autres chercheurs peuvent obtenir les mêmes résultats s'ils reproduisent l'expérience dans les mêmes conditions.

Un article de haute qualité ne doit pas exprimer les émotions des auteurs sauf dans certains cas particuliers.

En moyenne, entre 20 à 80% des manuscrits soumis pour publication sont **rejetés** par les revues. Dans tout l'article, les auteurs doivent clarifier le **message ou les messages** qu'ils veulent transmettre. Les messages doivent être cohérents.

1.3.2. Structure d'un article scientifique

1.3.2.1. Titre d'un article scientifique

Le titre d'un article scientifique doit être **concis, informatif, facile à lire**, ni trop long ni trop court. Il doit de préférence commencer par le **mot-clé le plus pertinent** du travail, afin d'identifier clairement le message principal de l'article. Le titre constitue le **premier critère** de sélection lors des **recherches sur Internet**.

Il est important d'éviter l'utilisation d'abréviations dans le titre, sauf si elles sont largement reconnues et essentielles. Un titre de longueur convenable compte généralement entre **8 et 10 mots**.

1.3.2.2. Les règles éditoriales (IMRED en français)

La majorité des articles scientifiques sont structurés selon le plan **IMRED (Introduction, Matériel et méthodes, Résultats et Discussion)**.

1.3.2.2.1. Introduction

Dans cette partie il convient de présenter l'état de l'Art sur le sujet abordé, **situer le sujet** de recherche par rapport aux connaissances disponibles dans la bibliographie et formuler l'hypothèse de la recherche. À la fin de l'introduction, il faut **définir l'objectif principal et les objectifs secondaires** de l'étude.

Il est préférable de construire l'introduction comme **un entonnoir** qui va du général vers le spécifique. Durant la rédaction du manuscrit, des éléments peuvent être ajoutés dans la partie introduction dont la version finale ne doit être rédigée qu'à la fin, c'est-à-dire après avoir rédigé les autres sections du manuscrit.

En général, le volume de l'introduction représente 10% du manuscrit.

1.3.2.2.2. Matériel et méthodes

C'est la partie la **moins difficile** à écrire. Cette section fait suite à **l'introduction**. Elle ne doit pas contenir les résultats de l'étude. L'auteur doit décrire de manière concise mais précise toutes les étapes et les techniques utilisées. Les pairs (chercheurs spécialisés dans le même domaine) doivent être en mesure de reproduire l'expérience dans les mêmes conditions décrites dans cette

partie. Lorsque des méthodes sont tirés de travaux antérieurs, il est nécessaire citer les **références bibliographiques** correspondantes.

Les verbes de toute la partie matériel et méthodes doivent être conjugués au **passé simple ou le passé composé** ce qui est facile à comprendre car toutes les actions ont déjà eu lieu. Les phrases doivent être écrites avec un **style passif**. Par exemple, il faut écrire : *les échantillons de sang ont été collectés entre Et non nous avons collecté les échantillons de sang entre ...*

Les principales sous-sections de la section Matériel et méthodes

- Région d'étude : nom, statut administratif (wilaya...), localisation géographique (ajouter une carte si nécessaire ou au moins les coordonnées GPS), caractéristiques climatiques de la région...

- Animaux et élevages : nombre d'élevages, effectifs par élevages, préciser les espèces, l'âge, les sexes, les effectifs...

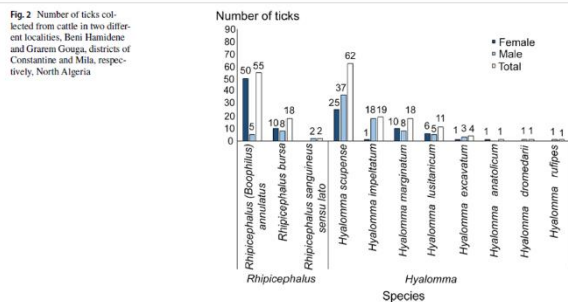
- Préciser la période d'étude.

- Décrire les tests statistiques et mentionner les logiciels statistiques utilisés et le seuil de signification.

1.3.2.2.3. Résultats

La longueur de la partie résultats représente environ **20%** de la taille totale de l'article. Elle vient après la partie Matériel et méthodes. Dans cette section, l'auteur doit présenter les résultats **sans les discuter**.

La présentation des résultats se fait sous formes de **texte, tableaux, figures (graphiques, photos, microphotographie, radios, cartes...)**. Ces présentations doivent être clairs, suffisent à eux-mêmes, légendés, numérotés suivant les instructions aux auteurs. Il est également recommandé de diviser cette section en sous-titres lorsque cela est possible, afin d'améliorer la compréhension du texte. Les figures utilisées doivent être de bonne qualité avec une résolution d'au moins **300 dpi** (*dot per inch* ou pixel par pouce). Cette recommandation varie en fonction de la revue et en fonction du type de figure).



almost all *Hy. scapense* (59/62; 95.2 ± 2.7) were collected in June (29/62) and July (30/62).

Distribution of ticks according to anatomical regions

In male cattle, adult *Hy. scapense* had several attachment sites especially testicles (11/62; 17.7 ± 4.9%). In female cattle, adult *Rh. (Boophilus) annulatus* were found mainly in belly (19/55; 34.5 ± 6.4%) and the udder (12/55; 21.8 ± 5.6) regions.

Infections by hemopathogens

All visited farms (n=51) contained at least one cattle infected by at least one hemopathogen and all of them had at least one cattle infected by *T. annulata*. Moreover, PCR showed that 39.2 ± 5.7% (20/51), 29.4 ± 6.4% (15/51), and 5.9 ± 2.6% (3/51) of visited farms contained at least one cattle infected by *B. bovis*, *A. marginale*, and *B. bigemina*, respectively ($p < 0.001$). Giemsa-stained blood smears examination showed that 72.5 ± 6.2% (37/51), 11.8 ± 4.5%

(7/66); and 9.1 ± 3.5% (6/66) of cattle were infected by *T. annulata*, *Babesia* spp., and *A. marginale*, respectively ($p < 0.001$).

Seven co-infection patterns were found: *T. annulata/A. marginale* (15/66; 22.7 ± 5.2%); *T. annulata/B. bovis* (21/66; 31.8 ± 5.7%); *T. annulata/B. bigemina* (3/66; 4.5 ± 2.6%); *T. annulata/A. marginale/B. bovis* (7/66; 10.6 ± 3.8%); *T. annulata/B. bovis/B. bigemina* (2/66; 3 ± 2.1%); *T. annulata/A. marginale/B. bigemina* (1/66; 1.5 ± 1.5%); and *T. annulata/A. marginale/B. bigemina/B. bovis* (1/66; 1.5 ± 1.5%) (Table 2). When considering PCR as a reference test, the sensitivity of *T. annulata* Giemsa-stained blood smears examination was 67%.

The infection intensity was very low for all pathogens; it varied from 0.03 to 4% for *A. marginale* and from 0.0057 to 0.086% for *Babesia* spp. *Theileria annulata* infection intensity was lower than 1% in the majority of cattle (35/44; 79.5 ± 6.1%); among them, 18 (51.4 ± 8.4%) were infected by only *T. annulata*. For all the other positive animals (9/44; 20.5 ± 6.1%), the infection intensity varied between 1.4 and 26%; among them, 4 animals were co-infected.

Figure 2 : Photo illustrant une partie de la section résultats d'un article scientifique en biologie moléculaire, comprenant un diagramme légendé, un texte descriptif et des sous-titres permettant d'organiser la présentation des résultats.

1.3.2.2.4. Discussion

La taille de la partie discussion représente environ **40%** de taille totale de l'article.

Une bonne discussion donne du **pooids** au travail sans déprécier les travaux des autres. Elle doit mettre en valeur les résultats, les **comparer** à d'autres travaux ou aux attentes des auteurs, mentionner les limites de l'étude, donner une signification scientifique aux résultats. Il est crucial de citer les **références bibliographiques** pertinentes pour soutenir l'interprétation des résultats et situer l'étude dans son contexte scientifique.

Tous les résultats ne sont pas obligatoirement discutés. Il est parfois possible de fusionner la discussion avec la section résultats, notamment dans un des types d'articles scientifiques appelé Communications courtes.

1.3.2.3. Conclusion

Dans un article scientifique, la conclusion est placée en **dernière position**. Elle peut être présentée avec un **sous-titre à part** ou faire suite à la discussion. Dans tous les cas, elle doit être concise.

Dans cette section, l'auteur conclut le travail en reprenant le ou les **messages principaux** de l'article. Il ne faut pas clore la conclusion en citant les travaux des autres ni mettre en doute son propre travail (c'est-à-dire qu'on détruit son propre travail). Enfin, il est essentiel d'inclure des

recommandations et d'ouvrir des **perspectives** pour des recherches futures, afin d'ouvrir de nouvelles pistes d'exploration pour les pairs et montrer que son travail peut faire l'objet d'un point de départ pour des travaux ultérieurs.

1.3.2.4. Références

Cette section contient la liste **complète** de toutes les publications scientifiques citées dans l'article. Chaque référence doit inclure les informations suivantes :

- **Le nom des auteurs** : Le nom de famille de chaque auteur doit être mentionné.
- **Le prénom ou les prénoms des auteurs** : Les prénoms ou les initiales des prénoms des auteurs selon les recommandations aux auteurs.

- **L'année de publication** : Il est impératif de mentionner l'année de publication de l'article.

- **Le titre de l'article** : Le titre complet comme écrit dans l'article.

- **Le nom de la revue** : Le nom de la revue peut être abrégé mais cela dépend des recommandations aux auteurs de la revue.

Par exemple, le nom de la revue "**Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**" peut être abrégé en "**Rev. Élev. Méd. Vét. Pays Trop.**".

- **Le volume et/ou le numéro de la revue** : Ces informations sont nécessaires pour localiser facilement l'article dans la revue. Si l'article est accompagné de pages spécifiques, celles-ci doivent aussi être mentionnées. Cette information peut ne pas être disponible pour les revues en ligne.

- **Le numéro de la première et de la dernière page de l'article**. Cette information peut ne pas être disponible pour les revues en ligne.

- **Le numéro DOI (pour *Digital Object Identifier*)** qui est un URL permanent.

Les références doivent être présentées selon les **règles de citation** demandées par la revue à laquelle le manuscrit est soumis.

Exemple : Sivakumar, T., Tuvshintulga, B., Kothalawala, H., Silva, S.S.P., Lan, D.T.B., Long, P.T., Ybañez, A.P., Ybañez, R.H.D., Benitez, D.F., Tayebwa, D.S., De Macedo, A.C.C., Schnittger, L., Yokoyama, N., "Host range and geographical distribution of *Babesia* sp. Mymensingh", *Transbound. Emerg. Dis.*, 67, 5, (2020), 2233 – 2239.

1.3.2.5. Remerciements

Dans cette section, les auteurs doivent remercier les personnes ou les structures (organismes, universités...) qui ont aidé à l'élaboration du travail. Il faut citer les noms des personnes ou structures à remercier tout en précisant leurs contributions.

1.3.2.6. Financement

Dans cette section, les auteurs doivent citer et remercier **tous les bailleurs de fonds** du travail de recherche.

1.3.2.7. Résumé

Le résumé est placé **au début de l'article** et doit être **attirant et informatif**. Il est rédigé après l'article. C'est la première partie que les lecteurs lisent et elle est **toujours en accès libre**. Il résume le travail en 150 à 250 mots (parfois peu aller jusqu'à 400 mots). Le résumé ne doit pas contenir des tableaux et des figures. Il est généralement accompagné de mots-clés.

Bien que l'article soit rédigé en français, il est fréquent qu'un résumé en anglais soit également demandé.

2. Différents types d'articles (en anglais : *types of papers*)

2.1. Article de recherche (en anglais : *Original Research* ou *Original Paper*)

C'est le type d'articles qui ont le plus de **valeur scientifique**. C'est aussi le seul type d'articles pouvant être utilisés **pour la soutenance de doctorat et les différents passages de grades**. Il s'agit de publier un **travail de recherche original** sur un **sujet particulier**.

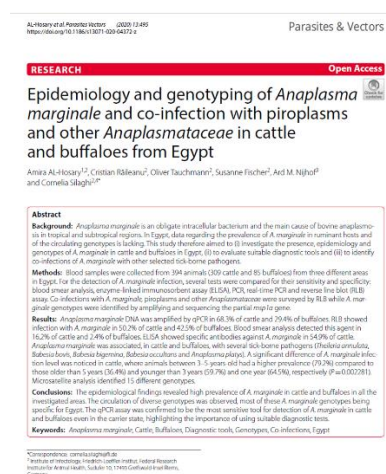


Figure 3 : Photo montrant un article de recherche en parasitologie, infectiologie et biologie moléculaire, illustrant les différents constituants.

2.2. Article de synthèse ou revue bibliographique (*Review en anglais*)

C'est une revue **exhaustive** sur un **sujet particulier**. L'article de synthèse fait le **bilan des recherches et des connaissances** sur un sujet précis. Ce type de publication nécessite une connaissance approfondie du sujet. L'article de synthèse n'est pas un catalogage des articles publiés. Les auteurs décortiquent les concepts et les questions, les méthodologies et les résultats des équipes de recherche qui ont travaillé sur ce sujet.

Il existe trois types d'articles de synthèse :

- *Les revues systématiques.*
- *Les revues de littératures.*
- *Les méta-analyses* : Combinent les résultats de plusieurs études publiées à travers une analyse statistique afin d'obtenir des conclusions globales robustes.

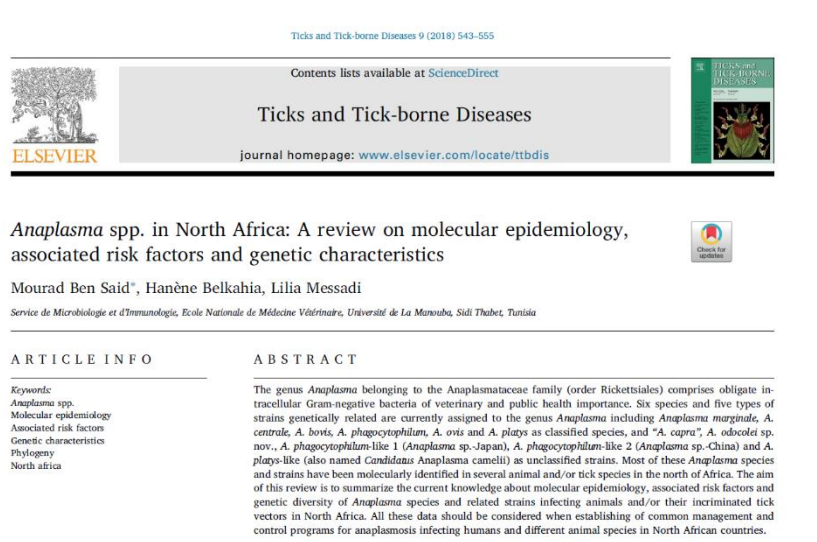


Figure 4 : Photo montrant un article de synthèse.

2.3. Communication courte (*Short Communication en anglais*)

La communication courte offre l'opportunité de publier **rapidement des résultats moins nombreux mais potentiellement importants et à jour**. Le manuscrit est plus court, il contient 4 à 5 pages.

2.5. Étude de cas (en anglais *Case report*)

L'étude de cas est généralement utilisée dans **différentes spécialités médicales**. Il s'agit de la publication d'un **cas clinique original**, souvent très rare ou complexe, basé dans la plupart des cas sur l'observation. Le cas clinique est présenté **en détail** et il est **discuté sur tous ses aspects**. Le choix du journal pour ce type de publication est un facteur important pour la **visibilité** de l'article.

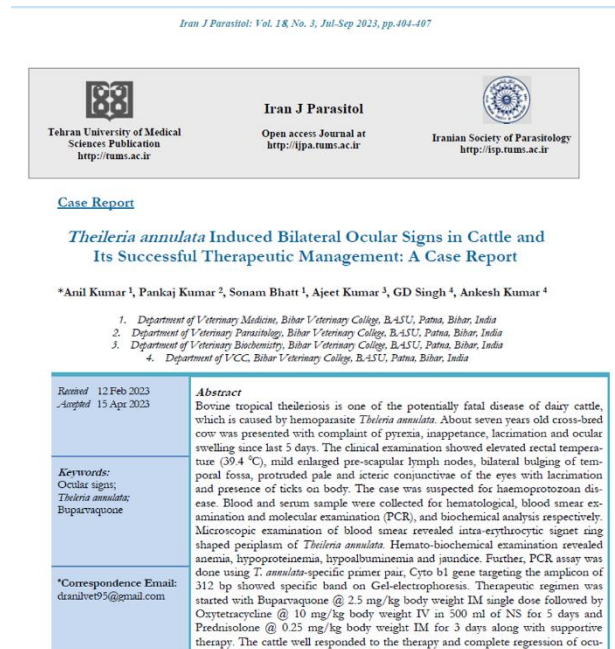


Figure 7 : Photo montrant un article de type " Étude de cas ".

TP 1 : RECOMMANDATIONS ET PRÉLÈVEMENTS DU MATÉRIEL BIOLOGIQUE POUR ANALYSE MOLÉCULAIRE

1. Introduction

Les analyses en biologie moléculaire ont pour principal objectif de **détecter** la présence d'agents pathogènes ou de **rechercher des traits génétiques** (mutations génétiques, sexage des oiseaux et des reptiles) dans un échantillon biologique, en identifiant leur matériel génétique (ADN ou ARN).

2. Recommandations générales

Afin de garantir la qualité des résultats des analyses de biologie moléculaire et la bonne marche du laboratoire plusieurs recommandations sont nécessaires et exigées :

1/ Le port de la **blouse de laboratoire est obligatoire**. Les blouses doivent être propre et fermées, et les poignets doivent être serrés. L'idéal est d'avoir des blouses distinctes pour chaque type de travail (extraction, PCR, électrophorèse).

2/ **Pour les femmes, attacher les cheveux longs, ne pas porter de bijoux**, porter des chaussures fermées, et couper régulièrement les ongles.

3/ Nommer une **personne qualifiée** qui sera **responsable** et veillera sur le bon fonctionnement du laboratoire.

4/ **Afficher des instructions** claires dans chacune des zones de travail pour sensibiliser le personnel à certaines règles du laboratoire.

5/ Mettre un **plan d'assurance de qualité**. Le plan doit contenir :

- La liste des stocks de base de réactifs et des stocks de travail. Faire une commande avant que le stock ne soit épuisé.

- Règles de stockage pour les kits et les réactifs.

6/ Tenir un **cahier de laboratoire** afin d'assurer la traçabilité des travaux de recherches.

7/ Le port de gants **sans talc** est recommandé lorsque l'échantillon à prélever est destiné à des analyses de biologie moléculaire car des traces de talc peuvent **inhiber certaines réactions** (Figure 1.1).

- Changer de gants systématiquement s'ils sont souillés.

- Changer de gants à chaque nouvelle manipulation.

**Gants en nitrile, sans
poudre****Gants en latex
avec talc blanc****Figure 1.1** : Deux types de gants de laboratoire.

- Les gants ne doivent pas être portés près d'une flamme ou de surfaces chaudes.
- Chaque prélèvement est **susceptible de contenir des germes** (bactérie, virus, parasite...) transmissibles à l'Homme. Quelque soit l'échantillon, il faut le manipuler avec des **gants**.

- La surface des mains contient des bactéries qui produisent des enzymes : les DNases. Ces enzymes dégradent l'ADN, ce qui peut altérer ou contaminer les échantillons lors de l'extraction de l'ADN.

8/ Respecter les **règles d'hygiène et de sécurité**

- Ne jeter aucune matière dangereuse ni solution de rinçage des contenants dans l'évier. Cela peut contaminer les eaux usées et perturber les systèmes de traitement des eaux, posant ainsi des risques pour l'environnement et la santé publique.

9/ Le travail en dehors des heures normales doit être autorisé par le superviseur.



Figure 1.2 : Photo montrant un évier de laboratoire.

10/ Il est **interdit** de boire, fumer, manger, mâcher de la gomme et appliquer des cosmétiques dans le laboratoire (Figure 1.3).

Interdit de fumer de manger ou de boire



Figure 1.3 : Photos présentant des panneaux d'interdiction de fumer de manger ou de boire.

11/ Il est interdit d'utiliser le portable, et de préférence, de l'éteindre.

- Ne pas utiliser le portable pour le calcul des concentrations car il sera contaminé.

12/ Vérifier toujours **la date de péremption du consommable** utilisé (tube de prélèvement sanguin, Kits d'extraction d'ADN...) (Figure 1.4).



Figure 1.4 : Photo montrant la date de péremption des tubes EDTA.

13/ Utilisez du matériel à **usage unique** pour ne pas contaminer les échantillons (gants, seringues, embouts, tubes...).



Figure 1.5 : Photo montrant les différents types d'embouts de micropipettes.

14/ Éviter de vous distraire ou distraire vos collègues.

15/ Il est interdit de courir ou de se bousculer dans toutes les zones du laboratoire de biologie moléculaire, afin d'assurer la sécurité de tout le personnel et de prévenir les accidents.

16/ Prenez **soin du matériel de laboratoire** et signaler tous dysfonctionnement de ce dernier.

- Faire un contrôle périodique des équipements du laboratoire.

- Le calibrage et la vérification des micropipettes tous les **6 mois** sont essentiels pour garantir leur précision et leur fiabilité.

17/ Étiqueter tous les produits à conserver en mentionnant le nom du produit, la date d'ouverture et la date de péremption.

18/ Respecter strictement **les températures de conservation** des échantillons au laboratoire.

19/ Prendre les mesures nécessaires afin **d'éviter toute contamination de l'aiguille et du liquide biologique** lors des prises de sang.

20/ Les échantillons doivent être **exempts de contaminants** et **compatibles** avec les techniques d'analyse en biologie moléculaire requises.

21/ Chaque prélèvement (recueilli dans des tubes, flacons, ou par écouvillonnage) doit être identifié de manière **lisible** et **indélébile** au moment du prélèvement. Cela garantit non seulement la traçabilité des échantillons tout au long du processus, mais aussi leur corrélation correcte avec les résultats des analyses.

- L'étiquette de signalisation doit être bien **visible** et **résister** aux conditions de conservation, de transport et d'utilisation.

22/ Les échantillons biologiques doivent être conservés au réfrigérateur (4°C) en attendant leur envoi au laboratoire. Si l'échantillon ne peut être acheminé dans les 24h suivant le prélèvement, il faut le congeler dès que possible (-20°C pour l'ADN et -80°C pour l'ARN).

- Lorsque la quantité de sang prélevée est suffisante, il est utile de diviser l'échantillon en **aliquotes** et de congeler ces aliquotes dans des tubes **Eppendorf distincts et étiquetés** (Figure 1.6).

Remarque : Eppendorf est une entreprise allemande travaillant dans le domaine de la biotechnologie et de la recherche scientifique, spécialisée dans la fabrication d'instruments et de consommables pour les laboratoires, notamment pour la manipulation de liquides.

Les **microtubes à centrifuger de 1,5 ml de type** Eppendorf, sont parmi leurs produits emblématiques. Ces tubes sont utilisés dans de nombreux domaines de la recherche, comme la biologie moléculaire, la génétique, la biochimie, et bien d'autres. Ils sont conçus pour résister à des vitesses de centrifugation élevées et sont souvent fabriqués à partir de plastique de haute qualité, comme le polypropylène, ce qui les rend solides, résistants et adaptés à une large gamme d'applications en laboratoire.

Les tubes Eppendorf de 1,5 ml sont souvent utilisés pour la séparation de particules par centrifugation, pour l'extraction d'ADN ou d'ARN, ainsi que pour d'autres protocoles de manipulation de petites quantités de liquides.

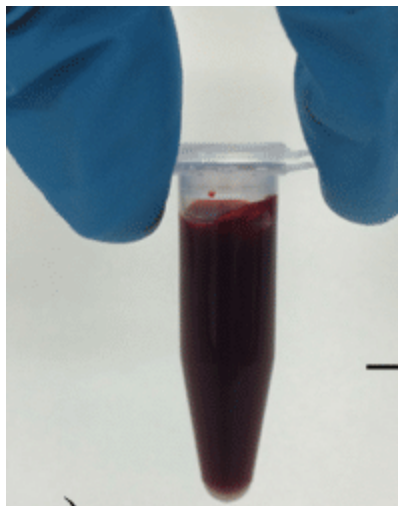


Figure 1.6 : Photo montrant une aliquote de sang total destiné à la conservation.

23/ Il est recommandé de transporter les échantillons destinés à la biologie moléculaire à l'écart d'autres prélèvements.

24/ L'envoi d'échantillons biologiques par la **voie postale ordinaire n'est pas autorisé dans certains pays**. Les expéditeurs doivent respecter la réglementation spécifique de chaque pays d'envoi et de réception, et veiller à emballer les échantillons en tenant compte de la destination et de la nature biologique de la matière.

- Les emballages doivent être de **bonne qualité** et suffisamment **solides** pour résister aux chocs, et être fermés hermétiquement de manière à éviter toute fuite du contenu dans des conditions normales de transport. Une **autorisation d'envoi** expliquant la nature, l'innocuité, la destination, l'objectif, etc., doit être jointe et signée par l'institution expéditrice.

25/ Le port de **lunettes de sécurité** lorsque vous manipulez un produit **toxique** (Ex le BET "bromure d'éthidium, qui est un agent intercalant de l'ADN" il sert à visualiser l'ADN sous rayonnements ultraviolets en présentant une fluorescence **violette**) afin de protéger les yeux contre les projections.

26/ Certains produits sont **térogènes** et peuvent entraîner des risques aux fœtus, les **femmes enceintes** doivent éviter de travailler avec ces produits.

27/ Utiliser toujours un **pipeteur automatique**. Aucun pipetage à la bouche ne doit être effectué (Figure 1.7). Il y'a risque d'avaler ou d'inhaler le produit prélevé.



Figure 1.7 : Photo montrant une personne effectuant un pipetage à bouche.

28/ Fermer les **tubes immédiatement** après **leur utilisation** pour éviter leurs contaminations et le dégagement d'odeurs.

29/ Utiliser les embouts des micropipettes une **seule fois** (usage unique).

30/ **Nettoyer** les pailles après chaque manipulation et vider les poubelles de paille.

31/ Lorsque l'alarme du laboratoire sonne, il est impératif d'arrêter de travailler et d'évacuer les lieux.

32/ Afin d'éviter les risques d'incendies, d'explosion et d'électrocution, il convient de **protéger les bouteilles de gaz comprimé**, de manipuler les autoclaves par les personnes qualifiées et de **respecter la capacité des appareils électriques**.

33/ En cas d'ingestion de produit toxique, il est recommandé de **ne pas faire vomir la personne si le produit est corrosif**, de rincer la bouche et appeler le service de toxicologie ou les urgences.

34/ **Trier** les déchets en fonction de leurs natures.

35/ L'élimination des déchets potentiellement contaminés, y compris les restes d'échantillons biologiques analysés doit être assuré par des sociétés spécialisées.

36/ Se laver les mains à la sortie du laboratoire.

3. Prélèvements pour la biologie moléculaire

3.1. Définition d'un prélèvement

En biologie médicale, le prélèvement est l'ensemble des procédures permettant le **recueil**, la **conservation** et le **transport** d'un échantillon biologique (sang, salive, tissu, matière fécale, urine, sperme...) jusqu'à son traitement dans un laboratoire de biologie.

3.2. Gestion éthique des prélèvements vétérinaires

Tout prélèvement effectué sur un animal doit être fait avec l'accord du propriétaire (c'est le consentement éclairé), qui doit être informé des risques éventuels, de l'intérêt de l'examen complémentaire ainsi que de son coût. Ce processus garantit le respect du bien-être de l'animal tout en assurant la confiance du propriétaire dans la prise en charge vétérinaire. Lors de la réalisation des prélèvements, il faut éviter de blesser l'animal et mettre en danger les personnes qui le manipulent.

3.3. Précautions à prendre

Avant tout prélèvement, il est crucial de **vérifier que l'animal n'est pas suspect de rage**. La rage étant une zoonose, un examen vétérinaire minutieux ne permet pas d'exclure toute possibilité d'infection par le virus rabique.

Il est essentiel de garantir une **contention appropriée** de l'animal, par exemple en muselant les chiens à chaque fois. Toutefois, il est également important d'éviter toute contention brutale de l'animal, afin de minimiser le stress et réduire les risques de blessures, tant pour l'animal que pour l'assistant ou le vétérinaire. Parfois, on utilise des tranquillisants pour calmer l'animal (contention chimique).

En cas de morsures ou de griffures, il est impératif de laver immédiatement la plaie à l'eau courante pendant au moins 15 minutes, puis de la désinfecter avec du savon de Marseille, avant d'appliquer un antiseptique et stopper le saignement. Consulter sans délais un médecin pour une éventuelle prise en charge de la morsure ou de la griffure, ainsi que pour envisager une prise en charge de l'exposition au virus antirabique (vaccination et ou sérothérapie).

3.4. Caractéristique d'un prélèvement destiné à la biologie moléculaire

Un prélèvement **adéquat** est essentiel pour garantir la fiabilité des résultats d'analyse moléculaire. La **quantité** et le **volume** doit être appropriés à l'analyse prévue. Les normes

générales relatives à la réalisation du **prélèvement**, **l'expédition** et le **stockage** des échantillons doivent être **respectées**.

Les échantillons peuvent provenir **d'animaux individuels** (ex : la recherche de certains parasites comme : *Theileria annulata*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*...), de **populations animales** (lait...), ou de **l'environnement** (ex : virus de l'influenza aviaire, parvovirose des palmipèdes...).

La **nature** de l'échantillon diffère selon la **maladie suspectée**, la **durée de l'évolution** et la **forme de l'infection** (systémique ou localisée).

3.5. Différents types de prélèvements destinés à la biologie moléculaire

3.5.1. Échantillon sanguin

3.5.1.1. Sang total sur tube EDTA

Les **échantillons sanguins** doivent être prélevés dans des **tubes EDTA** (généralement bouchon mauve) en respectant un rapport anticoagulant/sang adéquat, et de manière **aseptique**, généralement par ponction veineuse sur l'animal vivant. L'**EDTA** (Acide Éthylène Diamine Tétra-acétique) est l'anticoagulant de choix pour les techniques de biologie moléculaire.

Il est important d'éviter toute contamination de l'échantillon avec de l'**héparine**, ce dernier est un **inhibiteur** de la **polymérase** (enzyme amplificatrice du matériel génétique). Dans le cas où plusieurs tubes de sang doivent être prélevés, il convient de respecter un ordre de prélèvement pour éviter la contamination des échantillons par l'héparine. Le prélèvement pour la biologie moléculaire doit toujours être effectué **avant le prélèvement d'un tube hépariné** (Figure 1.8).



**Tube à prélèvement
Vacutainer Héparine de
Lithium**

Figure 1.8 : Tube à prélèvement vacutainer Héparine de Lithium.

Le tube doit être **homogénéisé** par retournement **lent** et **complet**. En effet, une homogénéisation trop brutale entraîne l'hémolyse et une homogénéisation incomplète entraîne la formation de micro caillots. L'hémolyse peut également être causée par un prélèvement difficile ou par une température élevée. Il est essentiel de ne jamais ajouter de sang après avoir mélangé l'échantillon.

Exemples : diagnostic de l'anaplasmose bovine ou la Blue Tongue en utilisant la technique de PCR...

Le sexage des oiseaux et des reptiles peut également être réalisé à partir du sang total à l'aide de la PCR...

Les échantillons de sang destinés à **l'analyse de l'ARN** devraient de préférence être prélevés dans des tubes contenant un **additif stabilisant** (comme le Trizol).

3.5.2. Écouvillonnage nasal (prélèvement nasopharyngé)

L'écouvillonnage nasal est actuellement la technique de **référence** pour la mise en évidence des **virus respiratoires** (infection respiratoire haute) notamment SARS-CoV-2. L'écouvillonnage nasal se caractérise par une sensibilité plus élevée. Ce type de prélèvement est habituellement effectué par des professionnels. Un prélèvement mal effectué augmente le taux de faux négatifs.



Figure 1.9 : Écouvillonnage nasal chez un cheval.

Exemple : l'herpèsvirus de type 1 (EHV-1) chez le cheval (Figure 1.9).

3.5.3. Prélèvement salivaire

Le prélèvement salivaire est **indolore, moins désagréable** qu'un prélèvement nasopharyngé, **facile à réaliser** et peut se faire à n'importe quel moment de la journée. Il est facilement réalisable sur terrain.

En médecine humaine, le prélèvement salivaire peut être proposé lors d'un dépistage collectif ou lorsqu'il est difficile voire impossible de réaliser un prélèvement nasopharyngé.

Il existe différentes façons de prélever un échantillon de salive.

3.5.3.1. Étapes

- Le prélèvement doit être réalisé 30 minutes après avoir bu une boisson, mangé un aliment, mâché un chewing-gum ou fumé une cigarette.
- Frotter la face interne de la joue (muqueuse jugale) avec un coton-tige afin de décoller les cellules épithéliales.

3.5.4. Écouvillonnage vaginal

Chez les femelles d'animaux, un nettoyage soigneux de la vulve est nécessaire, en soulevant la queue de l'animal. Le prélèvement doit être effectué par un vétérinaire. Introduire doucement l'écouvillon et frotter les parois du vagin pendant 15 à 20 secondes.

Application : recherche de *Coxiella burnetii* chez les petits ruminants (caprins et ovins).

3.5.5. Prélèvements cellulaires et tissulaires

Les prélèvements cellulaires et tissulaires peuvent être utilisés pour analyse moléculaire **non morphologique**. Ces prélèvements sont importants pour le diagnostic de **certaines pathologies tumorales**. Ils sont **mieux réalisés** sur des prélèvements **congelés**. Les analyses moléculaires non morphologiques doivent impérativement être effectuées **après un contrôle morphologique du prélèvement**. Ce contrôle est réalisé par un spécialiste en anatomopathologie, qui émettra un rapport de diagnostic morphologique.

L'analyse moléculaire peut être réalisée sur des prélèvements fixés au formol tamponné.

Organes : poumon, foie, cœur, rate, estomac, cerveau, nœuds lymphatiques, fragment d'intestin, fragment de peau, poils...

3.5.6. Matière fécale (fèces)

Les fèces destinées à l'analyse moléculaire doivent être **prélevées directement** à partir du **rectum** ou **cloaque** (selon l'animal) au moyen **d'écouvillons en coton**, ou avec **une gaze**, en fonction du volume recommandé.

3.5.6.1. Préparation de l'animal

Pour effectuer un prélèvement rectal ou cloacal, il est nécessaire de préparer l'animal de manière adéquate, afin de garantir à la fois sa sécurité et celle du vétérinaire.

- La contention se fait généralement par une autre personne (jamais par le propriétaire car pendant l'examen clinique, le vétérinaire a la **garde juridique** du propriétaire et de l'animal, s'ils sont victimes d'un accident, la responsabilité du vétérinaire est engagée).

- L'animal est debout, ce qui facilite l'accès au rectum ou au cloaque pour prélever les fèces sans induire de stress excessif.

3.5.6.2. Condition de conservation

Il est essentiel que l'échantillon de fèces soit transféré rapidement au laboratoire dans des conditions de conservation appropriées.

Application : recherche de l'ADN de l'agent de la paratuberculose par la technique RT-PCR.

Remarques :

- La **bouse** est la matière fécale des bovins.
- La **fiente** est la matière fécale des volailles.
- Le **crottin** est la matière fécale des chevaux.
- Les **crottes** sont les matières fécales des ovins.

3.5.7. Lait

Le lait peut être prélevé chez des animaux **individuels** ou il peut s'agir **d'un lait de tank en vrac**, c'est-à-dire provenant de plusieurs animaux d'un même troupeau ou de troupeaux différents.

Plusieurs études ont montré que la technique de PCR est plus sensible que la culture bactérienne pour l'identification des germes mammaires dans le lait.

L'analyse moléculaire du lait de tank qui est un échantillon facile à effectuer et représentatif du troupeau semble être une option pratique pour avoir une idée sur les agents pathogènes qui circulent dans l'élevage lorsque la prévalence de l'infection est faible.

3.5.7.1. Technique de prélèvement

Avant de commencer les prélèvements, il est recommandé de toujours se laver les mains et de porter des gants.

Les trayons doivent être nettoyés avec une lavette et du savon, puis rincés soigneusement, les premiers jets de lait doivent être éliminés. Utiliser un flacon stérile pour collecter le lait.

3.5.8. Le sperme

L'analyse moléculaire du sperme implique souvent l'étude des composants génétiques du sperme. Le sperme est généralement obtenu à l'aide d'un vagin artificiel ou par extrusion du pénis et stimulation électrique des glandes séminales à partir de l'anus.

Chez l'étalon, les vagins artificiels sont la méthode la plus courante de collecte de sperme.

3.5.9. Plumes

3.5.9.1. Sexage moléculaire

Chez certaines espèces d'oiseaux, le dimorphisme sexuel est absent ou difficile à mettre en évidence ou bien ne se manifeste que tardivement dans la vie. Cependant, l'information génétique qui détermine le sexe des oiseaux est présente dans leur ADN avant l'éclosion, ce qui permet de connaître le sexe des oiseaux à un stade précoce, bien avant que les différences phénotypiques ne deviennent perceptibles.

Le sexage moléculaire est une méthode qui permet de déterminer le sexe des oiseaux en utilisant leur ADN. Cette technique est particulièrement utile lorsque le dimorphisme sexuel se manifeste tardivement. Elle constitue un outil précieux pour les éleveurs et chercheurs souhaitant connaître le **sexe des oiseaux** dès leur jeune âge.

Le sexage moléculaire consiste à analyser l'ADN de l'oiseau. Bien que tout fragment d'organe puisse être utilisé pour cette analyse, la **plume** reste le prélèvement **privilégié** en raison de sa praticité (technique non invasive qui peut être réalisée même sans effectuer une contention de l'animal).

3.5.9.4. Avantages du sexage moléculaire à partir d'une plume

- La facilité du prélèvement, Il faut prélever des plumes sur la poitrine, à la base du cou de l'oiseau, sur l'aile ou la queue et de les placer dans un sac.
- Aucun saignement n'est généré pendant ou après le prélèvement.
- Le prélèvement est peu douloureux et génère un minimum de stress pour l'oiseau.

Les plumes doivent être **tirés sur l'animal** et non récupérées au fond d'une cage. Si les plumes font plus de 2 cm, trois plumes suffisent. Si elles font moins de 2 cm, il faut récupérer une dizaine de plumes.

3.5.9.5.1. Manipulation délicate

Il est important de ne pas toucher la base de la plume (la partie qui pénètre dans la peau ou le follicule plumeux) avec les doigts.

Pour minimiser la douleur et le stress chez l'oiseau, il est crucial de n'arracher qu'une plume à la fois.

Veiller à ce qu'il n'y ait pas de saignement à la base de la plume pendant le prélèvement.

Éviter d'utiliser des gants talqués lors du prélèvement des plumes.

3.5.10. Cadavre (prélèvement *post-mortem*)

Les cadavres peuvent provenir de **toutes espèces animales**. Ces cadavres ne doivent pas être putréfiés, une lyse des tissus et la présence d'asticots.

La congélation permet de conserver les cadavres. Une mauvaise conservation favorise les mécanismes d'autolyses et de putréfaction. Parfois l'autopsie révèle des lésions pathognomoniques qui nous oriente vers un diagnostic de certitude en utilisant des techniques de biologie moléculaire.

Il est recommandé de prélever **plusieurs cadavres** en cas de mortalités regroupés.

3.5.11. Avortons

Ce type de prélèvement est recommandé lors d'un épisode d'**avortement** (avortement répétés), soit des avortements espacés ou rapprochés en excluant les avortements d'origine traumatiques et accidentels.

Exemple : fièvre Q, toxoplasmose.

3.5.12. Urine

La technique de prélèvements d'urine est différente d'un animal à un autre. Elle dépend de la docilité de l'animal et de sa taille.

Exemple : détection des leptospires dans l'urine des chiens.

3.5.12.1. Sondage urinaire

Chez le chien mâle, le prélèvement urinaire stérile peut être réalisé par **sondage urinaire**, et il doit toujours être effectué par un vétérinaire. La technique consiste à passer une sonde stérile de longueur et de diamètre adaptés, depuis l'orifice urinaire du pénis et la remonter jusque dans la vessie. Le sondage urinaire est possible mais parfois difficile chez la chienne.

3.6. Non-conformité des échantillons

Afin de garantir la qualité des résultats qui est directement liée à la qualité du prélèvement, le laboratoire se réserve le droit de **refuser tout échantillon non conforme**.

Le personnel de laboratoire déclare non conforme des échantillons qui ne présentent pas les garanties suffisantes **d'identifications** ou de **qualité** :

- Absence d'échantillon biologique.
- Date du prélèvement non indiquée.
- Délai d'acheminement au laboratoire dépassé.
- Conditions de transport non respectées.
- Tube cassé ou fuyant (tube non-intact).
- Échantillon non identifié.
- Double étiquetage de la demande, c'est-à-dire lorsque le prélèvement contient deux étiquettes, ce qui peut entraîner des risques d'identification erronée.
- Moment de prélèvement inapproprié.
- Échantillon non conforme : les échantillons de sang présentant des caillots ou ceux ayant été prélevés dans un tube autre que celui recommandé ne seront pas analysés.
- Incohérence entre le formulaire et les échantillons.
- Quantité d'échantillon insuffisante.
- Prélèvement contaminé par des germes extérieurs : la cause la plus fréquente d'erreur en médecine vétérinaire.
- Qualité physico-chimique de l'échantillon altérée (couleur, odeur, consistance).
- Nature d'examen non précisée.

Remarque : malgré que la biologie moléculaire soit une technique rapide spécifique et sensible, certains laboratoires algériens favorisent encore l'utilisation des méthodes traditionnelles à savoir l'examen direct, la culture cellulaire, les techniques sérologique à cause de leurs coûts.

TP 2 : VISITE DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

2.1. Laboratoire de biologie moléculaire

Le laboratoire de biologie moléculaire joue un rôle très important dans la recherche scientifique, l'identification et l'amplification des séquences cibles, ainsi que le diagnostic et le suivi de maladies. C'est une structure **complexe** conçue pour assurer une **ventilation optimale dans les différentes zones du laboratoire**. Celle-ci est essentielle pour garantir un environnement de travail sûr et contrôlé.

C'est une structure complexe conçue pour assurer une ventilation optimale dans les différentes zones du laboratoire. Celle-ci est essentielle pour garantir un environnement de travail sûr et contrôlé.

Afin de diminuer le risque de contamination, le laboratoire de biologie moléculaire doit être divisé en trois zones distincts :

- **Une zone pré-PCR** où l'on manipule de l'ADN non amplifié (extraction d'ADN...).
- **Une zone de préparation du mix** dans laquelle aucun ADN ni échantillons ne sont manipulés.
- **Une zone post-PCR** réservée à la manipulation d'échantillons d'ADN amplifiés.

Afin d'éviter la contamination, tout échange de matériel entre ces deux zones est interdit. Il est très important que toutes les zones du laboratoire soient propres et entretenues de manière régulière, le sol doit être **résistant, facilement lavable** et désinfecté (sol en résine...) et les paillasses devraient être construites à partir de **matériaux robustes** et faciles à désinfecter.

Des contrôles réguliers doivent être effectués pour s'assurer que les conditions du laboratoire restent conformes aux normes.

2.2. Équipements

Dans un laboratoire de biologie moléculaire, une variété d'équipements et d'instruments spécialisés sont nécessaires pour mener à bien les expériences et les analyses :

2.2.1. Armoires de sécurité

Les armoires de sécurité sont des **constructions robustes** permettant un stockage sécurisé des produits dans le laboratoire de biologie moléculaire, conformément à la législation en vigueur.

2.2.2. Réfrigérateurs et congélateurs

Les réfrigérateurs (4°C) et les congélateurs de laboratoire permettent la **conservation** et le **stockage** à une **température basse** des échantillons biologiques, des cellules de grande valeur, des substances, des réactifs et des produits chimiques. Ils doivent être bien **fermés**.

Les congélateurs à -80°C sont des congélateurs à **ultra-basse température**. Ils permettent de conserver à long terme les échantillons à des températures très basses. Les congélateurs à -80°C peuvent être réglés à des température variants entre -4 et -86°C.

2.2.3. Réservoirs d'azote liquide

Pour des températures encore plus basses que celles atteintes par les congélateurs, l'azote liquide est capable de maintenir des températures extrêmement basses, généralement inférieures à -150°C (l'azote liquide est à -196°C). Cela en fait un choix **idéal pour la préservation à long terme d'échantillons biologiques** et de matériaux sensibles à la chaleur.

L'azote liquide doit être stocké dans des récipients spécialement conçus pour résister à ces basses températures et pour prévenir les fuites. Il est également important de stocker l'azote liquide dans un endroit bien ventilé et éloigné de toute source de chaleur ou de flammes nues. L'azote liquide doit être manipulé avec précaution.



Figure 2.1 : Conteneur à azote liquide.

2.2.4. Autoclave

C'est un appareil permettant de **stériliser**, par utilisation de la **chaleur** et de la **vapeur d'eau sous pression** pendant un temps défini. Il est conçu pour stériliser du matériel emballé ou non, des instruments, des verreries ou des liquides pouvant supporter la chaleur.

La stérilisation par autoclave appelé **autoclavage** est la méthode d'inactivation physique la plus courante et la plus efficace. Cette méthode est utilisée à la fois pour réaliser les opérations de stérilisation de matériel ou de liquide et de décontamination des déchets infectieux.

En raison de la haute température et pression, une manipulation appropriée et des mesures de sécurité sont essentielles lors de l'utilisation de l'autoclave pour éviter les accidents.



Figure 2.2 : Autoclave.

2.2.5. Hotte de laboratoire

Ce sont des enceintes dans lesquelles il est possible de manipuler les échantillons biologiques et les réactifs (Figure 2.3). Il existe plusieurs types de hottes :

- **Hotte aspirante ou chimique** : elle permet l'extraction des vapeurs toxiques, offrant ainsi une protection optimale à l'utilisateur contre les dangers et assurant un environnement sûr.
- **Hotte à flux laminaire horizontal** : elle souffle un air qui va de l'intérieur de la hotte vers le manipulateur. Elle est de ce fait utilisée en culture cellulaire.

- **Hotte à flux laminaire vertical** : elle souffle un air qui va du haut vers le bas, elle est utilisée en bactériologie et en virologie.
- **Hotte sans flux laminaire** : elle est utilisée pour l'extraction d'ADN. Une autre doit être réservée au mélange du mix pour PCR.

Avant chaque utilisation, Il est important vérifier la hotte. Cela comprend la vérification de l'alimentation en air et en électricité, l'inspection visuelle des filtres et des grilles d'aération, ainsi que la confirmation du bon fonctionnement du système de ventilation.

Les hottes doivent être nettoyées avant et après chaque utilisation.



Figure 2.3 : Hotte de laboratoire.

2.2.6. Micropipettes

Les micropipettes sont des instruments indispensables au laboratoire, conçues pour des **dosages précis** et se caractérisent par une **justesse de pipetage**. Elles permettent de pipeter des solutions

liquides de volumes très faibles de l'ordre du **microlitre** avec une grande **précision** et **exactitude**. Les micropipettes sont utilisées avec des **embouts jetables** (à usage unique).

Pour assurer un bon fonctionnement des micropipettes et des résultats précis, il est important de suivre quelques règles de bonne pratique :

- Évitez de poser les micropipettes automatiques à plat.
- Toujours vérifier que vous avez bien mis l'embout avant de pipeter.
- Nettoyer les micropipettes régulièrement. Si la micropipette est autoclavable, le nettoyage peut être effectué par autoclavage.
- Décompressez le piston après chaque utilisation.
- Effectuez un calibrage semestriel des micropipettes afin de garantir des résultats précis.



Figure 2.4 : Jeu de micropipettes.

Il existe différents types de micropipettes. Ces derniers peuvent être classés selon plusieurs critères : **volume** (variable ou fixe), **nombre d'extrémités** (monocanaux ou multicanaux) (Figure 2.5).



Figure 2.5 : Micropipette multicanaux.

Une micropipette est composée d'un **bouton poussoir**, d'**éjecteurs de cônes**, une **fenêtre de volume** et un **embout porte-cône**.

2.2.7. Pipeteur automatique

Le pipeteur automatique est un instrument léger facilement manipulable avec une seule main (Figure 2.6). Il permet de pipeter des liquides avec une précision élevée.

Les pipeteurs automatiques sont compatibles avec la majorité des pipettes en verre et en plastique.



Figure 2.6 : Pipeteur automatique.

2.2.8. Agitateurs vortex

C'est un instrument de laboratoire à vitesse variable (Figure 2.7), utilisé pour un mélange rapide et efficace de liquides ou de solutions en un temps réduit. Il permet une agitation stable et fiable pour les tubes sans efforts fournis par le manipulateur. Cependant, le manipulateur doit tenir fermement le tube pendant l'agitation.

À chaque fois que l'appareil est mis sous tension et en choisissant le mode automatique, l'agitation démarre par une simple pression.



Figure 2.7 : Agitateur vortex.

2.2.9. Balance de précision électronique

Les balances sont des instruments de **précision** conçues pour **peser la masse** ou le poids d'une substance ou d'un produit comme l'agarose utilisé en électrophorèse. Elles se caractérisent par leur simplicité d'utilisation et sont essentielles pour garantir la qualité et la fiabilité de nombreuses expériences de laboratoire notamment en biologie moléculaire (Figure 2.8).



Figure 2.8 : Balance de précision électronique de laboratoire.

2.2.10. Thermocycleur

Le thermocycleur appelé aussi cycleur thermique ou machine PCR est un appareil utilisé en biologie moléculaire. Il est utilisé pour l'amplification de l'ADN et la digestion enzymatique.

Un thermocycleur est un appareil de laboratoire muni d'un **bloc thermique** avec des puits où l'on introduit des tubes à PCR contenant le mélange réactionnel (Figure 2.9). Le thermocycleur se caractérise par une capacité à changer la température rapidement et précisément suivant un programme introduit pour chaque PCR. Il peut chauffer et refroidir le mélange réactionnel contenu dans les tubes et permet la programmation de la durée et le nombre de cycles.

Il convient de noter qu'il existe une différence entre le thermocycleur utilisé dans la PCR en temps réel celui utilisé dans la PCR conventionnelle.



Figure 2.9 : Thermocycleur.

2.2.11. Centrifugeuse avec température contrôlée

2.2.11.1. Principe

La centrifugeuse utilise la **force centrifuge** pour séparer les composants d'un échantillon en fonction de leur **densité**. Lorsque l'échantillon est placé dans des tubes et soumis à une force centrifuge, les particules plus lourdes se déposent au fond du tube, tandis que les particules les plus légères se retrouvent vers le haut.

La partie la plus fragile d'une centrifugeuse est l'axe du rotor. Il faut impérativement équilibrer le rotor et répartir les tubes de façon **homogène** de part et d'autre de l'axe central.

Il est important de contrôler les paramètres de la centrifugeuse tels que la température, la vitesse et le temps avant chaque utilisation.

2.2.11.2. Entretien

Un entretien régulier de la centrifugeuse est essentiel pour garantir son bon fonctionnement et prolonger sa durée de vie. Cela doit inclure le nettoyage régulier des rotors, le remplacement des pièces d'usure, et la vérification périodique de la calibration et de la performance de la centrifugeuse.

2.2.12. Bain-marie

C'est un instrument de **chauffage essentiel** en biologie moléculaire (Figure 2.10). Il permet de chauffer l'échantillon étudié en fonction de la température souhaitée. Il est utilisé pour incuber des échantillons dans de l'eau à température constante. Habituellement, le bain-marie est

constitué de **cuve en acier inox** et doté d'une **température réglable**, le bain-marie assure des conditions de chauffage précises et contrôlées.

Afin de garantir le bon fonctionnement du bain-marie, il est recommandé d'ajuster le niveau d'eau avant utilisation, de couvrir la cuve pour éviter l'évaporation et de changer l'eau de la cuve quand le besoin s'en fait sentir. Seule l'eau distillée doit être utilisée car elle ne provoque pas l'oxydation du bain-marie.



Figure 2.10 : Bain-marie.

2.2.13. Distillateur

Un distillateur est un appareil servant à produire de **l'eau distillée**.

2.2.13.1. Principe de la distillation

La distillation consiste à chauffer l'eau jusqu'à ce qu'elle atteigne son point d'ébullition, ce qui entraîne la formation de vapeur d'eau. Cette vapeur est ensuite récupérée, refroidie et condensée

pour former de l'eau distillée, éliminant ainsi les impuretés et les contaminants présents dans l'eau.

2.2.14. Four à micro-onde

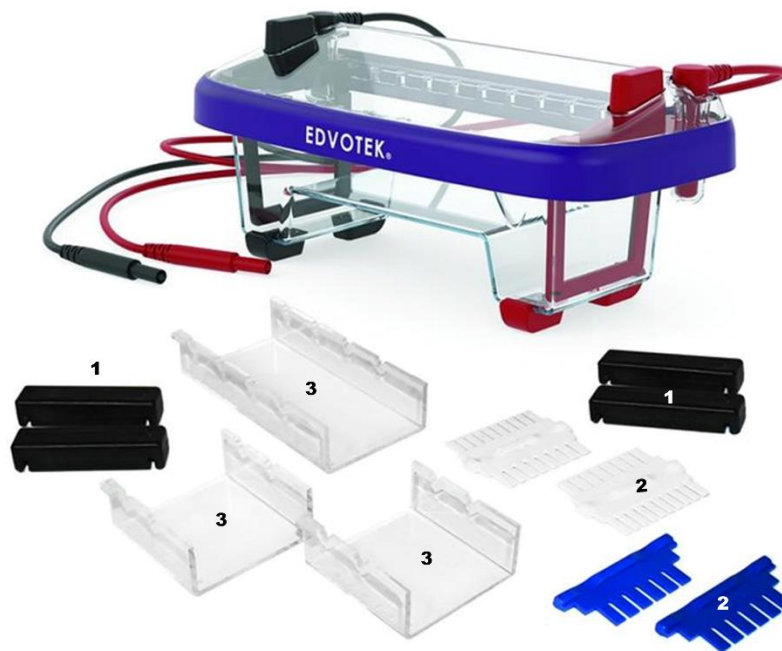
Les fours à micro-ondes peuvent être utilisés en biologie moléculaire dans plusieurs applications, telles que l'accélération de la dissolution uniforme de l'agarose dans le tampon lors de la préparation d'électrophorèse. La préparation du gel peut également se faire sur une plaque chauffante avec agitation.

2.2.15. Cuve d'électrophorèse horizontale

Les cuves d'électrophorèses sont utilisées pour l'électrophorèses du matériel génétique. Elles sont constituées de :

- **Support de moulage du gel** : support pour mouler le gel et insérer les peignes.
- **Plaques de coulage** : livrées par paires, les plaques de coulage s'emboîtent dans les extrémités du support de gel pour créer un récipient dans lequel le gel est coulé.
- **Peignes** : utilisés pour former les puits où les échantillons sont déposés. Ils sont fixés à leurs extrémités sur le support de moulage du gel avant que ce dernier ne soit coulé. Une fois que le gel a pris forme et est prêt à être utilisé, le peigne est soigneusement retiré pour laisser les puits formés dans le gel.
- **Spatule de transport de gel** : utilisée pour manipuler le gel une fois formé.
- Générateur de courant électrique, **câbles et électrodes** : ils comprennent les électrodes positive et négative, ils permettent de fournir le courant électrique nécessaire à l'électrophorèse (Figure 2.11).

Cuve d'électrophorèse horizontale



- 1: Plaques de coulage
- 2: Peignes
- 3: Support de moulage du gel

Figure 2.11 : Schéma montrant les différents composants d'une cuve électrophorèse horizontale.

2.2.16. Séquenceur

Un séquenceur est un appareil utilisé en biologie moléculaire pour déterminer l'ordre exact des bases nucléotidiques dans un échantillon d'ADN ou d'ARN.

Le séquençage est une technique couramment utilisée en biologie moléculaire. Il permet de déterminer l'ordre **linéaire et exact des bases nucléotidiques** dans les acides nucléiques, que ce soit l'ADN ou l'ARN.

2.3. Consommables

Les laboratoires de biologie moléculaire utilisent une variété de consommables pour mener à bien leurs expériences et leurs analyses. Parmi ces consommables couramment utilisés on trouve :

2.3.1. Microtubes à centrifuger de 1,5 mL

Les Microtubes à centrifuger sont des micro-tubes de 1,5 mL avec un bouchon attaché (Figure 2.12). Ces tubes sont utilisés pour manipuler, stocker, protéger et transférer les échantillons et

les réactifs. Ils peuvent être centrifugés et congelés. Ils ne contiennent aucun additif. Ils peuvent être ouverts et fermés d'une seule main.



Figure 2.12 : Différents types de Microtubes à centrifuger de 1,5 mL.

2.3.2. Autres consommables

Plusieurs autres consommables sont nécessaires dans un laboratoire de biologie moléculaire, tels que les tubes à PCR, les kits d'extraction d'ADN/RNA, les gants en nitrile sans poudre, les embouts pour micropipettes, PCR Master Mix, les amorces d'ADN...

2.3.3. Verrerie

La verrerie de laboratoire désigne une variété de récipients en verre, **gradués**, de différentes tailles, tels que les béchers, les erlenmeyers, les éprouvettes graduées et les éprouvettes graduées, qui servent à **mesurer et à mélanger des liquides** (Figure 2.13). Il est important d'éliminer la verrerie endommagée dans des poubelles spécifiques destinées au verre.



Figure 2.13 : Verrerie de laboratoire.

TP 3 : EXTRACTION D'ADN

1. Extraction des acides nucléiques

L'extraction des acides nucléiques est une étape essentielle en biologie moléculaire. Elle est différente selon le **matériel biologique** utilisé (tissus, organes, sang, cellules...) et **l'acide nucléique à extraire** (ADN ou ARN). Elle permet d'obtenir des échantillons purs d'ADN ou d'ARN nécessaires pour des analyses moléculaires, telles que la PCR, et le séquençage. L'extraction des acides nucléiques doit se faire dans une zone désignée, appelée **zone d'extraction**, disposant d'un ensemble distinct de matériels afin de prévenir toute contamination croisée (pipettes, embouts, gants sans latex...) et doit être effectuée par un personnel qualifié. Certaines techniques nécessitent des kits spécifiques et onéreux, tandis que d'autres ne requièrent aucun équipement particulier et peuvent être réalisées à l'aide de produits couramment disponibles dans le commerce. En général, les techniques d'extraction des acides nucléiques **prennent quelques heures**.

1.1. Objectif de l'extraction des acides nucléiques

L'objectif principal de l'extraction des acides nucléiques est **d'isoler l'ADN ou l'ARN** à partir d'un échantillon biologique, tout en éliminant les contaminants susceptibles d'interférer avec les analyses de biologie moléculaire, tels que les **protéines** et les **lipides**. Ces contaminants peuvent nuire à la qualité de l'ADN ou de l'ARN et perturber les réactions nécessaires pour les techniques de biologie moléculaire, comme la **PCR** ou le **séquençage**.

1.2. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN constitue une **étape initiale** de l'analyse en biologie moléculaire. Elle consiste à **isoler les molécules d'ADN** à partir d'un organisme, un tissu ou des cellules.

1.2.1. Principales étapes d'extraction d'ADN

Il existe plusieurs méthodes et protocoles d'extraction d'ADN. Ces derniers, partagent les mêmes étapes à l'exception de la première qui consiste en la lyse.

- **Destruction des tissus et lyse cellulaire** en utilisant plusieurs méthodes :

La destruction mécanique des tissus consiste à broyer le matériel biologique frais ou congelé à l'aide d'un mortier de billes en verre ou de métal ou encore l'utilisation de pistons (Figure 3.1).

Les Méthodes enzymatiques utilisent des enzymes qui permettent la lyse des tissus, telles que la **protéinase K**.

Les méthodes chimiques utilisent des détergents qui lysent les cellules tout en préservant l'intégralité des molécules d'ADN.

Une combinaison des trois méthodes est retrouvée dans de nombreux protocoles d'extraction d'ADN.



Figure 3.1 : Piston en verre.

- **L'inactivation des endonucléases** est réalisée grâce aux traitements enzymatiques.
- **L'élimination des protéines** par l'addition de protéinase qui permette de digérer les protéines en particulier celles associées à l'ADN.
- **La précipitation des protéines.**
- **L'élimination des ARN** afin de ne garder que les ADN. Cette étape nécessite l'utilisation d'une enzyme, l'ARNase.
- **Purification de l'ADN.**

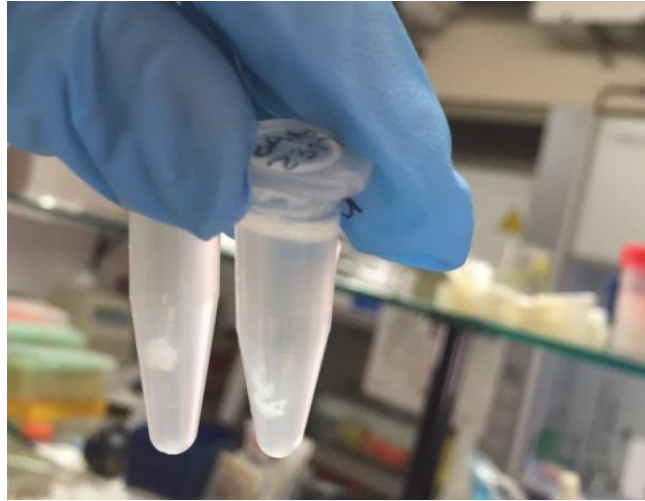


Figure 3.2: Photo montrant une pelote d'ADN.

1.2.2. Extraction de l'ADN à l'aide de kits du commerce

L'utilisation de kits de commerce permet **l'isolement rapide de l'ADN de haute qualité** (Figure 3.3). Chaque kit est fourni avec **un manuel d'utilisation** contenant le protocole d'extraction d'ADN. Ces kits ont pour avantage la **rapidité**, **l'efficacité** et **l'absence d'utilisation de solvants toxiques**. Cependant, l'ADN est parfois dégradé à cause de l'utilisation des détergents forts, un nombre limité d'essais et le coût d'extraction d'ADN par la méthode des kits est très élevé.

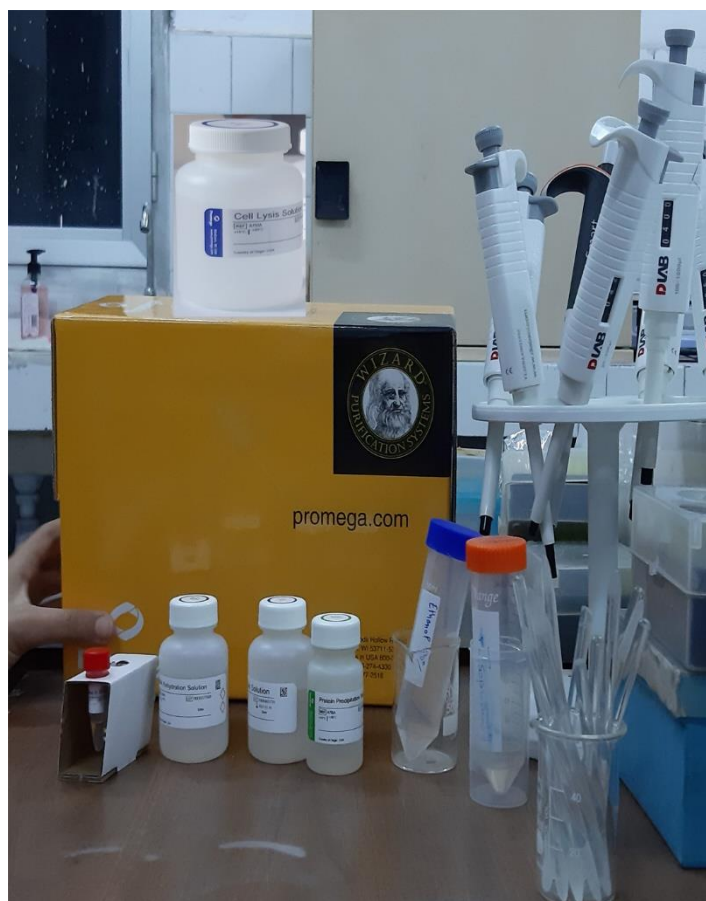


Figure 3.3 : Kit commercial d'extraction d'ADN.

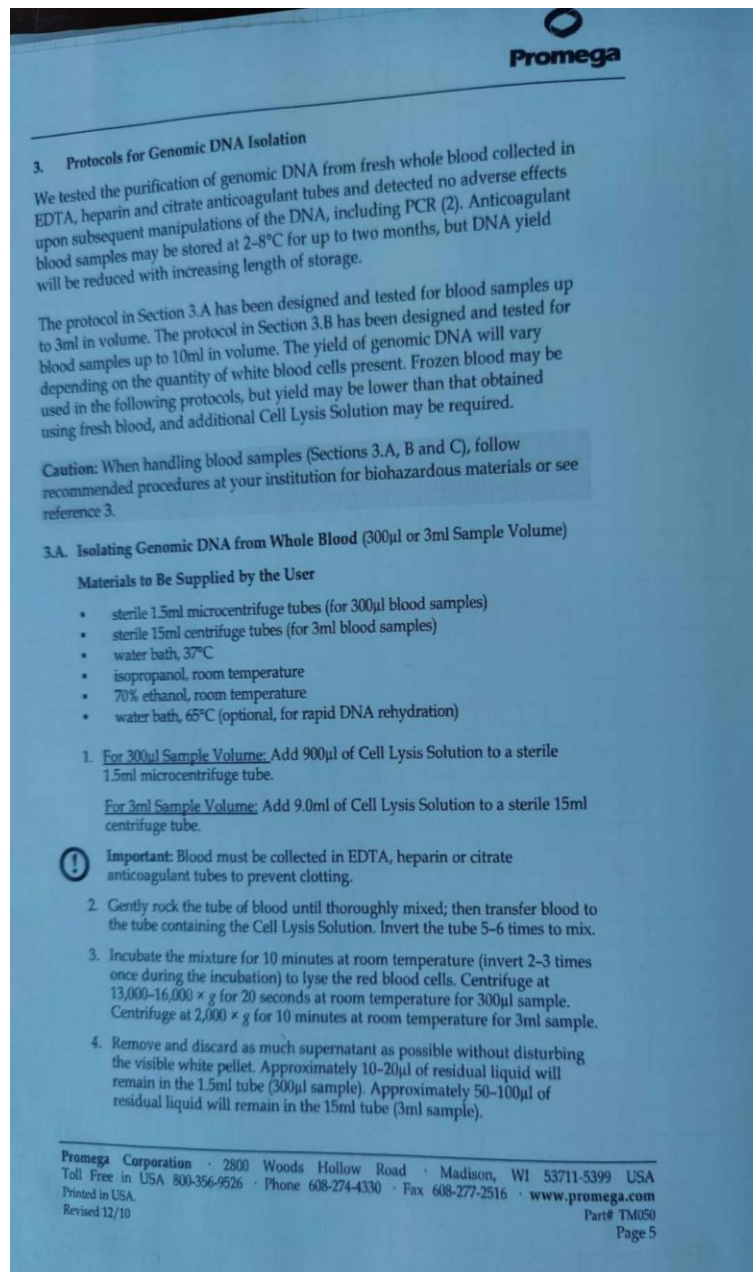


Figure 3.4 : Manuel d'utilisation d'un kit d'extraction d'ADN de la marque Promega.

1.2.3. Purification de l'ADN

La purification de l'ADN consiste en **l'élimination des éventuelles contaminations** issues du reste des cellules éclatées au cours de l'extraction ou des réactifs utilisés. La purification de l'ADN peut se faire **après extraction et après la PCR.**

Pour les produits de la PCR, la purification de l'ADN s'applique soit directement sur le produit (pour éliminer l'excès d'amorces ou d'autres réactifs utilisés) soit à partir du gel dans le but d'isoler une seule bande d'ADN et éliminer les bandes aspécifiques.

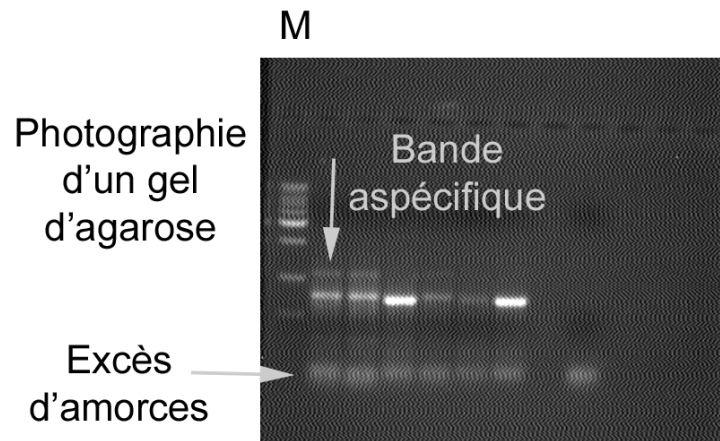


Figure 3.5 : Photographie d'un gel d'agarose à 1% montrant la présence de bandes non spécifiques et la présence d'excès d'amorces.

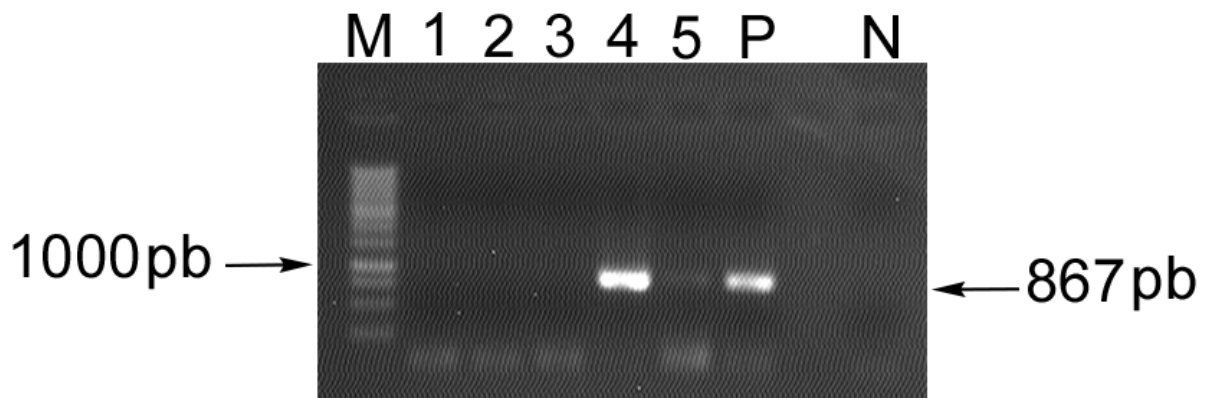


Figure 3.6 : Photographie d'un gel d'agarose à 1,2%.

1.2.4. Kits de purification de l'ADN

Les kits de purification de l'ADN est un moyen rapide et efficace qui sert à extraire et à isoler l'ADN de haute qualité contenu dans les échantillons biologiques en éliminant les impuretés chimiques et biologiques comme les débris cellulaires, les protéines, les lipides et les composants ioniques.

1.2.5. Quantification et qualité des ADN

1.2.5.1. Migration de l'ADN sur gel d'agarose (0,5 à 1%)

La technique la plus simple, et la moins couteuse pour un contrôle d'ADN est la **migration de l'échantillon sur un gel d'agarose** par un **fluorophore** est une visualisation sous **lumière UV** (Figure 3.7).

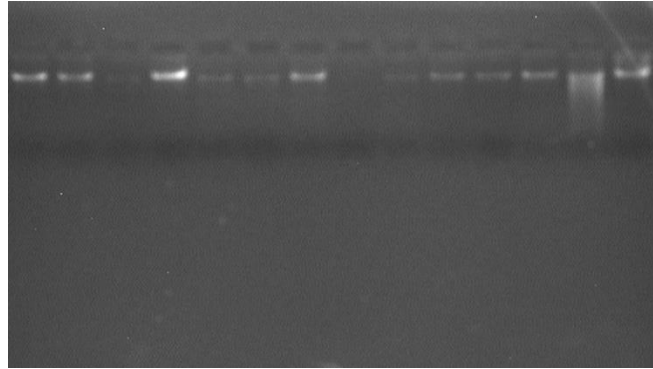


Figure 3.7 : Photographie montrant une migration de l'ADN sur un gel d'agarose.

La quantité d'ADN purifiée peut être aussi évaluée à la fin de l'extraction par dosage d'absorbance au spectrophotomètre ou au fluorimètre.

1.2.5.2. Dosage spectrophotométrique

La mesure d'absorbance au spectrophotomètre (type NanoDrop) permet un dosage de l'ADN à condition que celui-ci soit en quantité suffisante (Figure 3.8).



Figure 3.8 : Photo d'un appareil NanoDrop de la marque Thermo Scientific.

1.2.5.3. Dosage fluorimétrique

Pour **plus de spécificité et de sensibilité** l'ADN peut également être dosé avec un fluorimètre (type Qubit) (Figure 3.9) après coloration avec un fluorochrome spécifique.



Figure 3.9 : Photo d'un appareil de type Qubit.

1.2.5.4. Bioanalyser

Le bioanalyseur est un instrument de **quantification et de contrôle des acides nucléiques**. Cet appareil réalise l'électrophorèse capillaire des acides nucléiques et l'analyse automatique des résultats, permettant d'avoir un dosage et une analyse précis de la qualité de l'échantillon d'ADN.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Delpech, M., “Applications médicales actuelles de la biologie moléculaire”, *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 6 (4), 1991, 9 – 15.
2. Denis, T., Jaubert-Possamai, S., Coord, A.M., “Principes des techniques de biologie moléculaire et génomique”, Éditions Quae, 3^e édition, 2018, 321 pages.
3. Fovet-Rabot, C., “Rédiger le titre de l’article scientifique, en 5 points”, Montpellier (FRA) : CIRAD, 2015, 3 pages.
4. Fovet-Rabot, C., “Connaître les types d’articles scientifiques”, en 8 points. Montpellier (FRA) : CIRAD, 2022, 5 pages.
5. Gharbi, M., “Mes conseils pour publier un article scientifique”, Tunis, 2020, 117 pages.
6. “Invitrogen™ Qubit™ 3 Fluorometer”, Fisher Scientific, <https://www.fishersci.fr/shop/products/qubit-3-0-fluorometer/15387293>, consulté le 16 mars 2025.
7. Manuel terrestre de l’OMSA 2018., “Prélèvement, expédition et stockage des échantillons pour le diagnostic”, Chapitre 1.1.2, 2018, 1 – 11.
8. Médaille, C., “Vade-Mecum des analyses vétérinaires”, édition Med'Com, 2^e édition, 2011, 192 pages.
9. “Pipeteur automatique Sarpette® KR”, Sarstedt, <https://www.medicalexpo.fr/prod/sarstedt/product-69921-1126727.html>, consulté le 6 janvier 2025.

10. “Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000C Spectrophotometer Packages”, Fisher Scientific, <https://www.fishersci.com/shop/products/thermo-scientific-nanodrop-2000-2000c-spectrophotometer-packages/13400504>, consulté le 16 mars 2025.