

ETUDE COMPAREE DE QUATRE METHODES D'EXTRACTION DE L'ADN DU GENE DE L'INSULINE (INS) CHEZ LES DIABETIQUES DE «TYPE 2» EN COTE D'IVOIRE

BOYVIN ^{1,3*}, LO MOKE-BEDJI ², AJL N'GUESSAN ³, GA BAH^{1,3},
YG YAYE ⁴, AJ DJAMAN^{1,3}

RESUME

Introduction : Le diabète de type 2 est le résultat d'une combinaison de prédispositions génétiques et de facteurs environnementaux. Plusieurs gènes dont les gènes de l'insuline et de son récepteur ont été identifiés dans les formes polygéniques et monogéniques du diabète de type 2. En Côte d'Ivoire, très peu de travaux ont été consacrés aux mutations affectant le gène de l'insuline. L'objectif général de ce travail a été de comparer quatre méthodes d'extraction d'ADN afin d'effectuer un meilleur séquençage pour mettre en évidence des mutations portant sur le gène INS et permettre une meilleure prise en charge médicale.

Matériel et Methodes : Il s'agit d'une étude expérimentale prospective réalisée, à l'Institut Pasteur de (IPCI) et à la Clinique de diabétologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Treichville en Côte d'Ivoire, sur 30 échantillons de sang total veineux de patients diabétiques de type 2 prélevés sur tube EDTA (éthylène diamine tétra-acétique). Après isolement des cellules mononucléées, quatre méthodes Qiagen, Phénol/chloroforme, Méthanol et Salting Out ont été utilisées pour extraire l'ADN. La détermination des Concentration de l'ADN a été effectuée à l'aide du fluoromètre Qubit®

3 Invitrogen. Méthodes d'analyses pour comparer les différentes méthodes (Qiagen, Phénol/chloroforme, Méthanol et Salting Out)

Résultats : La méthode Qiagen Blood Kit Maxi® (217 et 306 ng/μL) a obtenu des concentrations moyennes en ADN® (217 et 306 ng/μL) plus élevées et bien adaptées à la PCR que les trois autres méthodes d'extraction avec un meilleur rendement d'extraction de 17,96 ng/mL à 431,5 ng/mL.

La valeur moyenne du rendement d'extraction de la méthode Qiagen a été la plus élevée (431,5 ng/mL). La rapidité du travail a été celle observée par la méthode Qiagen avec un temps réel de 1H15 et un temps travail de 4H15.

Conclusion : L'évaluation comparative des quatre techniques a révélé que la méthode d'extraction Qiagen est la meilleure pour obtenir une bonne qualité de L'ADN et une meilleure amplification du gène de l'insuline humaine

Mots-clé : Côte d'Ivoire - Diabète de type 2 - Méthode d'extraction d'ADN -

ABSTRACT

Introduction : Type 2 diabetes is the result of a combination of genetic predisposition and environmental factors. Several genes including the insulin and insulin receptor genes have been identified in polygenic and monogenic forms of type 2 diabetes. In Côte d'Ivoire, very few studies have been performed on mutations affecting the insulin gene. The aim of this work was to compare four methods of DNA extraction in order to

perform better sequencing to highlight mutations in the INS gene and allow better medical management.

Material and Methods : This is a prospective experimental study carried out at the Pasteur Institute of (IPCI) and at the Diabetology Clinic of the University Hospital Center (CHU) of Treichville in Côte d'Ivoire, on 30 venous whole blood samples of type 2 diabetic patients

1- Département de Biochimie fondamentale et médicale, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI),
01 BP 490 Abidjan 01 (Côte d'Ivoire), tél : +(225)22 00 58 29

2- Clinique du diabète et de l'hypertension Beda Yao Bernard, CHU de Treichville,
01 BP V 03 Abidjan 01 Côte d'Ivoire

3- UFR Biosciences, Université Felix Houphouët-Boigny (UFHB),
01 BP V34 Abidjan 01 Côte d'Ivoire

4- Département de Biochimie-Microbiologie, Université de Jean Lorougnon Guédé, Daloa, Côte d'Ivoire

*Correspondant : BOYVIN Lydie
MD/PHD

06 BP 481 Abidjan 06 / Tél : (225)09311969

lydieboyvin@gmail.com / lydieboyvin@pasteur.ci

collected on EDTA (ethylene diamine tetra-acetic) tube. After mononuclear cells isolation, four methods Qiagen, Phenol/chloroform, Methanol and Salting Out were used to extract DNA. The DNA concentrations were measured by the Qubit® 3 Invitrogen fluorometer.

Results : The Qiagen Blood Kit Maxi® method (217 and 306 ng/ μ L) obtained higher mean DNA concentrations well suited for PCR than the other three extraction

methods with a better extraction yield of 17.96 ng/mL to 431.5 ng/mL.

Conclusion : The comparative evaluation of the four techniques revealed that the Qiagen extraction method was the best.

Keywords : Côte d'Ivoire - Type 2 diabetes - DNA extraction method

INTRODUCTION

Le diabète constitue un problème de santé publique majeur dans le monde. En Côte d'Ivoire, le taux de prévalence du diabète est passé de 5,19 % en 2013 ⁹ à 6,2 % en 2017 ^{1,2}. Le diabète de type 2 est la forme la plus courante de la maladie dans 90% des cas. Il est défini comme une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique résultant de l'inaction de l'insuline par défaut de signalisation au niveau des récepteurs insuliniques malgré une production normale d'insuline ¹³. Le diabète de type 2 est le résultat d'une combinaison de prédispositions génétiques et de facteurs environnementaux ¹⁴.

La production d'insuline comprend de nombreuses étapes de voies de signalisation et le glucose contrôle cette synthèse à plusieurs niveaux depuis la transcription du gène, la stabilisation des ARNm jusqu'à la traduction et la maturation de la pro-insuline en insuline ^{16,21,23}.

Plusieurs gènes dont les gènes de l'insuline et de son récepteur ont été identifiés dans les formes polygéniques et monogéniques du diabète de type 2 ^{5,20}. Des mutations récessives du gène de

l'insuline à l'état homozygote et à Des mutations à l'état hétérozygote ont été rapportées ²⁰.

L'identification de mutations au niveau du gène INS pourrait expliquer le problème de la persistance de l'hyperglycémie malgré le traitement antidiabétique

La recherche de la qualité de l'ADN du gène de l'insuline humaine est indispensable pour permettre une meilleure amplification du gène INS.

En Côte d'Ivoire, très peu de travaux ont été consacrés aux mutations affectant le gène de l'insuline. L'objectif général de ce travail a été de comparer quatre méthodes d'extraction d'ADN afin d'effectuer un meilleur séquençage pour mettre en évidence des mutations portant sur le gène INS et de contribuer à une meilleure prise en charge médicale du diabète de type 2.

Les objectifs spécifiques ont été de décrire les quatre méthodes d'extraction de l'ADN du gène INS de l'insuline, de déterminer les concentrations d'ADN après extraction et d'établir les critères d'évaluation de la qualité de l'ADN après extraction.

MATERIEL ET METHODES

CADRE ET TYPE D'ÉTUDE

Une étude expérimentale prospective a été réalisée, dans la période d'Octobre 2019 à Novembre 2019, à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) et à la Clinique de diabétologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Treichville. Ont été inclus les échantillons sanguins de patients adultes atteints de diabète de type 2 ayant donné leur consentement éclairé et dont l'âge est compris entre 30 et 75 ans.

COLLECTE DES ÉCHANTILLONS SANGUINS

Le matériel biologique a été constitué d'échantillons de sang total veineux prélevé sur tube EDTA (éthylène diamine tétra-acétique) à bouchon violet dans le strict respect des conditions de prélèvement ¹⁰ chez trente (30) patients diabétiques de type 2 sous ou sans traitement insulinothérapie. Ces échantillons, accompagnés de fiches de suivi du prélèvement, ont été ensuite acheminés dans les 24 heures à l'IPCI selon les règles de sécurité pour analyse.

II-2-Appareillage et réactifs de Biologie moléculaire

MATERIEL TECHNIQUE	REACTIFS
Agitateur vortex de marque MIX FISCHER BAND®.	Solution de Ficoll (Milieu de séparation des lymphocytes, d = 1,077),
Balance de précision de marque BEL engeering®,	SDS (Dodécyl sulfate de sodium) à 10%,
Microcentrifugeuse de marque mySpin®	Ethanol à 95°C refroidi, ET Ethanol à 70°C refroidi sur glace utilisé
Centrifugeuse réfrigérée de marque SIGMA Fischer®,	kit Qiagen
un bain-marie à 60°C Heibolp®, Une hotte chimique de marque Bioband contact®,	Protéinase K à 20 mg/mL, Solution de MgCl ₂ , Tris-HCl, PBS (tampon phosphate buffer saline)
un Qubit 3 Fluorometer Invitrogen™ de marque Thermo Fisher	Acétate de sodium, Phénol/chloroforme Alcool isoamylique, Solution de NaCl, le triton X-100

II-3-Méthodologie

Il existe différents protocoles d'extraction d'ADN mais le principe est à peu près toujours le même et comporte 4 étapes qui sont la lyse des cellules ou des tissus ; l'élimination des protéines ; l'élimination des autres acides nucléiques (ARN ...) ; la Concentration d'ADN par précipitation.

- Extraction de l'ADN génomique par la méthode au kit Qiagen

Dans le fond de chaque microtube de 1,5 ml, 20 µL protéinase K et 200 µL de PBS 1x ont été déposés puis 200 µL de sang d'échantillon y ont été ajoutés. A ce mélange 200 µL de tampon AL ont été ajoutés, et le tout homogénéisé au vortex par impulsions pendant 15 s. Après une incubation à 56 ° C pendant 10 min suivi d'une brève centrifugation pendant 5 s à vitesse maximale pour éliminer les gouttelettes accumulées à l'intérieur du capuchon, 200 µL d'éthanol 100 % ont été ajoutés au mélange. Le mélange ainsi obtenu a été à nouveau homogénéisé au vortex par impulsion pendant 15 s puis déposé dans des tubes de lyse. Après centrifugation des

tubes de lyse pendant 5 s à vitesse maximale, la totalité du lysat a été déposé dans les colonnes de centrifugation Qiagen Mini. Les colonnes ont été centrifugées à 8000 tr/min pendant 1 min après fermeture de leurs capuchons puis remplacées dans de nouveaux tubes de lavage après élimination du surnageant. 500 µL de tampon AW1 ont été ajoutés dans ces nouveaux tubes de lavage, suivi d'une 2^{ème} centrifugation à 8000 tr/min. Après élimination du surnageant, 500 µL de tampon de lavage AW2 ont été ajoutés dans les colonnes de centrifugation QIAamp Mini. Ces colonnes ont été centrifugées à 14000 tr/min pendant 1 minute puis placées à nouveau dans des tubes de lavage après élimination du surnageant. Les colonnes contenues dans les tubes de lavage ont été centrifugées à 14000 tr/min pendant 3 minutes pour sécher la membrane complètement. Après élimination du surnageant, les colonnes de centrifugation QIAamp ont été à nouveau placées dans des tubes d'élution et enfin 200 µL de tampon d'élution ont été déposés au centre de la membrane de chaque colonne de centrifugation puis le nouveau mélange obtenu a été centrifugé à 8000 tr/min pendant une minute afin d'éluer l'ADN. Ensuite l'ADN a été conservée à -20° C.

- Extraction de l'ADN génomique par la méthode phénol/chloroforme-alcool-isoamylique

Dans un micro-tube de 2 mL, 1 ml de sang total a été ajouté à 1 ml d'eau distillée et centrifugés à 14000 g pendant 10 minutes puis le surnageant éliminé. Cette étape a été répétée 2 ou 3 fois. Puis 1 ml de tampon de lyse I a été ajouté au culot puis homogénéisé au vortex avant d'être centrifugé de nouveau à 14000 g pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant rejeté, 800 µL de Tampon de lyse II et 100 µL de SDS 10% et 25 µL de protéinase k ont été ajoutés au culot et les tubes ont été incubés à 56 ° C pendant 2 heures. Après incubation, 400 µL de phénol ont été ajoutés au lysat contenant l'ADN. Le mélange, après homogénéisation douce, a été centrifugé à 10000 g pendant 5 minutes et le surnageant récupéré. 400 µL de phénol chloroforme-alcool isoamylique (v/v/v, 25:24:1) ont été ajoutés dans le surnageant obtenu et le mélange obtenu centrifugé à 10000 g pendant 5 minutes . 400 µL de chloroforme-alcool isoamylique (24:1)

et 50 µl d'acétate de sodium (0,3M) ont été ajoutés dans le surnageant obtenu. Après agitation et centrifugation du surnageant à 4000 g pendant 5 minutes, l'éthanol absolu à froid a été ajouté, 3 fois le volume de la solution résultante de l'étape précédente puis les tubes centrifugés à 4000 g pendant 3 minutes après une agitation légère. Le surnageant a été ensuite rejeté et 1 ml de l'éthanol 70% a été ajouté au culot d'ADN puis le mélange obtenu centrifugé à 4000 g pendant 3 minutes. Cette étape a été répétée 3 fois. Après élimination du surnageant, l'ADN est séché à l'air. Enfin, 100 µL de TE ont été ajoutés au culot et stockés à -20°C.

- Extraction de l'ADN génomique au Méthanol
- L'ADN génomique a été extraire selon le protocole modifié de Miguel ¹⁸ en 2013. Le sang total (25 µL) a été transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Ensuite ont été ajouté le tampon de lavage (950 µL de PBS 1X plus 50 µL de saponine 10%) puis le mélange incubé à 4 °C pendant une nuit. Le tampon de lavage a été retiré puis un lavage a été effectué avant d'ajouter 150µL de méthanol. Après une incubation de 20 min, le méthanol a été délicatement retiré et les tubes ont été séchés à la température ambiante pendant 2 heures avant d'ajouter 300 µL d'eau stérile. Les tubes ont ensuite été chauffés à 99 °C dans un thermo-mixeur pendant 30 min pour éluer l'ADN puis les extraits d'ADN ont été aliquotés dans un tube eppendorf de 1,5 mL.
- Extraction de l'ADN par la méthode de Salting Out

L'extraction de l'ADN génomique des cellules mononucléées du sang périphérique a été réalisée selon la méthode décrite par Maurya en 2013 ¹⁷. Après décongélation, le sang a été mis en suspension dans 900 µL de tampon A, puis maintenu dans de la glace pendant 15 minutes, et centrifugé à 10 000 tr / min à 4 °C pendant 10 minutes. Après élimination du surnageant, les cellules mononucléées (environ 10⁷ cellules) préalablement isolées ont été remises en suspension dans un tube contenant un volume de 1,8 mL de tampon B, auquel ont été ajoutés 150 µL de SDS à 10% et 20 µL de protéinase K (20 mg / mL). Le mélange obtenu a été incubé pendant une nuit à 56°C sur un orbiteur shaker dans un bain marie.

Après incubation, un volume de 700 µL de NaCl saturée a été ajouté au mélange réactionnel. Le tout a été vigoureusement mélangé pendant 15 min, puis centrifugé à 10 000 tr/min à 4 °C pendant 10 minutes. Le surnageant a été délicatement recueilli, puis mis dans un autre tube de 15 mL en polypropylène de type Falcon et le culot rejeté. Le surnageant a été mis dans des aliquotes. L'ADN a été précipité dans un volume de 450 µL d'éthanol absolu refroidi à la glace et le mélange centrifugé à 10 000 trs/min à 4 °C pendant 10 minutes. Un volume de 50 µL d'éthanol 100% glacial a été ensuite ajouté dans chaque tube après élimination du surnageant. Le contenu du tube a été ensuite mélangé par retournement. Le précipité blanc d'ADN, apparu sous forme de coton a été recueilli. L'ADN recueilli a été lavé trois fois avec de l'éthanol 70%, séché à l'air pendant 30 minutes, puis dissous dans du tampon TE pendant au moins 4 h à 50°C, avec une agitation douce au cours de l'incubation. L'échantillon d'ADN purifié a été conservé à -20°C pour une utilisation ultérieure.

II-4-Détermination des concentrations d'ADN par le Qubit

Après extraction de l'ADN, la mesure de la concentration de l'ADN des différents échantillons a été effectuée à l'aide du fluoromètre Qubit® 3 Invitrogen ³ dont le principe est basé sur une interaction entre un fluorophore (un colorant fluorescent) et la molécule d'ADN. Le fluorophore se lie spécifiquement à l'ADN et émet de la fluorescence (Longueurs d'ondes d'émission 510 à 720 nm ; Longueurs d'ondes de détection : 300 à 1000 nm). À une quantité spécifique du colorant, la quantité de signal de fluorescence de ce mélange est directement proportionnelle à la concentration d'ADN dans la solution, même en présence d'autres biomolécules ^{19, 12}.

La mesure a été effectuée comme suit : Dans un tube Eppendorf, 190 µL d'extrait d'ADN ont été déposés, puis 10 µL de tampon du kit Qubit 3® ont été ajouté soit un volume total de 200 µL. Après une agitation douce le mélange a été incubé à température ambiante pendant 2mn puis placé dans le fluoromètre. Le calcul de la concentration d'ADN dans l'échantillon est effectué par l'appareil. La lecture de la concentration de chaque échantillon a été faite en 3 secondes et les résultats ont été consignés dans un fichier Excel.

II-5 Critères d'évaluation de la qualité de l'ADN

Dans cette étude, le rendement de l'extraction et la rapidité ont été utilisés comme critères d'évaluation de la qualité de l'ADN. Les autres critères sont la taille des fragments d'acides nucléiques et la pureté (Bienvenu *et al.*, 1999). Le rendement a été calculé en réalisant le rapport entre la quantité d'ADN obtenue et le volume initial de sang total utilisé. La rapidité est le temps nécessaire pour réaliser une extraction. Elle a été déterminée par le temps réel et temps de travail.

II-6-Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats a été réalisée à partir du logiciel Graph Pad Prism version 8.0.1. Le test de Student a été utilisé pour la comparaison des moyennes. Le seuil de significativité est $p < 0,05$ avec un intervalle de confiance à 95%. Les résultats ont été exprimés en moyenne accompagnés des erreurs standards sur la moyenne (moyenne \pm ESM).

II-7-Considération éthique

Cette étude a été réalisée conformément à la déclaration d'Helsinki et a eu l'approbation du comité National d'Éthique et de Recherche (CNER) dont la référence est N/Réf :127-18/MSHP/CNESVS6-km.

RESULTATS

Épidémiologie du diabète de type 2 dans la population d'étude

Parmi les 30 échantillons de patients diabétiques de type 2 analysés, il y a eu plus d'hommes diabétiques (16/30 ; 53,33%) que de femmes (14/30 ; 46,67%) avec un Sex ratio de 1,14.

La moyenne d'âge de la population d'étude a été de $55 \pm 1,66$ avec des extrêmes de 30 à 75 ans.

Répartition des concentrations d'ADN après extraction selon les quatre méthodes utilisées.

La méthode Qiagen a montré une valeur moyenne des concentrations d'ADN après extraction plus élevée ($86,3 \pm 21,62$ ng/mL) que celles des autres méthodes : Phénol/chloroforme ($8,98 \pm 4,07$ ng/mL), Méthanol ($8,91 \pm 4,12$ ng/mL) et Salting out ($0,99 \pm 0,49$ ng/mL) (Tableau I) avec $p \leq 0,0001$ (figure 1).

Par contre les méthodes Phénol/chloroforme, Méthanol et Salting out ont présenté des valeurs moyennes de concentrations d'ADN après extraction sans différences significatives $p \leq 0,1754$ (figure 2).

Critères de qualité de l'ADN selon les quatre méthodes utilisées

La valeur moyenne du rendement d'extraction de la méthode Qiagen a été la plus élevée (431,5 ng/mL). Viennent ensuite celles du méthanol

(356,4 ng/mL), du Phénol/chloroforme (17,96 ng/mL) et de Salting Out (9,9 ng/mL).

La rapidité du travail a été celle observée par la méthode Qiagen avec un temps réel de 1H15 et un temps travail de 4H15. Le temps de travail a été de 3H à 7H pour la méthode Phénol/chloroforme, de 4H15 à 6H15 + 1 nuit d'incubation pour la méthode au méthanol, de 6H20 à 9H30 + 1 nuit d'incubation pour la méthode Salting Out.

Tableau I : Concentration moyenne d'ADN après extraction

Méthodes D'Extraction	Echantillons (N=30)	
	Volume de sang total utilisé (μL)	Concentration moyenne ADN (ng/mL)
Qiagen	200	$86,3 \pm 21,62$ a
Phénol/chloroforme alcool-isoamylique (PCI)	500	$8,98 \pm 4,07$ b
Méthanol	25	$8,91 \pm 4,12$ c
Salting out	100	$0,99 \pm 0,49$ d

La différence est significative pour $p \leq 0,05$ NS= Non significatif

a et b : $p = 0,0009$ a et c : $p = 0,0009$ a et d : $p = 0,0002$

b et c : $p = 0,9894$ NS b et d : $p = 0,0557$ NS c et d : $p = 0,0557$ NS

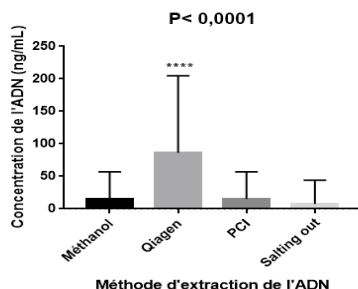


Figure 1 : Histogramme des Concentration D'ADN obtenue par la méthode Qiagen et les autres méthodes conventionnelles

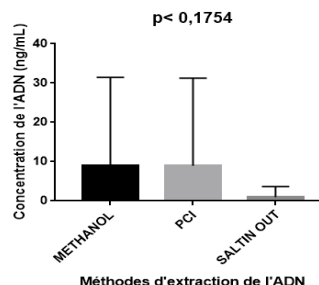


Figure 2 : Histogramme des Concentrations D'ADN obtenues par les méthodes de Salting Out et des solvants organiques

DISCUSSION

DONNÉES SOCIODÉMOGRAPHIQUES

La moyenne d'âge mise en évidence dans cette étude était de 55 ans. Le diabète de type 2 se manifeste généralement après 40 ans, **touche surtout les personnes au-delà de 50 ans**¹² et est diagnostiquée vers l'âge de 65 ans¹⁹.

Etude comparative des quatre Méthodes d'extraction

L'évaluation comparative des quatre techniques d'extraction de l'ADN Qiagen, Phénol/chloroforme, Méthanol et Salting Out a révélé que la méthode d'extraction Qiagen a été la meilleure avec des concentrations d'ADN plus élevées après extraction avec un meilleur rendement d'extraction qui permet la réalisation de la PCR. En effet, les concentrations en ADN obtenues avec les méthodes Qiagen Blood Kit Maxi® sont en moyenne de 217 et 306 ng/μL et bien adaptées à la méthode PCR^{4,6}. Cependant ces concentrations ne sont pas adaptées à des expériences ultérieures de détection des séquences d'ADN (Southern-blot), nécessitant environ 10 μg dans un faible volume (10 à 30 μL). Il faut dans ces cas effectuer des concentrations par précipitation de l'ADN à l'alcool⁴.

Par contre les concentrations d'ADN après extraction ont été nettement plus faibles avec les méthodes Salting Out par rapport aux méthodes utilisant des solvants organiques que sont Phénol/chloroforme et Méthanol⁷. La méthode au

phénol-chloroforme est reconnue comme la méthode de « référence » permettant l'extraction d'un ADN hautement purifié débarrassé de la très grande majorité des contaminants possibles. Malheureusement l'utilisation du phénol toxique constitue un inconvénient majeur car il doit être manipulé avec grande précaution. Cette méthodologie est donc peu adaptée au laboratoire d'analyse médicale de ville^{4,5,11}.

Les méthodes au phénol-chloroforme, Qiagen Blood Maxi®, chlorure de guanidium ont donné un rendement moyen d'extraction de 15 à 41 μg/ml du volume de sang frais utilisé ce qui permet de réaliser au minimum une analyse par Southern-blot et plusieurs dizaines de réactions de PCR par ml de sang⁴.

Concernant le temps de travail, La méthode Qiagen a été plus rapide que les autres méthodes. Parmi les autres méthodes, la méthode au phénol-chloroforme est la moins longue. Les travaux de Bienvenu en 1999 sur la méthode Qiagen Blood Kit Maxi® ont montré un temps de travail (2h30 dont 1h35 de travail effectif) similaire à celui de notre étude. Les méthodes les plus longues sont celles utilisant les solvants organiques tel que le phénol-chloroforme^{7,11}.

Des méthodes très rapides, adaptées uniquement à l'amplification par PCR de fragments génomiques, ont été récemment commercialisées : Genereleaser® de ATGC Biotechnologie, qui consiste à ajouter 1 μl de sang directement

dans un tube PCR contenant une solution de lyse (10 mn), et Dynabeads DNA direct® de Dynal, qui consiste à purifier de l'ADN dans un seul tube à partir de 10 µl de sang à laide

de microbilles magnétiques (10 mn). L'avenir est probablement dans l'automatisation de ces méthodes d'extraction de l'ADN ^{4,5}.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La méthode Qiagen est excellente, plus simple et plus rapide que les méthodes conventionnelles réduisant le coût en personnel et pouvant ainsi être des alternatives intéressantes dans certains

laboratoires. Cependant l'évaluation de la pureté de l'ADN après extraction par la mesure de l'absorbance par spectrophotométrie est indispensable pour une meilleure PCR.

REFERENCES

1. Adoueni KV. Santé : le taux de prévalence Nationale du diabète est passé à 6,2 % selon une enquête coordonnée en 2017. Programme National de Lutte contre les Maladies Métaboliques et de Prévention des Maladies Non Transmissibles (PNLMM/PMNT). 2019. <https://news.abidjan.net/h/654442.html>. Publié le jeudi 21 mars 2019.
2. Akré Djako Sosthène Thierry, Obouayeba Abba Pacôme, Koffi Allali Eugène, Kouakou Koffi Elysée, Konan Délafosse, Kporou Kouassi Elysée, Akoua-Koffi Chatal. Évaluation des facteurs de risques du diabète chez les patients diabétiques au centre hospitalier régional de Daloa, Côte d'Ivoire. J. Appl. Biosci. 2021; 168: 17436 – 17445 ISSN 1997-5902
3. Anonyme 2. Qubit™ 3 Fluorometer invitrogen. Catalog Number Q33216 Publication Number MAN0010866. Revision B.0 . 2017, Ed 2017 Thermo Fisher Scientific Inc. 68p pdf.
4. Bienvenu T, Meunier C, Bousquet S, Chiron S, Richard L, Gautheret-Dejean A, Rouselle J F, Feldmann D. Les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin. Annales de Biologie Clinique. 1999; 57 (1): 77-84.
5. Bonnefond A, Boissel M, Bolze A, Durand E, Toussaint B, Vaillant E, Gaget S, De Graeve F, Dechaume A, Allegaert F, LeGuilcher D, Yengo, Dhennin V, Borys JM, Lu JT, Cirulli ET, Elhanan G, Roussel R, Balkau B, Marre M, Franc S, Charpentier G, Vaxillaire M, Canouil M, Washington NL, Grzymalski JJ, Froguel P. Pathogenic variants in actionable MODY genes are associated with type 2 diabetes. Nat Metab. 2020;2(10):1126-1134. doi: 10.1038/s42255-020-00294-3. Epub 2020 Oct 12.
6. Chacon-Cortes D, Haupt L, Lea R, Griffiths L. Comparison of genomic DNA extraction techniques from whole blood samples: a time, cost and quality evaluation study. Molecular biology reports. 2012 ;39:5961-5966
7. Chacon Cortes D F & Griffiths L. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. Journal of Biorepository Science for Applied Medicine, 2014(2), pp. 1-9.
8. Collins F S. *Realizing the Dream of Molecularly Targeted Therapies for Cystic Fibrosis*. New England Journal of Medicine. 2019; 381: 1863-1865.
9. Diop SN & Diédhiou D. Le diabète sucré en Afrique sub-saharienne : aspects épidémiologiques et socioéconomiques. *Médecine des Maladies Métaboliques*. 2015 ; 9 (2) : 123-129
10. Duchassaing D. L'assurance de la qualité de la phase pré-analytique : le prélèvement. Annales De Biologie Clinique. 1997 ; 55 : 497-508
11. Ghaheri M, Kahrizi D, Yari K., Babaie A, Suthar R S, Kazemi E. A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. Cellular and Molecular Biology. 2016, 62 (3): 120-124 ISSN:1165-158X doi: 10.14715/cmb/2016.62.3.20
12. Hamza I A, Jurzik L, Wilhelm M, Uberla K. *Détection et quantification du bocavirus humain dans l'eau de rivière*. Journal of General Virology. 2009 ; 90 : 2634-2637.
13. Hancock ML, Meyer RC, Mistry M, Khetani RS, Wagschal A, Shin T, Ho Sui SJ, Näär AM, Flanagan JG. Insulin Receptor Associates with Promoters Genome-wide and Regulates Gene Expression. Cell. 2019;177(3):722-736.e22. doi: 10.1016/j.cell.2019.02.030. Epub 2019 Apr 4. PMID: 30955890; PMCID: PMC6478446.
14. Karuranga S., Malanda B., Saeedi P. & Salpea P. L'Atlas du Diabète de la FID. 2019. 9ème Édition 2019 (Atlas du Diabète de la FID No. 9).

15. Lange G. L'âge moyen de découvert du diabète de type 2. THESE. Pour le Doctorat en MEDECINE. Université Paris 7 – Denis Diderot. 62p pdf Année ??
16. Lennicke C, & Cochemé HM. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Molecular Cell*. 2021; 81(18): 3691-3707.
17. Maurya R, Kumar B, Sundar S. Evaluation of salt-out method for the isolation of DNA from whole blood: A pathological approach of DNA based diagnosis. *Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*. 2013;2:53–57. 22.
18. Miguel RB, Coura JR, Samudio F, Suárez-Mutis MC. Evaluation of three different DNA extraction methods from blood samples collected in dried filter paper in Plasmodium subpatent infections from the Amazon region in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013;55(3):S0036-46652013000300205.
19. Schweitzer C, Scaiano, JC. [Selective binding and local photophysics of the fluorescent cyanine dye PicoGreen in double-stranded and single-stranded DNA..](#) *Chimie physique Physique chimique*. 2003 ; 5 : 4911–4917.
20. Stoy J., De Franco E., Ye H., Park S.-Y., Bell G.I. & Hattersley A.T. In celebration of a century with insulin – Update of insulin gene mutations in diabetes. 100th Anniversary of the Discovery of Insulin. *Molecular Metabolism*. 2021; 52: 101280.
21. Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, [Froguel P](#). A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nature Genetics*. 1998 ; 20 (2) :113-4.
22. Virally M, Laloi-Michelin M, Kevorkian J-P, Bitu J, Guillausseau P-J. Spécificités du diabète de type 2 chez le sujet âgé. **Sang Thrombose Vaisseaux**. 2011; **23 (8) : 409-415**
23. Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, [Stanhope RG](#) , [O'Rahilly S](#). A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nature Genetic*. 1998; 20 (2) :111-2.