



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie

# MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :

**Amani CHERGUI**

Le : mercredi 10 juillet 2019

## Thème

**Amélioration de la méthode d'extraction d'ADN  
génomique au CTAB appliquée aux feuilles de la vigne**

---

### Jury :

M.	Ziane LAIADI	MCA	Université de Biskra	Président
M.	Yacine DERRADJI	MAA	Université de Biskra	Examineur
Mlle.	Hanane ACHOUR	MAB	Université de Biskra	Rapporteur

Année universitaire : 2018 - 2019

# Remerciements

Je remercie Allah qui m'a aidé et grâce à lui nous pouvons réaliser ce travail.

Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide de mon encadreur Mm. Achour Hanane, je la remercie pour son orientation et son plus haut soutien.

J'adresse mes sincères remerciements à ceux qui ont permis à ce travail d'être réalisable, notamment le chef de département des sciences de la nature et de la vie Mm. Mokrani, sans oublier tous les ingénieurs de laboratoire d'El-Hadjeb, Mm. Maouaheb et tous le groupe des chercheurs du Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides-Biskra et également tous les personnes qui ont participé de près ou loin à la réalisation de ce travail.

# Dédicace

Je dédie ce modeste travail,

A ma chère mère Asma et mon cher père Ahmed, pour son soutien qu'ils m'ont toujours accordé et l'intérêt qu'ils ont porté à mes études et pour ses encouragements. Quoi que je face ou que je dise, je ne saurai pas vous remercier comme il se doit.

A mon cher fiancé Samir ... pour ta compréhension, ta confiance et ta patience. Sincère gratitude.

A ma deuxième famille qui ma donné de l'amour et de la vivacité.

A ma chère tante Souad, qui ma soutenu durant toute ma vie. Qu'Allah te donne santé, bonheur et longue vie.

A mes frères, Mahmoud, Moncef et sœurs Manel et Aya

A tous mes amies surtout Djihen, Kenza, Karima, Tahani, Soumia et Maryama, qui m'ont toujours encouragé.

A tous ceux qui m'ont soutenu et qui me soutient encore.

Amani

# Table des matières

Remerciements

Dédicace

Sommaire

Liste des Tableaux .....	I
Liste des Figures .....	II
Liste des abréviations .....	III
Introduction .....	1

## Première partie : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### Chapitre 1. GENERALITES SUR LA VIGNE

1.1. Viticulture en Algérie .....	3
1.2. Classification des vitacées .....	3
1.3. Morphologie générale de la vigne.....	4
1.4. Cycle végétatif de la vigne.....	5
1.5. Composition générale de la feuille de la vigne .....	6

### Chapitre 2. EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE

2.1. Généralités sur le génome de la vigne.....	7
2.2. Extraction de l'ADN génomique .....	7
2.3. Différentes méthodes permettant d'obtenir l'ADN .....	7
2.3.1. Isolement de l'ADN par extraction liquide-liquide .....	7
2.3.2. Isolement de l'ADN par affinité sélective entre la silice et l'ADN .....	7
2.4. Techniques d'analyse de l'ADN .....	7
2.4.1. Analyse sur gel d'agarose .....	7
2.4.2. Analyse de la concentration de l'ADN .....	8
2.4.2.1. Dosage de l'ADN à l'aide d'un gel d'agarose .....	8
2.4.2.2. Dosage de l'ADN par spectrophotométrie .....	8
2.4.2.3. Dosage de l'ADN à l'aide de colorant fluorescent .....	9
2.4.3. Analyse sur gel de polyacrylamide .....	9

## Deuxième partie : PARTIE EXPERIMENTALE

### Chapitre 3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Stratégie de travail.....	10
--------------------------------	----

<b>3.2. Matériel et méthodes</b> .....	11
3.2.1. Matériel biologique .....	11
A. Séchage par le gel de silice .....	12
B. Séchage à l'étuve ventilée .....	12
3.2.2. Méthodes de travail .....	15
3.2.2.1. Paramètres optimisés .....	17
3.2.2.2. Extraction d'ADN .....	17
3.2.2.3. Vérification de la qualité et la quantité d'ADN extrait .....	20

#### **Chapitre 4. RESULTATS**

<b>4.1. ADN obtenu avant l'optimisation</b> .....	22
4.1.1. Protocole A .....	22
<b>4.2. ADN obtenu après l'optimisation</b> .....	24
4.2.1. Protocole B .....	24
4.2.2. Protocole D .....	27
4.2.3. Protocole E (salting out) .....	28
4.2.4. Protocole F .....	33
4.2.5. Protocole G .....	33

#### **Chapitre 5. DISCUSSION DES RESULTATS**

<b>5.1. Discussion des résultats</b> .....	35
5.1.1. Le matériel végétal .....	35
5.1.2. Intégrité de l'ADN extrait .....	37
5.1.3. Concentration et rendement de l'ADN extrait .....	37
5.1.4. Pureté de l'ADN extrait .....	39
5.1.5. Estimation des coûts .....	40
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	41
<b>Bibliographie</b> .....	43
<b>Annexes</b>	
<b>Résumés</b>	

# Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Caractéristiques de chaque échantillon. ....	14
<b>Tableau 2.</b> Réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN génomique. ....	15
<b>Tableau 3.</b> Paramètres optimisés au protocole de Sandra et <i>al.</i> (2012). ....	17
<b>Tableau 4.</b> Ratio et ces indications.....	21
<b>Tableau 5.</b> Résultats de l'absorbance à 230, 260 et 280 nm des échantillons (VI4, VI3, TAL, VIAL, T3, T5). ....	23
<b>Tableau 6.</b> Résultats de l'absorbance à 230, 260 et 280 nm pour les échantillons (VI3 et TAL).....	25
<b>Tableau 7.</b> Moyenne de la concentration, la masse et le rendement de l'ADN extrait par le protocole B. ....	26
<b>Tableau 8.</b> Détermination de la pureté de l'ADN extrait. ....	26
<b>Tableau 9.</b> Moyenne de la concentration, la masse et le rendement de l'ADN extrait par le protocole D. ....	28
<b>Tableau 10.</b> Détermination de la pureté de l'ADN. ....	28
<b>Tableau 11.</b> Résultats de l'absorbance à 230, 260 et 280 nm des échantillons (VIAL, T3 et VI3). ....	29
<b>Tableau 12.</b> Moyenne de la concentration, la masse et le rendement de l'ADN extrait par le protocole E. ....	30
<b>Tableau 13.</b> Détermination de la pureté de l'ADN. ....	30
<b>Tableau 14.</b> Résultats de l'absorbance à 230, 260 et 280 nm pour l'échantillon VI4. ....	32
<b>Tableau 15.</b> Moyenne de la concentration, la masse et le rendement de l'ADN extrait par le protocole F.....	32
<b>Tableau 16.</b> Détermination de la pureté de l'ADN. ....	32
<b>Tableau 17.</b> Moyenne de la concentration, la masse et le rendement de l'ADN extrait par le protocole G.....	34
<b>Tableau 18.</b> Détermination de la pureté de l'ADN. ....	34
<b>Tableau 19.</b> Résultat de l'extraction d'ADN à partir des feuilles préparés par différentes méthodes.....	35
<b>Tableau 20.</b> Concentrations moyennes et les rendements moyens de l'ADN extrait des différents protocoles.....	38
<b>Tableau 21.</b> Rapports DO260/DO280 et DO260/DO230 des différents protocoles appliqués. ....	39
<b>Tableau 22.</b> Etude de coût de l'extraction d'ADN génomique pour un échantillon par le protocole optimisé (G) et le protocole avant optimisation (A). ....	40

# Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> Schéma général de la vigne.....	5
<b>Figure 2.</b> Feuille de la vigne .....	5
<b>Figure 3.</b> Cycle végétatif de la vigne.....	6
<b>Figure 4.</b> Spectre U.V. réalisé par spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 montrant une contamination par le phénol .....	8
<b>Figure 5.</b> Spectre d'absorbance d'un polyphénol .....	9
<b>Figure 6.</b> Illustration schématique des différentes étapes de l'extraction d'ADN génomique.	10
<b>Figure 7.</b> Récolte et préparation des échantillons.....	11
<b>Figure 8.</b> Différentes étapes de séchage des feuilles par le gel de silice. ....	12
<b>Figure 9.</b> Séchage des feuilles à l'étuve. ....	13
<b>Figure 10.</b> Broyage et conservation des feuilles.....	13
<b>Figure 11.</b> Agitation mécanique horizontale de tous les échantillons au bain-mari.....	20
<b>Figure 12.</b> Visualisation de l'ADN extrait par le gel d'agarose. ....	20
<b>Figure 13.</b> Aspect de l'échantillon après l'ajout du tampon de lyse.....	22
<b>Figure 14.</b> Profile électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application de protocole A de Sandra et <i>al.</i> (2012). Une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % après une coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V.....	23
<b>Figure 15.</b> Profil électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application de protocole B. Une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % après coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V.....	25
<b>Figure 16.</b> Profile électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application du protocole D. Une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 %, après coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V.....	27
<b>Figure 17.</b> Profile électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application de protocole E. Une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % après une coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V. ....	29
<b>Figure 18.</b> Profile électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application de protocole F. Une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % après coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V.....	31
<b>Figure 19.</b> Profile électrophorétique d'ADN obtenu après l'application de protocole G. Une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % après une coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V.....	33
<b>Figure 20.</b> Etape de purification d'ADN par l'ajout de l'acétate de sodium, suivie d'une centrifugation, les phases ne sont pas séparées. ....	38

# Liste des abréviations

**ADN:** Acide désoxyribonucléique.

**BET:** Bromure d'éthidium.

**CAI:** Chloroforme alcool isoamylique.

**CTAB:** Cetyl triméthylammonium bromide.

**DA:** Dinar algérien.

**EDTA:** Acide éthylène-diamine-tétra-acétique.

**FAO:** Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and agriculture organisation of the united nations).

**OIV:** Organisation internationale de la vigne et du vin.

**P.K:** Protéinase K.

**PCAI:** Phénol chloroforme alcool isoamylique.

**PCR:** Amplification en chaîne par polymérase (Polymerase chain reaction).

**TAE:** Tris-base / Acide acétique glacial / EDTA.

**β-ME:** β-Mercaptoéthanol.



# **Introduction**

## Introduction

Le premier fossile de la famille des vitacées serait présent dès l'ère secondaire (-140 million d'années), et les plus vieux fossiles de *Vitis vinifera*, datent du début de l'Eocène (-65 millions d'années) ont été trouvés en Asie, en Amérique ainsi qu'en Champagne. Les changements climatiques ont favorisé la diffusion de la vigne et de nouvelles espèces ayant disparu ou parfois détruit, dans certaines régions dans le monde, à cause des différentes glaciations. Les plus anciens sites de domestication de la vigne semblent être le Caucase d'une part, la Palestine et la Mésopotamie d'autre part. Une fois les vignobles implantés au Moyen-Orient, la culture de la vigne se répand dans tout le bassin méditerranéen sans qu'on puisse définir un ordre d'apparition précis (Michel, 2012). Aujourd'hui les raisins étant la culture fruitière représentant la plus forte valeur de production dans le monde, selon une étude présentée par OIV en collaboration avec le FAO et publiée le 10 Mai 2017.

L'existence des milliers de variétés de vigne, conduit à l'apparition de nombreux cultivars qui sont mal identifiés ou appelés sous différents noms selon les régions. On peut identifier génétiquement les différentes variétés grâce aux méthodes de biologie moléculaire, mais la réussite de ces techniques nécessite une bonne qualité et quantité d'ADN génomique extrait. Pour cela nous allons essayer de faire l'extraction d'ADN génomique à partir des feuilles déshydratées et conservées, sans utilisation de l'azote liquide, et optimiser une méthode d'extraction d'ADN afin d'obtenir un protocole efficace, peu coûteux, réalisable au niveau de notre laboratoire qui est peu équipé, et permet d'obtenir un ADN génomique de bonne qualité et en meilleur rendement. Pour atteindre à tous ces objectifs, il faut d'abord répondre aux problématiques suivantes :

- Quelle est la meilleure méthode de préparation des feuilles afin d'avoir un ADN génomique intact ?
- Quelles sont les paramètres à modifier et qui influencent sur le rendement et la pureté d'ADN génomique ?

Pour cela notre travail est divisé en deux parties :

Une partie de synthèse bibliographique répartie en deux chapitres, des généralités sur la vigne, ce chapitre va consacrer à l'histoire de la viticulture en Algérie, la classification des vitacées, la morphologie générale de la vigne, son cycle végétatif et la composition générale en métabolites primaires et secondaires de la feuille de vigne. Le génome de la vigne et son analyse, vont présenter dans le deuxième chapitre, ce dernier est consacré aux généralités sur

le génome de la vigne, les différentes méthodes d'extraction et puis les techniques quantitative et qualitative permettant son analyse.

Une partie expérimentale, elle va contenir quatre parties « la stratégie de travail » dont nous allons expliquer le déroulement de ce travail, « Matériel et méthodes » dans cette partie nous allons expliquer en détail les méthodes de traitement des feuilles, la préparation des différents réactifs puis les protocoles appliqués et enfin la méthode choisie pour vérifier la qualité et la quantité d'ADN obtenu. Dans la partie « résultats » tous les profils et les résultats de l'analyse quantitative des différents protocoles vont afficher dans des tableaux et enfin la partie « discussion des résultats obtenus ».

**Première partie :**  
**SYNTHESE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

**Chapitre 1.**  
**GENERALITES**  
**SUR LA VIGNE**

### 1.1. Viticulture en Algérie

D'après Isnard (1947), la vigne est la principale richesse de l'Algérie (Marcel, 1948). Après la colonisation française, ils hésitèrent sur la vocation agricole de l'Algérie, surtout après les essais qui sont échoués pour la culture des plantes tropicales (Meynier, 1956). Depuis 1863, l'invasion progressive du phylloxéra au vignoble français, renversa la situation et la viticulture en Algérie fut sauvée (Hildebert, 1947), les premières plantations de vigne ont été faites, après d'une longue période de recherche duré de 1830 à 1878, (Marcel, 1948).

De 1878 à 1905, les plantations se poursuivent sans arrêt, elles se ralentissent ensuite après l'invasion du phylloxéra en Algérie (Marcel, 1948). La seule solution était la reconstitution par des porte-greffes américains (Hildebert, 1947). Entre 1929 et 1935, une crise de surproduction survenait (Marcel, 1948). En 1936, la crise Algérienne prit fin aussitôt, après les lois du 04 juillet 1931 et 08 juillet 1933, et les années suivantes furent très favorables à la viticulture Algérienne (Hildebert, 1947; Marcel, 1948).

Le vignoble Algérien est presque entièrement reconstitué sur porte-greffe américains : l'encépagement ne comprend qu'un petit nombre de variétés empruntées au Midi: le carignan, le mourvèdre, le cinsault, l'aramon, le grenache, la clairette de Provence, le farana indigène, le chasselas et le muscat. Malgré l'uniformité des cépages et de la production, les plantations Algériennes comporte une certaine diversité. La viticulture représente près de 50 % de l'exportation de l'Algérie (Hildebert, 1947).

Adil Nuaihidi a mentionné dans son livre « Sanaouat kanat Arabia » (1990), que le président Boumédiène, avait coupé les vignes et planté des pommiers à leur place.

### 1.2. Classification des vitacées

En botanique, la famille des vitacées (appelées autrefois Ampélidées), appelées également *Vinifères*, cette famille est caractérisée par des tiges le plus souvent sarmenteuse et grimpantes, avec des vrilles opposées aux feuilles (Alain, 2012). Elle comprend 19 genres, dont deux genres fossiles (Alain, 2012; Michel, 2012).

Pas d'universelle classification admise pour subdiviser le genre *Vitis*. En 1700 (l'année de création de ce genre), divers classifications ont été proposé par de nombreux ampélographes. Ci-dessous la classification proposée par Pierre (2001), répartit le genre *Vitis* en onze séries, chacune est divisées en espèces :

**Candicansae (sud des Etats-Unis):** *Vitis candicans*, *V. champinii*, *V. coriacea*, *V. doaniana*, *V. longii* (ou *solonis*) *V. simpsonii* .

**Labruscae** : *V. labrusca* (Nord-est des Etats-Unis), *V. coignetiae* (Japon).

**Caribaeae**: *V. caribaea* (Antilles, Mexique, Vénézuéla), *V. blancoii* (Mexique), *V. lanata* (Inde, Népal, Sikkim, Chine du sud).

**Arizonae (ouest des Etats-Unis)**: *V. arizonica*, *V. californica*, *V. girdania*, *V. treleasei*

**Cinereae (sud des Etats-Unis)**: *V. cinerea*, *V. berlandieri*, *V. baileyana*, *V. bourgeana*

**Aestivalae (amérique)**: *V. aestivalis*, *V. linsecumii*, *V. bicolor*, *V. bourquina*, *V. gigas*, *V. rufotomentosa*, *V. del rioi* (Mexique).

**Cordifoliae (Etats-Unis)**: *V. cordifolia*, *V. helleri*, *V. illex*, *V. monticola*, *V. rubra*.

**Flexuosae (Asie)**: *V. flexuosa*, *V. amurensis*, *V. balansaeana*, *V. betulifolia*, *V. embergeri*, *V. pentagona*, *V. piasezkii*, *V. reticula*, *V. retordii*, *V. thunbergii*, *V. bryoniaefolia*, *V. chunganensis*, *V. chungii*, *V. ficifolioides*, *V. hancockii*, *V. hexamera*, *V. pedicellata*, *V. piloso-nerva*, *V. pseudoretiiculata*

**Spinosaes (Chine)**: *V. armata*, *V. davidii*, *V. romanetii*

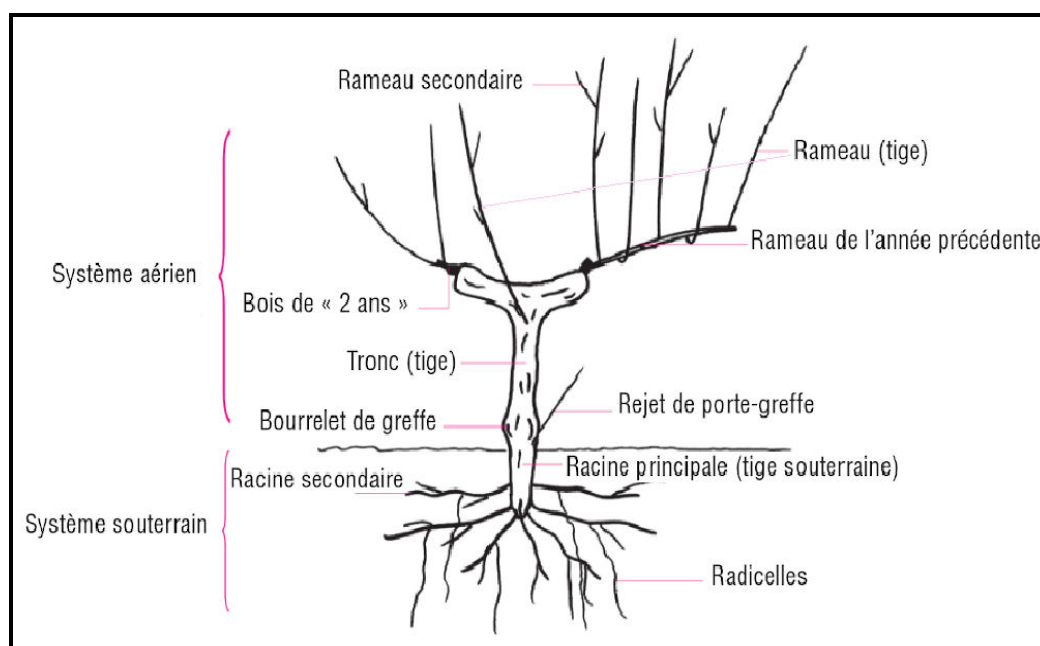
**Ripariae (Etats-Unis)**: *V. riparia*, *V. rupestris*

**Viniferae (indo-européenne)**: *V. vinifera*, *V. silvestris* (lambrusque).

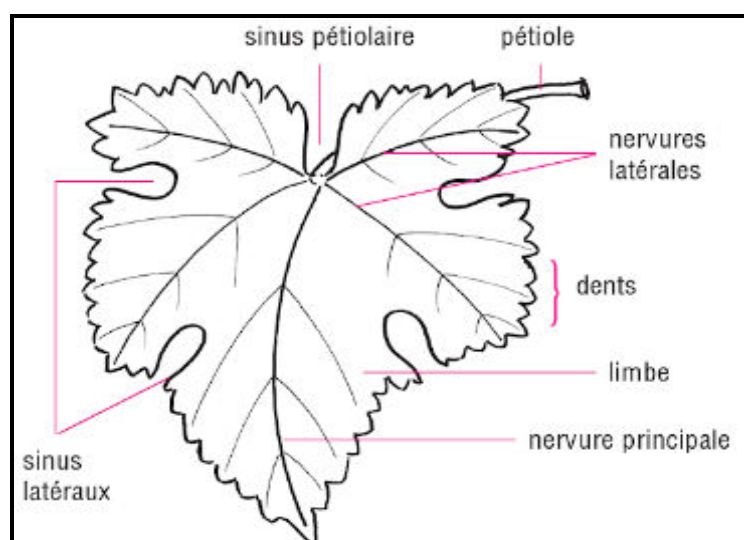
### 1.3. Morphologie générale de la vigne

La vigne comme toutes les plantes, est composé de deux parties, une partie souterraine qui est le système racinaire qui colonise le sol et le sous-sol qui assure l'ancrage de la plante, puiser dans le sol l'eau et les matières minérales, la production des hormones de croissance, et constitue aussi l'organe de réserve de l'amidon synthétisé au niveau des feuilles, et un système aérien formé d'un tronc (tige) grêle et tortueux qui se divise en bras portant les bois de taille. Ces bois appelés sarment portent des yeux ou ensemble de bourgeons qui donneront naissance à des rameaux. Le rameau de vigne porte des feuilles en disposition alterne, en face des feuilles on trouve des vrilles ou des inflorescences (Fig. 1) (Guillaume, 2010; Marie-cecile, 2011; Ouarda, 2013).

La feuille comporte cinq nervures principales entre lesquelles on trouve cinq sinus, un sinus pétiolaire et deux latéraux formant un limbe plus ou moins découpé, et attaché par son pétiole sur le rameau (Fig. 2) (Guillaume, 2010).



**Figure 1.** Schéma général de la vigne (Guillaume, 2010).

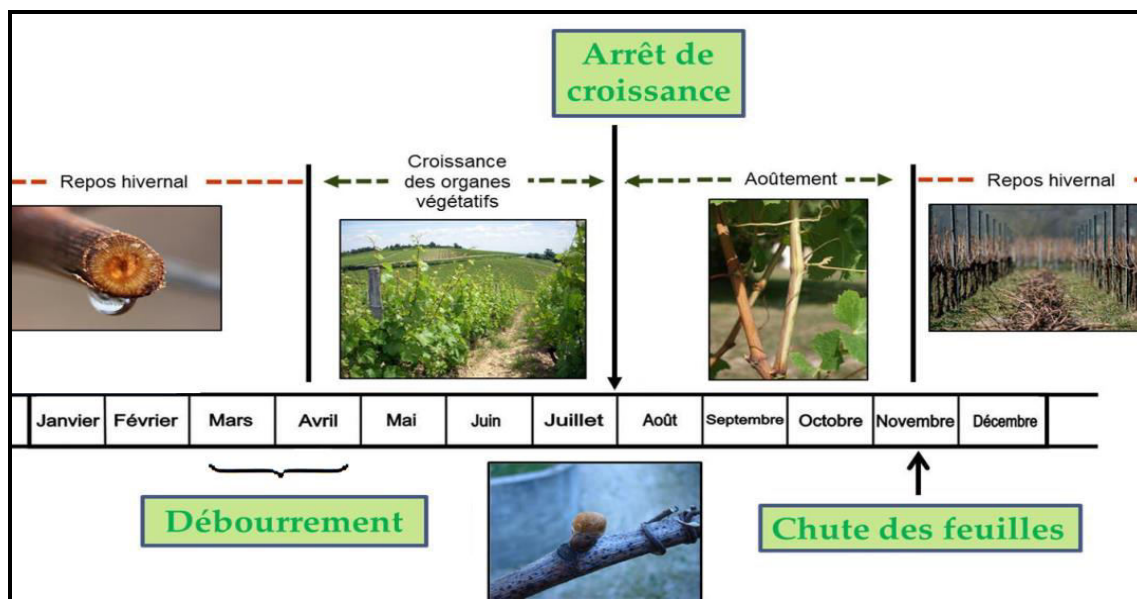


**Figure 2.** Feuille de la vigne (Guillaume, 2010).

#### 1.4. Cycle végétatif de la vigne

La croissance de la vigne présente une alternance de période de végétation et de repos (Fig. 3). La fin de Novembre à Février c'est le repos hivernal, au cours de laquelle la circulation de la sève cesse. Au printemps (Mars / Avril) il y'a un débournement des bourgeons, puis un allongement des rameaux jusqu'à la fin de juillet, en hiver les rameaux s'épaississent et durcissent avant la chute des feuilles et l'entrée en dormance (Marie-Cecile, 2011).





**Figure 3.** Cycle végétatif de la vigne (Marie-Cecile, 2011; Younes, 2017).

### 1.5. Composition générale de la feuille de la vigne

Au niveau des jeunes feuilles, les sucres formés par photosynthèse sont utilisés sur place, ils sont considéré comme des importateurs de sucres (Guillaume, 2010), notamment pour la respiration, la synthèse d'acides organiques (principalement tartrique et malique), de protides, de lipides, de polyphénols et de substances de croissance alors que l'excédent migre vers les fleurs puis les fruits et l'autre partie, vers les rameaux jusqu'aux sarments, tronc et racines (Alain, 2012).

Au niveau des feuilles adultes la surface foliaire étant à son plus fort développement et la capacité photosynthétique est supérieur à leur besoins respiratoires, ils sont donc exportateurs de sucres (Guillaume, 2010).

Un certain nombre de facteurs influence sur les types et les concentrations des métabolites secondaires, parmi ces facteurs : le stade de maturation, le sol, les conditions climatiques, la culture de la vigne et le traitement auquel est soumise (Naçira, 2016).

**Chapitre 2.**  
**EXTRACTION DE**  
**L'ADN**  
**GENOMIQUE**

## 2.1. Généralités sur le génome de la vigne

Le projet de séquençage du génome de la vigne en 2007, est le quatrième projet pour les plantes à fleurs, le second pour les espèces ligneuses et le premier pour les cultures fruitières (Nature publishing group, 2007).

Le génome de la vigne est diploïde et possède 38 chromosomes ( $n = 19$ ), d'une taille totale d'environ 487 Mb (Riccardo et *al.*, 2007; Giuliana et *al.*, 2011).

## 2.2. Extraction de l'ADN génomique

En biologie moléculaire l'extraction d'ADN est une étape critique, il y'a des étapes importantes qu'il faut les suivre pour isoler l'ADN de n'importe qu'elle échantillon biologique (Bipinchandra et *al.*, 2012):

- ✓ Collection des échantillons.
- ✓ La lyse cellulaire.
- ✓ Elimination des protéines par l'ajout des protéases, utilisation du phénol-chloroforme ou même par l'utilisation des sels (salting out).
- ✓ Précipitation de l'ADN par un alcool, d'habitude l'éthanol ou isopropanol froid.

## 2.3. Différentes méthodes permettant d'obtenir l'ADN

### 2.3.1. Isolement de l'ADN par extraction liquide-liquide

Les méthodes classiques de l'extraction, utilisent une partition entre la phase aqueuse qui contient les acides nucléiques, et les autres composant sont retenus dans la phase organique ou à l'interface, après une lyse cellulaire (Bernard et *al.*, 2008).

### 2.3.2. Isolement de l'ADN par affinité sélective entre la silice et l'ADN

Cette méthode consiste à faire adsorber sélectivement les acides nucléiques dans un mélange aqueux, sur la surface de silice sous forme de billes, fibres ou membrane. L'ADN est détaché par élution avec de l'eau distillée ou un tampon de faible force ionique (Bernard et *al.*, 2008).

## 2.4. Techniques d'analyse de l'ADN

### 2.4.1. Analyse sur gel d'agarose

Cette technique permet de connaître l'intégrité d'une préparation d'ADN, séparer des fragments d'ADN d'une taille de 50 à 60 000 pb et déterminer la taille de chaque fragment ou d'évaluer la concentration en ADN (Joëlle et *al.*, 2007).

## 2.4.2. Analyse de la concentration de l'ADN

### 2.4.2.1. Dosage de l'ADN à l'aide d'un gel d'agarose

La concentration en ADN d'un échantillon est déterminée par une comparaison visuelle de l'intensité d'une bande avec des marqueurs de poids moléculaire de concentration connue (Joëlle et *al.*, 2007).

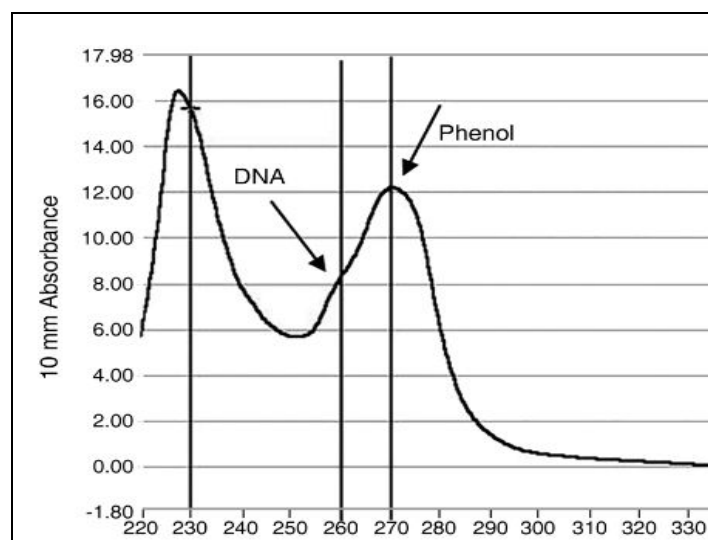
### 2.4.2.2. Dosage de l'ADN par spectrophotométrie

Les acides nucléiques ont la propriété d'absorber les U.V. très fortement à une longueur d'onde de 260 nm, ce qui permet de déterminer sa concentration.

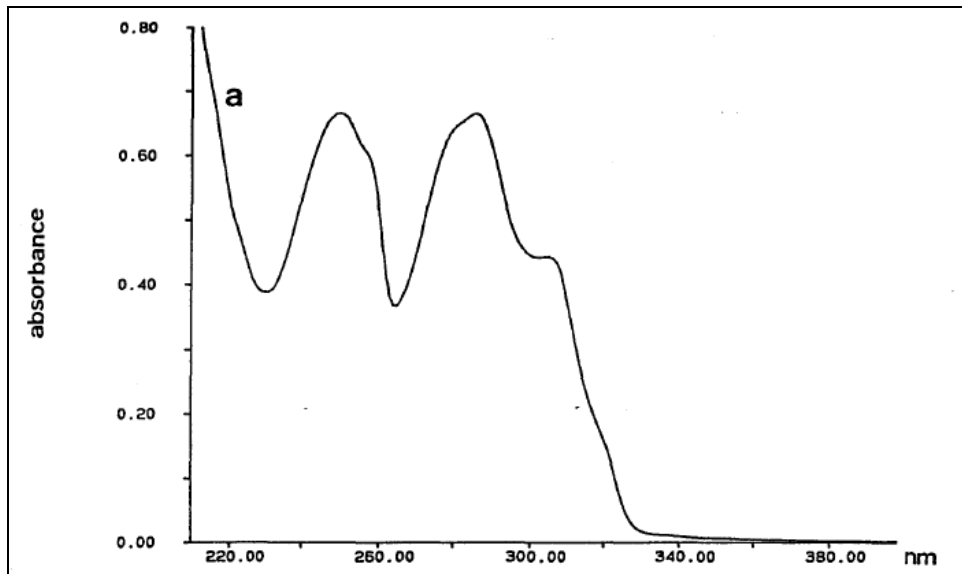
Le ratio de l'absorbance à 260 nm sur 280 nm ( $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ ) est entre 1,8 et 2. Un ratio inférieur à 1,8 indiquerait une contamination protéique et de substances aromatique (Joëlle et *al.*, 2007), le phénol utilisé dans les méthodes d'extractions d'ADN, a une absorbance maximale de 270 à 275 nm (Fig. 4), ce qui est proche de celui de l'ADN (Leonor et *al.*, 2011). Une contamination par les ARN est indiquée par un ratio supérieur à 2 (Joëlle et *al.*, 2007).

Un deuxième ratio de l'absorbance à 260 nm sur 230 nm ( $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ ), supérieur à 1,8 indique une bonne pureté des acides nucléiques. Un ratio faible, signifie une contamination par des polysaccharides, du phénol ou des sels (Varma et *al.*, 2007; Denis Tagu et *al.*, 2018).

Des contaminants comme les polysaccharides, protéines, polyphénols (Fig. 5), solvants (Fig. 4), et les sels absorbent également à 280, 270 et 230 nm (Leonor et *al.*, 2011).



**Figure 4.** Spectre U.V. réalisé par spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 montrant une contamination par le phénol (Leonor et *al.*, 2011).



**Figure 5.** Spectre d'absorbance d'un polyphénol (Vrielynck, 1996).

#### **2.4.2.3. Dosage de l'ADN à l'aide de colorant fluorescent**

Cette technique permet de doser la concentration de l'ADN par un colorant fluorescent qui se lie spécifiquement à l'ADN double brin. Après une excitation lumineuse, la fluorescence émise est mesurée par un fluorimètre (Joëlle et *al.*, 2007).

#### **2.4.3. Analyse sur gel de polyacrylamide**

Selon le même principe de l'analyse sur gel d'agarose, le gel de polyacrylamide permet d'analyser des fragments plus courts (de 5 à 2000 pb), avec un grand pouvoir de résolution pour séparer des fragments d'ADN n'ayant qu'une seule paire de base de différence (Joëlle et *al.*, 2007).

**Deuxième partie :**  
**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

**Chapitre 3.**  
**MATERIEL**  
**ET**  
**METHODES**

### 3.1. Stratégie de travail

Au cours de ce travail (Fig. 6), on a commencé par la récolte des jeunes feuilles non infectés de trois variétés de la vigne. Ces feuilles furent ensuite sécher et conserver par différentes méthodes.

Après la préparation des échantillons, nous avons effectué l'extraction d'ADN génomique. Cette extraction est faite par une extraction liquide-liquide (la méthode classique) au CTAB, qui commence par une lyse cellulaire, puis l'élimination des lipides de la membrane, les protéines et les métabolites secondaires et enfin la précipitation de l'ADN génomique.

Pour vérifier la qualité et la quantité d'ADN (analyse de l'ADN), nous avons réalisé une migration sur gel d'agarose qui permet à analyser la qualité d'ADN et le dosage par spectrophotométrie afin de connaître sa concentration et sa pureté.



**Figure 6.** Illustration schématique des différentes étapes de l'extraction d'ADN génomique.



## 3.2. Matériel et méthodes

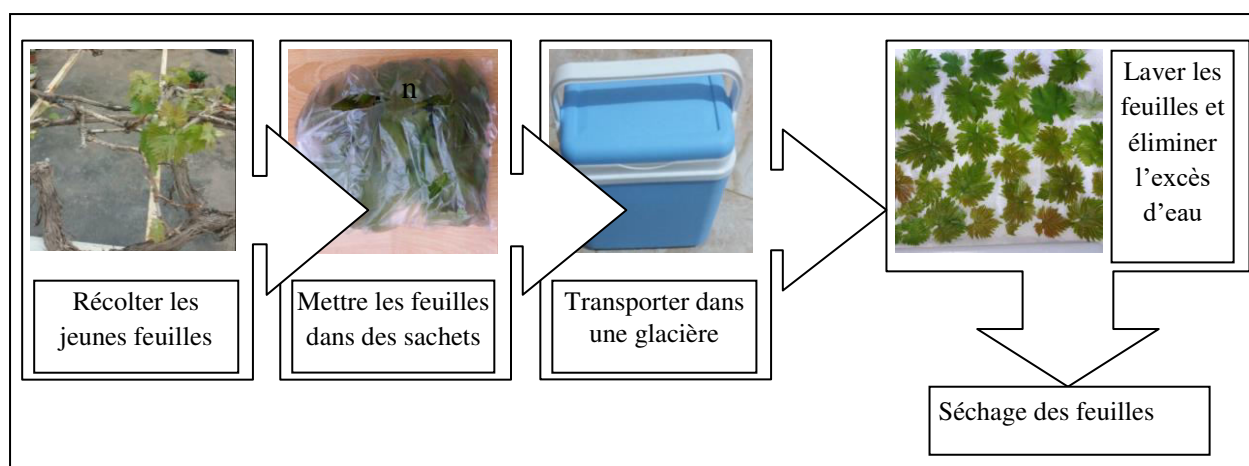
### 3.2.1. Matériel biologique

Notre analyse repose sur trois variétés de la vigne (El-tamri et les autres variétés sont inconnues), la récolte a été effectuée dans deux périodes. La première période de 12 septembre 2018 au 12 octobre 2018 et la deuxième de 20-24 mars 2019 et 7-10 avril 2019, de la commune d'El-kantara (wilaya de Biskra), située dans le sud-ouest des Aurès, à 52 km au nord de Biskra, caractérisé par un climat froid en hiver et chaud en été (Site web 1), et la commune de Sidi-Okba, située à une vingtaine de kilomètres de Biskra, caractérisé par un climat désertique sec et chaud (Site web 2).

La récolte des feuilles est effectuée par des gants et un ciseau préalablement désinfecté. Ensuite, les feuilles récoltées sont mises dans des sachets en plastique et sont transportées dans une glacière (Fig. 7). Le délai maximum entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 4 jours, pour assurer son stockage et conservation, on peut conserver les feuilles au réfrigérateur (+4°C) pendant cette période. Le nettoyage des feuilles est effectué par l'eau distillée, afin d'éliminer toute trace de poussière, insectes ...etc., en éliminant les parties desséchées ou oxydées à l'aide d'un ciseau préalablement désinfecté. Éliminer l'excès d'eau par un papier absorbant.

S'il y a plusieurs échantillons, faire le nettoyage de la paillasse avec l'eau de Javel et désinfecter le matériel de prélèvement (ciseau) par trempage d'une durée d'au moins deux minutes dans une solution d'eau de Javel puis rincés abondamment à l'eau.

Enfin, faire le séchage des feuilles. Il y a deux méthodes de séchage qui sont appliquées; un séchage par le gel de silice et à l'étuve ventilée pendant quatre jours.



**Figure 7.** Récolte et préparation des échantillons.

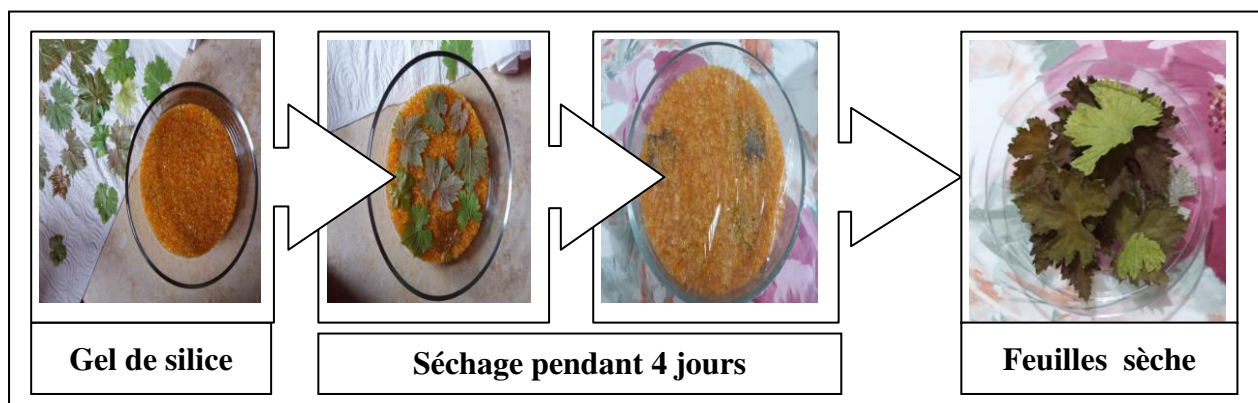
La procédure de séchage des feuilles est comme suite:

#### A. Séchage par le gel de silice

- Recouvrir le fond d'une boîte plate avec couvercle hermétique, de cristaux de gel de silice ;
- Poser les feuilles séparer l'une de l'autre sur la couche de gel de silice ;
- Recouvrir complètement les feuilles avec le gel de silice ;
- Fermer la boîte hermétiquement ;
- Laisser les feuilles pendant quatre jours, dès que les feuilles deviendraient cassantes ;
- Déposer les feuilles sèches dans des boîtes fermées hermétiquement (Fig. 8).

#### Remarque :

Le gel de silice est réutilisable plusieurs fois, après activation par chauffage au four à une température de 110°C jusqu'à ce qu'ils aient retrouvé leur couleur d'origine (Site web 3).



**Figure 8.** Différentes étapes de séchage des feuilles par le gel de silice.

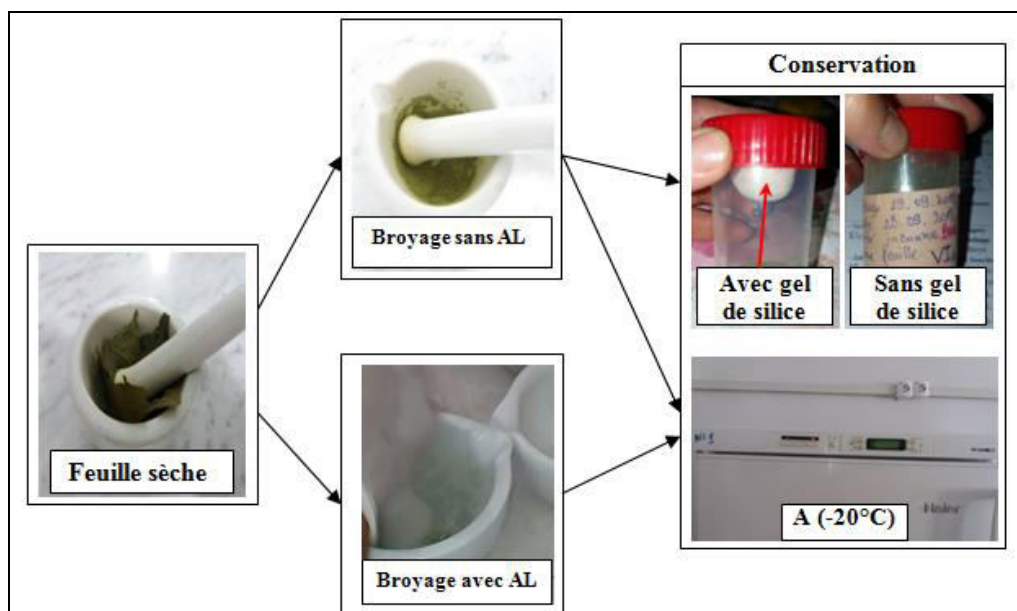
#### B. Séchage à l'étuve ventilée

- Mettre les feuilles séparer l'une de l'autre dans une étuve ventilée (Fig. 9) (pendant quatre jours) à 27°C (Halima, 2006), dès que les feuilles deviendraient cassantes ;
- Déposer les feuilles sèches dans des boîtes fermées hermétiquement.



**Figure 9.** Séchage des feuilles à l'étuve.

En fin, les feuilles sèches sont broyées par un pilon et mortier (Fig. 10), avec ou sans azote liquide. Entre chaque échantillon, changer les mortiers de broyage (préalablement désinfectés par éthanol 70%), et nettoyer la paillasse afin d'éviter les contaminations croisées, puis on doit mettre la poudre des feuilles dans des flacons stériles étiquetés et bien fermés. La conservation des échantillons est faite soit à température ambiante (en présence / absence de gel de silice) ou à (- 20°C).



**Figure 10.** Broyage et conservation des feuilles (AL: azote liquide).

Le tableau ci-dessous résume les différentes étapes de préparation de chaque échantillon.

**Tableau 1.** Caractéristiques de chaque échantillon.

Variété et lieu d'échantillonnage	Code	Méthode de séchage	Conservation	Age de la plante
El-tamri (jeune feuille) El-kantara	T2	Avec gel de silice	à T° ambiante	Plus de 15 ans
	T3	Avec gel de silice	à (-20°C)	
	T5	Dans l'étuve ventilée	à T° ambiante	
	TAL	Avec gel de silice	à (-20°C)	
Variété inconnu (jeune feuille) El-kantara	VI3	Avec gel de silice	à (-20°C)	7 ans
	VI4	Avec gel de silice	à T° ambiante	
	VIAL	Avec gel de silice	à (-20°C)	
Variété inconnu	V5	dans une	à T° ambiante	Presque 7 ans

(jeune feuille)		étuve ventilée		
Sidi Okba	V6	Dans l'étuve ventilée	à T° ambiante	

### 3.2.2. Méthodes de travail

Avant de passer à l'extraction d'ADN génomique, d'abord il faut préparer tous les réactifs nécessaires, le tableau ci-dessous (Tab. 2) résume les volumes et les concentrations des réactifs utilisés.

**Tableau 2.** Réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN génomique.

Produit	La formule chimique du produit	Concentration préparée	Volume total préparé	Masse molaire (g/mol)	Masse ou volume utilisé	Température de conservation et stérilisation
Acétate de Na	$\text{CH}_3\text{COO}^-$ $\text{Na}^+$	5M	3 ml	82	1,23 g	à température ambiante
Ethanol absolu	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	70%	50 ml	46	40 ml	à (-20°C)
$\text{Na}_2\text{EDTA}$ (pH 8,0)	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	500 mM	25 ml	372,23	4,65 g	à température ambiante Autoclavé
NaCl	NaCl	5 M	25 ml	58,44	7,305 g	à température ambiante Autoclavé

NaCl	NaCl	4 M	50 ml	58,44	11,688 g	à température ambiante Autoclavé
Tris-HCl(pH 8,0)	Tris-HCl	500 mM	50 ml	157,6	3,94 g	à température ambiante Autoclavé
Phénol (pH 8,0)	Phénol	Cristaux	100 ml	94,11	7 g	à (+4°C)
Protéïnase K	Enzyme	20 mg/ml	1 ml	/	20 mg	à (-20°C)

L'extraction de l'ADN s'effectue en plusieurs étapes selon le protocole de Sandra *et al.* (2012). Ce protocole est une procédure simple et rapide d'extraction d'ADN au CTAB et chloroforme alcool isoamylique modifié de Doyle et Doyle (1990) et appliqué sur les feuilles de vigne. Les différentes étapes de ce protocole sont :

1. Désinfecter la paillasse et les micropipettes, travailler avec des embouts et réactifs stériles (autoclavés) ;
2. Mettre (200-300 mg) la poudre des feuilles congelés à (-80°C) dans un tube Eppendorf de 1,5 ml contenant 700 µl de tampon de lyse préchauffé (60-65°C) constitué de 2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA (pH 8,0), 2,5 M NaCl, 2% PVP, et 1% β-Mercaptoéthanol ;
3. Agiter les tubes et incuber à 65°C pendant 60 minutes au bain-marie, en mélangeant par inversion 3-4 fois pendant l'incubation ;
4. Centrifuger les tubes à 10 000 rpm / min pendant 10 min à 4°C et transférer doucement la phase aqueuse dans un nouveau tube ;
5. Ajouter un volume égale de chloroforme : alcool isoamylique (24: 1) et mélanger par inversion ;

6. Centrifuger les tubes à 10 000 rpm / min pendant 10 min à 4°C et transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube ;
7. Ajouter un volume égal d'isopropanol froid (-20°C), mélanger les tubes et incubé à (-20°C) pendant 30 min ;
8. Centrifuger les tubes à 14 000 rpm / min pendant 10 min à 4°C, et jeter le surnageant ;
9. Laver le culot d'ADN par 500 µl d'éthanol 70% froid (-20°C) et centrifuger à 14000 rpm / min pendant 5 min à 4°C ;
10. Sécher le culot d'ADN résultant à l'air et le dissoudre dans 200 µl de tampon TE. La RNase A, a été ajoutée à chaque échantillon (1/100 µl d'échantillon d'ADN) et puis les incubé à 37°C pendant 1 h ;
11. Conserver les échantillons à (-20°C).

### 3.2.2.1. Paramètres optimisés

Dans cette étude, nous avons optimisé certaines étapes du protocole de Sandra et *al.* (2012) en vue de proposer une méthode d'extraction d'ADN de qualité, relativement simple, peu coûteuse et applicable dans notre laboratoire. Les paramètres testés pour optimiser ce protocole par rapport à celui de Sandra et *al.* (2012) sont listés dans le tableau ci-dessous (Tab. 3).

**Tableau 3.** Paramètres optimisés au protocole de Sandra et *al.* (2012).

N° de l'étape	Protocole de Sandra et <i>al.</i>	Les modifications
2	Les feuilles congelées à (-80°C)	Echantillons en poudre séchés et conservés par différents méthodes.
3	(200-300 mg) de la poudre.	100 mg de la poudre dans tous les protocoles optimisés, afin de comparer les résultats de l'extraction des différents protocoles.
	700 µl de tampon de lyse	1ml de tampon de lyse
	2% CTAB	2% à 3% CTAB

	25 mM EDTA (pH 8,0)	25 à 50 mM EDTA (pH 8,0)
	2,5 M NaCl	2,5 à 2,7M NaCl
	2% PVP	2% à 3% PVP
	1% $\beta$ - Mercaptoéthanol	1% -3% $\beta$ -Mercaptoéthanol
		3 $\mu$ l PK (20 mg/ml)
		0,5% Tween 20
4	Incubation à 65°C pendant 60 minutes au bain-marie, agitation 3-4 fois pendant l'incubation.	Incubation à 58- 65°C pendant 60 minutes au bain-marie, sous agitation continue.
6	Chloroforme: alcool isoamylique (24:1)	Phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1)
		Lavage deux fois par le Chloroforme: alcool isoamylique (24:1).
		Acétate de sodium 5M
8	Les échantillons ont été mélangés et à (-20°C) pendant 30 min.	Incubation à (-20 °C) pendant 30 min.
		Pendant une nuit à (-20 °C).
11	200 $\mu$ l de tampon TE	60 ml d'eau bidistillée.



### 3.2.2.2. Extraction d'ADN

#### a) Protocole avant optimisation

##### ➤ Protocole A

C'est le même protocole de Sandra et *al.* (2012), mais sans utilisation des feuilles congelées à (-80 °C) ni de tampon TE et pas de traitement par RNase A.

#### b) Protocoles après optimisation

##### ➤ Protocole B

C'est le même protocole A, mais avec une optimisation de volume du tampon de lyse (1 ml), la quantité de la poudre des feuilles ajouté est (100 mg) et le culot d'ADN résultant a été dissous dans 60 µl d'eau bidistillée.

##### ➤ Protocole D

Dans ce protocole nous avons modifié les différentes concentration du tampon de lyse (3% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 2,7M NaCl, 3% PVP et 3% β-Mercaptoéthanol) avec l'ajout de 3µl du PK (20mg/ml), les tubes ont été agités et incubés à (58 °C) pendant 45 minutes, puis 15 minutes à (65°C) au bain-marie.

##### ➤ Protocole E (technique de salting-out)

Les paramètres modifiés sont : la concentration de β-Mercaptoéthanol du tampon de lyse du protocole D est diminuée jusqu'à 1%, le chloroforme-alcool isoamylique est remplacé par l'acétate de sodium 5M, qui permet de précipiter les protéines à force ionique élevée (c'est la technique de salting-out). Pour bien précipiter l'ADN, l'échantillon est incubé pendant une nuit après l'ajout de l'isopropanol.

##### ➤ Protocole F

Le tampon de lyse est constitué de 3% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 2,7M NaCl, 3µl PK (20 mg/ml), 1% β-Mercaptoéthanol, 0,5% Tween 20 est ajouté et la concentration du PVP est diminué jusqu'à 2%, les tubes ont été agités mécaniquement (agitation continue) (Fig. 11) et incubés à (58 °C) pendant une heure au bain-marie, l'étape 6 est remplacé par l'ajout de 1/3 de volume du phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24: 1) et une autre purification par chloroforme: alcool isoamylique (24: 1), et enfin pour précipiter l'ADN; les échantillons ont été mélangés et incubés à l'isopropanol absolu (à -20 °C) pendant 30 min.



**Figure 11.** Agitation mécanique horizontale de tous les échantillons au bain mari (Un support de tubes qui j'ai fabriqué pour assurer une agitation horizontal).

### ➤ Protocole G

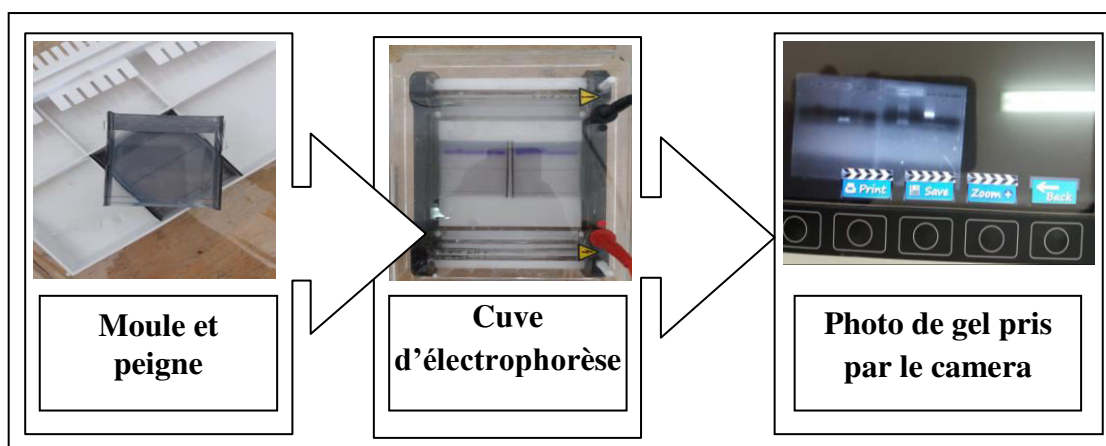
C'est le même protocole F, mais sans utilisation du phénol, l'étape du chloroforme alcool isoamylique est répété deux fois. Pour précipiter l'ADN, nous avons incubé l'ADN dans l'isopropanol froid à (-20°C) pendant une nuit (Voir l'annexe 4).

### 3.2.2.3. Vérification de la qualité et la quantité d'ADN extrait

#### A. Evaluation de l'intégrité d'ADN

Elle consiste à colorer l'ADN par le BET, qui s'intercale entre les bases de la double hélice et devient fluorescent après excitation par les ultra-violets. Plus le fragment d'ADN est long, plus la coloration émise est intense.

La migration se fait sur un gel d'agarose 1% (Fig. 12).



**Figure 12.** Visualisation de l'ADN extrait par le gel d'agarose.

### B. Détermination du rendement d'extraction d'ADN

Le rendement a été calculé en réalisant le rapport entre la masse d'ADN obtenue ( $\mu\text{g}$ ) et le volume ou la masse initial de l'échantillon (Bienvenu et *al.*, 1999). La détermination de la masse est effectué après calcul de la concentration.

#### • Calcul de la concentration

Préparer des dilutions de l'échantillon au 1/50.

Après une lecture au spectrophotomètre, une absorbance de 1,0 unité à 260 nm, elle correspond à 50  $\mu\text{g/ml}$  d'ADN double brin.

La concentration d'ADN pour un échantillon pur et dilué 1/50 est égale à :

$$[\text{ADN}] = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times 50 \text{ (facteur de dilution)}$$

### C. Détermination de la pureté de l'ADN

La pureté de l'ADN est déterminée par les ratios dans le (tableau 4) suivant :

**Tableau 4.** Ratio et ces indications.

Ratio	Valeur	Indication de la pureté
$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	> 2,0	Contamination par les ARN (Joëlle Brodeur et <i>al.</i> , 2007).
	1,8 - 2,0	ADN pur (Joëlle Brodeur et <i>al.</i> , 2007; Denis Tagu et <i>al.</i> , 2018).
	<1,8	Une contamination protéique et/ou des substances aromatiques (Joëlle et Martin, 2007; Denis et <i>al.</i> , 2018).
$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$	>1,8	Bonne pureté des acides nucléiques (Varma et <i>al.</i> , 2007).
	<1,8	Une contamination par des polysaccharides, polyphénols, phénol ou des sels (Varma et <i>al.</i> , 2007; Denis et <i>al.</i> , 2018).

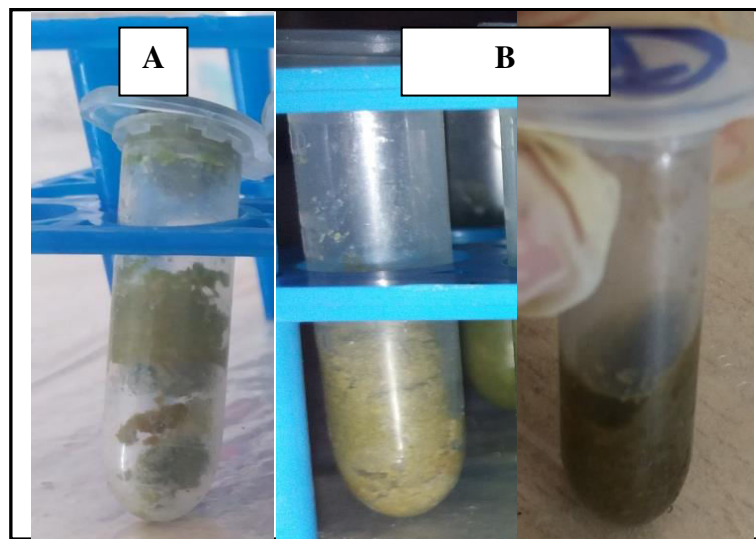
# **Chapitre 4.**

# **RESULTATS**

## 4.1. ADN obtenu avant l'optimisation

### 4.1.1. Protocole A

Les résultats de l'application du protocole (A) Sandra et *al.* (2012) sur nos échantillons montrent, l'absence d'ADN qui a été confirmée après une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % (Fig. 14). Les problèmes rencontrés après l'application de ce protocole sont: la formation d'une pâte après l'ajout du tampon de lyse, et l'absence totale de la phase aqueuse après centrifugation dans certains tubes ou elle est en petit volume (étape 5, voir le protocole de référence) (Fig. 13).



**Figure 13.** Aspect de l'échantillon après l'ajout du tampon de lyse.

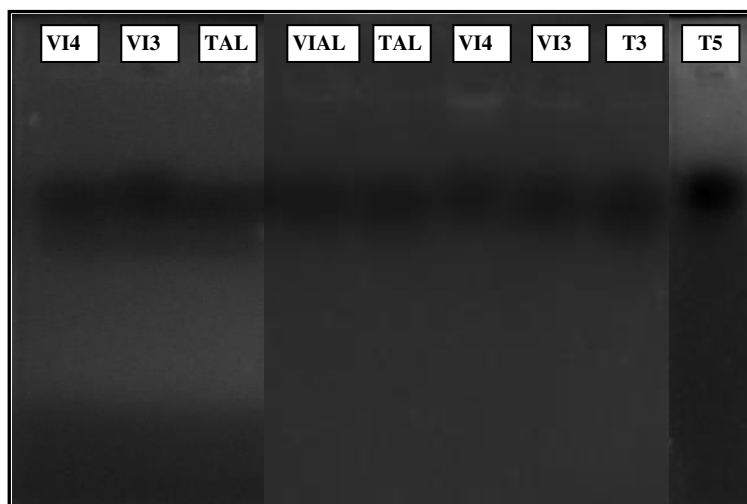
**A)** Formation d'une pâte après l'ajout du tampon de lyse à la poudre des feuilles.

**B)** Après centrifugation (étape 5) la phase est soit absente soit le volume est réduit.

#### • Evaluation de l'intégrité d'ADN

Il est primordial d'évaluer la présence et l'intégrité d'ADN par une migration électrophorétique sur gel d'agarose.

Les résultats du protocole (A) de Sandra et *al.* (2012) sur nos échantillons, montrent l'absence d'ADN, après une électrophorèse (sous une tension de 100 V) sur un gel d'agarose à 1 % (Fig.14).



**Figure 14.** Profile électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application de protocole A de Sandra et al. (2012). Une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % après une coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V.

Les puits VI4, T5 représente les échantillons conservés à température ambiante.

Les puits (VI3, TAL, VIAL et T3) représentent les échantillons conservés à (-20°C).

#### • Evaluation de la qualité et la quantité d'ADN extrait

La quantité et la qualité d'ADN extrait ont été mesurées par spectrophotométrie. Les résultats obtenus après la migration électrophorétique (Fig. 14) et le spectrophotomètre sont contradictoires, le profil donne des résultats négatifs (absence des bandes d'ADN) mais le spectrophotomètre donne des faibles absorbances à 260 nm (Tab. 5), ceci indique normalement la présence d'ADN. Les absorbances à 230 et 280 nm indiquent la présence des contaminants comme les polyphénols, les protéines, les polysaccharides, les sels ... etc.

**Tableau 5.** Résultats de l'absorbance à 230, 260 et 280 nm des échantillons (VI4, VI3, TAL, VIAL, T3, T5).

Echantillons	Absorbance à 230 nm	Absorbance à 260 nm	Absorbance à 280 nm
VI4	0,077	0,024	0,02
VI3	0,129	0,021	0,043
TAL	0,036	0,01	0,006

VIAL	0,033	0,002	0,021
TAL	0,072	0,03	0,021
VI4	0,011	0,006	0,046
VI3	0,223	0,027	0,092
T3	0,066	0,018	0,015
T5	0,045	0,021	0,02

## 4.2. ADN obtenu après l'optimisation

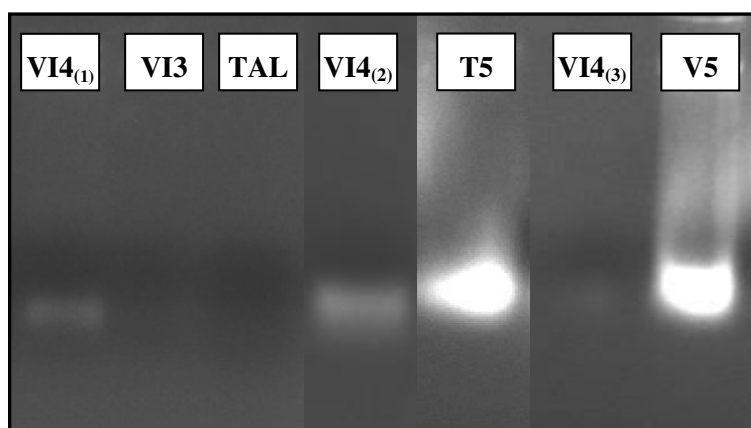
### 4.2.1. Protocole B

Les changements effectués sur ce protocole sont portés sur le volume du tampon de lyse utilisé qui est 1 ml au lieu de (700 µl) et 100 mg de la poudre des feuilles au lieu de (200-300 mg).

#### • Evaluation de l'intégrité d'ADN

D'après le profil électrophorétique (Fig. 15), on remarque que les bandes d'ADN obtenues des échantillons VI4 (1) et VI4 (2) (conservés pendant presque 5 mois (du 02/10/2018 jusqu'à 25/02/2019 sans gel de silice) sont de faible fluorescence, et un faible signal pour l'échantillon VI4 (3) (Il a plus de 6 mois de conservation (du 02/10/2018 jusqu'à 17/04/2019) sans gel de silice), ceci indique que la concentration d'ADN est faible. D'après l'aspect des bandes (une seule bande), cet ADN se trouve à l'état intact.

Par contre les fragments d'ADN des échantillons T5 et V5 (conservés pendant presque 15 jours en présence du gel de silice) sont de fort signal, ceci indique que l'ADN extrait est de concentration élevée. L'ADN obtenu est intègre.



**Figure 15.** Profil électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application de protocole B. Une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % après coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V.

Les puits VI4(1) VI4(2), VI4(3), T5 et V5 représentent des échantillons conservés à température ambiante. Les puits (VI3 et TAL) représentent les échantillons conservés à (-20°C).

#### • Détermination du rendement de l'extraction

Pour déterminer la concentration, la masse et le rendement d'ADN, un dosage par spectrophotomètre à la longueur d'ondes 260 nm est nécessaire. Les résultats obtenus de la migration électrophorétique (Fig. 15) et le spectrophotomètre (Tab. 6) sont contradictoires, le profil donne des résultats négatifs (absence des bandes d'ADN) pour les échantillons VI3 et TAL mais le spectrophotomètre donne des faibles absorbances à 260 nm (Tab. 6). Les absorbances à 230, 260 et 280 nm indiquent la présence des contaminants comme les protéines, les polyphénols, les polysaccharides, les sels ... etc.

Les résultats du protocole (B) (Tab. 7) montrent une concentration moyenne d'ADN de (562,40 µg/ml) avec une masse moyenne de (33,72 µg) et un rendement moyen de (337,20 µg/g).

**Tableau 6.** Résultats de l'absorbance à 230, 260 et 280 nm pour les échantillons (VI3 et TAL).

Echantillons	Absorbance à 230 nm	Absorbance à 260 nm	Absorbance à 280 nm
VI3	0,044	0,018	0,016
TAL	0,015	0,008	0,008



**Tableau 7.** Moyenne de la concentration, la masse et le rendement de l'ADN extrait par le protocole B.

Echantillon	Concentration en ADN ( $\mu\text{g/ml}$ )	Masse totale d'ADN ( $\mu\text{g}$ )	Rendement d'extraction ( $\mu\text{g}$ d'ADN par g de feuille)
VI4 (1)	123	7,35	73,5
VI4 (2)	235	14,10	141
T5	683	40,95	409,5
VI4 (3)	113	6,75	67,5
V5	1658	99,45	994,5
<b>Moyenne</b>	<b>562,40</b>	<b>33,72</b>	<b>337,20</b>

• **Evaluation de la qualité d'ADN obtenu**

Pour la détermination de la pureté d'ADN, un dosage par spectrophotomètre aux longueurs d'ondes 230 nm, 260 nm et 280 est nécessaire.

Les résultats du (Tab. 8) montrent que l'ADN extrait de l'échantillon VI4 (1, 2, 3), est contaminé par les protéines, les polysaccharides, les polyphénols, les sels ... etc., sauf les échantillons T5 et V5 qui donnent un ADN de bonne pureté.

**Tableau 8.** Détermination de la pureté de l'ADN extrait.

Echantillon	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	Indication de la pureté ( $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ )	$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$	Indication de la pureté ( $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ )
VI4(1)	1,3	Présence de protéines et/ou substance aromatique.	0,9	Une contamination par les polysaccharides, les polyphénols et les sels
VI4 (2)	1,4		1,2	
T5	1,9	ADN pur	2,2	Bonne pureté de l'ADN

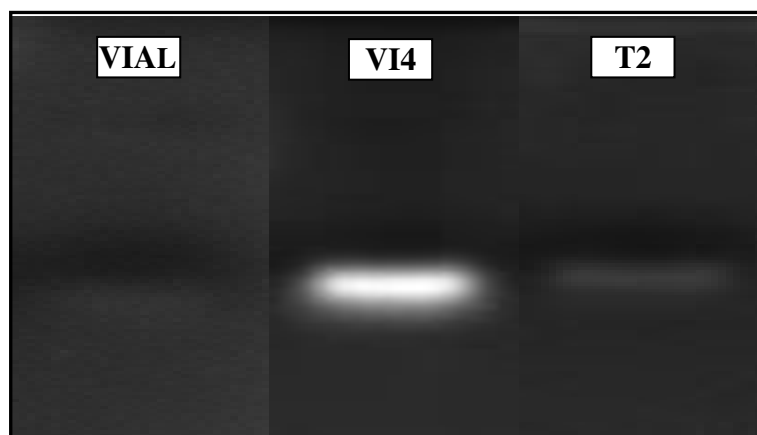
VI4 (3)	1,4	Présence de protéines et/ou substance aromatique.	1,5	Une contamination par les polysaccharides, les polyphénols et les sels
V5	1,9	ADN pur	2,1	Bonne pureté de l'ADN

#### 4.2.2. Protocole D

Dans ce protocole nous avons changé la concentration des différents composants de tampon de lyse (3% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 2,7M NaCl, 3% PVP, 3%  $\beta$ -Mercaptoéthanol, 3 $\mu$ l de PK (20 mg/ml) et une incubation à 58°C, pendant 45 minutes, puis 15 minutes à 65°C au bain-marie.

#### • Evaluation de l'intégrité d'ADN

Le profil électrophorétique (Fig. 16) montre une bande d'ADN de fort signal de l'échantillon VI4 par rapport aux VIAL et T2. De plus, l'ADN extrait de cette méthode d'extraction est intègre (une seul bande).



**Figure 16.** Profil électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application du protocole D. Une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 %, après coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V.

Les puits VI4 et T2 représentent les échantillons conservés à température ambiante, et l'échantillon VIAL à été conservé à (-20°C). Les échantillons sont conservés pendant 6 mois.

### • Détermination du rendement de l'extraction

Le tableau 9 montre une concentration moyenne en ADN égale à (67,67 µg/ml) avec une masse totale moyenne de (4,05 µg) et un rendement moyen de (40,50µg) d'ADN par g de feuille sèche.

**Tableau 9.** Moyenne de la concentration, la masse et le rendement de l'ADN extrait par le protocole D.

Echantillon	Concentration en ADN (µg/ml)	Masse totale d'ADN (µg)	Rendement d'extraction (µg d'ADN par g de feuille)
VIAL	23	1,35	13,5
VI4	125	7,5	75
T2	55	3,3	33
<b>Moyenne</b>	<b>67,67</b>	<b>4,05</b>	<b>40,50</b>

### • Evaluation de la qualité d'ADN obtenu

D'après le tableau 10 indique que l'ADN extrait est contaminé par des protéines, des polysaccharides, des sels ... etc.

**Tableau 10.** Détermination de la pureté de l'ADN.

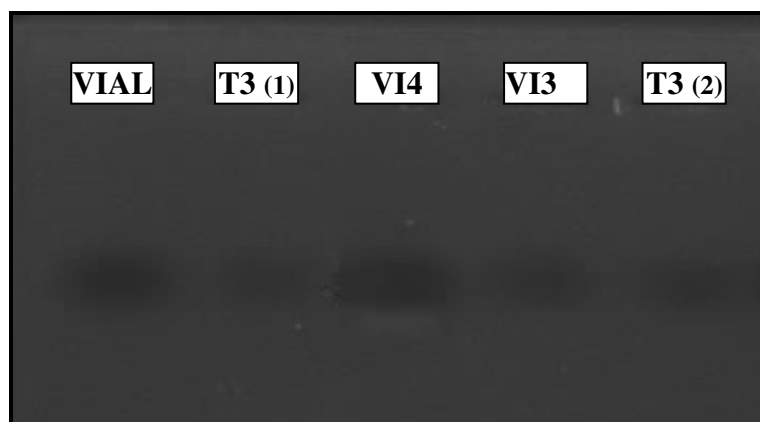
Echantillon	$A_{260nm}/A_{280nm}$	$A_{260nm}/A_{230 nm}$	Indication de la pureté
VIAL	0,75	0,47	Une contamination par les protéines, les polysaccharides, le phénol, les polyphénols, les sels ... etc
VI4	1,35	1,11	
T2	1,57	1,57	

#### 4.2.3. Protocole E (salting out)

Les paramètres optimisés dans ce protocole sont : les mêmes concentrations du tampon de lyse du protocole (D), sauf que la concentration de β-Mercaptoéthanol a été modifiée par 1% au lieu de 3 %, le chloroforme-alcool isoamylique est remplacé par l'acétate de sodium 5M et une incubation pendant une nuit avec l'isopropanol.

### • Evaluation de l'intégrité d'ADN

D'après le profil électrophorétique, il n'y a pas des bandes d'ADN sur le gel d'agarose à 1 % (Fig. 17).



**Figure 17.** Profile électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application de protocole E. Une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % après une coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V.

Le puits VI4, représente l'échantillon conservé à température ambiante sans gel de silice.

Les puits (VIAL, VI3 et T3) représente les échantillons conservé à (-20°C).

### • Détermination du rendement de l'extraction

Les résultats obtenus de migration électrophorétique (Fig. 17) et le spectrophotomètre (Tab. 11) sont contradictoires, le profil donne des résultats négatifs (absence des bandes d'ADN) pour tous les échantillons (VIAL, VI3 et T3) mais le spectrophotomètre donne des faibles absorbances à 260 nm (Tab. 11). Les absorbances à 230, 260 et 280 nm indiquent la présence des contaminants comme les protéines, les polyphénols, les polysaccharides, les sels ... etc.

**Tableau 11.** Résultats de l'absorbance à 230, 260 et 280 nm des échantillons (VIAL, T3 et VI3).

Echantillons	Absorbance à 230 nm	Absorbance à 260 nm	Absorbance à 280 nm
VIAL	0,024	0,015	0,018
T3 (1)	0,037	0,019	0,019

VI3	0,019	0,018	0,017
T3 (2)	0,028	0,018	0,016

D'après le tableau 12, on remarque que l'ADN extrait de l'échantillon VI4 est de faible concentration (60 µg/ml), avec une masse de (3,6 µg) et un rendement d'extraction de (36 µg/g).

**Tableau 12.** Moyenne de la concentration, la masse et le rendement de l'ADN extrait par le protocole E.

Echantillon	Concentration en ADN (µg/ml)	Masse totale d'ADN (µg)	Rendement d'extraction (µg d'ADN par g de feuille)
VI4	60	3,6	36

#### • Evaluation de la qualité d'ADN obtenu

Le (Tab. 13) indique que l'ADN extrait de l'échantillon VI4 est contaminé par des protéines, des polysaccharides, des polyphénols, des sels ... etc.

**Tableau 13.** Détermination de la pureté de l'ADN.

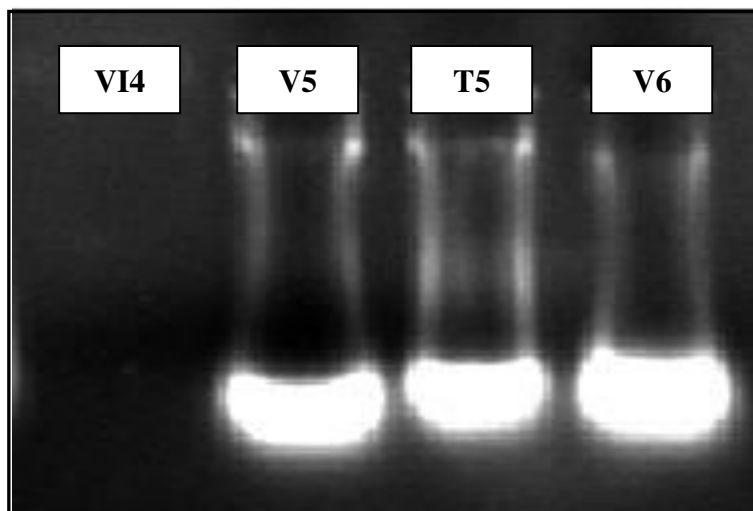
Echantillon	$A_{260nm}/A_{280nm}$	$A_{260nm}/A_{230 nm}$	Indication de la pureté
VI4	0,71	0,55	Une forte contamination les des protéines, les polysaccharides, les polyphénols, les sels ... etc.

#### 4.2.4. Protocole F

Les mêmes concentrations du tampon de lyse E ont été utilisées, sauf la concentration du PVP est diminué à 2% PVP. Nous avons ajouté 0,5% de Tween 20, le phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24: 1) est ajouté après l'étape 5 (étape de purification) (voir le protocole de référence). L'incubation à l'isopropanol a été effectué à (-20°C) pendant 30 min seulement.

### • Evaluation de l'intégrité d'ADN

Le profil électrophorétique (Fig. 18) montre que l'ADN extrait des échantillons V5, T5 et V6 est intacte avec un fort signal, ce qui indique que l'ADN obtenu est d'une concentration élevée, alors que l'échantillon VI4 ne donne aucun signal (absence d'ADN).



**Figure 18.** Profil électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application de protocole F. Une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % après coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V.

Les puits :

VI4: échantillon conservés à température ambiante pendant plus de 6 mois.

V5, T5 et V6: échantillons conservé à température ambiante pendant presque 20 jours en présence du gel de silice.

### • Détermination du rendement de l'extraction

Les résultats obtenus de la migration électrophorétique (Fig. 18) et le spectrophotomètre sont contradictoires pour l'échantillon VI4, par contre ils sont compatible pour les échantillons V5, T5 et V6. Le profil donne un résultat négatif pour l'échantillon VI4 (absence d'une bande d'ADN) mais le spectrophotomètre donne une faible absorbance à 260 nm (Tab. 14), et les absorbances à 230, 260 et 280 nm indiquent la présence des contaminants comme les protéines, les polyphénols, les polysaccharides, les sels ... etc.

D'après les résultats du (Tab. 15) pour les échantillons (V5, T5, V6) qui donnent un fort signal après migration électrophorétique la concentration moyenne d'ADN est significatif, elle est égale à (1960,33  $\mu\text{g/ml}$ ), avec une masse moyenne totale d'ADN de (117,60  $\mu\text{g}$ ) et un rendement moyen d'extraction égale à (1176,00  $\mu\text{g/g}$ ).

**Tableau 14.** Résultats de l'absorbance à 230, 260 et 280 nm pour l'échantillon VI4.

Echantillon	Absorbance à 230 nm	Absorbance à 260 nm	Absorbance à 280 nm
VI4	0,014	0,013	0,059

**Tableau 15.** Moyenne de la concentration, la masse et le rendement de l'ADN extrait par le protocole F.

Echantillon	Concentration en ADN ( $\mu\text{g/ml}$ )	Masse totale d'ADN ( $\mu\text{g}$ )	Rendement d'extraction ( $\mu\text{g}$ d'ADN par g de feuille)
V5	2235	134,1	1341
T5	2013	120,75	1207,5
V6	1633	97,95	979,5
<b>Moyenne</b>	<b>1960,33</b>	<b>117,60</b>	<b>1176,00</b>

• **Evaluation de la qualité d'ADN obtenu**

D'après le (Tab. 16), l'ADN obtenu est contaminé par les protéines, les polysaccharides, les polyphénols, le phénol, les sels ... etc., sauf l'ADN de l'échantillon V6, il a donné un ADN sans contamination protéique avec un ratio égale à 1,92.

**Tableau 16.** Détermination de la pureté de l'ADN.

Echantillon	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	Indication de la pureté ( $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ )	$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$	Indication de la pureté ( $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ )
V5	1,13	Présence de protéines et/ou	0,94	Une contamination par les

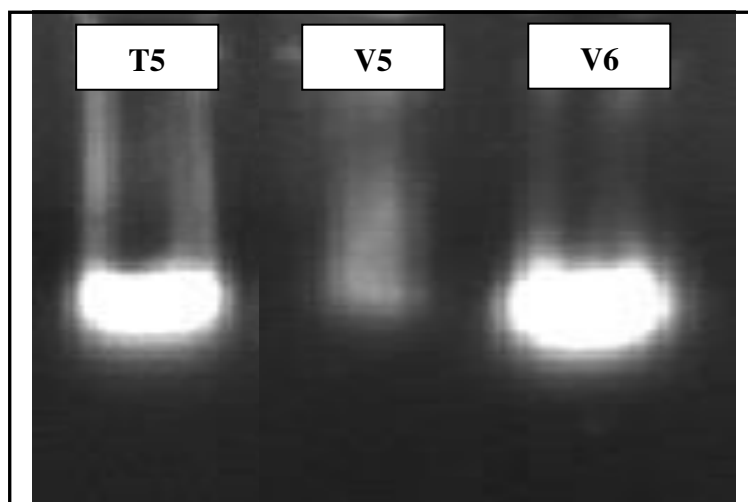
T5	1,49	substance aromatique.	1,43	polysaccharides, les polyphénols, le phénol ou les sels
V6	1,92	ADN pur	1,59	

#### 4.2.5. Protocole G

Dans ce protocole le même tampon de lyse du protocole (F) a été utilisé, la purification se fait sans phénol, un double lavage a été fait par le chloroforme : alcool isoamylique (24:1) et l'incubation à l'isopropanol (-20°C) est faite pendant une nuit.

##### • Evaluation de l'intégrité d'ADN extrait

D'après le profil électrophorétique (Fig. 19), un signal de plus forte intensité a été révélé avec les échantillons T5 et V6. Un faible signal pour l'échantillon V5, ceci s'explique par une erreur lors du chargement de ce puits.



**Figure 19.** Profil électrophorétique d'ADN obtenu après l'application de protocole G. Une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % après une coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V.

Les puits : V5, T5 et V6 ont plus de 20 jours de conservation à température ambiante en présence du gel de silice.



• **Détermination du rendement de l'extraction**

D'après le (Tab. 17), ce protocole donne une concentration moyenne d'ADN de (3975 $\mu$ g/ml), une masse moyenne totale de (238,50  $\mu$ g), et un bon rendement d'extraction égale à (2385  $\mu$ g/g).

**Tableau 17.** Moyenne de la concentration, la masse et le rendement de l'ADN extrait par le protocole G.

<b>Echantillon</b>	<b>Concentration en ADN (<math>\mu</math>g/ml)</b>	<b>Masse totale d'ADN (<math>\mu</math>g)</b>	<b>Rendement d'extraction (<math>\mu</math>g d'ADN par g de feuille)</b>
T5	3835	230,1	2301
V5	2520	151,2	1512
V6	5570	334,2	3342
<b>Moyenne</b>	<b>3975</b>	<b>238,5</b>	<b>2385</b>

• **Evaluation de la qualité d'ADN obtenu**

D'après les résultats du (Tab. 18), un ADN extrait est de bonne pureté pour tous les échantillons (T5, V5 et V6).

**Tableau 18.** Détermination de la pureté de l'ADN.

<b>Echantillon</b>	<b><math>A_{260nm}/A_{280nm}</math></b>	<b><math>A_{260nm}/A_{230 nm}</math></b>	<b>Indication de la pureté</b>
T5	1,93	2,1	Bonne pureté de l'ADN
V5	1,89	2,00	
V6	1,89	1,95	

**Chapitre 5.**  
**DISCUSSION**  
**DES**  
**RESULTATS**

### 5.1. Discussion des résultats

L'identification génétique des différentes variétés de la vigne, nécessite une bonne qualité et quantité d'ADN génomique extrait. De nombreux protocoles d'extraction d'ADN existent dans la littérature, mais la majorité de ces protocoles, exigent d'utiliser des jeunes feuilles fraîches et l'utilisation de l'azote liquide qui est indisponible. Parfois, ces protocoles sont coûteux on ne peut pas les appliqués dans notre laboratoire qui est peu équipé. Donc l'objectif de cette étude est d'essayer de résoudre tous ces problèmes et de trouver une simple et une meilleure méthode de séchage, de broyage et de conservation pour obtenir un ADN génomique non dégradé, de bonne qualité et en meilleur rendement. Les quantités d'ADN extrait ainsi que les ratios d'absorbance 260/280 et 260/230 sont comparés entre le protocole de référence de Sandra et *al.* (2012) et le protocole optimisé.

#### 5.1.1. Le matériel végétal

**Tableau 19.** Résultat de l'extraction d'ADN à partir des feuilles préparés par différentes méthodes.

	<b>La concentration moyenne d'ADN (µg/ml)</b>	<b>Rendement d'extraction moyen (µg d'ADN par g de feuille)</b>
Jeunes feuilles séchées par gel de silice, broyées sans azote liquide et conservées à température ambiante pendant plus de 05 mois.  (VI4/T2)	79	47,33
Jeunes feuilles séchées par gel de silice, broyées sans azote liquide et conservées à (-20°C) pendant plus de 05 mois.  (VI3/T3)	/	/
Jeunes feuilles séchées par gel de silice, broyées avec azote liquide et	3,83	2,25

conservées (-20°C) pendant plus de 05 mois.  (TAL/VIAL)		
Jeunes feuilles séchées à l'étuve ventilée pendant 04 jours, broyées sans azote liquide et conservées à température ambiante, à une durée de conservation plus de 15 jours.  (T5/V5/V6)	2238,56	1343

Selon les résultats du (Tab. 19) qui représentent les concentrations et les rendements moyens de l'ADN extrait à partir d'une poudre des feuilles traité par différents méthodes de préparation, il semble que le séchage à l'étuve ventilée est la méthode la plus simple que le gel de silice qui nécessite une réactivation après chaque utilisation.

La méthode de broyage avec l'azote liquide est la méthode la plus utilisée dans presque tous les protocoles, mais ce produit n'est pas toujours disponible dans notre laboratoire en plus il est facilement évaporable. D'après le (Tab. 19), les feuilles séchés par le gel de silice, broyés avec l'azote liquide et conservés à (-20 °C), donne une concentration moyenne d'ADN extrait égale à 3,83 µg/ml, avec un rendement moyen égale à 2,25 µg/g, alors que les résultats de l'extraction d'ADN sont négatif à partir des feuilles séchés par le gel de silice, broyés sans azote liquide et conservés à (-20 °C), donc l'ajout de l'azote liquide dans le broyage des feuilles a un effet positif sur l'extraction d'ADN.

Concernant la conservation des feuilles, la plupart des protocoles utilisent la congélation à ultra-basse température à (-80 °C) ou (-70 °C) qu'ils assurent une préservation fiable à long terme des échantillons ainsi que un broyage qui s'effectue plus facilement et rapidement (Hajer, 2017), mais un congélateur de ce type n'est pas disponible dans notre laboratoire, ceci nous a conduit d'essayer la congélation à (-20 °C), mais il semble qu'elle est inefficace, d'après les résultats négatifs des concentrations et des rendements moyens de l'ADN extrait à partir des échantillons VI3 et T3 conservés à (-20 °C). Par contre on a obtenu un résultat positif avec une concentration moyenne d'ADN égale à (79 µg/ml) et un rendement moyen de (47,33 µg/g) à partir des échantillons VI4 et T2 conservés à température ambiante et séchés

dans le gel de silice. Donc on peut expliquer qu'il y'a apparemment une réhydratation des échantillons qui sont conservés à (-20 °C) ce qui provoque la dégradation de l'ADN.

D'après ces résultats obtenus, il semble que la méthode de séchage à l'étuve, avec un broyage au mortier sans azote liquide et la conservation à température ambiante, est la meilleur et la plus simple méthode de préparation des échantillons avec une concentration moyenne d'ADN égale à (2518,4 µg/ml) et un rendement moyen de (1510,9 µg/g), en plus la période de conservation ne doit pas dépassé 6 mois. Par cette méthode simple et facile on peut utiliser la poudre des feuilles obtenues dans n'importe quel moment pour extraire l'ADN, sans attendre la période de croissance des organes végétatifs (feuilles plus jeunes), pendant la période fin du mois de Mars et début d'Avril.

### **5.1.2. Intégrité de l'ADN extrait**

La migration sur gel d'agarose nous montre deux chose, la présence d'une seul bande dans tous les protocoles (B, D, E, F et G) indiquant la présence d'ADN intacte ou intègre, son intégrité est préservé par une bonne méthode de préparation des échantillons donc une déshydratation complète (Berton, 2001), une température de centrifugation à (+ 4 °C) et une concentration idéale de l'EDTA qui capte ou chélate les ions métalliques, tous ces paramètres vont assurer une inactivation des enzymes nucléases (Sharma, 2012).

Concernant l'intensité du signal, un faible signal indique une faible concentration d'ADN extrait, confirmé par une faible absorbance à 260 nm et vice versa.

### **5.1.3. Concentration et rendement de l'ADN extrait**

Le rendement d'extraction moyen doit être calculé pour pouvoir comparer entre les différentes techniques d'extraction d'acides nucléiques. Ce paramètre est essentiel car il permet de s'assurer que la quantité d'ADN obtenue est suffisante pour les applications en aval (comme la PCR), et le calcul de la concentration permet de donner une idée sur le signal obtenu après migration électrophorétique. Le tableau 20 représente la concentration moyenne et le rendement moyen de l'ADN extrait des différents protocoles appliqués.

**Tableau 20.** Concentrations moyennes et les rendements moyens de l'ADN extrait des différents protocoles.

	Concentrations moyennes d'ADN en ( $\mu\text{g/ml}$ )	Rendements moyens d'ADN en ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Protocole A</b>	/	/
<b>Protocole B</b>	562,4	337,2
<b>Protocole D</b>	67,7	40,5
<b>Protocole E</b>	60	36
<b>Protocole F</b>	1960,3	1176
<b>Protocole G</b>	3975	2385

Les meilleures concentrations et rendement sont obtenus par le protocole (G), avec une concentration égale à ( $3975 \mu\text{g/ml}$ ) et un rendement moyen de ( $2385 \mu\text{g/g}$ ), et le protocole (F) avec une concentration moyenne égale à ( $1960,3 \mu\text{g/ml}$ ) et un rendement moyen de ( $1176 \mu\text{g/g}$ ), cette différence de concentration entre les deux protocoles (G et F) est due à la durée de l'incubation avec l'isopropanol à ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), donc plus le temps d'incubation est long plus le maximum d'ADN est précipité, et l'utilisation d'un autre détergent en plus du CTAB par rapport les protocoles (A,B,D) qui est le Tween 20. Alors que la méthode saline (Protocole E) donne le faible résultat d'extraction avec une concentration d'ADN égale à ( $60 \mu\text{g/ml}$ ) et un rendement de ( $36 \mu\text{g/g}$ ), ce qui explique que le salting-out n'interfère non seulement sur les protéines mais même sur la molécule d'ADN, il neutralise leur charge et en absence d'alcool isoamylique, les phases ne sont pas bien séparées ce qui perdre une quantité d'ADN extrait dans la phase inférieure (Fig. 20).



**Figure 20.** Etape de purification d'ADN par l'ajout de l'acétate de sodium, suivie d'une centrifugation, les phases ne sont pas séparées.

Selon ces résultats, la méthode la plus efficace est la méthode au chloroforme alcool isoamylique du protocole (G). Le protocole F au phénol chloroforme alcool isoamylique (25 :24 :1) a donné aussi des résultats acceptables.

Les résultats contradictoires entre les profils électrophorétiques avec un faible signal et fort absorbance à 260 nm est due à un problème de chargement des puits. Pour les profils qui montrent l'absence d'ADN mais la présence de faible absorbance à 260 nm, ceci est expliqué par la présence des contaminants comme certains polyphénols qui absorbent dans 240 et 285 nm (Vrielynck, 1996), et les phénols avec absorbance vers 270-275 nm, proche à celui de l'ADN (Leonor et *al.*, 2011).

#### 5.1.4. Pureté de l'ADN extrait

D'après les résultats du tableau 21, le protocole G est le protocole qui a donné un ADN de haute pureté, dont le ratio moyen 260 nm/280 nm égale à 1,90 qui indique l'absence d'une contamination par des protéines et de substance aromatique. Les protéines sont éliminées par un double lavage au chloroforme qui provoque une dénaturation de la surface des protéines, et même le  $\beta$ -Mercaptoéthanol utilisé dans le tampon de lyse aide également à dénaturer les protéines en rompant les liaisons disulfures entre les résidus cystéine (Sharma, 2012), ainsi que la protéinase K utilisé pour la dénaturation des protéines (Sharma, 2012). L'alcool isoamylique maintient la stabilité des phases après centrifugation de la solution déprotéinisée, ce qui aide à l'obtention d'une phase aqueuse bien séparé à la phase organique (Sharma, 2012).

Le ratio 260 nm/230 nm égale à 1,99 signifie l'absence d'une contamination par les polysaccharides et les phénols. Les polysaccharides sont cependant plus difficiles à enlever, le CTAB est connu pour enlever les polysaccharides (Sharma, 2012). Le PVP et le  $\beta$ -Mercaptoéthanol se lient avec les polyphénols et évitent leurs interactions avec l'ADN (Sharma, 2012).

**Tableau 21.** Rapports DO260/DO280 et DO260/DO230 des différents protocoles appliqués.

	La moyenne 260nm/280nm	La moyenne 260nm/230nm
<b>Protocole A</b>	/	/
<b>Protocole B</b>	1,58	1,58
<b>Protocole D</b>	1,22	1,05
<b>Protocole E</b>	0,71	0,55
<b>Protocole F</b>	1,51	1,32
<b>Protocole G</b>	1,90	1,99

### 5.1.5. Estimation des coûts

Les prix de tous les produits utilisés à l'extraction ont été donnés par le chef du laboratoire de notre département. Pour quelques produits, on a eu recours à la recherche des prix auprès des fournisseurs. Le tableau suivant (Tab. 22) résume le coût de chaque produit utilisé, et le coût total de l'extraction.

**Tableau 22.** Etude de coût de l'extraction d'ADN génomique pour un échantillon par le protocole optimisé (G) et le protocole avant optimisation (A).

<b>Produit</b>	<b>prix en DA du produit</b>	<b>Quantité utilisée en (g) ou (ml) pour un échantillon protocole A</b>	<b>prix de la quantité utilisé pour un échantillon</b>	<b>Quantité utilisée en (g) ou (ml) pour un échantillon protocole G</b>	<b>prix de la quantité utilisé pour un seul échantillon</b>
2-Mercaptoéthanol (1000 ml)	3400,00	0,0070	0,02	0,0100	0,03
3-méthylbutanol (2500 ml)	10100,00	0,0320	0,13	0,0317	0,13
Chloroforme (2500 ml)	5500,00	0,7280	1,60	0,7683	1,69
CTAB (100g)	8950,00	0,0140	1,25	0,0300	2,69
EDTA disodium (1000 g)	6916,00	0,0065	0,05	0,0186	0,13
Ethanol absolu (2500 ml)	2800,00	0,3500	0,39	0,3333	0,37
Isopropanol (500 ml)	11800,00	0,3000	7,08	0,3000	7,08
Polyvinyl pyrrolidone (100 g)	4741,30	0,0140	0,66	0,0200	0,95
Protéinase K (500 mg)	69700,00	/	/	0,00006	8,36
Sodium chloride (1000 g)	1850,00	0,1023	0,19	0,1578	0,29
Trizma®hydrochloride (100g)	7985,45	0,0110	0,88	0,0158	1,26



Tween®20 (1000 ml)	7559,42	/	/	0,0050	0,04
<b>Prix total</b>			<b>12,26</b>		<b>23,02</b>

Le tableau (22) montre une comparaison des coûts entre le protocole non optimisé (A) et le protocole optimisé (G). D'après l'étude précédente le meilleur protocole, qui a donné les meilleurs résultats et qui répond à nos objectifs, est le protocole (G). L'estimation de coût de ce protocole optimisé d'après le tableau ci-dessus, pour un seul échantillon de 100 mg est égale à 23,02 DA par rapport le protocole non optimisé (A) qui coûte 12,26 DA. Le coût de protocole G est raisonnable. Ceci revient à dire que 5 mg de feuille sèche (50 extractions) coûte 1151,00 DA.

# **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspectives

Le but de notre travail était une optimisation et une validation d'une méthode d'extraction d'ADN génomique afin d'obtenir un ADN de bon rendement et de bonne qualité, selon les moyens disponibles dans notre laboratoire d'El-Hadjeb, en comparant les résultats des concentrations et des rendements obtenus du protocole optimisé avec celui avant optimisation.

Nous avons pu améliorer le protocole de référence et les résultats étaient satisfaisants, avec l'utilisation des feuilles déshydratées et conservées à température ambiante, qui sont préparées par des simples moyens de notre laboratoire, un séchage à l'aide d'une étuve ventilée et broyage dans un mortier sans utilisation de l'azote liquide. Pour faire une extraction d'ADN génomique efficace avec un bon rendement, nous avons modifié les concentrations du tampon de lyse, avec l'ajout du tween 20 et la protéinase K qui améliorent l'extraction d'ADN et une incubation pendant 60 minutes à 58°C, une incubation avec l'isopropanol à (-20°C) est effectuée pendant une nuit et l'ADN obtenu est resuspendu dans 60 µl d'eau bidistillée. Un double lavage avec le chloroforme-alcool isoamylique a été ajouté pour augmenter la pureté de l'ADN extrait. Pour garder l'intégrité de l'ADN, les nucléases sont bloquées dès la préparation des feuilles jusqu'à l'obtention d'ADN génomique. La quantité et la qualité de l'ADN génomique extrait sont étudiées par visualisation sur gel d'agarose au BET, et spectrophotométrie. Une bonne concentration (3975 µg/ml) de l'ADN ainsi qu'un bon rendement (2385 µg/g) ont été obtenus par le protocole optimisé avec un faible coût d'extraction (23,02 DA).

Pour la continuité de notre travail expérimental nous proposons:

- Augmenter le nombre des échantillons pour faire une étude sur l'efficacité des méthodes d'extraction, ce qui va nous permettre d'en tirer des conclusions et dégager des recommandations, très utiles sur ce protocole optimisé;
- Mesurer précisément la quantité et la qualité d'ADN extraits, en effectuant un dosage au Nanodrop et par fluorimétrie;
- Valider les résultats positifs obtenus *via* la PCR afin de confirmer la qualité d'ADN obtenu;
- Faire un séquençage et création des cartes génomiques de la vigne algérienne.

# **Bibliographie**

## Bibliographie

1. Hanane Achour. 2015. Analyse mutationnelle du gène suppresseur de tumeur p53 dans le cancer du sein : A propos de cas cliniques d'une population Algérienne. Thèse de magister, université Mohamed Khider, Biskra, 49 p.
2. Adel Nouaihith. 1990. Sanaouet kanet arabia. Beirout : entreprise culturelle Nouaihith, 1<sup>ère</sup> édition, 37822.
3. Alain Reynier. 2012. Manuel de viticulture. Lavoisier, 11<sup>e</sup> édition, TEC & DOC, p. 91-93.
4. Allen G.C., Flores-Vergara M.A., Krasynanski S., Kumar S., Thompson W.F. 2006. A modified protocol for rapide DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide, p.2323.
5. Bernard Hainque, Bruno Baudin, Philippe Lefebvre. 2008. Appareils et méthode en biochimie et biologie moléculaire. Médecine-Science, Flammarion, Paris, p. 34-40.
6. Berton H. (2001). Sorcellerie en Auvergne : Sorciers, guérisseurs, médecine magique et traditionnelle. De Boré (Clement-Ferrand), France : 288.
7. Bienvenu T., Meunier C., Bousquet S., Chiron S., Richard L., Gautheret-Dejean A., Rouselle J.-F., Feldmann D.1999 . Annales de Biologie Clinique, Vol. 57, Paris, p.77-84.
8. Bipinchandra B. Kalbande, Vivek L. Ghonge, Satish R. Sutar, Suchitra V. Sable, Mithila D. Meshram and Jayesh Warade. 2012. Principle of DNA extraction and the role of various components used in DNA extraction. Biotechnologie 01:972-7027.
9. Denis Tagu, Stéphanie Jaubert-Possamai, Agnès Méreau, coord. 2018. Principe des techniques de biologie moléculaire et génomique, 3<sup>ème</sup> édition, Quae, France, page 47.
10. Giuliana Giannuzzi, Pietro D'Addabbo, Marica Gasparro, Maurizio Martinelli, Francesco N Carelli, Donato Antonacci, Mario Ventura. 2011. Analysis of high-identity segmental duplications in the grapevine genome. BMC Genomics, 12 (1):436.
11. Guillaume Girard .2010. Bases scientifiques et technologiques de la viticulture, Lavoisier, 2<sup>ème</sup> édition, p. 4 - 6.

12. Hajer Snoussi. 2017. Extraction d'ADN du palmier dattier: optimisation et influence des principaux paramètres. Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie 0365-4761.
13. Halima BENBOUZA, Jean-Pierre BAUDOIN & Guy MERGEAI. 2006. Amélioration de la méthode d'extraction d'ADN au CTAB appliquée aux feuilles de cotonnier. *Phytotechnie tropicale et d'Horticulture* 10 (2) : 73 – 76.
14. Hildebert Isnard. 1947. Vigne et colonisation en Algérie: 1880-1947. *Annales. Histoire, science sociales*, 2<sup>e</sup> Année, N<sup>o</sup>.3, pp. 288-300.
15. Janssens T. Salden I. Matthijs G. 2008. Automated DNA extraction : integration of the chemagic Magnetic Separation Module I with the Perkin Elmer MultiProbe II Liquid Handler. Eurogentest, Belgium, 26 p.
16. Joëlle Brodeur, Martin Toussaint. 2007. *Biologie moléculaire concepts. Technique. Application.* CCDMD, Canada, Chapitre: 6.
17. Leonor Pereira, Henrique Guedes-Pinto, Paula Martins-Lopes. 2011. An enhanced method for *Vitis vinifera* L. DNA extraction from wines. *American society for enology and viticulture*, pp. 547-552.
18. Marcel Larnaude. 1948. La vigne en Algérie d'après H. Isnard. *Anale de géographie*, 57<sup>e</sup> année, N<sup>o</sup>308, pp.356-359.
19. Marie-cecile Dufour. 2011. Etude de l'efficacité des défonceuses de différents géotypes de *Vitis* induites par élicitations face à la diversité génétique de bioagresseurs (*Plasmopara viticola* et *Erysiphe necator*): du gène au champ : *Biologie Cellulaire et Physiopathologie*. Thèse de doctorat, université Bordeaux - Victor Segalen, 384 p.
20. Meynier A. 1956. La vigne en Algérie. T. II by Isnard. *Revue historique*, p.331-332.
21. Michel Quéré. 2012. Cépage hybride : une expérience de viticulture et vinification en Berry. 114 pages.
22. Naçira Amara, Fatma Zohra Melouk. 2016. Activité antimicrobienne des extraits des feuilles de la vigne sauvage (*Vitis vinifera sylvestris*). *Biologie des populations et des organismes*, université Blida 1, *Algerian journal of Natural Products*, 358-366.
23. Nature Publishing Group. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla, Vol. 449 , p.463–467.

24. Ouarda Bounab. 2013 . Influence de l'ablation des prompt-bourgeons sur la croissance du rameau principal de la vigne (*Vitis vinifera* L.): mise en évidence des corrélations de croissance : Agronomie. Thèse de magister, Université 20 Août 1955, Skikda, 65 p.
25. Pierre Galet. 2001. Dictionnaire encyclopédie des cépages. Hachette, Paris, 935 p.
26. Riccardo Velasco, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, Fitzgerald LM, Vezzulli S, Reid J, Malacarne G, Iliev D, Coppola G, Wardell B, Micheletti D, Macalma T, Facci M, Mitchell JT, Perazzolli M, Eldredge G, Gatto P, Oyzerski R, Moretto M, Gutin N, Stefanini M, Chen Y, Segala C, Davenport C, Demattè L, Mraz A, Battilana J, Stormo K, Costa F, Tao Q, Si-Ammour A, Harkins T, Lackey A, Perbost C, Taillon B, Stella A, Solovyev V, Fawcett JA, Sterck L, Vandepoele K, Grando SM, Toppo S, Moser C, Lanchbury J, Bogden R, Skolnick M, Sgaramella V, Bhatnagar SK, Fontana P, Gutin A, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R. 2007. A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety. PLoS ONE, p. 1-18.
27. Sandra Lo Piccolo, Antonio Alfonzo, Gaetano Conigliaro, Giancarlo Moschetti, Santella Burrano, Amalia Barone. 2012. A simple and rapid DNA extraction method from leaves of grapevine suitable for polymerase chain reaction analysis. Biotechnology 11 (45) : 10305-10309.
28. Sharma H. P. 2012 . Plant tissue culture: totipotency to transgenic. A monthly magazine of agriculture and biological sciences AGROBIOS. Vol. XI. Issue N° 01, p. 6 - 8.
29. Varma A., Padh H., Shrivastava N. 2007. Plant genomique DNA isolation: An art or science. Biotechnol. J. 2: 386-392.
30. Vrielynck Laurence. 1996. Structures et propriétés spectroscopiques de la flavone, de la 3 hydroxy et de la 5 hydroxy-flavone : étude des liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires: Spectroscopies et réactivité des systèmes chimiques. Thèse de docteur de l'université, université des sciences et technologie, Lille, 173 p.
31. Youness Zayd. 2017. Etude des techniques de multiplication et d'amélioration de la vigne : Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources. Thèse de licence sciences et techniques, université Sidi-Mohamed Ben Abdellah, Fes, 34 p.

## Webographie

1. Wikipédia l'encyclopédie libre. Commune dans la Wilaya de Biskra. [https://fr.wikipedia.org/wiki/El\\_Kantara\\_\(Biskra\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/El_Kantara_(Biskra)) on 22 mai 2016.
2. DB-city. Sidi-Okba. <https://fr.db-city.com/Alg%C3%A9rie--Biskra--Sidi-Okba--Sidi-Okba> on 08 juillet 2013.
3. Groupe des experts Ooreka. Séchage des feuilles. <https://jardinage.ooreka.fr/fiche/voir/272433/faire-secher-des-fleurs-et-des-feuilles> on 2018.
4. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/papers/3284591?fbclid=IwAR08Eg3BmXHwVkcUNgx850g9IJP6Fuq0CcVAGB17hicORj9emo6iP58erE>.



# **Annexes**

**Annexe 1.**

- **Réactifs et matériels utilisés pour la réalisation de l'extraction d'ADN.**
  - Réactifs utilisés.

<b>Le produit chimique/formule chimique</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Pays de fabrication</b>
2-Mercaptoéthanol (HSCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH)	Merck Schuchardt OHG	Allemagne
Acétate de sodium anhydre	SIGMA-ALDRICH	Allemagne
Acide acétique glacial	BIOCHEM Chemopharma	Québec
Agarose	SIGMA life science	Etats-Unis
Alcool isoamylique (3-Methylbutanol)	SIGMA-ALDRICH	Allemagne
BET	SIGMA-ALDRICH	France
Bleu de bromophénol	CARLO ERBA reagents	Italie
Chloroforme	SIGMA-ALDRICH	France
Chlorure de sodium (NaCl)	Honeywell Fluka	Danemark
CTAB	SIGMA-ALDRICH	Royaume-Uni (UK)
EDTA disodium Ethylenediaminetetraacetic acide disodium (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O)	BIOCHEM Chemopharma	Québec
Ethanol	Honeywell Riedel-de Haen	Allemagne
Gel de silice	ISOLAB	
Glycérol	SIGMA-ALDRICH	Allemagne
H <sub>2</sub> O bidistillée		
H <sub>2</sub> O distillée		
Isopropanol	QUICK service	France
Phénol (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O)	BIOCHEM Chemopharma	Québec
Polyvinyl pyrrolidone	BIOCHEM Chemopharma	USA

Protéinase K	SIGMA life science	Etats-Unis
Sodium hydroxide (HNaO)	BIOCHEM Chemopharma	Québec
Tris base	SIGMA life science	Etats-Unis
Tris HCL	SIGMA life science	Etats-Unis
Tween 20 (C <sub>58</sub> H <sub>114</sub> O <sub>26</sub> )	SIGMA-ALDRICH	France

➤ Matériels utilisés.

Matériel	fournisseur
Bain Marie (agitation continue)	Memmert
Balance	KERN ABJ
Centrifugeuse des tubes Eppendorf (+4°C)	Hettich zentrifugen
Congélateur (-20°C)	Haier
Caméra	Doc-Print VX2
Etuve ventilé	Memert
Générateur pour électrophorèse	Consort EV265
La hotte chimique	Exosafe
PH mètre	OHAUS
Spectrophotomètre	UV-2005 J.P. SELECTA
Table U.V.	VILBER LOURMAT

## Annexe 2.

Le bleu de chargement est préparé en mélangeant ces produits (Hanane, 2015):

- 3 µl H<sub>2</sub>O.
- 2,4 µg bleu de bromophénol.
- 3 µl glycérol.

## Annexe 3.

Préparation de TAE 1X (pH 8,0) :

- 1 volume de TAE 50X (pH 8,0)
- 49 volumes d'eau distillée stérile.

#### **Annexe 4.**

Le protocole G optimisé :

Notre protocole est appliqué sur des feuilles séchées à l'étuve ventilée à (27 °C) pendant 4 jours, broyé en poudre dans un mortier sans azote liquide et conservé dans une boîte stérile en présence de gel de silice à température ambiante. Les différentes étapes de ce protocole sont :

1. Peser 100 mg de la poudre des feuilles déshydratées, et la mettre dans un tube Eppendorf de 2 ml. ;
2. Ajouter 1ml du tampon de lyse préchauffé (60-65°C) constitué de 3% CTAB, 2% PVP, 100 mM Tris-HCl (pH8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 2,7M Na Cl, 3µl PK (20 mg/ml), 1% β-mercaptoéthanol et 0,5% Tween 20 ;
3. Agiter les tubes par inversement pour avoir une préparation homogène, puis incubés à (58 °C) pendant 60 minutes au bain-marie sous agitation horizontale continue ;
4. Centrifuger les tubes à 10 000 rpm / min pendant 10 min à 4°C et transférer la phase aqueuse doucement dans un nouveau tube ;
5. Ajouter un volume égale de chloroforme: alcool isoamylique (24: 1), et mélanger par inversion pendant 5 min ;
6. Centrifuger les tubes à 10 000 rpm / min pendant 10 min à 4°C, et transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube ;
7. Faire un deuxième lavage par un volume égale de chloroforme: alcool isoamylique (24: 1). Mélanger par inversion pendant 5 min ;
8. Centrifuger les tubes à 10 000 rpm / min pendant 10 min à 4°C, et transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube ;
9. Ajouter un volume égal d'isopropanol froid (-20°C), et mélanger les tubes doucement pendant quelques minutes et les incubés à (-20°C) pendant une nuit ;
10. Centrifuger l'ADN précipité à 14 000 rpm / min pendant 10 min à 4°C, et jeter le surnageant ;

11. Laver le culot d'ADN par 500  $\mu$ l d'éthanol 70% froid (-20°C), et centrifuger les tubes à 14 000 rpm / min pendant 5 min à 4°C ;
12. Sécher à l'air pendant 15 min le culot d'ADN résultant ;
13. Resuspendre l'ADN dans 60  $\mu$ l de l'eau bidistillée ;
14. Conserver l'ADN extrait à (-20°C).

## ملخص

الكرمة هي واحدة من أقدم النباتات على الأرض اليوم، تمثل هذه الفواكه محصول الفاكهة الأعلى إنتاجية في العالم. وجود الآلاف من أنواع الكروم، أدى إلى ظهور العديد من الأصناف التي لم يتم التعرف عليها أو تتم تسميتها بأسماء مختلفة اعتمادًا على المنطقة. حاليًا، ويفضل أساليب البيولوجيا الجزيئية التي تتطلب حمضا نوويا جينيا بكمية ونوعية جيدة، مكنتنا من التعرف على هذه الأنواع المختلفة وراثياً.

تعتبر دراستنا خطوة أولى نحو التعرف الجيني، لهذا قمنا بتحسين بروتوكول استخراج الحمض النووي الجينومي وأيضاً وجدنا طريقة بسيطة وغير مكلفة لإعداد الأوراق في شكل مسحوق محفوظ يمكن استخدامه في أي وقت للحصول على الحمض النووي الجينومي السليم. متوسط التركيز و متوسط المردودية وكذلك نقاء الحمض النووي الجيني المستخلص بواسطة البروتوكول المحسن مرضية للغاية مقارنة بالبروتوكول غير المحسن. ضيق الوقت وكذلك نقص المواد في مختبرنا كانا عتبة من أجل التأكد بواسطة PCR من نقاء الحمض النووي المستخلص.

**الكلمات المفتاحية:** ورق العنب، استخراج الحمض النووي الجيني، CTAB.

## Résumé

La vigne fait partie des plantes les plus anciennes sur terre. Aujourd'hui, par ces fruits elle représente la culture fruitière la plus forte valeur de production dans le monde. L'existence des milliers de variété de vigne, conduit à l'apparition de nombreux cultivars qui sont mal identifiés ou appelés sous différents noms selon les régions. Actuellement, grâce aux méthodes de biologie moléculaire qui nécessitent un ADN génomique de bonne quantité et qualité on peut identifier génétiquement ces différentes variétés.

Notre étude est considérée comme un premier pas vers l'identification génétique. Pour cela nous avons fait une optimisation d'un protocole d'extraction d'ADN génomique au CTAB et aussi nous avons trouvé une méthode simple et peu couteuse de préparation des feuilles sous forme d'une poudre conservé afin de l'utiliser dans n'importe qu'elle moment pour l'obtention d'un ADN génomique intacte. La concentration moyenne, le rendement moyen ainsi que la pureté de l'ADN génomique extrait par le protocole optimisé sont très satisfaisants par rapport le protocole non optimisé. Le temps court ainsi que le manque des amorces dans notre laboratoire étaient des obstacles qui nous ont bloqué pour passer au PCR et confirmer la pureté de notre ADN extrait.

**Mots clés :** feuille de vigne, extraction d'ADN génomique, CTAB.

## Abstract

The vine is one of the oldest plants on earth. Today, through these fruits it represents the highest production value of fruit cultivation in the world. The existence of thousands of vine varieties leads to the appearance of many cultivars that are poorly identified or called under different names depending on the region. Currently, due to molecular biology methods that require genomic DNA of good quantity and quality, these different varieties can be identified genetically.

Our study is considered a first step towards genetic identification. For this reason we made an optimization of a genomic DNA extraction protocol and also found a simple and inexpensive method of preparing the leaves in the form of a preserved powder for use at any time to obtain an intact genomic DNA. The average concentration, the average yield and the purity of the genomic DNA extracted by the optimized protocol are very satisfying when compared to the non-optimized protocol. The short time and the absence of primers in our laboratory are obstacles that we have prevented to switching to PCR and confirming the purity of our extracted DNA.

**Keywords:** leaf of grapevine, extraction of genomic DNA, CTAB.