



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 :
Asma CHAHDI et Hanane SALHI

Le : mardi 9 juillet 2019

Thème

Comparaison de trois techniques d'extraction d'ADN appliquées à l'étude de la vigne cultivée

Jury :

Mme. Aicha MEDJADBA	MAB	Université de Biskra	Président
Mlle. Hanane ACHOUR	MAB	Université de Biskra	Rapporteur
M. Abdelhamid MOUSSI	MCA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018 - 2019

Remerciement

*Avant tout nous remercions **Allah** le tout puissant, de nous avoir guidé tout au long de nos années d'études et de nous avoir donné la volonté, la patience et le courage pour achever ce travail.*

*Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus cordiaux et notre vive reconnaissance à notre encadreur **ACHOUR HANANE** qui a bien voulu accepter de diriger ce travail, pour son encouragement, ses conseils précieux, sa disponibilité, ses suggestions pertinentes, ses critiques constructives et pour sa patience tout au long de ce projet et sans lesquels, ce travail n'aurait pu aboutir.*

Nous remercions les membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Enfin, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

Dédicace

Nous dédions notre travail à notre parent, qu'ils

Trouvent ici toute nos gratitudes pour leur soutien

Tout au long de nos études.

A nos frères et nos sœurs.

A notre amies Lamia, Ameni, Nour El Houda, Dalal, Safa et

Meriem.

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Liste des tableaux I

Liste des figures II

Liste des abréviations..... III

Introduction 1

Première partie : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. GENERALITES SUR LA VIGNE

1.1. Historique sur la vigne 3

1.2. Taxonomie de la vigne..... 4

1.3. Vigne cultivée (*Vitis Vinifera*) 4

1.4. Génome de la vigne..... 5

Chapitre 2. EXTRACTION D'ADN GENOMEQUE

2.1. Type de tissu utilisé dans l'extraction d'ADN 6

2.2. Méthodes d'extraction d'ADN génomique..... 6

2.2.1. Méthodes classiques 6

2.2.1.1. Méthode d'extraction au CTAB..... 7

2.2.1.2. Méthode d'extraction par SDS 7

2.2.2. Méthode des kits..... 7

Deuxième partie : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Stratégie de travail 8

3.2. Matériel et méthodes 9

3.2.1. Matériel biologique	9
3.2.2. Méthodes de travail.....	9
3.2.2.1. Préparation des échantillons.....	10
3.2.2.2. Préparation des réactifs de l'extraction.....	12
3.2.2.3. Extraction d'ADN génomique	12
a. Méthode CTAB	12
b. Méthode SDS	14
3.2.2.4. Détermination de la concentration de l'ADN et contrôle de leur qualité	15
a. Détermination de la concentration de l'ADN.....	15
b. Contrôle de la pureté de l'ADN extrait	15
c. Vérification de l'intégrité de l'ADN en présence de BET	15

Chapitre 4. RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Echantillons utilisés	17
4.2. Qualité et rendement d'ADN obtenu	19
4.2.1. Profils d'ADN obtenu	19
4.2.2. Pureté d'ADN extrait	22
4.2.3. Rendement d'ADN obtenu	25
4.3. Études des coûts.....	27
Conclusion.....	29
Bibliographie.....	31
Annexes	
Résumés	

Liste des tableaux

Tableau 1. Différentes variétés utilisées au cours de l'extraction d'ADN génomique, les conditions du séchage, broyage et de la conservation.....	11
Tableau 2. Solutions utilisées au cours de l'extraction d'ADN.....	12
Tableau 3. Moyenne des concentrations et des rendements des échantillons utilisés.	17
Tableau 4. Concentration d'ADN extrait du protocole A d'Alexander (2016) et le jugement de leur pureté à partir des ratios A260/A280, A260/A230.	23
Tableau 5. Concentration d'ADN extrait du protocole B de Simon <i>et al.</i> (2014) et le jugement de leur pureté à partir des ratios A260/280, A260/230.	23
Tableau 6. Concentration d'ADN extrait de protocole C de Meru <i>et al.</i> (2013) et le jugement de leur pureté à partir des ratios A260/280, A260/230.	23
Tableau 7. Concentration et rendement d'ADN obtenu par le protocole A.	25
Tableau 8. Concentration et rendement d'ADN obtenu par le protocole B.	25
Tableau 9. Concentration et rendement d'ADN obtenu par le protocole C.	26
Tableau 10. Étude des coûts de l'extraction d'ADN par les trois méthodes utilisées.	27

Liste des figures

Figure 1. Illustration schématique des différentes étapes de notre travail.	9
Figure 2. Profils électrophorétiques d'ADN génomique des jeunes feuilles de la vigne. Une électrophorèse sur gel d'agarose (1%) et coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V. L'ADN extrait par la méthode CTAB 2%	20
Figure 3. Profils électrophorétiques d'ADN génomique des jeunes feuilles de la vigne. Une électrophorèse sur gel d'agarose (1%) et coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V. L'ADN extrait par la méthode SDS selon le protocole C.	21

Liste des abréviations

- **A**: absorbance.
- **ADN**: acide désoxyribonucléique.
- **ARN**: Acide ribonucléique.
- **BET**: bromure d'éthidium.
- **CIA**: Chloroforme/isoamyl alcool.
- **CTAB**: cetyl trimethylammonium bromude.
- **DO**: densité optique.
- **EDTA**: Éthylène diamine tétraacétique.
- **fig** : figure.
- **MB**: number of base.
- **Mpb**: number of base pairs.
- **NaCl**: chlorure de sodium.
- **NaOAc** : acétate de sodium.
- **P** : page.
- **PCR** : réaction en chaine par polymérase.
- **PVP**: Poly vinyl pyrrolidone.
- **R**: ratio.
- **SDS**: dodécylsulfate de sodium.
- **tab** : tableau
- **TE**: Tris EDTA.
- **Tris\HCL**: Trizma hydrochloride.
- **U.V**: ultraviolet.

Introduction

Introduction

L'Algérie est un grand centre de diversité biologique, sa position géographique et la structure de ses étages bioclimatiques font de ses terroirs un gisement relativement important de ressources génétiques. Depuis les années 80, les chercheurs et les agronomes Algériens ont présenté la nécessité de s'occuper des patrimoines génétiques locaux, tel que la viticulture. La viticulture est cependant plus ancienne car plusieurs vestiges témoignent de la présence de la vigne et de ses produits avant l'antiquité. De nombreuses influences (phéniciennes, romaines et autres) ont contribué à l'introduction des cépages et à l'évolution de la culture (Allouani, 2011).

La taxonomie ampélographique classique basée essentiellement sur la morphologie des cépages. Cependant, plusieurs restrictions sont imposées à ce méthode, étant donné que l'identification morphologique concerne principalement les feuilles entièrement développées, les méthodes ne peuvent être appliquées que pendant la période végétative à des plantes pleinement développées. Cependant, le matériel végétal de vigne est commercialisé sous forme de cannes ligneuses, ce qui rend l'identification des cultivars presque impossible (Sefc *et al.*, 2001). Pour ces raisons, la mise au point de méthodes biochimiques d'identification et de codage génétique viendra confirmer ou infirmer les résultats obtenus par les observations morphologiques (Bisson, 1999).

Identification génétique des différentes variétés, elles débutent par une étape d'extraction des acides nucléiques suivi d'une amplification de certaines régions particulières de l'ADN ou ARN par PCR, puis la diversité est observée via utilisation de techniques d'empreintes moléculaires ou encore séquençage. Parmi toutes ces étapes, l'extraction d'ADN est la plus critique. En effet, L'étude de la biologie moléculaire nécessite l'utilisation d'un ADN de haute qualité et en bonne quantité. Mais La présence des métabolites secondaires chez les plantes peut subir une oxydation rapide, se lier étroitement à l'ADN, puis coprécipiter avec l'ADN, empêchant ainsi son utilisation dans les applications en aval, comme la PCR (Olvera *et al.*, 2018).

La plupart des méthodes classiques essaie d'extraire un ADN de bonne pureté, ces méthodes impliquent une procédure CTAB ou SDS pour libérer le matériel génétique dans un tampon d'extraction. Alors que les kits commerciaux permettent une extraction plus rapide et

efficace de l'ADN de bon qualité par rapport aux méthodes conventionnelles, mais ils ont l'inconvénient d'être coûteux (Marsal *et al.*, 2013).

L'objectif est de comparer trois techniques d'extraction de l'ADN génomique, pour identifier une méthode capable d'extraire un ADN de bonne qualité et quantité et d'utiliser des réactifs disponibles à notre laboratoire. Nous allons essayer aussi de faire l'extraction d'ADN génomique à partir des jeunes feuilles déshydratées, conservées à température ambiante et broyer sans l'azote liquide afin d'avoir un ADN génomique pur, intact et en bon rendement.

Les méthodes utilisées pour ce but sont :

- Méthode CTAB d'extraction au Chloroforme alcool isoamylique ;
- Méthode CTAB d'extraction saline et au Chloroforme alcool isoamylique ;
- Méthode d'extraction SDS.

Les comparaisons concernent principalement :

- Concentration de l'ADN ;
- Pureté de l'ADN ;
- Intégrité d'ADN ;
- Coût de l'extraction.

Première Partie

Synthèse

Bibliographique

Chapitre 1

Généralités sur

La vigne

1.1. Historique sur la vigne

La vigne a une relation historique ancienne avec le développement de la culture humaine. Elle est subie de nombreux changements pour assurer une meilleure productivité et une production plus régulière. Dans ce processus, les changements dans la morphologie des grappes, la taille des mâriers, les bouquets et le passage de plantes sauvages bivalentes à des espèces de plantes étaient cruciaux (Rowley et Ribaut, 2003).

Pendant l'antiquité, les premières traces de raisins ont été découvertes dans la Géorgie actuelle, qui remonte à plus de 7 000 ans. Sous l'influence de romains, *Vitis vinifera* s'est étendu vers diverses régions et elle a atteint de nombreuses régions tempérées d'Europe, même au nord de l'Allemagne. Les Romains furent les premiers à donner des noms à des cultivars (Rowley et Ribaut, 2003).

L'extension de l'islam à l'Afrique du Nord, à l'Espagne et au Moyen-Orient également joué un rôle important dans la propagation du raisin (This *et al.*, 2006).

Après la Renaissance (16ème siècle), *V. vinifera* colonisé de nouvelles régions. Les missionnaires l'ont présenté en Amérique, d'abord sous forme de grappes, puis par bouturage à leur lieu d'origine (France, Allemagne, Espagne, Italie et Europe de l'Est). Les boutures également ont été introduites en Afrique du Sud, en Australie et en Nouvelle-Zélande (This *et al.*, 2006).

Au 19ème siècle, les raisins sont introduits plus tard au Nord d'Afrique. À la fin du 19ème siècle, un agent pathogène de L'Amérique a atteint l'Europe (mildiou, Phylloxera), ce qui a entraîné dans la destruction de nombreux vignobles européens (This *et al.*, 2006).

La viticulture française, ruinée par le phylloxéra ne couvre pas le besoin du pays. Pour se libérer des importations de l'étranger qui pèsent lourdement sur son économie, la métropole souhaite la création d'un vignoble d'appoint dans sa colonie. Beaucoup passèrent en Algérie, dans l'espoir de refaire leur vie par la vigne (Allouani, 2011).

La viticulture en Algérie est le plus souvent associée à l'agriculture coloniale et aux tentatives depuis 1962. Il occupait l'ensemble des terroirs au niveau national mais localisé surtout dans la zone ouest où les sols sont pauvres et la pluviométrie n'excède pas 450 mm par an (Allouani, 2011).

1.2. Taxonomie de la vigne

La vigne appartient à la grande famille ampélidacées, famille des *Vitaceae* qui comporte 17 genres et regroupe plus d'un millier d'espèces présentes en Afrique, Asie, Amérique et Océanie. Parmi lesquels le genre *Vitis*. (Lacombe, 2012).

L'origine du genre *Vitis* est située en Eurasie et il s'est ensuite étendu vers l'Ouest sur le continent américain. Le genre *Vitis* est en fait composé de deux sous-genres (*Euvitis* et *Muscadinia*) (Carrier, 2011).

Le sous-genre *Muscadinia* possède 40 chromosomes et comprend deux espèces (*Muscadinia popenoei*, et *Muscadinia rotundifolia*) originaires du Mexique et du Sud-Est des Etats-Unis (Carrier, 2011).

Le sous-genre *Euvitis* possède 38 chromosomes et comprend une soixantaine d'espèces diploïdes dont *Vitis vinifera* L. Ces espèces, malgré la spéciation, sont restées inter-fertiles. Elles sont classées selon leurs origines géographiques (Lacombe, 2012).

Les vignes américaines, utilisées en particulier depuis la crise phylloxérique comme porte-greffes ou en croisement avec *Vitis vinifera* L (Lacombe, 2012).

Les vignes asiatiques notamment l'espèce *Vitis amurensis* qui est utilisée dans les programmes d'amélioration pour sa tolérance au froid. (Lacombe, 2012).

La vigne euro-asiatique, *Vitis vinifera* L. qui regroupe l'ensemble des cépages cultivés, de cuve et de table appartenant à la sous espèce *Vitis vinifera* subsp. *vinifera*, ainsi que les vignes sauvages de la sous espèce: *Vitis vinifera* subsp. *Sylvestris* (Carrier, 2011).

1.3. Vigne cultivée (*Vitis Vinifera*)

La Vigne (*Vitis vinifera*) est une plante grimpante pérenne à croissance indéterminée, capable de se multiplier par voie sexuée, par bouturage ou par greffage (Gary *et al.*, 2003). La constitution d'un vignoble nécessite du temps, il faut attendre 3 ans pour obtenir les premiers fruits, 10 à 12 ans pour avoir un rendement significatif, et 25 ans pour arriver à la pleine production. La qualité organoleptique augmente avec l'âge du cep (Mrdinoglu, 2008).

Le genre *Vitis* est un genre d'arbustes et arbrisseaux sarmenteux de la famille des *Vitaceae*. Ce genre rassemble les espèces de plantes désignées collectivement sous le nom vernaculaire « vignes ». Il comporte plus de 72 espèces réparties dans les zones tempérées et subtropicales de l'Europe et du Proche-Orient, d'Asie Orientale et d'Amérique du Nord et Centrale (Mahboub, 2017).

Parmi les nombreuses espèces du genre, la principale sur le plan économique est la vigne européenne, *Vitis vinifera*, cultivée un peu partout dans les régions tempérées du monde (Mahboub, 2017).

Selon SIMON *et al.* (1992), la vigne cultivée appartient à la classification suivante :

- Embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous-classe : Archichlamydées
- Ordre : Rhamnales
- Famille : Vitacées
- Genre : *Vitis*
- Espèce : *Vitis vinifera* L.

1.4. Génome de la vigne

La vigne possède environ 30000 gènes dont la moitié a déjà été identifiée (par ex : gène contrôlant le développement des pépins, gène contrôlant la couleur de la baie..), d'autre sont en court d'identification (Hamon *et al.*, 1999).

La vigne cultivée possède un génome nucléaire diploïde (38 chromosomes) (Lacombe, 2012). Le génome de *Vitis vinifera* L. est composé de 19 paires de chromosomes (38 chromosomes). La taille du génome est évaluée à 470 Mb. La taille des chromosomes varie de 16,6 Mb pour le chromosome 17 et 29,7 Mb pour le chromosome 14 (Carrier, 2011).

Chapitre 2

Extraction d'ADN

génomique

2.1. Type de tissu utilisé dans l'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN de qualité à partir de tissus / cellules pose divers problèmes, en particulier lorsque les plantes sont utilisées comme matériel source. Les problèmes les plus fréquemment rencontrés dans presque toutes les procédures sont la présence de composés contaminants dans les échantillons d'ADN, en particulier l'ARN, les protéines, les polysaccharides et les polyphénols. Les métabolites secondaires amplifient les difficultés des cellules végétales (Varma *et al.*, 2007).

Les tissus jeunes, sains et tendres, en particulier les feuilles partiellement dilatées, constituent un choix idéal, car ils permettent d'obtenir une bonne qualité et quantité d'ADN, grâce à un plus grand nombre de cellules et à moins de dépôts d'amidon et de métabolites secondaires (Varma *et al.*, 2007).

2.2. Méthodes d'extraction d'ADN génomique

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans les études de biologie moléculaire (Tan et Yian, 2009). L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. L'ADN extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage. La recherche d'un moyen plus efficace d'extraire un ADN de qualité et de rendement supérieurs, a conduit à la mise au point de plusieurs protocoles permettant d'isoler l'ADN de plantes contenant des taux élevés de métabolites secondaires (Carrier, 2011). Les différents protocoles suivent approximativement le même schéma de principe (site Web 1) :

- Lyse des cellules ;
- Elimination des protéines, des métabolites secondaires et des autres acides nucléiques (ARN) ;
- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool.

Diverses techniques d'isolement d'ADN ont été élaborées. Outre les méthodes classiques, des méthodes d'extraction commercialisées sous forme de kits (Ben Larbi, 2014).

2.2.1. Méthodes classiques

2.2.1.1. Méthode d'extraction au CTAB

Élaboré pour la première fois par Murray et Thompson en 1980. Le protocole du test au cétyl triméthyl ammonium bromure (CTAB) a été publié ultérieurement, et plus précisément en 1987, par Wagner et ses collègues (Wagner *et al.*, 1987).

La méthode convient pour l'extraction et la purification d'ADN des végétaux et d'aliments tirés des végétaux et convient particulièrement pour la suppression des polysaccharides et des composés polyphénoliques qui affectent la pureté de l'ADN et donc sa qualité (Lipp *et al.*, 1999).

2.2.1.2. Méthode d'extraction par SDS

Cette méthode a été adaptée à partir de Dellaporta (1983). Le dodécylsulfate de sodium (SDS) est un détergent ionique utilisé en biochimie et biologie moléculaire, SDS a utilisé comme un détergent dénaturant (Grisshammer et Buchanan, 2006).

2.2.1.2. Méthode des kits

Un kit d'extraction permettant de réaliser l'extraction de l'ADN de façon rapide. Un kit est une solution commerciale proposée par un fabricant pour simplifier l'usage d'outil de biologie moléculaire. Un kit sert à être utilisé sur un grand nombre d'échantillons (indiqué par le fabricant) (Chakour *et al.*, 2003). les kits commerciaux permettent une extraction plus rapide et efficace de l'ADN de bon qualité, mais ils ont l'inconvénient d'être coûteux (Marsal *et al.*, 2013).

Deuxième partie

PARTIE

EXPERIMENTALE

Chapitre 3

Matériel et méthodes

3.1. Stratégie de travail

L'étude que nous avons menée était l'extraction d'ADN génomique à partir des jeunes feuilles de différentes variétés de la vigne récoltés de différentes régions de la wilaya de Biskra.

En premier temps, nous avons préparé les échantillons (séchage et broyage) pour faire l'extraction de leur ADN génomique, en utilisant deux méthodes d'extraction différentes (méthode d'extraction par CTAB et méthode d'extraction par SDS). Dont l'extraction d'ADN comporte trois étapes :

- Lyse des cellules, c'est-à-dire qu'on utilise un détergent afin de digérer les membranes cellulaires et nucléaires.
- Élimination des protéines et des autres contaminants (ARN, polyphénols ...).
- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool.

L'ADN extrait a été soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% coloré au bromure d'éthidium et a été visualisé sous la lumière U.V pour déterminer la présence et la qualité de l'ADN. De plus, Le rendement et la qualité d'ADN extrait ont été mesurés par spectrophotométrie. La pureté d'ADN a été évaluée sur la base du rapport d'absorbance A260/280 nm et A260/230nm. La figure 1 représente les différents étapes de notre stratégie de travail.

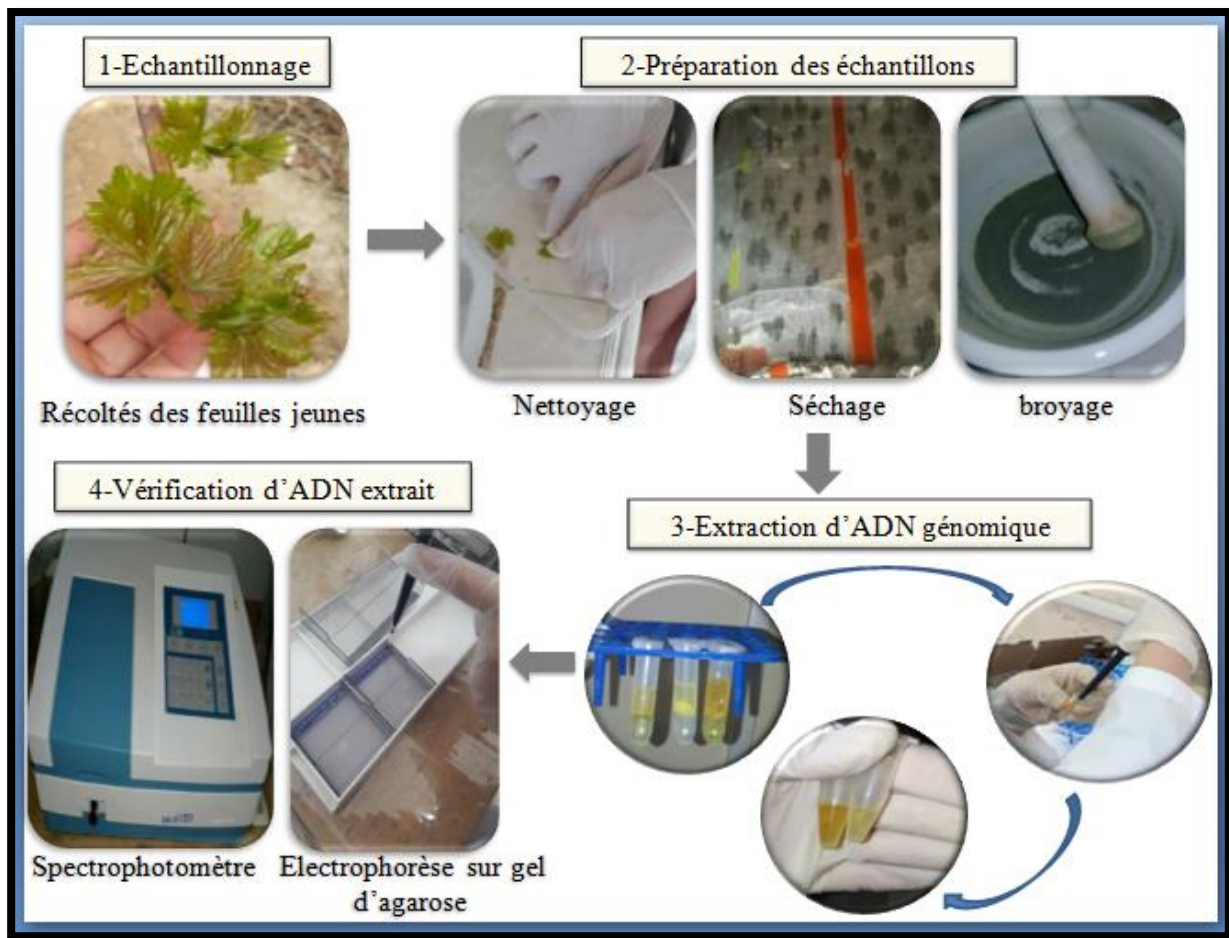


Figure 1. Illustration schématique des différentes étapes de notre travail.

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1. Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué des jeunes feuilles de la vigne qui ont été prélevées au mois de septembre 2018 et de mars 2019 à partir des différentes régions de la wilaya de Biskra ; El Hadjeb, El Kantara et la région Sidi Okba. Ces trois régions se caractérisent par un climat désertique. Il est important d'assurer qu'on ramasse toujours des feuilles saines.

La présente étude a été réalisée sur trois variétés de vignes : deux variétés connues muscat, cardinal et des autres variétés inconnues (V2, V3, V5 et V6).

Au cours de la récolte, les feuilles jeunes de la vigne sont mises ensuite dans des sacs bien aérés et sont transportés dans une glacière.

3.2.2. Méthodes de travail

3.2.2.1. Préparation des échantillons

Au cours de cette préparation, les échantillons sont manipulés avec des gants, tout matériel utilisé est désinfecté par l'éthanol 70%.

En premier temps, Les jeunes feuilles collectées sont nettoyées par l'eau distillée à l'aide d'un papier absorbant pour éliminer les traces d'eau ;

Les pétioles et les fragments de rameaux sont découpés à l'aide d'un scalpel ou ciseaux préalablement désinfecté ;

Lors de broyage, après chaque échantillon, on a changé les mortiers qui sont désinfectés auparavant sans oublier de nettoyer la paille avec de l'eau de javel afin d'éviter les contaminations croisées ;

Les petits matériels de prélèvement (scalpels, sécateurs, ...) ont été désinfectés, par trempage d'une durée d'au moins 2 minutes dans une solution d'eau de javel puis rincés abondamment à l'eau.

Ces feuilles furent ensuite placées dans l'étuve ventilée pendant 5 jours à 27 °C (Benbouza *et al.*, 2006) afin de sécher les feuilles. Ce dernier phénomène permet de conserver et stocker les feuilles. Puis les échantillons sont broyés selon deux modalités ; il y a des échantillons broyés dans un mortier en présence d'azote liquide à l'aide d'un pilon et des autres sont broyés sans azote liquide. Ensuite, les échantillons sont conservés à -20 °C et des autres à température ambiante.

Les différentes variétés des échantillons utilisés sont présentées dans le tableau suivant (tab. 1), en présence des conditions de conservation et de broyage.

Tableau 1. Différentes variétés de la vigne utilisées au cours de l'extraction d'ADN génomique, les conditions du séchage, broyage et de la conservation.

Code	Echantillon (variété)	Lieu d'échantillonnage	Séchage	Broyage	Conservation
A	<i>Muscat</i>	ITDAS (El Hadjeb)	Pendant cinq jours. De 27/09/2018 à 02/10/2018 T° : 28-30 °C	sans azote liquide	* une quantité à -20°C * une quantité à température ambiante.
B	<i>Cardinal</i>	ITDAS (El Hadjeb)	Pendant cinq jours. De 27/09/2018 à 02/10/2018 T° : 28-30 °C	sans azote liquide	* une quantité à -20°C * une quantité à température ambiante.
D	Inconnu V2	El Hadjeb	cinq jours. De 23/09/2018 à 27/09/2018 T° : 28-34 °C	sans azote liquide	* une quantité à -20°C * une quantité à température ambiante.
E	Inconnu V3	ITDAS (El Hadjeb)	Cinq jours. De 27/09/2018 à 02/10/2018 T° : 28-30 °C	avec azote liquide	Conserver à -20°C
F	Inconnu V5	Sidi Okba	Quatre jours. De 20/03/2019 à 24/03/2019 T° : 27°C	sans azote liquide.	Conserver à température ambiante.
G	Inconnu V6	Sidi Okba	Quatre jours. De 20/03/2019 à 24/03/2019 T° : 27°C	sans azote liquide.	Conserver à température ambiante.
I	<i>Muscat</i>	El kantara	Pendant quatre jours. De 07/04/2019 à 11/04/2019 T° : 27°C	sans azote liquide	Conserver à température ambiante.

3.2.2.2. Préparation des réactifs de l'extraction

Au cours d'extraction d'ADN génomique, on a utilisé des solutions mères de concentration élevée à partir de laquelle on a pris la quantité nécessaire à utiliser lors de chaque protocole.

Tableau 2. Solutions utilisées au cours de l'extraction d'ADN.

solution	Masse molaire en g/mol	Concentration	Volume totale préparé	Masse en gramme ou en ml
Na Cl	58.44	4 M	50 ml	11.688
Na Cl	58.44	6 M	25 ml	8.766
EDTA	372.23	500 mM	30 ml	5.583
Tris HCl	157.6	500 mM	50 ml	3.94
Acétate de sodium	82.02	3 M	5 ml	1.2303
Ethanol 70%	46,07	70%	50 ml	24 ml

3.2.2.3. Extraction d'Adn génomique

Nous avons utilisés deux méthodes d'extraction, méthode au CTAB et méthode par SDS. Nous avons appliqués deux protocoles pour la méthode CTAB, et un seule protocole pour la méthode SDS.

Afin de pouvoir comparer strictement les différentes techniques d'extraction, la même quantité des échantillons a été utilisée, 100 mg de poudre.

a. Méthode CTAB

Cette méthode a été adaptée à partir de Doyle et Doyle (Doyle et Doyle, 1987)

➤ Protocole (A) d'Alexander (2016)

1. Dans un tube eppendorf, mélanger 100mg d'échantillons avec 1 ml de tampon de lyse CTAB [2% de CTAB, NaCl 1,4 M, 100 mM de Tris-HCl (pH 8), 20 mM EDTA];

2. Incuber à 65 ° C pendant 1 h en vortexant les tubes chaque 5 à 10 min ;
3. centrifuger pendant 5 min à 16 000 g ;
4. transférer Le surnageant (presque 500 µl) dans un nouveau tube eppendorf, Un volume (505 µl) de chloroforme: alcool isoamylique (24: 1) a été ajouté à chaque échantillon ;
5. Inverser les tubes pendant 2 min puis centrifuger pendant 5 min à 16 000 g ;
6. La phase aqueuse (300 µl) a été prélevée dans un tube de 2 ml ;
7. Ajouter 150 µl de NaCl 5 M, puis 3 volumes d'éthanol absolu glacé (1350 µl), ont été ajoutés à chaque échantillon ;
8. Inverser les tubes pendant 30 secondes, incuber à -20°C pendant 1 heure et centrifuger pendant 10 minutes à 16 000 g ;
9. Jeter Le surnageant et laver le culot d'ADN deux fois avec 300 ml d'éthanol froid à 70%, à la fin éliminer l'éthanol (surnageant) ;
10. sécher les culots d'ADN à température ambiante pendant 20 min pour éliminer toutes les traces d'éthanol ;
11. Resuspendre les échantillons d'ADN extraits dans 200 ml de l'eau bidistillée ;
12. conserver l'ADN à -20°C jusqu'à usage ultérieure.

➤ **Protocole (B) de Simone *et al.* (2014)**

1. Ajouter 1 ml de tampon d'extraction préchauffé (2% de CTAB, 2% de polyvinylpyrrolidone, 100 mM de Tris-HCL (pH 8,0), 25 mM d'EDTA, 2,0M NaCl, 10 mg de RNase, 10% de b-mercaptoéthanol) aux échantillons ;
2. incuber pendant 30 min dans un bain marie (65 °C), vortexer toutes les 5 min ;
3. Attendez que les échantillons atteignent la température ambiante et ajoutez 300 µl de NaCl saturé 6M ;
4. Centrifuger à 10 000 g à 4 ° C pendant 10 minutes ;
5. Transférer le surnageant dans un autre tube de 2 ml, ajouter 160 µl de NaCl 5 M et homogénéiser ;

6. Ajouter 600 μ l de CIA (chloroforme - alcool isoamylique 24: 1) et centrifuger à 10 000 g à 4 ° C pendant 10 min ;
7. Transférer la phase supérieure dans un autre tube de 2 ml. Ajouter 50 μ L de solution de CTAB (10%) avec une solution de 1,4M NaCl et vortexer ;
8. Ajouter 600 μ L de CIA, homogénéiser par inversion et centrifuger ;
9. Transférer la phase supérieure dans un nouveau tube, répétez l'étape 8 ;
10. Transférer la phase aqueuse supérieure obtenue dans un nouveau tube de 1,5 mL et ajouter de l'isopropanol froid (remplir le tube) ;
11. Incuber les tubes à - 20 C° pendant 12 h ;
12. Centrifuger à 10 000 g, à 4° C pendant 30 min ;
13. laver le culot obtenu deux fois avec 400 μ l d'éthanol à 70% et une fois avec de l'éthanol absolu ;
14. Sécher le culot d'ADN à l'aire pendant 15 min et remettre en suspension dans 40 μ l d'eau bidistillée.

b. Méthode SDS

Cette méthode à été adaptée à partir de Dellaporta *et al.*, (1983).

➤ **Protocole (C) de Meru *et al.* (2013)**

1. Dans un tube eppendorf, mélanger 100 mg d'échantillons avec 450 μ l de tampon de lyse (0.5% SDS, 1% PVP, 200mM Tris HCl pH=7.5, 250Mm NaCl, 25mM EDTA pH=8 et 0.2% β -mercaptoethanol) ;
2. Incuber au bain marie à 65°C pendant 30 minutes ;
3. Ajouter 135 μ l de NaOAc et puis centrifuger à 2465g pendant 10 minutes à température ambiante ;
4. Récupérer le surnageant ;
5. Ajouter un volume égale au surnageant d'isopropanol (\approx 100 μ l) ;
6. Laisser les tubes à température ambiante pendant 10 minutes puis centrifuger à 2465g pendant 10 minutes à température ambiante ;
7. Jeter le surnageant et ajouter 100 μ l d'éthanol 70% au culot d'ADN ;

8. Centrifuger à 2465g pendant 10 minutes à température ambiante;
9. Jeter l'éthanol ;
10. sécher le culot d'ADN à l'air, puis ajouter 30ul d'eau bidistillée.

3.2.2.4. Détermination de la concentration de l'ADN et contrôle de leur qualité

a. Détermination de la concentration de l'ADN

Les acides nucléiques ont un spectre d'absorption maximum en U.V à 260 nm. Cette absorption est proportionnelle à la concentration de l'ADN ou de l'ARN.

La concentration de l'ADN extrait a été estimée par spectrophotométrie à 260 nm sachant que: 1 unité de $DO_{260\text{ nm}} = 50\text{ }\mu\text{g/ml}$ d'ADN.

On mesure donc à 260 nm la DO d'une dilution au 1 /250ième de la solution mère (Brodeur et Toussaint, 2015). On déduit la concentration de l'ADN grâce au calcul suivant :

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

b. Contrôle de la pureté de l'ADN extrait

L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un « ratio ». Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio A_{260}/A_{280} est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ $1,8 < R < 2$, s'il est inférieur à 1,8, l'ADN est contaminé par les protéines et s'il est supérieur à 2, l'ADN est contaminé par les ARN (Denis *et al.*, 2018).

L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio A_{260}/A_{230} supérieure à 2 indique une contamination des sucres, du phénol ou des sels (Denis *et al.*, 2018).

c. Vérification de l'intégrité de l'ADN en présence de BET

La présence et l'intégrité de l'ADN obtenu ont été déterminées par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% coloré au bromure d'éthidium dans un tampon TAE 1 X (annexe 3). Pour chaque échantillon de 6 ul est complétés par 4ul de tampon de charge (annexe 2).

Des quantités égales d'ADN (10 μ L) ont été appliquées dans les puits de gel afin d'observer l'intégrité des échantillons d'ADN. Le gel est alors pris en photo avec un appareil photo numérique. Les bandes d'ADN ont été visualisées sous la lumière U.V.

Chapitre 4

Résultats et discussion

Dans cette étude, nous avons testé des différents protocoles pour identifier une méthode efficace, plus rapide et moins onéreuse.

Trois méthodes différentes d'isolement de l'ADN ont été utilisées pour isoler l'ADN génomique à partir des feuilles déshydratées. Les spectres d'absorption, la concentration en ADN, l'apparence sur gel d'agarose ont été utilisés pour analyser la qualité, la quantité et l'intégrité de l'ADN extrait.

4.1. Echantillons utilisés

Le tableau ci-dessous résume les résultats d'extraction d'ADN à partir des feuilles préparés par des différentes méthodes.

Tableau 3. Moyenne des concentrations et des rendements des échantillons utilisés.

	Moyenne de concentration en ug/ml	Moyenne de rendement en µg d'ADN/g de feuille sèche	Intégrité de l'ADN Extrait
Jeunes feuilles séchées à l'étuve pendant 5jours, broyées sans azote liquide et conservés a -20C° : D*, A* et B* (conservation pendant 5 mois)	1023.6	202.1	ADN non dégradé (fig. 1 et 2)
Jeunes feuilles broyées avec azote liquide après séchage à l'étuve pendant 5jours, et conservés a -20C° pendant 5 mois : E*	262.5	26	Aucune bande mentionné dans les protocoles A et B (Fig.2), et une bande de faible signal et elle s'a l'air un peu dégradé (smear) dans le protocole C (Fig. 3)

Jeunes feuilles séchées à l'étuve pendant 5 jours, broyées sans azote liquide et conservés à température ambiante : A, B (conservation pendant 5 mois)	156.875	94.125	ADN non dégradé (fig. 1 et 2)
Jeunes feuilles séchées à l'étuve (pendant 4 jours), broyées sans azote liquide et conservés à température ambiante : G, F, I (conservation pendant 15 jours).	1306.94	317.5	ADN non dégradé dans protocole A (fig.1) ADN dégradé selon le protocole C (fig.2)

Les résultats obtenus d'après le tableau précédent et la migration sur gel d'agarose, nous permet de mentionné que ;

Le séchage à l'étuve est une méthode efficace pour obtenir un ADN intègre mais il faut être pendant 5 jours à température entre 27 à 30 °C (échantillons A, B). Au contraire l'ADN extrait des feuilles séchées pendant 4 jours (G, F, I), il est dégradé à cause de séchage incomplète. Le broyage des échantillons sans azote liquide donne des résultats satisfaisants d'un ADN intact, ce qui est confirme que l'absence d'azote liquide n'affecte pas sur l'intégrité d'ADN extrait.

La conservation des échantillons (A, B) à température ambiante pendant longue durée (presque 5 mois) a un résultat satisfaisant avec une concentration moyenne de 156.875 µg/ml et rendement moyen de 94.125 µg d'ADN/g de feuille sèche, de sorte qu'elle nous a donnée un bon ADN (ADN intègre). Alors les échantillons conservés à (-20 °C) pendant 5 mois et broyés sans azote liquide, donnent un bon rendement (202.1 µg d'ADN/g) et une concentration moyenne élevé (1023.6 µg/ml) d'ADN extrait. Par contre la faible concentration et rendement sont obtenus avec l'échantillon (E*) qui est broyé avec l'azote liquide et conservé à -20 °C pendant 5 mois où peut être il est soumis à une réhydratation qui conduit à la dégradation d'ADN. Concernant les jeunes feuilles qui sont séchées pendant 4 jours, broyées sans azote liquide et conservées à température ambiante pendant une période ne dépasse pas un mois, ces

échantillons donnent le meilleur rendement (317.5 µg d'ADN/g) et la forte concentration d'ADN extrait (1306.94 µg/ml), mais on remarque que l'ADN obtenu est dégradé selon le résultat du profil C (fig.3) et ceci s'explique par le séchage incomplet (pendant 4 jours) des feuilles qui va provoquer la dégradation d'ADN.

Donc, pour obtenir un ADN de meilleur rendement et de bonne qualité (intacte), on peut extraire l'ADN génomique à partir des jeunes feuilles déshydratés à l'étuve ventilée (27°C à 30°C) pendant 5 jours et on a pas besoin l'azote liquide pour broyer les échantillons, mais il faut les conserver dans un endroit sec et à température ambiante ou à -20°C.

4.2. Qualité et rendement d'ADN obtenu

4.2.1. Profils d'ADN obtenu

Les résultats obtenus par l'électrophorèse sur gel d'agarose pour le protocole (A) d'Alexander (2016) et le protocole (B) de Simone *et al.* (2014) sont mentionnés dans les profils (a) et (b) de la figure 1. Ces deux protocoles sont appliqués sur des jeunes feuilles de la vigne par l'utilisation de bromure de cetyltriméthyl ammonium (2% CTAB) et du chloroforme (CHL) avec des autres réactifs comme le PVP Polyvinylpyrrolidone et le b-mercaptoethanol et NaCl 6M qui sont utilisés par le protocole (B).

Le protocole (A) d'Alexander (2016) prend un temps de trois heures et 15 min pour extraire l'ADN à partir de 10 échantillons de 100mg, tandis que le protocole (B) de Simone *et al.* (2014) prend deux jours pour extraire l'ADN à partir de 7 échantillons de 100 mg.

Concernant le protocole (C) de Meru *et al.* (2013), il est réalisé sur des jeunes feuilles de la vigne par l'utilisation de sulfate de sodium dodécyle (SDS 0.5%) dont le tampon de lyse contient le PVP et le β mercaptoethanol. la figure 2 représente le profil d'ADN extrait par ce protocole.

Ce dernier protocole prend un temps de deux heures pour extraire l'ADN à partir de 10 échantillons de 100mg.

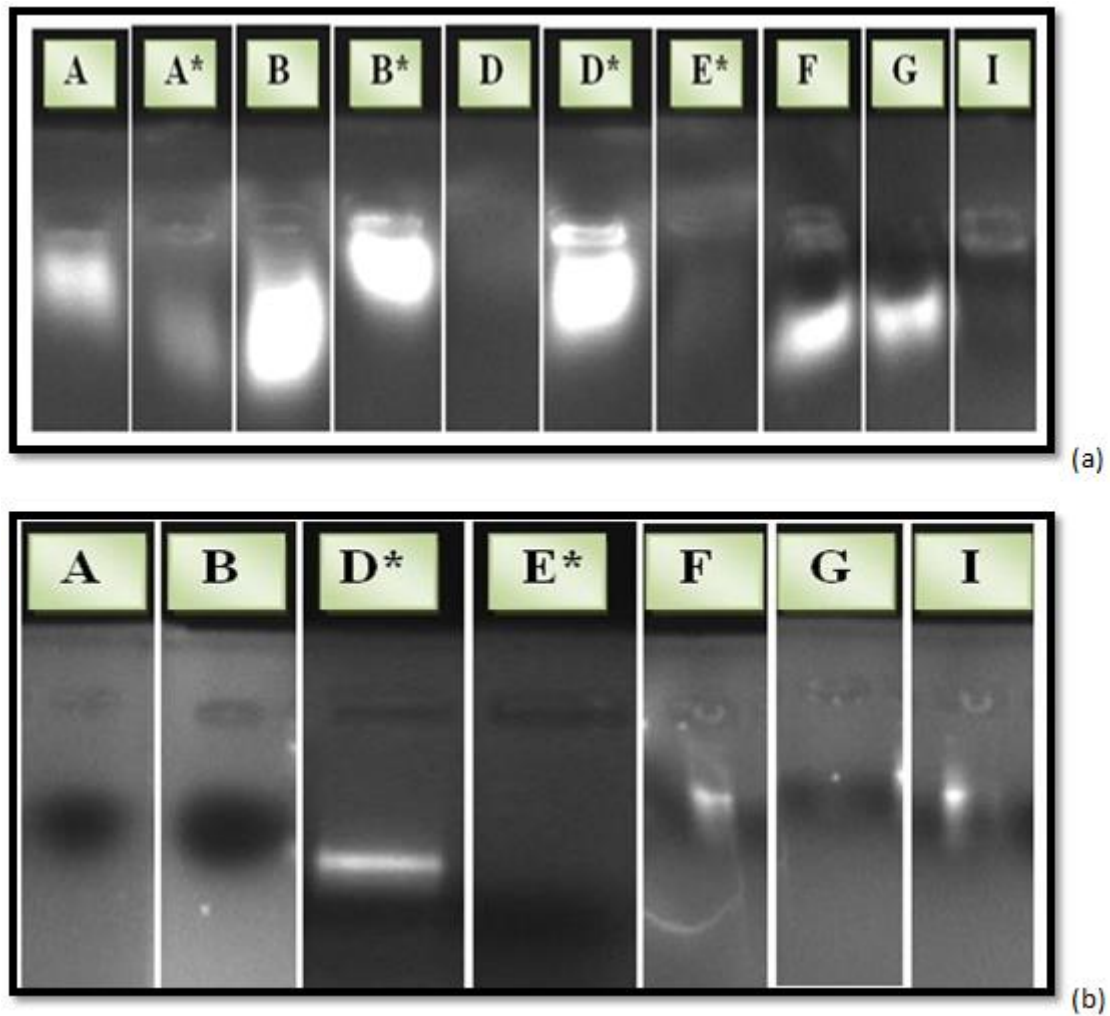


Figure 2. Profils électrophorétiques d'ADN génomique des jeunes feuilles de la vigne. Une électrophorèse sur gel d'agarose (1%) et coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V. L'ADN extrait par la méthode CTAB 2% selon le protocole A (profil a) et le protocole B (profil b).

Les puits A*, B*, D* et E* : représentent les échantillons conservés à -20°C.

Les puits A, B, D, F, G et I : représentent les échantillons conservés à température ambiante.

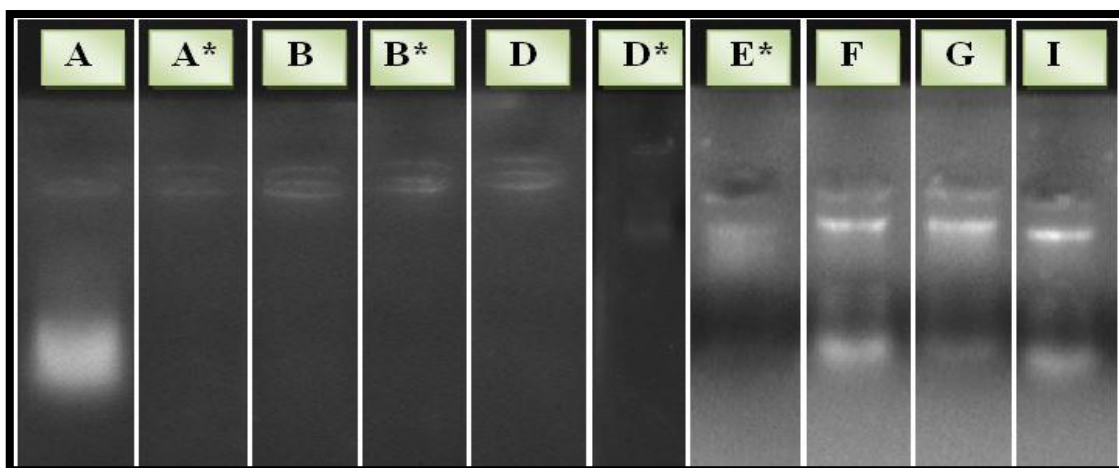


Figure 3. Profil électrophorétique d'ADN génomique des jeunes feuilles de la vigne. Une électrophorèse sur gel d'agarose (1%) et coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V. L'ADN extrait par la méthode SDS selon le protocole C.

Les puits A*, B*, D* et E* : représentent les échantillons conservés à -20°C.

Les puits A, B, D, I, F et G : représentent les échantillons conservés à température ambiante.

D'après le profil du protocole A (Fig. 2), on remarque la présence d'un signal de plus forte fluorescence avec les échantillons B, B* et D*, et une fluorescence moins intense pour les échantillons A, F, G et A*. En temps que les échantillons D, E* et I ne donne aucune bande d'ADN. Ces résultats nous indiquent que l'ADN extrait par la méthode A, a été de concentrations élevées (fort signale) et l'ADN semble être intact (il n'est pas dégradé).

Le protocole B donne une bonne fluorescence avec échantillon D*, une bande d'ADN incomplète avec les échantillons F et I ceci revient à une partie de l'ADN de ces échantillons sont éliminées par défaut de manipulation et c'est à cause à une erreur lors du chargement de ces puits qui semblent un peu fermés (mal collés) et on confirme ça par leurs concentrations significatives dans le tableau 5. Alors qu'on obtient des résultats négatifs pour les restes des échantillons.

D'après le profil du protocole C qui suivit la méthode SDS (Fig. 3), montre que les échantillons F, G et I donnent un ADN dégradé, l'échantillon E* présente un trace d'ADN. L'échantillon A c'est le seul qui donne un ADN intact avec une faible fluorescence. Les restes des échantillons ne donnent pas un ADN.

Ce dernier protocole semble être de faible concentration par rapport les méthodes d'extraction CTAB (les protocoles A et B).

Ces résultats nous indiquent que l'ADN a été bien extrait par le protocole A qui utilise un tampon de lyse CTAB. Le protocole A a été donné un ADN intact revient à l'utilisation d'EDTA qui permet de protéger l'ADN contre les nucléases (Charma, 2012). La forte fluorescence des bandes qui s'indique une concentration élevée d'ADN extrait c'est à grâce à la lyse complète pendant une heure à 60°C au contraire les protocoles B et C qui sont réalisés l'incubation des échantillons pendant 30 min seulement. Ainsi, la précipitation de l'ADN (les protocoles A et B) dans l'alcool à une basse température (-20°C) pendant une longue durée, une heure ou peut atteindre à une nuit, au lieu d'une précipitation à température ambiante pendant quelques minutes (protocole C), améliore nettement la formation rapide du culot d'ADN ce qui augmente la quantité d'ADN obtenu (Benbouza *et al.*, 2006).

La dégradation d'ADN extrait (des échantillons E*, F, G, et I) par le protocole C bien qu'il utilise l'EDTA, ceci s'explique par le séchage incomplète (4 jours) des échantillons (F, G, et I) qui peut induire la dégradation d'ADN, et concernant l'échantillon E* qui est conservé à -20°C où peut être soumis à une réhydratation et donc la dégradation d'ADN. La dégradation d'ADN peut être due aussi à un risque de contamination des tubes eppendorf utilisés pendant l'extraction ou l'endroit où nous avons travaillé, Il est à signaler que nous avons été confrontés aux mauvaises conditions de travail et c'est à cause à l'absence d'un laboratoire spécial pour les analyses de biologie moléculaire au niveau de notre département.

4.2.2. Pureté d'ADN extrait

La pureté de l'ADN est estimée par dosage au spectrophotomètre. Les mesures des DO à trois longueurs d'ondes ainsi que les ratios qui résultent sont résumés dans les tableaux sous dessous.

Tableau 4. Concentration d'ADN extrait du protocole A d'Alexander (2016) et le jugement de leur pureté à partir des ratios A260/A280, A260/A230.

Echantillon	Ratio 260/280	ratio 260/230	Jugement de la pureté d'ADN
D*	1,6	1,2	Il y'a une Faible contamination par les protéines. L'ADN est contaminé par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques.
G	1,4	1,0	
F	1,4	1,0	
B	1,3	0,6	
A	1,2	0,5	
B*	1,3	0,7	
A*	1,4	0,5	

Tableau 5. Concentration d'ADN extrait du protocole B de Simon *et al.* (2014) et le jugement de leur pureté à partir des ratios A260/280, A260/230.

Echantillon	ratio 260/280	ratio 260/230	Jugement de la pureté d'ADN
D*	1.1	0.9	Une forte contamination par les protéines et une contamination par les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques.
F	0.9	1.4	
I	1.1	1.8	

Tableau 6. Concentration d'ADN extrait de protocole C de Meru *et al.* (2013) et le jugement de leur pureté à partir des ratios A260/280, A260/230.

Echantillon	ratio 260/280	ratio 260/230	Jugement de la pureté d'ADN
F	1,3	0,7	Il y'a une contamination par les protéines et par les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques.
A	1,4	0,7	
E*	1.3	0.6	
I	1,4	0,7	
G	1,4	0,7	

Les rapports DO260/DO280 sont très variables, Les valeurs inférieurs à 1.8 témoignent d'une contamination par les protéines, et les valeurs qui dépassent 2 témoignent d'une contamination par les ARN (Varma *et al.*, 2007), en effet, le traitement à la RN-ase n'a pas été réalisé pour ces protocoles.

Les valeurs de ratio DO260/DO280 obtenues par les différents protocoles appliqués sont presque proches et elles varient entre 0.9 et 1,6. Le protocole A montre des valeurs variés entre 1.2 et 1.6 (tab. 4), les valeurs de protocole C sont entre 1.3 et 1.4, alors que le protocole B présente des ratios A260/ A280 variés de 0,9 à 1,1.

Ces résultats nous indiquent que l'ADN extrait par le protocole A, B et C est contaminé par les protéines, malgré que le protocole A et B ont été utilisés le mélange chloroforme : alcool isoamylique (CAI) (24 : 1) qui dénature les protéines et facilite la séparation des phases aqueuse et organique (Benbouza *et al.*, 2006). La forte contamination par les protéines (tab. 4 et 5), malgré on a fait une répétition de l'étape chloroforme : alcool isoamylique (24 : 1) 3 fois (protocole B), nous expliquons cette contamination par les protéines, par erreur de manipulation lors de la pipetage de non seulement la phase supérieure qui contient uniquement l'ADN mais même la phase intermédiaire. Si on interfère la phase intermédiaire, on prélève des protéines, si on s'éloigne trop de cette phase, on risque d'éliminer des quantités d'ADN.

Alors que le protocole C utilise le NaOAc (salting out) a la place de CAI pour éliminer les protéines, l'ADN que nous avons obtenu par méthode saline est de mauvaise qualité, il est fortement contaminé par les protéines (tab. 6).

Le rapport A260/ A230 reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillon pur, le ratio A260/A230 devrait être supérieure à 2 (Denis *et al.*, 2018).

L'ADN extrait par la méthode C présente des valeurs entre 0,6 à 0,7, le protocole A affiche des valeurs entre 0,5 à 1,2 tandis que le protocole B montre des bonnes valeurs par rapport aux autres protocoles de 0,9 à 1.8.

Les métabolites secondaires (polyphénols) et les polysaccharides sont libérés avec du matériel génétique en écrasant l'échantillon lors de broyage (Loomis, 1974). Bien que les protocoles B et C utilisent le B mercaptoethanol et le PVP qui sont réagis avec les composés polyphénoliques et éviter leurs interaction avec l'ADN (H.P. Charma, 2012). Mais les résultats obtenus s'indiquent une forte contamination par les polyphénols et/ou les polysaccharides, ceci s'expliquer par une oxydation rapide des métabolites secondaires (polyphénols), se lient

étroitement et irréversiblement à l'ADN, puis co-précipiter avec l'ADN (Olvera *et al.*, 2018). Donc de préférence de broyer rapidement les feuilles en présence du tampon de lyse.

Les méthodes ne présentent pas de différence significative pour la pureté de l'ADN.

4.2.3. Rendement d'ADN obtenu

Le rendement d'extraction correspond au rapport entre la quantité d'ADN extraite en ug et la quantité de la matrice initiale utilisée (Bienvenu *et al.*, 2018). Le rendement d'extraction moyen doit être calculé pour pouvoir comparer entre les différentes techniques d'extraction d'acides nucléiques.

Tableau 7. Concentration et rendement d'ADN obtenu par le protocole A.

	D*	G	F	B*	B	A	A*	MOYENNE
[ADN] en ug/ml	437,5	2140	1395	1037.5	865	340	1185	1057,1
Rendement d'ADN en µg d'ADN/g	437,5	1284,0	837,0	103.8	519,0	204,0	711,0	585,2

Les résultats obtenus d'après ce protocole, nous montrent que la concentration d'ADN extrait a été entre 340 et 2140 ug/ml d'ADN avec une concentration moyenne de 1057.1ug/ml.

Les résultats obtenus sur 7 échantillons consécutifs (jeunes feuilles) indiquent que cette méthode d'extraction permet l'obtention d'un rendement moyen de 585.2 µg d'ADN/g de feuille sèche.

Tableau 8. Concentration et rendement d'ADN obtenu par le protocole B.

	D*	F	I	Moyenne
[ADN] en ug/ml	162.5	500	137.5	266.7
Rendement d'ADN	162.5	300	82.5	181,7

La concentration d'ADN obtenu à partir ce protocole a été entre 137.5 et 500 ug/ml d'ADN avec une concentration moyenne de 266.7 ug/ml.

Les résultats obtenus sur 3 échantillons consécutifs (jeunes feuilles) indiquent que la méthode d'extraction permet l'obtention d'un rendement moyen 181.7 μg d'ADN/g de feuille sèche.

Tableau 9. Concentration et rendement d'ADN obtenu par le protocole C.

	G	F	I	A	E*	MOYENNE
[ADN] en ug/ml	215	335	40	50	130	154
Rendement d'ADN en μg d'ADN/g	129,0	201,0	24,0	30,0	78 ,0	92,4

Les résultats obtenus d'après le protocole C, nous montrent que la concentration d'ADN extrait a été entre 40 et 335 ug/ml d'ADN avec une concentration moyenne de 154 ug/ml.

Les résultats obtenus sur 5 échantillons consécutifs (jeunes feuilles) indiquent que la méthode d'extraction permet l'obtention d'un rendement moyen de 92.4 μg d'ADN/g de feuille sèche.

En résumé que, les méthodes ont été classées par le rendement d'ADN dans l'ordre suivant : méthode A, B et puis C. d'après le résultat, le protocole A est la meilleure méthode qui permet l'obtention d'un rendement moyen de 1057,1 μg d'ADN/g de feuille sèche avec une concentration moyenne de 585,2 ug/ml, par rapport aux autres protocoles appliqués et ça revient au CTAB qui est considéré comme un détergent fort par apport au SDS qui utilise dans le protocole C, et même le temps d'incubation au bain marée à 65 ° C pendant 1 h par apport les autres protocoles (B et C) pendant 30min, ce qui permet une lyse complète . Le protocole A a également été utilisé le NaCl 5M avec l'éthanol froid, ce qui augmente la précipitation de l'ADN et donc améliore le rendement obtenu (Charma H.P., 2012).

Le faible rendement obtenu par le protocole B qui utilise le NaCl (salting out) 2 fois (6M, 5M), avant l'ajout chloroforme : alcool isoamylique (24 : 1), le salting out n'interfère non seulement sur les protéines mais même sur la molécule ADN en neutralise leur charge et en absence d'alcool isoamylique, les phases ne sont pas bien séparés ce qui perdre une quantité d'ADN extrait dans la phase inferieure.

4. 3. Études des coûts

Le coût total de l'extraction a été estimé par un calcul des prix des produits utilisés. Les prix de tous les produits utilisés ont été obtenus par la recherche des prix auprès des fournisseurs. Le tableau suivant résume le coût de chaque produit utilisé dans l'extraction d'ADN d'un seul échantillon.

Tableau 10. Étude des coûts de l'extraction d'ADN par les trois méthodes utilisées.

Produits	Prit de produit en DA	Protocole A		Protocole B		Protocole C	
		Quantité utilisé	Coût en DA	Quantité utilisé	Coût en DA	Quantité utilisé	Coût en DA
CTAB 100g	8950,0 0	0.02g	179	0.025g	223,75	-	0
SDS 1kg	943.61	-	0	-	0	0.00225g	2,19
NaCl 1kg	1850,0 0	0.12g	22,2	0.27g	49,95	0.00657g	1,22
PVP 100g	22352. 18	-	0	-	0	0.0045g	21,33
TrisHCl 500g	28201. 66	0.015g	0.84	0.0015g	0.08	0.014g	0.78
EDTA 1kg	6916,0 0	0.0074g	5,12	0.0093g	6,43	0.00418g	2,89
CHL 2,5 L	5500.0 0	0.484ml	106.48	1.728ml	380.16	-	0
Acide isoamilique 2,5L	10100. 00	0.0205ml	8,28	0.072ml	29,09	-	0
Isopropanol 500ml	11800, 00	-	0	0.600ml	1416	0.500ml	1180
Ethanol 2,5 L	2800.0 0	0.600ml	176,96	0.68ml	76,16	0.28ml	31,36
B mercaptoethanol 1L	3400,0 0	-	0	0.1ml	34	0.0009ml	0,31

NaOAc 1kg	12624, 74	-	0	-	0	0.000033 g	0,04
Somme			498,88		2215,62		1240,12

A partir de ces résultats, les méthodes ont été classées selon le coût le moins chère de l'extraction d'ADN à partir d'un échantillon de 100mg dans l'ordre suivant : méthode A, C et puis le B.

La méthode CTAB menée par le protocole A d'Alexander (2016) donne un résultat acceptable par rapport aux autres méthodes, où ce protocole permettait d'extraire un ADN intacte avec une concentration moyenne de 1057.1 ug/ml et un rendement moyen de 585.2 µg d'ADN/g dans un temps de trois heures et 15 minutes, et avec un coût raisonnable d'un échantillon de 100mg est d'environ 498,88 **DA**. Ceci revient à dire que 1 g de feuille sèche coûte 4,9888 DA. Mais le protocole n'utilise pas le B mercaptoethanol et le PVP dans leur tampon de lyse, ce qui conduit à la contamination par les polyphénols ou les polysaccharides. Donc Il est souhaitable d'ajouter ces deux réactifs pour donner un ADN plus pur.

Conclusion

Conclusion

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage.

Notre travail est réalisé sous l'objectif de comparer les différents protocoles d'extraction d'ADN génomique à partir des feuilles de la vigne pour identifier une méthode capable d'extraire un ADN de bonne qualité et de bon rendement dans un temps court par des réactifs disponibles et peu coûteuse.

Trois protocoles ont été menés au cours de notre étude pour faire l'extraction d'ADN génomique. La méthode CTAB appliqué par Alexander (2016) a donné un résultat acceptable par rapport aux autres méthodes. Où l'ADN isolé à partir cette méthode, c'est un ADN intègre avec une concentration moyenne de 1057.1 ug/ml et d'un rendement moyen de 585.2 µg d'ADN/g de feuille sèche, à un coût d'extraction de 498.88 DA/ échantillon, l'extraction se déroule pendant trois heures et 15 minutes.

Les techniques d'extraction sont donc très complexes et demandent un ajustement précis. Il faut se poser la question de quelle exigence on veut avoir, une économie de temps, d'argent ou encore la plus reproductibilité dans les résultats.

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 le protocole appliqué ;

-Mesurer précisément la quantité et la qualité d'ADN extraits, en effectuer un dosage au Nanodrop ;

-Valider les résultats positifs obtenus via la PCR afin de confirmer la qualité d'ADN obtenu ;

Référence
Bibliographique

Bibliographie

-A-

Achour H. 2016. Analyse mutationnelle du gène suppresseur de tumeur p53 dans le cancer du sein : à propos de cas cliniques d'une population algérienne. Mémoire de magister, université Mohamed Khider, Biskra, 58 p.

Alexander L. 2016. Rapid, Effective DNA Isolation from *Osmanthus* via Modified Alkaline Lysis. *Journal of Biomolecular Techniques* 27:53-60.

Allen G. C., Flores-Vergara M. A., Krasynanski S., Kumar S. et Thompson W. F. 2006. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature protocols* 1(5): 2325-2320.

Allouani M. 2011. Contribution à l'étude des causes de la disparition du patrimoine Végétal local à travers la viticulture. Thèse de doctorat, université Abou-Bekr Belkaid, Algérie, 66 p.

-B-

Benbouza H., Baudoin J. P. et Mergeai G. 2006. Amélioration de la méthode d'extraction d'ADN au CTAB appliquée aux feuilles de cotonnier. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement* 10(2):73-76.

Bienvenu T., Meunier C., Bousquet S., Chiron S., Richard L., Gautheret-Dejean A., Rouselle J. F. et Feldmann D. 1999. Les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin. *Laboratoire de biochimie et génétique moléculaire, Hôpital Cochin* 57(1): 77-84.

Bisson J. 1999. French grapevines classed in phenotypical ecogeogroups essay. *OENO One* 33(3): 105-110.

Ben Larbi M., Naouaria G., Yahyaoui M. H. et Hadded B. 2014. Etude technico-économique de méthodes d'extraction de l'ADN chez le lapin Européen (*Oryctolagus cuniculus*) à partir du sang. *Journal of New Sciences* 5(1) : 5-6.

Brodeur J. and Toussaint M. 2015. *Biologie moléculaire : concepts, techniques, applications*, vol. 1, CTRE COLL. DEVEL. MATERIEL D., Canada. 360 p.

-C-

Carrier G. 2011. Bases moléculaires de la variation clonale chez la vigne (*Vitis vinifera* L.): approche pangénomique. Thèse de doctorat, Montpellier, SupAgro, 127p.

Chakour M., Koeck J. L., Maslin J., Nicand E., Chadli M., Nizou J. Y. et Buisson Y. 2003. Diagnostic biologique rapide en contexte épidémique: état des lieux, perspectives. *Médecine et maladies infectieuses* 33(8):396-412.

Charma H. P. 2012. Plant tissue culture : totipotency to transgenic. *Agrobiose Newsletter. Agriculture and biological sciences* 11(01) : 972-7027.

-D-

Dellaporta S. L., Wood J. and Hicks J. B. 1983. A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1 (4) : 19-21.

Denis T., Possamai S. J. et Méreau A. 2018. Principe des techniques de biologie moléculaire et génomique. 3ème édition, Quae, France. p. 47.

Doyle J. J. and Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin* 19(1):11-15.

-H-

Halliwell B. 1990. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun* 9: 1-32.

Hamon P., Seguin M., Perrier X. et Glaszmann J.C. 1999. Diversité génétique des plantes tropicales cultivées. 1^{ère} édition. 338 p.

-G-

Grisshammer R. et Buchanan S.K. 2006. *Structural Biology of Membrane Proteins*, Cambridge: RSC Publ. 1^{ère} édition. 580 p.

-L-

Lacombe T. 2012. Contribution à l'étude de l'histoire évolutive de la vigne cultivée (*Vitis vinifera* L.) par l'analyse de la diversité génétique neutre et de gènes d'intérêt. Thèse de doctorat, Montpellier, SupAgro, 94 p.

Lipp M., Brodmann P., Pietsch K., Pauwels J. and Anklam E. 1999. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International* 82: 923–928.

Loomis W.D. 1974. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol* 31: 528-544.

-M-

Mahboub S. 2017. Contribution a l'étude des maladies de quelques variétés de la vigne dans la région de Tlemcen .Thèse de doctorat, université de Tlemcen, Algérie ,91 p.

Marsal G., Boronat N., Canals J. M., Zamora F. et Fort F. 2013. Comparison of the efficiency of some of the most usual DNA extraction methods for woody plants in different tissues of *Vitis vinifera* L. *OENO One* 47(4): 227-237.

Merdinoglu M. D. 2008. Etude transcriptomique de la réponse de la Vigne (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) au champignon ascomycète vasculaire *Eutypa lata*, responsable de l'eutypiose .Thèse de doctorat, université de Bordeaux ,110 p.

Meru G., McDowell D., Waters V., Seibel A., Davis J. and McGregor C. 2013. A non-destructive genotyping system from a single seed for marker-assisted selection in watermelon. *Genetics and Molecular Research* 12 (1): 702-709.

Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321–4325.

-O-

Olvera S., Cortés-Cruz M., Contreras-Toledo A., Ortiz S., Avendaño-Arrazate C., Olivera A. et Grajales M. 2018. Comparison of four DNA extraction methods in *Heliconia* (*Heliconia* L.) 17(45): 1331-1338.

-R-

Ramos S. N.M., Salazar M. M., Pereira A.G. et Efraim P. 2014. Plant and metagenomic DNA extraction of mucilaginous seeds. *Méthodes* 1 : 225–228.

Rowley A. et Ribaut J. C. 2003. *Le vin: une histoire de goût*. Gallimard.

-S-

Sefc K. M., Lefort F., Grando M. S., Scott K. D., Steinkellner H. and Thomas M. R. 2001. Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. In molecular biology and biotechnology of the grapevine 1(6):433-463.

Simon J. L., Eggenberger W., Kobelt, W., Mischler, M. et Schwarzenbach, J. 1992. Viticulture. 3^{ème} Ed. Payot, Paris. 223 p.

-T-

Tan S. C. and Yiap B. C. 2009. "DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present", Journal of Biomedicine and Biotechnology 2009: 7-10.

This P., Lacombe T. and Thomas M. R. 2006. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. TRENDS in Genetics 22(9):511-519.

-V-

Varma A., Padh H. et Shrivastava N. 2007. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology 2(3):386-392.

-W-

Wagner D.B., Furnier G.R., Saghay-Marroof M.A., Williams S.M., Dancik B.P. and Allard R.W. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. Proceedings of the National Academy of Science USA 84: 2097–2100.

Site web

TPE Police Scientifique ; <http://tpepolicescientifique63.e-monsite.com/pages/l-extraction-de-l-adn.html>.

Lab protocols ; <http://mcblabprotocols.com/protocols/preparation-50x-tae>
electrophoresis-buffer, consulté le 31/03/2017.

Annexes

Annexes

Annexe 1. Matériels et réactifs utilisés lors d'extraction.

Tableau 1. Réactifs utilisés lors de l'extraction.

Les réactifs	Fournisseur, pays de fabrication
CTAB (C ₁₆ H ₃₃)N(CH ₃) ₃]Br	Sigma-Aldrich, USA
SDS C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	Sigma-Aldrich, Danemark
NaCl	Sigma-Aldrich, USA
EDTA disodique C ₁₀ H ₁₈ N ₂ Na ₂ O ₁₀	Biochem Chemopharma, Georgia-USA
B mercaptoethanol C ₂ H ₆ OS	Merck Schuchardt OHG
PVP (C ₆ H ₉ NO) _n	Biochem Chemopharma, Georgia - USA
Chloroforme CHCl ₃	Sigma-Aldrich, France
Alcool isoamilique C ₅ H ₁₂ O	Sigma-Aldrich, Germany
Tris HCl	Sigma-Aldrich, USA
Isopropanol C ₃ H ₈ O	Sigma-Aldrich,
Acétate de sodium Na OAc	Sigma-Aldrich
Agarose	Sigma-Aldrich, USA
Tris base	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol C ₂ H ₅ OH	Honeywell, Brazil

Le matériel utilisé au cours de l'extraction :

- Tubes eppendorfs de 1.5 ml et de 2 ml.
- Micropipettes + les embouts.
- Centrifugeuse (Hettich zentrifugen).
- Vortex.
- Bain marie (Memmert).
- Spectrophotomètre (UV-2005 J.P. SELECTA)
- La hotte chimique (Exosafe)
- Etuve ventilé (Memmert).
- congélateur -20°C (Haier).
- générateur de l'électrophorèse (Consert EV 265).
- table U.V. (VILBER LOURMAT).
- caméra (VILBER LOURMAT).

Annexe 2 : préparation de bleu de chargement (Achour, 2016)

Le bleu de chargement été préparée a base des réactifs suivants ;

- 3 μ l H₂O.
- 2,4 μ g bleu de bromophénol.
- 3 μ l glycérol.

Annexe 3. Préparation de TAE 1X (Tris base - acide acétique glaciale - EDTA)

- 10ml TAE 50X;
- 490ml H₂O.

Résumés

ملخص

في دراستنا ، طبقنا ثلاث بروتوكولات لاستخراج الحمض النووي الجينومي من الأوراق الفتية لبعض الأصناف من العنب ، التي تم جمعها من مناطق مختلفة من ولاية بسكرة . لتحديد طريقة قادرة على إعطاء حمض نووي سليم بكمية جيدة في أسرع وقت وبأقل تكلفة.

تم التحقق من جودة وكمية الحمض النووي المستخرج من خلال طيف الأشعة فوق البنفسجية والرحلان الكهربائي على جال الاغاروز.

تخبرنا هذه التجربة أن البروتوكول A (طريقة CTAB) يعطي نتيجة مقبولة مقارنة بالبروتوكولات الأخرى. حيث يصل متوسط تركيز الحمض النووي الجيني المستخرج إلى 1057.1 ميكروغرام / مل ويبلغ متوسط المردود 585.2ميكروغرام من الحمض النووي / غرام في وقت يقدر ب ثلاثة ساعات و 15 دقيقة بتكلفة معقولة بشكل خاص تصل إلى 498.88 AD

الكلمات المفتاحية : أوراق العنب، الحمض النووي , CTAB

Résumé

Dans notre étude, nous avons appliquées trois protocoles d'extraction d'ADN génomique à partir des jeunes feuilles de différentes variétés de la vigne cultivé, récoltés de différentes régions de la wilaya de Biskra. Pour identifier une méthode capable à donné un ADN intègre et de bon rendement, plus rapide et moins onéreuse et moins chère.

La qualité et la quantité d'ADN extrait à été vérifié par spectrophotomètre à U.V et par migration sur gel d'agarose.

Cette expérience nous indique que le protocole A (méthode CTAB) donne un résultat acceptable par rapport aux autres protocoles, où la concentration moyenne d'ADN génomique extrait atteint à 1057.1 ug/ml et un rendement moyenne de 585.2 µg d'ADN/g dans un temps de trois heures et 15 minutes avec un coût particulièrement raisonnables arrivent à 498,88 DA.

Mots clés : feuille de vigne cultivée, Extraction d'ADN, CTAB.

Abstract

In our study, we applied three protocols of genomic DNA extraction from young leaves of different cultivated grape varieties, harvested from different regions of the Biskra wilaya. To identify a method capable of giving a DNA integrity and good performance, faster and less expensive and cheaper.

The quality and quantity of extracted DNA was verified by UV spectrophotometer and agarose gel migration. This experiment tells us that protocol A gives an acceptable result compared to other protocols, where the average concentration of extracted genomic DNA reaches 1057.1 µg / ml and an average yield of 585.2 µg DNA / g in a time of three hours and 15 minutes with a particularly reasonable cost comes to 498.88 DA.

Key words : leaves cultivated grape, Extraction DNA, CTAB.