



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 :  
Hanane HACHANI et Haifa LAROUÏ

Le : mercredi 7 octobre 2020

## Thème

### Extraction et purification d'ADN génomique des feuilles de la vigne suivie par la technique PCR

---

#### Jury :

M.	Nasser BELLOUCIF	MAA	Université de Biskra	Président
Mlle.	Hanane ACHOUR	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	Aicha MEDJADBA	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2019/ 2020

# Remerciements

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à Allah le tout puissant de nous avoir donné la santé, la patience et l'audace pour dépasser toutes les difficultés pour achever ce travail.

En premier lieu, ce travail ne sera pas aussi riche et n'aura pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mme. ACHOUR Hanane, pour la qualité de son encadrement exceptionnel, sa patience, ses conseils avisés et sa disponibilité durant notre préparation de ce travail, elle mérite tous nos remerciements.

Et bien évidemment, nous exprimons nos remerciements aux membres du jury d'avoir accepté l'évaluation de notre travail.

Nous tenons à remercier tous les ingénieurs du laboratoire d'El-Hadjeb pour leur assistance et leur efficacité en toutes circonstances.

Un grand merci au chercheur Mme. DJANET pour son soutien, son humanité et son aide précieux sur certaines analyses qui sans lui n'auraient pas pu se faire, sans oublier tous le groupe des chercheurs du Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides-Biskra.

Enfin, nos remerciements s'adressent à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# Dédicaces

Nous dédions notre travail

## **A nos très chers parents**

Aucune dédicace n'aurait pas être assez éloquente pour exprimer la profondeur  
Des sentiments d'affections, d'estime et de respect que nous vous portons pour  
votre amour et votre soutien sans oublier pour vos sacrifices et vos prières tout  
au long de nos études.

## **A nos chers sœurs et frères**

Pour leur soutien et ses encouragements.

## **A tous nos amies chacun par son nom**

AIDOUDI Aicha Nesrine, BOUDRES Samah, BRINIS Ghania, DRIHEM  
Youssra

Qui font partie de ces personnes rares par leur gentillesse et leur tendresse  
Nous les remercions pour leur inlassable soutien et pour tous les merveilleux  
moments que nous avons passés ensemble dans un environnement familial.

## **A tous nos amis et nos collègues**

**A toute notre promotion 2019-2020 sans exception.**

Haifa et Hanane.

# Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Sommaire

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

## Première Partie : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### Chapitre 1. GENERALITE SUR LA VIGNE

1.1. Historique de la viticulture en Algérie .....	3
1.2. Position systématique de la vigne .....	3
1.3. Description botanique de la vigne .....	4

### Chapitre 2. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE

2.1. Génome de la vigne .....	6
2.2. Lyophilisation comme une étape préparatrice avant l'extraction .....	6
2.3. Extraction de l'ADN génomique .....	7
2.3.1. Principe.....	7
2.3.2. Extraction d'ADN génomique à la méthode CTAB .....	7
2.3.3. Diversité des méthodes de purification d'ADN génomique.....	7
2.3.3.1. Purification liquide-liquide .....	8
2.3.3.2. Purification liquide-solide .....	8
2.4. Techniques d'analyse d'ADN .....	8
2.4.1. Électrophorèse sur gel d'agarose.....	9
2.4.2. Dosage par le spectrophotomètre.....	9
2.4.3. PCR conventionnelle.....	10
2.4.3.1. Principe .....	10
2.4.3.2. Milieu réactionnel de la PCR.....	10
2.4.3.3. Etapes de la PCR .....	10

2.4.3.4. Inhibiteurs de la PCR .....	11
--------------------------------------	----

## **Deuxième partie : PARTIE EXPERIMENTALE**

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

<b>3.1. Stratégie de travail.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2. Présentation de la région d'étude.....</b>	<b>13</b>
3.2.1. Situation géographique.....	13
3.2.2. Climat de la région d'El-Kantara.....	14
3.3. Matériel et produits nécessaires.....	14
3.3.1. Préparation des solutions utilisées .....	14
3.3.2. Elimination des déchets.....	15
<b>3.4. Matériel biologique .....</b>	<b>15</b>
3.4.1. Collecte des feuilles .....	15
3.4.2. Séchage des feuilles .....	17
3.4.2.1. Séchage des feuilles à l'étuve ventilée .....	17
3.4.2.2. Séchage des feuilles par lyophilisation selon Kang et Yang (2004) et Nunes <i>et al.</i> (2011).....	18
3.4.3. Broyage des feuilles .....	20
<b>3.5. Méthode de travail.....</b>	<b>22</b>
3.5.1. Extraction d'ADN génomique.....	22
3.5.2. Paramètres optimisés.....	23
3.5.2.1. Protocole 1 (P1) .....	25
3.5.2.2. Protocole 2 (P2) .....	26
3.5.2.3. Protocole 3 (P3) .....	26
3.5.3. Evaluation de la qualité et la quantité d'ADN extrait .....	29
3.5.3.1. Vérification de l'intégrité d'ADN .....	29
3.5.3.2. Détermination du rendement d'extraction et la concentration d'ADN extrait ...	30
a. Rendement de l'extraction .....	30
b. Concentration de l'ADN extrait.....	30
c. Détermination de la pureté d'ADN extrait.....	31
3.5.4. Amplification in vitro de l'ADN extrait par PCR.....	31
3.5.4.1. Préparation du mix PCR .....	32
3.5.4.2. Déroulement de la PCR .....	32
3.5.4.3. Vérification du résultat de la PCR .....	33

### **Chapitre 4. RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>4.1. Résultats.....</b>	<b>35</b>
4.1.1. Protocole (P1) .....	36
4.1.1.1. Résultats de migration électrophorétique .....	38
4.1.2. Protocole (P2) .....	39

4.1.2.1. Résultats de migration électrophorétique .....	40
4.2. Discussion analytique .....	41
4.2.1. Préparation des échantillons pour l'analyse .....	41
4.2.1.1. Broyage des échantillons .....	41
4.2.1.2. Choix des feuilles par rapport aux autres tissus .....	42
4.2.1.3. Conservation des échantillons avant l'analyse.....	42
4.2.2. Optimisation des techniques d'analyse .....	43
4.2.2.1. Technique de référence.....	43
a. Inconvénients.....	46
4.2.2.2. Protocole amélioré P1 .....	46
4.2.2.3. Protocole amélioré P2.....	48
4.2.2.4. Protocole amélioré P3.....	49
4.2.3. Mode d'évaluation des protocoles d'extraction.....	50
4.2.3.1. Rendement et pureté d'ADN extrait.....	51
4.2.3.2. Durée de l'extraction et la facilité de mise en œuvre .....	53
4.2.3.3. Estimation des coûts .....	54
4.2.4. Difficulté d'application de la recherche scientifique dans le locale universitaire ....	56
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>58</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>60</b>

## Annexes

## Résumés

# Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Exemple des inhibiteurs de la PCR reportés dans la littérature (Demeke et Jenkins, 2010 ; Opel <i>et al.</i> , 2010). .....	11
<b>Tableau 2.</b> Réactifs utilisés pour l'extraction d'ADNg. ....	14
<b>Tableau 3.</b> Caractéristiques des différentes variétés de la vigne utilisées au cours de cette étude.....	21
<b>Tableau 4.</b> Paramètres testés pour améliorer le protocole de l'extraction de l'ADN génomique de Piccolo <i>et al.</i> (2012). ....	23
<b>Tableau 5.</b> Ratio, valeur et l'indication de pureté d'un échantillon d'ADN extrait. ....	31
<b>Tableau 6.</b> Locus, séquence d'amorce, température d'hybridation et la longueur du fragment obtenu. ....	32
<b>Tableau 7.</b> Programme d'amplification de la réaction en chaîne par polymérase selon Bowers <i>et al.</i> (1996). ....	33
<b>Tableau 8.</b> Comparaison des résultats obtenus par les différentes études qui appliquent la purification liquide-solide. ....	53
<b>Tableau 9.</b> Evaluation des protocoles en termes de durée. ....	54
<b>Tableau 10.</b> Calcul des coûts (consommables et réactifs) de l'extraction d'ADN par échantillon par le protocole développé P3 en comparaison avec le coût d'un protocole de référence.....	55

# Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> Classification de la vigne (Reynier, 2011). .....	4
<b>Figure 2.</b> Feuille de la vigne (photo originale). .....	5
<b>Figure 3.</b> Illustration schématique des différentes étapes de notre travail. ....	13
<b>Figure 4.</b> Carte de situation géographique de la zone d'étude (voire l'annexe 2). ....	13
<b>Figure 5.</b> Emplacement des sites d'échantillonnage sur la commune d'El-Kantara (Site web 1). .....	16
<b>Figure 6.</b> Récolte et préparation des feuilles (photos originaux). ....	17
<b>Figure 7.</b> Séchage des feuilles à l'étuve ventilée (photo originale). ....	18
<b>Figure 8.</b> Congélation des feuilles (photos originaux). .....	18
<b>Figure 9.</b> Séchage des feuilles fraîches à lyophilisateur (photos originaux). .....	19
<b>Figure 10.</b> Conservation des feuilles avec gel de silice (photo originale). ....	19
<b>Figure 11.</b> Activation de gel de silice (photos originaux). .....	20
<b>Figure 12.</b> Broyage et conservation des feuilles (photos originaux). ....	21
<b>Figure 13.</b> Colonne mini spin DNeasy (Qiagen) utilisée (photo originale). .....	27
<b>Figure 14.</b> Illustration schématique des différentes étapes de P3. ....	29
<b>Figure 15.</b> Visualisation de l'ADN obtenu (photos originaux). .....	30
<b>Figure 16.</b> Exemple des produits de la PCR vérifiés sur un gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium. ....	34
<b>Figure 17.</b> Aspect de l'échantillon après l'ajout du tampon de lyse (photo originale). .....	36
<b>Figure 18.</b> Différentes teintes du surnageant obtenues au cours de l'extraction (photo originale). .....	36
<b>Figure 19.</b> Différentes phases obtenues après lavage au chloroforme/alcool isoamylique (24:1) (photo originale). .....	37
<b>Figure 20.</b> Pelote d'ADN obtenu (photo originale). .....	37
<b>Figure 21.</b> Profils électrophorétiques d'ADN génomique extrait des feuilles de la vigne, après l'application du protocole (P1). .....	39
<b>Figure 22.</b> Lavage des échantillons au tampon à base de sorbitol. ....	40
<b>Figure 23.</b> Profil électrophorétique d'ADN génomique des feuilles de la vigne obtenu après l'application du protocole (P2). .....	40
<b>Figure 24.</b> Conservation des feuilles broyées en présence de gel de silice (photo originale). ..	42



## Liste des abréviations

- **ADNg** : Acide désoxyribonucléique génomique.
- **ARN** : Acide ribonucléique.
- **Al** : Collaborateur.
- **BET** : Bromure d'éthidium.
- **β-ME** : β-Mercaptoethanol.
- **CTAB** : Cetyl trimethylammonium bromide.
- **DA** : Dinar algérien.
- **DNTPs** : Désoxyribonucléoside triphosphate.
- **DO** : Densité optique.
- **E** : Est.
- **Ech** : Echantillon.
- **GuHCl** : Chlorhydrate de guanidine
- **J.C** : Jésus Christ.
- **LiCl** : Chlorure de lithium.
- **mBar** : Millibar.
- **Mpb** : Méga paires de base.
- **N** : Nord.
- **Na<sub>2</sub>EDTA** : Acide éthylène-diamine-tétra-acétique disodique.
- **P°** : Pression.
- **PCR** : Réaction de polymérisation en chaîne.
- **PK** : Protéinase K.
- **PVP** : Polyvinyl pyrrolidone.
- **SSRs** : Séquences simple répétées.
- **T°** : Température.
- **TAE** : Tris-base / Acide acétique glacial / EDTA.
- **TE** : Tris-EDTA.
- **U.V** : Ultra-violets.

# **Introduction**

# Introduction

L'histoire de la Vigne accompagne depuis longtemps celle de l'Homme. De nombreuses découvertes archéologiques, des pépins et des feuilles fossiles, suggèrent que les premières traces de primo-domestication de la vigne a eu lieu au Transcaucasie, datent entre 5 à 7 millénaire avant J.C (Cantu *et al.*, 2019), et grâce à la migration des hommes qui ont découvert l'intérêt alimentaire de cette plante, la viticulture se propage à des régions tempérées de la planète allant escadrille des désertiques chauds et secs, aux climats tropicaux, aux zones très froides, devenant la troisième culture horticole la plus précieuse au monde (Françoise *et al.*, 2011), à partir de la Géorgie vers toutes les pays du bassin méditerranéen qui sont les principaux producteurs mondiaux de raisins, et jusqu'aux zones côtières de l'Australie méridionale, de l'Afrique du Sud, de la Californie et du Chili (Françoise *et al.*, 2011).

La viticulture traditionnelle était basée sur des milliers de cultivars distincts présentant un large éventail d'adaptations, d'habitudes de croissance et de caractéristiques des fruits. Actuellement, plus de 6000 cultivars sont documentés. Néanmoins, les noms de ces cultivars sont souvent ambigus en raison de la translittération (Aradhya *et al.*, 2003), de la substitution de noms locaux ou régionaux aux noms de cultivars originaux (Lacombe, 2012), de la présence de variantes au sein des cultivars (clones) et de la faible documentation des données des informations sur les variétés de la vigne. De plus, la large distribution et la longue histoire de viticulture ont conduit au développement de nombreux cultivars qui sont mal connus ou identifiés (Aradhya *et al.*, 2003).

Grâce à l'importance économique de la vigne et son grande diversité naturelle, ont fait de *Vitis vinifera* L. un candidat précoce évident pour les études scientifiques qui s'intéressent sur la description des variétés de la vigne et l'étude de leur évolution (Reynier, 2011). Les méthodes ampélographiques traditionnelles fondées uniquement sur la morphologie et la morphométrie, sont cependant considérées comme dépassées par certains auteurs (Santiago *et al.*, 2005). Malheureusement, les critères morphologiques ne permettent pas toujours une identification sans équivoque de cultivars (Manen *et al.*, 2003).

Il y a de nombreuses techniques de caractérisation qui reposent sur des caractères internes révélés par des marqueurs moléculaires basées sur la réaction en chaîne de la polymérase (PCR). En particulier, il a été démontré que les microsatellites étaient très utiles pour la vigne et considéré comme un outil efficace et puissant pour l'identification génétique

des cépages (Liadi *et al.*, 2018). L'identification génétique des différentes variétés de la vigne requiert un ADN génomique à haute qualité et de bonne quantité. Dans cette étude, nous allons essayer de faire l'extraction et la purification d'ADN génomique, à partir des feuilles déshydratées et conservées pendant une longue durée de temps, sans l'utilisation d'azote liquide, et nous allons optimiser une méthode d'extraction d'ADN génomique afin d'obtenir un protocole efficace, peu coûteux, réalisable au niveau notre laboratoire, et permet d'obtenir une quantité suffisante et de pureté satisfaisante pour permettre toutes les manipulations postérieures de la biologie moléculaire.

Pour achever ces objectifs, il faut d'abord répondre aux problématiques suivantes :

- 1- Comment faire préparer les feuilles de la vigne pour obtenir un ADN génomique intact à la fin des étapes de l'extraction ?
- 2- Quelles sont les étapes et les paramètres à modifier afin d'obtenir un ADN génomique hautement pur et de bonne quantité ?
- 3- Quelle est le meilleur protocole à appliquer qui répond aux exigences de la PCR ?

Pour parvenir de répondre à ces problématiques, notre travail s'articule autour deux parties :

Une partie de synthèse bibliographique subdivisée en deux chapitres, le premier va consacrer à l'histoire de viticulture en Algérie, la position systématique de la vigne dans le monde des vitacées, et une description botanique sur cette plante. Le deuxième va traiter le génome de la vigne, la lyophilisation, la diversité des méthodes de purification d'ADN génomique et finalement les techniques d'analyse d'ADN.

Une deuxième partie est une étude expérimentale, contenant deux chapitres, un chapitre « Matériel et méthodes » va concerner la description des méthodes de traitement des feuilles et des matériaux utilisés au cours de ce travail, la préparation des différents réactifs nécessaires, les protocoles à appliquer, les méthodes choisies pour vérifier la qualité et la quantité d'ADN obtenu et enfin la technique moléculaire : PCR. De plus, un autre chapitre « Résultats et discussion » qui va présenter les résultats obtenus, ainsi que une discussion analytique concernant la préparation des échantillons et l'optimisation des techniques d'analyse.

# **Première Partie**

## **Synthèse Bibliographique**

**- Chapitre 1 -**  
**Généralité sur la vigne**

### **1.1. Historique de la viticulture en Algérie**

La culture de la vigne est bien enracinée dans les traditions des populations paysannes Maghrébines en générale et Algérienne en particulier (Hamama *et al.*, 2014), où elle a connu deux grandes époques, la première remonte à l'antiquité carthaginoise, en plus des paysages ruraux, des vignobles a été créés par les phéniciens grâce au conditions agro-climatiques idéales (Tayeb, 1990).

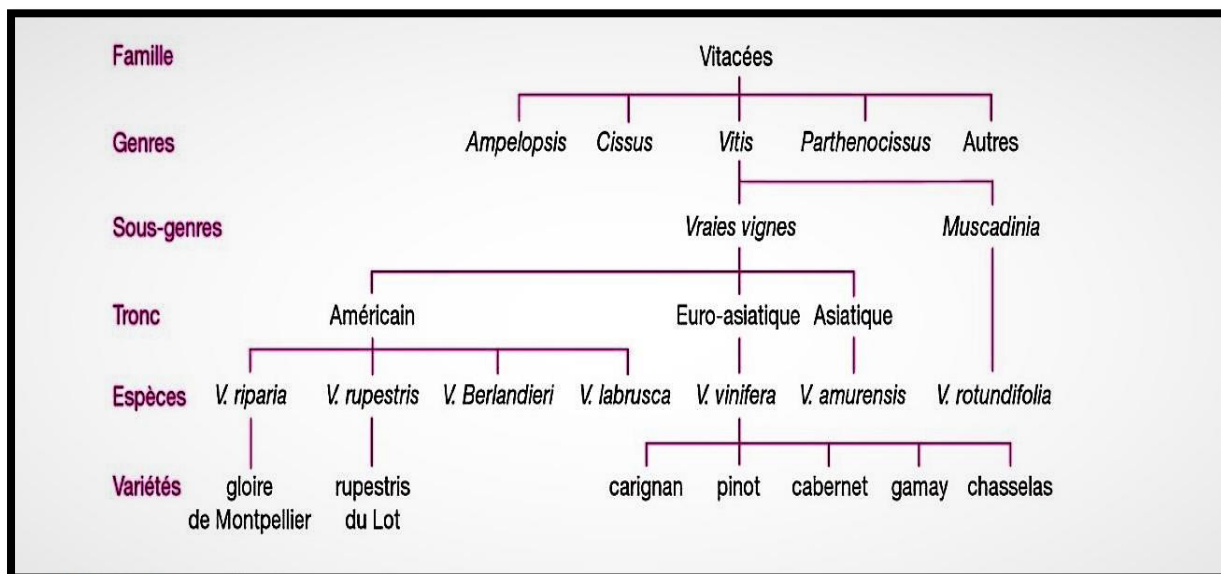
La deuxième, plus longue et plus marquante est celle de la colonisation française (Caïd *et al.*, 2019). D'ailleurs, durant toute cette période, l'introduction de la vigne n'eut jamais l'aspect d'une révolution agricole (Barrère, 1957). Dès aux années de 1863 vers la fin des années 1880, le puceron ravageur le phylloxéra a entraîné des pertes dévastatrices des vignobles européens et notamment français (Neethling, 2016), l'Algérie alors considérée comme une "terre promise" et fortement devenue un producteur de la vitivinicole nécessaire pour la France (Scotti, 1987).

D'après Isnard H., la vigne est la principale richesse de l'Algérie (Larnaude, 1948), où la viticulture a puissamment joué le rôle d'une activité motrice, c'est en fonction de son développement et pour le faciliter que s'est constituée l'infrastructure économique de l'Algérie coloniale, le réseau de communications est complété par l'ouverture des routes, la construction des chemins de fer, l'équipement des ports, les banques multiplient leurs guichets; le crédit et la coopération agricole se développent, et des industries s'installent pour être sous service de cette culture (Brun, 1968). Malgré ce développement, le nouvel état algérien à l'indépendance a été légué une économie déséquilibrée basée sur une monoculture viticole qui ne correspond à aucun besoin, et grâce à son indépendance économique et politique vis-à-vis de la France (Larnaude, 1948), elle remplacerait donc un vignoble de masse de type colonial par un vignoble plus restreint pour son propre compte, déplacé vers le Centre et l'Est pour s'adapter aux meilleurs terroirs et donner un raisin de qualité, un vignoble, enfin employant une masse plus importante de main-d'œuvre, c'est le modèle algérien que s'est créé le vignoble moderne marocain (Brun, 1968).

### **1.2. Position systématique de la vigne**

Cette plante appartient à la famille des Vitaceae (Fig.1). Elle fait partie de classe des angiospermes dicotylédones (Ampélidacées) selon la classification nommée « Angiosperm Phylogeny Group classification » APG III (2009) (Haston *et al.*, 2009), sous-classe de Archichlamydées et à l'ordre des Rhamnales (Lacombe, 2012). Cette famille des Vitaceae compte 19 genres (Pensec, 2013) et regroupe plus d'un millier d'espèces présentes en

Afrique, Asie, Amérique et Océanie (Toumi, 2006). Mais seul le genre *Vitis* composé d'environ 80 espèces (Toumi, 2006) est utilisé en agriculture car il est le seul à produire des fruits consommables par l'Homme (Rezgui, 2016). Ce genre est constitué en deux sections, *Eu vitis* ou *Vraies vignes* et *Muscadinia* (Françoise *et al.*, 2011). Parmi les espèces d'*Eu vitis*, l'espèce *Vitis vinifera* L. (vigne européenne) originaire de l'Europe et l'Asie occidentale, est celle largement utilisée dans les secteurs viticoles (Reynier, 2011).



**Figure 1.** Classification de la vigne (Reynier, 2011).

### 1.3. Description botanique de la vigne

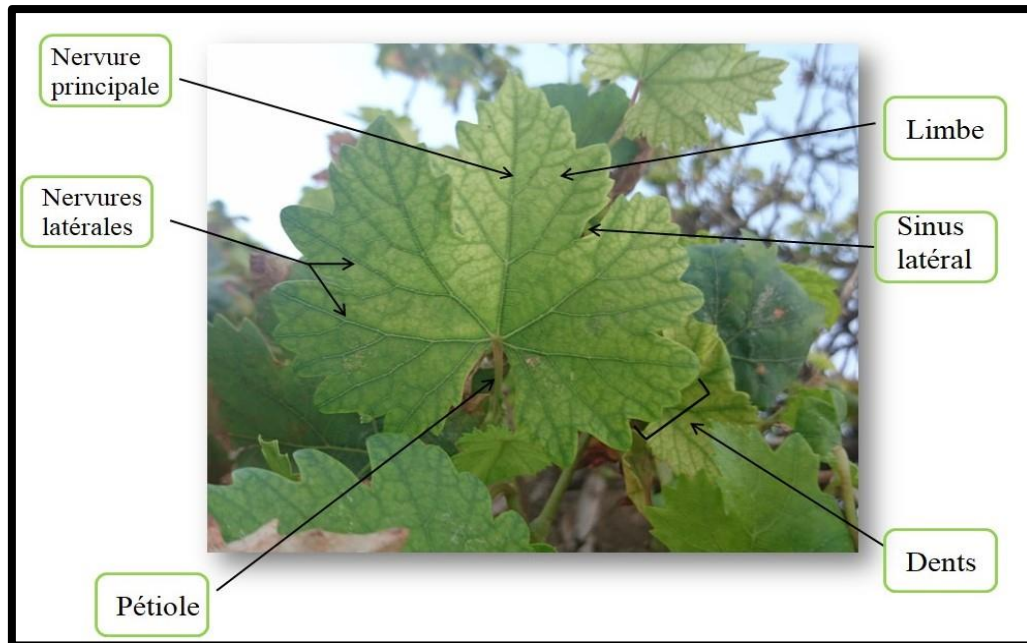
La vigne est une plante pérenne ligneuse, peut demeurer en place plusieurs dizaines d'année et adapter à des environnements variés (Cantu *et al.*, 2019). C'est un arbrisseau sarmenteux, grimpant comme des lianes et s'attachant à des supports variés grâce à des vrilles opposées aux feuilles (Reynier, 2011).

La vigne, comme toute plante supérieure, présente plusieurs formes morphologiques (fruits, fleurs, feuilles, rameaux...etc.), dont elle comporte dans sa morphologie deux parties, l'un racinaire et l'autre aérienne.

En précisant de parler sur la feuille de vigne (Fig.2), elle est composée d'une queue ou pétiole et d'une partie élargie et étalée appelée le limbe (Reynier, 2011). La feuille est palmatilobée (entière, simple et palmée), contient 5 principaux à 7 lobes dentés et séparés par des sinus plus ou moins profonds et ouverts (Hansse Gluszak, 2019), une nervure principale part du point pétiolaire et se divise en nervures secondaires (Hansse Gluszak, 2019). Les feuilles jouent un rôle physiologique important; la transpiration et la photosynthèse. Elles



possèdent du point de vue ampélographique des caractères propres à chaque espèce et variété sa forme, ses découpures et les poils (Reynier, 2011).



**Figure 2.** Feuille de la vigne (photo originale).

**- Chapitre 2 -**  
**Extraction d'ADN**  
**génomique**

### 2.1. Génome de la vigne

Plusieurs études ont été faites sur le génome de la vigne pour développer les connaissances de leurs caractères agronomiques. International Grape Genome Program : c'est le titre de projet de séquençage franco-italien lancé en 2005 comme un travail fait par participation de l'Institut national de la recherche agronomique (INRA) et le Génoscope (le laboratoire national de séquençage) (Jaillon *et al.*, 2007). Ce projet fait de la vigne la première plante à fruit dont l'ADN a été entièrement séquencé (Jean, 2007).

La vigne cultivée possède un petit génome nucléaire d'une taille estimée à environ 475Mpb (Velasco *et al.*, 2007). Ce génome est constitué d'un nombre élevé des chromosomes ( $2n = 38$  chromosomes) de petit taille de 1 à 2,4  $\mu\text{m}$ , dont le nombre des gènes est estimé à 30434 (Françoise *et al.*, 2011).

### 2.2. Lyophilisation comme une étape préparatrice avant l'extraction

C'est une méthode de dessiccation sous vide à basse température de produits liquides préalablement congelés (Toulemonde et Desage, 2009). Leur principe de base repose sur les changements d'état de l'eau c'est à dire quand on réchauffe de l'eau à l'état solide à très basse pression, elle se transforme directement à l'état gazeux sans passer par l'état liquide (Grugier, 2013). Selon Dumez *et al.* (2017), un cycle de lyophilisation est découpé en deux grandes phases:

- ❖ phase de congélation : abaissement de la température pour la congélation du produit.
- ❖ phase de dessiccation : se déroule en deux étapes (Toulemonde et Desage, 2009) :
  1. la dessiccation primaire : C'est la sublimation, l'abaissement de la pression et de la température dans l'appareil provoque l'évaporation de l'eau libre ;
  2. la dessiccation secondaire ou la désorption : consiste à soumettre le produit à la température la plus élevée possible et la pression la plus basse possible, pour arracher les molécules d'eau adsorbées.

Cette technique permet de conserver la qualité du produit qui est alors lyophilisé, il s'agit de l'unique méthode de séchage qui garde parfaitement la structure moléculaire des différentes molécules qui composent le produit, car elle provoque l'inhibition des réactions chimiques et biochimiques (Bogdani, 2011).

## **2.3. Extraction de l'ADN génomique**

### **2.3.1. Principe**

L'extraction de l'acide désoxyribonucléique est une technique permettant d'isoler ce dernier de cellules ou de tissus, cet isolement est la première étape dans la plupart des études de biologie moléculaire. Dont l'objectif de cette technique dans le cas présent est d'obtenir un ADN purifié, isolé de sources diverses, afin de pouvoir mener une analyse spécifique (Raoudha *et al.*, 2012). Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN mais le principe est à peu près toujours le même (Surzycki, 2000) :

- la lyse de membrane cellulaire et nucléaire ;
- élimination des protéines, des acides nucléiques (ARNs) et des autres contaminants comme les métabolites secondaires ;
- un traitement à l'aide d'une solution de précipitation, d'habitude l'éthanol ou l'isopropanol.

### **2.3.2. Extraction d'ADN génomique à la méthode CTAB**

La majorité des méthodes d'extraction d'ADN végétal sont dérivées de la méthode originale basée sur le CTAB (Healey *et al.*, 2014), qui a été élaboré pour la première fois par Murray et Thompson en 1980, elle convient pour l'extraction et la purification d'ADN 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 (Murray et Thompson, 1980). La méthode se repose sur l'utilisation d'un détergent cationique CTAB pour faire une lyse chimique qui va permettre la solubilisation de la paroi cellulaire afin d'extraire l'ADN (Marsal *et al.*, 2011).

### **2.3.3. Diversité des méthodes de purification d'ADN génomique**

L'isolement de l'ADN des tissus végétaux peut être très difficile car la biochimie entre les espèces végétales divergentes peut être extrême. Les plantes peuvent avoir des niveaux variables de métabolites et de biomolécules structurales, les polysaccharides et les polyphénols sont deux classes de biomolécules végétales qui varient considérablement entre les espèces et sont considérés comme des contaminants peuvent interférer avec les manipulations de l'ADN après l'isolement. Néanmoins, diverses méthodes sont disponibles qui peuvent efficacement éliminer les polysaccharides et les polyphénols des préparations d'ADN végétal (Li *et al.*, 2020). Dans ce contexte, le choix de la méthode doit dépendre du (Marsal *et al.*, 2013) :

- tissu sélectionné (feuille, graine... etc.) ;

- la simplicité et la rapidité ;
- le rendement et la pureté ;
- le coût ;
- les applications en aval (PCR, clonage... etc.).

### **2.3.3.1. Purification liquide-liquide**

Des méthodes de purification liquide-liquide sont employées afin de purifier et concentrer l'ADN extrait préalablement à une analyse permettant leur transfert d'une phase liquide vers une autre phase liquide non miscible (Abe *et al.*, 2010). La méthode la plus courante est l'extraction organique au phénol-chloroforme, elle implique l'ajout et l'incubation dans plusieurs solutions chimiques différentes comprenant une étape de lyse, une purification au phénol-chloroforme, une précipitation à l'éthanol et des étapes de lavage.

L'avantage de cette méthode est la simplicité du protocole, mais le principal inconvénient est l'utilisation de produits chimiques toxiques comme le phénol et le chloroforme (Shi *et al.*, 2018).

### **2.3.3.2. Purification liquide-solide**

Les colonnes contenant une matrice de purification sont souvent utilisées pour la séparation des acides nucléiques en phase solide. De nombreux kits commerciaux choisissent cette méthode pour la rapidité, la facilité d'utilisation et son faible coût, sachant que la phase solide peut être une résine échangeuse d'anions ou une matrice d'adsorption en silice (Thatcher, 2015). L'extraction en phase solide en utilisant une méthode d'isolement sur colonne de silice, qui est un système ayant recours à la technologie des membranes de silice pour l'isolation et la purification de l'ADN génomique à partir d'échantillons biologiques, fait office d'un remplaçant de plusieurs étapes de la centrifugation et de l'extraction organique (McCormick, 1989).

## **2.4. Techniques d'analyse d'ADN**

Avant toute manipulation, il est souvent nécessaire de connaître l'état d'ADN extrait, l'ADN est-il intact ou dégradé ? Que sa quantité. Une façon simple et rapide d'analyser une préparation d'ADN consiste à en faire migrer l'ADN extrait dans un gel d'agarose, puis à le visualiser grâce à une coloration au bromure d'éthidium (BET). Alors que, l'évaluation de la quantité d'ADN extrait s'effectue par un dosage spectrophotométrique qui est une méthode plus simple et plus rapide. Une vérification de pureté s'effectue par l'application de la PCR.

### 2.4.1. Électrophorèse sur gel d'agarose

La technique d'électrophorèse sur gel d'agarose est utilisée quotidiennement dans les laboratoires de biologie moléculaire, il s'agit d'un moyen de séparation efficace et parfait des biomolécules chargées tel que l'ADN, en fonction de leur charge, leur taille et leur forme (Magdeldin, 2012).

L'analyse sur gel d'agarose est valable pour tout ADN, qu'il soit d'origine génomique ou plasmidique. Cette technique permet entre autres de connaître la qualité d'une préparation d'ADN, de déterminer la taille de fragments d'ADN ou d'évaluer la concentration en ADN d'une préparation (Brodeur et Toussaint, 2007 ; Ghowsi, 2012). Nous verrons plus en détail la préparation de ce gel dans le chapitre 3 (partie expérimentale).

En milieu légèrement basique, l'ADN se comporte comme une chaîne polyanionique (groupements phosphates ionisés), placé dans un gel d'agarose, tous les échantillons d'ADN chargés négativement se déplacent vers l'anode sous un champ électrique appliqué. Le flux de migration est déterminé uniquement par le poids moléculaire où les plus grosses molécules auront le plus de difficulté à traverser les pores du gel, tandis que les plus petites molécules seront relativement libres et migrent plus rapidement que les plus grosses (Magdeldin, 2012). Afin de visualiser les molécules d'acide nucléique dans les gels d'agarose, le bromure d'éthidium est parmi les colorants fluorescents couramment utilisés. L'illumination de gel d'agarose avec une lumière U.V est ensuite utilisée pour visualiser les fragments d'ADN colorés même si avec des quantités faibles (Magdeldin, 2012).

### 2.4.2. Dosage par le spectrophotomètre

La concentration en ADN de l'échantillon est estimée par spectrophotométrie. En effet, les acides nucléiques présentent un pic d'absorption dans l'ultraviolet. Le maximum de cette absorption se situe à 260nm (Ahakoud, 2015).

La reconnaissance de l'interférence par des contaminants est faite par un calcul d'un «ratio». Les protéines absorbent à 280 nm, le ratio  $A_{260}/A_{280}$  est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique, un ratio d'environ 1,8 à 2,0 indique que l'ADN extrait est pur (Surzycki, 2000). Tandis que l'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les peptides, les phénols ou les composés aromatiques (Ahakoud, 2015). Le ratio  $A_{260}/A_{230}$  devrait être plus de 1,8 (environ 2,2) pour les échantillons purs (Varma *et al.*, 2007 ; Ahakoud, 2015).

### **2.4.3. PCR conventionnelle**

#### **2.4.3.1. Principe**

La réaction de polymérisation en chaîne est un test enzymatique qui permet l'amplification *in vitro* des traces d'ADN spécifique, et génère des millions de copies suffisamment à analyser (Garibyan et Avashia, 2013). Le Dr Kary Mullis qui a découvert le test PCR a déclaré qu'il "vous permet de choisir le morceau d'ADN qui vous intéresse et d'en avoir autant que vous le souhaitez" (Mullis, 1990). Depuis son invention, la PCR est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN et de l'ARN (Poitras et Houde, 2002).

#### **2.4.3.2. Milieu réactionnel de la PCR**

L'amplification s'effectue par la présence de plusieurs composants de base dans le mix de PCR (Johnson, 1991):

- matrice d'ADN qui contient la région du fragment d'ADN à amplifier ;
- les nucléotides (dNTPs) comprennent les quatre bases - adénine, thymine, cytosine et guanine et ceux-ci agissent comme les blocs de construction qui sont utilisés par l'ADN polymérase pour créer le produit de PCR résultant ;
- l'ADN polymérase est l'enzyme clé qui relie les nucléotides individuels ensemble pour former le produit de PCR ;
- les amorces, courts fragments d'ADN qui spécifient dans la réaction le produit d'ADN exact à amplifier. Ceux-ci servent de point d'extension sur lequel l'ADN polymérase peut s'appuyer.

Tous ces composants nécessitent un environnement chimique approprié qui est fourni par un agent tamponneur.

#### **2.4.3.3. Etapes de la PCR**

Le processus de PCR consiste en une série des cycles. Chacun se compose de trois étapes (Rahman *et al.*, 2013) :

- dénaturation de l'ADN double brin pour obtenir des matrices simples brins ;
- hybridation des amorces spécifiques, après la séparation des deux brins, les amorces puissent se fixer eux-mêmes aux simples brins d'ADN afin de créer un point d'extension pour l'enzyme ;
- réaction de polymérisation du brin complémentaire par l'enzyme polymérase. A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin.

#### 2.4.3.4. Inhibiteurs de la PCR

Afin d'éviter un résultat faux-négatif du fait de la présence d'inhibiteurs de PCR dans l'échantillon, il est vivement recommandé d'appliquer des méthodes d'extraction adéquates pour extraire des acides nucléiques hautement purifiés exempts de tout contaminant. Quelques exemples des contaminants susceptibles d'inhiber la PCR sont énumérés dans le tableau 1.

**Tableau 1.** Exemple des inhibiteurs de la PCR reportés dans la littérature (Demeke et Jenkins, 2010 ; Opel *et al.*, 2010).

Inhibiteurs	Description et concentration inhibitrice de la PCR	Références
CTAB	0.01%	(Demeke et Jenkins, 2010)
EDTA	$\geq 0.5$ mM ; 1 mM	
Polysaccharides	Comme la Pectine : $>0.5\%$ et Xylène : $>0.0025\%$	
Isopropanol	$>1\%$ (v/v)	
Phénol	$>2\%$ (v/v)	
Polyphénols	Comme l'acide tannique : entre 1,5 à 4,5 ng/ $\mu$ l	(Opel <i>et al.</i> , 2010)



**Deuxième partie**  
**Partie Expérimentale**

**- Chapitre 3 -**  
**Matériel et méthodes**

### 3.1. Stratégie de travail

L'objectif de l'extraction est d'isoler la molécule d'ADN de toute autre molécule organique, et d'en obtenir une quantité suffisante et de pureté satisfaisante pour permettre toutes les manipulations postérieures de biologie moléculaire.

La présente étude a été réalisée sur des jeunes feuilles de quatre variétés locales de la vigne obtenues de la commune d'El-Kantara, wilaya de BISKRA.

Notre étude est effectuée en plusieurs étapes (Fig.3). Au début, nous avons commencé par la récolte des jeunes feuilles saines de quatre variétés de la vigne pendant la période d'échantillonnage (octobre 2019 et mars 2020). Ensuite, nous avons lavé, séché et conservé ces feuilles. Pour effectuer l'extraction d'ADN génomique nous avons broyé les feuilles sèches, puis nous avons isolés l'ADN génomique par l'application de la méthode CTAB (une extraction liquide-liquide), passant en premier par une lyse cellulaire (destruction de la membrane plasmique et nucléaire pour libérer l'acide nucléique) puis l'élimination des différents contaminants comme les lipides, les protéines et les métabolites secondaires et enfin la précipitation d'ADN à l'alcool. Pour améliorer l'extraction de l'ADN génomique, nous avons essayé de réaliser une extraction liquide-solide (extraction sur membrane de silice) comme une méthode de purification.

Afin de vérifier la qualité et la quantité d'ADN extrait, nous avons fait son analyse en réalisant une migration sur gel d'agarose qui permet de déterminer l'existence et l'intégrité d'ADN extrait. La concentration de l'ADN et sa pureté ont été déterminées grâce à la lecture de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre.

Enfin, une étape de PCR où l'ADN extrait est amplifiée grâce à un couple d'amorces spécifiques. Les produits de PCR obtenus (d'une taille entre 233pb et 263pb) sont contrôlés par une électrophorèse sur gel d'agarose (2%). Après coloration au BET, les bandes sont visualisées sous U.V, et leurs tailles sont estimées par rapport au standard de poids moléculaire.

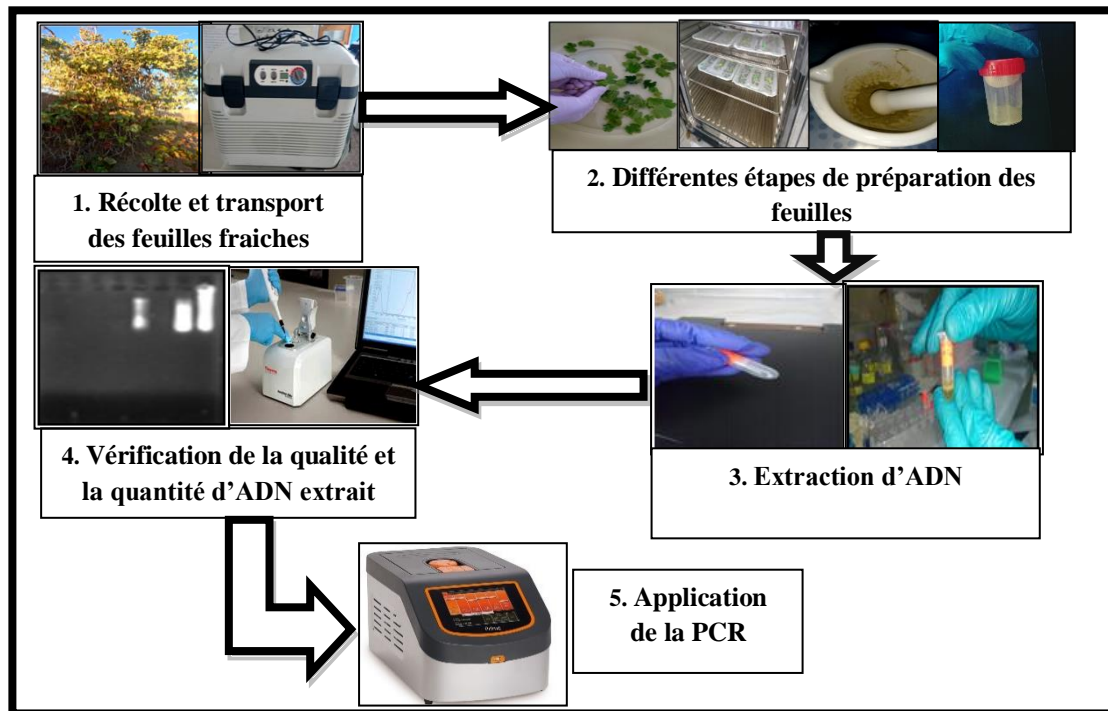


Figure 3. Illustration schématique des différentes étapes de notre travail.

### 3.2. Présentation de la région d'étude

#### 3.2.1. Situation géographique

Le territoire de la commune d'El-Kantara (wilaya de BISKRA), surnommé la porte du sud ou encore la porte d'or est une oasis de 35°15'11,3''Nord, 05°44'25,5'' Est (Salemkour *et al.*, 2012), située dans le Sud-ouest des Aurès (Fig.4) à 52 km au Nord de la reine des Ziban BISKRA et à 62 km au Sud-ouest de la capitale des Aurès BATNA .

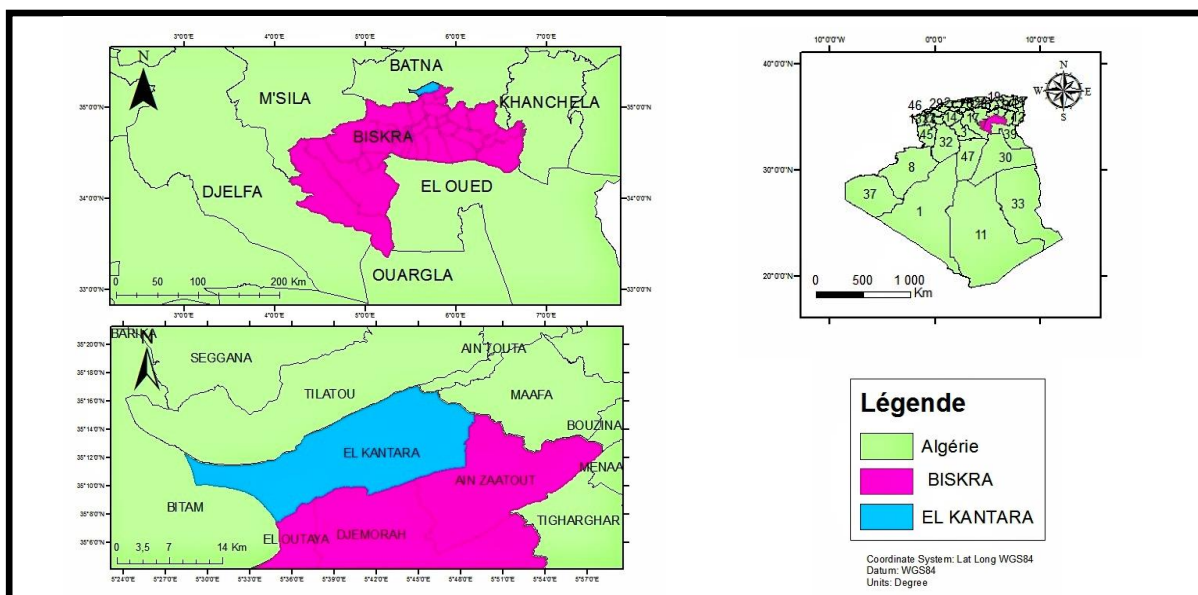


Figure 4. Carte de situation géographique de la zone d'étude (voir l'annexe 2).

### 3.2.2. Climat de la région d'El-Kantara

La région d'El-Kantara est caractérisée par un climat semi-aride et instable grâce à sa position géographique, entre les monts des Aurès au nord, et le Sahara au sud. Elle est froide en hiver et chaude en été, avec des tendances sahariennes caractérisées par une saison sèche qui va du mois de Mars jusqu'au mois de Novembre (Karboub, 2012).

### 3.3. Matériel et produits nécessaires

Tous matériels utilisés pour l'extraction d'ADN génomique, ainsi que les consignes de sécurité à suivre pour assurer une protection individuelle efficace sont mentionnés dans l'annexe 1.

#### 3.3.1. Préparation des solutions utilisées

Pour extraire l'ADN il faut d'abord réaliser une étape précoce et essentielle qui est la préparation de tous les réactifs nécessaires à l'extraction. Les réactifs de biologie moléculaire peuvent faire ou défaire notre expérience ou la préparation des échantillons, donc ce genre de recherche nécessite l'utilisation des réactifs et de produits chimiques de haute pureté pour garantir des résultats précis. L'annexe 1 représente tous les gammes des réactifs utilisés dans notre étude.

Nous avons préparé des solutions mères pour nous permettre de prendre la quantité à utiliser dans le protocole d'extraction. Le tableau 2 ci-dessous résume les volumes et les concentrations des réactifs utilisés. Pour des autres informations sur la toxicité et les mesures de protection individuelle pour chaque produit utilisé voir l'annexe 1.

**Tableau 2.** Réactifs utilisés pour l'extraction d'ADNg.

Produit	Masse molaire	Concentration préparée	Volume total préparé	Masse ou volume utilisé	Température de conservation et stérilisation
Tris-HCl	156,6 g/mol	500mM	90 ml	7,05g	à (+4°C), stérilisés par autoclavage.
Na <sub>2</sub> EDTA	372,23 g/mol	1M	20 ml	7,444g	
		50mM	20 ml	0,372g	

NaCl	58,44 g/mol	4M	90 ml	21,04g	
Ethanol	46 g/mol	70%	56,34 ml	40 ml	
Protéinase K	28,93 KDa	20 mg/ml	500 $\mu$ l	0,01g	à (-20°C).
Sorbitol	182,17 g/mol	600mM	25 ml	2,732g	à (+4°C), stérilisés par autoclavage.
NaOH	39,997 g/mol	5N	100 ml	20g	à température ambiante.

### 3.3.2. Elimination des déchets

Le travail en laboratoire requiert la manipulation de produits trop toxiques et dangereux et peut être à l'origine des accidents graves, où il doit tenir compte des règles de sécurité pour prévenir ces accidents et à ce point-là il faut parler sur l'élimination correcte des déchets. C'est pour ça, au cours de notre travail nous avons traité ces déchets avec prudence de la manière suivante :

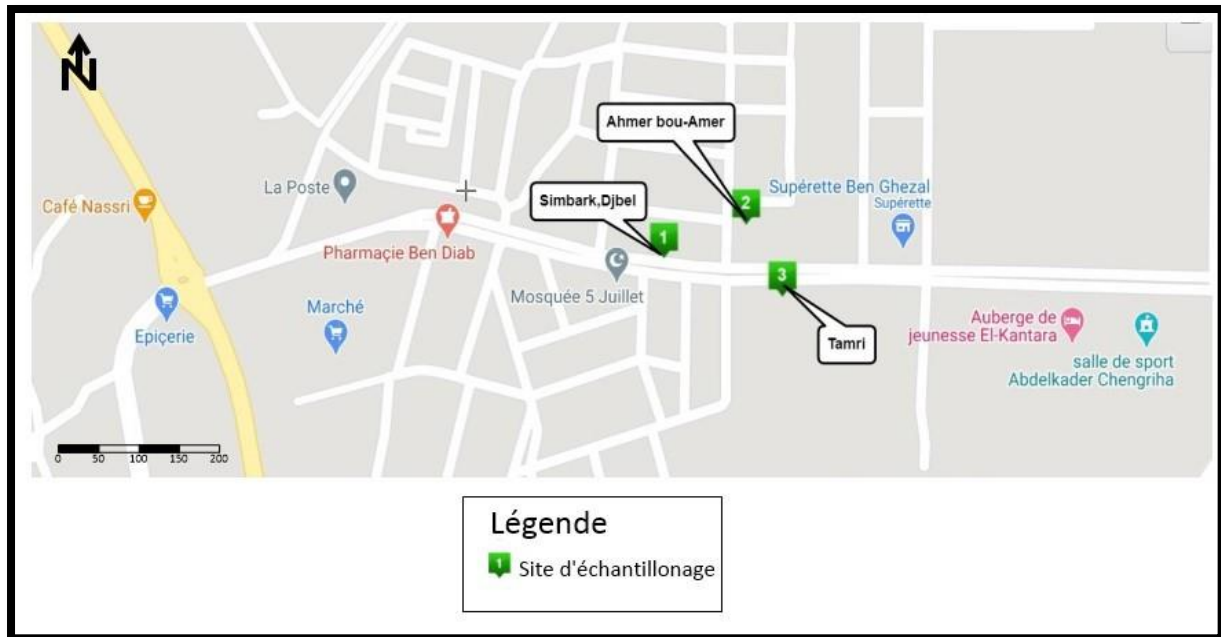
- les embouts contaminés par des produits toxiques tels que le chloroforme,  $\beta$ -Mercaptoethanol, l'isopropanol...etc. sont récupérés et éliminés en bidon ;
- les tubes eppendorfs et autres consommables sont éliminés dans un sac poubelle à risque chimique (sacs jaunes) ;
- tout matériel consommé et pas contaminé par un produit toxique est éliminé dans un sac poubelle noir de laboratoire.

### 3.4. Matériel biologique

#### 3.4.1. Collecte des feuilles

Le cadre taxinomique de notre étude correspond strictement à l'espèce *Vitis vinifera*. Quatre variétés ont fait l'objet de notre travail : Simbark, Tamri, Djbel et Ahmer bou-Amer.

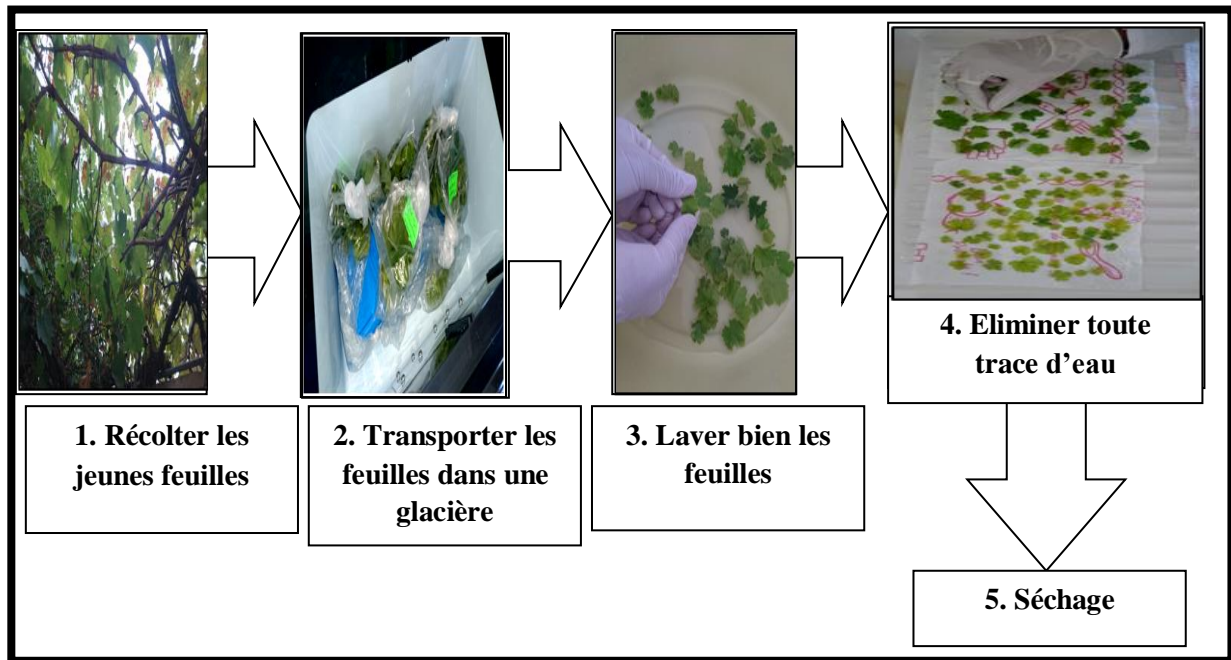
Nous avons entrepris la récolte des jeunes feuilles pendant le mois d'octobre 2019, et la deuxième a été faite le 12 mars 2020. Tous les échantillons sont collectés de la commune d'El-Kantara (Fig.5).



**Figure 5.** Emplacement des sites d'échantillonnage sur la commune d'El-Kantara (Site web 1).

Au cours de cette récolte, nous avons porté des gants et nous avons utilisé un ciseau préalablement désinfecté. Les feuilles récoltées sont ensuite mises dans des sachets en plastique et sont transportées dans une glacière (+4°C).

En premier temps, ces jeunes feuilles collectées sont nettoyées par l'eau distillée pour éliminer toute trace de poussière, insectes ...etc. Les pétioles et les fragments des rameaux sont découpés à l'aide d'un scalpel ou ciseaux préalablement désinfectés. À l'aide d'un papier absorbant, on élimine toute trace d'eau. Il faut nettoyer la paillasse avec l'eau de javel, les petits matériels de prélèvement (scalpels, sécateurs ...etc.) ont été désinfectés par trempage d'une durée de quelques minutes dans une solution d'eau de javel puis rincés abondamment à l'eau. La figure 6 présente la préparation des feuilles collectées.



**Figure 6.** Récolte et préparation des feuilles (photos originaux).

### 3.4.2. Séchage des feuilles

Les feuilles collectées ont été séchées en appliquant deux différentes méthodes de séchage, à l'étuve ventilée et par lyophilisateur.

#### 3.4.2.1. Séchage des feuilles à l'étuve ventilée

Les feuilles ont été séchées selon la procédure de Benbouza *et al.* (2006). Le séchage à chaud a été fait à 27°C pendant 5 jours (Fig.7). Les étapes de séchage sont comme suit :

- prendre des plateaux et les nettoyer par l'eau de javel ;
- séparer les feuilles l'une de l'autre sur les plateaux ;
- recouvrir les feuilles de chaque variété par des compresses stériles ;
- mettre les plateaux dans l'étuve ventilée pendant 5 jours à 27°C afin de bien sécher les feuilles ;
- les feuilles sèches ont été mises dans des bocaux stériles bien fermés.





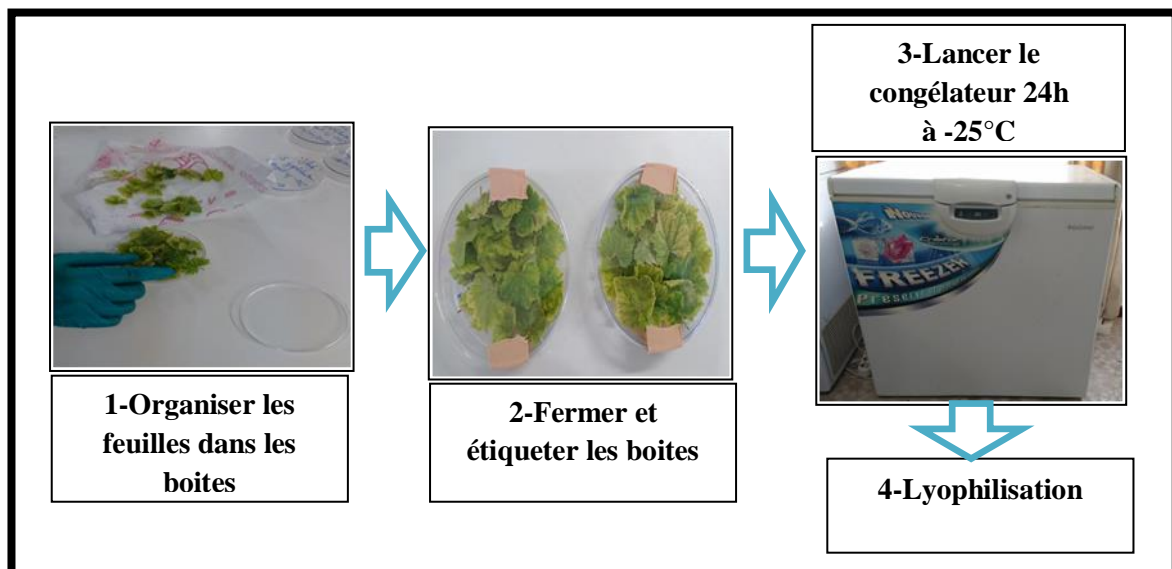
**Figure 7.** Séchage des feuilles à l'étuve ventilée (photo originale).

### 3.4.2.2. Séchage des feuilles par lyophilisation selon Kang et Yang (2004) et Nunes *et al.* (2011)

A-D'abord, il faut passer par une étape de congélation (Fig.8) :

-les feuilles nettoyées sont déposées dans des boites des pétries stériles ;

-mettre ces boites dans un congélateur à  $-25^{\circ}\text{C}$  pendant un jour ;



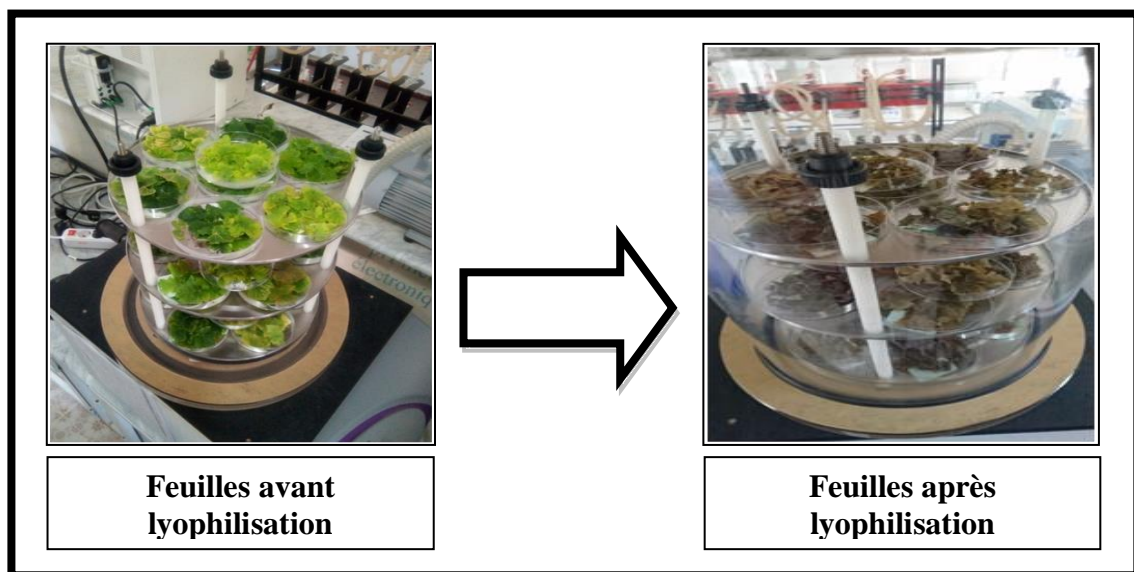
**Figure 8.** Congélation des feuilles (photos originaux).

**B**-Après la congélation, mettre les feuilles congelées sur les plateaux de lyophilisateur (Fig.9) et lancer l'appareil à une température égale à  $-100^{\circ}\text{C}$  et à une pression égale à 1000 mBar. Nous avons effectué cette étape de façon discontinue, c'est-à-dire l'appareil a été lancé quelques heures/jour, pendant 3 jours pour une durée finale de lyophilisation égale à 14 heures 40 min.

-Déposer les feuilles séchées dans des bocaux stériles en présence de gel de silice (Fig.10) ;

-Fermer les boîtes hermétiquement ;

-Conserver les feuilles à température ambiante pendant 5 mois.



**Figure 9.** Séchage des feuilles fraîches à lyophilisateur (photos originaux).

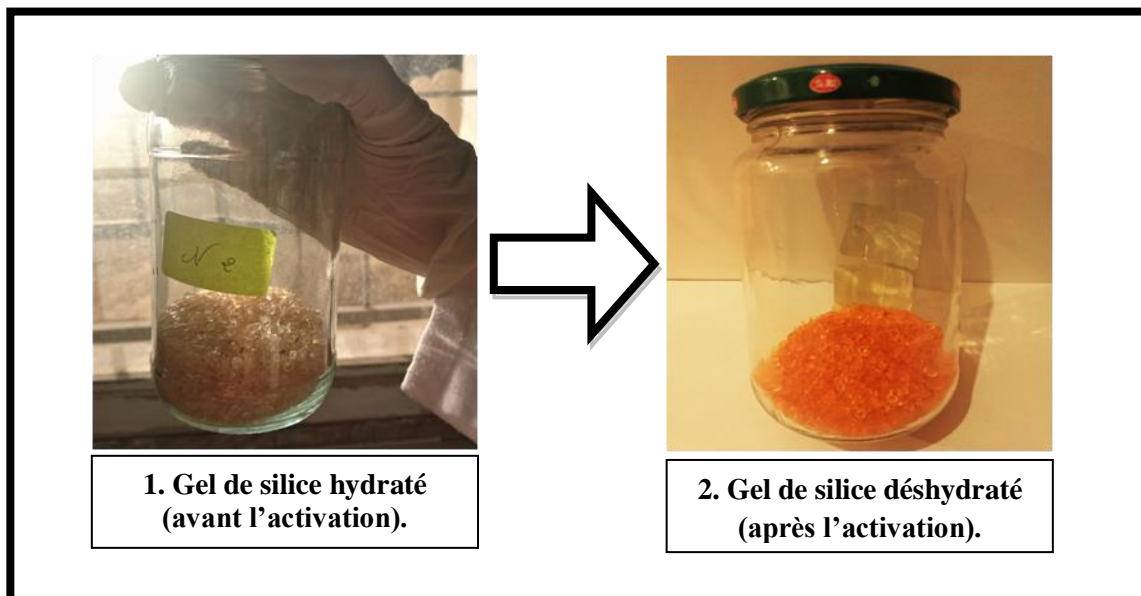


**Figure 10.** Conservation des feuilles avec gel de silice (photo originale).

**Remarque :**

De temps en temps; il faut vérifier la couleur de gel de silice, un changement de la couleur de ce gel, d'orange à blanche indique qu'il est réhydraté (Funk *et al.*, 2017). Donc il faut le réactiver (Varma *et al.*, 2007), comme suite :

- collecter toute quantité de gel de silice qui a été déposé avec les feuilles ;
- mettre le gel dans des flacons stériles ouverts ;
- mettre les flacons dans l'étuve ventilée dès que le gel devient sec (dont la couleur est orange foncée) (Fig.11) ;
- réutiliser le gel pour conserver les échantillons.



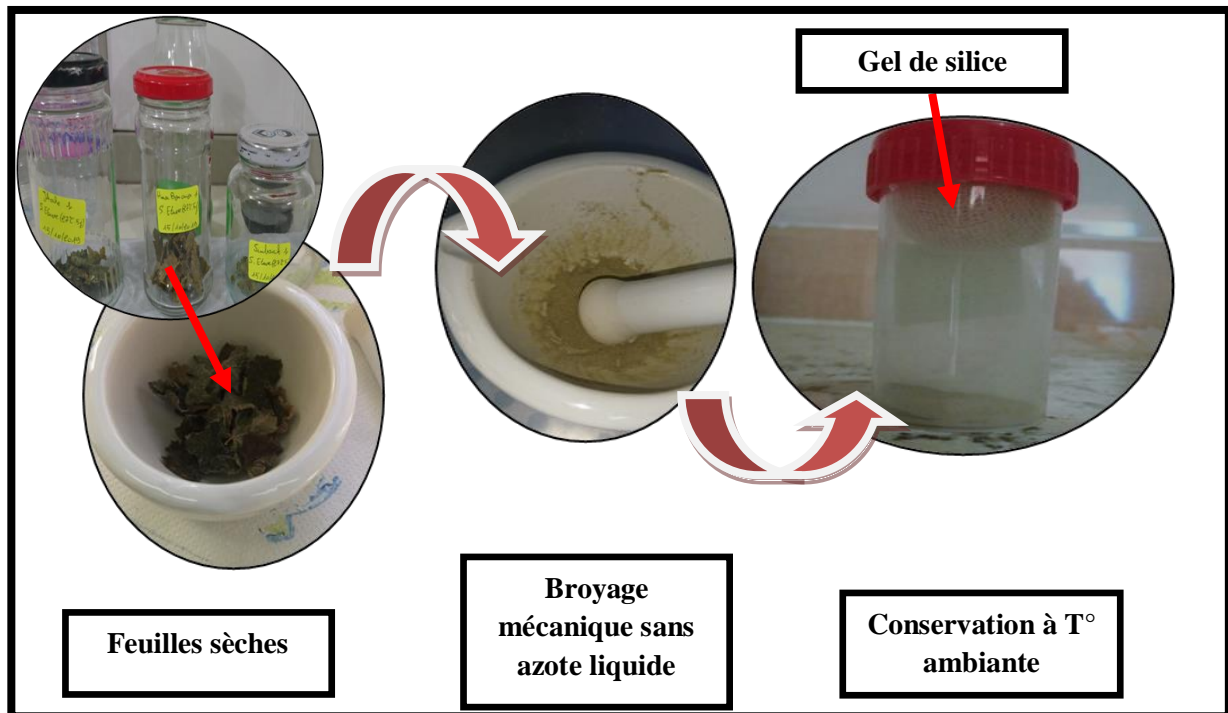
**Figure 11.** Activation de gel de silice (photos originaux).

**3.4.3. Broyage des feuilles**

La plupart des cellules végétales ont une paroi cellulaire très dure (Nguyen-Kim, 2015) et elles nécessitent une méthode délicate pour briser ce paroi en petits morceaux qui sont accessibles au traitement aux détergents (Surzcki, 2000). La qualité et la quantité de l'ADN extrait sont influencées par la proportion des parois cellulaires brisées (Henry, 2008).

Les feuilles sèches sont broyées manuellement par un pilon et mortier sans azote liquide (Fig.12). Après chaque échantillon, on a changé le mortier qui est désinfecté auparavant par l'éthanol 70%, sans oublier de nettoyer la paillasse avec l'eau de javel afin d'éviter les contaminations croisées. Puis, on met la poudre obtenue dans des flacons stériles bien

étiquetés et bien fermés. La conservation des échantillons a été effectuée à température ambiante en présence de gel de silice (Chase et Hills, 1991).



**Figure 12.** Broyage et conservation des feuilles (photos originaux).

Le tableau 3 ci-dessous résume les étapes de préparation de chaque échantillon (variété).

**Tableau 3.** Caractéristiques des différentes variétés de la vigne utilisées au cours de cette étude.

Echantillon	Tamri	Ahmer bou-Amer	Simbark	Djbel
Site d'échantillonnage (région d'El-Kantara) (Google Maps)	<b>Latitude</b>			
	35°13'30.7''N	35°13'32.1''N	35°13'31.5''N	35°13'31.4''N
	<b>Longitude</b>			
	5°42'50.0''E	5°42'49.3''E	5°42'46.2''E	5°42'46.5''E
Code*	TE1E	HE1E	SE1E	JE1E
	TE1L	HE1L	SE1L	JE1L

<b>Séchage</b>	Séchage par lyophilisation pendant 14 heures et 40 minutes de façon discontinu de 14 à 16/10/2019 T° : -100°C P° : 1000mBar
	Séchage à l'étuve ventilée, pendant cinq jours. De 10 à 15/10/2019 T° : 27°C
<b>Conservation</b>	A T° ambiante en présence de gel de silice Pendant 5 mois: - De 15/10/2019 à 02/03/2020 (Feuilles séchées à l'étuve) -De 16/10/2019 à 02/03/2020 (Feuilles lyophilisées)

(\*)T /H/S/J: nom de variété, E1: équipe 1, E: séché à l'étuve et L: lyophilisé.

### 3.5. Méthode de travail

#### 3.5.1. Extraction d'ADN génomique

Dans le cadre de notre étude, nous avons pris le protocole décrit par Piccolo *et al.* (2012) comme un protocole de référence, afin d'extraire l'ADN génomique à partir des feuilles de la vigne. Ce protocole s'inspire d'un protocole de base de Doyle et Doyle (1990). Il est simple à appliquer et rapide pour isoler l'ADN par la méthode CTAB/ Chloroforme alcool isoamylique (isolement liquide-liquide).

Les différentes étapes de ce protocole d'extraction sont comme suite :

1. 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-Mercaptoethanol ;
2. agiter les tubes et incuber à 65°C pendant 60 minutes au bain-marie, en mélangeant par inversion 3-4 fois pendant l'incubation ;
3. centrifuger les tubes à 10 000 rpm pendant 10 min à 4°C et transférer doucement la phase aqueuse dans un nouveau tube ;
4. ajouter un volume égale de chloroforme : alcool isoamylique (24:1) et mélanger par inversion ;
5. centrifuger les tubes à 10 000 rpm pendant 10 min à 4°C et transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube ;

6. ajouter un volume égal d'isopropanol froid (-20°C), incuber les tubes à (-20°C) pendant 30 min ;
7. centrifuger les tubes à 14 000 rpm pendant 10 min à 4°C, et jeter le surnageant;
8. laver le culot d'ADN par 500 µl d'éthanol 70% froid (-20°C) et centrifuger à 14000rpm / min pendant 5 min à 4°C ;
9. sécher le culot d'ADN résultant à l'air et le dissoudre dans 200 µl de tampon TE (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)). La RNase A, a été ajoutée à chaque échantillon (1/100 µl d'échantillon d'ADN) et puis les incuber à 37°C pendant 1h ;
10. conserver les échantillons à (-20°C).

### 3.5.2. Paramètres optimisés

Le rendement et la pureté des acides nucléiques sont deux éléments importants pour assurer l'efficacité et la fiabilité des analyses en biologie moléculaire. Surtout pour l'échantillon végétal, il est plus difficile d'obtenir un rendement optimal et/ou une pureté satisfaisante. De nombreuses études ont essayé d'améliorer la pureté de l'ADN extrait et d'augmenter son rendement.

Nous avons continué l'optimisation de protocole de référence qui a été commencée par l'équipe de master de l'année passée (2019) encadrée par l'enseignante ACHOUR H. en vue d'améliorer la qualité et la quantité d'ADN extrait. Les paramètres testés pour les importantes étapes de l'extraction de l'ADN en référence au protocole de Piccolo *et al.* (2012) sont listés dans le tableau 4.

**Tableau 4.** Paramètres testés pour améliorer le protocole de l'extraction de l'ADN génomique de Piccolo *et al.* (2012).

Etape	Piccolo <i>et al.</i> (2012)	Gamme testée	Protocole final (2020)
Etape de lavage	/	Lavage par une solution à base de sorbitol (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.35 M Sorbitol, 5 mM EDTA (pH 8.0), 1% PVP, 1% β-ME, lavage de 1 à 3 fois	3 lavages successifs par une solution à base de sorbitol
	2% CTAB 25 mM EDTA	2%, 3% CTAB 25, 50 mM EDTA (pH 8,0)	3% CTAB 50 mM EDTA

Tampon d'extraction	(pH 8,0) 2,5 M NaCl 2% PVP 1% $\beta$ -ME / / /	2,5 à 2,7 M NaCl 2%, 3% PVP 1%, 3% $\beta$ -ME 0,5% Tween 20 3 $\mu$ l PK (20 mg/ml)  2 M LiCl	(pH 8,0) 2,7 M NaCl 2% PVP 1% $\beta$ -ME 0,5% Tween 20 3 $\mu$ l PK (20 mg/ml) 2 M LiCl
Lyse	65°C pendant 60 min, agitation 3-4 fois	58- 65°C, 1-2heures sous agitation continue	58 °C pendant 1h 30 min, sous agitation continue.
Purification	Chloroforme: alcool isoamylique (24:1). (purification liquide-liquide)	-Lavage deux fois par le Chloroforme:alcoolisoamylique (24:1) -Acetate de sodium 5 M (salting out) -Purification en phase solide (sur des colonnes mini spin contenant une matrice de purification (membrane de silice))	Purification en phase solide (purification liquide –solide) en utilisant un tampon d'adsorption qui contient: 2 M chlorhydrate de guanidine
Précipitation d'ADN	Isopropanol (-20 °C), 30 min. Lavage par l'éthanol 70% froid (-20°C).	-Isopropanol, 30min, une nuit. -Lavage par l'éthanol 70% froid (-20°C) -Tampon utilisé pour laver l'ADN (70% éthanol) et un autre pour l'élution (10mM Tris-HCl (pH 8,5).	Tampons utilisés pour laver et éluer l'ADN.
Resuspension d'ADN et traitement par RNase	Tampon TE, RNase A (1/100 $\mu$ l d'éch. d'ADN)	60 $\mu$ l d'eau bidistillée.	60 $\mu$ l d'eau bidistillée.

### 3.5.2.1. Protocole 1 (P1)

Ce protocole est une version améliorée de protocole de référence. Il a été appliqué en plusieurs étapes sont comme suite :

1. désinfecter la paillasse et les micropipettes, travailler avec des embouts et réactifs stériles (autoclavés) ;
2. peser 100 mg de la poudre des feuilles préalablement préparé et conservé, et la mettre dans un tube eppendorf de 2 ml ;
3. ajouter 1 ml de tampon de lyse préchauffé (60-65°C) constitué de 3% CTAB, 2% PVP, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 2,7M NaCl, 3µl PK (20 mg/ml), 1% β-Mercaptoethanol et 0,5% Tween 20 ;
4. agiter les tubes par inversement pour avoir une préparation homogène, puis incuber à (58°C) pendant 60 min au bain-marie sous agitation horizontale continue ;
5. centrifuger les tubes à 10 000 rpm pendant 10 min à 4°C et transférer doucement la phase aqueuse dans un nouveau tube ;
6. ajouter un volume égale de chloroforme : alcool isoamylique (24: 1) et mélanger par inversion pendant 5 minutes ;
7. centrifuger les tubes à 10 000 rpm pendant 10 min à 4°C et transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube ;
8. faire un deuxième lavage par un volume égale de chloroforme: alcool isoamylique (24: 1) et mélanger par inversion pendant 5 min ;
9. centrifuger les tubes à 10 000 rpm pendant 10 min à 4°C et transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube ;
10. ajouter un volume égal d'isopropanol froid (-20°C) pour séparer l'ADN, et mélanger les échantillons doucement pendant quelque minutes et les incuber à (-20°C) pendant une nuit ;
11. centrifuger l'ADN précipité à 14 000 rpm pendant 10 min à 4°C, et jeter le surnageant ;
12. laver le culot d'ADN par 500 µl d'éthanol 70% froid à (-20°C), et centrifuger les tubes à 14000 rpm pendant 5 min à 4°C ;
13. sécher à l'air pendant 15 min le culot d'ADN résultant, et le dissoudre dans 60 µl de l'eau bidistillée ;
14. conserver l'ADN extrait à (-20°C).



### 3.5.2.2. Protocole 2 (P2)

Au cours de ce deuxième protocole, nous avons ajouté une étape de lavage, avant l'extraction, par un tampon de sorbitol (Inglis *et al.*, 2018 ; Lucas *et al.*, 2019). Ainsi le temps d'incubation (l'étape 4) dans le tampon de lyse a été modifié à 1h30min (Bokszczanin et Przybyla, 2006). Les autres étapes (3, 5 jusqu'à 14) restant les mêmes que les étapes de (P1).

L'étape de lavage est décrite ci-dessous :

1. avant de commencer, il est obligatoire de désinfecter le plan de travail par des solutions l'eau de javel (10%) ou l'éthanol (70%) (Chiaroni *et al.*, 2012);
2. mettre 100mg de poudre des feuilles sèches dans un tube eppendorf de 1,5 ml contenant 1ml de tampon de lavage constitué de 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.35 M Sorbitol, 5 mM EDTA (pH 8.0), 1% PVP et 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol ;
3. agiter les tubes pendant 5 secondes avec le vortex, puis confirmer la suspension des matériaux en poudre et mélanger à nouveau si nécessaire ;
4. centrifuger les tubes à 8000 rpm pendant 5 min à température ambiante, et jeter le surnageant ;
5. si nécessaire, répéter le lavage jusqu'à le surnageant devient clair.

### 3.5.2.3. Protocole 3 (P3)

Cependant, un nouveau protocole d'extraction d'ADN a été optimisé en faisant varier la concentration de tampon de lyse où 2M de chlorure de lithium a été ajouté pour éliminer les ARNs (Pirttilä *et al.*, 2001), et l'ajout d'une étape de lavage qui a été déjà appliquée dans le (P2) et une purification sur colonne de silice (purification liquide-solide).

Cette extraction liquide-solide (P3) est une version améliorée de (P2). Dont, nous avons modifié l'étape de purification organique par le chloroforme/alcool isoamylique par une autre méthode de purification très efficace qui utilise les colonnes de silice. L'extraction sur membrane de silice est parmi les systèmes de purification les plus utilisés et adoptés pour l'obtention d'ADN à haute qualité sans l'utilisation d'aucune solution organique (Esser *et al.*, 2005 ; Tagliavia *et al.*, 2009). Le protocole 3 optimisé est appliqué suivant des différentes étapes successives (Fig.14, page 29).

- **Étape de lavage**

1. Avant de commencer l'extraction, il est obligatoire de désinfecter l'endroit de travail et le matériel par l'eau de javel 10% ou l'éthanol 70% (Chiaroni *et al.*, 2012) ;

2. Mettre 100mg de poudre des feuilles sèches dans un tube eppendorf de 1,5ml contenant 1ml de tampon de lavage (constitué de 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.35 M Sorbitol, 5 mM EDTA (pH 8.0), 1% PVP et 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol) ;
  3. Agiter les tubes pendant 5 secondes avec le vortex, puis confirmer la suspension des matériaux en poudre et mélanger à nouveau si nécessaire ;
  4. Centrifuger les tubes à 8000 rpm pendant 5 min à température ambiante, et jeter le surnageant ;
  5. Si nécessaire, répéter le lavage jusqu'à le surnageant devient clair ;
- **Etape de lyse**
6. Après le lavage, resuspendre l'échantillon avec 1ml de 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 NaCl, 2M LiCl, 3 $\mu$ l PK (20 mg/ml), 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol et 0,5% Tween 20 ;
  7. Agiter les tubes par inversement pour avoir une préparation homogène, puis incuber à (58°C) pendant 1heure et 30 min au bain-marie sous agitation horizontale continue ;
  8. Centrifuger les tubes à 10000 rpm pendant 10 min à 4°C et transférer doucement la fraction de surnageant dans la mini colonne DNeasy emboîtée sur un tube de collecte de 2ml, la figure 13 montre la colonne de DNeasy utilisée pour l'extraction ;



**Figure 13.** Colonne mini spin DNeasy (Qiagen) utilisée (photo originale).

- **Etape de purification liquide-solide**

L'ADN génomique a été purifié suivant un protocole modifié aux protocoles de Lemke *et al.* (2011) et Shi *et al.* (2018), en utilisant les colonnes de DNeasy (fournisseur : Qiagen). Cette étape de purification se comporte trois étapes successives.

- Etape d'adsorption

Nous avons utilisé des colonnes de silice pour purifier l'ADN extrait. Où, l'ADN libéré en solution va être adsorbé dans des conditions chaotropiques à l'aide d'un tampon d'adsorption qui contient : 2 M hydrochlorate de guanidine.

9. Ajouter 1,5x Volume du tampon d'adsorption au lysat puis mélanger par inversement ;
10. Centrifuger les tubes à 6000g pendant 1 min, éliminer la solution filtrée et conserver le tube collecteur ;
11. Si nécessaire, charger le lysat restant dans une mini colonne pour une autre centrifugation de sorte que tout le mélange de lysat soit passé à travers cette colonne de silice ;

- Etape de lavage

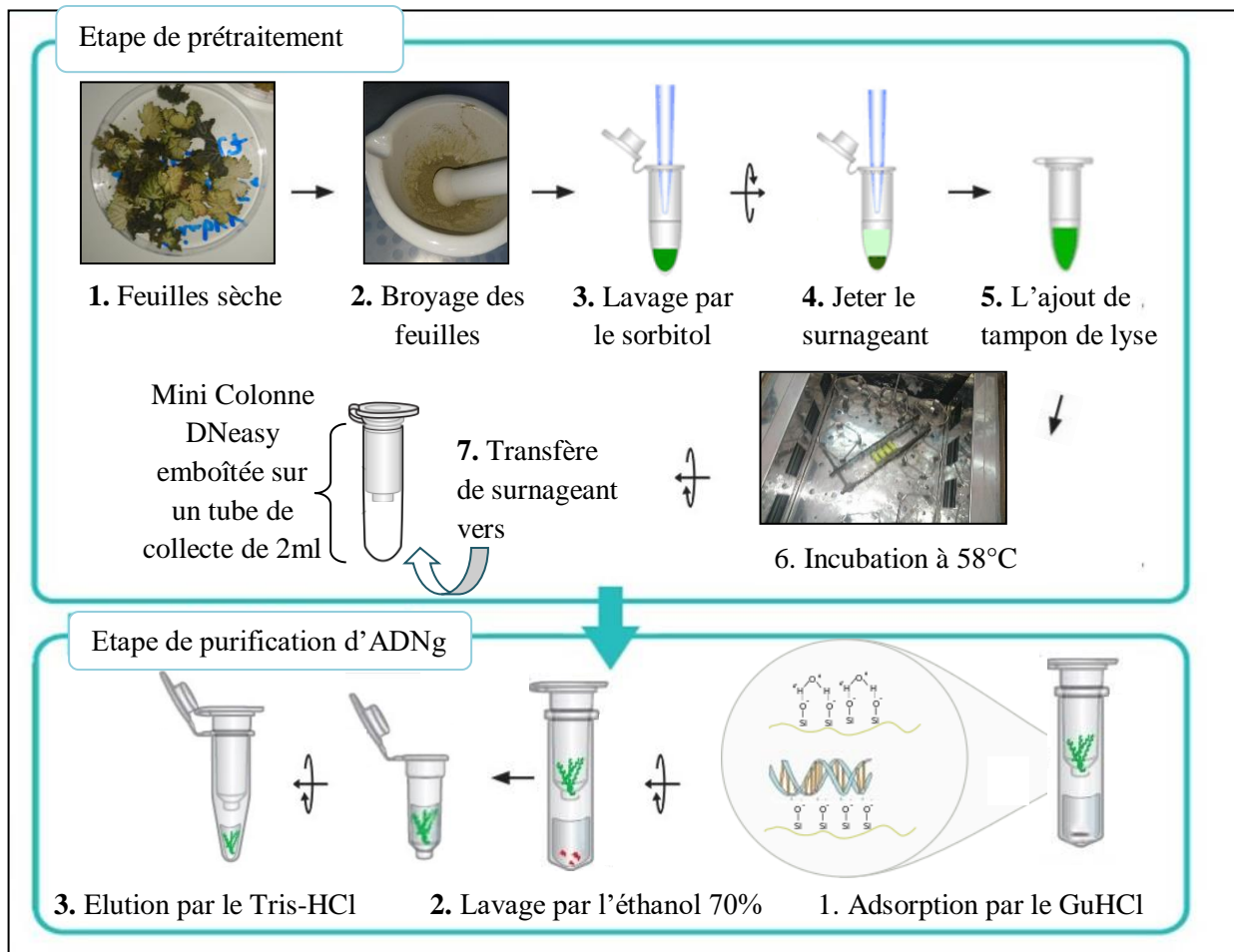
Pour laver les colonnes de silice de tous les débris et les contaminants on utilise un tampon de lavage approprié à base d'éthanol.

12. Effectuer un lavage par l'ajout de 400µl d'éthanol 70 % (Katevatis *et al.*, 2017) et centrifuger les tubes à 6000g pendant 1 min, éliminer la solution filtrée ;
13. Insérer les mini colonnes dans un nouveau tube de collecte de 1,5ml et ensuite les sécher à l'air libre pendant 10 minutes ;

- Etape d'élution

Finalement, pour détacher l'ADN de la membrane de silice, un tampon d'élution a été utilisé qui contient 10 mM Tris-HCl (pH 8,5).

14. Ajouter 400µl de tampon d'élution et incubé les tubes à une température ambiante pendant 5 min ;
15. L'ADN élué est ensuite récupéré dans des tubes de collecte après une centrifugation à 6000g pendant 1 min.



**Figure 14.** Illustration schématique des différentes étapes de P3.

### 3.5.3. Evaluation de la qualité et la quantité d'ADN extrait

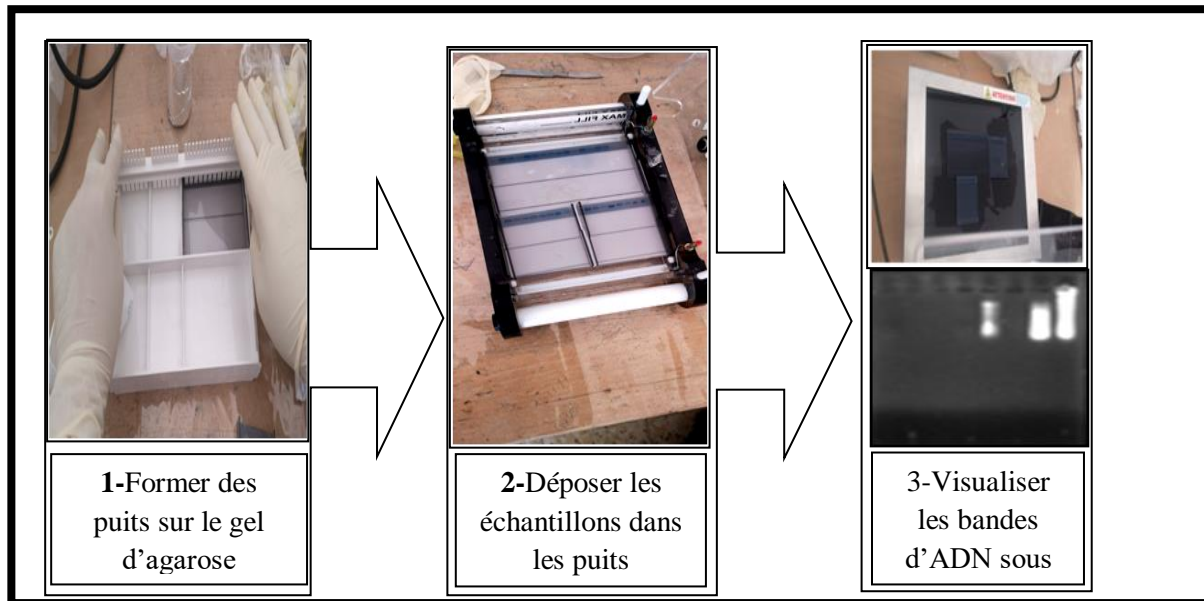
#### 3.5.3.1. Vérification de l'intégrité d'ADN

L'intégrité d'ADN extrait ainsi que sa présence ont été vérifiées par l'électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8% (Annexe 3).

Préparation et dépôt des échantillons (Fig.15) :

- dans un tube mettre 6  $\mu$ l de l'échantillon et ajouter 2  $\mu$ l du colorant de chargement (Annexe 4) ;
- déposer délicatement les échantillons, et noter son ordre ;
- placer le gel dans la cuve et s'assurer qu'il est recouvert de tampon TAE 1X (Annexe 5) ;
- brancher les fils et mettre le générateur de puissance sous tension à 100 volts pendant 17 min ;
- à la fin de la migration, l'ADN a été visualisé sous U.V après coloration au BET (Fig.15).

**Remarque :** Le BET s'intercale entre les bases azotées de la double hélice d'ADN et devient fluorescent après excitation par les ultraviolets. Plus le fragment d'ADN est long, plus la coloration émise est intense.



**Figure 15.** Visualisation de l'ADN obtenu (photos originaux).

### 3.5.3.2. Détermination du rendement d'extraction et la concentration d'ADN extrait

La spectrophotométrie ultra violette est la plus couramment utilisée pour la détermination de la concentration d'ADN. Les structures de résonance des bases pyrimidiques et purines sont responsables de ces absorptions (Surzycki, 2000).

#### a. Rendement de l'extraction

Le rendement a été calculé en réalisant le rapport entre la quantité d'ADN obtenue et le masse initiale utilisée (Bienvenu *et al.*, 1999).

#### b. Concentration de l'ADN extrait

L'ADN peut être mesuré directement dans des solutions aqueuses, par une mesure effectuée à 260 nm dans des solutions diluées au 1/100 ou 1/50 (selon le procédé), sachant que 1 unité d'absorbance correspond à 50 µg/ml d'ADN.

La concentration d'ADN extrait est calculée comme suit :

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

### c. Détermination de la pureté d'ADN extrait

L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un ratio. Les indications de la pureté ainsi les ratios sont représentés dans le tableau 5 ci-dessous :

**Tableau 5.** Ratio, valeur et l'indication de pureté d'un échantillon d'ADN extrait.

Ratio	Valeur	Indication de pureté
A260nm/A280nm	>2,0	Contamination par les ARNs (Surzycki, 2000 ; Tiwari <i>et al.</i> , 2017)
	1,8-2,0	ADN pur (Surzycki, 2000)
	< 1,8	Contamination par des protéines et substance aromatique (Surzycki, 2000 ; Tiwari <i>et al.</i> , 2017)
A260nm/A230nm	>1,8	ADN pur (Ahakoud, 2015 ; Varma <i>et al.</i> , 2007)
	<1,8	Contaminants copurifiés ( polyphénols, polysaccharides) ou contamination par des solvants (phénol) (Varma <i>et al.</i> , 2007 ; Tiwari <i>et al.</i> , 2017)

#### 3.5.4. Amplification in vitro de l'ADN extrait par PCR

Afin de vérifier la présence d'ADN extrait et confirmer sa pureté, des PCRs sont effectuées en utilisant un couple d'amorces encadrant des courtes régions. Les fragments d'ADN à amplifier sont des marqueurs SSRs ou microsatellites qui sont l'une des nombreuses variations des séquences nommées variable number of tandem repeats (VNTR) et se composent de 1 à 5 nucléotides répétés (Ben-Ari et Lavi, 2012). Les SSRs sont largement utilisés dans les programmes de sélection végétale, ainsi que dans les études évolutives, en

raison de leur grande capacité à montrer la diversité entre les cultivars (Uddin et Cheng, 2015).

L'amplification est effectuée par le couple d'amorce: VVMD7/VVMD7r (Fournisseur: STAR-LAB International), le tableau 6 présente les amorces utilisées avec leurs caractéristiques. La spécificité de ces amorces a été préalablement validée par une étude antérieure dans la caractérisation génomique des variétés du *Vitis vinifera* L. (Bowers *et al.*, 1996).

**Tableau 6.** Locus, séquence d'amorce, température d'hybridation et la longueur du fragment obtenu.

Locus marqueur	Séquence des primer (5'---3')	Tm (C°)	Taille attendue (pb)	Motif de répétition
VVMD7	AGAGTTGCGGAGAACAGGA	56 et	Variait entre 233 et 263	Parfait (CT)
VVMD7r	CGAACCTTCACACGCTTGAT	58,4		

#### 3.5.4.1. Préparation du mix PCR

La réaction est effectuée dans 20 µl de mix contenant notamment de 10 ng d'ADN extrait, de 200 µM de chaque dNTP, 20 pmole de chaque amorce, de 0,5 U de *Taq* polymérase et 2 µl de tampon PCR 10X (Bowers *et al.*, 1996).

#### -Risque de contamination de la PCR

Au cours de l'expérience, il y a des risques d'introduction involontaire des contaminants dans le tube de la réaction. Ceci peut conduire à de faux résultats positifs ou négatifs. Un tube « témoin négatif » dépourvu d'ADN contenant de l'H<sub>2</sub>O est nécessaire à chaque amplification, afin de s'assurer de l'absence de contamination (Ausubel *et al.*, 2003).

#### 3.5.4.2. Déroulement de la PCR

Nous utilisons une technique de PCR conventionnelle. Une fois tous les éléments réunis (ADN génomique et mix de PCR), l'échantillon est placé dans un thermocycleur (PRIME : Standard) puis traité selon le protocole suivant (Voir le tableau 7).

Pour établir la température d'hybridation des amorces, il est admis qu'il faut soustraire 5 degrés à la température de fusion (Ameziane *et al.*, 2005). Nos amorces ayant une Tm de 56 à 58°C, la température d'hybridation théorique optimale serait entre 51 à 53°C.

**Tableau 7.** Programme d'amplification de la réaction en chaîne par polymérase selon Bowers *et al.* (1996).

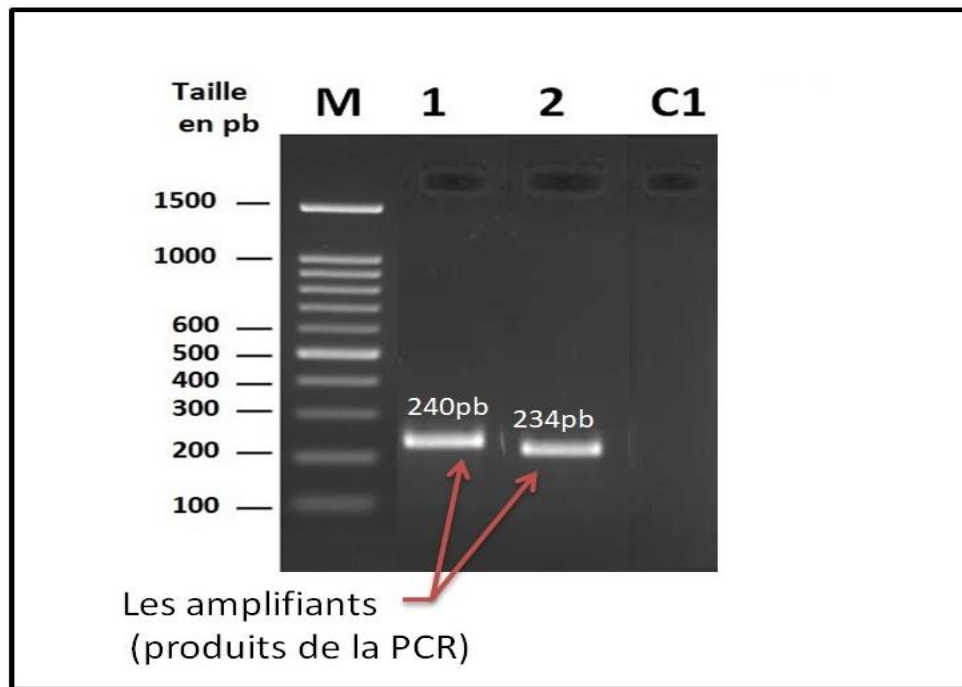
Nombre des cycles	Etape	Température (C°)	Durée
	Dénaturation initiale	94	2 min
X40	Dénaturation	92	30 s
	Hybridation	52	30 s
	Elongation	72	2 min
	Elongation finale	72	7 min
	Conservation	4	Indéfiniment

#### 3.5.4.3. Vérification du résultat de la PCR

Les produits de PCR sont vérifiés par une électrophorèse sur gel d'agarose 2%, de tampon TAE 1X et de Bromure d'éthidium (BET). Les échantillons (5µl de l'ADN amplifié) et 2 µl de bleu de bromophénol comme indicateur de front, qui permet de suivre le bon déroulement de la migration lors de l'électrophorèse, sont déposés sur le gel d'agarose. Ainsi qu'un 5µl de marqueur de poids moléculaire (marqueur de poids moléculaire 100pb DNA ladder), contenant plusieurs fragments de taille connue est déposé dans les puits de gel d'agarose.

Le gel d'agarose est soumis à un champ électrique pendant 10 min sous un courant de 40 volts, puis en évolue à 100 volts durant 30 min. Dans ces conditions, les fragments d'ADN sont séparés en fonction de leur taille. La fixation du BET (0,1µg/1µl) marqueur fluorescent à la lumière U.V à l'ADN va permettre d'augmenter sa fluorescence, ainsi de visualiser les produits de PCR sous forme d'une bande, comme le montre la figure 16.





**Figure 16.** Exemple des produits de la PCR vérifiés sur un gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium. Puits M : marqueur moléculaire de 100pb jusqu'à 1500pb. Puits 1 et 2 : les amplifiants. Puits C1 : control négatif.

**- Chapitre 4 -**  
**Résultats et discussion**

L'identification génétique des différentes variétés de la vigne requiert un ADN génomique à haute qualité et de bonne quantité. De nombreux protocoles d'extraction sont décrits à la littérature comme (Dellaporta *et al.*, 1983 ; Doyle et Doyle, 1987 ; Bowers *et al.*, 1993 ; Piccolo *et al.*, 2012), mais leur application reste limitée par la disponibilité des moyens et des équipements appropriés. Il est difficile de choisir un protocole adéquat à réaliser, ce qui rend une adaptation des différentes étapes de certains protocoles une nécessité.

L'espèce *Vitis vinifera* L. est connue par sa richesse en métabolites secondaires tels que les polysaccharides, les polyphénols et en biomolécules comme les protéines (Lodhi *et al.*, 1994), ces derniers sont considérés comme des contaminants peuvent interférer avec l'ADN et inhiber l'application de la PCR et des autres applications en aval. L'objectif de ce travail a donc été de mettre au point à partir des travaux déjà engagés avec l'équipe de master de l'année passée (2019).

Le protocole d'extraction d'ADN décrit dans la publication de Piccolo *et al.* (2012) a été optimisé, afin d'obtenir un protocole efficace, rapide, moins coûteux et permet d'extraire un ADN propre et de bonne qualité.

#### 4.1. Résultats

Les travaux déjà engagés dans l'année passée par l'équipe de master qui est encadré par notre enseignante ACHOUR H. dont ils sont essayés d'appliquer le protocole de Piccolo *et al.* (2012) sur les feuilles sèches conservées et fraîches. Cependant, ils ont obtenu des résultats négatifs. Ils ont essayé d'adapter le protocole pour faire l'extraction au niveau le laboratoire d'El-Hadjeb mettant en considération la disponibilité des moyens et des équipements nécessaires à la manipulation. Ils ont appliqué ce protocole mais sans l'utilisation des feuilles congelées à ultra-basse température (-80°C) qu'elle assure une préservation fiable à long terme des échantillons (Huang *et al.*, 2016), ainsi qu'un broyage qui s'effectue plus facilement et rapidement. Malheureusement, un congélateur de ce type n'est pas disponible au niveau de notre laboratoire, ainsi ni de traitement par RNase A été faite.

Plusieurs problèmes ont été rencontrés après l'application de protocole de Piccolo *et al.* (2012) : 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 (Fig.17) ça due à l'utilisation d'un trop de matière (200-300mg) par rapport au tampon d'extraction (700µl).



**Figure 17.** Aspect de l'échantillon après l'ajout du tampon de lyse (photo originale). A) Formation d'une pâte après l'ajout du tampon de lyse à la poudre des feuilles. B) Après centrifugation (étape 3) la phase soit absente soit le volume est réduit.

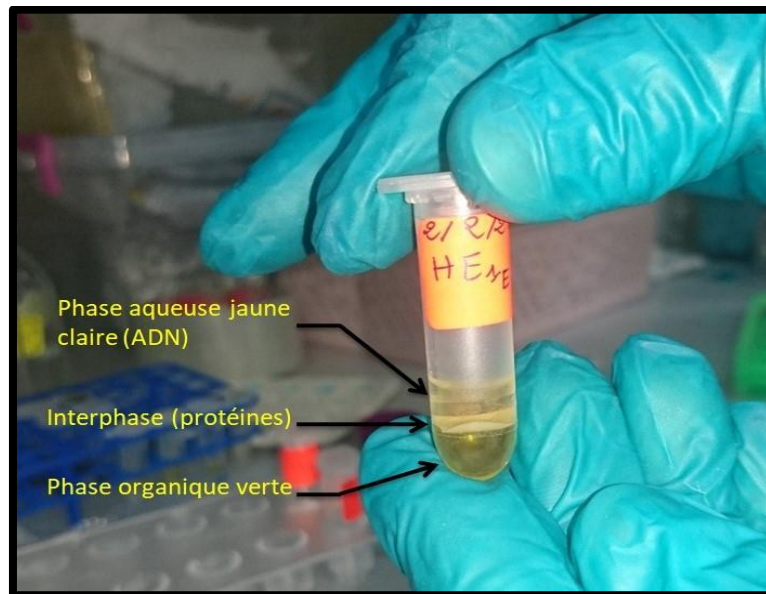
#### 4.1.1. Protocole (P1)

Le protocole P1 est une version améliorée du protocole de référence. Nous avons extrait l'ADN de cinq échantillons différents des feuilles de la vigne (SE1E, JE1L, TE1E, TE1L et HE1L). Au cours de l'extraction, les échantillons ont montré des couleurs allant du brun foncé au vert foncé (Fig.18).



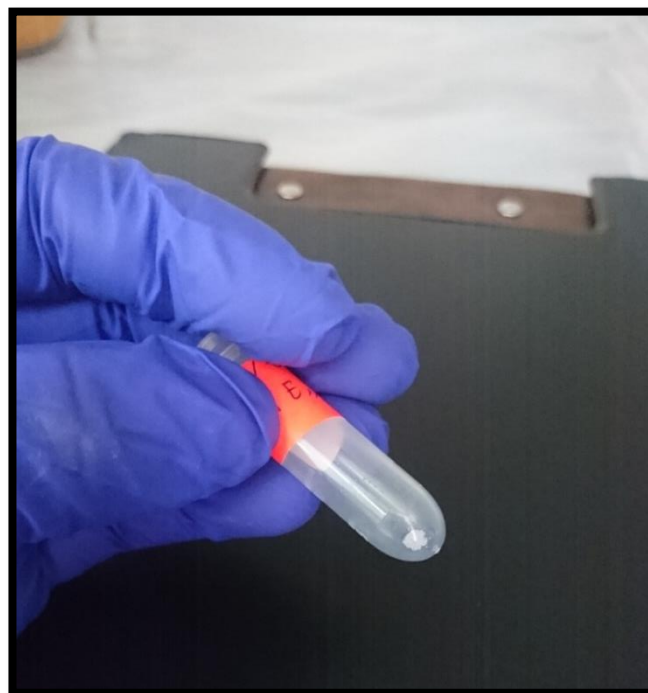
**Figure 18.** Différentes teintes du surnageant obtenues au cours de l'extraction (photo originale).

Après la répétition de traitement des échantillons par le chloroforme-alcool isoamylique, la phase inférieure d'une couleur verte est retrouvée sous une phase aqueuse jaune claire (Fig.19).



**Figure 19.** Différentes phases obtenues après lavage au chloroforme/alcool isoamylique (24:1) (photo originale).

Après les précipitations, nous avons pu apercevoir un culot d'ADN blanchâtre, aperçu dans quelques tubes (Fig.20).



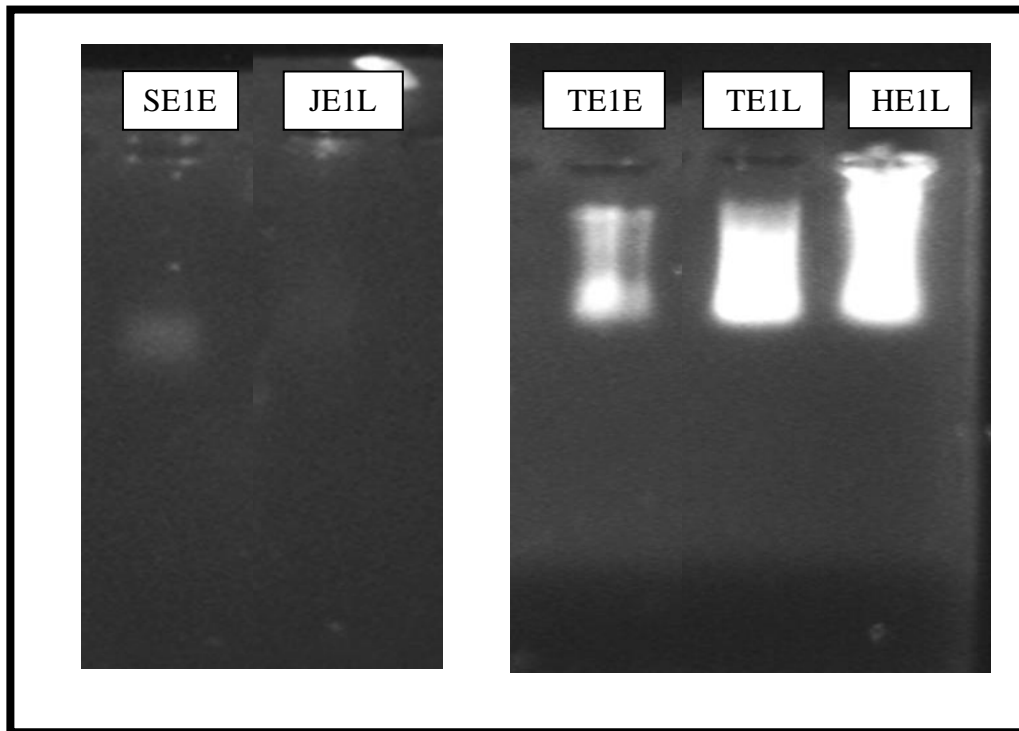
**Figure 20.** Pelote d'ADN obtenu (photo originale).

#### 4.1.1.1. Résultats de migration électrophorétique

Les extraits obtenus ont été mis à migrer sur un gel d'agarose (0,8%) sous une tension de 100 volts, suivie d'une coloration en BET puis visualisation sous U.V (Fig.21). Ce gel révèle la présence et l'intégrité d'ADN extrait. Les bandes de migration obtenues dans la figure 21 donne une indication sur la nature et la densité de l'échantillon.

D'après le profil électrophorétique, les cinq échantillons extraits ("SE1E", "JE1L", "TE1E", "TE1L" et "HE1L") ont donné un résultat positif. Nous avons remarqué que l'ADN des échantillons TE1L et HE1L (des feuilles lyophilisées et conservées pendant 5 mois) ayant présenté des bandes qui ont montré une forte intensité ceci est dû à une concentration élevée en ADN. L'ADN de ces échantillons doit être dilué. De plus, la bande d'ADN obtenu de l'échantillon TE1E (feuilles séchées à l'étuve et conservés pendant 5 mois) représente un signal un peu faible aux autres. Il semble qu'une partie de l'ADN de cet échantillon a été éliminée par défaut de manipulation. Alors que, l'échantillon d'ADN SE1E ayant présenté une bande qui a montré une assez faible intensité ceci est dû à la faible concentration en ADN. L'échantillon JE1L donne une bande à très faible signal, ceci peut être expliqué par l'élimination de l'échantillon par défaut de manipulation.

L'ADN qui résulte de ces échantillons conservés, semble être intact (il n'est pas dégradé en fragments de taille moindre) puisque tous les fragments semblent d'une seule bande. Les résultats obtenus (Fig.21) laissent fortement envisager que les deux méthodes de séchage, soit la lyophilisation ou le séchage à l'étuve ventilée, sont efficaces. Cependant, la méthode de séchage au lyophilisateur a permis d'obtenir une concentration élevée d'ADN donc de bien conserver le matériel génétique à longue période (pendant 5 mois). Les mesures des DO peuvent alors suffire pour conclure sur les concentrations.

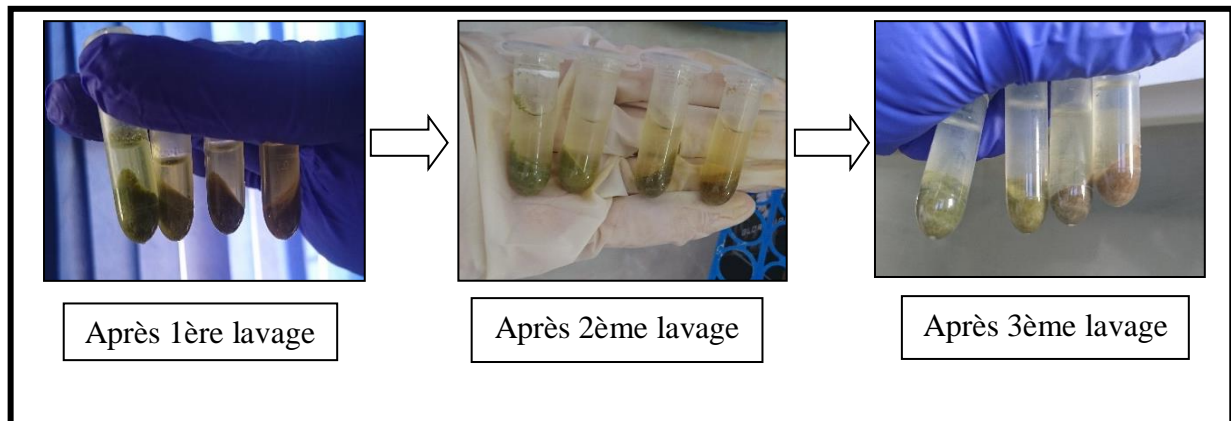


**Figure 21.** Profils électrophorétiques d'ADN génomique extrait des feuilles de la vigne, après l'application du protocole (P1). Une électrophorèse sur un gel d'agarose à (0,8%) après coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V. Les puits : SE1E (Simbark), JE1L (Djbel), TE1E (Tamri), TE1L (Tamri) et HE1L (Ahmar bou-Amer).

#### 4.1.2. Protocole (P2)

La deuxième extraction a été faite à l'aide du deuxième protocole (P2) à partir des quatre échantillons : " TE1L" et " HE1L" (des feuilles lyophilisées et conservés pendant 5 mois), "TE1E" et "HE1E" (des feuilles séchées à l'étuve et conservés pendant 5 mois).

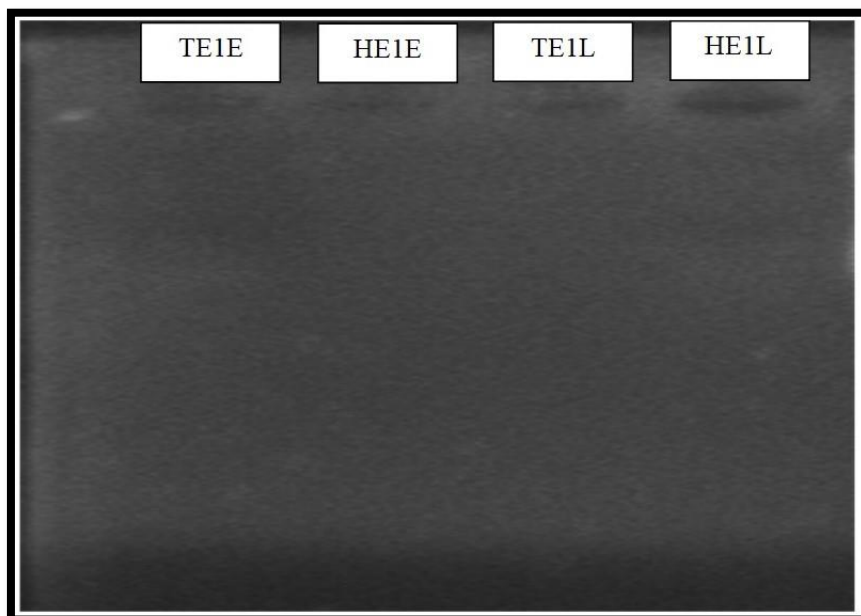
Ce protocole a été modifié par l'ajout de tampon de lavage avant l'extraction. Le tampon de lavage à base de sorbitol a été préparé un jour avant la manipulation et conservé à +4°C. Après l'ajout de tampon de lavage, les tubes sont centrifugés, les surnageant obtenus des échantillons ont montré des couleurs dégradées allant de la brune claire à la verte claire (Fig.22). Pourtant l'étape de lavage a été répétée deux fois, tous les échantillons présentaient une teinte verdâtre. Tandis qu'après le troisième lavage le surnageant obtenu semble de couleur jaune claire ceci indique à une élimination efficace des contaminants (Fig.22).



**Figure 22.** Lavage des échantillons au tampon à base de sorbitol.

#### 4.1.2.1. Résultats de migration électrophorétique

D'après le profil électrophorétique (Fig.23), les quatre échantillons soit pour les échantillons séchés à l'étuve ventilée ou lyophilisés ne donnent aucun résultat, ceci peut indiquer l'absence de l'ADN génomique. Mais, on ne peut pas juger l'efficacité de ce protocole à partir d'une seule essai, car le tampon de sorbitol est efficacement utilisé par les équipes de Inglis *et al.* (2018) et Lucas *et al.* (2019), on suspecte une erreur lors de la manipulation. Toutefois, ce protocole doit être répété pour confirmer leur efficacité, ainsi qu'on peut l'optimiser après.



**Figure 23.** Profil électrophorétique d'ADN génomique des feuilles de la vigne obtenu après l'application du protocole (P2). Une électrophorèse sur un gel d'agarose à (0,8%) après coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V. Les puits : TE1E (Tamri), HE1E (Ahmar bou-Amer), TE1L (Tamri) et HE1L (Ahmar bou-Amer).



## **4.2. Discussion analytique**

### **4.2.1. Préparation des échantillons pour l'analyse**

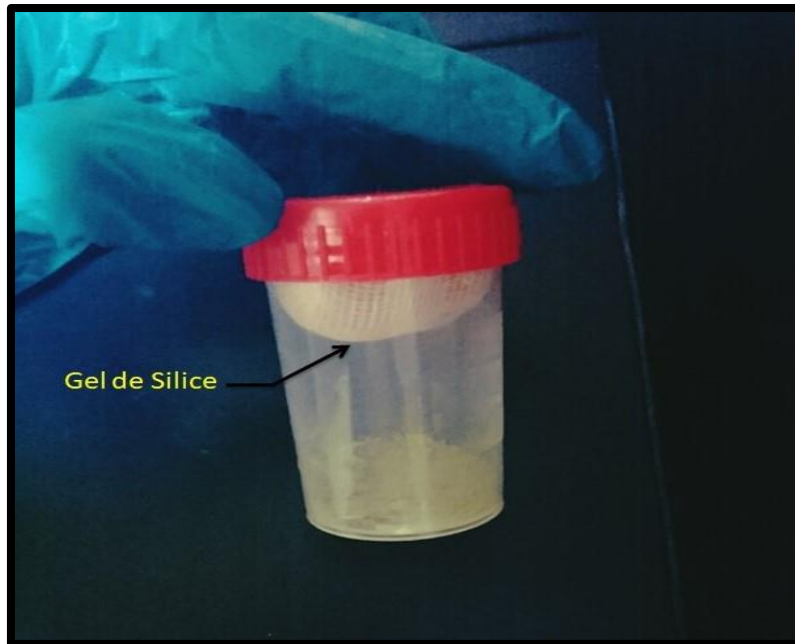
L'extraction d'ADN à partir des plantes présente des difficultés particulières par rapport aux tissus animaux, premièrement parce que les plantes ont une paroi cellulaire qui nécessite des techniques spécifiques pour être interrompues, et deuxièmement parce que les plantes contiennent des métabolites secondaires qui favorisent la dégradation de l'ADN, ce qui rend les échantillons visqueux et l'ADN non amplifiable (Hanania *et al.*, 2004).

Nous avons fait l'extraction de l'ADN à partir des feuilles séchées à l'étuve ventilée à 27°C pendant cinq jours et des feuilles lyophilisées. Nous avons utilisé deux méthodes de séchage, c'est pour optimiser un protocole de préparation des feuilles tout en ayant un impact minimum sur la qualité d'ADN extrait.

#### **4.2.1.1. Broyage des échantillons**

Il existe différentes méthodes pour broyer les tissus de végétaux, mais pour obtenir une bonne granulométrie sans altération des tissus, le broyage dans un mini-mortier et au pilon dans l'azote liquide est la méthode la plus fiable. Cependant, au niveau de notre laboratoire l'azote liquide est indisponible et même son transport est difficile, c'est pour ça nous avons optimisé une méthode de broyage facile et moins coûteuse et permet d'obtenir une poudre fine sans que l'échantillon subisse un cycle de congélation/décongélation. La qualité du broyage est essentielle car trop broyés, les tissus sont dégradés, et pas assez broyés, ils ne permettent pas un accès optimum au tampon d'extraction.

Nous avons bien séché les jeunes feuilles de la vigne soit à l'étuve ventilée ou dans le lyophilisateur. Les feuilles sèches sont faciles à broyer dans un mortier et au pilon, la poudre obtenue est transférée dans un pot stérile de prélèvement (de 50 ml). Les échantillons peuvent être ainsi conservés plusieurs mois à température ambiante en présence de gel de silice (Fig.24).



**Figure 24.** Conservation des feuilles broyées en présence de gel de silice (photo originale).

#### **4.2.1.2. Choix des feuilles par rapport aux autres tissus**

L'obtention d'ADN génomique en bonne quantité et qualité peut être influencée par l'âge et le type de tissu utilisé (tels que les feuilles, les tiges, les racines et les fruits) et aussi par la méthode de préparation de l'échantillon (Varma *et al.*, 2007). Les jeunes feuilles sont souvent les plus utilisées dans les études génétiques (Lucas *et al.*, 2019), parce qu'il est facile d'extraire leurs ADN (Marsal *et al.*, 2013) et elles se caractérisent par un grand nombre des cellules, aussi elles sont pauvres en métabolites secondaires comme les polysaccharides, les polyphénols, tannins...etc. Donc, elles présentent une source idéale pour l'isolement d'ADN pur et en bonne quantité. au contraire aux feuilles adultes qui sont riches en métabolites secondaires et l'ADN extrait serait de mauvaise qualité (Hanania *et al.*, 2004 ; Varma *et al.*, 2007 ; Sahu *et al.*, 2012 ; Marsal *et al.*, 2013 ; Cantu *et al.*, 2019). Cependant, les autres tissus sont plus lignifiées et peuvent contenir de haute concentration des métabolites secondaires, ce qui peut nuire à l'isolement du matériel génétique (Lewinsohn *et al.*, 1994) ou d'inhiber la réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour amplifier le locus d'intérêt (Schori *et al.*, 2013). Par exemple, les racines de certaines espèces ont de grandes quantités de métabolites secondaires qui agissent comme des pesticides de défense naturelle, principalement contre les herbivores et les infections par des microorganismes pathogènes (Bourgaud *et al.*, 2001).

#### **4.2.1.3. Conservation des échantillons avant l'analyse**

La plupart des protocoles extraient l'ADN à partir des tissus frais, mais nous avons utilisé des feuilles conservées c'est à cause des plusieurs problèmes, parfois les échantillons

collectés à partir des endroits éloignés, où nous avons trouvés des problèmes pour transporter rapidement les collectes au laboratoire. Ainsi, la dépendance évidente au cycle biologique de la plante où le moment optimal pour la collecte des feuilles était pendant la période d'élongation active des pousses après le débourrement et avant le début de la chute des feuilles au demi novembre (Lodhi *et al.*, 1994 ; Ghaffari *et al.*, 2011) de plus, avant la période de dormance hivernal qui empêche toute extraction d'ADN (Marsal *et al.*, 2013). Après tous ces problèmes, nous avons obligé d'optimiser un protocole de conservation des feuilles pour pouvoir extraire l'ADN dans n'importe quel moment, sans attendre la période de croissance des organes végétatifs (les jeunes feuilles).

Les feuilles déshydratées sont caractérisées par un teneur en eau faible dans les tissus et par conséquent la processus catabolique à l'intérieur de la cellule va être réduit à cause de ralentissement de l'activité catalytique des nucléases et protéases (Nunes *et al.*, 2011). Cette déshydratation est achevée par plusieurs méthodes de séchage qui doivent être efficaces pour une déshydratation complète et certainement satisfaisante, et par conséquent elle permet de la conservation des feuilles pour une longue durée et les utiliser selon la nécessité avec peu de perte de qualité de l'ADN. Ainsi, les feuilles sèches peuvent être facilement broyées, sans la coupure de l'ADN (Clark, 1997), en obtenant une poudre fine et on peut les utiliser dans n'importe quel moment pour extraire l'ADN, sans attendre la période de croissance des organes végétatifs (feuilles plus jeunes) (Murray et Thompson, 1980 ; Khanuja *et al.*, 1999 ; Sharma *et al.*, 2002).

Pour éviter la contamination et la dégradation d'ADN due à l'humidité au cours de conservation de nos échantillons, le gel de silice est utilisé pour conserver nos feuilles récoltées sur le terrain par conséquent en préservant l'intégrité de l'ADN (Chase et Hills, 1991) à fin d'établir notre étude moléculaire. L'utilisation de gel de silice non seulement pour son propriété de conservation mais aussi pour sa facilité d'utilisation, de plus il est peu coûteux (Chase et Hills, 1991).

## **4.2.2. Optimisation des techniques d'analyse**

### **4.2.2.1. Technique de référence**

L'extraction du matériel génétique (l'ADN) à partir de tissus de l'espèce *Vitis vinifera* est une étape primordiale pour la caractérisation moléculaire de cette espèce. Plusieurs protocoles d'extraction et purification décrites à littérature sont théoriquement appropriés pour *Vitis vinifera*. Le protocole s'inspire d'une méthode couramment employée chez les plantes (Doyle et Doyle, 1990) et d'une autre plus spécifique à la vigne (Piccolo *et al.*, 2012).

Le protocole d'extraction de Piccolo *et al.* (2012) à l'espèce étudiée (*Vitis vinifera*) consiste d'extraire l'ADN génomique selon la méthode modifiée de CTAB qui permet d'une extraction rapide à partir d'une petite quantité des feuilles de la vigne sans l'utilisation de l'azote liquide.

L'extraction de l'ADN génomique par protocole de Piccolo *et al.* (2012) s'effectue en plusieurs étapes. Les feuilles congelées (-80°C) ont été broyées en poudre avec un mortier et un pilon pour détruire la paroi cellulaire et les membranes cytoplasmiques. Les poudres (200-300 mg) ont été immédiatement transférées dans des tubes eppendorfs de 1,5 ml, une quantité de 700 µl de tampon CTAB préchauffé (60-65°C) a été ajouté au broyat, ce tampon est 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-Mercaptoethanol.

Le protocole utilise un excellent détergent le CTAB (2%) qui un détergent cationique permet d'augmenter la solubilité de la membrane cellulaire et dissocier les protéines aux bicouches lipidiques, ce qui perturbe la membrane cellulaire en libérant les acides nucléiques (Surzycki, 2000 ; Palomera-Avalos *et al.*, 2008). Ainsi que, l'augmentation de la concentration du chlorure de sodium de 1,4 M (Doyle et Doyle, 1990) à 2,5 M provoque une amélioration significative dans la pureté d'ADN. En effet, l'utilisation de CTAB avec une forte concentration en sel permet de réduire la co-précipitation des polysaccharides (Hanania *et al.*, 2004 ; Hasan *et al.*, 2008 ; Henry, 2008 ; Marsal *et al.*, 2011 ; Marsal *et al.*, 2013).

Selon Henry (2008), l'ajout de Tris-HCl dans le tampon de lyse c'est pour contrôler le pH de la solution d'extraction. Alors que, l'EDTA est utilisé pour éviter la dégradation d'ADN par l'ADNase, car ce réactif est un chélateur des ions bivalents comme l'ion de magnésium qui est un cofacteur des ADNases (Surzycki, 2000). Le PVP fut aussi utilisé pour éliminer les polyphénols et les séparer à l'ADN (Palomera-Avalos *et al.*, 2008 ; Demeke et Jenkins, 2010). Selon les études de Nazhad et Solouki (2008) et Ghaffari *et al.* (2011), le β-Mercaptoethanol est un agent antioxydant qui empêche l'oxydation des polyphénols et il sert aussi à l'élimination des protéines.

Après l'ajout de tampon de lyse aux échantillons, les tubes ont été agités et incubés à 65°C pendant 60 min dans un bain-marie puis mélangés par inversion 3-4 fois. Le but de cette étape est de bien homogénéiser et solubiliser le milieu de la réaction, afin d'éviter la formation d'un mélange gélatineux, ceci permet l'accélération de la réaction de lyse (Armaleo et Clerc, 1995). La centrifugation des échantillons permet de retirer aisément les débris cellulaires après la lyse des cellules (Hasan *et al.*, 2008).

Ensuite, le protocole de Piccolo *et al.* (2012) utilise un mélange de chloroforme: alcool isoamylique (24: 1) qui a pour but de dénaturer les protéines en solution (purification en utilisant les solvants organiques). Ce lavage est nécessaire, dont le chloroforme est un solvant organique, leur action à éliminer les protéines est basée sur la dénaturation des chaînes polypeptidiques pour les immobiliser dans l'interphase entre chloroforme et l'eau. Le chloroforme est non miscible avec l'eau (la phase aqueuse) c'est pour ça l'alcool-isoamylique est ajouté comme un émulsifiant pour former une émulsion et augmenter la surface d'interphase entre le chloroforme et l'eau pour favoriser une précipitation efficace des protéines (Armaleo et Clerc, 1995 ; Kim *et al.*, 1997 ; Surzycki, 2000 ; Varma *et al.*, 2007). La centrifugation à 4°C au lieu de 25°C favorise l'obtention d'une interphase plus compacte entre les phases aqueuses et organiques permettant une meilleure séparation (Ripoll *et al.*, 2011).

En fin, pour précipiter l'ADN, un volume égal d'isopropanol froid (-20°C) a été ajouté. L'isopropanol a l'avantage de précipiter les molécules à haut poids moléculaire, donc il permet la précipitation d'ADN qui est insoluble dans les alcools (Green et Sambrook, 2017 ; Cantu *et al.*, 2019). Les échantillons ont été mélangés et incubés à -20°C pendant 30 min, cette incubation froide est pour but de récupérer le maximum des molécules d'ADN existantes. On obtient alors l'acide nucléique sous forme une pelote que l'on récupère par centrifugation (Cantu *et al.*, 2019). Le culot d'ADN a été lavé avec 500 µl d'éthanol 70% (-20°C) et centrifugé à 14 000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le lavage avec l'éthanol est nécessaire parce que il permet d'éliminer toutes traces d'isopropanol ou des autres traces des réactifs d'extraction (Demeke et Jenkins, 2010). Le culot résultant a été séché à l'air, à température ambiante où le séchage est obligatoire pour éliminer l'éthanol qui pourrait empêcher la dissolution ultérieure du culot.

Pour dissoudre le culot d'ADN obtenu, 200 µl de tampon TE (constitué de 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) et 1 mM EDTA (pH 8.0)) a été ajouté. La dissolution de l'ADN dans le tampon TE est pour le conserver sous des conditions optimales qui limitent leur dégradation: à pH 8,0. L'EDTA permet de chélater les ions bivalents et donc d'inhiber les nucléases qui peuvent dégrader l'ADN (Heikrujam *et al.*, 2020). Mais les ARNs réduites la chance d'obtenir un ADN de bonne qualité, leur traitement par une enzyme est nécessaire à ce stade. La RNase A est un endoribonucléase utilisée pour éliminer les ARNs (Jadhav *et al.*, 2015), elle a été ajoutée à chaque échantillon (1/100 µl d'échantillon d'ADN) et incubée à 37°C pendant 1 h. Puis l'ADN a été conservé à -20°C.

### **a. Inconvénients**

Le protocole de Piccolo *et al.* (2012) a fait des modifications dans la méthode CTAB en vue d'obtenir un ADN de bonne qualité et en bon rendement. Mais ce protocole utilise seulement une lyse chimique qui a été réalisée par une concentration moyenne de CTAB (2%). Plus l'étape de lyse est complète, plus on obtient un meilleur rendement.

De plus, ce protocole utilise le chloroforme qui est un solvant organique pour éliminer les protéines. Mais, les solvants organiques sont nocifs pour l'utilisateur et l'environnement, le phénol ou le chloroforme résiduel peut affecter les applications en aval telle que la PCR (Tan et Yiap, 2009 ; Thatcher, 2015). Cette méthode présente un autre inconvénient représenté par la dissolution de l'ADN dans le tampon TE, ce dernier contient 1mM d'EDTA qui peut bloquer la réaction de PCR (Demeke et Jenkins, 2010).

En outre, cette technique nécessite un échantillon de départ important (200 à 300 mg des feuilles) avec l'utilisation d'un faible volume de tampon de lyse (700µl) et qui ne permet pas de bien lyser toutes les cellules ce qui provoque un faible rendement d'ADN extrait. De plus, ce protocole est long et fastidieux donc inadaptée en routine.

#### **4.2.2.2. Protocole amélioré P1**

Une des parties les plus ardues dans ce travail a consisté en la mise au point d'un protocole efficace pour extraire l'ADN à partir des feuilles conservées pendant une longue période. De plus, les feuilles de *Vitis vinifera* contiennent des quantités importantes de métabolites secondaires, ce qui limite l'utilisation d'ADN extrait en biologie moléculaire (Lodhi *et al.*, 1994).

Les polyphénols et les polysaccharides sont les principaux interférents dans la procédure d'isolement de l'ADN. Les polysaccharides sont difficiles à éliminer, leur présence en grandes quantités rend l'homogénat tissulaire très visqueux et donne une fausse indication de la présence de grandes quantités d'ADN. Ils co-précipitent souvent avec l'ADN et lui confèrent une consistance collante et visqueuse. Sous cette forme, ils interfèrent également avec l'activité de plusieurs enzymes biologiques comme les polymérases, les ligases et les endonucléases de restriction (Varma *et al.*, 2007 ; Japelaghi *et al.*, 2011).

Les polyphénols peuvent provoquer la dégradation de l'ADN génomique, sont extrêmement variables dans leur occurrence et leur type. Lors de la lyse cellulaire, ils sortent des vacuoles et sont facilement oxydés par les oxydases cellulaires. Ces polyphénols oxydés subissent des interactions irréversibles avec les acides nucléiques (Khanuja *et al.*, 1999 ;

Japelaghi *et al.*, 2011). Ce qui rend nécessaire l'adjonction des agents antioxydants et adsorbants avec des concentrations appropriés comme le  $\beta$ -Mercaptoethanol (1%) et le PVP (2%), afin d'éliminer le co-isolement des contaminants indésirables avec l'ADN. L'ajout de  $\beta$ -Mercaptoethanol au tampon de lyse permet de dénaturer et d'inactiver certaines enzymes telles que les peroxydases, afin d'inhiber la réaction d'oxydation des composés phénoliques (Clemente et Salatino, 2010 ; Heikrujam *et al.*, 2020). Alors que, le PVP forme des liaisons hydrogènes complexes avec des composés polyphénoliques, ce qui permet de les retirer facilement avant qu'ils oxydent irréversiblement avec la molécule d'ADN (Yee *et al.*, 2018).

Apparemment, certaines étapes du protocole de Piccolo *et al.* (2012) doivent être adapté pour pouvoir proposer une méthode d'extraction d'ADN de qualité, relativement simple et applicable au niveau de notre laboratoire. Nous avons utilisé pour l'extraction d'ADN génomique 100 mg des feuilles déshydratées et conservées à température ambiante, qui sont préparées par des simples moyens, un séchage à l'aide d'une étuve ventilée ou lyophilisateur et un simple broyage dans un mortier sans l'utilisation de l'azote liquide.

Afin d'améliorer le rendement d'extraction, nous avons modifié le volume et les concentrations du tampon de lyse. 1ml de tampon de lyse utilisé au lieu de 700  $\mu$ l. Le CTAB (3%) en combinaison avec une haute concentration de NaCl (2,7%) ont été utilisés. Le CTAB c'est un détergent cationique permet de désorganiser les membranes et solubiliser les lipides membranaires sous forme de micelles. Cela permet de créer des pores membranaires suffisamment larges pour libérer le contenu de la cellule ( Marsal *et al.*, 2011 ; Marsal *et al.*, 2013 ).

La deuxième modification chimique au tampon de lyse, l'ajout d'un autre détergent qui est le tween 20 (0,5%) qui est un détergent non ionique va aider à la lyse membranaire et d'éliminer les protéines associées à la membrane (Xin *et al.*, 2003) .

La troisième modification réalisée pour renforcer la lyse chimique, nous avons ajouté 3 $\mu$ l de protéinase K (une lyse enzymatique) qui est une endoprotéase non spécifique utilisée pour dénaturer les protéines par une coupure protéolytique qui brise les liaisons peptidiques (Varma *et al.*, 2007). Toutes ces modifications sont testées après l'étape initiale d'incubation de 1h à 58°C, sous agitation continue. Donc, plus la lyse est complète plus le rendement de l'extraction est meilleur.

La forte concentration de NaCl utilisée avec le CTAB c'est pour former un complexe insoluble avec les polysaccharides et les protéines (Varma *et al.*, 2007 ; Ghaffari *et al.*, 2011).

En outre, l'ajout de ce sel va empêcher la séparation des deux brins de l'ADN, c'est grâce aux ions  $\text{Na}^+$  qui s'associent avec les groupements phosphate  $\text{PO}_4^-$  ce qui diminue les forces de répulsion qui s'exercent entre les deux brins d'ADN (Varma *et al.*, 2007 ; Hasan *et al.*, 2008 ; Ghaffari *et al.*, 2011 ; Sahu *et al.*, 2012). Pour obtenir un ADN intact et garder leur intégrité au cours de l'extraction, nous avons augmenté la concentration d'EDTA à 50 mM, une concentration idéale qui chélate les ions métalliques pour assurer une inactivation des enzymes nucléases (Surzycki, 2000).

Après l'incubation au bain marie, l'étape de purification est effectuée par l'ajout de chloroforme. Dont, le chloroforme a une capacité de débarrasser les protéines. Selon les études de Armaleo et Clerc (1995) et Demeke et Jenkins (2010), pour bien purifier l'ADN extrait, de préférence de faire double lavages par le chloroforme-alcool isoamylique.

La dernière modification correspond à une incubation froide avec l'isopropanol ( $-20^\circ\text{C}$ ) pendant une nuit pour bien précipiter l'ADN et assembler le maximum de ses molécules (Scaldferrri *et al.*, 2013). Après la centrifugation, le culot est directement mis à sécher et redissoudre dans 60 $\mu\text{l}$  d'eau bidistillée stérile.

La durée totale de notre protocole (P1) d'obtention d'ADN génomique de la vigne est alors de 18h 10min, il est plus long que le protocole de Piccolo *et al.* (2012) (Tab.9, page 54).

#### **4.2.2.3. Protocole amélioré P2**

Afin d'améliorer la pureté d'ADN extrait, nous avons ajouté une étape de lavage, avant de débiter la lyse cellulaire pour éliminer les métabolites interférents tels que les polyphénols et les polysaccharides (Russell *et al.*, 2010 ; Scaldferrri *et al.*, 2013 ; Inglis *et al.*, 2018). Le tampon de lavage utilisé est à base de Sorbitol ou encore le glucitol. Vu que l'isolement de l'ADN peut être particulièrement difficile pour les petits échantillons dégradés ou contenant des concentrations élevées des métabolites secondaires (polysaccharides et substances phénoliques), le sorbitol est pour but d'éliminer avant la lyse cellulaire les polysaccharides mucilagineux qui sont abrités dans les tissus végétaux (Russell *et al.*, 2010) et d'assurer également à inhiber les polyphénols-oxydases (Henry, 2008).

Au cours de cette étape de lavage, les échantillons sont suspendus dans 1 ml de tampon de sorbitol puis ont été bien mélangés et centrifugés à température ambiante, le lavage peut être répété jusqu'à l'obtention d'un surnageant de couleur plus claire.

Le volume et les constituants de tampon de lyse utilisé restant les mêmes (de protocole P1). Un agent tamponneur (100 mM Tris-HCl), un inhibiteur des DNases (50 mM EDTA),



des détergents (3% CTAB, 0,5% tween 20), sel pour solubiliser l'ADN (2,7M NaCl) et d'autres composants qui facilitent l'extraction (20mg/ml Protéinase K). Sans oublier l'ajout de 2% PVP et de 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol.

Le temps et la température d'incubation sont importants pour obtenir une grande quantité d'ADN de haute qualité (Thomson, 1995), pour cette raison nous avons effectué cette étape pendant une heure et demi. L'étude de Bokszczanin et Przybyla (2006) suggère que l'augmentation du temps d'incubation d'une heure à une heure et demi favorise une action optimale de tampon de lyse sur les membranes et les différents contaminants cellulaires.

#### 4.2.2.4. Protocole amélioré P3

Ce protocole est une version améliorée de protocole (P2), il est optimisé en termes de rapidité, de facilité de mise en œuvre et d'efficacité d'extraire un ADN pur.

Nous avons effectué une modification concernant les constituants de tampon de lyse utilisé, où nous avons ajouté le chlorure de lithium (2M), selon les études de Lefort et Douglas (1999) et Pirttilä *et al.* (2001), la présence de LiCl dans le tampon d'extraction sert à éliminer efficacement l'ARN, ce dernier est considéré comme un contaminant lors de l'isolement d'ADNg, il peut supprimer l'amplification par PCR et inhiber les applications en aval (Jobes *et al.*, 1995). Cette précipitation sélective par LiCl présente des avantages par rapport au traitement par RNase utilisé dans le protocole de référence en ce que d'une part, l'ARN est éliminé et non simplement dégradé en des plusieurs petites unités (Ribeiro et Lovato, 2007) et d'autre part que cette méthode est plus économique (Jobes *et al.*, 1995) (Tab.10, page 55).

Cependant, le volume de tampon de lyse ainsi que la durée d'incubation restent les mêmes de protocole (P2). Une autre modification a été ajoutée au niveau de l'étape de purification/précipitation d'ADN extrait ainsi que sa durée d'application. Les méthodes classiques utilisent la purification d'ADN génomique basée sur une extraction organique suivie d'une précipitation à base d'éthanol. Cependant, ces méthodes prennent du temps et nécessitent l'utilisation de solvants toxiques tels que le chloroforme et le phénol, qui peuvent être nocifs pour l'utilisateur et l'environnement (Shi *et al.*, 2018). Dont, une étude établie par l'Institute National de Cancer aux États-Unis sur le chloroforme est mentionnée par Fawell (2000) a montré que le  $\text{CHCl}_3$  est carcinogène. De plus l'alcool isoamylique utilisé dans le protocole de référence peut irriter les voies respiratoires et provoquer des graves lésions des yeux (Boust, 2009). C'est pour ces raisons, nous avons modifié l'étape de La purification

organique/précipitation par les alcools, par une autre méthode rapide, plus efficace et permet d'obtenir un 'ADN de haute qualité sans l'utilisation de solvants organiques. C'est la méthode de purification sur les colonnes de DNeasy (Qiagen) à base de silice. Ce type de colonne est utilisé par plusieurs kits commerciaux (Pipan *et al.*, 2018) où l'ADN pur peut être obtenu dans un délai de temps court (Varma *et al.*, 2007). Nous avons préparé tous les tampons utilisés à cette purification.

Le principe de purification sur les membranes de silice est basé sur la fixation d'ADN sur ces membranes (Abdel-Latif et Osman, 2017). Où, après la lyse cellulaire les molécules d'ADNg libérées dans la solution qui sont des polyanions chargés négativement, peuvent interagir grâce à une liaison hydrogène avec les groupes fonctionnels de la membrane de silice, principalement des groupes de silanol de surface (SiOH) (Rimola *et al.*, 2013), en condition d'une force ionique élevée, à l'aide d'un tampon d'adsorption à base d'agent chaotrope qui permet de dénaturer les protéines et aider à fixer l'ADNg sur la colonne (Tan et Yiap, 2009 ; Thatcher, 2015 ; Zainabadi *et al.*, 2019). Nous avons utilisé une solution à 2M du chlorhydrate de guanidine (un sel chaotrope) (Lemke *et al.*, 2011 ; Shi *et al.*, 2018). Les contaminants tels que les polysaccharides et les protéines sont éliminés par un lavage à l'aide de tampon à base d'éthanol (70%), par conséquent on élimine les problèmes potentiels lors des applications ultérieures (Katevatis *et al.*, 2017). L'ADN purifié est élué dans des conditions d'une force ionique faible vis-à-vis un pH élevé (pH 8,5)(Abdel-Latif et Osman, 2017), où un tampon d'éluion à base de Tris-HCl (10 mM) a été utilisé (Lemke *et al.*, 2011 ; Shi *et al.*, 2018). Une centrifugation rapide est nécessaire pendant les étapes de lavage et d'éluion du processus de purification (Tan et Yiap, 2009).

Notre protocole optimisé est plus rapide, permet une purification efficace de l'ADN, c'est grâce de l'utilisation d'une purification initiale par un tampon de lavage à base de sorbitol et l'utilisation des colonnes de DNeasy (Qiagen) à base de silice.

Pour finir, il est à regretter que ce travail n'était pas terminé c'est à cause de la pandémie de Covid-19. Il aurait été plus souhaitable d'effectuer les extractions pour évaluer le protocole optimisé.

#### **4.2.3. Mode d'évaluation des protocoles d'extraction**

Pour évaluer les protocoles d'extraction, le rendement et la pureté d'ADN extrait par les trois protocoles seront comparés. Et à l'aide d'une PCR classique, la pureté d'ADN extrait sera confirmée. Par ailleurs, les trois protocoles seront évalués en termes de simplicité, de rapidité, et de coût.

Malheureusement, nous n'avons pas pu évaluer le rendement et la pureté d'ADN ni pour le protocole de référence ni pour le protocole proposé (pas des résultats suffisants), et même d'appliquer la PCR c'est à cause le confinement appliqué dû au coronavirus. Donc, nous allons faire une évaluation en termes de la théorie du rendement et la pureté d'ADN extrait selon les résultats obtenus à partir des protocoles décrites précédemment ou dans la littérature, ainsi qu'une simple évaluation en termes de simplicité, de rapidité et de coût.

#### **4.2.3.1. Rendement et pureté d'ADN extrait**

Selon Piccolo *et al.* (2012) le rendement d'extraction d'ADNg obtenu a été très faible, environ 0,0045 ng/mg des feuilles congelés à (-80°C). L'équipe de l'année passée (2019) a essayé d'optimiser le protocole de Piccolo *et al.* (2012), cependant qu'elle a été faite l'extraction d'ADN à partir des jeunes feuilles déshydratées. Les résultats obtenus ont été acceptables du côté du rendement (3,372 µg/mg) et non satisfaisantes au côté de la pureté où le ratio 260/230nm donne une valeur égale à 1,58, ce qui explique la contamination de l'ADN extrait par les métabolites secondaires, donc l'amplification de l'ADNg sera infructueuse.

Une autre étude a été faite par Marsal *et al.* (2013) montre que la majorité des méthodes classiques d'extraction de l'ADNg (extraction liquide-liquide) décrites à la littérature et couramment utilisés comme celles de Dellaporta *et al.* (1983), Doyle et Doyle (1987) et Bowers *et al.* (1993) donnent des résultats inadéquates après leurs application sur l'espèce *Vitis vinifera* L. surtout avec la richesse de cette plante en métabolites secondaires et protéines, dont un ratio de pureté 260/280nm variait entre : 0,7-2. Ces procédures d'extraction n'ont pas donné des résultats satisfaisantes surtout au côté de pureté ce qui inhibe et cesse la progression des applications en aval (PCR, clonage...etc.).

Plusieurs études ont été réalisées qui s'intéressent à l'amélioration des méthodes d'extraction et de purification d'ADNg, qui font appel à l'utilisation des colonnes à base de silice. D'après l'équipe de Marsal *et al.* (2013), les résultats de l'utilisation d'un kit commercial standard (DNeasy Plant mini kit) sur les jeunes feuilles de la vigne ont donné des rendements et des indices de pureté acceptables (Tab.8, page 53), ainsi les résultats de l'amplification des microsatellites comme la VVMD7 sont positifs, cela confirme que l'ADN extrait est de bonne pureté.

Shi *et al.* (2018) ont modifié la purification liquide-liquide par la méthode liquide-solide, et ils utilisent des colonnes de DNeasy (Quiagen) à base de silice. Les résultats obtenus par cette étude ont été intéressantes et satisfaisantes. Ils ont réussi d'extraire l'ADN à partir des feuilles de *Nicotiana tabacum* L. malgré, il est difficile à extraire leurs ADN c'est à cause

de la richesse de cet espèce par les métabolites secondaires, qui y compris des carbohydrates jusqu'à 30% (oligosaccharides, polysaccharides) (Banožić *et al.*, 2020), terpénoïdes, alcaloïdes (nicotine), flavonoïdes et anthocyanines (Nugroho et Verpoorte, 2002). Un rendement acceptable a été relevé égal à 5.65 µg/100 mg de feuilles, avec un ratio d'absorbance 260/280nm parfait :  $1.81 \pm 0.05$ . L'ADN purifié a été amplifié, les résultats positifs des SSRs comme indique le tableau 8, confirment que l'ADN extrait ne contient aucun inhibiteur supplémentaire pour la PCR.

Selon Lemke *et al.* (2011), l'extraction liquide-solide d'ADN génomique à partir des jeunes feuilles de *Vitis* a donné un bon rendement de 10-30 µg/80-100 mg des feuilles, donc cette approche fournit un protocole adapté pour l'extraction d'une quantité élevée d'ADN. En outre, une amplification réussite à l'aide des amorces qui couvrent la région du microsatellite nucléaire VVMD37 (Tab.8, page 53) montre que l'ADN extrait est de haute pureté, ainsi qu'une réduction de l'effet inhibiteur exercé par les métabolites secondaires a été observé par l'utilisation des tampons préparés manuellement.

Bien que ces résultats obtenus d'après Lemke *et al.* (2011) et Shi *et al.* (2018) sont acquis avec des méthodes ayant des modes opératoires similaires. Toutefois, il y a une différence observée dont le matériel végétal étudié qui est complètement différent en composition des métabolites secondaires, en taille et quantité de génome (4500Mpb pour le tabac (Edwards *et al.*, 2017) et 475Mpb pour la vigne (Velasco *et al.*, 2007)) et en quantité de départ impliquée dans l'extraction et la différence aussi dans les méthodes de préparation des échantillons. Néanmoins, nous pouvons parvenir à conclure (théoriquement) de côté de pureté que l'extraction d'ADNg sur les colonnes de DNeasy est très efficace pour une élimination efficace de tous types de contaminants possibles, surtout que la vigne est connue par sa richesse en polysaccharides, tannins et autres métabolites secondaires. L'utilisation des colonnes à base de silice est la meilleure méthode, adéquate et la plus simple à appliquer afin d'extraire un ADNg hautement pur et de bonne quantité, ce qui permet d'appliquer la PCR et les autres applications postérieures.

Malheureusement, notre étude dépourvue des résultats expérimentaux suffisants qui peuvent confirmer l'efficacité de l'extraction d'ADNg sur les colonnes de DNeasy pour l'espèce *Vitis vinifera*.

**Tableau 8.** Comparaison des résultats obtenus par les différentes études qui appliquent la purification liquide-solide.

Etudes	Méthode		Echantillon	Rendement	Ratio 260/280nm	SSRs
	Colonne	Tampons				
Lemke <i>et al.</i> (2011)	DNeasy (Qiagen)	Préparé manuellement (de l'étape de lyse jusqu'à l'élution)	Jeunes feuilles de <i>Vitis</i> ssp.	10-30 µg par 80 à 100 mg des feuilles	/	+
Marsal <i>et al.</i> (2013)		Qiagen	Jeune feuilles de <i>Vitis</i> <i>vinifera</i> L.	405 ± 51 µg par 100 mg des feuilles	1,9 ± 0,1	+
Shi <i>et al.</i> (2018)		Préparé manuellement (de l'étape de lyse jusqu'à l'élution)	Feuilles de <i>Nicotiana</i> <i>tabacum</i> L.	5.65± 0.72 µg par 100 mg des feuilles	1.81 ± 0.05	+

(/) Données non publiées. (+) Résultat positif.

#### 4.2.3.2. Durée de l'extraction et la facilité de mise en œuvre

La technique développée (P3) au cours de ce travail a été optimisée avec le souci d'obtenir une technique plus rapide (Tab.9). L'étape de lavage d'échantillon est importante pour réduire les métabolites secondaires et cette étape est réalisée en un temps de 15min15s avec une diminution du nombre de lavages nécessaires. Alors que, l'étape de lyse est essentielle pour libérer le maximum des molécules d'ADN génomique, nous avons obligé d'augmenter le temps d'incubation à 1h 30 min pour bien lyser les cellules. Nous avons mis au point une technique de purification qui a pris environ 18min. L'amélioration de protocole de Piccolo *et al.* (2012) a permis d'extraire facilement l'ADN végétal à partir des feuilles conservées à température ambiante et d'éliminer efficacement les contaminants grâce à l'utilisation des étapes de lavage initial et purification sur colonne de silice. La durée totale de notre protocole (P3) d'obtention d'ADN génomique de *Vitis vinifera* est alors de 2h13min 15s environ. Cette technique est donc tout à fait applicable en routine. Le protocole optimisé

semble facile à appliquer et il y a la possibilité de traiter plusieurs échantillons en même temps.

Cependant ce protocole nécessite deux fois plus de temps d'application par rapport à un kit commercial (DNeasy Plant Pro, SIGMA) et nécessite des installations particulières telles qu'une hotte chimique pour la manipulation du  $\beta$ -Mercaptoethanol.

**Tableau 9.** Evaluation des protocoles en termes de durée.

Protocole	Durée de chaque étape				Durée totale	Nombre d'échantillons traités à la fois
	Étape de lavage initial	Étape de lyse cellulaire	Étape de purification	Étape de précipitation d'ADN		
<b>Protocole initial de Piccolo et al. (2012)</b>	/	1h10min	10min	1h45min	3h5min	Nombre limité vu le grand nombre de manipulations
<b>Protocole amélioré (P1)</b>	/	1h10min	30min	16h30min	18h10min	Nombre limité vu le grand nombre de manipulations
<b>Protocole amélioré (P2)</b>	15min 15s	1h40min	30min	16h30min	18h55min 15s	Nombre limité vu le grand nombre de manipulations
<b>Protocole amélioré (P3)</b>	15min 15s	1h40min	18min		2h13min 15s	Possibilité de traiter plus d'échantillons, moins de manipulations

#### 4.2.3.3. Estimation des coûts

Les prix de tous les produits utilisés ont été donnés par le chef du laboratoire de notre département, pour quelques produits on a eu fait la recherche des prix auprès des fournisseurs.

Le tableau 10 ci-dessous résume le coût de chaque produit utilisé dans l'extraction d'ADN d'un seul échantillon et le coût total de l'extraction de deux protocoles de référence et celui développé (P3).

Le coût par échantillon (100mg des feuilles sèches) extrait a été calculé. Le protocole 3 représente le coût le moins cher (137,03 DA/Ech.) à peu près cinq fois que le coût d'un échantillon extrait avec un kit commercial (DNeasy Plant Pro, SIGMA) (608,42 DA/Ech.). En plus, l'utilisation des colonnes de DNeasy (Qiagen) à base de silice par notre protocole développé peut compenser son coût très élevé par rapport au protocole initial (1235,316 DA/Ech.).

**Tableau 10.** Calcul des coûts (consommables et réactifs) de l'extraction d'ADN par échantillon par le protocole développé P3 en comparaison avec le coût d'un protocole de référence.

Produits/tubes	prix en DA du Produits ou tubes	Protocole de référence		Protocole 3	
		Nombre ou Quantité utilisée en (g) ou (ml)	prix en DA de la quantité utilisé	Nombre ou Quantité utilisée en (g) ou (ml)	prix en DA de la quantité utilisé
Colonnes de silice	4506,25	/	/	1	90 ,125
Tube Eppendorfs 1,5ml (500 tubes)	4973,57	3	29 ,841	1	9,947
B-Mercaptoéthanol (1000 ml)	3400,00	0,0070	0,02	0,04	0,136
Chloroforme (2500ml)	5500,00	0,7280	1,60	/	/
Isopropanol (500ml)	11800,00	0,3000	7,08	/	/
CTAB (100g)	8950,00	0,0140	1,25	0,03	2,685
EDTA disodique (1000 g)	6916,00	0,0065	0,05	0,0243	0,1681
Ethanol absolu	2800,00	0,3500	0,39	0,3	0,336

(2500ml)					
Tris-HCl (100g)	7985,45	0,0110	0,88	0,06343	4,875
Polyvinyl pyrrolidone 40 (100 g)	4741,30	0,0140	0,66	0,08	3,793
Protéinase K (500mg)	69700,00	/	/	0,00006	8,364
Sodium chloride (1000 g)	1850,00	0,1023	0,19	0,1578	0,292
Tween 20 (1000ml)	7559,42	/	/	0,005	0,0378
RNase A (10mg)	11933,55	0.001	1193,355	/	/
Chlorure de lithium (100g)	6656,71	/	/	0,0848	5,645
Sorbitol (1000g)	23442,58	/	/	0,1914	4,487
chlorhydrate de guanidine (100g)	10715,06	/	/	0,0573	6,139
Prix total			1235,316		137,03

#### 4.2.4. Difficulté d'application de la recherche scientifique dans le locale universitaire

De conception ancienne (plus de 20ans), il n'a pas une activité spécifique de biologie moléculaire, mais celle-ci se développe de plus en plus depuis une dizaine d'année: extraction d'ADN, analyse d'ARNm, PCR, clonage...etc.

Initialement, la conception de notre locale universitaire n'avait pas prévu cette activité croissante, nous avons travaillé dans un laboratoire mixte (Biochimie/Biologie végétale/ Microbiologie/Biologie moléculaire) ce qui génère un encombrement souvent important des laboratoires et des paillasse concernant le nombre des manipulateurs, dont les laboratoires doivent être découpés et individualisés, ce qui fait l'activité de chaque petit laboratoire est déterminé par l'objectif de recherche de celui qui y travaille (Lefebvre *et al.*, 2001).

C'est pour ça nous avons rencontré de nombreux difficultés au cours des manipulations où les techniques de biologie moléculaire sont délicates, et nécessitent des contraintes d'organisation de locaux extrêmement contraignantes (Herve *et al.*, 2007). L'installation



d'une paillasse spécifique pour toute manipulation moléculaire a été très difficile, il s'agit d'un manque de laboratoires et des palliasses, nous avons eu du mal de travailler dans une zone qui ne représente complètement un environnement de biologie moléculaire :

-pas de local spécifique à la biologie moléculaire qui nécessite réglementairement trois zones pour : la préparation des réactifs, la préparation des échantillons, les étapes d'amplification et d'analyse des produits amplifiés (Clemont *et al.*, 2007). Une seule palliasse était disponible pour préparer les échantillons ainsi que les réactifs ;

-pas de séparation des zones de manipulation ce qui augmente les risques de contaminations, où tout échange de matériel est strictement proscrit (tout particulièrement les micropipettes qui sont une source importante de contamination), les activités à risque doivent être le plus isolées possibles et être clairement identifiées (Gauthier, 2006) ;

-pas d'organisation de l'espace spécifique de travail qui ne respecte pas la réglementation propre à la recherche en biologie moléculaire : la répartition des panneaux d'affichage d'hygiène et de sécurité, la mise à jour régulière des listes des produits utilisés vue que le nombre de substances qui entrent dans la rubrique des réactifs utilisés, quelques-unes sont toxiques et dangereuses, la présence des salles d'entreposage des déchets car laboratoire d'analyse moléculaire produit plusieurs types des déchets qui doivent suivre des filières d'élimination spécifiques (Clemont *et al.*, 2007) ;

-le travail dans des laboratoires mixtes nous a rendu exposé plus ou moins à des risques biologiques, l'évaluation de tel risque biologique joue un rôle important particulièrement dans la conception des laboratoires : le type de manipulation et le classement des agents biologiques infectieux trouvés (Clemont *et al.*, 2007), malheureusement ce genre d'évaluation est absent dans notre laboratoire.

De nos jours, la recherche scientifique est onéreuse, il est manifeste que la science exige d'importantes infrastructures trop coûteuses. En fait, pour des raisons économiques et techniques, la majorité des appareils et des pièces (hotte chimique, centrifugeuse réfrigérée, micropipettes...etc.) souffre d'un manque dans notre laboratoire donc ne sont pas distribués à proximité de la zone de travail qui ne permet pas d'une circulation cohérente au cours de manipulation. On signale ainsi le manque dans les produits chimiques ce qui limite notre travail, vue que la modification d'un protocole nécessite de nombreux essais et des répétitions pour prouver son efficacité.

# **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspectives

L'objectif générale de cette étude est d'optimiser une méthode d'extraction d'ADN génomique afin d'obtenir un protocole efficace, peu coûteux, réalisable au niveau de notre laboratoire et permet d'obtenir une quantité suffisante et de pureté satisfaisante pour permettre toutes les manipulations postérieures de biologie moléculaire en particulier la PCR.

Une amélioration du protocole de référence a été réalisée où nous avons utilisé des jeunes feuilles déshydratées et conservées à température ambiante en présence de gel de silice. Les feuilles sont préparées par des méthodes simples, un séchage à l'aide d'étuve ventilée, aussi par lyophilisation qui permet une déshydratation complète, un broyage mécanique à l'aide d'un mortier et un pilon sans l'utilisation de l'azote liquide. Par ailleurs, pour une extraction efficace et l'amélioration de pureté d'ADNg extrait, une étape de lavage avant l'extraction par un tampon à base de sorbitol a été réalisée suivie par une lyse cellulaire à l'aide d'un tampon à base CTAB (3%), le temps d'incubation a été modifié où il est augmenté à une heure et 30 minutes à 58°C pour améliorer le rendement. En outre, une nouvelle approche de purification a été ajoutée qui fait appel à l'utilisation des colonnes d'extraction de DNeasy à base de silice pour simplifier le protocole, éviter l'utilisation des solvants toxiques, réduire son coût (137,03 DA/Echantillon) ainsi que sa durée d'application (2h13min15s) et principalement pour obtenir un ADN génomique de qualité (hautement pur) et de rendement élevé qui permet d'appliquer la PCR. L'intégrité de l'ADNg extrait est évalué par visualisation sur gel d'agarose au BET, toutefois, cette analyse qui ne devait être qu'une simple validation de l'efficacité d'une part des méthodes de séchage et d'autre part la conservation à longue durée de nos échantillons.

Du fait de la crise sanitaire avec l'épidémie de Covid-19, malheureusement nous n'avons pas pu terminer notre travail. Donc, pas des résultats suffisants à présenter, c'est seulement des études théoriques. Il serait utile et intéressant que les prochaines études aillent à continuer et poursuivre ce travail à l'avenir.

Pour la continuité de notre travail expérimental nous proposons :

- appliquer le protocole proposé et étudier son efficacité d'extraction d'ADN de haute qualité et en bonne rendement ;
- effectuer un dosage au Nanodrop pour mesurer précisément la quantité et la qualité d'ADN extrait. Le Nanodrop permet d'analyser des micro-volumes sans les diluer ;

- valider les résultats positifs obtenus via la PCR afin de confirmer la qualité d'ADN obtenu ;
- utiliser un jeu d'amorces afin d'appliquer la PCR multiplexe pour réduire le temps d'amplification ;
- faire un séquençage et création des cartes génomiques de la vigne algérienne.

# **Bibliographie**

## Bibliographie

1. Abdel-Latif A. et Osman G. 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods* 13(1):1–9.
2. Abe E., Delye S.G. et Alvarez J.C. 2010. Extraction liquide-liquide: théorie, applications, difficultés. *Annales de Toxicologie Analytique* 22(2):51–59.
3. Achour H. 2015. Analyse mutationnelle du gène suppresseur de tumeur p53 dans le cancer du sein: A propose de cas cliniques d'une population Algérienne. Mémoire de magister, université de Mohamed Khider, Biskra, Algérie, 76 p.
4. Ahakoud M. 2015. Le séquençage de l'ADN: Principes théoriques, indications médicales et expérience du CHU Hassan II de Fès. Thèse de doctorat, université Sidi Mohammed Ben Abdallah, Maroc, 160 p.
5. Ameziane N., Bogard M. et Lamoril J. 2005. Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Elsevier Masson, 705 p.
6. Aradhya M.K., Dangl G.S., Prins B.H., Boursiquot J.-M., Walker M.A., Meredith C.P. et Simon C.J. 2003. Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L. *Genetical Research Cambridge* 81(3):179–192.
7. Armaleo D. et Clerc P. 1995. A rapid and inexpensive method for the purification of DNA from lichens and their symbionts. *Lichenologist* 27(3):207–213.
8. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. et Struhl K. 2003. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons Inc, Vol. 63, 4648 p.
9. Banožić M., Jokić S., Ačkar Đ., Blažić M. et Šubarić D. 2020. Carbohydrates—Key Players in Tobacco Aroma Formation and Quality Determination. *Molecules* 25(7):1734.
10. Barrère P. 1957. Une histoire du vignoble algérien. *Cahiers d'outre-mer*, pp. 373-378.
11. Ben-Ari G. et Lavi U. 2012. Marker-assisted selection in plant breeding. *Plant Biotechnology and Agriculture*. Academic Press. San Diego, pp.163–184.
12. Benbouza H., Baudoin J.-P. et Mergeai G. 2006. Amélioration de la méthode d'extraction d'ADN au CTAB appliquée aux feuilles de cotonnier. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10(2):73–76.

13. 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. *Annales de biologie clinique* 57(1):77–84.
14. Bogdani E. 2011. Étude expérimentale et optimisation du procédé de lyophilisation de l'ibuprofène en milieu organique. Thèse de doctorat, université Claude Bernard - Lyon I, France, 187 p.
15. Bokszczanin K. et Przybyla A.A. 2006. New simple and efficient method of DNA isolation from pear leaves rich in polyphenolic compounds. *International Journal of Horticultural Science* 12(4):21-24.
16. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S. et Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161(5):839–851.
17. Boust C. 2009. Les alcools ED 4225 (Fiche solvants). Institut National de Recherche et de Santé pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles, 2<sup>e</sup> édition, Paris, 6 p.
18. Bowers J.E., Bandman E.B. et Meredith C.P. 1993. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. *Am. J. Enol. Vitic* 44:266–274.
19. Bowers J.E., Dangl G.S., Vignani R. et Meredith C.P. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39(4):628–633.
20. Brodeur J. et Toussaint M. 2007. Biologie moléculaire: Concepts, Techniques, Applications. Centre collégial de développement de matériel didactique. Vol. 8, Canada, 331 p.
21. Brun F. 1968. La vigne dans l'économie algérienne. Essai d'analyse des phénomènes de domination et des problèmes posés par l'accession à l'indépendance économiques dans le secteur agricole. *Méditerranée*, 9<sup>e</sup> année, N°2, pp. 183-184.
22. Caïd N., Chachoua M. et Berrichi F. 2019. Analyse spatiale diachronique de l'occupation du vignoble algérien depuis 60 ans : cas de la wilaya de Mostaganem. *Géographie physique et environnement* 13:53–74.
23. Cantu D., Walker, M.A. et Chittaranjan K. 2019. *The Grape Genome*. 1<sup>er</sup> édition. Springer Nature, Switzerland, 385 p.

24. Chase M.W. et Hills H.H. 1991. Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40(2):215–220.
25. Chiaroni J., Roubinet F., Bailly P., Mannessier L. et Noizat-Pirenne F. 2012. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext, Paris, 324 p.
26. Clark M.S. 1997. *Plant Molecular Biology -A laboratory Manual*. Springer-Verlag, Berlin, 551 p.
27. Clemente M.S. et Salatino M.L.F. 2010. Análise da variação genética de populações de *Vochysia pyramidalis* e *V. tucanorum* por AFLP e da composição de ácidos graxos de sementes. Thèse de doctorat, université de São Paulo, Brazil.
28. Clemont H., David C., Duquenne P., Meyer A., Nassar N., Rocher M., Suiro A. et Touche S. 2007. Conception des laboratoires d'analyse biologiques (guide). Institut national de la recherche et de sécurité, 1<sup>er</sup> édition, Paris, 116 p.
29. Dellaporta J.J., Wood J. et Hicks J.B. 1983. A plant DNA mini preparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1(4):19–21.
30. Demeke T. et Jenkins G.R. 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396(6):1977–1990.
31. Doyle J.J. et Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin* 19(1):11–15.
32. Doyle J.J. et Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
33. Dumez C., Forey P., Foy E., Mahier H., Mateos C., Marotte O., Lobbens J. et Perotin A. 2017. Cryogénéisation & Lyophilisation. Projet Professionnel, université de Lorraine, France, 29 p.
34. Edwards K.D., Fernandez-Pozo N., Drake-Stowe K., Humphry M., Evans A.D., Bombarely A., Allen F., Hurst R., White B., Kernodle S.P., Bromley J.R., Sanchez-Tamburrino J.P., Lewis R.S. et Mueller L.A. 2017. A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. *BioMed Central Genomics* 18:448.



35. Esser K.-H., Marx W.H. et Lisowsky T. 2005. Nucleic acid-free matrix: Regeneration of DNA binding columns. *BioTechniques* 39(2):270–271.
36. Fawell J. 2000. Risk Assessment Case Study -Chloroform and Related Substances. *Food and Chemical Toxicology* 38:S91–S95.
37. Françoise A., Blondon A., Martínez J.M.Z. et Chittaranjan K. 2011. Genetics, genomics and breeding of Grape. 1<sup>er</sup> edition, Florida, USA, 360 p.
38. Funk V., Gostel M., Devine A., Kelloff C., Wurdack K., Tuccinardi C., Radosavljevic A., Peters M. et Coddington J. 2017. Guidelines for collecting vouchers and tissues intended for genomic work (Smithsonian Institution): Botany Best Practices. *Biodiversity Data Journal* 5:e11625.
39. Garibyan L. et Avashia N. 2013. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* 133(3):1–4.
40. Gauthier P. 2006. Organisation et fonctionnement d'un laboratoire de biologie moléculaire. *Formation Biologie Moléculaire*, Montpellier, 20 p.
41. Ghaffari S., Hasnaoui N. et Ferchichi A. 2011. Rapid, High Quality DNA Isolation from Tunisian Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Cultivars and Optimization of the RAPD Marker Technique. *Romanian Biotechnological Letters* 16(1):5881-5890.
42. Ghowsi K. 2012. Electrophoresis. InTech, Rijeka, Croatia, 244 p.
43. Green M.R. et Sambrook J. 2017. Precipitation of DNA with Isopropanol. *Cold Spring Harbor Protocols*, pp. 673-674.
44. Grugier J. 2013. La lyophilisation et les enjeux pour les métiers de la santé. *La vague*, N° 36, pp.22–23.
45. Hamama A., El Heit K., Meghezzi S., Sebki S., Agouazi O. et Cherfaoui M.S. 2014. Étude des caractères ampélographiques et phyllométriques des cépages mineurs du tel Algérien (Conférences). 37th World Congress of Vine and Wine and 12th General Assembly of the OIV, Mendoza, Argentina, 6 p.
46. Hanania U., Velcheva M., Sahar N. et Perl A. 2004. An improved method for isolating high-quality DNA from *Vitis vinifera* nuclei. *Plant Molecular Biology Reporter* 22(2):173–177.

47. Hansse Gluszak J. 2019. Les vertus méconnues de la vigne et du raisin. Thèse de doctorat, université de Lille, France, 126 p.
48. Hasan S.M.Z., Shafie M.S.B. et Shah R.M. 2008. Efficient method for the extraction of genomic DNA from wormwood (*Artemisia capillaris*). African Journal of Biotechnology 7(18):3211–3216.
49. Haston E., Richardson J.E., Stevens P.F., Chase M.W. et Harris D.J. 2009. The Linear Angiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APG III: A LINEAR SEQUENCE OF THE FAMILIES IN APG III. Botanical Journal of the Linnean Society 161(2):128–131.
50. Healey A., Furtado A., Cooper T. et Henry R.J. 2014. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. Plant Methods 10(1):21.
51. Heikrujam J., Kishor R. et Behari Mazumder P. 2020. The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols. Biochemical Analysis Tools - Methods for Bio-Molecules Studies. IntechOpen, 12p.
52. Henry R.J. 2008. Plant genotyping II: SNP technology. CAB International, Wallingford, UK, 296 p.
53. Herve C., Ameziane N. et Guet P. 2007. Mise en œuvre de la biologie moléculaire dans un laboratoire de biologie médicale : l'expérience du CH de Sens. Spectra Biologie, N°162, pp.94–98.
54. Huang M., Sun X.J., Zhou Y. et Wang X.M. 2016. Comparison of methods to preserve *Rheum palmatum* (Polygonaceae) for efficient DNA extraction and PCR amplification. Genetics and Molecular Research 15(3):9.
55. Inglis P.W., Pappas M. de C.R., Resende L.V. et Grattapaglia D. 2018. Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications. Plos One 13(10):e0206085.
56. Jadhav K.P., Ranjani R.V. et Senthil N. 2015. Chemistry of plant genomic dna extraction protocol. Bioinfolet 12(3A):543–548.
57. Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Policriti A., Clepet C., Casagrande A., Choisne N., Aubourg S., Vitulo N., Jubin C., Vezzi A., Legeai F., Huguenev P., Dasilva C., Horner H.,

Mica E., Jublot D., Poulain J., Bruyere C., Billault A., Segurens B., Gouyvenoux M., Ugarte E., Cattonaro F., Anthouard V., Vico V., Fabbro C.D., Alaux M., Di Gaspero G., Dumas V., Felice N., Paillard S., Juman I., Moroldo M., Scalabrin S., Canaguier A., Le Clainche I., Malacrida G., Durand E., Pesole G., Laucou V., Chatelet P., Merdinoglu D., Delledonne M., Pezzotti M., Lecharny A., Scarpelli C., Artiguenave F., Enrico Pé M., Valle G., Morgante M., Caboche M., Françoise F., Blondon A., Weissenbach J., Quétier F. et Wincker P. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature Letters* 449: 463–468.

58. Japelaghi R.H., Haddad R. et Garoosi G.-A. 2011. Rapid and Efficient Isolation of High Quality Nucleic Acids from Plant Tissues Rich in Polyphenols and Polysaccharides. *Molecular Biotechnology* 49(2):129–137.

59. Jean P. 2007. Séquençage du génome de la vigne: un acquis scientifique prometteur. Institut Français de la Vigne et du Vin.

60. Jobes D.V., Hurley D.L. et Thien L.B. 1995. Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. *Taxon* 44(3):379–386.

61. Johnson W.M. 1991. The polymerase chain reaction: An overview and development of diagnostic PCR protocols at the LCDC. *The Canadian Journal of Infectious Diseases* 2(2):89–91.

62. Kang T.-J. et Yang M.-S. 2004. Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic plants. *BMC Biotechnology* 4(1):20.

63. Karboub D. 2012. Impact des rejets urbains et industriels sur la qualité des eaux souterraines: cas de la région d'El-Kantara Sud Est Algérien. Mémoire de magistère, université de Tébessa, Algérie, 156 p.

64. Katevatis C., Fan A. et Klapperich C.M. 2017. Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase. *Plos One* 12(5):e0176848.

65. Khanuja S.P.S., Shasany A.K., Darokar M.P. et Kumar S. 1999. Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils. *Plant Molecular Biology Reporter* 17:1–7.

66. Kim C.S., Lee C.H., Shin J.S., Chung Y.S. et Hyung N.I. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Research* 25(5):1085–1086.

67. 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, l'institut Agro, Montpellier, France, 94 p.
68. Larnaude M., 1948. La vigne en Algérie. *Annales de Géographie*, 57<sup>e</sup> année(308), pp.356–359.
69. Lefebvre V., Gimenez C. et Brochard P. 2001. Risque chimique dans les laboratoires de biologie moléculaire. *Documents pour le Médecin du Travail*, N°85, pp.1–31.
70. Lefort F. et Douglas Gerard C. 1999. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Annals Of Forest Science* 56(3):259–263.
71. Lemke L., Rex M., Zyprian E. et Töpfer R. 2011. A simple, inexpensive and environmentally friendly method for high throughput DNA extraction from grapevine (*Vitis* spp.). *Vitis* 50(1):7–10.
72. Lewinsohn E., Steel C.I. et Croteau R. 1994. Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms. *Plant Molecular Biology Reporter* 12:20–25.
73. Li Z., Parris S. et Saski C.A. 2020. A simple plant high-molecular-weight DNA extraction method suitable for single-molecule technologies. *Plant Methods* 16(1): 38.
74. Liadi Z., Rahali M. et Achour H. 2018. Molecular Clarifications of Grapevine Identities in Algerian Germplasm Collections using Microsatellite Markers. *Jordan Journal of Biological Sciences* 22(3):317-322.
75. Lodhi M.A., Ye G.-N., Weeden N.F. et Reisch B.I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12:6–13.
76. Lucas M.S., Carvalho C. da S., Hypolito G.B. et Côrtes M.C. 2019. Optimized protocol to isolate high quality genomic DNA from different tissues of a palm species. *Hoehnea* 46(2):e942018.
77. Magdeldin S. 2012. Gel electrophoresis: advanced techniques. InTech, Rijeka, Croatia, 511 p.
78. Manen J.-F., Bouby L., Dalnoki O., Marival P., Turgay M. et Schlumbaum A. 2003. Microsatellites from archaeological *Vitis vinifera* seeds allow a tentative assignment of

the geographical origin of ancient cultivars. *Journal of Archaeological Science* 30(6):721–729.

79. Marsal G., Baiges I., Canals J.M., Zamora F. et Fort F. 2011. A Fast, Efficient Method for Extracting DNA from Leaves, Stems, and Seeds of *Vitis vinifera* L. *American Journal of Enology and Viticulture* 62(3):376–381.

80. 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. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 47(4):227–237.

81. McCormick R.M. 1989. A solid-phase extraction procedure for DNA purification. *Analytical Biochemistry* 181(1):66–74.

82. Mullis K.B. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* 262:56–65.

83. Murray M.G. et Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8(19):4321–4326.

84. Nazhad N.R. et Solouki M. 2008. Separation of DNA for Molecular Markers Analysis from Leaves of *Vitis Vinifera*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11(11):1436–1442.

85. Neethling E. 2016. Adaptation de la viticulture au changement climatique: vers des stratégies à haute résolution. Thèse de doctorat, université Rennes 2, Haute Bretagne, 204 p.

86. Nguyen-Kim H. 2015. Recherche de la fonction de protéines riches en hydroxyproline dans les parois végétales. Thèse de doctorat, université Fédérale Toulouse Midi-Pyrénées, France, 231 p.

87. Nugroho L.H. et Verpoorte R. 2002. Secondary metabolism in tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68:105–125.

88. Nunes C.F., Ferreira J.L., Fernandes M.C.N., Breves S., Generoso A.L., Soares B.D.F., Dias M.S.C., Pasqual M., Borem A. et Cançado G.M. 2011. An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. *Ciência Rural* 41(8):1383–1389.

89. Opel K.L., Chung D. et McCord B.R. 2010. A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR. *Journal of Forensic Sciences* 55(1):25–33.

90. Palomera-Avalos V., Castro-Félix P. et Villalobos-Arámbula A.R. 2008. High yield and high quality DNA from vegetative and sexual tissues of Mexican white pine (*Pinus ayacahuite*). *African Journal of Biotechnology* 7(1):51–54.
91. Pensec F. 2013. Les triterpénoïdes chez la vigne: quantifications, voies de biosynthèse et intérêt pour la lutte contre des bioagresseurs. Thèse de doctorat, université de Haute Alsace, France, 276 p.
92. Piccolo S.L., Alfonzo A., Conigliaro G., Moschetti G., Burruano S. et Barone A. 2012. A simple and rapid DNA extraction method from leaves of grapevine suitable for polymerase chain reaction analysis. *African journal of Biotechnology* 11(45):10305-10309.
93. Pipan B., Zupančič M., Blatnik E., Dolničar P. et Meglič V. 2018. Comparison of six genomic DNA extraction methods for molecular downstream applications of apple tree (*Malus X domestica*). *Cogent Food & Agriculture* 4:1–10.
94. Pirttilä A.M., Hirsikorpi M., Kämäräinen T., Jaakola L. et Hohtola A. 2001. DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 19(3):273a-f.
95. Poitras E. et Houde A. 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Biology and Biotechnology* 2(2):2–11.
96. Rahman M.T., Uddin M.S., Sultana R., Moue A. a et Setu M. 2013. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal* 4(1):30–36.
97. Raoudha A., Amel S., Hassen G. et Azeiz O.B. 2012. Extraction de l'ADN et optimisation de la PCR (Polymorphism Chain Reaction) pour l'application des marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) chez *Stipa lagascae*. *Acta Botanica Gallica* 159(1): 73–78.
98. Reynier A., 2011. Manuel de viticulture : Guide technique du viticulteur. Lavoisier TEC & DOC, 11<sup>e</sup> édition, 592 p.
99. Rezgui A. 2016. Étude de la microflore colonisant les tissus ligneux de *Vitis vinifera*: Intérêt pour le développement d'agents de biocontrôle contre une maladie du bois de la vigne, l'esca. Thèse de doctorat, université de Tunis El Manar et université de France Bordeaux, 203 p.

100. Ribeiro R.A. et Lovato M.B. 2007. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. *Genetics and Molecular Research* 6(1):173–187.
101. Rimola A., Costa D., Sodupe M., Lambert J.-F. et Ugliengo P. 2013. Silica Surface Features and Their Role in the Adsorption of Biomolecules: Computational Modeling and Experiments. *Chemical Reviews* 113(6):4216–4313.
102. Ripoll J., Bon M.-C. et Jones W. 2011. Optimisation de l'extraction d'ADN génomique de la morelle jaune (*Solanum elaeagnifolium* Cav.), une plante invasive des milieux cultivés en région méditerranéenne. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 15(1):95–100.
103. Roy M.-N., Beaudoin J.-P., Belleville A., St-Germain M.-È. et Dessureault P.C. 2015. Guide de sécurité spécifique aux laboratoires d'enseignement et de recherche (guide). Université du Québec à Trois-Rivières, 46 p.
104. Russell A., Samuel R., Rupp B., Barfuss M.H.J., Šafran M., Besendorfer V. et Chase M.W. 2010. Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandaeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon* 59(2):389–404.
105. Sahu S.K., Thangaraj M. et Kathiresan K. 2012. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *International Scholarly Research Network Molecular Biology* 2012:1–6.
106. Salemkour N., Chalabi K., Farhi Y. et Belhamra M., 2012. Inventaire floristique de la région des Ziban. *Journal Algérien des Régions Arides* (9/10/11):104.
107. Santiago J.L., Boso S., Martín J.P., Ortiz J.M. et Martínez M.C. 2005. Characterisation and identification of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) from northwestern Spain using microsatellite markers and ampelometric methods. *Vitis* 44(2):67-72.
108. Scaldaferrri M.M., Freitas J.S., Santos E.S.L., Vieira J.G.P., Gonçalves Z.S. et Cerqueira-Silva C.B.M. 2013. Comparison of protocols for genomic DNA extraction from velame pimenta (*Croton linearifolius*), a native species to the Caatinga, Brazil. *African Journal of Biotechnology* 12(30):4761–4766.
109. Schori M., Appel M., Kitko A. et Showalter A.M. 2013. Engineered DNA polymerase improves PCR results for plastid DNA. *Applications in Plant Sciences* 1:1–7.
110. Scotti E. 1987. Petite histoire du vignoble en Algérie. *L'Algérieniste*, N°38.

- 
111. Sharma A.D., Gill P.K. et Singh P. 2002. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 20(4):415–415.
112. Shi R., Lewis R.S. et Panthee D.R. 2018. Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification. *Plos One* 13(12):e0203011.
113. Surzycki S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, 444 p.
114. Tagliavia M., Nicosia A. et Gianguzza F. 2009. Complete decontamination and regeneration of DNA purification silica columns. *Analytical Biochemistry* 385(1):182–183.
115. Tan S.C. et Yiap B.C. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009:1–10.
116. Tayeb B.M. 1990. Le secteur viticole et vinicole en Algérie: marché interne et commerce international. *Medit* 1(1):33–36.
117. Thatcher S.A. 2015. DNA/RNA Preparation for Molecular Detection. *Clinical Chemistry* 61(1):89–99.
118. Thomson D. 1995. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *BioTechniques* 19(3):394–400.
119. Tiwari S., Tomar R.S., Tripathi M.K. et Ahuja A. 2017. Modified Protocol for Plant Genomic DNA Isolation. *IndianRes. J. Genet. & Biotech.* 9(4):478 – 485.
120. Toulemonde M. et Desage S. 2009. La Lyophilisation ou Cryodessiccation. Projet thématique tutoré, université Jean Monnet de Saint-Etienne, France, 28 p.
121. Toumi M. 2006. Evaluation de l'état nutritionnel du vinoble de table. Thèse de doctorat, Institut National Agronomique EL Harrache, Algérie, 166 p.
122. Triolet J. et Mairesse M. 1998. Manipulations dans les laboratoires de chimie: Risques et prévention. *Cahiers de notes documentaires - Hygiène et sécurité du travail*, N°173, Paris, 16 p.
123. Uddin M.S. et Cheng Q. 2015. Recent application of biotechniques for the improvement of mango research. In: *Applied Plant Genomics and Biotechnology*. Woodhead Publishing. Oxford, pp.195–212.
124. 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.



125. Velasco R., Zharkikh A., Troglio M., Cartwright D.A., Cestaro A., Pruss D., Pindo M., FitzGerald L.M., Vezzulli S., Reid J., Malacarne G., Iliev D., Coppola G., Wardell B., Micheletti D., Facci M., Mitchell J.T., Perazzolli M., Eldredge G., Gatto P., Oyzerski R., Moretto M., Gutin N., Stefanini M., Chen Y., Segala C., Davenport C., Dematte L., Mraz A., Battilana J., Stormo K., Tao Q., Si-Ammour A., Harkins T., Lackey A., Perbost C., Taillon B., Stella A., Fawcett J.A., Sterck L., Vandepoele K., Grando S.M., Toppo S., Moser C., Lanchbury J., Skolnick M., Sgaramella V., Bhatnagar S.K., Fontana P., Gutin A. et Viola R. 2007. A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety. *PLoS One* 2(12):18.
126. Xin Z., Velten J.P., Oliver M.J. et Burke J.J. 2003. High-Throughput DNA Extraction Method Suitable for PCR. *BioTechniques* 34:820–826.
127. Yee W., Kumar J.N. et Muthusamy P.D. 2018. Inclusion of 2-Mercaptoethanol in Lysis Buffer Could Interfere with Isolation of High Molecular Weight DNA from Freshwater Microalgae. *Indian Journal of Microbiology* 58(1):109–113.
128. Zainabadi K., Dhayabaran V., Moideen K. et Krishnaswamy P. 2019. An efficient and cost-effective method for purification of small sized DNAs and RNAs from human urine. *PLoS ONE* 14(2):1–15.
129. Site web 1 : Google Maps [En ligne], consulté le 12 septembre 2020. Disponible : <https://www.google.com/maps/place/El+Kantara/@35.2252519,5.7106197,17z/data=!4m5!3m4!1s0x12f4f842d51b3985:0xbb5b244f94e572a4!8m2!3d35.2180269!4d5.7102465>

# **Annexes**

## Annexes

### Annexe 1. Matériels et réactifs utilisés

#### Matériel spécifique

- matériel utilisé pour l'extraction d'ADN génomique.

Equipement	La marque
Jeu de micropipettes (gamme de 1 µl à 1000 µl)	Gilson, DragonLab, Eppendof
Agitateur vortex	Zx3 VELP Scientifica
Balance de précision	ISOLAB <i>Laborgeräte GmbH</i>
PH mètre	OHAUS
Plaque agitateur- chauffant	ISOLAB <i>Laborgeräte GmbH</i>
Agitateur Rotatif à tube	SB3 Stuart
Hotte chimique	Exosafe
Etuve ventilée	Memmert
Lyophilisateur de Laboratoire	VirTis SP SCIENTIFIC
Congélateur	Haier
Bain marie (agitation contenue)	Memmert
Centrifugeuse équipée d'un rotor à microtubes réfrigérée (+4°C)	Mikro 220 R-Hettich
Générateur d'électrophorèse	Consort EV265

Table U.V	VILBER LOURMAT
Caméra	Doc-Print VX2
Machine à Glace pilée	Fiocchi
Thermocycleur pour 96 x 0,2 ml tubes et plaques 96 puits	PRIME (Standard)

- Consommables


- Tubes autoclavés :



- ✓ A usage unique : microtubes de centrifugation de 1,5-2 ml et tubes secs ;
- ✓ Tubes à vis et tubes coniques.



- Les cônes stériles (bleus, jaunes et blancs) de : •1-10  $\mu$ l • 20-200  $\mu$ l •100-1000  $\mu$ l.


### Réactifs utilisés



➤ La toxicité et les Mesures de protection individuelle pour chaque produit utilisé.

Produits	Fournisseur	Toxicité	Mesures de protection individuelle
Na <sub>2</sub> EDTA 	BIOCHEM Chemopharma	-Matières corrosives pour les métaux ; -Corrosion cutanée ; -Lésion oculaire grave.	- Porter des vêtements de protection (Blouse) avec des Chaussures de travail antidérapantes ; -Utilisation des lunettes de protection ; -Protection des mains par des gants : <ul style="list-style-type: none"> <li>• de type NBR (Caoutchouc nitrile)</li> <li>• épaisseur de la</li> </ul>

			<p>matière &gt;0,11 mm ;</p> <p>-Une protection respiratoire est nécessaire lors de formation d'aérosol ou de nébulosité.</p>
<p>Tris-HCl</p> 	<p>SIGMA life science</p>	<p>-Irritation cutanée ; -Irritation oculaire.</p>	<p>- Porter des vêtements de protection (Blouse) avec des Chaussures de travail antidérapantes ;</p>
<p>NaCl</p> 	<p>Honeywell Fluka</p>	<p>-Provoque une sévère irritation des yeux</p>	<p>-Utilisation des lunettes de protection ;</p> <p>- Porter des gants appropriés :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• type de matière NBR (Caoutchouc nitrile)</li> <li>• épaisseur de la matière &gt;0,11 mm ;</li> </ul> <p>-Une protection respiratoire est nécessaire lors de dégagement de poussière :</p>
<p>Sorbitol (mention d'avertissement non requis)</p>	<p>VWR CHEMICALS</p>	<p>-Ce produit n'est pas dangereux</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•un masque de type: Filtre à particules P1 (filtre 80% des particules atmosphériques)</li> </ul>

<p>Ethanol</p> 	<p>Honeywell Riedel-de Haen</p>	<p>-Liquide et vapeurs très inflammables ;</p> <p>-Provoque une sévère irritation des yeux.</p>	<p>- Porter des blouses de protection ignifuge en fibres difficilement inflammables (coton) et des chaussures de protection à propriétés antistatiques et résistant à la chaleur ;</p> <p>-Utilisation des lunettes de protection avec une protection sur les côtés ;</p> <p>-Porter des gants appropriés:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• type de matière Caoutchouc butyle ;</li> <li>• épaisseur de la matière 0,5 mm ;</li> </ul> <p>-Une protection respiratoire est nécessaire lors de formation de nébulosité :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•un masque de type: A (contre les gaz et les vapeurs organiques).</li> </ul>
<p>PK</p> 	<p>SIGMA life science</p>	<p>-Provoque une sévère irritation de la peau et des yeux ;</p> <p>-Peut irriter les voies respiratoires.</p>	<p>-Porter des vêtements de protection (Blouse), l'utilisation des lunettes de protection, et des Chaussures de travail antidérapantes ;</p> <p>-Porter des gants appropriés :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• type de matière NBR (Caoutchouc nitrile)</li> </ul>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>• épaisseur de la matière &gt;0,11 mm ;</li> <li>- Une protection respiratoire est nécessaire lors de dégagement de poussière:</li> <li>• un masque de type: Filtre à particules P2 (filtre 94% des particules atmosphériques).</li> </ul>
<p>BET</p> 	SIGMA-ALDRICH	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mortel par inhalation ;</li> <li>- Susceptible d'induire des anomalies génétiques.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Porter des vêtements de protection contre les risques chimiques de type 6 avec des Chaussures de travail antidérapantes ;</li> <li>- Utilisation des lunettes de protection avec une protection sur les côtés ;</li> <li>- Porter des gants appropriés : <ul style="list-style-type: none"> <li>• type de matière NBR (Caoutchouc nitrile)</li> </ul> </li> <li>• épaisseur de la matière &gt;0,11 mm ;</li> <li>- Une protection respiratoire est nécessaire : <ul style="list-style-type: none"> <li>• un masque de type: Filtre à particules P3 (filtre 99,95% des particules atmosphériques)</li> </ul> </li> </ul>

<p>Chloroforme</p> 	<p>SIGMA-ALDRICH</p>	<p>-Provoque une sévère irritation des yeux ;</p> <p>-Toxique par inhalation ;</p> <p>-Susceptible de provoquer le cancer.</p>	<p>-Porter des vêtements de protection contre les risques chimiques de type 6 avec des Chaussures de travail antidérapantes ;</p> <p>- Utilisation des lunettes de protection;</p> <p>- Porter des gants appropriés:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• type de matière FKM (caoutchouc fluoré)</li> <li>• épaisseur de la matière 0,7 mm ;</li> </ul> <p>- Une protection respiratoire est nécessaire lors de formation de nébulosité:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• un masque de type: AX (filtres anti gaz)</li> </ul>
<p>NaOH</p> 	<p>SIGMA-ALDRICH</p>	<p>-Peut être corrosif pour les métaux ;</p> <p>-Provoque des brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.</p>	<p>-Porter des vêtements de protection (Blouse) et des Chaussures de travail antidérapantes ;</p> <p>-Utilisation des lunettes de protection avec une protection sur les côtés ;</p> <p>-Protection des mains par des gants :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• de type NBR (Caoutchouc nitrile)</li> </ul>



			<ul style="list-style-type: none"> <li>• épaisseur de la matière &gt;0,3 mm ;</li> <li>-Une protection respiratoire est nécessaire lors de formation d'aérosol ou de nébulosité:</li> <li>• Un masque de type: Filtre à particules P2 (filtre 94% des particules atmosphériques).</li> </ul>
--	--	--	--

### Consignes de sécurité

➤ Assurer une protection individuelle efficace :

-porter obligatoirement des vêtements appropriés : blouse fermée ;

-porter obligatoirement des gants de nitrile ou latex peuvent-être recommandé ou indispensable pour certaines manipulations, celles de produits corrosifs, celles de produits très toxiques par voie cutanée, ils peuvent être doublés en situation plus risquée (Roy *et al.*, 2015) ;

-séparer les zones propres d'écriture et de lecture des zones de manipulation et ne pas porter de gants dans les zones propres (Roy *et al.*, 2015) ;

-utiliser obligatoirement un masque approprié pour une protection respiratoire pour les manipulations qui présentent des risques d'exposition par inhalation d'aérosols provenant d'échantillons potentiellement contaminés par des agents biologiques, ou de vapeurs chimiques dangereuses, entraînant des pathologies respiratoires (Clemont *et al.*, 2007) ;

-porter des lunettes de sécurité en cas de nécessité ;

-exécuter les manipulations impliquant des matières ou des solutions dangereuses sous une hotte chimique (Triolet et Mairesse, 1998) ;

-respecter les règles d'hygiène personnelle : se laver les mains, ôter les vêtements de travail souillés avant de manger, soigner et protéger immédiatement les blessures même les plus petites (Roy *et al.*, 2015) ;

-respecter les consignes de sécurité, les avertissements et les dangers qui sont indiqués dans les affiches de laboratoire.

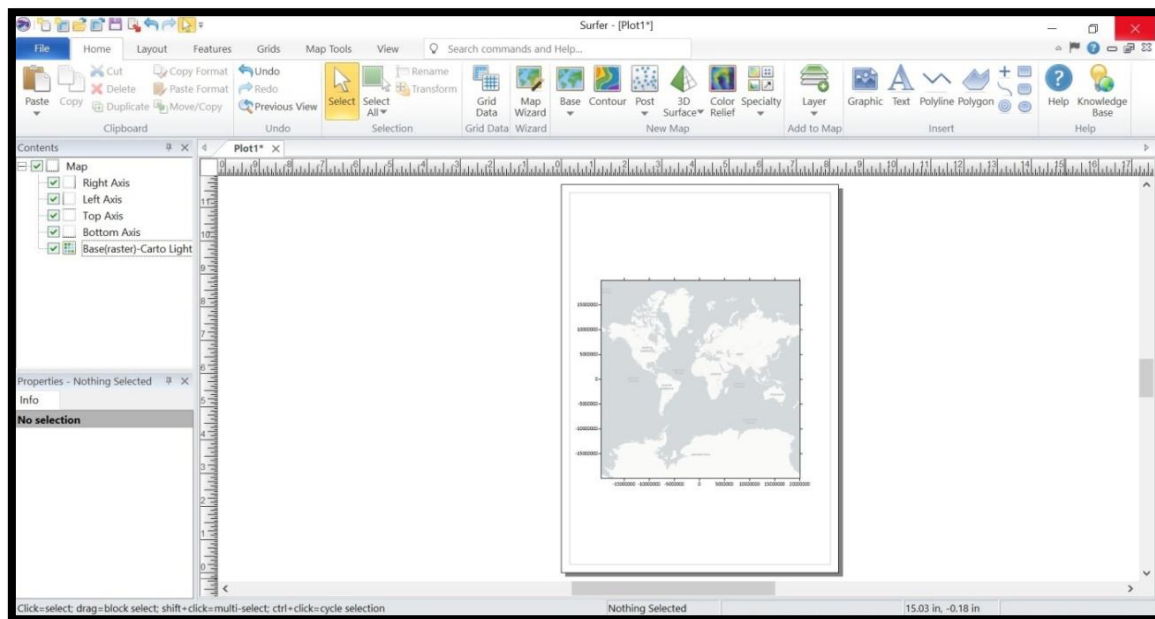
- Sans oublier d'étiqueter, entreposer et éliminer correctement les produits (Triolet et Mairesse, 1998) :

-étiqueter les flacons et les récipients contenant les produits chimiques ainsi que les solutions préparés que l'on souhaite conserver pour faciliter leur identification ;

-entreposer les déchets chimiques avant de les éliminer (recueillir ces déchets toxiques dans des récipients résistants) ;

-éliminer les déchets et tout matériel consommable contaminé par un produit toxique dans des sacs poubelles jaunes.

## Annexe 2. Logiciel de cartographie: Surfer version 18.1



La carte « Situation géographique de la zone d'étude » est créé à partir d'un logiciel puissant de contournage, de quadrillage et de cartographie de surface: Surfer, version 18.1. Projet de la société des logiciels graphiques scientifiques GOLDEN SOFTWARE, Colorado, USA.

## Annexe 3. Préparation de gel d'agarose (0,8%) pour la migration électrophorétique:

- 0,4g de poudre de gel d'agarose ;
- 50ml de TAE 1X ;
- 2 $\mu$ l de BET.

**Annexe 4.** Le colorant de chargement est préparé en mélangeant les produits suivants (Achour, 2015) :

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

**Annexe 5.** Préparation de TAE 1X (Tris base - acide acétique glaciale - EDTA) :

- 10ml TAE 50X;
- 490ml H<sub>2</sub>O.

**Annexe 6. Liste des Articles dans la littérature utilisés dans la partie expérimentale**

1. Abdel-Latif A. et Osman G. 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods* 13(1):1–9.

2. Armaleo D. et Clerc P. 1995. A rapid and inexpensive method for the purification of DNA from lichens and their symbionts. *Lichenologist* 27(3):207–213.

3. Banožić M., Jokić S., Ačkar Đ., Blažić M. et Šubarić D. 2020. Carbohydrates—Key Players in Tobacco Aroma Formation and Quality Determination. *Molecules* 25(7):1734.

4. Benbouza H., Baudoin J.-P. et Mergeai G. 2006. Amélioration de la méthode d'extraction d'ADN au CTAB appliquée aux feuilles de cotonnier. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10(2):73–76.

5. 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. *Annales de biologie clinique* 57(1):77–84.

6. Bokszczanin K. et Przybyla A.A. 2006. New simple and efficient method of DNA isolation from pear leaves rich in polyphenolic compounds. *International Journal of Horticultural Science* 12(4):21-24.

7. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S. et Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161(5):839–851.

8. Bowers J.E., Bandman E.B. et Meredith C.P. 1993. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. *Am. J. Enol. Vitic* 44:266–274.

9. Bowers J.E., Dangl G.S., Vignani R. et Meredith C.P. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39(4):628–633.

10. Chase M.W. et Hills H.H. 1991. Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40(2):215–220.
11. Dellaporta J.J., Wood J. et Hicks J.B. 1983. A plant DNA mini preparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1(4):19–21.
12. Demeke T. et Jenkins G.R. 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396(6):1977–1990.
13. Doyle J.J. et Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin* 19(1):11–15.
14. Doyle J.J. et Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
15. Esser K.-H., Marx W.H. et Lisowsky T. 2005. Nucleic acid-free matrix: Regeneration of DNA binding columns. *Bio Techniques* 39(2):270–271.
16. Fawell J. 2000. Risk Assessment Case Study -Chloroform and Related Substances. *Food and Chemical Toxicology* 38:S91–S95.
17. Funk V., Gostel M., Devine A., Kelloff C., Wurdack K., Tuccinardi C., Radosavljevic A., Peters M. et Coddington J. 2017. Guidelines for collecting vouchers and tissues intended for genomic work (Smithsonian Institution): Botany Best Practices. *Biodiversity Data Journal* 5:e11625.
18. Ghaffari S., Hasnaoui N. et Ferchichi A. 2011. Rapid, High Quality DNA Isolation from Tunisian Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Cultivars and Optimization of the RAPD Marker Technique. *Romanian Biotechnological Letters* 16(1):5881-5890.
19. Hanania U., Velcheva M., Sahar N. et Perl A. 2004. An improved method for isolating high-quality DNA from *Vitis vinifera* nuclei. *Plant MolecularBiology Reporter* 22(2):173–177.
20. Hasan S.M.Z., Shafie M.S.B. et Shah R.M. 2008. Efficient method for the extraction of genomic DNA from wormwood (*Artemisia capillaris*). *African Journal of Biotechnology* 7(18):3211–3216.
21. Inglis P.W., Pappas M. de C.R., Resende L.V. et Grattapaglia D. 2018. Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and RNA from

challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications. *Plos One* 13(10):e0206085.

22. Jadhav K.P., Ranjani R.V. et Senthil N. 2015. Chemistry of plant genomic dna extraction protocol. *Bioinfolet* 12(3A):543–548.

23. Japelaghi R.H., Haddad R. et Garoosi G.-A. 2011. Rapid and Efficient Isolation of High Quality Nucleic Acids from Plant Tissues Rich in Polyphenols and Polysaccharides. *MolecularBiotechnology* 49(2):129–137.

24. Jobes D.V., Hurley D.L. et Thien L.B. 1995. Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. *Taxon* 44(3):379–386.

25. Kang T.-J. et Yang M.-S. 2004. Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic plants. *BMC Biotechnology* 4(1):20.

26. Katevatis C., Fan A. et Klapperich C.M. 2017. Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase. *Plos One* 12(5):e0176848.

27. Khanuja S.P.S., Shasany A.K., Darokar M.P. et Kumar S. 1999. Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils. *Plant Molecular Biology Reporter* 17:1–7.

28. Kim C.S., Lee C.H., Shin J.S., Chung Y.S. et Hyung N.I. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Research* 25(5):1085–1086.

29. Lefort F. et Douglas Gerard C. 1999. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Annals Of Forest Science* 56(3):259–263.

30. Lemke L., Rex M., Zyprian E. et Töpfer R. 2011. A simple, inexpensive and environmentally friendly method for high through out DNA extraction from grapevine (*Vitis* spp.). *Vitis* 50(1):7–10.

31. Lewinsohn E., Steel C.I. et Croteau R. 1994. Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms. *Plant Molecular Biology Reporter* 12:20–25.

32. Lodhi M.A., Ye G.-N., Weeden N.F. et Reisch B.I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12:6–13.

33. Lucas M.S., Carvalho C. da S., Hypolito G.B. et Côrtes M.C. 2019. Optimized protocol to isolate high quality genomic DNA from different tissues of a palm species. *Hoehnea* 46(2):e942018.
34. Marsal G., Baiges I., Canals J.M., Zamora F. et Fort F. 2011. A Fast, Efficient Method for Extracting DNA from Leaves, Stems, and Seeds of *Vitis vinifera* L. *American Journal of Enology and Viticulture* 62(3):376–381.
35. 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. *J. Int. Sci. VigneVIN* 47(4):227–237.
36. Murray M.G. et Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8(19):4321–4326.
37. Nazhad N.R. et Solouki M. 2008. Separation of DNA for Molecular Markers Analysis from Leaves of *Vitis vinifera*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11(11):1436–1442.
38. Nugroho L.H. et Verpoorte R. 2002. Secondary metabolism in tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68:105–125.
39. Nunes C.F., Ferreira J.L., Fernandes M.C.N., Breves S., Generoso A.L., Soares B.D.F., Dias M.S.C., Pasqual M., Borem A. et Cançado G.M. 2011. An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. *Ciência Rural* 41(8):1383–1389.
40. Palomera-Avalos V., Castro-Félix P. et Villalobos-Arámbula A.R. 2008. High yield and high quality DNA from vegetative and sexual tissues of Mexican white pine (*Pinus ayacahuite*). *African Journal of Biotechnology* 7(1):51–54.
41. Piccolo S.L., Alfonzo A., Conigliaro G., Moschetti G., Burruano S. et Barone A. 2012. A simple and rapid DNA extraction method from leaves of grapevine suitable for polymerase chain reaction analysis. *African journal of Biotechnology* 11(45):10305-10309.
42. Pipan B., Zupančič M., Blatnik E., Dolničar P. et Meglič V. 2018. Comparison of six genomic DNA extraction methods for molecular downstream applications of apple tree (*Malus X domestica*). *Cogent Food & Agriculture* 4:1–10.
43. Pirttilä A.M., Hirsikorpi M., Kämäräinen T., Jaakola L. et Hohtola A. 2001. DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 19(3):273a-f.

44. Ribeiro R.A. et Lovato M.B. 2007. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. *Genetics and Molecular Research* 6(1):173–187.
45. Rimola A., Costa D., Sodupe M., Lambert J.-F. et Ugliengo P. 2013. Silica Surface Features and Their Role in the Adsorption of Biomolecules: Computational Modeling and Experiments. *Chemical Reviews* 113(6):4216–4313.
46. Ripoll J., Bon M.-C. et Jones W. 2011. Optimisation de l'extraction d'ADN génomique de la morelle jaune (*Solanum elaeagnifolium* Cav.), une plante invasive des milieux cultivés en région méditerranéenne. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 15(1):95–100.
47. Russell A., Samuel R., Rupp B., Barfuss M.H.J., Šafran M., Besendorfer V. et Chase M.W. 2010. Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandaeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon* 59(2):389–404.
48. Sahu S.K., Thangaraj M. et Kathiresan K. 2012. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *International Scholarly Research Network Molecular Biology* 2012:1–6.
49. Scaldaferrri M.M., Freitas J.S., Santos E.S.L., Vieira J.G.P., Gonçalves Z.S. et Cerqueira-Silva C.B.M. 2013. Comparison of protocols for genomic DNA extraction from *velamepimenta* (*Croton linearifolius*), a native species to the Caatinga, Brazil. *African Journal of Biotechnology* 12(30):4761–4766.
50. Schori M., Appel M., Kitko A. et Showalter A.M. 2013. Engineered DNA polymerase improves PCR results for plastid DNA. *Applications in Plant Sciences* 1:1–7.
51. Sharma A.D., Gill P.K. et Singh P. 2002. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 20(4):415–415.
52. Shi R., Lewis R.S. et Panthee D.R. 2018. Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification. *Plos One* 13(12):e0203011.
53. Tagliavia M., Nicosia A. et Gianguzza F. 2009. Complete decontamination and regeneration of DNA purification silica columns. *Analytical Biochemistry* 385(1):182–183.
54. Tan S.C. et Yiap B.C. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009:1–10.

55. Thatcher S.A. 2015. DNA/RNA Preparation for Molecular Detection. *Clinical Chemistry* 61(1):89–99.

56. Tiwari S., Tomar R.S., Tripathi M.K. et Ahuja A. 2017. Modified Protocol for Plant Genomic DNA Isolation. *Indian Res. J. Genet. & Biotech.* 9(4):478 – 485.

57. 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.

58. Xin Z., Velten J.P., Oliver M.J. et Burke J.J. 2003. High-Throughput DNA Extraction Method Suitable for PCR. *BioTechniques* 34:820–826.

59. Yee W., Kumar J.N. et Muthusamy P.D. 2018. Inclusion of 2-Mercaptoethanol in Lysis Buffer Could Interfere with Isolation of High Molecular Weight DNA from Freshwater Microalgae. *Indian Journal of Microbiology* 58(1):109–113.

60. Zainabadi K., Dhayabaran V., Moideen K. et Krishnaswamy P. 2019. An efficient and cost-effective method for purification of small sized DNAs and RNAs from human urine. *PLoS ONE* 14(2):1–15.



# Résumés

## ملخص

تعتبر الكرمة من الزراعات القديمة في شمال إفريقيا والجزائر خصوصا، حيث تحتل حاليا منتجات هذه النبتة الخشبية من نوع *Vitis vinifera* L. المراتب الأولى عالميا من الناحية الاقتصادية، مما جعلها موضوعا لدراسات جينية معمقة، فقد خلق الانتشار الواسع لزراعة الكروم تنوعا وراثيا مهما، أدى إلى ظهور العديد من الأصناف التي لم يتم التعرف عليها أو تم تسميتها بأسماء مختلفة اعتمادا على المنطقة، مما يتطلب جمع مختلف هذه الأصناف للتعرف عليها وتصنيفها من خلال تطبيق أساليب البيولوجيا الجزيئية. إن الهدف من دراستنا هو استخلاص حمض نووي جينومي نقي من جميع الملوثات، من أربعة أصناف من الكروم التابعة لبلدية القنطرة ولاية بسكرة. لقد قمنا بتحسين طريقة لاستخلاص الحمض النووي الجينومي من أوراق العنب و التي تعتمد على استخدام CTAB و ذلك انطلاقا من بروتوكول مرجعي (Piccolo *et al.* 2012)، كما اقترحنا بروتوكولا فعالا، يعتمد على استخدام colonne de DNeasy (Qiagen) لتنقية الحمض النووي، وقمنا أيضا بتقليل تكلفته (137,03 دج / عينة) و تقليل مدة تطبيقه (2سا 13د و 15ثا)، و كما قمنا بإعداد الأوراق بطريقة بسيطة غير مكلفة على شكل مسحوق محفوظ يمكن استخدامه في أي وقت لاستخلاص الحمض النووي الجينومي السليم. لقد أثبتت تقنية الهجرة الكهربائية فعالية طرق إعداد وحفظ الأوراق لمدة طويلة.

**الكلمات المفتاحية:** ورق العنب، استخراج الحمض النووي الجيني، تنقية، CTAB، colonnes de DNeasy.

## Résumé

La vigne est une des cultures les plus anciennes de l'Afrique de nord et l'Algérie en particulier, actuellement les produits de cette plante ligneuse de l'espèce *Vitis vinifera* L. occupent les premières places mondiales au niveau économique, ce que l'a fait l'objet des études génétiques approfondies, où la large distribution de la viticulture a créé une diversité génétique importante et conduit à l'apparition de nombreux cultivars mal identifiés ou appelés par différents noms selon les régions, cela nécessite de recueillir ces variétés afin de les identifier par l'application des méthodes de biologie moléculaire. Notre étude s'inscrit dans l'objectif de l'extraction et la purification d'ADN génomique de tous contaminants majeurs, de quatre variétés de la vigne appartenant à la commune d'El-Kantara, wilaya de BISKRA. Nous avons optimisé une méthode d'extraction d'ADNg des feuilles de la vigne à base de CTAB à partir d'un protocole de référence de Piccolo *et al.* (2012), nous avons proposé un protocole efficace qui utilise les colonnes de DNeasy (Qiagen) pour bien purifier l'ADNg, nous avons également réduit son coût (137,03 DA/Ech) et minimisé sa durée d'application (2h 13min 15s), ainsi que nous avons développé un protocole simple, facile et peu coûteux pour bien conserver les feuilles et l'utiliser dans n'importe qu'elle moment. L'analyse électrophorétique permet la mise en évidence de l'efficacité des méthodes de préparation et conservation de ces feuilles à longue durée.

**Mots Clés:** feuilles de la vigne, extraction d'ADNg, purification, CTAB, colonnes de DNeasy.

## Abstract

The vine is one of the oldest crops in North Africa and Algeria in particular, currently, the products of this woody plant of the species *Vitis vinifera* L. occupy the world's leading economic places, this has been the subject of extensive genetic studies where the wide distribution of the vineyard has created significant genetic diversity and leads to the appearance of many cultivars that are poorly identified or called under different names depending on the region, this requires a collecting of these varieties to identify and classify them by applying molecular biology methods. The objective of our study is the extraction and purification of gDNA from all major contaminants, from four cultivars of vines belonging to the region of El-Kantara, wilaya of BISKRA. We optimized a CTAB-based gDNA extraction method from grapevine leaves, from a reference protocol of Piccolo *et al.* (2012), we have proposed an effective protocol that uses DNeasy columns (Qiagen) to properly purify gDNA, we have reduced its cost (137,03 DA/sample) and minimized its application time (2h 13min 15s), as we have prepared leaves in the form of a preserved powder using simple and inexpensive methods for use at any time to obtain intact genomic DNA. Electrophoretic analysis demonstrates the effectiveness of methods for the preparation and conservation of these long-term leaves.

**Keywords:** grapevine leaves, extraction of genomic DNA, purification, CTAB, DNeasy columns.