



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 :
Aicha Nesrine AIDOUDI et Samah BOUDRAS

Le : mercredi 30 septembre 2020

Thème

Etude comparative entre deux méthodes d'extraction d'ADN génomique, SDS et CTAB

Jury :

Mlle. Khadidja BOUKHAROUBA	Pr	Université de Biskra	Président
Mme. Fatima Zohra BENABDELLAH	MAA	Université de Biskra	Examineur
Mlle. Hanane ACHOUR	MAA	Université de Biskra	Rapporteur

Année universitaire : 2019/ 2020

Remerciements

Nous adressons en premier lieu notre reconnaissance à ALLAH notre DIEU tout puissant, de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre encadreur Mme. ACHOUR Hanane pour l'aide qu'elle nous a apportée, pour sa patience et la disponibilité dont elle a fait preuve à notre égard et de son œil critique qui nous a été très précieux pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes sections de notre mémoire, nous le remercions vivement et nous espérons que nos efforts et nos résultats ont été à la mesure de son attente.

Nous tenons également à remercier les membres du jury, qui ont bien voulu accepter de porter leur jugement sur ce modeste travail que nous souhaitons à la mesure de leur satisfaction.

Je ne puis m'empêcher d'exprimer mes meilleurs remerciements à tous les ingénieurs du laboratoire d'El-Hadjeb pour leur patience et disponibilité dans toutes les circonstances.

Mes derniers remerciements à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

C'est avec une grande gratitude et des mots sincères, que Nous dédions ce modeste travail de fin d'étude à nos très chers parents, c'est grâce à vous nous avons réussi toutes ces années d'études de biologie, merci pour votre amour et pour votre soutien perpétuel, pour leur soutien et encouragement et vos prières tout au long de nos étude

A nos chers sœurs et frères

Qui nous a donné de l'amour et de la vivacité

Tous nos amies chacun par son nom

Haifa, Asma, Rayane, Rania, Hasna, Faten, Khadija, Afaf, Ikram, Mounira Ghania, yousra, nous nous ne pouvons trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer notre affection et nos pensées, vous êtes pour nous des sœurs et des amies sur qui nous pouvons compter.

A tous nos collègues

A toute notre promotion 2019-2020 sans exception.

Aicha-Samah

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Table des matières

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

Première Partie: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. GENERALITE SUR LA VIGNE

1.1. Taxonomie et diversité de la vigne	3
1.2. L'espèce <i>Vitis vinifera</i>	4
1.2.1. Compartiment cultivé	4
1.2.2. Compartiment sauvage	4
1.3. Morphologie générale de la vigne.....	4

Chapitre 2. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE

2.1. Génome de la vigne	6
2.2. Extraction de l'ADN génomique	6
2.2.1. La lyse cellulaire	6
2.2.1.1. Extraction par CTAB	7
2.2.1.2. Extraction par SDS	7
2.2.2. Purification d'ADN extrait	7
2.2.2.1. Extraction liquide liquide	7
a. Extraction à base de phénol /chloroforme /alcool isoamylique	7
b. Salting out	8
2.2.2.2. Extraction liquide solide.....	8
2.3. Techniques d'analyse de l'ADN	9
2.3.1. Analyse sur gel d'agarose	9

2.3.2. Analyse de la concentration de l'ADN	9
2.3.2.1. Dosage de l'ADN par spectrophotométrie	9
2.3.2.2. Dosage de l'ADN par nano drop	9
2.3.3. Amplification in vitro de l'ADN extrait par PCR	9
a. La dénaturation	10
b. Hybridation	10
c. Allongement	10

Deuxième partie: PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Stratégie de travail	12
3.2. Présentation de laboratoire de biologie moléculaire	13
3.3. Présentation des sites d'étude	14
3.4. Matériel biologique	16
3.4.1. La récolte	16
3.4.2. Préparation du matériel végétal	16
3.4.2.1. Séchage des feuilles	16
a. Séchage à l'étuve (séchage à chaud)	16
b. Séchage à lyophilisateur (séchage à froid)	17
3.4.2.2. Conservation des feuilles	18
3.4.2.3. Broyage des feuilles	19
3.5. Méthode de travail	21
3.5.1. Préparation des solutions utilisées dans les protocoles d'extraction d'ADN	21
3.5.2. Extraction d'ADN génomique.....	24
3.5.2.1. Protocole (A) d'Aboul-Maaty et Oraby (2019)	25
3.5.2.2. Protocole (B) de Lucas <i>et al.</i> (2019)	26
3.5.2.3. Protocole (C) d'Ali <i>et al.</i> (2019).....	27
3.5.2.4. Protocole (D) de Xia <i>et al.</i> (2019)	28
3.5.3. Détermination de la concentration et la pureté d'ADN extrait.....	29
3.5.3.1. Détermination de la concentration d'ADN.....	29
3.5.3.2. Contrôle de la pureté de l'ADN extrait	29
3.5.3.3. Vérification de l'intégrité de l'ADN en présence de BET	30
a. Préparation du gel	30
b. préparation des échantillons	30
c. Migration et visualisation de l'ADN.....	31
3.5.4. Amplification in vitro de l'ADN extrait par PCR	32
3.5.4.1. Préparation du mélange réactionnel pour PCR.....	32
3.5.4.2. Contrôle de la taille des fragments à amplifier	33

Chapitre 4. Résultats et discussion

4.1. Résultats	35
4.1.1. Extraction de l'ADN.....	35
4.1.1.1. Protocole (A)	35

4.1.1.2. Protocole (B)	36
4.1.2. Evaluation de l'intégrité d'ADN extrait.....	39
4.1.2.1. Protocole (A)	39
4.1.2.2. Protocole (B)	39
4.1.3. Évaluation de la rapidité, la simplicité et le coût des protocoles choisis	40
4.2. Discussion analytique.....	42
4.2.1. Matériel végétal.....	42
4.2.1.1. Choix des feuilles	42
4.2.1.2. Séchage des feuilles	43
4.2.2. Techniques d'analyse.....	44
4.2.2.1. Protocole d'extraction (A).....	44
4.2.2.2. Protocole d'extraction (B).....	46
4.2.2.3. Protocole d'extraction (C).....	47
4.2.2.4. Protocole d'extraction (D).....	51
4.2.3. Evaluation des protocoles d'extraction.....	52
Conclusion et perspectives	54
Bibliographie	55

Annexes

Résumés

Liste des Tableaux

Tableau 1. Coordonnées géographiques de site de collecte.	15
Tableau 2. Différentes variétés de la vigne utilisées au cours de l'extraction d'ADN génomique, les conditions de séchage et la conservation.....	21
Tableau 3. Réactifs utilisées au cours de l'extraction d'ADN.....	21
Tableau 4. Préparation 5ml du tampon CTAB 1% pour 5 échantillons.	23
Tableau 5. Préparation de 2 ml du tampon CTAB 2% pour 5 échantillons.	23
Tableau 6. Préparation 4ml de tampon CTAB 3% pour 5 échantillons.	23
Tableau 7. Préparation 2ml de tampon SDS 1% pour 5 échantillons.	24
Tableau 8. Préparation 5ml de tampon SDS 2% pour 5 échantillons.	24
Tableau 9. Préparation 5ml du tampon de lavage.....	24
Tableau 10. Couples d'amorces choisies et la longueur du fragment obtenu avec quelques paramètres associant.	32
Tableau 11. Programme d'amplification d'un couple d'amorces VVMD5.	33
Tableau 12. Evaluation des protocoles en termes de simplicité et rapidité.....	41
Tableau 13. Estimation de coût de l'extraction d'ADN génomique pour un échantillon.	41
Tableau 14. Résultat de la pureté d'ADN extrait de quelques échantillons par Aboul-Maaty et Oraby (2019).....	45
Tableau 15. Comparaison des résultats obtenus par les protocoles appliqués.....	53

Liste des Figures

Figure 1. Classification de la vigne (André, 1992).	3
Figure 2. Feuille de la vigne (André, 1992).....	5
Figure 3. Différentes étapes appliquées dans notre travail.	13
Figure 4. Situation géographique de la région d'étude (Site web 1 et 2).	15
Figure 5. Séchage à l'étuve (photo originale).....	17
Figure 6. Appareil de lyophilisation (photo originale).....	18
Figure 7. Séchage à lyophilisateur (photo originale).	18
Figure 8. Conservation des feuilles (photo originale).	19
Figure 9. Broyage des feuilles (photo originale).....	20
Figure 10. Différentes étapes de préparation des échantillons (photo originale).....	20
Figure 11. Étape de migration et visualisation de l'ADN (photo originale).....	31
Figure 12. Exemple illustré d'un résultat typique après électrophorèse sur gel d'agarose (2%) des produits de PCR de locus VVMD5.....	34
Figure 13. Après l'ajoute de 2-β-mercaptoéthanol au tampon de lyse (photo originale).	36
Figure 14. L'étape de lavage des échantillons au tampon de sorbitol (photo originale).	37
Figure 15. Étape de la lyse cellulaire par le tampon de CTAB (photo originale).	37
Figure 16. Précipitation et élimination des protéines par le chloroforme/alcool isoamylique (photo originale).	38
Figure 17. Résultat de la précipitation de l'ADN (photo originale).....	38
Figure 18. Profile électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application de protocole (A) (photo originale).	39
Figure 19. Profile électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application de protocole (B)..	40

Liste des abréviations

2-βME : 2-β-Mercaptoéthanol.

A : Absorbance

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ARN : Acide Ribonucléique

BET : Bromure d'éthidium.

CAI : Chloroforme Alcool Isomaylique.

CHL : Chloroforme

CTAB : Cetyl trimethylammonium.

DA : Dinar Algérien.

dNTP : Désoxyribonucléoside Triphosphates.

DO : Densité Optique.

E : Est.

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétra-acétique.

N : Nord.

NaAc : Acétate de Sodium

NaCl : Chlorure de Sodium.

P.k : Protéinase K.

Pb : Paire de base.

PCR : Amplification en Chaîne par Polymérase (Polymerase Chain Reaction).

PVP : poly vinyl pyrrolidone.

SAU : Surface Agricole Utile

SDS : Dodécylsulfate de Sodium.

SSRs: Séquences simple répétées.

T° : Température.

Tab : Tableau .

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

TE : Tris-EDTA.

Tris-HCl : Trizma hydrochloride.

U.V : Ultraviolet.

Introduction

Introduction

La vigne représente sans aucun doute l'une des cultures les plus importantes et les plus répandues dans les régions à climat tempéré et elle est d'une importance économique majeure surtout dans le bassin méditerranéen (Amedjkouh, 2004).

En Algérie, comme dans l'ensemble des pays viticoles, la vigne occupe une place importante sur le plan économique. Avant l'indépendance, le vignoble algérien couvrait une superficie de 350000 hectares. En 1983, le vignoble algérien atteignait la plus grande superficie de son histoire avec 400000 hectares. Après l'indépendance, l'Algérie a hérité un vignoble colonial estimé à plus de 350.000 Ha. Après la crise vitivinicole Algéro-Française en 1966, la reconversion et la reconstitution du vignoble algérien inéluctable a été entamée (Agouazi, 2013).

Actuellement, la viticulture occupe une superficie de 99432 ha et représente 12% de la SAU (Surface Agricole Utile) occupée par les cultures. Elle constitue la 4^{ème} culture pérenne sur le plan de la surface et représente le 2^{ème} poste à l'exportation (Agouazi, 2013).

Le *Vitis vinifera* et les espèces apparentées ont fait l'objet d'études génétiques approfondies en raison de leur culture et de leur importance dans le monde. Cette plante a été utilisée pour la cartographie génétique, la transformation génétique et la prise d'empreintes d'ADN (Lodhi *et al.*, 1994) et dans de nombreux domaines tels qu'en phytothérapie pour soulager les sensations de jambes lourdes, en cosmétologie pour ses propriétés anti-âge, et également dans l'alimentation (Pierre, 2019). La taille relativement petite du génome de *V. vinifera* par rapport à de nombreuses autres espèces de plantes pérennes devrait faciliter les études de génétique moléculaire de *Vitis* (Lodhi *et al.*, 1994).

L'application de la biologie moléculaire pour étudier la variabilité génétique des végétaux est restée pendant longtemps limitée par les difficultés d'extraction de l'ADN. L'extraction et la purification d'ADN est la première étape dans la plupart des études de biologie moléculaire et dans toutes les techniques d'ADN. Il existe des méthodes conventionnelles pour extraire simplement l'ADN de différents organismes vivants. Il y a aussi des Kits commerciaux qui nous donnent une bonne qualité mais leur quantité est limitée, pour cela la plupart des chercheurs utilisent les méthodes conventionnelles pour trouver le maximum de quantité (Abdelkrim et Djaouida, 2016).

L'extraction de l'ADN à partir de la vigne a cependant été difficile en raison de la présence de contaminants tels que les polyphénols et les polysaccharides. La présence de ces contaminants dans les préparations d'ADN rend souvent les échantillons visqueux et rend l'ADN extrait non amplifiable par la PCR. Les protocoles d'extraction d'ADN existants produisent souvent des rendements et / ou une qualité insatisfaisante.

L'objectif de cette étude est de faire une étude comparative entre deux méthodes d'extraction d'ADN, méthode d'extraction par le SDS et celle de CTAB, pour choisir une méthode efficace, simple, peu coûteuse et elle permet d'extraire un ADN hautement pur et en quantité suffisante qui seront soumis à des analyses de biologie moléculaire. De plus, nous allons tenter à optimiser une méthode de préparation des échantillons qui permet de conserver les feuilles de la vigne à longue période sans altérer leurs ADN et aussi sans besoin des moyens et des équipements appropriés, comme le congélateur (-80°C).

Pour atteindre à tous ces objectifs, il faut d'abord répondre à la problématique suivante : quelle est la meilleure méthode à appliquer pour obtenir un ADN de haute pureté, en bonne quantité, dans un temps court et d'un coût raisonnable ? Pour cela notre travail est divisé en deux parties :

Une partie de synthèse bibliographique répartie en deux chapitres, le premier chapitre va consacrer à la classification des vitacées, l'espèce *Vitis vinifera* et la morphologie générale de la vigne, alors que le deuxième chapitre va présenter le génome de la vigne, les différentes méthodes d'extraction et puis les techniques d'analyse et l'amplification *in vitro* de l'ADN extrait par PCR.

Une partie expérimentale, va contenir quatre parties « la stratégie de travail » dont nous allons présenter le déroulement de ce travail, « Matériel et méthodes » dans cette partie nous allons expliquer en détail les méthodes de traitement des feuilles, la préparation des différents réactifs puis les protocoles à appliqués et enfin la détermination de la pureté et de la concentration d'ADN extrait. La partie « résultats et discussion » contient les profils des protocoles appliqués, évaluation de l'intégrité d'ADN extrait, estimation des coûts et discussion analytique qui comporte le choix de matériel végétal et les analyses de tous les protocoles choisis, et enfin une partie d'évaluation des protocoles.

Première Partie

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

GENERALITE SUR LA

VIGNE

1.1. Taxonomie et diversité de la vigne

La vigne appartient à la famille des Vitacées qui comprend un millier d'espèces réparties en quatorze genres dont les principaux sont : *Ampelopsis* et *Parthenocissus* (vignes ornementales), *Cissus* (vigne tropicale) et le genre *Vitis* originaire des zones tempérées de l'Asie, de l'Europe et de l'Amérique. Le genre *Vitis*, auquel appartient la vigne, est le seul genre qui est utilisé en agriculture pour ses fruits. Il est divisé en deux sous genres (fig. 1), le sous genre *Muscadinia* à $2n = 40$ chromosomes et le sous genre *Euvitis* à $2n = 38$ chromosomes (André, 1992). La quasi-totalité des vignes cultivées fait partie du sous genre *Euvitis*, à l'intérieur duquel on distingue trois groupes (Pierre, 1986) :

- groupe eurasiatique : comporte une seule espèce *Vitis vinifera* qui comprend des milliers de variétés cultivées ;
- groupe asiatique : comprend dix espèces, la plus connue est *Vitis amurensis* ;
- groupe américain : comprend plusieurs espèces, les plus importants sont *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*, *Vitis labrusca* et *Vitis berlandieri*.

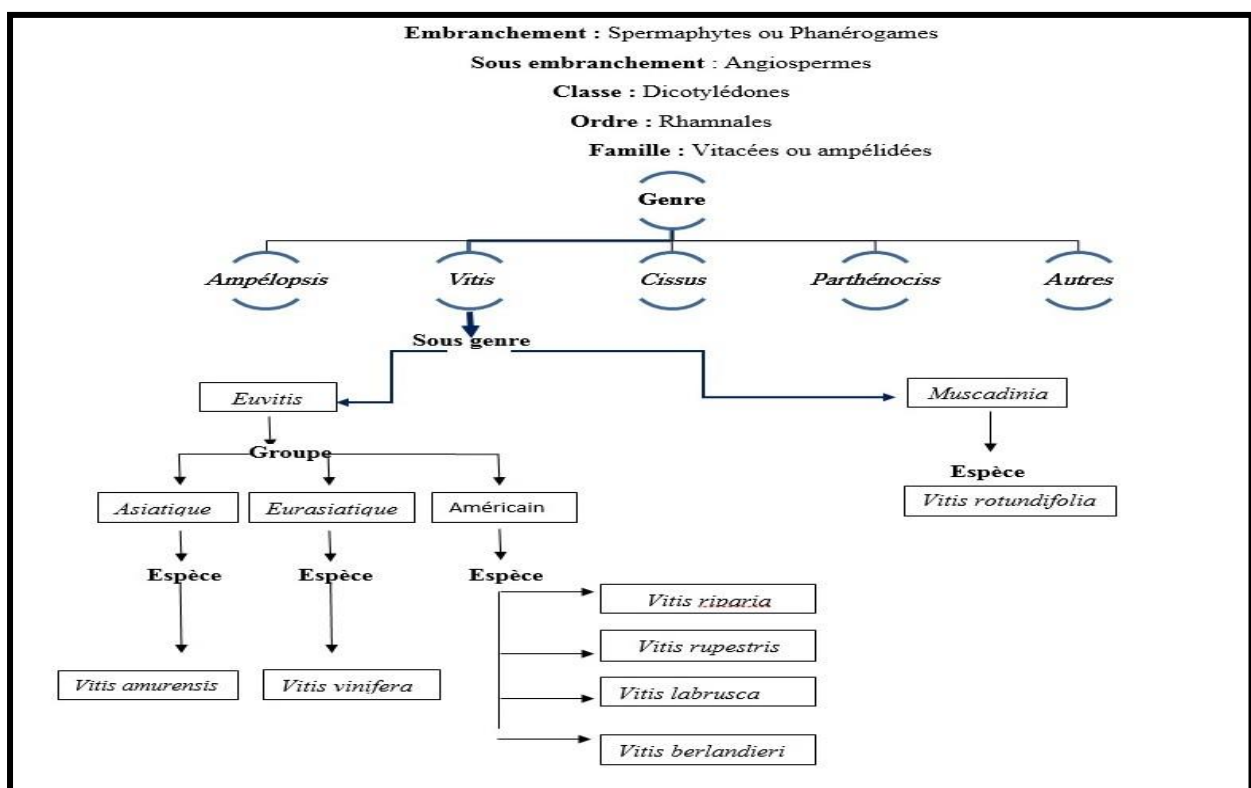


Figure 1. Classification de la vigne (André, 1992).

1.2. L'espèce *Vitis vinifera*

L'espèce *Vitis vinifera* comprend deux compartiments : un cultivé et un autre sauvage. Ces deux plantes peuvent, avec une probabilité non nulle, échanger des gènes par hybridation directe ou indirecte (Reynier, 2011). Toute plante cultivée est issue d'un parent sauvage suite à un processus de domestication. Donc, la domestication a créé un compartiment cultivé à partir de compartiments sauvages particuliers (Agouazi, 2013).

1.2.1. Compartiment cultivé

Selon certaines estimations, le nombre de variétés cultivées dans le monde se situerait entre 7000 et 10000, identifiées sur la base de leurs caractéristiques ampélographiques (Agouazi, 2013).

La viticulture dans le monde s'étend sur les cinq continents et sa surface est de 8 millions d'hectares où seules quelques centaines de cépages (300-400) constituent l'essentiel de l'encépagement mondial actuel (Agouazi, 2013).

1.2.2. Compartiment sauvage

La vigne sauvage dite lambrusque est considérée par de nombreux spécialistes comme étant l'ancêtre ou le plus proche parent sauvage des vignes cultivées contemporaines et anciennes. Elle présente des différences morphologiques végétatives (fleurs, pépins, fruits, feuillage), comme elle présente un dimorphisme sexuel ou dioïque (Agouazi, 2013 ; Reynier, 2011).

1.3. Morphologie générale de la vigne

La vigne est une plante ligneuse grimpante, à souche pérenne (Reynier, 2011). Elle est constituée d'un système racinaire en pivot et d'un système aérien avec un tronc et ramifications sarmenteuses. La racine se ramifie, au cours de son développement, pour former un réseau de racines appelé « Système racinaire ». Les racines d'une souche de vigne sont des racines adventives constituant avec la partie enterrée de la tige, la partie souterraine. Ces racines ont avant tout un rôle d'ancrage pour la plante. Le système aérien forme d'un tronc qui se divise en bas portant des bois de taille, qui peuvent être long ou court, ces bois, appelés sarment, portent des bourgeons ou des yeux qui donneront naissance à un rameau feuillé, fructifère ou non. Entre les deux mois d'avril et mai, les feuilles s'apparaissent ainsi que de minuscules inflorescences (Agouazi, 2013).

Les feuilles de vigne sont insérées sur le rameau au niveau des nœuds en position alterne par l'intermédiaire d'un pétiole assez long. La feuille de vigne est simple, dentée et

présente des sinus plus ou moins accentués ; elle porte en général cinq lobes séparés par cinq nervures (fig. 2) (Reynier, 2011).

La forme des dents, le sinus pétiolaire, la pilosité et la pigmentation fait que les feuilles sont les organes les plus utilisées en ampélographie pour la détermination des cépages (Reynier, 2011).

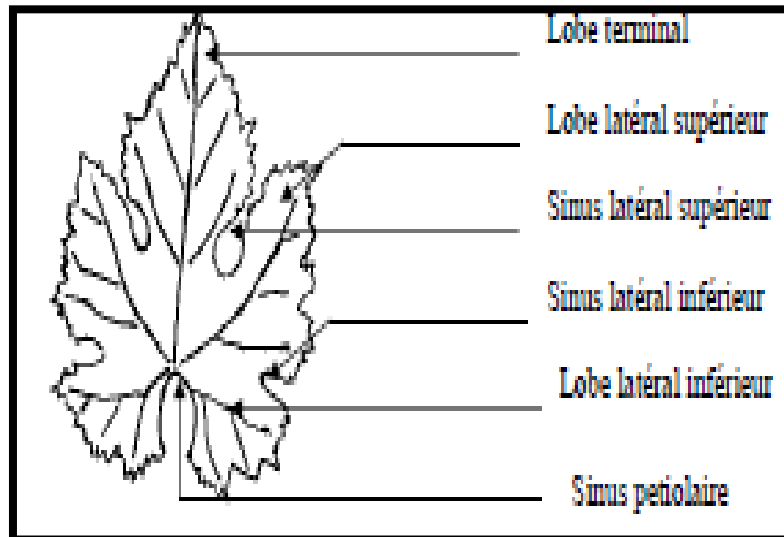


Figure 2. Feuille de la vigne (André, 1992).

Chapitre 2
EXTRACTION D'ADN
GENOMIQUE

2.1. Génome de la vigne

Le génome est l'ensemble des informations génétiques présentes chez un individu. Le matériel principal support est l'ADN localisé dans le noyau cellulaire qui se présente chez la vigne (genre *Vitis*) sous la forme de 38 chromosomes (2 x 19, un jeu de chromosomes de chaque parent) (Torregrosa, 2014). Il existe aussi des informations génétiques dans les mitochondries et les chloroplastes mais en moindre quantité. En théorie, toutes les cellules constituant un cep de vigne ont le même contenu génomique. En réalité, le génome est dynamique, il subit en permanence des mutations naturelles, des erreurs de réplication de l'ADN ou des modifications de configuration de l'ADN (épigénétique) qui conduisent à des lignées cellulaires divergentes du zygote original. Ces variations, qui s'accumulent dans les différents organes de la vigne en conduisant parfois à des variations phénotypiques, peuvent se propager par bouturage ou par multiplication sexuée. On estime que la taille du génome nucléaire de *Vitis vinifera* avoisine les 475 millions de nucléotides, taille similaire aux autres membres du groupe des *Vitis* (Torregrosa, 2014).

2.2. Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN) a considérablement évolué depuis qu'elle a été effectuée pour la première fois en 1869 (Tan et Yiap, 2009). Il s'agit de la première étape nécessaire pour de nombreuses applications en aval utilisées dans le domaine de la biologie moléculaire. L'extraction d'ADN contenu dans des cellules eucaryotes ou procaryotes, nécessite plusieurs étapes :

- lyse cellulaire ;
- purification liquide-liquide ou liquide-solide ;
- précipitation d'ADN par l'utilisation des alcools.

2.2.1. La lyse cellulaire

Elle est la première étape qui consiste à rompre les membranes cellulaires afin de libérer l'ADN dans la solution. Selon l'échantillon utilisé, les protocoles pour extraire l'ADN varient. Lorsque l'ADN doit être extrait d'un tissu solide, celui-ci doit être broyé afin d'obtenir une solution homogène des cellules provenant de ce tissu. Ainsi, la lyse des cellules, et par conséquent l'extraction de l'ADN, seront facilitées.

La destruction de la membrane cellulaire se fait par des agents chimiques ou enzymatiques, la lyse chimique est beaucoup plus utilisée, il y a deux méthodes conventionnelles utilisées CTAB et SDS.

2.2.1.1. Extraction par CTAB

Dans l'extraction de l'ADN, le bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB) est incorporé dans le tampon d'extraction pour éliminer les lipides membranaires et favoriser la lyse cellulaire, même pour les tissus riches en polysaccharides et une contamination excessive par des métabolites secondaires tels, les plantes. Il y a des études qui ont montré que l'utilisation de la méthode d'extraction du CTAB a donné de bons profils d'ADN ainsi que des résultats plus rapides par rapport aux autres méthodes conventionnelles. Malgré l'obtention de bons profils d'ADN, le CTAB reste un agent nocif (Ayoib *et al.*, 2017).

2.2.1.2. Extraction par SDS

Cette méthode a été adaptée à partir de Dellaporta (1983). Le dodécyl sulfate de sodium est un détergent anionique qui élimine les molécules lipidiques de la membrane cellulaire et provoque sa perturbation. Il lie également aux protéines chromosomiques chargées positivement (histones) pour libérer l'ADN dans la solution (Sharma, 2012).

2.2.2. Purification d'ADN extrait

Après la lyse cellulaire, il y a des différentes étapes nécessaires pour retirer les protéines, l'ARN et toutes les autres molécules contaminants, de façon à obtenir une solution la plus pure possible en ADN (Brodeur et Toussaint, 2007).

2.2.2.1. Extraction liquide liquide

L'extraction liquide/liquide est une méthode chimique utilisée pour extraire et séparer les composés à la molécule d'ADN, en utilisant des solvants organiques ou des sels concentrés (Ayoib *et al.*, 2017).

a. Extraction à base de phénol /chloroforme /alcool isoamylique

Le phénol /chloroforme / alcool isoamylique est une méthode d'extraction organique qui a été largement utilisée dans des nombreux laboratoires pour isoler l'acide nucléique. Cette extraction est basée sur la solubilité entre deux liquides non miscibles. La connaissance des propriétés chimiques de l'échantillon biologique permet de sélectionner correctement les solvants organiques, ce qui est le principal facteur de réussite l'isolement et la purification de l'ADN (Ayoib *et al.*, 2017).

Cette méthode est efficace pour purifier de grandes quantités d'ADN génomique de haut poids moléculaire. Après la lyse des cellules, un mélange de solvants organiques, phénol /chloroforme /alcool isoamylique, est utilisé pour éliminer les macromolécules telles que les protéines, les lipides, les glucides et les débris cellulaires du lysat.

Même en l'absence d'alcool isoamylique, le mélange organique de phénol-chloroforme seul peut aider à la purification de l'ADN. Le plus souvent une condition préalable dans de nombreuses expériences de purification de l'ADN à partir d'une solution contenant des protéines. La phase aqueuse transporte l'ADN dissous tandis que tout le reste se dépose dans la phase non aqueuse. Toutefois, par rapport aux techniques récentes, cette méthode est longue et exige beaucoup de travail (Ayoib *et al.*, 2017).

b. Salting out

Salting out est une technique conventionnelle qui consiste à traiter avec un sel faiblement ionique utilisé après la lyse des cellules, où l'élimination des contaminants tels que les protéines et autres biomolécules se fait au moyen de concentrations élevées d'acétate de potassium ou d'acétate d'ammonium. Une concentration élevée de ces sels provoque la précipitation des contaminants qui peuvent être éliminés après la centrifugation. Cette méthode simple et peu coûteuse mais se révèle inefficace pour isoler l'ADN des contaminants, ce qui se traduit par un faible rendement et une faible pureté de l'ADN. De plus, les extraits d'ADN nécessitent souvent une purification supplémentaire avant de pouvoir être soumis à des tests moléculaires. La précipitation répétée de l'alcool est également souvent nécessaire pour permettre une meilleure isolation de l'ADN, ce qui peut entraîner des résultats variés (Ayoib *et al.*, 2017).

2.2.2.2. Extraction liquide solide

La purification de l'acide nucléique en phase solide se trouve dans la plupart des kits d'extraction commerciale disponibles sur le marché. Elle permet une purification rapide et efficace par rapport aux méthodes conventionnelles. Cette méthode permet l'obtention d'ADN de haut poids moléculaire qui peut être utilisé pour des analyses ultérieures en RFLP ou en amplification (Walsh *et al.*, 1991).

La purification en phase solide est normalement réalisée à l'aide d'une colonne à spin, fonctionnent sous l'effet de la force centrifuge. Cette méthode permet de purifier rapidement les acides nucléiques par rapport aux méthodes conventionnelles (Tan et Yiap, 2009). Les matrices de silice et les supports échangeurs d'anions sont des exemples de supports solides utilisés dans la méthode d'extraction en phase solide. Les quatre étapes clés impliquées dans l'extraction en phase solide sont la lyse des cellules, l'adsorption des acides nucléiques, le lavage et l'élution d'ADN extrait (Tan et Yiap, 2009).

Par contre, cette méthode de purification requiert plusieurs transferts de tubes et plusieurs lavages. Toutes ces étapes additionnelles peuvent augmenter les risques de mélange

d'échantillon ou l'introduction de contaminations. De plus, elles s'avèrent relativement coûteuses lorsqu'un grand nombre d'échantillons doit être traité.

2.3. Techniques d'analyse de l'ADN

2.3.1. Analyse sur gel d'agarose

L'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose est une technique qui permet de séparer et d'identifier des fragments d'ADN, afin d'en déterminer la taille. Elle est basée sur la séparation des acides nucléiques, via les mailles formées par l'agarose, en fonction de leur taille et de leur conformation spatiale. En effet, plus une molécule d'ADN est grosse, plus elle sera ralentie dans les mailles du gel et migrera donc moins loin qu'une molécule plus petite. Cependant, la conformation spatiale de l'ADN joue également un rôle important dans la migration. Pour une molécule d'ADN de même taille, un ADN relâché va migrer moins loin qu'un ADN linéarisé, qui lui-même va migrer moins loin qu'un ADN surenroulé (Sénicourt, 2017).

Les fragments d'ADN sont facilement détectés sur le gel grâce à un colorant fluorescent, comme le BET. On peut ainsi visualiser en lumière U.V des quantités très faibles d'ADN (de l'ordre de 5-10 ng par bande) (Sénicourt, 2017).

2.3.2. Analyse de la concentration de l'ADN

2.3.2.1. Dosage de l'ADN par spectrophotométrie

La mesure de l'absorbance de l'ADN extrait permet de calculer sa concentration et de vérifier sa pureté. On établit le spectre d'absorption de la solution d'ADN à des longueurs d'ondes variant de 210 nm à 300 nm (U.V). La contamination par l'ARN ou les protéines montre une distorsion de la courbe (Banuls, 1994).

2.3.2.2. Dosage de l'ADN par nano drop

Pour mesurer précisément la quantité et la qualité d'ADN extrait. De préférence d'utiliser le Nanodrop parce qu'il permet d'analyser des microvolumes sans les diluer, et à quantifier et d'analyser la pureté d'ADN obtenu (Tiwari et al., 2017).

2.3.3. Amplification in vitro de l'ADN extrait par PCR

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) a été inventée par Mullis en 1994. Son principe est basé sur l'utilisation de l'ADN polymérase, elle permet la réplique *in vitro* de séquences d'ADN spécifiques. La PCR est une technique largement utilisée dans la biologie moléculaire. Cette méthode peut générer des dizaines de milliards de copies d'un fragment d'ADN particulier (la séquence d'intérêt) à partir d'un extrait d'ADN (matrice d'ADN). A partir d'une telle masse de séquences qui constitue l'ADN de la matrice, la PCR peut donc

sélectionner une ou plusieurs séquences et les amplifier par réplication à des dizaines de milliards de copies. Une fois la réaction terminée, la quantité d'ADN de matrice qui n'est pas dans la zone d'intérêt n'aura pas varié (Mullis *et al.*, 1994). La PCR est une technique puissante qui est rapidement devenue une des techniques les plus utilisées en biologie car elle est rapide, peu coûteuse et facile (Vasiliskov *et al.*, 2020).

La réaction en chaîne par polymérase est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend l'extrait d'ADN (ADN matrice), la *Taq* polymérase, les amorces et les quatre désoxyribonucléoside triphosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon. Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température répétitifs plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur. L'appareil permet la programmation de la durée et la succession des cycles d'étapes de température. Chaque cycle comprend trois périodes de quelques dizaines de secondes. Le processus de la PCR est subdivisé en trois étapes comme suit :

a. La dénaturation

C'est la séparation des deux brins d'ADN, obtenue en élevant la température. La première période est réalisée à une température de 94 ° C, à cette température l'ADN matrice est dénaturé. Les liaisons hydrogène ne peuvent pas être maintenues à une température supérieure à 80 ° C et l'ADN double brin est dénaturé en ADN monocaténaire (Mullis *et al.*, 1994).

b. Hybridation

Elle est réalisée à une température généralement comprise entre 40 et 70 ° C, appelée température d'hybridation des amorces. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider. Les amorces, courtes séquences simple brin complémentaires des régions qui flanquent l'ADN à amplifier, s'hybrident plus facilement que l'ADN matriciel long brin. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective, plus elle est spécifique (Mullis *et al.*, 1994).

c. Allongement

La troisième période est réalisée à une température de 72°C, appelée température d'élongation, c'est la température de synthèse du brin complémentaire. À 72°C, la *Taq* polymérase se lie à l'ADN simple brin amorcés et catalyse la réplication en utilisant les désoxyribonucléoside triphosphates présents dans le mélange réactionnel (Mullis *et al.*, 1994). Les amorces qui sont ajoutées à la solution en excès, se lient au début de l'extrémité 3' de chaque brin matrice et empêche la réhybridation du brin matrice avec lui-même. L'ADN

nouvellement synthétisé est maintenant identique au brin matrice et sera utilisé tel que dans les cycles de PCR progressif (Varacallo et Ghannam, 2018). La réaction de PCR est extrêmement rapide, elle ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles) (Mullis *et al.*, 1994).

Deuxième partie
PARTIE
EXPERIMENTALE

Chapitre 3
MATERIEL
ET METHODES

3.1. Stratégie de travail

L'étude que nous avons entreprise a été réalisée sur six variétés des jeunes feuilles de la vigne. Elles ont été collectées à partir de la région d'EL KANTRA, willaya de BISKRA. L'échantillonnage a été effectué le mois d'octobre 2019.

Nous avons commencé par le séchage des feuilles par deux méthodes (séchage à l'étuve et par le lyophilisateur), en préservant l'intégrité de l'ADN et le conserver pendant six à sept mois à température ambiante. Les feuilles ont été conservées dans des bocaux en présence de gel de silice. Après cette étape, nous avons préparé les solutions pour effectuer l'extraction d'ADN génomique par l'utilisation de différentes méthodes d'extraction (méthode d'extraction par CTAB et autre par SDS).

Une fois l'ADN extrait, il est analysé par l'électrophorèse sur un gel horizontal d'agarose à 0,8 %. Un dosage par spectrophotomètre U.V visible permettra l'estimation de la concentration d'ADN extrait.

Finalement, un fragment d'ADN précis est amplifié en de multiples copies par une réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN ou PCR (Polymerase Chain Reaction), en utilisant des amorces oligonucléotidiques de séquence définie. Dans notre étude, nous avons utilisé un couple d'amorces pour amplifier un fragment précis d'ADN qui est un microsatellite caractérisé de *vitis vinifera*, il est nommé VVMD5. Les produits de la PCR sont analysés sur un gel d'agarose 2% après marquage au bromure d'éthidium (BET) (fig. 3).

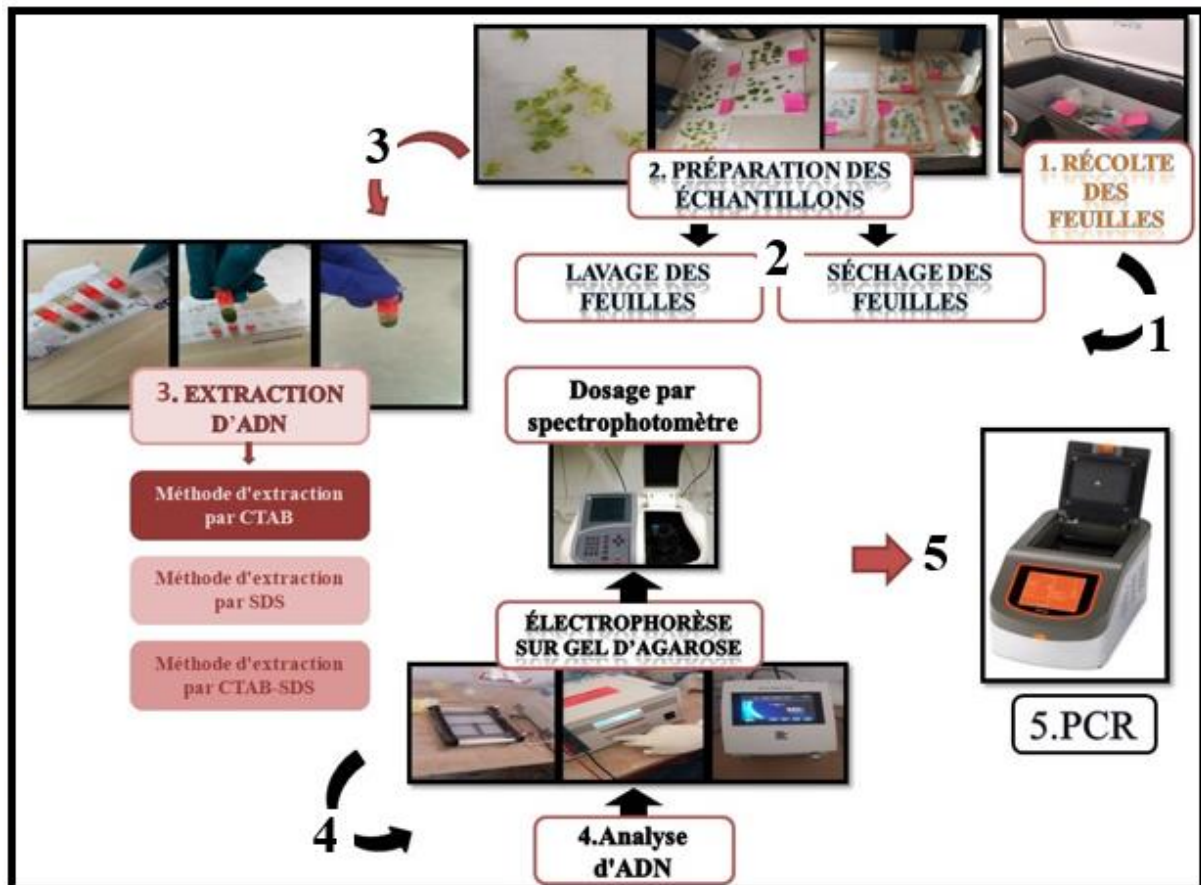


Figure 3. Différentes étapes appliquées dans notre travail.

3.2. Présentation de laboratoire de biologie moléculaire

La localisation du laboratoire de la biologie moléculaire a besoin d'être située dans un endroit séparé, avec au moins deux pièces de telle sorte que la préparation des extraits d'ADN ne soit pas réalisée dans la même pièce où sont réalisés les étapes suivantes, préparation des mix et amplification d'ADN. On peut diviser le labo en deux zones, la zone des activités pré-PCR (la préparation des réactifs et des échantillons) et la zone des activités post-PCR. La séparation entre ces zones doit être absolue. Cette séparation a pour but de réduire les risques de contaminations (l'ADN amplifié étant très contaminant pour l'ADN non amplifié). Tout échange de matériel entre ces zones est strictement proscrit (tout particulièrement les micropipettes qui sont une source importante de contamination du fait des aérosols). A l'intérieur de ces zones, les activités à risque doivent être le plus isolées possibles et être clairement identifiées (il faut assurer l'information aux utilisateurs) (Clemont *et al.*, 2007).

Le laboratoire doit être conçu de manière grâce à un système de ventilation actif. Le laboratoire devrait aussi être spacieux pour permettre la circulation des personnes. Un laboratoire de biologie moléculaire nécessite un certain matériel : micropipettes automatiques,

balance de précision, centrifugeuse, bain marie, Table U.V, cuve d'électrophorèse, thermocycleur, la hotte ...etc. Le laboratoire doit comporter aussi des Fûts et jerricans pour les déchets liquides et aussi sacs plastiques ou des conteneurs pour les déchets solides à risque chimiques et toxiques ou infectieux.

Au niveau le laboratoire de notre département, malgré il y a quelques matériels utilisé dans les analyses moléculaires (le thermocycleur, la table U.V, l'électrophorèse,...), mais il n'y a pas un laboratoire spécial pour la biologie moléculaire, ce qui peut augmenter les risques de contaminations.

L'organisation de travail peut être plus difficilement applicable et les consignes de sécurité ne sont pas toujours respectées, c'est à cause des paillasse de travail où interviennent de nombreux étudiants et ce qui peut provoquer un risque de contamination de notre échantillon.

3.3. Présentation des sites d'étude

L'échantillonnage a été effectué à partir de la région d'El-Kantara qui se situe au Sud-Est algérien (fig. 4). Elle se trouve dans le territoire, de la Wilaya de Biskra, à mi-chemin (50 Km) entre Batna et Biskra (Kerboub, 2012). Cette région se trouve au piedmont sud des Aurès et entre les coordonnées géographiques suivantes :

- Latitude $35^{\circ} 37' 53''\text{N}$ et $35^{\circ} 25' 37''\text{N}$.
- Longitude $5^{\circ} 5' 60''\text{E}$ et $6^{\circ} 14' 53''\text{E}$. (Kerboub, 2012).

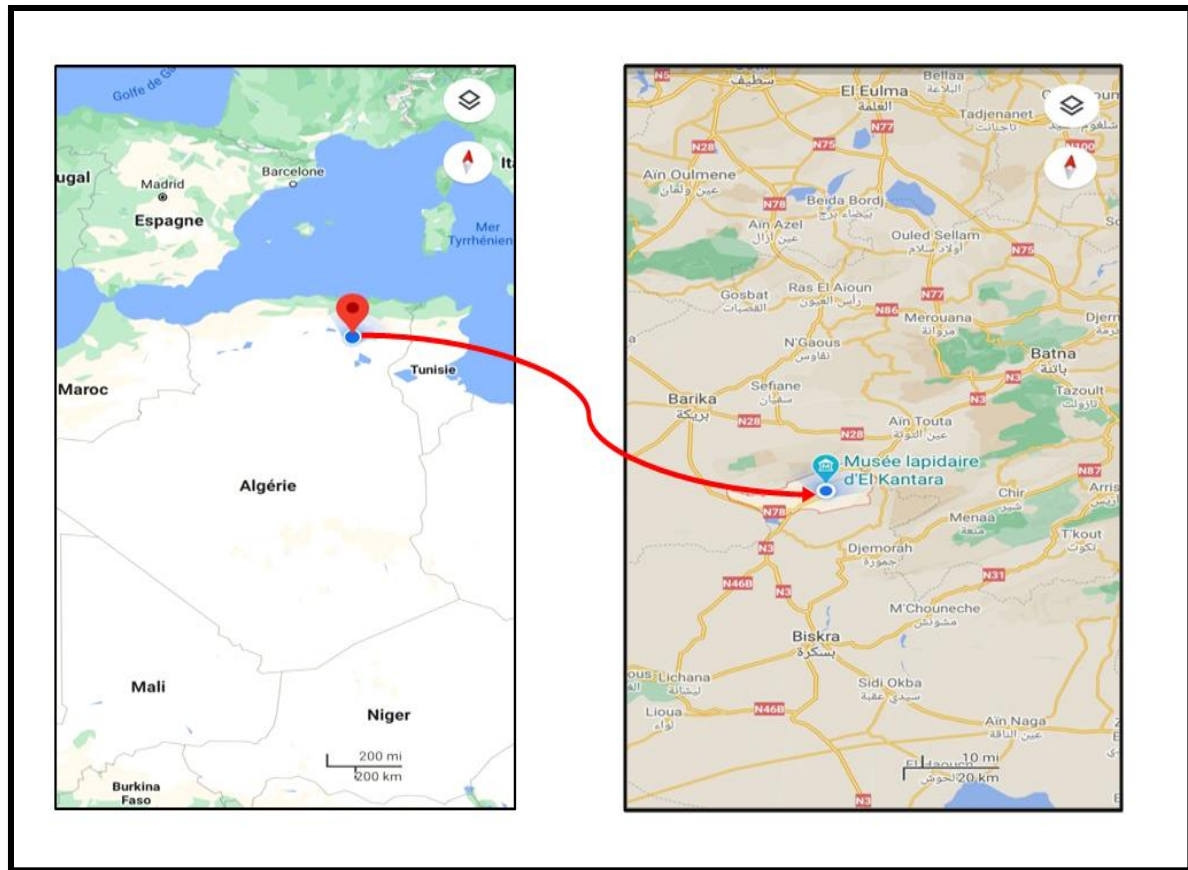


Figure 4. Situation géographique de la région d'étude (Site web 1 et 2).

Le tableau au-dessous représente les sites d'échantillonnage avec les coordonnées GPS de différentes variétés collectées.

Tableau 1. Coordonnées géographiques de site de collecte.

Variété	Site d'échantillonnage	Longitude	Latitude
EL-kahla	El-Kantara (Bourabes)	5.702484	35.212765
Chemrakha 1		5.702505	35.212746
Swikia		5.688461	35.205196
Datti		5.688289	35.204926
Kahla Ain Taher		5.688439	35.205032
Chemrakha 2	El-kantara (Gerager)	5.708481	35.222202

3.4. Matériel biologique

3.4.1. La récolte

La première récolte des feuilles a été effectuée au mois d'octobre 2019 (entre le 13 à 17), alors que la deuxième récolte a été réalisée au début de mars 2020.

La récolte des feuilles est effectuée en utilisant des gants et un ciseau préalablement désinfecté, les feuilles récoltées sont mis dans des sachets en plastique percés, en précisant le nom de la variété et la région sur une étiquette bien collée sur les sachets et transportées dans une glacière électrique à une température de 3°C.

3.4.2. Préparation du matériel végétal

Avant la préparation, Il faut nettoyer la paillasse à l'eau de javel. Le lavage des feuilles est effectué à l'eau distillée. On les laisse tremper dans de l'eau afin d'enlever la poussière, les insectes, etc. ensuite, on les éponge bien après le lavage et avant de les mettre à sécher.

Remarque : après chaque essai, il faut nettoyer à nouveau le récipient utilisé en changeant l'eau distillée ainsi que les gants utilisés.

3.4.2.1. Séchage des feuilles

Notre objectif est de faire subir les feuilles au séchage irréprochable afin de les garder la plus longtemps possible. Donc, L'étape de séchage est nécessaire et indispensable. L'action et l'efficacité des feuilles sèches dépendent directement de la qualité du séchage. Le séchage a été réalisé grâce à deux méthodes : un séchage à l'étuve ventilée et un autre au lyophilisateur.

a. Séchage à l'étuve (séchage à chaud)

Les étuves de séchage sont utilisées dans tous les domaines où il s'agit de protéger des objets ou matériaux sensibles de l'humidité, c'est pour le stockage d'aliments ou les objets à long durée. La plage de température des étuves de séchage se situe, dans la majorité des cas, entre une température ambiante minimale de +5 °C et un maximum de 300 °C (site web 3).

Le séchage des feuilles est effectué à température de 27°C pendant 5 jours (de 17 octobre 2019 jusqu' à 22 octobre 2019) avec une ventilation de 40% (Benbouza *et al.*, 2006).

Les étapes de séchage sont comme suit :

- déposer les variétés sur un papier absorbant en couvrant avec une compresse sur laquelle indiqués la date, le nom de la variété et la région, en fin placer le tous dans l'étuve (fig. 5) ;
- après le séchage, les feuilles sont de couleur verte clair que lorsqu'elles étaient fraîches ;

- s'assurer que la plante est bien sèche, ensuite on les met dans un bocal en verre stérile.

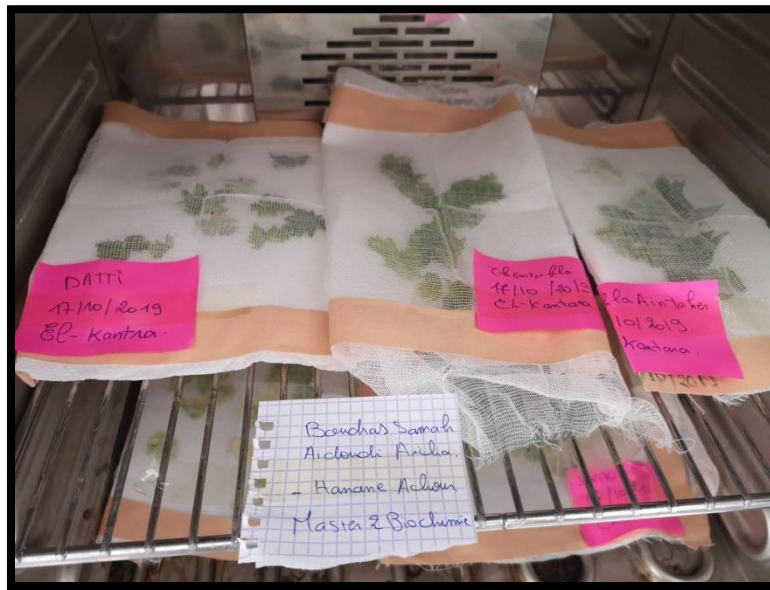


Figure 5. Séchage à l'étuve (photo originale).

b. Séchage à lyophilisateur (séchage à froid)

La lyophilisation, pcyodessiccation, cryodéshydratation ou cryosublimation, est une opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer par sublimation la majeure partie de l'eau contenue dans un produit afin de le rendre stable à la température ambiante, et ainsi faciliter sa conservation (Zidani, 2009) (fig. 6).

La lyophilisation c'est l'unique méthode qui permet de conserver l'échantillon à l'état sec sur le long terme. La technique consiste à retirer l'eau d'un produit par l'action combinée du froid et du vide. L'opération se déroule en trois étapes, la congélation, la sublimation (séchage primaire) et la désorption (séchage secondaire) (Pierre, 2019).

- La congélation : le produit doit être congelé à basse température (-20°C à -80°C) (Zidani, 2009).

- La sublimation (ou déshydratation primaire) ou toute l'eau congelée est sublimée à basse température et généralement sous vide (Wolff et Gibert, 1988), c'est le passage d'une substance de l'état solide à l'état gazeux directement, sans passer par l'état liquide (Zidani, 2009).

- La désorption (ou déshydratation secondaire) : au cours de cette étape, l'eau non congelable est éliminée. Cette dernière opération est indispensable pour conférer au produit une teneur en eau suffisamment basse pour sa conservation (Wolff et Gibert, 1988).

Après la congélation des feuilles à -25°C pendant 24 heures, le séchage à lyophilisateur est effectué à Température de -100°C à une pression de 1000 à 1300 mbar pendant 18 heures (fig. 6 et 7).

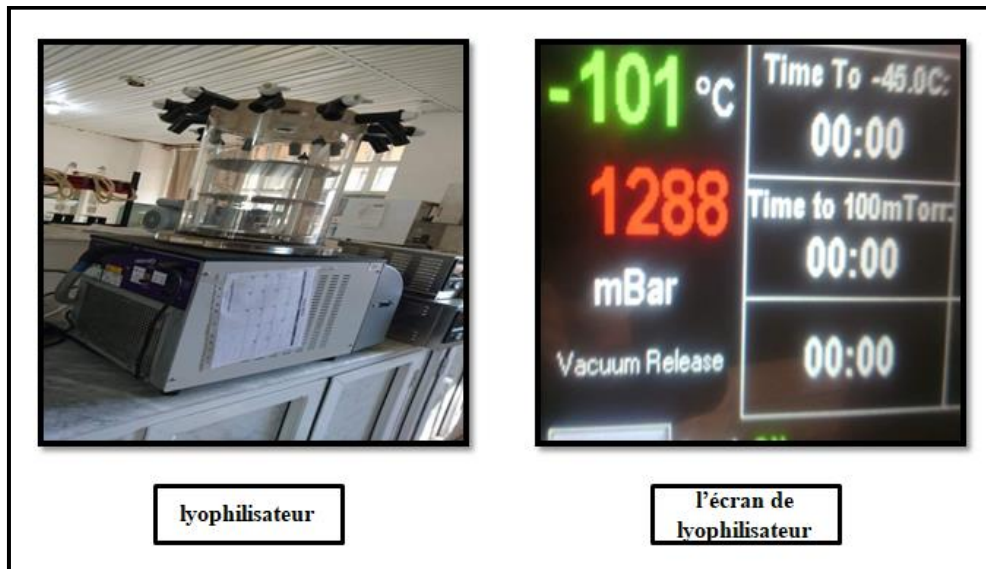


Figure 6. Appareil de lyophilisation (photo originale).

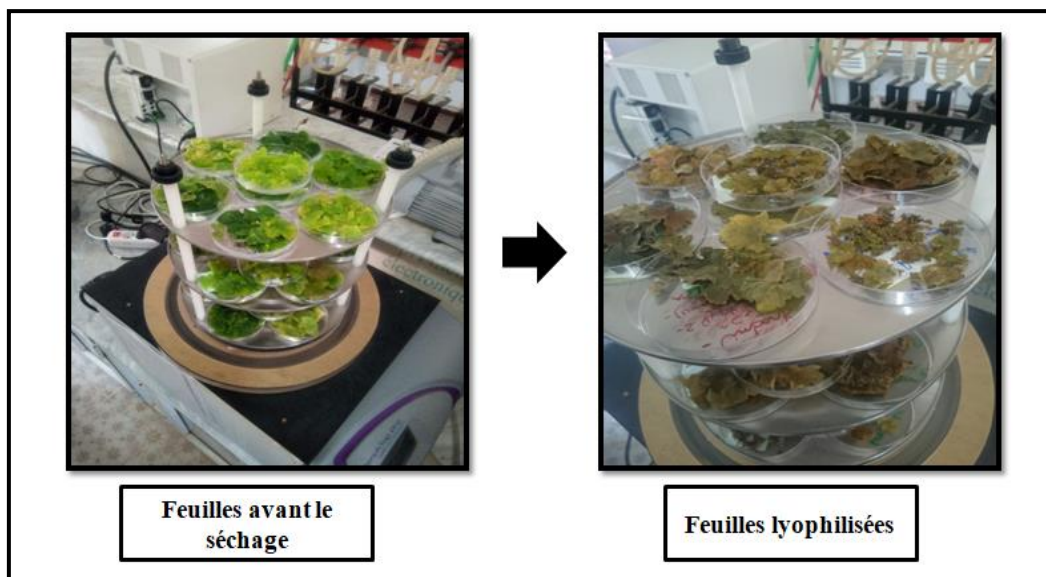


Figure 7. Séchage à lyophilisateur (photo originale).

3.4.2.2. Conservation des feuilles

Les feuilles sèches ont été conservées à température ambiante jusqu'au le jour de l'extraction. Dont les feuilles sont met dans des bocaux en verre stériles et étiquetés. Sans oublier d'ajouter une quantité de gel de silice aux feuilles (fig. 8).



Figure 8. Conservation des feuilles (photo originale).

Remarque : après deux mois de conservation, on a remarqué un changement de la couleur du gel de silice de l'orange vers le blanc, pour cela on a fait la réactivation du gel de silice dans l'étuve à une température 100°C pendant trois heures.

3.4.2.3. Broyage des feuilles

Il existe différents appareils pour broyer les tissus végétaux par exemple un Broyeur de tissus végétaux et petit matériel adapté, par exemple : broyeur à billes (Homex / Bioreba) avec sachets de broyage, broyeur à rouleaux (Pollähne / Méku) avec tubes, presse à genouillère (Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, 2005)

Nous avons broyés les feuilles par une méthode simple et facile, dans un mortier et au pilon désinfecté avec l'éthanol 70%, sans l'utilisation de l'azote liquide (fig. 09).

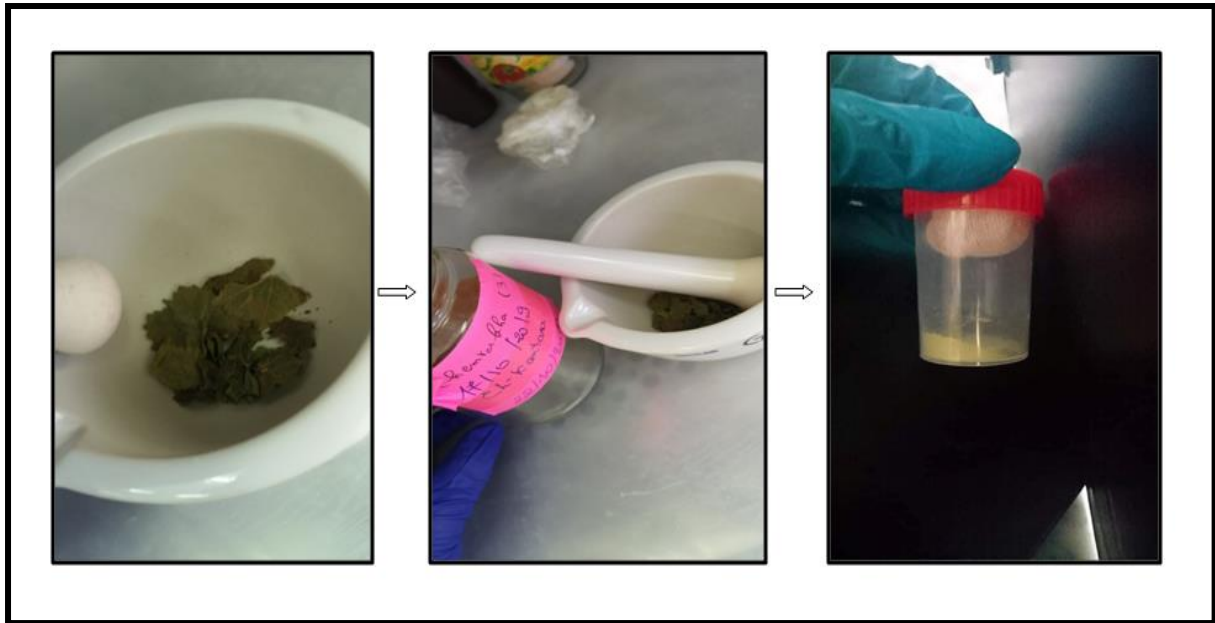


Figure 9. Broyage des feuilles (photo originale).

La figure au-dessous résume toutes les étapes de préparation de l'échantillon.

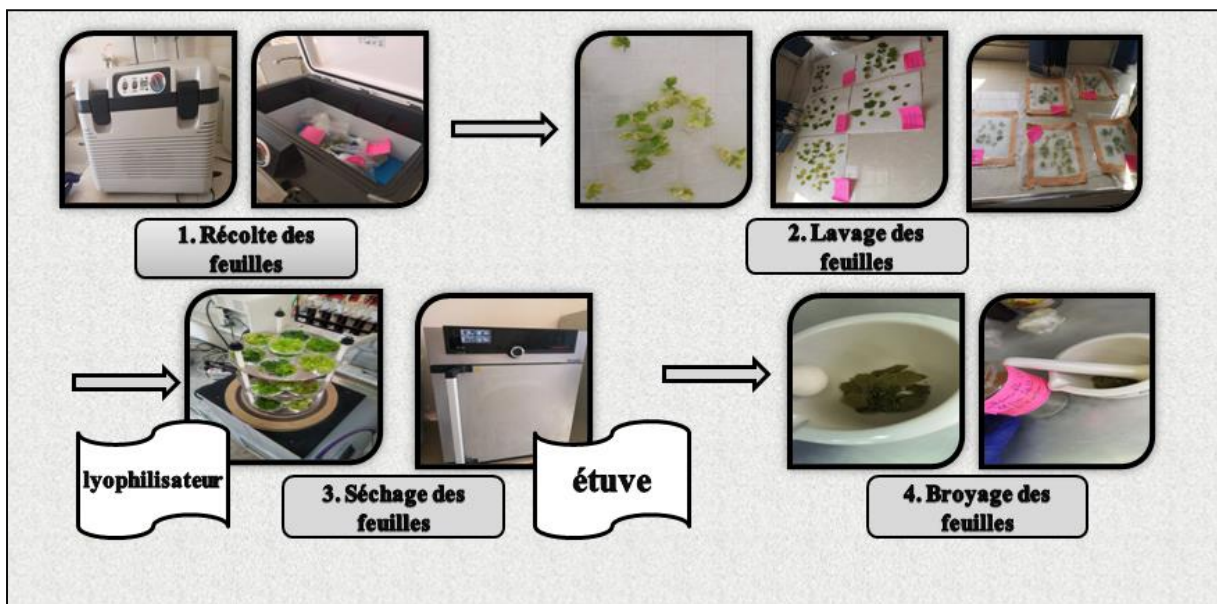


Figure 10. Différentes étapes de préparation des échantillons (photo originale).

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

Tableau 2. Différentes variétés de la vigne utilisées au cours de l'extraction d'ADN génomique, les conditions de séchage et la conservation.

Variété		couleur de fruit	Type de séchage	Conservation	
EL-kahla	K1E	Marron	à l'Etuve	Conservé à température ambiante De 22/10/2019 Jusqu'à 03/03/2020	
	K1L		lyophilisation		
Chemrakha1	Ch1E	jaune	à l'Etuve		
	Ch1L		lyophilisation		
Swikia	WE		à l'Etuve		
	WL		lyophilisation		
Datti	DE		à l'Etuve		
	DL		lyophilisation		
Kahla Ain Taher	K2E		Noire		à l'Etuve
	K2L				lyophilisation
Chemrakha 2	Ch2E		Jaune	à l'Etuve	





3.5. Méthode de travail





3.5.1. Préparation des solutions utilisées dans les protocoles d'extraction d'ADN

D'abord, il faut préparer tous les solutions et les tampons employés pour les protocoles d'extraction d'ADN. Le tableau ci-dessous (tab. 3) résume les volumes et les concentrations des réactifs utilisés.

Tableau 3. Réactifs utilisées au cours de l'extraction d'ADN.

Réactifs	Poids moléculaire (g/mol)	Concentration Préparée (M)	Volume total préparé (ml)	Stérilisation et conservation	Mesures de protection individuelle
Na ₂ EDTA (pH 8,0) C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ .2H ₂ O	372.23	1.5	6		Porter une bavette et des gants
		1	20		
		0,5	90		
		0,02	15		
		0,05	20		

		2	6	Ces solutions sont stérilisées pendant 20 min à l'autoclave (à 120° C). la Conservation à (+4°C)	
NaCl	58.44	6	15		Porter des gants
		5	20		
		4	90		
		2	20		
Tris-HCl (pH 8,0) C₄H₁₂CINO₃	156.6	0,5	90		Porter des gants et bavette
		2	15		
sorbitol C₆H₁₄O₆	182.17	0,6	25	Porter des gants	
					
Acétate de potassium C₂H₃KO₂	98.1	3	2	Porter des gants	
glucose C₆H₁₂O₆.H₂O	198.17	2	4		
Acétate de sodium C₂H₃NaO₂	136.08	3.5	3		
Ethanol 96% C₂H₅OH 	46.07	70%	50	Porter une bavette et des gants	
Solution Chloroforme-alcool isoamylique	CH=119.38 AI =88.15	24 volumes de chloroforme avec 1 volume d'alcool	10	Conservation à (4°C)	Porter une bavette et des gants. La

			isoamylique			préparation est effectuée sous la hotte
Protéinase K			28.93KDa	20 mg/ml	0,5	

Après la préparation de toutes les solutions, nous avons préparés les tampons d'extraction utilisés dans les différents protocoles d'extraction (tableaux 4 jusqu'à 9).

Tableau 4. Préparation 5ml du tampon CTAB 1% pour 5 échantillons.

Produits chimique	Concentration finale	Quantité préparé
CTAB	1% poids/volume	0.05g
Na ₂ EDTA 20mM	2mM	0.5ml
TRIS-HCL 2M	0,15M	0.375ml
NaCl 4M	2.6M	3.25ml
Eau bidestillé		875 µl

Tableau 5. Préparation de 2 ml du tampon CTAB 2% pour 5 échantillons.

Produits chimique	Concentration finale	Quantité préparé
CTAB	2% poids/volume	0.04g
Na ₂ EDTA 1M	20mM	0.04ml
TRIS-HCL 2M	100mM	0.1ml
NaCl 4M	1.4M	0.7ml
PVP	2% poids/volume	0.04g
Eau bidestillé		1.16ml

Tableau 6. Préparation 4ml de tampon CTAB 3% pour 5 échantillons.

Produits chimique	Concentration finale	Quantité préparé
CTAB	3% poids/volume	0.12g
Na ₂ EDTA 1M	0,5 M	1ml
TRIS-HCL 2M	0,8 M	1,6ml
NaCl 5M	1,4 M	1.12ml
2-β-mercaptoéthanol	0.3% volume/volume	12 µl
Eau bidestillé		280 µl

Tableau 7. Préparation 2ml de tampon SDS 1% pour 5 échantillons.

Produits chimique	Concentration finale	Quantité préparé
SDS	1% poids/volume	0.02g
Na ₂ EDTA 1M	30mM	0.06ml
TRIS-HCL 2M	200mM	0.2ml
NaCl 4M	200mM	0.1ml
GLUCOSE 2M	0.5M	0.5ml
2-β-mercaptoéthanol	0.5% volume/volume	0.01ml
Eau bidestillé		1.14ml

Tableau 8. Préparation 5ml de tampon SDS 2% pour 5 échantillons.

Produits chimique	Concentration finale	Quantité préparé
SDS	2% poids/volume	0.1g
Na ₂ EDTA 500M	50mM	0.5ml
TRIS HCL 500M	50mM	0.5ml
NaCl 2M	150mM	0.375ml
Eau bidestillé		3.625ml

Tableau 9. Préparation 5ml du tampon de lavage

Produits chimique	Concentration finale	Quantité préparé
SORBITOL 600mM	0.35M	2.91ml
Na ₂ EDTA 50mM	5mM	0.5ml
TRIS-HCL 500mM	100mM	1ml
PVP	1% poids/volume	0.05g
2-β-mercaptoéthanol	/	2ul pour un seul échantillon
Eau bidestillé		590 µl

3.5.2. Extraction d'ADN génomique

L'isolement de l'ADN peut être particulièrement difficile surtout pour l'ADN des plantes qui contiennent des concentrations élevées de polysaccharides, de substances phénoliques qui peuvent inhiber la PCR (Khanuja *et al.*, 1999). Dans cette étude, quatre protocoles d'extraction ont été comparés pour leur capacité à produire de l'ADN de bonne qualité à partir des feuilles sèches de vigne, conservées pendant cinq mois.

Nous avons utilisés trois méthodes d'extraction, protocole de CTAB, protocole de SDS et un troisième de CTAB-SDS.

3.5.2.1. Protocole (A) d'Aboul-Maaty et Oraby (2019)

Ce protocole choisit est basé sur la méthode conventionnelle du bromure de cétyl triméthyl ammonium (CTAB) modifiée et s'inspire de protocole de Doyle et Doyle (1990). Les étapes de ce protocole sont les suivantes :

1. peser 50 mg de poudre de l'échantillon dans un tube eppendorf de 2 ml, ajouter 800 μ l du tampon d'extraction préchauffé 3 \times CTAB (3% de CTAB (p / v), 1,4 M NaCl, 0,8 M Tris-HCl pH 8,0, EDTA 0,5 M pH 8,0) et agiter doucement ;

2. Ajouter 0,3% de 2- β -mercaptoéthanol au tampon d'extraction 3 \times CTAB, juste avant l'extraction ;

3. incuber les tubes au bain-marie à 60–65 ° C pendant 1 h, mélanger toutes les 20 min ;

4. ajouter un volume égal de chloroforme : alcool isoamylique (v / v) (24: 1) et mélanger par légère inversion ;

5. centrifuger à 13 000 tr / min pendant 15 min à température ambiante ;

6. à l'aide d'une pipette, transférer soigneusement la phase aqueuse supérieure, qui contient l'ADN, dans un nouveau tube eppendorf de 1,5 ml ;

Répétez les étapes d'extraction (4 – 5), si nécessaire jusqu'à ce que la phase aqueuse supérieure soit claire.

7. estimer le volume de la phase aqueuse (environ 700 μ l) puis ajouter la moitié de ce volume (350 μ l) de NaCl (6M) et bien mélanger. Ajouter successivement 1/10 du volume (70 μ l) d'acétate de potassium (3M) et 500 μ l d'alcool isopropylique froid (100%). Inversez doucement pour précipiter l'ADN ;

8. incuber à -20 ° C pendant 30 min ;

9. centrifuger à 13 000 tr / min pendant 5 min, jeter le surnageant ;

10. inversez les tubes contenant le culot d'ADN sur du papier absorbant ;

11. laver le culot d'ADN avec 500 μ l d'éthanol 70% ;

12. centrifuger à 13 000 tr / min pendant 5 min ;

13. jeter l'alcool ;

14. resuspendre le culot d'ADN dans 50 μ l d'eau bidistillée ;

15. conserver à - 20 ° C jusqu'à une utilisation ultérieure.

3.5.2.2. Protocole (B) de Lucas *et al.* (2019)

Le deuxième protocole est modifié et adapté à celui de Doyle et Doyle (1987). Il est utilisé un tampon de lavage et un tampon d'extraction de bromure de cetyltriméthyl ammonium (CTAB). L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir des feuilles sèches de la vigne, selon les étapes suivantes :

1. mettre 100 mg de poudre de l'échantillon dans un tube eppendorf de 2 ml ;
2. ajouter 1 ml de tampon de lavage froid (4°C) à base de Sorbitol (Tris-HCl 100 mM (pH 9.5), EDTA 5 mM (pH 8), sorbitol 0.35 M, 1% PVP) et 2 µl de 2-β-mercaptoéthanol, à chaque tube et mélanger dans un vortex pendant cinq secondes ;
3. après une incubation à 4°C pendant 20 min, centrifuger les tubes pendant 10 min à 10000 rpm à (4°C), éliminer le surnageant ;
4. répéter l'ajout du tampon de lavage au Sorbitol et 2-β-mercaptoéthanol jusqu'à ce que le surnageant soit clair ;
5. ajouter 800 µl du tampon d'extraction préchauffé 1 × CTAB (1 % CTAB, Tris-HCl 0.15 M (pH8), NaCl 2.6 M, EDTA 2 mM (pH 8)) aux échantillons ;
6. incuber les tubes à 65 ° C pendant 1-2 heures avec agitation douce ;
7. après la période d'incubation, centrifuger les tubes à 13 000 rpm pendant 15 min, à une température de 22 ° C ;
8. ajouter 600 µl de CAI (chloroforme et d'alcool isoamylique, 24: 1) pour chaque tube, homogénéiser manuellement les échantillons et centrifuger à 13000 rpm pendant 10 min à 6 ° C ;
9. transférer le surnageant dans un nouveau tube eppendoref de 1,5 ml et ajouter 600 µl de la CAI, homogénéiser manuellement les échantillons ;
10. centrifugé à 13000 rpm pendant 10 minutes à 6 ° C ;
11. transférer le surnageant à un nouveau tube de 1,5 ml ;
12. ajouter un mélange de NaCl (5 M) (ou de l'acétate de sodium) et de l'isopropanol dans chaque tube. Dont le volume de sel est 10% du surnageant récupéré et 70% volume d'isopropanol. Homogénéiser manuellement les échantillons ;
13. placer les tubes dans le congélateur à -20°C pendant au moins 2 heures (de préférence pendant une nuit) pour précipiter l'ADN ;

14. centrifuger les tubes pendant 20-30 minutes à 14 000 rpm à 16 ° C ;
15. a ce stade, le culot d'ADN doit être fixé au fond du tube, élimine le liquide ;
16. ajouter 1 ml d'éthanol 70%, agiter les tubes manuellement et doucement ;
17. laisser les tubes à température ambiante pendant 10 minutes, puis centrifuger à 14000 rpm pendant 10 minutes ;
18. répéter à nouveau le lavage à l'éthanol 70% ;
19. ajouter 1 ml d'éthanol absolu, agiter les tubes manuellement et doucement ;
20. laisser les tubes pendant 10 minutes, puis centrifuger à 14000 rpm à température ambiante pendant 10 minutes ;
21. éliminer la totalité du liquide et laisser les tubes ouverts à température ambiante ;
22. solubiliser l'ADN avec 50 µl d'eau bidestillée et 1 µl de RNase 10 mg / ml, incuber les tubes pendant une heure à température ambiante ;
23. conserver l'ADN à -20°C.

3.5.2.3. Protocole (C) d'Ali *et al.* (2019)

Le troisième protocole d'extraction d'ADN est s'inspiré des travaux de Paterson *et al.* (1993) et Porebski *et al.* (1997). Ce protocole est utilisé deux tampon de lyse en même temps, le SDS et le CTAB. Les solutions utilisées sont :

Tampon d'extraction A : est utilisé d'après Paterson *et al.* (1993) : 0.5 M glucose, 30 mM EDTA (pH 8.0), 200 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% (v/v) 2-βME (ajouter juste avant l'utilisation) et 1% (p/v) SDS.

Tampon d'extraction B : est utilisé d'après Porebski *et al.* (1997) : 2% (p/v) PVP, 2% (w/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl et 20 mM EDTA (pH 8.0).

L'extraction s'effectue en plusieurs étapes :

1. préchauffer les tampons d'extraction A et B à 60 °C ;
2. peser 100 mg de poudre des feuilles et le mettre dans un tube eppendorf de 1.5 ml puis ajouter 400 µl de tampon A et B dans le même tube ;
3. vortexer le mélange pendant 10 s. Incuber les tubes à 60°C pendant 30 min et inverser toutes les 10 min pour homogénéiser le milieu réactionnel ;

4. refroidir les tubes à température ambiante et ajouter RNase A (25 ug / ml). Inverser les tubes 4 à 5 fois et incuber à 37°C pendant 20 min ;
5. ajouter 400 µl de CAI et vortexer pendant 5 s pour former une émulsion ;
6. centrifuger à 13000 g pendant 10 min à température ambiante pour séparer les phases organique et aqueuse ;

Remarque : si la couche aqueuse n'est pas transparente, répétez l'étape 5.

7. transférer soigneusement la phase aqueuse (transparente) à l'aide d'une micropipette dans un nouveau tube ;
8. ajouter 2/3 vol d'isopropanol et 1/10 de NaAc (3,5 M) (pH 5,2) ;
9. fermer bien les tubes, inverser doucement pendant 5 à 6 fois, puis précipiter l'ADN en incubant à -20 ° C pendant 15 min ;

Remarque : pour augmenter la précipitation de l'ADN, le tube peut être incubé pendant une nuit.

10. centrifugé à 13000 g pendant 5 min ;
11. retirer délicatement le surnageant sans perturber le culot et ajouter 400 µl d'éthanol froid à 70% ;
12. centrifuger à 13000 g pendant 5 min et jeter le surnageant ;
13. éliminer les résidus d'éthanol en séchant le culot d'ADN à l'air ;

Remarque : ne pas trop sécher le culot car il sera difficile de le dissoudre.

14. resuspendre le culot d'ADN dans 40 µl d'eau bidistillée.

3.5.2.4. Protocole (D) de Xia *et al.* (2019)

Il existe plusieurs techniques utilisées pour l'extraction d'ADN, celle adoptée dans cette étude est la méthode de SDS.

1. Peser 100 mg de poudre des feuilles et le mettre dans un tube eppendorf 2 ml ;
2. Ajouter Un millilitre de tampon d'extraction SDS (SDS 2% (p/ v), NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8,0), préchauffé à 65 ° C, mélanger puis ajouter 10 µl de protéinase k (10 mg / ml) ;
3. Incuber les tubes à 65 ° C pendant 1 h, avec l'agitation chaque 10 min ;

4. Centrifuger les tubes pendant 10 min à 12000 g, extraire le surnageant deux fois avec du chloroforme / alcool isoamylique (24 : 1) ;
5. Ajouter 0,6 volume d'isopropanol (première précipitation) à la phase aqueuse supérieure, puis inversé doucement et vortex pendant 10 min à 15000 g ;
6. laver deux fois le culot avec une solution d'éthanol (70%) froid et sécher à l'air pendant 5 min, le culot séché a été dissous avec 400 ul de tampon Tris / EDTA (10 mM Tris, 1 mM EDTA) ;
7. ajouter 7 à 10 mg de RNase dans le mélange et incuber à 37 ° C pendant 30 min pour éliminer l'ARN ;
8. Une autre extraction avec CAI (troisièmes extractions) ;
9. Récupérer la phase supérieure dans un nouveau tube stérile contenant 2,5 volumes d'éthanol (seconde précipitation) aiderait à précipiter l'ADN facilement ;
10. Après la centrifugation de tube à 15000 g pendant 10 min et le lavage du culot d'ADN deux fois, l'ADN séché a été dissous dans 200 µl d'eau bidistillée stérile.

3.5.3. Détermination de la concentration et la pureté d'ADN extrait

3.5.3.1. Détermination de la concentration d'ADN

Les acides nucléiques ont un spectre d'absorption maximum en U.V à 260 nm. Cette absorption est proportionnelle à la concentration de l'ADN ou de l'ARN. La concentration de l'ADN extrait a été estimée par spectrophotométrie à 260 nm sachant que :

1 unité de DO 260 nm = 50 µg/ ml d'ADN. On mesure donc à 260 nm la DO d'une dilution au 1 /250ième de la solution mère (Brodeur et Toussaint, 2015). On déduit la concentration de l'ADN grâce au calcul suivant :

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

3.5.3.2. Contrôle de la pureté de l'ADN extrait

L'analyse spectrophotométrique est l'une des techniques les plus fréquemment utilisées pour l'évaluation de la qualité d'un ADN. Le rapport d'absorption U.V à A 260/280 est entre $1,8 < R < 2$, pour un ADN pur, toute augmentation de celui-ci indique une contamination par l'ARN et inversement, la présence de protéine diminue la valeur (Denis *et al.*, 2018).

L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols. Dans le cas d'échantillons purs, le taux

d'absorption recommandé à A 260/230 est de 2,0 à 2,22. le ratio A260/A230 inférieur à cette valeur indique une contamination des sucres, du phénol ou des sels (Arruda *et al.*, 2017)

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

Avant toute manipulation, d'abord il est nécessaire de connaître l'état d'ADN extrait, l'ADN est-il intact ou dégradé ? La présence et l'intégrité de l'ADN extrait ont été vérifiées par l'électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8% puis à le visualiser grâce à une coloration au bromure d'éthidium.

Pour chaque échantillon de 6 μ l est complété par 2 μ l de bleu de charge (voir l'annexe2).

a. Préparation du gel selon Lee *et al.* (2012)

1. Peser la masse appropriée d'agarose (0.4 g) dans un erlenmeyer. La concentration d'agarose dans un gel dépend de la taille d'ADN à analyser, avec la plupart des gels comprises entre 0,5% -2% ;
2. Ajouter au l'agarose 50 ml de tampon TAE 1X (voir l'annexe 3). Agiter pour mélanger ;
3. Faire bouillir le mélange d'agarose / tampon. Ceci est le plus souvent effectué par chauffage dans un four micro-onde, mais peut aussi être fait sur un chauffe-ballon ;
4. Retirer la fiole et agiter le contenu pour bien mélanger. Répétez jusqu'à ce que l'agarose est complètement dissous ;
5. Ajouter 1 μ l du bromure d'éthidium (BET);
6. 7. Verser l'agarose fondu dans le moule de gel. Insérer ensuite un peigne approprié dans la solution, avant que celle-ci ne polymérise ;
8. Lorsque le gel d'agarose est refroidit et solidifié, retirer le peigne du gel. Ceci créera des puits dans lesquels les échantillons pourront être déposés ;
9. Placer le gel dans la chambre à électrophorèse et on le submerge d'une solution tampon TAE 1X.

b. préparation des échantillons

1. Préparer un tube 1,5 ml pour le marqueur de poids moléculaire et un pour chaque échantillon ;
2. Déposer environ 6 μ l d'ADN de chaque échantillon au fond de chaque tube ;

3. Ajouter 2 μl de colorant de chargement ;
4. Mélanger en tapotant quelques fois le bas du tube avec un doigt.

c. Migration et visualisation de l'ADN

1. Déposer délicatement dans les puits, à l'aide de la micropipette, la totalité de l'échantillon préparé ;
2. Brancher les fils en mettre le générateur de puissance sous tension à 100 V ;
3. Laisser migrer 17 minutes. L'évolution de la migration peut être suivie à l'aide de colorant de chargement ;
4. Lorsque l'électrophorèse est terminée, éteigne l'alimentation et retirer le gel du réservoir à électrophorèse. Égoutter le tampon en excès de la surface du gel. Placez le plateau de gel sur du papier absorbant pour absorber tout tampon supplémentaire en cours d'exécution ;
5. Exposer le gel à la lumière U.V, en utilisant un transilluminateur (VILBRE LOURMAT). Les bandes d'ADN devrait montrer en tant oranges bandes fluorescentes. ;
6. Prendre une photo du gel par un système de documentation (DOC-PRINT VX2) (fig. 11).

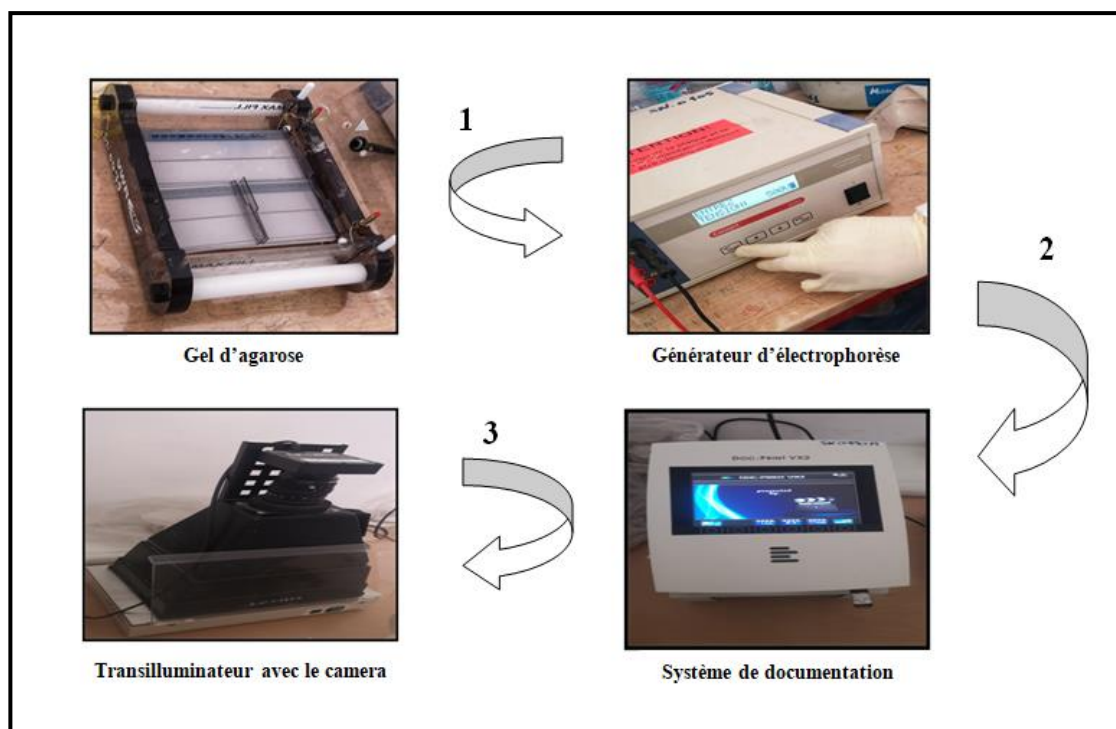


Figure 11. Étape de migration et visualisation de l'ADN (photo originale).

Mise en garde

Le bromure d'éthidium est mutagène et toxique. Il faut manipuler ce colorant avec soin et éviter tout contact direct avec la peau. Lorsqu'il est sous forme de poudre. Il faut le manipuler sous une hotte chimique ou porter un masque approprié. De plus, les rayons ultraviolets utilisés pour la visualisation de l'ADN sont très dommageables pour la rétine et pour la peau. Il faut éviter toute exposition directe et travailler avec un sarrau, des gants et un protecteur facial complets conçu à cette fin (Brodeur et Toussaint, 2007).

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

L'amplification par PCR d'une séquence spécifique de l'ADN extrait a été utilisée ici pour évaluer l'efficacité des protocoles testés à produire un ADN de bonne qualité.

La séquence cible amplifiée est un microsatellite (VVMD5) ou SSRs (short tandem repeats). Les microsatellites sont des séquences simples et courtes, composées d'un motif k répété n fois. La longueur du motif k varie de 1 à 6 bases répétées en tandem. Le nombre de répétitions varie beaucoup, selon l'espèce, l'individu et même selon l'allèle (Tautz, 1989).

L'amplification d'une séquence d'ADN cible (microsatellite) est effectuée par le couple d'amorce VVMD5 (fournisseur : STAR- LAB International). La spécificité de ces amorces a été préalablement validée par une étude antérieure (Bowers, 1996).

Les couples d'amorces utilisés, la température d'hybridation des amorces (T_m) et les tailles des fragments attendus sont détaillés dans le Tableau 10.

Tableau 10. Couples d'amorces choisies et la longueur du fragment obtenu avec quelques paramètres associés.

Locus marqueur	Séquence des primer (5'----3')	T_m (C°)	Taille attendue (pb)
VVMD5	Amorce sens : CTAGAGCTACGCCAATCCAA	58,40	226-246 (Bowers, 1996)
	Amorce antisens : TATACCAAAAATCATATTCCTAA	53,30	

3.5.4.1. Préparation du mélange réactionnel pour PCR

Les réactions d'amplification ont été effectuées dans un mix de 20 μ l, contenant : 10 ng d'ADN génomique, 20 pmole de chaque amorce, 2 mM de mix de dNTPs, 5 U/ μ l de *Taq*

polymérase, 2 ul Tampon de *Taq* 10X et compléter le volume à 20 µl par H₂O bidistillée (Bowers, 1996).

Un tube « témoin négatif » (contenant de l'H₂O à la place de l'ADN) dépourvu d'ADN est nécessaire à chaque amplification, afin de s'assurer de l'absence de contamination.

Les programmes d'amplification se déroulent sur un thermocycleur de type prime (standard). Les conditions d'amplification par PCR sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 11. Programme d'amplification d'un couple d'amorces VVMD5 (Bowers, 1996).

Nombre des cycles	Etape	Température (C°)	Durée
	Dénaturation initiale	94	2 min
X40	Dénaturation	94	30 s
	Hybridation	56	30 s
	Elongation	72	2 min
	Elongation finale	72	7 min
	Conservation	4	Indéfiniment

3.5.4.2. Contrôle de la taille des fragments à amplifier

L'analyse du produit d'amplification est effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. Le tampon de migration utilisé est le TAE 1X. 06 µl de l'ADN amplifié est mélangé avec 04µl de bleu de bromophénol, ce dernier utilisé comme indicateur de front. Les produits de PCR sont séparés selon leur taille en paire de bases (pb) sur un gel d'agarose 2 % en présence d'un marqueur de poids moléculaire (PM) (marqueur de poids moléculaire 100 pb DNA ladder) qui permet d'évaluer la taille des fragments d'ADN amplifiés (fig. 12).

La visualisation des produits amplifiés a été réalisée sous U.V. La séquence amplifiée a été visualisée après une coloration au bromure d'éthidium (BET) à une concentration de 0,1 ug/ul dans le gel d'agarose.

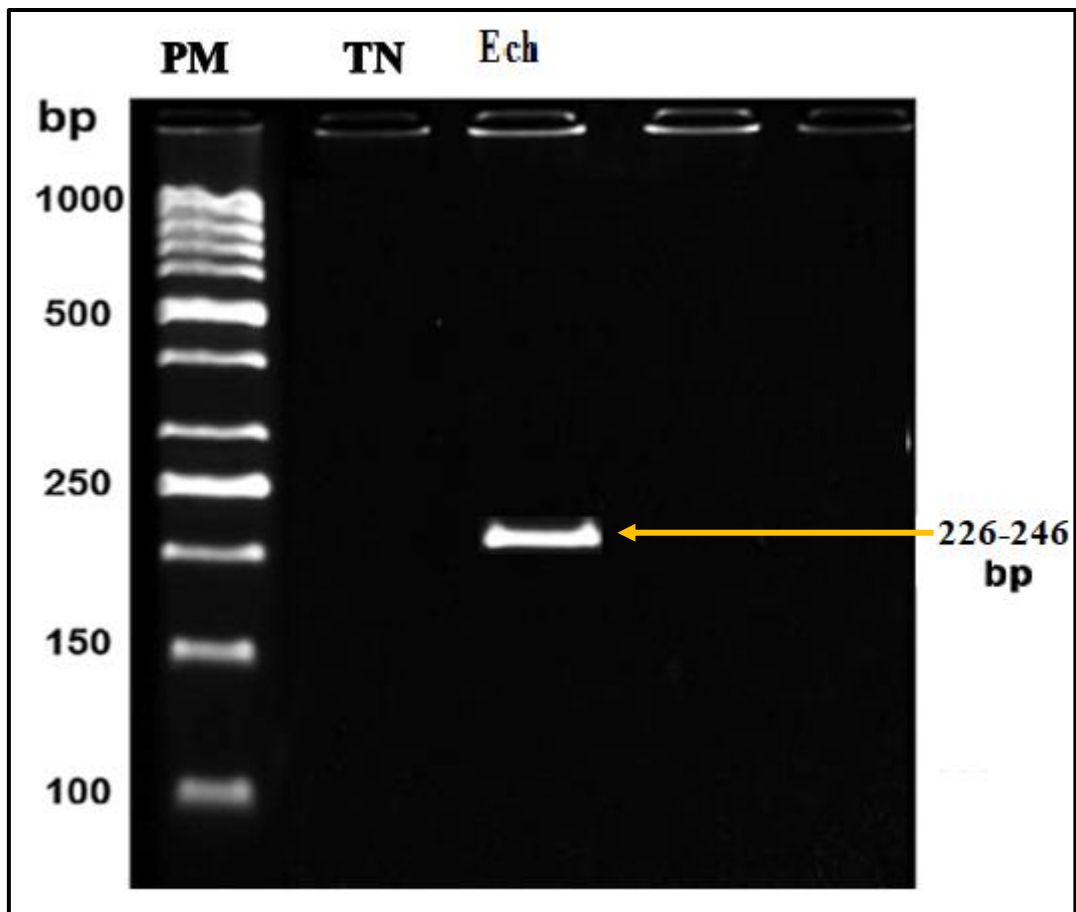


Figure 12. Exemple illustré d'un résultat typique après électrophorèse sur gel d'agarose (2%) des produits de PCR de locus VVMD5. Après la séparation, les fragments d'ADN résultants sont visibles sous forme de bandes clairement définies. PM : marqueur de poids moléculaire 100 pb DNA ladder. TN : témoin négatif. Ech : amplicon obtenu de taille entre 226 -246 pb.

Chapitre 4

Résultats et discussion

Les difficultés d'extraction de l'ADN de plantes sont restées pendant longtemps une des limites de l'application de la biologie moléculaire. En effet, les plantes contiennent une quantité importante de contaminants de l'ADN tels que les polysaccharides et les composés polyphénoliques. Les composés polyphénoliques interagissent irréversiblement avec les protéines et les acides nucléiques induisant leur oxydation et dégradation (Dabo *et al.*, 1993). De nombreux protocoles d'extraction de l'ADN ont été décrits, des méthodes classiques comme la méthode d'extraction par le SDS ou le CTAB. Cependant, la plupart de ces protocoles donnent un ADN de mauvaise qualité. Il y a des kits commerciaux qui ont pour avantage la rapidité, la reproductivité et l'absence d'utilisation de solvants toxiques. Cependant, ils sont souvent coûteux, ce qui empêche leur utilisation.

4.1. Résultats

4.1.1. Extraction de l'ADN

Nous avons extrait l'ADN de 4 échantillons différents de la vigne. Deux expérimentations différentes d'extraction furent réalisées.

4.1.1.1. Protocole (A)

La première extraction fut effectuée en utilisant le premier protocole (A) avec deux échantillons séchés à l'étuve (K2E, WE) et deux échantillons lyophilisés (K2L, WL). Après l'ajout de 2-β-mercaptoéthanol dans le tampon de lyse, nous avons remarqué le changement de couleur du tampon de lyse à une couleur claire qui peut être expliqué par une contamination de tube (fig. 13). Nous avons constaté que le protocole (A) pouvait être échoué c'est à cause de l'étape de préparation de tampon de lyse et il faut le répéter, mais malheureusement à cause de la pandémie de covid-19 et le confinement, nous n'avons pas pu l'appliquer une autre fois.



Figure 13. Après l'ajoute de 2- β -mercaptoéthanol au tampon de lyse (photo originale).

4.1.1.2. Protocole (B)

La deuxième extraction a été faite, en utilisant le deuxième protocole (B) à partir d'abord des échantillons " k2E " et " ch1E "(des échantillons séchés à l'étuve) puis "k2L" et "ch1L "(des échantillons lyophilisés). Après l'ajout le tampon de lavage et une centrifugation pendant 10 min à 10000 rpm (4C°), les échantillons (CH1L, CH1E et K2L) présentaient une teinte brun foncé et l'échantillon K2E présentait une couleur verte jaunâtre. Nous avons répété cette étape 3 fois jusqu'à l'obtention d'une phase aqueuse jaune clair. Les lavages successifs ont permis d'éliminer les métabolites secondaires, Les résultats sont montrés dans la figure 14.

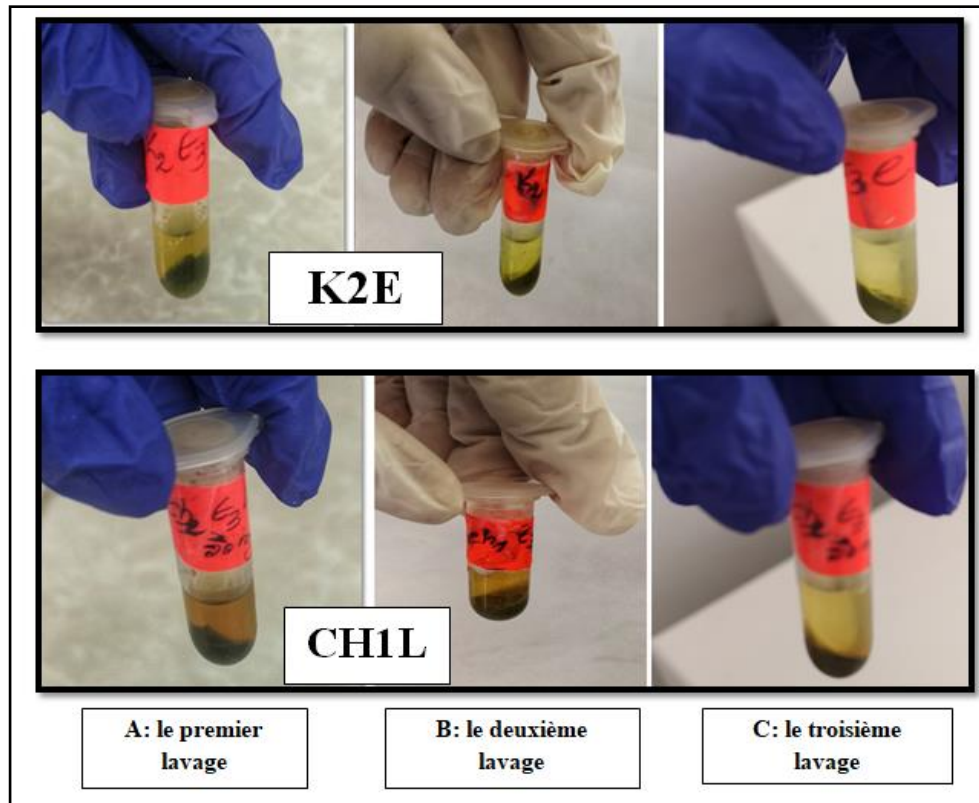


Figure 14. L'étape de lavage des échantillons au tampon de sorbitol (photo originale).

Au cours de l'extraction, les échantillons ont montré des couleurs allant du brun foncé au brun verdâtre (fig. 15). Après le nettoyage au chloroforme suivi d'une centrifugation à 13000 rpm pendant 10 min, nous avons obtenu une phase aqueuse d'une couleur jaune foncé pour les échantillons (CH1L, CH1Eet K2L) et jaune claire pour l'échantillon(K2E). Une couche des déchets sont retrouvés à l'interface (fig. 16).

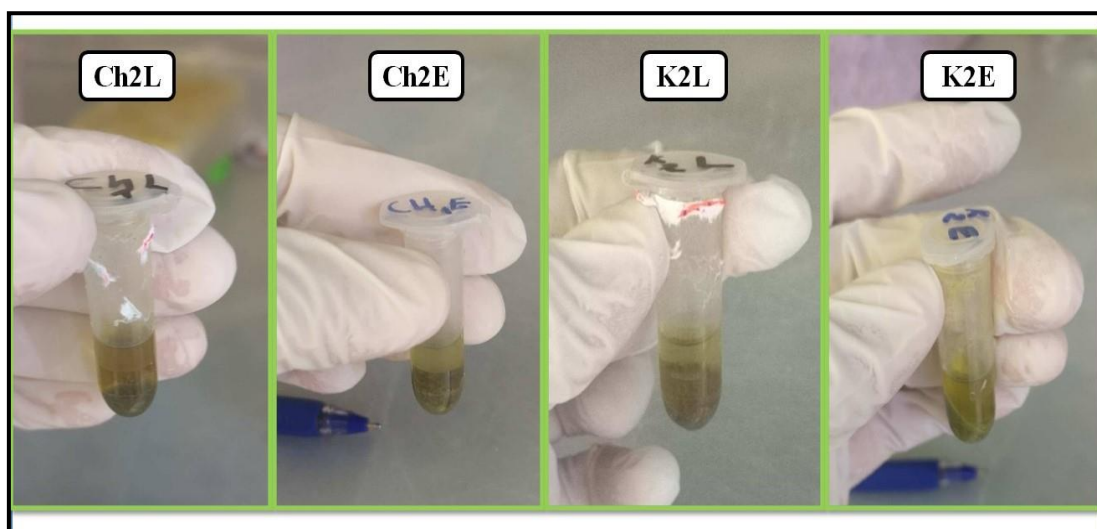


Figure 15. Étape de la lyse cellulaire par le tampon de CTAB (photo originale).

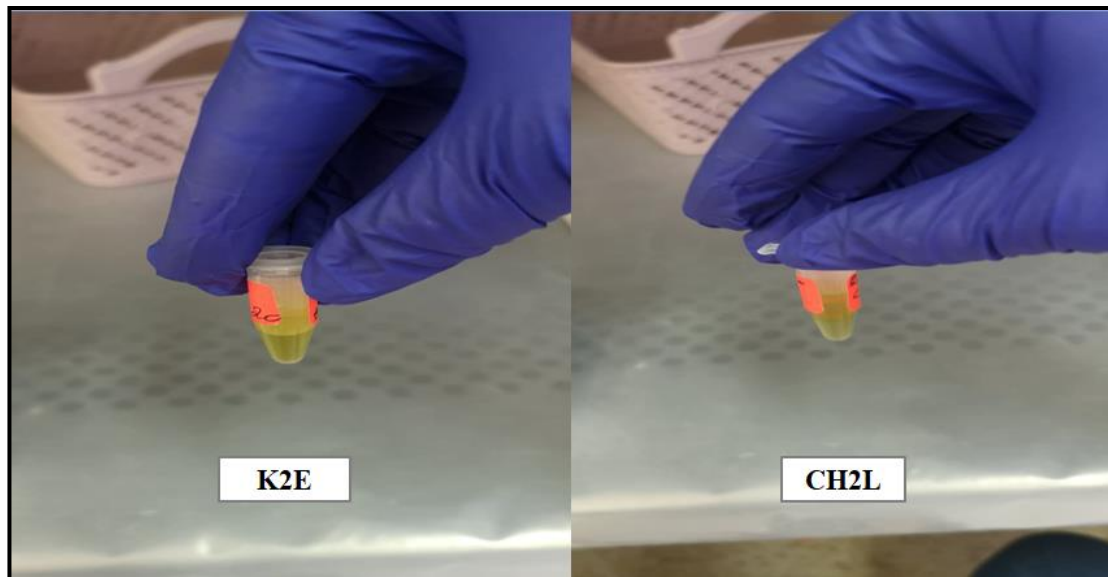


Figure 16. Précipitation et élimination des protéines par le chloroforme/alcool isoamylique (photo originale).

Après la centrifugation de 10 min à 13000 rpm (6 °C), le surnageant contenant l'ADN est transféré dans un autre tube et il est précipité avec un mix d'isopropanol absolu et de NaCl 5M, après agitation douce et incubation à -20 C° pendant une nuit , l'ADN est précipité sous forme un culot blanchâtre. L'ADN est récupéré par centrifugation de 30 min à 14000 rpm (figure 17).

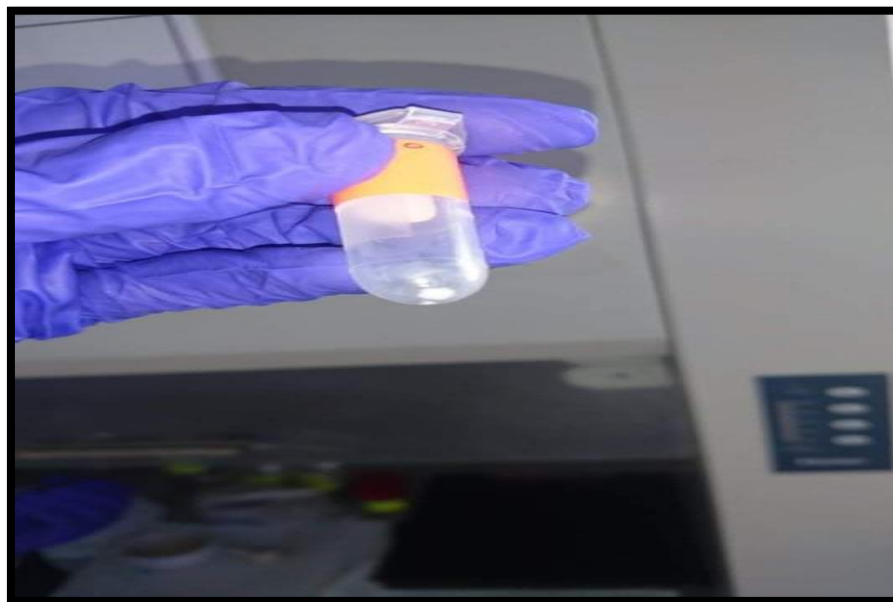


Figure 17. Résultat de la précipitation de l'ADN (photo originale).

4.1.2. Evaluation de l'intégrité d'ADN extrait

4.1.2.1. Protocole (A)

Il est primordial d'évaluer la présence et l'intégrité d'ADN extrait par une migration électrophorétique sur gel d'agarose **0.8%** sous une tension de 100 volts durant 17 minutes, suivie d'une coloration en BET puis visualisation sous U.V. Le résultat obtenu par l'électrophorèse sur gel d'agarose pour le protocole (A) est présenté dans le profil de la figure 18. D'après le profil, l'absence de l'ADN extrait à partir de tous les échantillons testés. On suspecte une erreur lors de la manipulation (lors de la préparation de tampon de lyse). Toutefois, ce protocole doit être répéter pour confirmer leur efficacité.



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

4.1.2.2. Protocole (B)

Les extraits obtenus ont été mis à migrer sur un gel d'agarose 0.8% sous une tension de 100 volts durant 17 minutes, suivie d'une coloration en BET puis la visualisation sous U.V. Ce gel révèle la présence et l'intégrité d'ADN extrait. Le profil électrophorétique (fig. 19) montre une bande d'ADN de fort signal de l'échantillon k2E par rapport au CH1E (signal de fluorescence moins faible) et K2L, CH1L (signal de fluorescence très faible). Le fort signal de fluorescence indique que l'échantillon " K2E " est plus concentré que les autres. De plus, la présence d'une seule bande sur gel d'agarose nous montre que l'ADN extrait est intègre, son intégrité est préservé par une bonne méthode de préparation des échantillons donc une déshydratation complète.

Suite aux résultats obtenus, les feuilles séchées à l'étuve (CH1 et K2) ont donné le meilleur résultat, puisque le séchage ici est complet et fait d'une manière continue pendant 5 jours successifs. Au contraire aux feuilles lyophilisées ont donné des quantités d'acides nucléiques beaucoup plus faibles, indiquant que beaucoup d'ADN avaient été dégradé parce que le séchage était faite de façon discontinue « 24 heures séparées» puisque le laboratoire n'était pas ouverte que de 8:00 Am jusqu'à 4 :30 pm, ce qui provoque une dégradation partielle d'ADN. Le faible signal de l'ADN extrait à partir des autres échantillons peut être aussi expliqué par l'utilisation de petite quantité de gel de silice pendant la période de conservation seraient aussi considérées comme un facteur limitant de l'extraction d'ADN.



Figure 19. Profil électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application de protocole (B). Une électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8% après une coloration au BET suivie d'une visualisation sous U.V. Les puits K2E, CH1E représente les échantillons séchés à l'étuve. Les puits K2L, CH1L représente les échantillons lyophilisés (photo originale).

4.1.3. Évaluation de la rapidité, la simplicité et le coût des protocoles choisis

Malheureusement, nous n'avons pas des résultats suffisants pour évaluer le rendement et la pureté d'ADN et même d'appliquer la PCR c'est à cause le confinement appliqué dû au coronavirus.

Les quatre protocoles seront évalués en termes de simplicité et rapidité (tab. 12), et aussi le coût de chaque protocole sera vérifié (tab. 13).

D'après le tableau (12), les protocoles (C) et (D) semblent faciles à appliquer et même ils ne prennent pas beaucoup de temps pour extraire l'ADN, environ 3 heures d'application.

Tableau 12. Evaluation des protocoles en termes de simplicité et rapidité

Méthode d'extraction	Code de méthode	Durée d'application	Séparation des phases	Précipitation d'ADN
Au CTAB	P(A)	3h et demi à 4h	3 volumes égaux au CAI	Une moitié de volume de Na Cl (6M) 1/10 du volume d'acétate de potassium (3M) un volume d'alcool isopropylique
Au CTAB - SORBITOL	P(B)	presque 8 h	2 volumes de CAI	10% de volume de Na Cl (5 M) 70% de volume d'alcool isopropylique
Au CTAB-SDS	P(C)	presque 3h	3 volumes de CAI	1/10 volume de NaAc(3.5M) 2/3 volume d'isopropanol
Au SDS	P(D)	presque 3h	3 volumes de CAI	0.6 volume d'isopropanol 2.5 volume d'éthanol

Notre laboratoire n'est pas bien équipé, c'est pour ça nous voulons de choisir une méthode d'extraction de meilleure efficacité, mais avec des coûts raisonnables. Les prix de tous les produits utilisés à l'extraction ont été donnés par le chef du laboratoire de notre département. Pour quelques produits, on a eu recours à la recherche des prix auprès des fournisseurs. Le tableau suivant résume le coût de chaque produit utilisé, et le coût total de l'extraction. Parmi tous ces protocoles, le prix d'extraction d'ADN par le protocole (C) est le moins couteux (30.869 DA)

Tableau 13. Estimation de coût de l'extraction d'ADN génomique pour un échantillon.

Produits	Prix de produit en DA	Protocole A		Protocol B		Protocol C		Protocol D	
		Quantité utilisée en (g ou L)	coût (DA)	Quantité utilisée en (g ou L)	coût (DA)	Quantité utilisée en (g ou L)	coût (DA)	Quantité utilisée en (g ou L)	coût (DA)
CTAB (100g)	895,00	0.024	0.215	0.008	0.716	0.008	7.16	/	/
SDS (1Kg)	943,61	/	/	/	/	0.004	0.00377	0.2	0.189
Na Cl (1Kg)	1850,00	0.01355	0.024	0.13324	24.650	0.0187	0.034	0.233	0.0086
PVP (100 g)	22352,18	/	/	0.01	2.235	0.008	1.788	/	/
Tris-HCl	28201,66	0.250	14.100	0.32886	18.53	0.250	14.10	0.3132	17.666

(500g)									
EDTA (1 kg)	6916,00	0.029	0.200	0.0134	0.09	0.297	2.059	0.372	2.57 2
CHL (2,5 L)	5500,00	0.001	2.2	1.16	255. 2	0.76. 10^{-3}	1.672	2.04. 10^{-3}	4.44 8
Alcool isoamyl ique (2,5 L)	10100,0 0	0.06. 10^{-3}	0.242	0.04. 10^{-3}	0.16 1	0.004. 10^{-3}	0.161	0.06. 10^{-3}	0.24 2
Isoprop anol (500 ml)	11800,0 0	0.5. 10^{-3}	0.0118	0.28. 10^{-3}	0.00 6	0.004. 10^{-3}	0.009	0.42	0.00 9
Ethanol (2,5 L)	2800 ,00	0.5. 10^{-3}	0.56	0.003	3.36	0.4. 10^{-3}	0.044	1.75. 10^{-3}	1.96
2-β- mercap toéthan ol (1L)	3400,00	0.0024. 10^{-3}	0.0081 6	0.002. 10^{-3}	0.00 68	0.005. 10^{-3}	0.017	/	/
Glucose (1kg)	7196.0 1	/	/	/	/	0.00396	0.028	/	/
Protéin ase K (500 mg)	69700,0 0	/	/	/	/	/	/	0.0001	0.13 9
Acétate de sodium (1Kg)	12624,7 4	/	/	/	/	0.028	0.335	/	/
Sorbitol (1Kg)	151,54	/	/	109	16.5 1	/	/	/	/
ARNase A (2.5ml)	34534, 78	/	/	0.001. 10^{-3} (10mg/ ml)	69	0.001. 10^{-3} (25µg/ ml)	3.45	0.001	1381 .39
La Somme total (DA)		17.560		390.473		30.869		1408.616	

4.2. Discussion analytique

4.2.1. Matériel végétal

4.2.1.1. Choix des feuilles

L'isolement de l'ADN de bonne qualité est la condition préalable à la recherche moléculaire. Le maintien du rendement et de la qualité de l'ADN extrait à partir de la cellule végétale est l'une des tâches difficiles par rapport à l'ADN extrait de la cellule animale, en raison de sa paroi cellulaire rigide et aussi ces cellules contiennent une grande quantité des composés organiques tels que les polysaccharides, les polyphénols, les protéines et les lipides qui agissent comme contaminant lors de l'extraction de l'ADN. La quantité de ces composants varie selon les espèces végétales, la partie végétale utilisée, l'état de l'environnement et le

stade de croissance. Par exemple, les céréales sont riches en glucides alors que les plantes médicinales sont riches en polyphénols et les plantes stressées ont des polyphénols plus élevé (Heikrujam *et al.*, 2020).

Dans les plantes, l'ADN peut être extrait de divers tissus, comme les feuilles, la tige, la racine, l'endocarpe de fruits et l'embryon. Les feuilles et la tige, par exemple, sont souvent utilisées dans la génétique des populations (Xia *et al.*, 2019). Le choix du matériel de départ approprié est essentiel à l'isolement efficace de l'acide nucléique (Cantu et Walker, 2019).

Dans cette étude, nous avons choisis les jeunes feuilles pour extraire l'ADN parce qu'elles se caractérisent par un grand nombre des cellules et qu'elles contiennent généralement moins de métabolites secondaires (Murray et Thompson, 1980 ; Doyle et Doyle, 1987 ; Peterson *et al.*, 1997 ; Cantu et Walker, 2019). Alors que, les feuilles adultes sont généralement fortement chargées en métabolites secondaires, qui s'interfèrent avec l'ADN extrait (Porebski *et al.*, 1997).

4.2.1.2. Séchage des feuilles

Les analyses en génétique moléculaire chez les plantes sont souvent limitées par la disponibilité du matériel végétal frais et le temps nécessaire pour l'extraction ainsi que par la qualité de l'ADN extrait. Les tissus fraîchement collectés, doivent être immédiatement utilisés pour isoler les acides nucléiques, pour éviter la dégradation de ces derniers par les endonucléases (Cantu et Walker, 2019). Un autre problème majeur pour la plupart des laboratoires des pays en développement est l'achat et le stockage continu de l'azote liquide.

Dans notre étude, nous avons collecté les feuilles au mois d'octobre 2019 que nous les utiliserons pour extraire l'ADN au mois de mars 2020 en sachant que pendant l'hiver les feuilles de vigne sont indisponibles, pour cela nous avons essayé d'optimiser une méthode facile et efficace pour conserver les feuilles pendant 5 à 6 mois sans altérer l'ADN génomique. Nous avons séché les feuilles collectées pour réduire l'activité enzymatique ce qui conserve l'intégrité de l'ADN génomique (Arruda *et al.*, 2017).

Le stockage approprié des tissus est également important, c'est pour ça nous avons conservés les feuilles à température ambiante en présence de gel de silice. Cette méthode de conservation est simple et facile et elle permet de préserver les échantillons, quel que soit le taux d'humidité, pendant une longue période de temps.

Les tissus déshydratés sont avantageux car ils peuvent être broyés plus facilement dans un mortier et au pilon sans l'utilisation de l'azote liquide qui est indisponible au niveau notre

laboratoire. Par cette simple méthode de broyage, nous avons obtenu une poudre fine sans que l'échantillon subisse un cycle de congélation/ décongélation (par l'azote liquide) ce qui agit sur l'intégrité d'ADN. 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.

4.2.2. Techniques d'analyse

4.2.2.1. Protocole d'extraction (A)

Le premier protocole étudié est un protocole modifié de Doyle et Doyle (1990) par Aboul-Maaty et Oraby (2019). Il utilise l'extraction par la méthode CTAB pour extraire l'ADN génomique des échantillons très divers (19 graines de plantes différentes et sept ordres différents), en vue d'extraire un ADN de bonne qualité. Ces échantillons de plantes sont riches en protéines, polysaccharides et polyphénols.

Tout d'abord, il y a une étape de la lyse chimique par le détergent cationique CTAB (3%). D'après Surzycki (2000) et Palomera-Ávalos *et al.* (2008), le CTAB va 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.

Le tampon d'extraction comprend également 1,4M de NaCl, cette concentration fournit la force ionique nécessaire au CTAB pour précipiter les polysaccharides (Sharma, 2012). Tandis que l'utilisation de l'EDTA dans le tampon de lyse pour un but de capter les ions bivalents et donc d'inhiber de nombreuses nucléases qui utilisent des ions Mg^{+2} comme cofacteur (Sharma, 2012). D'après Shukla *et al.* (2018) l'ajout de Tris-Hcl ça permet de maintenir le pH du tampon d'extraction à un pH physiologique presque de 8, c'est le pH idéal pour empêcher l'hydrolyse de l'ADN.

Le protocole utilise 0,3% de 2-β-mercaptoéthanol qui élimine les polyphénols qui apparaissent dans le culot final d'ADN sous forme de sédiments colorés (Khanuja *et al.*, 1999)

Ensuite, le traitement répété avec le chloroforme/alcool isoamylique (24:1 v/v) va permettre d'éliminer la chlorophylle et d'autres pigments jusqu'à l'obtention d'une phase aqueuse claire (Shukla *et al.*, 2018).

L'ajout de chloroforme permet aussi de dénaturer les protéines. Son addition à une phase aqueuse a pour effet de dénaturer les protéines en solution dans le milieu, après centrifugation, elles se situent à l'interface entre la phase aqueuse et la phase organique (Henry, 2008).

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, L'ADN extrait se trouvent dans la phase aqueuse (Ripoll *et al.*, 2011).

Ce protocole utilise les sels à haute concentration (NaCl 6M et l'acétate potassium 3M) avec l'isopropanol absolu froid. Selon Fang *et al.* (1992), une solution concentrée en sel va permettre d'éliminer les polysaccharides qui sont restés en solution et ont été jetés avec le surnageant d'isopropanol, en diminuant la coprécipitation des polysaccharides avec l'ADN, pour améliorer la qualité d'ADN extrait.

Toutefois, la purification de l'extrait d'ADN est souvent limitée par la présence de métabolites secondaires. Les feuilles de *Vitis vinifera* contiennent des quantités importantes de métabolites secondaires, ce qui limite l'utilisation d'ADN extrait en biologie moléculaire. Le protocole (A) utilise une concentration faible de 2-β-mercaptoéthanol (0,3%) et selon Lencina *et al.*, (2019) ont montré que la concentration efficace de 2-β-mercaptoéthanol utilisé est 10 fois plus concentré (2% au lieu de 0,2%) que le protocole de base (Doyle et Doyle, 1987), pour réduire l'oxydation des composés phénoliques présents dans l'échantillon.

Selon Rogers et Bendich (1985), l'ajout de PVP au tampon d'extraction était nécessaire pour améliorer la qualité d'ADN extrait. La PVP forme des liaisons hydrogène complexes avec des composés polyphénoliques qui peuvent être séparés de l'ADN par centrifugation (John, 1992)

Ce protocole utilise un seule lavage par éthanol 70% mais il vaut mieux d'utiliser un double lavage par éthanol 70% pour éliminer totalement les traces de sels. De plus, ce protocole n'utilise pas l'ARNase pour éliminer tous les ARNs qui peuvent contaminer l'ADN extrait. Et selon le résultat trouvé par Aboul-Maaty et Oraby (2019), tous les ADN extraits sont contaminés par l'ARN, le ratio 260/280 est supérieur à 2 (tab. 14).

Tableau 14. Résultat de la pureté d'ADN extrait de quelques échantillons par Aboul-Maaty et Oraby (2019).

Espèce	Ordre	Pureté d'ADN (DO) (260/280)
<i>Zea mays</i>	Poales	2.23
<i>Oryza sativa</i>	Poales	2.13
<i>Solanum tuberosum</i>	Solanales	2.15

<i>Solanum melongena</i>	Solanales	2.12
<i>Cucurbitales maxima</i>	Cucurbitales	2.19
<i>Cucumis sativus</i>	Cucurbitales	2.15
<i>Lupinus lupinus</i>	Fabales	2.18
<i>Cicer arietinum</i>	Fabales	2.22
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabales	2.10
<i>Lens culinaris</i>	Fabales	2.10
<i>Triticum aestivum</i>	Cyperales	2.14

Cette méthode présente un autre inconvénient représenté par l'utilisation de l'azote liquide coûteux qui est indisponible au niveau plusieurs laboratoires. Aussi, Il utilise le chloroforme qui est un agent mutagène et cancérigène. Dû à sa grande volatilité, il est principalement absorbé par les voies respiratoires, mais il peut également être absorbé par la peau et le système digestif. C'est un irritant de la peau et des yeux et il s'accumule préférentiellement dans les tissus adipeux, le foie et le cerveau (National Research Council, 1995)

4.2.2.2. Protocole d'extraction (B)

Le deuxième protocole choisis est basé sur la méthode conventionnelle du bromure de cétyl triméthylammonium (CTAB). Il est modifié pour extraire l'ADN à partir des différents tissus (La feuille, la tige et l'endocarpe des graines) d'une espèce de palmier, *L'Euterpe edulis* (Lucas *et al.*, 2019).

Tout d'abord, un lavage répété par 1ml de tampon de lavage de sorbitol froid (4 ° C) avec l'ajout de 2 µL de 2-β-mercaptoéthanol, jusqu' à ce que le surnageant soit clair. Selon Tel-Zur *et al.* (1999) et Inglis *et al.* (2018), le tampon de sorbitol a utilisé pour neutraliser l'action des contaminants, tels que les polysaccharides, les polyphénols et les autres métabolites secondaires.

Donc, les prélavages au sorbitol réduisent ou éliminent les polyphénols avant qu'ils ne puissent se lier de manière covalente à l'ADN et réduisent les polysaccharides avant qu'ils ne puissent être co-extraits et plus tard co-précipités par l'alcool, avec des acides nucléiques (Inglis *et al.*, 2018).

L'utilisation du PVP dans le tampon de lavage de sorbitol pour éliminer les polyphénols. Le PVP forme des liaisons hydrogène complexes avec les composés polyphénoliques (Ghaffari et al., 2011). Lorsque le PVP n'était pas utilisé, le précipité d'ADN extrait était parfois brun à noir c'est à cause l'interaction entre les polyphénols oxydés et la molécule d'ADN (Rogers et Bendich, 1985).

L'un des antioxydants les plus utilisés est le 2- β -mercaptoéthanol qui est un antioxydant empêché les activités de peroxydase ou de polyphénoloxydase (Henry, 2008). Afin d'inhiber la réaction d'oxydation des composés phénoliques (Clemente et Salatino, 2010).

Ensuite, une étape de lyse a été effectuée par le CTAB (1%) en présence d'une forte concentration en sel (2.6 M NaCl) pour détruire la membrane cellulaire et nucléaire. L'extraction d'ADN par le CTAB en présence d'une forte concentration en sel a supprimé la co-précipitation des polysaccharides avec l'ADN (Tel-Zur *et al.*, 1999). Selon Lodhi *et al.* (1994), l'utilisation des concentrations plus élevées de NaCl (concentration finale 2,5 M) éliminait efficacement les polysaccharides chez les espèces de *Vitis*. Une incubation à 65 ° C pendant 1-2 heures avec une agitation, ça permet d'accélérer la lyse cellulaire.

Le traitement répété avec le chloroforme/alcool isoamylique (24:1 v/v) va permettre d'éliminer les protéines, la plupart des lipides et les débris cellulaires (Aboul-Maaty et Oraby, 2019). La centrifugation à 4 ° C favorise une bonne séparation des phases pendant les différentes étapes, en particulier lors de l'extraction des protéines par le mélange CAI (24 : 1) (Benbouza *et al.*, 2006).

La précipitation de l'ADN à -20 ° C pendant 30 min au lieu d'une précipitation à température ambiante améliore nettement la formation rapide du culot d'ADN (Benbouza *et al.*, 2006). Une incubation plus longue de l'ADN extrait à - 20 ° C a également augmenté la précipitation de l'ADN ce qui augmente le rendement de l'extraction (Aboul-Maaty et Oraby, 2019). Un lavage répété par l'éthanol (deux fois par l'éthanol 70% et un fois par l'éthanol absolu) pour éliminer tous les traces des sels (Henry, 2008).

Cette méthode présente un inconvénient représenté par l'utilisation de chloroforme qui considéré comme un agent mutagène et cancérigène (National Research Council, 1995).

Cependant, ce protocole s'avère un peu difficile à appliquer surtout avec l'étape de lavage qui prend un peu de temps sans oublier les différentes étapes d'extraction (presque 8h).

4.2.2.3. Protocole d'extraction (C)

Ce protocole a été modifié en utilisant deux détergents (CTAB et SDS) pour l'extraction d'ADN de bonne qualité et en bon rendement. Le troisième protocole a essayé d'extraire l'ADN à partir de graines et de feuilles des cotonniers qui contiennent une quantité importante de contaminants de l'ADN tels que les polysaccharides et les composés polyphénoliques (une plante récalcitrante) (Paterson *et al.*, 1993 ; Benbouza *et al.*, 2006). Le protocole a été optimisé pour réduire le temps, le coût et résoudre les problèmes associés aux métabolites secondaires, en particulier les polysaccharides et les polyphénols.

Tout d'abord, il y a une étape de lyse chimique qui a été effectuée par deux détergents le SDS et le CTAB. D'après Paterson *et al.* (1993) et Porebski *et al.* (1997), l'utilisation de deux détergents dans ce protocole permet d'obtenir un rendement plus élevé d'ADN (Henry, 2008). Les détergents contribuent à la rupture des tissus en éliminant les lipides membranaires et en permettant à l'ADN et aux autres éléments cellulaires d'être libérés dans la solution (Henry, 2008).

La combinaison de détergents peut conduire à la formation efficace de complexes insolubles permettant l'élimination des protéines et des polysaccharides (Lefort et Douglas, 1999). Pour cette raison, plusieurs études ont utilisé un mélange de SDS et de CTAB (De la Cruz *et al.*, 1995 ; De la Cruz *et al.*, 1997 ; Jobes *et al.*, 1995 ; Lefort et Douglas, 1999). Les études de Mondragon *et al.* (2000) et Steenkamp *et al.* (1994) ont rapporté que la combinaison de CTAB et SDS était efficace pour éliminer les polysaccharides des tissus contenant du mucilage. La combinaison de CTAB et SDS réduisait la concentration de polysaccharides, mais la contamination d'ADN par le SDS pouvait provoquer la digestion des endonucléases et d'inhiber l'enzyme *Taq* polymérase dans l'amplification PCR. (Blanchard et Nowotny, 1994 ; Henry, 2008).

Le SDS est un détergent anionique, il a la capacité de briser les membranes cellulaires et de dénaturer les protéines. Henry, (2008) et Kang *et al.*, (1998) ont constaté que le SDS était le détergent le plus efficace pour extraire l'ADN des graines sèches. Le CTAB cationique est largement utilisé dans les protocoles d'isolation de l'ADN des plantes et il a la capacité de lyser des divers types de tissus frais, par exemple : les feuilles, et les tissus végétaux préservés (c'est-à-dire congelés, lyophilisés et déshydratés) (Henry, 2008). Le CTAB produit des rendements plus élevés que les autres détergents à partir de n'importe quel type de matière première (Huang *et al.*, 2000). Elle ne détruit pas seulement les membranes cellulaires et les protéines (Rogers et Bendich, 1985), mais sépare également les polysaccharides de la molécule d'ADN extraite (Pirttila *et al.*, 2001). À faible concentration en sel, le CTAB chargé

positivement solubilise la membrane cellulaire et forme un complexe avec l'ADN chargé négativement. L'ADN peut ensuite être précipité à partir de ce mélange complexe en augmentant la concentration en sel (Henry, 2008). L'utilisation d'une très faible concentration de CTAB (0,5% p/v), le CTAB ne perd pas son efficacité ni sa capacité de précipitation (Henry, 2008). De plus, des faibles concentrations de CTAB contribuent à réduire la formation de mousse lors l'homogénéisation et à minimiser la viscosité de la solution. Des concentrations plus élevées de CTAB sont recommandées pour les tissus végétaux riches en polysaccharides (Doyle et Doyle, 1990 ; De la Cruz *et al.*, 1997 ; Henry, 2008). Cependant, Chaudhry *et al.* (1999) ont déclaré que des concentrations plus élevées de CTAB peuvent diminuer le rendement en ADN des feuilles de cotonniers. Une autre étude a indiqué que 2 % de CTAB (p/v) est capable de produire un bon rendement mais que 3 % de CTAB (p/v) donnent un ADN de bonne qualité qui est plus facilement utilisé dans les analyses de biologie moléculaire (Steenkamp *et al.*, 1994). Weir *et al.* (1996) ont rapporté que parmi plusieurs détergents différents, le CTAB était le plus efficace pour produire de l'ADN de poids moléculaire élevé à partir de divers arbres fruitiers (Henry, 2008).

Ce protocole choisis utilise le SDS (1%) et CTAB (2%) dans un tampon d'extraction avec l'ajout des autres réactifs qui sont :

Le Tris (pH 7,0-8,0) est un agent tampon, pour contrôler le pH de la solution d'extraction (Henry, 2008).

L'EDTA, un agent chélateur pour inactiver l'activité des nucléases. Les ions de magnésium (Mg^{2+}) sont un cofacteur de la plupart des activités des nucléases (Henry, 2008), c'est pourquoi l'ajout d'un chélateur d'ions bivalent (EDTA) dans le tampon d'extraction empêche la dégradation de l'ADN (Lahiri et Schnabel, 1993). Certaines études ont rapporté que sans l'EDTA, aucun ADN n'est produit (Hong *et al.*, 1995 ; Rogstad *et al.*, 2001). Alors que des concentrations plus élevées d'EDTA peuvent entraîner l'élimination de Mg^{2+} , qui est essentielle pour l'activité des enzymes utilisées dans les étapes ultérieures en biologie moléculaire (Hengen, 1994).

Lors de la lyse cellulaire, les composés phénoliques sortent des vacuoles, deviennent facilement oxydés et se lient de manière réversible aux acides nucléiques et aux protéines, ce qui induit à la formation d'un culot d'ADN parfois brun à noir qui est inadapté à la plupart des manipulations de biologie moléculaire. D'autre part, la nature visqueuse des polysaccharides rend l'ADN extrait difficile au pipetage, et ils interfèrent également avec diverses enzymes biologiques, et empêche en particulier la réaction de PCR en inhibant

l'activité de l'ADN polymérase. C'est pour ça, le protocole utilise des concentrations élevées des réactifs (2% PVP et 1.4 M NaCl) pour éliminer les polyphénols et les polysaccharides, respectivement. De plus, le glucose a été utilisé comme agent réducteur qui inhiber le polyphénol oxydase et en empêchant le brunissement du culot d'ADN (Katterman et Shattuck, 1983 ; Aboul-Maaty et Oraby, 2019).

Tandis que le 2- β ME a été utilisé comme antioxydant pour empêcher l'oxydation des polyphénols. Le 2- β ME protège également l'ADN des quinones, des disulfures, des peroxydases et des polyphénols oxydases et retarde donc l'oxydation des polyphénols (Henry, 2008).

De nombreuses études d'extraction d'ADN ont montré que le PVP et le 2- β ME sont capables de produire de l'ADN exempt de contaminant (les polyphénols) (Maliyakal, 1992 ; Pich et Schubert, 1993 ; Henry, 2008). Lefort et Douglas (1999) ont constaté que 1% de 2- β ME (v/v) est nécessaire pour dénaturer la nucléase endogène et pour réduire l'oxydation des substances phénoliques.

Cheng *et al.* (1997) ont suggéré que l'élimination efficace des polyphénols nécessite plus de 1% de 2- β ME (v/v), et que 2% de 2- β ME (v/v) est suffisant pour éliminer les polyphénols.. Il est suggéré que l'utilisation de 2% de 2- β ME (v/v) avec 2% de PVP (p/v) peut éliminer les polyphénols des tissus de diverses espèces ligneuses, des feuilles de plantes ligneuses séchées au gel de silice et des feuilles de vigne (Cheng *et al.*, 1997). Le PVP se lie avec les polyphénols par une liaison hydrogène, ce qui facilite leurs éliminations de la solution (Steenkamp *et al.*, 1994 ; Porebski *et al.*, 1997). Cheng *et al.* (1997) ont suggéré que l'élimination efficace des polyphénols de l'écorce de diverses espèces nécessitait un minimum de 2% de PVP (p/v), tandis que Bandana et Ahuja (1999) ont trouvé que 1% de PVP (p/v) était suffisant pour l'élimination efficace des polyphénols des feuilles de thé séchées.

Après une incubation 30 min, il y a une étape d'élimination des ARN par ARNase A. L'ARNase A est une enzyme fréquemment utilisée pour digérer l'ARN en petits fragments (Rether *et al.*, 1993 ; Lefort et Douglas, 1999). Porebski *et al.* (1997) ont constaté qu'un traitement d'une heure avec ARNase A est suffisant pour dégrader l'ARN en petits ribonucléosides qui ne sont pas détectables dans les gels d'agarose. L'élimination de l'ARN par ARNase A augmente l'efficacité du processus d'amplification (Guidet, 1994). La contamination par l'ARN peut entraîner une surestimation de la quantité d'ADN extraite lorsqu'elle est quantifiée à l'aide de l'absorbance U.V, ou elle peut apparaître sous forme d'ADN de faible poids moléculaire lors de l'électrophorèse sur gel d'agarose (Henry, 2008).

L'élimination de l'ARN devrait donc être une considération importante dans toute procédure d'isolement de l'ADN (Jobes *et al.*, 1995).

Ensuite, Les protéines, la plupart des lipides et les débris cellulaires ont été éliminés par liaison avec des composés non aqueux et précipités lors de l'étape de chloroforme- l'alcool isoamylique (24:1 v/v) (Aboul-Maaty et Oraby, 2019). Le chloroforme dénature également les protéines et l'alcool isoamylique facilite la séparation de la phase aqueuse à la phase organique et réduit la formation de mousse pendant la centrifugation (Henry, 2008). Selon Rhonda *et al.* (1992), deux extractions avec CAI amélioreraient la pureté de l'ADN sans affecter le rendement.

Après l'étape d'extraction organique, l'ADN est précipité par l'isopropanol en présence d'acétate de sodium, suivie d'un lavage à l'éthanol. L'isopropanol est plus efficace que l'éthanol pour précipiter l'ADN et il a permis d'améliorer considérablement la qualité de l'ADN (Ripoll *et al.*, 2011). Dellaporta *et al.* (1983) ont décrit que l'utilisation de l'isopropanol avec l'acétate de sodium permet une meilleure précipitation de l'ADN de poids moléculaire élevé. De plus, ce protocole utilise un seul lavage par l'éthanol 70%, mais de préférence de faire double lavage pour bien éliminer les traces des sels.

4.2.2.4. Protocole d'extraction (D)

On a choisi le Protocole de Xia *et al.* (2019), qui a utilisé la méthode d'extraction d'ADN qui se base sur SDS à partir de graines de soja. Les graines de soja contiennent des protéines, de l'huile, du polysaccharide, du polyphénol et d'autres contaminants.

D'abord, il y a une étape de lyse chimique par le détergent anionique SDS (2%) qui va éliminer les molécules lipidiques de la membrane cellulaire et provoque sa perturbation. Il se lie également aux protéines chromosomiques chargées positivement (histones) pour libérer l'ADN dans la solution (Sharma, 2012). kang *et al.* (1998) ont découvert que le SDS était le détergent le plus efficace pour extraire l'ADN à partir les graines sèches.

Ensuite, il y a une étape de lyse enzymatique par la protéinase K 10 µl (10 mg / ml) qui va éliminer les protéines lourdes présentes dans l'extrait, il est utilisé pour un but de dénaturer et précipiter les protéines (Sharma, 2012). La protéinase k digère les polypeptides en petites molécules qui sont ensuite facilement éliminé par une extraction au phénol/chloroforme (Henry, 2008).

Soni et Murray (1994) ont déclaré qu'une activité efficace de la protéinase k nécessite un minimum 2% de SDS.

kang *et al.* (1998) ont découvert que l'incubation avec un tampon d'extraction contenant de la protéinase K donnait un ADN de bonne qualité et quantité.

Selon Lahiri et Schanbel (1993) l'ajout d'un chélateur d'ions bivalents EDTA dans le tampon d'extraction empêche la dégradation de l'ADN.

Le Protocole utilise trois extractions organiques par CAI (24 :1) qui étaient nécessaires pour éliminer l'excès des protéines (Henry, 2008). De nombreuses études ont préféré l'extraction au CAI (24 :1) au lieu d'une extraction au phénol ou Phénol/Chloroforme, parce que ce dernier solvant entraîne une réduction de la qualité et la quantité d'ADN isolée. (Lefort et Douglas 1999 ; Mary *et al.*, 1998 ; Fulton *et al.*, 1995 ; Sangwam *et al.*, 2000)

L'ajout de l'isopropanol absolu a pour but d'isoler un ADN extrait de poids moléculaire élevé (Ruead *et al.*, 1998). Khanuja *et al.* (1999) ont déclaré que la meilleure précipitation s'effectue par l'isopropanol absolu suivie d'un lavage à l'éthanol 70% donne plus d'ADN. Le lavage de culot d'ADN par l'éthanol 70% pour éliminer toute trace de sel.

Ce Protocole dissout l'ADN dans un tampon TE (10mM Tris, 1 mM EDTA) puis traité avec l'ARNase à 37°C pendant 30 min pour digérer l'ARN en petits fragments qui ne contaminent pas l'ADN (Lefort et Douglas 1999 ; Rether *et al.*, 1997).

Porebski *et al.* (1997) ont constaté qu'un traitement d'une heure avec l'ARNase est suffisant pour dégrader l'ARN en petits fragments qui ne sont pas détectables dans le gel d'agarose.

Les graines de soja sont riches en composé phénolique et pour obtenir un ADN de qualité, il faut les éliminer. Ce Protocole n'utilise pas le PVP et le 2-β-mercaptoéthanol. Des nombreuses études d'extraction d'ADN ont montré que le PVP et 2-βME sont capables de purifier un ADN sans contamination par les polyphénols (Wang *et al.*, 1996 ; Kim *et al.*, 1997).

4.2.3. Evaluation des protocoles d'extraction

Dans cette étude, Nous avons comparé deux méthodes universelles (SDS, CTAB) pour déterminer la méthode d'extraction la plus appropriée, relativement simple, peu coûteuse, applicable par notre laboratoire et elle permet d'isoler un ADN de qualité et en bon rendement. Les quatre protocoles sont évalués en termes de simplicité et rapidité (tableau 12, page 41), et aussi le coût de chaque protocole a été vérifié (tableau 13, page 41-42).

Malheureusement, nous n'avons pas des résultats suffisants pour évaluer le rendement et la pureté d'ADN et c'est trop difficile de comparer théoriquement la pureté d'ADN extrait entre ces différents protocoles parce qu'ils sont utilisés des différentes plantes qui sont préparés par des méthodes différentes. Nous avons essayé de faire une étude comparative théorique dont on prend en considération le type de tissu et la plante utilisé (tab. 15).

D'après les informations présentées au tableau 15. Le rendement le plus élevé était obtenu par la méthode SDS-CTAB (protocole C) (1500 (ng/mg), malgré il a fait l'extraction d'ADN à partir de tissu récalcitrante (cotonnier). alors que, la plus faible avec le protocole B, en particulier avec l'extraction d'ADN à partir les différents tissus de palmier (70 ng/mg).

La qualité de l'ADN caractérisée par un rapport A260/A280 de l'ordre de 1,8, est bonne pour tous les échantillons de protocole C et D, sauf pour les extractions avec la méthode d'extraction (A) qui donne des valeurs supérieur à 2 (contamination par les ARNs). Cependant, il n y a pas des résultats détaillés par l'article de protocole (B). De plus, les plus échantillons contaminés par les métabolites secondaires avec un ratio 260/230 < 2, sont celui de protocoles (A) et (D).

Tableau 15. Comparaison des résultats obtenus par les protocoles appliqués.

Méthode d'extraction d'ADN	Plante utilisée	Quantité d'échantillon utilisée	La pureté d'ADN (DO)		Rendement	PCR
			260/280	260/230		
Protocole A : Au CTAB	19 graines de plantes différentes et sept ordres différents	50mg	2.08 à 2.23	1.59 à 2.17	24.957 (ng/mg)	+
Protocole B : Au CTAB + washing buffer à base de sorbitol	Différents tissus de palmier	100mg	/	/	70 (ng/mg)	+
Protocole C : Au CTAB-SDS	graines et feuilles des cottonniers	100mg	1.79 à 1.84	2.01 à 2.20	1500 (ng/mg)	+
Protocole D : Au SDS	Graine de soja	100mg	1.818 à 2.023	0.885 à 2.865	2444 (ng/mg)	+

D'après l'étude précédente, nous avons constaté que la méthode CTAB-SDS menée par le protocole de Qasim Ali *et al.* (2019), donne un meilleur résultat par rapport aux autre

méthodes, où ce protocole permettait d'extraire un ADN avec un bon rendement de 1500 (ng/mg) dans un temps presque de 3heurs, et avec un coût raisonnable d'un échantillon de 100mg est d'environ 30.869 DA.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans notre travail, nous sommes intéressés à l'extraction d'ADN à partir des feuilles de la vigne qui ont été séchées juste après la collecte pour éviter toute dégradation enzymatique. L'extraction a été réalisée sur six variétés différentes de feuilles de la vigne. C'est la méthode de séchage à l'étuve ventilée qui a été donnée des bons résultats (ADN intègre), malgré les échantillons sont conservés pendant cinq mois à température ambiante. La meilleure méthode d'extraction choisis est celui de Qasim Ali *et al.* (2019) (protocole C) qui a été utilisé une combinaison entre deux tampons de lyse SDS et CTAB suivant d'un traitement avec l'ARNase (25mg/ml) pour éliminer les ARN ensuite trois volumes de CAI sont ajoutés avec l'utilisation de 0,5% de 2-β-mercaptoéthanol et 2% de PVP pour purifier l'ADN extrait puis une précipitation d'ADN a été effectuée avec 1/10 volume de NaAc (3.5M) et 2/3 volume d'isopropanol. Le protocole (C) a donné un bon résultat par rapport aux autres protocoles. Où l'ADN isolé à partir de cette méthode est de rendement 1500(ηg/mg), avec un coût d'extraction de 30.869 DA/ échantillon, l'extraction se déroule pendant presque trois heures.

L'intérêt de ce travail est :

- D'optimiser une méthode de préparation des feuilles, cette méthode est très facile, efficace et moins coûteuse, qui permettant de préparer l'échantillon végétale sans l'utilisation de l'azote ;
- De choisir une méthode efficace moins coûteuse permet d'obtenir un ADN de bonne qualité dans un temps réduit ;

Cependant, vu le confinement appliqué à cause de la pandémie de coronavirus, nous n'avons pas pu terminer notre travail. Nous proposons pour la continuité du travail expérimental :

- De continuer et poursuivre ce travail à l'avenir ;
- D'augmenter le nombre des échantillons analysés pour en tirer des conclusions fiables ;
- D'essayer de Mesurer précisément la quantité et la qualité d'ADN extraits, en effectuer un dosage au Nanodrop ;
- D'optimiser la technique CTAB-SDS pour obtenir un ADN plus pure et un rendement plus élevés.

Bibliographie

Bibliographie

1. Abdelkrim R., Djaouida D. 2016. Extraction de l'ADN génomique des plantes. Cas de palmier dattier 5(3):12.
2. Aboul-Maaty N. A. F., Oraby H. A. S. 2019. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. Bulletin of the National Research Centre 43(1):2-10.
3. Agouazi O. 2013. Contribution à la caractérisation physico-chimique de cépages de *Vitis vinifera* ssp *vinifera* autochtones. Mémoire de magister, d'Algérie.
4. Ali Q., Salisu I. B., Raza A., Shahid A. A., Rao A. Q., Husnain T. 2019. A modified protocol for rapid DNA isolation from cotton (*Gossypium* spp.). MethodsX 6:259-264.
5. Amedjkouh H. (2004). Maître de conférences / usthb examinateur. thèse de doctorat, Houari boumediene, Alger, p.126.
6. André C. 1992. Viticulture d'aujourd'hui: 2ème édition, p. 241
7. Arruda S. R., Pereira D. G., Silva-Castro M. M., Brito M. G., Waldschmidt A. M. 2017. An optimized protocol for DNA extraction in plants with a high content of secondary metabolites, based on leaves of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Leguminosae). Genetics and Molecular Research 16(3):2-9
8. Ayoib A., Hashim U., Gopinath S. C. B., Md Arshad M. K. 2017. DNA extraction on bio-chip. History and preeminence over conventional and solid-phase extraction methods. Applied Microbiology and Biotechnology 101(22) : 8077-8088.
9. Bandana S.M., Ahuja P.S. 1999. Isolation and PCR amplification of genomic DNA from market samples of dry tea. Plant Molecular Biology Reporter 17: 171-178
10. Banuls A.L. (s. d.).1994. Analyse génétique d'isolats naturels sud-américains de *Leishmania* montrant de possibles phénomènes de recombinaison. 52.

11. Benbouza H., Baudoin J. P., 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.
12. Blanchard M. M., Nowotny V. 1994. High-throughput rapid yeast DNA extraction. *Genetic Analysis . Biomolecular Engineering* 11(1):7 -11.
13. Bowers J. E., Dangl G. S., Vignani R., Meredith C. P. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39(4):628-633
14. Brodeur J., Toussaint M. 2007. *Biologie moléculaire: Concepts Techniques Applications*. Centre collégial de développement de matériel didactique. Vol. 8. Canada, 331 p. Cantu D., Walker M. A. 2020. *The Grape Genome*. Springer.
15. Cantu D., Walker, M.A. et Chittaranjan K. 2019. *The Grape Genome*. 1er édition. Springer Nature, Switzerland, 385 p.
16. Chaudhry B., Yasmin A., Husnain T., Riazuddin S. (s. d.). 1999. Mini-scale Genomic DNA Extraction from Cotton. 1.
17. Cheng F. S., Brown S. K., Weeden N. F. 1997. A DNA Extraction Protocol from Various Tissues in Woody Species. *HortScience* 32(5):921-922.
18. Clemente M. S., 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.
19. Clemont H., David C., Duquenne P., Meyer A., Nassar N., Rocher M., Suiro A., Touche S. 2007. *Conception des laboratoires d'analyse biologiques (guide)*. Institut national de la recherche et de sécurité : 1er édition, Paris, p.116 .
20. Dabo S. M., Mitchel ED., Melcher U. 1993 . A method for the isolation of nuclear DNA from cotton (*Gossypium*) leaves. *Ann. Biochem.* 210, p. 34–38.
21. De la Cruz M., Ramirez, F., Hernandez H. 1997. DNA Isolation and amplification from Cacti. *Plant Molecular Biology Reporter* 15:319–325.
22. De la Cruz M., Whitkus R.M., Motabravo L. 1995 Tropical tree DNA isolation and amplification. *Molecular Ecology* 4:787–789.

23. Dellaporta J. J., Wood J., Hicks J.B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1(4):19–21.
24. Denis Tagu., Stéphanie Jaubert-Possamai., Agnès Méreau., coord. 2018. *Principe des techniques de biologie moléculaire et génomique : 3ème édition*, Quae, France, p. 47.
25. Doyle J. J., Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin* 19(1):11–15.
26. Doyle J.J., Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
27. Fang, G., Hammer S., Rebecca R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* 13:52–56
28. Fulton T. M., Chunwongse J., Tanksley S.D. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol Biol Rep* 13:207–209
29. Ghaffari S., Hasnaoui N., 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.
30. Guidet F. 1994. A powerful new technique to quickly prepare hundreds of plant extracts for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Research* 22(9):1772 - 1773.
31. Heikrujam, J., Kishor, R., & Mazumder, P. B. (2020). The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols. In *Biochemical Analysis Tools—Methods for Bio-Molecules Studies* (p. 13).
32. Hengen P.N. 1994 Methods and reagents—on the magic of mini preps. *Trends in Biochemical Sciences* 19:182–183.
33. Henry R.J. 2008. *Plant genotyping II: SNP technology*. CAB International, Wallingford, UK, 296 p.
34. Hong Y. K., Kim S. D., Polne-Fuller M., Gibor A. (s. d.). 1995. DNA extraction conditions from *Porphyra perforata* using LiCl.

35. Huang J., Ge X., Sun. M. 2000. Modified CTAB Protocol Using a Silica Matrix for Isolation of Plant Genomic DNA. *BioTechniques* 28(3):432- 434.
36. Inglis P.W., Pappas M..C.R., Resende L.V., 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):0206085.
37. Jobs D.V., Hurley D.L., Thien L.B. 1995. Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. *Taxon* 44(3):379–386.
38. John M. E. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research* 20(9):23-81.
39. Kang H. W., Cho Y.G., Yoon U.H. 1998. A Rapid DNA Extraction Method for RFLP and PCR Analysis from a Single Dry Seed. *Plant Molecular Biology*.
40. Katterman F. R. H., Shattuck V. I. 1983. An Effective Method of DNA Isolation from the Mature Leaves of *Gossypium* Species That Contain Large Amounts of Phenolic Terpenoids and Tannins. *Preparative Biochemistry* 13(4):347-359.
41. Kerboub 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.
42. 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.
43. Kim C. S., Lee C. H., Shin J. S., Chung Y. S., 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):108-1086.
44. Lahiri D. K., Schnabel B. 1993. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: Effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochem Genet* 31:321–328.

45. Lee P.Y., Costumbrado J., Hsu C.Y., Kim Y.H. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* (62):39-23.
46. Lefort F., 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.
47. Lencina K. H., Freitas J. M. B., Essi L., Pimentel N., Bisognin D. A. 2019. Research Article Improved methods for storing and extracting DNA from *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) tissue samples. *Genetics and Molecular Research* 18(3):1-10.
48. Lodhi M.A., Ye G.N., Weeden N.F., 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.
49. Lucas M. S., Carvalho C. D. A. S., Hypolito G. B., Côrtes M. C. 2019. Optimized protocol to isolate high quality genomic DNA from different tissues of a palm species. *Hoehnea* 46(2): 2-10.
50. Maliyakal E.J. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research* 20: 2381.
51. Mary W., Davies H.V., Brennan R.M. 1998. The isolation of genomic DNA from blackcurrant (*ribes nigrum* L.). *Mol Biotechnol* 9:243–246
52. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de pêche et de ruralité . 2005. végétal : VIGNE (*Vitis* sp.), Detection des virus par la technique serologique DAS-ELISA. Laboratoire Nationale de la protection des végétaux. version b, 10 p.
53. Mondragon-Jacobo C., Doudareva N., Bordelon B. P. 2000. DNA Extraction from Several Cacti. *HortScience* 35(6):1124 -1126.
54. Mullis K.B. 1994. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* 262:56–65.
55. Murray M. G., Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8(19):4321–4326.

-
56. National Research Council. 1995. Prudent Practices in the Laboratory: Handling and Disposal of Chemicals. Washington, DC: The National Academies Press.
 57. Palomera-Avalos V., Castro-Félix P., 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.
 58. Paterson A. H., Brubaker C. L., Wendel J. F. 1993. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* 11(2):122-127.
 59. Pich U., Schubert I. 1993. Midiprep method for isolation of DNA from plants with a high content of polyphenolics. *Nucleic Acids Research* 21(14):3328-3330.
 60. Pierre H., 1986. *Biologie et écologie de la vigne*. Ed. Payot, Lausanne. 371 pages.
 61. Pierre Verlhac .2019. Étude et optimisation des cycles de lyophilisation d'une souche probiotique modèle. Thèse de doctorat, Claude Bernard Lyon 1, France, p 222.
 62. Pirttilä A. M., Hirsikorpi M., Kämäräinen T., Jaakola L., Hohtola A. 2001. DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 19(3):273.
 63. Porebski S., Bailey L. G., Baum B. R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep* 15:8–15.
 64. Rether B., Delmas G., Laouedj A. 1993. Isolation of polysaccharide-free DNA from plants. *Plant Mol Biol Rep* 11:333–337.
 65. Reynier A., 2011. *Manuel de viticulture: Guide technique du viticulteur*. Lavoisier TEC & DOC, 11e édition, 592 p.
 66. Rhonda J., Sorbel H.B.W.S., Keim P. and Irvine J.E. 1992 A rapid DNA extraction method for sugarcane and its relatives. *Plant Molecular Biology Reporter* 10: 66–72.

67. Ripoll J., Bon M.C., 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.
68. Rogers S. O., Bendich A. J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology* 5(2):69-76.
69. Rogstad S. H., Keane B., Keiffer C. H., Hebard F., Sisco P. 2001. DNA extraction from plants The use of pectinase. *Plant Molecular Biology Reporter* 19(4):353-359.
70. Rueda J., Linacero R., Vázquez A. M. 1998. Plant Total DNA Extraction. *Molecular Tools for Screening Biodiversity*:10-14.
71. Sangwan R.S., Yadav U., Sangwan N.S.2000. Isolation of genomic DNA from defatted oil seed residue of opium poppy (*Papaver somniferum*). *Plant Molecular Biology Reporter* 18(3):265- 270.
72. Séricourt, L. 2017. Etudes des protéines membranaires TSPO. 358.
73. Sharma H. P. 2012 . Plant tissue culture: totipotency to transgenic. A monthly magazine of agriculture and biological sciences AGROBIOS. Vol. XI. Issue N° 01, p. -8.
74. Shukla R., Sharma D.C., Pathak N.2018.Genomic DNA Isolation from High Polyphenolic Content *Grewia asiatica* L. Leaf Without Using Liquid Nitrogen. *Iran J Sci Technol Trans Sci* 42:347–351.
75. Soni R., Murray A.1994.Isolation of intact DNA and RNA from plant tissues. *Anal Biochem* 218(2):474-6.
76. Steenkamp J., Wiid I., Lournes A., Van Helden P. 1994. Improved method for DNA extraction from *Vitis vinifera*. *American Journal of Enology and Vita culture* 45:102–106.
77. Surzycki S. 2000. General Aspects of DNA Isolation and Purification. In: *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer Lab Manuals. Springer, Berlin, Heidelberg.

78. Tan S.C., Yiap B.C. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009:1–10.
79. Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17(16):6463 -6471.
80. Tel-Zur N., Abbo S., Myslabodski D., Mizrahi Y. (s. d.). 1999. Modified CTAB Procedure for DNA Isolation from Epiphytic Cacti of the Genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). 6.
81. 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.
82. Torregrosa, L. (2014). La sélection de cépages tolérant les maladies : Notions de biologie essentielles en amélioration génétique de la vigne. L'institut Agro Montpellier Sup Agro.
83. Varacallo, M., & Ghannam, M. (2018). Biochemistry, Polymerase Chain Reaction (PCR). StatPearls - Bibliothèque NCBI.
84. Vasiliskov V. A., Shershov V. E., Miftahov R. A., Kuznetsova V. E. Radko S. P., Lisitsa A. V., Lapa S. A., Surzhikov S. A., Timofeev E. N., Zasedatelev A. S., Chudinov A. V. 2020. Slippage of the Primer Strand in the Primer Extension Reaction with Modified 2'-Deoxyuridine Triphosphates. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 46(3):312-314.
85. Walsh P. S., Metzger D. A., Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques* 54(3).
86. Wang X. D., Wang Z. P., Zou Y. P. 1996. An improved procedure for the isolation of nuclear DNA from leaves of wild grapevine dried with silica gel. *Plant Molecular Biology Reporter* 14(4):369-373.
87. Webb D. M., Knapp S. J. 1990. DNA extraction from a previously recalcitrant plant genus. *Plant Molecular Biology Reporter* 8(3):180-185.
88. Weir B. J., St. Pierre R. G., Chibbar R. N. 1996. Isolation of DNA for RAPD analysis from leaves of the saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) and other horticultural crops. *Canadian Journal of Plant Science* 76(4):819-824.

89. Wolff E., Gibert H. 1988. Développements technologiques nouveaux en lyophilisation. *Journal of Food Engineering* 8(2):9-108.
90. Xia Y., Chen F., Du Y., Liu C., Bu G., Xin Y., Liu B. 2019. A modified SDS-based DNA extraction method from raw soybean. *Bioscience Reports* 39(2):1-10.
91. Xin Z., Velten J.P., Oliver M.J., Burke J.J. 2003. High-Throughput DNA Extraction Method Suitable for PCR. *BioTechniques* 34:820–826.
92. Yee W., Kumar J.N, 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.
93. Zidani Sara. 2009. Influence des techniques de sechage sur la solubilité des protéines De la levure *Saccharomyces cerevisiae* produite dans un milieu A base de datte. Thèse de magistère, Université El Hadj Lakhdar Batna, p145.

Webographie

Site Web 1:

El Kantara. (s. d.). El Kantara. Consulté le 15 septembre 2020, à l'adresse <https://www.google.com/maps/place/El+Kantara/@35.2226643,5.6722214,13z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x12f4f85d30a8bac9:0x92ddd5301c6d327d!8m2!3d35.2179519!4d5.7102066>

Site Web 2 :

Algérie. (s. d.). Algérie. Consulté le 15 septembre 2020, à l'adresse <https://www.google.com/maps/place/Alg%C3%A9rie/@27.7998517,-7.3516362,5z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0xd7e8a6a28037bd1:0x7140bee3abd7f8a2!8m2!3d28.033886!4d1.659626>

Site Web 3:

GmbH, B. (s. d.). *Étuve de séchage pour un séchage rapide et précis.* Consulté le 3 septembre 2020, à l'adresse <https://pages.binder-world.com/fr/etuve-de-sechage>

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 μ L à 1000 μ L)	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	Fiocchetti
Thermocycleur pour 96 x 0,2 ml tubes et plaques 96 puits	PRIME (Standard)

- Consommable

- Tubes autoclavés :

A usage unique : microtubes de centrifugation de 1, 5- 2 ml et tubes secs ;

Tubes à vis et tubes coniques.

- Micro cônes stériles (bleus, jaunes et blancs) de : • 1-10 μL • 20-200 μL • 100-1000 μL .

Réactifs utilisés

Produits	Fournisseur
Na ₂ EDTA	BIOCHEM Chemopharma
Tris-HCl	SIGMA life science
NaCl	Honeywell Fluka
Sorbitol	VWR CHEMICALS
Ethanol	Honeywell Riedel-de Haen
PK	SIGMA life science
BET	SIGMA-ALDRICH
Chloroforme	SIGMA-ALDRICH

Annexe 2. Le bleu de chargement est préparé en mélangeant ces produits

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

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

10ml TAE 50X;

490ml H₂O.

Résumés

ملخص

الكرمة نبات معمر ، خشبي وقوي. إنه يمثل تنوعًا وراثيًا كبيرًا مع عدة آلاف من الأصناف المحددة لأنواع *Vitis vinifera*. لتمييز الأنواع المختلفة من خلال طرق البيولوجيا الجزيئية ، نحتاج إلى الحمض النووي النقي بالكمية المناسبة. لكن يصعب استخراج الحمض النووي الجيني من أوراق العنب بسبب وجود الملوثات مثل البوليفينول والسكريات المتعددة والديغ والتي تسبب أيضًا صعوبات في تنقية الحمض النووي. أجرينا في دراستنا مقارنة بين طريقتين لاستخراج الحمض النووي الجينومي (SDS و CTAB) من الأوراق الجافة الفتية لأنواع مختلفة من الكرمة، التي تم جمعها من منطقة القنطرة بولاية بسكرة. لغرض تحديد طريقة بسيطة و سريعة وبتكلفة معقولة قادرة على إنتاج حمض نووي نو مردود جيد. كمية المرود المتحصل عليها (1500 نانو غرام / ملغ) ونقاء الحمض النووي المستخرج من البروتوكول (C) لقاسم علي (2019) مرضيين للغاية مقارنة بالبروتوكولات الأخرى. هذا البروتوكول بسيط نسبيًا وأقل تكلفة (30.869 دج / للعينة). بالإضافة إلى ذلك، فهو سريع ولا يستغرق الكثير من الوقت ، ما يقارب 3 ساعات من التطبيق.

الكلمات الرئيسية: CTAB، SDS ، أوراق الكروم ، استخراج الحمض النووي الجيني.

Résumé

La vigne est une plante pérenne, ligneuse et rustique. Elle présente une grande diversité génétique avec plusieurs milliers de variétés identifiées pour l'espèce *Vitis vinifera*. Pour caractériser les différentes variétés par les méthodes de biologie moléculaires, nous avons besoin un ADN pur et de bonne quantité. L'extraction de l'ADN génomique à partir des feuilles de la vigne est difficile en raison de la présence de contaminants tels que les polyphénols, les polysaccharides et les tanins qui sont également causes des difficultés dans la purification de l'ADN. Dans notre étude nous avons fait une comparaison entre deux méthodes d'extraction d'ADN génomique (SDS et CTAB) à partir des jeunes feuilles sèches de différentes variétés de la vigne, récoltés de la région d'Elkanatra, wilaya de Biskra. Pour un but de déterminer une méthode capable de donner un ADN intègre et de bon rendement, simple, plus rapide et d'un coût raisonnable. Le rendement (1500 ng/mg) ainsi que la pureté de l'ADN génomique extrait par le protocole (C) de Qasim Ali (2019) sont très satisfaisants par rapport aux autres protocoles. Ce protocole est relativement simple et moins couteux (30.869 DA/ échantillon). De plus, il est un peu rapide, ça ne prend pas beaucoup de temps, presque 3h.

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

Abstract

The vine is a perennial, woody and hardy plant. It presents a great genetic diversity with several thousand varieties identified for the *Vitis vinifera* species. To characterize the different varieties by molecular biology methods, we need pure DNA in the right amount. Extraction of genomic DNA from grape leaves is difficult due to the presence of contaminants such as polyphenols, polysaccharides and tannins which also cause difficulties in DNA purification. In our study we made a comparison between two methods of genomic DNA extraction (SDS and CTAB) from young dry leaves of different varieties of the vine, harvested from the region of El Kanatra, wilaya of Biskra. For the purpose of determining a method capable of yielding DNA with integrity and good yield, simple, faster and at reasonable cost. The yield (1500 ng / mg) as well as the purity of the genomic DNA extracted by the protocol (C) of Qasim Ali (2019) are very satisfactory compared to the other protocols. This relatively simple and less expensive protocol 30.869 DA / sample. In addition, it is a little fast, it does not take a lot of time, almost 3 hours.

Keywords: SDS, CTAB, grapevine leaves, genomic DNA extraction.