



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

MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Ghania BRINIS et Yousra DRIHEM

Le : 01/10/2020

Thème :
**Mise au point d'un protocole d'extraction
d'ADN génomique à partir des feuilles
lyophilisées de la vigne**

Jury

Mme. Asma MEDDOUR	MAA Université de Biskra	Président
Mme. Rima RECHID	MAA Université de Biskra	Examinateur
Mlle. Hanane ACHOUR	MAA Université de Biskra	Rapporteur

Année universitaire : 2019 – 2020

Remerciements

Notre remerciements les plus sincères s'adressent à Allah qui nous aide et grâce à lui nous avons accordé la chance de réaliser ce travail.

Nous dirigeons un grand remerciement à notre encadreur ACHOUR Hanane de nous avoir encadré, orienté et aidé ; aussi grâce à sa patience, ses bons conseils et sans leur orientation notre travail n'aurait pas été possible.

Nous adresse mes sincères remerciements à tous les ingénieurs de laboratoire d'El-Hadjeb surtout madame Sara, sans oublier les équipes de Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides-Biskra (CRSTRA).

Dédicace

Je dédie ce modeste travail,

A ma chère mère Louiza et mon cher père Abdelaziz pour son amour, son soutien et pour sa confiance, patience et l'encouragement qu'ils m'ont donné tout au long de ma carrière académique et jusqu'à atteindre mon intérêt. Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte à mes parents.

A mes chères frères Sami, El-Arkam et mes sœurs Ikram et Nour.

A mon cher fiancé Riadh et sa famille pour ta compréhension, et ta patience.

A ma camarade et ma sœur Ghania.

A tous mes amies Houda, Aicha, Khawla, Mofida, Hadjer qui m'ont toujours encouragé.

A tous ceux qui m'ont soutient de réaliser mon travail.

Yousra

Dédicace

Je dédie ce modeste travail,

A ma chère mère Dalila et mon cher père Mohamed Salah, pour son soutien et encouragement qu'ils m'ont donné tout au long de ma carrière académique et de l'atteinte mon intérêt, pour ses confiances, patience et compréhension.

Les mots ne parviennent pas à vous remercier, à vous décrire à quel point je suis fier de vous deux.

A mes frères, Khaled et chère femme Selma, Riadh et sœur Djahida
Et jumeaux d'âme Imad et Chaima.

A ma chère camarade Yousra.

A ma cousine Khalissa et mon cousin Noujoud.

A mes chers Bouchra et Kenza, qui m'ont toujours encouragé.

A mes aimes Houda, Aicha, Khaoula, Haïfa, Hanane, Samah, Nessrine, Wafa et Racha.

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

Ghania

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Sommaire

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

Première Partie: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. GENERALITES SUR LA VIGNE

1.1. Viticulture en Algérie	3
1.2. Taxonomie de la vigne.....	3
1.3. Morphologie de la vigne	4

Chapitre 2. EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE

2.1. Généralité sur le génome de la vigne.....	6
2.2. Principe de la lyophilisation.....	6
2.3. Extraction d'ADN génomique	7
2.4. Différentes méthodes d'extraction d'ADN génomique	7
2.4.1. Méthode conventionnelle (SDS)	7
2.4.2. Méthodes des kits	7
2.5. Différentes techniques d'analyse d'ADN	8
2.5.1. Analyse de la concentration d'ADN par spectrophotomètre	8
2.5.2. Analyse par migration électrophorétique sur gel d'agarose.....	8
2.5.3. La PCR.....	9

Deuxième partie : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Stratégie de travail.....	11
3.2. Matériel biologique.....	13
3.3. Méthodes de travail	13
3.3.1. Préparation de l'échantillon	13

3.3.1.1. Séchage à l'étuve ventilée (séchage à chaud)	14
3.3.1.2. Séchage à lyophilisateur (séchage à froid)	14
3.3.1.3. Conservation dans le gel de silice.....	15
3.3.1.4. Broyage des échantillons.....	17
3.3.2. Préparation des réactifs	20
3.3.2.1. Réactifs chimiques et éléments de sécurité	21
3.3.2.2. Elimination des déchets.....	24
3.3.3. Extraction d'ADN génomique.....	24
3.3.3.1. Protocole avant l'optimisation (protocole de référence).....	24
3.3.3.2. Protocole après l'optimisation	25
A. Paramètres optimisés.....	25
B. Protocoles optimisés.....	27
3.3.4. Evaluation de la qualité et la quantité d'ADN extrait.....	30
3.3.4.1. Détermination de la concentration et de la pureté d'ADN extrait	30
3.3.4.2. Evaluation de l'intégrité d'ADN..	31
A. Préparation de l'échantillon.....	32
B. Préparation de gel d'agarose (0,8%).....	32
C. Migration électrophorétique et visualisation des fragments d'ADN.....	33
3.3.4.3. L'amplification par PCR	33
A. Conditions d'amplification.....	33
B. préparation du mélange réactionnel pour PCR.....	34
C. Déroulement de la PCR dans le thermocycleur	34
D. Vérification des résultats de la PCR	35

Chapitre 4.RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Résultats.....	36
4.1.1. Profil électrophorétique de l'ADN extrait par le protocole (0).....	36
4.1.2. Profil électrophorétique de l'ADN extrait par le protocole (01).....	37
4.2. Discussion analytique	39
4.2.1. Caractéristiques et particularités des échantillons étudiés	39
4.2.1.1. Choix des feuilles par rapport aux autres tissus.....	39
4.2.1.2. Séchage et conservation des feuilles.....	39
4.2.2. Analyse des protocoles appliqués.....	40
4.2.2.1. Technique de référence	40

4.2.2.2. Protocoles optimisés	44
4.2.2.3. Évaluation de la rapidité, la simplicité et le coût de protocole optimisé	46
4.2.3. Les difficultés retrouvées au niveau le laboratoire.....	48
Conclusion et perspectives.....	49
Bibliographie.....	51

Annexes

Résumés

Liste des Tableaux

Tableau 1. Caractéristiques principales des échantillons	19
Tableau 2. Solutions préparé pour l'extraction d'ADN génomique	21
Tableau 3. Réactifs utilisées et leurs éléments de sécurité	22
Tableau 4. Paramètres testés pour les étapes importantes de l'extraction de l'ADN en références au protocole de Meru et al.et le protocole optimisé	26
Tableau 5. Les couples d'amorces choisies et la longueur du fragment obtenu avec quelques paramètres associés	34
Tableau 6. Les étapes de PCR et condition d'amplification	35
Tableau 7. Evaluation des protocoles en termes de rapidité	46
Tableau 8. Etude de cout de l'extraction d'ADN génomique pour un échantillon par le protocole (3) et le protocole avant optimisation (0)	47

Liste des Figures

Figure 1. Caractéristiques morphologiques d'une feuille de vigne.....	5
Figure 2. Illustration schématiques des différentes étapes d'extraction et d'analyse d'ADN.	12
Figure 3. Récolte des feuilles.	13
Figure 4. Différentes étapes de séchage à l'étuve ventilée.....	14
Figure 5. Différentes étapes de séchage à lyophilisateur.....	15
Figure 6. Conservation des feuilles séchées dans le gel de silice.....	16
Figure 7. Réactivation du gel de silice.....	17
Figure 8. Broyage et conservation des échantillons.	18
Figure 9. Différentes étapes d'extraction d'ADN génomique de protocole 2	28
Figure 10. Différentes étapes optimisées d'extraction d'ADN génomique de protocole 3.	29
Figure 11. Dispositif schématique du montage d'électrophorèse.....	31
Figure 12. Profil électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application de protocole de Meru et al., (P0).....	37
Figure 13. Profil électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application de Protocol de Meru et al., 2013 (P1)..	38

Liste des abréviations

- A : Absorbance.
- ADN : Acide désoxyribonucléique.
- ARN : Acide ribonucléique.
- BET : Bromure d'éthidium.
- DA : Dinar algérien.
- DO : Densité optique.
- EDTA : Éthylène diamine tétra acétique.
- NaCl : Chlorure de sodium.
- NaAc : Acétate de sodium.
- Pb : Paire de base.
- PCR : Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction).
- PVP : Polyvinyle pyrrolidone.
- PK : Protéinase K.
- R : Ratio.
- SDS : Dodécylsulfate De Sodium.
- TAE : Tris-base / Acide acétique glacial / Éthylène diamine tétra acétique.
- TBE : Tris, Borate, Éthylène diamine tétra acétique.
- TE : Tris Éthylène diamine tétra acétique.
- Tris\HCL : Trizma hydrochloride.
- U.V : Ultraviolet.

Introduction générale

Introduction générale

L'histoire de la vigne accompagne depuis longtemps celle de l'homme. La plus ancienne fossile connue d'une feuille de vigne existe en Sorbonne, qui a été attribuée à 65 millions d'années. D'autres fossiles de l'ère tertiaire et quaternaire ont été trouvés en Europe, en Amérique du nord et même au Japon. Ainsi, il est admis que le passage de la vigne sauvage à la vigne cultivée a eu lieu autour de 6000 ans avant J.C. (Agouazi, 2013). La vigne possède de grandes facultés d'adaptation aux conditions pédoclimatiques. Elle est cultivée dans les régions chaudes et également sous des climats relativement froids (Reynier, 1989 ; Galet, 1998). Leur domestication la plus ancienne est située dans les régions de Caucase, puis grâce à la migration des populations humaines, la viticulture s'est dispersée et répandue progressivement sur l'ensemble de pourtour méditerranéen puis vers d'autres régions du globe (Blanc, 2012).

Au plan mondial, la vigne est l'une des espèces fruitières les plus cultivées dans le monde en termes de surface et de valeur économiques (Agouazi, 2013).

L'identification génétique de différentes espèces et variétés de la vigne basée sur des techniques de biologie moléculaire, ces techniques nécessitent une étape primordiale qui est l'extraction d'ADN. La qualité et quantité d'ADN extrait dépend à l'efficacité des méthodes d'extraction et de purification utilisées et les tissus choisis à cause de la présence des métabolites secondaires qui influence sur le rendement et la qualité d'ADN et peuvent inhiber la PCR. Il existe plusieurs méthodes d'extraction d'ADN génomique parmi lesquelles la méthode SDS qui donne un faible rendement.

Pour cela, l'objectif de notre étude est l'optimisation d'un protocole d'extraction d'ADN génomique qui basé sur la méthode SDS, par des modifications au niveau de leur différentes étapes à partir des jeunes feuilles déshydratées et conservées pendant quelques mois à température ambiante, afin d'obtenir un protocole efficace, rapide, moins couteux et réalisable selon la disponibilité des réactifs et des appareils au niveau de notre laboratoire, et il permet d'obtenir un ADN extrait hautement pur et meilleur rendement.

Pour réaliser notre travail, nous avons suivi deux parties :

La première partie est la synthèse bibliographique divisée en deux chapitres ; généralités sur la vigne, ce chapitre va présenter la viticulture en Algérie, taxonomie de la vigne et leur

morphologie. Le deuxième chapitre va consacrer sur le génome de la vigne, la lyophilisation, les différentes méthodes d'extraction et d'analyses d'ADN génomique.

La deuxième partie expérimentale, va porter deux chapitres « Matériel et Méthodes » dont lequel nous allons expliquer la stratégie de travail, les différentes méthodes de séchage des feuilles, la préparation des réactifs puis les protocoles appliqués et les méthodes d'analyse d'ADN extrait ; enfin nous allons présenter la PCR classique qui va utiliser pour l'estimer la qualité d'ADN extrait. Le deuxième chapitre « Résultats et discussions », dans ce chapitre, nous allons mettre les résultats des profils électrophorétiques des protocoles appliquées, et nous allons faire une discussion analytique de toutes les modifications apportées sur le protocole d'extraction et leurs efficacités.

Première Partie

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1
GENERALITES
SUR
LA VIGNE

1.1. Viticulture en Algérie

Le mot viticulture signifie la culture de la vigne sous toutes ses formes. L'étude de l'histoire et de l'évolution de la viticulture n'est pas nouvelle, de nombreux spécialistes documenter l'histoire de la culture de vigne (Limier, 2016).

La vigne est une des cultures les plus anciennes de l'Afrique du Nord et de l'Algérie en particulier (Belaid, 2017). La viticulture algérienne connaît deux grandes époques : la première période est l'antique, Phénicien puis Romain. La deuxième, plus longue et plus marquante c'est date de la colonisation française, suite à la guerre d'Alger (1830) (Caid et *al.*, 2019).

Après l'indépendance, dans les années 70 le gouvernement a changé la viticulture par d'autres cultures comme maraichères, les fourrages et l'arboriculture (Sebki, 2014).

L'Algérie présente une richesse en ressources génétiques dans le domaine de la viticulture, elle est constituée de nombreuses variétés autochtones, grâce aux populations naturelles isolées de la vigne sauvage (les zones côtières, les zones de plaines, les zones de montagne, les zones steppiques et les zones sahariennes) (Sebki, 2014). Ces vignes sont conservées jusqu'à nos jours, elles croissent abondamment le long de la corniche de Bejaia, Jijel...etc (Benabderabou, 1971).

Le développement du vignoble algérien et le reflet fidèle de l'histoire de ce pay, il est lié à la situation géographique et au brassage des populations et des civilisations (Benabderabou, 1971). Actuellement, la viticulture dans l'Algérie constitue 4^{ème} culture pérenne sur plan de surface et représente 2^{ème} poste à l'exportation (Agouazi, 2013).

1.2. Taxonomie de la vigne

La vigne est une plante sarmenteuse, vivace, pérenne, appartient à la famille des Vitacées ou Ampélidacées (Reynier, 2007). Cette famille est caractérisée par des tiges le plus souvent sarmenteuses et grimpantes, avec des vrilles opposées aux feuilles (Alain, 2012).

Elle est cultivée ou spontanée, diploïdes, des phanérogames (végétaux ayant des fleurs), et appartient des angiospermes (ovules toujours cachés dans un ovaire) de la classe de dicotylédones (Reynier, 2007). Elle compte 19 genres, parmi lesquels, seul le genre *Vitis* qui est utilisé en agriculture pour ces fruits (Galet, 2000 ; Camps, 2008).

Le genre *Vitis* comporte plus de 70 espèces et il est divisé en deux sous genres, *Muscadinia* ($2n = 40$) et *Vitis* anciennement appelé *Euvinis* ($2n = 38$) qui se distinguent en fonction des caractéristiques anatomiques, cytologiques et morphologiques (Camps, 2008 ; Limier, 2016).

À l'intérieur d'*Euvinis*, on distingue trois groupes : un groupe eurasiatique, un groupe asiatique et un groupe américain (Hichri, 2009).

Selon la classification de (Simon et *al.*, 1992) :

Règne : Végétale

Embranchement : Phanérogames

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Rhamnales

Famille : Vitacées

Genre : *Vitis*

Espèce : *Vitis vinifera*

1.3. Morphologie de la vigne

La vigne, comme toute plante, développe un système racinaire qui colonise le sol et le sous-sol tout au long de sa vie et un système aérien, formé d'un tronc qui se divise en bras ou cornes et en bois de taille qui peuvent être longs ou courts. Ces bois appelés sarments portent des yeux ou ensemble de bourgeons qui donneront naissance à des rameaux feuillés, fructifères ou non (Bounab, 2014). Les troncs et les nombreux bras des souches, courant sur le sol ou grimpant aux arbres, peuvent mesurer plusieurs mètres (Agouazi, 2013).

Les feuilles de la vigne sont caduques. Sur les plantes adultes, ces feuilles sont en position alterne et opposée. Elles sont assez petites, entières ou lobées, avec un sinus pétiolaire bien ouvert (Agouazi, 2013). Chaque feuille est constituée de deux parties : le pétiole et le limbe où s'insère cinq nervures principales, un sinus pétiolaire et deux sinus latéraux de chaque côté de limbe (Sebki, 2014). Le pétiole donne naissance à 5 branches qui forment les nervures principales des 5 lobes principaux de la famille de vigne (voir la figure 01) (Hansse, 2019).

La forme des feuilles, ces découpures (sinus) et les poils (villosités) sont des caractéristiques variétales et permettent d'identifier les vignes (Sebki, 2014).

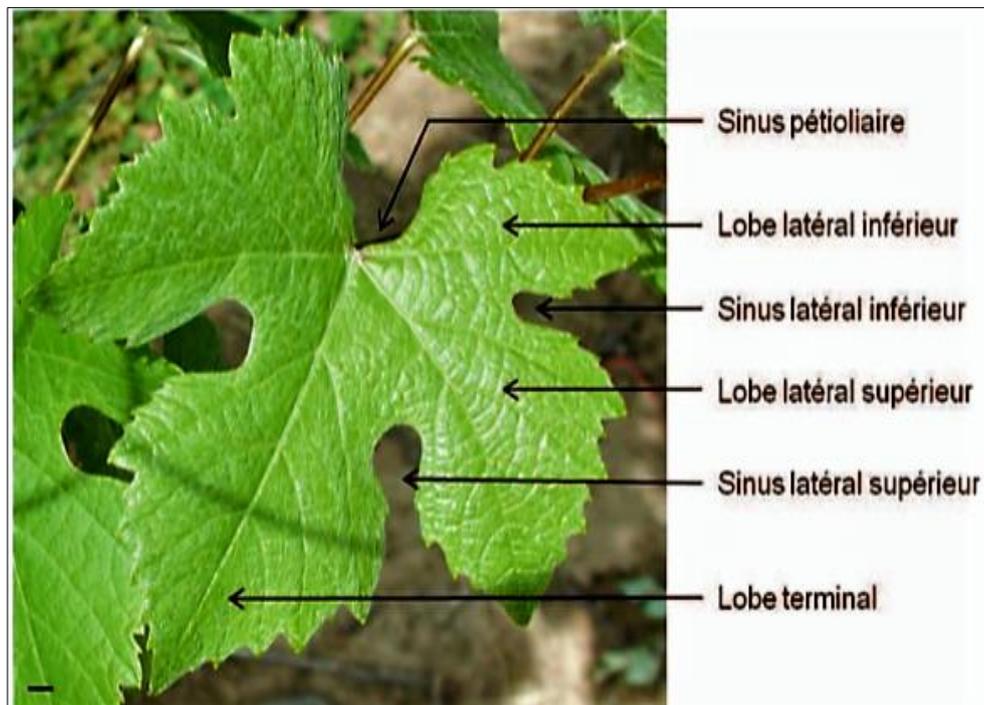


Figure 01. Caractéristiques morphologiques d'une feuille de vigne selon Romon (2013).

CHAPITRE 2

EXTRACTION DE

L'ADN

GENOMIQUE

2.1. Généralité sur le génome de la vigne

La vigne est la quatrième plante dont le génome a été entièrement décrypté, après l'arabette, le riz et le peuplier (Blanc, 2012 ; Fodor, 2013).

La vigne est une espèce diploïde, elle est composée de 19 paires de chromosomes ($2n=38$) (Carrier, 2011 ; Fodor, 2013). Dont la taille du génome est estimée à 487 millions de bases (Mb) (Duchene, 2015). Cette espèce est très hétérozygote ($He = 0,74$), caractérisée par une diversité génétique importante (Fodor, 2013).

2.2. Principe de la lyophilisation

La lyophilisation est un procédé discontinu, lent et mis au service de l'industrie pharmaceutique depuis 1930 pour améliorer la conservation d'un produit (Thorne, 2015). La lyophilisation permet d'obtenir des produits de la meilleure qualité par rapport à produit séchés avec des méthodes traditionnelles (Kunal et *al.*, 2015).

La lyophilisation est une opération de déshydratation à basse température et à basse pression qui consiste à éliminer principalement par sublimation la majeure partie de l'eau contenue dans un produit (Eni, 2011). L'absence d'eau permet sa conservation et sa stabilité dans le long terme (Thorne, 2015). Par l'abaissement de l'activité de l'eau, vitesses de réactions chimiques ou biochimiques peuvent alors être fortement ralenties (Eni, 2011). Parmi les techniques à froid ; la lyophilisation permet de conserver le volume, l'aspect (forme final) et les propriétés du produit (Thorne, 2015).

Le procédé de lyophilisation est composé de trois étapes principales, successives et indissociables :

- la congélation : consiste à diminuer la température de celui-ci à une valeur comprise entre -10 C° et -80 C° qui transforme l'eau libre en cristaux de glace (Eni, 2011 ; Thorne, 2015) ;
- la dessiccation primaire (sublimation) : c'est un changement d'état au cours duquel un corps passe directement de l'état solide à l'état gazeux sans passage par l'état liquide, sous un vide. Elle consiste à sublimer les cristaux de glace formée. Elle est la plus longue des trois étapes de la lyophilisation (Desage, 2009 ; Eni, 2011 ; Kunal, 2015) ;
- la dessiccation secondaire (désorption) : une fois que la lyophilisation primaire est terminée et que toute la glace s'est sublimée, l'humidité liée est toujours présente dans le produit. Donc cette étape permet d'éliminer l'eau liée et non congelée adsorbée à la

surface des pores de la matière sèche ou incluse dans la masse du lyophilisat. Pour l'objectif de réduire l'humidité résiduelle à un niveau de l'ordre de 3 à 1 % pour augmenter la durée de conservation à long terme (Thorne, 2015 ; Kunal, 2015 ; Eni, 2011). La désorption est la raison principale de l'utilisation de la lyophilisation, car justement on peut atteindre une très bonne qualité du produit (Desage, 2009).

2.3. Extraction d'ADN génomique

L'extraction et l'isolement de l'ADN génomique intact est une étape essentielle dans différentes applications de la biologie moléculaire (Abdellaoui, 2012). Leur objectif est d'isoler la molécule d'ADN de toute autre molécule organique, et d'en obtenir une quantité suffisante et de pureté satisfaisante pour permettre toutes les manipulations postérieures de biologie moléculaire (Ben larbi et *al.*, 2010).

L'extraction de l'ADN passe par trois étapes clés :

- la lyse des cellules ;
- dénaturation et élimination de toutes macromolécules autres que l'ADN ;
- précipitation et récupération de l'ADN.

2.4. Différentes méthodes d'extraction d'ADN génomique

2.4.1. Méthode conventionnelle (SDS)

Les méthodes classiques sont des méthodes manuelles qui assurent l'isolement de l'ADN par l'utilisation de solutions chimiques de différentes concentrations et/ou l'introduction d'éléments qui facilitent l'isolement de l'ADN (Ben larbi et *al.*, 2010).

La plupart des protocoles d'extraction d'ADN tissulaire utilisent un détergent SDS (Dodécyl sulfate de sodium), puisque leur utilisation aide à digérer la membrane cellulaire et libérer plus d'acides nucléiques au cours de la lyse cellulaire. Il a également la propriété de perturber les interactions acide nucléique / protéine, en séparant les protéines des acides nucléiques (Barbier et *al.*, 2019 ; André et *al.*, 2018).

Il y a la possibilité d'adapter les protocoles pour extraire l'ADN plus rapidement, sans toutefois perdre la qualité de l'échantillon (André et *al.*, 2018).

2.4.2. Méthodes des kits

En laboratoire, les méthodes traditionnelles d'extraction de l'ADN génomique sont remplacées par les kits commerciaux (Holzapfel, 2018). Un kit d'extraction est un paquet commercialisé qui contient tous les réactifs prêt à l'emploi et / ou matériels permettant de

réaliser l'extraction de l'ADN de façon rapide (Ben larbi et *al.*, 2010). L'extraction de l'ADN par le kit se caractérise par la reproductivité et l'absence de l'utilisation des solvants toxiques (Benedit et *al.*, 2018). Cependant, ils sont souvent coûteux, ce qui empêche leur utilisation.

Les kits trouvés aujourd'hui sur marché sont spécifiques à l'espèce ou au type de l'organisme étudié, au type de source de l'ADN, au type d'acides nucléique qu'on veut extraire et la méthode d'extraction (kits manuelles et kits pour les extracteurs automatiques qui contiennent juste les tampons de lyse d'éluion) (Ben larbi et *al.*, 2010).

2.5. Différentes techniques d'analyse d'ADN

2.5.1. Analyse de la concentration d'ADN par spectrophotomètre

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution.

L'absorbance maximale des acides nucléiques est fixée à 260 nm, tandis que l'absorbance maximale de solutions à base de protéines est de 280 nm (Ben larbi et *al.*, 2010). La mesure du rapport de DO $_{260/280}$ permet donc de contrôler la pureté des échantillons d'ADN obtenus en évaluant la présence de contaminants (solvants organiques, ARN, protéines résiduelles) dans la solution d'ADN.

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

2.5.2. Analyse par migration électrophorétique sur gel d'agarose

La migration sur gel d'agarose permet d'évaluer l'intégrité de l'ADN. Elle consiste à séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille. L'ADN étant chargé négativement va migrer dans le gel soumis à un champ électrique vers le pôle positif (anode). Il est visualisé sous forme de bandes colorées, grâce au bromure d'éthidium (BET) sous illumination par UV (Tellaa, 2013).

L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité de l'ADN linéaire. Cette méthode peut être utilisée pour obtenir une estimation de la quantité d'ADN dans les échantillons.

2.5.3. La PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est fondée sur une réaction enzymatique *in vitro* permettant d'amplifier plusieurs millions de fois des séquences d'ADN génomique, on utilisant des amorces nucléotidiques. L'incorporation de désoxyribonucléotides libres grâce à une enzyme ADN polymérase thermostable. Des variations cycliques de températures vont permettre successivement la dénaturation de l'ADN, l'hybridation des amorces et leur extension par l'ADN polymérase (Zafrani et *al.*, 2019).

La réaction de polymérisation en chaîne est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend :

- **L'acide désoxyribonucléique contenant le fragment à amplifier**

Avant la réaction de PCR, l'ADN est extrait à partir de l'échantillon que l'on veut analyser. Puis, cet extrait purifié, contenant le fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier, peut être utilisé en PCR (Tellaa, 2013).

- **Les amorces (primers)**

Ce sont des oligonucléotides d'une taille comprise entre 17 Pb et 30 Pb (Tellaa, 2013). Capables de s'hybrider de façon spécifique, par complémentarité des bases, sur l'un des deux brins d'ADN. Les amorces encadrent la séquence d'intérêt, et l'allongement se fait dans des directions opposées (Goossens, 1990). Ils possèdent une composition globale de 50 % [G+C] (Tellaa, 2013). De plus, Les amorces sont en très forte concentration par rapport à celle de l'ADN à amplifier (Reddahi, 2017). Leur choix est très important, ils déterminent les caractéristiques de l'ADN amplifié (longueur, spécificité et nature) (Onnier, 1999).

- **L'enzyme, *Taq* polymérase**

Cette enzyme a été purifiée à partir d'une bactérie vivante *Thermus Aquaticus* (*Taq*), il s'agit d'une ADN polymérase ADN-dépendante, thermorésistante et possédant une activité exonucléase 5'→3' (Tellaa, 2013), permettant la synthèse des nouveaux brins d'ADN lors de l'amplification (Onnier, 1999).

- **Les Désoxyribonucléotides-Tri-Phosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)**

Les dNTP (Désoxyribonucléotides-Tri-Phosphates) sont des molécules de base, qui constituent l'ADN, seront assemblés par la *Taq*-polymérase et formeront le brin d'ADN complémentaire (Tellaa, 2013).

- **Un tampon**

Le tampon 10X est souvent utilisé, il contient en général du Tris-Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 (15mM), pH8 (Onnier, 1999).

- **MgCl_2**

Ce cation est un cofacteur indispensable au bon fonctionnement de la polymérase et à l'incorporation des précurseurs. Il doit être apporté en concentration précises sous forme de MgCl_2 (Tellaa, 2013). La présence dans le milieu réactionnel des cations bivalents Mg^{2+} et de cations monovalents (K^+ ou NH_4^+) vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN /ADN (Benaissa, 2008).

Deuxième Partie
PARTIE
EXPERIMENTALE

CHAPITRE 3

MATERIEL

ET METHODES

3.1. Stratégie de travail

Notre étude a été réalisée sur six variétés locales de la vigne. Nous avons commencé par la récolte des jeunes feuilles non infectées à partir de différentes régions d'EL-KANTARA wilaya de BISKRA. Ensuite, le séchage des feuilles a été effectué par deux méthodes, l'un dans l'étuve ventilée et l'autre à lyophilisateur. Puis, elles sont conservées de la même façon pendant cinq mois (d'Octobre à Mars) en présence de gel de silice à température ambiante.

Après la préparation des échantillons, nous avons fait l'extraction d'ADN génomique qui basé sur la méthode SDS. Cette extraction débute par la lyse cellulaire, suivi par la purification qui permet d'éliminer les contaminants (lipides, protéines, les métabolites secondaires) et enfin la précipitation pour regrouper les molécules d'ADN. Puis, nous avons optimisé le protocole qui basé sur la méthode SDS par des modifications de quelques étapes et réactifs utilisées.

Après l'obtention d'ADN, nous avons vérifié leur qualité et déterminer leur quantité, pour cela l'intégrité de l'ADN a été évaluée par une migration électrophorétique sur un gel d'agarose 0.8% après coloration au BET et visualisation des bandes sous U.V. La concentration d'ADN a été déterminée par un dosage spectrophotométrique.

Enfin, une PCR classique a été lancé pour estimer et confirmer la qualité d'ADN extrait.

Nous avons illustré la stratégie de travail dans la figure ci-dessous :

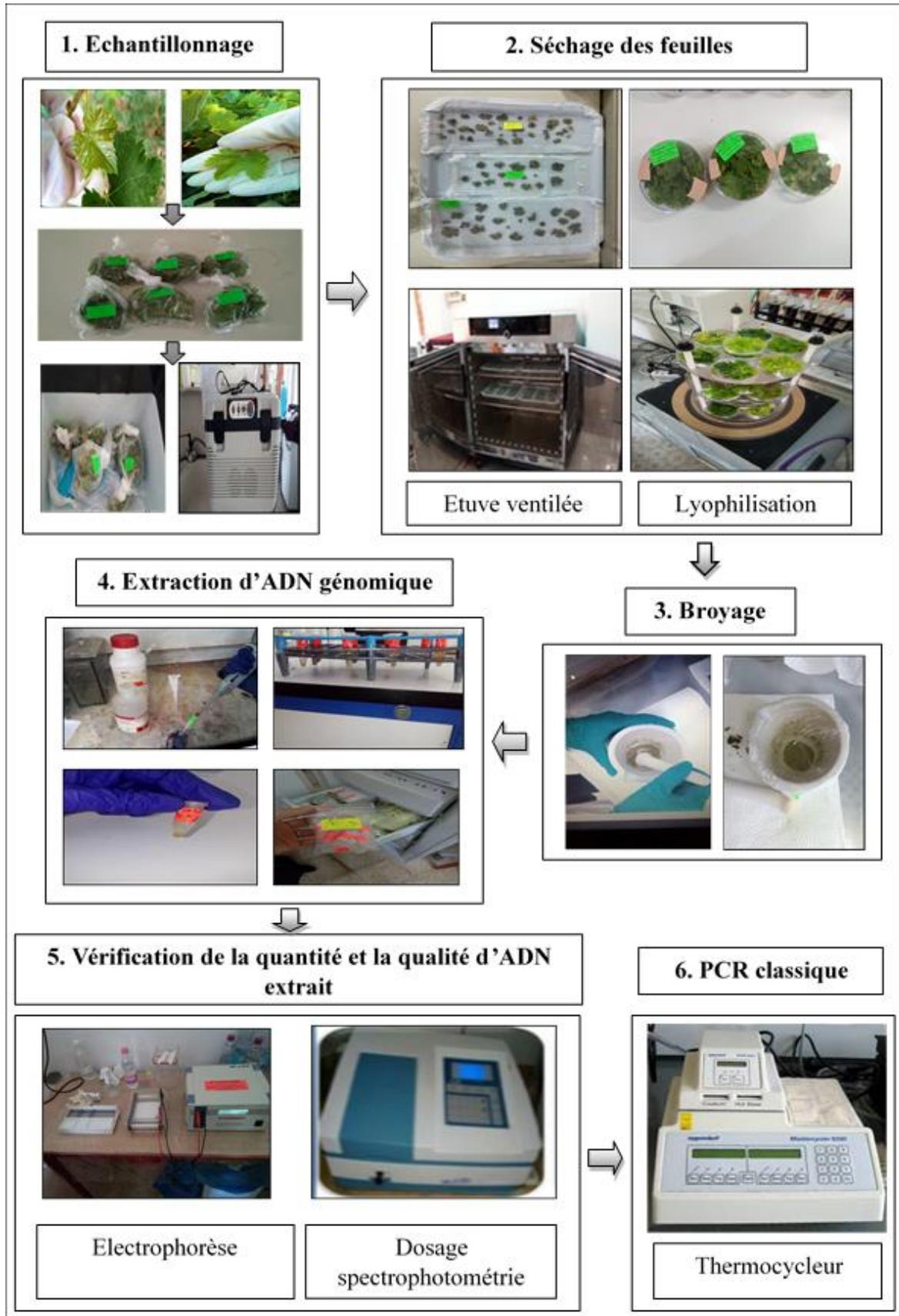


Figure 02. Illustration schématique des différentes étapes d'extraction et d'analyses d'ADN.

3.2. Matériel biologique

La présente étude a été réalisée sur six variétés locales différentes de la vigne qui sont : Eljbel, Datti, Cimbark, Chamrakha, Souikia, Lkahla.

La récolte a été effectuée dans deux périodes. La première période qui a été en mois d'Octobre 2019, 10 jusqu'à le 13. Et la deuxième qui a été en moins de Mars 2020, à partir la commune d'El-Kantara (Wilaya de Biskra).

Le site d'études situées dans le sud-ouest des Aurès, à 52 kilomètres au nord de Biskra et à 62 kilomètres au sud-ouest de Batna (Moussi et *al.*, 2019).

Nous avons fait l'échantillonnage des feuilles par des gants (pour éviter la contamination).

Ensuite, nous avons mis les échantillons dans des sachets en plastique et doit être étiquetées et ils sont transportés dans une glacière (+4) au notre laboratoire (voir la figure 03).



Figure 03. Récolte des feuilles.

3.3. Méthodes de travail

3.3.1. Préparation de l'échantillon

Au début de préparation, nous avons fait le nettoyage du paillasse avec l'eau de javel et désinfecté le matériel de prélèvement par l'éthanol 70%. Puis, nous avons nettoyé les feuilles par l'eau distillée, afin d'éliminer toutes les traces des poussières, insectes ...etc, en éliminant les parties desséchées. Enfin nous avons éliminé l'excès d'eau à l'aide d'un papier absorbant. Lorsqu'on a plusieurs échantillons il faut nettoyer le paillasse à chaque fois entre les échantillons par l'eau de javel. Ensuite nous avons fait le séchage de ces feuilles par deux méthodes (étuve ventilée et lyophilisation).

3.3.1.1. Séchage à l'étuve ventilée (séchage à chaud)

Cette méthode déroule comme suit :

- nettoyer bien les plateaux de l'étuve par l'eau de javel et laisse sécher ;
- mettre les feuilles sur les plateaux et séparer entre les variétés ;
- recouvrir les feuilles par des compresses stériles et scotcher bien ;
- étiqueter les variétés ;
- régler l'étuve ventilée à 27 C° pendant 5 jours (Benbouza et *al.*, 2006) ;
- placer les plateaux à l'étuve ventilée (voir la figure 04).

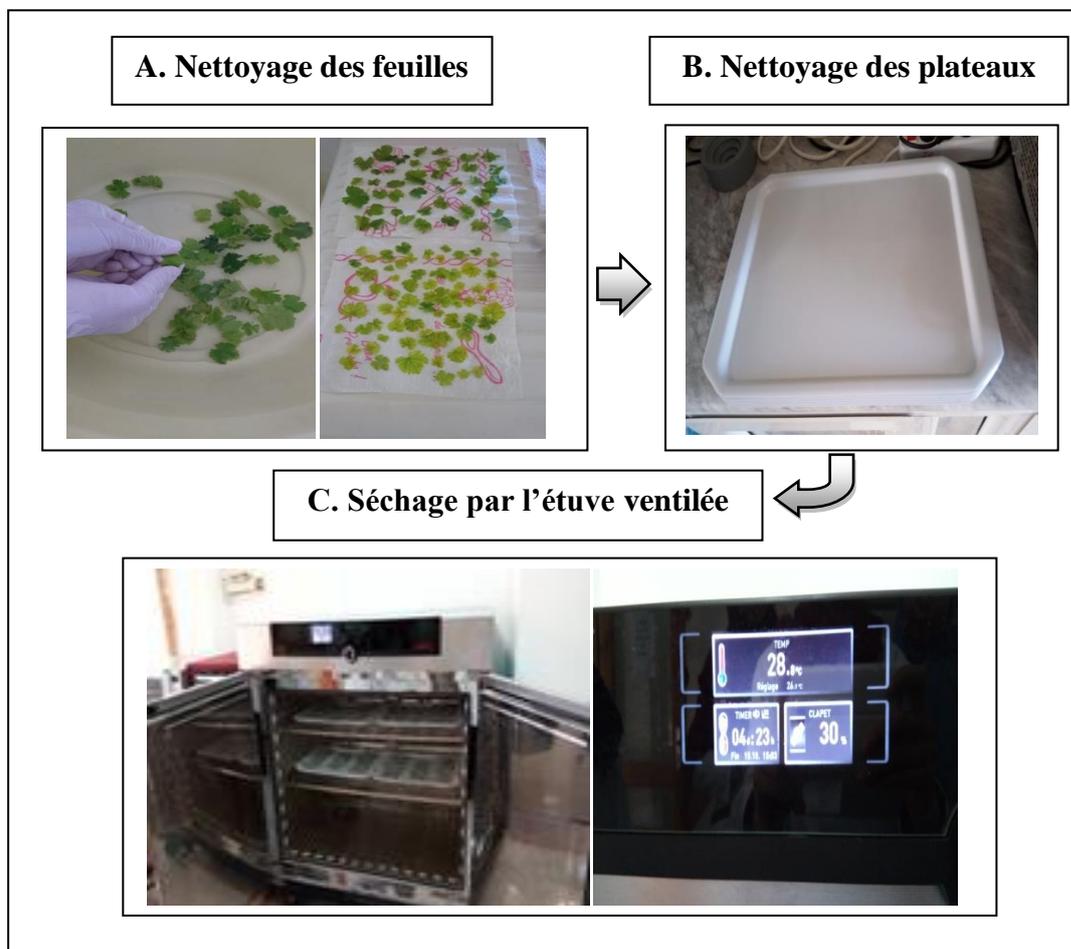


Figure 04. Différentes étapes de séchage à l'étuve ventilée.

3.3.1.2. Séchage à lyophilisateur (séchage à froid)

Cette méthode comporte trois étapes : la congélation, la dessiccation primaire et dessiccation secondaire. Nous avons mis les échantillons dans des boîtes pétries stériles ; Ensuite nous avons complété comme suit :

- étiqueter les boîtes ;
- placer les boîtes au congélateur à 25 C° pendant 24h ;
- régler lyophilisateur à température -100 C° et pression entre 1000 et 1277 mbar pendant deux jours ;
- placer les échantillons sur les étages superposés du lyophilisateur (voir la figure 05).

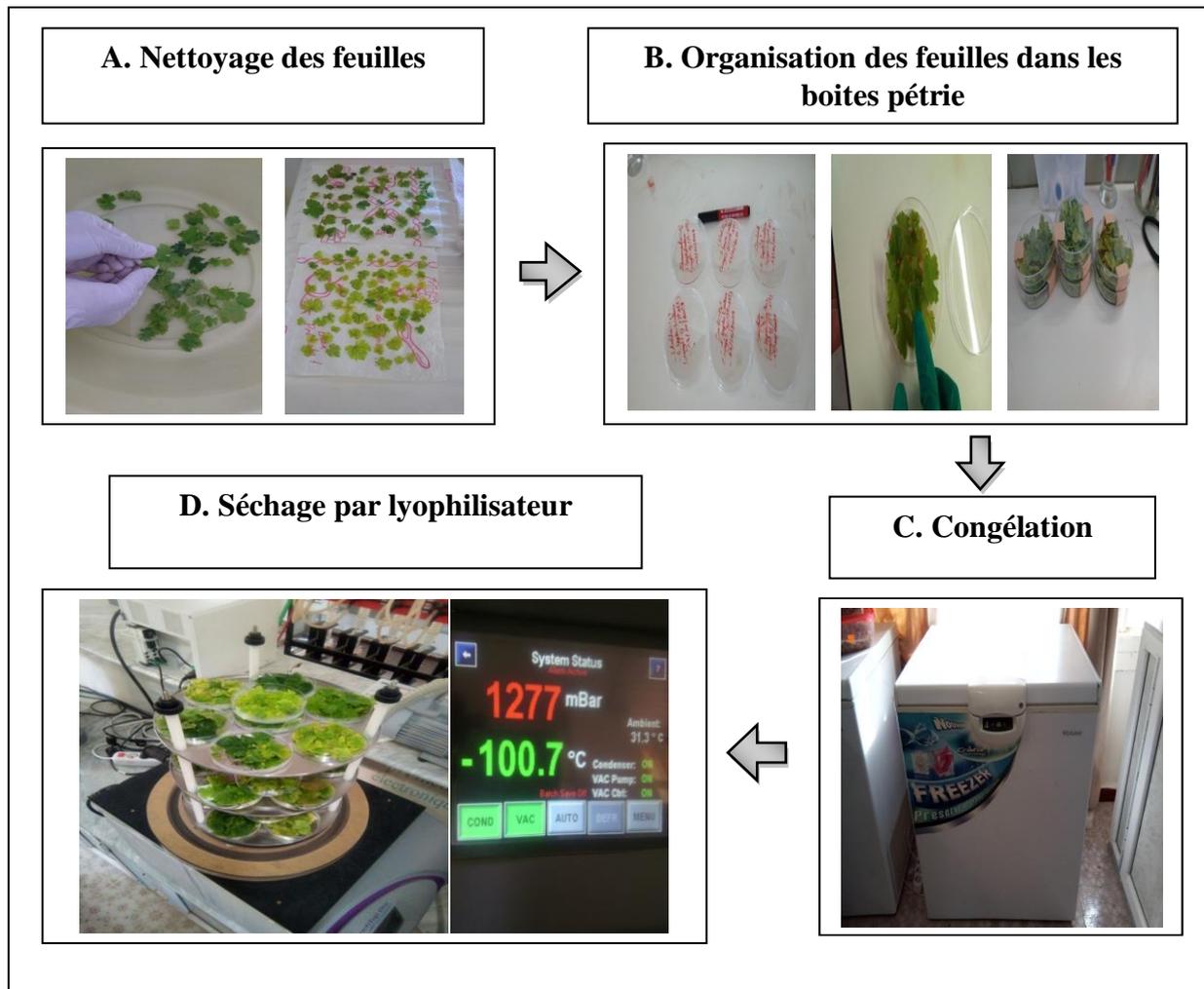


Figure 05. Différentes étapes de séchage à lyophilisateur.

3.3.1.3. Conservation dans le gel de silice

Les feuilles séchées peuvent être conservé à température ambiante pendant quelques mois. Nous avons mis ces feuilles dans des bocaux stériles et étiquetées. Dont, l'étiquette doit comporter le code de l'échantillon, la méthode de séchage et la durée de conservation. Nous avons ajouté le gel de silice pour bien conserver les échantillons. Il faut bien fermer les boîtes jusqu'au le jour d'extraction d'ADN (voir la figure 06).

Au cours de la durée de conservation des échantillons, nous avons observé un changement de couleur de gel de silice qui indique son hydratation, ce qui a besoin de sa régénération.

La méthode de régénération de gel de silice la plus fréquente, l'augmentation de la température. La température de régénération du gel de silice est 120 C° et ne doit pas dépasser 140 C° (voir la figure 07).

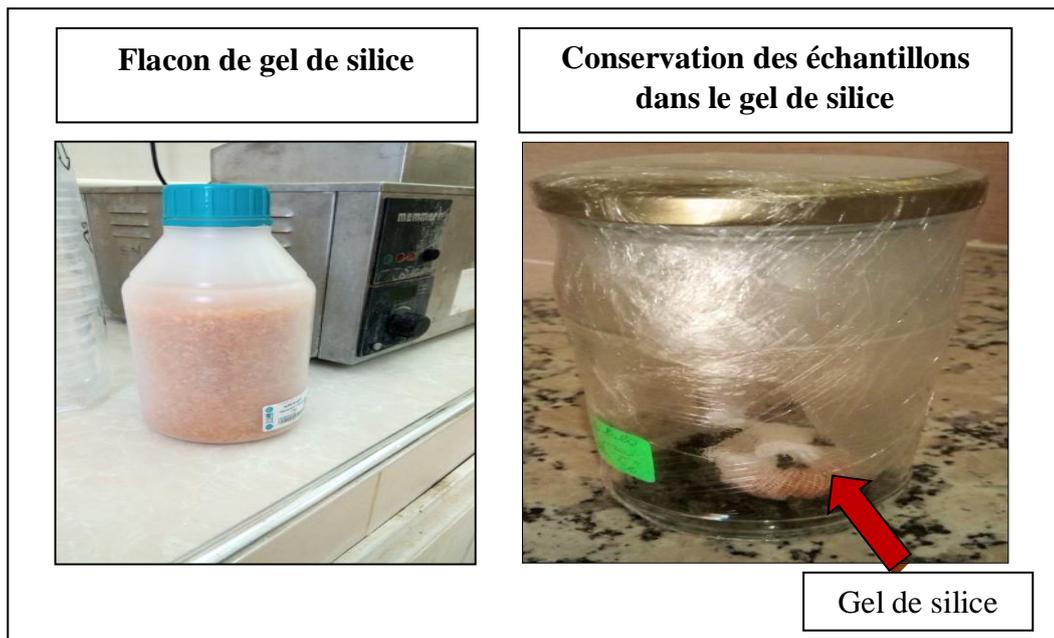


Figure 06. Conservation des feuilles séchées dans le gel de silice.

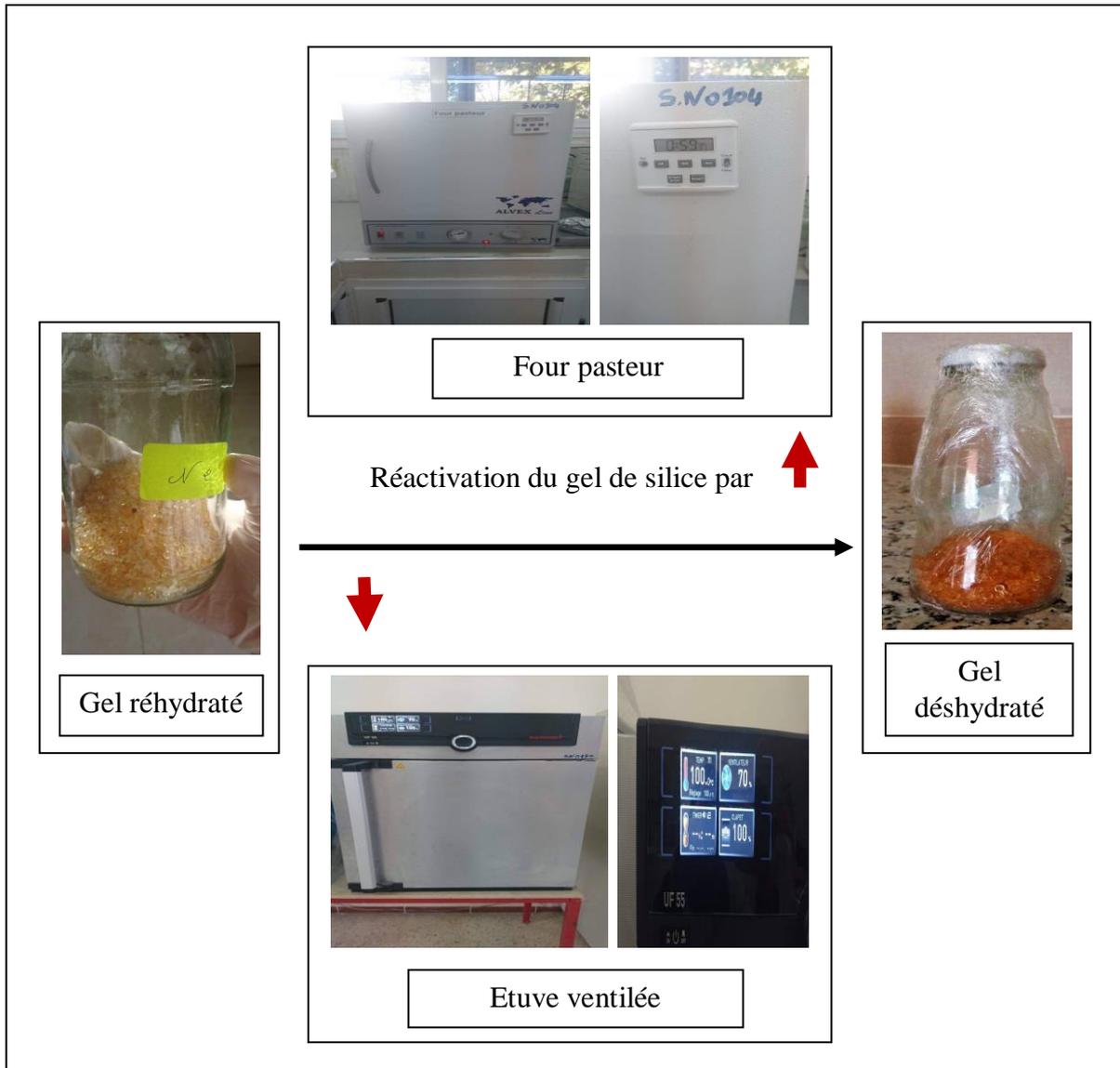


Figure 07. Réactivation du gel de silice.

3.3.1.4. Broyage des échantillons

Il faut broyer les feuilles pour obtenir une fine poudre utilisée dans l'extraction d'ADN. Les feuilles sèches sont facilement broyées par un pilon et mortier sans azote liquide. Il faut désinfecter le mortier par l'éthanol 70%. Après chaque manipulation nettoyer la paillasse et le matériel utilisé afin d'éviter les contaminations croisées. Puis nous avons mis la poudre des feuilles dans des flacons stériles, étiquetés et comportent le gel de silice (voir la figure 08).

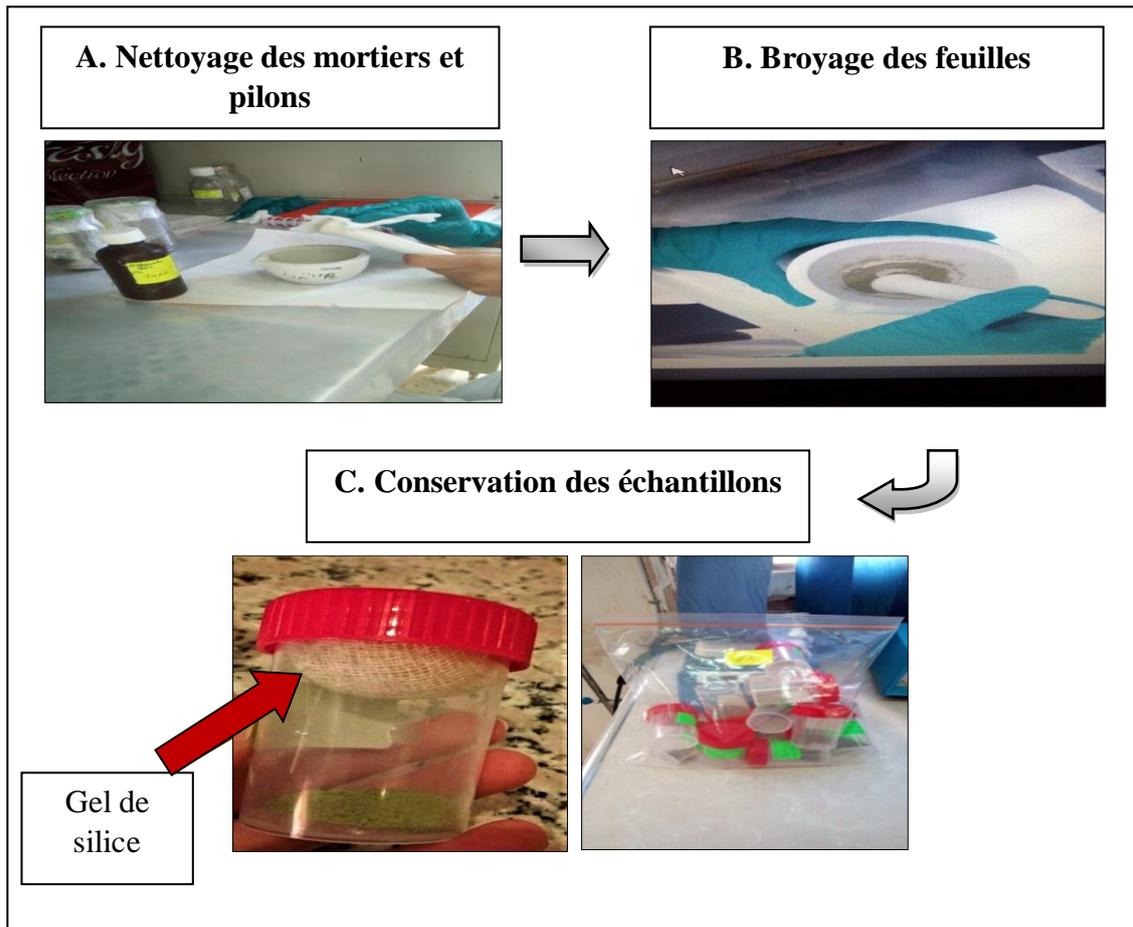


Figure 08. Broyage et conservation des échantillons.

Le tableau ci-dessous comporte tous les informations concernant la préparation des échantillons.

Tableau 01. Caractéristiques principales des échantillons.

Echantillon (jeunes feuilles)	Code	Poids sec (mg)	Site d'échantillonnage	Type de séchage	Conservation
Datti	DE2e	785.1	Longitude : 5.695038	A l'Etuve ventilée pendant 5 jours (10/10 au 15/10/2019)	Echantillon conservée à T° ambiante avec gel de silice. (17/10/2019 Jusqu'à 12/03/2020)
	DE2L2J	743	Altitude : 35.204872	Lyophilisation pendant 2 jours (14/10 à 16/10/2019)	
Chamrakha	CE2e	706.1	Longitude : 5.694641	A l'Etuve ventilée pendant 5 jours (10/10 au 15/10/2019)	
	CE2L2J	1091.5	Altitude : 35.206932	Lyophilisation pendant 2 jours (14/10 à 16/10/2019)	
Souikia	SE2e	795.1	Longitude : 5.702269	A l'Etuve ventilée pendant 5 jours (10/10 au 15/10/2019)	
	SE2L2J	720	Altitude : 35.213509	Lyophilisation pendant 2 jours (14/10 à 16/10/2019)	
Eljbel	EE2e	462.1	Longitude : 5.694791 Altitude : 35.204742	A l'Etuve ventilée pendant 5 jours (10/10 au 15/10/2019)	

	EE2L2J	587.2		Lyophilisation pendant 2 jours (14/10 à 16/10/2019)
Cimbark	CE2e	683.9	Longitude : 5.694641	A l'Etuve ventilée pendant 5 jours (10/10 au 15/10/2019)
	CIE2L2J	750	Altitude : 35.206932	Lyophilisation pendant 2 jours (14/10 à 16/10/2019)
Lkahla	LE2e	650	Longitude : 5.695284	A l'Etuve ventilée pendant 5 jours (10/10 au 15/10/2019)
	LE2L2J	630	Altitude : 35.204818	Lyophilisation pendant 2 jours (14/10 à 16/10/2019)

Remarque :

e : signifié le séchage à l'étuve ventilée.

L : signifié le séchage à lyophilisateur.

2j : signifié les deux jours de séchage à lyophilisateur.

3.3.2. Préparation des réactifs

Avant faire l'extraction d'ADN génomique nous avons préparé des solutions mères des réactifs nécessaires. Nous avons résumé tous les informations de préparation de ces solutions au tableau ci-dessous :

Tableau 02. Solutions préparés pour l'extraction d'ADN génomique.

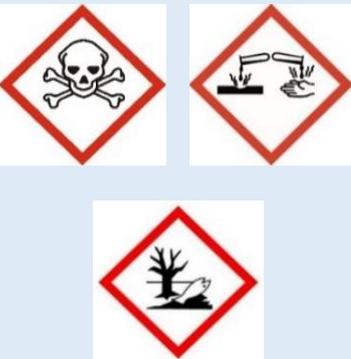
Solution préparé	Date de préparation	Concentration de la solution mère (M)	Volume total préparé (ml)	pH	Conditions de conservation et stérilisation
NaCl	10/02/2020	4	90	7	Température d'autoclavage : 110 C° Température de conservation : +4 C°
Tris-HCl (HOCH ₂) ₃ CNH ₂		0,5	90	7,90	
NaCl	16/02/2020	5	15,5	7	
		6	15	12,40	
Tris-HCl (HOCH ₂) ₃ CNH ₂		2	15	7,90	
EDTA-Na ₂ (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈)		0,02	15	8	
		0,5	98,5	7,90	
		1	15	8,33	
Acétate de sodium C ₂ H ₃ NaO ₂	08/03/2020	3	10	5.45	

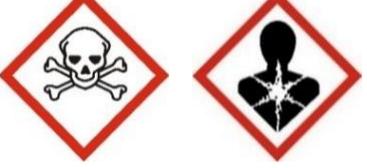
3.3.2.1. Réactifs chimiques et éléments de sécurité

La réglementation sur la classification, l'emballage et l'étiquetage des produits chimiques dangereux vise à assurer la protection des travailleurs, des consommateurs et de l'environnement. L'étiquetage est la première information fournie à l'utilisateur sur les dangers et les précautions à prendre lors de leur utilisation.

Le tableau suivant représente les différents réactifs utilisés, leurs toxicités et les éléments de sécurité :

Tableau 03. Réactifs utilisés et leurs éléments de sécurité.

Réactif	Toxicité	Protection
Dodécylsulfate de sodium (SDS $C_{12}H_{25}NaO_4S$)		<ul style="list-style-type: none"> - Blouse fermée. - Chaussures fermées. - Gants résistants aux produits chimiques. - Lunettes de sécurité adéquate. - Bavette.
polyvinylpyrrolone (PVP)		<ul style="list-style-type: none"> - Blouse fermée. - Gants de protection. - Lunettes de sécurité.
β-Mercaptoethanol		<ul style="list-style-type: none"> - Blouse fermée. - Hotte chimique. - Lunettes de protection avec une protection sur les côtés. - Gants appropriés. - Double bavettes et masque FFP2.
EDTA-Na_2		<ul style="list-style-type: none"> - Blouse fermée. - Lunettes de protection avec une protection sur les côtés. - Gants appropriés. - Bavette.
Sodium hydroxyde (NaOH)		<ul style="list-style-type: none"> - Blouse fermée. - Gants appropriés. - Lunettes appropriées. - Bavette ou masque.

Chloroforme alcool isoamylique		<ul style="list-style-type: none"> - Blouse fermée. - Hotte chimique. - Lunettes de protection avec une protection sur les côtés. - Gants appropriés. - Double bavettes et masque FFP2.
Ethanol		<ul style="list-style-type: none"> - Blouse fermée. -Gants. - Bavette.
Charbon actif		<ul style="list-style-type: none"> - Blouse fermée. - Lunettes de protection avec une protection sur les côtés. - Gants appropriés.
Protéinase K		<ul style="list-style-type: none"> - Blouse fermée. - Hotte chimique. - Gants. - Bavette.
Bromure d'éthidium		<ul style="list-style-type: none"> - Blouse fermée. - Double gants. - Double bavettes et masque FFP2.
Isopropanol		<ul style="list-style-type: none"> - Blouse fermée. - Gants. - Bavette.

3.3.2.2. Elimination des déchets

Les risques chimiques-toxiques désignent les conséquences potentiellement néfastes pour les travailleurs liées à l'utilisation de matières chimiques générant des déchets chimiques. Les conséquences sont très variées, allant de problèmes mineurs et passagers comme des irritations légères au niveau de la peau, des yeux ou des poumons jusqu'à des problèmes très sérieux tels que leur carcinogénicité (Devriese *et al.*, 2005).

Pour l'élimination des déchets à risques chimique-toxiques ces problèmes, tels que : matériel contaminées par BET, β -Mercaptoethanol,...etc, il convient d'opter des récipients indéformables pour les déchets à risque liquides et pâteux et des boîtes en cartons munies d'un sac intérieur en plastique jaune pour les déchets solides à risque.

3.3.3. Extraction d'ADN génomique

L'extraction du matériel génétique (ADN) à partir de tissus des espèces vivantes est une étape primordiale pour la caractérisation moléculaire d'une espèce donnée, pour étudier des mutations au sein des variétés, pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage.

Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN comme : Dellaporta *et al.*(1983) ; Doyle et Doyle, (1987) ; Abd-Elsalam *et al.*(2011) ; Sandra *et al.*(2012) ; Meru *et al.*(2013) ; Simon *et al.*(2014) ; Alexander,(2016)..., qui suivent approximativement le même schéma. Parmi lequel protocole de Meru *et al.*(2013) qui consiste d'extraire l'ADN selon la méthode de polyvinylpyrrolone (PVP) + SDS. Ce protocole s'inspire d'un protocole de base d'Abd-Elsalam *et al.*2011.

3.3.3.1. Protocole avant l'optimisation (protocole de référence)

Le protocole de Meru *et al.* (2013) (protocole 0) est une procédure simple et rapide d'extraction d'ADN génomique par SDS qui effectué en plusieurs étapes sont :

1. mettre 100 mg des feuilles broyées dans un tube eppendorf (1.5ml) avec 450 μ l de tampon de lyse préchauffé à 60 C° qui constitué de : 0.5% SDS, 1% PVP, 200 mM Tris-HCl pH=7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH=8 et 0.2% β -Mercaptoethanol ;
2. agiter les tubes, incuber à 65 C° pendant 30 minutes au bain-marie et vortexer à chaque 5 minutes pendant l'incubation ;

3. ajouter 135 µl d'acétate de sodium (3 M) à chaque tube eppendorf ;
4. centrifuger les tubes à 2465g pendant 10 minutes à température ambiante ;
5. récupérer le surnageant doucement, et transférer dans un nouvel tube propre ;
6. ajouter un volume égale au surnageant récupérer d'isopropanol froid ;
7. laisser les tubes à température ambiante pendant 10 minutes ;
8. centrifuger les tubes à 2465g pendant 10 minutes à température ambiante ;
9. jeter le surnageant après la centrifugation, et laver le culot d'ADN par de l'éthanol 75% ;
10. centrifuger les tubes à 2465g pendant 10 minutes à température ambiante ;
11. laver le culot à la deuxième fois par l'éthanol 75%, et centrifuger les tubes à 2465g pendant 10 minutes à température ambiante ;
12. éliminer l'éthanol ;
13. sécher le culot d'ADN résultant par l'inversement du tube sur un papier absorbant pendant 15min ;
14. suspendre le culot d'ADN extrait dans 50 µl d'eau bidistillée stérile ;
15. conserver les échantillons à -20 C°.

3.3.3.2. Protocole après l'optimisation

A. Paramètres optimisés

Dans cette étude, nous avons cherché à optimiser certaines étapes du protocole de Meru *et al.* (2013) en vue de proposer une méthode d'extraction d'ADN génomique de bonne qualité et en grande quantité. Cette optimisation est effectuée selon la disponibilité du matériel et des réactifs au niveau de notre laboratoire. Les paramètres testés pour optimiser ce protocole sont listés dans le tableau 04.

Tableau 04. Paramètres testés pour les étapes importantes de l'extraction de l'ADN en référence au protocole de Meru *et al.* 2013 et le protocole optimisé.

Etape	Protocole de référence (Meru et al., 2013)	Modifications	Référence des modifications
La lyse cellulaire (étape 1 et 2)	<p>Tampon de lyse : 0.5% SDS 1% PVP 25 mM EDTA 200 mM Tris-HCl 250 mM NaCl 0.2% β-Mercaptoethanol</p> <p>Incubation : 30 min à 65 C°</p>	<p>Tampon de lyse : 2% SDS 2% PVP 20 mM EDTA 200 mM Tris-HCl 250 mM NaCl 1% β-Mercaptoethanol 0.5 % (w/v) de charbon actif 6 μl PK (20 mg/ml) 1M LiCl</p> <p>Incubation : 60 min à 65 C°</p>	<p>Xia et al., (2019) Allen et al., (2006) Ginwal et al., (2009) Raimundo et al., (2018) Nelson et al., (2011) et Puchooa, (2004) Križman, (2006) Marília et al., (2019) Xia et al., (2019) Ginwal et al., (2009) Lencina et al., (2019)</p>
Purification (étape 3 à 5)	<p>Salting out : 135 μl d'acétate de sodium (3M)</p>	<p>Solvant organique : Chloroforme alcoolisoamylique (24 :1)</p>	<p>Tiwari, (2017) Julie et al., (2010)</p>
Précipitation (étape 6 à 8)	<p>Isopropanol froid</p> <p>Incubation : 10min/T° ambiante</p>	<p>Ajout 70% volume* d'isopropanol froid absolue avec un volume (10%) de NaCl (5M).</p> <p>Incubation : 10 min/T°-20 C°</p>	<p>Marília et al., (2019)</p>

Lavage (étape 9 à 11)	Double lavage par l'éthanol 75%	1 ^{ère} lavage par washing solution : contient 76% d'éthanol absolue, 0.2% d'acétate d'ammonium (5M) et 23.8% d'eau bidistillée. 2 ^{ème} lavage par l'éthanol 75%	Lencina <i>et al.</i> , (2019) Ginwal <i>et al.</i> , (2009)
Vitesse et T° de centrifugation	Centrifugation à température ambiante 2465g / 10 min	Centrifugation à 4 C° (centrifugeuse réfrigérée) 5000g / 5 min	Kumar <i>et al.</i> , (2009) Julie <i>et al.</i> , (2010) Benbouza <i>et al.</i> , (2006)

(*) Volume ajouté par rapport au volume total de surnageant obtenu.

B. Protocoles optimisés :

➤ Protocole 1 :

C'est le même protocole de référence Meru *et al.* 2013, mais avec une optimisation de volume du tampon de lyse de 450 µl à 1 ml. Les restes étapes sont les même.

➤ Protocole 2 :

C'est le même protocole 1, mais nous avons modifié quelques étapes (voir la figure 09) l'étape de lyse par le changement des concentrations de certains réactifs, la durée d'incubation et l'ajout des autres réactifs, comme suit :

1. mettre 100 mg des feuilles broyées dans un tube eppendorf (2 ml) avec 1ml du tampon lyse préchauffé (à 60 C°) qui constitué de : 2% SDS, 2% PVP, 200 mM Tris-HCl pH=7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA PH=8, 2% β-Mercaptoethanol ; et 6 µl de Protéinase K (20mg/ml) à chaque tube ;

2. agiter les tubes, incuber à 65 C° pendant 60 minutes au bain-marie et vortexer à chaque 5 minutes pendant l'incubation ;

- Les restes étapes sont les même au protocole en référence (P0).

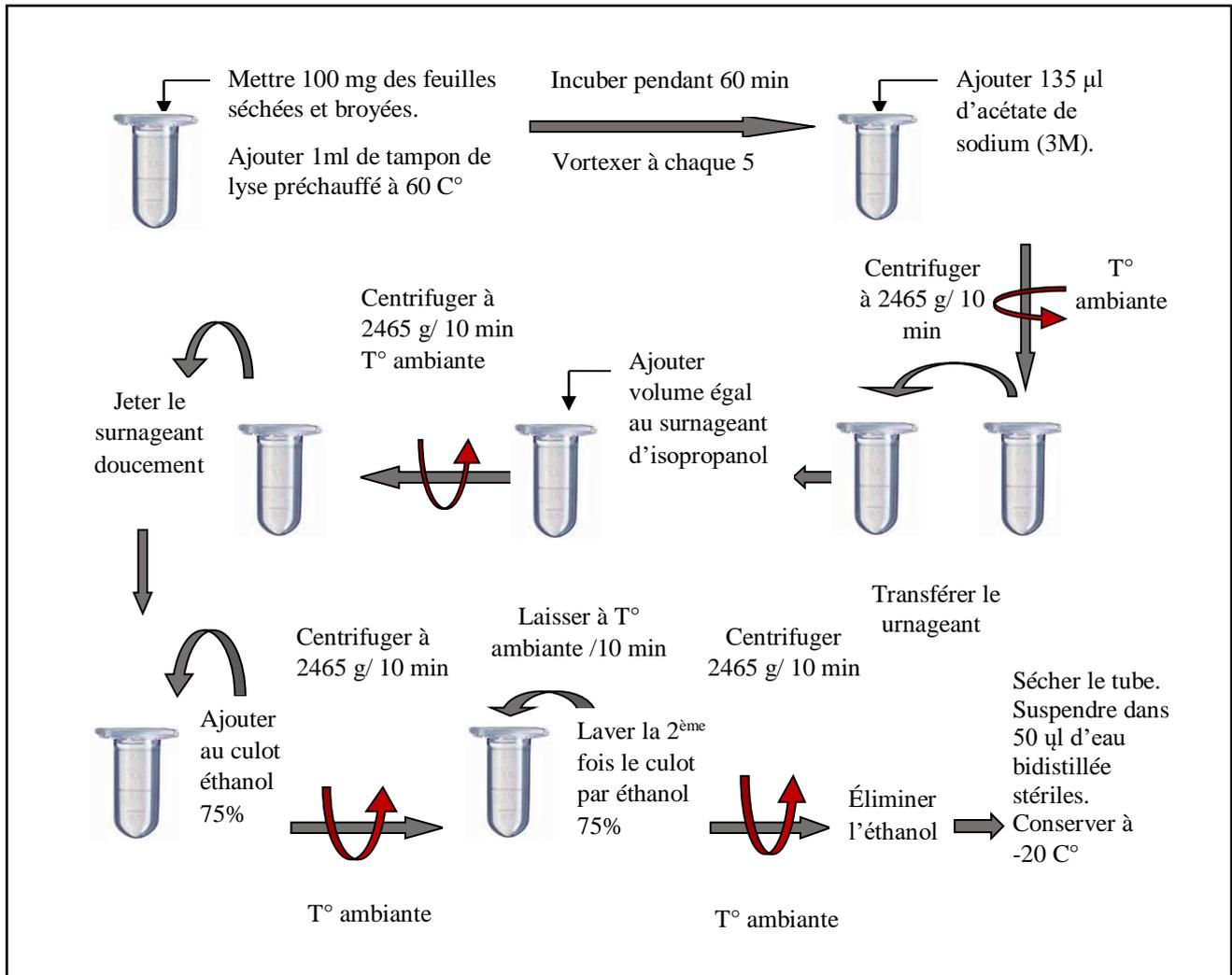


Figure 09. Étapes d'extraction d'ADN génomique de protocole 2.

➤ **Protocole 3 :**

Dans ce protocole, nous avons ajouté deux autres réactifs au tampon de lyse, 0.5% de Charbon actif et 1M de chlorure de lithium. Ensuite, nous avons modifié l'étape de purification « Salting-out » à une méthode de purification organique par l'utilisation des solvants organiques. Nous avons changé aussi la vitesse et la température de centrifugation sans oublier les modifications apportées à l'étape de précipitation. Donc le protocole 3 est le protocole final (protocole proposé).

- Les étapes de ce protocole sont présentées dans la figure 10.

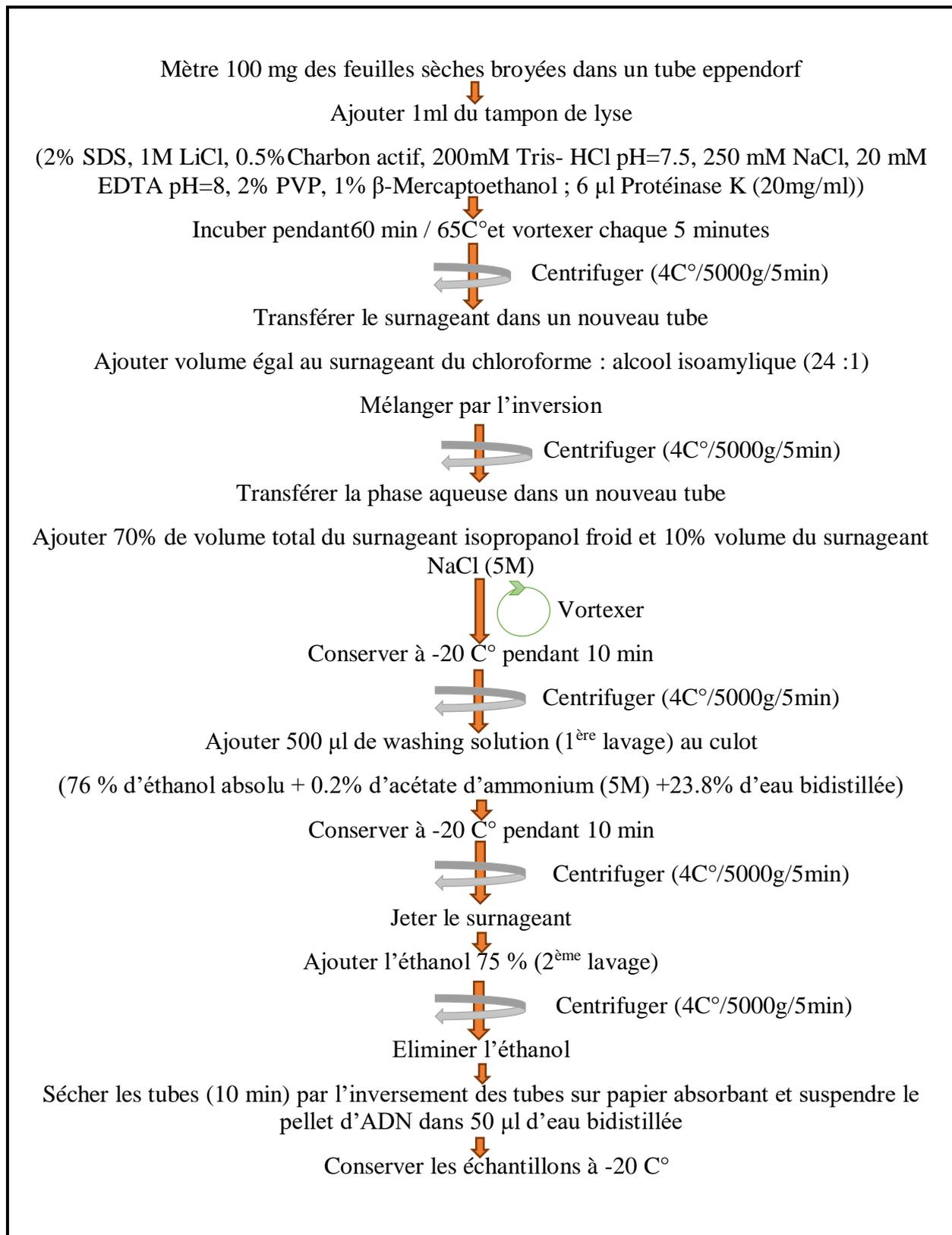


Figure 10. Étapes optimisées d'extraction d'ADN génomique de protocole 3.

3.3.4. Evaluation de la quantité et la qualité d'ADN extrait

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

La concentration d'acides nucléiques est généralement déterminée par une mesure effectuée à 260 nm contre un échantillon appelé blanc sachant que : une unité de densité optique à 260 nm (DO_{260}) = 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ADN double brin. On mesure donc à 260 nm et 280 nm la DO d'une dilution au 1/250^{ième} de la solution mère (Benaissa, 2008).

Selon Boukhari, (2014) la concentration de l'ADN est déduite grâce au calcul suivant :

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

- **Calcul de la masse à partir de la concentration**

Masse d'ADN : $C = m/v$

C : concentration d'ADN en ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

m : masse de l'ADN en (μg).

v : volume de l'eau bidistillée utilisée pour resuspendre l'ADN en (ml) = 50 μl = 0,05ml.

Donc : $m = C.v$

- **Le rendement d'ADN extrait par g de feuille sèche (R)**

Le rendement a été calculé en réalisant le rapport entre la quantité d'ADN obtenue et le volume ou la masse initial de l'échantillon (Bienvenu, 1999). La détermination de la masse est effectué après calcul de la concentration.

$$R (\mu\text{g}/\text{g}) = \text{Masse d'ADN } (\mu\text{g}) / \text{Quantité de l'échantillon de départ en (g)}$$

Pour vérifier la pureté de l'échantillon, deux ratios seront calculer de : A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} (Benaissa, 2008)

Le rapport $R = A_{260} \text{ nm} / A_{280} \text{ nm}$ constitue un bon moyen pour apprécier une éventuelle contamination de la préparation d'ADN par les protéines ou par les ARN. Ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2,1 (ADN pur).

Un ratio inférieur à 1,8 indiquerait une contamination protéique. Les protéines, principaux contaminant des préparations absorbent aussi à 260 nm, mais avec maximum

d'absorption qui se situe vers 280 nm à cause des acides aminés aromatiques (Joëlle et *al.*, 2007).

Une contamination par les ARN est indiquée par un ratio supérieur à 2. Les ARN étant en simple brin, le coefficient moyen d'absorption d'un nucléotide est supérieur à celui du même nucléotide dans la double hélice à cause de l'hypochromisme (Joëlle et *al.*, 2007).

L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbones, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio A_{260}/A_{230} devrait être environ 2,2 (Benaïssa, 2008)

3.3.4.2. Evaluation de l'intégrité d'ADN

L'intégrité de l'ADN est déterminée par l'électrophorèse (voir la figure 09) sur un gel d'agarose à 0.8%, après une coloration par le bromure d'éthidium (BET) qui devient fluorescent après excitation par les ultra-violets dans un tampon TAE 1X (voir l'annexe 03).

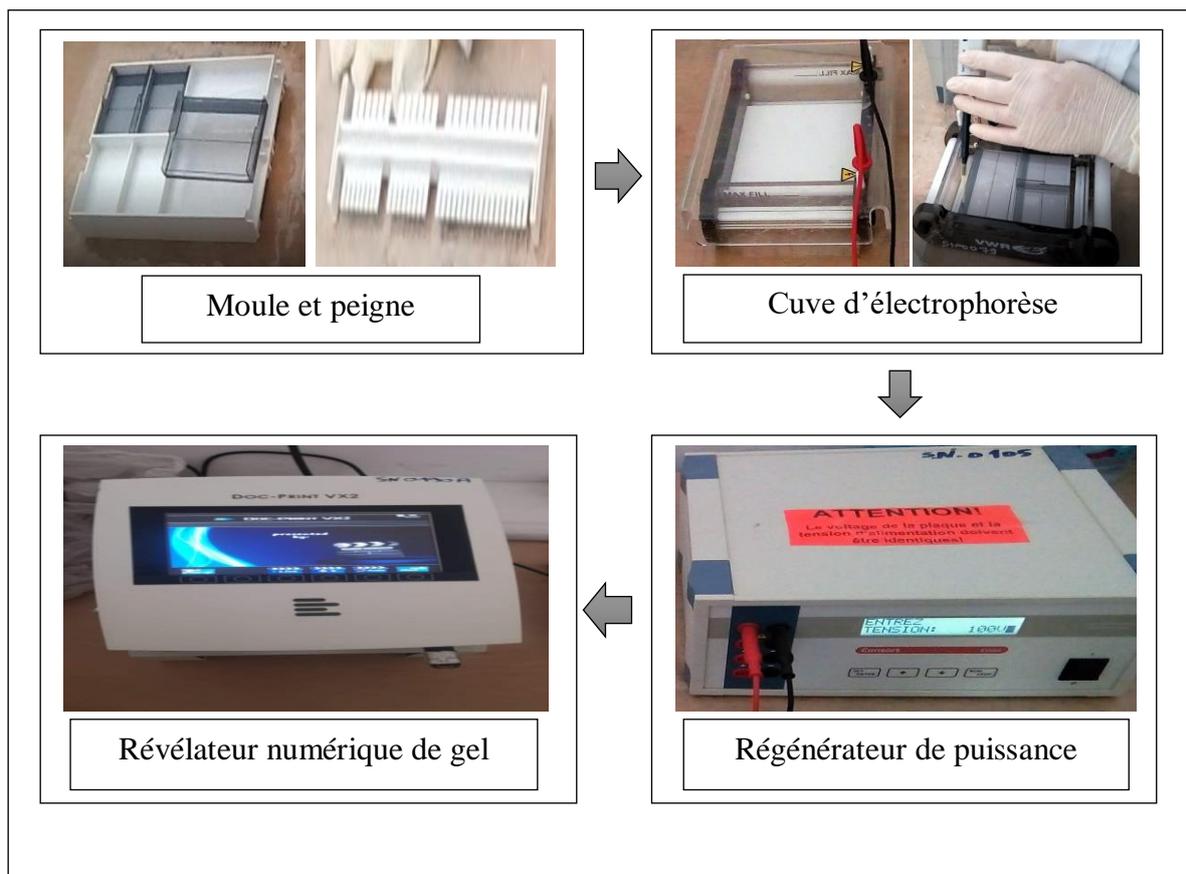


Figure 11. Dispositif schématique du montage d'électrophorèse.

A. Préparation de l'échantillon

Mettre dans chaque tube eppendorf (1.5 ml) 6 µl de l'échantillon d'ADN extrait et ajouter 2 µl de tampon de charge (bleu de bromophénol) (voir l'annexe02).

Remarque :

Le colorant de bleu de bromophénol est présenté l'avantage d'alourdir l'échantillon afin qu'il sédimente au fond des puits de dépôt creusés dans le gel (Tellaa, 2013).

B. Préparation de gel d'agarose (0,8%)

Avant de préparer le gel d'agarose, l'opérateur doit être porté une blouse à manches longues, des gants en vinyle jetables qu'il change tous les quarts d'heures environ et des lunettes de protection. Il place un papier Whatman sur sa paillasse afin d'absorber les fuites possibles. Les étapes sont comme suit :

1. peser la poudre d'agarose 0.16 g ;
2. transférer cette poudre dans un erlenmeyer ;
3. ajouter 20 ml de tampon TAE 1X ;
4. chauffer ce mélange quelques minutes dans un chauffe ballon, Le chauffage entraîne la formation d'une mousse abondante en surface ;
5. retirer l'erlenmeyer avec un linge ;
6. ajouter une goutte de BET, au dernier moment ;
7. agiter l'erlenmeyer à nouveau manuellement de façon à obtenir un mélange homogène ;
8. couler le gel entre les deux plaques en prêtant attention à limiter les fuites ;
10. placer un peigne dans le moule de gel pour créer des puits ;
11. laisser le gel de 15 à 25 minutes jusqu'à leur solidification ;
12. placer les plaques horizontalement, après la solidification dans une cuve contenant le tampon TAE 1X et raccorder aux électrodes.

TAE : Le Tris-Acétate-EDTA est généralement le tampon le plus fréquemment utilisé. Néanmoins, sa capacité de tampon relativement faible s'épuisera pendant une électrophorèse longue, rendant nécessaire une recirculation de tampon dans les cycles dépassant 140 mA-heures. Les avantages potentiels liés à l'utilisation d'un tampon TAE par rapport à un tampon TBE incluent une meilleure séparation de l'ADN super-enroulé et une migration plus rapide d'environ 10 % des fragments d'ADN linéaire double brin.

C. Migration électrophorétique et visualisation des fragments d'ADN

Les échantillons d'ADN extraits sont placés dans les puits pour la migration. La migration d'ADN se fait vers l'anode de la cuve (fil rouge), qui est effectuée sous un courant de 100 volts pendant 20 min. Ce courant assuré par un régénérateur de puissance.

Après migration, sous illumination par UV, l'ADN est visualisé sous forme de bandes colorées qui peuvent être photographiées sur un film très sensible, grâce au bromure d'éthidium (BET) qui est un agent intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques (à manier avec précaution car cancérigène) quand il s'intercale, il présente une fluorescence rouge sous rayonnement ultra-violet (UV) (Tella, 2013).

Remarque

L'opérateur connaît la toxicité du BET, les mesures de prévention à respecter et est particulièrement attentif à limiter les projections lors des secousses du flacon. Le BET est un liquide de couleur rouge brique à marron, conservé dans un petit flacon bien fermé, dans l'emballage recouvert par le papier aluminium en raison de la photosensibilité du produit, et étiqueté. Le gel et la solution tampon qui contient du BET après la migration sont déposés dans un bidon bien fermé.

3.3.4.3. L'amplification par PCR

L'ADN extrait est amplifié par la PCR pour estimer sa qualité. Dont, l'amplification se fait d'un fragment d'ADN nucléaire de motif répété en tandem (1 à 6 nucléotides). Cette classe d'ADN nucléaire répétitif est appelée microsatellite.

La séquence cible est amplifiée par PCR à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques, VVS2 (fournisseur : STAR-LAB International), s'hybridant dans les régions flanquantes très conservées du microsatellite.

A. Conditions d'amplification

L'amplification d'une séquence d'ADN cible (microsatellite) est effectuée par le couple d'amorces VVS2 (tableau 05). La spécificité de ces amorces a été préalablement validée par une étude antérieure de Thomas et Scott, (1993). Le locus VVS2 contient une répétition parfaite (GA)₂₂ (Thomas et Scott, 1993). Les tailles d'allèles attendus de VVS2 allant de 118 bp à 153 bp (Schuck et *al.*, 2014).

Le couple d'amorces utilisées, la température d'hybridation et la taille du fragment attendue sont détaillés dans le tableau 05.

Tableau 05. Les couples d'amorces choisies et la longueur du fragment obtenu avec quelques paramètres associés.

Locus	Séquence des primer (5'---- 3')	T° (C°)	Taille attendue (pb)	Motif de répétition
VVS2	CAGCCCGTAAATGTATCCATC (sens)	59.4	118-153	Parfait (GA) 22
	AAATTCAAATTTCTAATTCAACTGG (anti sens)	56.00		

B. préparation du mélange réactionnel pour PCR

L'amplification par réaction en chaîne par polymérase a été réalisée dans un volume final de 12,5 µl qui distribué dans des tubes appropriés, chaque tube contient : 10 ng/µl d'ADN matrice, 1,25 µl de tampon PCR 10X, 25 mmol/l MgCl₂, 2,5 mmol/l de chaque dNTP, 4 mmol/l de chaque amorce et 1 unité de *Taq* polymérase (Patrícia et *al.*, 2011).

Un tube de témoin négatif dépourvu d'ADN (contenant de l'H₂O) est nécessaire à chaque amplification, afin d'éliminer la possibilité des faux positifs dû à une contamination lors de la préparation du mélange réactionnel.

La technique PCR se réalise par le biais d'un appareil programmable appelé un thermocycleur de type « PRIME » dans lequel sont placés les microtubes contenant le mélange réactionnel.

C. Déroulement de la PCR dans le thermocycleur

Après la préparation des échantillons sont mélangés dans des microtubes et placés dans le thermocycleur programmé, les étapes qui se déroule étapes de PCR et conditions d'amplification sont plus détaillés dans le tableau 06.

Tableau 06. Les étapes de PCR et conditions d'amplification (Thomas et Scott, 1993).

Nombre des cycles	Etape	Température (C°)	Durée
	Dénaturation initiale	95	5 min
X35	Dénaturation	95	30 s
	Hybridation	59	45s
	Elongation	72	1min
	Elongation finale	72	7 min
	Conservation	4	Indéfiniment

D. Vérification des résultats de la PCR

Lorsque la PCR est terminée, les amplifications ont été vérifiées en passant une aliquote de 4µl du produit de la réaction PCR sur un gel d'agarose 2%, colorés au bromure d'éthidium (BET).

4µl de l'ADN amplifié est mélangé avec 2 µl de bleu de bromophénol sont déposés sur le gel d'agarose, ainsi un marqueur moléculaire est déposé sur le gel. A l'aide d'un champ électrique de 40 volts pendant 10 min, puis en évolue à 100 volts durant 30 min, l'ADN chargé négativement, va migrer de la cathode vers l'anode (Reddahi, 2017). La fixation de BET, marqueur fluorescent à la lumière UV, à l'ADN va permettre d'augmenter sa fluorescence et ainsi de visualiser les produits de PCR se forme d'une bande (Reddahi, 2017).

La taille des fragments d'ADN amplifiés est évaluée par rapport d'un marqueur de poids moléculaire (PM) (DNA Ladder 50 bp).

CHAPITRE 4

RESULTATS

ET DISCUSSIONS

L'identification génétique de différentes variétés locales de la vigne, nécessite l'extraction d'ADN génomique de bonne qualité et quantité. Dans cette étude, nous avons cherché à optimiser certaines étapes du protocole de Meru *et al.* (2013), en vue de proposer une méthode d'extraction d'ADN de qualité, relativement simple, peu coûteux et réalisable selon la disponibilité des réactifs et des appareils dans notre laboratoire d'EL-HADJEB qui peu équipé.

Les résultats seront comparés à ceux obtenus par le protocole de référence de Meru *et al.* (2013). Le type d'échantillon biologique utilisé qui est un tissu végétal, présente des problèmes à l'extraction ou à l'amplification. Il s'agit d'échantillons riches en métabolites secondaires qui inhibent la réaction d'amplification.

4.1. Résultats

4.1.1. Profil électrophorétique de l'ADN extrait par le protocole (0) de Meru *et al.* (2013)

Le premier protocole a été appliqué est celui de Meru *et al.* (2013), afin d'y appliquer par la suite les modifications souhaitées.

L'ADN des feuilles sèches (à lyophilisateur et à l'étuve ventilée) a été extrait. Ces échantillons des feuilles sont : Datti (**DE2e** et **DE2L2j**), Souikia (**SE2e**) et Eljbel (**EE2L2j**). Elles sont conservées pendant cinq mois (d'Octobre à Mars) à température ambiante en présence de gel de silice.

Tous les échantillons d'ADN extraits ont été soumis à une migration électrophorétique sur un gel d'agarose **0.8%** sous une tension de **500 V**, suivie d'une coloration en BET puis visualisation sous UV afin de vérifier si l'extraction a bien eu lieu (Figure 12).

L'électrophorèse est une méthode d'estimation de la densité et la qualité des échantillons, c'est à partir de l'inflouescence des bandes et la forme de bande qui peut nous faciliter l'interprétation des résultats.

D'après la figure 12, l'absence de l'ADN extrait à partir de tous les échantillons utilisés : **SE2e**, **DE2L2j**, **DE2e**, et **EE2L2j**.

Toutefois, l'extraction des acides nucléiques peut être confrontée à divers facteurs limitants. On cite alors des insuffisances au cours des étapes d'extraction, comme une lyse

cellulaire incomplète ou encore un séchage incomplet des feuilles ce qui provoque la réhydratation des feuilles et induit la dégradation d'ADN génomique.

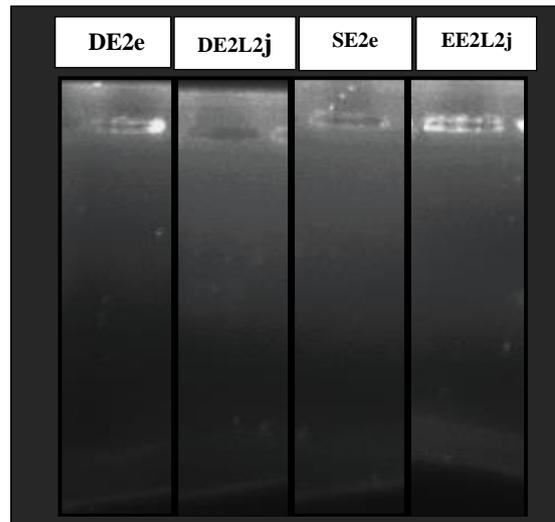


Figure 12. Profil électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application de protocole de Meru *et al.* 2013 (P0). Une électrophorèse sur un gel d'agarose à 0.8% après une coloration au BET suivi d'une visualisation sous UV.

4.1.2. Profil électrophorétique de l'ADN extrait par le protocole (01)

Nous avons réessayé d'extraire l'ADN en deuxième fois, par l'application de protocole de Meru *et al.* (2013), avec un changement de volume de tampon de lyse, nous avons proposé d'utiliser un volume de 1 ml au lieu de 450 μ l, ce volume suffisant pour la lyse cellulaire. Les échantillons qui nous avons utilisé dans cette essai sont : Souikia (**SE2L2j**), Chamrakha (**CE2e** et **CE2L2j**) et Eljbel (**EE2e**).

D'après la figure 13, seulement les échantillons lyophilisés **SE2L2j** et **CE2L2j** des 04 échantillons testés a donné une bande d'ADN perceptible sous UV. Dont, la quantité en ADN semblait optimale au vu de l'intensité légèrement plus élevée de cette bande sur le gel d'agarose. L'obtention d'une bande pour les deux échantillons Souikia signifie que l'ADN extrait n'est pas dégradé (intègre). Ces résultats montrent la présence d'ADN extrait à partir des feuilles lyophilisées et conservées pendant cinq mois (d'Octobre à Mars), ce qui expliqué par une bonne conservation d'ADN au cours de cette longue période.

Les résultats obtenus montrent que le protocole de Meru *et al.*, (2013) qui a basé sur la méthode SDS ne donne pas des bonnes concentrations d'ADN sauf dans les cas où nous avons augmenté le volume de tampon de lyse (1ml), ce qui permet de bien lyser les cellules.

Cependant, pour les autres échantillons séchés à l'étuve, il n'y a pas eu de détection d'ADN. Ce dernier résultat peut s'expliquer par un séchage incomplète des feuilles à l'étuve ce qui provoque la réhydratation des feuilles et induit la dégradation d'ADN génomique. Et même 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.

D'après les résultats obtenus, le meilleur procédé de préparation des échantillons est la lyophilisation qui permet de bien conserver l'ADN génomique des feuilles en qualité supérieure à celle des feuilles séchées à l'étuve. Les mesures des DO peuvent alors suffire pour conclure sur les concentrations.

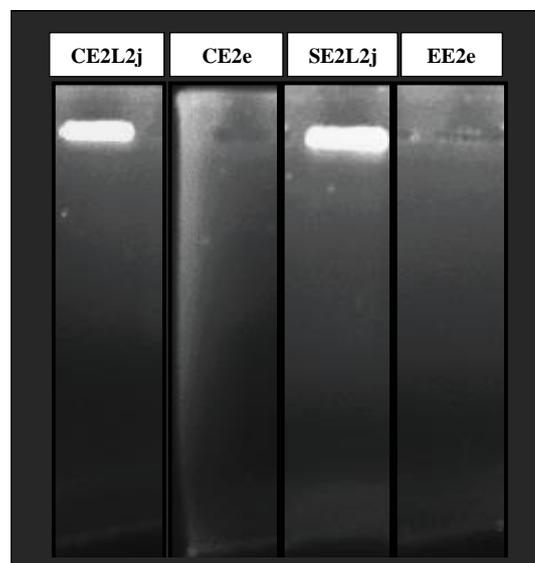


Figure 13. Profil électrophorétique d'ADN génomique obtenu après l'application de protocole de Meru *et al.*, 2013 (P1). Une électrophorèse sur un gel d'agarose à 0.8% après une coloration au BET suivi d'une visualisation sous UV.

4.2. Discussion analytique

4.2.1. Caractéristiques et particularités des échantillons étudiés

L'extraction d'ADN à partir de plantes est plus difficile que celle d'animaux, premièrement parce que les plantes ont une paroi cellulaire et la lignine (Varner et *al.*, 1989) qui nécessitent des étapes de broyage spécifiques pour être rompues, et deuxièmement parce que les plantes contiennent des métabolites secondaires qui peuvent inhiber la PCR (Khanuja et *al.*, 1999 ; et Marília et *al.*, 2019).

Chez les plantes, l'ADN peut être extrait de divers tissus, tels que la feuille, la tige, les racines, l'endocarpe du fruit, etc. La feuille et la tige, par exemple, sont souvent utilisées dans la génétique des populations (Marília et *al.*, 2019).

Dans cette étude, l'extraction de l'ADN total a été faite à partir de 100 mg de poudre de jeunes feuilles séchées, conservées à température ambiante. Nous avons essayé d'optimiser un protocole rapide et efficace permettant d'extraire de façon homogène de l'ADN génomique de qualité à partir de feuilles déshydratées de vigne, sans la nécessité de travailler par l'azote liquide ou le besoin de congélateur -80 C° qui sont indisponibles au niveau notre laboratoire.

4.2.1.1. Choix des feuilles par rapport aux autres tissus

Les jeunes feuilles sont toujours le choix préféré pour l'isolement d'ADN pur de bonne quantité (Porebski et *al.*, 1997), parce qu'elles contiennent un grand nombre des cellules et de petites quantités des métabolites secondaires (Murray et *al.*, 1980 ; Marília et *al.*, 2019). Alors que, nous avons évité de faire l'extraction à partir des feuilles adultes parce qu'elles contiennent des quantités plus élevées des composés phénoliques et des polysaccharides qui peuvent influencer la qualité et la quantité d'ADN extrait (Porebski et *al.*, 1997).

Cependant, les autres tissus comme la tige ou les racines, sont plus lignifiés et peuvent être riche en métabolites secondaires, qui peuvent empêcher l'isolement du matériel génétique ou inhiber la réaction en chaîne par polymérase (PCR) utilisée pour amplifier les locus d'intérêt (Marília et *al.*, 2019).

4.2.1.2. Séchage et conservation des feuilles

Au cours de cette étude, nous avons essayé d'optimiser une méthode de conservation des échantillons pendant presque six mois sans altérer d'ADN et sans le besoin d'un congélateur à basse températures (-80 C°). C'est pour ça nous avons fait le séchage des feuilles à l'étuve et par lyophilisateur.

La lyophilisation est une méthode permet d'éliminer la partie de l'eau contenue dans l'échantillon. Par abaissement de l'activité de l'eau, les vitesses des réactions biochimiques ou

enzymatiques peuvent alors être fortement ralenties (Eni, 2011). Par conséquent, une stabilité de stockage d'échantillon à long terme et à température ambiante est possible (Wang, 2004).

Utilisation de tissu lyophilisé offre plusieurs avantages. Tissu sec peut être efficacement rompu alors que l'ADN n'est pas hydraté et donc moins sensible au cisaillement. Enfin, les tissus secs peuvent être conservés pendant plusieurs années avec peu de perte de qualité de l'ADN (Murray et Thompson, 1980). Nous avons proposé les conditions d'optimisation -100 C° avec 1000 mbar, qui donne des bons résultats d'après le profil électrophorétique.

Selon les trois études de (Gostel *et al.* 2016 ; Funk *et al.* 2017 ; Lencina *et al.* 2019), l'ajout de gel de silice aux échantillons séchés va inhiber toute réaction de réhydratation même si le taux d'humidité est trop élevé, et ça permet une meilleure conservation pendant une longue période. Le rapport du gel de silice à l'échantillon doit dépasser (10 : 1), pour bien conserver l'échantillon (Nagy, 2010).

En outre, ces feuilles sèches sont faciles à broyées sans la nécessité à l'azote liquide qui est indisponible au niveau notre laboratoire. Donc par un simple broyage dans un mortier et au pilon, nous avons obtenu une poudre fine des feuilles utilisés dans l'extraction d'ADN à n'importe quel moment.

4.2.2. Analyse des protocoles appliqués

4.2.2.1. Technique de référence

L'isolement d'ADN pur, intact et de haute qualité est très crucial pour toute étude moléculaire. La technique manuelle de référence Meru *et al.* (2013) de notre étude à base de détergent anionique SDS (Dodécylsulfate de sodium) s'inspire de protocole modifié par Abd-Elsalam *et al.* (2011).

L'extraction de l'ADN génomique s'effectue en trois étapes qui sont : la lyse cellulaire, la purification et la précipitation d'ADN. Les jeunes feuilles des variétés locales de vigne bien séchées sont broyées pour obtenir une fine poudre (100 mg) qui est utilisé dans l'extraction.

Tout d'abord, il y a une étape de lyse cellulaire par un tampon de lyse de 450 μ l préchauffée à 60 C° qui constitué de : 0.5% SDS, 1% PVP, 200 mM Tris-HCl (pH=7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA (pH=8) et 0.2% β -Mercaptoethanol.

L'utilisation de SDS (Dodécylsulfate de sodium) qui est un détergent aide à digérer la membrane cellulaire et libérer plus d'acides nucléiques au cours de cette étape. Le SDS a également la propriété de perturber les interactions acide nucléique / protéine, en séparant les

protéines des acides nucléiques (Barbier et *al.*, 2019). Il élimine les lipides moléculaires de la membrane cellulaire et provoque sa perturbation (Sharma, 2012).

Lorsque la paroi et les membranes sont brisées pendant le broyage des tissus, le contenu cytoplasmique de la cellule est libéré, ce qui modifie le pH et par conséquent, la stabilité des biomolécules comme l'acide nucléique est perturbée. Le Tris (amino méthane, hydroxyméthyle), qui est très courant utilisé pour maintenir le pH du tampon d'extraction d'ADN. Ceci maintient le pH de solution à un pH presque physiologique (8) (Sharma, 2012).

Alors que, l'EDTA (acide éthylène diamino tétra acétique) a la propriété de chélater les ions de magnésium, un cofacteur nécessaire pour les nucléases (Puchooa, 2004). La chélation des ions bivalent (Mg^{2+}) avec l'EDTA rend l'enzyme DNase non fonctionnelle et protège ainsi l'ADN. Les ions (Mg^{2+}) sont également nécessaires pour l'agrégation de l'acide nucléique avec la protéine (Heikrujam et *al.*, 2020).

Le NaCl utilisé dans le tampon de lyse aide à éliminer les protéines liées à l'ADN. Et à stabiliser la structure hélicoïdale double brin de l'ADN (Sharma, 2012). Aussi, il est facilité l'élimination des polysaccharides (Ghaffari et *al.*, 2011).

La PVP (polyvinylpyrrolone) a été utilisée pour éliminer les polyphénols par la formation des liaisons hydrogène complexes avec des composés polyphénoliques qui peuvent être séparés de l'ADN par centrifugation (Ghaffari et *al.*, 2011). Et éviter leur interaction avec l'ADN (Sharma, 2012).

L'utilisation de β -Mercaptoethanol est souvent incluse dans le tampon d'extraction d'ADN végétal (Sharma, 2012). Ce réactif aide à l'inactivation et à la dénaturation de certaines enzymes telle que les peroxydases qui catalysent l'oxydation des composés phénoliques (Marília et *al.*, 2019). Donc, le β -Mercaptoethanol est un agent antioxydant permet de limiter l'action des polyphénols qui, après oxydation, sont liés de façon covalente aux protéines et acides nucléiques au cours de l'homogénéisation (Julie et *al.*, 2010). Ainsi, il est un agent réducteur qui peut éliminer les tanins présents dans l'extrait végétal brut (Sharma, 2012).

Après l'ajout de tampon de lyse, les tubes sont incubés au bain-marie à 65°C pendant 30 min, cette étape permet d'homogénéiser et solubiliser les réactifs de milieu réactionnel et devient clair en quelques secondes ce qui augmente l'interaction entre les différents réactifs avec les protéines, les composés phénoliques et les polysaccharides (Ghaffari et *al.*, 2011).

Ils sont mélangés par le vortex chaque 5 min, cette action permet d'accélérer l'action de lyse (Marília et *al.*, 2019).

La lyse cellulaire est suivie d'une étape de purification pour éliminer les protéines et les contaminants récupérés avec l'ADN en solution. Cette étape est importante puisque les différents composés de la solution de lyse et les enzymes cellulaires peuvent entraîner la dégradation du matériel génétique ou perturber les analyses ultérieures. Un volume 135 μ l d'acétate de sodium (3 M) est utilisé pour faire le relargage des protéines à force ionique élevée, c'est la technique de Salting-out (Dairawan et *al.*, 2020).

Les tubes sont centrifugés à 2465g pendant 10 minutes. Après centrifugation, les acides nucléiques se trouvent dans la phase aqueuse (surnageant). Le surnageant est récupéré doucement pour éviter la contamination aux débris cellulaire puis transféré dans un nouveau tube propre.

La précipitation de l'ADN est réalisée par l'addition d'un volume égale d'isopropanol froid au surnageant récupéré. C'est un bon choix pour la précipitation de l'ADN car l'isopropanol a une grande capacité à réduire la constante diélectrique de l'eau que l'éthanol. Il aussi permet d'éliminer les impuretés se forment dans l'étape précédente. L'utilisation d'isopropanol glacé est généralement pratiquée, parce que le rendement d'ADN soit augmenté à basse température.

Pour assurer la précipitation, laisse les tubes eppendorfs à température ambiante pendant 10 min, puis centrifuge à 2465g pendant 10 min à température ambiante. Après la centrifugation, le surnageant est jeté par contre le culot est lavé par l'ajout de l'éthanol 75% pour éliminer les traces de l'isopropanol de l'étape précédente. Puis, les tubes sont centrifugés à 2465g pendant 10 min à température ambiante.

Le culot est lavé la deuxième fois par l'éthanol 75%. Le précipité d'ADN résultant est séché par l'inversement du tube sur un papier absorbant pendant 15 min. Ensuite, le culot d'ADN est suspendu dans 50 μ l d'eau bidistillée stérile.

Enfin, Les échantillons d'ADN extrait sont conservés à -20 C°.

- **Avantages et inconvénients :**

Le protocole de Meru *et al.* (2013) qui basé sur l'utilisation de SDS est simple, rapide et nécessite pas des réactifs et des équipements coûteux et dangereux dans l'environnement. Aussi, il permet d'éliminer les polyphénols pouvant gêner les prochaines étapes d'analyse moléculaire, par l'utilisation des antioxydants 1% PVP et 0,2 % β -Mercaptoéthanol.

Ce protocole utilise la méthode de Salting out qui est une méthode d'extraction d'ADN non toxique (acétate de sodium 3M) par Miller, Dykes et Polesky en 1988 (Dairawan *et al.*, 2020) et elle est plus facile à appliquer, comparable à celui qui utilise le phénol et chloroforme (solvants organiques) qui sont des agents toxiques, cancérigènes et donc impraticables (Barbier *et al.*, 2019).

L'étape de lyse impact directement le rendement des acides nucléiques. La lyse doit être suffisamment puissant pour casser les cellules des échantillons (paroi, les membranes) et libérer les acides nucléiques.

Par contre, cette technique utilise un volume insuffisant de tampon de lyse (450 μ l), et nécessite un échantillon de départ important (100 mg des feuilles), ce qui induit la formation d'une pâte et la réduction de la phase aqueuse. Ce problème conduit à une lyse incomplète, comme nous avons obtenu après l'application de ce protocole sur nos échantillons.

L'extraction d'ADN à partir des plantes, présente des difficultés parce que les plantes ont une paroi cellulaire. Elles sont plus résistantes à la lyse et nécessitent l'ajout des détergents forts à concentration approprié (lyse chimique) et des enzymes (lyse enzymatique), à la solution de digestion pour le bris de la membrane. Cependant, ce protocole utilise une faible concentration de détergent (0,5% SDS) qui peut induire à une lyse cellulaire incomplète ce qui donne un faible rendement d'ADN extrait.

En plus, la méthode de purification utilisée (le Salting-out) donne des résultats de mauvaise qualité d'ADN par rapport la purification par les solvants organiques (le phénol-chloroforme) (Julie *et al.*, 2010).

Cette méthode présente un autre inconvénient représenté par une faible précipitation des filaments d'ADN extraits au cours de l'étape de l'ajout d'isopropanol froid. Elle laisse les tubes à température ambiante. En effet l'incubation d'ADN à basse température ça permet une bonne précipitation.

4.2.2.2. Protocoles optimisés

Après des essais préliminaires de protocole Meru *et al.* (2013), ils ont montré qu'il était nécessaire d'optimiser ce protocole d'extraction d'ADN, compte tenu des facteurs suivants :

- l'efficacité (sensibilité), simplicité et la rapidité ;
- la quantité et la qualité de l'ADN extrait ;
- le coût, vu le nombre important d'échantillons à extraire ;
- un protocole utilisable par notre laboratoire dont il est peu équipé.

Il est difficile d'extraire l'ADN à partir de *Vitis vinifera*, c'est à cause de la présence d'une paroi cellulaire et la richesse de cette plante en métabolites secondaire (Lodhiet *al.*, 1994). Donc, il doit être détruite la paroi cellulaire pour libérer le contenu de la cellule par l'utilisation des détergents forts à concentration appropriée (lyse chimique) et éliminer les contaminants par l'utilisation des antioxydants et des agents chimiques.

Pour bien lyser les cellules, nous avons modifié la concentration de SDS utilisé dans le protocole de base (Meru *et al.*, 2013) de 0,5 à 2%. D'après l'étude de Xia *et al.* (2019), l'utilisation de 2% SDS donne un rendement plus élevé d'ADN extrait par rapport à 0.5%, à partir de leurs résultats le rendement d'extraction obtenue est de 1800 ng/mg, alors que Meru *et al.* (2013) a obtenu un faible rendement environ 0.01 ng/mg.

En plus pour améliorer le rendement d'ADN, nous avons proposé l'utilisation de la protéinase K qui est un enzyme permet de détruire les protéines membranaires et cellulaire et même garder l'ADN intact contre la digestion enzymatique par les ADNases (Marília *et al.*, 2019).

Puis, un autre changement apporté pour améliorer l'étape de lyse, l'augmentation de temps d'incubation au bain marie de 30 min à 60 min avec une agitation chaque 5min, cette modification assure une bonne interaction entre les différents réactifs avec les protéines, polysaccharides et composées phénoliques (la lyse complète), c'est selon les études de Lencina *et al.*, 2019) et (Ghafari *et al.*, 2012).

Le ratio 260/230 est égal à 0.53 pour le protocole de Meru *et al.* (2013), indiquant une forte contamination par des composés comme les polysaccharides qui absorbent à 230 nm (Varma *et al.*, 2007), les polyphénols ou les sels...etc (Benaissa, 2008). Cette forte contamination peut expliquer par faible concentration utilisé de PVP et β -Mercaptoethanol, 1% et 0.2% respectivement. C'est pour ça, nous avons modifié les concentrations de ces réactifs pour bien éliminer les métabolites secondaires, nous avons met 2% de PVP et 1% de β -Mercaptoethanol, d'après l'étude de Nelson *et al.* (2011), l'utilisation de β -Mercaptoethanol

va éliminer les métabolites secondaires, selon leurs résultats le ratio $A_{260}/A_{230} = 2.08$ (meilleur résultat), malgré qu'ils sont extrait l'ADN à partir de 16 espèces différentes de plantes médicinales qui sont riche en métabolites secondaires surtout les polyphénols (Balunas, 2005)

Pour bien purifier l'ADN de tous les contaminants existant parmi lesquels les ARNs qui sont éliminé par l'ARNase A, dont le protocole de base n'utilise aucun produit ou des enzymes pour éliminer les ARNs. Dans notre protocole optimisé nous avons ajouté 1M de chlorure de lithium qui va précipiter les ARNs pendant l'étape de lyse (Ginwal *et al.*, 2009), il a été avantageusement remplacé l'ARNase A par le chlorure de lithium, parce qu'il est moins coûteux, dont 100g de chlorure de lithium ça coute 5683,20 DA par rapport à 34534.78 DA de 2,5 ml de l'ARNase A (quiagen).

En plus, pour améliorer la pureté d'ADN extrait nous avons rajouté le charbon actif qui empêche la solubilisation des polysaccharides et les polyphénols (Križman *et al.*, 2006). Les polysaccharides sont particulièrement problématiques car co-précipitent avec l'ADN. Ils rendent les pipetages et la migration sur gel difficiles, causent des anomalies dans les cinétiques de réassociation et interfèrent avec les activités enzymatiques telles que les ligases, nucléases (Varma *et al.*, 2007 ; Julie *et al.*, 2010). D'après les résultats de Milica *et al.* (2014), l'ajout de charbon actif améliore la pureté d'ADN extrait, dont ils ont obtenu un ratio $A_{260}/A_{230} = 1.8$, proche des valeurs théoriques attendues.

La méthode de purification appliqué par le protocole Meru *et al.* (2013) est le Salting-out (3M d'acétate de sodium) qui n'est pas bien purifié l'ADN extrait par rapport à la purification par les solvants organiques (chloroforme : alcool isoamylique) (Julie *et al.*, 2010). Donc, nous avons utilisé le mix chloroforme : alcool isoamylique qui empêche le cisaillement de l'ADN pendant l'isolement. Il va éliminer efficacement les protéines et les lipides (Tiwari, 2017), selon Ginwal *et al.* (2009) les meilleurs résultats ont été obtenus par l'utilisation de chloroforme : alcool isoamylique avec un ratio d' A_{260}/A_{280} égal à 1.98.

Nous avons modifié aussi la température de centrifugation à 4 C° au lieu de 25 C°. À partir les résultats obtenus par Benbouza *et al.* (2006), la centrifugation à 4 C° favorise l'obtention d'une interface plus compacte entre les phases aqueuses et organiques, soit après phénol ou le chloroforme, cette couche intermédiaire contient les protéines. La baisse température permet aussi une meilleure séparation entre la phase aqueuse qui contient l'ADN et la phase organique qui comporte les contaminants.

Pour améliorer l'étape de précipitation d'ADN nous avons utilisé un sel (5M NaCl) avec l'isopropanol froid suivi par un lavage par une solution de lavage (éthanol absolue avec

l'acétate d'ammonium (5 M) et l'eau bidistillée). Selon Marília *et al.* (2019), l'utilisation d'isopropanol avec le NaCl (5M) vont bien précipiter les molécules d'ADN, ce qui augmente le rendement d'ADN obtenu. En plus, selon Lencina *et al.* (2019), l'utilisation de Washing solution aide à l'élimination de toute trace d'isopropanol.

4.2.2.3. Évaluation de la rapidité, la simplicité et le coût de protocole optimisé

Dû la pandémie de coronavirus et le confinement appliqué sur les établissements les universités, nous n'avons pas terminé notre travail et les résultats obtenus sont insuffisants qui sont de quelques profils électrophorétiques d'ADN extrait. C'est pour ça, les deux protocoles (de référence et optimisé) seront évalués en termes de simplicité et rapidité (tableau 07), et aussi le coût de chaque protocole sera vérifié (tableau 08).

D'après le tableau 07 le protocole optimisé semble facile à appliquer et il y a la possibilité de traiter plusieurs échantillons en même temps, malgré nous avons ajouté des étapes pour améliorer le rendement d'extraction par l'augmentation de la durée de lyse des cellules de 30 à 60min avec l'ajout d'une étape de précipitation au sel et doubles lavages à l'éthanol pour bien purifier d'ADN. Malgré ça, le protocole optimisé ne prend pas beaucoup de temps pour extraire l'ADN, environ 2 heures d'application.

Tableau 07. Evaluation des protocoles en termes de rapidité.

	Durée d'application				Nombre d'échantillons traités à la fois
	Etape de lyse	Etape de purification	Etape de précipitation	totale	
Protocole de référence de Meru <i>et al.</i> (2013)	30 min	10 min	55 min	1h 35 min	Possibilité de traiter plus d'échantillons, moins de manipulations
Protocole optimisé (P3)	1h 5 min	5 min	45 min	1h 55 min	Possibilité de traiter plus d'échantillons, moins de manipulations

Le coût par échantillon extrait a été calculé. Il représente un coût acceptable (22.2478 DA) du coût d'un échantillon extrait avec le protocole P0 de Meru *et al.* (2013) (16.5239 DA).

Tableau 08. Etude de coût de l'extraction d'ADN génomique pour un échantillon par le protocole optimisé (3) et le protocole avant optimisation (0).

produits	Prix de produit en DA	Protocole 0		Protocole 3	
		Quantité utilisée en (g) ou (ml)	Prix de la quantité utilisée en DA	Quantité utilisée en (g) ou (ml)	Prix de la quantité utilisée en DA
SDS (1Kg)	943.61	0.00225	0.00212	0.02	0.0189
PVP (100g)	22352. 18	0.0045	1.0058	0.02	4.470
LiCl (100g)	5683.20	/	/	0.00007	0.004
Charbon actif (1Kg)	14100.00	/	/	0.005	0.0705
Tris-HCl (500g)	28201. 66	0.01409	0.795	0.03132	1.766
EDTA (1Kg)	6916,00	0.004	0.028	0.007	0.048
NaCl (1Kg)	1850,00	0.006	0.011	0.006	0.011
B- Mercaptoethanol (1 Kg)	3400,00	0.0009	0.003	0.01	0.034
Protéinase K (500 mg)	69700,00	/	/	0.0003	0.0418
Acétate de sodium (1Kg)	12624, 74	0.1837	2.319	/	/
Chloroforme (2.5 L)	5500.00	/	/	0.6	1.32
Isopropanol (500 ml)	11800, 00	0.500	11.8	0.420	9.912

Ethanol absolu 99 % (2,5 L)	2800.00	0.500	0.56	1,38	1,545
Acétate d'ammonium	3900.00	/	/	0.3854	3.00621
Prix total			16.5239		22.2478

4.2.3. Les difficultés retrouvées au niveau de notre laboratoire

Les analyses de biologie moléculaire nécessitent réglementairement trois zones pour la préparation des réactifs, la préparation des échantillons et la réaction d'amplification proprement dite. Soit on peut diviser le labo en deux zones, la zone des activités pré-PCR (la préparation des réactifs et des échantillons, l'extraction d'ADN) et la zone des activités post-PCR. La séparation entre ces zones doit être absolue. Mais au niveau notre département, il n'y a pas un laboratoire spécial de biologie moléculaire ce qui peut augmenter les risques de contaminations (l'ADN amplifié étant très contaminant pour l'ADN non amplifié). Pas d'un espace aménagé pour revêtir et enlever les vêtements et équipements de protection.

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. Le manque de matériel (pas de masque ou de lunettes disponibles, hotte déjà occupée).

Conclusion

Et perspectives

Conclusion et perspectives

L'objectif de notre travail est la mise au point d'un protocole d'extraction d'ADN afin d'obtenir un ADN de bonne quantité et de bonne qualité, simple, rapide, moins couteux et réalisable selon la disponibilité des réactifs et des matériels au niveau de notre laboratoire d'EL-Hadjeb, en comparant les résultats des concentrations et des rendements obtenus du protocole optimisé avec les résultats de protocole de base.

Au cours de cette étude, nous avons réussi de valider d'une part l'efficacité des méthodes de séchage et d'autre part la conservation à longue durée de nos échantillons.

Nous avons appliqué le protocole de référence de Meru *et al.* (2013), à partir des jeunes feuilles déshydratées de la vigne (à l'étuve ventilée et par le lyophilisateur) et conservées a long durée à température ambiante ; qui sont broyées dans un mortier et sans l'utilisation de l'azote liquide, les résultats obtenus de ce protocole n'étaient pas satisfaisants. C'est pour ça, nous avons optimisé le protocole de base par des modifications des différentes étapes, nous avons augmenté le volume de tampon de lyse à 1ml et la concentration de SDS à 2%, PVP à 2% et β -Mercaptoethanol à 1% et diminuer la concentration de EDTA à 20 mM. Nous avons ajouté des réactifs qui améliorent le rendement d'ADN telle que : la protéinase K ; et d'autres qui améliorent la pureté d'ADN telle que : Chlorure de lithium (1M), Charbon actif (0.5%) avec un changement de durée d'incubation à 60 minutes, et remplacement de l'étape de purification (Salting-out) par le chloroforme-alcool isoamylique. La précipitation d'ADN se fait par l'ajoute d'isopropanol froid et NaCl (5M) avec une incubation à -20 C° durant 10 min. Un double lavage s'effectué par washing solution contient l'éthanol absolue, d'acétate d'ammonium (5M) et d'eau bidistillée avec une incubation à -20 C°. Ces toutes ces modifications apportées pour améliorer la pureté et la quantité d'ADN extrait. Le protocole optimisé est de coût raisonnable (22.2478 DA/Echantillon) ainsi que sa durée d'application est environ (1h 55 min) donc ce protocole est tout à fait applicable en routine.

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

Les perspectives pour la continuation de notre travail expérimental :

- Utiliser d'autres techniques précises pour la détermination de la quantité d'ADN extrait tels que dosage au Nanodrop et par fluorimétrie ;
- Faire un séquençage pour créer des cartes génomiques de la vigne algérienne.

Bibliographie

Bibliographie

1. Achour Hanane, 2015. Analyse mutationnelle du gène suppresseur de tumeur p53 dans le cancer du sein : A propos de cas cliniques d'une population Algérienne. Thèse de magister, université Mohamed Khider, Biskra, 49 p.
2. Abdellaoui Raoudha, Sayah Amel, Gouja Hassen & Ouled Belgacem Azeiz, 2012 Extraction de l'ADN et optimisation de la PCR (Polymorphism Chain Reaction) pour l'application des marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) chez *Stipa lagascae*, Acta Botanica Gallica, 159:1, 73-78p.
3. Agouazi Ounissa, 2013. Contribution à la caractérisation physico-chimique de cépages de *Vitis vinifera ssp. vinifera* autochtones d'Algérie. Mémoire de Magister en Sciences Agronomiques Spécialité : Sciences de la Vigne et Préservation des Ressources Phytogénétique. Université Mouloud MAMMERRI de Tizi Ouzou (UMMTO), p. 1-6.
4. Alain Reynier, 2012. Manuel de viticulture. Lavoisier, 11e édition, TEC DOC, p. 91-93.
5. Allen G.C., Flores-Vergara M.A., Krasynanski S., Kumar S., Thompson W.F. 2006. A modified protocol for rapide DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide, p.2320.
6. André Luís F. Santos, Carolina Q. P. Oliveira, Geovana Nicole P. N. Arruda, John Kenned Martins, 2018. Comparison of DNA extraction using Proteinase K and extraction kit: analysis of the quality of the genetic material. J Bras Patol Med Lab. 2018 Apr; 54(2): 70-75.
7. Arvind Soni, Anil Kumar, 2009. Protocol for improved extraction and PCR amplification of genomic DNA from liverwort, *plagiochasma appendiculatum*. Indian journal of Experimental Biology. Vol.47, November 2009, pp.921-924.
8. Balunas, M.J. and A.D. Kinghorn. 2005. Drug discovery from medicinal plants. Life Sci. 78, 431-441.
9. Barbier François F., Tinashe G. Chabikwa , Muhammad U. Ahsan , Stacey E. Cook , Rosanna Powell , Milos Tanurdzic and Christine A. Beveridg, 2019. A phenol/chloroform-free method to extract nucleic acids from recalcitrant, woody tropical species for gene expression and sequencing. Barbier et al. Plant Methods (2019) 15:62. 2-13p.

10. Belaid Djamel, 2017. ALGERIE: renouveau de la viticulture. Collection Brochures Agronomiques, Une histoire de la viticulture algérienne et de ses vins. Edition 2017.
11. Benabderabou, L. L, 1971. Ampélographie algérienne : cépages de cuve et de table cultivés en Algérie. Alger : société générale d'édition et de diffusion.
12. Benaissa Keltoum, 2008. Caractérisation moléculaire de quelques espèces légumières. Mémoire de magister. Université SAAD DAHLAB de BLIDA. p 68-76.
13. Benbouza Halima, Jean-Pierre Baudoin, Guy Mergeai, 2006. Amélioration de la méthode d'extraction d'ADN au CTAB appliquée aux feuilles de cotonnier. Phytotechnie tropicale et d'Horticulture 10 (2) : 73 – 76.
14. Benedit Stéphane et Pierre Barret, 2018. Technique d'extraction d'ADN génomique de végétaux permettant l'amplification de long fragments à partir d'une petite quantité de matériel. Le Cahier des Techniques de l'INRA 2018 (95).
15. Ben larbi M., Naouaria G., Yahyaoui M. H. et Hadded B, 2014. Etude technico-économique de méthodes d'extraction de l'ADN chez le lapin Européen (*Oryctolagus cuniculus*) à partir du sang. Journal of New Sciences 5(1) : 5-6.
16. Bienvenu T., Meunier C., Bousquet S., Chiron S., Richard L., Gautheret-Dejean A., Rouselle J.-F., Feldmann D, 1999. Annales de Biologie Clinique, Vol. 57, Paris, p.77-84.
17. Blanc Sophie, 2012. Cartographie génétique et analyse de la résistance au mildiou et l'oïdium de la vigne chez *Muscadinia Rotundifolia*. Thèse de doctorat. Université Strasbourg. Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé. p 9-17.
18. Boukhari Dalale, 2014. Recherche des polymorphismes nucléiques des gènes de répétition par recombinaison homologue (RAD 51, XRCC2 et 3) et risque de cancer du sein chez les femmes Algériennes. Mémoire de Magister. Université Mohamed Khider Biskra. p
19. Bounab Ouarda, 2013. Influence de l'ablation des prompt-bourgeons sur la croissance du rameau principal de la vigne (*Vitis vinifera* L.): mise en évidence des corrélations de croissance: Agronomie. Thèse de magister, Université 20 Août 1955, Skikda. 65 p.
20. Caid Nabila, Mustapha Chachoua et Faouzi Berrichi, 2019. Analyse spatiale diachronique du vignoble algérien depuis 60 ans : cas de wilaya de Mostaganem.

21. Camps Céline. 2008. Etude transcriptomique de la réponse. Thèse de doctorat. Université de POITIERS. p 3.
22. Carrier G. 2011. Bases moléculaires de la variation clonale chez la vigne (*Vitis vinifera L.*): approche pangénomique. Thèse de doctorat, Montpellier, Sup Agro. p12-15.
23. Dairawan Mariyam, Preetha J Shetty, 2020. The Evolution of DNA Extraction Methods. American Journal of Biomedical Science & Research, -8(1). AJBSR. MS. ID. 001234. 39p.
24. Denis T., Possamai S. J. et Méreau A. 2018. Principe des techniques de biologie moléculaire et génomique. 3ème édition, Quae, France. p. 47.
25. Desage Simon, Matthieu Toulemonde, 2009. Projet thématique tutoré. La Lyophilisation ou Cryodessiccation. Université Jean Monnet de Saint-Etienne. p 2-11.
26. Devriese Herman, Fraeyman Norbert, Potvliege Catherine, Reybrouck Gerald, Verschraegen Gerda, Woiche Christian, Zumofen Michèle, 2005. Recommandations en matière de gestion des déchets de soins de santé, Conseil Supérieur d'hygiène. p14.
27. Duchene Eric, 2015. Une exploration des possibilités génétique pour l'adaptation de la vigne au changement climatique. Thèse de doctorat. Université Strasbourg. p38.
28. Eni Bogdani, 2011. Étude expérimentale et optimisation du procédé de lyophilisation de l'ibuprofène en milieu organique. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard - Lyon I, Français. p2-17.
29. Ezzouhra El Maaiden, Youssef El Kharrassi, Abdel Khalid Essamadi, Khadija Moustaid and Boubker Nasser, 2019. Improved Method for DNA Extraction and Purification from *Tetrahymena pyriformis*. Acta Scientiarum. Agronomy, Maringá, v. 36, n. 3, p. 301-308, July-Sept., 2014.
30. Fodor Agota, 2016. La sélection génomique appliquée à l'espèce *Vitis vinifera L. subsp. Vinifera*, évaluation et utilisation. Thèse de doctorat. Préparée au sein de l'école doctorale SIBAGHE Et de l'unité de recherche UMT Geno-Vigne, IFV-INRA Montpellier Supagro p24.
31. Funk VA, Gostel M, Devine A, Kelloff CL, 2017. Guidelines for collecting vouchers and tissues intended for genomic work (Smithsonian Institution): Botany best practices. Biodivers. Data J. 5 : e11625.

-
32. Galet P., 1988. Cépages et vignobles de France : Les vignes américaines. 2^{ème} édition. T1. Dehan. Montpellier.
33. Galet P., 2000 - Précis de pathologie viticole. 7eme édition. Ed : Déhan, Montpellier, 602.
34. Ghaffari Sana, Nejib Hasnaoui, Ali Ferchichi, 2011. Rapid, High Quality DNA Isolation from Tunisian Grapevine (*Vitis vinifera L.*) Cultivars and Optimization of the RAPD Marker Technique. Romanian Biotechnological Letters, Copyright 2011 University of Bucharest. Vol. 16, No. 1, p 5881.
35. Ginwal H S, Neha Mittal, 2009. An efficient genomic DNA isolation protocol for RAPD and SSR analysis in *Acoruscalamus L.* Indian journal of Biotechnology, Vol9, April, pp213-216.
36. Gostel MR, Kelloff C, Wallick K and Funk VA, 2016. A workflow to preserve genome-quality tissue samples from plants in botanical gardens and arboreta. Appl. Plant Sci. 4: 1600039.
37. Goossens M, 1990. L'amplification des séquences de nucléotide par PCR et les nouvelles techniques de diagnostic. 8 e Réunion de la Société Française pour l'Étude de la Fertilité; Paris, 19-21 octobre 1989. Reprod Nutr dev(1990) supp 1, 117s-124s.
38. Hansse Gluszak Justine, 2019. Les vertus méconnues de la vigne et du raisin. Thèse de doctorat. Université de Lille. p 24.
39. Heikrujam Jina, Kishor Rajkumar, Mazumder Pranab Behari, 2020. Biochemical Analysis Tools - Methods for Bio-Molecules Studies. India, Chapitre : The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols. p3.
40. Hichri Iméne, 2009. Identification et caractérisation fonctionnelle de gènes régulateurs de la voie de biosynthèse des flavonoïdes chez la vigne. Thèse de doctorat. Université Bordeaux 1. p19.
41. Holzapfel Marion, 2018. De l'épidémiologie moléculaire aux analyses fonctionnelles de Brucella chez les ruminants, une approche intégrée pour l'identification et l'étude de la diversité phénotypique d'un genre génétiquement homogène. Thèse de doctorat. Université PARIS-EST, école doctorale abies. p 49.
42. Joëlle Brodeur, Martin Toussaint, 2007. Biologie moléculaire concepts. Technique. Application. CCDMD, Canada, Chapitre: 6 .

43. Julie Ripoll, Marie-Claude Bon, Walker Jones, 2010. 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.* 011 15(1), 95-100.
44. Khanuja SPS, Shasany AK, Darokar MP and Kumar S, 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Mol. Biol. Rep.* 17: 1-7.
45. Križman Mitja, Jernej jakše, Dea Baričević, Branka Javornik, Mirko Prošek, 2006. Robust CTAB-activated charcoal protocol for plant DNA extraction, *Acta agriculturae Slovenica*, 87 - 2, September, str. 427 – 433.
46. Kunal A. Gaidhani, Mallinath Harwalkar, Deepak Bhambere, Pallavi S. Nirgude, 2015. Lyophilization / freeze drying. *World Journal of Pharmaceutical Research* SJIF Impact Factor 5.990 Volume 4, Issue 8, 516-543.
47. Lencina K.H., J.M.B. Freitas, L. Essi, N. Pimentel and D.A. Bisognin, 2019. Improved methods for storing and extracting DNA from *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) tissue samples. *Genetics and Molecular Research* 18 (3): gmr18390.
48. Limier Bertrand, 2016. Approche éco-anatomique du bois de vigne (*Vitis vinifera* L) pour une meilleure connaissance de l'histoire de la viticulture en Méditerranée nord-occidentale. *École pratique des hautes études*. p19.
49. 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 *Ampelopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.12, p.6-13.
50. Marília Souza Lucas, Carolina da Silva Carvalho, Giovane Böerner Hypolito and Marina Corrêa Côrtes, 2019. Optimized protocol to isolate high quality genomic DNA from different tissues of a palm species. *Hoehnea* 46(2): e942018, 3 tab., 2 fig.
51. Meru G., Mc Dowell D., Waters V., Seibel A., Davis J. and McGregor C, 2013. A non-destructive genotyping system from a single seed for marker-assisted selection in watermelon. *Genetics and Molecular Research* 12 (1): 702-709.
52. Moussi Wahiba, Khaled Selatnia., 2019. Oasian Berber Architecture: the red village ELKANTARA, BISKRA. *International Journal of Human Settlements* Vol. 3 Nr. 2. p 47.

-
- 53.** Murray, M.G. and Thompson, W.F, 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321–4325.
- 54.** Nagy ZT, 2010. A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses. *Org. Divers. Evol.* 10 : 91-105.
- 55.** Nelson Enrique Vega-Vela, Maria Isabel Chacon Sanchez, 2011. Isolation of high quality DNA in 16 aromatic and medicinal Colombian species using silica-based extraction columns. *Agronomia Colombiana* 29(3), 349, 357.
- 56.** Onnier Laure, 1999. Techniques de biologie moléculaire (RAPD-PCR, PCR allèle spécifique) appliquées à la caractérisation d'un vecteur du paludisme en Asie du sud-est, *anophelesdirus*. Stage Ingénieur. Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier. p 24.
- 57.** Patrícia Coelho de Souza Leão and Sérgio Yoshimitsu Motoike, 2011. Genetic diversity in table grapes based on RAPD and microsatellite markers. *Pesq. agropec. bras.* Brasília, v.46, n.9, p.1035-1044, set. 2011.
- 58.** Puchooa, D, 2004. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *Afr. J. Biotechnology.* 3, 253–255.
- 59.** Porebski S, Bailey LG and Baum BR, 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15: 8-15.
- 60.** Raimundo Joana, Carlos Manuel Gaspar Reis, Maria Margarida Ribeiro, 2018. Rapid, simple and potentially universal method for DNA extraction from *Opuntia* spp. fresh cladode tissues suitable for PCR amplification. *Molecular Biology Reports.*
- 61.** Reddahi Meriam, 2017. PCR en temps réel : principe et application. Thèse de doctorat. Université MOHAMMED V- RABAT. p 8-17.
- 62.** Reynier A., 1989. Manuel de viticulture. 5e édition. J.L. Bailliere. Paris. 406p.
- 63.** Reynier A., 2007. Manuel de viticulture. 10^{ème} éd. Lavoisier Tec & Doc. Paris. 600p
- 64.** Romon Marjorie, 2013. Rôle du gène de floraison VvFT dans la mise en place de la floraison chez la vigne. Thèse de doctorat. Université Strasbourg. p 25.
- 65.** Schuck Mariane Ruzza, Luiz Antonio Biasi, Flavia Maia Moreira, Aparecido Lima da Silva, Summaira Riaz and Michael Andrew Walker, 2014. Use of microsatellite markers to

assess the identity and genetic diversity of *Vitis labrusca* and *Vitis rotundifolia* cultivars. Acta Scientiarum. Agronomy Maringá, v. 36, n. 3 , p. 301-308, July-Sept.

66. Sebki Salima, 2014. Contribution à l'étude de la sensibilité au phylloxéra vastatrix (Homoptera : Phylloxeridae) des cépages de *Vitis vinifera* L.ssp.Vinifera autochones d'Algérie. Mémoire de Magister. Université Mouloud MAMMARI de TIZIOUZOU. p16.

67. Sharma H. P, 2012. Plant tissue culture: totipotency to transgenic. A monthly magazine of agriculture and biological sciences AGROBIOS. Vol. XI. Issue N° 01, p. 6 - 8.

68. Simon J-L., Eggenberger W., Koblet W., Mischler M. et Schwarzenba.CH. J., 1992. Viticulture. 3ème Ed. Payot Lausanne la Maison Rustique. Paris. 223p.

69. Tellaa Redouane, 2013. Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic des infections fongiques invasives revue de la littérature. Thèse de doctorat. Université Mohammed v –souissi. p 19-32.

70. Thomas, M.R.; Scott, N.S, 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). Theoretical and Applied Genetics, v.86, p.985-990.

71. Thorne Christopher, 2015. Développement de suspensions liposomales pour l'administration d'une substance médicamenteuse difficilement formulable. Thèse de doctorat. Université JOSEPH FOURIER.

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

73. Varma, A., Padh, H., Shrivastavan, N. 2007. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. Biotechnology Journal 2: 386-92

74. Varner, J.E. & Lin, L.-S, 1989. Plant cell wall architecture. Cell 56: 231-239.

75. Wang W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. International journal of pharmaceutics, 2000; 20: 1-60.

76. Xia Yimiao Fusheng Chen, Yan Du, Chen Liu, Guanhao Bu, Ying Xin and Boye Liu, 2019. A modified SDS-based DNA extraction method from raw soybean, Bioscience Reports (2019) 39 BSR20182271.

77. Zafrani F. Uhel, L., 2019. Nouvelles techniques de biologie moléculaire New Techniques in Molecular Biology. Méd. Intensive Réa, DOI 10.3166/rea-2019-0119.

Annexes

Annexes

Annexe 1.

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

➤ Réactifs utilisés.

Le produit chimique/formule chimique	Fournisseur	Pays de fabrication
2-Mercaptoéthanol (HSCH ₂ CH ₂ OH)	Merck Schuchardt OHG	Allemagne
Acétate de sodium anhydre	SIGMA-ALDRICH	Allemagne
Agarose	SIGMA life science	Etats-Unis
Alcool isoamylique (3Methylbutanol) C ₅ H ₁₂ O	SIGMA-ALDRICH	Allemagne
BET	SIGMA-ALDRICH	France
Bleu de bromophénol	CARLO ERBA reagents	Italie
Chloroforme CHCl ₃	SIGMA-ALDRICH	France
Chlorure de sodium (NaCl)	Honeywell Fluka	Danemark
EDTA di sodium Ethylenediaminetetraacetic acide di sodium (C ₁₀ H ₁₄ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O)	BIOCHEM Chemopharma	Québec
Ethanol C ₂ H ₅ OH	Honeywell Riedel-de Haen	Allemagne
Gel de silice	ISOLAB	
Glycérol	SIGMA-ALDRICH	Allemagne

Isopropanol C ₃ H ₈ O	QUICK service	France
Polyvinylpyrrolone (C ₆ H ₉ NO) _n	BIOCHEM Chemopharma	USA
Protéinase K	SIGMA life science	Etats-Unis
SDS C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	Sigma-Aldrich	Danemark
Tris HCL	SIGMA life science	Etats-Unis

➤ **Matériels utilisés.**

Le matériel utilisé au cours de l'extraction :

- Bêchers (25, 50, 250,500 ml) en verre et en plastique.
- Barreau magnétique de tailles différentes + baguette.
- Micropipettes (10, 20, 100, 200,1000 µl) variables et fixes.
- Embouts (Blanc, Jaune, Bleu).
- Epprouvettes (25, 50, 250,500 ml) en verre et en plastique.
- Eppendorf (1.5 et 2 ml).
- Tubes secs (5 et 10 ml) en verre.
- Flacons en verre.
- Portoir.

Appareilles utilisés dans l'extraction d'ADN :

Matériel	fournisseur
Agitateur plaque chauffante	ISOLAB Laborgeräte GmbH
Bain Marie	Memmert
Balance	KERN ABJ
Centrifugeuse (mini spin)	Eppendorf Minispin
Congélateur (-20°C)	Haier
Caméra	Doc-Print VX2
Etuve ventilé	Memmert

Générateur pour électrophorèse	Consort EV265
La hotte chimique	Exosafe
Lyophilisateur	VirTis SP SCIENTIFIC
PH mètre	OHAUS
Spectrophotomètre	UV-2005 J.P. SELECTA
Table U.V.	VILBER LOURMAT
Thermocycleur	Prime
Vortex	Zx3VELP Scientifica

Annexe 2.

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

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

Annexe 3.

Préparation de TAE 1X (pH 8,0) :

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

ملخص

تعتبر الكرمة من أقدم الثقافات في شمال إفريقيا والجزائر على وجه الخصوص. وهي من أكثر أنواع الفاكهة المزروعة في العالم من حيث المساحة والقيمة الاقتصادية. يؤدي التنوع الجيني للكرمة إلى وجود أنواع مختلفة، ويتطلب تحديدها الجيني طرقاً في علم الأحياء الجزيئي تبدأ بخطوة مهمة، وهي استخراج الحمض النووي.

تتعلق دراستنا، باستخراج الحمض النووي الجيني من الأوراق الصغيرة المجففة بالتجميد لأصناف محلية من الكرمة. يتم تخزين هذه الأوراق لفترة طويلة دون حدوث تغير في الحمض النووي الجيني. حيث تحصلنا على حمض نووي جيني ذو نوعية جيدة من الأوراق المجففة بالتجميد وهذا مبين في نتائج الرحلان الكهربائي. لقد قمنا بتحسين بروتوكول الاستخراج الذي يستخدم SDS من أجل الحصول على بروتوكول فعال وبسيط وسريع (1س55 د) وأقل تكلفة (22.2478 دج للعينة الواحدة) ويمكن تطبيقه في مختبرنا.

الكلمات المفتاحية: الكرمة، الأوراق المجففة بالتجميد، استخلاص الحمض النووي، SDS.

Résumé

La vigne est une des cultures les plus anciennes de l'Afrique du Nord et de l'Algérie en particulier. Elle est l'une des espèces fruitières les plus cultivées dans le monde en termes de surface et de valeur économiques. La diversité génétique de la vigne conduit à l'existence de différentes variétés et espèces, leur identification génétique nécessite des méthodes de biologie moléculaire qui débutent par une étape primordiale c'est l'extraction d'ADN.

Notre étude est concerné l'extraction d'ADN génomique à partir des jeunes feuilles lyophilisées des variétés locales de la vigne. Ces feuilles sont conservées pendant long durée sans altérer l'ADN génomique, dont les résultats d'extraction à partir les feuilles lyophilisées sont satisfaisants, d'après les profils électrophorétique l'ADN extrait est en bonne qualité. Ainsi, nous avons optimisé un protocole d'extraction qui utilise SDS afin d'obtenir un protocole simple, rapide (1h 55 min), de coût raisonnable (22.2478DA) et réalisable au niveau de notre laboratoire.

Mots clés : vigne, feuilles lyophilisées, extraction d'ADN génomique, SDS.

Abstract

The vine is one of the oldest cultures in North Africa and in Algeria in particular. It is one of the most cultivated fruit species in the world in terms of area and economic value. The genetic diversity of the grapevine leads to the existence of different varieties and species, their genetic identification requires molecular biology methods, which begin with an essential step, which is DNA extraction.

Our study concerns the extraction of genomic DNA from the freeze-dried young leaves of local varieties of the vine. These leaves are stored for a long time without altering the genomic DNA, whose extraction results from the lyophilized leaves are satisfactory, according to the profils electrophoretically, the extracted DNA is of good quality. We have therefore optimized a protocol which uses SDS in order to obtain a protocol simple, rapid (1h 55 min), inexpensive (22.2478 DA) extraction protocol that can be carried out in our laboratory.

Key words : vine, lyophilized leaves, extraction of DNA, SDS.