



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

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :

Somia KARBO et Aicha MEGHAZI

Le : 26/10/2020

Thème

**Évaluation de deux méthodes d'extraction de l'ADN
total des acridiens**

Jury :

Mme. Fatiha BENGURAICHI	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. Bahia BACHA	MAA	Université de Biskra	Président
Mme. Aicha MEDJADBA	MAB	Université de Biskra	Examineur

Remerciements

Ce mémoire doit beaucoup aux nombreuses personnes qui nous ont encouragé, soutenu et conforté au long de toutes ces années. Qu'elles trouvent dans ce travail l'expression de nos plus sincères remerciements.

Nous remercions tout particulièrement :

✓ notre encadreur Mme. Fatiha Benguraichi pour avoir proposé, accepté et encadré ce mémoire, pour son encouragement, ses conseils précieux, sa disponibilité, ses suggestions pertinentes, ses critiques constructives et pour sa patience tout au long de ce projet et sans lesquels, ce travail n'aurait pu aboutir.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à M Mohammed SORTI, qui nous a fournis de l'azote liquide et nous a permis de travailler dans son laboratoire.

*Nous remercions les membres du jury Mme. Aicha Medjadba et
Mme Bahia Bacha, d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire.*

Dédicace

*Nous dédions notre travail à nos parents, qu'ils
trouvent ici toute nos gratitude pour leur soutien
tout au long de nos études.*

A nos frères et nos sœurs.

Table des matières

Liste des tableaux	□
Liste des figures	□
Liste des abréviations.....	□
Introduction	1

Première partie. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Extraction d'ADN

1. Méthodes d'extraction d'ADN	4
1.1 Lyse cellulaire	Erreur ! Signet non défini.
1.2 Tampon de lyse	Erreur ! Signet non défini.
1.3 Précipitation des protéines	Erreur ! Signet non défini.
1.4 Précipitation d'ADN	Erreur ! Signet non défini.
1.5 Dissolution de l'ADN.....	6

Chapitre 2. Importance des acridiens

2.1 Orthoptères.....	9
2.2 Caelifères.....	10
2.3 Acrididae.....	10
2.4 Importance des acridiens.....	10

Deuxième partie.12 PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 3. Matériel et méthodes

3. Matériel et méthodes.....	14
3.1. Echantillonnage des acridiens.....	14
3.2. Protocole d'extraction d'ADN selon H. Chen et al. (2010) modifié.....	14
3.2.1. Préparation des tampons de lyse.....	14
3.1.2. Estimation de la concentration de l'ADN et contrôle de leur qualité	14
3.1.2.1. Estimation de la concentration de l'ADN par spectrophotomètre Nanodrop.....	16
3.1.3.2. Contrôle de la qualité d'ADN par l'électrophorèse sur geld'agarose.....	16
3.1.3. Amplification du gène COI par PCR	19

Chapitre 4. Résultats et discussion

4. Résultat.....	22
------------------	----

4.1. Poids de tissus musculaires et rendement d'ADN.....	22
4.2. Taux de rendement d'ADN et rapport d'absorbance.....	23
4.3. Analyse par électrophorèse de l'ADN extrait.....	24
4.4. Amplification du gène COI par PCR.....	26
5. Discussion.....	28
Conclusion.....	30
Bibliographie.....	32

Liste des tableaux

Tableau 1. Programme de PCR pour le gène COI.....	20
Tableau 2. Rendement et rapport d'absorbance d'ADN extrait par les deux méthodes SDS et CTAB.....	23

Liste des figures

Figure 1. Phylogénie des Caelifera.....	9
Figure 2. Un gel d'agarose solidifié après le retrait du peigne.....	17
Figure 3. Ajouter le colorant de charge aux échantillons d'ADN extraits.....	18
Figure 4. Chargement de l'échantillon d'ADN dans un puits dans le gel.....	18
Figure 5. Courbe des concentrations (ng/mg) en fonction du poids des tissus (mg) utilisés pour l'extraction d'ADN génomiques par la méthode SDS.....	22
Figure 6. Courbe des concentrations (ng/mg) en fonction du poids des tissus (mg) utilisés pour l'extraction d'ADN génomiques par la méthode CTAB.....	23
Figure 7. Photographie de profile électrophorétique de l'ADN extrait par SDS.	25
Figure 8. Photographie de profile électrophorétique de l'ADN extrait par CTAB.	26
Figure 9. Photographie de profiles électrophorétique représentant le produit de PCR correspondant au fragment cible de 669 pb du gène COL.....	27

Liste des abréviations

ADN: Acide DésoxyriboNucléique.

ARN: Acide RiboNucléique

BET: Bromure d' ETHidium

COI : Cytochrome Oxydase sous-unité I

CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromude.

DO: Densité Optique.

EDTA: Éthylène Diamine Tétra Acétique.

pb: paire de bases

PCR : Polymérase Chain Réaction

SDS : Dodécyl Sulfate de Sodium

U.V: Ultra Violet

w/v: weight (mass)/ volume

Introduction

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire, y compris l'identification moléculaire, l'inférence phylogénétique. L'extraction d'ADN est souvent utilisée dans les examens médicaux, les diagnostics cliniques et les investigations médico-légales. De plus, l'analyse de la variation génétique utilisant polymorphismes des acides désoxyribonucléiques (ADN) est devenue un outil important pour accéder l'histoire évolutive, la diversité génétique, l'identification des souches cellulaires, bactériennes et virales, ainsi que certains problèmes écologique et programmes d'amélioration génétique (Badenhausser, 2012).

Une variété de méthodes d'extraction d'ADN a été décrite pour différents groupes et différents matériels biologiques, et de nombreux kits commerciaux sont disponibles. La principale préoccupation de ces méthodes est la quantité et la qualité de l'ADN extrait ainsi que le coût (H. Chenet *al.*, 2010).

Les Orthoptères, en particulier les criquets (Orthoptera: Acrididae), forment une composante importante des écosystèmes prairiaux. Ce sont des proies de prédilection pour de nombreux prédateurs invertébrés (araignées, autres insectes) et vertébrés (reptiles, mammifères, oiseaux), en particulier pour les oiseaux dont le déclin est pour partie expliqué par la raréfaction de la ressource alimentaire, du fait de leur herbivore, les criquets sont très dépendants de la végétation, ce qui en fait des indicateurs de plus en plus reconnus pour traduire, de par la structure de leurs communautés, le niveau de perturbation anthropique et la qualité des milieux. Les criquets sont des ravageurs majeurs dans de nombreuses régions du monde, qui peuvent former une migration dense essaims et présentent un polyphénisme de phase dépendant de la densité (Badenhausser, 2012).

L'objectif de notre travail est d'extraire de l'ADN pur et intact des acridiens. Selon les conditions de cette année et les réactifs disponibles au notre laboratoire ; les extractions fait par la méthode SDS et la méthode CTAB ont été comparées en termes de quantité et de qualité d'ADN extrait et ont été évaluée par un test d'amplification du gène Cytochrome Oxydase sous-unité I (COI) du génome mitochondrial.

Première partie
PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

Extraction d'ADN

1. Méthodes d'extraction d'ADN

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans les études de biologie moléculaire (El-Ashramet *al.*, 2016).

L'extraction d'ADN est une étape de routine dans de nombreuses études biologiques, et compris l'identification moléculaire, l'inférence phylogénétique, la génétique et la génomique. De plus, l'extraction d'ADN est souvent utilisée dans les examens médicaux, les diagnostics cliniques et les investigations médico-légales. Par conséquent, une variété de méthodes a été établie pour isoler les molécules d'ADN des matériaux biologiques. L'ADN extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage (H. Chenet *al.*, 2010).

Différentes méthodes ont différents effets sur l'extraction d'ADN. Une technique d'extraction idéale devrait optimiser le rendement en ADN, minimiser la dégradation de l'ADN et être efficace en termes de coût, de temps, de main-d'œuvre et de fournitures. Il doit également être adapté à l'extraction de plusieurs échantillons et générer un minimum de déchets dangereux (H. Chenet *al.*, 2010).

L'extraction d'acides nucléiques d'un matériau biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité de débris cellulaires. La procédure de lyse idéale est souvent un compromis de techniques et doit être suffisamment rigoureuse pour briser le matériau de départ complexe (par exemple, le tissu), mais suffisamment douce pour préserver l'acide nucléique cible. Les procédures de lyse courantes sont les suivantes :

- la rupture mécanique (ex. : broyage ou lyse hypotonique),
- le traitement chimique (ex.: lyse détergente, agents chao tropiques, réduction des thiols)
- et la digestion enzymatique (ex.: protéinase K). La rupture de la membrane et l'inactivation des nucléases intracellulaires peuvent être combinées. À titre d'exemple, une solution simple peut contenir des détergents pour solubiliser les membranes cellulaires et des sels chao tropiques puissants pour inactiver les enzymes intracellulaires. Après la lyse cellulaire et l'inactivation du nucléase, les débris cellulaires peuvent être aisément retirés par filtrage ou par précipitation (Somma, 2007).

Les différents protocoles suivent approximativement le même schéma de principe :

- lyse cellulaire ou homogénéisation,
- précipitation des protéines,
- précipitation de l'ADN,
- dissolution de l'ADN.

1.1 Lyse cellulaire

La lyse est la destruction de la membrane d'une cellule biologique par un agent physique, chimique ou biologique. Avant l'extraction d'ADN une lyse cellulaire doit être faite, Il existe différentes méthodes de préparation des lysats cellulaires telles que le broyage mécanique, la sonication, la lyse enzymatique, la lyse chimique, la congélation, etc. Pour afin faire sortir et d'obtenir du matériel génétique de l'échantillon (Lu *et al.*, 2005).

1.2 Tampon de lyse

L'étape de l'homogénéisation consiste à perturber les membranes cellulaires de sorte que l'ADN est libéré dans un tampon d'extraction. La plupart des tampons de lyse contiennent des détergents. Il existe des détergents qui sont utilisés pour y parvenir en fonction du protocole (K. Vinod, 2004). Parmi les tampons de lyse :

- **Tampon de SDS**

Ce tampon a été adaptée par de Dellaporta (1983) où le SDS est utilisé comme un détergent dénaturant. Le dodécylsulfate de sodium (SDS) est un détergent qui détruit les membranes de la cellule et du noyau, supprime les liaisons non-covalentes de la protéine, permettant la dénaturation de la protéine, la molécule perd donc à terme sa conformation initiale et permet de dissocier l'ADN des protéines (Robinson et Tanford, 1975).

- **Tampon de CTAB**

Cette méthode élaboré la première fois par Murray et Thompson en 1980, le protocole du test au CTAB a été publié ultérieurement, et plus précisément en 1987, par Wagner et ses collègues. Le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) est un détergent non ionique qui peut précipiter des acides nucléiques à partir de solutions à faible force ionique. Pendant ce temps, les protéines restent en solution dans ces conditions. Dans les solutions de force ionique élevée, le CTAB ne précipitera pas les acides nucléiques et forme des complexes avec

les protéines. Les protéines solubles et d'autres matières sont séparées par mélange avec du chloroforme et centrifugation (Tan et Yiap, 2009).

1.3 Précipitation des protéines

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.

➤ Par solvants organiques

Phénol-chloroforme : l'utilisation du phénol-chloroforme améliore l'efficacité de l'extraction de l'ADN en raison de sa capacité à dénaturer les protéines, dissociant ainsi les acides nucléiques des protéines (K.Vinod, 2004).

Un mélange de phénol: chloroforme: alcool isoamylique favorisent le partage des lipides et des débris cellulaires dans la phase organique, laissant l'ADN isolé dans la phase aqueuse (McKiernan et Danielson, 2017).

La toxicité du phénol et l'intensité du travail doivent être soigneusement examinées. De plus, la présence de phénol minimise la quantification de l'ADN détecté par l'absorbance UV puisque le phénol présente un coefficient d'extinction élevé à 260 nm (Javadiet *al.*, 2014).

➤ Par solvants non organiques

Salting out : il est basé sur le principe que les protéines et autres contaminants cellulaires précipiteront dans une solution saline saturée telle que du chlorure de sodium (NaCl) en raison de leur hydrophobicité relative, contrairement à l'ADN. La méthode d'extraction de l'ADN par salting-out est sans danger ; l'avantage de ne pas utiliser de produits chimiques toxiques. Mais pas performante puisque l'ADN reste assez contaminé par les protéines et les quantités extraites restent faibles (McKiernan et Danielson, 2017).

1.4 Précipitation d'ADN

Elle se fait le plus souvent par addition répétée des solutions d'alcool qui suffisent à débarrasser l'acide nucléique des protéines contaminants et enzymes. Elle a pour but de récupérer les acides nucléiques sous forme solide. Ainsi protégés, ils pourront après séchage être résolubilisés à la concentration souhaitée (El-Ashram *et al.*, 2016).

En présence d'alcool, les brins d'ADN se regroupent et forme une pelote non soluble favorisant ainsi l'interaction ADN-Alcool au dépend de l'interaction ADN-ADN. Diverses solutions alcooliques peuvent être utilisées pour la précipitation. On a par exemples :

- Précipitation à l'alcool éthylique à haute force ionique. L'éthanol à forte concentration précipite presque totalement les acides nucléiques. Récupérer le précipité par centrifugation
- Précipitation à l'isopropanol : même principe que précédemment sauf que le sel n'est pas nécessaire et que les petits fragments d'ADN sont éliminés car non précipités.

La solution d'ADN, portée à haute force ionique par addition de NaCl 3 M (1/10 du volume), est additionnée d'un large excès d'éthanol absolu à -20°C. Au bout de quelques minutes au maximum, on voit apparaître un précipité blanchâtre, translucide et filamenteux, la « méduse », constitué de longs filaments d'ADN précipité. On recueille ce précipité par centrifugation à 10000 g pendant un quart d'heure environ. Pour laver l'ADN on resuspend le précipité dans de l'éthanol à 75 % toujours à -20°C puis on centrifuge à nouveau (El-Ashram *et al.*, 2016).

1.5 Dissolution de l'ADN

Après la précipitation d'ADN, le culot d'ADN a été laissé sécher et dissous soit à la TE (Tris-EDTA) (Benbouza*et al.*, 2006) ou dans l'eau bi-distillée. Ensuite, l'ADN a été quantifié et aliquoté pour être stocké à -20 ° C (El-Ashram *et al.*, 2016).

Chapitre 2

Importance des acridiens

2.1 Orthoptères

Les Orthoptères représentent l'ordre entomologique le plus important. Leur aire de répartition est extrêmement vaste ; du cercle polaire à l'équateur.

Les orthoptères se reconnaissent facilement à leurs pattes postérieures très développées, leur conférant ainsi une forte aptitude au saut, caractéristique de cet ordre d'insectes. Elles sont souvent ornées de couleurs parfois très variables, même entre les individus d'une même espèce. Au repos, les élytres protecteurs recouvrent les ailes et une partie du corps chez les adultes, sauf chez les taxons aptères.

L'ordre des orthoptères se subdivise en deux sous ordres les Ensifères et les Caelifères (Hassani, 2013).

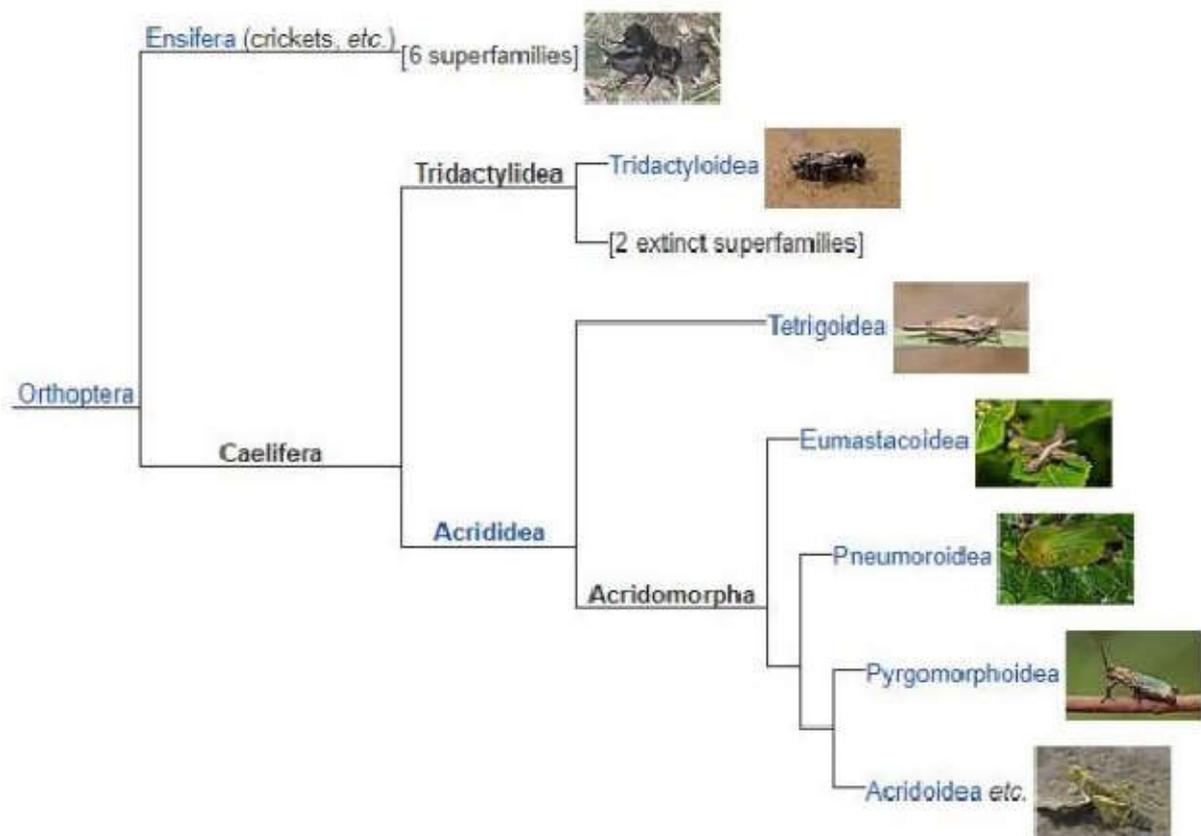


Figure 1. Phylogénie des Caelifera, en détail pour les sauterelles, avec 6 sur 8 superfamilles existantes présentées ici sous forme de cladogramme. Comme l' Ensifera, Caelifera et toutes ses superfamilles semblent être monophylétiques (Panhwar, 2018).

2.2 Caelifères

C'est un sous-ordre d'insectes phytophages de l'ordre des orthoptères, couramment appelés caelifères ou criquets. Ils portent, suivant leur comportement, le nom de locuste lorsqu'ils sont grégariptes (tendance à devenir grégaire) et sautereau lorsqu'ils ne sont pas grégariptes.

Ils se caractérisent par de courtes antennes qui vont peu au-delà de la tête et du pronotum réunis. Ils sont essentiellement phytophages et peuvent occasionner de grands dommages notamment sous les tropiques. Les acridiens ou acrididés constituent l'essentiel des caelifères.

Le sous-ordre des Caelifères est divisé en trois Super- familles :

* Super- famille des Tridactyloidae ;

* Super- famille des Tetrigoidae ;

* Super- famille des Acridoidae (Hassani, 2013).

2.3 Acrididae

La famille des Acrididae comprend plus de 6700 espèces validés et représente la lignée la plus diversifiée au sein du sous-ordre des orthoptères Caelifera. Il existe actuellement 26 sous-familles reconnues au sein des Acrididae (Song *et al.* 2018).

Généralement les espèces appartenant à cette famille sont de taille moyenne et petite; c'est la plus riche en espèces par rapport aux autres familles (Hassani, 2013).

2.4 Importance des acridiens

Les criquets représentent un taxon central dans les chaînes alimentaires et sont de bons indicateurs à la fois des caractéristiques des milieux et des perturbations de leurs habitats. Associés exclusivement aux habitats herbacés pérennes, ils sont menacés dans les zones d'agriculture intensive. Du fait de leur importance dans les réseaux trophiques, notamment comme ressources alimentaires pour un grand nombre d'espèces aviaires, ils font l'objet d'une attention croissante des écologistes et des gestionnaires des milieux (Badenhausser, 2012).

Les interactions entre les acridiens et le monde végétal sont très dépendants de la végétation, ce qui en fait des indicateurs de plus en plus reconnus pour traduire, de par la

structure de leurs communautés, le niveau de perturbation anthropique et la qualité des milieux (Badenhausser, 2012)

Les acridiens sont parmi les principaux insectes habitants des prairies et constituent une composante dominante de la biodiversité des écosystèmes terrestres. En plus de l'effet direct de la réduction des cultures sur pied, ils peuvent influencer les processus écosystémiques en augmentant la lixiviation des nutriments par le feuillage, la défécation, la modification de l'allocation des ressources végétales et la structure de la communauté végétale. Cependant, ce sont des proies majeures pour d'autres invertébrés et pour des vertébrés prédateurs, notamment les serpents et les oiseaux. De plus, les acrididés sont considérés comme des indicateurs du changement agricole et de ses conséquences environnementales. Les estimations des paramètres de la population acrididés sont donc essentielles dans les études écologiques et dans les stratégies de gestion (Badenhausser *et al.* 2014).

Deuxième partie
PARTIE
EXPERIMENTALE

Chapitre 3.

Matériel et Méthodes

3. Matériel et méthodes

Notre partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire pédagogique du département des sciences de la nature et de la vie à El Hadjeb, à l'université de Biskra.

3.1. Echantillonnage des acridiens

L'étude a été réalisée sur 42 échantillons frais des Acrididae collectés en février et mars 2020 dans les régions : El Alia (département l'agronomie), Mkhadma et Sidi khaled de la wilaya de Biskra.

On a utilisé un filet fauchoir. Cet outil est composé d'une poche en toile, du type tulle à mailles serrées, et de 50 cm de profondeur. Le cerceau métallique forme un cercle de 30 cm de diamètre et le manche du filet mesure entre 70 et 120 cm de long. La méthode consiste à animer le filet par des mouvements de va et vient proches de l'horizontale, tout en maintenant le plan de l'ouverture perpendiculaire au sol.

Les acridiens capturés sont récupérés à chaque fois dans des bouteilles en plastique sur lesquels la date et le lieu de capture sont mentionnés. Ils sont conservés au réfrigérateur pendant quelques heures voire quelques jours selon les conditions du travail au laboratoire.

3.2. Protocole d'extraction d'ADN selon H. Chenet *al.*, (2010) (modifié)

3.2.1. Préparation des tampons de lyse

Nous avons préparés deux tampons de lyse, tampon de SDS et tampon de CTAB.

- **Tampon de SDS** : [0.5% (w/v) SDS dilué dans 200mM Tris, 25mM EDTA, 250mM NaCl]
- **Tampon de CTAB** : le tampon CTAB était composé de : 2% (w/v) CTAB dilué dans 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA et 1,4 M NaCl; 0,2% (v / v) du β -mercaptoéthanol a été ajouté immédiatement avant utilisation.

Les solutions tampons préparés ont été conservées à 4 ° C.

3.1.2. Extraction d'ADN

L'ADN a été extrait du tissu musculaire du fémur postérieur. Le tissu obtenu de chaque individu a été mis dans un micro-tube de 1,5 ml et pesé avec une balance de précision. Les tubes obtenus sont divisés en deux groupes avec le même nombre (21): l'un pour

le tampon SDS et l'autre pour le tampon CTAB. Ils sont ensuite traités de la même façon selon les étapes suivantes :

- afin d'assurer une extraction la plus optimale possible de l'ADN des différents échantillons, il est requis de procéder à un broyage de ceux-ci. Chaque échantillon a été congelé dans de l'azote liquide et immédiatement broyé en une poudre fine dans les micro-tubes ;
- ajouter 500 µl de tampon de lyse (tampon SDS ou tampon CTAB) dans chaque tube et vortexer brièvement;
- ajouter 5 µl d'ARNase (100 mg/ml), puis incuber les tubes pendant une heure dans un bain marie à 37 °C ;
- ajouter 5 µl de protéinase K (20 mg/ml) (la protéinase K va dégrader les protéines cellulaire) ;
- incuber à 55°C pendant une nuit sous agitation douce;
- l'homogénat ensuite extraire avec 240µl de phénol / chloroforme / alcool isoamylique (25: 24: 1) et centrifuger à 12 000 g pendant 10 min ;
- transférer le surnageant (phase contenant l'ADN) dans un nouveau tube de 1,5 ml propre ;
- pour précipiter l'ADN, ajouter 500 µl d'éthanol absolu réfrigéré et mélanger délicatement la solution puis mettre les tubes à -20°C pendant 20 min ;
- centrifuger à 12 000 g pendant 15 min puis éliminer l'éthanol ;
- laver le culot avec 500 µl d'éthanol à 70% et centrifuger dans les conditions ci-dessus pendant 3 min pour éliminer le sel résiduel ;
- éliminer le surnageant et sécher le culot dans l'étuve à 37 °C pendant 30 min ;
- solubiliser chaque échantillon dans 50µl d'eau bi-distillée stérile,

L'ADN peut maintenant être conservé à 4°C pour une courte période et transférer par la suite à -80°C pour longue conservation.

3.1.2. Estimation de la concentration de l'ADN et contrôle de leur qualité

3.1.2.1. Estimation de la concentration de l'ADN par spectrophotomètre Nanodrop

Une estimation de la concentration et de la pureté des acides nucléiques est également faite par lecture spectrophotométrique au Nanodrop. Les acides nucléiques ont un spectre d'absorption maximum en UV à 260 nm. Cette absorption est proportionnelle à la concentration de l'ADN.

Pour comparer l'efficacité des méthodes d'extraction d'ADN, Le rendement d'extraction correspond au rapport entre la quantité d'ADN extraite en ng et la quantité de la matrice initiale utilisée (Bienvenu *et al.*, 1999). Le rendement d'extraction moyen doit être calculé pour pouvoir comparer entre les différentes techniques d'extraction d'acides nucléiques.

En raison des différents poids de tissus musculaires des acrididés utilisés dans les deux méthodes, le rendement d'ADN d'un seul acrididés a été converti en un taux de rendement d'ADN (ADN ng / poids mg).

La pureté de l'ADN a été évaluée par mesure du rapport A260 / A280 (l'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines absorbent à 280 nm). L'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport $R = A260 / A280$ est compris entre 1.8 et 2 ($1.8 < R \leq 2$). L'ADN est contaminé par les protéines si : $A260 / A280 < 1.8$. L'ADN est contaminé par les ARN si : $A260 / A280 > 2$ (Denis *et al.* 2018).

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

3.1.3. 2. Contrôle de la qualité d'ADN par l'électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est la méthode la plus efficace de séparer des fragments d'ADN de différentes tailles allant de 100 Pb à 25 kb. Le tamisage moléculaire est déterminé par la taille des pores générés par les faisceaux d'agarose dans la matrice de gel. En général, plus la concentration d'agarose est élevée, plus la taille des pores est petite. On utilise le plus souvent des concentrations allant de 0,4 à 2 % (masse/volume). La cohésion entre des chaînes poly-osidiques est maintenue par des liaisons faibles, hydrogènes essentiellement. Les gels d'agarose sont donc fragiles, on doit les manipuler avec précaution (Lee *et al.*, 2012).

- peser la masse appropriée d'agarose 0,8 g dans un ballon (la concentration d'agarose dans un gel dépend des tailles des fragments d'ADN à séparer) ;
- ajouter 100 ml du tampon TAE1X (Tris-Acétate-EDTA) et agiter pour mélanger ;

- faire fondre le mélange d'agarose / tampon. Ceci est le plus souvent effectué par chauffage dans une micro-onde, mais peut aussi être fait sur un chauffe- ballon ;
- A intervalles 30s, retirer le ballon et agiter le contenu pour bien mélanger. Répétez jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissous ;
- après refroidissement partiel du gel, ajouter 10 μ l de BET (bromure d'éthidium qui est un agent intercalant entre les bases des acides nucléiques et émis une fluorescence orange sous illumination par UV) ;

Remarque: le BET est un carcinogène et il doit être éliminé de manière appropriée conformément aux règlements des institutions. Les gants doivent toujours être portés lors de la manipulation des gels contenant le BET. Des colorants alternatifs pour la coloration de l'ADN sont disponibles, mais le BET reste le plus populaire en raison de sa sensibilité et de son coût (Lee *et al.* 2012).

- versez l'agarose fondu sur le support d'une cuve horizontale et placez un peigne approprié dans le moule de gel pour créer des puits ;
- laisser l'agarose refroidir à température ambiante puis retirer le peigne (figure 2).

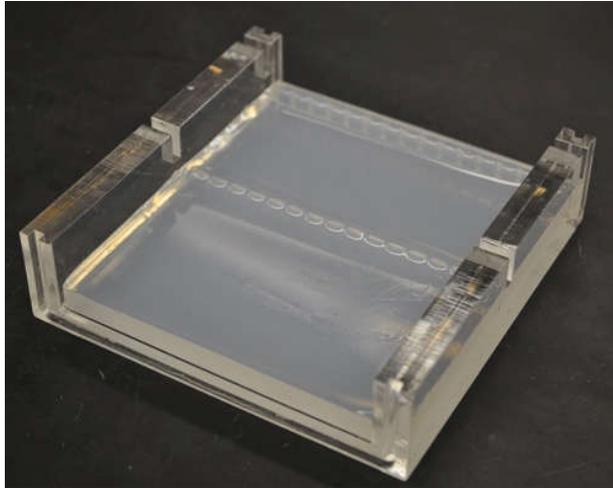


Figure 2. Un gel d'agarose solidifié après le retrait du peigne

- dans chaque puits du gel, déposer le mélange de : 6 μ l d'extrait d'ADN + 4 μ l de Bleu de Bromophérol (figure 3) (le colorant de charge permet de suivre la migration des échantillons d'ADN dans le gel) ;

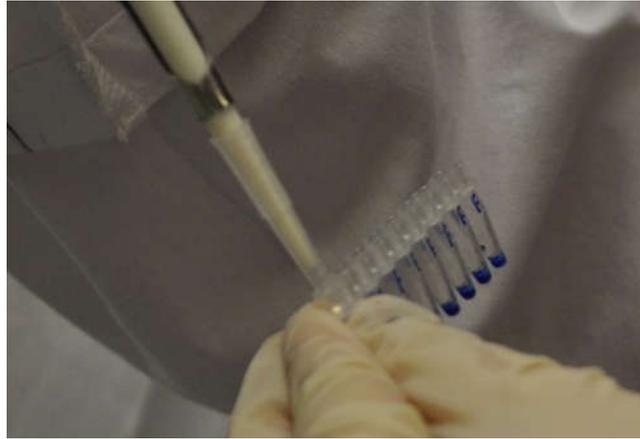


Figure 3. Ajouter le colorant de charge aux échantillons d'ADN extraits.

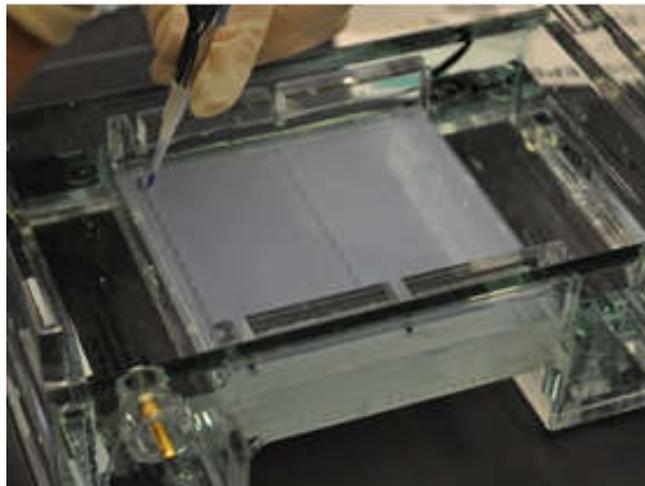


Figure 4. Chargement de l'échantillon d'ADN dans un puits dans le gel.

- ajouter un volume suffisant du tampon de migration afin de couvrir la surface du gel (Il est important d'utiliser le même tampon que celui utilisé pour préparer le gel) ;
- placez le couvercle de la cuve électrophorétique (la cathode (fils noirs) devrait être plus proche des puits que l'anode (fil rouge)). Vérifiez que les électrodes sont branchées aux bons emplacements du générateur électrique ;
- soumettre tout le système, par la suite, à un voltage initial de 30 V pendant 10 min puis évoluant à 100 V pendant 30 min ;
- exécuter le gel jusqu'à ce que le colorant ait migré à une distance appropriée ;
- lorsque l'électrophorèse est terminée, éteindre l'alimentation et retirer le gel à partir de la boîte de gel ;

- exposer le gel à la lumière UV sur transilluminateur UV muni d'un appareil Polaroid pour déterminer le profil et la taille des bandes obtenues.

3.1.3. Amplification du gène COI par PCR

La PCR correspond à une amplification d'un fragment d'ADN spécifique délimité par des amorces(ou primer).Celles-ci sont constituées d'un segment de 17 à30 bases d'acide nucléique. Leur association à l'ADN cible est suivie d'une élongation par la polymérase, aboutissant à la synthèse d'un ADN double brin. Cette amplification est répétée un certain nombre de fois afin d'obtenir une quantité d'AD N suffisante pour être détectée (Martin HUSEMANN *et al.*,2012).

➤ Amplification du gène COI par PCR

Les amorces utilisées sont (Martin HUSEMANN *et al.*, 2012):

COI-F COI CCATCTTACCGCAAA AATGAT
COI-R COI CTG GGTGWCCAAAGA ATCAAA

❖ Préparation du mélange réactionnel pour PCR

Mix de PCR	Quantité (en µl)
ADN	100µg (calculer en fonction de la concentration de l'ADN)
Tampon de <i>Taq</i>	5
<i>Taq</i> polymérase	0,5
Mix de dNTPs (0,2 mM)	2
Amorce sens (10 mM)	1
Amorce antisens (10 mM)	1
H2O distillé	QSP

Le volume total est de 20 µl.

Dans le tube témoin, l'ADN est remplacé par de l'eau distillée.

❖ Déroulement de la PCR

Les tubes contenant le mélange à amplifier sont placés dans le thermocycleur, selon le programme indiqué dans le tableau ci-après.

Tableau 1. Programme de PCR pour le gène COI

Nombre de Cycles	Etapes	Température (°C)	Durée
	Dénaturation initiale	94	3 min
30 x	Dénaturation	94	30 s
	Hybridation	54	1min
	Elongation	72	1min
	Elongation finale	72	10 min
	Conservation	4	Indéfiniment

❖ Visualisation des fragments amplifiés

Lorsque la réaction de PCR est achevée, les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Dans chaque puits du gel, il est déposé le mélange de : 6 µl de produit d'amplification + 4 µl de Bleu de Bromophémol, et un puits pour de 3 µl de marqueur de poids moléculaire. Tout le système est soumis, par la suite, à un voltage initial de 30 V pendant 10 min puis évoluant à 100 V pendant 30 min.

Chapitre 4

Résultats et discussion

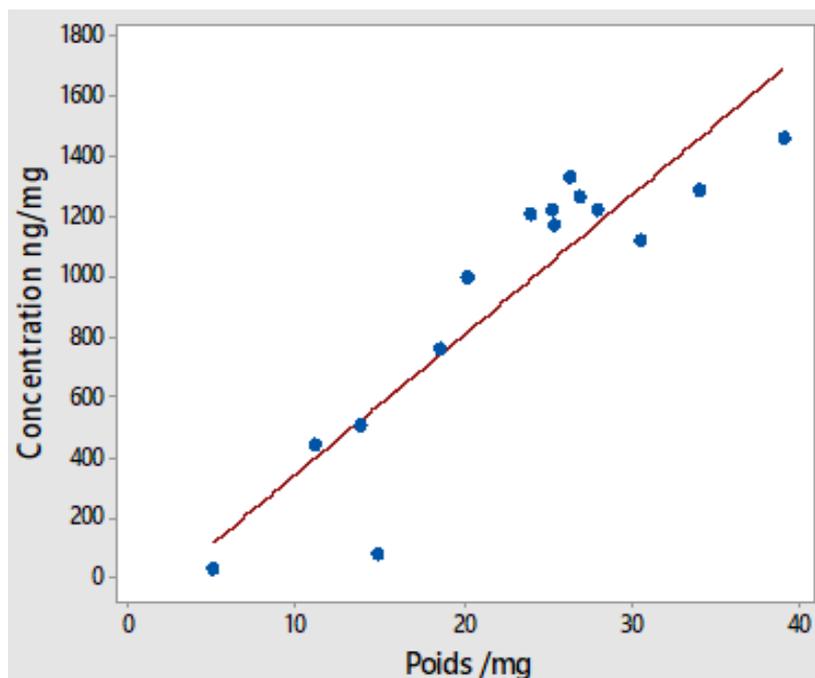
4. Résultat

Compte tenu des circonstances de cette année (propagation de l'épidémie du coronavirus), nous n'avons pu travailler que sur deux méthodes SDS et CTAB, nous avons testé les deux protocoles pour adopter une méthode efficace, plus rapide et moins onéreuse.

Deux méthodes ont été appliquées pour extraire l'ADN à partir des spécimens d'acridiens de la famille Acrididae. Le spectrophotomètre NanoDrop fournit des informations sur la concentration et la pureté de l'ADN et le profil électrophorétique montre l'intégrité de l'ADN extrait.

4.1. Poids de tissus musculaires et rendement d'ADN

La quantité et la qualité d'ADN extrait ont été mesurées par spectrophotométrie sur le NanoDrop.



L'équation de régression est : $y = 46.51x - 120.0$

$x =$ poids/mg

$y =$ Concentration /ng

$R^2 = 81.24\%$

Figure 5. Courbe des concentrations (ng/mg) en fonction du poids des tissus (mg) utilisés pour l'extraction d'ADN génomiques par la méthode SDS.

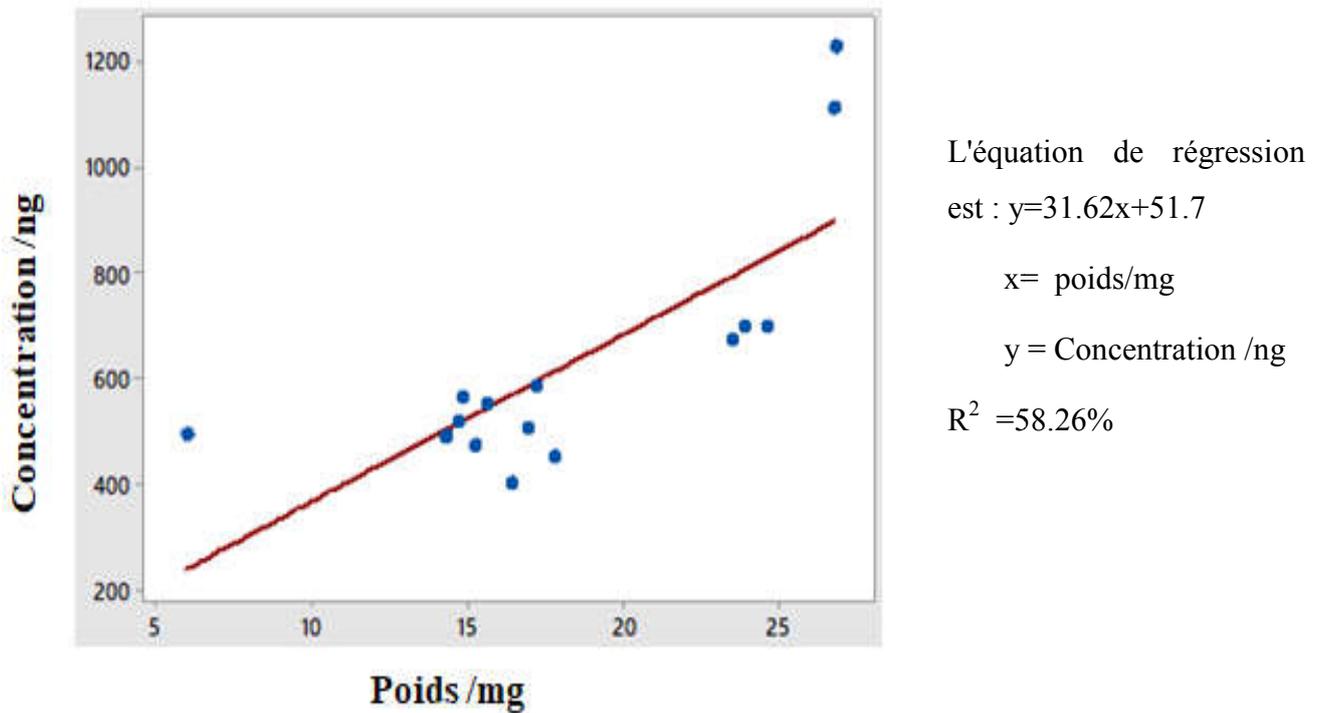


Figure 6. Courbe des concentrations (ng/mg) en fonction du poids des tissus (mg) utilisés pour l'extraction d'ADN génomiques par la méthode CTAB.

Il existe des régressions linéaires significatives entre le poids des tissus (x mg) et le rendement en ADN (y ng) pour les deux méthodes SDS et CTAB (SDS : $y = 46.51x - 120.0$, 81.24%; CTAB : $y = 31.62x + 51.7$, $R^2 = 58.26\%$).

4.2 Taux de rendement d'ADN et rapports d'absorbance

Les rendements et les rapports d'absorbance pour les deux méthodes d'extraction d'ADN, SDS et CTAB, sont répertoriés dans le tableau 2.

Tableau 2. Rendement et rapport d'absorbance d'ADN extrait par les deux méthodes SDS et CTAB.

	SDS	CTAB
Taux de rendement d'ADN (ng/mg)	1923.17	1638.472
Ratios d'absorbance		
➤ A260/A280	1.66	1.74
et intervalle	1.41-1.86	1.52-1.93
➤ A260/A230	1.29	1.44
et intervalle	0.5-2.01	0.85-1.99

Le taux de rendement de la méthode SDS (1923.17ng/mg) est plus élevé que celui obtenu avec la méthode CTAB (1638.472ng/mg).

En effet, sachant que les cycles aromatiques de certains acides aminés, à savoir la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane, absorbent dans l'UV à une longueur d'onde de 280 nm, il est possible, *via* le ratio A260/A280 d'observer la présence d'éventuelles protéines dans l'extrait. Les valeurs inférieures à 1.8 témoignent d'une contamination par les protéines, et les valeurs qui dépassent 2 témoignent d'une contamination par les ARN (Varma *et al.*, 2007).

Le protocole SDS montre que les valeurs de ratio d'absorbance A260/A280 sont comprises entre 1.41 et 1.86 et le rapport d'absorbance moyen est de 1.66 (tableau 2). Les ratios d'absorbance A260/A280 de protocole CTAB sont compris entre 0.85 et 1.93 et le rapport d'absorbance moyen est de 1.74 (tableau 2).

Les rapports d'absorbance A260/A280 moyens pour les deux méthodes est proche à 1,8. Le rapport moyen de CTAB est le plus proche de 1,8, indiquant la contamination protéique la plus faible.

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

Les valeurs de ratio A260/ A230 obtenues par les deux protocoles appliqués varient entre 0.5 et 2.01. Le protocole SDS montre des valeurs variées entre 0.5 et 2.01 et le rapport d'absorbance moyen égal à 1.29 (tableau 2). Les valeurs de protocole CTAB sont entre 0.85 et 1,99 et le rapport d'absorbance moyen est de 1.44 (tableau 2).

Les rapports d'absorbance A260/ A230 moyens des deux méthodes sont inférieurs à 2, indiquant que l'extrait d'ADN a été contaminé par des composés phénoliques.

4.3 Analyse par électrophorèse de l'ADN extrait

La taille des fragments a été contrôlée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8 %. 6 µl de la solution d'ADN ont été déposés dans chaque puits d'un gel d'agarose à 0,8 % soumis à une migration sous un courant de 100 volts pendant 30 minutes. Cette analyse permet, par ailleurs, d'observer une éventuelle dégradation de l'ADN survenue au cours de l'extraction.

Les résultats obtenus par l'électrophorèse sur gel d'agarose à partir des deux protocoles sont présentés sur les figures 7 et 8 ci-dessous.

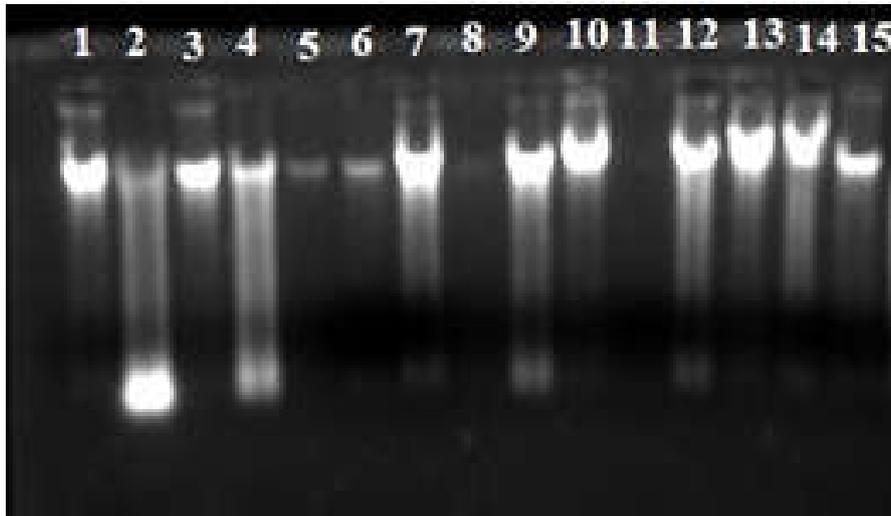


Figure 7. Photographie de profil électrophorétique de l'ADN extrait par SDS. Une électrophorèse sur gel d'agarose (0,8%) d'ADN après coloration au BET et visualisation sur UV.

D'après le profil électrophorétique des échantillons d'ADN génomique extrait par SDS (figure 7), on remarque un signal de fluorescence plus fort avec les échantillons 1, 2, 3, 7, 9, 10, 12, 13, 14 et 15, une fluorescence moins intense pour les échantillons 5 et 6, tandis que, les échantillons 8 et 11 ne donnent aucune bande d'ADN. L'absence d'ADN dans ces derniers extraits est due à une erreur de manipulation car lors du broyage des échantillons, une quantité importante de tissu a été perdue.

Ce résultat nous indique que l'ADN extrait par la méthode SDS à des concentrations élevées (fort signal) et cela correspond au résultat de NanoDrop.

L'électrophorèse d'un extrait ADN en gel d'agarose permet de juger de son intégrité. On note l'absence de traînée continue de dégradation aux basses masses moléculaires pour la plupart des échantillons sauf pour l'échantillon 4 qui a montré une dégradation partielle et l'échantillon 2 qui a montré une dégradation complète.

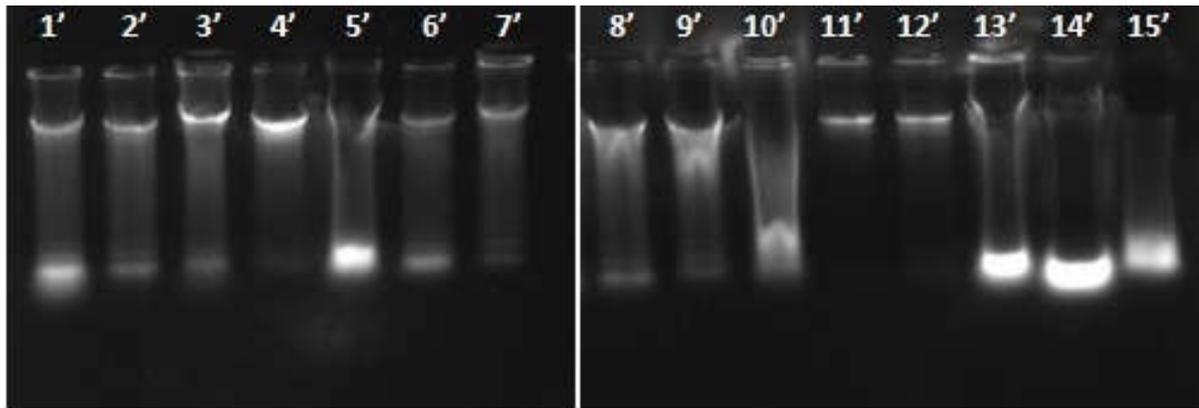


Figure 8. Photographie de profil électrophorétique de l'ADN extrait par CTAB. Une électrophorèse sur gel d'agarose (0,8%) d'ADN après coloration au BET et visualisation sur UV.

D'après le profil électrophorétique des échantillons d'ADN génomique extrait par CTAB (figure 8), on remarque un signal de fluorescence fort avec les échantillons 5', 13' et 14', une fluorescence moins intense pour le reste des échantillons.

Ce résultat nous indique que l'ADN extrait par la méthode CTAB à des concentrations inférieures à celle obtenue avec la méthode SDS et cela correspond également au résultat de NanoDrop.

On note des traînées continues de dégradation aux basses masses moléculaires pour la plupart des échantillons, à l'exception des échantillons 11' et 12'.

4.4 Amplification du gène COI par PCR

Le gène COI de 669 Pb a été amplifié avec succès à partir des deux échantillons d'ADN extraits par chaque méthode (figure 9), indiquant que les deux méthodes ont isolé un ADN de qualité suffisante pour l'application de la PCR.

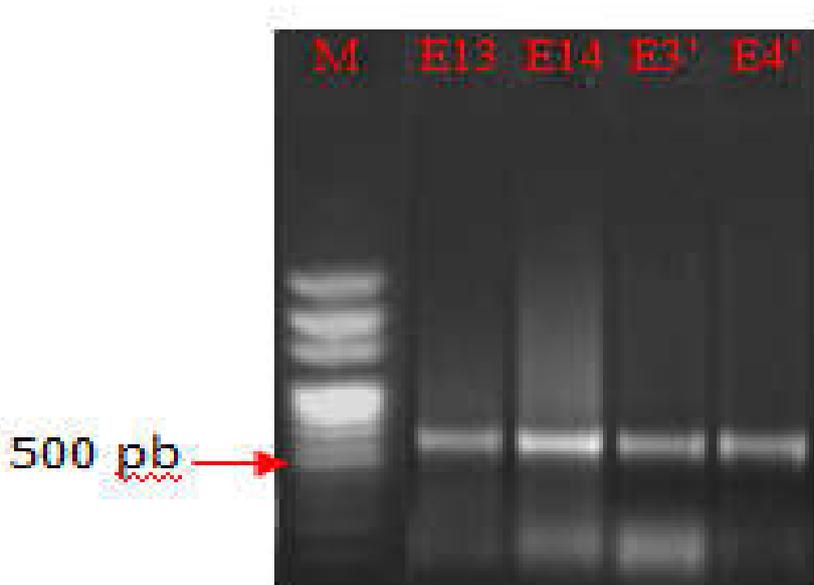


Figure 9. Photographie de profils électrophorétique représentant le produit de PCR correspondant au fragment cible de 669 Pb du gène COI. Ces fragments ont été migrés sur gel d'agarose à 1% et visualisée sur UV après coloration au BET. M : marqueur de taille moléculaire, E13 et E14 signifie les échantillons d'ADN extrait par SDS, E3' et E4' signifie les échantillons d'ADN extrait par CTAB.

5. Discussion

Nous avons étudié l'effet de la composition du tampon de lyse sur l'efficacité d'extraction de l'ADN. En général, les tensioactifs tels que le CTAB et le SDS sont enclins à interagir avec des polymères (protéines, ADN, etc.) entraînés par des forces électrostatiques, dipolaires et hydrophobes (Chatterjee *et al.*, 2002). Les interactions entre le SDS et CTAB et les protéines de la membrane cellulaire contribueront à la lyse cellulaire favorisant l'extraction de l'ADN (Perumal *et al.*, 2016).

Le taux de rendement de l'ADN, la contamination phénolique et la dégradation de l'ADN dans les échantillons d'ADN extraits d'individus des acridiens de la famille Acrididae sont différents au sein de chaque méthode d'extraction et entre les deux méthodes.

Le rendement d'ADN est influencé par de nombreux facteurs tels que les espèces, les tissus, la méthode de conservation, la procédure d'extraction et la méthode de précipitation. Le taux de rendement pour l'abdomen de la tordeuse du tabac, *Heliothis virescens*, par la méthode CTAB, était compris entre 500 et 600 ng / mg (Shahjahan *et al.*, 1995). À partir du tissu tégument de la pyrale de l'argousier, *Holcocerrushippophaecolus*, 2000–3000 ng / mg ont été obtenus en utilisant une méthode SDS modifiée (H. Chen *et al.* 2008). Le taux de rendement pour la chrysomèle des racines du maïs par les deux méthodes d'extraction SDS et CTAB ont généré des taux de rendement allant de 710 ng / mg à 4466 ng / mg par la méthode SDS (H. Chen *et al.*, 2010). Quelques autres rapports ont démontré que la méthode CTAB donne des rendements d'ADN plus élevés pour des denrées alimentaires complexes et des échantillons difficiles (Mafra *et al.*, 2008) (Elsanhoty *et al.*, 2011). Dans notre étude, les deux méthodes d'extraction ont généré des taux de rendement moyens de 1923.17 ng/mg par SDS et 1638.472 ng/mg par la méthode CTAB. Selon Xia *et al* (2019) qui ont trouvé les rendements le plus élevés d'ADN extrait avec SDS similaires à notre résultat.

Chenet *al.* (2010) ont montré que seules les méthodes SDS et CTAB ont montré des régressions linéaires significatives du poids corporel (mg) sur le rendement en ADN (ng), à proximité de nos résultats (figure 4) et (figure 5).

D'après Chen *et al.* (2010) et Mega et Revers (2011) qui ont fait l'étude d'extraction de l'ADN. Les ratios A260/A280 nm de leurs échantillons sont supérieurs à 1,7. Par conséquent, leurs résultats sont proches des nôtres. L'ADN extrait par CTAB contenait la contamination protéique la plus faible (1,74) tandis que l'ADN isolé par la méthode SDS avait des

concentrations en protéines relativement faible (1,66) comme indiqué par le rapport d'absorbance A260/A280.

Les rapports d'absorbance A260/A230 indiquent une contamination par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques.

L'ADN extrait par les deux méthodes montre une concentration et une pureté suffisante pour l'application de la PCR, car la qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse PCR, ceci a été confirmé par l'amplification du gène du cytochrome oxydase sous-unité I à partir duquel des fragments de 669 Pb ont été générés pour quatre échantillons.

Conclusion

Conclusion

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont essentielles pour un grand nombre d'études en biologie moléculaire. La quantité et la pureté des acides nucléiques sont deux éléments importants pour assurer l'efficacité et la fiabilité des analyses suivantes tel que la PCR, la RFLP, le séquençage....

L'objectif de notre travail est de faire extractions d'ADN, à partir des individus des grasshoppers de la famille Acrididae. Selon les conditions de cette année et les réactifs disponibles à notre laboratoire ; les extractions effectuées par la méthode SDS et la méthode CTAB ont été comparées en termes de quantité et de qualité d'ADN extrait et ont été évaluée par un test d'amplification du gène Cytochrome Oxydase sous-unité I du génome mitochondrial.

Bien que les deux méthodes aient abouti à des concentrations d'ADN et des taux d'absorbance acceptables, la méthode SDS a donné un moyen de rendement de 1923.17 ng/mg avec un ADN intact pour la plupart des échantillons, tandis que, la méthode de CTABa donné un moyen de rendement 1638.472 ng/mg avec un ADN dégradé.

Le gène COI a été amplifié avec succès à partir des échantillons d'ADN extrait par chaque méthode, indiquant que les deux méthodes ont isolé un ADN de qualité et quantité suffisante pour l'application de PCR.

Références Bibliographiques

Bibliographie

-B-

Badenhausser I. 2012. Estimation d'abondance des criquets (Orthoptera: Acrididae) dans les écosystèmes prairiaux. In Annales de la société entomologique de France Vol. 48, No. 3-4, pp. 397-406.

Badenhausser I., Amouroux P., Bretagnolle V. 2014. Estimating acridid densities in grassland habitats: a comparison between presence-absence and abundance sampling designs. *Environmental entomology*, 36(6), 1494-1503.

Bajyana Songa K., Hamers-Casterman Hammers R., Pholpark M. 1987. The use of card agglutination test for detection of *T. evansi* infection: a comparison with other trypanosomiasis diagnostic tests under field conditions in Thailand. *Ann. Soc. Belge Med. Trop*, 67, 137-148.

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

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

-C-

Chatterjee A., Moulik S.P., Majhi P.R., Sanyal S.K. 2002. Études sur l'interaction surfactant-biopolymère. I. Etude microcalorimétrique sur l'interaction du bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) et du dodécylsulfate de sodium (SDS) avec la gélatine (Gn), le lysozyme (Lz) et l'acide désoxyribonucléique (ADN). *Biophys. Chem.* 98, 313–327.

Chen H., Rangasamy M., Tan S.Y., Wang H., Siegfried B.D. 2010. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS one*, 5(8), e11963. 36(6), 1494-1503.

Chen M., Zhu Y., Tao J., Luo Y. 2008. Methodological comparison of DNA extraction from *Holcocerrushippophaecolus* (Lepidoptera: Cossidae) for AFLP analysis. *For Study China* 10: 189–192.

-D-

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

-E-

El-Ashram S., Al Nasr I., Suo X. 2016. Nucleic acid protocols: Extraction and optimization. *Biotechnology reports*, 12, 33-39.

El-Sanhoty R., Ramadan M. F., Jany K. D. 2011. DNA extraction methods for detecting genetically modified foods: A comparative study. *Food Chemistry*, 126, 1883–1889

-J-

Javadi A., Shamaei M., Ziazi LM., Pourabdollah M., Dorudinia A., Seyedmehdi SM., Karimi S. 2014. Etude de qualification de deux méthodes d'extraction d'ADN génomique dans différents échantillons cliniques. *Tanaffos*, 13 (4), 41-47.

-H-

Hassani F. 2013. Etude des Caelifères (Orthoptères) et caractérisation floristique (biodiversité floristique) de leur biotope dans des stations localisées à Tlemcen et Ain Temouchent. Régime alimentaire de *Calliptamus barbarus* et *Sphingonotus rubescens*. *Ecologie et Environnement*. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen, pp.9-12.

-L-

Lee P.Y., Costumbrado J., Hsu C.Y., Kim Y.H. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (62), e3923.

Le Gall P. 1989. Le choix des plantes nourricières et la spécialisation trophique chez les Acridoidea (Orthoptères). *Bulletin d'écologie*, 20(3), 245-261.

Lu H., Schmidt, M. A., Jensen K. F. 2005. A microfluidic electroporation device for cell lysis. *Lab on a Chip*, 5(1), 23-29.

-M-

McKiernan H.E., Danielson P.B. 2017. Molecular diagnostic applications in forensic science. In *Molecular diagnostics* (pp. 371-394).

Mega N. O., Revers L. F. 2011. Developing a rapid, efficient and low cost method for rapid DNA extraction from arthropods. *Ciencia rural*, 41(9), 1563-1570.

Mafra I., Silva S.A., Moreira E.J.M.O., Ferreira da Silva C.S., Beatriz M., Oliveira P.P. 2008. Etude comparative des méthodes d'extraction d'ADN pour les produits alimentaires dérivés du soja. *Contrôle alimentaire* 19 : 1183-1190

Martin Husemann., Jesse W.Ray., Ryan S.King., Emily A.Hooser., Patrick D.Danley. 2012. Comparative biogeography reveals differences in population genetic structure of five species of stream fishes, *Biological Journal of the Linnean Society*, Volume 107, Issue 4, pages 867–885.

-P-

Panhwar W.A. 2018. Biodiversity of Caelifera (Orthoptera) from Gorakh hill station, Dadu Sindh Pakistan. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3), 1807-1811.

Perumal NV., Zhang X., Yuki M., Fumio I., Wang F. 2016 Une méthode d'extraction d'ADN modifiée basée sur le SDS pour l'ADN environnemental de haute qualité à partir d'environnements de fond marin. *De face. Microbiol.* 7, 1–13.

-R-

Robinson N.C et Tanford C. 1975. Liaison des vésicules de désoxycholate, Triton X-100, dodécyl sulfate de sodium et phosphatidylcholine au cytochrome b5. *Biochemistry*, 14 (2), 369-378.

-S-

Shahjahan R., Hughes K., Leopold R., Devault J. 1995. Lower incubation temperatures increase yield of insect genomic DNA isolated by the CTAB method. *Biotechniques*, 19(3), 332-4.

Somma M. 2007. Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés. « Module 4 : Extraction et purification de l'ADN » : pp3-12.

Song H., Mariño-Pérez R., Woller D.A., Cigliano M.M. 2018. Evolution, diversification, and biogeography of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). *Insect Systematics and Diversity*, 2(4), 3.

-T-

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

-V-

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

Vinod K.K., 2004. Total genomic DNA extraction, quality check and quantitation. Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, 109-121

-W-

Wang X., Teng D., Tian F., Guan Q., Wang J. 2012. Comparison of three DNA extraction methods for feed products and four amplification methods for the 5'-junction fragment of roundup ready soybean. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(18), 4586-4595.

-X-

Xia Y., Chen F., Du Y., Liu C., Bu G., Xin Y., Liu B. 2019. Une méthode d'extraction d'ADN modifiée basée sur le SDS à partir de soja brut. *Rapports de bioscience* , 39 (2), BSR20182271.

Résumés

ملخص

من افراد الجنادب من فصيلة Acrididae التي تم جمعها من مناطق مختلفة من ولاية بسكرة. تم استخراج الحمض النووي بواسطة طريقة SDS و CTAB قمنابمقارنة الطريقتين من حيث الكمية والنوعية وتم تقييمها عن طريق اختبار مضاعفة مورثة السيتوكروم وأوكسيديز I لجينوم الميتوكوندري. تم تقييم مستخلصات الحمض النووي التي تم الحصول عليها بكلتا الطريقتين بواسطة مقياس الطيف الضوئي Nanodrop و هجرة هلام الاغاروز وتم اختبارها بواسطة PCR. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن طريقة SDS لاستخلاص DNA أفضل من حيث الكمية والجودة من طريقة CTAB. يُظهر الحمض النووي المعزول بواسطة SDS محصولًا متوسطًا قدره 1923.17 نانوغرام / ملغ و 1638.472 نانوغرام / ملغ بطريقة CTAB. تُظهر المستخلصات لكلا الطريقتين تلوًا منخفضًا جدًا للبروتين بينما التلوث الفيولي كان ملحوظًا. كلتا الطريقتين عزلتا DNA بجودة وكمية كافية لتطبيق PCR. الكلمات المفتاحية: Acrididae ، استخراج DNA ، CTAB ، SDS ، PCR.

Résumé

À partir des spécimens d'acridiens de la famille Acrididae récoltés de différentes régions de la wilaya de Biskra. L'ADN extrait par la méthode SDS et la méthode CTAB a été comparé en termes de quantité et de qualité et a été évalué par un test d'amplification du gène cytochrome oxydase sous-unité I du génome mitochondrial. Les extraits d'ADN obtenus par les deux méthodes ont été évalués par spectrophotomètre Nanodrop et par migration sur gel d'agarose et ont été testés par la PCR.

Les résultats obtenus ont montré que la méthode SDS donnait des extraits d'ADN de meilleure quantité et qualité que celle de la méthode CTAB. L'ADN isolé par SDS montre un rendement moyen de 1923.17 ng/mg et de 1638.472 ng/mg par la méthode CTAB. Les extraits des deux méthodes montrent une très faible contamination protéique et une contamination phénolique remarquable. Les deux méthodes ont isolé un ADN de qualité et quantité suffisante pour l'application PCR.

Mots clés: Acrididae, Extraction d'ADN, CTAB, SDS, PCR.

Abstract

From grasshoppers specimens of the family Acrididae collected from Biskra different regions. The DNA extracted by the SDS method and the CTAB method was compared in terms of quantity and quality and was evaluated by a mitochondrial COI gene amplification test. DNA extracts obtained by both methods were evaluated by Nanodrop spectrophotometer and agarose gel migration and were tested by PCR.

The results obtained showed that the SDS method gave DNA extracts of better quantity and quality than that of the CTAB method. DNA isolated by SDS shows an average yield of 1923.17 ng / mg and 1638.472 ng / mg by the CTAB method. Extracts from both methods show very low protein contamination and remarkable phenolic contamination. Both methods isolated DNA of sufficient quality and quantity for the PCR application.

Keywords: Acrididae, DNA extraction, CTAB, SDS, PCR.