

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie – Microbiologie



MEMOIRE

de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences de la
Nature et de la Vie
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par : M. CHANANE Ziad et M. KERKACHE Idir

Thème

Contribution à l'optimisation par la méthode de surfaces de réponses de l'extraction de l'ADN total de *Brassica oleracea* var. *botrytis* (le Chou-fleur)

Soutenu le 28/10/2015 devant le jury composé de :

M. HOUALI K.	Professeur	(UMMTO)	Président
M. TAZDAÏT D.	Maître de Conférences B	(UMMTO)	Promoteur
Mme SALAH-TAZDAÏT R.	Maître de Conférences B	(UMMTO)	Co-Promotrice
Melle LAHCENE S.	Maître Assistante A	(UMMTO)	Examinatrice
M. BOUAZZA B.	Maître Assistant B	(UMMTO)	Examineur

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

En premier lieu, nous tenons à remercier Dieu, le tout puissant, qui nous a donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail.

Nous remercions profondément, Mr TAZDAIT D. Maître de Conférences à l'université de Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour son suivi, sa patience, sa disponibilité, ses orientations et ses remarques pertinentes qui nous ont apporté aide et soutien pour la réalisation de ce modeste travail. Qu'il trouve ici notre profonde gratitude.

Nos vifs remerciements vont à Mme TAZDAIT R. Maître de Conférences à l'université de Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou, pour la codirection de ce mémoire, pour ses conseils avisés, son aide précieuse ainsi que sa disponibilité.

Nous remercions vivement Mr HAOUALI K., Professeur à l'université Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou, qui nous a fait l'honneur de présider le jury de notre soutenance.

Nos remerciements s'adressent également à Melle LAHCENE S. Maître Assistante à l'université Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou et Mr BOUAZZA B. Maître Assistant à l'université Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous exprimons notre reconnaissance et nos sincères remerciements à l'ensemble des ingénieurs du laboratoire commun pour leurs conseils et soutien technique.

Aussi, nous remercions tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail.

IDIR et ZIAD

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents en témoignage de ma reconnaissance envers le soutien, les sacrifices et tous les efforts qu'ils ont fait pour mon éducation ainsi que ma formation.

A mes très cher grand parents.

A mes très cher frères RABAH et MOHAND AREZKI qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

A mes chers oncles et tantes.

A mes chers cousins et cousines.

A tous mes amis(es) de près comme de loin.

A mon binôme et mon ami IDIR ainsi que toute sa famille.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

ZIAD.

Dédicace

D'abord je dis merci ALLAH pour le courage, la volonté que tu nous as donnée pour achever ce travail.

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tous simplement que : Je dédie ce mémoire de fin d'étude à :

*A Ma tendre Mère **Ouzna** : Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

*A Mon très cher Père **Ammar** : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon*

bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.

A mes chers beaux parents.

A mes chers frères : Mohammed, Saïd, et Ahmed

A ma sœur : Fatima

A l'épouse de mon frère Mohammed : Souad

A mes chers petits neveux et nièces

Ali, Melina et Sabrina

*A mes chers oncles, tantes, leurs époux et épouses a mes
chers cousins cousines*

A toute ma famille

A mes très chers amis

Surtout mon ami, mon partenaire Ziad

A tous les membres de ma promotion.

*A tous mes enseignants depuis mes premières années
d'études.*

A tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de citer.

IDIR

SOMMAIRE

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

Etude bibliographique

Chapitre I. Généralités sur l'ADN

I.1. Structure et fonction de l'ADN.....	3
I.2. Propriétés physico-chimiques de l'ADN.....	6
I.2.1. Solubilité.....	6
I.2.2. Absorption dans les rayons ultraviolets.....	7
I.2.3. Dénaturation thermique.....	7

Chapitre II. Extraction et purification de l'ADN

II.1. Méthodes d'extraction et de purification de l'ADN.....	9
II.1.1. Méthode d'extraction et de purification de référence usuelle au phénol-chloroforme.....	9
II.1.1.1. Lyse cellulaire.....	9
II.1.1.2. Extraction proprement dite.....	9
II.1.1.3. Précipitation de l'ADN.....	10
II.1.2. Méthode alternative d'extraction et de purification.....	10
II.1.2.1. Lyse cellulaire.....	10
II.1.2.1.1. Lyse par traitement enzymatique.....	10
II.1.2.1.2. Lyse cellulaire par traitement avec des détergents.....	11
II.1.2.1.3. Lyse par choc osmotique.....	12
II.1.2.1.4. Lyse par broyage avec abrasifs.....	12

II.1.2.2. Extraction et purification	12
II.1.2.2.1. Technique de relargage (<i>salting out</i>)	12
II.1.2.2.2 Gradient de chlorure de césium	12
II.1.2.2.3. Chromatographie échangeuse d'anions	13
II.1.2.2.4. Fixation sur la silice	15
II.1.2.2.5. Méthode d'extraction et de purification au CTAB	16
II.1.2.2.6. Séparation magnétique.....	16
II.2. Estimation qualitative et quantitative de l'ADN	18
II.2.1. Spectrophotométrie ultraviolet	18
II.2.2. Fluorimétrie	18
II.2.3. Électrophorèse sur gel d'agarose	19
II.3. Conservation de l'ADN	21

Chapitre III. Les plans d'expériences

III.1. Généralités sur les plans d'expérience	22
III.1.1. Introduction	22
III.1.2. Terminologie	23
III.1.3. Modélisation mathématique de la réponse	25
III.1.3.1. Modélisation mathématique	25
III.1.3.2. Modélisation expérimentale	26
III.2. Classification des plans d'expériences	26
III.2.1. Plans factoriels.....	26
III.2.1.1. Plans factoriels complets	27
III.2.1.2.Plans factoriels fractionnaires.....	28

III.2.2. Plans pour surface de réponse	28
III.2.2.1. Plans composites centrées	29
III.2.2.2. Plans de Doehlert.....	30
III.2.2.3. Plans de Box Behnken.....	31
III.3. Domaines d'application des plans d'expériences.....	32

Partie expérimentale

Chapitre I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel	33
I.1.1. Matériel biologique	33
I.2. Méthodes	34
I.2.1. Extraction, purification et quantification de l'ADN	34
II.1.1. Lyse cellulaire.....	34
II.1.2. Purification et précipitation de l'ADN.....	35
II.1.3. Détermination de la concentration et la pureté de l'ADN	36
II.2. Optimisation par la méthodologie de surface de réponse.....	38
II.2.1. Définition des objectifs et les réponses	38
II.2.1.1. Définition des objectifs de l'étude	38
II.2.1.2. Définition des réponses caractérisant l'objectif.....	38
II.2.2. Définition des facteurs et les niveaux	39
II.2.3. Choix du plan d'expérience	40
II.2.4. Traitement mathématique et statistiques des données expérimentales	41

Chapitre II. Résultats et discussion

II.1. Analyse de la réponse Y_1	43
II.1.1. Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y_1	43
II.1.2. Modélisation de la réponse Y_1	45
II.1.3. Représentation des surfaces de réponses associée à la réponse Y_1	46
II.2. Analyse de la réponse Y_2	48
II.2.1. Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y_2	48
II.2.2. Modélisation de la réponse Y_2	50
II.2.3. Représentation des surfaces de réponses associée à la réponse Y_2	52
II.4. Validation des modèles mathématiques obtenus	56
Conclusion.....	57
Références bibliographiques	58
Annexes	

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucleique.

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne).

RT-PCR : Reverse Transcriptase-PCR.

MSR : Méthodologie de Surfaces de Réponses.

A : Adénine.

G : Guanine.

T : Thymine.

C : Cytosine.

ARN : Acide Ribonucleique.

ARNm : ARN messenger

RNase : Ribonucléase

UV: rayonnements Ultra-Violets.

Tm: Melting Temperature (Température de fusion).

EDTA : Ethylène Diamine Tétracétique.

TE : Tris-EDTA.

CTAB : Bromure de Cétyle Triméthyl Ammonium.

CMC : Concentration Micellaire Critique.

BET : Bromure d'Éthédium.

DEAE-Cellulose : Di-éthyl-Amino-Ethyl-Cellulose.

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate.

Kb : Kilo-base.

DO : Densité Optique.

DABA : Acide Dichlorhydrate 3,5-Diamino-Benzoïque.

DAPI : 4',6'-Di-Amidino-2-Phényl Indole.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

Liste des figures

Figure 1 : Structure moléculaire des bases Purines (Adénine et Guanine) et des bases Pyrimidines (Cytosine et Thymine).

Figure 2 : Structure d'un nucléotide (Le désoxyadénosine 5' monophosphate).

Figure 3 : Molécule d'ADN double brins.

Figure 4 : Empaquetage de l'ADN dans les chromosomes.

Figure 5 : Structure d'un nucléosome.

Figure 6 : Représentation schématique de la séparation des brins de l'ADN duplex lors de sa dénaturation par la chaleur.

Figure 7 : Courbe de fusion de l'ADN.

Figure 8 : Isolement de l'ADN par centrifugation au Gradient de chlorure de césium.

Figure 9 : Attachement de l'ADN au support de chromatographie.

Figure 10 : Isolation de l'ADN par chromatographie échangeuse d'anions.

Figure 11 : Domaine de variation du « facteur ».

Figure 12 : Définition de l'espace expérimental.

Figure 13 : Définition du domaine d'étude par l'expérimentateur.

Figure 14 : Définition de la surface de réponse.

Figure 15 : Meilleur emplacement des points expérimentaux.

Figure 16 : Plan composite centré pour deux facteurs.

Figure 17 : Plan Doehlert pour deux facteurs.

Figure 18 : Plan Doehlert pour trois facteurs.

Figure 19 : Plan de Box- Behnken pour trois facteurs.

Figure 20 : Photo du chou-fleur (*Brassica oleracea* var. *botrytis*).

Figure 22 : Protocole expérimental de l'extraction, purification et quantification de l'ADN de *Brassica oleracea* var. *botrytis*.

Figure 23 : Diagramme de Pareto des effets sur la réponse Y_1 .

Figure 24 : Tracé de probabilité normale de la réponse Y_1 .

Figure 25 : Représentation des surfaces de réponse associées à la réponse Y_1 .

Figure 26 : Diagramme de Pareto des effets des facteurs sur la réponse Y_2

Figure 27 : Tracé de probabilité normale de la réponse Y_2 .

Figure 28 : Représentation des surfaces de réponse associée à la réponse Y_2 .

Liste des tableaux

Tableau I : Avantages et inconvénients des techniques de purification de l'ADN.

Tableau II : Composition de la solution de lyse.

Tableau III : Facteurs étudiés et leurs niveaux

Tableau IV : Matrice d'expériences en valeurs codées.

Tableau V : Matrice d'expériences en valeurs réelles.

Tableau VI : Les valeurs expérimentales obtenues des deux réponses (Y_1 et Y_2).

Tableau VII : Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y_1 .

Tableau VIII : Estimation des coefficients de régression du modèle mathématique lié à la réponse Y_1 .

Tableau IX : Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y_2 .

Tableau X : Estimation des coefficients de régression du modèle mathématique lié à la réponse Y_2 .

Tableau XI : Les résultats des réponses prédites et expérimentales de quelques conditions.

Introduction

En 1869, Friedrich Miescher était le premier scientifique qui a isolé l'ADN pour la première fois en étudiant la composition chimique des leucocytes. Au cours de ses expériences, il a identifié une nouvelle substance dans les noyaux, qu'il a appelé "nucléine". Il a ensuite développé deux protocoles pour séparer les noyaux cellulaires du cytoplasme et d'isoler ce nouveau composé, actuellement connu comme l'ADN, qui diffère des protéines et d'autres substances cellulaires. Cette constatation scientifique, ainsi que les protocoles d'isolement utilisés, ont été publiés en 1871. Cependant, c'est seulement en 1958 que Meselson et Stahl ont développé une procédure de routine en laboratoire pour l'extraction de l'ADN. Ils ont effectué l'extraction d'ADN à partir d'échantillons bactériens d'*Escherichia coli* en utilisant un protocole de centrifugation à gradient de densité de sel (CHACON-CORTES et GRIFFITHS, 2014).

L'extraction de l'ADN est requise pour des applications de biologie moléculaire telles que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), la digestion par les enzymes de restriction, le Southern blot etc., et pour l'analyse d'échantillons médico-légaux et cliniques de même que les échantillons environnementaux (ANANDIKA, 2013). L'extraction de l'ADN à deux objectifs principaux : maximiser la quantité de l'ADN d'un échantillon et d'extraire un ADN qui est suffisamment pur pour une analyse ultérieure (GOODWIN et al., 2011). La qualité et quantité d'ADN extraits sont d'une importance capitale pour toutes les méthodes moléculaires ultérieures. En effet l'efficacité de l'amplification par PCR peut être affectée par la présence de plusieurs inhibiteurs de la Taq polymérase, tel que le phénol, les polyamines et les polysaccharides (NGUYEN et NGUYEN, 2013).

Il existe actuellement de nombreuses méthodes pour extraire l'ADN. Le choix de la technique la plus adéquate repose généralement sur les critères suivants : l'ADN cible ; l'organisme source (mammifères, eucaryotes inférieurs, plantes, procaryotes, virus, etc.) ; le matériel de départ (tissu, feuille, graine, matériel transformé, etc.) ; les résultats souhaités (rendement, pureté, temps de purification requis, etc.) et l'application en aval (PCR, clonage, étiquetage, transfert d'ADN, RT-PCR, synthèse d'ADN complémentaire, etc.) (SOMMA, 2006).

Traditionnellement, l'optimisation des processus chimiques et biochimiques a été réalisée par la surveillance de l'influence d'un facteur à la fois sur une réponse expérimentale. Bien qu'un seul paramètre soit modifié, les autres sont maintenus à un niveau constant. Cette technique d'optimisation est appelée une variable-à-un-temps. Son inconvénient majeur est

qu'il ne comprend pas les effets interactifs entre les variables étudiées. En conséquence, cette technique ne représente pas les effets complets du paramètre sur la réponse (BEZERRA et *al.*, 2008 ; BAŞ et BOYACI, 2007). Un autre inconvénient de l'optimisation d'un facteur est l'augmentation du nombre d'expériences nécessaires pour mener la recherche, ce qui conduit à l'augmentation du temps et les dépenses (BEZERRA et *al.*, 2008).

Afin de surmonter ce problème, l'optimisation des procédures analytiques a été effectuée en utilisant la méthodologie de surfaces de réponses (MSR) (BEZERRA et *al.*, 2008 ; BAŞ et BOYACI, 2007). La MSR est la méthode d'optimisation la plus populaire au cours de ces dernières années (BAŞ et BOYACI, 2007), elle a été développée par Box et Wilson en 1951 (DEAN et VOSS 1999). Elle consiste en un ensemble de techniques mathématiques et statistiques pour développer, améliorer et optimiser des processus dans lesquels la réponse d'intérêt est influencée par plusieurs variables et l'objectif est d'optimiser cette réponse. La MSR a une application importante dans la conception, le développement et la formulation de nouveaux produits, ainsi que dans l'amélioration de la conception des produits existants. Elle définit l'effet des variables indépendantes, seuls ou en combinaison, sur les processus. En plus d'analyser les effets des variables indépendantes, cette méthodologie expérimentale permet l'établissement d'un modèle mathématique susceptible de décrire les procédés faisant l'objet de l'optimisation (BAŞ et BOYACI, 2007).

L'objectif de ce mémoire vise l'application de la MSR pour optimiser l'extraction chimique de l'ADN d'un organisme eucaryote : le chou-fleur (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). L'optimisation porte sur trois paramètres : le volume du tampon de lyse ; le volume de chloroforme et le rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification.

**Etude
bibliographique**

Chapitre I :

Généralités sur l'ADN

I.1. Structure et fonction de l'ADN

L'ADN ou acide désoxyribonucléique, est une molécule qui comporte trois composants : du phosphate, un sucre appelé désoxyribose et quatre bases azotées (l'adénine ou A, la guanine ou G, la thymine ou T et la cytosine ou C). Deux de ces bases, l'adénine et la guanine possèdent une structure à deux cycles, caractéristique d'une substance chimique appelée purine. Les deux autres bases, la cytosine et la thymine, ont une structure à un seul cycle, d'un type appelé pyrimidine (figure 1). Les composants chimiques de l'ADN sont organisés en groupes appelés nucléotides, composés chacun d'un groupement phosphate, d'une molécule de désoxyribose et l'une des quatre bases (figure 2) (GRIFFITHS et al., 2001 ; VINCENT 2007; GRIFFITHS et al., 2010).

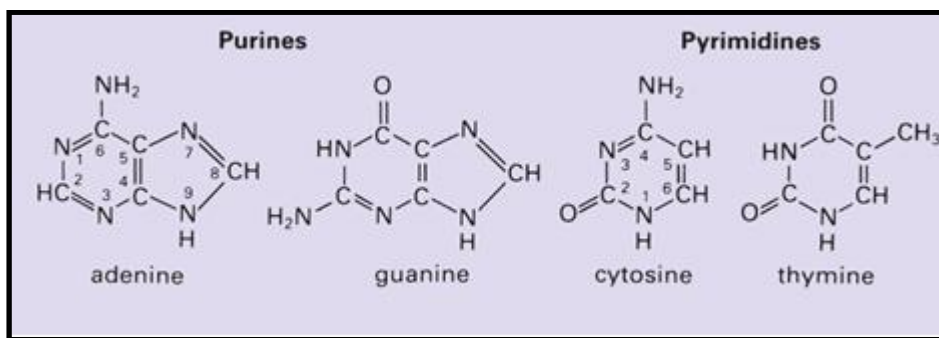


Figure 1 : Structure moléculaire des bases Purines (Adénine et Guanine) et des bases Pyrimidines (Cytosine et Thymine) (WILSON et WALKER, 2005).

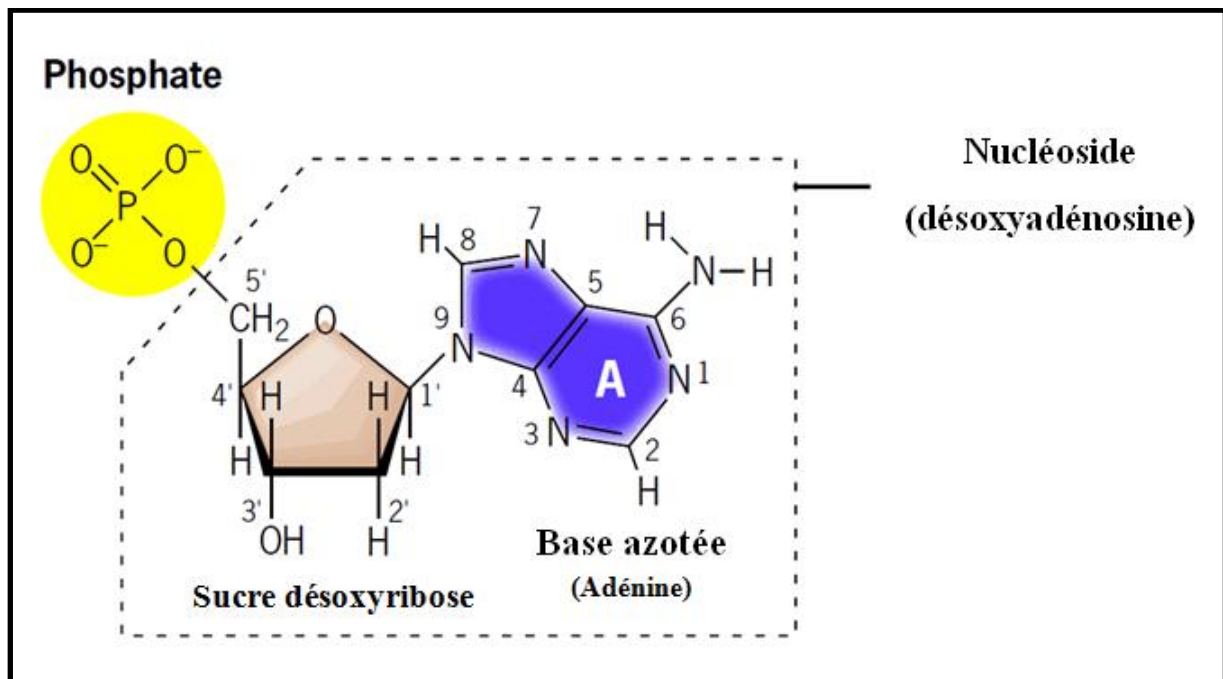


Figure 2 : Structure d'un nucléotide (Le désoxyadénosine 5' monophosphate) (KARP, 2013).

La structure tridimensionnelle de l'ADN imaginée par Watson et Crick en 1953 (figure 3A) est constituée de deux brins polynucléotidiques associés, qui s'enroule l'un autour de l'autre pour former une double hélice. La succession des nucléotides le long de chaque brin est formée par de liaisons phosphodiester entre l'atome de carbone 5' d'un désoxyribose et l'atome de carbone 3' du désoxyribose adjacent. Les deux squelettes sucre-phosphate sont à l'extérieur de la double hélice et les bases se projettent vers l'intérieur. Les bases adjacentes dans un même brin s'empilent les uns sur les autres dans des plans parallèles. Entre les brins du squelette se trouvent les sillons majeurs et mineurs, également de forme hélicoïdale. L'orientation des deux brins est antiparallèle, c'est-à-dire que leurs sens 5'→3' sont opposés. Les deux brins coïncident grâce à la formation de paires de bases entre eux : A s'apparie avec T par deux liaisons hydrogènes et G avec C par trois liaisons hydrogènes (figure 3B). La présence de ces milliers de liaisons hydrogène dans une double hélice d'ADN contribue fortement à sa stabilité (GARRETT et GRISHAM, 2000 ; GRIFFITHS *et al.*, 2001 ; GRIFFITHS *et al.*, 2002 ; LODIS *et al.*, 2005 ; VOET et VOET, 2005 ; GRIFFITHS *et al.*, 2006 ; GRIFFITHS *et al.*, 2010). Les interactions de van der Waals et les liaisons hydrophobes entre les paires de bases adjacentes verticalement stabilisent encore davantage la structure en double hélice. Dans les cellules, la plus grande partie de l'ADN est sous forme d'hélice droite (GARRETT et GRISHAM, 2000 ; LODIS *et al.*, 2005) .

L'information génétique est stockée dans la séquence des bases des chaînes polynucléotidiques qui constituent le génome. L'ADN détient l'information nécessaire à la synthèse des protéines chez nombre de Virus (Virus à ADN) et dans toutes les cellules procaryotes ou eucaryotes. La séquence des bases de l'ADN qui constitue les gènes détermine la séquence des aminoacides des protéines qui forment le protéome, mais elle ne le fait pas de façon directe ; des molécules d'acide ribonucléique (ARN) du transcriptome servent d'intermédiaires entre le génome et le protéome. L'information génétique contenue dans l'ADN est tout d'abord transcrite dans des molécules d'ARN dénommées ARN messager (ARNm), puis traduite en molécules de protéines (WEINMAN et MEHUL, 2004).

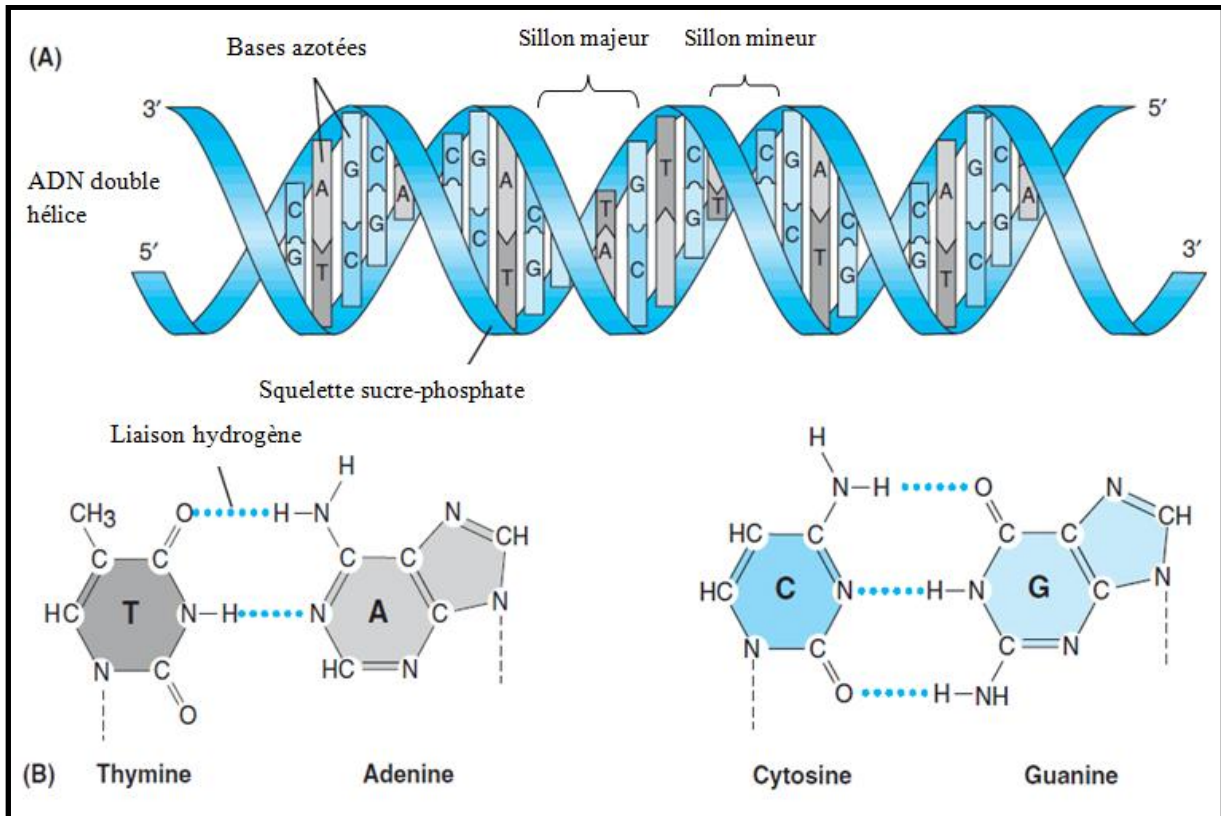


Figure 3 : Molécule d'ADN double brins (BUCKINGHAM et FLAWS 2007). (A) représente la double hélice. (B) représente les liaisons hydrogènes qui se forment entre les bases azotées (trois liaisons entre T et A, deux liaisons entre C et G).

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN s'enroule autour des histones, protéines de structure, formant ainsi un complexe nucléoprotéique hautement condensé appelé chromatine (figure 4). L'élément de constitution de la chromatine est le nucléosome. Il est constitué d'un octamère d'histone autour duquel sont enroulés 147 paires de bases d'ADN (figure 5). La condensation de la chromatine au niveau du noyau forme les chromosomes (LODIS et *al.*, 2005). Alors que l'ADN des procaryotes n'est pas contenu dans un noyau pourvu d'une membrane nucléaire (AUDIGIE et ZONSZAIN, 1999). La plupart des chromosomes procaryotes contiennent de l'ADN circulaire à double brin, mais certains d'entre eux sont linéaires, comme ceux des eucaryotes. *Escherichia coli* est un bon exemple pour illustrer la nature des génomes procaryotes. L'ensemble de l'ADN des cellules d'*Escherichia coli* est rassemblé dans une seule molécule d'ADN circulaire fermé, sa longueur atteint 4,6 millions de paires de bases, qui se concentre dans une région de la cellule appelée nucléoïde. Cette région concentrée en ADN contient aussi toutes les protéines associées à l'ADN telles que les polymérases, répresseur et autres (ALEXANDER et *al.*, 2013).

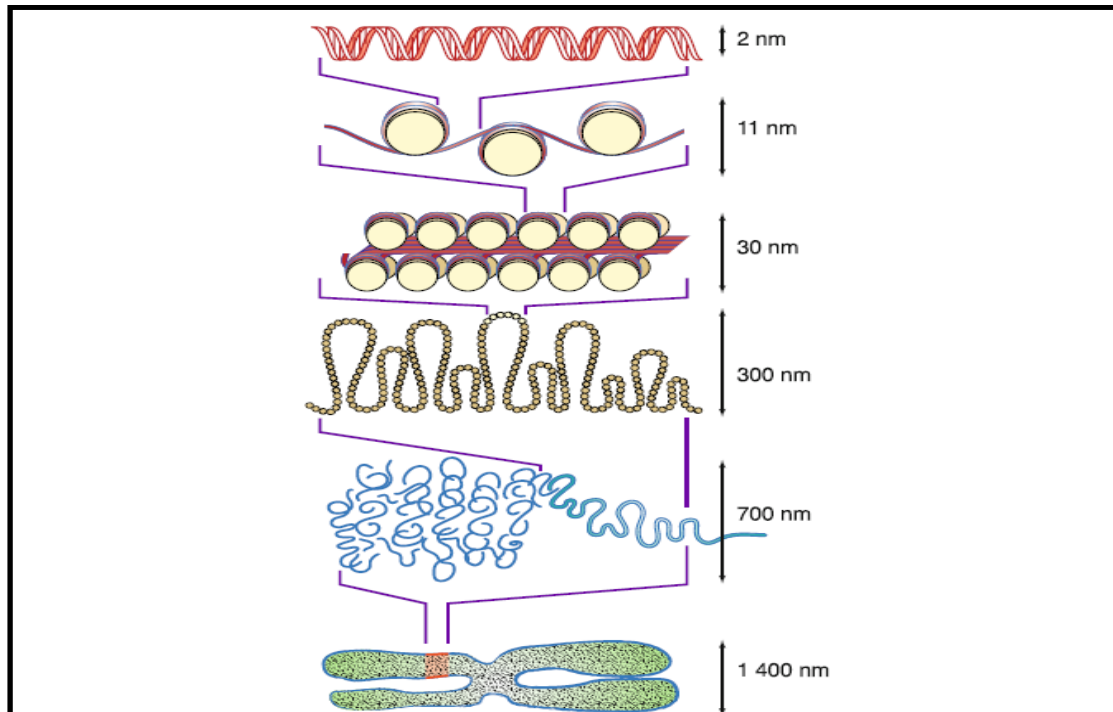


Figure 4 : Empaquetage de l'ADN dans les chromosomes (ROBERT, 2010).

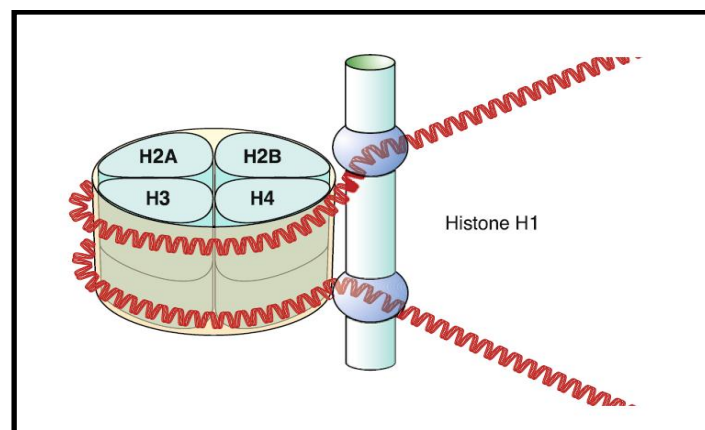


Figure 5 : Structure d'un nucléosome (ROBERT, 2010).

I.2. Propriétés physico-chimiques de l'ADN

I.2.1. Solubilité

L'ADN est un polyanion (chargé négativement due à la présence des groupements phosphates) soluble dans l'eau en formant des solutions de viscosité élevée. Il est précipitable par l'éthanol (AUDIGIE et ZONSZAIN, 1999) et insoluble dans le phénol qui est un agent déprotéinisant puissant utilisé pour la purification de l'ADN (KAPLAN et DELPECH, 2007).

I.2.2. Absorption dans les rayons ultraviolets

L'ADN absorbe les rayons ultraviolets (U.V) grâce à la nature aromatique conjuguée de leurs bases (puriques et pyrimidiques) ; le squelette sucre-phosphate ne contribue pas sensiblement à l'adsorption. La longueur d'onde de l'adsorption maximale (λ_{\max}) d'un rayon par l'ADN est de 260 nm ($\lambda_{\max} = 260$ nm), elle est différente de λ_{\max} des protéines (280 nm). Les propriétés d'adsorption de l'ADN peuvent être utilisées pour la détection, la quantification et l'évaluation de la pureté (ALEXANDER et *al.*, 2013).

I.2.3. Dénaturation thermique

Lorsqu'une solution d'ADN duplex est chauffée progressivement au-dessus d'une certaine température, sa structure initiale disparaît parce que les deux chaînes complémentaires se séparent et prennent chacune une conformation aléatoire ondulante appelée enroulement au hasard (*random coil*) (figure 6). Pendant la dénaturation, l'absorbance s'accroît de près de 40% à toutes les longueurs d'ondes. Ce phénomène s'appelle l'effet d'hyperchromicité. La valeur de la température au point correspondant à 50% de la variation hyperchromicité, s'appelle la température de fusion ou T_m (m pour *melting*) (figure 7) (VOET et VOET, 2005). La T_m est en fonction du contenu G+C de l'ADN et varie de 80 °C à 100 °C pour les grosses molécules d'ADN (ALEXANDER et *al.*, 2013).

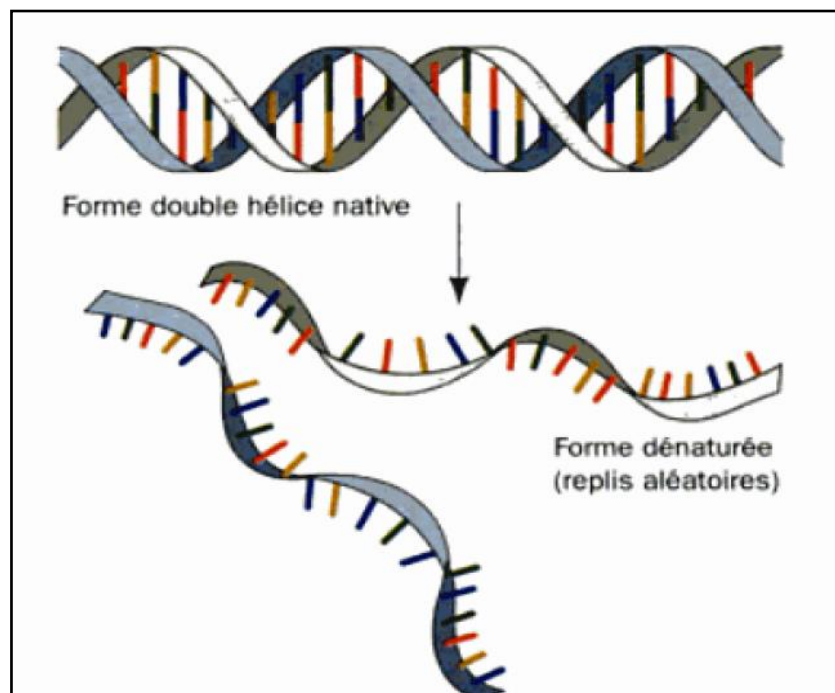


Figure 6 : Représentation schématique de la séparation des brins de l'ADN duplex lors de sa dénaturation par la chaleur (VOET et VOET, 2005).

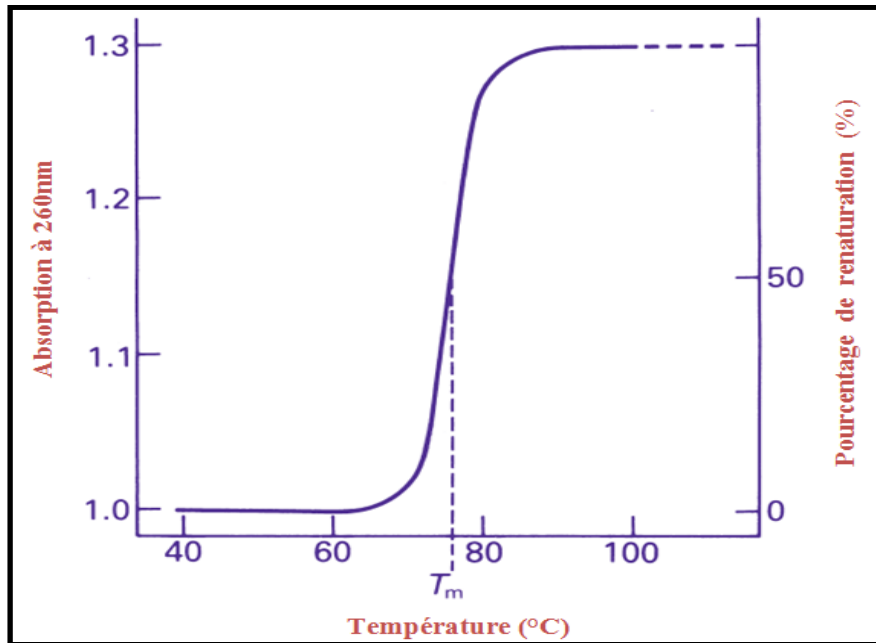


Figure 7 : Courbe de fusion de l'ADN (WILSON et WALKER, 2005). La température de fusion T_m est celle à laquelle on atteint 50% de l'accroissement maximal d'absorbance.

Si une solution d'ADN dénaturé est refroidie rapidement bien en dessous de sa T_m , l'ADN résultant ne sera que très partiellement apparié car les brins complémentaires n'ont pas assez de temps pour se réassocier complètement (VOET et VOET, 2005). Cependant, le refroidissement lent laisse suffisamment de temps aux brins d'ADN complémentaires pour s'apparier, ainsi l'ADN peut devenir complètement bicaténaire et présenter la même adsorption qu'à l'origine (ALEXANDER et *al.*, 2013).

Chapitre II : Extraction et purification de l'ADN

II.1. Méthodes d'extraction et de purification de l'ADN

Il existe une pléthore de méthodes d'extraction-purification de l'ADN, qui suivent tous les mêmes étapes. Les trois phases de l'extraction d'ADN sont : la rupture des membranes cellulaires, ce qui entraîne la lyse cellulaire ; la dénaturation des protéines et enfin la séparation de l'ADN des protéine dénaturées et d'autres composants cellulaires (GOODWIN et *al.*, 2011). L'objectif principal de ces méthodes est de libérer l'ADN de haute qualité qui peut être stocké pendant plusieurs années dans des conditions appropriées (DAS et DASH, 2015).

II.1.1. Méthode d'extraction et de purification usuelle au phénol-chloroforme

La méthode d'extraction au phénol-chloroforme a été depuis de nombreuses années la méthode la plus largement utilisée pour l'extraction d'ADN (BUTLER, 2010). Elle comporte trois étapes : une étape de lyse des cellules et de dénaturation des complexes nucléoprotéiques pour libérer l'ADN du milieu intracellulaire, une étape d'extraction proprement dite pour éliminer les protéines et, enfin, une étape de précipitation pour purifier l'ADN.

II.1.1.1. Lyse cellulaire

La première étape de l'extraction implique l'incubation des cellules dans un tampon de lyse contenant un détergent avec la protéinase K. Les détergents couramment utilisés sont le dodécyl sulfate de sodium (SDS), le Tween 20, Triton X-100 et le Nonidet P-40. Le tampon de lyse déstabilise les membranes cellulaires, ce qui conduit à la dégradation des structures cellulaires (GOODWIN et *al.*, 2011).

Certaines bactéries et champignons ont des parois cellulaires rigides qui doivent être détruites pour permettre la libération de l'ADN. Des enzymes comme le lysozyme, le zymolyase sont utilisés pour digérer la paroi cellulaire (BUCKINGHAM et FLAWS, 2007).

Les tissus frais ou congelés doivent être dissociés avant le démarrage des procédures d'isolement de l'ADN. Le broyage des tissus congelés dans l'azote liquide, leur homogénéisation, ou simplement leur hachage en utilisant un scalpel peut dissocier des tissus entiers (BUCKINGHAM et FLAWS, 2007).

II.1.1.2. Extraction proprement dite

L'ADN contenu dans le lysat est séparé des protéines en appliquant la technique phénol-chloroforme. Le phénol étant un puissant agent déprotéinisant, son addition à une

phase aqueuse a pour effet de dénaturer les protéines en solution dans le milieu. Après centrifugation, les protéines se retrouvent à l'interface entre la phase aqueuse (qui contient les acides nucléiques) et la phase organique. Après transfert de la phase aqueuse dans un autre tube, les acides nucléiques sont traités par un mélange chloroforme-alcool isoamylique. Ceci a pour effet d'éliminer les traces du phénol, composé organique qui présente l'inconvénient d'être non seulement un produit toxique mais également un inhibiteur de certaines enzymes dont la Taq polymérase (enzyme utilisée dans la PCR). A ce stade, après mélange, centrifugation et élimination de la phase organique, les acides nucléiques sont à l'état soluble dans la phase aqueuse (AMEZIANE, 2006).

II.1.1.3. Précipitation de l'ADN

Elle permet l'obtention d'ADN pur et concentré. La précipitation se fait soit à l'éthanol 100 % (dans ce cas, elle a lieu à -80 °C et en présence de sels tels que l'acétate de sodium), soit à l'isopropanol (le sel n'est pas nécessaire et la précipitation se fait alors à +4 °C). Un lavage ultérieur à l'éthanol 70 % est indispensable pour éliminer les sels. Le précipité est repris dans du tampon TE [Trihydroxyméthylaminométhane-HCl (tris-HCl) à 10mM, pH 8 ; Ethylène diaminetétra-acétique (EDTA) à 1mM, pH 8] (AMEZIANE, 2006).

II.1.2. Méthodes alternatives d'extraction

La technique phénol-chloroforme est considérée comme étant la méthode de référence. Cependant, depuis quelques années, le phénol étant un produit toxique et les manipulations correspondantes plus au moins longues et fastidieuses, d'autres techniques d'extraction ont été développées. D'une manière générale, toutes les méthodes passent par une étape de dislocation des cellules par rupture de leurs membranes suivie de lyse. Ensuite les protéines et autres molécules contaminantes sont éliminées sous l'action de la protéinase K. les protéines dénaturées sont éliminées par *salting out* (précipitation en présence de sels), extraction organique ou liaison de l'ADN à un support (chromatographie par échange d'ions, adsorption sur silice). Enfin, l'ADN est généralement précipité par l'éthanol ou isopropanol (AMEZIANE, 2006).

II.1.2.1. Lyse cellulaire

II.1.2.1.1. Lyse par traitement enzymatique

- Le lysozyme est une enzyme produite commercialement à partir de blanc d'œuf de poule (SCAWEN et HAMMOND, 2000). Elle est la plus utilisée dans les opérations de déstabilisation cellulaire. Elle hydrolyse les liaisons bêta-1,4-glycosidiques dans les peptidoglycanes de la paroi cellulaire bactérienne. Les bactéries Gram-positive sont plus

susceptibles à l'attaque de cette enzyme, alors que la lyse des bactéries Gram-négative nécessite le passage du lysozyme à travers la membrane externe, ce passage est facilité par l'addition de l'EDTA (PARMJIT et *al.*, 2010).

- La protéinase K, est une protéase à serine produite par le champignon *Tritirachium album*, elle coupe les liaisons peptidiques C-terminale à côté des acides aminés aliphatiques et aromatiques, y compris les peptides de réticulations inter-bridge (inter-chaine) des peptidoglycanes des parois cellulaires des bactéries. L'utilisation de la protéinase K pour rompre les parois cellulaires bactériennes est renforcée par son insensibilité aux agents chélateurs spécifiques, lui permettant d'être utilisée en combinaison avec de l'EDTA et du lysozyme. Cependant, les ponts peptidiques inter-chaine des parois des cellules de différentes espèces sont formées par différentes combinaisons d'acides aminés qui les composent, avec différentes susceptibilités de clivage et peuvent être plus ou moins résistant à la lyse par la protéinase K (MOORE et *al.*, 2004). La protéinase-K est également responsable de l'inactivation des nucléases, empêchant ainsi leur action dommageable sur l'ADN isolé (DAS et DASH, 2015).

II.1.2.1.2. Lyse cellulaire par traitement avec des détergents

Les détergents sont des molécules amphipathiques qui ont à la fois des propriétés hydrophiles et hydrophobes. Ils constituent un moyen doux de lyse cellulaire. Ils facilitent le processus de lyse par élimination des lipides et par conséquent provoquent la disruption des membranes cellulaires. Ils sont également connus pour dénaturer les protéines. Cette méthode de lyse des cellules est couramment utilisée (MAHESH et SOMENATH, 2003).

Les détergents ioniques les plus couramment utilisés sont le sodium dodécyl sulfate (SDS), le N-lauryl sarcosinate de sodium (Sarkosyl), alkyl benzène sulfonates, et les sels d'amine quaternaire tels que le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB). Des détergents ioniques ont tendance à former de petites micelles (poids moléculaire d'environ 10 000) et présentent une concentration micellaire critique (CMC) plutôt élevée. La CMC est la concentration critique des molécules tensioactives au-dessus de laquelle la formation de micelles a lieu. La CMC pour SDS dans une solution diluée est d'environ 0,2% à température ambiante. Les détergents non ioniques comprennent le polyoxyéthylène (10), isooctylcyclohexylether (Triton X-100), Nonidet P-40 (NP-40), le polyoxyéthylène (20) sorbitan monooléate (Tween 80), et l'octyl glucoside. En général, ces détergents sont caractérisés par des poids moléculaire plus élevé (50 000 ou plus) et une CMC basse (MAHESH et SOMENATH, 2003).

II.1.2.1.3. Lyse par choc osmotique

Le choc osmotique est causé par un changement soudain dans la concentration saline ce qui provoque la destruction de certaines cellules. Un choc osmotique des cellules est provoqué par la pénétration d'eau dans les cellules lorsque celles-ci sont plongées dans une solution hypotonique. Les cellules gonflent à cause de l'écoulement osmotique de l'eau et éclatement, en libérant ainsi leur contenu dans le milieu environnant. La sensibilité des cellules à subir une lyse par un choc osmotique dépend de leur type. Les globules rouges sont facilement détruits. Les cellules animales peuvent être détruites seulement après la dislocation des tissus. Les cellules végétales sont plus résistantes à la destruction par ce procédé (KUMAR et AWASTH, 2009). La plupart des micro-organismes ne peuvent pas être perturbé par un choc osmotique à moins que leurs parois cellulaires soient d'abord affaiblies par attaque enzymatique ou par la croissance dans des conditions qui inhibent la synthèse de la paroi cellulaire (MAHESH et SOMENATH, 2003).

II.1.2.1.4. Lyse par broyage avec abrasifs

Initialement, cette technique a été limitée à la mouture des pâtes de cellules dans un mortier avec une poudre abrasive, tel que le verre, l'alumine ou le kieselguhr. Puis avec le développement des technologies, ce système a été amélioré et automatisé. Actuellement, divers équipements tels que le Dyno mill ont été utilisés. Il se compose d'une chambre contenant un axe central entraîné par un moteur électrique équipé de roues à aubes de différents types, et peut être chargé des perles. Les perles sont faites de matériaux résistants tels que le verre, la céramique d'alumine et quelques composés titaniques. La suspension cellulaire est pompée à travers la chambre, et l'agitation rapide est suffisante pour détruire même les bactéries les plus rigides (RAPLEY et RAPLEY, 2000 ; PARMJIT et *al.*, 2010).

II.1.2.2. Extraction et purification

II.1.2.2.1. Technique de relargage (*salting out*)

La technique de relargage par les sels ou « *salting out* » est une technique classique où les protéines et d'autres contaminants sont précipités à partir du lysat cellulaire en utilisant de hautes concentrations en sel tels que l'acétate de potassium et l'acétate d'ammonium. Les débris cellulaires et les enzymes sont éliminés par centrifugation. L'ADN est précipité par de l'alcool (AMEZIANE, 2006).

II.1.2.2.2. Gradient de chlorure de césium

Dans ce procédé, les cellules sont lysées à l'aide d'un détergent puis le lysat est soumis à une précipitation alcoolique. L'ADN remis en suspension est mélangé avec du

chlorure de césium (CsCl) et du bromure d'éthidium (BET) et appliqué sur un gradient de chlorure de césium. Une ultracentrifugation est effectuée durant plusieurs heures. Au cours de la centrifugation, les macromolécules présentes dans un tel mélange s'équilibrent à une position dans le gradient qui a une densité de flottaison similaire. L'ADN a une densité de flottaison d'environ $1,70 \text{ g/cm}^3$ et par conséquent, l'ADN migre vers la couche du gradient du CsCl où la densité est également de $1,70 \text{ g/cm}^3$. En revanche, les protéines possèdent une densité de flottaison inférieure, flottent donc à la partie supérieure du tube. La fraction d'ARN forme un culot en bas du tube (figure 8) (DUNCAN et *al.*, 2003 ; AMEZIANE, 2006 ; ABHILASHA et SHILPA, 2015). La bande du gradient colorée par le BET, correspondant donc à la position du gradient où se situe l'ADN. L'ADN est ensuite récupérée est soumis à un lavage avec l'isopropanol afin d'éliminer le BET. Enfin, l'ADN est précipité par l'éthanol (DUNCAN et *al.*, 2003 ; AMEZIANE, 2006).

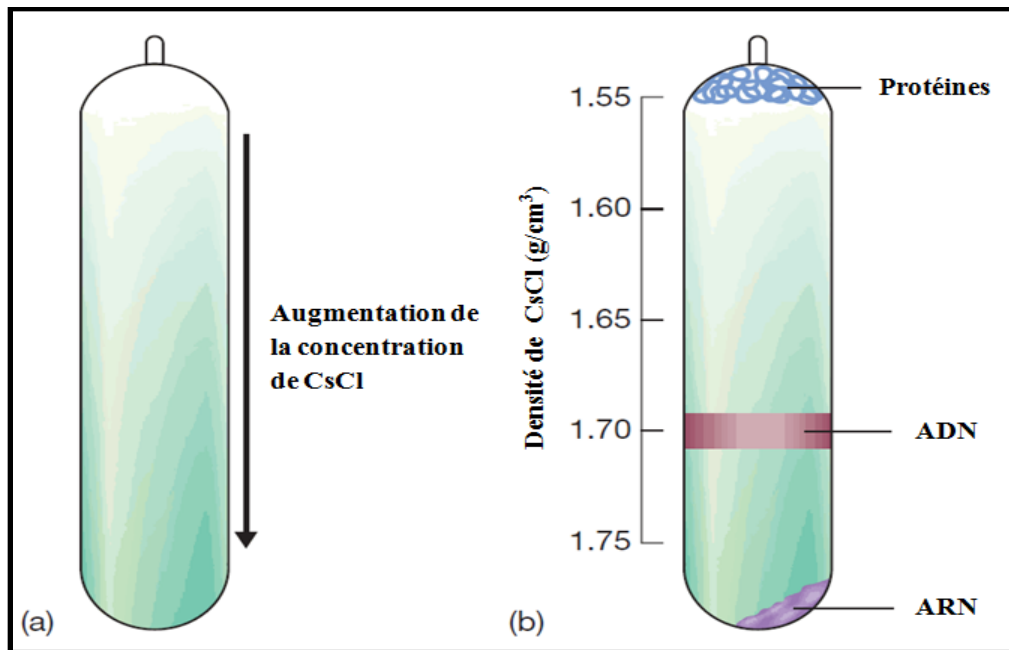


Figure 8 : Isolement de l'ADN par centrifugation au Gradient de chlorure de césium (BROWN, 2010). (a) avant centrifugation (b) après centrifugation.

II.1.2.2.3. Chromatographie échangeuse d'anions

La chromatographie par échange d'anions est basée sur l'interaction entre les charges négatives des groupements phosphates de l'ADN et les charge positives du support de chromatographie (figure 9) par exemple, di-éthyl-amino-éthyl cellulose (DEAE cellulose). Après dépôt du lysat sur la colonne de chromatographie dans des conditions de basses concentrations en sels, l'ADN se fixe à la colonne à l'aide de liaisons ioniques. Ensuite, les protéines, les débris cellulaires et les autres molécules en solution sont éliminés par un lavage

à l'aide d'un tampon moyennement chargé en sels. L'ADN est finalement élué à l'aide d'un tampon à haute force ionique. Afin d'éliminer les sels, l'ADN est précipité avec l'alcool (figure 10) (DUNCAN *et al.*, 2003 ; AMEZIANE, 2006 ; ABHILASHA et SHILPA, 2015).

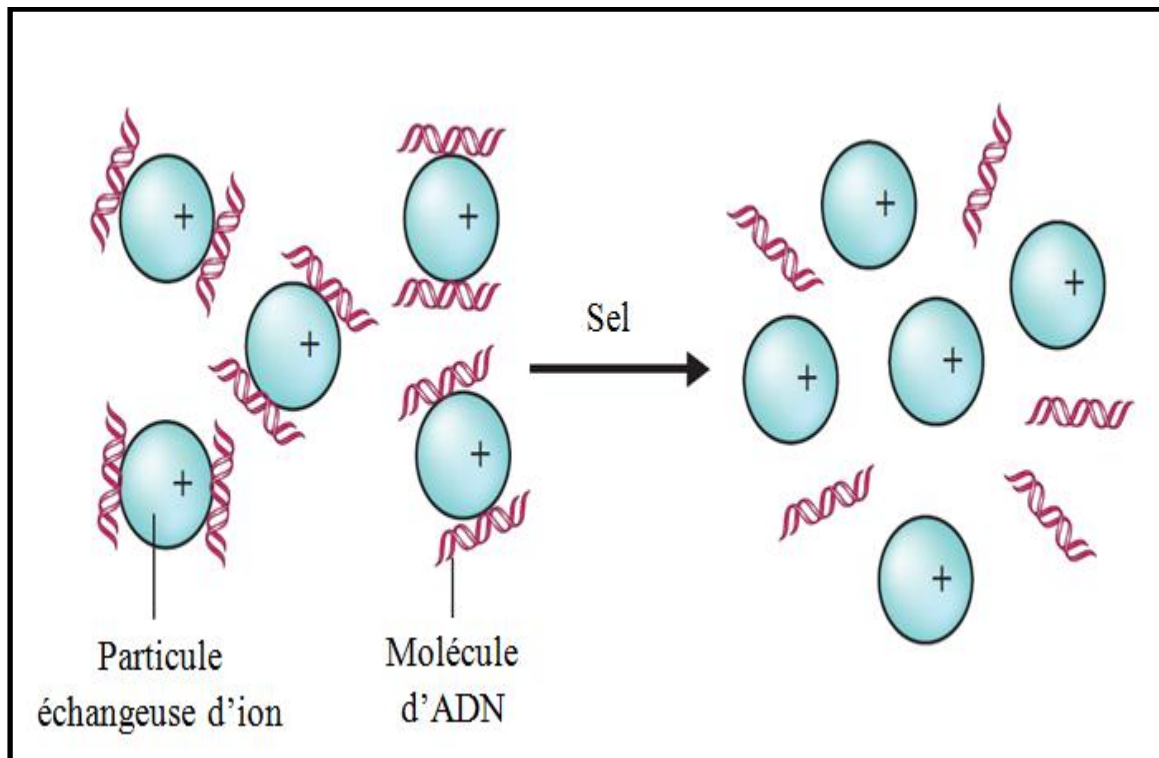


Figure 9 : Attachement de l'ADN au support de chromatographie (BROWN, 2010).

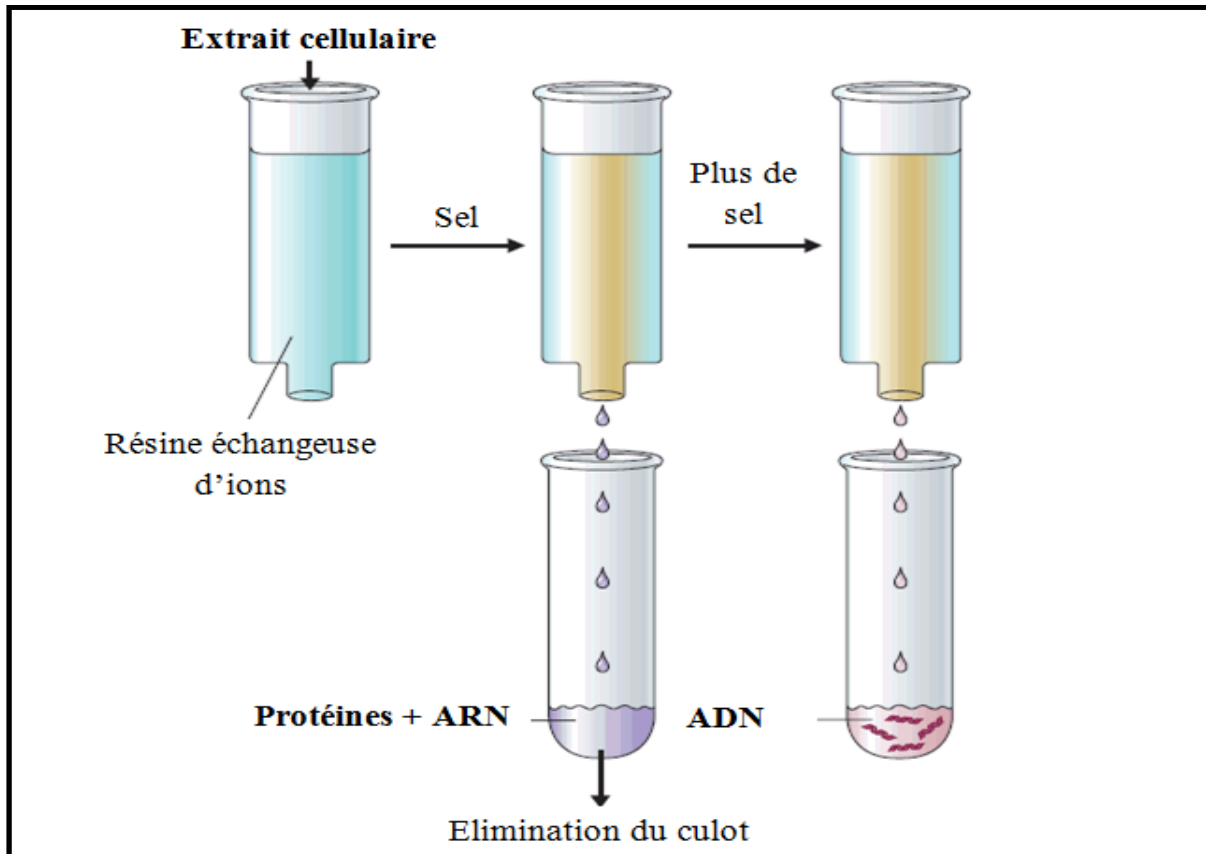


Figure 10 : Isolation de l'ADN par chromatographie échangeuse d'anions (BROWN, 2010).

L'ADN isolé par cette procédure peut atteindre une taille moyenne de 150 kilobases (kb) de long (DUNCAN *et al.*, 2003 ; AMEZIANE, 2006 ; ABHILASHA et SHILPA, 2015).

II.1.2.2.4. Fixation sur la silice

Cette méthode repose sur l'adsorption sélective d'acides nucléiques sur une membrane de gel de silice en présence de concentration élevée d'agents chaotropiques (DUNCAN *et al.*, 2003 ; AMEZIANE, 2006 ; ABHILASHA et SHILPA, 2015), tel que le chlorhydrate de guanidine, l'isothiocyanate de guanidine, l'iodure de sodium, et le perchlorate de sodium (DUNCAN *et al.*, 2003). En effet, les agents chaotropiques perturbent la couche d'hydratation qui se forme autour des acides nucléiques, ce qui permet la formation de liaisons hydrogène entre les acides nucléiques et la surface de la silice (SALGADO et HUSSAIN, 2013).

Le tampon de lyse est choisi de telle sorte que les débris cellulaires, les protéines et les molécules indésirables restent en solution alors que l'ADN se fixe sur la silice. Après lavage de la colonne, l'ADN est élué par un tampon à basse force ionique (DUNCAN *et al.*, 2003 ; AMEZIANE, 2006 ; ABHILASHA et SHILPA, 2015).

La taille moyenne de l'ADN isolé est de 20 à 50 kb (DUNCAN *et al.*, 2003).

II.1.2.2.5. Extraction et purification au CTAB

Elaboré pour 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 al.* La méthode convient pour l'extraction et la purification d'ADN de végétaux et d'aliments tirés des végétaux. Cette procédure a été largement appliquée dans la génétique moléculaire des végétaux et a déjà été testée dans des essais de validation dans le but de détecter les organismes génétiquement modifiés (OGM) (LIPP *et al.*, 1999 ; LIPP *et al.*, 2001).

Des cellules végétales peuvent être lysées en utilisant le détergent ionique CTAB, qui forme un complexe insoluble avec les acides nucléiques dans un environnement à faible teneur en sels (< 0,5 M NaCl). Dans ces conditions, les polysaccharides, les composés phénoliques et les autres contaminants restent dans le liquide surnageant et peuvent être enlevés par extraction au chloroforme. Ce dernier dénature les protéines et facilite la séparation des phases aqueuses et organiques. Le complexe d'ADN est solubilisé en élevant la concentration en sels et est précipité avec de l'éthanol ou de l'isopropanol.

II.1.2.2.6. Séparation magnétique

Cette méthode est basée sur la liaison réversible de l'ADN à une surface solide (billes ou particules magnétiques) préalablement recouverte d'anticorps liant l'ADN ou d'un groupe fonctionnel qui interagit spécifiquement avec celui-ci. Après liaison de l'ADN, les billes sont séparées des autres composants cellulaires contaminants puis lavées. L'ADN est finalement purifié est élué par extraction à l'éthanol (ANANDIKA, 2013).

Les avantages et les inconvénients des techniques précédemment décrites sont montrés dans le tableau I.

Tableau I. Avantages et inconvénients des techniques de purification de l'ADN.

Technique	Avantages	Inconvénients
Technique de relargage (<i>salting out</i>)	Rapide, simple et non coûteuse (SUGUNA et al., 2014).	Elimination des protéines et d'autres contaminants est inefficace et le traitement avec la Ribonucléase (RNase), la dialyse et / ou une précipitation répétée à l'alcool sont souvent nécessaires (DUNCAN et al., 2003).
Gradient de chlorure de césium	Isolement de l'ADN de haute qualité (DUNCAN et al., 2003 ; AMEZIANE, 2006).	Prend beaucoup de temps, de main-d'œuvre, et elle est coûteuse (DUNCAN et al., 2003 ; AMEZIANE, 2006).
Chromatographie échangeuse d'anions	Isolement de l'ADN de haute pureté, prend pas du temps et évite l'utilisation des substances toxiques. (DUNCAN et al., 2003 ; AMEZIANE, 2006 ; ABHILASHA et SHILPA, 2015).	Coûteuse
Fixation sur la silice	Simple à mettre en œuvre, fiable, rapide et peu coûteuse. (DUNCAN et al., 2003).	Coûteuse
Extraction et purification au CTAB	Convient particulièrement pour la suppression des polysaccharides et des composés polyphénoliques qui affectent la pureté de l'ADN et donc sa qualité (MURRAY et THOMPSON, 1980 ; WAGNER et al. 1987).	Incubation de longue durée et utilisation de produits toxiques (chloroforme) (FITZGERALD et BURDEN, 2014).
Séparation magnétique	Rapide et adaptable à l'automatisation (ANANDIKA, 2013).	Plus coûteuse par rapport aux autres méthodologies présentées précédemment (ANANDIKA, 2013).

II.2. Estimation qualitative et quantitative de l'ADN

II.2.1. Spectrophotométrie

Toutes les molécules absorbent de l'énergie radiante à une longueur d'onde spécifique à partir de laquelle il est possible d'extrapoler la concentration d'un soluté à l'intérieur d'une solution. Selon la loi de Beer-Lambert, il existe une relation linéaire entre l'absorbance A également appelée densité optique (DO) et la concentration de la macromolécule qui est donnée par la relation suivante (équation 1) :

$$A = DO = \epsilon l c \quad (1)$$

où ϵ est égal au coefficient d'extinction molaire, c indique la concentration et l représente le trajet optique (SOMMA, 2006). Comme indiqué précédemment, l'absorbance maximale d'une solution d'ADN est fixée à 260 nm, tandis que l'absorbance maximale d'une solution protéique est de 280 nm.

Pour un trajet optique de 1 cm et une longueur d'onde d'absorption de 260 nm, une $DO = 1$ correspond à environ 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN, 40 $\mu\text{g/ml}$ d'ARN ou environ 33 $\mu\text{g/ml}$ d'oligonucléotides (PARIMOO et PARIMOO, 2003 ; SOMMA, 2006). L'absorbance à cette longueur d'onde est donc directement proportionnelle à la concentration d'ADN présent dans une solution (BUCKINGHAM et FLAWS 2007). La détermination de la concentration d'ADN en mesurant la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 260 nm est rapide, simple et très utilisée (MÜLHARDT, 2007).

La mesure de la DO à 280 nm permet, par ailleurs, de s'assurer de l'absence de contamination significative par les protéines. En effet, le rapport $DO_{260\text{nm}}/DO_{280\text{nm}}$ permet d'estimer le degré de pureté de l'ADN extrait. La valeur de ce rapport doit être comprise entre 1,7 et 2. Si elle est inférieure à 1,7, cela indique une contamination par les protéines qui impose de pratiquer une seconde extraction. Un rapport supérieur à 2 témoigne de la présence d'une quantité importante d'ARN (AMEZIANE, 2006).

II.2.2. Fluorimétrie

Une alternative moins bien connue est la détermination de la concentration d'ADN à l'aide de colorants fluorescents qui absorbent la lumière d'une certaine longueur d'onde et peuvent émettre une lumière d'une longueur d'onde différente (MÜLHARDT, 2007). Cette technique est plus sensible que la spectrophotométrie (PARIMOO et PARIMOO, 2003 ; AMEZIANE, 2006 ; MÜLHARDT, 2007 ; ABHILASHA et SHILPA, 2015).

Les premières méthodes utilisaient l'acide Dichlorhydrate 3,5-diamino-benzoïque (DABA.2HCl). Ce fluorochrome se combine avec les désoxyriboses de l'ADN pour donner un produit fluorescent (PAPADIMITRIOU et LELKES, 1993 ; BUCKINGHAM et FLAWS 2007). L'utilisation de DABA pour quantifier l'ADN nécessite une longue préparation des échantillons et sa sensibilité est limitée. En outre, le DABA est très cancérigène et donc dangereux à utiliser (PAPADIMITRIOU et LELKES, 1993).

Des procédures plus modernes utilisent des fluorochromes spécifiques de l'ADN tel que le Hoechst 33258 : 2-[2-(4-hydroxyphényl)-(6-benzimidazol)]-6-(1-méthyl-4-pipérazyle) benzimidazol trihydrochloride hydrate (BUCKINGHAM et FLAWS 2007). L'excitation de ce fluorochrome se produit à une longueur d'onde de 365 nm, et la lumière émise est mesurée à 460 nm (AMEZIANE, 2006 ; MAHESH et SOMENATH 2003 ; MÜLHARDT, 2007 ; MAHESH). Ce fluorochrome se fixe préférentiellement sur les ADN riches en A et T dans le sillon mineur de la double hélice d'ADN. Il est donc spécifique de l'ADN double brin. Cependant, cette spécificité de liaison pour les résidus AT complique les mesures d'ADN qui ont un contenu anormalement élevé ou faible en GC. Une mesure standard est nécessaire pour déterminer la concentration par fluorométrie. Le standard utilisé devra avoir une composition en GC proche de celle de l'ADN mesuré (AMEZIANE, 2006 ; BUCKINGHAM et FLAWS 2007). Les cellules eucaryotes ont une composition en GC de 39 à 46 %, en moyenne, et les cellules procaryotes de 26 à 77 % (AMEZIANE, 2006). La détermination fluorométrique de la concentration d'ADN en utilisant le colorant Hoechst 33258 est très sensible (jusqu'à 200 ng d'ADN / ml) (BUCKINGHAM et FLAWS 2007). Cette technique ne quantifie pas l'ARN (AMEZIANE, 2006 ; BUCKINGHAM et FLAWS 2007).

PicoGreen et OliGreen sont d'autres fluorochromes spécifiques de l'ADN qui peuvent être employés pour la quantification fluorométrique. PicoGreen est plus sensible que le Hoechst 33258 (jusqu'à 25 pg/mL). Comme le fluorochrome Hoechst 33258, le PicoGreen ne se lie ni à l'ADN monocaténaire ni à l'ARN. OliGreen est conçu pour se lier aux petits fragments d'ADN monocaténaires (oligonucléotides). Ce fluorochrome détecte des concentrations inférieures à 100 pg/mL de l'ADN monocaténaire (BUCKINGHAM et FLAWS 2007).

II.2.3. Électrophorèse sur gel d'agarose

Un procédé relativement simple et rapide pour évaluer la quantité et la qualité de l'ADN extrait est de le visualiser sur un gel d'agarose (GOODWIN et *al.*, 2011). L'agarose est un polymère polysaccharidique naturel isolé à partir de l'agar qui est obtenu à partir de

diverses espèces d'algues rouges. Les espèces du genre *Gelidium* et *Gracilaria* sont une source majeure d'agar (SIWACH et SINGH, 2009). L'agarose est utilisée comme matrice de séparation, car elle permet une diffusion rapide des macromolécules de poids moléculaire élevé (de 1000 Kda) sans rétention significative par le gel. En outre, l'agarose est non toxique, et ce, contrairement au polyacrylamide (SIWACH et SINGH, 2009).

Le gel d'agarose est immergé dans un tampon d'électrophorèse et la solution d'ADN est chargée dans des puits qui sont formés dans le gel par un peigne ; un courant électrique est appliqué à travers le gel et l'ADN chargé négativement migre vers l'anode. Le gel d'agarose forme une matrice poreuse à travers laquelle les molécules d'ADN les plus petites se déplaceront plus rapidement et plus loin que les grosses molécules (GOODWIN et al., 2011). Ce phénomène est appelé tamisage moléculaire (MESAPOGU et al., 2013). La méthode la plus commode et qui est couramment utilisée pour visualiser l'ADN dans le gel d'agarose est une coloration avant ou après l'électrophorèse avec un fluorochrome : le BET, qui s'intercale entre les bases de l'ADN (SAMBROOK et RUSSEL 2001). Cependant, le BET a une sensibilité limitée et il est cancérigène et mutagène (ABHILASHA et SHILPA, 2015). Pour cette raison d'autres fluorochromes peuvent être utilisés. Le 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI), peut être ajouté directement à l'ADN avant l'électrophorèse (BUEL, 1995). Le SYBR Green I est un autre fluorochrome utilisé après l'électrophorèse. Il est plus cher, mais 25 fois plus sensible, et peut-être plus sûr que le BET (MESAPOGU et al., 2013). L'ADN est visualisé en plaçant le gel sur un transilluminateur qui émet une lumière UV. Les marqueurs de taille peuvent être séparés à côté des échantillons d'ADN à analyser (GOODWIN et al., 2011).

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de montrer la présence et l'estimation de la taille des molécules d'ADN extraites. L'ADN de haut poids moléculaire peut être considéré comme une seule bande nette bien visible, alors que l'ADN dégradé qui a été fragmenté lors de l'extraction apparaît comme une tache étalée rendant les comparaisons aux marqueurs d'ADN difficile. L'estimation de la concentration par cette méthode est subjectif (GOODWIN et al., 2011), elle est basée sur la comparaison des intensités des bandes (MÜLHARDT, 2007). L'intensité de la bande de l'échantillon à concentration inconnue est comparée à l'intensité des bandes des marqueurs avec des concentrations connues (SIWACH et SINGH, 2009). La limite de détection de cette méthode est d'environ 5 ng d'ADN par bande (MÜLHARDT, 2007). Cependant, il est difficile de mesurer les quantités d'ADN dégradé car il n'y a pas de marqueurs de référence appropriés (SIWACH et SINGH, 2009).

II.3. Conservation de l'ADN extrait

L'ADN extrait peut être conservé dans du tampon TE à 4°C pendant plusieurs mois. Pour un stockage à long terme (plusieurs années), l'ADN est conservé dans l'éthanol à -20°C. La conservation de l'ADN dans un congélateur sans gel à -20°C ou -80°C est une méthode de choix pour le stockage à long terme. Cependant, si l'ADN est soumis à des cycles de congélation/décongélation successifs, cela entraîne des cassures dans sa structure (PARIMOO et PARIMOO, 2003).

Chapitre III :

Les plans d'expériences

III.1. Généralités sur les plans d'expérience

III.1.1. Introduction

Introduits en 1920, par R. A. Fisher, pour l'agronomie, les plans d'expériences ont été appliqués en 1940 aux USA par G. Box chez Dupont de Nemours et dans d'autres compagnies industrielles. Après la deuxième guerre mondiale, G. Taguchi, au Japon, a élargi leurs champs de diffusion au domaine de la qualité en production industrielle. Depuis, de nombreux secteurs d'activités industrielles ont intégré la méthodologie des plans d'expériences, aussi bien au niveau de la production, que de la recherche et développement (TELFORD 2007 ; KAMOUN et *al.*, 2011) .

A l'époque actuelle, un bon nombre de procédés de fabrication ou d'expériences en laboratoire deviennent de plus en plus complexes car ils dépendent d'un grand nombre de variables difficiles à régler intuitivement. Seule la réalisation d'expériences va permettre d'appréhender et de modéliser de tels phénomènes complexes. Si ces expériences sont effectuées sans une méthodologie rigoureuse il est fort probable qu'elles vont soit conduire à des impasses soit à des résultats de qualité décevante. C'est pourquoi la méthode des plans d'expérience est préconisée afin d'optimiser ce type de démarche (TINSSON, 2010).

Un plan d'expériences peut être défini comme une suite d'essais organisés à l'avance, de manière à déterminer, au moyen d'un nombre réduit d'essais et avec un maximum de précision, l'influence de multiples paramètres (facteurs) sur une (ou plusieurs) propriétés (s) étudiée (s) (réponses) (KAMOUN et *al.*, 2011).

L'intérêt des plans d'expériences est d'obtenir un maximum d'information en un minimum d'expériences ; établir s'il existe des relations de dépendances entre certains facteurs et certaines réponses et de les modéliser. (LINDER, 2005 ; TINSSON, 2010).

Selon TELFORD (2007) l'utilisation des plans d'expériences a pour objectifs :

- étudier les interactions entre les facteurs ;
- criblage de plusieurs facteurs ;
- établir et maintenir le contrôle de qualité ;
- optimiser un processus ;
- concevoir des produits robustes (résistants).

III.1.2. Terminologie

Les plans d'expériences ont un vocabulaire et une terminologie qu'il est nécessaire de définir.

a- Réponse : On qualifie de réponse la grandeur à laquelle s'intéresse l'expérimentateur qui est observée pour chaque expérience réalisée (TINSSON, 2010).

b- Facteur : On qualifie de facteur toute variable, obligatoirement contrôlable, susceptible d'influer sur la réponse observée (TINSSON, 2010). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau. Les variations d'un niveau sont limitées entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas. La borne supérieure est le niveau haut. L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le domaine du facteur (figure 11). Le niveau bas est noté -1 et niveau haut noté +1 (GOUPY, 1997).

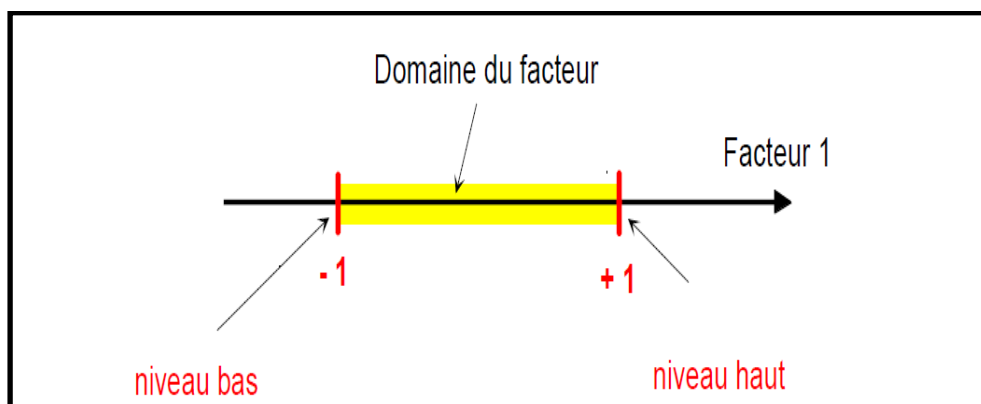


Figure 11 : Domaine de variation du « facteur » (GOUPY, 2006a).

c- Espace expérimental : Un facteur peut être représenté par un axe gradué et orienté. S'il y a un second facteur continu, il est représenté, lui aussi, par un axe gradué et orienté. Ce second axe est disposé orthogonalement au premier. On obtient ainsi un repère cartésien qui définit un espace euclidien à deux dimensions. Cet espace est appelé l'espace expérimental (figure 12). L'espace expérimental comprend tous les points du plan « facteur 1 × facteur 2 » et chacun d'eux représente une expérience (GOUPY, 2006b).

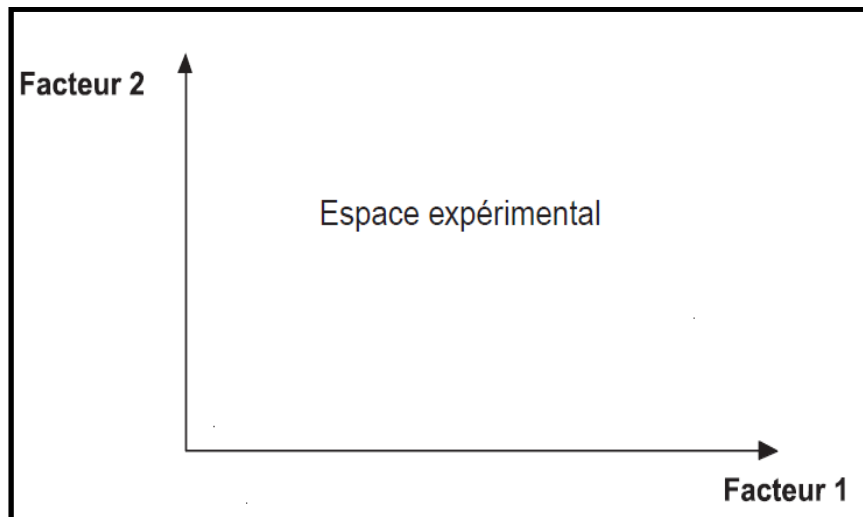


Figure 12. Définition de l'espace expérimental (GOUPY, 2006b).

d- Domaine d'étude : Domaine expérimental délimité par les niveaux inférieurs et supérieurs des facteurs étudiés (figure 13) (KAMOUN et *al.*,2011). C'est la zone de l'espace expérimental choisie par l'expérimentateur pour faire ses essais (GOUPY, 2006a).

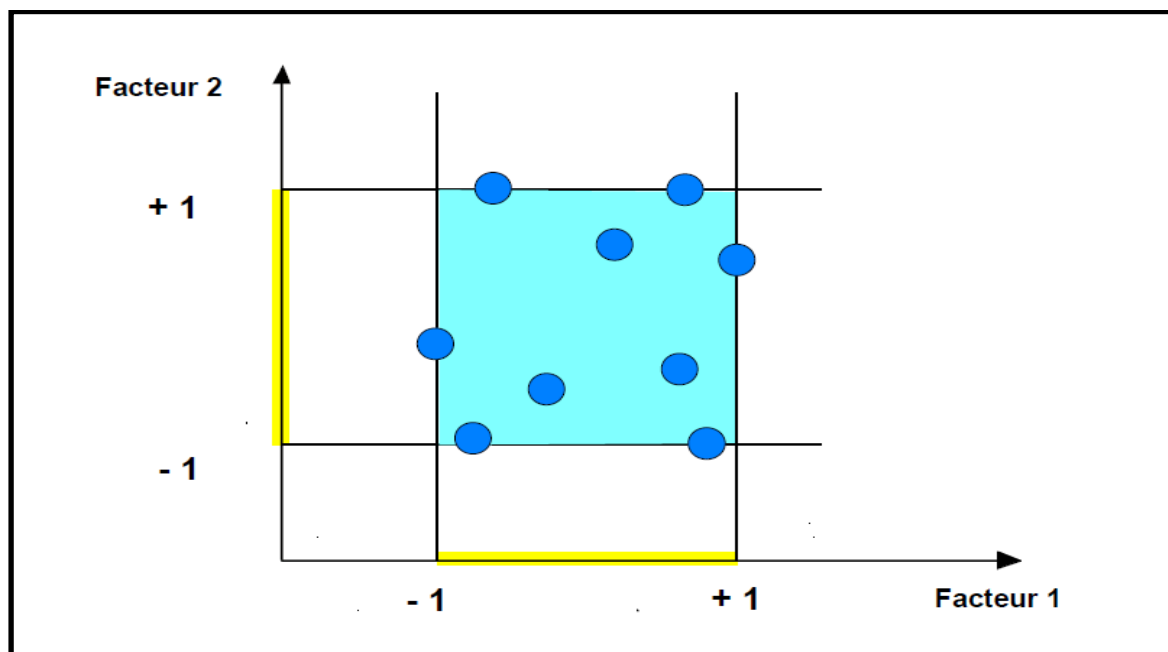


Figure 13 . Définition du domaine d'étude par l'expérimentateur (GOUPY, 2006a). Une étude, c'est-à-dire plusieurs expériences bien définies, est représentée par des points répartis dans le domaine d'étude

e- **Surface de réponse** : A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. À l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localise sur une surface appelée surface de réponse (figure 14) (GOUPY, 2006b).

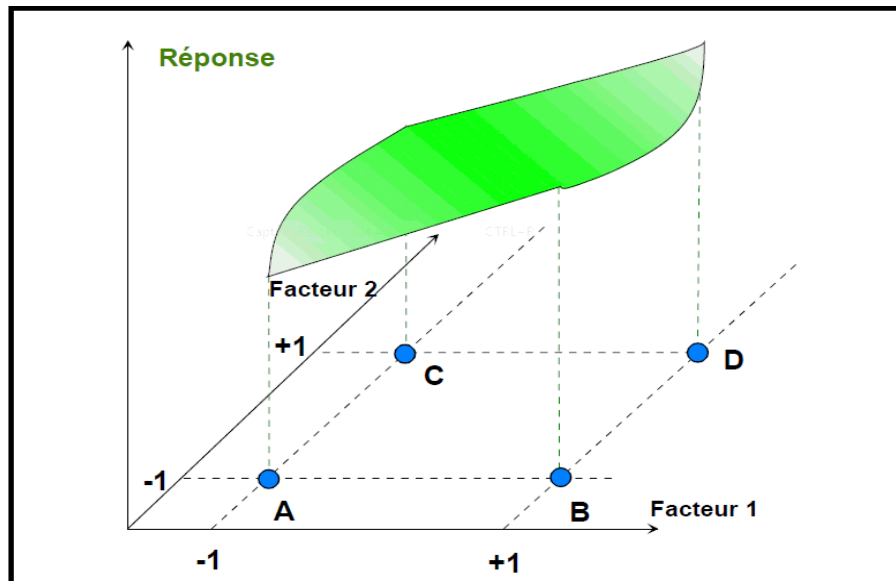


Figure 14 : Définition de la surface de réponse (GOUPY, 2006a).

III.1.3. Modélisation mathématique de la réponse

III.1.3.1. Modélisation mathématique

En l'absence de toute information sur la fonction qui lie la réponse aux facteurs, on se donne a priori une loi d'évolution dont la formulation la plus générale est la suivante (équation 2) (GOUPY, 2000) :

$$y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n) \quad (2)$$

Cette fonction est trop générale et il est d'usage d'en prendre un développement limité de Taylor-Mac Laurin, c'est-à-dire une approximation. Si les dérivées peuvent être considérées comme des constantes, le développement précédent prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé (équation 3) (GOUPY, 2000) :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij} \dots x_i x_j \dots x_z \quad (3)$$

où

-y est la réponse ou la grandeur d'intérêt. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et elle est obtenue avec une précision donnée ;

- x_i représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai. Cette valeur est parfaitement connue ;

- a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} sont les coefficients du modèle mathématique adopté a priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences.

L'intérêt de modéliser la réponse par un polynôme est de pouvoir calculer ensuite toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligé de faire les expériences (GOUPY, 2006a)

III.1.3.2. Modélisation expérimentale

Deux compléments doivent être apportés au modèle précédemment décrit. Le premier complément est le "manque d'ajustement". Cette expression traduit le fait que le modèle a priori est fort probablement différent du modèle réel qui régit le phénomène étudié. Il y a un écart entre ces deux modèles. Cet écart est le manque d'ajustement (*lack of fit* en anglais). Le second complément est la prise en compte de la nature aléatoire de la réponse. En effet, si l'on mesure plusieurs fois une réponse en un même point expérimental, on n'obtient pas exactement le même résultat. Les résultats sont dispersés. Les dispersions ainsi constatées sont appelées erreurs expérimentales. Ces deux écarts, manque d'ajustement et erreur expérimentale, sont souvent réunis dans un seul écart, notée e . Le modèle utilisé par l'expérimentateur s'écrit alors (équation 4) (GOUPY, 2000) :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z + e \quad (4)$$

III.2. Classification des plans d'expériences

III.2.1. Plans factoriels

Les plans factoriels sont largement utilisés dans des études où le nombre de facteurs est peu élevé et où il est nécessaire d'estimer, à la fois, les effets des facteurs et de leurs interactions sur la propriété d'intérêt (KAMOUN et al., 2011).

III.2.1.1. Plans factoriels complet

Un plan factoriel complet comprend toutes les combinaisons possibles des niveaux de chaque facteur avec les niveaux de tous les autres facteurs (CZITROM, 1997 ; ANTONY, 2003 ; GATTI, 2015). Les plans factoriels complets peuvent fournir de bonnes informations, ils sont fréquemment utilisés dans la pratique lorsque il y a un petit nombre de facteurs et de niveaux, et cela pour lancer toutes les combinaisons expérimentales avec réplication (gagner du temps et diminuer le coût). Pour k facteurs, chacun d'eux avec n niveaux, il y a n^k combinaisons possible des niveaux des facteurs (GATTI, 2015).

Le plan factoriel complet à 2 niveau (noté 2^k) est particulièrement très utile au début de l'expérimentation spécialement lorsque le nombre de facteurs est inférieur ou égale à 4 (ANTONY, 2003). Dans ces plans, les facteurs ne peuvent prendre que 2 niveaux distincts (GOUPY, 2000). Lorsque le nombre de facteurs est supérieur à 4 on utilise le plan factoriel fractionnaire (MYERS et *al.*, 2009).

Les plan factoriel à 2 niveau le plus simple est celui avec 2 facteurs noté 2^2 (MYERS et *al.*, 2009). Le domaine d'étude est un carré (figure15). Le modèle mathématique postulé est un modèle du premier degré par rapport à chaque facteur (équation 5) (GOUPY, 2000).

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 + e \quad (5)$$

où, y est la réponse ; x_i représente le niveau attribué au facteur i ; a_0 est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude ; a_1 est l'effet (ou effet principal) du facteur 1 ; a_2 est l'effet (ou effet principal) du facteur 2 ; a_{12} est l'interaction entre les facteurs 1 et 2 ; e est l'écart.

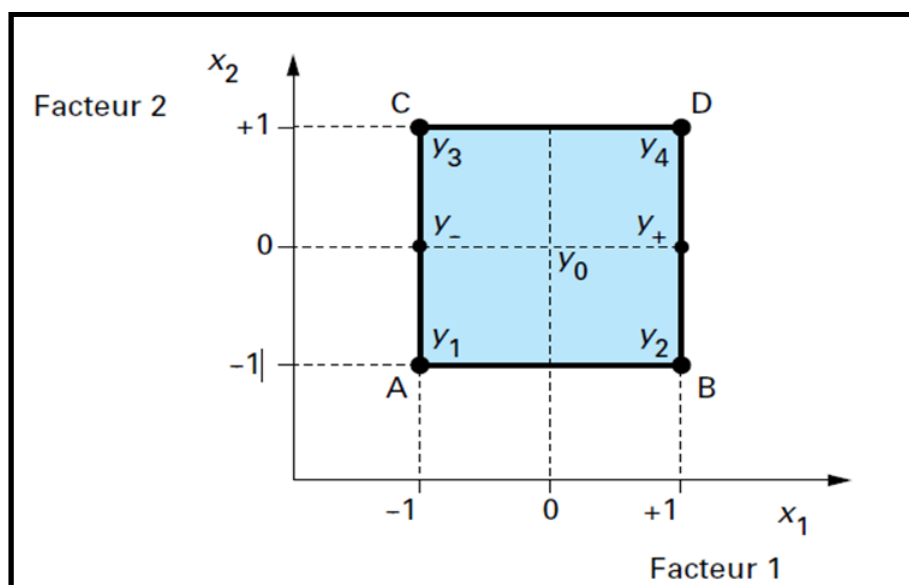


Figure 15. Meilleur emplacement des points expérimentaux (GOUPY, 1997). Le meilleur emplacement des points expérimentaux se situe aux sommets du carré représentant le domaine d'étude : points A, B, C et D.

III.2.1.2. Plans factoriels fractionnaires

Très souvent, les expérimentateurs n'ont pas de temps, les ressources et l'argent nécessaire pour réaliser les expériences basées sur le plan factoriel complet. L'expérimentateur peut apporter les informations sur les effets principaux en réalisant une fraction du plan factoriel complet. Un plan qui permet à l'expérimentateur d'étudier les principaux effets et interactions en un minimum d'essais est appelé un plan factoriel fractionnaire (ANTONY, 2003). Ces plans sont notés n^{k-p} , où p détermine une fraction du plan factoriel complet (GATTI, 2015).

Le plan factoriel fractionnaire à 2 niveau noté 2^{k-p} est le plus utilisé (ONYIAH, 2008). Ce plan a 2 fois moins, ou 4 fois moins ou 2^q fois moins d'essais que le plan factoriel complet correspondant. Un plan 2^{k-q} permet d'étudier k facteurs prenant chacun deux niveaux. Le plan complet a été divisé par 2^q . Par exemple un plan 2^{5-2} permet d'étudier cinq facteurs prenant chacun deux niveaux en 8 essais. Le plan complet a été divisé par 2^2 (GOUPY, 2000).

III.2.2. Plans pour surfaces de réponses

Les modèles étudiés précédemment, d'ordre un ou bien avec effets d'interactions, ne permettent pas toujours de rendre compte correctement du phénomène étudié. Il existe en effet des situations où de tels modèles vont s'avérer trop pauvres, principalement parce qu'ils

ne comportent pas de termes quadratiques aptes à traduire une "courbure" dans la réponse étudiée. Afin de pallier ce type de problème il est possible d'ajuster cette fois un modèle polynomial complet de second degré. On dit alors que l'on ajuste une surface de réponse (TINSSON, 2010).

Les plans du second degré ou plans pour surfaces de réponses permettent d'établir des modèles mathématiques du second degré. Ils sont utilisés pour les variables continues. Pour deux facteurs (équation 6) (GOUPY, 2000) :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + e \quad (6)$$

Il existe plusieurs types de plans du second degré dont les principaux sont : les plans composites, les plans de Box-Behnken et les plans de Doehlert.

III.2.2.1. Plans composites centrés

Le plan composite centré a été présenté par Box et Wilson en 1951 (BEZERRA *et al.*, 2008). Ce plan est constitué de trois parties (figure 16) (BEZERRA *et al.*, 2008 ; ONYIAH, 2008 ; JEFF WU, 2009) :

- un plan factoriel complet ou fractionnaire dont les facteurs prennent deux niveaux ;
- au moins un point expérimental situé au centre du domaine d'étude ;
- des points axiaux notés α (ou points en étoile). Ces points expérimentaux sont situés sur les axes de chacun des facteurs.

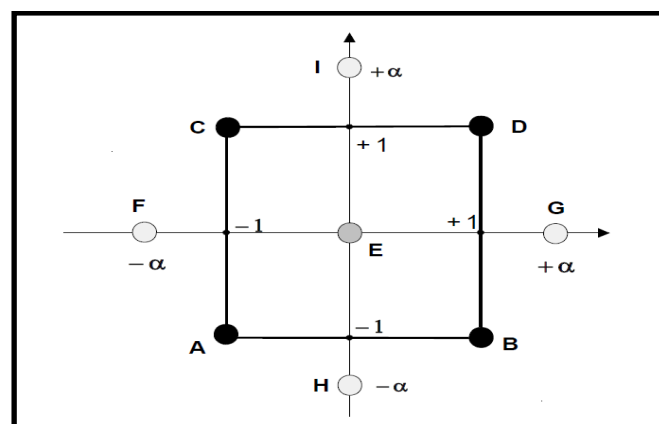


Figure 15. Plan composite centré pour deux facteurs (GOUPY, 2006a). Les points A, B, C et D sont les points expérimentaux d'un plan 2^2 . Le point E est le point central. Ce point peut avoir été répliqué une ou plusieurs fois. Les points F, G, H et I sont les points axiaux.

L'objectif de ces plans est de compléter les plans d'expérience factoriels (complets ou fractionnaires) de manière à pouvoir ajuster un modèle pour surfaces de réponses (TINSSON, 2010).

III.2.2.2. Plans de Doehlert

Développés par David H. Doehlert en 1970 (BEZERRA et *al.*, 2008), ils sont un peu moins connus, mais ils sont utiles pour la méthode de surfaces de réponses (DEJAEGHER et *al.*, 2010).

Le domaine défini par les plans de Doehlert est un domaine sphérique, un cercle dans un espace à deux dimensions, une sphère dans un espace à trois dimensions, une hypersphère dans un espace à plus de trois dimensions (BEZERRA et *al.*, 2008). Les points d'expériences remplissent de manière uniforme l'espace expérimental. Ainsi, les distances entre toutes les expériences voisines sont égales (DEJAEGHER et *al.*, 2010).

Comme les points expérimentaux sont régulièrement répartis dans l'espace expérimental, il sera facile d'étendre le plan vers n'importe quelle direction de l'espace en ajoutant des points qui seront, eux aussi, régulièrement répartis. Ces plans permettent également l'introduction facile de nouveaux facteurs (GOUPY, 2006b).

Le plan Doehlert pour deux facteurs se compose de six points situés aux sommets d'un hexagone avec un point central (figure 17), tandis que pour les trois facteurs, il se compose d'un dodécaèdre centré (figure 18). Le point central de nouveau peut être répliqué. Concernant le nombre d'expériences pour examiner un certain nombre de facteurs, les plans Doehlert sont plus économiques que les plans composites centrés (DEJAEGHER et *al.*, 2010), car ils nécessitent quelques points expérimentaux pour son application et présente une grande efficacité (BEZERRA et *al.*, 2008).

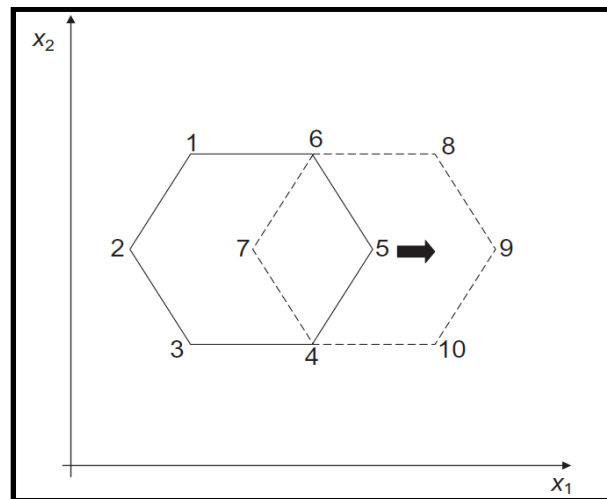


Figure 17. Plan Doehlert pour 2 facteurs (au moins 7 essais) (DEJAEGHER et *al.*, 2010).

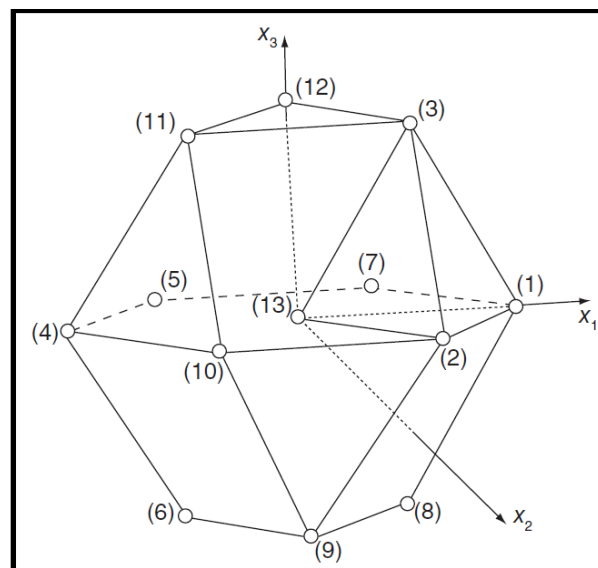


Figure 18. Plan Doehlert pour 3 facteurs (au moins 13 essais) (DEJAEGHER et *al.*, 2010).

III.2.2.3. Plans de Box Behnken

Box et Behnken en 1960 ont développés une famille de plans à trois niveaux (-1, 0 et 1) efficaces pour les surfaces de réponse de second degré (MYERS et *al.*, 2009).

Les plans Box et Behnken sont utiles lorsque des expériences dans les sommets sont indésirables ou impossibles. Dans la plupart du temps, ces plans sont utilisés lorsque l'étude réalisée se porte sur trois ou quatre facteurs. Noter que ce type de plans sont inexistant pour la situation à deux facteurs (ERIKSSON et *al.*, 2008).

Le plus connu des plans de Box-Behnken est celui qui permet d'étudier trois facteurs. Les points expérimentaux sont au milieu des arêtes de chacun des côtés du cube (Figure 19). Ce plan comporte douze essais auxquels on peut ajouter un (ou plusieurs) point central. Dans la pratique on réalise souvent 3 ou 4 points au centre (GOUPY, 2006 b).

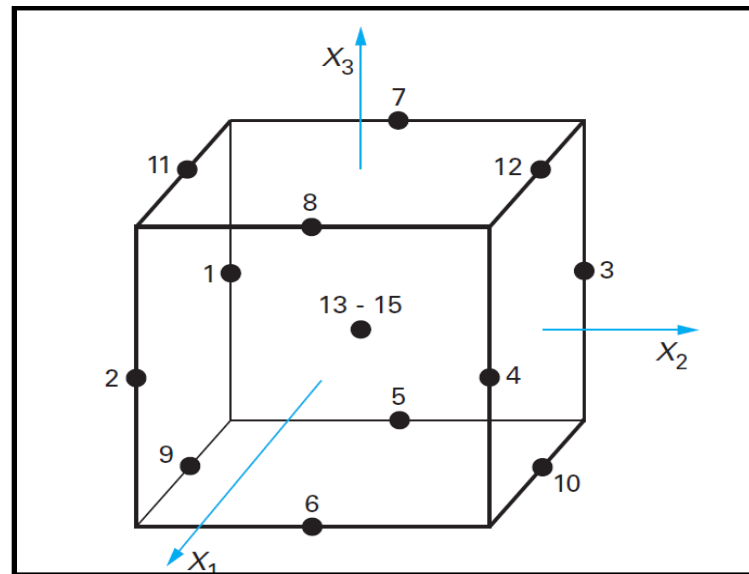


Figure 19 : Plan de Box- Behnken pour trois facteurs (KAMOUN et *al.*,2011).

III.3. Domaines d'application des plans d'expériences

Les plans d'expériences jouent un rôle de plus en plus prépondérant dans différents domaines : industriel, biologique et sciences cliniques, sciences sociales, sciences alimentaires, physique et sciences de l'ingénieur (MORSHEDI et AKBARIAN, 2014).

Les intérêts des plans d'expériences dans un procédé de fabrication quelconque comprennent (ANTONY, 2003) :

- l'amélioration du rendement et la stabilité du procédé ;
- l'amélioration des bénéfices et le coût de revenu sur l'investissement ;
- l'amélioration de l'efficacité des processus ;
- la réduction de la variabilité des processus et donc un meilleur produit de performance régulière ;
- la réduction des coûts de fabrication ;
- la réduction des étapes et le temps des processus ;
- l'augmentation de la rentabilité de l'entreprise.

Partie expérimentale

Chapitre I :

Matériel et méthodes

La partie expérimentale a été réalisée dans le laboratoire d'analyses physicochimiques, le laboratoire pédagogique de microbiologie et le laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques, de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

L'étude consiste en l'optimisation, par la méthode de surfaces de réponses, de trois paramètres liés au protocole d'extraction chimique de l'ADN de *Brassica oleracea* var. *botrytis*. Les trois paramètres en question sont : le volume du tampon de lyse ; le volume de chloroforme et le rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification.

I.1.Matériel

I.1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé comme source d'ADN est un végétal dénommé *Brassica oleracea* var. *botrytis* communément appelé chou-fleur (figure20). Ce dernier a été acheté dans un marché à Tizi Ouzou et a été conservé au réfrigérateur, et ce, afin d'éviter sa détérioration.



Figure 20 : Photo du chou-fleur (*Brassica oleracea* var. *botrytis*).

Le chou-fleur est choisi comme source d'ADN, d'une part en raison de la quantité d'ADN par unité de masse qui est très importante dans les cellules de son inflorescence méristimatique, et d'autre part, pour l'absence de pigmentation ou de chlorophylle. De plus, les cellules méristématiques qui constituent la pomme du chou-fleur sont bordées de parois primaires minces, faciles à déchirer au broyage (LARDON, 2015).

I.2. Méthodes**I.2.1. Extraction, purification et quantification de l'ADN**

Les étapes d'extraction, de purification et de quantification de l'ADN de *Brassica oleracea* var. *botrytis* ont été réalisées, respectivement selon les protocoles rapportés par LELIEVRE (2013), PANG et *al.*, (2008) et BELISLE et SONNENBERG (1998).

II.1.1. Lyse cellulaire

La première étape implique la lyse cellulaire pour libérer l'ADN, tout en détruisant les parois cellulaires et les membranes plasmiques. Celle-ci peut être accomplie par des méthodes physiques, chimiques ou enzymatiques.

Dans notre cas, nous avons combiné la lyse mécanique et chimique. Vingt grammes de tissu sont prélevés à partir de l'extrémité de la pomme du chou-fleur puis broyés dans un mortier. Le broyat est récupéré dans un tissu, puis filtré. A partir du filtrat, une aliquote de 0,5 ml est prélevée et introduite dans un tube à essai auquel est ajouté un volume donné de solution de lyse, le mélange obtenu est alors homogénéisé à la main avant d'être incubé au bain-marie (NÛVE BATH) à 70°C pendant 30 min. Après incubation, le tube est centrifugé à 6000 tr/min pendant 20 min à 20°C (dans une centrifugeuse HETTICH ZENTRIFUGEN D-7200). Le surnageant est récupéré dans un tube à essai propre afin de subir l'étape de purification.

La composition de la solution de lyse est décrite dans le tableau II.

Tableau II : Composition de la solution de lyse (LELIEVRE, 2013).

Concentrations de des solutions mères	Volumes prélevé	Concentrations finales	Rôles des produits
Tris-HCl 1 M pH8	1 mL	Tris-HCl 100 mM pH8	Rôle tamponneur à pH8
EDTA 0,5 M pH8	2 mL	EDTA 100 mM pH8	Chélateur des cations bivalents
NaCl 1 M	1 mL	NaCl 100 mM	Interactions ADN-protéines
SDS 20%	1 mL	SDS 2%	Lyse membranaire
H2O	5 mL	H2O	-----

II.1.2. Purification et précipitation de l'ADN

A l'issue de l'étape de la lyse cellulaire, l'ADN est purifié et précipité en utilisant la méthode de PANG et *al.* (2008) mais modifiée. Les modifications apportées concernent la vitesse et le temps de centrifugation et le temps de repos du mélange (phase supérieure-NaCl/éthanol absolu).

Le surnageant récupéré est purifié avec un volume égal du mélange : Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique (P/C/A). Le mélange (surnageant-P/C/A) est homogénéisé et centrifugé à 6000 tr/min pendant 60min à 4°C. La phase aqueuse est récupéré dans un tube à essai propre.

L'ADN contenu dans la phase aqueuse est précipité avec le mélange NaCl 5M /éthanol absolu (0,1/2,5) (v/v). Le volume de ce mélange représente un rapport donné de celui de la phase aqueuse récupérée. Le tube est agité par retournement et laissé reposer pendant 10 min à température ambiante. Ensuite le tube est centrifugé à 6000 tr/min pendant 90min à 4°C, puis, le surnageant est éliminé. Enfin, le culot d'ADN est lavé par l'éthanol 70%, séché à l'air libre et dissous dans 2,5 ml de Tris-EDTA (TE).

II.1.3. Détermination de la concentration et la pureté de l'ADN

La détermination de la concentration et la pureté de l'ADN a été effectuée par la méthode décrite par BELISLE ET SONNENBERG (1998). Une dilution au 1/50 avec le TE est réalisée à partir de la solution d'ADN mère (ADN dissout dans 2,5ml du TE). La DO de l'échantillon est mesurée à 260nm et 280nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible (SPECRUM SP-2000UV) contre le blanc (TE).

La concentration d'ADN est calculée en utilisant la formule suivante (équation 7) :

$$\text{Concentration de l'ADN } (\mu\text{g/ml}) = 50 (\mu\text{g/ml}) \times (\text{facteur de dilution}) \times DO_{260 \text{ nm}} \quad (7)$$

La pureté de l'ADN est déterminée par le calcul du rapport DO_{260}/DO_{280} . L'ADN bicaténaire pur présente un rapport de 1,8. Des valeurs du rapport comprises entre 1,7 et 2 sont considérées également acceptables.

La figure 21 résume les différentes étapes du protocole expérimental de l'extraction, purification et quantification de l'ADN de *Brassica oleracea* var. *botrytis*.

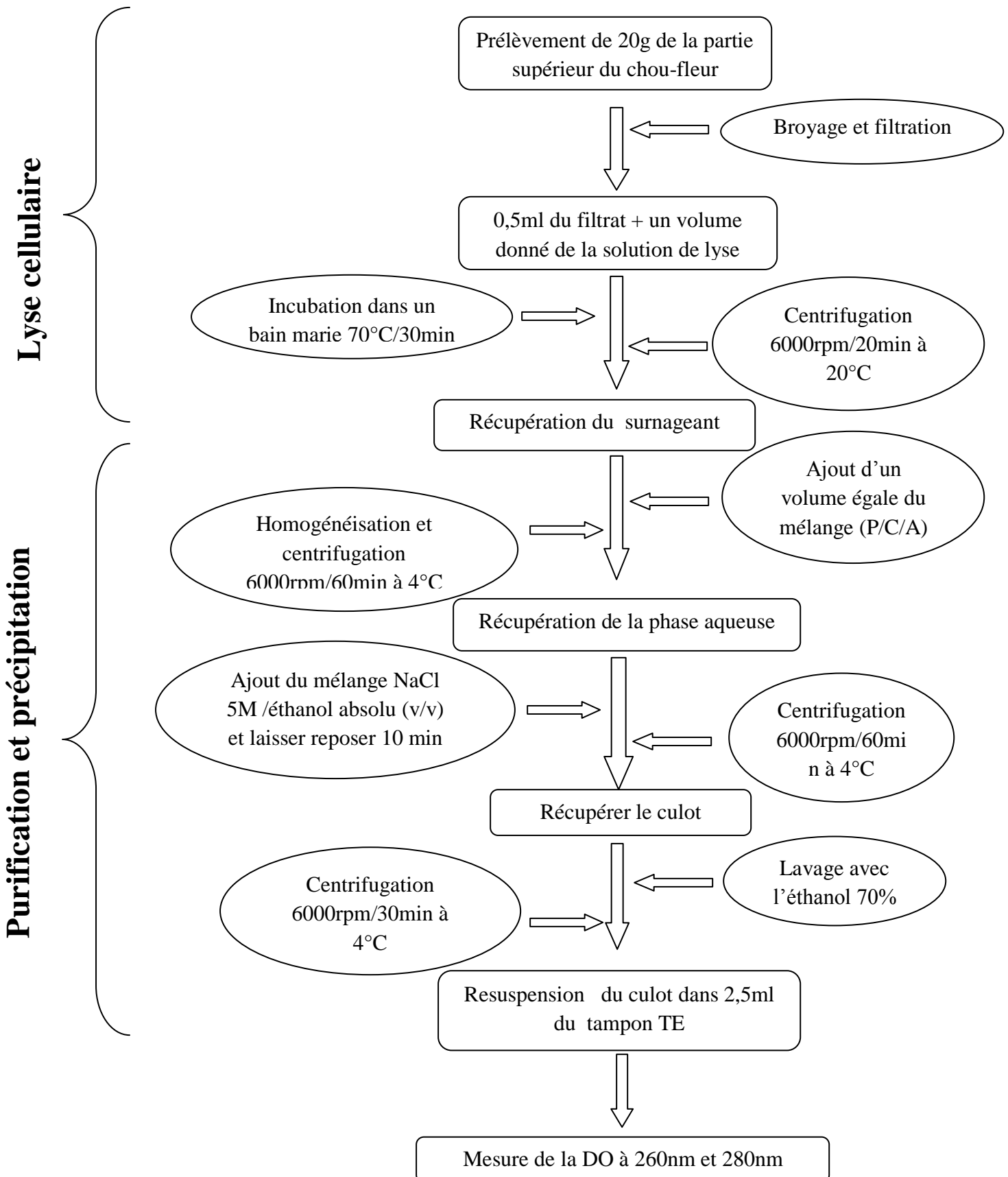


Figure 21 : Protocole expérimental de l'extraction, purification et quantification de l'ADN de *Brassica oleracea* var. *botrytis*.

II.2. Optimisation par la méthodologie de surfaces de réponses

L'optimisation par la méthode de surfaces de réponses a été réalisée en utilisant le logiciel Statistica *Release 7.0*.

L'optimisation par MSR comporte les étapes suivantes :

- Définition des objectifs et les réponses.
- Définition des variable et des niveaux.
- Choix du plan d'expérience.
- Traitement mathématique-statistique des données expérimentales.

II.2.1. Définition des objectifs et les réponses

II.2.1.1. Définition des objectifs de l'étude

L'objectif visé lors d'une étude de surface de réponse peut être de différentes natures (GOUPY, 1999) :

- optimiser (maximiser/minimiser) une ou plusieurs variables de réponse ;
- trouver un compromis satisfaisant entre plusieurs variables de réponse,
- construire une cartographie de la variation d'une réponse dans un plan.

Dans notre étude, l'objectif visé est l'optimisation de la quantité et la qualité de l'ADN extrait à partir *Brassica oleracea var. botrytis* par une méthode chimique.

II.2.1.2. Définition des réponses caractérisant l'objectif

La modélisation d'une surface de réponse à partir d'un polynôme approprié nécessite de disposer de réponses sous forme de grandeurs quantitatives. Le nombre de réponses est spécifique à chaque étude, on parle d'optimisation multicritères dès que l'on caractérise les objectifs d'un problème à partir d'au moins deux réponses (GOUPY, 1999).

Dans notre étude, les réponses choisis et qui caractérisent l'objectifs sont : concentration de l'ADN exprimée en $\mu\text{g/mL}$ qui traduit la quantité et le rapport $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ qui traduit la qualité.

II.2.2. Définition des facteurs et les niveaux

Dans toute procédure expérimentale, plusieurs variables expérimentales ou facteurs peuvent influencer la réponse. Il est pratiquement impossible d'identifier et de contrôler les effets de chacun de ces variables. Par conséquent, il est nécessaire de sélectionner des variables qui ont des effets majeurs. Le choix des facteurs peut provenir d'un premier plan de criblage, destiné à identifier, parmi de nombreux facteurs, ceux dont l'effet sur la réponse est notable. Les plans factoriels complet ou fractionnaire à deux niveaux peuvent être utilisés pour cet objectif, car ils sont efficaces et économiques (LUNDSTEDT et *al.*, 1998).

Les unités des facteurs affectant un processus diffèrent les uns des autres. Afin de ramener chacun des facteurs à un même intervalle, de supprimer leurs unités, de permettre leur comparaison et enfin de simplifier l'analyse mathématique à venir on va systématiquement les coder (TINSSON, 2010). L'équation (8) permet de transformer une valeur réel (x) en une valeur codée (X) (BAŞ et BOYACI, 2007 ; MORSHEDI et AKBARIAN, 2014).

$$X = \frac{x - ([x \text{ max} + x \text{ min}]/2)}{[x \text{ max} - x \text{ min}]/2} \quad (8)$$

Où, x est la valeur réel, X est la valeur codée et $x \text{ max}$ et $x \text{ min}$ sont respectivement la valeur maximale et minimale de la variable réel.

Dans notre étude, trois facteurs ont été sélectionnés : le volume du tampon de lyse ; volume du chloroforme et le rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification. Les niveaux retenus pour les trois facteurs étudiés sont indiqués dans le tableau III.

Tableau III. Facteurs étudiés et leurs niveaux (les valeurs codées sont indiquées entre parenthèse).

Facteurs	Niveaux				
	Bas (-1)	Moyen (0)	Haut (+1)	- α (-1,68)	+ α (+1,68)
X1: Rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification	0,5	1	1,5	0,16	1,84
X2 : Volume de chloroforme (mL)	18	24	30	13,9	34,09
X3 : Volume du tampon de lyse (mL)	3	4,5	6	0,99	3,51

II.2.3. Choix du plan d'expérience

Dans la présente étude, le plan composite a été utilisé pour optimiser les trois facteurs choisis. La matrice du plan composite retenu est présentée en valeurs codées, dans le tableau (IV) et en valeurs réels, dans le tableau (V).

Tableau IV : Matrice d'expériences en valeurs codées.

N° d'essai	X1	X2	X3
1	-1,00000	-1,00000	-1,00000
2	-1,00000	-1,00000	1,00000
3	-1,00000	1,00000	-1,00000
4	-1,00000	1,00000	1,00000
5	1,00000	-1,00000	-1,00000
6	1,00000	-1,00000	1,00000
7	1,00000	1,00000	-1,00000
8	1,00000	1,00000	1,00000
9	-1,68179	0,00000	0,00000
10	1,68179	0,00000	0,00000
11	0,00000	-1,68179	0,00000
12	0,00000	1,68179	0,00000
13	0,00000	0,00000	-1,68179
14	0,00000	0,00000	1,68179

Tableau V : Matrice d'expériences en valeurs réelles

N° d'essai	X1	X2	X3
1	0,500	18,000	1,500
2	0,500	18,000	3,000
3	0,500	30,000	1,500
4	0,500	30,000	3,000
5	1,500	18,000	1,500
6	1,500	18,000	3,000
7	1,500	30,000	1,500
8	1,500	30,000	3,000
9	0,1600	24,000	2,250
10	1,8400	24,000	2,250
11	1,000	13,900	2,250
12	1,000	34,090	2,250
13	1,000	24,000	0,990
14	1,000	24,000	3,510

II.2.4. Traitement mathématique et statistiques des données expérimentales

Comme indiqué précédemment, le traitement mathématique et statistique des données expérimentales a été effectué à l'aide du logiciel Statistica Release 7.0. Ce dernier permet l'estimation des coefficients des modèles associés aux réponses choisies.

Les valeurs des coefficients sont estimées par la méthode des moindres carrés qui est une technique de régression multiple utilisé pour ajuster un modèle mathématique pour un ensemble de données expérimentales (BEZERRA et *al.*, 2008).

L'évaluation de la qualité globale du modèle mathématique ajusté permet de savoir si ce modèle résume correctement les résultats des essais du plan d'expériences. Pour cela, le tracé de probabilité normale qui est un tracé des résultats expérimentaux par rapport aux résultats du modèle devrait être d'environ le long d'une ligne droite. En outre, les valeurs de coefficients de déterminations multiples calculé (R^2) et R^2 ajusté donnera également des informations sur l'adéquation du modèle ajusté. En effet, la valeur de R^2 et R^2 ajusté est compris entre 0 et 1 et une valeur proche de 1 indique que la plus part de la variabilité de la réponse est expliqué par le modèle de régression (SIVAKUMAR ET SRIVASTAVAV, 2007).

Chapitre II : Résultats et discussion

Dans la perspective d'améliorer la procédure d'extraction de l'ADN de *Brassica oleracea* var. *botrytis*, nous avons entrepris d'examiner les effets de trois paramètres (facteurs) qui sont : le volume du tampon de lyse, le volume de chloroforme et le rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification sur la quantité et la qualité de l'ADN extrait. Pour ce faire, la méthode de surfaces de réponses a été appliquée par le biais du logiciel *Statistica Release 7.0*. Cette méthode nous a permis de déterminer une relation d'approximation entre les facteurs en question appelés variables d'entrée et deux réponses de sortie désignées par Y_1 et Y_2 . La première des deux estime son degré de pureté exprimé par le rapport DO_{260}/DO_{280} et la seconde correspond à la quantité d'ADN extrait en ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Au total, 14 essais expérimentaux ont été réalisés. Les valeurs obtenues inhérentes aux deux réponses sont indiquées dans le tableau VI.

Tableau VI : Les valeurs expérimentales obtenues des deux réponses (Y_1 et Y_2).

Essai	Y_1	Y_2
1	1,742	152,500
2	1,463	150,000
3	1,433	107,500
4	1,592	215,000
5	1,925	130,000
6	1,700	127,500
7	1,568	200,000
8	1,571	275,000
9	1,875	37,500
10	1,750	140,000
11	2,083	62,500
12	1,750	140,000
13	1,863	102,500
14	1,666	187,500

D'après les résultats de ce tableau, on constate que les essais 5, 9, 11 et 13 ont permis d'extraire un ADN de bonne qualité. En effet, les rapports DO_{260}/DO_{280} obtenues sont compris entre 1,8 et 2. Tandis que les autres essais donnent un ADN plus au moins pure avec des rapports DO_{260}/DO_{280} inférieur à 1,8. Par ailleurs, le même tableau indique que les meilleures concentrations de l'ADN sont obtenues dans les essais 4, 7, 8 et 14. Alors que, les essais 9 et 11 donnent les concentrations les plus faibles (37,5 et 62,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivement).

II.1. Analyse de la réponse Y_1 II.1.1. Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y_1

Sur la base de leur effets, les trois variables ou facteurs considérées ont été criblés, et ce, au seuil de confiance de 95%. Les résultats rapportés dans le tableau VII montrent que seul le facteur X_2 semble exercer un effet linéaire significative sur la réponse Y_1 ($p < 0,05$) dans les limites choisies. On constate par ailleurs, que l'effet quadratique de X_1 , l'effet quadratique de X_2 et l'effet quadratique de X_3 sont significatifs ($p < 0,05$). Le reste des effets n'est pas significatif car la valeur de p est supérieure à 0,05. La non significativité des effets d'interactions entre les différents facteurs, pris deux par deux, montre que la variation d'un des deux facteurs n'influence en rien l'effet de l'autre facteur sur la réponse.

Par ailleurs, il est à noter que le facteur X_2 semble exercer un effet linéaire négatif significatif ($p \approx 0,03$) sur la réponse Y_1 . Ceci signifie que l'augmentation de la valeur de ce facteur induit une diminution de la valeur de la réponse Y_1 . Ce qui implique qu'en moyenne, la valeur du rapport DO_{260}/DO_{280} diminue de près de 0,18 lorsqu'on passe de la valeur minimale du volume de chloroforme (18mL) à sa valeur maximale (30mL).

Tableau VII : Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y_1 .

Facteur	Effet	Erreur standard	t	p^*	-95% Limt. Conf.	+95% Limt. Conf.
Constante (ordonnée à l'origine)	5,17079	0,938895	5,50731	0,005303	2,56400	7,777580
X1 (Linéaire)	0,04749	0,056229	0,84459	0,445894	-0,10863	0,203607
X1 (Quadratique)	-2,37981	0,643696	-3,69710	0,020888	-4,16700	-0,592623
X2 (Linéaire)	-0,18111	0,056196	-3,22280	0,032195	-0,33713	-0,025084
X2 (Quadratique)	-2,29931	0,641856	-3,58228	0,023121	-4,08138	-0,517229
X3 (Linéaire)	-0,09864	0,056229	-1,75425	0,154249	-0,25476	0,057477
X3(Quadratique)	-2,41382	0,643696	-3,74994	0,019948	-4,20101	-0,626637
Interaction de X1 et X2	-0,07650	0,073434	-1,04175	0,356350	-0,28039	0,127386
Interaction de X1 et X3	-0,02550	0,073434	-0,34725	0,745905	-0,22939	0,178386
Interaction de X2 et X3	0,16650	0,073434	2,26733	0,085981	-0,03739	0,370386

*si $p < 0,05$ l'effet est significatif.

Le diagramme de Pareto permet également de détecter les effets des facteurs les plus importants et leurs interactions sur un processus. Il affiche les valeurs des effets standardisés et établit une ligne de référence sur le diagramme. Tout effet qui dépasse cette ligne de référence est potentiellement important (ANTONY, 2003). Les effets standardisés sont calculés en divisant l'effet par son erreur standard (NEUREITER et *al.*, 2002 ; ANDERSON et WHITCOMB, 2015).

Les valeurs numériques des effets standardisés des trois facteurs sur la réponse Y_1 sont illustrées dans le diagramme de Pareto (Figure 23).

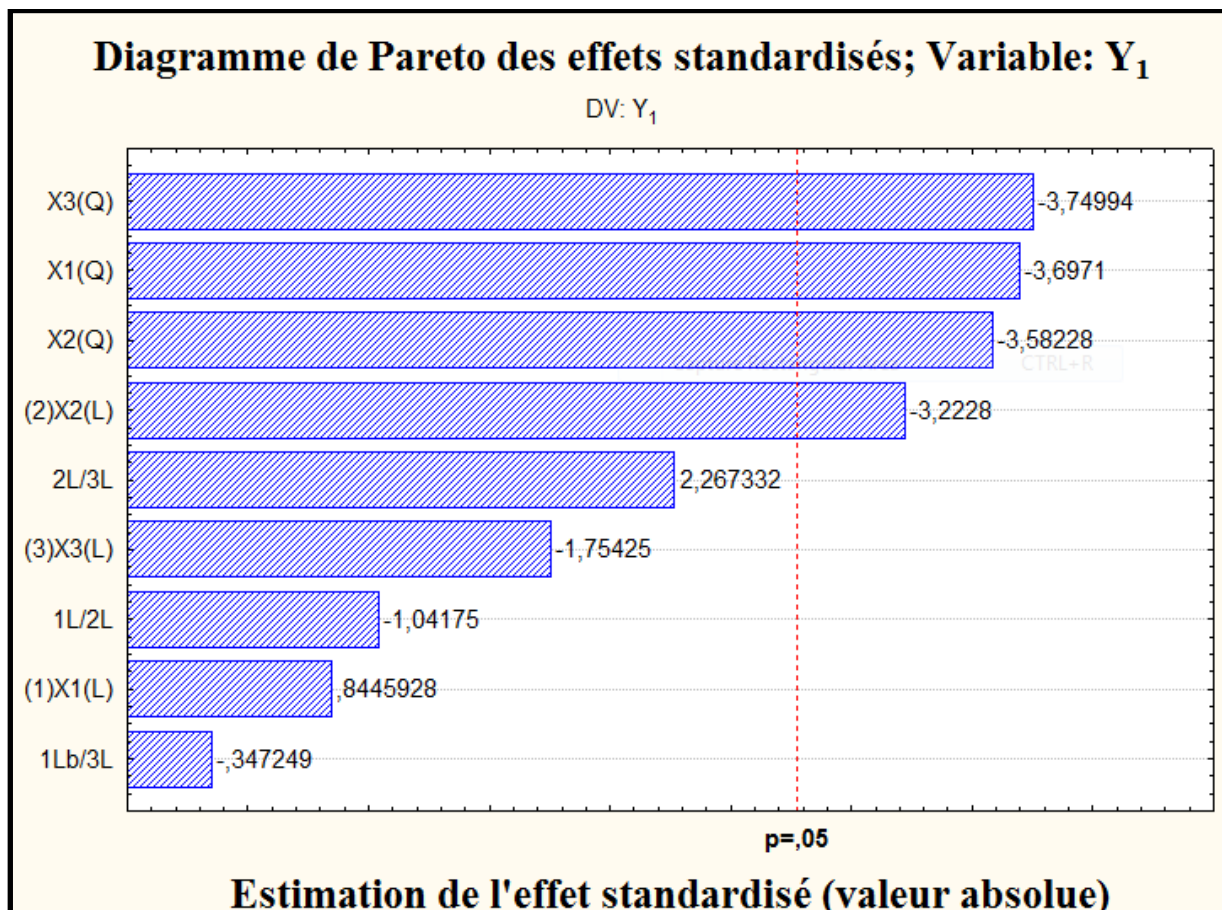


Figure 23 : Diagramme de Pareto des effets sur la réponse Y_1 (DO_{260}/DO_{280}).

Les résultats rapportés dans ce diagramme montrent que les facteurs ayant un effet significatif ($p < 0,05$), influent négativement sur la réponse Y_1 , c'est-à-dire l'augmentation des niveaux de ces facteurs induit une baisse de la qualité de l'ADN extrait.

Par ailleurs, on constate que l'effet quadratique du facteur X_3 (-3,582) est le plus important, suivi par l'effet quadratique du facteur X_1 (-3,697), l'effet quadratique du facteur X_2 (-3,582) et l'effet linéaire du facteur X_2 (-3,222).

II.1.2. Modélisation de la réponse Y_1

L'estimation des coefficients de régression du modèle mathématique lié à la réponse Y_1 est donnée dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Estimation des coefficients de régression du modèle mathématique lié à la réponse Y_1 .

Facteur	Coefficient de régression	Erreur standard	t	p^*	-95% Limt. Conf.	+95% Limt. Conf.
Constante (ordonnée à l'origine)	-27,7663	8,383171	-3,31215	0,029595	-51,0417	-4,49089
X_1 (Linéaire)	9,9492	2,601441	3,82451	0,018706	2,7265	17,17199
X_1 (Quadratique)	-4,7596	1,287392	-3,69710	0,020888	-8,3340	-1,18525
X_2 (Linéaire)	1,4889	0,428461	3,47500	0,025468	0,2993	2,67850
X_2 (Quadratique)	-0,0319	0,008915	-3,58228	0,023121	-0,0567	-0,00718
X_3 (Linéaire)	9,1795	2,584348	3,55197	0,023756	2,0042	16,35484
X_3 (Quadratique)	-2,1456	0,572174	-3,74994	0,019948	-3,7342	-0,55701
Interaction entre X_1 et X_2	-0,0128	0,012239	-1,04175	0,356350	-0,0467	0,02123
Interaction entre X_1 et X_3	-0,0340	0,097912	-0,34725	0,745905	-0,3058	0,23785
Interaction entre X_2 et X_3	0,0185	0,008159	2,26733	0,085981	-0,0042	0,04115

*si $p < 0,05$ les valeurs des coefficients de régression sont significatifs.

Les valeurs de ces coefficients sont utilisées pour établir le modèle mathématique du second degré associé à la réponse Y_1 . L'équation du modèle s'écrit comme suit (équation 9) :

$$Y_1 = -27,7663 + 9,9492X_1 - 4,7596X_1^2 + 1,4889X_2 - 0,0319X_2^2 + 9,1795X_3 - 2,1456X_3^2 - 0,0128 X_1X_2 - 0,0340X_1 X_3 + 0,0185X_2X_3 \quad (9)$$

On remarque que certains termes du modèle (coefficients de régression) présentent un $p > 0,05$, ils sont par conséquent retirés du modèle de prévision. Ce dernier est réécrit comme suit (équation 10) :

$$Y_1 = -27,7663 + 9,9492X_1 - 4,7596X_1^2 + 1,4889X_2 - 0,0319X_2^2 + 9,1795X_3 - 2,1456X_3^2 \quad (10)$$

Les qualités de l'ajustement et de prévision du modèle ont été évaluées à partir d'un tracé de probabilité normale. En effet, la figure 24 montre que le tracé de probabilité normale

il est d'environ une ligne droite. Par ailleurs, les valeurs calculées de R^2 et R^2 ajusté, égales à 0,90 et 0,68 respectivement, sont proches de 1. Ceci traduit que la plupart de la variation observée est expliqués par les effets des facteurs.

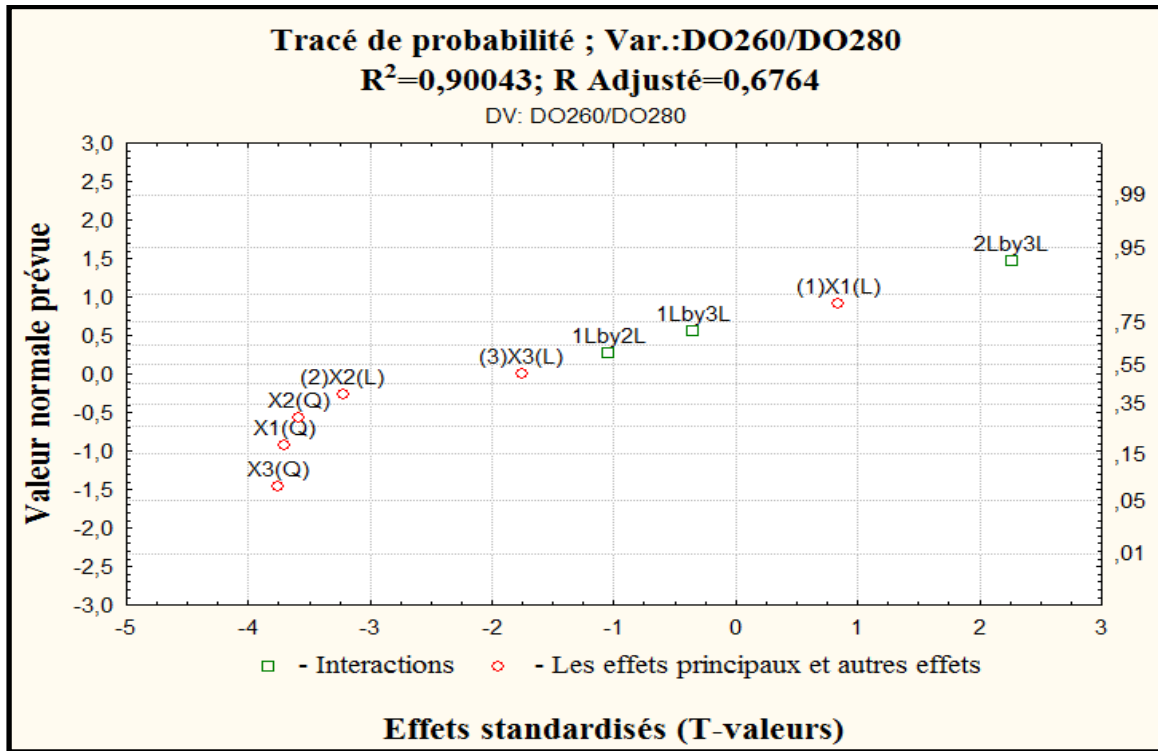


Figure 24. Tracé de probabilité normale de la réponse Y_1 .

II.1.3. Représentation des surfaces de réponses associée à la réponse Y_1

Les surfaces de réponses présentent les variations d'une réponse donnée en fonction de deux facteurs à la fois, les autres facteurs étant maintenus constants.

La figures 25 représente les surfaces de réponses associées à la réponse Y_1 .

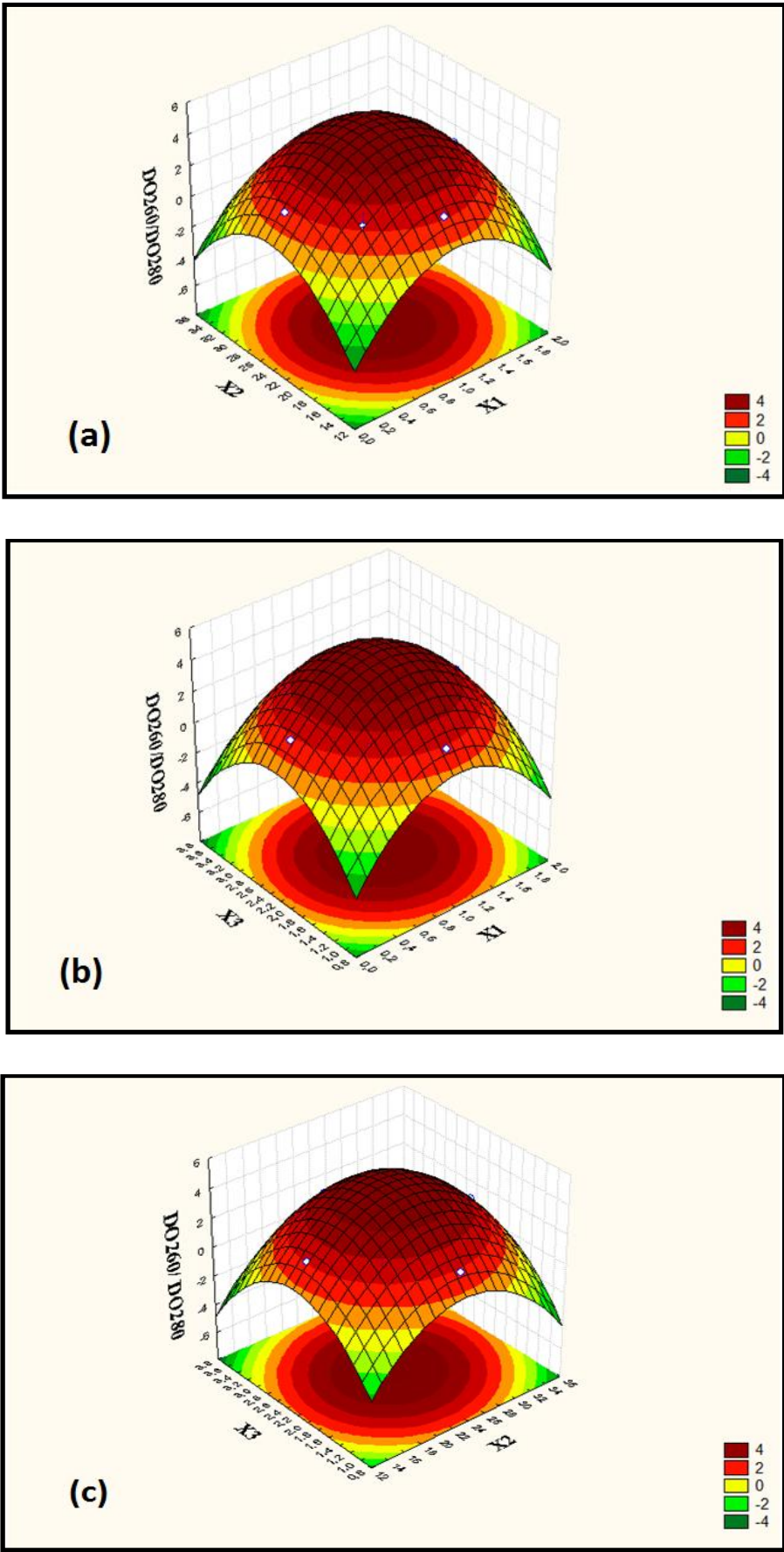


Figure 25 : Représentation des surfaces de réponse associées à la réponse Y_1 .

La figure 25a illustre l'effet du rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification et le volume du chloroforme sur la qualité de l'ADN extrait. Le volume de la solution de lyse étant maintenu à une valeur constante (2,25mL). Cette figure montre que la réponse atteint des valeurs optimales ($1,7 \leq Y_1 \leq 2$) lorsque le rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification se situe entre les valeurs de 0,6 à 1,6 et le volume du chloroforme se situe entre les valeurs de 18mL à 30mL.

La figure 25b représente l'effet du rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification et le volume de la solution de lyse sur la même réponse (qualité de l'ADN extrait). La valeur du volume du chloroforme étant fixée à 24ml. Ce graphe montre que les valeurs optimales de la réponse sont obtenues lorsque la valeur du volume de la solution de lyse se situe entre 1,4mL et 3,4mL, et pour le rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification, on observe des valeurs identiques à celles obtenues dans le graphe de la figure 25a (entre 0,6 à 1,6).

La figure 25c représente l'effet du volume du chloroforme et le volume de la solution de lyse sur la qualité de l'ADN extrait avec une valeur du rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification fixé à 1. On remarque que les valeurs optimales de la réponse sont obtenues pour des valeurs identiques à celles obtenues dans les graphes des figures 25a et 25b (pour le volume du chloroforme, les valeurs sont comprises entre 18ml et 30ml et pour le volume de la solution de lyse, les valeurs sont comprises entre 1,4ml et 3,4ml).

II.2. Analyse de la réponse Y_2

II.2.1. Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y_2

Les résultats de l'estimation des effets des facteurs sur la réponse Y_2 sont donnés dans le tableau IX. Les facteurs considérés ont été criblés en se basant sur leur effets et ce, au seuil de confiance de 95%. D'après les résultats de ce tableau, on constate que les trois facteurs semblent exercer un effet linéaire positif significatif sur la réponse Y_2 ($p < 0,05$). En effet, l'augmentation de la valeur de ces facteurs induit une augmentation de la valeur de la réponse Y_2 . Ce qui implique qu'en moyenne, la valeur de la quantité de l'ADN extrait

augmente de près de 40,997 $\mu\text{g/mL}$, 54,311 $\mu\text{g/mL}$ et 46,948 $\mu\text{g/mL}$ lorsqu'on passe de la valeur minimale à la valeur maximale des facteurs X_1 , X_2 et X_3 , respectivement.

Par ailleurs, les effets quadratiques des trois facteurs ainsi que l'interaction entre X_1 et X_2 et l'interaction entre X_2 et X_3 sont significatifs ($p < 0,05$). Toutefois, on constate l'absence d'effets d'interaction entre les facteurs X_1 et X_3 car la valeur de p de cet effet est supérieur à 0,05. Ceci montre que l'effet du facteur X_1 ne dépend pas du niveau du facteur X_3 et vice-versa.

Tableau IX : Estimation des effets des facteurs sur la réponse Y_2 .

Facteur	Effet	Erreur standard	t	p^*	-95% Limt. Conf.	+95% Limt. Conf.
Constante (ordonnée à l'origine)	-826,709	159,9470	-5,16865	0,006658	-1270,79	-382,625
X_1 (Linéaire)	40,997	9,5790	4,27992	0,012848	14,40	67,593
X_1 (Quadratique)	648,686	109,6579	5,91554	0,004089	344,23	953,145
X_2 (Linéaire)	54,311	9,5734	5,67311	0,004763	27,73	80,891
X_2 (Quadratique)	655,611	109,3444	5,99584	0,003892	352,02	959,200
X_3 (Linéaire)	46,948	9,5790	4,90118	0,008037	20,35	73,544
X_3 (Quadratique)	688,545	109,6579	6,27903	0,003285	384,09	993,005
Interaction entre X_1 et X_2	49,375	12,5100	3,94684	0,016863	14,64	84,108
Interaction entre X_1 et X_3	-8,125	12,5100	-0,64948	0,551439	-42,86	26,608
Interaction entre X_2 et X_3	46,875	12,5100	3,74700	0,019999	12,14	81,608

*si $p < 0,05$ l'effet est significatif.

Les valeurs numériques des effets standardisés des trois facteurs sur la réponse Y_2 sont illustrées dans le diagramme de Pareto (Figure 26).

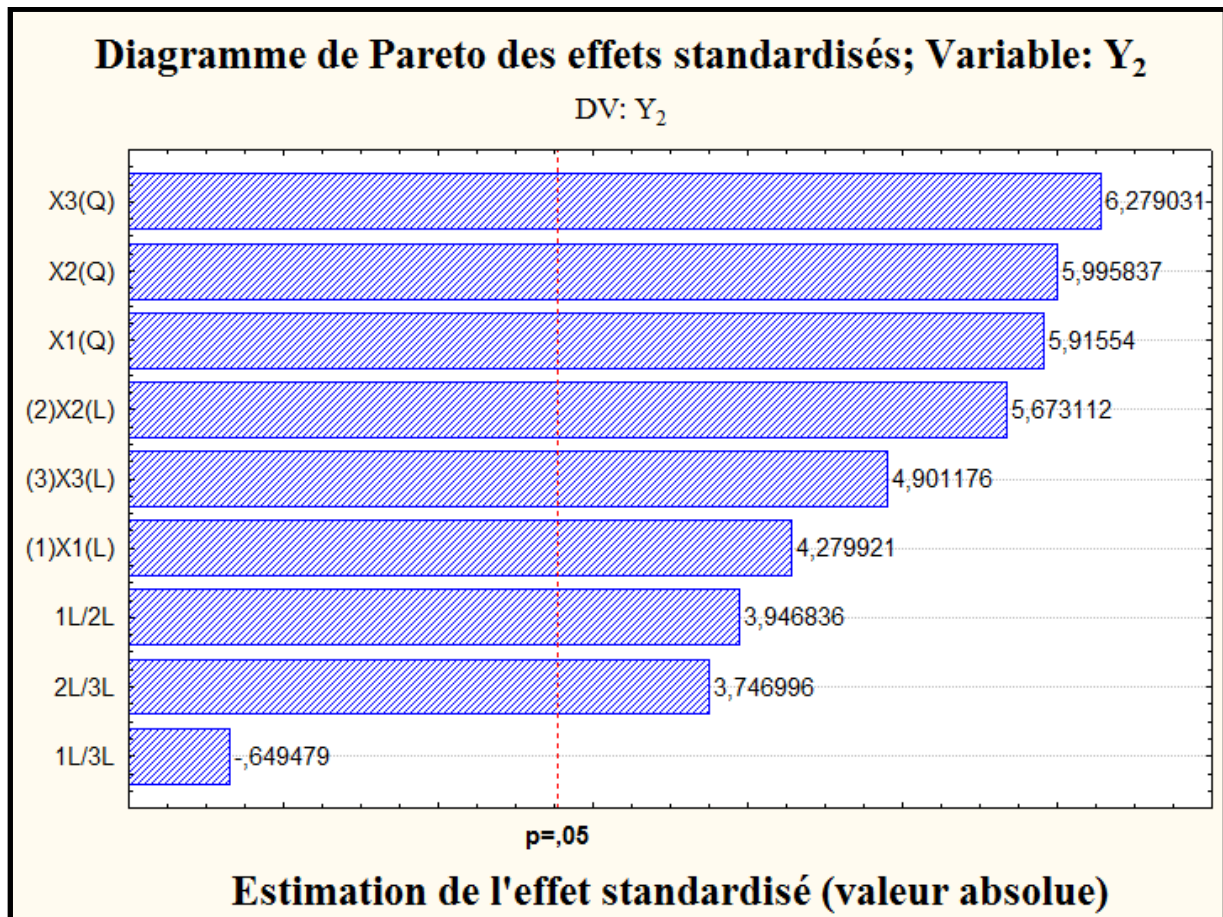


Figure 26 : Diagramme de Pareto des effets des facteurs sur la réponse Y_2

D'après ce diagramme, on constate que tous les effets significatifs ($p < 0,05$), sont positifs. Leur influence est donc positive sur la réponse Y_2 .

Par ailleurs, on constate que les effets quadratiques des trois facteurs sont les plus importants avec des effets standardisés proches, leur classement décroissant est le suivant : le facteur X_3 (6,279), le facteur X_2 (5,995) et le facteur X_1 (5,915), suivis par les effets linéaires des trois facteurs dont le classement décroissant est le suivant : le facteur X_2 (5,673), le facteur X_3 (4,901), le facteur X_1 (4,279) et l'interaction entre les facteurs X_1 et X_2 (3,946), et celle entre les facteurs X_2 et X_3 (3,746).

II.2.2. Modélisation de la réponse Y_2

Le tableau X donne l'estimation des coefficients de régression du modèle mathématique lié à la réponse Y_2 .

Tableau X : Estimation des coefficients de régression du modèle mathématique lié à la réponse Y_2 .

Facteur	Coefficient de régression	Erreur standard	t	p^*	-95% Limt. Conf.	+95% Limt. Conf.
Constante (ordonnée à l'origine)	9048,34	1428,129	6,33580	0,003177	5083,22	13013,46
X_1 (Linéaire)	-2726,87	443,173	-6,15307	0,003539	-3957,32	-1496,43
X_1 (Quadratique)	1297,37	219,316	5,91554	0,004089	688,45	1906,29
X_2 (Linéaire)	-452,50	72,991	-6,19932	0,003443	-655,15	-249,84
X_2 (Quadratique)	9,11	1,519	5,99584	0,003892	4,89	13,32
X_3 (Linéaire)	-2837,05	440,261	-6,44402	0,002984	-4059,41	-1614,69
X_3 (Quadratique)	612,04	97,474	6,27903	0,003285	341,41	882,67
Interaction entre X_1 et X_2	8,23	2,085	3,94684	0,016863	2,44	14,02
Interaction entre X_1 et X_3	-10,83	16,680	-0,64948	0,551439	-57,14	35,48
Interaction entre X_2 et X_3	5,21	1,390	3,74700	0,019999	1,35	9,07

*si $p < 0,05$ les valeurs des coefficients de régression sont significatifs.

Le modèle mathématique du second degré associé à la réponse Y_2 est donné dans l'équation (10):

$$Y_2 = 9048,34 - 2726,87X_1 + 1297,37X_1^2 - 452,50X_2 + 9,11X_2^2 - 2837,05X_3 + 612,04X_3^2 + 8,23X_1X_2 - 10,83X_1X_3 + 5,21X_2X_3 \quad (11)$$

Cependant, si on prend en considération uniquement les termes du modèle ayant une influence statistiquement significative ($p < 0,05$), le modèle se réécrit comme suit (équation 12) :

$$Y_2 = 9048,34 - 2726,87X_1 + 1297,37X_1^2 - 452,50X_2 + 9,11X_2^2 - 2837,05X_3 + 612,04X_3^2 + 8,23X_1X_2 + 5,21X_2X_3 \quad (11)$$

les qualités de l'ajustement et de prévision du modèle sont évaluées par un tracé de probabilité normale (figure 27). Ce tracé il est d'environ une ligne droite. Cependant, nous remarquons que l'interaction des facteurs X_1 et X_3 est exclue de cette droite. De plus, les

valeurs calculées de R^2 et R^2 ajusté, égales à 0,97 et 0,92 respectivement, sont proches de 1. Ceci traduit que la plupart de la variation observée sont expliqués par les effets des facteurs.

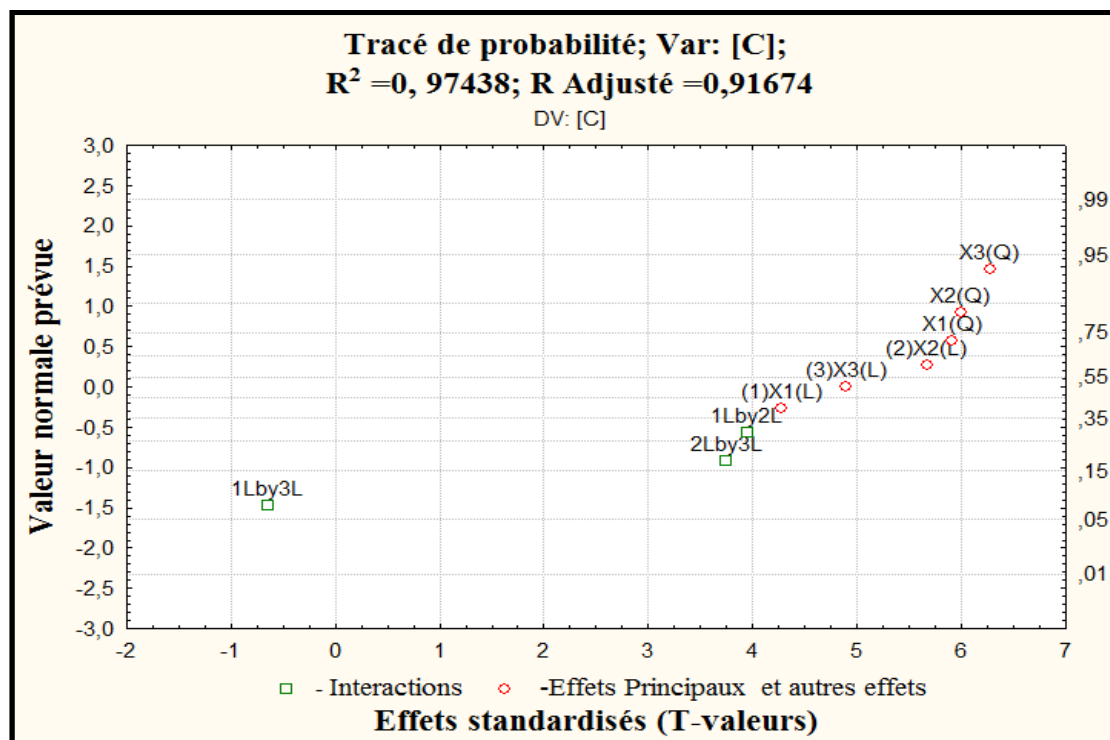


Figure 27. Tracé de probabilité normale de la réponse Y_2 .

II.2.3. Représentation des surfaces de réponses associée à la réponse Y_2

Les surfaces de réponse associées à la réponse Y_2 sont représentées dans la figure 28.

La figure 28a montre l'effet du rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification et le volume du chloroforme sur la quantité de l'ADN extrait. Le volume de la solution de lyse étant fixé à 2,25mL. Cette figure indique que la quantité atteint des valeurs optimales ($1500 \mu\text{g/ml} < Y_2 < 2000 \mu\text{g/ml}$) lorsque la valeur du rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification est de 2 et la valeur du volume du chloroforme est de 36mL.

La figure 28b représente l'effet du rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification et le volume de la solution de lyse sur la quantité de l'ADN extrait. La valeur du volume du chloroforme étant fixée à 24mL. On remarque d'après ce graphe que la quantité maximale de l'ADN ($Y_2 = 2000 \mu\text{g/mL}$) est obtenue lorsque la valeur du rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui

de la phase aqueuse récupérée après purification est de 2 et la valeur du volume de la solution de lyse est de 3,8mL.

La figure 28c représente l'effet du volume du chloroforme et le volume de la solution de lyse sur la quantité de l'ADN extrait. La valeur du rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification étant fixée à 1. On constate d'après cette figure que la valeur optimale de la quantité ($Y_2 > 2000 \mu\text{g/mL}$) est obtenues lorsque la valeur du volume du chloroforme est de 36ml et la valeur du volume de la solution de lyse est de 3,8mL.

Il apparait clairement d'après cette figure, que les valeurs élevées de la quantité de l'ADN sont atteintes lorsque les facteurs sont fixés à leur niveau haut.

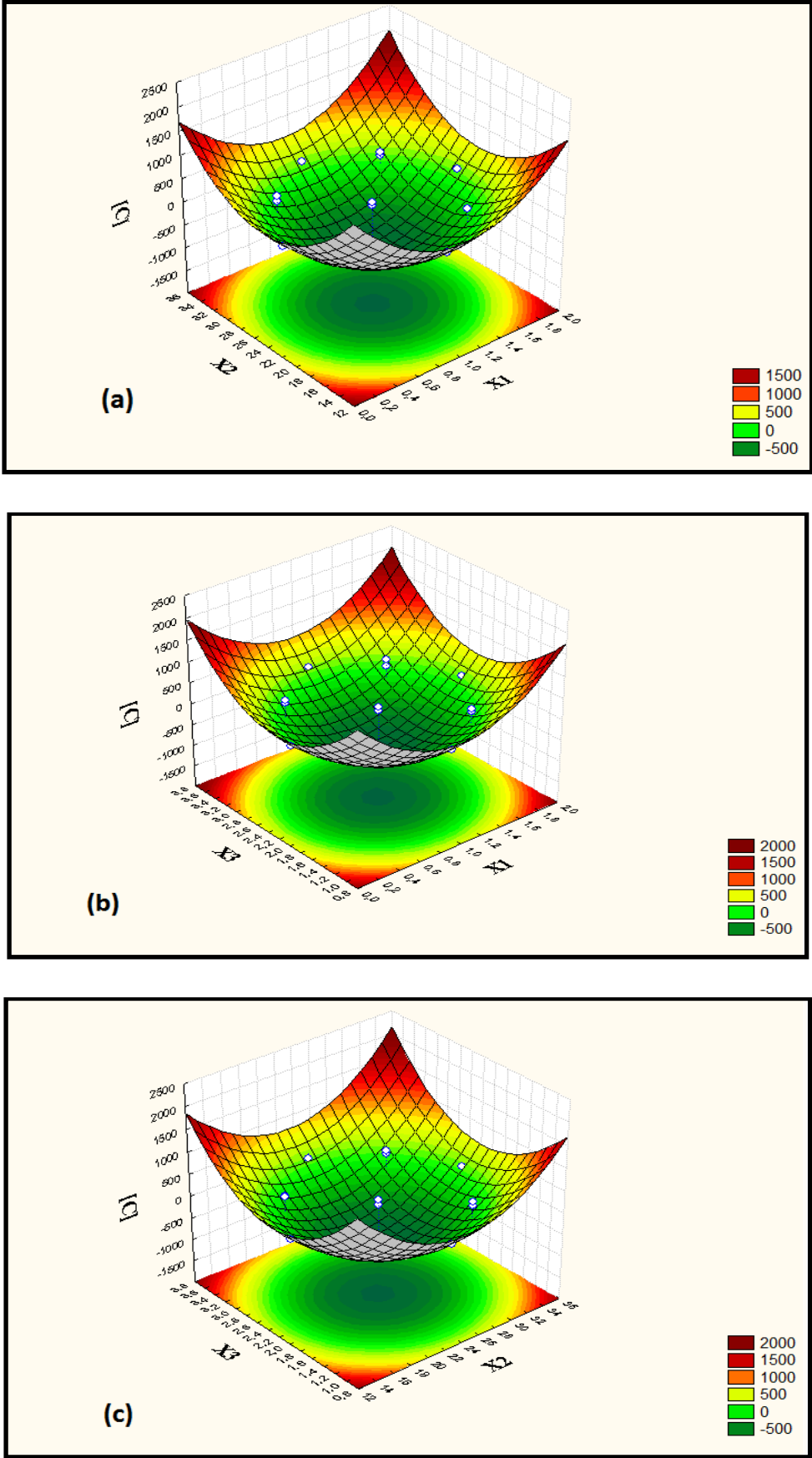


Figure 28 : Représentation des surfaces de réponse associée à la réponse Y_2 .

A notre connaissance, les informations relatives à l'influence des facteurs étudiés (le volume du tampon de lyse, le volume de chloroforme et le rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification), sont assez rares. Néanmoins, les résultats de quelques études par rapport à la quantité et la qualité de l'ADN extrait sont en accord avec les résultats de la présente étude.

Ainsi, les résultats de l'étude de KHOSRAVINIA et *al.*(2007) sur l'optimisation des facteurs influençant l'extraction d'ADN à partir de sang entier frais, montrent que le rapport du volume du tampon de lyse/volume du sang présente un effet significatif sur la qualité et sur la quantité de l'ADN extrait ce qui est en accord avec les résultats que nous avons obtenus. Par ailleurs, une autre étude réalisée par ROBE et *al.* (2003) montre que l'augmentant de la concentration en EDTA augmente l'efficacité de la lyse conduisant à des quantités d'ADN extrait plus élevées, mais de pureté inférieure car, selon KHOSRAVINIA et *al.*(2007) l'ADN pourrait être contaminé par l'EDTA. Ce résultat permet d'expliquer l'effet positif de la solution de lyse sur la quantité de l'ADN et l'effet négatif de la solution de lyse sur la qualité de l'ADN constaté dans la présente étude.

La purification de l'ADN avec un mélange P/C/A donne des rendements élevés de l'ADN de bonne qualité. Cependant, si le phénol n'est pas complètement éliminé, il va interférer avec la quantification de l'ADN car, le phénol a un coefficient d'extinction très élevé à 260nm (SANTELLA, 2006). Par ailleurs, le rôle du chloroforme dans l'extraction de l'ADN selon SAMBROOK et RUSSEL (2001), est d'éliminer le phénol résiduel de la phase aqueuse. Ceci peut expliquer l'effet positif du chloroforme sur la quantité d'ADN observé dans la présente étude. Néanmoins, d'après HERZER (2001), le chloroforme résiduel peut être problématique et par conséquent, l'utilisation d'important volume de chloroforme augmente le risque de contamination de l'ADN. Ceci expliquerait l'effet négatif de ce solvant sur la qualité de l'ADN extrait constaté dans la présente étude.

CHEN et *al.* (2010) ont rapporté dans leur étude que, l'augmentation du volume d'éthanol augmente la quantité de l'ADN précipité, ce qui confirme les résultats observés dans la présente étude. De plus, LEVER et *al.* (2015) rapportent que la quantité d'ADN précipitée par le mélange NaCl/éthanol est plus importante que celle obtenue par d'autres mélanges sel/alcool. Cependant, l'éthanol doit être éliminé complètement après l'étape de lavage par séchage, pour éviter d'éventuelles contaminations. Ce qui conduirait selon

KHOSRAVINIA et al. (2007) à une détermination incorrecte de la concentration de l'échantillon et la diminution de la qualité de l'ADN extrait.

II.4. Validation des modèles mathématiques obtenus

Nous avons entrepris de vérifier les modèles mathématiques obtenus en testant quatre combinaisons de conditions déterminées à partir des surfaces de réponses obtenues. Ces conditions ont été vérifiées expérimentalement. Les résultats des réponses prédits par les deux modèles ainsi que ceux obtenues expérimentalement sont montrés dans le tableau XI.

Tableau XI. Les résultats des réponses prédites et expérimentales de quelques conditions.

Essai	Facteur						Réponse			
	X ₁		X ₂		X ₃		Y ₁		Y ₂	
	Val. codée	Val. réelle	Val. codée	Val. réelle	Val. codée	Val. réelle	Val. prédite	Val. exp.	Val. prédite	Val. exp.
1	1,000	1,500	-1	18,00	-1,000	1,500	1,922	2,000	142,390	130,000
2	0,000	1,000	-1,7	13,80	0,000	2,500	2,002	2,000	76,480	85,000
3	0,000	1,000	-1,681	13,900	0,000	2,500	2,065	2,083	56,450	62,500
4	0,000	1,000	-1,690	13,860	0,000	2,500	2,040	2,000	63,640	70,000

Abréviations : val. (valeur) ; exp. (expérimentale).

Pour chaque réponse, les valeurs prédites ont été comparées aux valeurs expérimentales par le test de Student avec un seuil de signification $\alpha = 0,05$ à l'aide du logiciel Statistica Release 7.0. Les résultats obtenus à partir de ce test, montre que les valeurs prédites par les deux modèles sont en accord avec les valeurs expérimentales, c'est-à-dire qu'il n'existe pas de différence significative entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales. Ceci signifie que, les deux réponses sont très bien expliquées par les modèles proposés.

Au regard des résultats présentés dans le tableau V, on est en mesure de déterminer les valeurs optimales des trois facteurs en question. Ces valeurs correspondent aux essais 1, 10 et 13.

Conclusion

La présente étude a porté sur l'optimisation de l'extraction de l'ADN de *Brassica oleracea* var. *botrytis* par la méthode de surfaces de réponses. Les paramètres optimisés sont : le volume du tampon de lyse, le volume de chloroforme et le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification.

L'analyse mathématique et statistique des données expérimentales en utilisant le logiciel Statistica *Release 7.0*, a permis d'estimer les effets des facteurs et les coefficients de régression relatifs aux deux réponses choisies à savoir : la qualité et la quantité d'ADN extrait.

L'étude a montrée que les facteurs exerçant des effets significatifs sur la qualité sont négatifs, c'est-à-dire que l'augmentation des niveaux de ces facteurs diminue la qualité de l'ADN extrait. Tandis que les facteurs exerçant des effets significatifs sur la quantité sont positifs, c'est-à-dire que l'augmentation des niveaux de ces facteurs favorise la quantité d'ADN extrait.

De plus, l'estimation des coefficients de régression a permis la modélisation des deux réponses sous forme de modèles mathématique linéaires.

La comparaison entre les réponses prédites par les modèles et les réponses obtenues expérimentalement montre qu'il n'existe pas de différence significative et par conséquent, la qualité et quantité d'ADN extrait sont très bien expliquées par les modèles proposés.

En guise de perspectives, il serait souhaitable d'étudier l'influence des paramètres cités ci-dessus sur l'extraction de l'ADN d'autres organismes tels que les bactéries. Il serait également intéressant d'examiner l'influence d'autres paramètres sur la qualité et la quantité de l'ADN extrait tels que la concentration de l'EDTA et celle du SDS. Et pour compléter l'étude, il serait intéressant d'évaluer la qualité de l'ADN extrait par électrophorèse.

Références bibliographiques

- ❖ **ABHILASHA S., SHILPA S. C. (2015).** Bioanalytical Techniques, Ed, The Energy and Resources Institute (TERI), New Delhi.
- ❖ **ALEXANDER M.C. L., PHIL T. & ANDY B. (2013).** Molecular Biology Fourth Edition. Ed, Garland Science. New York.
- ❖ **AMEZIANE N., BOGARD M. & LAMORIL J. (2006).** Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Ed, Elsevier Masson. Paris.
- ❖ **ANANDIKA D. (2013).** Extraction et purification de l'ADN, *in* <http://www.labome.fr/method/DNA-Extraction-and-Purification.html>. USA.
- ❖ **ANDERSON M. J. & WHITCOMB P. J. (2015).** DOE Simplified: Practical Tools for Effective Experimentation, Third Edition. Ed, CRC Press. New York.

- ❖ **ANTONY J. (2003).** Design of Experiments for Engineers and Scientists. Ed, Butterworth-Heinemann. UK.
- ❖ **AUDIGIE C. & ZONSZAIN F. (1991).** Biochimie structurale. Ed, Doin. Paris. pp 266.
- ❖ **BAŞ D. & BOYACI I. H.(2007).** Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *in Journal of Food Engineering*, 78, pp 836-845.
- ❖ **BELISLE J. T. & SONNENBERG M. G. (1998).** Isolation of Genomic DNA from Mycobacteria. *In Methods in Molecular Biology vol 101*. Ed, Humana Press Inc. New Jersey.
- ❖ **BEZERRA M. A., SANTELLI R. E., OLIVEIRA E. P., VILLAR L. S. & ESCALEIRA L. A. (2008).** Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *in Talanta*, 76, pp965-977.
- ❖ **BROWN T.A. (2010).** Gene Cloning and DNA Analysis : An Introduction 6th edition. Ed, John Wiley and Sons. USA.
- ❖ **BUCKINGHAM L. & FLAWS M. L. (2007).** MOLECULAR DIAGNOSTICS : Fundamentals, Methods, & Clinical Applications. F.A. Davis Company. Philadelphia.
- ❖ **BUEL E. (1995).** The Use of DAPI as a replacement for ethidium-bromide in forensic DNA analysis. *in Journal of Forensic Sciences*, 40, pp. 275–278.
- ❖ **BUTLER J. M. (2010).** Fundamentals of Forensic DNA Typing, Ed Elsevier. USA.
- ❖ **CHACON-CORTES D. & GRIFFITHS L. R. (2014).** Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *In Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, 2, pp1-9.
- ❖ **CHEN H., RANGASAMY M., TAN S.Y., WANG H. & SIEGFRIED B.D. (2010).** Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Root worm Beetles. *In Plosone*. 5(8).

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0011963>

- ❖ **CZITROM V. (1997)**. Introduction To Design Of Experiments. In Statistical Case Studies for Industrial Process Improvement. Ed, American Statistical Association and the Society for Industrial and Applied Mathematics.USA.
- ❖ **DAS S. & DASH H. R.(2015)**. Microbial Biotechnology: A Laboratory Manual for Bacterial Systems. Ed, Springer. India.
- ❖ **DEAN A. &VOSS D. (1999)**. Design and Analysis of Experiments. Ed, Springer. New York.
- ❖ **DEJAEGHER B., DURAND A. & HEYDEN Y. V. (2010)**. Experimental Design in Method Optimization and Robustness Testing. *In Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis*. Ed, John Wiley & Sons. New Jersey.
- ❖ **DUNCAN E., SETZKE E. & LEHMANN J. (2003)**. Isolation of Genomic DNA. *In Nucleic Acids Isolation Methods*. Ed, American Scientific Publishers. USA.
- ❖ **ERIKSSON L., JOHANSSON E., KETTANEH-WOLD N., WIKSTROM C. & WOLD S. (2008)**. Design of Experiments: Principles and Applications. Ed, MKS Umetrics. Sweden.
- ❖ **GARRETT R. H. & GRISHAM C. M. (2000)**. Biochimie. Ed, De Boeck Université. Paris.
- ❖ **GATTI C. (2015)**. Design of Experiments for Reinforcement Learning. Ed, Springer. New York.
- ❖ **GOODWIN W., LINACRE A. & HADI S. (2011)**. An Introduction to Forensic Genetics, Second Edition. Ed, Wiley-Blackwell. USA.
- ❖ **GOUPY J. (1999)**. Plans d'expériences pour surfaces de réponse. Ed. Dunod. Paris.
- ❖ **GOUPY J. (2006b)**. Introduction aux Plans d'expériences 3^{ème} édition. Ed. Dunod. Paris.
- ❖ **GOUPY J.(1997)**. Plans d'expériences. *In Techniques de l'Ingénieur*. Paris. pp1-28.
- ❖ **GOUPY J.(2000)**. Modélisation par les plans d'expériences. *In Techniques de l'Ingénieur*. Paris. pp1-23.
- ❖ **GOUPY J.(2006a)**. Les Plans d'expériences. *In Revue MODULAD*. 34. Paris. Pp74-116.
- ❖ **GRIFFITHS A. J. F., MILLER J. H., SUZUKI D. T., LEWONTIN R. C., & GELBART W. M. (2002)**. Introduction à l'analyse génétique 3^{ème} édition. Ed, De Boeck université. Paris.
- ❖ **GRIFFITHS A. J. F., MILLER J. H., SUZUKI D. T., LEWONTIN R. C., & GELBART W. M. (2006)**. Introduction à l'analyse génétique 4^{ème} édition. Ed, De Boeck université. Paris.

- ❖ **GRIFFITHS A. J. F., CARROLL S., WESSLER S. & LEWONTIN R. C. (2010).** Introduction à l'analyse génétique 5^{ème} édition. Ed, De Boeck université. Paris.
- ❖ **GRIFFITHS A. J. F., GELBART W. M., MILLER J. H. & LEWONTIN R.C. (2001).** Analyse génétique moderne, 1^{ère} édition . Ed, De boeck université, Paris.
- ❖ **HERZER S. (2001).** DNA Purification. *In* Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide. Ed, Wiley-Liss. USA.
- ❖ **JEFF WU C. F. (2009).** Experiments : Planning, Analyze, And Optimization 2nd edition. Ed, John Wiley & Sons. New Jersey.
- ❖ **KAMOUN A., CHAABOUNI M. M. & AYEDI H. F. (2011).** Plans d'expériences et traitements de surface - Étude quantitative des effets et interactions. *In Techniques de l'ingénieur.* pp.1-24.
- ❖ **KAPLAN J. C. & DELPECH M. (1993).** Biologie moléculaire et médecine 2^{ème} édition. Ed, Flammarion médecine-sciences. Paris.
- ❖ **KARP G. (2013).** Cell and Molecular Biology Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments 7th edition. Ed, John Wiley and Sons. USA.
- ❖ **KHOSRAVINIA H., MURTHY H. N. N., PARASAD T. D. & PIRANY N. (2007).** Optimizing factors influencing DNA extraction from fresh whole avian blood. *In African Journal of Biotechnology.* 6 (4), pp. 481-486.
- ❖ **KUMAR A. & AWASTH A. (2009).** Bioseparation Engineering: A Comprehensive DSP Volumen. Ed, I K International Publishing House. India.
- ❖ **LARDON A. (2015).** <http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biologie/spip.php?article192>
- ❖ **LELIEVRE M. (2013).** Extraction d'ADN à partir de 1g de sol équivalent sec. *In Plateforme GenoSol.*
- ❖ **LEVER M. A., TORTI A., EICKENBUSCH P., MICHAUD A. B., ŠANTL-TEMKIV T. & JORGENSEN B. B. (2015).** A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types. *In Frontiers in Microbiology.*6(476).
http://www.frontiersin.org/Journal/Abstract.aspx?s=420&name=extreme_microbiology&ARTDOI=10.3389/fmicb.2015.00476
- ❖ **LINDER R. (2005).** Les plans d'expériences: un outil indispensable à l'expérimentateur. Ed, Presses Ponts et Chaussées. France.
- ❖ **LIPP, M., BLUTH, A., EYQUEM, F., KRUSE, L., SCHIMMEL, H., VAN DEN EEDE, G. & ANKLAM, E. (2001).** Validation of a method based on polymerase chain

reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *In European Food Research Technology* 212, 497-504.

❖ **LIPP, M., BRODMANN, P., PIETSCH, K., PAUWELS, J. & ANKLAM, E. (1999).** IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *In Journal of AOAC International* 82, 923–928.

❖ **LODIS H H., BERK A., MATSUDAIRA P., KAISER C. A., KRIEGER M., SCOTT M. P., (2005).** Biologie moléculaire de la cellule 3^{ème} édition. De boeck université. Bruxelles.

❖ **LUNDSTEDT T., SEIFERT E., ABRAMO L., THELIN B., A. NYSTRÖM A., PERTENSEN J. & BERGMAN R. (1998).** Experimental design and optimization. *In Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42 , pp. 3-40.

❖ **MAHESH K. & SOMENATH M. (2003).** Techniques For The Extraction, Isolation, And Purification Of Nucleic Acids, *in Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry* Volume 162. Ed, Wiley interscience. New Jersey.

❖ **MESAPOGU S., JILLEPALLI C. M. & ARORA D. K. (2013).** Agarose Gel Electrophoresis and Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Methods and Principles. *In Analyzing Microbes Manual of Molecular Biology Techniques*. Ed, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York..

❖ **MOORE E., ARNSCHEIDT A., KRUGER A., STRO · · MPL C. & MAU M. (2004).** Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. *In Molecular Microbial Ecology Manual, Second Edition*. Kluwer Academic Publishers. pp 3-18. Netherlands.

❖ **MORSHEDI A. & AKBARIAN M. (2014).** Application of Response Surface Methodology: Design of Experiments and Optimization: A Mini Review. *In Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*. 4, pp. 2434-2439.

❖ **MURRAY, M.G. & THOMPSON, W. F. (1980).** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *In Nucleic Acids Research* 8, 4321–4325.

❖ **MYERS R. H., MONTGOMERY D. C. & ANDERSON-COOK C. M. (2009).** Response surface methodology : process and product optimization using designed experiments. Ed, John Wiley & Sons. New Jersey.

❖ **NEUREITER M., DANNER H., THOMASSER C., SAIDI B. & BRAUN R. (2002).** Dilute-Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse at Varying Conditions. *In Applied Biochemistry and Biotechnology*. 98-100. pp.49-58.

- ❖ **NGUYEN T. H. & NGUYEN T. T. L. (2013).** Evaluation of the Human Genomic DNA extraction from Hair Root Method. *In 4th International Conference on Biomedical Engineering in Vitnam.* 40. pp. 190-194.
- ❖ **ONYIAH L. C. (2008).** Design and Analysis of Experiments Classical and Regression Approaches with SAS Leonard C. Ed, Taylor & Francis Group. USA.
- ❖ **PANG M. F., ABDULLAH N., LEE C.W. & NG C. C. (2008).** Isolation of High Molecular Weight DNA from Forest Topsoil for Metagenomic Analysis. *In Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology.* Vol. 16 (2). 35-41.
- ❖ **PAPADIMITRIOU E. & LELKES P. I. (1993).** Measurement of cell numbers in microtiter culture plates using the fluorescent dye Hoechst 33258. *In ournal of Immunological Methods,* Volume 162. 3 Elsevier Science Publishers. pp41-45.
- ❖ **PARIMOO S. & PARIMOO B. (2003).** Sample Preparation in DNA Analysis. *In Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry.* Chemical analysis volume 162. Ed, Wiley-Interscience. USA.
- ❖ **PARMJIT S. P., SATWINDER S. M. & HARISH K. C. (2010).** Enzymes in Food Processing: Fundamentals and Potential Applications. Ed, I K International Publishing House. India.
- ❖ **RAPLEY J. M. W. & Rapley R. (2000).** Molecular Biology and Biotechnology 4th Edition. Ed, The Royal Society of Chemistry. UK.
- ❖ **ROBE P., NALIN R., CAPELLANO C., VOGEL T. M. & SIMONET P. (2003).** Extraction of DNA from soil. *In European Journal of Soil Biology.* 39. pp.183–190.
- ❖ **ROBERT J. (2010).** Signalisation Cellulaire et Cancer. Ed, Springer. Paris.
- ❖ **SALGADO C. & HUSSAIN W. (2013).** The Extraction and Purification of Nucleic Acids for Analysis by PCR. *In Real-Time PCR: Advanced Technologies and Applications.* Ed, Caister Academic Press. UK.
- ❖ **SAMBROOK J. & RUSSEL D.W. (2001).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd edition. Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York.
- ❖ **SANTELLA R. M. (2006).** Approaches to DNA/RNA Extraction and Whole Genome Amplification. *In Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15. pp1585-1587.
- ❖ **SCAWEN M. D. & HAMMOND P. M. (2000).** Downstream Processing: Protein Extraction and Purification. *In Molecular Biology and Biotechnology Fourth Edition.* Royal Society of Chemistry. UK.

- ❖ **SIVAKUMAR BABU GL AND SRIVASTAVAV A (2007)**. Reliability analysis of allowable pressure on shallow foundation using response surface method. *In Computers and Geotechnics*. 34. pp187–194.
- ❖ **SIWACH S., & SINGH N. (2009)**. Molecular Biology: Principles and Practices. Ed, Laxmi Publications. New Delhi.
- ❖ **TELFORD J. K. (2007)**. A Brief Introduction to Design of Experiments. *In Johns Hopkins APL Technical Digest*. 27(3). pp.224-232.
- ❖ **TINSSON W. (2010)**. Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques. Ed, Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- ❖ **VINCENT R. (2007)**. Génétique moléculaire. Ed, De Boeck Université. Paris.
- ❖ **VOET D. & VOET J. G. (2005)**. Biochimie 2^{ème} édition. Ed, De Boeck Université. Bruxelles.
- ❖ **WAGNER, D.B., FURNIER, G.R., SAGHAY-MAROOF, M.A., WILLIAMS, S.M., DANCIK, B.P. & ALLARD, R.W. (1987)**. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines.
- ❖ **SUGUNA S., NANDAL D. H., KAMBLE S., BHARATHA A. & KUNKULOL R. (2014)**. Genomic DNA Isolation from Human Whole Blood Samples by Non Enzymatic Salting Out Method. *In International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6. pp198-199.
- ❖ **WEINMAN S. & MEHUL P. (2004)**. Toute la Biochimie. Ed Dunod. Paris.
- ❖ **WILSON K. & WALKER J. (2005)**. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology sixth edition. Ed, Cambridge University Press. New York.
- ❖ **FITZGERALD F. K. & BURDEN D. W. (2014)**. Evaluation of the Synergy™ Rapid Plant DNA Isolation Chemistry. *In OPS Diagnostics LLC*. 13. pp1-7.

Annexes

Annexe 1 : Produits et matériels utilisés dans l'expérimentation

I.1.2. Produits et réactifs utilisés

- Tris (trishydroxyméthylaminométhane) ;
- HCl (Acide Chlorhydrique) ;
- EDTA (Ethylène diamine tétra-acétique) ;
- NaOH (Hydroxyde de sodium) ;
- NaCl (chlorure de sodium)
- SDS (Dodécyl Sulfate de Sodium) ;
- Phénol ;
- Chloroforme ;
- Alcool Isoamolyque ;
- Ethanol 100% et 70%.

I.1.3. Petit matériel et verrerie

- Mortier en porcelaine ;
- Micropipettes ;
- Tubes à essai ;
- Tubes à centrifugation;
- Bêchers ;
- Fioles jaugées ;
- Eprouvette ;
- Barreaux magnétiques
- Tissu blanc

I.1.4. Appareillages

- Agitateur magnétique (RAYPA, Espagne) ;
- pH mètre (HANNA HI 8424, USA).
- Bain-marie (NÜVE BATH, Turquie)
- Centrifugeuse (HETTICH ZENTRIFUGEN D-7200, Allemagne);
- Spectrophotomètre (SPECRUM SP-2000UV, USA).

Résumé

Cette étude consiste en l'optimisation, par la méthode de surfaces de réponses, de l'extraction au phénol-chloroforme de l'ADN de *Brassica oleracea* var. *botrytis* (le chou-fleur). Trois paramètres liés à cette méthode d'extraction ont été considérés : le volume du tampon de lyse ; le volume de chloroforme et le rapport entre le volume du mélange NaCl/éthanol (v/v) et celui de la phase aqueuse récupérée après purification. Les réponses considérées sont la concentration d'ADN extrait ainsi que sa pureté.

L'étude a permis l'estimation des effets des trois paramètres sur les réponses considérées, ainsi que celle des coefficients de régression des modèles mathématiques linéaires élaborés. Ces modèles ont été validés en comparant les valeurs des réponses prédites avec celles obtenues expérimentalement. Les valeurs optimales des trois paramètres étudiés ont également été déterminées.

Mots clés : ADN, extraction, modélisation, optimisation, surfaces de réponses.

Abstract

In this study, response surface methodology was undertaken to optimize and model the DNA extraction from *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cauliflower). The design variables were the volume of the lysis buffer; the volume of chloroform and the ratio between the volume of NaCl / ethanol (v/v) and the volume of the aqueous phase recovered after purification while response variables were DNA concentration and purity.

The results of this study estimated the effects of the three parameters on the specified responses, as well as the regression coefficients of the developed linear mathematical models. On the other hand, the experimental values of responses agreed with those predicted by the two models employed. The optimal values of the three parameters studied were also determined.

Keywords: DNA, extraction, modeling, optimization, response surface methodology.