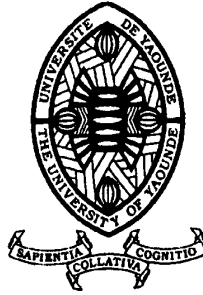


REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
ECOLE NORMALE SUPERIEURE
DEPARTEMENT DE DEPARTEMENT DES
SCIENCES BIOLOGIQUES



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
HIGHER TEACHER TRAINING COLLEGE
DEPARTMENT OF DEPARTEMENT DES
SCIENCES BIOLOGIQUES

**RECHERCHE ET IDENTIFICATION DES ENSYMES DE
RESTRICTION PRODUITES PAR LES BACTERIES
ISOLEES DES ECHANTILLONS COLLECTES DANS UN
MARECAGE DE LA LOCALITE D'EMANA VALLEE
(YAOUNDE)**

Mémoire présenté et soutenu en vue de l'obtention du Diplôme de Professeur
de l'Enseignement Secondaire 2e grade D.I.P.E.S.II

Par :

NGUIME MAKOLLO Richard
Licenciés és Sciences

Sous la direction
NKENFOU NGUEFEU Céline
Maître de Conférences



Année Académique
2015-2016



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire de Yaoundé I. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : biblio.centrale.uyi@gmail.com

WARNING

This document is the fruit of an intense hard work defended and accepted before a jury and made available to the entire University of Yaounde I community. All intellectual property rights are reserved to the author. This implies proper citation and referencing when using this document.

On the other hand, any unlawful act, plagiarism, unauthorized duplication will lead to Penal pursuits.

Contact: biblio.centrale.uyi@gmail.com

DÉDICACE

Au Seigneur JESUS-CHRIST.

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail n'a été possible que grâce à la générosité et le soutien indéfectible de nombreuses personnes que j'ai l'honneur et le plaisir de remercier ici. Je pense notamment:

- Au Pr NKENFOU NGUEFEU Céline pour votre encadrement, la confiance et l'intérêt que vous avez accordé à ce travail de recherche, votre participation active dans ce travail surtout votre patience et votre rigueur m'ont permis d'effectuer ce travail;
- Au Chef de Département des Sciences Biologiques de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé, Pr SONKE Bonaventure dont le souci est de former des Enseignants dignes et responsables;
- À tous les Enseignants du Département des Sciences Biologiques de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé pour leur dévouement et leurs enseignements pour nous offrir la meilleure formation qui soit;
- Au technicien du Molecular Biology Center, M. NOTEDJI Augustin pour l'encadrement, le sacrifice de votre temps et de tous les conseils et encouragements que vous nous avez prodigué pour l'accomplissement de ce travail;
- À tous les autres membres du laboratoire pour tous les échanges fructueux, les encouragements que j'ai reçus de vous tout au long de ce travail. Je n'oublierai non plus l'entraide, tous les services et les petits mots de soutien;
- À mon feu papa MAKOLLO LÉA Jeannot pour tous les sacrifices que tu as consentis pour nous;
- À ma maman MBONE Hélène pour tes sacrifices durant ces années afin de nous offrir la meilleure éducation qui soit. Merci pour tout ce que tu as fait et pour tout ce que tu veux faire pour nous voir aller toujours plus loin;
- À ma tante Mme MBESSI Régine pour tes conseils, encouragements et tout le soutien consentis durant ces années;
- À mes camarades de promotion et amis en général et à WANGNAMOU, NOAH VODONO, NDONG, KLAPAÏ, ONANA, MILAWE et KENGNE en particulier pour leur soutien sans faille;
- À mes frères et neveux, MBESSI Guy Martin, MBESSI Pascal, MBESSI Georgette, MBESSI Felix, LEA Richard, YOKE MAKOLLO Calixte, MBONE MAKOLLO Germaine, NGOLOCK Théodore, EKANGO Félix, BIWELE Elzira, NYABALO Samira, MBESSI Régina, MBESSI Ryan, MBESSI Achille et MBESSI Dora.

- Enfin, à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail et dont les noms ne sont pas cités, je vous dis merci.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
ABSTRACT	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xi
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTÉRATURE	3
I.1. GÉNÉRALITÉS SUR LES BACTÉRIES	3
I.1.1. Définition d'une bactérie.....	3
I.1.2. Anatomie des bactéries.	3
I.1.3. Physiologie bactérienne	6
I.2. GÉNÉRALITÉS SUR LES ENZYMES	10
I.2.1. Historique	10
I.2.2. Définition.....	10
I.2.3. Classification des enzymes	11
I.2.4. Enzymes de restriction.....	12
I.3. GÉNÉRALITÉS SUR L'ADN	20
I.3.1. Bases azotées	20
I.3.2. Bases modifiées dans l'ADN.....	21
I.4. VECTEURS EN GÉNIE GÉNÉTIQUE: L'ADN PLASMIDIQUE	21
I.4.1. Définition.....	21
I.4.2. Caractéristiques des plasmides utilisés en génie génétique	22

I.4.3. Exemple de vecteurs plasmidiques: pBR322 et pUC19	22
I.4.4. Avantages et inconvénients des plasmides	25
I.5. TECHNIQUE DE GÉNIE GÉNÉTIQUE	26
I.5.1. Électrophorèse sur gel.....	26
CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES	28
II.1. MATÉRIEL	28
II.1.1. Échantillons collectés dans un marécage de la localité d'Émana Vallée	28
II.1.2. Milieux de culture et réactifs.....	28
II.1.3. Matériel de laboratoire	29
II.1.4. Équipements	29
II.2. MÉTHODES.....	30
II.2.1. Site de collecte et d'analyse des échantillons.....	30
II.2.2. Préparation des tampons.....	30
II.2.3. Préparation des milieux de culture	30
II.2.4. Préparation des échantillons	31
II.2.5. Culture dans le milieu liquide	32
II.2.6. Préparation de l'extrait brut.....	32
II.2.7. Préparation des substrats	33
II.2.8. Réaction de digestion avec l'extrait brut.....	33
II.2.9. Migration des fragments générés par électrophorèse	33
II.2.10. Purification	34
II.2.11. Réaction d'optimisation et de mapping.....	35
CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION	36
III.1. RÉSULTATS.....	36
III.1.1. Isolement des bactéries	36
III.1.2. Identification des enzymes de restriction.....	38
III.2. DISCUSSION.....	54

CHAPITRE IV: IMPLICATION DU SUJET SUR LE SYSTÈME ÉDUCATIF	56
IV.1. GÉNÉRALITÉS	56
IV.2. INTÉRÊT DIDACTIQUE.....	56
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	63
BIBLIOGRAPHIE	64
ANNEXES.....	69

ABSTRACT

Bacteria are single-celled microorganisms with variable morphology. They can be isolated from soil, fresh water, air, skin etc. These microorganisms produce enzymes called restriction enzymes that cut double stranded DNA. Restriction enzymes provide a bacterium with the defense system especially against the DNA of the infecting virus. They recognize specific sites on the DNA molecule and cut the double strand either at the recognition site or few nucleotides away. Because of their properties, they are commonly used for manipulating DNA in the laboratory and are an essential tool in the realization of molecular cloning process in various fields. The aim of our work was to identify restriction enzymes produced by some bacterial isolated. To achieve this goal we collected samples of mud, stagnant water, leaves, sand and earth into a swamp of the resort of Emana Valley. These samples were cultivated in solid and liquid media for isolation of the different colonies. After this step, the restriction enzymes produced by the bacteria were identified thanks to optimization reactions, double digestion and mapping. We isolated a total of 32 kinds of bacteria from which 7 isolates produced an identifiable enzymatic activity (isolates R5, R7 and R10 from mud sample, R21 from leave samples, R26 from sand samples and R28 and R32 from soil samples). Comparing the profiles obtained with the known digestion models enabled us to identify the enzyme produced by isolate R5 as *AvaII* isoschizomer, R7 as *BpmI* isoschizomer, R10 as *BstEII* isoschizomer, R21 as *EarI* isoschizomer, R26 as *HaeIII* isoschizomer, R28 as *HpaII* isoschizomer and R32 as *MboI* isoschizomer. Other isolates did not produce identifiable enzyme activity. These activities will enrich the Cameroonian collection. The study of restriction enzymes is of capital importance in genetic engineering to isolate one or more genes in order to understand its function.

Keywords: *Emana Valley, restriction enzyme, mapping reaction, optimization reaction, isoschizomer.*

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique.

ARN: Acide ribonucléique.

BET: Bromure d'Ethidium.

BSA: Bovin Serum Albumine.

dNTP: Désoxy-ribonucléoside triphosphates.

DTT: Dithio Triol.

EDTA: Ethylène diamine tétra-acétate.

HCL: Chlorure d'Hydrogène.

MgCl₂: Dichlorure de Magnésium.

NaCl: Chlorure de Sodium.

PBP: Pénicillin Binding Proteins.

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis.

PLP: Protéines de Liaison aux Pénicillines.

UV: Ultra-violet.

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism.

SDS: Sodium Dodécyl Sulfate.

TBE BrEt: Tris borate EDTA Bromure d'Ethidium.

TBE: Tris borate EDTA.

IPTG: Isopropylthio- β -D-galactose.

pb: Paires de bases.

UPMC: Université Pierre et Marie Curie.

NC-IUBMB: Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure d'une bactérie.	6
Figure 2. Plasmide pBR322 à 4361 paires de bases.	23
Figure 3. Plasmide pUC19 à 2686 paires de bases.	24
Figure 4. Clonage d'un gène dans un plasmide.	25
Figure 5. Milieux de culture solides.	31
Figure 6. Culture des colonies dans les milieux liquides de 5 ml.	32
Figure 7. Migration des produits de la digestion des substrats d'ADN par les extraits bruts.	34
Figure 8. Échantillons cultivés dans les milieux solides (A): échantillon R1 boue; (B): échantillon R4 sable.	36
Figure 9. Isolement des colonies (A): colonies R19, et R20; (B): colonies R11, et R12.	36
Figure 10. Électrophorégramme de la réaction avec l'extrait brut R1 sur les ADN λ et T7. ...	38
Figure 11. Électrophorégramme de la réaction avec l'extrait brut R15 sur les ADN λ et T7.	38
Figure 12. Électrophorégramme de la réaction avec l'extrait brut R5 sur les ADN λ et T7. ...	39
Figure 13. Électrophorégramme de la réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ	39
Figure 14. Électrophorégramme de la réaction d'optimisation sur l'ADN λ et de la digestion complète sur les ADN T7; pBR322; Φ X174; pUC19 et M13mp19.	40
Figure 15. Électrophorégramme de la réaction de mapping sur les ADN Φ X174; pUC19 et M13mp18.	40
Figure 16. Schéma de la réalisation du mapping sur l'ADN Φ X174.	41
Figure 17. Électrophorégramme de la réaction de double digestion de l'enzyme commerciale <i>Ava</i> II sur les ADN λ ; T7 et pBR322.	42
Figure 18. Électrophorégramme de la réaction avec l'extrait brut R7 sur les ADN λ et T7. ...	42
Figure 19. Électrophorégramme de la réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ	43
Figure 20. Électrophorégramme de la réaction d'optimisation sur l'ADN λ et de la digestion complète sur les ADN T7; pBR322; Φ X174; pUC19 et M13mp19.	43
Figure 21. Électrophorégramme de la réaction avec l'extrait brut R10 sur les ADN λ et T7.	44
Figure 22. Électrophorégramme de la réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose testées sur l'ADN λ	44

Figure 23. Électrophorégramme de la réaction de double digestion de l'enzyme commerciale <i>BstEII</i> sur l'ADN λ	45
Figure 24. Électrophorégramme de la réaction de l'extrait brut R21 sur les ADN λ et T7. ...	46
Figure 25. Électrophorégramme de la réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ	46
Figure 26. Électrophorégramme de la réaction d'optimisation sur l'ADN λ et de la digestion complète sur les ADN T7; pBR322; Φ X174; pUC19 et M13mp19.	47
Figure 27. Électrophorégramme de la réaction de double digestion avec l'enzyme commerciale <i>EaeI</i> sur l'ADN λ	47
Figure 28. Électrophorégramme de la réaction avec l'extrait brut R26 sur les ADN λ et T7.	48
Figure 29. Électrophorégramme de la réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ	48
Figure 30. Électrophorégramme de la réaction d'optimisation sur l'ADN λ et de la digestion complète sur les ADN T7; pBR322; Φ X174; pUC19 et M13mp19.	49
Figure 31. Électrophorégramme de la réaction de l'extrait brut R28 sur les ADN λ et T7. ...	50
Figure 32. Électrophorégramme de la réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ	50
Figure 33. Électrophorégramme de la réaction d'optimisation sur l'ADN λ et de la digestion complète sur les ADN T7; pBR322; Φ X174; pUC19 et M13mp19.	51
Figure 34. Électrophorégramme de la réaction de double digestion avec l'enzyme commerciale <i>HpaII</i> sur l'ADN λ	51
Figure 35. Électrophorégramme de la réaction de l'extrait brut R32 sur les ADN λ et T7. ..	52
Figure 36. Électrophorégramme de la réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ	52
Figure 37. Électrophorégramme de la réaction d'optimisation sur l'ADN λ et de la digestion complète sur les ADN T7; pBR322; Φ X174; pUC19 et M13mp19.	53
Figure 38. Électrophorégramme de la réaction de double digestion avec l'enzyme commerciale <i>MboI</i> sur l'ADN λ	53

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification des enzymes.....	11
Tableau 2. Quelques aspects macroscopiques des colonies après culture sur le milieu solide	37
Tableau 3. Résultat de la réaction du mapping sur l'ADN Φ X174	41
Tableau 4. Tableau récapitulatif des enzymes de restriction trouvées	54

INTRODUCTION

GÉNÉRALE

Les bactéries sont des micro-organismes vivants unicellulaires (procaryotes) de petite taille, de morphologie variable. Elles peuvent être isolées du sol, des eaux douces (Hahn *et al.* 2003), de l'air, des déchets organiques, de la peau, de l'intestin des animaux et des déchets radioactifs (Fredrickson *et al.* 2004). Il existe environ 10 000 espèces de bactéries connues à ce jour, mais la diversité réelle du groupe est probablement supérieure. L'estimation du nombre des espèces oscillerait entre 5 et 10 millions (Sogin *et al.* 2006). Les domaines d'application des bactéries sont nombreux. En biotechnologie, elles peuvent être utilisées dans la biofermentation (Sarah *et al.* 2012), en agroalimentaire pour la fabrication des yaourts et des fromages, dans l'industrie pharmaceutique (David *et al.* 2000) et en biotechnologie environnementale. Les bactéries ont été les premiers organismes utilisées comme outils du génie génétique pour cloner les gènes. Ces micro-organismes contiennent des petites molécules d'ADN circulaires (les plasmides) qui peuvent être coupées par une enzyme de restriction au niveau d'un site précis et se refermer après avoir intégrées un gène d'un autre organisme découpé par la même enzyme (Novick 1981). Les biologistes Aber, Nathan et Smith (prix Nobel de médecine en 1978) avaient remarqué dans leurs travaux que certaines bactéries avaient un système de défense, elles avaient la propriété de découper l'ADN étranger introduit dans leur cytosol (Chevassus-au-Louis 1973). La recherche de l'explication de ce phénomène les a amenés à la découverte d'une nouvelle classe d'enzymes présentes chez les bactéries hôtes: les enzymes de restriction (Othman 1971). Lorsque les bactéries sont parasitées par les virus à ADN ou bactériophages, les enzymes de restriction coupent les ADN étrangers pour les empêcher de s'insérer dans leur propre ADN et de se dupliquer. La destruction du génome du virus bloque ainsi l'infection. Ainsi les enzymes de restriction sont l'objet de diverses études sur les processus de localisation des séquences cibles sur l'ADN. Plusieurs raisons encouragent ces études et nous ont en outre conduit à étudier ce groupe d'enzymes. Il existe un grand nombre d'enzymes de restriction mais seulement, peu ont été découvertes et décrites. Le présent travail vise à rechercher et identifier les enzymes de restriction produites par les bactéries isolées des échantillons de boue, d'eau stagnante, de feuilles mortes, de sable et de terre collectés dans un marécage de la localité d'Émana Vallée.

Le but du présent travail est de rechercher et d'identification les enzymes de restriction produites par les bactéries. De façon plus spécifique il s'agit de:

- Isoler les colonies microbiennes des échantillons;
- Déterminer la séquence de reconnaissance des enzymes de restriction produites par ces bactéries.

Le présent mémoire comporte quatre chapitres. Le premier chapitre est consacré à la revue de la littérature. Le second chapitre présente le matériel et les approches méthodologiques mises sur pied pour répondre aux différentes questions de recherche. Dans le troisième chapitre sont présentés les résultats et la discussion. Le chapitre IV présente l'implication sur le système éducatif de notre travail et une conclusion met un terme à ce travail.

CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.1. GÉNÉRALITÉS SUR LES BACTÉRIES

I.1.1. Définition d'une bactérie

Une bactérie est un micro-organisme ubiquiste, unicellulaire et sans noyau (procaryote) dont le génome est constitué d'ADN. Celui-ci consiste en un seul chromosome, et on note éventuellement la présence de plasmides (petit ADN circulaire).

I.1.2. Anatomie des bactéries.

Les bactéries sont des êtres vivants unicellulaires qui possèdent les éléments essentiels à la vie cellulaire. Leur taille varie de 1 à 10 micromètres (μm). Elle n'est donc visible qu'au microscope optique ($\times 10^3$) ou au microscope électronique ($\times 10^6$). Le poids d'une bactérie est d'environ 10^{-12} g. Elle contient 70% d'eau. Rapportée au poids sec (3×10^{-13} g), une bactérie est constituée de protéines (55%), de lipides (10%), de lipopolysaccharides (3%), de peptidoglycanes (3%), de ribosomes (40%), d'ARN (20%) et d'ADN (3%). Elles peuvent être désintégrées par divers procédés physiques et chimiques, ce qui permet d'étudier les constituants bactériens ainsi libérés (UPMC 2003).

I.1.2.1. Appareil nucléaire des bactéries

Comme tous les protistes procaryotes, les bactéries possèdent un appareil nucléaire constitué d'acide désoxyribonucléique (ADN) qui est le support de l'information génétique. L'ADN chromosomique est constitué d'une double hélice d'ADN circulaire. Cette double hélice est pelotonnée, surenroulée dans le cytoplasme grâce à l'action des topoisomérases. C'est ce chromosome qui porte tous les gènes codant pour les protéines nécessaires à la vie des bactéries y compris les endonucléases. Déplié, le chromosome bactérien a près de 1 millimètre (mm) de long (1000 fois la longueur de la bactérie) et 3 à 5 nanomètres (nm) de large. Les deux chaînes de nucléotides se répliquent selon le schéma de Watson et Crick, chaque chaîne assurant la répllication de la chaîne complémentaire selon un mode semi-conservatif. L'analyse chimique de l'appareil nucléaire indique qu'il est composé à 80% d'ADN (le chromosome), à 10% d'acide ribonucléique ou ARN (rôle de structuration) et à 10% de protéines (UPMC 2003).

I.1.2.2. Cytoplasme bactérien

La structure du cytoplasme bactérien est beaucoup plus simple que celle du cytoplasme des cellules eucaryotes. Le cytoplasme ne contient pas en effet de mitochondries, les enzymes transporteuses d'électrons sont localisés dans la membrane cytoplasmique. En

revanche, le cytoplasme est particulièrement riche en ARN solubles (ARN messager et ARN de transfert) et surtout en ARN ribosomal. Les ribosomes, au nombre de 15000 environ par bactérie, représentent 40% du poids sec de la bactérie et 90% de l'ensemble de l'ARN. Les ribosomes sont la cible d'action de nombreux antibiotiques. Ils sont constitués de protéines ribosomales et d'ARN (ARNr 16S, ARNr 23S et ARNr 5S). Les ARNr 16S sont conservés chez les bactéries et permettent leur caractérisation par séquençage ou par RFLP (Restriction Fragment Length Polymerisation).

I.1.2.3. Membrane cytoplasmique

Cette membrane est la limitante externe du cytoplasme. Elle est constituée d'une double couche d'unités de phospholipides (35%) et de protéines qui lui sont associées (65%) (Gitai 2005). Certaines de ces protéines jouent un rôle dans la synthèse du peptidoglycane et sont appelées protéines de liaison aux pénicillines (PLP) ou penicillin-binding-proteins (PBP) car elles sont également la cible d'action des β -lactamines, famille d'antibiotiques à laquelle appartient la pénicilline. La membrane cytoplasmique des bactéries se distingue de celle des cellules eucaryotes par l'absence de stérols. Elle est caractérisée par son extrême fluidité qui est liée au déplacement et à la rotation des groupements lipidiques.

Les fonctions principales de la membrane cytoplasmique sont les suivantes:

- La perméabilité sélective et transport des substances solubles à l'intérieur de la bactérie: la membrane est à la fois une barrière osmotique et un lieu de transport actif grâce à des perméases;
- La fonction respiratoire par transport d'électrons et phosphorylation oxydative chez les espèces bactériennes aérobies (rôle équivalent à celui des mitochondries des eucaryotes);
- L'excrétion d'enzymes hydrolytiques, qui dégradent les polymères en sous-unités suffisamment petites pour pouvoir traverser la membrane cytoplasmique et être importées dans la bactérie;
- Le support d'enzymes et de transporteurs de molécules impliqués dans la biosynthèse de l'ADN, des polymères de la paroi et des lipides membranaires.

I.1.2.4. Paroi bactérienne

Malgré la forte pression osmotique (5 à 20 atmosphères) qui règne à l'intérieur du cytoplasme bactérien, la bactérie n'éclate pas grâce à l'existence d'une structure rigide, appelée paroi, de nature polymérique. Les polymères et leur mode de liaison varient selon les espèces

bactériennes. Toutefois, une substance de base, spécifique des bactéries, est partout présente: c'est la muréine, appelée encore peptidoglycane.

Les rôles de la paroi sont les suivantes:

- La paroi confère à la bactérie sa morphologie véritable. Elle constitue le squelette externe de la bactérie et représente 25 à 35 % du poids total de la bactérie;
- La paroi contient la pression osmotique interne. Sans paroi, les bactéries prennent une forme sphérique appelée protoplaste s'il s'agit d'une bactérie à Gram positif, ou sphéroplaste s'il s'agit d'une bactérie à Gram négatif. Les bactéries peuvent survivre sans paroi et même se multiplier à condition d'être placées dans un milieu dont la pression osmotique est équilibrée avec la pression osmotique qui règne à l'intérieur de la bactérie;
- Elle joue un rôle déterminant dans la coloration de Gram. Chez les bactéries à Gram positif, la paroi bloque l'extraction du violet de gentiane et de l'iodure par l'alcool alors qu'elle ne bloque pas cette extraction chez les bactéries à Gram négatif;
- Elle joue un rôle déterminant dans la spécificité antigénique des bactéries;
- Elle est le support de l'action de certaines enzymes exogènes (lysozyme) ou endogènes (autolysines) et de certains antibiotiques, notamment les β -lactamines (pénicillines) qui inhibent la synthèse du peptidoglycane (Charachon 2013).

I.1.2.5. Structures inconstantes

Outre les structures constantes qui sont rencontrées chez toutes les bactéries, certaines possèdent des structures inconstantes qui jouent un rôle aussi important. Ce sont:

- La capsule qui est un enduit excrété par certaines bactéries. Elle joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de certaines espèces bactériennes (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella*, *E.coli* K1,) par son rôle protecteur contre la phagocytose. La capsule rend encore plus difficile l'accès au contenu de la bactérie (Charachon 2013);
- Les pili: il en existe de deux sortes : les pili communs, qui permettent de fixer la bactérie sur un support, et les pili sexuels qui servent à faire passer des plasmides d'une bactérie à un autre;
- Les cils ou flagelles, sont des appendices filamenteux, composés entièrement de protéines, de 6 à 15 μm de long sur 12 à 30 nm d'épaisseur. Ils constituent les organes de locomotion pour les bactéries qui en possèdent. Selon la disposition des flagelles, on

distingue les bactéries monotriches (un seul flagelle polaire), lophotriches (une touffe de flagelles polaires), amphitriche (un flagelle à chaque pôle) ou péritriches (flagelles répartis sur toute la surface de la bactérie) (UPMC 2003). La structure d'une bactérie est la suivante (figure 1):

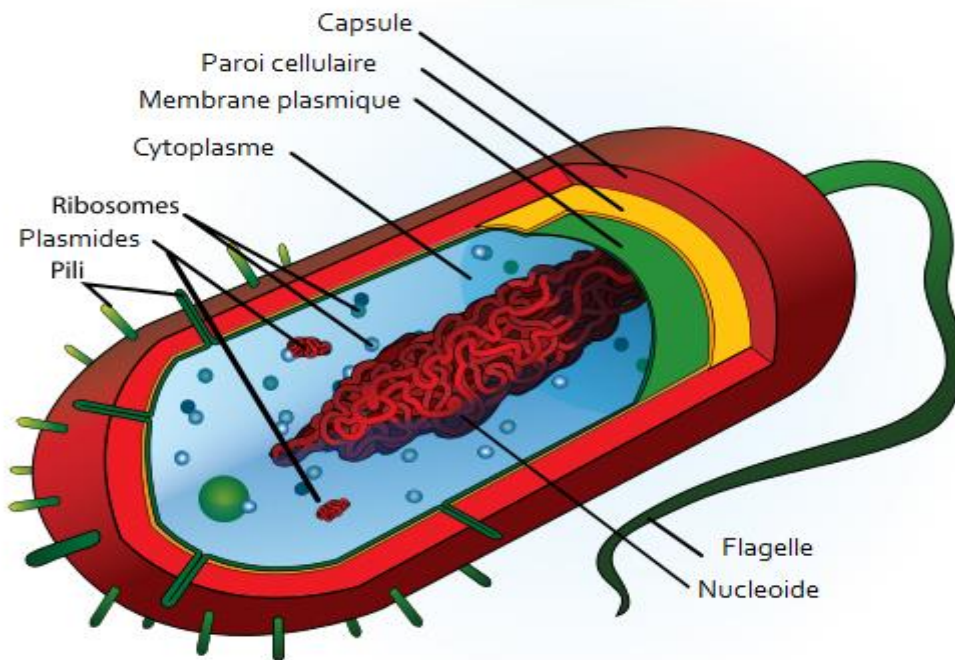


Figure 1. Structure d'une bactérie (UPMC 2003).

I.1.3. Physiologie bactérienne

I.1.3.1. Besoins nutritifs des bactéries

Les bactéries sont des organismes vivants devant trouver dans l'environnement l'ensemble des substances nécessaires à leur énergie et à leurs synthèses cellulaires. Leur source d'énergie peut être de nature lumineuse (bactéries phototrophes) ou représentée par des composés minéraux ou organiques divers: on parle alors de bactéries chimiotrophes. Parmi cette dernière catégorie de bactéries, on distingue les bactéries chimiolithotrophes tirant leur énergie d'un élément minéral et les bactéries chimioorganotrophes pour lesquelles la source d'énergie est un élément organique. La plupart des bactéries d'intérêt médical sont des bactéries chimioorganotrophes (Marchandin 2007).

La source de carbone nécessaire à la vie bactérienne peut être le dioxyde de carbone (CO_2) qui est la source de carbone exclusive pour les bactéries autotrophes alors que les

bactéries dites hétérotrophes utilisent le carbone de substances organiques diverses comme l'alcool, l'acide acétique, l'acide lactique, des sucres divers. Les bactéries doivent également trouver dans leur environnement une source d'azote et une source de soufre. Les bactéries ont des besoins inorganiques (exemple du phosphore). Les autres éléments nécessaires à la vie bactérienne sont les ions comme le sodium, le potassium, le magnésium, le chlore; divers oligo-éléments comme le manganèse, le nickel, le zinc, le sélénium; divers facteurs de croissance comme les vitamines (acide folique, acide nicotinique).

I.1.3.2. Milieux de culture

Leur composition doit permettre la croissance bactérienne et doit donc tenir compte des besoins nutritifs des bactéries. La composition de base de ces milieux comprend:

- Des substrats nutritifs: acides aminés, peptides, bases nucléiques, sucres,
- Un système tampon assurant la constance du pH;
- Des sels minéraux;
- Des vitamines;
- D'autres facteurs de croissance pour certaines bactéries dites exigeantes: sang, protéines, hémoglobine, vitamines supplémentaires.

On distingue plusieurs types de milieux de cultures selon leur composition:

- Les milieux synthétiques de composition définie;
- Les milieux semi-synthétiques qui sont des milieux synthétiques additionnés d'un extrait d'organismes comme un extrait de levures contenant des facteurs de croissance pour les bactéries;
- Les milieux complexes de réalisation empirique (extraits de viande, de levure, extraits enzymatiques, protéines ou peptones).

On distingue également les milieux de culture selon leur fonction:

- Les milieux d'isolement permettant la croissance de plusieurs espèces bactériennes;
- Les milieux d'enrichissement permettant de favoriser la croissance d'une espèce en faible quantité dans un échantillon;
- Les milieux enrichis permettant la croissance des bactéries exigeantes;

- Les milieux sélectifs favorisant la croissance d'un type bactérien particulier tout en inhibant celle des autres types bactériens (exemple des milieux sélectifs pour les bactéries à Gram positif contenant des antibiotiques inhibiteurs des bactéries à Gram négatif).

Ces milieux peuvent se présenter sous forme liquide: bouillons de culture en tubes ou en flacons (exemple des flacons d'hémoculture). La croissance bactérienne peut alors être objectivée par un trouble du bouillon après incubation de 2 à 15 jours à 37°C le plus souvent. Les milieux solides sont le plus souvent des milieux gélosés en boîte de Pétri. Après incubation de 24 à 72 heures à 37°C, la croissance bactérienne est objectivée par la mise en évidence de colonies bactériennes à la surface du milieu gélosé. Chaque bactérie présente initialement dans l'échantillon cultivé va donner une colonie.

I.1.3.3. Conditions environnementales

Plusieurs facteurs environnementaux vont conditionner la croissance bactérienne:

- Le pH: certaines bactéries se développent à pH compris entre 6 et 8: elles sont appelées bactéries neutrophiles (exemple: *Escherichia coli*), d'autres se développeront préférentiellement à pH alcalin (pH supérieur à 8) et sont appelées bactéries alcalinophiles (exemple: *Pseudomonas*). Enfin, la croissance de certaines bactéries dites acidophiles est optimale à pH acide (pH inférieur à 6) (exemple: *Lactobacillus*).
- La pression osmotique: les bactéries ont une bonne tolérance générale au sel. Certaines bactéries dites halophiles nécessitent du chlorure de sodium (NaCl) pour leur croissance; d'autres sont dites halotolérantes.
- La pression mécanique ou hydrostatique: les bactéries ont une bonne tolérance générale à la pression, certaines espèces vivant dans les grands fonds marins supportent une pression très importante et sont dites barophiles.
- La température: cinq catégories de bactéries sont différenciées sur la base de leur fourchette de températures de croissance :
 - Les bactéries mésophiles dont la croissance est possible de 10 à 45°C mais ayant une température optimale de croissance comprise entre 30 et 37°C et parmi lesquelles se trouvent la plupart des bactéries d'intérêt médical;
 - Les bactéries psychrophiles poussant de -15 à 20°C avec une température optimale de croissance comprise entre 5 et 10°C (exemple: *Listeria monocytogènes*, agent de la listériose, dont la croissance est optimale à la température des réfrigérateurs);

- Les bactéries psychrotropes se développant à des températures de -5 à 35°C (optimum: 20-25°C);
 - Les bactéries thermophiles poussent de 45 à 70°C;
 - Les bactéries hyperthermophiles ou extremophiles pouvant croître à des températures supérieures à 80°C.
- L'oxygène moléculaire: les bactéries possèdent des modes respiratoires variés, certaines nécessitent de l'oxygène pour leur croissance alors que, pour d'autres, l'oxygène peut être délétère. On distingue:
- Les bactéries aérobies strictes (exemple: *Pseudomonas*) nécessitant une teneur en oxygène moléculaire suffisante pour pouvoir se multiplier;
 - Les bactéries micro-aérophiles (exemple: *Campylobacter*) se développant uniquement lorsque la teneur en oxygène moléculaire est réduite;
 - Les bactéries aéro-anaérobies facultatives (exemple: *Escherichia coli*) dont la croissance n'est pas affectée par la concentration en oxygène moléculaire;
 - Les bactéries anaérobies strictes ne se développant qu'en absence d'oxygène (exemple: *Clostridium*).

I.1.3.4. Division bactérienne

La croissance bactérienne est un accroissement ordonné et coordonné de tous les composants de la bactérie. Le nombre de bactéries augmente entraînant un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et un enrichissement du milieu en sous-produits du métabolisme. Les bactéries sont des organismes asexués dont la reproduction a lieu par division cellulaire ou reproduction binaire encore appelée scissiparité (Bramhill 1997). La reproduction se fait selon trois phases:

- L'allongement de la bactérie;
- La duplication des constituants;
- La séparation.

Une bactérie mère va donc donner deux bactéries filles identiques qui pourront à leur tour se diviser par scissiparité. L'ensemble des bactéries issues d'une même cellule mère formera une colonie bactérienne.

I.2. GÉNÉRALITÉS SUR LES ENZYMES

I.2.1. Historique

Les enzymes sont responsables des transformations biochimiques (catalyse) des molécules du vivant. Lazzaro Spallanzani, moine et physiologiste italien, a été le premier à suggérer le phénomène de catalyse enzymatique à la fin du XVIII^e siècle. Il observa l'action des sucs gastriques de requin sur des aliments.

En 1815, Louis Joseph Gay-Lussac décrivit la fermentation alcoolique par des micro-organismes. La première enzyme (la diastase) ne fut découverte qu'en 1833 par Anselme Payen et Jean-François Persoz. En traitant un extrait aqueux de malt avec de l'éthanol, ils firent précipiter une substance, sensible à la chaleur et capable d'hydrolyser l'amidon: la diastase. Enfin, en 1836, Theodore Schwann isolera la pepsine qu'il avait déjà décrite en 1834. C'est la première enzyme isolée à partir d'un tissu animal. Henri et Brown furent les premiers, en 1902, à proposer un modèle dans lequel il y a formation d'un complexe intermédiaire enzyme-substrat. L'uréase, capable de donner, à partir de l'urée, de l'ammoniaque et du CO₂, fut la première enzyme à être cristallisée en 1926. La pepsine, la trypsine et la chymotrypsine ont ensuite été cristallisées par Northrop *et al* en 1926. Ceux-ci démontrèrent de plus que les cristaux de protéines étaient des enzymes pures. Dans les années 30, Otto Warburg établit les bases de la purification des enzymes, ce qui permit d'expliquer un grand nombre de phénomènes physiologiques (la glycolyse dans le muscle, la luminescence chez le ver luisant et finalement la synthèse de l'ADN).

En 1955, Sanger établit la séquence des 600 acides aminés qui composent l'insuline, avant qu'en 1966, Merrifield et Wang ne mettent au point une voie de synthèse. Progressivement, le champ d'application des enzymes s'est élargi, avec notamment des applications dans le domaine médical (comme par exemple le traitement des désordres digestifs par des enzymes pancréatiques), en chimie analytique ou encore dans le domaine agro-alimentaire (par exemple l'utilisation de l'amylase et de la glucose isomérase pour la production de sirop de fructose à partir d'amidon de maïs), pour devenir une science à part entière, l'enzymologie (NC-IUBMB 1999).

I.2.2. Définition

Les enzymes, catalyseurs biologiques des organismes vivants, sont des macromolécules majoritairement de nature protéique et chirale. Elles sont constituées de plusieurs acides α -aminés de la série L unis entre eux par une liaison formée par condensation

entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide. Les enzymes sont donc des polypeptides de masse moléculaire élevée entre 10 à 1 000 kDa.

L'ordre, dans lequel sont arrangés les acides aminés, constitue ce que l'on appelle la structure primaire des enzymes. Ces protéines vont avoir tendance à se replier sur elles-mêmes afin de former des arrangements secondaires principalement en hélices α et en feuillets β ; cette structure est stabilisée grâce à la génération de liaisons hydrogènes. L'arrangement de ces structures secondaires les unes par rapport aux autres forme une structure tertiaire qui, elle, sera stabilisée par des ponts disulfures. Une structure quaternaire peut même être décrite pour les très grosses enzymes. Cette structure tridimensionnelle de l'enzyme lui donnera sa spécificité permettant à celle-ci de reconnaître un substrat en particulier via une région distincte de l'enzyme, appelée le site actif (NC-IUBMB 1999).

I.2.3. Classification des enzymes

Le pouvoir catalytique des enzymes permet de produire de nouvelles substances et de l'énergie, indispensables au bon fonctionnement des organismes vivants. C'est en fonction de leur activité catalytique que celles-ci sont classées. Une nomenclature a été proposée par la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie divisant les enzymes en six grandes classes (tableau 1).

Tableau 1. Classification des enzymes (NC-IUBMB 1999).

E.C (Classe)	Classification	Type de réaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse
E.C.4	Lyases	Elimination de groupements et formation de doubles liaisons
E.C.5	Isomérases	Isomérisation
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

Chaque classe est divisée en sous-classe et chaque sous-classe en sous-sous-classe. Un "numéro" de classification est associé à chaque enzyme et est appelé "EC number". Il se présente de la manière suivante: EC [numéro de la classe].[numéro de la sous-classe].[numéro

de la sous-sous-classe].[numéro individuel de série dans la sous-sous classe]. Prenons l'exemple de la glucose oxydase: EC 1.1.3.4. Ce chiffre est explicité ci-dessous:

EC 1: Oxydoréductase

EC 1.1: Agissant sur le groupe CH-OH du donneur

EC 1.1.3: Avec l'oxygène comme accepteur

EC 1.1.3.4: Le dernier chiffre est le numéro individuel de l'enzyme

I.2.4. Enzymes de restriction

I.2.4.1. Définition et propriétés

En 1962, Werner Arber découvre que les bactéries infectées par les virus, ont un moyen de défense contre ces parasites: elles découpent l'ADN viral en petits morceaux grâce à des enzymes, véritables ciseaux moléculaires. Cela restreint considérablement l'aptitude des virus à répliquer leur ADN et donc à se multiplier à l'intérieur des bactéries. Ces enzymes particulières sont appelées enzymes de restriction (Kessler & Manta 1990). Les enzymes de restriction sont des enzymes, principalement d'origine bactérienne, capables de couper l'ADN double brin. Elles ne coupent pas l'ADN à n'importe quel endroit: une enzyme de restriction donnée reconnaît une séquence de bases spécifiques dans l'ADN (généralement de 4 à 6 paires de bases) appelée site de restriction et à chaque fois qu'elle rencontre ce site elle coupe l'ADN à cet endroit. Les enzymes de restriction sont capables de cliver les deux brins d'ADN: elles appartiennent à la classe des endonucléases, c'est-à-dire des enzymes qui coupent à l'intérieur d'un acide nucléique, les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides. Beaucoup d'enzymes de restriction différentes ont été progressivement extraites de diverses bactéries; on en connaît aujourd'hui plusieurs centaines, (chez *E. Coli*, on connaît plus d'une centaine d'enzymes de restriction différentes), ce qui permet à priori de couper quasiment n'importe quel ADN viral.

Les cellules bactériennes contiennent beaucoup d'endonucléases spécifiques capables de reconnaître l'ADN des autres espèces et l'ADN des virus qui les infectent. Ces enzymes constituent un système de défense de la bactérie surtout contre l'ADN des virus au cours de leur infection (Krüger & Bickle 1983). Ces enzymes de restriction reconnaissent des sites particuliers sur l'ADN et coupent la molécule double brin soit au niveau du site de reconnaissance soit à quelques nucléotides plus loin (Kessler & Manta 1990). La souche d'*Escherichia coli* B possède une endonucléase appelée *EcoR1* qui reconnaît spécifiquement la séquence bicaténaire suivante:



L'enzyme catalyse l'hydrolyse d'une liaison phosphodiester dans le site reconnu au niveau des deux flèches. Cependant, la coupure ne peut avoir lieu que si les Adénines (A) figurées en gras ne sont pas méthylées. Le phénomène de restriction résulte donc de l'existence dans la bactérie, de deux types d'activités enzymatiques:

- Une activité de restriction qui coupe l'ADN lorsqu'il est reconnu comme étranger à la cellule hôte.
- Une activité méthylase qui méthyle une base donnée (A ou C) au niveau du site restriction du génome de la cellule bactérienne pour empêcher sa propre dégradation par l'activité restrictive.

Les souches d'*Escherichia coli* R possède en plus de l'enzyme qui coupe la séquence reconnue par (*EcoRI*) une autre qui assure la méthylation (*EcoRI* méthylase ou *MEcoRI*) qui reconnaît la même séquence mais méthyle les deux Adénines. Le système de restriction formé par le couple *EcoRI/MEcoRI* permet aux cellules bactériennes d'hydrolyser un éventuel ADN étranger, phagique en particulier, tout en conservant l'intégrité de leur propre génome (Kobayashi 2001). Les enzymes de restriction constituent donc un système de défense de la bactérie.

Plus de 3000 enzymes de restriction ont été étudiées en détail, et plus de 600 d'entre elles sont disponibles dans le commerce (Roberts *et al.* 2007). Ces enzymes sont couramment utilisées pour la modification de l'ADN dans les laboratoires et sont un outil essentiel dans la réalisation du processus de clonage moléculaire (Primrose 1994).

I.2.4.2. Classification des enzymes de restriction

Il existe six groupes d'enzymes de restriction: les enzymes de restriction de type I; de type II; de type III; de type IV; de type V; et les enzymes de restriction artificielles. Tous ces types d'enzymes, reconnaissent des séquences spécifiques sur la molécule d'ADN et la clivent pour donner des fragments spécifiques. Elles diffèrent les unes des autres par leur séquence de reconnaissance, par le site de coupure, et par l'exigence d'un cofacteur (Rao & Sistla 2004).

I.2.4.2.1. Enzymes de restriction de type I

Les enzymes de restriction de type I (E.C 3.1.21.3) possèdent à la fois l'activité endonucléase et méthylase. Elles consomment l'ATP et utilisent la S-adenosyl-L- comme cofacteur pour fonctionner. Ces enzymes reconnaissent une séquence d'ADN spécifique, ne coupe pas l'ADN à ce niveau mais coupent à un endroit plus ou moins éloigné (à environ 1000 jusqu'à 5000 paires de bases) du site reconnu et libèrent plusieurs dizaines de nucléotides (Bickle & Krüger 1993).

I.2.4.2.2. Enzymes de restriction de type II

Les enzymes de restriction de type II (E.C 3.1.21.4) possèdent les activités endonucléases et méthylases. Elles ne consomment pas l'ATP et leur site de coupure se trouve souvent dans leur séquence de reconnaissance, leur séquence de restriction de 4 à 8 paires de bases sont des séquences palindromiques (se lisent de droite à gauche et inversement). Le magnésium joue le rôle de cofacteur dans la réaction de clivage (Pingoud & Jeltsch 2001). La capacité à couper spécifiquement l'ADN fait des enzymes de restriction de type II un outil simple et fondamental pour les biologistes moléculaires puisqu'elles permettent de fragmenter l'ADN en segments de taille définie: leur découverte a ainsi constitué une avancée décisive dans la manipulation de l'ADN et ses gènes. On dispose aujourd'hui, de plusieurs centaines de ces enzymes pouvant couper l'ADN selon différentes séquences.

Compte tenu de la grande diversité des endonucléases de type II, la nomenclature actuelle tente de les regrouper selon leurs propriétés. Ainsi, le type II est subdivisé en sous-types que sont:

- Les enzymes de types IIA: elles reconnaissent des séquences asymétriques. Un membre intéressant de ce sous-type est *BpuIOI*. Cette enzyme est formée de deux sous unités non identiques et chacune d'elles est responsable du clivage d'un brin de la molécule d'ADN.



Les enzymes de type IIA sont des précurseurs idéals pour la génération des nicking enzymes (Stankevicius *et al.* 1998).

- Les enzymes de type IIB: elles clivent l'ADN au niveau des deux côtés de la séquence de reconnaissance. Un exemple de ce sous-type est *BpII* qui clive le brin supérieur 8

nucléotides avant et 13 nucléotides après la séquence de reconnaissance, tandis que le brin inférieur est clivé 13 nucléotides avant et 8 nucléotides après la séquence de reconnaissance (Vitkute *et al.* 1997).

- Les enzymes de type IIC: elles ont à la fois un domaine de clivage et un domaine de modification. La première à être découverte est *BcgI* qui a une organisation fonctionnelle très inhabituelle. Elle a une structure quaternaire A_2B (Kong *et al.* 1994) avec à la fois un domaine endonucléase et un domaine méthyltransférase dans la sous unité A et un domaine de reconnaissance de la séquence cible dans le sous unité B (Kong 1998).
- Les enzymes de type IIE: elles interagissent avec deux copies de leur séquence de reconnaissance pour un clivage efficace de l'ADN, une copie étant la séquence cible pour le clivage et l'autre servant d'effecteur allostérique (Mücke *et al.* 2003). Les exemples les mieux étudiés sont les enzymes *EcoRII* (Reuter *et al.* 1999) et *NaeI* (Colandene & Topal 1998). Il est intéressant de noter que la suppression du domaine effecteur de l'enzyme *EcoRII* converti ce sous-type en sous-type IIP qui est une enzyme très active (Mücke *et al.* 2002).
- Les enzymes de type IIF: elles sont des enzymes de restriction homotétramériques, elles interagissent également avec deux copies de leur séquence de reconnaissance, mais clivent les deux séquences en même temps (Halford *et al.* 1999). Les plus étudiées sont: *CfrI0I* (Bozic *et al.* 1996), *NgoMIV* (Embleton *et al.* 2001) et *SfiI* (Nobbs *et al.* 1998).
- Les enzymes de type IIG: elles sont semblables aux enzymes de type IIC, elles ont à la fois un domaine de clivage et un domaine de modification. Elles sont en général stimulées par l'AdoMet (Adénosyl-Méthionine). Un exemple bien étudié est *Eco57I* (Janulaitis *et al.* 1992).
- Les enzymes de type IIH: elles se comportent comme les enzymes de type II, mais leur organisation génétique ressemble au système RM (système restriction-modification) de type I. *AhdI*, par exemple a un domaine endonucléase et un domaine méthyltransférase et reconnaît la séquence GACNNN/NNGTC (Marks *et al.* 2003).
- Les enzymes de type IIM: ces enzymes reconnaissent une séquence méthylée spécifique et clive l'ADN à un site fixe. Le meilleur représentant connu de ce sous-type est l'enzyme *DpnI* (Hermann & Jeltsch 2003).
- Les enzymes de type IIS: elles clivent au moins un brin de l'ADN à l'extérieur de la séquence de reconnaissance (Szybalski *et al.* 1991). L'une des enzymes de type IIS est *FokI* (Vanamee *et al.* 2001) qui, comme beaucoup d'autres enzymes de type IIS interagit avec deux sites de reconnaissance avant de cliver l'ADN (Bath *et al.* 2002). Les enzymes

de type IIS sont actives comme des dimères et sont composées de deux domaines, un domaine responsable de reconnaissance de la séquence cible et un autre domaine responsable de la catalyse. Ceci est apparent à partir de la structure cristalline de *FokI* (Wah *et al.* 1998) et des études biochimiques de *BfiI* (Zaremba *et al.* 2004). Les enzymes de type IIS ont été utilisées pour la génération des nucléases chimériques (Chandrasegaran & Smith 1999), ainsi que des endonucléases de restriction d'un brin spécifique d'ADN (nicking enzymes) (Samuelson *et al.* 2004).

- Les enzymes de type IIT: elles sont des enzymes hétérodimériques. Celle qui a été récemment caractérisée est *BsII*. Cette enzyme est composée de deux sous-unités différentes (Hsieh *et al.* 2000). Plusieurs de ces enzymes ont été utilisées pour générer des nicking enzymes, à savoir *BbvCI*, *BsaI*, *BsmAI*, *BsmBI* et *BsrDI* (Zhu *et al.* 2004).

I.2.4.2.3. Enzymes de restriction de type III

Les enzymes de restriction de type III (E.C 3.1.21.5) tout comme celles du type I possèdent à la fois l'activité endonucléase et méthylase. Elles consomment de l'ATP et coupent une vingtaine de nucléotides après la séquence de reconnaissance (Dryden *et al.* 2001).

I-2.4.2.4. Enzymes de restriction de type IV

Les enzymes de restriction de type IV (E.C 3.1.21.6) reconnaissent et coupent un ADN modifié. Cet ADN modifié peut être méthylé ou hydroxyméthylé. (Dryden *et al.* 2001).

I.2.4.2.5. Enzymes de restriction de type V

Les enzymes de restriction de type V (E.C 3.1.21.7) utilisent des ARNs guides pour cibler des séquences non palindromiques spécifiques se trouvant dans des organismes envahisseurs. Ils peuvent couper l'ADN à de longueurs variables (Rodolphe & Philippe 2007).

I.2.4.2.6. Enzymes de restriction artificielles

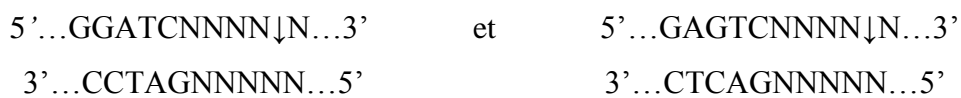
Les enzymes de restriction artificielles peuvent être générées en fusionnant un domaine de liaison de l'ADN à un autre domaine d'une autre endonucléase (souvent le domaine de clivage de l'enzyme de restriction de type IIS) (Kim *et al.* 1996) et peuvent reconnaître de larges sites de coupure sur la molécule d'ADN (jusqu'à 36 paires de bases) (Urnov *et al.* 2010).

Les nucléases à doigt de zinc sont des enzymes de restriction artificielles les plus couramment utilisées et sont généralement utilisées en génie génétique (Townsend *et al.* 2009) et pour d'autres applications de clonage de gènes standard (Tovkach *et al.* 2010).

I.2.4.2.7. Nicking Enzymes

A côté de ces enzymes de restriction, il existe d'autres appelées nicking enzymes qui coupent un seul brin d'ADN. Elles ont aussi comme les enzymes de restriction une séquence de reconnaissance (New England Biolabs catalog 2008).

Exemple: *N.AlwI* et *N.BstNBI*



I.2.4.3. Nomenclature des enzymes de restriction

En 1973, Smith et Nathan ont proposé une nomenclature qui est définitivement adoptée (Smith & Nathan 1973). Chaque endonucléase a un nom de code déterminé selon les principes suivants:

- La première lettre en italique, en majuscule, représente l'initiale du genre de la bactérie;
- Les deux lettres suivantes, écrites toujours en italique, en minuscules, désignent l'espèce de la bactérie;
- La quatrième lettre en majuscule, (pas toujours présente) désigne la souche bactérienne;
- Le chiffre romain qui suit ces trois lettres est le numéro d'ordre de découverte de l'enzyme pour la même bactérie source.

Exemple: *EcoRI*:

E = *Escherichia*

co = espèce *Coli*

R = Souche RY13

I = Première endonucléase isolée de cette souche de bactérie

I.2.4.4. Mécanisme d'action des endonucléases

I.2.4.4.1. Caractéristiques de l'hydrolyse

Une endonucléase de restriction se lie à une séquence spécifique qu'elle reconnaît sur l'ADN: c'est le site de restriction. Elle catalyse ensuite un clivage double brin au niveau des liaisons phosphodiester spécifiques à l'organisation de la séquence de reconnaissance. L'hydrolyse d'une liaison phosphodiester, entre le groupement 3'OH et le phosphate génère une extrémité 5' phosphate d'un côté de la coupure et un groupement 3'OH de l'autre.

I.2.4.4.2. Sites de restriction

La plupart des sites de restriction comporte 4 à 6 paires de bases. Un nombre assez restreint d'enzymes de restriction reconnaît des séquences plus complexes. Les séquences de restriction présentent toujours une double symétrie par rapport à un centre ou à un plan de symétrie. De telles séquences sont dites palindromiques. On observe sur les deux brins la même séquence (5'→3') mais en sens inverse (Pingoud & Jeltsch 2001).

Exemple: *EcoRI*

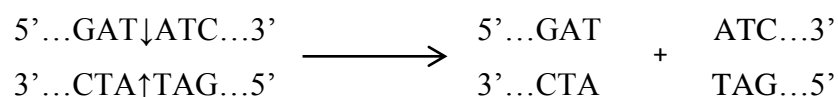


I.2.4.4.3. Différents types de coupure

Les enzymes de restriction de type II peuvent donner deux types de coupure:

- Les coupures à bouts francs (blunt ends ou flush ends). L'enzyme coupe les deux brins de l'ADN au niveau du centre ou l'axe de symétrie. On obtient des extrémités franches (blunt ends) qui n'ont pas un grand intérêt en génie génétique sauf pour réaliser des « tailing » à l'extrémité 3'OH ou un marquage pour un séquençage.

Exemple: *EcoRV*

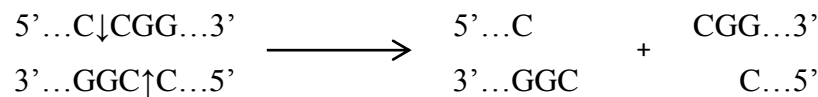


- Les coupures décalées donnent des extrémités cohésives. Les extrémités débordantes résultent d'une coupure décalée et les extrémités obtenues sont auto-complémentaires

entre elles. Elles peuvent donc se réapparier spontanément si les conditions sont favorables. On parle alors d'extrémités cohésives ou de bouts collants "Sticky ou protruding ends" (Goodsell 2002). Ces enzymes sont très utilisées pour fabriquer des ADN recombinants, car les fragments de différents ADN coupés par la même enzyme donnent les mêmes bouts qui peuvent s'associer par leurs extrémités cohésives. L'association est ensuite rendue covalente par l'action d'une ADN ligase (Russell & Sambrook 2001).

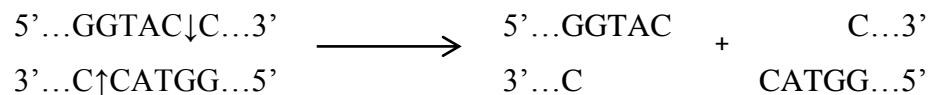
- Coupure décalée du côté 5': ce type de coupure génère des extrémités 5'phosphate débordantes ou sortantes.

Exemple: les coupures par *MspI*



- Coupure décalée du côté 3': ce type de coupure génère des extrémités 3'OH débordantes ou sortantes.

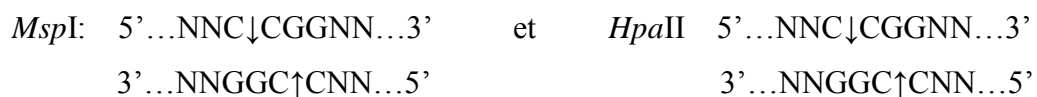
Exemple: les coupures par *KpnI*



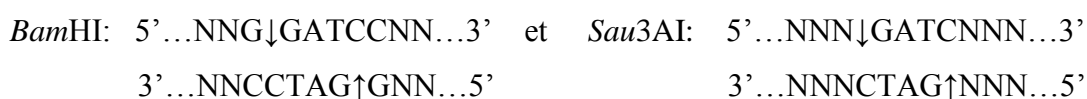
I.2.4.4.4. Isoschizomères et enzymes compatibles

On appelle isoschizomères deux enzymes différentes qui reconnaissent le même site de restriction.

Exemple: *MspI* et *HpaII*



Deux enzymes compatibles ont des sites de restriction différents mais donnent naissance aux mêmes extrémités cohésives. C'est le cas de *BamHI* et *Sau3AI* qui donnent les mêmes extrémités cohésives car le site de reconnaissance de *Sau3AI* est contenu dans celui de *BamHI*.



Ainsi, *Bam*HI donne les mêmes extrémités cohésives que *Sau*3AI avec qui elle est compatible.

I.2.4.5. Carte et fragments de restriction

L'hydrolyse d'un ADN par une enzyme de restriction conduit à une série de fragments dits de restrictions dont le nombre est fonction du nombre de sites de restriction présent sur cet ADN. La longueur des fragments est déterminée par la distance séparant les séquences de restriction reconnues par cette endonucléase. On obtient pour un ADN donné, avec une même enzyme toujours le même nombre de fragments qui donne ce que l'on appelle RFLP (longueur des fragments de restriction polymorphiques ou Restriction Fragments Length Polymorphism). Une molécule d'ADN déterminée, donne toujours les mêmes fragments et cette série de fragments constitue une empreinte caractéristique de l'ADN hydrolysé. On parle alors de carte d'identité moléculaire.

Une carte de restriction est une séquence de sites de restriction séparés par des distances précises sur l'ADN et mesurée en paires de bases. Diverses techniques permettent d'obtenir de telles cartes. Elles passent toutes par une digestion de l'ADN à analyser par une enzyme de restriction suivie d'une électrophorèse pour la séparation des fragments et la détermination de leurs tailles. L'analyse par double digestion est obtenue quand l'ADN est digéré séparément par deux enzymes différentes. On obtient un certain nombre de fragments pour chaque enzyme. Ces fragments sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

I.3. GÉNÉRALITÉS SUR L'ADN

La molécule d'ADN est une macromolécule du vivant. Sa structure a été découverte par James Watson et Francis Crick en 1953. Chaque molécule d'ADN est constituée de deux chaînes de nucléotides enroulées en spirale l'une autour de l'autre décrivant une structure dite en double hélice, la molécule est dite bicaténaire. Chaque chaîne est un polymère de nucléotides et chaque nucléotide est formé d'une molécule d'acide phosphorique, d'un sucre à cinq atomes de carbone (le désoxyribose) et d'une base azotée.

I.3.1. Bases azotées

Les bases azotées s'associent entre elles de façon spécifique grâce aux liaisons hydrogènes qui sont des liaisons de faible énergie. Ainsi l'Adénine (A) s'associe toujours à la Thymine (T) par deux liaisons hydrogènes et la Guanine (G) à la Cytosine (C) par trois liaisons hydrogènes. Les bases azotées présentes dans la molécule d'ADN dérivent de deux

noyaux hétérocycliques, un noyau pyrimidique et un noyau purique. Ce sont ces bases qui contiennent l'information génétique, tandis que les oses et les phosphates jouent un rôle structural. L'Adénine et la Guanine ont un noyau purique dans leur structure, alors que la Thymine et la Cytosine possèdent un noyau pyrimidique.

Les nucléotides de l'ADN, comme ceux de l'ARN ne comportent que quatre de ces bases azotées:

- Deux bases puriques communes aux deux types d'acides nucléiques: l'Adénine et la Guanine.
- Une base pyrimidique commune: la Cytosine.
- Une base pyrimidique spécifique: l'Uracile pour l'ARN et la Thymine pour l'ADN.

I.3.2. Bases modifiées dans l'ADN

Les modifications peuvent avoir lieu sur des sites cycliques ou exocycliques:

- La 5-méthylcytosine est trouvée dans l'ADN des plantes et des animaux. Cette méthylation est un signal négatif de la régulation de l'expression des gènes, le groupement méthyle favorisant une conformation de l'ADN qui ne peut fixer un facteur de transcription.
- La N-6-méthyladénine est présente dans les bactéries. Cette méthylation permet aux enzymes de restriction de reconnaître son propre ADN vis-à-vis d'ADN étranger (virus).

I.4. VECTEURS EN GÉNIE GÉNÉTIQUE: L'ADN PLASMIDIQUE

I.4.1. Définition

Les plasmides sont de petites molécules d'ADN bicaténaire, circulaires, extrachromosomiques, susceptibles de se répliquer de façon autonome. Ils sont présents dans le cytoplasme de nombreuses espèces bactériennes. Leur ADN comprend au minimum les gènes intervenant dans la répllication et la ségrégation de leur matériel génétique dans les cellules filles à chaque cycle de division cellulaire de la cellule hôte. La plupart des plasmides naturels contiennent des gènes qui confèrent à l'hôte des propriétés supplémentaires comme la résistance aux antibiotiques.

Une bactérie peut posséder en même temps plusieurs plasmides différents sauf si leur cohabitation est incompatible avec la survie de la bactérie. Elle peut également posséder un très grand nombre de copies plasmidiques transférables d'une bactérie à une autre au cours de

la conjugaison bactérienne. Leurs utilisations majeures comme vecteurs en génie génétique sont:

- Le clonage et l'amplification d'une séquence d'ADN exogène;
- L'étude des mécanismes de l'expression d'une séquence d'ADN exogène;
- L'introduction des gènes dans les cellules bactériennes (transformation) ou animales (transfections) ou dans des organismes entiers (animaux transgéniques);
- A l'échelle industrielle, la production des protéines codées par les gènes contenus dans l'ADN inséré.

I.4.2. Caractéristiques des plasmides utilisés en génie génétique

La cellule hôte la plus utilisée est *Escherichia coli*. Les plasmides naturels dits de première génération ont été utilisés dans le passé comme vecteur de clonage, mais les plasmides utilisés actuellement sont modifiés et donc des chimères obtenues par des recombinaisons de différents plasmides naturels et d'ADN viral. Ils sont petits de taille pour permettre l'insertion d'une importante quantité d'ADN exogène tout en maintenant une bonne efficacité de transformation. Ils possèdent:

- Une origine de répllication de type relâché: la séquence ori;
- Un gène de résistance à un antibiotique auquel la souche hôte est sensible, ce qui permet la sélection des cellules résistantes qui survivent sur un milieu contenant l'antibiotique en question;
- Un second gène marqueur phénotypique (soit un deuxième gène de résistance à un second antibiotique ou gène Lac Z) qui permet de reconnaître parmi les colonies transformées celles qui hébergent un plasmide recombinant;
- Un ou plusieurs sites de restriction (polylinker) qui permettent la linéarisation du plasmide préalable à l'insertion de l'ADN exogène.

I.4.3. Exemple de vecteurs plasmidiques: pBR322 et pUC19

Le plasmide pBR322 de 4361 paires de bases est très simple dans sa structure (figure 2). Il contient deux gènes de résistance aux antibiotiques: tet^R et amp^R (Bolivar *et al.* 1977). Chacun de ces gènes contient un site de restriction qui est utilisé pour le clonage. L'ADN du donneur peut être, par exemple, inséré dans le gène tet^R. Une insertion réussie se traduira par l'inactivation de ce gène qui ne sera plus capable de conférer la résistance à la tétracycline à la cellule hôte. C'est pourquoi le protocole de clonage consistera à mélanger l'ADN du plasmide et l'ADN du donneur, les deux coupés par une même enzyme de restriction suivi d'une

ligation. Cette préparation est alors utilisée pour transformer les bactéries et sélectionner les colonies résistantes à l'ampicilline par exemple. Ces dernières doivent avoir été transformées avec succès par une molécule de plasmide recombinante. Parmi les colonies amp^R, seules celles qui s'avèrent sensibles à la tétracycline contiennent une insertion, en d'autres termes, seules les colonies amp^Rtet^S contiennent de l'ADN recombinant (ADN du plasmide et ADN inséré). L'insertion de l'ADN étranger dans pBR322 est détectée par l'inactivation du gène de résistance (tet^R), indiqué par le phénotype tet^S (sensible) (Sutcliffe 1979).

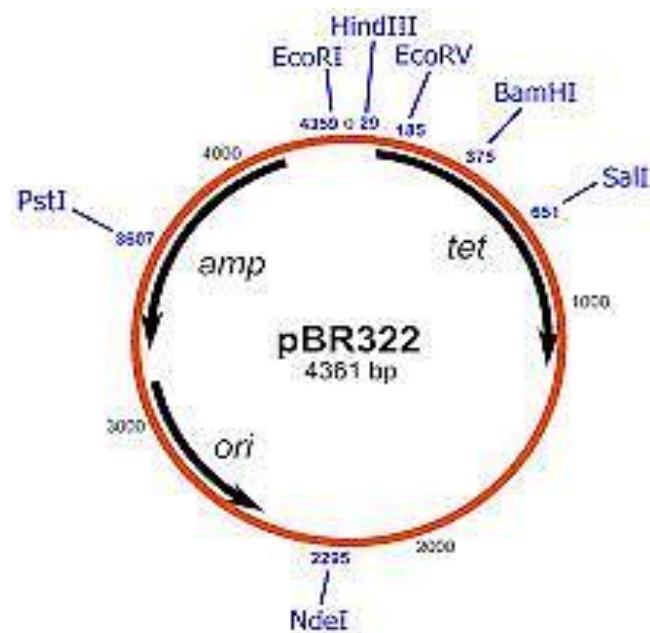


Figure 2. Plasmide pBR322 à 4361 paires de bases (Sutcliffe 1979).

Le plasmide pUC19 est un plasmide classique de 2686 paires de bases (figure 3). Il comporte les particularités suivantes:

- Un gène de résistance à l'ampicilline (antibiotique). La présence de ce gène permettra à la bactérie porteuse de ce plasmide de ne pas être sensible à l'effet de cet antibiotique;
- Le gène Lac Z qui code pour la β -galactosidase dans l'opéron lactose;
- Une région avec des sites multiples et uniques pour des enzymes de restriction connues. Cette région est appelée « polylinker ». Son rôle est de permettre l'insertion du fragment d'ADN étranger.

Ce type de plasmide est intéressant car il montre un système de sélection des bactéries ayant été transformées par les plasmides recombinants. Un système enzymatique appartenant à l'opéron lactose peut être utilisé à la place d'un second antibiotique (Lin-Chao *et al.* 1992).

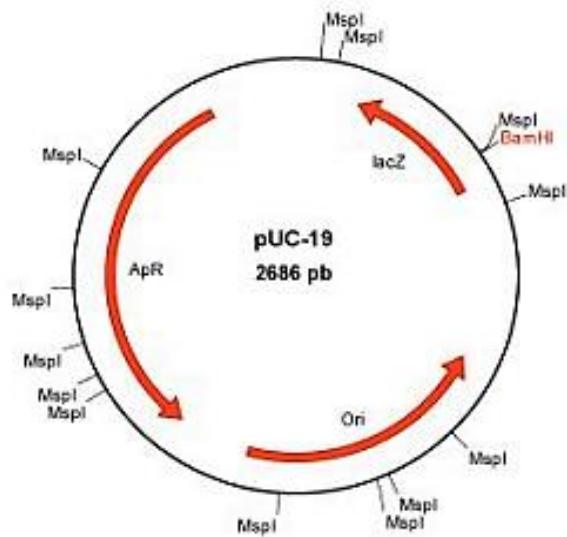


Figure 3. Plasmide pUC19 à 2686 paires de bases (Lin-Chao *et al.* 1992).

L'insertion du fragment d'ADN dans le plasmide pUC19 aboutit à l'inactivation du gène qui code pour la β -galactosidase, on utilise un galactoside dont la couleur passe de l'incolore au bleu quand il est clivé par la β -galactosidase, ce composé s'appelle X-gal. Pour pouvoir métaboliser le X-gal, la cellule doit être exposée à un inducteur, cet inducteur est l'IPTG (Isopropylthio- β -D-galactoside).

En culture et en présence d'IPTG et de X-gal, les bactéries résistantes à l'ampicilline et transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies blanchâtres car elles ont perdu la capacité de clivage de l'équivalent coloré du lactose (le X-gal) par la β -galactosidase. Par contre, les bactéries résistantes à l'ampicilline et non transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies bleues. La sélection visuelle des bactéries transformées par les plasmides recombinants est donc possible (figure 4).

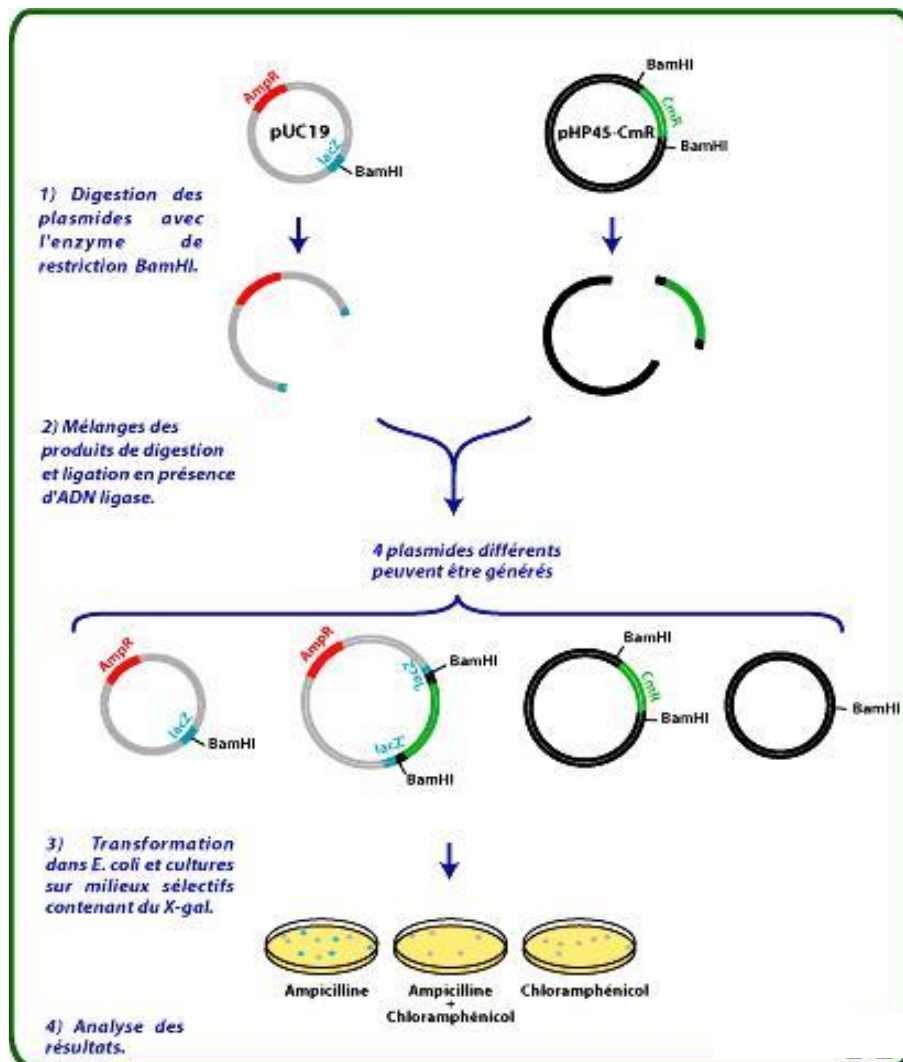


Figure 4. Clonage d'un gène dans un plasmide (Lin-Chao *et al.* 1992).

I.4.4. Avantages et inconvénients des plasmides

I.4.4.1. Avantages

L'utilisation des plasmides comme vecteurs du génie génétique présente plusieurs avantages:

- Petite taille du vecteur, permettant un travail expérimental aisé.
- Sélection des plasmides recombinants (sélection par les antibiotiques).

I.4.4.2. Inconvénients

Malgré ces avantages leur utilisation en génie génétique présente aussi bien des inconvénients:

- Faible efficacité pour la transformation des bactéries (pénétration de plasmides).

- Impossibilité d'insérer des larges fragments d'ADN.

I.5. TECHNIQUE DE GÉNIE GÉNÉTIQUE

I.5.1. Électrophorèse sur gel

L'électrophorèse est une technique de séparation et déplacement, en présence d'un champ électrique des particules chargées.

I.5.1.1. Type d'électrophorèse

Les différents types d'électrophorèse utilisés dans les laboratoires de biologie moléculaire, permettent de séparer les acides nucléiques en fonction de leur taille. Ainsi, on distingue:

- L'électrophorèse horizontale sur gel d'agarose qui permet de séparer les fragments d'ADN de 300 à 10000 paires de bases en fonction de la concentration de l'agarose.
- L'électrophorèse verticale sur gel polyacrylamide qui permet de séparer les fragments d'ADN dont les longueurs vont de 1 à 1000 nucléotides en fonction de la longueur du gel et de la tension appliquée (de 1000 à 2000 volts/cm) (Sanger & Coulson 1978).
- L'électrophorèse sur gel d'agarose en champ pulsé (PFGE ou Pulsed Field Gel Electrophoresis) qui permet de séparer des fragments d'ADN double brin dont la taille peut varier de 220000 à 2500000 paires de bases.

I.5.1.2. Migration sur gel

Les échantillons d'ADN, avant d'être déposés dans les puits, sont mélangés avec une solution de charge qui contient:

- Un alourdisseur (glycérol ou saccharose) pour entraîner la solution d'ADN au fond du puits.
- Des marqueurs de mobilités (colorants visibles: Bleu de Bromophénol et Xylène cyanol).
- Un agent dénaturant comme le SDS ou l'urée qui dénature les protéines, et donc de permettre de les séparer par électrophorèse selon leur poids moléculaire uniquement suivant la nature du gel.

Les deux marqueurs (colorants) migrent à des vitesses différentes. Le Bleu de Bromophénol de couleur violette migre avec les fragments de petites tailles (donc plus vite) alors que le Xylène cyanol de couleur bleu turquoise migre avec les fragments de grande taille. On peut ainsi suivre indirectement la migration de l'ADN sur le gel.

I.5.1.3. Etalonnage du gel

On étalonne les gels avec des marqueurs de taille. Un marqueur de taille est un mélange de fragments d'ADN linéaires bicaténaires dont les tailles sont connues. Il existe deux types de marqueurs de tailles:

- Des marqueurs fabriqués à partir d'une molécule d'ADN naturelle digérée par des enzymes de restriction.
- Des marqueurs composés d'une série de fragments, chacun constitué d'une à plusieurs répétition d'un même fragment d'ADN de taille connue.

I.5.1.4. Révélation

Les bandes d'ADN sur le gel de polyacrylamide ou d'agarose ne sont pas visibles si l'ADN n'est pas marqué ou coloré. Une méthode sensible de coloration de l'ADN consiste à plonger le gel après électrophorèse dans du Bromure d'éthidium (BET) qui devient cent fois plus fluorescent sous illumination ultra-violette lorsqu'il est lié à l'ADN.

CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. MATÉRIEL

II.1.1. Échantillons collectés dans un marécage de la localité d'Émana Vallée

- Boue;
- Eau stagnante;
- Feuilles mortes;
- Sable;
- Terre.

II.1.2. Milieux de culture et réactifs

- Milieu de culture LB agar miller and miller (SIGMA);
- Milieu de culture LB broth de Miller (SIGMA);
- Eau distillée;
- Alcool éthylique (SIGMA);
- Agarose (AMERICAN BIOANALYTICAL);
- Glycérol (SIGMA);
- Chlorure de Sodium (SIGMA);
- Solution A (25% sucrose; 50 mM TRIS HCL pH 7,5);
- Solution B (1 mg/ml lysozyme);
- Solution C (200 mM EDTA, pH 8,0);
- Solution D (1 M MgCl₂);
- Solution E (5% Brij-58);
- Tampon TBE BrEt (Tris Borate EDTA bromure d'Ethidium) 5X (48,33 g Trisma base; 24,66 g acide borique; 2,70 g EDTA; 170 µl BrEt pH 8,3 dans 1 litre d'eau distillée);
- Substrats (ADN λ; T7; pBR322; ΦX174; pUC19; M13mp19) (NEB);
- tampon de réaction commerciale (10 mM TRIS HCl pH 7,8; 20 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 100 µg/ml BSA) (NEB);
- Tampon stop (50% glycérol; 50 mM EDTA pH 8,0; 0,05% Bleu de Bromophénol);
- Marqueur de poids moléculaire (NEB);
- Alcool acétone (SIGMA).

II.1.3. Matériel de laboratoire

- Tubes Eppendorf (VWR);
- Boîtes de pétri (VWR);
- Papiers à peser (VWR);
- Tubes de culture avec bouchon 15ml (PYREX);
- Anse d'inoculation en plastique;
- Anse d'inoculation en platine;
- Bec Bunsen;
- Autoclave (PRESSURE COOKER);
- Incubateur agitateur (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC);
- Micropipettes P20; P50; P100; P200; P1000 (GILSON);
- Embouts pour micropipettes (AXYGEN SCIENTIFIC);
- Pipettes de 25 ml (VWR);
- Pipet Aid (DRUMMOND SCIENTIFIC);
- Bouteilles de culture de 500 ml (PYREX);
- Bouteilles de 2,5 ml avec bouchon;
- Bécher de 500 ml;
- Plaques de micro titration 96 puits;
- Moule à gel;
- Peignes;
- Scotch;
- Tank de migration;
- Gants;
- Lunettes;
- Système de purification (chambre froide; collecteur de fractions; pompe; colonnes; agitateur magnétique; gel d'Héparine sépharose ou Q-sépharose; 2 béchers de 20 ml; pont en verre; barre magnétique).

II.1.4. Équipements

- Générateur (THERMO);
- Lampe UV (HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENT);
- Camera;
- Balance (DENVER INSTRUMENTS);
- Incubateur (PRECISION);

- Four à micro-ondes (SHARP);
- Distillateur (BARNSTEAD);
- Machine à glace (ICE-O-MATIC);
- Microcentrifugeuse (EPPENDORF);
- Bain marie (LAB-LINE);
- Centrifugeuse (THERMO SCIENTIFIC);
- Congélateur (LIEBHERR);
- Réfrigérateur (Singer NO-FROST);
- Mixer (THERMOLYNE).

II.2. MÉTHODES

II.2.1. Site de collecte et d'analyse des échantillons

Nous avons collecté les échantillons dans un marécage de la localité d'Emana vallée située dans l'arrondissement de Yaoundé 1^{er}, département du Mfoundi dans la région du Centre-Cameroun entre 6 heures et 6 heures 15 minutes en Juillet pendant la saison des pluies. Le site d'étude est constamment marécageux et l'activité microbienne est très développée dans ce site. L'analyse de ces échantillons s'est effectuée au centre de Biologie Moléculaire situé au quartier Ngouso (Yaoundé).

II.2.2. Préparation des tampons

II.2.2.1. Tampon de réaction

Nous avons utilisé le tampon de réaction commerciale "New England Biolabs" numéro 2 de composition (10 mM TRIS HCl pH 7,8; 20 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 100 µg/ml BSA).

II.2.2.2. Tampon stop

Le tampon stop est préparé en ajoutant dans un tube de 50 ml, 25 ml de glycérol; 5 ml d'EDTA à 0,5 M pH 8,0; 20 ml d'eau distillée et une pincée de Bleu de Bromophénol.

II.2.3. Préparation des milieux de culture

II.2.3.1. Milieux solides

Les milieux solides sont préparés en ajoutant dans 1 litre d'eau distillée 37 g de milieu LB agar et stérilisé dans un autoclave pendant 30 minutes à 110°C environ. Après refroidissement jusqu'à une température d'environ 55°C, le milieu est coulé dans les boîtes de pétri près de la

flamme du Bec Bunsen pour éviter toute contamination (figure 5). Une fois refroidies, les boîtes de pétri sont conservées dans la chambre froide à 4°C.



Figure 5. Milieux de culture solides (photo prise par Nguimé 2015).

II.2.3.2. Milieux liquides

Les milieux liquides sont préparés en ajoutant 10g de milieu LB broth de Miller dans 400 ml d'eau distillée, ensuite des aliquots de 5 ml sont faits à l'aide d'une pipette et d'un Pipet Aid dans les tubes de culture de 15 ml ou de 250 ml dans les bouteilles de culture de 500 ml. Ces milieux de culture divisés sont ensuite stérilisés dans l'autoclave pendant une heure à 110°C environ.

II.2.4. Préparation des échantillons

Les échantillons de boue, eau stagnante, sable, feuilles mortes, sable et terre sont collectés dans cinq tubes Eppendorf différents. 1 g de chaque échantillon est introduit dans cinq nouveaux tubes Eppendorf et le reste est conservé dans la chambre froide à 4°C. Dans chaque nouveau tube, 1 ml d'eau distillée est ajoutée et les échantillons sont mélangés à l'aide d'un Mixer. 20 µl de chaque échantillon sont ensuite pipetés par une micropipette et étalés dans la boîte de pétri à l'aide de l'anse d'inoculation ceci près de la flamme du Bec Bunsen pour éviter la contamination. L'étalement se fait par dilution progressive sur les quadrants de la boîte de pétri. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 16 heures environ. L'isolement des colonies se fait en réinoculant près de la flamme du Bec Bunsen, les colonies individuelles et différentes sur les nouvelles boîtes de pétri. Les boîtes de pétri sont à nouveau incubées à

37°C pendant 16 heures environ. La différence entre les colonies est notée au niveau de la taille, la couleur et la poussée; il faut toujours s'assurer que la paillasse est désinfectée par l'alcool éthylique.

II.2.5. Culture dans le milieu liquide

La culture dans le milieu liquide s'effectue en inoculant une colonie pure dans les tubes contenant 5 ml de milieu à l'aide de l'anse d'inoculation en platine préalablement chauffée à la flamme du Bec Bunsen et refroidie dans le milieu de culture (figure 6). Les milieux de culture contenant les colonies sont ensuite incubés à 37°C dans un incubateur agitateur pendant 16 heures environ. En présence du Bec Bunsen, 1 ml de chaque culture est pipeté et conservé dans les bouteilles de 2,5 ml contenant 300µl de glycérol stérilisé. Ces bouteilles sont stockées à - 20°C. Le reste de la culture est introduit dans les tubes Eppendorf et centrifugée à 5000 tours pendant 3 minutes. Ces cellules sont conservées à -20°C après être resuspendues dans 300 µl de la solution A.



Figure 6. Culture des colonies dans les milieux liquides de 5 ml (photo prise par Nguimé 2015).

II.2.6. Préparation de l'extrait brut

Les cellules sont décongelées et placées dans un bac de glace. L'extrait brut est préparé en ajoutant dans chaque tube contenant 300 µl de cellules, 20 µl de solution B; 11 µl de solution C; 11,5 µl de solution D et 24,2 µl de solution E. Après avoir bien mélangé en pipétant, les tubes sont incubés à la température ambiante pendant 15 minutes. A la fin de l'incubation on

procède à la centrifugation à 1400 tours pendant 15min au bout de laquelle chaque surnageant est transféré dans un nouveau tube et placé dans la glace.

II.2.7. Préparation des substrats

Les substrats (ADN λ et T7) sont préparés en ajoutant dans un tube, 3 μ l d'une solution contenant 0,33 μ g d'ADN; 5 μ l de tampon et 42 μ l d'eau distillée, pour un volume total de 50 μ l.

II.2.8. Réaction de digestion avec l'extrait brut

Sur une plaque de microtitration de 96 puits, 50 μ l de substrats préparés (ADN λ et T7) sont introduits dans chacun des 3 puits successifs. Pour les 3 puits de chaque substrat, 20 μ l du surnageant (extrait brut) sont ajoutés dans le premier puits ensuite, 20 μ l du mélange du premier puits sont à nouveau repipetés et introduits dans le deuxième puits ainsi de suite jusqu'au troisième puits (dilution en série). La plaque est ensuite recouverte et incubée à 37°C pendant 1 heure. La réaction est stoppée à la fin de l'incubation en ajoutant dans chaque puits 5 μ l de tampon stop.

II.2.9. Migration des fragments générés par électrophorèse

II.2.9.1. Préparation du gel de migration

Pour préparer le gel de migration, les extrémités de chaque moule à gel de longueur 25 cm sont fermées par le scotch et les peignes de 18 dents sont placés à une extrémité et au milieu du moule. 4,5 g d'agarose sont ajoutés dans un bécher contenant 400 ml d'eau distillée. Le mélange est chauffé dans un four à micro-ondes pendant 10 minutes. A ce gel chauffé, 100 ml de tampon 5X TBE BrEt sont ajoutés et le mélange est ensuite coulé dans le moule à gel. Après refroidissement les peignes et le scotch sont enlevés et le gel d'agarose polymérisé est placé dans le "Tank" d'électrophorèse contenant le tampon 1X TBE BrEt.

II.2.9.2. Migration

A l'aide d'une micropipette, les produits de la digestion sont introduits dans les puits formés dans le gel par les peignes (figure 7). On prend soin de migrer à côté de ces réactions les marqueurs de poids moléculaire. A la fin de la migration, le gel est visualisé à la lumière UV et la photo est prise par la camera. Les modèles obtenus sont comparés à ceux existant dans une base de données pour identifier l'enzyme. On doit s'assurer de porter les gants avant de manipuler les gels qui contiennent le Bromure d'Ethidium (BrEt) qui est cancérigène et de porter les lunettes avant d'observer les gels à la lumière UV qui est nuisible pour la vue. Si

l'extrait brut présente une activité enzymatique (production des fragments d'ADN à partir du substrat), il doit être purifié pour la caractérisation et l'identification.

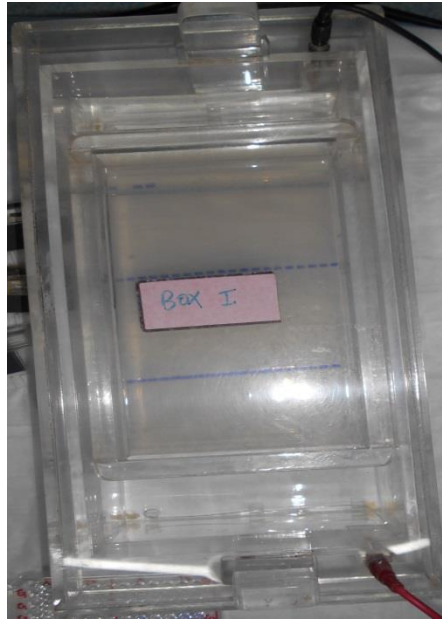


Figure 7. Migration des produits de la digestion des substrats d'ADN par les extraits bruts (photo prise par Nguimé 2015).

II.2.10. Purification

Les échantillons positifs obtenus sont cultivés en grande quantité dans 250 ml du milieu liquide. Les cellules obtenues après centrifugation sont résuspendues dans 6 ml de solution A dans laquelle on ajoute 600 μ l de solution B, 300 μ l de solution C, 345 μ l de solution D, 725 μ l de solution E. Après incubation à la température ambiante pendant 15 minutes, le mélange est centrifugé. Le surnageant (extrait brut) obtenu est utilisé pour la purification.

II.2.10.1. Préparation dans la colonne d'Héparine sépharose ou Q-sépharose

Elle s'effectue dans la chambre froide. 5 ml de solution A sont introduits dans un petit bécher contenant un barreau magnétique et 5 ml de NaCl 1M sont introduits dans un autre bécher. Les deux béchers sont ensuite reliés par un pont et posés sur un agitateur magnétique. 500 μ l de gel (Héparine sépharose ou Q-sépharose) sont introduits dans une colonne de hauteur 25cm et de diamètre 1 cm qu'on équilibre en faisant passer à travers 10 ml de solution A. L'extrait brut, obtenu à partir d'une culture de 250 ml est passé dans la colonne et le gel est ensuite lavé avec 10 ml de solution A. On procède ensuite à l'élution par un gradient de NaCl de 0 à 1 M.

II.2.10.2. Collecte et analyse des fractions

Les fractions de 1 ml sont collectées et testées sur le substrat (ADN). Si le pic de digestion est faible, il faut optimiser les conditions de digestion.

II.2.11. Réaction d'optimisation et de mapping

II.2.11.1. Réaction d'optimisation

Le pic de digestion obtenu est utilisé pour faire les réactions avec d'autres tampons de digestion qui sont différents par la quantité de sel, la qualité de la molécule tampon et à de différentes températures (60°C et température ambiante).

II.2.11.2. Réaction de mapping et de double digestion

Concernant les échantillons qui ont peu de sites de coupure, on procède au mapping. C'est une réaction qui consiste à digérer l'ADN par des enzymes commerciales de sites de coupure connus, et l'enzyme à identifier et la taille des différents fragments obtenus permettent de déterminer le site de coupure de l'enzyme inconnue. Quand on suspecte une enzyme on peut faire une double digestion avec l'enzyme commerciale. Cette double digestion consiste à comparer les résultats de trois réactions: une réaction avec l'enzyme à identifier seule, une réaction avec le mélange de l'enzyme à identifier et l'enzyme commerciale et une réaction avec l'enzyme commerciale seule.

CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. RÉSULTATS

III.1.1. Isolement des bactéries

Les échantillons cultivés dans les milieux de culture solides ont produit plusieurs colonies différentes les unes les autres en fonction de leur couleur, leur taille et leur poussée (figure 8).

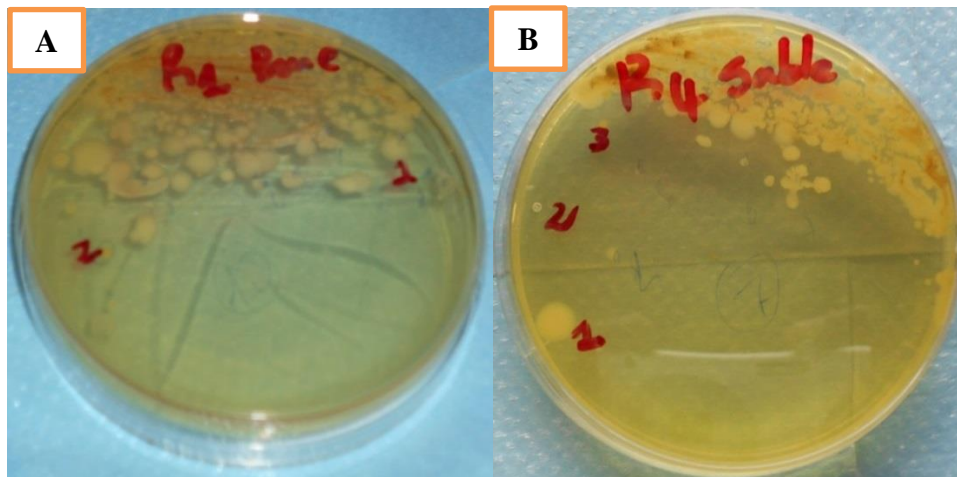


Figure 8. Échantillons cultivés dans les milieux solides (A): échantillon R1 boue; (B): échantillon R4 sable (photo prise par Nguimé 2015).

Les différentes colonies identifiées ont été isolées différemment sur des nouvelles boîtes de pétri (figure 9).

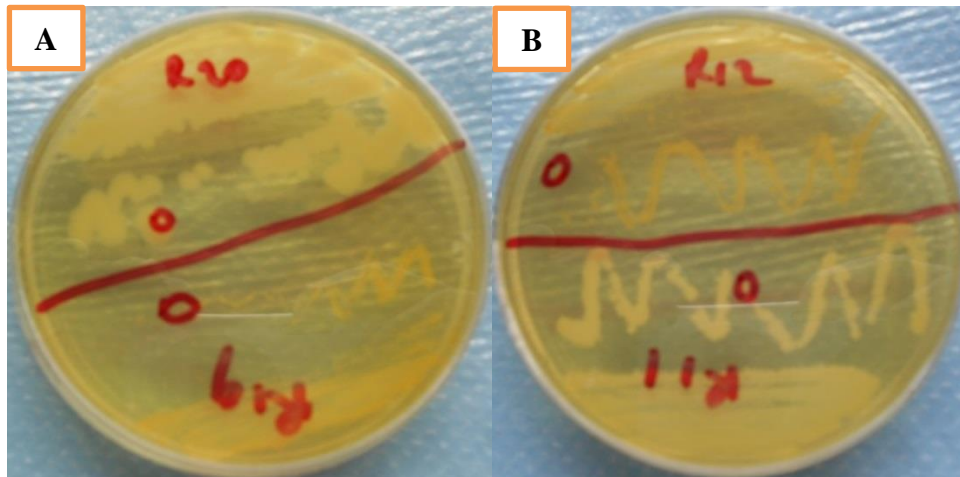


Figure 9. Isolement des colonies (A): colonies R19, et R20; (B): colonies R11, et R12 (photo prise par Nguimé 2015).

Nous avons isolé trente-deux colonies bactériennes. Les aspects macroscopiques des colonies sont représentés dans le tableau suivant:

Tableau 2. Quelques aspects macroscopiques des colonies après culture sur le milieu solide.

Echantillons	Isolats	Taille	Couleur	Poussée
Boue	R1	Moyenne	Blanchâtre	Bonne
	R2	Petite	Jaunâtre	Bonne
	R3	Moyenne	Blanchâtre	Bonne
	R4	Petite	Jaunâtre	Bonne
	R5	Moyenne	Blanchâtre	Bonne
	R6	Petite	Jaunâtre	Bonne
	R7	Grande	Claire	Très bonne
	R8	Petite	Blanchâtre	Bonne
	R9	Moyenne	Blanchâtre	Bonne
	R10	Moyenne	Blanchâtre	Bonne
Eau stagnante	R11	Moyenne	Blanchâtre	Bonne
	R12	Petite	Jaunâtre	Bonne
	R13	Petite	Blanchâtre	Bonne
	R14	Très petite	Blanchâtre	Moyenne
	R15	Grande	Blanchâtre	Très bonne
	R16	Grande	Blanchâtre	Bonne
	R17	Petite	Claire	Moyenne
Feuilles mortes	R18	Petite	Claire	Bonne
	R19	Petite	Très claire	Bonne
	R20	Grande	Blanchâtre	Bonne
	R21	Moyenne	Très claire	Bonne
	R22	Petite	Jaunâtre	Bonne
Sable	R23	Grande	Blanchâtre	Bonne
	R24	Moyenne	Jaunâtre	Bonne
	R25	Moyenne	Blanchâtre	Bonne
	R26	Moyenne	Blanchâtre	Bonne
	R27	Grande	Claire	Très bonne
Terre	R28	Grande	Blanchâtre	Très bonne
	R29	Petite	Blanchâtre	Bonne
	R30	Grande	Claire	Bonne
	R31	Moyenne	Blanchâtre	Bonne
	R32	Moyenne	Blanchâtre	Bonne

III.1.2. Identification des enzymes de restriction

Parmi les trente-deux colonies bactériennes isolées, sept isolats ont présenté une activité enzymatique identifiable (R5; R7; R10; R21; R26; R28; R32) et vingt-cinq isolats n'ont pas présenté d'activité enzymatique perceptible.

III.1.2.1. Isolats à activité non identifiable

Les réactions des extraits R1 et R15 sur les ADN λ et T7 présentent les profils suivants:

Isolat R1

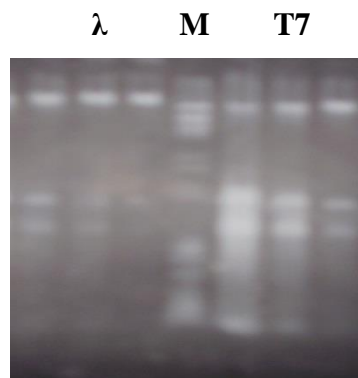


Figure 10. Électrophorégramme de la réaction avec l'extrait brut R1 sur les ADN λ et T7.

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; λ : ADN λ ; T7: ADN T7.

Isolat R15

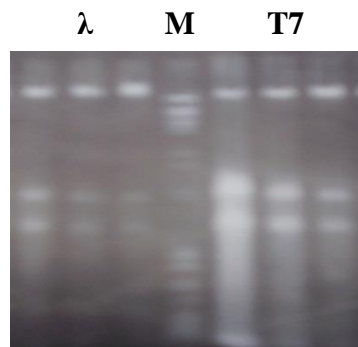


Figure 11. Électrophorégramme de la réaction avec l'extrait brut R15 sur les ADN λ et T7.

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; λ : ADN λ ; T7: ADN T7.

III.1.2.2. Isolats à activité identifiable

Isolat R5

- Après digestion de la paroi bactérienne, la réaction avec l'extrait brut R5 sur les ADN λ et T7 présente les profils suivants:

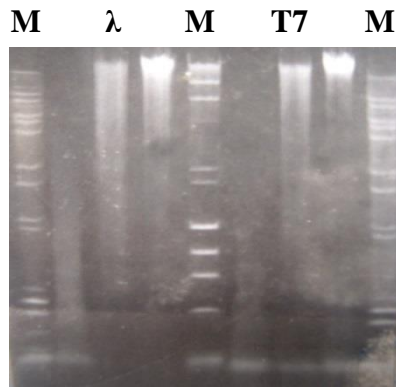


Figure 12. Électrophorégramme de la réaction avec l'extrait brut R5 sur les ADN λ et T7.

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; λ : ADN λ ; T7: ADN T7.

- La réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ présente les profils suivants:

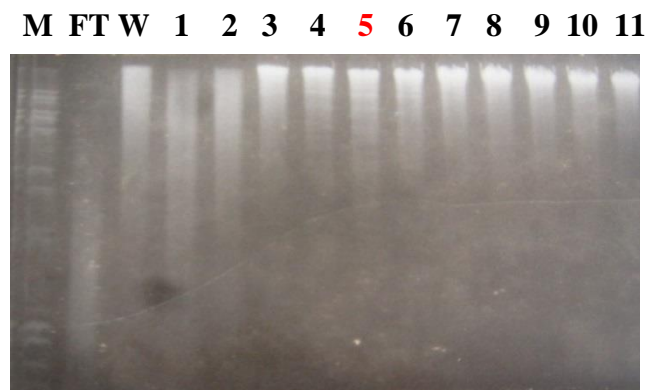


Figure 13. Électrophorégramme de la réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ .

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; FT: Flow Through (fraction obtenue après passage de l'extrait brut dans le gel); W: Wash (lavage); 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11: fractions collectées pendant l'élution. La fraction 5 représente le pic de digestion.

- La réaction d'optimisation sur le substrat ADN λ et de digestion complète sur les substrats ADN T7, pBR322, Φ X174, pUC19 et M13mp19, présentent les profils suivants:

M b1 b2 b3 b4 Ta Tb M T7 A B C D M

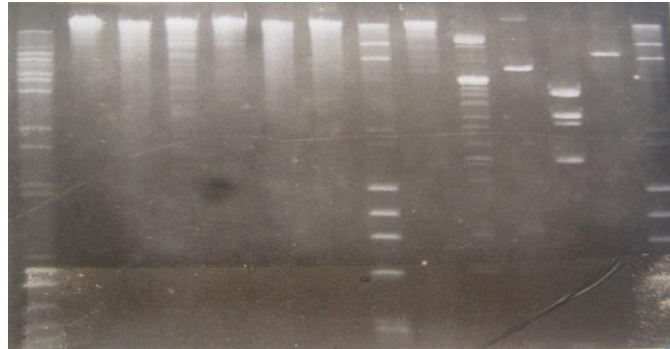


Figure 14. Électrophorégramme de la réaction d'optimisation sur l'ADN λ et de la digestion complète sur les ADN T7; pBR322; Φ X174; pUC19 et M13mp19.

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; A: pBR322; B: Φ X174; C: pUC19; D: M13mp19; T7: ADN T7; b1, b2, b3, b4: différents tampons de digestion; Ta, Tb: deux températures différentes (Ta= température ambiante; Tb= 60°C). Le tampon b3 représente le tampon optimal de digestion et Ta représente la température optimale de digestion.

➤ La réaction de mapping sur les ADN Φ X174; pUC19 et M13mp18 présente les profils suivants:

M e f g h d M i j k l d M m n o p d

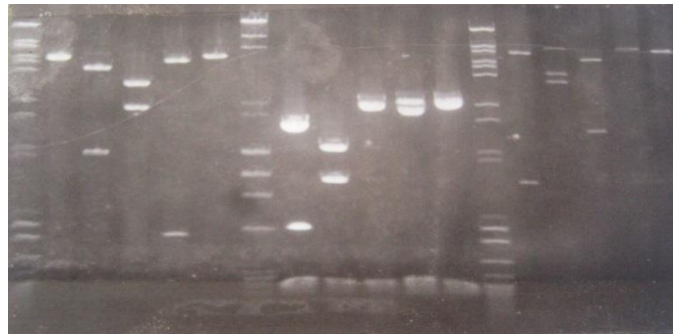


Figure 15. Électrophorégramme de la réaction de mapping sur les ADN Φ X174; pUC19 et M13mp18.

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; d: digestion; e: *Pst*I; f: *Ssp*I; g: *Nci*I; h: *Stu*I; i: *Eco*01091; j: *Afl*III; k: *Ahd*I; l: *Xmn*I; m: *Bgl*II; n: *Bse*RI; o: *Pac*I; p: *Kas*I.

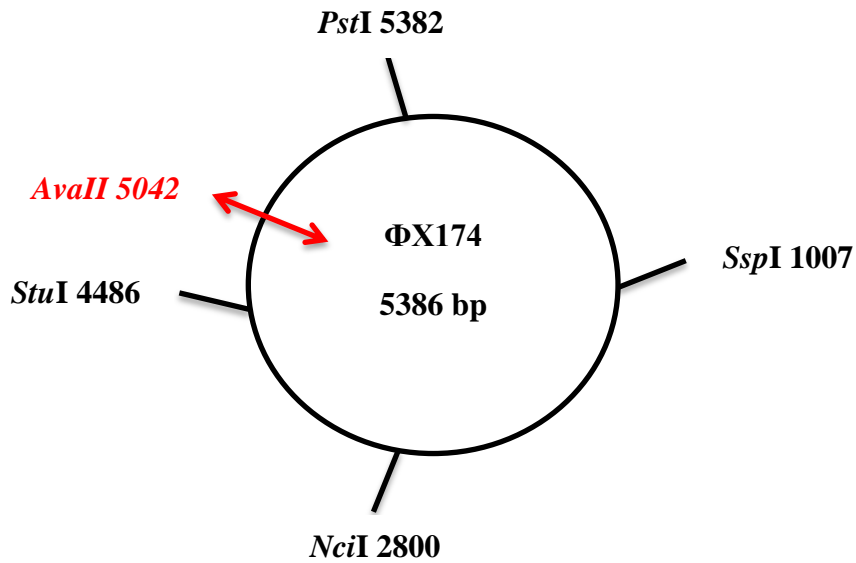


Figure 16. Schéma de la réalisation du mapping sur l'ADN ΦX174.

La réaction de mapping sur les ADN ΦX174; pUC19 et M13mp18 a présenté plusieurs sites de coupure. Sur l'ADN ΦX174, la réaction de mapping a présenté un fragment à 1300 paires de bases avec l'enzyme *SspI*, un fragment de 2180 paires de bases avec l'enzyme *NciI* et un fragment de 590 paires de bases avec l'enzyme *StuI*. D'après la carte de restriction de l'ADN ΦX174, l'enzyme *AvaII* coupe à 5042 paires de bases. En projetant ces fragments sur la carte de restriction de l'ADN ΦX174, nous avons trouvé le site de coupure à 5076 paires de bases. Ce site étant proche du site de coupure de l'enzyme *AvaII*.

Tableau 3. Résultat de la réaction du mapping sur l'ADN ΦX174.

Enzymes de restriction	Taille des fragments (en paire de base)
<i>SspI</i>	1300
<i>NciI</i>	2180
<i>StuI</i>	590

- À partir du profil presque complet de la fraction 5, nous avons soupçonné l'enzyme *AvaII*. Pour confirmer ceci, nous avons fait une double digestion avec l'enzyme commerciale *AvaII* sur les ADN λ; T7 et pBR322, nous avons obtenu les profils suivants:

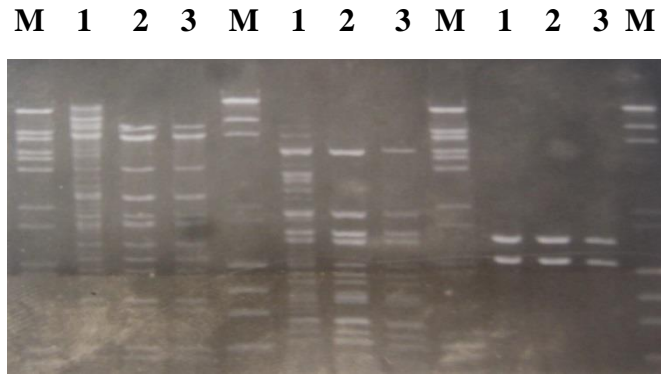


Figure 17. Électrophorégramme de la réaction de double digestion de l'enzyme commerciale *AvaII* sur les ADN λ ; T7 et pBR322.

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; 1: R5; 2: R5 + *AvaII*; 3: *AvaII*.

Les profils avec R5 + *AvaII* et *AvaII* nous ont permis d'identifier l'isolat R5 comme isoschizomère de l'enzyme *AvaII*. La séquence de reconnaissance est la suivante:

5'...GGTCC...3'

3'...CCAGG...5'

Isolat R7

➤ Après digestion de la paroi bactérienne, la réaction avec l'extrait brut R7 sur les ADN λ et T7 présente les profils suivants:

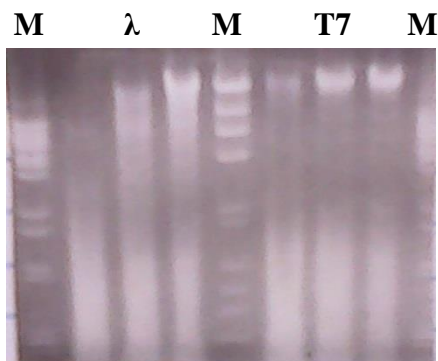


Figure 18. Électrophorégramme de la réaction avec l'extrait brut R7 sur les ADN λ et T7.

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; λ : ADN λ ; T7: ADN T7.

- La réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ présente les profils suivants:



Figure 19. Électrophorégramme de la réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ .

Légende: **M:** marqueur de poids moléculaire; **FT:** Flow Through (fraction obtenue après passage de l'extrait brut dans le gel); **W:** Wash (lavage); **1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12:** fractions collectées pendant l'élution. Les fractions **6** et **7** représentent le pic de digestion.

- La réaction d'optimisation sur le substrat ADN λ et de digestion complète sur les substrats ADN T7, pBR322, Φ X174, pUC19 et M13mp19, présentent les profils suivants:

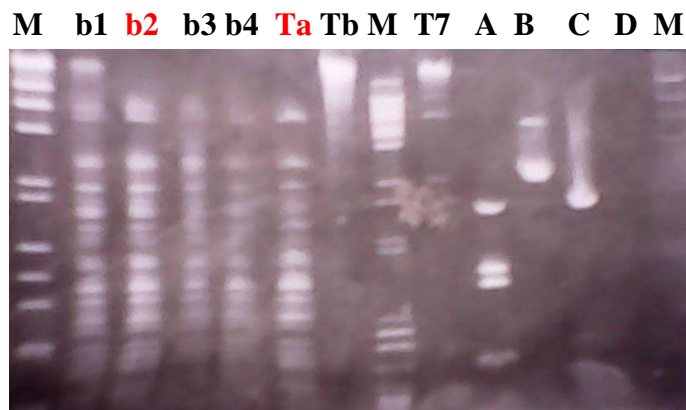


Figure 20. Électrophorégramme de la réaction d'optimisation sur l'ADN λ et de la digestion complète sur les ADN T7; pBR322; Φ X174; pUC19 et M13mp19.

Légende: **M:** marqueur de poids moléculaire; **A:** pBR322; **B:** Φ X174; **C:** pUC19; **D:** M13mp19; **T7:** ADN T7; **b1, b2, b3, b4:** différents tampons de digestion; **Ta, Tb:** deux températures différentes (**Ta**= température ambiante; **Tb**= 60°C). Le tampon **b2** représente le tampon optimal de digestion et **Ta** représente la température optimale de digestion.

La présentation des motifs de digestion sur les différents substrats a permis d'identifier l'isolat R7 comme isoschizomère de l'enzyme *BpmI*. La séquence de reconnaissance est suivante:



Isolat R10

- Après digestion de la paroi bactérienne, la réaction avec l'extrait brut R10 sur les ADN et T7 présente les profils suivants:

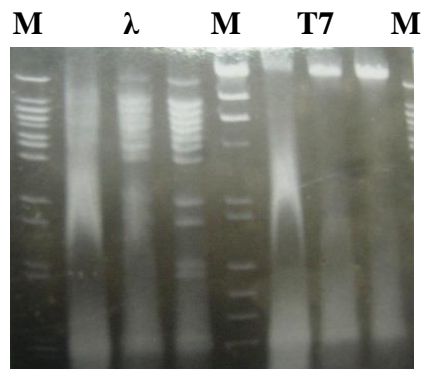


Figure 21. Électrophorégramme de la réaction avec l'extrait brut R10 sur les ADN λ et T7.

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; λ : ADN λ ; T7: ADN T7.

- La réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ présente les profils suivants:

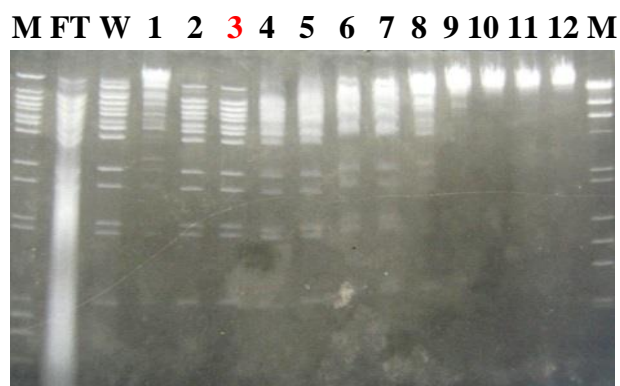


Figure 22. Électrophorégramme de la réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose testées sur l'ADN λ .

Légende: **M:** marqueur de poids moléculaire; **FT:** Flow Through (fraction obtenue après passage de l'extrait brut dans le gel); **W:** Wash (lavage); **1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12:** fractions collectées pendant l'élution. La fraction **3** représente le pic de digestion.

- À partir du profil de digestion presque complet de la fraction **3**, nous avons soupçonné l'enzyme *BstEII*. Pour confirmer ceci, nous avons fait une double digestion avec l'enzyme commerciale *BstEII* sur l'ADN λ et nous avons obtenu les profils suivants:

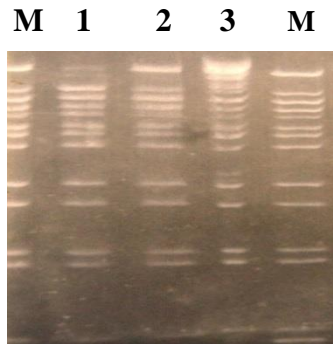


Figure 23. Électrophorégramme de la réaction de double digestion de l'enzyme commerciale *BstEII* sur l'ADN λ .

Légende: **M:** marqueur de poids moléculaire; **1:** R10; **2:** R10 + *BstEII*; **3:** *BstEII*.

Les profils de digestion avec R10 + *BstEII* et *BstEII* nous ont permis d'identifier l'isolat R10 comme isoschizomère de l'enzyme commerciale *BstEII*. La séquence de reconnaissance est la suivante:



Isolat R21

- Après digestion de la paroi bactérienne, la réaction de l'extrait brut R2 sur les ADN λ et T7 présente les profils suivants:

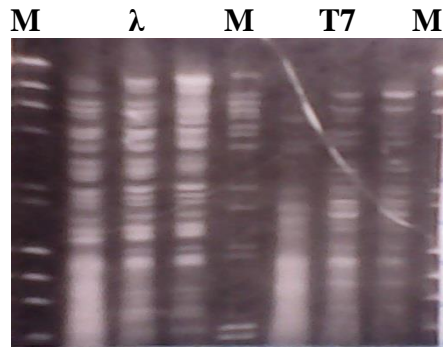


Figure 24. Électrophorégramme de la réaction de l'extrait brut R21 sur les ADN λ et T7.

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; λ : ADN λ ; T7: ADN T7.

- La réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ présente les profils suivants:

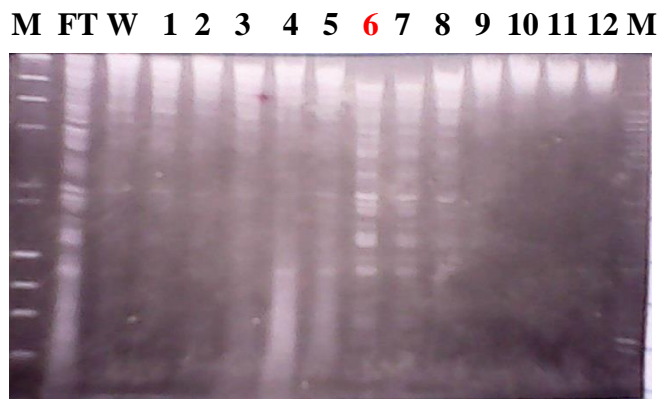


Figure 25. Électrophorégramme de la réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ .

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; FT: Flow Through (fraction obtenue après passage de l'extrait brut dans le gel); W: Wash (lavage); 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12: fractions collectées pendant l'éluion. La fraction 6 représente le pic de digestion.

- La réaction d'optimisation sur le substrat ADN λ et de digestion complète sur les substrats ADN T7, pBR322, Φ X174, pUC19 et M13mp19, présentent les profils suivants:

M b1 b2 b3 b4 Ta Tb M T7 A B C D M



Figure 26. Électrophorégramme de la réaction d'optimisation sur l'ADN λ et de la digestion complète sur les ADN T7; pBR322; Φ X174; pUC19 et M13mp19.

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; A: pBR322; B: Φ X174; C: pUC19; D: M13mp19; T7: ADN T7; b1, b2, b3, b4: différents tampons de digestion; Ta, Tb: deux températures différentes (Ta= température ambiante; Tb= 60°C). Le tampon b4 représente le tampon optimal de digestion et Ta représente la température optimale de digestion.

- À partir du profil de digestion presque complet de la fraction 6, nous avons soupçonné l'enzyme *EarI*. Pour confirmer ceci, nous avons fait une double digestion avec l'enzyme commerciale *EarI* sur l'ADN λ et nous avons obtenu les profils suivants:

M 1 2 3



Figure 27. Électrophorégramme de la réaction de double digestion avec l'enzyme commerciale *EarI* sur l'ADN λ .

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; 1: R21; 2: R21 + *EarI*; 3: *EarI*.

Les profils avec R21 + *EarI* et *EarI* nous ont permis d'identifier l'isolat R21 comme isoschizomère de l'enzyme commerciale *EarI*. La séquence de reconnaissance est présentée comme suit:



Isolat R26

- Après digestion de la paroi bactérienne, la réaction de l'extrait brut R26 sur les ADN λ et T7 présente les profils suivants:

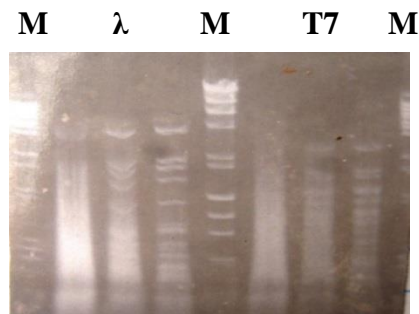


Figure 28. Électrophorégramme de la réaction avec l'extrait brut R26 sur les ADN λ et T7.

Légende: **M:** marqueur de poids moléculaire; λ : ADN λ ; **T7:** ADN T7.

- La réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ présente les profils suivants:

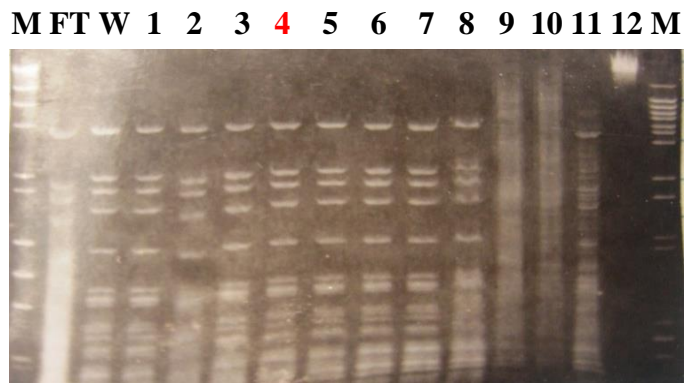


Figure 29. Électrophorégramme de la réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ .

Légende: **M:** marqueur de poids moléculaire; **FT:** Flow Through (fraction obtenue après passage de l'extrait brut dans le gel); **W:** Wash (lavage); **1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12:** fractions collectées pendant l'éluion. La fraction **4** représente le pic de digestion.

- La réaction d'optimisation sur le substrat ADN λ et de digestion complète sur les substrats ADN T7, pBR322, Φ X174, pUC19 et M13mp19, présentent les profils suivants:

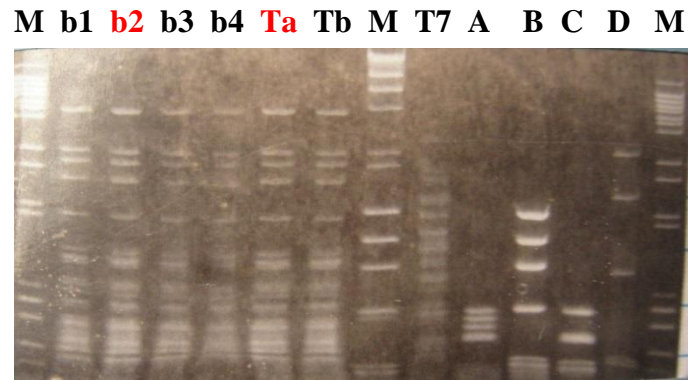
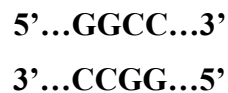


Figure 30. Électrophorégramme de la réaction d'optimisation sur l'ADN λ et de la digestion complète sur les ADN T7; pBR322; Φ X174; pUC19 et M13mp19.

Légende: **M:** marqueur de poids moléculaire; **A:** pBR322; **B:** Φ X174; **C:** pUC19; **D:** M13mp19; **T7:** ADN T7; **b1, b2, b3, b4:** différents tampons de digestion; **Ta; Tb:** deux températures différentes (**Ta**= température ambiante; **Tb**= 60°C). Le tampon **b2** représente le tampon optimal de digestion et **Ta** représente la température optimale de digestion.

La présentation des motifs de digestion sur les différents substrats a permis d'identifier l'isolat R26 comme isoschizomère de l'enzyme *Hae*III. La séquence de reconnaissance est la suivante:



Isolat R28

- Après digestion de la paroi bactérienne, la réaction de l'extrait brut R28 sur les ADN λ et T7 présente les profils suivants:

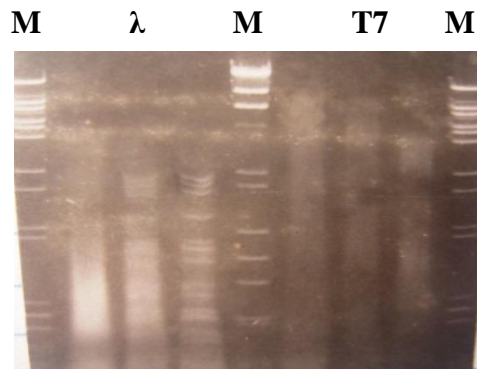


Figure 31. Électrophorégramme de la réaction de l'extrait brut R28 sur les ADN λ et T7.

Légende: **M:** marqueur de poids moléculaire; **λ :** ADN λ ; **T7:** ADN T7.

- La réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ présente les profils suivants:

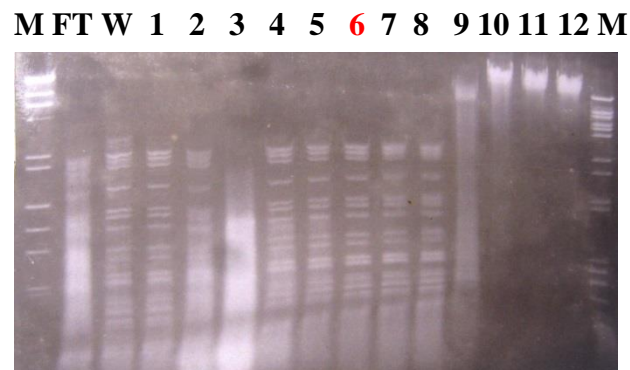


Figure 32. Électrophorégramme de la réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ .

Légende: **M:** marqueur de poids moléculaire; **FT:** Flow Through (fraction obtenue après passage de l'extrait brut dans le gel); **W:** Wash (lavage); **1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12:** fractions collectées pendant l'élution. La fraction **6** représente le pic de digestion.

- La réaction d'optimisation sur le substrat ADN λ et de digestion complète sur les substrats ADN T7, pBR322, Φ X174, pUC19 et M13mp19, présentent les profils suivants:

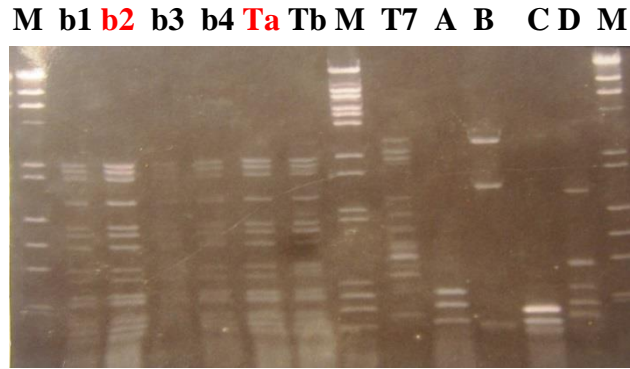


Figure 33. Électrophorégramme de la réaction d'optimisation sur l'ADN λ et de la digestion complète sur les ADN T7; pBR322; Φ X174; pUC19 et M13mp19.

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; A: pBR322; B: Φ X174; C: pUC19; D: M13mp19; T7: ADN T7; b1, b2, b3, b4: différents tampons de digestion; Ta; Tb: deux températures différentes (Ta= température ambiante; Tb= 60°C). Le tampon b2 représente le tampon optimal de digestion et Ta représente la température optimale de digestion.

- À partir du profil de digestion presque complet de la fraction 6, nous avons soupçonné l'enzyme *HpaII*. Pour confirmer ceci, nous avons fait une double digestion avec l'enzyme commerciale *HpaII* sur l'ADN λ et nous avons obtenu les profils suivants:

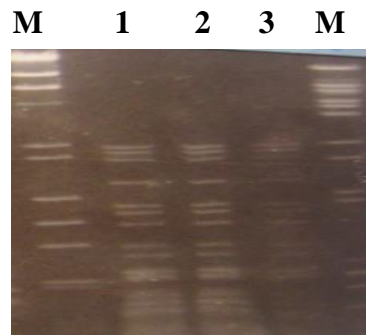


Figure 34. Électrophorégramme de la réaction de double digestion avec l'enzyme commerciale *HpaII* sur l'ADN λ .

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; 1: R28; 2: R28 + *HpaII*; 3: *HpaII*.

Les profils avec R28 + *HpaII* et *HpaII* nous ont permis d'identifier l'isolat R28 comme isoschizomère de l'enzyme commerciale *HpaII*. La séquence de reconnaissance est la suivante:



Isolat R32

- Après digestion de la paroi bactérienne, la réaction de l'extrait brut R32 sur les ADN λ et T7 présente les profils suivants:

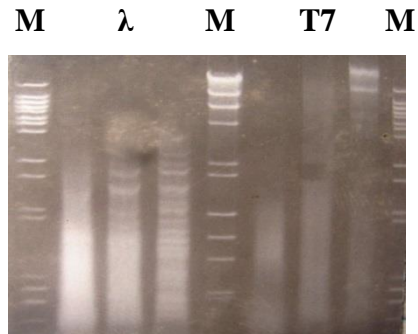


Figure 35. Électrophorégramme de la réaction de l'extrait brut R32 sur les ADN λ et T7.

Légende: **M**: marqueur de poids moléculaire; λ : ADN λ ; **T7**: ADN T7.

- La réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ présente les profils suivants:

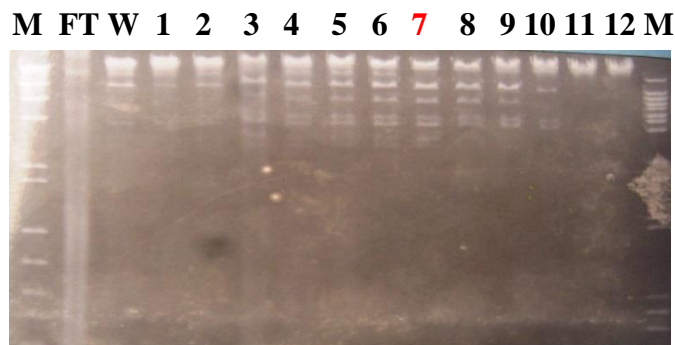


Figure 36. Électrophorégramme de la réaction des fractions purifiées avec l'héparine sépharose sur l'ADN λ .

Légende: **M**: marqueur de poids moléculaire; **FT**: Flow Through (fraction obtenue après passage de l'extrait brut dans le gel); **W**: Wash (lavage); **1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12**: fractions collectées pendant l'élution. La fraction **7** représente le pic de digestion.

- La réaction d'optimisation sur le substrat ADN λ et de digestion complète sur les substrats ADN T7, pBR322, Φ X174, pUC19 et M13mp19, présentent les profils suivants:

M b1 b2 b3 b4 Ta Tb M T7 A B C D M

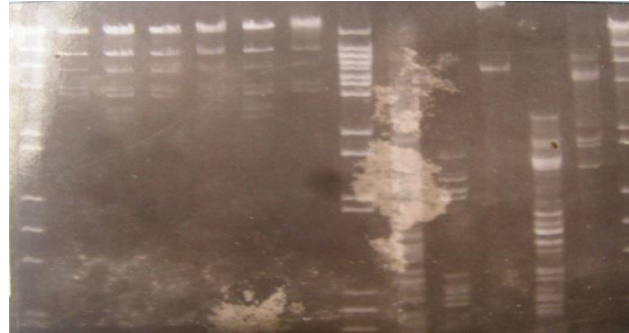


Figure 37. Électrophorégramme de la réaction d'optimisation sur l'ADN λ et de la digestion complète sur les ADN T7; pBR322; Φ X174; pUC19 et M13mp19.

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; A: pBR322; B: Φ X174; C: pUC19; D: M13mp19; T7: ADN T7; b1, b2, b3, b4: différents tampons de digestion; Ta, Tb: deux températures différentes (Ta= température ambiante; Tb= 60°C). Le tampon b2 représente le tampon optimal de digestion et Ta représente la température optimale de digestion.

- À partir du profil de digestion presque complet de la fraction 7, nous avons soupçonné l'enzyme *MboI*. Pour confirmer ceci, nous avons fait une double digestion avec l'enzyme commerciale *MboI* sur l'ADN λ et nous avons obtenu les profils suivants:

M 1 2 3 M

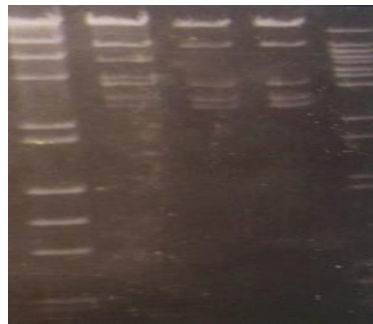


Figure 38. Électrophorégramme de la réaction de double digestion avec l'enzyme commerciale *MboI* sur l'ADN λ .

Légende: M: marqueur de poids moléculaire; 1: R32; 2: R32 + *MboI*; 3: *MboI*.

Les profils de digestion avec R32 + *MboI* et *MboI* nous ont permis de confirmer l'activité enzymatique de l'isolat R32 comme isoschizomère de *MboI*. La séquence de reconnaissance est présentée comme suit:

5'...GATC...3'
3'...CTAG...5'

Tableau 4. Tableau récapitulatif des enzymes de restriction trouvées.

Echantillons	Enzymes de restriction	Séquences de reconnaissance
R5	<i>AvaII</i>	5'...GGTCC...3' 3'...CCAGG...5'
R7	<i>BpmI</i>	5'...CTGGAG(N) ₁₆ ...3' 3'...GACCTC(N) ₁₄ ...5'
R10	<i>BstEII</i>	5'... GGTNACC ...3' 3'... CCANTGG ...5'
R21	<i>EarI</i>	5'...CTCTTC(N) ₁ ...3' 3'...GAGAAG(N) ₄ ...5'
R26	<i>HaeIII</i>	5'...GGCC...3' 3'...CCGG...5'
R28	<i>HpaII</i>	5'...CCGG...3' 3'...GGCC...5'
R32	<i>MboI</i>	5'...GATC...3' 3'...CTAG...5'

III.2. DISCUSSION

Nous avons isolé trente-deux colonies bactériennes à partir des échantillons (tableau 2). On s'attendait à un nombre plus grand étant donné qu'il est possible d'isoler plus d'un millier de bactéries par gramme d'échantillon récolté (Sogin et *al.* 2006). L'obtention de cette quantité peut s'expliquer par plusieurs raisons, soit que les conditions du milieu (la température, le pH du milieu, la pression osmotique ne permettent pas aux bactéries de se développer, soit le milieu de culture ne contenait pas des substances nécessaires à la croissance de ces bactéries. Certains facteurs physiques externes (la température, le pH du milieu, la pression osmotique) peuvent intervenir dans le développement des bactéries. La variation de certains de ces facteurs peut accélérer, ralentir, ou stopper la croissance bactérienne. Pour chaque bactérie, on définit une température optimale de croissance pour laquelle le développement est maximal, une température minimale en dessous de laquelle il n'y a pas de croissance et une température maximale en dessus de laquelle le développement s'arrête.

Nous avons noté chez certaines bactéries une poussée lente tandis que chez d'autres la poussée était rapide. Cette différence montre que certaines bactéries ont trouvé dans le milieu de culture des substances favorables à leur croissance. Concernant l'aspect macroscopique des colonies, nous ne l'avons convenablement décrit qu'à partir des colonies bien isolées. Les colonies sont d'autant plus petites qu'elles sont rapprochées.

Sur les trente-deux colonies isolées, vingt-cinq n'ont produit aucune activité identifiable. Ce résultat peut s'expliquer par plusieurs raisons: soit les conditions de digestion (température du milieu et tampon utilisé pour la digestion) étaient défavorables et n'ont pas permis à l'enzyme de restriction de s'exprimer, soit la bactérie ne possède pas de gène qui code pour l'enzyme de restriction, soit la bactérie possède un gène latent (dormant) qui devrait coder pour cette enzyme de restriction, soit le substrat utilisé ne contenait pas de sites de coupure de l'enzyme, soit la quantité d'enzymes produites était très faible pour avoir une activité enzymatique identifiable, soit la longueur du fragment d'ADN n'a pas permis à l'enzyme de reconnaître sa séquence cible et son site de coupure.

Les isolats R5, R7, R10, R21, R26, R28 et R32 ont produit une activité enzymatique identifiable. L'activité enzymatique dans certaines réactions était faible, nous avons optimisé les conditions de digestion avec des tampons différents et des températures. Nous avons fait la double digestion avec une enzyme commerciale pour identifier l'enzyme produite par la bactérie. Nous avons également fait le mapping pour déterminer les sites de coupure de l'enzyme produite par la bactérie. Etant donné que nos enzymes aient été identifiées comme isoschizomères des enzymes connues, ces isoschizomères nous ont permis de retrouver les séquences de reconnaissance et les sites de coupure des enzymes produites par les bactéries. Ainsi, les réactions de double digestion, de mapping et la comparaison des profils avec les modèles de digestion de "New England Biolabs Catalog 2008" ont permis d'identifier l'isolat R5 comme isoschizomère de l'enzyme *AvaII*, l'isolat R7 comme isoschizomère de l'enzyme *BpmI*, l'isolat R10 comme isoschizomère de l'enzyme *BstEII*, l'isolat R21 comme isoschizomère de l'enzyme *EarI*, l'isolat R26 comme isoschizomère de l'enzyme *HaeIII* décrite pour la première fois par Middleton *et al* 1972, l'isolat R28 comme isoschizomère de l'enzyme *HpaII* et l'isolat R32 comme isoschizomère de l'enzyme *MboI*.

Ces enzymes continuent à enrichir la collection des enzymes du Cameroun, utilisables par les scientifiques.

**CHAPITRE IV: IMPLICATION
DU SUJET SUR LE SYSTÈME
ÉDUCATIF**

IV.1. GÉNÉRALITÉS

Le présent travail cadre avec la démarche scientifique qui doit avoir cours dans les salles de classes: OHERIC (Observation, Hypothèse, Expérience, Résultat, Interprétation et Conclusion). Cette démarche nous permettra de mieux aborder les contenus des programmes officiels des enseignements des Sciences de la Vie et de la Terre, Education à l'Environnement, Hygiène et Biotechnologie élaborés par le Ministère des enseignements secondaires. Sachant que la nouvelle approche des enseignements des Sciences de la Vie et de la Terre, Education à l'Environnement, Hygiène et Biotechnologie évolue vers des savoirs faire et les compétences. Elle permet aux apprenants d'acquérir des compétences à travers des manipulations. Ce travail est salubre à toute la société en particulier aux populations dans les domaines de l'agriculture et la médecine.

IV.2. INTÉRÊT DIDACTIQUE

L'intérêt de ce travail porte sur l'importance des enzymes de restriction dans le génie génétique. Dès lors nous nous sommes proposé d'inscrire cette leçon dans le programme officiel de la classe de Première D au chapitre 6 intitulé: Le renouvellement moléculaire et le code génétique. La leçon porte sur l'utilisation des enzymes de restriction pour la manipulation de l'ADN. Ainsi, cette leçon sera présentée suivant la fiche pédagogique de préparation d'une leçon d'SVTEEHB ci-après:

FICHE PÉDAGOGIQUE DE PRÉPARATION D'UNE LEÇON DE SVTEEHB SELON L'APO

Établissement: Lycées et Collège du Cameroun

Domaine: Sciences de la Vie

Thème III: Identité biologique et information génétique

Chapitre 9: Le renouvellement moléculaire et le code génétique

Titre de la leçon: Utilisation des enzymes de restriction pour la manipulation de l'ADN

OPO: À la fin de cette leçon, à partir des documents ou illustration des techniques de modification de génomes, l'apprenant doit être capable de:

- Expliquer que l'homme peut modifier artificiellement la structure du génome.

Date:

Enseignant: NGUIME MAKOLLO Richard

Classe: 1^{ère} D

Effectif: **Garçons:** **Filles:**

Période:

Durée: 1 heure

Nombre de séances: 1

Étapes	Objectifs Pédagogiques Intermédiaires (OPI)	Contenus spécifiques aux objectifs Pédagogiques Intermédiaires	Supports didactiques	Activités enseignement/apprentissage		Evaluations	Durée
				Enseignant	Apprenants		
I N T	1-Établir le contrat enseignant-apprenant	<p>Titre: Utilisation des enzymes de restriction pour la manipulation de l'ADN</p> <p>OPI:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Donner le rôle biologique des enzymes de restriction; - Donner leur utilisation dans le génie génétique. 	<p>Livre Programme; Collection Planète Vivante PD; Hatier PS; craie; tableau</p>	<p>- Communique et écrit le titre de la leçon au tableau;</p> <p>- Communique les OPI</p>	<p>Recopient le titre de la leçon et les OPOI dans leur cahier</p>		5 Min

R O D	2-Vérifier des pré-requis	<p>Pré-requis</p> <p>Rappeler la notion de:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Génie génétique; 	Cours et apprentissages antérieurs	Pose les questions de l'évaluation diagnostique	<p>R: Ensemble de techniques qui consiste à modifier le matériel génétique d'un être vivant en y introduisant un ou plusieurs gènes provenant d'une espèce différente.</p>	<p>Q: Définir génie génétique.</p>
U C T	3-Déterminer l'intérêt de la séquence d'apprentissage	<p>Intérêt de la séquence d'apprentissage</p> <p>Connaître l'importance des enzymes de restriction dans le génie génétique.</p>	Vécu quotidien	Pour transférer d'un ou plusieurs gènes d'une espèce à l'autre on utilise souvent une enzyme de restriction.	<p>R: Les enzymes de restriction servent à couper/isoler un gène ou plusieurs gènes présent sur un génome.</p>	<p>Q: Donner le rôle des enzymes de restriction.</p>
I O	4- Formuler le problème scientifique et hypothèse	<p>Problème scientifique</p> <p>Quel est le rôle des enzymes de restriction?</p> <p>Hypothèse</p> <p>Les enzymes de restriction sont des outils très utilisés dans le génie génétique et dans les</p>	Vécu quotidien	En génie les enzymes de restriction ont un rôle essentiel.	<p>R: Quel est le rôle des enzymes de restriction?</p>	<p>Q: Quelle question pouvons-nous poser face à cette</p>

N		laboratoires de biologie moléculaire pour analyser et manipuler l'ADN.				situation ?	
D	- Donner le rôle biologique des enzymes de restriction	<p>1- Rôle biologique des enzymes de restriction</p> <p>Les enzymes de restriction sont issues des bactéries. Leur rôle est de couper l'ADN des virus qui infectent les bactéries: les bactériophages. Ainsi, elles empêchent la multiplication des virus et permettent aux bactéries de survivre.</p>	Document 2	- Guide l'activité: observer et analyser le document 2;	- Observent, analysent, réfléchissent et répondent aux questions;	Q: Citer les organismes qui produisent les enzymes de restriction;	35 Min
É		<p>2- Utilisation des enzymes de restriction dans le transfert de gènes</p> <p>Le transfert d'un gène s'effectue en trois étapes:</p>		- Communique les notions construites;	- Prennent les notions construites;	Q: Donner la raison pour laquelle elles produisent ces enzymes;	
V		<p>a- La recombinaison</p> <p>Elle consiste à isoler le gène d'intérêt en utilisant une enzyme de restriction qui permet de couper le fragment d'ADN. Le gène isolé est inséré dans un plasmide (vecteur) coupé par la même enzyme de restriction qui a servi à isoler le gène; puis une ADN ligase est</p>		- Pose les questions de l'évaluation formative.	R: Les bactéries. R: Pour se défendre contre les virus.		
E				- Guide l'activité: Observer, analyser, interpréter puis conclure les expériences du document 1;	- Observent, analysent, interprètent et concluent;		
L	- Donner leur utilisation dans le génie génétique.				- Réfléchissent et répondent aux questions;	Q: Citer les étapes du transfert d'un gène;	

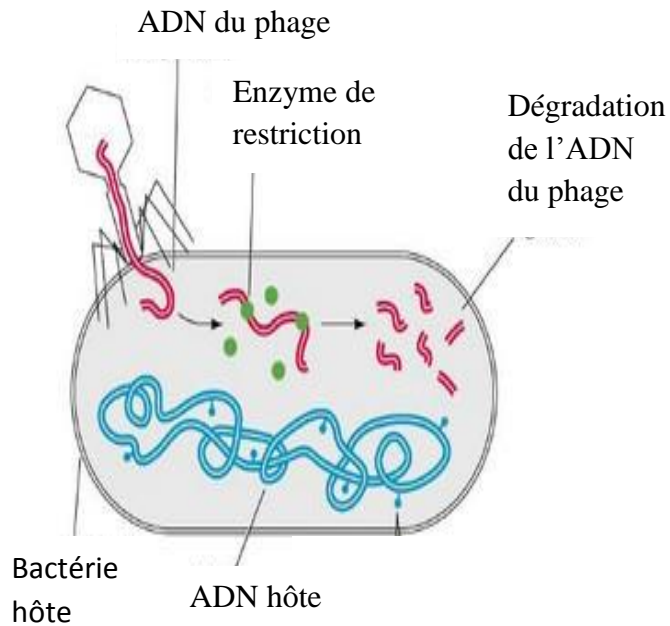
O		chargée de relier les fragments d'ADN: on obtient ainsi un plasmide recombiné.		- Communique les notions construites	notions construites;	
P		b- Le clonage Les plasmides recombinés sont introduits dans des bactéries hôtes que l'on met en culture. Un clone est une population de bactéries génétiquement identiques entre eux et à la cellule mère.	Document 1	- Pose les questions de l'évaluation formative.	R: La recombinaison, le clonage et enfin l'expression du gène d'intérêt.	Q: Donner le rôle des enzymes de restriction dans le clonage de gènes;
P		c- L'expression Le gène d'intérêt ainsi transféré s'exprime dans une nouvelle cellule hôte en stimulant la synthèse de la protéine recherchée.			R: Elles digèrent la molécule d'ADN et le vecteur (plasmide) de clonage.	Q: Citer un exemple
E		Dans le domaine médical, la bactérie <i>Escherichia coli</i> ayant reçu dans son génome une insertion du gène de l'hormone humaine de croissance, se multiplie et synthétise activement cette hormone qui est purifiée et injectée directement aux enfants nains. C'est une voie prometteuse permettant de traiter le nanisme. De même, ces bactéries génétiquement modifiées peuvent synthétiser			R: On a l'enzyme <i>EcoRI</i> produite par l' <i>Escherichia Coli</i> .	d'enzyme de restriction et la bactérie qui la produit.
M						
E						

N T		en grande quantité de l'insuline humaine (hormone sécrétée par les cellules du pancréas), permettant ainsi de soigner le diabète insulino-dépendant ou juvénile.					
C O N C L U S I O N	-Rappeler le problème scientifique; -Rappeler les objectifs; -Vérifier le degré d'atteintes des objectifs.	Les enzymes de restriction sont des protéines qui coupent l'ADN en des sites bien précis. Elles sont donc utilisées dans le génie génétique pour isoler un ou plusieurs gènes afin de comprendre sa fonction.		- Demande aux apprenants de rappeler le problème scientifique; - Demande aux apprenants de rappeler l'OPOI; -Pose les questions de l'évaluation sommative.	- Rappel le problème scientifique; - Rappelent les OPOI; - Répondent aux questions de l'évaluation sommative.	Q: Définir enzyme de restriction; Q: Donner le rôle des enzymes de restriction; Q: Citer les domaines d'utilisation des enzymes de restriction.	5 Min

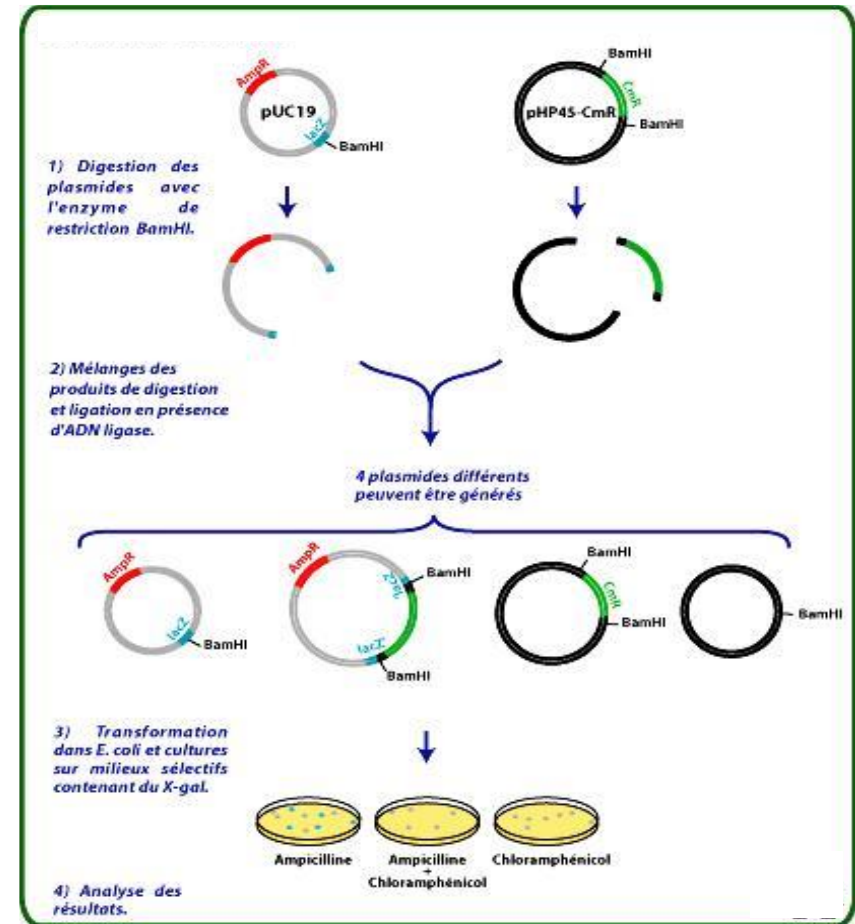
Références Bibliographiques

- Livre programme Sciences de la Vie et de la Terre CNAAP (Centre National d'Appui à l'Action Pédagogique)
- Collection Planète Vivante, Sciences de la Vie et de la Terre 1^{ers} C et D, Hatier international, 2010, pages: 110-111.
- Hatier International PS.

Annexe de la leçon



Document 1: agression d'une bactérie par un phage.



Document 2: utilisation des enzymes de restriction pour le Clonage d'un gène dans un plasmide.



**CONCLUSION ET
PERSPECTIVES**

Au terme de ce travail dont l'objectif général était de rechercher et d'identifier les enzymes de restriction produites par les bactéries isolées des échantillons de boue, d'eau stagnante, de feuilles mortes, de sable et de terre collectés dans un marécage de la localité d'Emana Vallée (Yaoundé). Il ressort que trente-deux colonies bactériennes ont été isolées des cinq échantillons récoltés en fonction de l'aspect macroscopique notamment la couleur, la taille et la poussée. Après les différentes réactions et visualisation des différents profils d'électrophorégrammes obtenus, vingt-cinq isolats n'ont présenté aucune activité enzymatique identifiable. Dans le reste des cas, nous avons observé une activité enzymatique. Les séquences de reconnaissance des enzymes de restriction produites par ces bactéries ont été déterminées. Ces enzymes ont été identifiées comme isoschizomères des enzymes commerciales *AvaII*, *BpmI*, *BstEII*, *EarI*, *HaeIII*, *HpaII* et *MboI*.

Notre travail portant sur la recherche et l'identification des enzymes de restriction produites par les bactéries, il serait intéressant de poursuivre ces travaux par la recherche ou l'utilisation d'autres milieux de culture aux fins d'optimiser le nombre de bactéries cultivables.

BIBLIOGRAPHIE

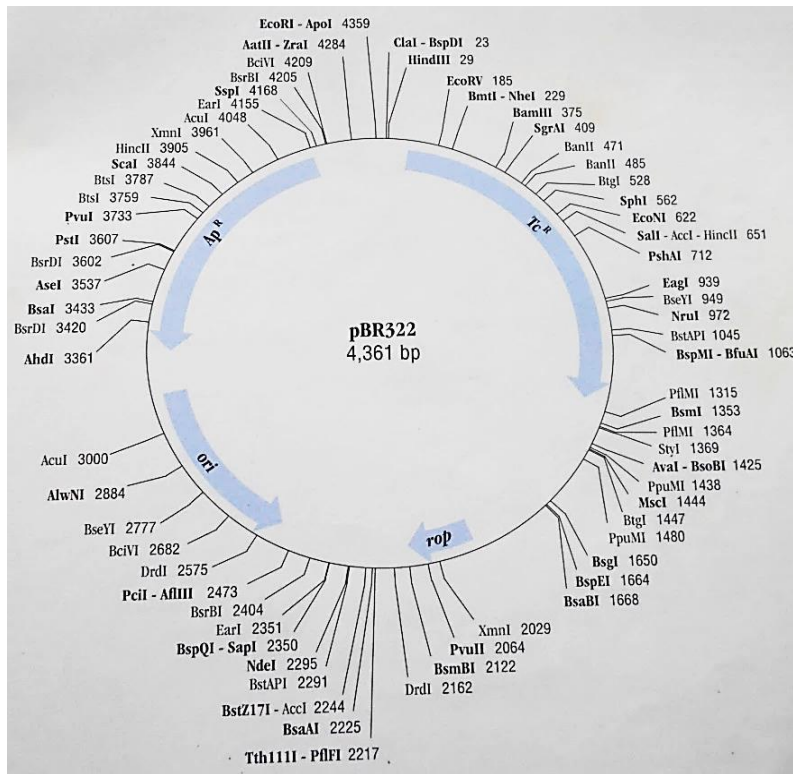
- Bath A.J., Milson S.E., Gormley N.A., Halford S.E. (2002) Many type II restriction endonucleases interact with two recognition sites before cleaving DNA. *Biology and Chemistry*. 277: 4024-4033.
- Bickle T.A., Krüger D.H. (1993) «Biology of DNA restriction». *Microbiology Reviews*. 57 (2): 434-450.
- Bozic D., Grazulis S., Siksnys V., Huber R. (1996) Crystal structure of *Citrobacter freundii* restriction endonuclease *Cfr*IOI at 2.15 Å resolution. *Molecular Biology*. 255: 176-186.
- Bramhill D. (1997) Bacterial cell division. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 13: 395-424.
- Chandrasegaran S., Smith J. (1999) Chimeric restriction enzymes: what is next? *Biology and Chemistry*. 380: 841-848.
- Charachon S. (2013) (Relation hôte-bactéries) UE agent infectieux. Faculté de médecine Montpellier-Nîmes.
- Chevassus-au-Louis N. (1973) «ENZYMES DE RESTRICTION», *Encyclopædia Universalis*. URL: <http://www.universalis.fr/encyclopedie/enzymes-de-restriction/> (consulté: 6/5/2016).
- Colandene J.D., Topal M.D. (1998) The domain organization of NaeI endonuclease: separation of binding and catalysis. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*. 95: 3531-3536.
- David E., Edward M., Marcotte., Ionannis X., Todd O.Y. (2000) Protein function in the post-genomic era. *Nature*. 405: 823-826.
- Dryden S., Bickle T.A., Krüger D.H. (2001) «Biology of DNA restriction». *Microbiology Reviews*. 38 (2): 224-229.
- Embleton M.L., Siksnys V., Halford S.E. (2001) DNA cleavage reactions by type II restriction enzymes that require two copies of their recognition sites. *Molecular Biology*. 311: 503-514.

- Fredrickson J., Zachara J., Balkwill D. (2004) «Geomicrobiology of high level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington state». *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (7): 4230-4241.
- Gitai Z. (2005) «The new bacterial cell biology: moving parts and subcellular architecture». *Cell*. 120 (5): 577-586.
- Goodsell D.S. (2002) «The molecular perspective: restriction endonucleases». *Stem Cells* 20 (2): 190-191.
- Hahn M.W., Lunsdorf H., Wu Q., Schauer M., Hofle M.G., Boenigk J., Stadtler P. (2003) Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 1442-1451.
- Halford SE., Bilcock DT., Stanford NP., Williams SA., Milsom SE and Gormley NA. (1999) Restriction endonuclease reaction requiring two recognition sites. *Biochemical Society Transactions*. 27: 696-699.
- Herman A and Jeltsch A. (2003) Methylation sensitivity of restriction enzymes interacting with GATC sites. *Biotechniques*. 34: 924-930.
- Hsieh PC., Xiao JP., O'Loane D and Xu SY. (2000) Cloning, expression and purification of a thermostable nonhomodimeric restriction enzyme. *BsII*. *Bacteriology*. 182: 949-955.
- Janulaitis A., Petrusyte M., Maneliene Z., Klimasauskas S and Butkus V. (1992) Purification and properties of the *Eco571* restriction endonuclease and methylase-prototypes of a new class (type IV). *Nucleic Acids Research*. 20: 6043-6049.
- Kessler C and Manta V. (1990) «Specificity of restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases a review (Edition 3)». *Gene*. 92 (1-2): 248.
- Kim YG., Cha J and Chandrasegaran S. (1996) «Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to fokI cleavage domain». *Proceedings of the National Academy Sciences U.S.A.* 93 (3): 1156-1160.
- Kobayashi I. (2001) «Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution». *Nucleic Acids Research*. 29 (18): 3742-3756.

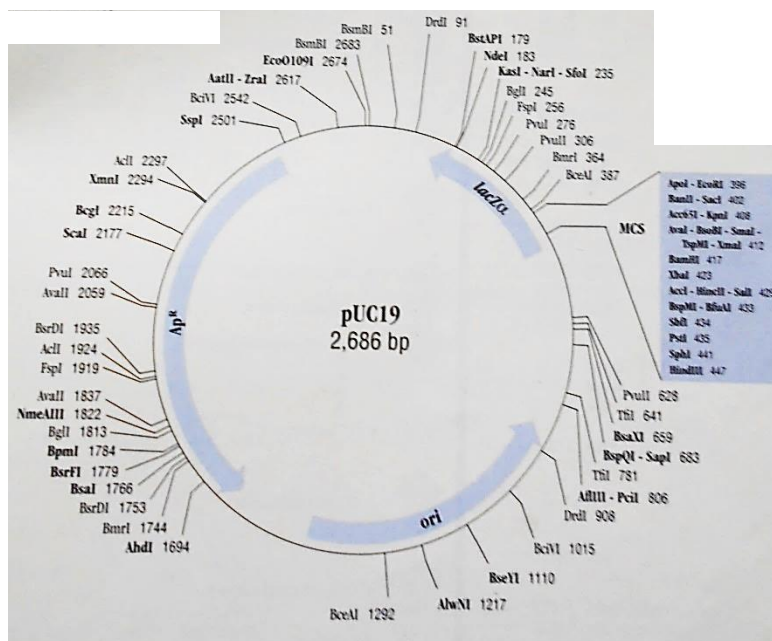
- Kong H. (1998) Analysing the function organization of a novel restriction modification system, the *BcgI* system. *Molecular Biology*. 279: 823-832.
- Kong H., Roemer SE., Waite-Rees PA., Benner JS., Wilson GG and Nwankwo DO. (1994) Characterization of *BcgI*, a new kind of restriction-modification system. *Biology and Chemotherapy*. 269: 683-690.
- Krüger DH and Bickle TA. (1983) «Bacteriophage survival: multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts». *Microbiology Reviews*. 47 (3): 345-360.
- Lin-Chao S., Chen WT and Wong TT. (1992). *Molecular Microbiology*. 6: 3385-3393.
- Marks P., McGeehan J., Wilson G., Errington N., Kneale G. (2003) Purification and characterisation of a novel DNA methyltransferase, *AhdI*. *Nucleic Acids Research*. 31: 2803-2810.
- Mücke M., Grelle G., Behlke J., Kraft R., Krüger D.H., Reuter M. (2002) *EcoRII*: a restriction enzyme evolving recombination functions. *The EMBO Journal*. 21: 5262-5268.
- Mücke M., Krüger D.H., Reuter M. (2003) Diversity of type II restriction endonucleases that require two DNA recognition sites. *Nucleic Acids Research*. 31: 6079-6084.
- New England Biolabs Catalog. (2007-2008). Catalog and technical reference.
- Nobbs T.J., Szczelkun M.D., Wentzell L.M., Halford S.E. (1998) DNA excision by the *SfiI* restriction endonuclease. *Molecular Biology*. 281: 419-432.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). (1999) Enzyme Nomenclature, Eur. *Biochemical*. 264: 610-650.
- Novick R.P. (1981) «Les Plasmides», in Pour la science. *Microbiology reviews* 10(2): 46-59.
- Othman S. (1971) «ARBER WERNER (1929-) », *Encyclopædia Universalis*. URL: <http://www.universalis.fr/encyclopedie/werner-arber/> (consulté: 6/5/2016).
- Pingoud A., Jeltsch A. (2001) «Structure and function of type II restriction endonucleases». *Nucleic Acids Research*. 29 (18): 3705-3727.
- Primrose S.B., Old R.W. (1994) Principles of gene manipulation an introduction to genetic engineering. Oxford: Blackwell Scientific. ISBN 0-623-03712-1.

- Rao D.N., Sistla S. (2004) «S-Adenosyl-L-methionine-dependent restriction enzymes». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 39 (1): 1-19.
- Reuter M., Schneider-Mergener J., Kuper D., Meisel A., Mackeldanz P., Krüger D.H. (1999) Regions of endonuclease *EcoRII* involved in DNA target recognition identified by membrane-bound peptide repertoires. *Biology and Chemistry*. 274: 5213-5221.
- Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. (2007) «REBASE-enzymes and genes for DNA restriction and modification». *Nucleic Acids Research*. 35: 269-270.
- Rodolphe B., Phillippe H. (2007) «CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes». *Science*. 315 (5819): 1709-1712.
- Russell D.W., Sambrook J. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory. ISBN0-87969-576-5.
- Samuelson J.C., Zhu Z., Xu S.Y. (2004) The isolation of strand-specific nicking endonucleases from a randomized *SapI* expression library. *Nucleic Acids Research*. 32: 3661-3671.
- Sanger F., Coulson A.R. (1978) «The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing». *FEBS Letters*. 87: 107-110.
- Sarah H., Christine M.R., Harvey W.B., Douglas S.C. (2012) *Escherichia coli* for biofuel production: bridging the gap from promise to practice. *Trends in biotechnology*. 30 (10): 538-545.
- Smith H.O., Nathan D. (1973) «Letter: A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes». *Molecular Biology*. 81 (3): 419-423.
- Sogin M.L., Morrison H.G., Huber J.A. (2006) «Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere"». *Proceedings of the National Academy Sciences U.S.A.* 103 (32): 12115-12120.
- Sutcliffe J.G. (1979) Cold Spring Harb Symp. *Quantitative Biology*. 43: 77-90.
- Stankevicius K., Lubys A., Timinskas A., Vaitkevicius D., Janulaitis A. (1998) Cloning and analysis of the four genes coding for *BpuI0I* restriction-modification enzymes. *Nucleic Acids Research*. 26: 1084-1091.

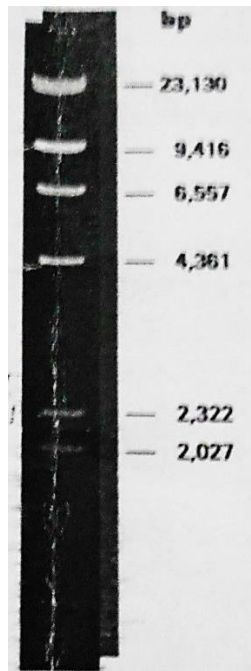
- Szybalski W., Kim S.C., Hasan N., Podhajaska A.J. (1991) Class-IIIS restriction enzymes a review. *Gene* 100: 13-26.
- Tovkach A., Zeevi V., Tzfira T. (2010) "Expression, purification and characterization of cloning-grade zinc finger nuclease". *Biotechnology* 151 (1): 1-8.
- Townsend J.A., Wright D.A., Winfrey R.J., Fu F., Maeder M.L., Joung J.K., Voytas D.F. (2009). "High frequency modification of plant genes using engineered zinc finger nucleases". *Nature* 459 (7245): 442-445.
- Université Pierre et Marie Curie (UPMC). (2003) Cours de bactériologie. 122.
- Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes M.C., Zhang H.S., Gregory P.D. (2010) "Genome editing with engineered zinc finger nucleases". *Nature Reviews Genetics*. 11 (9): 636-646.
- Vanamee E.S., Santagata S., Aggarwal A.K. (2001) *FokI* requires two specific DNA sites for cleavage. *Molecular Biology*. 309: 69-78.
- Vitkute J., Maneliene Z., Petrusyte M., Janulaitis A. (1997) *BpII*, a new *BcgI*-like restriction endonuclease, which recognizes a symmetric sequence. *Nucleic Acids Research*. 25: 4444-4446.
- Wash D.A., Bitinaite J., Schildkraut I., Aggarwal A.K. (1998) Structure of *FokI* has implications for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*. 95: 10564-10569.
- Zaremba M., Urbanke C., Halford S.E., Aggarwal A.K. (2004) Generation of the *BfiI* restriction endonuclease from the fusion of a DNA recognition domain to a non-specific nuclease from the phospholipase D superfamily. *Molecular Biology*. 336: 81-92.
- Zhu Z., Samuelson J.C., Zhou J., Dore A., Xu S.Y. (2004) Engineering strand-specific DNA nicking enzymes from the type IIS restriction endonucleases *BsaI*, *BsmBI* and *BsmAI*. *Molecular Biology*. 337: 573-583.



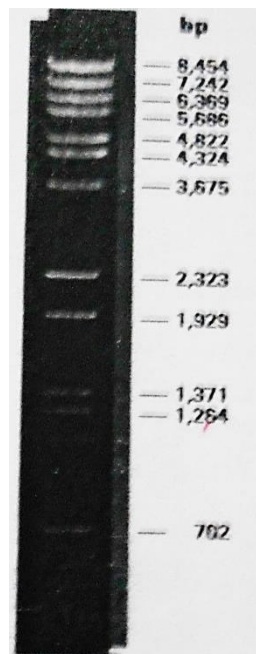
Annexe 3. Carte de restriction du plasmide pBR322 (New England Biolabs Catalog 2007-2008).



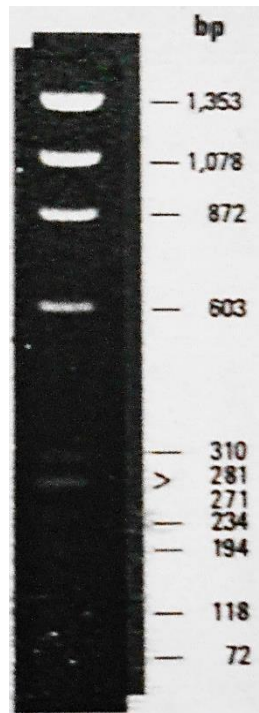
Annexe 4. Carte de restriction du plasmide pUC19 (New England Biolabs Catalog 2007-2008)



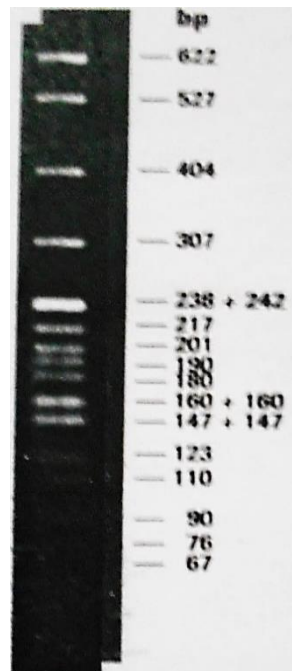
Annexe 5. Marqueur de poids moléculaire Lambda DNA-*Hind*III Digest visualisé par la coloration au bromure d'éthidium dans 1.0% agarose gel (New England Biolabs Catalog 2007-2008).



Annexe 6. Marqueur de poids moléculaire Lambda DNA-*Bst*EII Digest visualisé par la coloration au bromure d'éthidium dans 1.0% agarose gel (New England Biolabs Catalog 2007-2008).



Annexe 7. Marqueur de poids moléculaire ϕ X174 DNA-*Hae*III Digest visualisé par la coloration au bromure d'éthidium dans 1.7% agarose gel (New England Biolabs Catalog 2007-2008).



Annexe 8. Marqueur de poids moléculaire pBR322 DNA-*Msp*I Digest visualisé par la coloration au bromure d'éthidium dans 1.8% agarose gel (New England Biolabs Catalog 2007-2008).

