

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
ECOLE NORMALE SUPERIEURE
DEPARTEMENT DE Sciences biologiques



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
HIGHER TEACHER TRAINING COLLEGE
DEPARTMENT OF Biology

**Recherche et identification des enzymes de restitution
de bacteries isolees des echantillons collectes dans les
localites de Nkondengui et Omnisport de la ville de
Yaoundé**

Mémoire redige en vue de l'obtention du D.I.P.E.S II

Par :

NGO NKONDJOCK Carole Marguerite
Licenciee es Biochimie

Sous la direction
NKENFOU NGUEFEU Celine
Maitre de conferences



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

A

Mon fils NKONDJOCK MBELLA André Randy Loyal.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à « MolecularBiology Center » Yaoundé. Il me revient d'exprimer ma profonde gratitude à ceux de près ou de loin ayant contribué à la réalisation de ce travail.

J'adresse mes plus grands et sincères remerciements au Directeur de ce mémoire, **Professeur NKENFOU Céline (MC)** et chargée de cours à l'École Normale Supérieure de Yaoundé Département des Sciences Biologiques. Je vous témoigne ma gratitude de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et m'avoir offert un encadrement de qualité scientifique. Votre esprit scientifique rigoureux, votre disponibilité, votre patience, et vos critiques pertinentes lors de la rédaction de mémoire m'ont été d'une aide précieuse.

Mes remerciements vont à l'endroit du Chef de Département des Sciences Biologiques de l'École Normale Supérieure de Yaoundé, **Professeur SONKE Bonaventure**. Pour la disponibilité que vous mettez et l'abnégation dont vous faites preuve dans l'encadrement de tout le personnel dudit Département y compris vos étudiants.

Je remercie les enseignants du Département des Sciences Biologiques de l'École Normale Supérieure de Yaoundé, pour les enseignements de qualité qu'ils donnent à leurs étudiants.

Ma gratitude va également à l'endroit de **Monsieur NOTEDJI Augustin** le technicien de laboratoire à « MolecularBiology Center » Yaoundé pour sa grande disponibilité, sa gentillesse, ses conseils et son expertise dans le domaine qui m'ont aidé dans les manipulations et dans la progression dudit domaine.

À mon père **BILONG Victor** pour la contribution à mon éducation et au soutien moral.

À ma mère **NGO NKONDJOCK Béatrice** pour son soutien moral.

À ma tante **Mme PAGBE Marie Chantal** pour sa grande contribution à mon éducation et de son soutien moral.

À mon bien aimé **MBELLA Jean Daniel** pour son soutien inconditionnel et démesuré et de ses nombreux conseils.

À mes camarades de promotion, en particulier **PEGBA Sabine** pour la coopération, les échanges scientifiques et l'enthousiasme qui a régné tout au long de notre formation.

À mes sœurs **Grace, Fanny, Marcine et Reine** pour leur soutien moral.

À **NGENTCHOUE Marie** pour son soutien et son aide dans l'encadrement de l'enfant.

À toute la famille **NKONDJOCK** pour leur soutien moral et spirituel.

À ma grand-mère **Mme veuve NKONDJOCK Marguerite** pour ses nombreux conseils.

À tous ceux qui n'ont pas été mentionnés et qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail.

TABLE DE MATIÈRES

DÉDICACE.....	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DE MATIÈRES.....	iv
ABSTRACT	vii
RESUME.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I :REVUE DE LITTÉRATURE	3
I.1- HISTORIQUE SUR LES BACTÉRIES	4
I.2- ANATOMIE FONCTIONNELLE DES BACTÉRIES	4
I.3- QUELQUES ÉLÉMENTS OBLIGATOIRES DE LA BACTÉRIE	5
<i>I.3.1- Enveloppe bactérienne.....</i>	<i>5</i>
<i>I.3.2- Structures externes.....</i>	<i>6</i>
<i>I.3.3- Les structures internes</i>	<i>6</i>
I.4- MODE DE VIE DES BACTÉRIES	7
<i>I.4.1- Méthodes d'observation des bactéries</i>	<i>7</i>
<i>I.4.2- Observation macroscopique des colonies.....</i>	<i>7</i>
<i>I.4.3- Observation microscopique</i>	<i>8</i>
<i>I.4.4- Classification bactérienne en fonction de leur forme</i>	<i>10</i>
I.4.5- Classification des bactéries	10
<i>I.4.6- Particularités de la bactérie</i>	<i>16</i>
I.5- LES BACTÉRIOPHAGES	16
I.6- IMPORTANCE DES BACTÉRIES	16
I.7- ENZYMES DE RESTRICTION	17
<i>I.7.1- Découverte</i>	<i>17</i>
<i>I.7.2- Caractéristiques des enzymes de restriction.....</i>	<i>18</i>
<i>I.7.2.1- Nomenclature des enzymes de restriction</i>	<i>18</i>
<i>I.7.2.2- Réaction générale.....</i>	<i>19</i>

1.7.2.4- Sites de restriction	20
1.7.2.5- Types de coupures	21
1.7.3- Quelques enzymes de restriction et leur site de coupure	21
1.7.4- Utilisation des enzymes de restriction	22
1.7.5- Notion de vecteurs	22
I.8- SÉPARATION DES FRAGMENTS D'ADN PAR ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE	22
1.8.1- Électrophorèse en gel	22
1.8.2- Analyse électrophorétique des fragments de restriction.....	23
1.8.3- Visualisation des fragments de l'ADN.....	23
CHAPITRE II :MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	24
II.1- MATÉRIEL	25
II.1.1- Matériel biologique :	25
II.1.2- Matériel de laboratoire	25
II.1.3- Réactifs :	26
II.1.4- Sites d'échantillonnage :	26
II.2- MÉTHODES	27
II.2.1- Collecte des échantillons.....	27
II.2.2- Préparation des tampons.....	27
II.2.3- Préparation des milieux de culture.....	27
II.2.4- Isolation des colonies de bactéries sur le milieu solide	28
II.2.5- Culture des bactéries dans le milieu liquide	29
II.2.6- Préparation de l'extrait brut	29
II.2.7- Réaction de digestion avec l'extrait brut.....	29
II.2.8- Électrophorèse sur gel d'agarose	30
II.2.9- Purification.....	31
II.2.10- Réaction d'optimisation.....	31
II.2.11- Réaction de mapping et de double digestion.....	31
CHAPITRE III :RÉSULTATS ET DISCUSSION	32
III.1- RESULTATS	33
III.1.1- Ensemencement des bactéries	33
III.1.2- Colonies des bactéries isolées.....	33
III.1.3- Identification d'enzymes de restriction	34
III.1.3.1-Activités détectables.....	34

<i>III.1.3.2- Activités non identifiables</i>	45
<i>III.1.3.3- Profils des activités non identifiables de C5 et C19</i>	45
III.2- DISCUSSION	45
CHAPITRE IV :INTÉRÊT DIDACTIQUE.....	50
IV.1- QUELQUES DÉFINITIONS.....	51
<i>IV.1.1- Objectif pédagogique opérationnel (OPO) de la leçon</i>	52
<i>IV.1.2- Objectifs pédagogiques intermédiaires ou spécifiques</i>	52
IV.2- INTÉRÊT DIDACTIQUE	52
IV.3- PRÉPARATION D'UNE LEÇON	52
<i>IV.3.1- Modèle de fiche de préparation d'une leçon</i>	52
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	59
BIBLIOGRAPHIE	61
ANNEXE	64

ABSTRACT

Restriction enzymes are molecules produced by bacteria and play defense role against infection by bacteriophages. These enzymes are able to digest DNA after the recognition of a nucleotide sequence. These are the tools used in the field of biotechnology to manipulate DNA. This work aimed at searching and identifying restriction enzymes of type II of bacteria from samples collected in the neighbor hoods of Nkondengui and Omnisport in the city of Yaoundé.

Mud and dirty water samples were taken in a swamp of district Nkondengui. Earth and dust samples were collected respectively around an abandoned house and in carpentry and a sample of decomposing leaves in a field in a headquarters Omnisport. These samples were introduced in eppendorf tubes labeled, transported to the laboratory and stored in the freezer.

The culture of bacteria was done on solid medium from which macroscopic observation of the colonies was made. This observation allowed to distinguish colonies based on the size, the color and the growth speed. Then distinct colonies of bacteria were grown in liquid medium and subjected to lysis then to centrifugation. The extracts obtained after centrifugation were tested on λ DNA and DNA T7. Then these extracts were subjected to heparin sepharose to get a peak of digestion which was used either for optimization, or complete digestion reaction.

Based on the culture on solid medium, 25 bacterial colonies were isolated. Among these, 6 have exhibited after tests on DNA, digestion activities (restriction enzymes). While 19 did not present any activity after electrophoretic analyses. Digestion profiles were compared with those already known in the literature and have been identified as isoschizomere of the prototypes:

AflIII; AsuI; HaeIII; BstBI; PstI and SnaBI. These enzymes recognize specific nucleotide sequences and cleave DNA at specific position and therefore easily digest DNA and can be used in biotechnology.

Keyword (s): restriction enzyme, bacteria, bacteriophage, isoschizomere, biotechnology

RESUME

Les enzymes de restriction sont les molécules produites par les bactéries et constituent pour elles un mécanisme de défense contre les infections par les bactériophages. Ces enzymes ont pour rôle de digérer l'ADN en fonction des séquences nucléotidiques reconnues. Ce sont les outils utilisés dans le domaine des biotechnologies et pour manipuler l'ADN. Le présent travail a permis de rechercher et d'identifier les enzymes de restriction de type II des bactéries des échantillons collectés dans les quartiers Nkondengui et Omnisport de la ville de Yaoundé.

Les échantillons de boue et d'eau sale ont été prélevés dans un marécage du quartier Nkondengui, Les échantillons de Terre et de sciure ont été prélevés respectivement aux alentours d'une maison abandonnée et dans une menuiserie et l'échantillon de feuilles mortes en décomposition dans un champ au quartier Omnisport. Ces échantillons ont été introduits dans les tubes eppendorf étiquetés, acheminés au laboratoire et conservés au congélateur.

La culture des bactéries s'est faite sur milieu solide coulée dans les boites de pétrie et a ensuite servi à l'observation macroscopique des colonies. Cette observation a permis de distinguer les colonies en fonction de la taille, de la couleur et de la vitesse de la poussée. Ensuite les colonies de bactéries ont été cultivées dans le milieu liquide et à la lyse puis à la centrifugation. Les extraits obtenus après centrifugation ont été testés sur les ADN λ et ADN T7. Puis ces extraits ont été soumis à l'héparine sépharose pour obtenir un pic de digestion qui a été utilisé soit pour la réaction d'optimisation, ou de digestion complète.

Au niveau de la culture en milieu solide, 25 colonies bactériennes différentes ont été identifiées. Parmi ces isolats, 6 ont présentés après les tests sur les ADN les activités de digestion des enzymes de restriction. Tandis que 19 n'ont pas présentés d'activités décelables après une analyse électrophorétique. Les profils de restriction obtenus des 6 isolats actifs ont été comparés à ceux déjà connus dans la littérature et ont été identifiés comme isoschizomère des enzymes suivantes :

AflIII ; AsuI ; HaeIII ; BstBI ; PstI et SnaBI. Ces enzymes présentent des séquences nucléotidiques de reconnaissance et des coupures et par conséquent digèrent facilement l'ADN et peuvent être utilisés en biotechnologie.

Mots clés : enzymes de restriction, bactéries, bactériophages, isoschizomère, biotechnologie

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ARN	:	Acide ribonucléique
BSA	:	Bovine SerumAlbumin
DTT	:	Dithiothréitol
EDTA	:	Ethylène Diamine tétra acétate
HCL	:	Chlorure d'Hydrogène
NaCl	:	Chlorure de Sodium
M	:	Molaire
MgCl₂	:	Dichlorure de Magnésium
min	:	Minute
ml	:	Millilitre
TBE	:	Tris Borate EDTA
TBE BrEt	:	Tris Borate EDTA Bromure d'Ethidium
UV	:	Ultra Violet
µl	:	Microlitre
fig	:	Figure
Pb	:	paire de bases

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Structure d'une cellule bactérienne (Deleuil., 2012)</i>	5
Figure 2 : <i>Colonies de bactéries (Favet, 2014)</i>	8
Figure 3 : <i>Différentes méthodes observation macroscopique des microorganismes (Tournier, 2014)</i>	8
Figure 4 : <i>Les différentes formes des bactéries (Dalia, 2013)</i>	10
Figure 5 : <i>Schéma réactionnel d'une enzyme de restriction (Raisonnier, 2006)</i>	19
Figure 6 : <i>l'enzyme Eco RI reconnaît un site de 6 paires de bases : GAATTC et coupe entre G et A (Bonnet., 2007).</i>	20
Figure 7 : <i>Les différentes coupures par action de quelques enzymes de restriction de type II. (Smith et Nathans, 1973)</i>	21
Figure 8 : <i>Boîtes de pétrie contenant le milieu solide (Ngo nkondjock, 2015)</i>	28
Figure 9 : <i> Tubes à essais contenant le milieu liquide (Ngo nkondjock, 2015)</i>	28
Figure 10 : <i> Observation macroscopique des colonies (Ngo nkondjock, 2015)</i>	33
Figure 11 : <i> Les stries réalisées dans une boîte de pétrie (Ngo nkondjock, 2015)</i>	33
Figure 12 : <i>Électrophorégramme de la digestion par l'extrait brut C7 des ADN λ et ADN T7 ..</i>	35
Figure 13 : <i>Électrophorégramme de la réaction de digestion de l'ADN λ par les fractions purifiées de C7 à l'Héparine Sépharose.</i>	35
Figure 14: <i>Électrophorégramme de digestion par l'ADN λ et de digestion complète sur les ADN T7, pBR322, ΦX174, pUC19 et M13mp19</i>	36
Figure 15 : <i>Électrophorégramme de la digestion par l'extrait brut C13 des ADN λ et ADN T7.</i>	36
Figure 16 : <i>Électrophorégramme de la réaction de digestion de l'ADN λ par les fractions purifiées de C13 à l'Héparine sépharose.</i>	37
Figure 17 : <i>Électrophorégramme de la réaction de digestion par l'ADN λ et de digestion complète sur les ADN T7, pBR322, ΦX174, pUC19 et M13mp19</i>	37
Figure 18 : <i>Électrophorégramme de la réaction de double digestion par l'ADN λ avec le pic d'éluion de C13 et l'enzyme commerciale AsuI.</i>	38
Figure 19: <i>Électrophorégramme de la digestion par l'extrait brut C16 des ADN λ et ADN T7....</i>	38

Figure 20 : Électrophorégramme de la réaction de digestion de l'ADN λ par les fractions purifiées de C16 à l'héparine sépharose.	39
Figure 21 : Électrophorégramme de la réaction digestion par l'ADN λ et de digestion complète sur les ADN T7, pBR322, Φ X174, pUC19, et M13mp19.	39
Figure 22: Électrophorégramme de la digestion de l'extrait brut C17 par les ADN λ et ADN T7.	40
Figure. 23 : Électrophorégramme de digestion de l'ADN λ par les fractions purifiées de C17 à l'héparine sépharose.	40
Figure 24 : Électrophorégramme de la réaction de digestion par l'ADN λ et de digestion complète sur les ADN T7, pBR322, Φ X174, pUC19 et M13mp19	41
Figure 25 : Électrophorégramme de digestion par l'extrait brut C21 des ADN λ et ADN T7.....	41
Figure 26 : Électrophorégramme de digestion de l'ADN λ par les fractions purifiées de C21 à l'Héparine sépharose.....	42
Figure 27 : Électrophorégramme de double digestion par l'ADN λ avec le pic d'éluion de l'extrait C21 et de l'enzyme commerciale Pst I.	42
Figure 28 : Électrophorégramme de la digestion de l'extrait brut C24 par les ADN λ et ADN T7.	43
Figure 29 : Électrophorégramme de la réaction de digestion de l'ADN λ par les fractions purifiées de C24 à l'héparine sépharose.	43
Figure 30 : Électrophorégramme de la réaction de digestion de l'ADN λ et de digestion complète sur les ADN T7, pBR322, Φ X174, pUC19, et M13mp19.....	44
Figure 31 : Électrophorégramme de la réaction de double digestion de C24 sur l'ADN λ et l'enzyme commerciale SnaB I.....	44
Figure 32 : Électrophorégrammes présentant des activités non détectables des extraits C5 et C19.....	45

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des bactéries en fonction du genre, espèce habitant et pouvoir pathogène. (Decoster, 2013)	11
Tableau 2 : Observation macroscopique des colonies en fonction de la couleur, taille et la poussée	34
Tableau 3 : Récapitulatif des colonies qui ont produit les enzymes, les sources et la séquence de reconnaissance.....	49

INTRODUCTION

Grâce à l'avènement de la biotechnologie moderne qui est l'utilisation industrielle d'organismes vivants, et à l'une de ses applications qui est le génie génétique, les gènes du matériel héréditaire ont été isolés et analysés ainsi que les informations contenus dans ces gènes (Saylor *et al.*, 1997). Le génie génétique permet aussi d'avoir l'échange de gènes entre différentes espèces, par exemple le gène d'une bactérie peut être transféré dans une plante. Ceci s'effectue par la méthode de « coupe- insertion ». Dès lors, les molécules particulières spécialisées appelées enzymes de restriction serviront à couper ou à exciser un gène particulier de l'ADN d'un organisme.

La découverte d'enzymes de restriction a constitué une avancée décisive dans la manipulation des gènes (Watson *et al.*, 1992). Ces enzymes de restriction sont produites des bactéries et les bactéries ont été les premiers organismes utilisés pour cloner les gènes. De plus, elles possèdent les plasmides (petites molécules d'ADN circulaire autonome) qui peuvent être coupés par une enzyme de restriction au niveau d'un site spécifique pour l'insertion d'un gène étranger. L'utilisation d'enzymes de restriction ouvre la voie du clonage des gènes et de leur séquençage. Ceci dit, la recherche d'enzymes de restriction demeure une activité permanente.

Dans le cadre de notre travail, nous avons recherché des enzymes de restriction de bactéries isolées dans différents échantillons collectés dans les quartiers Nkondengui et Omnisport de la ville de Yaoundé. Et pour y parvenir, il s'agira spécifiquement de :

- Isoler et cultiver les bactéries contenues dans les échantillons collectés.
- Rechercher puis identifier l'activité enzymatique de ces bactéries.
- Déterminer les séquences de reconnaissance et sites de coupure de ces enzymes.

Ce travail est donc présenté en quatre chapitres ; et dont le premier est organisé dans la revue de la littérature, le deuxième concerne les matériels et méthodes, le troisième s'articule au niveau des résultats et discussions et le quatrième concerne l'intérêt didactique. Tout ceci assorti d'une fiche pédagogique de préparation de la leçon.

CHAPITRE I :
REVUE DE LITTÉRATURE

I.1- HISTORIQUE SUR LES BACTÉRIES

Le monde vivant a été divisé en trois domaines sur la base des travaux de phylogénie moléculaire réalisés par Carl Woese et collaborateurs. Ces domaines sont les Eubactéries, les Archaeobactéries et les Eucaryotes (**Woese et al., 1990**).

Les Archaeobactéries et les Eubactéries forment les procaryotes, qui sont des organismes vivants unicellulaires de petite taille et en général caractérisés par une absence de membrane et même du noyau. Les Archaeobactéries se distinguent des Eubactéries par l'absence d'acide muramique² dans leur paroi cellulaire (**Kandler et König, 1993**).

Les Eucaryotes sont des organismes vivants plus complexes que les procaryotes. Les principales caractéristiques qui permettent de distinguer les Eucaryotes des procaryotes sont: la présence d'un noyau renfermant l'information génétique, la présence d'organites intracellulaires pourvus de membranes (les mitochondries, les chloroplastes, les appareils de Golgi, le réticulum endoplasmique) et la présence d'un cytosquelette.

La topographie de l'arbre phylogénétique universel révèle donc que ces trois domaines tirent leur origine d'un ancêtre commun à partir duquel ils auraient divergé. Ce dernier ancêtre commun généralement désigné Luca a fait l'objet de plusieurs études (**Forterre et al., 2005**).

Le domaine des Eubactéries est très diversifié et regroupe les bactéries très variées quant à leur morphologie, leur distribution dans l'environnement, leurs niches, leurs besoins nutritifs et leur métabolisme. Citons, les protéobactéries, les bactéries Gram-positif, les cyanobactéries, les spirochètes, etc. Les protéobactéries constituent le phylum le plus important. On y retrouve les bactéries de très grande importance des points de vue économique, médical, scientifique et environnemental connues à ce jour. Parmi les Protéobactéries, nous avons chez les humains, *Escherichia coli*, responsable de gastro-entérites, *Vibrio*, responsable du cholera ; *Salmonella*, responsable de gastro-entérite, de fièvres typhoïdes et d'intoxications alimentaires (**Kerster et al., 2006**).

I.2- ANATOMIE FONCTIONNELLE DES BACTÉRIES

Les bactéries sont des êtres vivants unicellulaires de petite taille (généralement 1 micron de diamètre et quelques microns de longueur). Elles ne sont donc visibles qu'au microscope optique ($\times 10^3$) ou au microscope électronique ($\times 10^6$) (**Marty, 2001**). Ce sont des cellules procaryotes (dépourvues d'un véritable noyau) car absence de membrane nucléaire,

chromosome unique en général. Le schéma ci-dessous (figure.1) met en évidence la structure d'une cellule bactérienne ainsi que ses différentes parties.

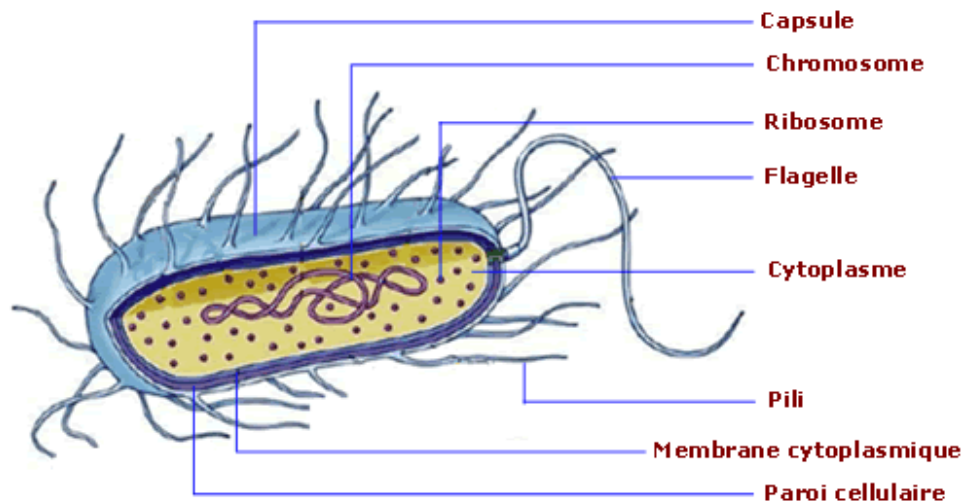


Figure 1 : Structure d'une cellule bactérienne(Deleuil., 2012)

I.3- QUELQUES ÉLÉMENTS OBLIGATOIRES DE LA BACTÉRIE

I.3.1- Enveloppe bactérienne

- La membrane cytoplasmique

Elle sert de barrière physique entre l'environnement extérieur et le cytoplasme de la bactérie. Elle est donc le siège d'échange avec cet environnement (sortie des déchets ou des productions bactériennes). Elle a également un rôle dans la fixation et la mobilité des flagelles.

- La paroi bactérienne (membrane externe)

La paroi confère à la bactérie sa morphologie véritable. Sans paroi, les bactéries prennent une forme sphérique appelée *protoplaste*, s'il s'agit d'une bactérie à Gram positif, ou *sphéroplastes* 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 à pression osmotique équitable.

Elle joue un rôle déterminant dans la coloration de Gram.

Elle est le support de l'action de certains enzymes exogènes (lysozyme) ou endogènes (Charachon, 2013).

- La capsule

La capsule est une structure qui n'est présente que chez certaines bactéries. Elle est habituellement de nature polysaccharidique, quoique dans le cas de *Bacillus anthracis*(le

bacille du charbon) elle consiste en un polypeptide de l'acide D-glutamique (**Charachon, 2013**).

La capsule joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de certaines espèces bactériennes (*Streptococcus, Haemophilus influenzae*), par son rôle protecteur contre la phagocytose.

I.3.2- Structures externes

I.3.2.1- les flagelles et les cils

Les cils et les flagelles, sont des structures instables chez les bactéries. Ce sont des appendices filamenteux, composés entièrement de protéines, de 6 à 15 µm de long sur 12 à 30 nanomètres d'épaisseur. Les protéines flagellaires sont appelées **flagellines**. Ils constituent les organes de locomotion pour les bactéries qui en possèdent.

I.3.2.2- les pilis

Ce sont aussi des filaments, beaucoup plus courts que les flagelles. Ils permettent aux bactéries de mieux adhérer à certaines surfaces ou tissus cellulaires.

I.3.3- Les structures internes

1.3.3.1- Le cytoplasme

La structure du cytoplasme bactérien est beaucoup plus simple que celle du cytoplasme des cellules eucaryotes. Il est particulièrement riche en ARN messager et ARN de transfert et surtout en ARN ribosomal.

1.3.3.2- Appareil nucléaire des bactéries

Les bactéries possèdent un appareil nucléaire constitué d'acide désoxyribonucléique (ADN).

L'ADN chromosomique est constitué d'une double hélice d'ADN circulaire. Déplié, le chromosome bactérien a près de 1 mm de long (1000 fois la longueur de la bactérie) et 3 à 5 nanomètres de large. L'analyse chimique de l'appareil nucléaire indique qu'il est composé à 80% d'ADN (le chromosome), à 10 % ARN et à 10 % de protéines (**Pierre et Marie Curie, 2003**).

1.3.3.3- les plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaire, circulaires et cytoplasmiques, de petite taille (5 à 4000 fois plus petit que le chromosome), se répliquant d'une manière autonome et non indispensables au métabolisme normal de cellule-hôte. (**Pierre et Marie Curie, 2003**).

Les gènes portés par les plasmides peuvent coder pour la synthèse de protéines qui confèrent des propriétés biologiques diverses :

- résistance aux antibiotiques (bêta-lactamines, aminosides, cyclines,) chez les bactéries à Gram positif ou négatif ;
- résistance aux antiseptiques mercuriels, aux métaux lourds (antimoine, argent, bismuth...);
- résistance aux bactériophages.

Les plasmides permettent ainsi aux bactéries de s'adapter à un environnement hostile.

La virulence des bactéries peut aussi être à médiation plasmique (pouvoir pathogène des colibacilles entéro-pathogènes).

I.4- MODE DE VIE DES BACTÉRIES

Les bactéries vivent en colonies. Chaque cellule doit tirer de son environnement les éléments nutritifs nécessaires et synthétiser les molécules pour sa croissance ou se diviser. Toutes ces opérations sont contrôlées par leur génome et impliquent plusieurs gènes (**Favet, 2014**).

Plus le génome est important, plus la bactérie a de possibilités et donc de chances de survivre. De plus, elles accumulent les gènes utiles. Par contre, les bactéries parasites perdent des gènes.

Quelques bactéries vivent mieux dans un environnement frais comme le sol ou un étang tandis que d'autres peuvent vivre dans des endroits chauds comme près de volcan sous-marin.

I.4.1- Méthodes d'observation des bactéries

En bactériologie, l'observation macroscopique des microorganismes peut se faire lorsqu'ils sont regroupés en colonies sur milieu solide, visible à l'œil nu.

I.4.2- Observation macroscopique des colonies

C'est l'étude de l'aspect des colonies. Une colonie est l'amas, visible à l'œil nu, constitué par des milliards de descendants d'une seule cellule bactérienne et dont la taille, la forme, la couleur, la consistance sont caractéristiques de chaque espèce (**Tournier, 2014**).

L'étude de l'aspect des colonies nécessite l'observation à l'œil nu, en lumière naturelle et artificielle, par éclairage direct et par transparence des colonies. Les bactéries vivent sous la forme des colonies comme présenté dans la figure 2 ci-dessous :

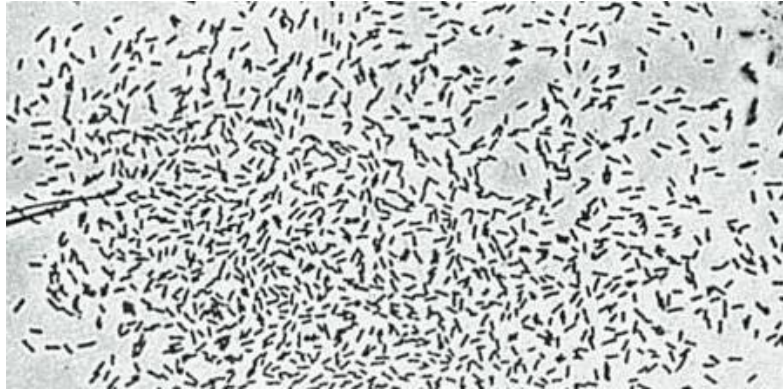


Figure 2 : Colonies de bactéries (Favet, 2014)

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, de la durée et de la température de l'incubation.

Les colonies de bactéries peuvent être observées par transparence, réflexion ou transillumination oblique, selon la figure 3 ci-dessous :

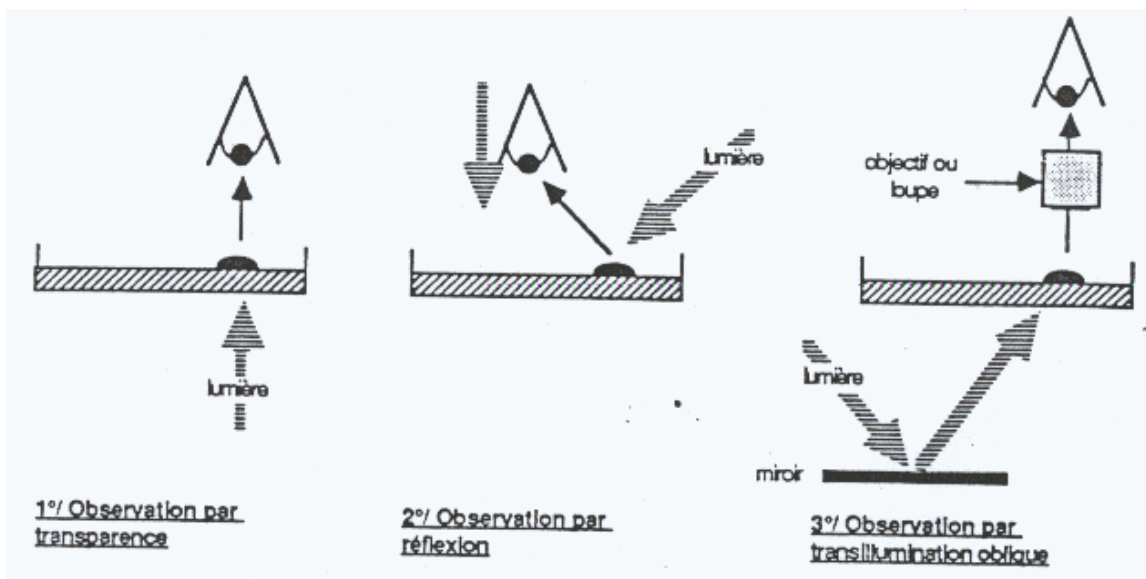


Figure 3 : Différentes méthodes d'observation macroscopique des microorganismes (Tournier, 2014)

1.4.3- Observation microscopique

L'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce microbienne. (Tournier, 2014).

Elle comprend l'examen à l'état frais (examen entre lame et lamelle des bactéries vivantes).

L'examen à l'état frais permet d'observer sur les cellules vivantes:

La forme des cellules

Ce caractère peut à lui seul conduire à la détermination de genre mais on doit l'utiliser avec une extrême prudence. C'est ainsi qu'on différencie des germes ayant :

- Une forme sphérique : les cocci (ordre de Micrococcales)
- Une forme allongée en bâtonnet : les bacilles (ordre des Bactériales)
- Une forme intermédiaire : les cocobacilles
- Une forme incurvée en virgule (vibrio) ou en ondulation (ordre des Spirillales)
- Une forme spiralée (ordre des Spirochaetales)
- Une forme ramifiée (ordre des Actinobactériales).

Mode de regroupement

L'étude des groupements retrouvés dans les cultures et qui sont liés au mode de division des germes vient compléter les données morphologiques et fournir de précieuses informations pour l'identification. Ainsi dans l'ordre des Micrococcales, les différents groupements observés sont caractéristiques d'un genre donné:

- groupement par deux en diplocoques: genre *Pneumococcus* pour les cocci Gram + genre *Neisseria* pour les cocci Gram-
- groupement en chaînettes: genres *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*
- groupement en tétrades : genre *Gaffkya*
- groupement en amas plan (grappe de raisin): genre *Staphylococcus*
- groupement en amas non plan: amas cubiques: genre *Sarcina* amas irréguliers : genre *Micrococcus*
- groupements en palissades ou en lettres (XVL) : genres *Corynebacterium* et *Cellulomonas*.

La mobilité

La mobilité est le caractère le plus important mis en évidence à l'état frais. On doit observer :

- la présence ou l'absence de mobilité
- les caractéristiques de cette mobilité (**Tournier, 2014**)

I.4.4- Classification bactérienne en fonction de leur forme

On distingue les bactéries selon leur forme : arrondie, (cocci), allongée (les bacilles), spiralée, (spirille) comme présenté dans la figure 4 ci-dessous :

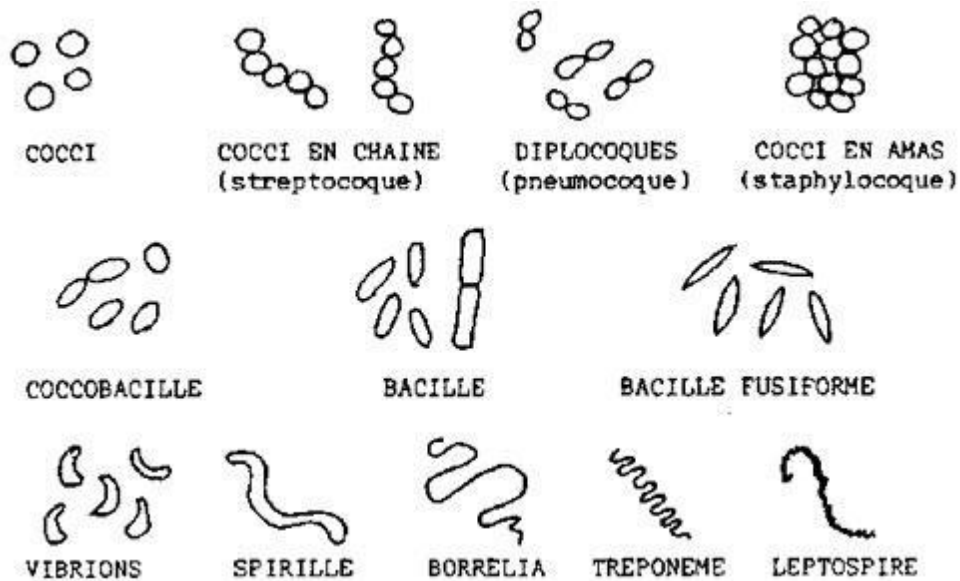


Figure 4 : Les différentes formes des bactéries (Dalia, 2013)

I.4.5- Classification des bactéries

La classification bactérienne de manière explicite présente les différentes formes bactériennes selon leur habitat, pouvoir pathogène, le genre et l'espèce comme présenté dans le tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1 : Classification des bactéries en fonction du genre, espèce habitat et pouvoir pathogène. (Decoster, 2013)

COQUES À GRAM POSITIF					
MORPHOLOGIE	GENRE	ESPÈCE	NOM COURANT	HABITAT	POUVOIR PATHOGÈNE
en amas	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i> <i>epidermidis</i> autres	Staphylocoque doré Staphylocoque blanc	ubiquitaire, peau, muqueuses	Suppurations
en chaînettes	<i>Streptococcus</i>	Groupe A, C, G, L... Agalactiae (groupe B) Groupe D	Strepto β hémolytique Strepto B non entérocoque	Pharynx Voies génitales	Streptococcies Synd. Post streptococcique Infections néonatales
en diplocoques	<i>Streptococcus</i>	<i>Pneumoniae</i>	Pneumocoque	Voies respiratoires	Otites, pneumonies, méningites
en courtes chaînes	<i>Enterococcus</i>	<i>Faecalis</i> <i>Faecium</i>	entérocoques	Intestin	Infections urinaires, digestives, endocardites...

COQUES À GRAM NÉGATIF					
MORPHOLOGIE	GENRE	ESPÈCE	NOM COURANT	HABITAT	POUVOIR PATHOGÈNE
en diplocoques	<i>Neisseria</i>	<i>Gonorrhoea</i> <i>Meningitidis</i>	Gonocoque méningocoque	Voies génitales Pharynx	Blénnorragie, MST Méningite cérébrospinale

BACILLES À GRAM POSITIF					
MORPHOLOGIE (taille)	GENRE	ESPÈCE	NOM COURANT	HABITAT	POUVOIR PATHOGÈNE
“petits”	<i>Listeria</i>	<i>Monocytogenes</i>		Ubiquitaire	Méningites Infections néonatales
	<i>Erysipelothryx</i>	<i>Rhusiopathiae</i>	Bacille du rouget du porc	Animaux	Lésions cutanées endocardites
	<i>Corynebacterium</i>	<i>Diphtheriae</i> Autres	Bacille de Loeffler Coryneformes	Gorge	Diphthérie, croup Infections respiratoires, cutanées, urinaires
“grands”	<i>Bacillus</i>	<i>Anthraxis</i> Autres	Bactéridie charbonneuse	Spores dans les sols, dans les végétaux, dans les fourrures	charbon rarement pathogènes

BACTÉRIES À GRAM NÉGATIF					
MORPHOLOGIE	GENRE	ESPÈCE	NOM COURANT	HABITAT	POUVOIR PATHOGÈNE
Coloration bipolaire	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	Colibacille	Intestin	Infect. Digestives, urinaires biliaires, méningées, pulm. infections néonatales Fièvre typhoïde, toxi- infections alimentaires
		<i>Citrobacter</i>			
		<i>Enterobacter</i>	Bacille de Friedländer		
		<i>Klebsiella</i>			
		<i>Samonella</i>	Bacille de Shiga		

		<i>Shigella</i> <i>Proteus</i>			Dysentérie Infections urinaires
Coccobacilles		<i>Brucella melitensis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Pasteurella pestis</i> <i>Bordetella pertussis</i> <i>Legionella pneumophila</i>		animaux gorge, pharynx, animaux rats, puces rhinopharynx eau	Fièvre de Malte, brucelloses otites, sinusites, méningites infections après morsures peste Coqueluche Infections respiratoires
Aérobies stricts	<i>Pseudomonaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Autres	Bacille pyocyannique	eaux, sols eaux, sols	Surinfections de plaies, ulcères, suppurations
Vibrions	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio cholerae</i> Vibrions autres <i>Campylobacter</i> <i>Helicobacter</i>	Bacille du choléra	eaux intestin estomac	Choléra Rarement pathogènes diarrhée ulcère gastro-duodéal

BACTÉRIES DE FORME SPIRALÉE

MORPHOLOGIE	GENRE	ESPÈCE	NOM COURANT	HABITAT	POUVOIR PATHOGÈNE
	<i>Treponema</i> <i>Leptospira</i> <i>Borrelia</i> <i>Spirillum</i>	<i>Pallidum</i> <i>Icterohémorragie</i> <i>Recurrentis</i> <i>Burgdorferi</i> <i>Minus</i>	Téponème	Homme Rats, eaux Poux, tiques tiques rat	Syphilis Leptospirose Fièvres récurrentes Maladie de Lyne sodoku

MYCOPLASMES

MORPHOLOGIE	GENRE	ESPÈCE	NOM COURANT	HABITAT	POUVOIR PATHOGÈNE
Sans paroi	<i>Mycoplasma</i>	<i>Pneumoniae</i> <i>Hominis</i> Autres			Infections respiratoires Infections génitales
	<i>Ureaplasma</i>	<i>Urealyticum</i>			Infections génitales

INTRACELLULAIRES

MORPHOLOGIE	GENRE	ESPÈCE	NOM COURANT	HABITAT	POUVOIR PATHOGÈNE
Très petite taille	<i>Chlamydia</i>	<i>Trachomatis</i> <i>psittaci</i> <i>pneumoniae</i>		Mouches, insectes perroquets, perruches	Trachome, MST Infections pulmonaires Infections respiratoires
	<i>Rickettsia</i>	(nombreuses espèces)		Poux, puces, tiques, acariens, aoûtats	Typhus Fièvres boutonneuses

MYCOBACTÉRIES

MORPHOLOGIE	GENRE	ESPÈCE	NOM COURANT	HABITAT	POUVOIR PATHOGÈNE
Bacilles alcool-acido résistants	<i>Mycobacterium</i>	<i>tuberculosis</i> <i>bovis</i> “atypiques” BCG	Bacilli de Koch (BK)	Homme Homme et animaux Environnement, homme	Tuberculose Tuberculose Infections (SIDA)
		<i>leprae</i>	Bacilli de Hansen	Vaccin Homme	Lèpre

BACTÉRIES ANAÉROBIES STRICTES

MORPHOLOGIE	GENRE	ESPÈCE	NOM COURANT	HABITAT	POUVOIR PATHOGÈNE
Coques à Gram positif	<i>Peptostreptococcus</i>				
Coques à Gram négatif	<i>Veillonella</i>				
Bacilles à Gram positif	<i>Clostridium</i>	<i>Tetani</i> <i>Perfringens</i> <i>botulinum</i>		Spores dans les sols Intestin et sols Aliments Intestin	Tétanos Gangrène gazeuse Botulisme Suppurations Suppurations Suppurations
Bacilles à Gram négatif	<i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i> <i>Actinomyces</i>				

I.4.6- Particularités de la bactérie

➤ **Les toxines**

Certaines bactéries sont capables de sécréter dans leur environnement des substances toxiques ce sont les exotoxines. Elles sont fabriquées en permanence, et constituent un facteur supplémentaire de virulence (toxine diphtérique, toxine botulique).

➤ **les spores**

Certaines bactéries gram + sont capables, lorsque les conditions extérieures sont très défavorables de prendre une forme dite sporulée. Il s'agit d'un état où la bactérie n'a plus d'activité, mais devient extrêmement résistante (à la chaleur, aux rayons ultra-violets, aux désinfectants...). Cet état peut durer de quelques semaines à quelques mois voire même les années.

Dès que les conditions deviennent favorable, elle reprend sa forme initiale et peut de nouveau se multiplier.

I.5- LES BACTÉRIOPHAGES

Les bactériophages sont des virus qui ont la particularité d'avoir pour hôtes des bactéries. Ils sont généralement identifiés par microscopie électronique. Ce sont les entités biologiques les plus abondantes de la biosphère. Les phages ont besoin d'une cellule bactérienne hôte pour se multiplier (**Pierre et Marie Curie, 2003**).

Certains phages vont systématiquement provoquer la lyse de la bactérie chez qui ils se sont multipliés, ce sont des **phages lytiques**.

Ils peuvent intégrer leur génome dans celui de la cellule hôte. Ce sont les **phages lysogènes**. Certains bactériophages lysogènes peuvent amener des gènes utiles pour la survie de la bactérie.

Chez les bactéries pathogènes, c'est souvent les phages qui apportent les gènes pour la production de toxines, exemple :

- La toxine cholérique (*Vibrio cholerae*) apportée par le phage CTX, (**Brigid, 2000**).
- La neurotoxine de *Clostridium botulinum* apportée par le phage CTX ϕ (**Dublanchet, 2009**).

I.6- IMPORTANCE DES BACTÉRIES

Les bactéries ont une grande importance des points de vue économique, environnemental et médical (**Gordon et al., 1973**). L'ordre des *Bacillales* renferme entre

autres des bactéries qui produisent les trois types de substances à grande valeur industrielle: les enzymes, les antibiotiques et les insecticides (**Parry et al. 1983**). Dans l'industrie des enzymes, les bactéries du genre *Bacillus* constituent la source majeure d'enzymes hydrolytiques utilisées surtout dans le domaine alimentaire et dans celui des détergents (**Parry et al. 1983**).

Dans le domaine médical et vétérinaire, plusieurs genres de différentes familles de l'ordre des *Bacilla* sont des pathogènes pour l'Homme et certains animaux. Chez les Hommes, *Listeria monocytogenes* est responsable de plusieurs pathologies telles que la gastroentérite, la méningite, la septicémie et l'avortement (**Doumithet al., 2004**). *Staphylococcus aureus* est responsable des infections nosocomiales, des intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées (**Klutmans et al., 1997**). Une souche de *S. aureus* résistante à la pénicilline est responsable des cas de septicémies graves à fort taux de mortalité (**Cosgrove et al., 2003**). Chez les animaux, *Paenibacillus larvae* est l'agent causal de la loque américaine, infection qui fait des ravages dans les ruches de par le monde (**Rieget al., 2010**). Chez les bovins et autres ruminants, *S. aureus* est la cause principale des mastites (**Herron et al. 2002**).

En agriculture, certains pesticides biologiques sont produits par des espèces du genre *Bacillus* telles que *B. thuringiensis*, *B. sphaericus* et *B. popilliae* (**Martin., 1994**). Il est pathogène chez les larves de plusieurs ordres d'insectes tels que les lépidoptères, les coléoptères, les diptères, etc.

En environnement, des études ont montré l'utilisation de *Geobacillus pallidus* en biorémédiation dans la lutte contre la pollution (**Bustard et al., 2002**).

En plus de la production d'antibiotiques et d'insecticides, certaines bactéries produisent les enzymes parmi lesquelles les enzymes de restriction.

I.7- ENZYMES DE RESTRICTION

I.7.1- Découverte

Le résultat d'une recherche scientifique menée en 1965 montra que les virus qui infectaient les bactéries n'arrivaient pas à répliquer leur matériel génétique (**Bordas. et al., 2002**). Car ces dernières possèdent un moyen de défense contre ces parasites. Ces bactéries découpent l'ADN viral en petits morceaux grâce à des ciseaux moléculaires appelés enzymes de restriction. Elles permettent de manipuler facilement l'ADN et les gènes qu'il contient. Elles ne coupent pas l'ADN n'importe où, elles reconnaissent une séquence de bases

spécifiques dans l'ADN et à chaque fois qu'elle la rencontre, elles coupent la molécule à cet endroit (site de restriction). Deux activités enzymatiques sont responsables de cette propriété de résistance aux intrusions d'ADN exogène :

- Une endonucléase spécifique de site de restriction clivant l'ADN double brin ;
- Une enzyme de modification ou méthylase qui reconnaît les mêmes sites que l'endonucléase dans le génome de la bactérie et les protège de l'hydrolyse par une méthylation (souvent sur une cytosine sur le carbone 5 ou une guanosine sur le carbone 6, et une adénosine sur le carbone 5).

Les enzymes de restriction sont donc les protéines particulières ayant la capacité de couper les molécules d'ADN au niveau de séquences spécifiques constituées de 4 à 8 paires de bases (les sites de restriction)(**Aquillare, 2008**).

1.7.2- Caractéristiques des enzymes de restriction

1.7.2.1- Nomenclature des enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des hydrolases c'est-à-dire qui provoquent et favorisent l'hydrolyse, et agissent sur des liaisons esters (des estérases).

Parmi les estérases on distingue celles qui hydrolysent un acide nucléique en fragments polynucléotidiques (endonucléases) et en particulier celles dont les produits gardent leur phosphate 5' initial (**Raisonnier, 2006**). Et les exonucléases qui n'attaquent la molécule d'acide nucléique qu'au niveau de ses extrémités.

En ce qui concerne les cofacteurs, les enzymes de restriction nécessitent la présence de l'ion Mg^{2+} dans le milieu, d'autres nécessitent le S- adénosyl méthionine.

Le nom de chaque enzyme est dérivé du nom d'espèce ou de variété de la bactérie qui la produit(**Raisonnier, 2006**). On écrit l'initiale du nom du genre, les deux initiales du nom de l'espèce, une lettre ou un nombre pour désigner la variété (ou souche) et après un espace, un chiffre romain pour désigner successivement les différentes enzymes de restriction obtenues à partir de la même souche.

Exemple : Nomenclature de BamH I(Watsonetal.,1992).

- **B** : première lettre du genre bactérien (*Bacillus*)
- **am** : lettres de l'espèce bactérienne (*amyloliquefaciens*)
- **H** : représente la souche bactérienne (H)
- **I** : première enzyme découverte chez cette bactérie.

1.7.2.2- Réaction générale

La réaction générale catalysée par les enzymes de restriction implique la présence dans le milieu réactionnel des facteurs suivants :

- Enzyme
- Substrat : ADN double brin non digéré
- Tampon
- Cofacteurs

En général, seul le Mg^{2+} est indispensable. Quelques endonucléases font appel à d'autres cofacteurs.

Les enzymes de méthylation ont pour coenzyme la S-Adénosyl-Méthionine (S-Ado-Met).

Des facteurs physiques contrôlent aussi ces réactions : pH, force ionique, l'énergie libre dégagée par l'hydrolyse pour éviter que la réaction ne soit pratiquement pas réversible dans les conditions habituelles (**Raisonnier, 2006**).

Le schéma réactionnel d'une enzyme de restriction se présente comme suit dans la figure 5 :

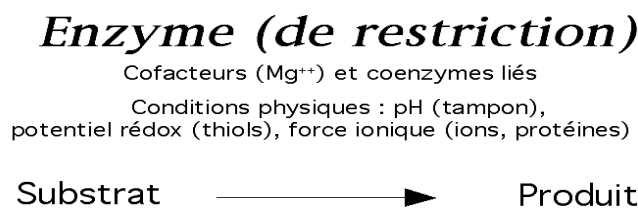


Figure 5 : Schéma réactionnel d'une enzyme de restriction (**Raisonnier, 2006**)

1.7.2.3- Classification des enzymes de restriction

Les endonucléases produites naturellement sont catégorisées en cinq groupes (Types I, II III, IV et V) sur la base du besoin en cofacteur, la nature de la séquence cible, la position et le site de coupure de la séquence de l'ADN cible.

- Les enzymes de restriction de type I

Les enzymes de restriction de type I étaient les premières à être identifiées dans deux souches différentes (K-12 et B) d'*Escherichia coli*. Ces enzymes coupent l'ADN au hasard et à une distance très éloigné (au moins à 1000 pb) de leur site de reconnaissance. Ces enzymes sont multifonctionnelles et sont capables à la fois d'activités de modification et restriction (**Arber et Linn, 1969**). Pour leurs différentes activités, elles nécessitent comme

cofacteurs du S-Adenosyl méthionine qui permet d'hydrolyser l'ATP ainsi que les ions magnésium (Mg^{2+}).

- **Les enzymes de restriction de type II**

Les enzymes de type II diffèrent des enzymes de type I sur plusieurs points : d'abord, elles forment les homodimères avec leurs sites de reconnaissance qui sont d'habitude divisés en palindrome d'une longueur de 4 à 8 nucléotides. Elles reconnaissent et coupent l'ADN au niveau du même site. Elles n'utilisent pas l'ATP ni le S-Adenosyl méthionine comme cofacteurs. Pour leur activité elles utilisent généralement les ions magnésium (Mg^{2+}) comme cofacteur. Ce sont les enzymes disponibles et très communément utilisées (**Roberts, 1976**).

- **Les enzymes de restriction de type III**

Les enzymes de restriction de type III tout comme celles de 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**).

- **Les enzymes de restriction de type IV**

Les enzymes de restriction de type IV reconnaissent et coupent un ADN modifié. Cet ADN modifié peut être méthylé, hydroxyméthylé et glucosyl-hydroxyméthylé.

- **Les enzymes de restriction de type V**

Les enzymes de restriction de type V 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 et Philippe, 2007**).

I.7.2.4- Sites de restriction

Le site de reconnaissance est une séquence la plupart du temps **palindromique** pour les enzymes de type II, c'est à dire qui possède un centre de symétrie. Chaque brin lu de 5' vers 3' est identique à son brin complémentaire inversé.

Le site de restriction de l'enzyme *EcoRI* est un exemple de palindrome comme présenté dans la figure 6 ci-dessous :

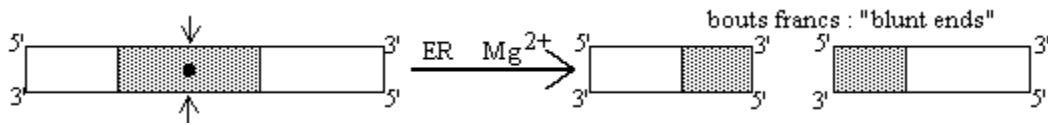


Figure 6 : l'enzyme *EcoRI* reconnaît un site de 6 paires de bases : GAATTC et coupe entre G et A (**Bonnet., 2007**).

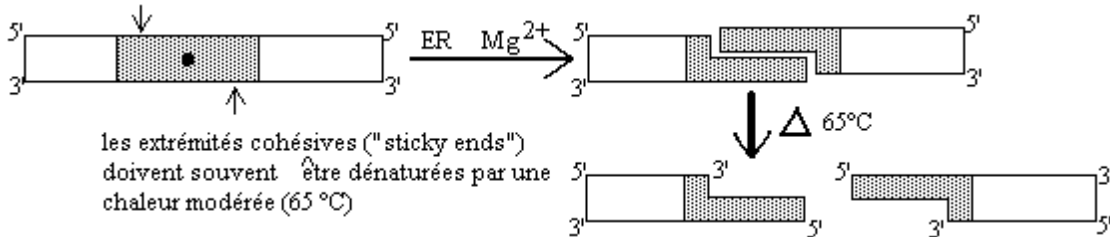
I.7.2.5- Types de coupures

On distingue deux types de coupures :

- Les hydrolyses qui génèrent des extrémités dites à **bouts francs** ("blunt ends"),



- Les hydrolyses qui génèrent des extrémités dites à **bouts collants** ou **décalés** ("sticky or protruding ends"),



Légende :

ER= enzyme de restriction

65°C correspond à la chaleur modérée de dénaturation des extrémités cohésives.

I.7.3- Quelques enzymes de restriction et leur site de coupure

Les coupures de quelques enzymes de restriction et les fragments générés sont présentés dans la figure7 ci-dessous :

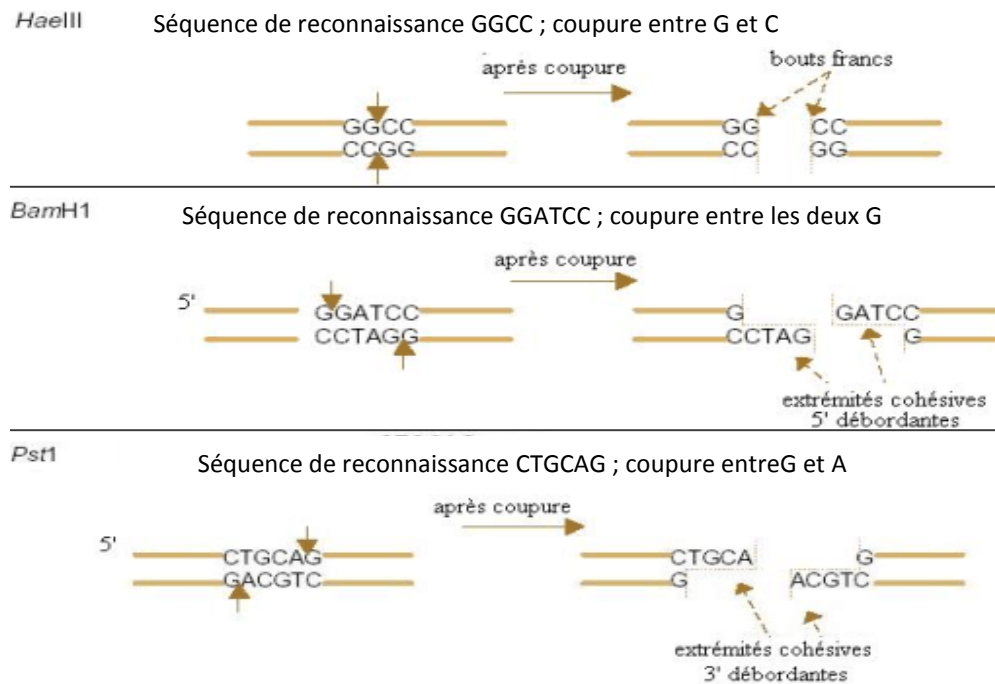


Figure 7 : Les différentes coupures par action de quelques enzymes de restriction de type II. (Smith et Nathans, 1973)

1.7.4- Utilisation des enzymes de restriction

Les enzymes de restriction peuvent être utilisées pour construire une carte génétique appelée « carte de restriction » d'une molécule d'ADN. La carte de restriction donne l'ordre des sites de restriction le long de cette molécule, et la taille des fragments produits. Cette technique de caractérisation des acides nucléiques, très utilisée, a été remplacée par le séquençage direct, devenu moins coûteux et réalisé de façon routinière.

Elles peuvent également être utilisées pour faire produire à des cellules hôte (par exemple la bactérie *Escherichia coli*) une protéine exogène. Les enzymes de restriction jouent un rôle crucial dans ce processus car elles permettent, de couper un ADN vecteur (plasmide) à un endroit précis et d'y insérer un gène d'intérêt (Smith et Nathans, 1973).

Les enzymes de restrictions peuvent être aussi utilisés pour isoler un gène afin de comprendre sa fonction, détecter une mutation à l'origine d'une maladie génétique, déterminer le type de mutation et son importance.

1.7.5- Notion de vecteurs

L'utilisation des plasmides ainsi que l'utilisation des bactériophages a permis la construction d'outils appelés vecteurs, (Gaillardin et Tinsley, 2007). Un vecteur est un transporteur capable de conduire une molécule prélevée dans une cellule et l'introduire dans une autre cellule. En biologie moléculaire, certains vecteurs sont étudiés pour faire entrer un acide nucléique dans une cellule et permettre la réplication ou l'expression de cet acide nucléique dans la cellule qui le reçoit.

Les plasmides bactériens, les bactériophages et de nombreux virus sont des vecteurs naturels permettant la transfection de différents types de cellules-hôtes.

I.8- SÉPARATION DES FRAGMENTS D'ADN PAR ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE

Un fragment d'ADN qui a été coupé avec les enzymes de restriction peut être séparé en utilisant un processus connu sous la désignation d'électrophorèse en gel.

1.8.1- Électrophorèse en gel

L'électrophorèse en gel est une technique de base visant à séparer l'ADN, l'ARN ou les protéines. Cette technique fait appel à un courant électrique afin de séparer les molécules dans un gel d'agarose, ou d'acrylamide substance épaisse ressemblant à la gélatine. Lorsqu'on applique un courant électrique au gel, les molécules plus petites se déplaceront plus

rapidement et atteindront les premiers l'extrémité du gel, tandis que les molécules plus grosses seront ralenties et resteront près du site de dépôt.

1.8.2- Analyse électrophorétique des fragments de restriction

Si un site de restriction se retrouve dans plusieurs emplacements d'une molécule d'ADN, l'enzyme effectue une coupure à chacun de ces sites, ce qui donne plusieurs fragments d'ADN. Par conséquent, si un morceau donné d'ADN linéaire est coupé avec une enzyme de restriction dont la séquence de reconnaissance spécifique est trouvée en cinq emplacements différents sur la molécule d'ADN, on obtiendra six fragments de longueurs différentes. La longueur de chacun des fragments dépend de l'emplacement des sites de restriction sur la molécule d'ADN(**Gaillardin et Tinsley, 2007**).

1.8.3- Visualisation des fragments de l'ADN

L'ADN est incolore, ainsi, on ne peut pas voir les fragments d'ADN dans le gel pendant l'électrophorèse. On ajoute à la solution d'ADN du bromure d'éthidium, (**Gaillardin, et Tinsley, 2007**). Ce dernier permet de visualiser les fragments d'ADN après migration.

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1- MATÉRIEL

II.1.1- Matériel biologique :

- Échantillon de boue (marécage)
- Échantillon d'eau sale (marécage)
- Échantillon de terre molle (aux alentours de la menuiserie)
- Échantillon de feuilles mortes (champ)
- Échantillon de sciure (menuiserie)

II.1.2- Matériel de laboratoire

- Tubes eppendorf
- Boîtes de pétri
- Balance sensible (DENVER INSTRUMENTS)
- Papiers à peser (UWR)
- Tubes à essai avec bouchon (PYREX)
- Anse d'inoculation jetables
- Anse de platine
- Bec de Bunsen
- Autoclave (PRESSURE COOKER)
- Bouteilles de 1000ml, 500ml (VWR)
- Pipette 50 ml (VWR)
- Incubateur (ECONOMY MODEL 2EG)
- Incubateur agitateur (GYROTORY WATER BATH SHAKER MODEL G76)
- Système de purification (chambre froide, collecteur de fractions ; pompe ; colonne de chromatographie ; agitateur magnétique ; Gel d'héparine de sépharose ou Q-sépharose ; 2 béchers de 20ml, pont en verre ; barre magnétique)
- Micropipettes P20 ; P200 ; P1000(GILSON)
- Micropipettes (AXYGEN SCIENTIFIC)
- Centrifugeuse à tube eppendorf (THEMO SCIENTIFIC 5424)
- Deluxe Mixer (S8220)
- Congélateur (LIEBHERR)
- Réfrigérateur (Singer NO- FROST)
- Mixer (THERMOLYNE)
- PipetAid (DRUMMOND SCIENTIFIC)
- Plaque de Micro titration 96 puits

- Moule à gel
- Peigne à 18 dents
- Scotch
- Bac de Migration
- Générateur (THERMO)
- Lampe UV (HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENT)
- Lunettes
- Gangs en latex
- Lames

II.1.3- Réactifs :

- Milieu de culture liquide LB Broth Miller (SIGMA)
- Milieu de culture solide LB Agar (SIGMA)
- Agarose (AMERICAN BIOANALYTICAL)
- Glycérol (SIGMA)
- Substrats (DNA λ , DNA M13, DNA T7, pBR322, Φ X174, pUC19, M13mp19) (NEW ENGLAND BIOLABS)
- Tampon de réaction (10 mM TRIS HCL pH 7,8 ; 20mM Na cl ; 5 mM MgCl₂ ; 1 mM DTT ; 100 μ g/ ml BSA)
- Tampon stop (50% glycérol ; 50mMEDTA PH, 8,0; 0,05% Bleu de Bromophénol)
- Solution A de sucrose 25%, 50mMTRIS-HCL, Ph 7,5
- Solution B de lysozyme 1mg/ml
- Solution C d'EDTA de 200mM Ph 8
- Solution D de MgCl₂ 1M
- Solution E de 5% Brij-58
- Solution de tampon d'électrophorèse TBE 5X 1L (48,32g Trisma base, 24,66g de l'acide Borique, 2,70g d'EDTA, 170 μ l d'ErBr (100g/ml, eau distillée)
- Marqueur de poids moléculaire(NEW ENGLAND BIOLABS)

II.1.4- Sites d'échantillonnage :

Le quartier Nkongdengui de la ville de Yaoundé a été l'un des lieux de collecte de certains nos échantillons. Le choix de ce quartier s'est basé sur la proximité de la résidence des proches qui était située près d'un marécage pas entretenu dans lequel on retrouvait de la boue et de l'eau.

Tandis que le choix du quartier Omnisport s'est fait dans une menuiserie. Cette dernière est construite en matériaux provisoires et dont le sol n'est pas cimenté. Et aux alentours de cette menuiserie, on retrouve de la terre molle et dans laquelle vivent des animaux fouisseurs.

II.2- MÉTHODES

II.2.1- Collecte des échantillons.

Au niveau du quartier Nkondengui, les échantillons de boue et d'eau sale ont été prélevés dans un marécage, et introduits dans les tubes eppendorf.

Un échantillon de sciure a été prélevé dans une menuiserie située dans le quartier Omnisport, et introduit dans le tube eppendorf.

L'échantillon de terre molle a été prélevé grâce à une spatule et introduite dans le tube eppendorf. Les feuilles mortes en cours de décomposition ont été également prélevées dans un tube eppendorf.

Tous ces prélèvements ont été faits en date du 26 juillet 2015 conditionnés dans les tubes eppendorf étiquetés et acheminés au laboratoire puis conservés au congélateur.

II.2.2- Préparation des tampons.

MgCl₂ : peser 20,331g de MgCl₂ à 1M et dissoudre dans un erlenmeyer contenant 1000ml d'eau distillée.

Tampon de digestion avec l'extrait brut. Pour sa préparation, 100µl de solution TRIS à 1M, 200µl de NaCl à 1M, 50µl de MgCl₂ à 1 M et 200µl de BSA ont été introduit dans un erlenmeyer de 5ml

Tampon stop : Mettre dans un tube de 50ml, 25ml de glycérol, 5ml d'EDTA, compléter le volume avec de l'eau distillée à 50 ml et ajouter une pincée de bleu de Bromophénol (bromure d'Ethidium).

II.2.3- Préparation des milieux de culture.

Deux milieux de culture ont été préparés :

- Milieu de culture solide (LB Agar).

Après avoir pesé la poudre d'Agar (37g), cette quantité a été introduite dans une bouteille contenant 500ml d'eau distillée, homogénéisée et ensuite l'eau distillée a été complétée jusqu'à 1000ml. La bouteille étant constituée, elle a été placée dans l'autoclave et porté à ébullition pendant une cinquantaine de minutes pour stérilisation. Ensuite le milieu a été

refroidit jusqu'à une température de 55°C. Après le refroidissement, ce milieu a été coulé dans les boîtes de pétri et laissé reposer jusqu'à la solidification. Ceci étant fait les boîtes de pétri ont été conservées au réfrigérateur. Les boîtes de pétri contenant le milieu solide sont présentées dans la figure 8 ci-dessous.

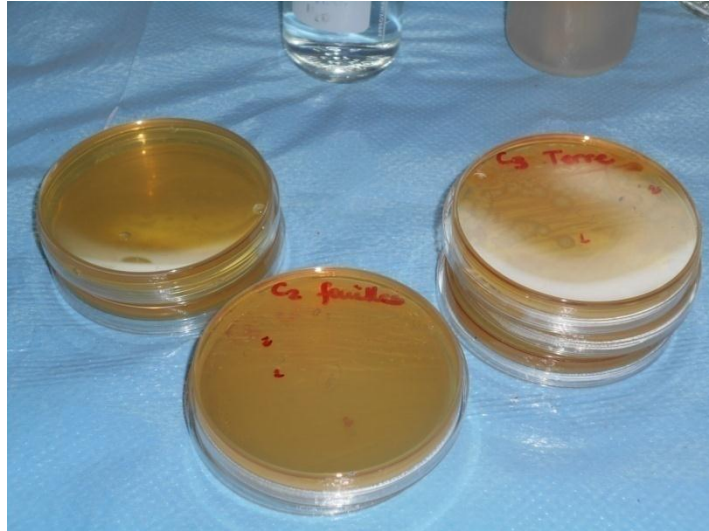


Figure 8 : Boîtes de pétri contenant le milieu solide (Ngo nkondjock, 2015)

- **Milieu de culture liquide (LB Miller Broth).**

La poudre de LB Miller Broth a également été pesé (25g) et introduite dans une bouteille de 500ml et contenant 200ml d'eau distillée, après homogénéisation, le volume a été complété avec l'eau distillée jusqu'à 500ml. Puis, ce milieu a été placé dans un autoclave et porté à ébullition pendant cinquante minutes pour stérilisation. Et le milieu a été refroidit jusqu'à une température de 55°C. Après refroidissement, ce milieu a été reparti dans les tubes à essai comme le montre la figure 9 ci- dessous.



Figure 9 : Tubes à essais contenant le milieu liquide (Ngo nkondjock, 2015.)

II.2.4- Isolation des colonies de bactéries sur le milieu solide

Les prélèvements biologiques ont été dégivrés, et les boîtes de pétri séchées et réchauffées à l'incubateur pendant une heure à 37°C puis étiquetées.

Un ml d'eau distillée a été ajouté dans chacun des tubes eppendorf contenant les échantillons. Ensuite ces échantillons ont été homogénéisés à l'aide d'un mixer. Sous la flamme du bec de Bunsen, et à l'aide d'une micropipette, 20µl de chacun des échantillons ont été pipetés et déposés dans les boîtes de pétri. A l'aide d'une anse d'inoculation préalablement stérilisée à la flamme du Bec de Bunsen et refroidie dans le milieu de culture, ces échantillons ont été étalés dans les boîtes de pétrie par la méthode des stries. Les boîtes de pétri ont été placées dans l'incubateur à 37°C pendant toute la nuit.

L'isolation des colonies de bactéries s'est faite en ré inoculant les colonies individuelles et différentes sur les nouvelles boîtes de pétri. La différence entre les colonies de bactéries est notée au niveau de la couleur, la taille, la forme de la colonie et la poussée.

II.2.5- Culture des bactéries dans le milieu liquide

La culture dans le milieu liquide a consisté à inoculer les colonies pures dans les tubes à essai contenant 5ml de milieu liquide et les incubés dans l'incubateur agitateur pendant toute la nuit à 37°C. Après incubation, et sous la flamme de Bec de Bunsen une partie des cellules (1,5ml) a été prélevée et introduite dans les bouteilles (2,5ml) contenant 300µl de glycérol préalablement stérilisées et stockées à -20°C. La partie restante a été introduite dans les tubes eppendorf puis ces tubes ont été centrifugés. La centrifugation a permis d'obtenir deux phases : le surnageant et le culot. Le surnageant a été récupéré dans un autre tube, tandis que le culot a été resuspendu avec 300 µl de tampon de lyse et ces lysats ont été congelés à -20°C.

II.2.6- Préparation de l'extrait brut

Les cellules sont décongelées et conservées dans un récipient contenant de la glace. Dans chaque tube contenant 200µl de cellules, on a ajouté successivement :

20µl de la solution B (lysozyme), 11µl de la solution C (EDTA) ; 11,5µl de la solution D (MgCl₂) ; 24µl de la solution E (Brij à 5%). Après avoir bien mélangé, en pipetant on les incubés à température ambiante pour 15minutes. A la fin de l'incubation on procède à la centrifugation à la vitesse maximale pendant 15min à 4°C à 1500tours par secondes au bout de laquelle chaque surnageant est transféré dans un nouveau tube.

II.2.7- Réaction de digestion avec l'extrait brut

Dans une plaque de 96 puits on mélange dans une série des trois puits par substrat (ADN λ, ou ADN T7), 42µl de l'eau stérile, 5µl de tampon de réaction et 3µl de substrat ADN. Pour les trois puits de chaque substrat, on ajoute dans le premier puits 25µl de l'extrait

brut obtenu plus haut et on repipete 25µl qui sont transférés dans le deuxième puits, mélangés et la procédure est reprise jusqu'au troisième puits. La plaque est recouverte et incubée à 37°C pendant une heure. A la fin de l'incubation, la réaction est arrêtée en ajoutant dans chaque puits une goutte de tampon stop.

II.2.8- Électrophorèse sur gel d'agarose

C'est une technique qui permet de séparer des molécules en fonction de leur taille et de leur charge sous l'effet d'un courant électrique.

- **Préparation du gel d'agarose :**

Pour la préparation du gel de migration, les extrémités de chaque moule à gel sont fermées par le scotch et les peignes sont placés à une extrémité et au milieu du moule. Ensuite, 4,5 g d'agarose sont ajoutés dans un bécher contenant 400ml d'eau distillée et sont portés à ébullition dans le four à micro ondes pendant 10 minutes. Après refroidissement à 50°C, 100ml de tampon 5X TBE / BrEt y sont ajoutés et le mélange est coulé dans le moule à gel. Après refroidissement, les peignes et le scotch sont enlevés et le moule introduit dans le bac d'électrophorèse contenant 1X TBE / BrEt. A l'aide d'une micropipette, les produits de la digestion sont introduits dans les puits du gel obtenu par les peignes, tout en prenant le 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 prise par la caméra. Les motifs de migration obtenus sont comparés à ceux existant dans la base de données pour identifier l'enzyme.

Il est à noter que le port des gants est obligatoire pour la manipulation du gel de migration, parce que le Bromure d'Éthidium qui est contenu dans le tampon stop est cancérigène et le port des lunettes est conseillé avant l'observation des gels à la lumière UV qui est nuisible pour la vue.

Après observation sous lampe UV, il ressort que certains échantillons présentent plusieurs sites de digestion et sont qualifiés de positifs, tandis que les échantillons négatifs ne présentent pas de fragments de digestion décelables.

Une fois que les échantillons positifs sont identifiés, ils sont cultivés en grande quantité dans 250ml du milieu liquide. Les cellules obtenues après centrifugation sont resuspendues dans 6ml de la solution A dans laquelle on va ajouter 345µl de MgCl₂, 600µl de lysozyme, 300µl de solution d'EDTA, 725µl de Brij-68. Le mélange est incubé pendant 15 minutes à température ambiante puis centrifugé. Le surnageant obtenu est récupéré et utilisé pour la purification.

II.2.9- Purification

Elle a eu lieu dans une chambre froide (4°C) contenant une colonne de hauteur 25 cm et de diamètre 1 cm. Dans la colonne 500 µl de gel (Héparine sépharose) sont ajoutés qu'on équilibre en faisant passer à travers 10 ml de la solution A. La solution collectée obtenue après passage de l'extrait brut dans le gel est appelé Flow Through. Ensuite on lave le gel avec 10ml de solution A. et on obtient le Wash. On procède à l'élution par un gradient de concentration de 100mM à 1M NaCl et les fractions de 1 ml sont collectées et testées sur le substrat (ADN).

II.2.10- Réaction d'optimisation

Le pic d'activité de digestion obtenu est utilisé pour faire les réactions avec d'autres tampons de digestion, différents par la quantité de sel. Les températures différentes sont aussi testées.

II.2.11- Réaction de mapping et de double digestion.

Ceux des substrats montrant peu de fragments après coupure sont utilisés pour la réaction de mapping qui consiste à digérer l'ADN par une ou deux enzymes commerciales de sites connus (1à 2 sites) d'identification et l'enzyme à identifier.

Si la digestion avec le pic d'activité donne un motif complet qui conduit à soupçonner une enzyme existante, la double digestion est faite pour confirmation. Trois réactions sont donc faites :

- une réaction avec l'enzyme en cours d'identification
- une réaction avec le mélange enzyme inconnue + enzyme soupçonnée commerciale
- une réaction avec l'enzyme commerciale seule.

Les motifs de migration sont comparés.

CHAPITRE III :
RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1- RESULTATS

III.1.1- Ensemencement des bactéries

Les échantillons ensemencés sur boîte de pétri ont produit les colonies que nous pouvons observer sur la figure 10. Et les colonies individuelles matérialisées sous forme de stries (figure 11).

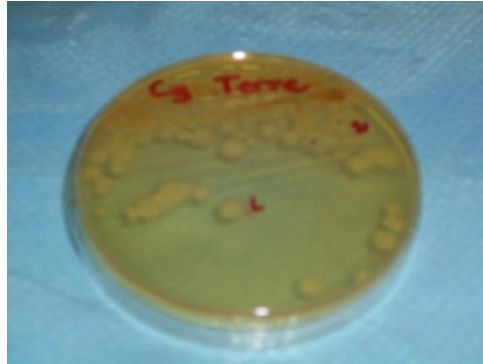


Figure 10 : Observation macroscopique des colonies (Ngo nkondjock, 2015).

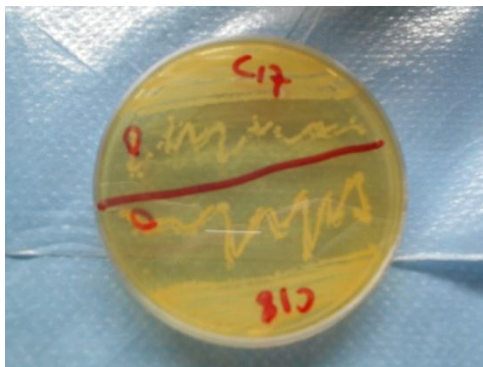


Figure 11 : Les stries réalisées dans une boîte de pétri (Ngo nkondjock, 2015).

III.1.2- Colonies des bactéries isolées

A partir des échantillons de boue, feuilles mortes, terre molle, sciure et d'eau sale prélevés dans différents sites, 25 colonies de bactéries ont été isolées et l'observation macroscopiques'est faite en fonction de la taille, couleur la forme et la poussée de la colonie. L'ensemble de ces résultats est présenté dans le tableau 2 ci- dessous :

Tableau 2 : Observation macroscopique des colonies en fonction de la couleur, taille et la poussée

TYPE D'ECHANTILLON	CODE DES COLONIES	OBSERVATION MACROSCOPIQUE		
		Taille	Couleur	poussée
BOUE	C1	Grande	blanchâtre	Bonne
	C2	Petite	blanchâtre	Bonne
	C3	Petite	Claire	Bonne
	C4	moyenne	Jaunâtre	Bonne
	C5	Petite	blanchâtre	Bonne
	C6	Petite	blanchâtre	Bonne
	C7	moyenne	blanchâtre	Bonne
	C8	moyenne	jaunâtre	Bonne
FEUILLES MORTES	C9	Petite	blanchâtre	Bonne
	C10	Petite	blanchâtre	Bonne
	C11	Petite	translucide	Bonne
	C12	Petite	jaunâtre	Bonne
	C13	Moyenne	jaunâtre	Bonne
TERRE MOLLE	C14	Large	blanchâtre	Bonne
	C15	Large	Blanche gluante	Très bonne
	C16	Très large	Blanchâtre	Très bonne
SCIURE	C17	Large	Blanchâtre gluante	Très bonne
	C18	Petite	Blanchâtre	Bonne
	C19	Fine	Blanchâtre	Bonne
	C20	Fine	Blanchâtre	Bonne
	C21	Moyenne	Blanchâtre	Bonne
	C22	Petite	Jaunâtre	Bonne
	C23	Moyenne	Blanchâtre	Bonne
EAU	C24	Moyenne	Blanchâtre	Bonne
	C25	Petite	Blanchâtre	Moyenne

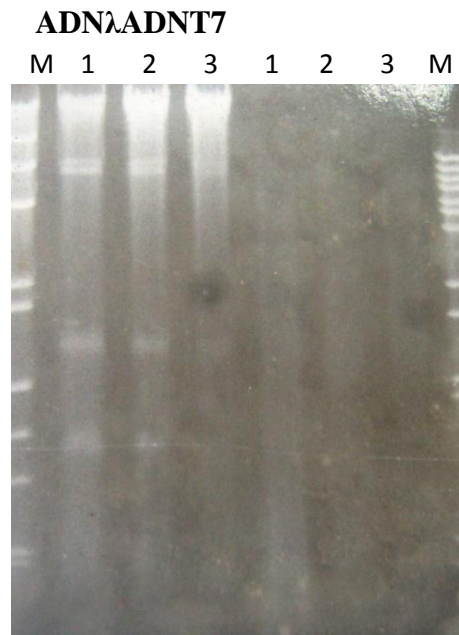
III.1.3- Identification d'enzymes de restriction

III.1.3.1-Activités détectables

Six échantillons ont produit des activités enzymatiques détectables.

Extrait C7

L'extrait brut C7 a été testé sur l'ADN λ et l'ADN T7 et les résultats sont présentés dans la figure 12 ci- après.



Légende

M : marqueur de poids moléculaire

1 : dilution 1/1

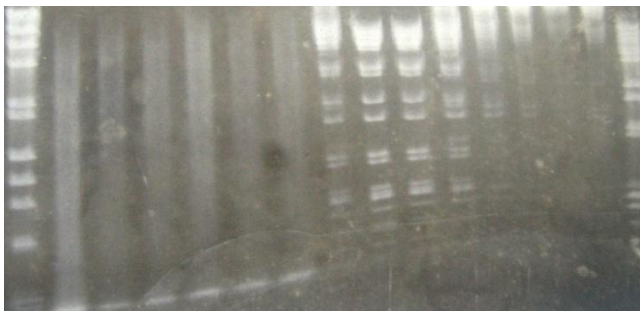
2 : dilution 1/2

3 : dilution 1/4

Figure 12 : Électrophorégramme de la digestion par l'extrait brut C7 des ADN λ et ADN T7

Après obtention de la digestion des substrats ADN, l'extrait C7 a été purifié à l'héparine sépharose et les résultats sont présentés dans la figure 13 ci- après.

M FT W 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M



Légende

M : marqueur de poids moléculaire

FT : Flow Through (fraction obtenue après passage de l'extrait brut dans le gel)

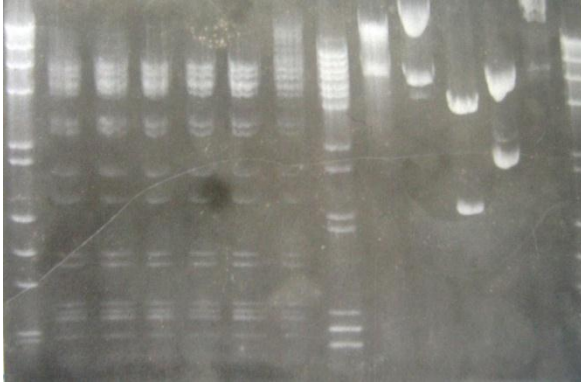
W : Wash

1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 et 12 : fractions collectées pendant l'élution et la fraction en rouge indique le pic d'activité

Figure 13 : Électrophorégramme de la réaction de digestion de l'ADN λ par les fractions purifiées de C7 à l'Héparine Sépharose.

L'optimisation et la digestion complète sur d'autres substrats nous ont permis d'obtenir le profil suivant :

M b₁ b₂b₃ b₄ T_aT_b M T7 p Φ P M13 M



Légende :

p= pBR322

P= pUC19

M13= M13mp19

Φ= ΦX174

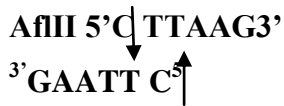
b₁, b₂, b₃ et b₄ sont 4 tampons différents et le tampon optimum est en rouge

T_a et T_b sont deux températures différentes et la température optimale est en rouge

M : marqueur de poids moléculaire

Figure 14: Électrophorégramme de digestion par l'ADN λ et de digestion complète sur les ADN T7, pBR322, ΦX174, pUC19 et M13mp19

En comparant ces différents profils avec ceux déjà connus, l'extrait C7 a été identifié comme isoschizomère d'*AflIII* dont la séquence de reconnaissance et le site de coupure sont :

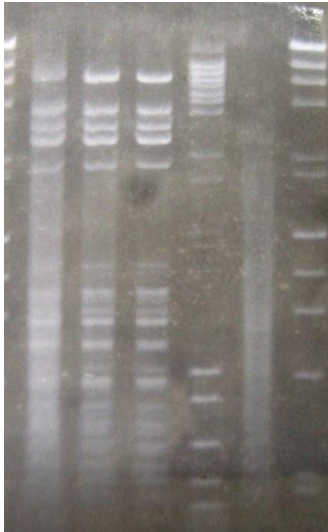


AflIII est une enzyme de type II qui après coupure donne des extrémités cohésives

Extrait C13

L'extrait brut C13 a été testé sur les ADN λ et ADN T7 et a présenté le profil suivant :

ADN λ ADN T7
M 1 2 3 M 1 2



Légende

M : marqueur de poids moléculaire

1 : dilution 1/1

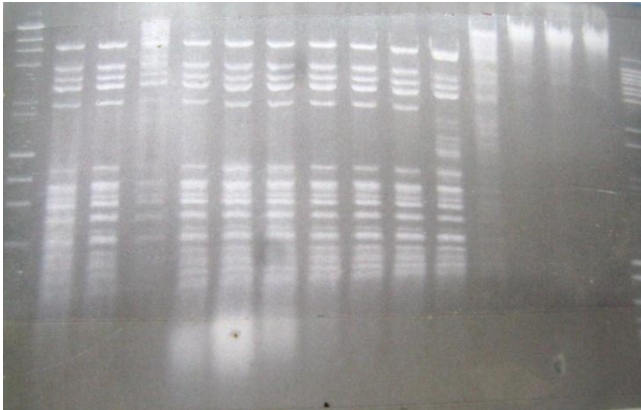
2 : dilution 1/2

3 : dilution 1/4

Figure 15 : Électrophorégramme de la digestion par l'extrait brut C13 des ADN λ et ADN T7.

L'extrait brut de C13 a été purifié à l'héparine sépharose et le profil de digestion suivant a été obtenu voir figure 16 ci-dessous:

M FT W 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M



Légende :

M : marqueur de poids moléculaire

FT : Flow Through (fraction obtenue après passage de l'extrait brut dans le gel

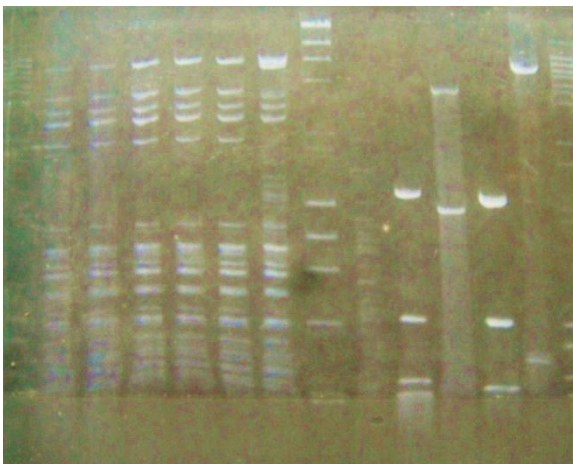
W : Wash

1, 2, 3, 4, 5,6,7, 8, 9, 10, 11 et 12 sont les fractions collectées successivement pendant l'éluion et les fractions en rouge représentent les pics de digestion

Figure 16 : *Électrophorégramme de la réaction de digestion de l'ADN λ par les fractions purifiées de C13 à l'Héparine sépharose.*

L'optimisation des conditions de digestion par le pic d'activité enzymatique et la digestion complète ont présenté le profil suivant :

M b₁ b₂ b₃b₄T_aT_b M T7 p Φ P M13



Légende :

p= pBRr322

P= pUC19

M13= M13mp19

Φ = Φ X174

b₁, b₁, b₂, b₃, b₄ sont 4 tampons différents et le tampon optimal est en rouge

T_a, T_b: deux températures différentes et la température optimale est celle en rouge

Figure 17 : *Électrophorégramme de la réaction de digestion par l'ADN λ et de digestion complète sur les ADN T7, pBR322, Φ X174, pUC19 et M13mp19*

Une double digestion avec l'enzyme commerciale *AsuI* a présenté le profil ci-dessous figure 18 :

M 1 2 3 M



Légende :

M : marqueur de poids moléculaire

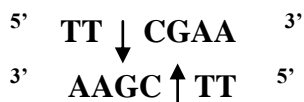
1 : C13

2 : C13 + *AsuI*

3 : *AsuI*

Figure 18 : Électrophorégramme de la réaction de double digestion par l'ADN λ avec le pic d'élution de C13 et l'enzyme commerciale *AsuI*.

D'après les motifs de digestion sur les différents substrats, l'isolat C13 a été identifié comme isoschizomère d'*AsuI*. Sa séquence de reconnaissance est présentée comme suit :

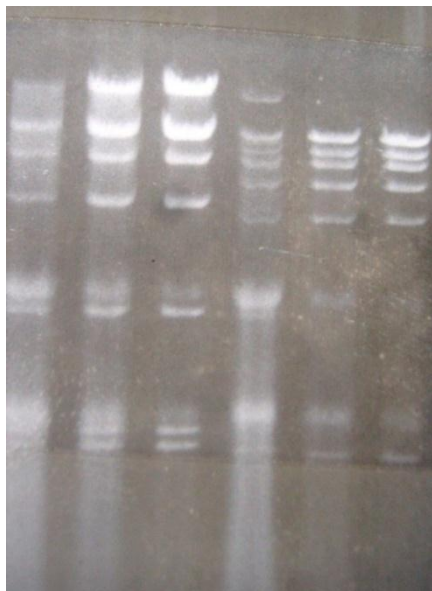


AsuI est une enzyme de type II et dont la coupure donne les bouts collants.

Extrait C16

L'extrait brut de C16 testé sur les ADN λ et T7 nous a montré le profil suivant (fig.19)

ADN λ ADN T7
M 1 2 3 M 1



Légende

M : marqueur de poids moléculaire

1 : dilution 1/1

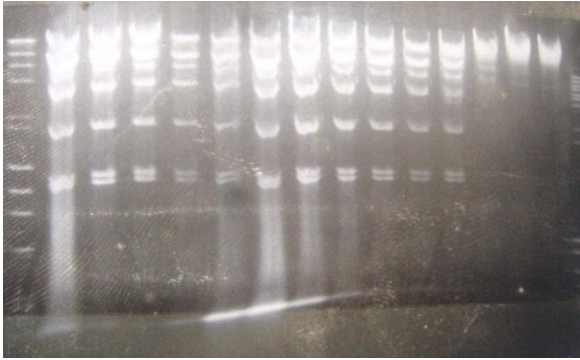
2 : dilution 1/2

3 : dilution 1/4

Figure 19:Électrophorégramme de la digestion par l'extrait brut C16 desADN λ et ADN T7

Après obtention des fragments d'ADN, l'extrait brut C16 a été purifié à l'héparine sépharose et a présenté le profil suivant sur la figure 20 :

M FT W 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M



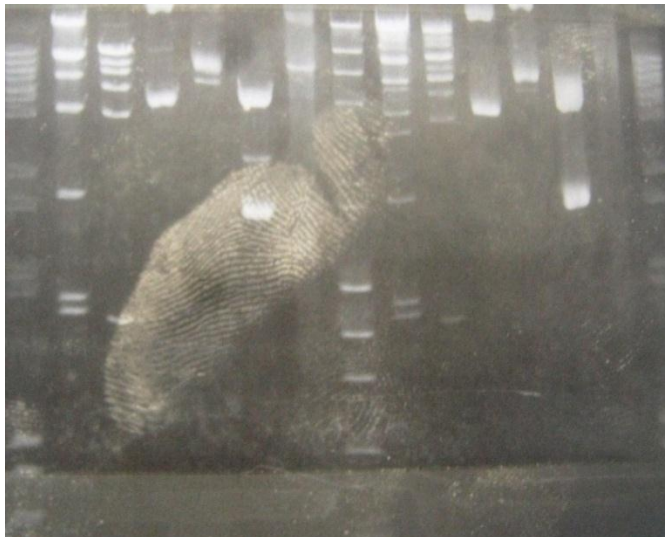
Légende :

M : marqueur de poids moléculaire
FT : Flow through (fraction obtenue après passage de l'extrait brut après le gel)
W : Wash
1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 et 12 sont les fractions collectées successivement pendant l'élution.

Figure 20 : Électrophorégramme de la réaction de digestion de l'ADN λ par les fractions purifiées de C16 à l'héparine sépharose.

L'optimisation des conditions de digestion par le pic d'activité enzymatique et la digestion complète ont présenté le profil ci-dessous (figure 21) :

M b₁b₂ b₃ b₄ T_aT_b M T7 p Φ P M13 M

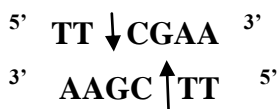


Légende

p= pBR322
P= pUC19
M13= M13mp19
Φ= ΦX174
b₁, b₂,b₃,b₄sont 4 tampons différents et le tampon optimum est en rouge
T_a et T_b : différentes températures et la température optimale est en rouge à 60°C
M : marqueur de poids moléculaire

Figure 21 : Électrophorégramme de la réaction de digestion par l'ADN λ et de digestion complète sur les ADN T7, pBR322, ΦX174, pUC19, et M13mp19.

En comparant ces différents profils avec ceux déjà connus, l'échantillon C16 a été identifié comme isoschizomère de **BstBI** dont la séquence de reconnaissance est :



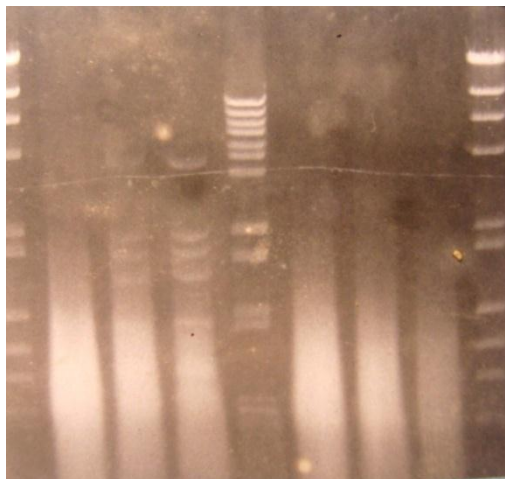
BstBI est une enzyme de type II dont l'action hydrolytique génère les extrémités dites à bouts collants.

Extrait C17

L'extrait brut C17 testé sur les ADN λ et ADN T7 a présenté le profil suivant :

ADN λ ADN T7

M 1 2 3 M 1 2 3 M



Légende :

M : marqueur de poids moléculaire

1 : dilution 1/1

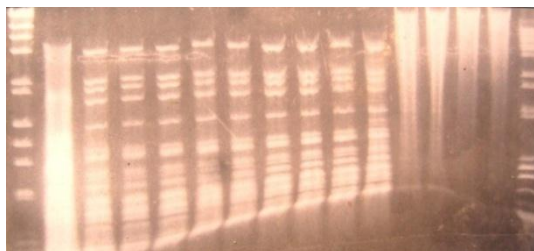
2 : dilution 1/2

3 : dilution 1/4

Figure 22: Électrophorégramme de la digestion de l'extrait brut C17 par les ADN λ et ADN T7.

Après obtention des fragments d'ADN issus de l'activité de l'extrait brut, ce dernier a été purifié à l'héparine sépharose et a présenté le profil suivant (figure 23) :

M FT W 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M



Légende

M : marqueur de poids moléculaire

FT : Flow Through (fraction obtenue après passage de l'extrait brut dans le gel)

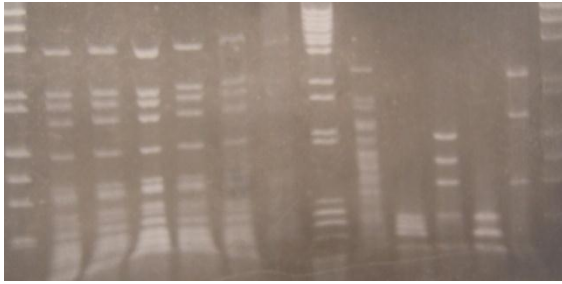
W : Wash

1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 et 12 sont les fractions collectées successivement pendant l'élution et la fraction en rouge représente le pic de digestion

Figure. 23 : Électrophorégramme de digestion de l'ADN λ par les fractions purifiées de C17 à l'héparine sépharose.

L'optimisation des conditions de digestion par le pic d'activité enzymatique et la digestion complète ont présenté le profil ci- dessous (figure24) :

M b₁ b₂ b₃b₄ T_aT_b M T7 P Φ p M13 M



Légende

p = pBR322

P = pUC19

M13 = M13mp19

Φ = ΦX174

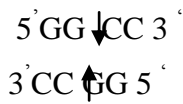
b₁,b₂,b₃,b₄ = sont 4 tampons différents et tampon optimum est en

T_a,T_b= températures et la température optimale est en rouge à 60°C et T_b est la température ambiante.

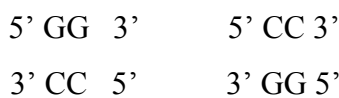
M = marqueur de poids moléculaire

Figure 24 : Électrophorégramme de la réaction de digestion par l'ADN λ et de digestion complète sur les ADN T7, pBR322, ΦX174, pUC19 et M13mp19

En comparant ces différents profils avec ceux déjà connus, l'échantillon C21 a été identifié comme isoschizomère de *Hae III* dont la séquence de reconnaissance est :



Hae III est une enzyme de type II et dont l'action hydrolytique génère des bouts francs qui sont :



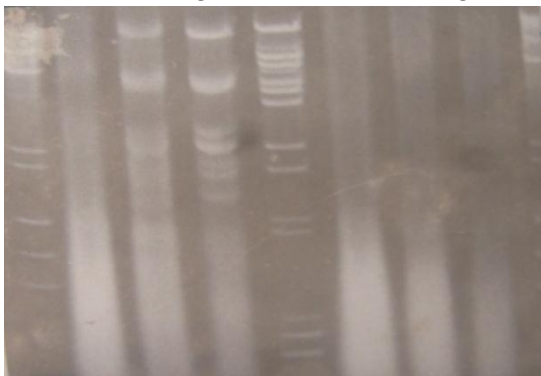
Extrait C21

L'extrait brut de C21 testé sur les ADN λ et ADN T7 a révélé le profil présenté sur la figure 25 ci-dessous :

ADN λ

ADN T7

M 1 2 3 M 1 2 3 M



Légende

M : marqueur de poids moléculaire

1 : dilution 1/1

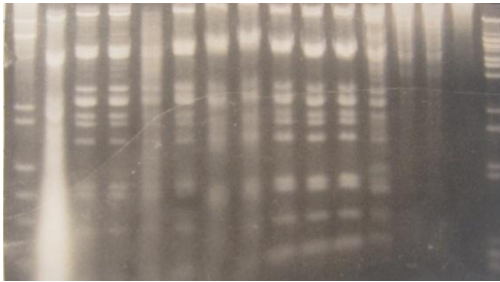
2 : dilution 1/2

3 : dilution 1/4

Figure 25 : Électrophorégramme de digestion par l'extrait brut C21 des ADN λ et ADN T7

Après obtention des fragments d'ADN issus de l'activité de l'extrait brut, ce dernier a été purifié à l'héparine sépharose et a présenté le profil de la (figure 26) ci-dessous :

M FTW 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M



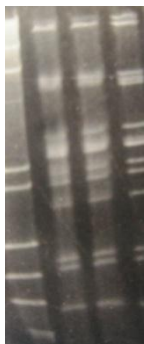
Légende :

M : marqueur de poids moléculaire ;
FT : Flow through (fraction obtenue après passage de l'extrait brut) ;
W : Wash ;
1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 et 12 sont les fractions collectées successivement pendant l'élution et la fraction en rouge représente le pic de digestion.

Figure 26 : *Électrophorégramme de digestion de l'ADN λ par les fractions purifiées de C21 à l'Héparine sépharose.*

Du profil presque complet de la fraction 6, nous avons soupçonné l'enzyme *Pst I*. Pour confirmer ceci, nous avons fait la double digestion avec l'enzyme commerciale et le profil ci- dessous a été obtenu (figure 27) :

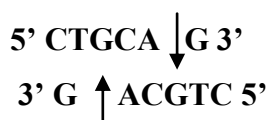
M 1 2 3



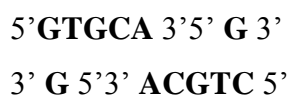
Légende : **M** : marqueur de poids moléculaire,
1: C 21;
2: C 21 + *PstI*;
3 :*Pst I*;

Figure 27 : *Électrophorégramme de double digestion par l'ADN λ avec le pic d'élution de l'extrait C21 et de l'enzyme commerciale Pst I.*

Les profils avec C 21 + *Pst I* et *Pst I* ont permis d'identifier l'extrait C 21 comme isoschizomère de *Pst I*. la séquence de reconnaissance et le site de coupure de l'enzyme *Pst I* sont :



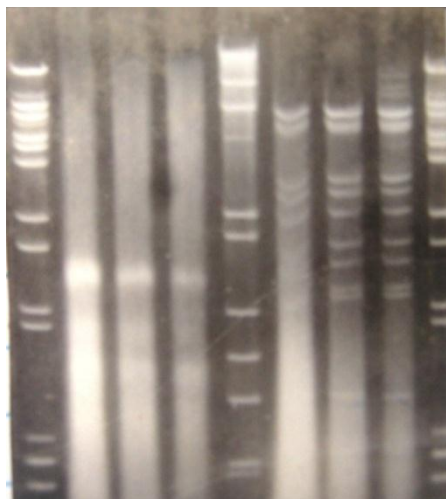
PstI est une enzyme de type II et dont l'action hydrolytique génère des bouts décalés ou collants qui sont :



Extrait C24

L'extrait brut de C24 testé sur les ADN λ et ADN T7 a révélé le profil ci-dessous :

ADN λ ADN T
M 1 2 3 M 1 2 3 M



Légende

M : marqueur de poids moléculaire

1 : dilution 1/1 ;

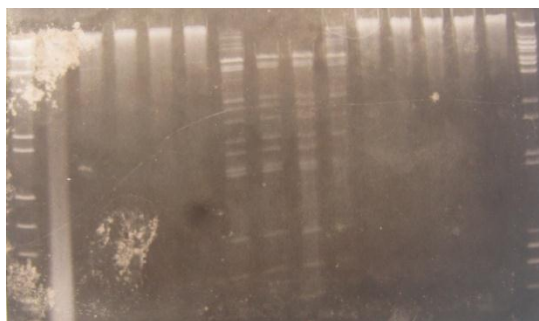
2 : dilution 1/2 ;

3 : dilution 1/4 ;

Figure 28 : Électrophorégramme de la digestion de l'extrait brut C24 par les ADN λ et ADN T7.

Après obtention des fragments d'ADN issus de l'activité de l'extrait brut, ce dernier a été purifié à l'héparine sépharose et a présenté le profil de la figure 29 ci-dessous :

M FT W 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M



Légende :

M : marqueur de poids moléculaire ;

FT : Flowthrough (fraction obtenue après passage de l'extrait brut dans le gel) ;

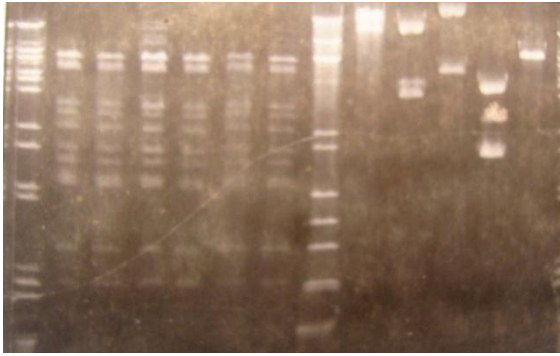
W : Wash ;

1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 et 12 sont les fractions collectées successivement pendant l'élution et la fraction en rouge représente le pic de digestion

Figure 29 : Électrophorégramme de la réaction de digestion de l'ADN λ par les fractions purifiées de C24 à l'héparine sépharose.

L'optimisation des conditions de digestion par le pic d'activité enzymatique et de digestion complète ont présenté le profil de la figure 30 ci-dessous :

M b₁ b₂ b₃ b₄ T_a T_b M T7 P ϕpM13



Légende

p ; pBR322 ;
P : pUC19 ;
M13 : M13mp19 ;
Φ : ΦX174 ;
b₁, b₂, b₃, b₄ : sont 4 tampons différents et le tampon optimum est en rouge ;
T_a, T_b : 2 températures et la température optimum est en rouge à 60°C ;
M : marqueur de poids moléculaire.

Figure 30 : Électrophorégramme de la réaction de digestion de l'ADN λ et de digestion complète sur les ADN T7, pBR322, ΦX174, pUC19, et M13mp19

Une double digestion avec l'enzyme commerciale *SnaB I* a montré le profil de la figure 31 ci- dessous :

M 1 2 3 M

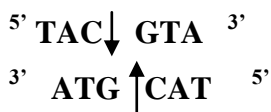


Légende :

M : marqueur de poids moléculaire ;
1 : C 24 ;
2 : C21 + *SnaB I* ;
3 : *SnaB I*

Figure 31 : Électrophorégramme de la réaction de double digestion de C24 sur l'ADN λ et l'enzyme commerciale *SnaB I*.

En comparant les différents profils avec ceux déjà connus, l'extrait C24 a été identifié comme isoschizomère de *SnaB I* dont la séquence de reconnaissance et le site de coupure sont :



SnaBI est une enzyme de type II et dont l'action hydrolytique génère des bous francs qui sont:

5' TAC 3' 5' GTA 3'
 3' ATG 5' 3' CAT 5'

III.1.3.2- Activités non identifiables

Certains extraits n'ont pas produit d'activités enzymatiques identifiables avec les substrats que nous avons utilisés ainsi que les conditions de digestion. Parmi ces extraits, nous avons ceux de C5 et C19 qui après avoir été testés sur les ADN λ et ADN T7 ont présenté les profils ci- dessous :

III.1.3.3- Profils des activités non identifiables de C5 et C19

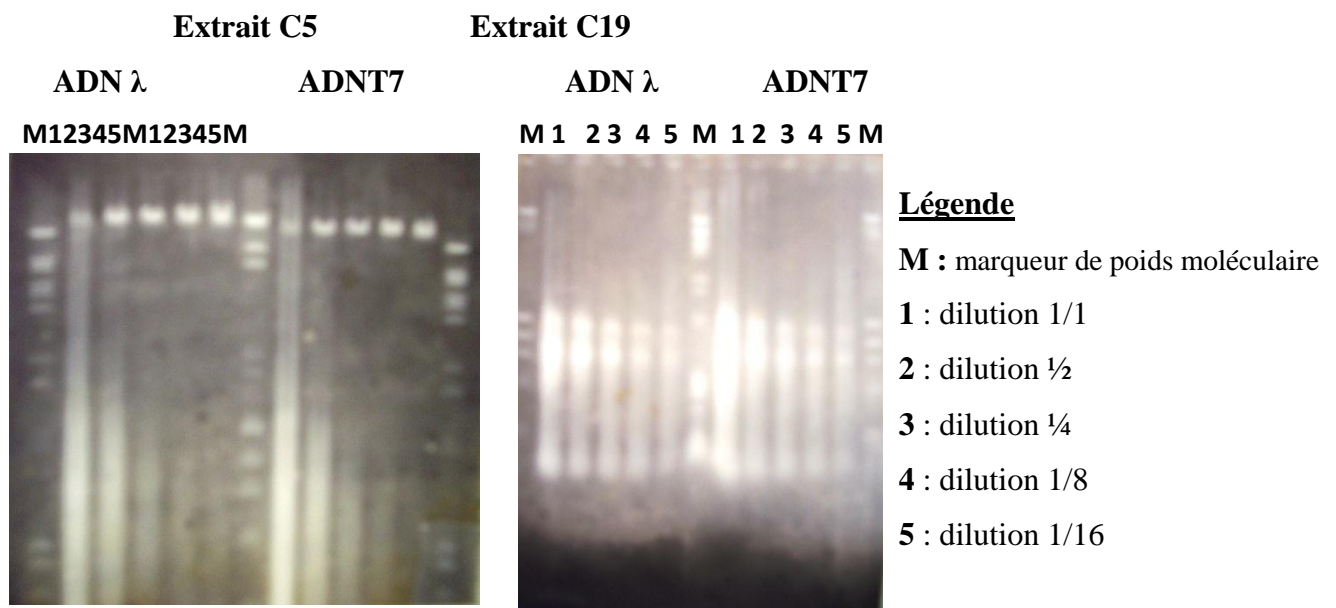


Figure 32 :Électrophorégrammes présentant des activités non détectables des extraits C5 et C19

III.2- DISCUSSION

L'obtention des colonies pures isolées des échantillons de bactéries dépend de plusieurs facteurs. Ces facteurs peuvent se focaliser autour du site de collecte des échantillons, de la procédure du prélèvement, de l'ensemencement dans le milieu de culture mais aussi de la nature du milieu de culture. Dans l'ensemble des échantillons prélevés dans différents sites, nous avons obtenu que 25 colonies de bactéries quand on sait que les bactéries se divisent de manière exponentielle lorsqu'elles trouvent les éléments nutritifs importants. Ceci pourrait s'expliquer par le faite que certains sites malgré le cadre environnemental qui laissait percevoir la présence des microorganismes, ne sont pas propices à la prolifération des bactéries. Cependant, certains échantillons bien qu'ils étaient prélevés dans le même environnement, ont produit des colonies en nombre inégales ; c'est le cas des échantillons de

boue et d'eau sale qui ont été prélevés dans le même marécage, la boue en a produit 8 colonies de bactéries tandis que nous en avons eu 2 colonies chez l'eau sale.

Toutes les colonies observées présentent une bonne poussée, ceci s'expliquerait par la nature du milieu de culture qui contenait les éléments nutritifs tels que les composés organiques nécessaires à la croissance bactérienne.

Nous notons une différence au niveau des tailles des colonies : une grande colonie a un diamètre supérieur à 5 millimètre, une colonie moyenne a un diamètre compris entre 3 et 5 millimètre tandis une petite colonie a un diamètre compris entre 1 et 2 millimètre.

A partir des échantillons prélevés, nous avons obtenu 25 extraits de colonies de bactéries et 6 de ses extraits ont présenté des activités enzymatiques détectables, tandis que 19 n'ont pas pu présenter d'activités enzymatiques détectables. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces extraits présenteraient les sites de méthylation au niveau des activités non détectables. Dans le cas des activités enzymatiques détectables, ceci peut s'expliquer par le fait que certaines bactéries étaient infectées par les virus (bactériophages) et elles ont pu se défendre en produisant certaines enzymes de restriction qui ont coupé l'ADN phagique.

Parmi les extraits présentant les activités détectables nous avons :

❖ **Extrait C7**

Après purification à l'héparine sépharose nous avons obtenu un pic de digestion à la fraction 6 (**Figure.13**). La réaction d'optimisation sur l'ADN λ a révélé comme tampon optimum le tampon b₂ et la température optimale 60°C (**Figure14**). En comparant les profils de restriction obtenus après digestion complète sur les substrats d'ADN T7, pBR322, Φ X174, pUC19 et M13mp19 avec ceux des catalogues, nous avons identifié cet extrait comme isoschizomère de *AfIII*. Cette enzyme reconnaît un palindrome et coupe à l'intérieur de la séquence de reconnaissance. C'est une enzyme de type II et le prototype a été isolée de la bactérie *Anabaena flos-aquae*. Cette enzyme produit des bouts collants et peut être utilisé dans le domaine de génie génétique.

❖ **Extrait C13**

Après purification à l'héparine sépharose, nous avons identifié des pics de digestion aux fractions 5,6 et 7 (**Figure16**). La réaction d'optimisation sur l'ADN λ a révélé comme tampon optimum le tampon b₃ et la température optimale 60°C (**Figure.17**). Les profils de restriction obtenus après digestion complète sur les substrats d'ADN T7, pBR322, Φ X174, pUC19 et M13mp19 ont présenté la séquence de reconnaissance. En comparant ces résultats avec ceux connus des catalogues, on a identifié cet extrait comme isoschizomère d'*AsuI*. *AsuI* est une enzyme de type II isolée de la bactérie *Anabaena Subcylindrika*.

❖ Extrait C16

Après purification à l'héparine sépharose, nous avons eu un pic de digestion à la fraction 2 (**Figure 20**). La réaction d'optimisation sur l'ADN λ a révélé comme tampon optimum le tampon b₁ et la température optimale 60°C (**Figure 21**). En comparant ce motif à celui des catalogues, nous avons identifié l'extrait C16 comme isoschizomère de **BstBI**. L'enzyme **BstBI** est de type II et a été isolée de la bactérie *Bacillus stearothermophilus*.

❖ Extrait C17

Après purification à l'héparine sépharose, nous avons identifié un pic de digestion à la fraction 3 (**Figure 22**). La réaction d'optimisation sur l'ADN λ a révélé comme tampon optimum le tampon b₃ et la température optimale 60°C (**Figure 23**). En comparant ce profil de restriction à ceux de la littérature nous avons identifié l'extrait C17 comme isoschizomère de **Hae IIII**. **HaeIII** est donc une enzyme de type II et a été isolée de la bactérie *Haemophilus aegyptius*.

❖ Extrait C21

Après purification à l'héparine sépharose, nous avons eu un pic de digestion à la fraction 6 (**Figure 25**). Les profils avec C 21+ **Pst I** et **Pst I** nous ont permis d'identifier l'extrait C 21 comme isoschizomère de **Pst I** (**Figure 26**). **PstI** est une enzyme de type II et a été isolée de la bactérie *Providencia stuartii*.

❖ Extrait C24

Après purification à l'héparine sépharose, nous avons eu pic de digestion à la fraction 5 (**Figure 29**). La réaction d'optimisation sur l'ADN λ a révélé comme tampon optimum le tampon b₄ et la température optimale à 60°C (**Figure 30**). En comparant les profils de restriction obtenus après digestion complète sur les substrats d'ADN T7, pBR322, Φ X174, pUC19 et M13mp19 et avec les modèles de digestions connus, nous avons identifié cet extrait comme isoschizomère de **SnaB I**. **SnaB I** est une enzyme de type II et a été isolé de la bactérie *Sphaerotilus natans*.

Notons qu'en chromatographie sur gel, les molécules sont séparées en fonction de la taille et la forme. La phase stationnaire est un solide poreux (granules du gel poreux) où les grosses molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores sont exclues et sont éluées les premières. Les petites molécules par contre sont éluées plus tardivement car incluses dans le gel (**Burgot, 2002**). C'est le cas du flow through qui est la fraction non retenue par la

colonneet a été éluée en premier. Ensuite, nous avons successivement collectés d'autres fractions (1, 2, 3, 4...) pour avoir une meilleure résolution. Après la séparation chromatographique, les fractions ont été soumises à l'ADN λ . Les bandes obtenues après analyse électrophorétique ont permis de se prononcer sur la fraction d'intérêt qui représente le pic de digestion. De plus le tampon utilisé pour le processus d'élution contenait le NaCl et dont les ions Na^+ servent de contre cations et ceux de Cl^- servent de contre anions a servi dans l'obtention du pic de digestion.

De plus, bien que plusieurs enzymes de restriction de type II peuvent reconnaître la même séquence de reconnaissance des nucléotides, toutes ne requièrent pas pour leur activité une température d'incubation à 37°C. Pour certaines, elle peut aller jusqu'à 60°C car l'activité de chaque enzyme dépend étroitement de sa température optimale. (**Ritchie, 2012**). De plus, l'enzyme a une activité déterminée dans un intervalle de pH à partir (7- 8,8) avec un optimum de 7,8 dans la solution. C'est pour cette nous avons eu le tampon optimal, le tampon qui permet à l'enzyme appropriée d'avoir une activité.

Le tableau ci-dessus récapitule des différentes enzymes de restriction isoschizomère des enzymes trouvées dans nos échantillons.

Tableau 3 : Récapitulatif des colonies qui ont produit les enzymes, les sources et la séquence de reconnaissance.

Code colonie (bactérie)	Enzyme identifiée	Source	Séquence de reconnaissance
Extrait C7	<i>Afl II</i>	<i>Anabaenaflos- aquae</i>	5' C ↓ TTAAG 3' 3' GAATT ↑ C 5'
Extrait C13	<i>Asu I</i>	<i>AnabaenaSubcylindrika</i>	5' TT ↓ CGAA 3' 3' AAGC ↑ TT 5'
Extrait C16	<i>Bst BI</i>	<i>Bacillus stearotherophilus</i>	5' TT ↓ CGAA 3' 3' AAGC ↑ TT 5'
Extrait C17	<i>Hae IIII</i>	<i>Haemophilusaegyptius</i>	5' GG ↓ CC 3' 3' CC ↑ GG 5'
Extrait C21	<i>Pst I</i>	<i>Providenciastuartii</i>	5' CTGCA ↓ G 3' 3' G ↑ ACGTC 5'
Extrait C24	<i>Sna BI</i>	<i>Sphaerotilusnatans</i>	5' TAC ↓ GTA 3' 3' ATG ↑ CTA 5'

Certains extraits n'ont pas produit d'activités détectables sur le gel d'agarose et ceci peut s'expliquer par plusieurs raisons :

- Une forte présence des exonucléases et qui a certainement étouffer l'expression des endonucléases
- La séquence de reconnaissance de l'enzyme n'était pas présente dans les substrats utilisés ou alors les fragments étaient soit trop longs ou très courts. Dans le cas où les fragments sont longs on diminue la concentration du gel d'agarose.
- Les conditions (température, tampon, substrats..) n'ont pas été favorables à la digestion. Pour cela on devrait changer les conditions de digestion.
- Expression des enzymes de type I qui coupent non pas au niveau de la séquence de reconnaissance mais à 1000 voire 5000 paires de bases plus loin, mais aussi les enzymes de type III qui présentent un site de reconnaissance mais coupent une vingtaine de nucléotides plus loin.
- Méthylation des sites de restriction et inactivation des enzymes de restriction.

CHAPITRE IV :
INTÉRÊT DIDACTIQUE

IV.1- QUELQUES DÉFINITIONS

- **Pré requis** : notions qui sont nécessaires pour la compréhension d'une nouvelle leçon.
- **la pédagogie** : c'est l'ensemble des méthodes et des techniques d'enseignement destinées à assurer, dans les meilleures conditions possibles, la transmission ou l'appropriation du savoir, en fonction des données de la psychologie de l'enfant.

Dans la compréhension du concept pédagogie, (**Houssaye, 2000**) définit tout acte pédagogique comme l'espace entre trois sommets d'un triangle : l'enseignant, l'étudiant, et le savoir. Les côtés du triangle sont les relations nécessaires à cet acte pédagogique :

- La relation didactique est le rapport qu'entretient l'enseignant avec le savoir et qui lui permet d'enseigner.
- La relation pédagogique est le rapport qu'entretient l'enseignant avec l'étudiant et qui permet le processus former.
- La relation d'apprentissage est le rapport que l'élève va construire avec le savoir dans sa démarche pour apprendre

- **La didactique** s'intéresse aux concepts qui fonctionnent dans une discipline donnée ses éléments particuliers et ses contenus spécifiques de la discipline et montre comment enseigner efficacement pour faire apprendre.

Parler d'un concept nécessite au préalable la formulation des objectifs

- **Un objectif** est une communication d'intention de ce qui est attendu de la part de celui qui le décrit.

Formuler les objectifs rend plus facile le choix des activités, et des méthodes d'apprentissages. Permet de planifier facilement l'enseignement, rend la communication plus facile avec les élèves et permet une évaluation cohérente.

Nous distinguons trois catégories d'objectifs :

- **L'objectif général** concerne la compétence que doit acquérir l'élève à la fin d'un module
- **L'objectif opérationnel** l'un des éléments qui contribue à l'atteinte de l'objectif général et par conséquent c'est l'objectif d'une leçon.
- **L'objectif spécifique** participe à la compréhension de l'objectif opérationnel et doit toujours comporter un verbe d'action afin de susciter chez l'apprenant le désir d'apprendre.

IV.1.1- Objectif pédagogique opérationnel (OPO) de la leçon

A la fin de la leçon sur le génie génétique et les organismes génétiquement modifiés, l'élève sera capable à partir de certaines illustrations de ressortir le rôle des enzymes de restriction dans le domaine de biotechnologies moderne (génie génétique).

IV.1.2- Objectifs pédagogiques intermédiaires ou spécifiques

L'élève sera capable à la fin de cette leçon

- Donner l'origine des enzymes de restriction
- Définir génie génétique
- Donner l'importance des enzymes de restriction en biotechnologie moderne

IV.2- INTÉRÊT DIDACTIQUE

Les enzymes de restriction sont des endonucléases, c'est-à-dire des enzymes capables de cliver les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides à l'intérieur de la chaîne d'un acide nucléique, elles permettent :

- D'évaluer la qualité de l'ADN
- De découper l'ADN et de réaliser des manipulations des gènes. et l'identification de ce gène.
- De réaliser la transgénèse
- La construction d'organismes génétiquement modifiés et leur utilisation dans divers secteurs d'activité dont l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique ou chimique
- D'appréhender la diversité des micro-organismes (bactéries)
- D'établir une carte génétique (carte de restriction) d'une molécule d'ADN
- De comprendre l'impact des mutations.
- De faire le diagnostic de certaines maladies génétiques ou bien encore la plasticité du génome.

IV.3- PRÉPARATION D'UNE LEÇON

Préparer une leçon est un exercice méthodique. Pour bien le mener, l'enseignant doit consulter certains documents tels que le programme officiel, les livres au programme, et d'autres documents en rapport avec la notion à dispenser. Il doit également savoir si la notion a déjà été abordée dans les classes précédentes, donner le contenu de la leçon et communiquer les objectifs de la leçon.

IV.3.1- Modèle de fiche de préparation d'une leçon

FICHE PÉDAGOGIQUE DE PRÉPARATION D'UNE LEÇON DE SVT

ÉTABLISSEMENT	LYCÉE D'ENSEIGNEMENT GÉNÉRAL	NOM ET PRÉNOM DE L'ENSEIGNANT : NGO NKONDJOCK Carole Marguerite. MATRICULE : 05R026 Contact :	
THÈME	IDENTITÉ BIOLOGIQUE ET INFORMATION GÉNÉTIQUE.	DATE	
CHAPITRE VI	LE RENOUVELLEMENT MOLÉCULAIRE ET LE CODE GÉNÉTIQUE.	CLASSE	1 ^{ère} D
TITRE DE LA LEÇON	Le génie génétique : les organismes génétiquement modifiés (OGM) Pratiques et avantages.	EFFECTIF	G F
OBJECTIFS PÉDAGOGIQUES OPÉRATIONNELS	<ul style="list-style-type: none"> - Expliquer que l'homme peut modifier artificiellement la structure du génome. - Donner l'importance des enzymes de restriction en génie génétique. 	DURÉE	55min
		PÉRIODE	

ETAPES	Objectifs Pédagogiques Opérationnels Intermédiaires	Contenus spécifiques aux OPOI	Matériels ou supports didactiques	Activités		évaluation de l'atteinte des OPOI	DURÉE
				Enseignant	Apprenant		
I N T R O D U C T I O N	1- vérifier les pré requis	Les prérequis Le code génétique La biosynthèse des protéines	Cours et apprentissages précédents	Pose les questions aux apprenants	Répond aux questions 1°) est un système de correspondance entre la séquence des nucléotides de l'ARNm et la séquence des acides aminés dans la protéine. 2°) ADN → ARNm → Protéine	1- qu'est-ce-que le code génétique ? 2- quel est le schéma d'obtention d'une protéine ?	10min
	2- identifier et formuler le problème scientifique	quel est le mécanisme de transfert du gène d'un organisme à un autre ?	-vécu quotidien	Pose les questions pour amener les élèves à poser le problème scientifique.	Répond aux questions 1°) de nucléotides 2°) les gènes 3°) oui 4°) quel est le mécanisme de transfert du gène d'un organisme à un autre ?	1- Parlant de l'ADN, de quoi est-il composé ? 2- Lorsque les nucléotides sont segmentés que forment-ils ? 3- Les gènes sont-ils transférables ? 4- quelle est la question qu'on peut se poser ?	
	3-établir le contrat professeur- élève	Titre : Le génie génétique : les organismes génétiquement	programme officiel	Écrit le titre de la leçon	Recopie le titre et les objectifs dans le cahier		

		modifiés (OGM). Pratiques et avantages OPOI : -donner l'origine du gène transféré - donner les substances responsables d'obtention du gène. - Donner l'importance des enzymes de restriction en biotechnologie.	-Projet pédagogique	au tableau et communique les objectifs			
	4- déterminer l'intérêt de la séquence d'apprentissage	Connaitre le rôle des substances impliquées dans l'obtention des gènes.	Vécu quotidien	Pose la question pour amener l'élève à déterminer l'intérêt de la leçon	Réfléchis et détermine l'intérêt de la leçon.	Pourquoi étudie- t-on cette leçon ?	
D E V E L O	1- donner l'origine du gène utilisé en génie génétique.	1- l'origine des gènes transférés Chaque organisme peut être modifié génétiquement. Mais généralement on n'utilise que certaines espèces du monde des micro-organismes, des plantes et des animaux. Et les bactéries sont les plus convoitées.	Vécu quotidien	Pose les questions	réfléchis et répond aux questions 1°) les plantes, les microorganismes, les animaux. 2°) les bactéries 3°) matériel génétique petit, se cultivent et se multiplient facilement. permettent le transfert des gènes d'une bactérie à un autre	Planche 1- quels sont les différents organismes qui peuvent être modifiés génétiquement ? 2- parmi les microorganismes quels sont ceux qui peuvent être utilisés en génie génétique ? 3-Pourquoi ?	10 min

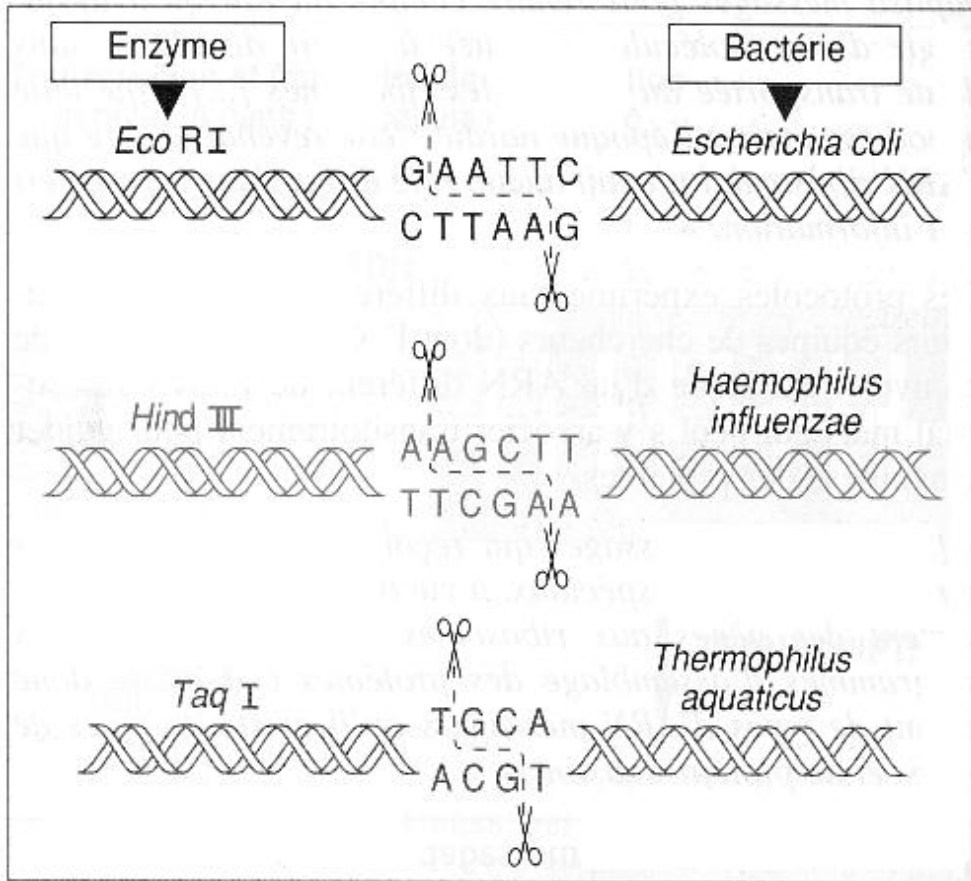
P P E M E N T	<p>2- Donner les substances impliquées dans l'obtention d'un gène.</p> <p>3- Donner l'importance de l'enzyme de restriction en génie génétique.</p>	<p>2- Donner les substances impliquées dans l'obtention du gène Les ADN appartenant à des espèces différentes se différencient par leur séquence de nucléotides, mais aussi, les différences dans la séquence de bases qui ne peuvent s'observer directement sur la molécule. A ce moment on peut se référer indirectement par l'emploi d'enzymes de restriction (analyse de restriction). Les enzymes de restriction sont des endonucléases, qui n'hydrolysent, les liaisons désoxyribose-phosphore ester de la double chaîne de l'ADN lorsqu'elles reconnaissent une séquence spécifique de l'ADN. Ces enzymes sont produites des bactéries.</p> <p>3- L'obtention des plantes transgéniques La transgénèse consiste à ajouter un nouveau gène dans un organisme. Chez les végétaux, plusieurs techniques de transgénèse ont été développées. Une des techniques les plus utilisées en génie génétique est la transgénèse végétale qui est l'utilisation d'une bactérie du sol,</p>	<p>Cours et apprentissages antérieurs Vécu quotidien Document I de la planche</p> <p>Vécu quotidien Document II de la planche</p>	<p>Pose les questions</p> <p>Orienté l'observation des documents et pose des questions</p>	<p>organisme. 1° de nucléotides 2° en utilisant les enzymes de restriction 3° les bactéries.</p> <p>réfléchis et répond aux questions 1° la transgénèse 2° une bactérie Agrobacterium tumefaciens 3° obtenir les plantes transgéniques ou plantes génétiquement modifiées</p>	<p>1- de quoi est composé l'ADN ? 2- dans le document 1 comment les nucléotides peuvent-ils être segmentés dans l'ADN ? 3- quels sont les microorganismes qui produisent ces enzymes de restriction ?</p> <p>1- Dans le document 2 quel est l'application de biotechnologie mise en jeu ? 2- quel est le microorganisme responsable de cette transgénèse ? 3- quel est le but de faire la transgénèse ?</p>	<p>20 min</p>
--	---	---	--	--	---	---	---------------

		<i>Agrobacterium Tumefaciens</i> . Cette bactérie est capable d'injecter un ADN dans une cellule végétale où il s'insère dans le génome chromosomique et permet la production des plantes transgéniques..					
CONCLUSION	La construction d'organismes génétiquement modifiés se fait avec l'insertion dans le génome d'une espèce receveuse un gène d'intérêt isolé à l'aide de ciseaux moléculaires appelés enzymes de restriction lesquelles sont produites par les bactéries.					A partir de quel microorganisme sommes-nous capables d'obtenir les organismes génétiquement modifiés ?	10 min

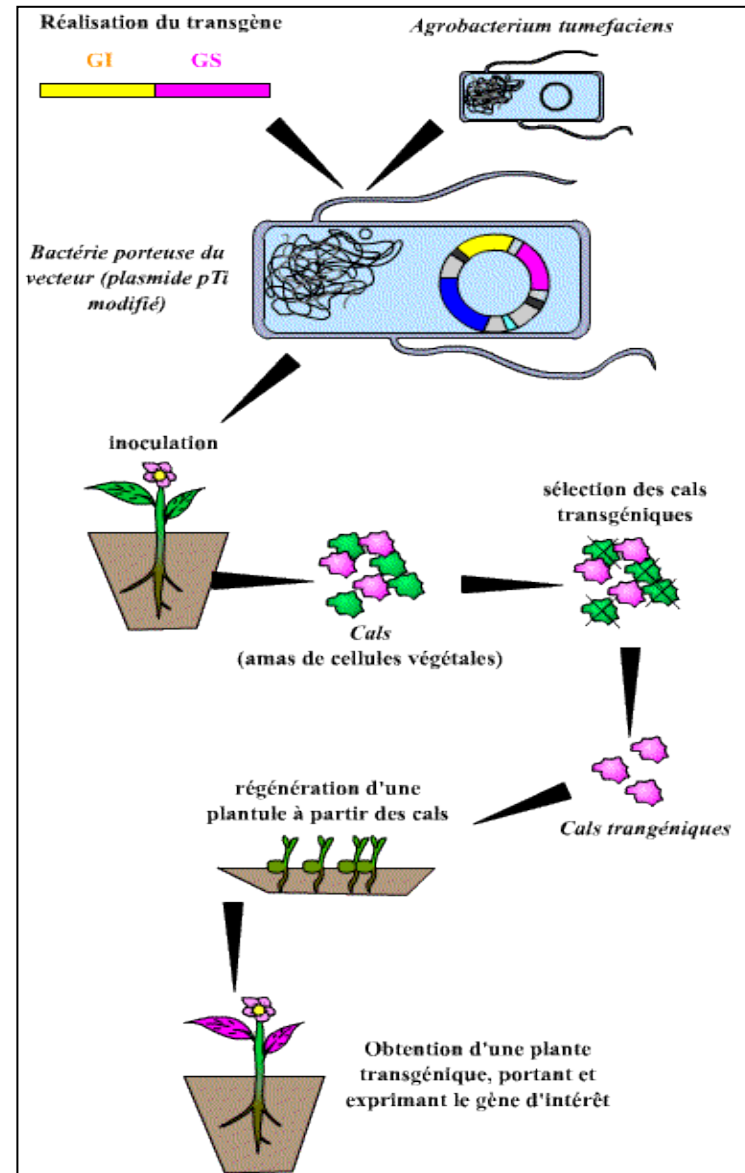
Références bibliographiques

- Livre Majors en Sciences de la Vie et de la Terre en 1^{ère} D.
- Programme officiel.

Planche de la leçon



Document 1



Document 2

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Dans le présent travail où il était question de faire la recherche d'enzymes de restriction des échantillons collectés dans certains quartiers de la ville de Yaoundé, en passant par l'isolement, la culture des extraits bactériens et l'analyse de l'activité enzymatique.

Il ressort de cette étude que sur l'ensemble de 5 échantillons collectés, nous avons pu isoler 25 extraits bactériens. Après réaction avec les extraits bruts et migration électrophorétique, nous avons constaté que seulement 6 extraits ont présenté des activités enzymatiques détectables.

A partir de leur profil de restriction, nous avons pu identifier les enzymes isoschizomère qui sont :

Afl II, Asu I, BstB I, Hae III, Pst I et SnaB I.

Toutes ces isoschizomères trouvées coupent l'ADN à des sites bien déterminés. Ces activités peuvent permettre l'identification de certaines anomalies génétiques, l'établissement des cartes de restriction et obtenir des organismes génétiquement modifiés.

PERSPECTIVES

Les résultats obtenus ont montré la présence des enzymes de restriction dans nos échantillons. Ce travail pourrait être amélioré en vue de l'exploitation des résultats pour d'autres analyses telles que :

- La recherche des conditions idéales pour l'expression des activités dans les extraits négatifs.
- L'estimation des enzymes de restriction obtenus dans une localité.

BIBLIOGRAPHIE

- Aquillare I. (2008) Les enzymes de restriction : analyser l'ADN. *École Estienne, école de l'ADN*.
- Arber W et Linn S. (1969) DNA modification and restriction: *Annual Review of Biochemistry* 38: 367- 500.
- Bonnet I. (2007) Mécanismes de diffusion facilitée de l'enzyme de restriction EcoRV. *Biological Physics*. Université Pierre et Marie Curie. Paris VI.
- Bordas TS., Hatier TS., Didier TS. (2002) Les débuts de la génétique aux... 1, 2, 5 et 6.
- Brigid M.D. (2000) « CTX Prophages in Classical Biotype *Vibrio cholerae*: Functional Phage Genes but Dysfunctional Phage Genomes ». *Journal of Bacteriology*.
- Burgot G. (2002) Méthodes Instrumentales d'Analyse Chimique. *Tec et Doc*.
- Bustard M.T., Whiting S., Cowan D.A., Wright P.C. (2002) Biodegradation of high-concentration isopropanol by a solvent tolerant thermophile, *Bacillus palidus*. *Extremophiles* 6: 319-323.
- Charachon S. (2013) (Relations hôte – bactéries) UE agent infectieux. Faculté de médecine Mont Pellier.
- Cosgrove S.E., Sakoulas G., Perencevich E.N. (2003) Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 36:53-59.
- Dalia R.Y. (2013) Classification des bactéries d'intérêt médical : service de bactériologie EHU ORAN.
- Decoster A. (2013) Classification des bactéries. *FLM* : 1- 3.
- Deleuil M. (2012) La résistance aux antibiotiques : Microbiologie générale.
- Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C. et Martin P. (2004) Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3819 -3822.
- Dublanquet. A. (2009) Des virus pour combattre les infections. *Éditions Favre*. Dryden D.T., Murray N.E., Rao D.N. (2001) "Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes". *Nucleic Acids Res.* 29 (18) 3728–3741.
- Forterre P., Gtibaldo S., et Brochier C. (2005) LUCA: the last universal common ancestor. *Med Sei.* 21 (10): 860-865.
- Favet J. (2014) Séminaire de microbiologie.
- Gaillardin C., Tinsley R. (2007) Génétique moléculaire 1^{ère} année module de Biologie. *Food and environmental Sciences Agro Paris Tech*.

- Gordon R.E., Haynes W.C., Pang C.H.N., Harwood C.R. (1973) The genus *Bacillus*. In *Bacillus* (éd.). *Plenum Press*, New-York. 293-320.
- Houssaye J., Peter L. (2000) Le triangle pédagogique.
- Herron L.L., Chakravarty R., Dwan C., Fitzgerald J.R., Musser J.M., Retzel E., Kapur V. (2002) Genome sequence survey identifies unique sequences and key virulence genes with unusual rates of amino acid substitution in Bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 70: 3978-3981.
- Kandler O., König H. (1993) Cell envelopes of archaea: structure and chemistry. In *The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)*. 223-259.
- Kerstens K., De Vos P., Gillis M., Swings I., Vandamme P. et Stackebrandt E. (2006) Introduction to the *Proteobacteria* in the Prokaryotes. *A Handbook on the Biology of Bacteria*. 3- 37.
- Kluytmans I., Belkum A., Verbrugh H. (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 505 -520.
- Marty N. (2001) Anatomie Fonctionnelle des bactéries. *Laboratoire Bactériologie-Hygiène CHU Ranguel*.
- Martin P.A.W. (1994) An iconoclastic view of *Bacillus thuringiensis* ecology. *Am. Entomol.* 40:85-90
- Parry M., Tumbull P.C.B., Gibson J.R. (1983) A color Atlas of *Bacillus* species London. *Wolfe Medical Publications Ltd*.
- Pierre et Marie Curie. (2003) Structure et croissance bactérienne relations hôtes – bactéries. Faculté de Médecine Cochin- Port- Royal, Université de Paris V.
- Raisonnier A. (2006) Biologie génique et objectifs au cours de formation de base. *IFTAB (2ème année)*, Université Pierre et Marie Curie.
- Rieg S., Bauer T.M., Peyerl G., Held I., Ritter W., Wagner D., Vinzenz K.W.E., Serr A. (2010) *Paenibacillus larvae* bacteremia in injection drug users. *Emerg. Infect. Dis.* 1-7
- Ritchie C. (2012) Purification de protéines par chromatographie sur colonne, Université de Californie à Los Angeles. Etats Unis.
- Roberts R.J. (1976) REBASE- enzymes and genes for DNA restriction and modification “. *Nucleic Acids Res* 35: 269 – 27.
- Rodolphe B and Philippe H. (2007) “CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes”. *Science* 315 (5819) 1709- 1712.

- Sayler G. S., Sanseverino J., Davis K.L. (1997) *Biotechnology in the Sustainable Environment. Plenum Press, New York. Etats- Unis.*
- Smith H.O., Nathans D. (1973) « Letter: A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes ». *J. Mol. Biol.* 81, 419–423.
- Tournier F. (2014) *Initiation à la recherche en microbiologie : Master Sciences.*
- Watson J.D., Gilman M., Witkowski J., M. Zoller. (1992) *Recombinant DNA, 2 ed. Copyright Scientific American Books.*
- Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 87: 4576-4579.*

ANNEXE



Dispositif d'électrophorèse



Camera qui permet de prendre la photo après analyse électrophorétique