

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة العليا للعلوم البيولوجية بهران
Ecole Supérieure en Sciences Biologiques d'Oran



MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biologie Moléculaire

Clonage et expression de l' α -amylase de *Bacillus subtilis* TLO3 dans *Escherichia coli* BL21

Présenté par :

MOKHTARI Hafsa ayat el rahmane
M'HIDI Nourhane

Devant le jury :

Mme.FELIDJ Manel	MCA	ESSB Oran	Présidente
Mr. CHOUBANE Slimane	MCB	ESSB Oran	Encadreur
Mr.MERZOUG Mohamed	MCB	ESSB Oran	Examineur
Mme.RAHLI Fouzia	MCB	ESSB Oran	Examinatrice

Année universitaire : 2019/2020

Dédicaces

À

Nos très chers parents.

On vous remerciera jamais assez pour nous assister financièrement et moralement « vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts. Vous nous avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance, nous sommes redevables d'une éducation dont on est fier ».

À

*nos chères sœurs Imane, Souhila, Amel, Chima, Hind et Chifa
Merci d'être toujours là à nos côtés.*

À

*Nos ami(e)s avec qui on a vécu 5 merveilleuses et inoubliables années
Hiba, Siham, Amina, Chiraz si on vous aime tant c'est à cause de votre sincère amitié et à la confiance que vous nous avez accordé durant cette moitié de décennie.*

À

Okacha et toute notre famille et nos proches

À

Vous cher lecteur

Nous présentons nos remerciements, notre respect et notre gratitude.



« Dans la vie, il y a deux catégories d'individus : ceux qui regardent le monde tel qu'il est, et se demandent pourquoi. Et ceux qui imaginent le monde tel qu'il devrait être, et qui se disent : pourquoi pas ? »
Georges-Bernard Shaw

« J'ai appris que l'on mesure le succès non pas par la situation que l'on a atteinte dans la vie, mais par les obstacles que l'on a surmontés pour essayer de réussir. »
– Booker T. Washington

Remerciements

Au nom de Dieu le plus miséricordieux, nous tenons à exprimer à travers ces quelques lignes l'énorme gratitude et les remerciements les plus chaleureux envers tous ceux qui par leur présence, leur soutien, leurs disponibilités et leurs conseils, nous avons pu accomplir ce projet.

Nos remerciements primordiaux vont à notre cher professeur **Mr CHOUBANE Slimane** qui nous a fait l'honneur de nous encadrer et de nous soutenir. En effet à travers ses précieux conseils qui nous ont orientés vers le bon chemin et nous ont donné la force et le courage d'accomplir ce projet.

Nous tenons également à présenter nos vifs remerciements à Madame Dr **FELIDJ Manel** pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury et au Dr **MERZOUG Mohamed** d'avoir accepté d'examiner, discuter et débattre ce modeste travail.

D'autre part nous adressons nos sincères remerciements à tous les professeurs de l'Ecole Supérieure des Sciences Biologiques d'Oran, pour leur dévouement et leur assistance tout au long de notre cursus.

Que Dieu vous protège

Sommaire

Sommaire	05
Liste des figures	07
Liste des tableaux	08
Liste des abréviations	09
Résumé.....	12
Abstract	13
Résumé en Arabe (ملخص).....	14
I. Introduction générale.....	16
II. Synthèse bibliographiques.....	18
1. Le genre <i>Bacillus</i>	19
1.1 <i>Bacillus subtilis</i>	19
1.1.1 Généralité et description.....	19
1.1.2 Classification	20
1.1.3 Structure de <i>Bacillus subtilis</i>	20
1.1.4 Applications de <i>Bacillus Subtilis</i>	20
1.1.4.1 Production d'enzymes	21
1.1.4.2 Production des antibiotiques	21
1.1.5 Production de biofilms	21
1.2.6 Indicateur biologique de stérilisation	21
2. Alpha-amylase	21
2.1 Définition des Alpha-amylase	22
2.2 Alpha-amylase	22
2.3 Caractéristique de l'alpha-amylase	22
2.3.1 Poids moléculaire.....	22
2.3.2 PH optimum	22
2.3.3 Température optimum	22
2.4 Nomenclature de l' α -amylase	23
2.5 Structure de l'alpha-amylase	23
2.6 Sources et origines de l'alpha-amylase	24
2.7 Applications	24
3. Clonage moléculaire.....	25
3.1 Définition du clonage	25
3.2 Un bref historique	25
3.3 Le principe du clonage moléculaire	25
3.4 Stratégies du clonage moléculaire	26
3.4.1 Clonage traditionnel (Clonage de restriction)	26
3.4.2 Le clonage TA	26
3.4.3 Insertion de terminaisons cohésives (Linkers et adapters)	27
3.4.4 Clonage contondant sans ligature (avec Topoisomérase)	27
3.5 Les enzymes de restriction	28
3.6 Les vecteurs	29
3.6.1 Les propriétés des vecteurs.....	29
3.6.2 Les types de vecteurs de clonage	29

3.7 Les microorganismes hôtes	23
3.8 Les applications du clonage moléculaire.....	30
III. Matériels et méthode.....	31
1. Matériel.....	32
1.1 Matériel biologique	32
1.2 Produits chimiques	32
1.3 Milieux de cultures	32
1.4 Les tampons et solutions	33
2. Méthodes	34
2.1 Culture de la souche <i>B. subtilis</i> TLO3.....	34
2.2 Extraction d'ADN génomique	34
2.3 Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN génomique	35
2.4 Quantification et analyse de la pureté de l'ADN extrait	35
2.5 Amplification du gène d' α - amylase par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	36
2.6 Electrophorèse des produits de PC	37
2.7 Purification du produit de PC	37
2.8 Le clonage moléculaire.....	38
2.9 La transformation bactérienne	39
2.10 Sélection des cellules transformées	39
2.11 Analyse de l'expression du gène α -amylase.....	39
2.12 Zymographie de l'amylase	40
IV. Résultats	41
1. Extraction de l'ADN génomique	42
2. Electrophorèse de l'ADN génomique	43
3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) du gène d' α - amylase	43
4. Résultat attendu du clonage et transformation bactérienne	44
5. Résultat attendu de l'électrophorèse SDS-PAGE et zymographie.....	45
V. Discussion.....	47
1. Extraction de l'ADN génomique.....	47
2. Quantité et qualité de l'ADN génomique	47
3. Amplification du gène alpha amylase par PCR	48
4. Clonage contendant du gène alpha amylase de <i>B. subtilis</i> TLO3	49
5. Transformation du vecteur d'expression portant le gène alpha amylase de <i>B.subtilis</i> TLO3	52
6. Contrôle de l'expression de l'alpha-amylase de <i>B. subtilis</i> TLO3.....	53
VI. Conclusion et perspectives.....	55
VII. Références bibliographiques	57

Liste des figures

Figure 1 : Vue sous microscope d'une <i>Bacillus subtilis</i> et son endospore.....	20
Figure 2 : Structure tridimensionnelle de l'alpha -amylase avec ses trois domaines distincts A (rouge), B (vert) et C (bleu).....	23
Figure 3: Carte du vecteur d'expression pEASY-E1 blunt.....	38
Figure 04 : Aspect macroscopique des isolats de <i>Bacillus subtilis</i> TLO3.....	42
Figure 05: Electrophorèse sur gel d'agarose (0,8%) de l'ADN génomique de <i>Bacillus subtilis</i> TLO3.....	43
Figure 06 : Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) du gène de l'alpha- amylase de <i>Bacillus subtilis</i> TLO3.....	44
Figure 7 : Représentation des résultats probables après transformation.....	45
Figure 8: Electrophorèse SDS-PAGE des protéines de <i>B. subtilis</i> TLO3.....	45
Figure 9: Zymographe de l'amylase de <i>B. subtilis</i> TLO3.....	46

Liste des tableaux :

Tableau 01 : La classification de <i>Bacillus Subtilis</i>	20
Tableau 02 : Exemples des applications industrielles des enzymes	23
Tableau 03 : Les endonucléases de restriction les plus fréquemment utilisées	28
Tableau 04 : Les différents types de vecteurs	29
Tableau 05 : Quelques souches d' <i>E.coli</i> compétentes utilisées dans le clonage	30
Tableau 06 : Différentes application du clonage moléculaire.....	30
Tableau 07 : Composition du mix de PCR pour l'amplification du gène α - amylase de <i>B. subtilis</i> TLO.....	36
Tableau 08 : Programme de la PCR pour l'amplification du gène α - amylase de <i>B. subtilis</i> TLO3	37
Tableau 09 : Dosage spectrophotométrique d'ADN extrait	42
Tableau 10 : Tableau indicatif de différentes études réalisées concernant le clonage du gène alpha amylase de différentes souches de <i>Bacillus</i>	50

Liste des abréviations :

ADNc : L'ADN complémentaire

ADN : acide désoxyribonucléique

ARNm : L'acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine-triphosphate

BAC : Bacterial Artificial Chromosome

BB : Binding buffer

dNTP : désoxyribonucléoside triphosphate

DO : Densité Optique

EB : Elution buffer

E. coli: *Escherichia. coli*

EDTA : Acide Éthylène-Diamine-Tétraacétique

Hcl : Acide chlorhydrique

HIFI : high fidelity

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

Kb : kilo base

kDa : Kilo Dalton

lacZ : Opéran lactose

LB : Lysogeny broth

MEB : Microscope

MgCl₂ : chlorure de magnésium

MgSO₄ : Magnesium sulfate

NaCl : Chlorure de sodium

NH₄Ac : Acétate d'ammonium

Nm : Nanometer

ORF : Open reading frame

PCR : Polymerase chain reaction

Pfu : *Pyrococcusfutiokus*

RBS : Ribosome binding site

RM: Restriction modification

SDS : Laurylsulfate de sodium

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SOC : Super optimum medium

TBE : Tris-borate-EDTA

TE :Tris-EDTA

TRIS : Tris-hydroxyméthyl-amino-méthane

UV : Ultraviolet

X-gal :5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

YAC :Yeast Artificial Chromosome

WB : Wash buffer

Avant propos

Avant d'aborder l'essence de notre thème, Nous tenons à mettre entre les mains des lecteurs certaines données qui nous ont empêché de faire un travail de la qualité que nous avions espéré.

Le confinement qui nous a été imposé par la situation sanitaire que traverse le monde (Pandémie du COVID-19) nous a obligé de suspendre la partie pratique de notre travail à partir du mois Mars 2020.

En effet, une partie de notre travail a été réalisée au niveau du laboratoire avec des résultats encourageants. Pour le reste, il a été fait en simulation en essayant de projeter les résultats d'autres recherches similaires sur notre thème.

Ceci dit, nous espérons néanmoins que ce travail servira d'ébauche pour des recherches ultérieures et plus approfondies sur ce sujet.

Résumé

Les α -amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie et à l'échelle industrielle. Ces enzymes sont produites en industrie essentiellement par des sources microbiennes notamment les bactéries du genre *Bacillus*.

Dans cette étude le gène de l' α -amylase thermostable produite par la souche *Bacillus subtilis* TLO3 a été cloné et exprimé dans une bactérie *Escherichia coli* BL21 compétente. L'ADN génomique de la souche *Bacillus subtilis* TLO3 a été extrait par une technique de « *Salting out* » et le gène alpha amylase a été amplifié en utilisant une PCR qui est basé sur l'utilisations de la Taq polymérase à haute fidélité. Ceci a permis d'obtenir un gène d'alpha amylase avec des extrémités franches, et le produit de PCR a été analysé par une électrophorèse sur gel d'agarose pour contrôler la taille du gène qui est de 1980 bp ; puis a été purifié en utilisant un kit de purification.

Le produit PCR purifié a subi un clonage blunt réalisé par un kit de clonage et d'expression (*PEASY®-Blunt E1 Expression Kit*). Les plasmides recombinants ont été incorporés dans la bactérie compétente *E. coli* BL21(DE3) par un choc thermique. Par la suite une sélection sur la base de la résistance à l'ampicilline a été réalisée pour sélectionner les transformants ayant acquis la résistance et donc le vecteur porteur du gène α -amylase cloné. Les bactéries transformées ont été cultivées sur des boîtes LB- ampicilline, parallèlement avec des bactéries témoins négatives.

Enfin, l'expression du gène α -amylase de la souche *Bacillus subtilis* TLO3 par la bactérie *E. coli* BL21 a été vérifiée. L'analyse *SDS-PAGE* suivi d'une zymographie des protéines de la culture de cellules *E. coli* recombinantes, a montré d'une bande d'un poids moléculaire de 72 kDa ; correspondant à la taille de l'enzyme α -amylase de *Bacillus subtilis*TLO3.

Mots clés : alpha amylase ,*Bacillus subtilis* ,*Escherichia coli* BL21, clonage moléculaire ,expression hétérologue .

Abstrac

α -amylases are among the most important enzymes in biotechnology and at the industrial level. These enzymes are produced in industry mainly by microbial sources including bacteria of the genus *Bacillus*

In this study, the gene of a thermostable α -amylase produced by *Bacillus subtilis* TLO3 strain was cloned and expressed in a competent *Escherichia coli* bacterium. The genomic DNA of the strain *Bacillus subtilis* TLO3 was extracted by a “Salting-out” technique and the α -amylase gene was amplified using a PCR that is based on the uses of Taq high-fidelity polymerase. This allowed to obtain a gene of α -amylase with blunt ends. The PCR product was analyzed by agarose gel electrophoresis to control the gene size which is 1980 bp; then was purified using a purification kit.

The purified PCR product underwent a blunt cloning using a cloning and expression kit (pEASY®-Blunt E1 Expression Kit). The recombinant plasmids were incorporated into the competent bacteria *E. Coli*BL21(DE3) by a heat shock. Subsequently, a selection based on ampicillin resistance was realized to select the transformants that acquired the resistance and thus the vector that carries the cloned α -amylase gene. The transformed bacteria were grown on LB-ampicillin plates in parallel with negative control bacteria.

Finally, the expression of the *Bacillus subtilis* TLO3 α -amylase gene by *E. coli* BL21 was examined. The SDS-PAGE analysis followed by an amylase zymography of recombinant *E. coli* cell culture proteins showed bands with a molecular weight of 72 kDa; corresponding to the size of the α -amylase enzyme of *Bacillus subtilis* TLO3

Keywords:alpha amylase , *Bacillus subtilis* , *Escherichia coli* BL21 , molecular cloning , heterologous expression.

الفاميلاز هي من بين أهم الإنزيمات في التكنولوجيا الحيوية وعلى المستوى الصناعي. ويتم إنتاج هذه الإنزيمات في الصناعة أساساً من مصادر ميكروبية بما في ذلك البكتيريا من جنس العصيات (*Bacillus*). في هذه الدراسة، تم استنساخ جين الفاميلاز القابل للحرارة الناتج عن سلالة *Bacillus subtilis* TLO3 وتم التعبير عنه في بكتيريا *Escherichia coli* المختصة. كما تم استخراج الحمض النووي الجيني للسلالة *Bacillus subtilis* TLO3 بواسطة تقنية " التلميح ،" و تضخيم جين الفاميلاز بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل الذي يعتمد على استخدام بوليميراز عالي الدقة، هذا سمح بالحصول على الجين الفاميلاز مع نهايات حادة ، الذي خضع للتحليل بواسطة تقنية الفصل الهلامي بهدف التأكد من حجم الجين الذي يتمثل في 1980 bp ؛؛ بعدها تم تنقيته باستخدام أدوات التنقية. خضع منتج الفاميلاز المنقى لعملية استنساخ حادة باستخدام مجموعة الاستنساخ والتعبير pEASY®-Blunt E1 (Expression Kit ، اين تم دمج البلازميدات المؤلفة في البكتيريا المختصة *E. coli* BL21 (DE3) بواسطة صدمة حرارية. بعدها تمت عملية اختيار تعتمد على مقاومة الأمبيسلين لتحديد المحولات التي اكتسبت المقاومة و بالتالي بتحديد الناقل الذي يحمل جين ألفا الأميليز المستنسخ، حيث نمت البكتيريا المحولة على صفائح LB- ampicillin بالتوازي مع بكتيريا التحكم السلبية. وأخيراً، تم فحص تعبير جين ألفا الفاميلاز المنتج من قبل *E. coli* BL21 حيث أظهر تحليل صفحة الفصل الكهربائي لهلام كبريتات دوديكل الصوديوم متعدد الأكريلاميد المتنوع بتحليل زيموغرافي للبروتينات المركبة من طرف البكتيريا المتحولة شريطاً وزنه جزيئي 72 kDa ؛ مطابقاً لحجم ألفا أميلاز الناتج عن سلالة *Bacillus subtilis* TLO3

الكلمات المفتاحية : ألفا أميليز، *Bacillus subtilis* ، *Escherichia coli* BL21 ، الاستنساخ، التعبير

1. Introduction générale

Introduction générale

1. Introduction générale

Compte tenu de la demande sans cesse croissante de procédés industriels et de produits d'entretien ménager rentables, à faible consommation d'énergie et respectueux de l'environnement, la production d'enzymes occupe une place essentielle dans le domaine de la biotechnologie où leur utilisation est préférée aux procédés chimiques car elles offrent un certain nombre d'avantages, notamment de meilleurs rendements et des économies de coûts, un respect de l'environnement, une plasticité et une grande disponibilité. L'hydrolyse enzymatique permet également un meilleur contrôle de la spécificité de la réaction et de la stabilité des produits générés (Truppo, 2017).

Parmi ces enzymes à large application commerciale, on trouve les amylases.

Aujourd'hui, un grand nombre d'amylases microbiennes sont disponibles dans le commerce et elles ont presque complètement remplacé l'hydrolyse chimique de l'amidon dans l'industrie de transformation de l'amidon (Elyasifar, Ahmadi, Khosroshahi, & Dilmaghani, 2019). Les amylases sont parmi les enzymes, celles qui occupent une place de choix. Ce sont les plus importantes et sont d'une grande importance en biotechnologie, constituant une classe d'enzymes industrielles représentant environ 25% du marché mondial des enzymes (OZDEMIR, CIHAN, Kilic, & Cokmus, 2019). Leur importance réside dans leurs applications potentielles dans un grand nombre de processus industriels tels que l'industrie alimentaire, la fermentation, le textile, le papier, les détergents et les produits pharmaceutiques... Aussi, avec les progrès de la biotechnologie, l'application des amylases s'est développée dans de nombreux domaines tels que la chimie clinique, médicinale et analytique, ainsi que leur application généralisée dans la saccharification de l'amidon et dans l'alimentation, du brassage et de la distillation (Elyasifar et al., 2019).

Les α -amylases (EC 3.2.1.1) sont des hydrolases endoglycosyliques qui clivent aléatoirement les liaisons α -1,4-glycosidiques présentes dans l'amidon. Cette réaction génère des oligosaccharides linéaires et ramifiés de différentes longueurs (Kannan & Kanagaraj, 2019)

Les systèmes fongiques et bactériens sont largement utilisés dans la production de l' α -amylase. En ce qui concerne les bactéries, les *Bacillus* est préféré en raison des nombreux avantages caractéristiques qu'offre ce genre (Daniel, Sudantharadevi, & Sowmiya, 2017). L'utilisation de ce dernier a connu un développement considérable en raison de sa capacité de production économique en vrac des enzymes et de sa facilité de culture pour la production d'enzymes performantes avec de bonnes propriétés (ex : thermostabilité) (Teodoro & Martins, 2000).

Ce genre est considéré comme un modèle, car il a été largement étudié et grâce à sa diversité, son génome entièrement séquencé et sa facilité de transformation en

1. Introduction générale

laboratoire (Errington & Aart, 2020). Aussi, sa culture aisée et sa maniabilité ont permis son exploitation dans divers domaines ce qui lui confère une valeur économique et scientifique très importante (Borriss et al., 2018).

De plus, la capacité des espèces du genre *Bacillus* de former des spores très résistantes dans des conditions non favorables et la production d'une grande variété d'enzymes lui ont permis d'occuper une place très importante dans l'industrie.

La faible incidence de pathogénicité, a mené à l'utilisation de l'espèce *Bacillus subtilis* dans un large champ d'applications industrielles notamment le domaine médical, agro-alimentaire, écologique. Elle occupe également une place importante dans la production des enzymes (Bouhairi, 2017).

Cependant, souvent ces microorganismes producteurs d'enzymes industrielles ne peuvent pas atteindre des productions satisfaisantes et nécessitent des conditions de culture et d'induction spéciales. Ainsi, parfois il est nécessaire d'utiliser un consortium d'enzymes dans certaines applications industrielles (exemple : saccharification et fermentation dans la production de bioéthanol). Donc, pour palier à ces contraintes l'un des moyens est l'expression hétérologue de ces enzymes dans un organisme hôte. Cette expression qui se fait suite au clonage du gène codant pour l'enzyme d'intérêt, permet de produire de grandes quantités sans l'utilisation de milieux de culture fastidieux, et aussi offre la possibilité d'exprimer plusieurs enzymes par une même souche et ainsi contourner les limitations des cocultures.

Dans ce contexte l'objectif de ce travail est de cloner et d'exprimer le gène d'une alpha amylase thermostable caractérisée, de la souche de *Bacillus subtilis* TLO3 préalablement isolée et dont le génome a été complètement séquencé et annoté et dans une bactérie hôte *E. coli*

Synthèse
bibliographique

2. Synthèse bibliographique

1. Le genre *Bacillus* :

Les *Bacillus* sont de bactéries à Gram positif, en forme de bâtonnets, souvent groupées en chaînettes ou isolées, elles sont aérobies ou anaérobies facultatives, formant des spores (quand les éléments nutritifs sont épuisés ou en conditions de stress), et très souvent mobiles sauf *Bacillus Anthracis*. Le genre *Bacillus* est parmi les microorganismes les plus abondants et omniprésents dans la nature, son principale habitat est le sol (Camille, 2014). Ce genre est devenu très exploité dans plusieurs applications ou il représente une source d'enzymes industrielles telles que : les protéase, cellulase, amylase ...

Dans L'industrie pharmaceutique il est impliqué dans production des antibiotiques, fabrication des médicaments et des vaccins (Kunst et al., 1997). Les *Bacillus* sont capables aussi de sécréter des biomolécules, telle que : les biosurfactants utilisés dans l'industrie pétrolière et alimentaire (Banat et al., 2010; Kaya-Ongoto & Kayath, 2018).

1.1. *Bacillus subtilis* :

1.1.1 Généralité et description :

L'avancement des connaissances en matière de microbiologie, biologie moléculaire et biotechnologie a permis d'élargir le champ d'application des micro-organismes dans le cadre d'une exploitation industrielle à grande échelle. Parmi les micro-organismes exploités, on trouve *Bacillus subtilis* qui occupe une place importante dans l'histoire de la bactériologie. Elle est aussi parmi les espèces les mieux caractérisées du point de vue génétique et biochimique. Appelée à l'origine *Vibrio subtilis* en 1835, cet organisme a été renommé *Bacillus subtilis* en 1872. C'est une bactérie ubiquitaire à Gram positif, catalase positive, aérobie pouvant se développer en anaérobiose en présence de nitrate comme accepteur final d'électron, mobile par des flagelles péritriches, on les trouve naturellement dans le sol et la végétation. *Bacillus subtilis* croît dans une température mésophile. La température optimale est de 25° à 35° (Kovács, 2019). En cas de stress (conditions acides, osmotiques, alcaline), ou de famine, *Bacillus subtilis* développe un ensemble de stratégies qui permettent la survie dans ces conditions difficiles. Une stratégie, par exemple, est la formation d'endospores résistantes au stress. Une autre stratégie est l'acquisition d'ADN externe, qui permet aux bactéries de s'adapter par recombinaison (McKenney, Driks, & Eichenberger, 2013; Piggot & Hilbert, 2004).

C'est une bactérie modèle très étudiée dont le génome, entièrement séquencé, est facilement transformable au laboratoire. Sa culture aisée et sa maniabilité ont permis son exploitation dans divers domaines ce qui lui confère une valeur économique et scientifique très importante (Guoyan et al., 2019).

2. Synthèse bibliographique

1.1.2 Classification :

Tableau1 : La classification de *Bacillus Subtilis*(Kovács, 2019).

Domaine	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus spore</i>	<i>Subtilis</i>

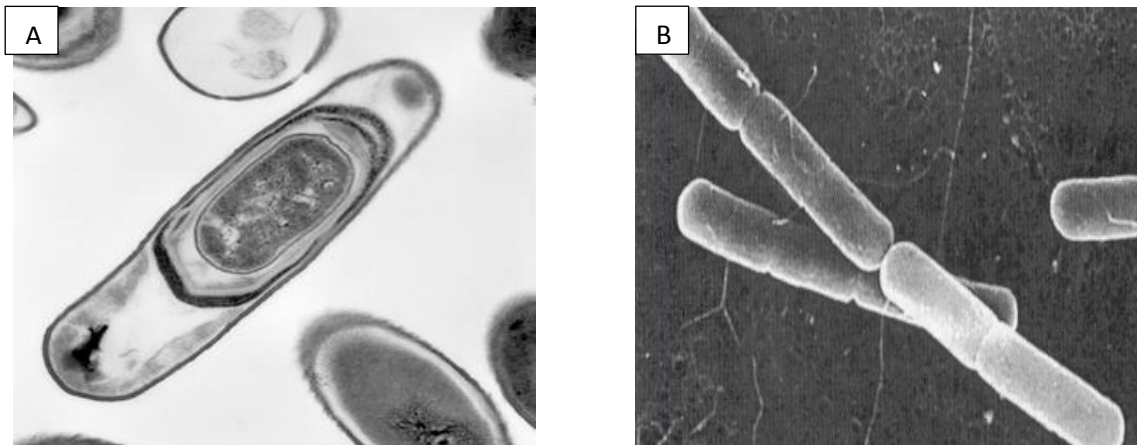


Figure 1: Vue sous microscope d'une *Bacillus subtilis* et son endospore.

A : Observation au microscope électronique à balayage MEB d'une bactérie *B. subtilis* ;

B : Observation au microscope électronique à transmission d'une spore de *Bacillus*

subtilis. (Bouhairi, 2017)

1.1.3 Structure de *Bacillus subtilis*:

La paroi de *Bacillus subtilis* est composée de (10-20) couches de peptidoglycane, qui est un polymère de sucres et d'acides aminés. Son génome est composé d'un chromosome circulaire dont la taille totale est de 4 214 814 pb et un pourcentage de 43.5% en GC. Au total, 4100 gènes ont été identifiés dont 271 sont indispensables à la survie de la bactérie (Bouhairi, 2017).

Sur les 4100 gènes 79 sont considérés comme essentiels (le métabolisme ; division ; traitement de l'information) (BARICH, 2018).

1.1.4 Applications de *Bacillus Subtilis*:

1.1.4.1 Production d'enzymes:

B. subtilis est connue par la production des enzymes importantes industriellement. Ces enzymes produites possèdent diverses applications industrielles :

2. Synthèse bibliographique

Tableau 2 : Exemples des applications industrielles des enzymes

Enzyme	Souche	Température	pH	Poids moléculaire	Applications	Références
Ex : alpha- amylase	<i>B.subtilis</i> TLO3	70 °	7	72 KDa	Bioéthanol Boulangerie	(Choubane & Cheba, 2017)
Cellulase	<i>B. subtilis</i> YJ1	60 °	7.5	32.5 KDa	L'industrie des biocarburants	(Yin, Lin, & Xiao, 2010)
Lipase	<i>B. subtilis</i> I-4	50 °	7	55 KDa	Production du biodiesel	(Iqbal & Rehman, 2015)
Protéase Alcaline	<i>B. subtilis</i> N CIM 2713	70 °	8	20 KDa	Les détergents	(Mane & Bapat, 2001; Schallmeyer, Singh, & Ward, 2004)

1.1.4.2 Production des antibiotiques :

Durant les premiers stades de la sporulation, *B. subtilis* est capable de produire plusieurs antibiotiques de structures variées, une moyenne d'environ 4 à 5% de son génome est consacré à la production de ces antibiotiques : mycobacilline, surfactine, bacilysine, bacitracine, difficidine, amicoumacine, mycobacilline, Rhizocitine (Nakkeeran, Vinodkumar, Renukadevi, Rajamanickam, & Jogaiah, 2019; Stein, 2005).

1.1.4.3 Production de biofilms :

Des amas structurés de cellules bactériennes enrobés d'une matrice polymérique et attachés à une surface appelé biofilm sont produits par *B. subtilis* quand les conditions du milieu environnant sont favorables, les biofilms sont utilisés pour la protection de l'environnement. Par une technologie des bioréacteurs, appliquées à la purification des eaux usées et de l'air usé, à la dépollution des sols et à la décomposition des déchets solides (Brück, Delvigne, Dhulster, Jacques, & Coutte, 2019; Morikawa, 2006).

1.1.4.4 Indicateur biologique de stérilisation :

Les spores de *B. subtilis* sont utilisées comme indicateur biologique pour valider les procédures de stérilisation grâce de leur résistance élevée aux procédures de stérilisation, par conséquent, un procédé qui neutralise ces spores assure une élimination complète des autres microorganismes ("US Pharmacopeia," 2020).

2. Synthèse bibliographique

2. Alpha-amylase

2.1 Définition des alphas-amylases :

Laplus ancienne référence historique concernant l'utilisation commerciale d'enzymes remonte à une description de fabrication du vin dans l'ancienne Babylone (2100 av JC) ; l'utilisation de microorganismes comme source d'enzymes pour les fermentations était très répandu dans les anciennes civilisations (Hames, Hooper, & Houghton, 2006). Les amylases, sont un groupe d'enzymes (α -amylase, la β -amylase et la glucoamylase) qui hydrolysent les liaisons glucosidiques α (1-4) glucane et α (1-6)-glucane présentes dans l'amidon à différentes endroits. Cependant, les découvertes récentes de nouvelles enzymes et de nouveaux effets d'enzymes connues sur l'amidon et les connaissances accumulées sur les structures primaires et tertiaires des enzymes ont élargi le concept d'amylase (Ozturk, Denizci, Ogan, & Kazan, 2014).

2.2 Alpha-amylase :

Les α -amylases (E.C.3.2.1.1) sont des enzymes hydrolytiques qui peuvent cliver aléatoirement des liaisons α -1,4-glycosidiques dans les molécules d'amidon pour générer des polymères progressivement plus petits constitués d'unités de glucose .La plupart des α -amylases appartiennent à la famille des glycosides hydrolases 13 (GH13)(Uygun & Tanyildizi, 2018) .

2.3 Caractéristique des alphas amylases :

2.3.1 Poids moléculaire :

Le poids moléculaire des α - amylases varie d'une origine à l'autre et d'une espèce à l'autre. Il est compris entre 40.000 et 90.000 daltons. Celui des α - amylases de levure, s'échelonne entre 40.000 et 70.000 daltons (Gupta, Gigras, Mohapatra, Goswami, & Chauhan, 2003).

2.3.2 PH optimum :

Les α -amylases sont généralement stables dans une gamme de pH de 5 à 8, avec un optimum se situant entre 4 à 5 pour les α -amylases fongiques et un optimum supérieur à la neutralité 6 à 8.5 pour les α -amylases bactériennes. Pour les levures, l'enzyme requiert, selon les espèces, des pH entre 4 à 6 (Gupta et al., 2003) .

2.3.3 Température optimum :

Les amylases microbiennes, quant à elles, ont une forte thermostabilité (30°C–60°C) et leur température optimale peut être plus élevée, se situant entre 40°C et 70°C et (Ohdan et al., 1999). Selon l'origine et les espèces, les α - amylases ont des températures optimales

2. Synthèse bibliographique

comprises entre 40°C et 90°C(Nouadri, 2011) .

2.4 Nomenclature de l' α -amylase :

- Nom codifié : E.C.3.2.1.1 ;
- Nom commun : α -amylase ;
- Nom systématique : 1,4- α -D-glucane-4-glucano hydrolase ;
- Synonymes : glycogénase, endoamylase, taka-amylase, maxilase.

2.5 Structure d'alpha amylase :

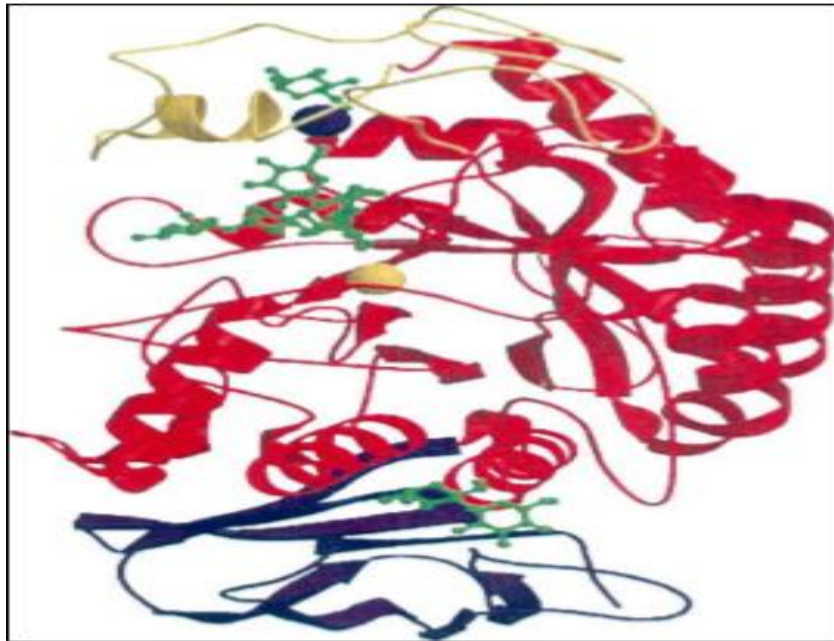


Figure 2 : Structure tridimensionnelle de l' α -amylase avec ses trois domaines distincts :

A (rouge), B (vert) et C (bleu)(de Souza & de Oliveira Magalhães, 2010).

L' α -amylase a une structure tridimensionnelle capable de se lier au substrat, et par l'action des groupes catalytiques hautement spécifiques, favorise la rupture des liaisons glycosidiques(de Souza & de Oliveira Magalhães, 2010) . La protéine contient trois domaines : A, B et C (Figure 2).Le domaine (A) a une structure à tonneau TIM à N-terminal et se trouve entre les domaines B et C. Le domaine (B) consiste en une longue boucle qui déborde entre le brin β 3 et l'hélice α 3. Enfin, le domaine (C) a une structure en feuillet β lié au domaine A. Le tonneau TIM (α/β)₈ est constitué de huit brins β et huit hélices α qui s'alternent. Le tonneau contient quatre régions très conservées très reliées au site actif présent dans toutes les α -amylases. Ces régions couvrent les brins β 3, β 4, β 5 et β 7 et sont utilisées pour définir la famille de l' α -amylase (CHOUBANE, 2017)

2. Synthèse bibliographique

2.6 Sources et origines de l'alpha amylase :

Les α -amylases sont des enzymes omniprésentes produites par les plantes, les animaux et les microbes, où elles jouent un rôle important dans le métabolisme des glucides. Les Alpha-amylases de sources végétales et microbiennes ont été utilisées pour siècles comme additifs alimentaires (KOLLI Narimane, 2014) .

Les amylases d'orge ont été utilisées dans l'industrie brassicole. Les amylases fongiques ont été largement utilisées pour la préparation des aliments orientaux (Z. Liu et al., 2012). Actuellement c'est les amylases fongiques et bactériennes qui sont les plus utilisées en industrie grâce à leur grande stabilité (Dey, Kumar, Banerjee, Chandna, & Kuhad, 2016) .

2.7 Applications :

Vu leur propriétés intéressantes et leurs potentiel biotechnologiques les alpha-amylases ont acquis une place de choix dans la recherche et les différents secteurs économiques. De ce fait, les alpha-amylases ont beaucoup d'applications car elles ont une grande stabilité, sans danger pour l'homme et l'environnement et présentent de bons rendements. Il existe de nombreuses applications qui motivent la recherche pour produire cette enzyme de manière optimale, sûre et pratique (Gupta et al., 2003; Sharma & Satyanarayana, 2013) .

Les alpha-amylases sont parmi les hydrolases .Les amylases sont utilisées dans des applications de transformation d'amidon, le désencollage des textiles, le dimensionnement du papier, comme additif détergent, et l'amélioration du pain, les industries pharmaceutiques, l'éthanol et d'autres procédés de fermentation (Elyasifar et al., 2019). Dans ce contexte, il est à noter leur utilisation pour des études structurales de molécules les plus importantes pour toutes les industries à base d'amidon, et leur commercialisation est la plus ancienne, avec une première utilisation en 1984 à partir d'*Aspegillusoryzae* connu sous le nom de «Taka diastase» comme produit pharmaceutique pour le traitement de désordres digestifs comme elles sont utilisées aussi comme agent anti inflammatoire (Minoda, Koyano, Arai, & Yamada, 1968). Aujourd'hui, les amylases détiennent la plus grande part du marché mondial des enzymes (Shruthi, Achur, & Nayaka Boramuthi, 2020).

2. Synthèse bibliographique

3. Clonage moléculaire

1.1 Définition du clonage :

Le clonage moléculaire est l'une des techniques de base de génie génétique. Il désigne principalement le processus de multiplication d'un organisme, d'une cellule souche ou d'un gène d'une même entité originale, en grand nombre d'exemplaires identiques (soit *in vitro*, soit *in vivo*) (Brown, 1990).

3.2 Un bref historique :

Le clonage moléculaire est une technique révolutionnaire du génie-génétique, mais qui est le fruit de l'accumulation de découvertes majeures, dont les plus marquantes sont comme suit ("GenScript," 2020) :

1961 : Première nucléase isolées.

1962 : Publication d'un modèle de recombinaison d'ADN dans les phages.

1967 : Isolement et caractérisation d'ADN ligase.

1972 : Première transformation d'*E. coli*.

1976 : La synthèse du premier gène synthétique.

1977 : Séquençage d'ADN par la méthode de Sanger et développement du premier vecteur de clonage pBR322 .

1983: PCR inventée.

3.3 Le principe du clonage moléculaire :

Le clonage moléculaire traditionnel s'appuie sur des étapes indispensables :

- Extraction des acides nucléiques (ADN, ARNm, synthèse d'ADNc).
- Séparation électrophorétique des acides nucléiques et visualisation.
- Fragmentation enzymatique d'ADN : par les enzymes de restriction qui coupent sélectivement l'ADN exogène et pas l'ADN bactérien car il est protégé par une enzyme appelée méthylase. Ou fragmentation mécanique par méthode shotgun .
- L'insertion d'un fragment d'ADN (insert) dans un vecteur approprié (plasmides, BAC, rétrovirus) contenant des gènes de résistances aux antibiotiques.
- Ligature de l'ADN par ADN ligase dans une stratégie de clonage d'un ADN sur un vecteur.

Le nouveau vecteur ainsi créé sera ensuite introduit dans une cellule hôte, en générale la bactérie *Escherichia coli*.

2. Synthèse bibliographique

- Transformation

bactérienne : il existe plusieurs méthodes pour introduire un vecteur dans une bactérie: Méthodes physico-chimiques, Choc thermique ou électrique (électroporation) (CARCY, 2018)

- Sélection colorimétrique de bactéries contenant un vecteur recombinant :

Les marqueurs de sélection les plus utilisés sont les gènes de résistance aux antibiotiques : l'ampicilline, la tétracycline, le chloramphénicol et la kanamycine (CARCY, 2018).

Sélection bleu/blanc : le vecteur porte le gène *lacZ* (codant pour la β -galactosidase) Cette enzyme transforme également le X-galactose (X-gal) incolore en un produit bleu qui s'accumule dans les cellules. Si un fragment d'ADN est inséré dans le gène *lacZ*, celui-ci ne sera plus fonctionnel et la conversion du X-gal ne sera plus possible. Les colonies resteront blanches. En absence d'insert, le gène *lacZ* sera fonctionnel et la colonie bactérienne deviendra bleue (Karl Perron, 2007).

- La construction d'une banque d'ADN génomique ou ADNc (complémentaire) (CARCY, 2018).

3.4 Stratégies du clonage moléculaire :

3.4.1 Clonage traditionnel (Clonage de restriction) :

Egalement appelé clonage PCR, nécessite l'utilisation de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour amplifier la séquence matrice d'intérêt (généralement le gène d'intérêt) et ajouter des sites de restriction aux extrémités de la séquence. Des enzymes de restriction sont utilisées pour couper à la fois la matrice d'intérêt et le vecteur cible, et l'ADN ligase est utilisée pour joindre les extrémités collantes de la matrice et du vecteur ensemble. Cependant, le clonage traditionnel peut être lourd et les réactifs nécessaires peuvent être coûteux ("Molecular Cloning Handbook," 2016) .

3.4.2 Le clonage TA :

Egalement appelé clonage rapide ou clonage T est une technique de clonage qui ne nécessite pas l'utilisation d'enzymes de restriction et qui est plus rapide que le clonage traditionnel. La technique repose sur la capacité de l'adénine (A) et de la thymine (T) (paires de bases complémentaires) sur différents fragments d'ADN à s'hybrider et en présence de ligase à se ligaturer ensemble. Les produits de PCR sont généralement amplifiés en utilisant la *Taq* polymérase qui ajoute de préférence une adénine à l'extrémité 3' du produit. De tels inserts amplifiés par PCR sont clonés dans des vecteurs linéarisés qui ont des surplombs de

2. Synthèse bibliographique

thymine 3' complémentaires. L'inconvénient de la technologie de clonage TA est que le clonage n'est pas directionnel, ce qui signifie que le gène d'intérêt peut être inséré dans le vecteur cible soit dans l'orientation sens ou anti sens (Zhou & Gomez-Sanchez, 2000).

3.4.3 Insertion de terminaisons cohésives (*Linkers* et *adapters*) :

Le choix de l'utilisation de la méthode de lieurs (*linkers*) ou d'adaptateurs (*adapters*) est basé sur l'application et les extrémités de l'ADN d'intérêt.

La première méthode implique l'utilisation de lieurs (*linkers*). Ce sont de courtes séquences à double brin synthétiques, de séquence nucléotidique connue. Ils possèdent des extrémités cohésives des deux côtés et des sites de restriction BamHI. L'ADN ligase peut attacher les lieurs aux extrémités franches (*Blunt ends*) de la molécule d'ADN, ce qui va engendrer une ligature à extrémité franche. Cependant, la digestion avec BamHI clive les chaînes au niveau des séquences de reconnaissance, produisant un grand nombre de lieurs clivés et le fragment d'ADN d'origine, portant maintenant des extrémités cohésives BamHI. Ce fragment modifié est prêt pour la ligature dans un vecteur de clonage restreint avec BamHI (Seth, 1984).

La deuxième méthode de fixation des extrémités cohésives à une molécule d'ADN à extrémités franches utilise les adaptateurs (*adapters*), qui sont de courtes séquences nucléotidiques synthétiques. Mais contrairement aux *linkers*, un adaptateur est synthétisé de sorte qu'il a déjà une extrémité cohésive, l'idée est bien sûr de ligaturer les extrémités franches de l'adaptateur aux extrémités franches du fragment d'ADN, pour produire une nouvelle molécule avec des extrémités cohésives. Une extrémité, appelée terminaison 5', porte un groupe phosphate (5'-P); l'autre, l'extrémité 3', a un groupe hydroxyle (3'-OH). Dans la double hélice, les deux brins sont antiparallèles donc chaque extrémité d'une molécule double brin se compose d'une extrémité 5'-P et d'une extrémité 3'-OH. La ligature a lieu entre les extrémités 5'-P et 3'-OH. Les molécules adaptatrices sont synthétisées de sorte que l'extrémité émoussée soit la même que «naturelle» ADN, mais l'extrémité collante est différente (Wu, Bahl, & Narang, 1982).

3.4.4 Clonage contondant sans ligature (avec Topoisomérase) :

Les topoisomérases d'ADN sont capables de séparer les deux brins d'une molécule d'ADN en provoquant des ruptures transitoires simple ou double brin dans le squelette d'ADN. Elles ont donc à la fois des activités de nucléase et de ligase. La réalisation d'une ligature à extrémité franche avec une topoisomérase nécessite un plasmide qui a été coupé par l'activité nucléase de l'enzyme topoisomérase. Elle coupe l'ADN au niveau de la séquence

2. Synthèse bibliographique

CCCTT. Ces enzymes restent liées de manière covalente aux extrémités franches résultantes. Le clivage par la topoisomérase entraîne des terminaisons 5'-OH et 3'-P. Avant en mélangeant ces molécules avec le vecteur, leurs phosphates terminaux doivent être éliminés pour donner des extrémités 5'-OH qui peuvent se lier aux extrémités 3'-P du vecteur. Les molécules sont donc traitées avec de la phosphatase alcaline. L'ajout des molécules phosphatées au vecteur réactive les topoisomérases liées. La ligature se produit entre les extrémités 3'-P des vecteurs et les extrémités 5'-OH des molécules phosphatées. Les molécules à bouts francs sont donc insérées dans les vecteurs. Un seul brin est ligaturé à chaque point de jonction, mais ce n'est pas un problème car les discontinuités seront réparées par les enzymes cellulaires après que les molécules recombinantes auront été introduites dans la bactérie hôte (Brown, 1990)

3.5 .Les enzymes de restriction :

Les enzymes de restriction de type II sont parmi les outils les plus précieux dont disposent les chercheurs en biologie moléculaire. Ces endonucléases de restriction font partie de systèmes de restriction-modification (RM), qui comprennent une endonucléase et une activité méthyl transférase et qui ne nécessite pas d'hydrolyse d'ATP pour son activité nucléolytique, reconnaissent des séquences courtes, généralement palindromiques, de 4 à 8 pb et, en présence de Mg^{2+} , clivent l'ADN à l'intérieur ou à proximité de la séquence de reconnaissance (Pingoud & Jeltsch, 2001).

Tableau 3 : Les endonucléases de restriction les plus fréquemment utilisées (Brown, 1990).

Enzyme	Organisme	Séquence de reconnaissance	Extrémité franche ou cohésive
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC	Cohésive
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefacien</i>	GGATCC	Cohésive
BglII	<i>Bacillus globigii</i>	AGATCT	Cohésive
PvuI	<i>Proteus vulgaris</i>	CGATCG	cohésive
PvuII	<i>Proteus vulgaris</i>	CAGCTG	Franche
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	AAGCTT	cohésive
Sau3A	<i>Staphylococcus aureus</i>	GATC	cohésive
AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGCT	Franche
TaqI	<i>Thermusaquaticus</i>	TCGA	Cohésive
HaeIII	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GGCC	Franche

2. Synthèse bibliographique

3.6 Les vecteurs :

Un vecteur de clonage est une séquence d'ADN permettant ,la propagation ,la sélection ,la modification d'une séquence d'ADN d'intérêt .

3.6.1 Les propriétés des vecteurs (Khalissa, 2017):

Le vecteur doit être :

- Capable de faire réplication autonome dans une cellule hôte donnée (origine de réplication de type procaryote et/ou eucaryote) ainsi possède des propriétés Permettant la sélection de la cellule hôte (la résistance au antibiotiques).
- Possède un polylinker ou site multiple de clonage .
- Support l'insertion d'un fragment d'ADN plus ou moins grand .

3.6.2 Les types de vecteurs de clonage (Khalissa, 2017):

Les vecteurs sont classés par leur capacité d'accepter ADN étranger :

Tableau 4: Les différentes types de vecteurs .

Vecteurs	Hôte	Inserts(Kb)
Plasmides	Bactérie	10
Phage lambda	Bactérie	25
Cosmide	Bactérie	45
Phage 1	Bactérie	100
BAC (bacterialartificial chromosomes)	Bactérie	300
YAC (yeastartificial chromosome)	Levure	1000

3.7 Les microorganismes hôtes :

La compétence génétique fait référence à la capacité de certaines bactéries à subir une transformation - à absorber l'ADN exogène et à l'incorporer de manière stable dans leur propre génome. *Escherichia coli* est l'un des hôtes les plus populaires pour la surexpression des protéines clonées en raison de sa croissance rapide et efficace.

2. Synthèse bibliographique

Tableau 5: Quelques souches d'*E. coli* compétentes utilisées dans le clonage (Casper, 2006).

La souche	Type de transformation	Avantage
<i>E.coli</i> DH5α	Par méthode chimique	Efficacité de transformation : $1-3 \times 10^9$ cfu/μg ADN pUC19
<i>E.coli</i> DH10B	Par électroporation	Résistance au phage T1
<i>E.coli</i> TOP10	Par méthode chimique	Convient au criblage bleu/blanc

3.8 Les applications du clonage moléculaire :

Le clonage moléculaire est présent, en plus du domaine de la recherche scientifique, dans différentes applications biotechnologiques où c'est une technique visant à améliorer la production de différents produits à valeur commerciale et économique.

Tableau 6 : Différentes application du clonage moléculaire (Brown, 1990)

Domaine industrielle	Domaine de la santé	Domaine agricole
Production hétérologue de molécules d'intérêt	Identification de gènes responsables de maladies humaines	Amélioration des qualités gustatives des aliments
Production des détergents	Production de protéine thérapeutique recombinant :	Amélioration du rendement
Production textile	Synthèse d'insuline	Création des plantes résistantes aux parasites
Fabrication et traitement des papiers	Synthèse d'hormones de croissance humaines dans <i>E. coli</i>	Obtention des plantes qui produisent leurs propres insecticides
Traitement du cuir		

3. Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

3. Matériels et méthodes

Matériel biologique :

La souche bactérienne *Bacillus subtilis* nous a été donnée par Mr CHOUBANE Slimane, elle était conservée dans le glycérol à 50% à -80°C.

La souche a été identifiée par l'analyse du gène ARNr 16S et porte le numéro d'accèsion Genbank KR262718. Le génome entier de la souche a été séquencé et porte le numéro d'accèsion Genbank NZ_CP021169 (S.Choubane et al ,2018)

Bacillus subtilis TLO3 a été isolée comme bactérie dégradant l'amidon. La souche a été isolée d'échantillons de sol rhizosphérique d'un olivier à Tlemcen, en Algérie. Des dilutions en série (10^{-6}) ont été effectuées pour chaque échantillon de sol, et les tubes ont été placés dans un bain-Marie réglé à 80°C pendant 10 min pour éliminer toutes les formes végétatives. Ensuite, 100 µl de la phase supérieure ont été étalés sur des plaques de gélose-amidon.

La bactérie *Echerhshiacoli* compétentes BL21 (DE3)(Thermofisher)est issue de la souche *E. coli* convenant à l'expression de gènes hétérologues non toxiques. La souche contient le prophage lambda DE3 qui porte le gène de l'ARN polymérase T7 sous le contrôle d'un promoteur lacUV5, permettant d'induire l'expression de l'ARN polymérase T7avec IPTG. La souche *E. coli*BL21(DE3) a été conservée à - 80° C.

1. Produits chimiques :

Agar Agar (VWR™) ; Nacl (Biolyse) ; Lysosyme (sigma) ; ARnase (sigma) ; EDTA (Biochem_Chemopharma) ; SDS (VWR™) ;Hcl (Biochemch_Chemopharma) ; Acétate d'amonium (Biochem_Chemopharma) ; Trizma® base (sigma Aldrich) ; Acide borique (VWR™) ; Tris (Biochem_Chemopharma) ; Ethanol 99.8% (Biochem_Chemopharma) ;SYBR green (invitrogen) ; Agarose (Condalab) ; colorant de charge (TaKaRa) ; *PEasy*®-Blunt E1 Expression Kit (TransgenBiotech) ; *PEasy*®-Blunt E1 Expression Kit (TransgenBiotech) ; kit EasyPure ® PCR(TransgenBiotech) .

Tous les autres produits chimiques utilisés dans ce travail sont des réactifs de qualité et ont été obtenus de sources commerciales.

2. Milieux de cultures :

Les milieux utilisés ont été obtenus de sources commerciales ou bien préparés :

- Milieu nutritif LB (*Loria-Bertani*)(SigmaAldrich) :

Tryptone 10g, Extrait de levure 5g ,Chlorure de sodium 5g dans 1000ml d'eau distillée ,pH 7

- Milieu SOC (*Super optimum medium*) (Thermo Fisher Scientific Inc):

3. Matériels et méthodes

2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, and 20 mM glucose. pH 7.

- **Milieu LB ampicilline**

Préparer une solution d'ampicilline à 100mg/ml dans l'eau distillée stérile. Puis, ajouter 10 µl de solution X-Gal à 20 mg / ml pour 1 ml de milieu. Ensuite, ajouter 10 µl d'IPTG (100 mM) pour 1 ml de milieu. Enfin, ajouter l'Ampicilline à 0,5 ml/L dans le milieu gélose LB quand il est à environs 60°C avant solidification.

- **Milieu Gélose agar - amidon** :2% Agar, 1% amidon , pH 7

3. Les tampons et solutions :

- **Solution de suspension :**

0.85 g de NaCl 85% a été dissous dans 100 ml d'eau distillé stérile.

0,02g de lysozyme dans 1 ml d'eau distillée stérile (conserver au congélateur).

L'enzyme ARNase a été ajouté lors de l'extraction.

- **Solution de lyse** (25 mM EDTA ; SDS 2%)

0,2g de SDS a été dissoudre dans 10ml d'EDTA 25mM .

- **Solution EDTA 0,5M ; pH=8 (50ml)**

7.3g de EDTA a été ajouté dans 35ml d'eau distillée, et ajustée avec NaOH jusqu'à un pH 8 (EDTA soluble à pH 8), puis Ajuster avec l'eau distillée jusqu'au 50ml.

- **Solution EDTA 25mM (10 ml)**

0.5 ml d'EDTA (0.5 M) a été ajusté avec l'eau distillé jusqu'à 10ml.

- **Solution de précipitation des protéines acétate d'ammonium 10M (20 ml)**

Dissoudre 15,41g d'acétate d'ammonium dans 15 ml d'eau distillée ; puis ajuster à 20ml.

- **Tampon TBE 10X** (200ml)

21.6g de Trizma© base, 11g acide borique et 8 ml EDTA 0.5M ont été mélangé dans 100ml d'eau distillée puis ajuster jusqu'au 200ml.

- **Tampon TE Préparation de 50ml TE10/1**

Mélanger 0.5ml Tris-HCl (1M, pH=8) avec 0,1ml EDTA (0.5M, pH=8), puis ajuster à 100 ml avec l'eau distillée.

- **Tris-HCl**

6.05g de Tris a été dissoute dans 20 ml d'eau distillée puis son ph a été ajuster par HCl jusqu'à 8

- **Ethanol 70%**

3. Matériels et méthodes

En utilisant le tableau de mouillage des alcools de Guy Lussac, 45.98 ml d'éthanol 99.8% a été ajuster jusqu'à 100 ml avec de l'eau distillée.

- **Gel de séparation SDS-PAGE 12%**

1.2ml dH₂O

1.5ml buffer 1.5M TrisHCl pH 8.8

2ml Acrylamide:

0.05ml SDS 10%:

0.25 ml Ammonium persulfate 1.4%

0.25 ml TEMED 2%

- **Gel de concentration SDS-PAGE 5%**

0.81 ml dH₂O

0.41 ml buffer 0.5M TrisHCl pH 6.8

0.25 ml Acrylamide:

0.016 ml SDS 10%:

0.083 ml Ammonium persulfate 1.4%

0.083 ml TEMED 2%

2.Méthode :

La souche bactérienne était conservée dans le glycérol.

1. Culture de la souche *B. subtilis* TLO3 :

D'abord, 100 µl de la souche *B. subtilis* TLO3, qui était conservée en présence du glycérol, a été inoculée dans 100ml de milieu LB liquide contenu dans un Erlen-Meyer dans la zone stérile du bec Bunsen. La culture a été incubée à 30°C pendant 48h.

Après croissance ;Une goutte (2 MC Farlan) de la culture bactérienne a été déposée sur le milieu LB gélosé puis étalée à l'aide d'un étaloire. La culture a été incubée à 30°C pendant 48 heures.

Des colonies d'apparence et de forme irrégulières ont été obtenues, avec une surface rugueuse et decouleur blanchâtre.

2. Extraction de l'ADN génomique :

L'ADN génomique de *B. subtilis* TLO3 a été extrait en utilisant un protocole d'extraction d'ADN Gram positif standard (CHOUBANE, 2017).

Des jeunes colonies de l'isolat TLO3 ont été inoculées ,cultivées et incubées dans 2 ml de bouillon LB pendant 24h à 37°C. La culture a été centrifugée à 14000 tr/min pendant 1 min et le surnageant a été jeté. Le culot a été par la suite suspendu dans une solution composée de : 100 µl NaCl 0.85% ; 20 µl ARNase et 5 µl lysozyme 20 mg/ml. Le mélange a été incubé à

3. Matériels et méthodes

37°C pendant 5 min puis 200 µl de solution de lyse (25 mM EDTA ; SDS 2%) a été ajoutée et le tout a été bien mixé. Ensuite, 115 µl de solution de précipitation des protéines (NH₄Ac 10M) a été ajoutée et mélangée au vortex et enfin centrifugé à 14000 tr/min pendant 10 min à 4°C. Ensuite, 400 µl du surnageant a été transféré dans un tube Eppendorf puis 400 µl d'isopropanol a été ajouté et mélangé en inversant le tube. Enfin le culot (après centrifugation) a été lavé avec 100 µl d'éthanol 70% puis séché à l'air libre. Le culot a été resuspendu dans 100 µl d'eau ultra pure et la pureté et la concentration ont été déterminées par spectrophotomètre.

3. Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN génomique :

Cette électrophorèse a été effectuée pour s'assurer que l'ADN génomique de *B. subtilis* a bien été extrait et qu'il est pur. D'abord, 0,8 g d'agarose a été dissoute dans 100 mL de tampon de migration TBE 1X et homogénéisée au microonde. Après refroidissement 10 µl de SYBR green ont été ajoutés pour détecter les bandes d'ADN et permettre sa visualisation sous UV (365 nm). Une migration de 20 µl de l'ADN extrait a été effectuée sur gel d'agarose en utilisant un marqueur de taille de 1 Kb. Avant que le volume de l'échantillon à analyser ne soit déposé dans les puits, 5 µL du tampon de charge 6X ont été additionnés. Ensuite le gel a été soumis à un courant électrique 100V pendant 45 minutes. Les bandes ont été enfin visualisées sous transilluminateur à UV.

4. Quantification et analyse de la pureté de l'ADN extrait :

En biologie moléculaire, il est important de quantifier et d'analyser la pureté des acides nucléiques.

La méthode la plus répandue pour le dosage de l'ADN est la spectrophotométrie qui mesure l'absorbance à 260 nm (absorbent dans l'ultraviolet). Parallèlement on détermine la pureté de l'ADN en mesurant l'absorbance à 280 nm, qui est la longueur d'onde à laquelle absorbent les protéines. Le ratio A_{260 nm}/280 nm est utilisé pour détecter la contamination par les protéines.

La pureté de l'ADN extrait et sa concentration ont été mesurées avec un spectrophotomètre (OPTIZEN 3220). La concentration a été calculée par l'équation suivante :

Concentration = 50 µg/mL × DO₂₆₀ × facteur dilution.

Un ratio d'absorbance 260/280 nm autour de 1.8 est généralement admis comme pure.

5. Amplification du gène de l' α- amylase par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :

La séquence du gène d' α- amylase de *B. subtilis* TLO3 a été obtenue après séquençage du génome et son annotation (S. Choubane et al., 2018).

3. Matériels et méthodes

Le gène d' α - amylase a été amplifié par PCR en utilisant de l'ADN génomique comme matrice et des amorces spécifiques pour amplifier la totalité du gène. L'amorce sens 5'–ATGTTTGCAAAACGATTCAAAACCTC–3' et l'amorce anti-sens 5'–TCAATAAGGAAGAGAACCGCTTAAGC–3'.

Tous les réactifs ont été décongelés de la glace, le mélange réactionnel d'amplification a été assemblé dans un volume final de 50 μ L dans des tubes de PCR à paroi mince de 0,2 ml.

Tableau7: Composition du mix de PCR pour l'amplification du gène α - amylase de *B. subtilis* TLO3.

	Concentration dans le mix	(Concentration initiale)	Volumes dans le mix
Eau ultra pure	/	/	QSP 50 μ L
Tampon	1X	10X	5 μ L
Taq polymerase <i>High Fidelity</i>	5U	5 U/ μ L	1 μ L
dNTP	200 μ M	2,5mM	4 μ L
Amorce Forward	0,5 μ M	10 μ M	2.5 μ L
Amorce Reverse	0,5 μ M	10 μ M	2.5 μ L
ADN extrait	200 μ g/ μ L	450 μ g/ μ L	2 μ L
GC enhancer	1X	10X	5 μ L

La réaction a été effectuée dans un thermocycler SimpliAmp™ (Fischer scientifique, France).

Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le programme de PCR est présenté dans le tableau ci-dessous.

3. Matériels et méthodes

Tableau 8 : Programme de la PCR pour l'amplification du gène α - amylase de *B. subtilis* TLO3

Etape	Température C°	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	10 min	
Dénaturation	95	30 sec	X 30
Hybridation	58	30 sec	
Elongation	72	30 sec	
Elongation finales	72	10 min	

6. Electrophorèse des produits de PCR

Cette électrophorèse a été effectuée pour s'assurer que le gène d' α - amylase a bien été amplifié et que l'amplicon a la taille qui correspond à la taille du gène qui est 1980 pb. La qualité et la taille du produit de PCR est analysé par migration électrophorétique sur gel d'agarose.

Le tampon de migration TBE 1X a été utilisé et la concentration du gel en agarose est de 1.2 %, suivant la taille de l'ADN considéré en utilisant le marqueur de taille 100 pb. Les échantillons d'ADN de 20 μ l ont été mélangés avec 5 μ l du colorant de charge 6X ; puis introduits dans les puits. L'électrophorèse a été réalisée à 90 V pendant 45 min. Les bandes ont été enfin visualisées sous UV.

7. Purification du produit de PCR :

Un kit de purification EasyPure ® PCR a été utilisé, il contient une colonne de centrifugation à membrane de gel de silice pour adsorber spécifiquement l'ADN (produit de PCR), et peut éliminer efficacement les impuretés telles que les protéines, les composés organiques, les amorces, les dNTPs, les enzymes et les ions de sels inorganiques.

Toutes les étapes de centrifugation ont été effectuées à température ambiante. Dans un microtube de 1.5 ml, 5 volumes de tampon de liaison (BB) a été ajouté à 1 volume de produits PCR (50-100 μ l). L'échantillon est mélangé brièvement par vortex. Tout le mélange est transféré dans une colonne de centrifugation fournie avec un tube de collecte (pour augmenter le rendement de purification de l'ADN, incubé pendant 1 minute). Il a été centrifugé à 10,000 \times g pendant 1 minute puis le filtrat a été jeté. Ensuite 650 μ l de tampon de lavage (WB) a été ajouté à la colonne et centrifugé à 10,000 \times g pendant 1 minute puis le filtrat a été jeté, la colonne vide a été centrifugé à 10,000 \times g pendant 1 à 2 minutes pour éliminer tout

3. Matériels et méthodes

WB résiduel ensuite la colonne d'essorage est placée dans un tube de microcentrifugeuse propre et 30-50 µl d'eau distillée (pH >7.0) est ajouté directement au centre de la matrice de colonne (pour augmenter le rendement, préchauffé le tampon d'éluion (EB) ou de l'eau peut être utilisé) et en fin la colonne a été incubé à température ambiante pendant 1 minute et centrifugé à 10,000 × g pendant 1 minute pour éluer l'ADN.

8. Le clonage moléculaire :

Nous avons utilisé une stratégie de clonage contondant sans ligature (*blunt*) simple et universelle qui permet la ligature directe d'un vecteur linéarisé avec des extrémités franches à une séquence d'ADN (insert) qui possède aussi des extrémités franches grâce à la *taq* polymérase Haute-fidélité (HIFI) utilisé qui donne des amplicons réellement identiques à la séquence matrice avec des extrémités franches.

Le clonage contondant contourne ces problèmes liés au clonage de restriction. En effet dans ce dernier les mêmes sites de restrictions des enzymes peuvent se trouver aussi au niveau de l'insert d'ADN et ainsi le fragmenter. En évitant la digestion des fragments d'insert, ce procédé ne nécessite pas des sites de restriction spéciaux ou des séquences supplémentaires ajoutés aux amorces d'amplification, ni l'utilisation d'endonucléases de restriction.

Le kit *pEasyBlunt E1 Expression* utilise le produit de PCR purifié (le gène α -amylase) comme matrice pour réaliser le processus de clonage.

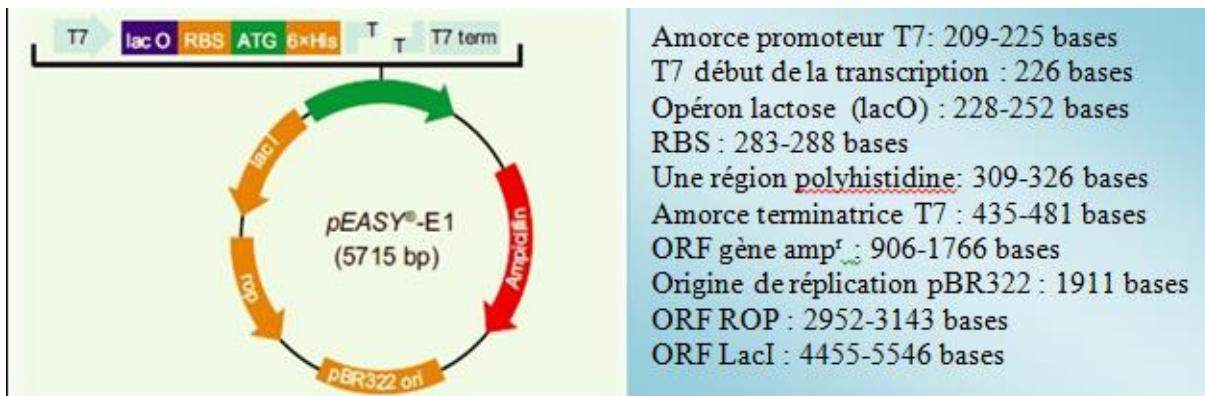


Figure 3 : Carte du vecteur d'expression pEASY-E1 blunt("TransGen," 2020).

La ligature de l'insert avec le vecteur linéarisé est assurée par une ligase, donc le clonage et la ligation sont effectués selon les instructions du fabricant qui sont : 4 µl du produit de PCR a été mélangé avec 1 µl du vecteur pEasy E1 Blunt expression kit, le tout a été incubé à une température ambiante pendant 15 minutes puis a été remis sur glace -20°C.

3. Matériels et méthodes

9. La transformation bactérienne :

Pour l'expression du produit de clonage un processus de transformation bactérienne par choc thermique a été réalisé en utilisant une souche d' *E.coli* BL21 (DE3) ; il s'agit d'une bactérie *E. coli* chimiquement compétente la plus couramment utilisée et appropriée pour la transformation et l'expression de protéines en utilisant un système d'induction d'ARN polymérase-IPTG T7 avec une forte efficacité de transformation.

En conditions stériles, 50 µl de bactéries compétentes *E. coli* BL21 (DO3) préalablement décongelés sur la glace, sont ajoutés au produit de clonage dans un Microtube. Après 30 minutes d'incubation sur glace, un choc thermique de 30 secondes à 42°C a été réalisé puis immédiatement refroidi dans un bain de glace pendant 2 minutes. Ensuite, 250 µL du milieu SOC a été ajouté aux cellules, puis le microtube a été incubée sous agitation orbitale à 200 rpm pendant 1 h à 37°C.

10. Sélection des cellules transformées :

En premier , des colonies transformées obtenus avec des plasmides portant un gène de résistance ont été sélectionnés en faisant étaler les bactéries sur des boîtes de gélose LB-ampicilline sélective et marquées LB/Amp⁺. D'autres boîtes de milieu LB ne contenant pas l'antibiotique et marquées LB/Amp⁻ ont été préparées et utilisées comme contrôle positif . Un plasmide d'expression E1 déficient en gène Ampicilline a été utilisé comme control négatif. Les boîtes ont été ensuite placées dans un incubateur à 37°C toute la nuit.

11. Analyse de l'expression du gène α -amylase :

Une colonie de *E. coli* BL21 transformée ayant poussée sur gélose LB/Amp⁺ a été transféré dans 5ml de bouillon LB/amp⁺ puis incubé sous agitation (250 rmm) à 37° jusqu'à atteindre un DO₆₀₀ = 0.5. Ensuite, IPTG a été ajouté à une concentration finale de 1 mM et agiter pendant 3-5 heures à 37°C pour favoriser l'expression du gène cloné.

Enfin une centrifugation a été effectuée pour la culture de *E coli* BL21 recombinante et le surnagent a été utilisée pour tester l'activité amylolytique en inoculant le surnagent sur boîte de gélose Agar-amidon 1%.

L'activité a été révélé après incubation 2-3h à 37°C avec du Iode bisublimé I₂. L'activité de l' α -amylase est traduite par une zone claire autours des spots d'inoculation

12. Zymographie de l'amylase :

La zymographie est une technique pour étudier les enzymes hydrolytiques sur la base de la dégradation du substrat. Il s'agit d'un outil puissant qui utilise les mêmes manipulations que l'électrophorèse SDS-PAGE et que l'électrophorèse bidimensionnelle, mais sans les

3. Matériels et méthodes

étapes de réductions des ponts disulfures, afin de pouvoir récupérer l'activité des enzymes après la migration.

Dans notre étude, la zymographie nous a permis d'étudier l'activité amylolytique du surnageant de *E coli* BL21 recombinante. D'abord le gel SDS-PAGE a été préparé composé de (gel de séparation de 12% et un gel de concentration de 5%). Ensuite le surnageant a été mélangé avec le tampon de charge Nupage LDS sample buffer x4 (Thermo Fisher, USA) ; et l'agent réducteur Novex x10. Sans chauffage préalable, l'échantillon a été déposé dans le puits. Une fois les échantillons sont déposés, le gel est mis à migrer selon le même protocole et dans les mêmes conditions qu'un gel classique. Le courant a été réglé sur 70V jusqu'au milieu du gel, puis augmenté à 100V et laissé migrer pendant 75 min. Lors de la terminaison de la migration le gel a subi un lavage avec l'eau courante et trempé dans une solution de Triton x100 pendant 1h à 4°C pour éliminer le SDS. Enfin le gel a été imbibé dans une solution d'amidon 0.5% pendant 1h à 4°C pour permettre à l'amidon de pénétrer dans le gel ; puis pendant 2-3h à 37°C dans la même solution pour activer l'amylase. L'activité de l'amylase a été révélée en utilisant une solution de Lugol (les zones de digestion apparaissent comme des bandes claires sur un fond sombre teinté où le substrat a été dégradé par l'enzyme) (Martínez, Alarcón, Díaz-López, & Moyano, 2000).

Résultats et discussions

4. Résultats et discussions

Résultats

1. Extraction de l'ADN génomique:

Après 48h de culture de la souche *B. subtilis*TLO3 sur le milieu LB à 37°C, des colonies de forme irrégulière avec un aspect visqueux et de couleur blanchâtre ont été observées.

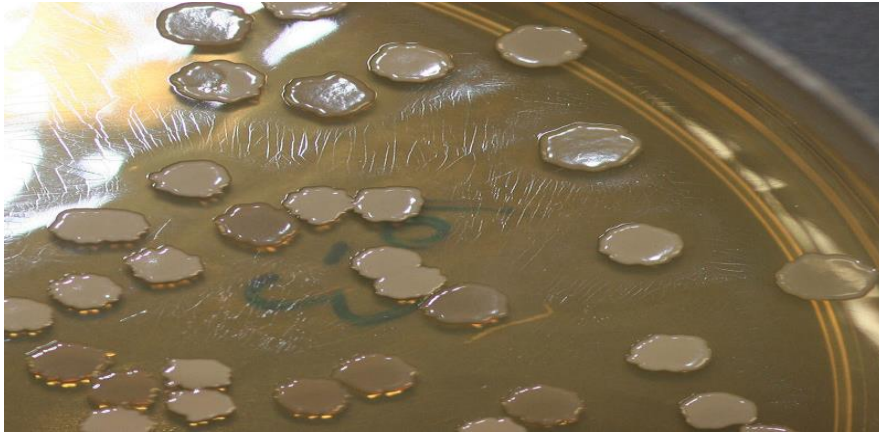


Figure 4 : Aspect macroscopique des isolats de *Bacillus subtilis* TLO3.

Après la culture, de la souche bactérienne l'extraction de l'ADN génomique de cette souche a été réalisée. La qualité d'échantillon d'ADN extrait a été vérifiée par une spectrophotométrie (OPTIZEN 3220) suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%.

Les mesures des densités optiques à $\lambda=260$ et $\lambda=280$ ainsi que les ratios qui résultent sont résumés dans le tableau sous dessous.

Tableau9 : dosage spectrophotométrique d'ADN extrait.

	260 nm	280 nm
DO	0.9	0.75

La concentration de la solution mère (C) est donnée par la formule suivante :

$$C \text{ (ug/ml)} = DO_{260} \times 50 \times \text{Dilution}$$

Ainsi, la concentration d'ADN calculée était de 450 μ g / ml et la pureté de l'ADN caractérisée par un rapport A260/A280 est de 1,2.

Ce ratio est inférieur au ratio idéal qui est aux alentours de 1.8 et qui signifie que l'ADN est pur.

2. Electrophorèse de l'ADN génomique :

4. Résultats et discussions

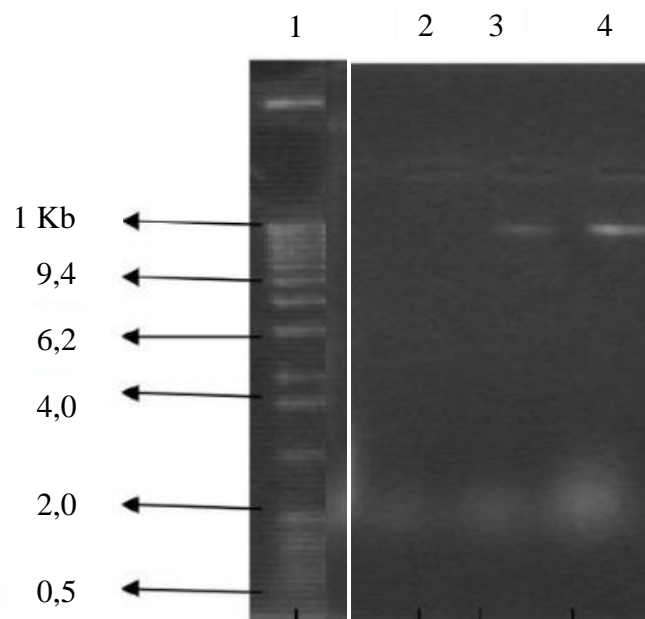


Figure 5 : Electrophorèse sur gel d'agarose (0,8%) de l'ADN génomique de *Bacillus subtilis* TLO3, .
(1) marqueur de taille moléculaire d'ADN 1 Kb, puits (2),(3),(4) ADN génomique bactérien complet (Shahriar, Haque, Kabir, Dewan, & Bhuiyan, 2011).

D'après la figure les résultats du gel d'électrophorèse obtenu à partir de cette étude a montré que la qualité et le rendement de l'ADN extrait étaient acceptables. On observe l'apparition d'une bande volumineuse (puits 4), Ceci explique sa concentration élevée et donc la forte fluorescence. L'échantillon semble être mal chargé dans les puits (2) et (3) .

Amplification du gène α - amylase :

Pour s'assurer de l'amplification par PCR du gène de l'alpha-amylase, l'électrophorèse sur gel d'agarose effectuée (1,2%) a permis l'observation d'une bande dans la région attendue de 1980pb (CHOUBANE, 2017), comme le montrent la figure(6).

4. Résultats et discussions

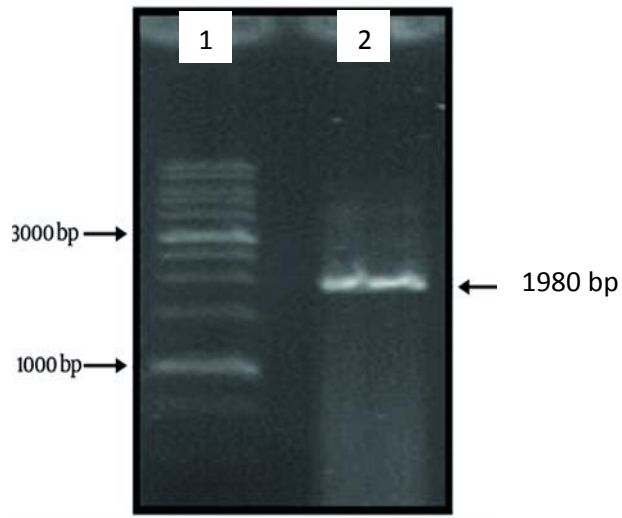


Figure 6 : Electrophorèse sur gel d'agarose (1 %) du produit de pcr.
Puits (1) Marqueur de taille moléculaire d'ADN 100 Pb,
Puits (2) Produit de PCR(Afzal-Javan & Mobini-Dehkordi, 2013).

3. Résultat attendu du clonage et transformation bactérienne :

Le résultat attendu c'est l'apparition de colonies blanches sur milieu LB-amp+ (Figure7), ce qui signifie que le vecteur (*pEasy-Blunt E1 expression vector*) contient le gène alpha-amylase de *Bacillus subtilis*, TLO3 et aussi que le gène de résistance à l'ampicilline a bien été transféré à la bactérie hôte *E. coli* BL21.

4. Résultats et discussions

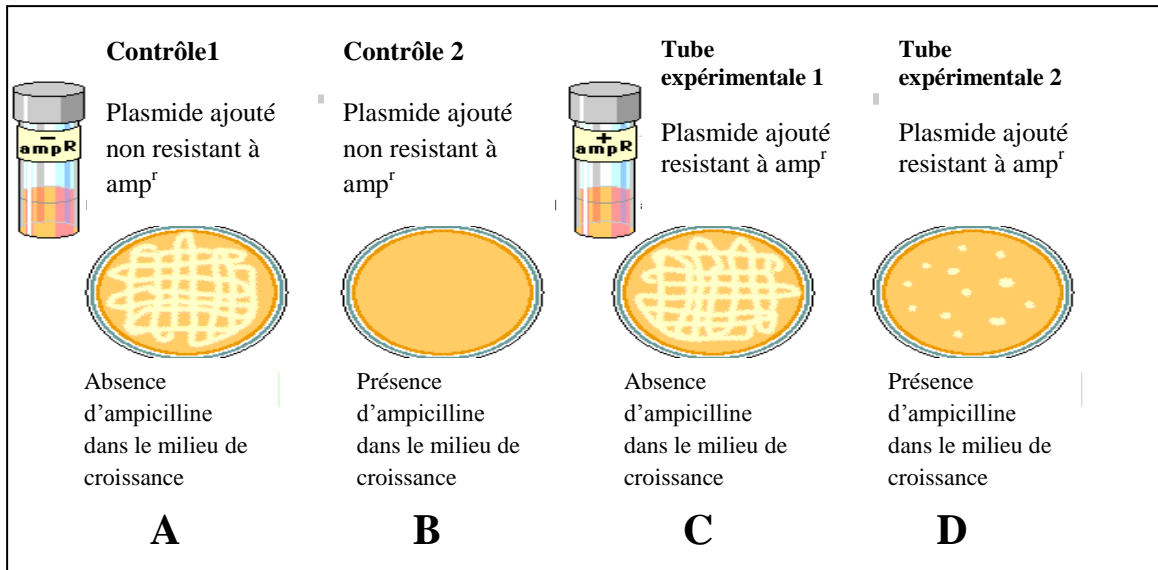


Figure 7 : Représentation des résultats probables après transformation d'*E. coli* BL21

Contrôle : *E. coli* BL21 transformée avec vecteur sans gène de résistance à l'ampicilline.

Tube expérimentale : *E. coli* BL21 transformée avec vecteur portant le gène de résistance à l'ampicilline. ("phscool," 2020).

4. Résultat attendu de l'électrophorèse SDS-PAGE et zymographie :

En supposant que le clonage et la transformation soient réussis, et étant donné que le vecteur utilisé est un vecteur d'expression ; il est attendu d'obtenir une sécrétion de l'enzyme α -amylase de la bactérie *B. subtilis* TLO3 par la bactérie hôte *E. coli* BL21.

Cette production peut être confirmée par une électrophorèse SDS-PAGE et zymographie de l'amylase. Ces deux techniques ayant été déjà réalisées pour α -amylase de la bactérie *B. subtilis* TLO3 (CHOUBANE, 2017) ; il est attendu d'obtenir des résultats similaires.

L'électrophorèse SDS-PAGE de la première figure montre la présence de 6 bandes après précipitation (115 ; 70 ; 47 ; 39.2 ; 26.5 ; 21 kDa) et concernant la zymographie de l'amylase.

4. Résultats et discussions

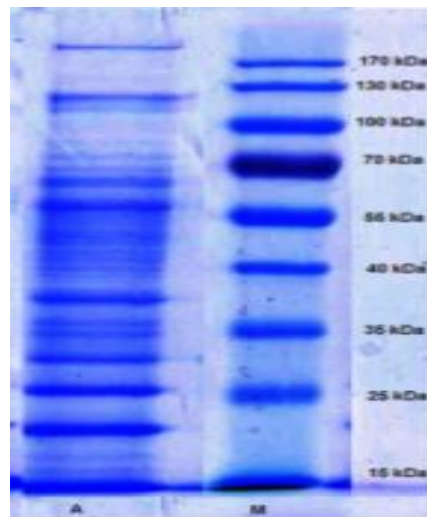


Figure 8 : Electrophorèse SDS-PAGE des protéines de *B. subtilis* TLO3
M: Marqueur de taille des protéines, Broad Range (BioLabs, USA);
A: Protéines du surnagent de la culture(CHOUBANE, 2017).

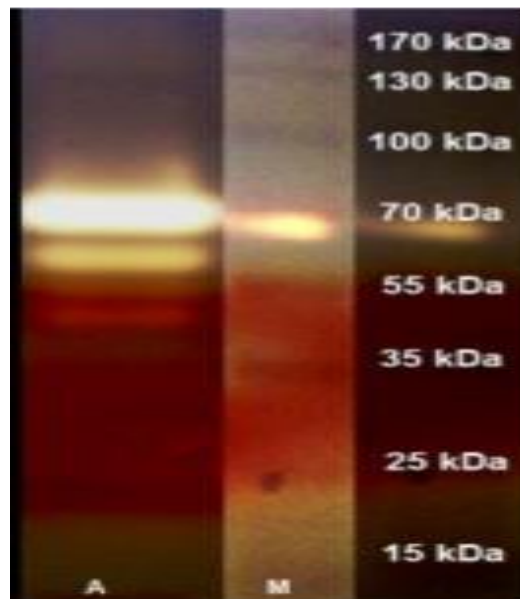


Figure 9: Zymographe de l'amylase de *B. subtilis* TLO3(CHOUBANE, 2017).
M : Marqueur de taille des protéines PageRuler™ (ThermoFisher, USA) ;
A : Protéines du surnagent de la culture(CHOUBANE, 2017).

une bande majeure a été obtenue pour le surnagent ainsi que quelques bandes plus légères qui peuvent correspondre à un autre type d'amylase.

4. Résultats et discussions

Discussion

1. Extraction de l'ADN génomique :

De nombreux protocoles ont été décrits pour l'extraction de l'ADN suivant les mêmes étapes telles que la perturbation des cellules, l'inactivation des nucléases et d'autres enzymes, l'élimination des contaminants biologiques et chimiques et enfin purification de l'ADN, mais ces protocoles sont différents dans le coût des consommables, la qualité et la quantité d'ADN obtenu, la toxicité et l'exigence de temps (Ghaheeri et al., 2016).

Parmi les méthodes d'extraction d'ADN les plus utilisées on note : la méthode au phénol chloroforme qui implique l'utilisation de produits chimiques toxiques ; le risque de contamination est accru et nécessite un temps considérable (Kong, 2020) . Les kits commerciaux sont les plus sûrs et sécurisants qui ne nécessitent pas beaucoup de temps mais ils sont très coûteux avec un rendement d'ADN faible et très pur (Benedict & Barret, 2018). On note aussi la technique de « *salting-out* » avec laquelle on a opté de faire l'extraction d'ADN malgré qu'elle prend du temps dans la préparation des solutions, mais elle est plus sûre que la méthode phénol-chloroforme et moins chère que les kits commerciaux, très facile à manipuler, non toxique, moins dangereuse que la méthode de phénol-chloroforme, et elle donne de très bons résultats (Ghaheeri et al., 2016) . Cette procédure de relargage introduite par Miller isole l'ADN de haute qualité et utilise une concentration élevée en sel pour attirer certaines molécules d'eau par les ions de sel ce qui diminue le nombre de molécules d'eau disponible pour interagir avec l'ADN. Cette méthode évite l'utilisation de solvants organiques mais nécessite toujours une étape de précipitation à l'alcool pour éliminer les sels et concentrer l'ADN, même si l'ADN de faible qualité a tendance à être obtenu (Miller, Dykes, & Polesky, 1988).

2. Quantité et qualité de l'ADN génomique :

La capacité de quantifier les acides nucléiques avec précision et rapidité est une condition préalable à de nombreuses méthodes utilisées en biochimie et en biologie moléculaire. Dans la majorité des situations, cela est réalisé en utilisant la spectrophotométrie, qui n'est pas destructrice et permet de récupérer l'échantillon pour une analyse ou une manipulation ultérieure (Balanovsky, Kagazheva, & Olkova, 2019). L'évaluation du degré de pureté de la solution d'ADN est très importante car elle permet de juger l'efficacité du protocole de l'extraction d'ADN pratiqué surtout dans notre cas.

4. Résultats et discussions

D'après le résultat obtenu la concentration d'ADN obtenue par la méthode du relargage est suffisante pour conduire des réactions de PCR et la pureté de l'ADN caractérisée par un rapport A260/A280 = 1,2 est une valeur significativement faible par rapport au ratio DO260/280 optimal situé entre 1,8 et 2,1. Cela peut expliquer que notre ADN extrait a été contaminé par des protéines, donc même si notre ADN est contaminé, il est suffisamment concentré pour combler ces défauts (lors d'une amplification ou d'une autre manipulation de génétique moléculaire) cette contamination peut être expliquée par la quantité de protéinase K utilisée lors de la précipitation des protéines et qui n'était pas suffisante, en effet certains auteurs décrivent que l'hydratation et la précipitation des polypeptides hydrolysés avec la protéinase K par une solution saturée en sel donne un l'ADN de mauvaise qualité (Bourgoin, 2000; Dykes, 1988; Laitinen, Samarut, & Hölttä, 1994). D'autre part on peut expliquer que le ratio DO 260/280 varie significativement en fonction du pH et de la force ionique de la solution spectrophotométrique donc il est important de prendre en compte ces paramètres pour interpréter ce ratio. Par exemple, le ratio d'une solution plus acide est de 0,2 – 0,3 plus faible et il est de 0,2 – 0,3 plus élevé quand la solution est plus basique (Desjardins & Conklin, 2010; Rizan, Shin, Tajuddin, Gnana kumar, & Periasamy, 2020). Enfin, le ratio A260 nm/A280 nm varie d'un ADN à l'autre, car il dépend de leur composition de séquences. Un ratio faible peut aussi s'expliquer par une contamination par un réactif utilisé lors de l'extraction et qui n'a pas été totalement éliminé (Eisenhofer et al., 2019).

L'électrophorèse nous a fourni des informations sur la qualité globale de l'ADN génomique bactérien par l'apparition d'une bande volumineuse qui explique que l'ADN a bien été extrait.

3. Amplification du gène alpha amylase par PCR :

La PCR est devenue un outil indispensable dans l'artisanat des sciences biologiques, elle a été modifiée au cours de la science, permettant aux biologistes « d'avoir du pouvoir » sur les génomes et de créer des gènes hybrides avec de nouvelles fonctions, permettant des tests cliniques spécifiques et précis, permettant de mieux comprendre les génomes et la diversité, ainsi que de simplement cloner des gènes pour une analyse biochimique. Malgré la standardisation de la PCR, il existe toujours des limites telles que : le risque de contamination, la présence des inhibiteurs de PCR, la dégradation des acides nucléiques en cas de mauvais conditionnement et surtout le risque de mutations au niveau des sites de fixation des amorces) sont autant d'inconvénients auxquels il faut faire face (Lorenz, 2012).

Pour cela lors de cette étude une optimisation des conditions de l'amplification du gène alpha amylase de la souche *Bacillus subtilis* fourni par la PCR haute-fidélité qui est basé sur

4. Résultats et discussions

l'utilisations de la Taq polymérase à haute fidélité (HIFI) appelée aussi *proof reading* (correction sur épreuve); car cette polymérase a la capacité de donner des séquences d'ADN avec des extrémités franches et de réparer les erreurs de transcription. Lorsqu'une paire de bases incorrecte est reconnue, l'ADN polymérase change son sens d'une paire de bases et élimine la base mal appariée. Après l'excision de la base, la polymérase peut réinsérer la base correcte et la réplication peut suivre son cours (Baños-Mateos et al., 2017).

L'amplification a permis d'obtenir un fragment d'ADN de taille déterminée (1980 pb) qui a été révélé par migration sur gel d'agarose 1.2%. Cela confirme que l'amplicon de PCR obtenu est ainsi identique en poids moléculaire à la prédiction basée sur la séquence du gène (Slimane Choubane, Noujoud Gabed, Omar Khelil, & Ben Amar Cheba, 2018). Ce résultat peut être expliqué soit par la fidélité de l'ADN polymérase qui génère des fragments de PCR comporteront moins d'erreurs que les inserts générés par PCR avec une Taq polymérase basique et elle permet d'obtenir des produits PCR à extrémités franches ce qui est idéal pour ce clonage (Marx, 2016). Comme il peut être expliqué par la concentration du $MgCl_2$ qui est un élément essentiel dans la réaction PCR. Les ions Mg^{2+} forment un complexe soluble avec les dNTPs, indispensable à l'incorporation de ces derniers dans la chaîne d'ADN en croissance; ces ions stimulent l'activité de l'ADN polymérase. De plus, $MgCl_2$ affecte d'autres paramètres comme l'hybridation des amorces et la dissociation des brins d'ADN et des produits d'amplification (Kuslich, Chui, & Yamashiro, 2019; Raoudha, Amel, Hassen, & Azeiz, 2012).

Afin d'obtenir un produit PCR pur pour passer au clonage moléculaire, une purification du produit de PCR du gène alpha amylase par un kit de purification EasyPure® PCR a été réalisée.

4. Clonage contendant du gène alpha amylase de *B. subtilis* TLO3 :

L'Alpha amylase était l'une des premières protéines adoptée pour plusieurs études de biologie moléculaire pour de nombreuses raisons comme l'existence d'un test d'hydrolyse facile à réaliser, la disponibilité des souches non amylasique et la connaissance de la génétique de l'enzyme (Mobini-Dehkordi & Javan, 2012).

En raison de leur potentiel élevé de surexpression d'amylase, les *Bacillus* sont considérés comme les plus importants et les plus utilisés en tant que producteurs de cette enzyme. Pour cela plusieurs tentatives de clonage ont été réalisées à partir de cette espèce comme montre le tableau ci-dessous.

4. Résultats et discussions

Tableau 10 : Tableau indicatif de différentes études réalisées concernant le clonage du gène alpha amylase de différentes souches de *Bacillus*.

Source d'enzyme	Organisme hôte	Vecteur	Type de clonage	Références
<i>Bacillus subtilis</i> DR8806	<i>E.coli</i> DH 5	pTZ57RT	Clonage TA	(Emtenani, Asoodeh, & Emtenani, 2015)
<i>B. subtilis</i> . BS168F	<i>E.coli</i> XL1Blue	pTZ57R / T	Clonage TA	(Rabbani, Mirmohammad Sadeghi, Moazen, Rahimi, & Salehi, 2011)
<i>Bacillus</i> sp. dsh19-1	<i>E.coli</i> BL21 DE3	pColdI	Clonage de restriction	(Dou et al., 2018)
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> YN	<i>E.coli</i> DH 5	Bluescript® II KS	Clonage cotandant	(Mahmoud M. Berekaa 2007)
<i>Bacillus stearothermophilus</i> DY-	<i>E. coli</i> HBI01	pBR322	Clonage de restriction	(Tsukagoshi, Ihara, Yamagata, & Udaka, 1984)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>S. cerevisiae</i>	pVS2	Clonage de contendant	(Southgate, Steyn, Pretorius, & Van Vuuren, 1993)
<i>Bacillus amyloliquefacien</i> JH-06	<i>E. coli</i> DH5	pMD18-T	Clonage TA	(Chen et al., 2015)
<i>B. subtilis</i> PY22	<i>Escherichia coli</i> DH5	Blunt II-Topo vector	Clonage cotandant	(Karakas, İnan, & Certel, 2010)
<i>Bacillus licheniformis</i> (ATCC 27811)	BL21 (DE3)	pET19b	Clonage de restriction	(Nandy et al., 2019)
<i>Bacillus</i> sp. dsh19-1 (CCTCC AB 2015426)	<i>E.coli</i> BL21T1R(DE3)	pColdIvector	Clonage de restriction	(Dou et al., 2018)

4. Résultats et discussions

Un clonage réussi d'un fragment d'ADN dérivé de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une étape clé pour une analyse plus approfondie des ADN amplifiés. De nombreuses méthodes de clonage ont été établies. Actuellement, les stratégies les plus largement utilisées pour le clonage moléculaire sont le clonage basé sur le clonage TA, le clonage basé sur la ligature à extrémité franche et le clonage indépendant de la ligase. Selon les extrémités de l'ADN, les méthodes de clonage dépendant de la ligature sont indispensables dans la biologie moléculaire moderne, car elles peuvent grandement améliorer l'efficacité des processus de clonage d'ADN, et qui se représentent en clonage à extrémités franches, le clonage T-A et clonage à extrémités cohésives (Brown, 1990).

Le clonage TA est l'un des méthodes les plus simples et les plus efficaces pour le clonage de produits de PCR, basé sur l'utilisation d'un "vecteur T" linéarisé qui a des surplombs 3'-T uniques aux deux extrémités permet un clonage direct des produits de PCR, facilité par la complémentarité entre les surplombs 3'-A du produit de PCR et le vecteur 3'-T surplombs, mais le clonage TA reste très chers et, par conséquent, son utilisation est limitée. De plus, il n'y a pas de clonage directionnel ou la probabilité de clonage dans une direction opposée est donc plus grande (Yao, Hart, & An, 2016).

En revanche, la ligature à extrémité cohésive est l'une des stratégies les plus utilisées pour le clonage moléculaire puisque les extrémités collantes des inserts d'ADN et des vecteurs plasmidiques, générés par digestion par restriction, ligaturent avec une grande efficacité.

Dans ce travail la méthode suivie est celle du clonage à extrémités franches qui a été adapté par (Z. G. Liu & Schwartz, 1992). Elle est également l'une des méthodes les plus simples et les plus polyvalentes qui consiste à cloner le gène alpha amylase dans le vecteur plasmidique linéarisé *pEasyBlunt E1*. C'est facile parce que l'insert à bouts francs nécessite peu ou pas de préparation, évitant la digestion enzymatique et la purification ultérieure nécessaire pour le clonage à extrémité cohésive. Il est polyvalent car l'insert et le vecteur ont moins de limitations de séquence que les autres méthodes (Sambrook J, 2012). Le produit de PCR à extrémités franches (alpha amylase) obtenu par l'ADN polymérase à haute fidélité de l'activité d'exonucléase intrinsèque 3' → 5' qui possède une fonction de correction sur épreuve (*proof-reading*), et les vecteurs à extrémités franches (souvent déphosphorylés) sont ligaturés ensemble par une enzyme ligase (Guo & Bi, 2002). Les inserts résultants de la PCR sont relativement faciles à cloner directement dans les deux orientations, par ligature à extrémités franches, car ils sont compatibles avec les vecteurs à extrémités franches (Reiske, 2019).

4. Résultats et discussions

Cependant, il existe plusieurs facteurs qui peuvent rendre le clonage à extrémités franches difficile. Il est parfois 10 à 100 fois moins efficace que le clonage à extrémité cohésive, ce qui entraîne moins de colonies, il y a beaucoup de re-circularisations des plasmides. Ceci, peut être réduit, mais n'est pas facilement éliminé, ce qui entraîne de nombreux vecteurs vides. Mais ce clonage reste toujours le clonage potentiellement le plus rapide parce que l'insert n'a pas besoin d'être préparé par digestion par restriction. Et aussi il évite les ajouts de séquences artificielles indésirables qui pourraient nuire à certaines applications (Hans Packer, 2012).

5. Transformation du vecteur d'expression portant le gène alpha amylase de *B.subtilis* TLO3:

Après avoir intégré le gène α -amylase dans le vecteur, les plasmides recombinants ont été transférés dans la souche compétente *E.coli* BL21.

Escherichia coli est parmi les hôtes microbiens les plus largement utilisés dans la recherche fondamentale et appliquée (Marisch, Bayer, Cserjan-Puschmann, Luchner, & Striedner, 2013). La souche *E. coli* BL21 (DE3) est chimiquement compétente préparée au laboratoire avec une grande productivité et haute efficacité de transformation, cet état de compétence est obtenu par une fragilisation chimique au CaCl_2 et à froid de la membrane plasmique. Ce traitement permettrait la formation de pores dans la membrane et faciliterait ainsi l'entrée de l'ADN à l'intérieur de la bactérie (Chang, Chau, Landas, & Pang, 2017). Cette souche elle porte un système d'expression inductible dépendant de l'ARN polymérase T7 qui permet la manipulation et le réglage simples des niveaux de production de protéines, cette souche portant des vecteurs pET commerciaux ou leurs dérivés a été l'hôte de choix dans de nombreuses études sur l'expression de protéines recombinantes (Balzer et al., 2013)

Les vecteurs *pEASY-blunt* permettant l'expression de protéines recombinantes chez les souches *E. coli* « DE3 » possèdent dans leur génome, un gène de l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur lacUV5. En absence d'IPTG, la transcription du gène d'intérêt est réprimée grâce à la fixation du répresseur LacI sur les opérateurs lac. L'ajout d'IPTG dans le milieu de culture induit la transcription de l'ARN polymérase du phage T7 à partir du promoteur *Lac* par l'ARN polymérase d'*E. coli*. L'ARN polymérase du phage T7 transcrit ensuite le gène d'intérêt à partir du promoteur T7 (Dvorak et al., 2015).

Les bactéries ayant été transformées par les plasmides recombinants qui portent un gène de résistance à l'ampicilline aboutit à l'apparition des colonies qui réfèrent uniquement aux bactéries résistantes ayant incorporé les plasmides. Cette technique a permis de séparer les

4. Résultats et discussions

bactéries comportant les plasmides qui porte a son sein le gène de résistance Ampr codant pour l'enzyme β -lactamase qui détruit l'ampicilline et les bactéries sans plasmides car ces dernières sont tuées par l'ampicilline qui agit comme un inhibiteur irréversible d'une enzyme indispensable aux bactéries pour la synthèse de leurs parois cellulaires. Elle inhibe la synthèse de la paroi bactérienne et conduit à la lyse cellulaire. (Shilling et al., 2020).

6. Contrôle de l'expression de l'alpha-amylase de *B. subtilis* TLO3 :

La zymographie est une technique basée sur l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) qui permet mesure du poids moléculaire, l'identification et même la quantification de l'activité enzymatique (A. Andrades & L. M. Contreras, 2017). Il s'agit d'un outil puissant, mais souvent mal interprété, qui fournit des informations sur les activités hydrolytiques potentielles, les formes enzymatiques et les emplacements des enzymes actives. Ces dernières années utilisation de la zymographie a connu une attention croissante, comme le révèle le nombre d'articles publiés (Adarelys Andrades & Lellys M Contreras, 2017; Oliveira et al., 2020; Ren, Chen, & Khalil, 2017).

Dans cette étude la zymographie de l' α -amylase a été réalisée pour la détection d'activité amylolytique produites par la souche *E.coli* BL21 transformée. Le surnageant a été passé au moyen de gel polyacrylamide natif comprenant 0.5% d'amidon soluble dans des conditions non réductrices. L'apparition d'une zone claire après ajout du lugol, où l'amidon a été dégradé sur le gel natif, a confirmé l'existence et la localisation d' α amylase ayant une activité amylolytique comme montre le résultat. Le poids moléculaire de l' α -amylase a été estimé a environ de $72,6 \pm 1.34$ kDa en comparaison avec les protéines de marqueur standard ; ainsi que d'autres bandes plus légères ont été observé sur le profil SDS-PAGE. La révélation de l'activité enzymatique qui se traduit par la dégradation de l'amidon confirme que l'induction par IPTG a été forte et accompagné avec une grande expression d' α amylase et que le système d'expression T7 été biologiquement active. cela peut être aussi expliquer que le vecteur génétique pEasy a été adapté avec *E.coli* BL21 et qu'il comporte tous les éléments indispensables à l'adressage et le repliement correct de l' α amylase dans l'hôte cellulaire et que les facteurs cellulaires et les paramètres de culture qui influencent l'expression et le repliement de l' α amylase ont été favorable pour adopter une conformation tridimensionnelle précise a l'état active (Betton & Chaffotte, 2005; Ghasemi et al., 2015).

5. Conclusion

Conclusion

5. Conclusion

En conclusion, le clonage et l'expression de l'alpha-amylase de *Bacillus subtilis* TLO3 dans la bactérie hôte *E.coli* BL21 est une approche très prometteuse en génie-enzymatique. Cette expression suite à un clonage à extrémités franches (*blunt-end cloning*) pourrait permettre de produire une grande quantité (haut niveau d'expression) de l'enzyme α -amylase avec une bonne qualité et à moindre coût, ce qui pourrait être exploité dans différents domaines (recherche, médecine, industrie...)

L'extraction de l'ADN génomique de la souche *Bacillus subtilis* TLO3 par la technique « *salting-out* » a permis d'obtenir un ADN avec une bonne concentration mais une faible pureté, qui peut être utilisé pour des techniques en biologie moléculaire comme la PCR. Mais pour des techniques sensibles comme le séquençage, il serait préférable d'optimiser le processus d'extraction afin d'obtenir une haute pureté de l'ADN.

Ensuite une réaction d'amplification PCR par l'enzyme Taq polymérase à haute fidélité, a été réalisée en utilisant deux amorces qui bornent la séquence à amplifier pour obtenir des amplicons du gène d'alpha amylase avec des extrémités franches. La qualité de l'ADN amplifié a été contrôlée par une électrophorèse sur gel d'agarose en utilisant un marqueur de taille. Ces produits de PCR ont été utilisés comme matrice pour être clonés et exprimés dans un organisme hôte (*E.coli* BL21).

Une technique de clonage cotandant (*blunt*) par un kit a été adoptée suivie d'une transformation par choc thermique dans une souche compétente *E.coli* BL21, et a permis d'obtenir des clones recombinants ayant incorporé le vecteur avec succès.

Les vecteurs intégrés dans *E. coli* BL21 portent un gène de résistance à l'antibiotique ampicilline qui sert pour la sélection des bactéries transformés ayant acquis le vecteur cloné. Pour atteindre ce but une technique de sélection sur des boîtes LB-ampicilline a été réalisée avec succès. En effet les bactéries transformés apparaissent sous forme de colonies blanches alors que les bactéries non transformés ne peuvent pas croître sur le milieu contenant l'antibiotique vu l'absence du gène de résistance.

Le contrôle de l'expression de l'alpha amylase a été réalisé par l'évaluation de l'activité amylolytique, ainsi que la mesure du poids moléculaire par une technique électrophorétique qui étudie les enzymes hydrolytiques sur la base de la dégradation du substrat, dite « zymographie ». L'analyse du profil zymographique a montré l'apparition d'une bande claire indiquant la réussite de l'expression du gène alpha amylase dans la bactérie hôte. Le poids moléculaire de l'enzyme recombinante a été de 72 kDa, qui est le poids exact de l'enzyme.

5. Conclusion

Il serait aussi judicieux de faire un contrôle de la réussite du clonage par un séquençage de la séquence du vecteur destinée à porter le produit PCR clonée ; en utilisant les amorces du promoteur T7 et du terminateur T7 fournies avec le kit.

Enfin nous espérons que ces résultats réunis soient enrichis et améliorés par les futures promotions, afin d'entreprendre un procédé de production a grande échelle et ainsi proposer au marché Algérien un produit local de haute qualité.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Afzal-Javan, F., & Mobini-Dehkordi, M. (2013). Amplification, Sequencing and Cloning of Iranian Native *Bacillus subtilis* Alpha-amylase Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(8).
- Andrades, A., & Contreras, L. M. (2017). Amylase zymography *Zymography* (pp. 301-308): Springer.
- Andrades, A., & Contreras, L. M. (2017). Amylase Zymography. *Methods Mol Biol*, 1626, 301-308. doi:10.1007/978-1-4939-7111-4_29
- Balanovsky, O., Kagazezheva, Z., & Olkova, M. (2019). Methods for DNA quantification yield similar relative but different absolute values. *Bulletin of Russian State Medical University*(3).
- Balzer, S., Kucharova, V., Megerle, J., Lale, R., Brautaset, T., & Valla, S. (2013). A comparative analysis of the properties of regulated promoter systems commonly used for recombinant gene expression in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 26. doi:10.1186/1475-2859-12-26
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., . . . Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(2), 427-444.
- Baños-Mateos, S., van Roon, A.-M. M., Lang, U. F., Maslen, S. L., Skehel, J. M., & Lamers, M. H. (2017). High-fidelity DNA replication in *Mycobacterium tuberculosis* relies on a trinuclear zinc center. *Nature communications*, 8(1), 1-10.
- BARICH, D. (2018). *Bacillus Subtilis* Retrieved from <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/MicrobeWiki>
- Benedit, S., & Barret, P. (2018). Technique d'extraction d'ADN génomique de végétaux permettant l'amplification de longs fragments à partir d'une petite quantité de matériel. *Cahier des Techniques de l'INRA*(95).
- Betton, J. M., & Chaffotte, A. (2005). [Recombinant protein folding and production]. *Med Sci (Paris)*, 21(6-7), 613-617. doi:10.1051/medsci/2005216-7613
- Borriss, R., Danchin, A., Harwood, C. R., Médigue, C., Rocha, E. P., Sekowska, A., & Vallenet, D. (2018). *Bacillus subtilis*, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement. *Microbial biotechnology*, 11(1), 3-17.
- Bouhairi, S. (2017). *BACILLUS SUBTILIS:caracteres et applications*. (DOCTORATE), Mohammed V-RABAT. (24)
- Bourgoin, S. (2000). *Protocoles rapides pour la préparation d'ADN à partir d'échantillons caractéristiques de la biologie judiciaire*. Université du Québec à Trois-Rivières.
- Brown, T. A. (1990). *Gene cloning*: Chapman and Hall.
- Brück, H. L., Delvigne, F., Dhulster, P., Jacques, P., & Coutte, F. (2019). Molecular strategies for adapting *Bacillus subtilis* 168 biosurfactant production to biofilm cultivation mode. *Bioresource technology*, 293, 122090.
- Camille, D. (2014). *Pratique en microbiologie de laboratoire? Recherche de bactéries et de levures-moisissures*: Lavoisier.
- CARCY, B. (2018). LE CLONAGE MOLECULAIRE D'UN ADN D'INTERET SUR UN VECTEUR. Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté de Pharmacie, Université Montpellier.
- Casper, M. N. (2006). clonage
- Thermo fisher* Retrieved from <https://www.thermofisher.com/dz/en/home/life-science/cloning/topo.html>
- Chang, A. Y., Chau, V., Landas, J. A., & Pang, Y. (2017). Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI methods*, 1, 22-25.
- Chen, J., Chen, X., Dai, J., Xie, G., Yan, L., Lu, L., & Chen, J. (2015). Cloning, enhanced expression and characterization of an α -amylase gene from a wild strain in *B. subtilis* WB800. *Int J Biol Macromol*, 80, 200-207. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.06.018
- CHOUBANE, s. (2017). *Amylase de Bacillus sp. : Production, étude*

Références bibliographiques

biochimique et moléculaire et application

- biotechnologique*. (doctorat), Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf.
- Choubane, S., & Cheba, B. A. (2017). Effect of Bacillus subtilis TLO3 Amylase Pre-treatment on Ethanol Production from Raw Starches. *Biotechnology Journal International*, 1-9.
- Choubane, S., Gabed, N., Khelil, O., & Cheba, B. A. (2018). Draft Genome Sequence of Bacillus subtilis TLO3, Isolated from Olive Tree Rhizosphere Soil. *Microbiology resource announcements*, 7(11), e00852-00818. doi:10.1128/MRA.00852-18
- Choubane, S., Gabed, N., Khelil, O., & Cheba, B. A. (2018). Draft Genome Sequence of Bacillus subtilis TLO3, Isolated from Olive Tree Rhizosphere Soil. *Microbiology resource announcements*, 7(11), e00852-00818. doi:10.1128/MRA.00852-18
- Daniel, J. C., Sudantharadevi, V., & Sowmiya, S. (2017). Influence of media components and pH on the production of alpha amylase from Bacillus sp. SJC B03. *Indian J Appl Microbiol*, 20(1), 55-62.
- de Souza, P. M., & de Oliveira Magalhães, P. (2010). Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 41(4), 850-861. doi:10.1590/S1517-83822010000400004
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp*(45). doi:10.3791/2565
- Dey, T. B., Kumar, A., Banerjee, R., Chandna, P., & Kuhad, R. C. (2016). Improvement of microbial α -amylase stability: strategic approaches. *Process Biochemistry*, 51(10), 1380-1390.
- Dou, S., Chi, N., Zhou, X., Zhang, Q., Pang, F., & Xiu, Z. (2018). Molecular cloning, expression, and biochemical characterization of a novel cold-active α -amylase from Bacillus sp. dsh19-1. *Extremophiles*, 22(5), 739-749.
- Dvorak, P., Chrast, L., Nikel, P. I., Fedr, R., Soucek, K., Sedlackova, M., . . . Damborsky, J. (2015). Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in Escherichia coli BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 201. doi:10.1186/s12934-015-0393-3
- Dykes, D. D. (1988). The use of biotinylated DNA probes in parentage testing: Non-isotopic labeling and non-toxic extraction. *Electrophoresis*, 9(8), 359-368.
- Eisenhofer, R., Minich, J. J., Marotz, C., Cooper, A., Knight, R., & Weyrich, L. S. (2019). Contamination in low microbial biomass microbiome studies: issues and recommendations. *Trends in microbiology*, 27(2), 105-117.
- Elyasifar, B., Ahmadi, Y., Khosroshahi, A. Y., & Dilmaghani, A. (2019). Microbial Alpha-Amylase Production: Progress-, Challenges and Perspectives. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(3), 350-358.
- Emtenani, S., Asoodeh, A., & Emtanani, S. (2015). Gene cloning and characterization of a thermostable organic-tolerant α -amylase from Bacillus subtilis DR8806. *Int J Biol Macromol*, 72, 290-298. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.08.023
- Errington, J., & Aart, L. T. v. d. (2020). Microbe Profile: Bacillus subtilis: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology*, 166(5), 425-427.
- GenScript. (2020). *Molecular Cloning*

Handbook

Past, Present, and Future

- Techniques of Molecular Cloning*. Retrieved from https://www.genscript.com/gsfiles/techfiles/SBG150127_GenEZ_Handbook.pdf
- Ghaheri, M., Kahrizi, D., Yari, K., Babaie, A., Suthar, R., & Kazemi, E. (2016). A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. *Cellular and Molecular Biology*, 62(3), 120-124.
- Ghasemi, A., Ghafourian, S., Vafaei, S., Mohebi, R., Farzi, M., Taherikalani, M., & Sadeghifard, N. (2015). Cloning, Expression, and Purification of Hyperthermophile α -Amylase from

Références bibliographiques

- Pyrococcus woesei*. *Osong public health and research perspectives*, 6(6), 336-340. doi:10.1016/j.phrp.2015.10.003
- Guo, B., & Bi, Y. (2002). Cloning PCR products *PCR cloning protocols* (pp. 111-119): Springer.
- Guoyan, Z., Yingfeng, A., Zabel, H., Qi, G., Yang, M., Jiao, Y., . . . Xianghui, Q. (2019). Bacillus subtilis Spore Surface Display Technology: A Review of Its Development and Applications. *J Microbiol Biotechnol*, 29(2), 179-190. doi:10.4014/jmb.1807.06066
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process biochemistry*, 38(11), 1599-1616.
- Hames, B., Hooper, N., & Houghton, J. (2006). L'essentiel en biochimie. Paris: BERTI, 109-327.
- Hans Packer. (2012). Cloning strategies, Part 2: Cohesive-end cloning. Retrieved from <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/cohesive-end-cloning>
- Iqbal, S. A., & Rehman, A. (2015). Characterization of Lipase from Bacillus subtilis-4 and Its Potential Use in Oil Contaminated Wastewater. *Brazilian archives of biology and technology*, 58(5), 789-797.
- Kannan, T. R., & Kanagaraj, C. (2019). Molecular characteristic of α -AMYLASE enzymes producing from Bacillus licheniformis (JQ946317) using solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101240.
- Karakaş, B., İnan, M., & Certel, M. (2010). Expression and characterization of Bacillus subtilis PY22 α -amylase in Pichia pastoris. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64(3-4), 129-134.
- Karl Perron, P. L. (2007). clonage d'un gène Retrieved from <https://www.bioutils.ch/protocoles/3-clonage-dun-gene>
- Kaya-Ongoto, M., & Kayath, A. C. (2018). *Identification rapide des bactéries du genre Bacillus en utilisant une nouvelle génération des gènes de ménage codant pour les enzymes fibrinolytiques*.
- Khalissa, M. B. D. (2017). Production de Protéines Recombinantes.
- KOLLI Narimane, Z. R. (2014). *Production de l'alpha amylase par certaines souches fongiques sur différents substrats*. (Master), Université des frères Mentouri Canstantine
- Kong, W. (2020). Evaluation and Optimization of Methods for the DNA Extraction from Drinking water.
- Kovács, Á. T. (2019). Bacillus subtilis. *Trends in microbiology*, 27(8), 724-725.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A., Alloni, G., Azevedo, V., . . . Borchert, S. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis. *Nature*, 390(6657), 249-256.
- Kuslich, C. D., Chui, B., & Yamashiro, C. T. (2019). Overview of PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 18(1), e27.
- Laitinen, J., Samarut, J., & Hölttä, E. (1994). A nontoxic and versatile protein salting-out method for isolation of DNA. *Biotechniques*, 17(2), 316, 318, 320-312.
- Liu, Z., Yin, H., Yi, X., Zhang, A., Luo, J., Zhang, T., . . . Chen, L. (2012). Constitutive expression of barley α -amylase in Pichia pastoris by high-density cell culture. *Molecular biology reports*, 39(5), 5805-5810.
- Liu, Z. G., & Schwartz, L. M. (1992). An efficient method for blunt-end ligation of PCR products. *Biotechniques*, 12(1), 28, 30.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments : JoVE*(63), e3998-e3998. doi:10.3791/3998
- Mahmoud M. Berekaa , N. A. S. a. Y. R. A.-F. (2007). Production, Partial Characterization and Cloning of Thermostable α -amylase of a Thermophile Geobacillus thermoleovorans YN. *Biotechnology Journal International*, 6: 175-183. doi:10.3923/biotech.2007.175.183
- Mane, R. R., & Bapat, M. M. (2001). A study of extracellular alkaline protease from Bacillus subtilis NCIM 2713.

Références bibliographiques

- Marisch, K., Bayer, K., Cserjan-Puschmann, M., Luchner, M., & Striedner, G. (2013). Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 58. doi:10.1186/1475-2859-12-58
- Martínez, T. F., Alarcón, F. J., Díaz-López, M., & Moyano, F. J. (2000). Improved detection of amylase activity by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with copolymerized starch. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 21(14), 2940-2943.
- Marx, V. (2016). PCR: the price of infidelity: Nature Publishing Group.
- McKenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol*, 11(1), 33-44. doi:10.1038/nrmicro2921
- Miller, S., Dykes, D., & Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Retrieved from
- Minoda, Y., Koyano, T., Arai, M., & Yamada, K. (1968). Acid-stable α -Amylase of Black Aspergilli: Part II. Some General Properties Part III. Separation of Acid-stable α -Amylase and Acid-unstable α -Amylase from the Same Mold Amylase Preparation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 32(1), 104-113.
- Mobini-Dehkordi, M., & Javan, F. A. (2012). Application of alpha-amylase in biotechnology. *J. Biol. today's world*, 1, 39-50.
- Molecular Cloning Handbook. (2016). *GenScript* (pp. 18).
- Morikawa, M. (2006). Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *J Biosci Bioeng*, 101(1), 1-8. doi:10.1263/jbb.101.1
- Nakkeeran, S., Vinodkumar, S., Renukadevi, P., Rajamanickam, S., & Jogaiyah, S. (2019). Bioactive molecules from *Bacillus* spp.: an effective tool for plant stress management *Bioactive molecules in plant defense* (pp. 1-23): Springer.
- Nandy, A., Jana, S., Khamrai, M., Kumar, V., Mukherjee, S., Bhattacharyya, A., & Kundu, P. P. (2019). Cloning and expression of α -amylase in *E. coli*: genesis of a superior biocatalyst for substrate-specific MFC. *International Journal of Green Energy*, 16(4), 309-316. doi:10.1080/15435075.2019.1566135
- Nouadri, T. (2011). L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. *Diplôme de Doctorat. Université Mentouri, Constantine*. 143p.
- Ohdan, K., Kuriki, T., Kaneko, H., Shimada, J., Takada, T., Fujimoto, Z., . . . Okada, S. (1999). Characteristics of two forms of α -amylases and structural implication. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(10), 4652-4658.
- Oliveira, C. T., Machado, S. W., Bezerra, C. d. S., Cardoso, M. H., Franco, O. L., Silva, C. P., . . . Macedo, M. L. R. (2020). Effects of a Reserve Protein on *Spodoptera frugiperda* Development: A Biochemical and Molecular Approach to the Entomotoxic Mechanism. *Molecules*, 25(9), 2195.
- OZDEMIR, S. C., CIHAN, A. C., Kilic, T., & Cokmus, C. (2019). Optimization of thermostable alpha-amylase production from *geobacillus* sp. D413. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2019, 689-694.
- Ozturk, H. U., Denizci, A. A., Ogan, A., & Kazan, D. (2014). A maltooligosaccharides producing α -amylase from *Bacillus subtilis* SDP1 isolated from rhizosphere of *Acacia cyanophylla* Lindley. *Food biotechnology*, 28(4), 309-332.
- phschool. (2020). *the biologie place*. Retrieved from http://www.phschool.com/science/biology_place/labbench/lab6/analysis1.html
- Piggot, P. J., & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current opinion in microbiology*, 7(6), 579-586.
- Pingoud, A., & Jeltsch, A. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research*, 29(18), 3705-3727. doi:10.1093/nar/29.18.3705
- Rabbani, M., Mirmohammad Sadeghi, H., Moazen, F., Rahimi, M., & Salehi, G. (2011). Cloning and Expression of Randomly Mutated *Bacillus subtilis* α -Amylase Genes in HB101. *Biotechnology research international*, 2011, 305956-305956. doi:10.4061/2011/305956

Références bibliographiques

- Raoudha, A., Amel, S., Hassen, G., & Azeiz, O. B. (2012). Extraction de l'ADN et optimisation de la PCR (polymorphism chain reaction) pour l'application des marqueurs RAPD (random amplified polymorphism DNA) chez *Stipa lagascae*. *Acta botanica gallica*, 159(1), 73-78.
- Reiske, H. (2019). New England Biolabs. Retrieved from <https://bitesizebio.com/45131/a-beginners-guide-to-how-blunt-end-cloning-works/>
- Ren, Z., Chen, J., & Khalil, R. A. (2017). Zymography as a Research Tool in the Study of Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1626, 79-102. doi:10.1007/978-1-4939-7111-4_8
- Rizan, N., Shin, T. Y., Tajuddin, H. A., Gnana kumar, G., & Periasamy, V. (2020). Effect of pH on the Conductivity of Basidiomycetes DNAs Integrated Within Schottky-Like Junctions. *ChemistrySelect*, 5(2), 601-609.
- Sambrook J, R. D. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (FOURTH EDITION ed.). NY: Laboratoire de Cold Spring Harbor.
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. (2004). Developments in the use of Bacillus species for industrial production. *Canadian journal of microbiology*, 50, 1-17. doi:10.1139/w03-076
- Seth, A. (1984). A new method for linker ligation. *Gene Analysis Techniques*, 1(6), 99-103.
- Shahriar, M., Haque, M., Kabir, S., Dewan, I., & Bhuiyan, M. (2011). Effect of Proteinase-K on Genomic DNA Extraction from Gram-positive Strains. *Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4, 53-57. doi:10.3329/sjps.v4i1.8867
- Sharma, A., & Satyanarayana, T. (2013). Microbial acid-stable α -amylases: characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*, 48(2), 201-211.
- Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z., & Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in Escherichia coli. *Communications Biology*, 3(1), 214. doi:10.1038/s42003-020-0939-8
- Shruthi, B. R., Achur, R. N. H., & Nayaka Boramuthi, T. (2020). Optimized Solid-State Fermentation Medium Enhances the Multienzymes Production from Penicillium citrinum and Aspergillus clavatus. *Current Microbiology*. doi:10.1007/s00284-020-02036-w
- Southgate, V. J., Steyn, A. J., Pretorius, I. S., & Van Vuuren, H. J. (1993). Expression and secretion of Bacillus amyloliquefaciens alpha-amylase by using the yeast pheromone alpha-factor promoter and leader sequence in Saccharomyces cerevisiae. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 1253-1258.
- Stein, T. (2005). Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*, 56(4), 845-857.
- Teodoro, C. E. d. S., & Martins, M. L. L. (2000). Culture conditions for the production of thermostable amylase by Bacillus sp. *Brazilian Journal of microbiology*, 31(4), 298-302.
- TransGen. (2020). *pEASY®-Blunt E1 Expression Kit*. Retrieved from <https://www.transgenbiotech.com/expression-vector/peasy-blunt-e1-expression-kit.html>
- Truppo, M. D. (2017). Biocatalysis in the pharmaceutical industry: the need for speed. *ACS medicinal chemistry letters*, 8(5), 476-480.
- Tsukagoshi, N., Ihara, H., Yamagata, H., & Udaka, S. (1984). Cloning and expression of a thermophilic alpha-amylase gene from Bacillus stearothermophilus in Escherichia coli. *Mol Gen Genet*, 193(1), 58-63. doi:10.1007/bf00327414
- US Pharmacopeia. (2020). *Biological indicators for sterilization*. Retrieved from http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1035.html
- Uygun, M. A., & Tanyildizi, M. Ş. (2018). Optimization of alpha-amylase production by Bacillus amyloliquefaciens grown on orange peels. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 42(2), 443-449.
- Wu, R. J., Bahl, C. P., & Narang, S. A. (1982). Oligonucleotides useful as adaptors in DNA cloning, adapted DNA molecules, and methods of preparing adaptors and adapted molecules: Google Patents.
- Yao, S., Hart, D. J., & An, Y. (2016). Recent advances in universal TA cloning methods for use in function studies. *Protein Engineering, Design and Selection*, 29(11), 551-556.

Références bibliographiques

- Yin, L.-J., Lin, H.-H., & Xiao, Z.-R. (2010). Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. *Journal of Marine Science and Technology*, 18(3), 466-471.
- Zhou, M.-Y., & Gomez-Sanchez, C. E. (2000). Universal TA cloning. *Current issues in molecular biology*, 2, 1-8.