

Année 2022

N°: MM0392022

MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE « **Biotechnologie Médicale** »

OPTION : « **Biomédicale** »

Intitulé

Caractérisation et clonage moléculaire des gènes de la phytase de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus velezensis*

Soutenu, le 19 Juillet 2022 par :

Assia LACHHAB

Devant le jury composé de :

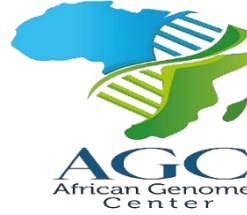
Pr. AANNIZ Tarik	Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat	Président de jury
Pr. BISKRI Latéfa	Université Mohammed VI Polytechnique	Encadrant
Pr. ALLAOUI Abdelmounaïm	Université Mohammed VI Polytechnique	Co-encadrant
Pr. HAMAMOUCHE Nouredine	Faculté des Sciences de Rabat	Examineur



ROYAUME DU MAROC
*Université Mohammed V - Rabat Faculté de
Médecine et de Pharmacie*
RABAT



Année 2022



N°: MM0392022

MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE « **Biotechnologie Médicale** »

OPTION : « **Biomédicale** »

Intitulé

Caractérisation et clonage moléculaire des gènes de la phytase de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus velezensis*

Soutenu, le 19 Juillet 2022 par :

Assia LACHHAB

Devant le jury composé de :

Pr. AANNIZ Tarik	Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat	Président de jury
Pr. BISKRI Latéfa	Université Mohammed VI Polytechnique	Encadrant
Pr. ALLAOUI Abdelmounaïm	Université Mohammed VI Polytechnique	Co-encadrant
Pr. HAMAMOUCHE Nouredine	Faculté des Sciences de Rabat	Examineur

Dédicace

À mes grands supporteurs

À ceux qui se sont toujours sacrifiés pour me voir réussir.

À mes chers parents qui ont été toujours là pour m'en encourager à réaliser mes aspirations.

C'est grâce à vos sacrifices inconditionnels, vos encouragements continuels, vos prières et vos soutiens aussi bien moral que matériel que je suis là aujourd'hui. Je vous suis infiniment reconnaissante de l'éducation et des valeurs que vous m'avez

transmises

Que Dieu vous protèges.

À ma chère sœur Meryem

Ma source de motivation et mon soutien moral

Merci sœur, d'être toujours à mes côtés pour me conseiller, me soutenir et me reconforter

À mes chers frères Mohammed et Omar

En leur souhaitant la réussite dans leur vie

À toute ma famille ... À mes chers amis

À tous ceux qui ont contribué à la réussite de ce travail

Ceux qui m'ont aidé de près ou de loin

Je vous dédie cet humble travail.

Remerciements

« Avant tout, nous remercions Dieu nous avoir donné la patience la volonté et le courage
d'achever la réalisation de ce travail »

Je voudrais dans un premier temps exprimer mes plus sincères remerciements au **Professeur ALLAOUI Abdelmounaïm**, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de Microbiologie et de Régénération Cellulaire et d'avoir accepté de codiriger ce travail. Je vous remercie Professeur pour les compétences que vous m'aviez transmises en Biologie moléculaire, pour vos conseils efficaces, votre encadrement pédagogique très consistant ainsi que pour l'intérêt avec lequel vous avez suivi de très près la progression de mon travail.

Ma reconnaissance s'adresse également au **Professeur BISKRI Latéfa**, mon encadrante de mémoire, pour sa patience, sa disponibilité, ses précieux conseils, sa rigueur professionnelle et ses discussions scientifiques qui ont été pour moi une source d'encouragement. J'ai eu le plaisir de bénéficier de votre grande compétence scientifique.

J'adresse mes plus vifs remerciements à vous, **Professeur AANNIZ Tarik** pour votre recommandation, votre soutien et pour la confiance que vous m'avez accordée. C'est avec un immense plaisir et beaucoup de fierté que j'ai compté parmi vos étudiantes et que j'ai bénéficié de votre enseignement de haute qualité. Je vous remercie également d'avoir accepté d'être le président du jury.

Je remercie **Professeur HAMAMOUCHE Nouredine**, qui m'a fait l'honneur d'assister à la présentation de ce travail et d'avoir accepté de le juger et tant qu'examinateur.

Je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipe du laboratoire, **OULKHIR FatimaEzzahra, ZIAMI Abdelhadi, ESSABRI Abdelilah** et **Laure Emeline Lylda Antey** pour leur gentillesse, leur bonne humeur, leur aide technique et conceptuelle en Microbiologie. Je voudrais remercier spécialement **Mlle CHAGRA Zaineb**, doctorante à l'UM6P, pour sa bienveillance à mon égard dès mon premier jour de stage, pour son écoute et ses conseils pertinents. Merci de m'avoir soutenu et encouragé pour continuer à parcourir cette aventure. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous et il le sera pour toujours.

Je exprime toute ma reconnaissance envers **Monsieur HIJRI Mohamed**, responsable de l'unité AGC et **Mme. ERRAFII Khaoula**, Lab Manager de la plateforme Génomiques de AGC, pour leur facilités et leur aide prestigieuse en matière de séquençage.

*U*n énorme merci à tous les enseignants responsables de la formation du Master Biotechnologie Médicale, à notre coordinatrice **OUADGHIRI Mouna**, ainsi qu'au membre du Laboratoire MedBiotech, sous la direction du **Professeur IBRAHIMI Azeddine**. Trouvez dans ce travail ma gratitude pour votre orientation et vos conseils ayant contribué à mener à bien cette formation.

*U*n grand merci à l'**UM6P**, une institution d'enseignement supérieur marocaine à vocation internationale, de m'avoir accordé une bourse durant toute ma période de stage.

Résumé

La libération séquentielle du phosphore inorganique à partir du phytate, principale forme de stockage de phosphore dans les plantes, est catalysée par des enzymes appartenant à la classe des phosphatases dénommées phytases. Parmi les phytases connues actuellement, les β -Propeller phytase (BPPHy), produites par les bactéries du genre *Bacillus*, se sont avérées être des candidats potentiels pour des applications en biotechnologie alimentaire. Durant cette présente étude, trois souches ; *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus velezensis* ont été investiguées pour l'étude et la caractérisation de leur activité phytasique au moyen d'approche moléculaires et biochimiques. Dans un premier temps, nous avons isolé le gène de la phytase des trois souches grâce à une amplification par PCR. La région codante du gène *phyL* (*B. licheniformis*) et *phyC* (*B. subtilis* et *B. velezensis*) a été ensuite clonée dans le vecteur pJET1.2 puis validée par deux méthodes : Une digestion enzymatique permettant la libération du gène d'intérêt (1146 pb) à partir du vecteur de clonage suivie du séquençage pour vérifier l'intégrité de l'insert. Parmi les clones validés, quatre ont été sélectionnés pour l'étude de l'activité phytasiques : pAL1 (*B. licheniformis*), pAL2 (*B. velezensis*), pAL3, pAL4 (*B. subtilis*). Ces derniers ont présenté une activité phytasique optimale à un pH 6.5 et à une température comprise entre 37°C et 42°C. Parmi l'ensemble des souches et clones étudiés, *B. licheniformis* et son clone dérivé (pAL1), ont montré une remarquable activité phytasique. Avec un pH optimal à 6.5 et une bonne stabilité thermique à 37 °C et 42 °C. Ces souches constituent des candidats prometteurs aux applications industrielles dans le secteur de la biotechnologie alimentaire.

Mots-clés : *Bacillus*, Phytase ; Acide phytique ; Activité phytasique ; Clonage moléculaire

Abstract

The sequential release of inorganic phosphorus from phytate, the main storage form of phosphorus in plants, is catalyzed by enzymes belonging to the class of phosphatases called phytases. Among currently known phytases, β -Propeller phytase (BPPHy), produced by bacteria of the genus *Bacillus*, have proven to be potential candidates for applications in food biotechnology. In this study, three strains; *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis* have been investigated for their phytase activity using molecular and biochemical approaches. First, we isolated the phytase gene from the three strains using PCR amplification. The coding regions of the *phyL* (*B. licheniformis*), *phyC* (*B. subtilis* and *B. velezensis*) gene were then cloned into the pJET1.2 vector and subsequently validated by two methods: Enzymatic digestion allowing the release of the inserted gene of interest (1146 bp) from the cloning vector followed and confirmed later by DNA sequencing. Among the validated clones, four were selected to study the phytase activity: pAL1 (*B. licheniformis*), pAL2 (*B. velezensis*), pAL3, pAL4 (*B. subtilis*). Collectively, we demonstrated that these clones exhibit optimal phytase activity at pH 6.5 and temperature ranging from 37°C to 42°C. As for tested strains, *B. licheniformis* and its derived clone (pAL1) showed the most remarkable phytase activity. Lastly, our results represent an interesting contribution that could be helpful in terms of industrial applications in the food biotechnology sector.

Keywords: *Bacillus*; Phytase; Phytic Acid; phytase activity; Molecular cloning

ملخص

يتم تحفيز الإطلاق المتسلسل للفوسفور غير العضوي من من حمض الفيتيك ، الذي يعد بمثابة المخزن الرئيسي للفوسفور في النباتات ، بواسطة إنزيمات تنتمي إلى فئة الفوسفاتاز المسماة الفيتاز. من بين الفيتاز المعروفة حالياً ، أثبتت β -Propeller phytase (BPPhy) التي تنتجها بكتيريا من جنس *Bacillus* ، أنها مرشحة محتملة للتطبيقات في التكنولوجيا الحيوية الغذائية. في هذه الدراسة تم اختبار ثلاث سلالات من العصيات ، *Bacillus velezensis* ، *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* بهدف دراسة نشاط الفيتاز باستخدام تقنيات الجزيئية والكيمياء الحيوية. أولاً ، قمنا بعزل جين إنزيم الفيتاز من السلالات الثلاث باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل ، ثم استنسخ منطقة ترميز جينات (*phyC* (*B. subtilis et B. velezensis*) و *phyL* (*B. licheniformis*) في الناقل البلازميدي *pJET1.2* للتأكد من الاستنساخ تمت الاستعانة بتقنيتين ، الأولى اعتمدت على إنزيمات القطع لتحرير الجين المعنى من ناقل الاستنساخ ، والثانية على تقنية تسلسل سانجر. من بين الحيوانات المستنسخة التي تم التحقق من صحتها ، تم اختيار أربعة لدراسة نشاط إنزيم الفيتاز: *pAL3* (*B. subtilis*) و *pAL4* ، *pAL2* (*B. velezensis*) ، *pAL1* (*B. licheniformis*) . بشكل جماعي ، بعد العديد من التعديلات والتحسينات التجريبية ، أظهرنا أن هذه الحيوانات المستنسخة تظهر نشاط إنزيم الفيتاز الأمثل عند درجة الحموضة 6.5 وعند الحضانة عند درجة حرارة تتراوح من 37 درجة مئوية إلى 42 درجة مئوية. أما بالنسبة للسلالات المختبرة ، فإن بكتيريا *B. licheniformis* والنسخة المشتقة منها (*pAL1*) أظهرت أعلى نشاط للفيتاز. أخيراً ، تمثل نتائجنا مساهمة مثيرة للاهتمام يمكن أن تكون مفيدة من حيث التطبيقات الصناعية في قطاع التكنولوجيا الحيوية الغذائية.

الكلمات المفتاحية: العصيات ، الفايترز ، حمض الفيتيك ، نشاط إنزيم الفايترز ، الاستنساخ

Avant-propos



Ce travail a été entamé dans le cadre du projet de fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master en **Biotechnologie Médicale** option Biomédicale sous la direction de Professeur BISKRI Latéfa, Professeur à Université Mohammed VI Polytechnique et Professeur ALLAOUI Abdelmounaïm, responsable du laboratoire de Microbiologie et Régénération Cellulaire.

Table des matières

Résumé.....	6
Abstract.....	7
Avant-propos.....	9
ABRÉVIATIONS	14
LISTE DES FIGURES	16
LISTE DES TABLEAUX.....	19
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	20
CHAPITRE I : ACIDE PHYTIQUE : UN COMPOSE ANTINUTRITIONNEL.....	23
I. Phosphore phytique	24
1. Définition.....	24
2. Structure et aspect physico-chimique	24
1. Occurrence de phytate dans les graines de plantes.....	25
II. Propriétés antinutritionnelles de l'acide phytique	26
1. Effet sur l'absorption des minéraux.....	26
2. Effet sur les macronutriments	27
CHAPITRE II : LES PHYTASES.....	28
I. Phytases.....	29
1. Définition.....	29
2. Mécanisme d'hydrolyse	29
3. Sources, caractéristiques et propriétés physicochimiques.....	30
a. Phytase végétale	30
b. Phytase microbienne.....	30
II. Classification des phytases.....	31

1.	pH optimal.....	31
2.	Site d'initiation de l'hydrolyse	32
3.	Mécanisme catalytique.....	32
a.	Phytase acide histidine (HAP)	32
b.	β -propeller phytase ou la phytase β –hélicoïdale (BPPs)	33
c.	Phytase à cystéine (CP).....	33
d.	La phosphatase acide pourpre (PAP)	34
III.	Activite phytasique	35
1.	Effet de la température et du pH.....	35
2.	Effet des métaux ioniques	36
IV.	Application des phytases.....	36
1.	Phytases comme additifs dans l'alimentation animale.....	36
2.	Phytases dans l'alimentation humaine	37
	CHAPITRE III : PHYTASES DES <i>Bacillus</i>.....	38
I.	Le genre <i>bacillus</i>	39
1.	<i>Bacillus subtilis</i>	39
2.	<i>Bacillus licheniformis</i>	39
3.	<i>Bacillus velezensis</i>	39
II.	Phytase des <i>Bacillus</i>.....	40
1.	Caractéristiques moléculaires, enzymatiques et propriétés biochimiques	40
a.	Propriétés biochimiques et enzymatiques.....	40
b.	Substrat spécificité et effet des ions Ca^{2+}	40
2.	Caractéristiques moléculaires et structurels	41
3.	Site actif.....	42
4.	Mécanisme catalytique.....	43
III.	Application biotechnologies des phytases de <i>Bacillus</i>.....	43
1.	Applications dans l'alimentation humaine et animal.....	43
a.	Application dans l'alimentation animale.....	43
b.	Application dans l'alimentation humaine	44
2.	Potentiel probiotique des bactéries productrices des phytases.....	44
3.	Synthèse des inositols phosphate (IP) inférieurs.....	44

MATERIELS ET METHODES.....	45
I. Objectif de ce memoire	46
II. Souches bacteriennes et milieux de cultures	46
1. les souches <i>Bacillus</i>	46
2. <i>Escherichia coli</i>	46
3. Milieux et conditions de cultures.....	46
III. Amplification des genes de phytase par pcr « Polymerase Chain Reaction ».....	46
1. Principe	46
2. Milieu réactionnel et programme utilisé.....	47
3. Electrophorèse sur gel d'agarose	48
4. Purification de produits de PCR.....	49
5. Dosage par spectrophotométrie : Nanodrop ®.....	49
IV. Clonage moléculaire.....	49
A. Vecteurs de clonage.....	50
1. Le plasmide pJET1.2.....	50
2. Le plasmide pSW23T.....	50
3. Le plasmide pGEX-4T2.....	51
B. Clonage dans le pJET1.2/blunt.....	51
1. Constructions plasmidiques.....	51
2. Blunting et ligation vecteur-insert.....	52
3. Transformation du produit de la réaction de ligation.....	52
4. Criblage et validation des clones recombinants.....	53
C. Clonage dans le vecteur d'expression pGEX-4T2.....	56
1. Préparation du vecteur et de l'insert.....	57
2. Transformation des bactéries Top10 chimio-compétentes et vérification des clones.....	58
D. Clonage dans le plasmide recombinant pSW23T.....	59
1. Elaboration de la construction plasmidique.....	59
2. Ligation vecteur-insert.....	60
3. Transformation des bactéries DH5 α λ pir et vérification des clones	61
4. Validation du clonage.....	61
V. Test de phytase.....	61
1. Test sur milieu solide	61

2. Test sur milieu liquide	62
Workflow de l'étude	62
RESULTATS ET DISCUSSION.....	63
I. Amplification des genes de phytase par pcr « Polymerase Chain Reaction ».....	64
II. Clonage moléculaire.....	65
1. Etude <i>in silico</i>	65
2. Clonage dans le pJET1.2.....	65
3. Criblage et screening pour des clones	66
4. Séquençage et alignement des séquences nucléotidiques	68
5. Traduction et alignement des séquences protéiques.....	68
6. Clonage dans le vecteur d'expression pGEX-4T2.....	68
5. Clonage dans le vecteur suicide pSW23T.....	69
III. Test de phytase.....	70
1. Test sur milieu solide	70
2. Test dans milieu liquide.....	73
DISCUSSION	74
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	78
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	80
ANNEXES	88

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

AP : Acide phytique

BET : Brommure d'Ethidium

BPP : β -propeller phytase

CN : Culture de nuit

CP : phytase cystéine

DO : Densité optique

dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate

ddNTP : di-désoxyribonucléotide triphosphate

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

GST : Glutathion S-Transférase

HAP : phosphatase acide histidine

IHS : myo-Inositol Hexa-Sulfurique

Ins: Inositol

IP: Inositol phosphate

IP6 : *Myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphorique

MCS : Site de Clonage Multiple

MM : Milieu minimum

Myo-Ins: Myo-inositol

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ORF: Open Reading Frame

P : phosphore

PAP : phosphate acide pourpre

pb : paire de base

PDB : Banque de Données des Protéines

PGPR: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

Pi: phosphore inorganique

pKa: constante d'équilibre

PSM: Phytate Screening Medium

PTP: Protéine Tyrosine Phosphatase

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

TAE: Tris-Acétate EDTA

TE: Tampon d'elution

TSA: Trypto-caséine soja agar

TSB : Bouillon Tryptone-Soja

Tm : Température de fusion

UM6P : Université Mohamed 6 Polytechnique

UV : Ultraviolet

Liste des figures

Figure 1 : Acide phytique : Myso-inositol hexaképhosphate (Kumar et al., 2010)	24
Figure 2 : Structure chimique de Myo-inositol (A), de la forme anionique de l'AP (B) et du chélate phytate à pH physiologique (C). De Ingelmann H-J, Rimbach G et Pallauf J (1993)	25
Figure 3 : Interactions possible de l'AP avec les minéraux et les protéines (Shabidi, 1997)	27
Figure 4 : Hydrolyse de l'AP par la phytase et libération de l'Ins, du phosphate et d'autres éléments divalents (Yao et al., 2012)	29
Figure 5 : Schéma résumant l'action des phytases sur l'AP et les InsP inférieures, avec la libération du Pi. Schéma inspiré de (R. Greiner et al., 2002)	29
Figure 6 : Représentation structurale de la phytase AppA d'Escherichia coli en complexe avec le Myo-Inositol hexasulfate (IHS : analogue du phytate) (PDB ID: 1DKN)	33
Figure 7 : Représentation de la structure secondaire de la PTP de S. ruminantium en complexe avec l'IHS (analogue de phytate). (PDB ID : 1U26). Les boucles qui hébergent les résidu catalytique sont indiquées et colorées en magenta (Chen et al., 2015)	34
Figure 8 : Représentation de la structure en hélice à six lames de BPP de Bacillus subtilis avec l'IHS (analogue du phytate) lié au site actif de l'enzyme. (PDBID : 3AMR).....	41
Figure 9 a) Diagramme en ruban b) Repliement topologique de la phytase TS-Phy de B. amyloliquefacience (B.-H. Oh et al., 2000).....	42
Figure 10 : Représentation de la structure cristalline de la BPP démontrant la présence les deux séquences conservées	42

Figure 11 : Mécanisme de déphosphorylation du phytate-Ca ²⁺ par la TS-phy de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> selon Oh et al.....	43
Figure 12 : Présentation du vecteur pJET1.2	50
Figure 13 : Présentation du vecteur suicide pSW23T.....	50
Figure 14 : Carte de restriction du vecteur pGEX4T2	51
Figure 15 : Amorces utilisées pour l'amplification du gène phyL de la souche DN1	57
Figure 16 : Électrophorèse sur gel d'agarose 0,7% (A) et 1% (B) de 2 µL de produits d'amplification par PCR. PM : poids moléculaire 1KB. Puits 1,3,5,7,9 : Contrôles négatifs ; Puits 2 : phyL(DN1) ; Puits 4 : phyC (Z10) ; Puits 6 : phyC (Z16) ; Puits 8 : GST-pphyL ; Puits 10 : GST-phyL-His	64
Figure 17 : (A) Analyse par électrophorèse en gel d'agarose 0,7 % de produits de PCR purifiés. Puits 1 : phyL (DN1), puits 2 : GST-phyL (D1), puits 3 : GST-phyL-His, puits 4 : phyC (Z10), puits 5 : phyC (Z16). (B) Analyse du produit de PCR purifié du fragment interne phyLIn en gel d'agarose à 1%.....	65
Figure 18 : Vérification du clonage par une double digestion enzymatique BamHI / XbaI (A) pour le clonage du gène entier phyL et BamHI / XbaI (B) pour le clonage du fragment interne (phyLIn). Les produits de digestion ont été analysés sur un gel d'agarose 1%.....	66
Figure 19 : Vérification du clonage des gènes phyCBS et phyCBV dans le pJET1.2 par une double digestion enzymatique BamHI / HindIII. PM : poids moléculaire 1KB plus DNA Ladder. 1 : produit de la digestion de pJET1.2 :: phyCBV 2 et 3 : produits de digestion de pJET1.2 :: phyCBS	67
Figure 20 : Vérification du clonage du gène phyL amplifié par les deux amorces GST-phyL R et phyL-His par une double digestion enzymatique Sall / BamHI. PM : Poids Moléculaire 1KB plus DNA Ladder. 1,2,3,4,5,6,7,8,9 et 10 : profil de la digestion enzymatique des 10 clones.....	67
Figure 21 : Double digestion enzymatique du pGEX-4T2 (A) et pAL5(B) par Sall/ BamHI	69
Figure 22 : Double digestion enzymatique BamHI/EcoRI de pAL (A) et pSW23T (B).....	69
Figure 23 : Électrophorèse en gel d'agarose du produit de PCR des dix colonies (3-12) 1 : contrôle négatif 2 : contrôle positif.....	70
Figure 24 : Résultats de test de l'activité phytasique sur milieu solide à des pH et températures différentes.....	70

<i>Figure 25 : Résultats de l'ensemencement des souches et des clones dans un milieu TSB.....</i>	<i>71</i>
<i>Figure 26 : Concentration de Pi (mg/L) libéré par les clones (pAL1, pAL2, pAL3 et pAL4) et les souches (DN1, Z10, Z16 et Top10) après une incubation de 3 jours dans un MM avec la phytate et sans phytate à un pH 6.5 et une température de 37°C et 42°C</i>	<i>73</i>
<i>Figure 27 : La carte de restriction des constructions plasmidiques élaborés au cours de cette étude.....</i>	<i>88</i>
<i>Figure 28 : Résultats de l'alignement dans l'outil BLASTn.....</i>	<i>89</i>
<i>Figure 29 : Résultats de l'alignement par paire de la séquence protéique du clone pAL1 (A), pAL3 (B) et pAL4 (C) avec celle de la souche d'origine en utilisant l'outil EMBOSS Ndedee.....</i>	<i>90</i>

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition en AP dans certaines sources alimentaires (N. R. Reddy et al., 1982)	26
Tableau 2 : Classification des phytases selon leur mécanisme d'action	35
Tableau 3 : Caractéristiques de certaines phytases actuellement disponible dans le marché	37
Tableau 4 : Listes des amorces utilisées dans notre études	47
Tableau 5 : Composition du milieu réactionnel et programme utilisé pour la réaction PCR.....	48
Tableau 6 : Constructions plasmidiques élaborées en utilisant le plasmide pJET1.2.....	51
Tableau 7 : Liste des enzymes de restrictions utilisées et leur sites de restriction.....	54
Tableau 8 : Composition du milieu réactionnel et programme de la PCR.....	56
Tableau 9 : Protocole adopté pour la double digestion enzymatique du vecteur et de l'insert	57
Tableau 10 : Tableau résumant le protocole de la ligation vecteur-insert	58
Tableau 11 : Amorces utilisées pour l'amplification d'un fragment interne (phyLI _n) du gène phyL de la souche DN1.....	59
Tableau 12 : Composition du milieu réactionnel de la double digestion enzymatique	60
Tableau 13 : Protocole de la ligation du vecteur pGEX-4T2 et l'insert GST-phyL.....	60
Tableau 14 : Résultat de l'alignement des séquences nucléotidiques.....	68
Tableau 15 : Résultats de teste de l'activité phytasique sur milieu solide dans différents conditions de pH et température	72

Introduction générale

Le phosphore est un oligoélément indispensable au bon fonctionnement des organismes. Il joue un rôle à la fois structurel en servant de composant d'ADN, d'ARN et des phospholipides membranaires et métabolique en contribuant au métabolisme minéral, à la mise en réserve et la libération de l'énergie (Takeda *et al.*, 2004). Les plantes tirent leur besoin en phosphore du sol, tandis que les animaux les obtiennent des végétaux où il est présent principalement sous forme d'un mélange de différents sels de l'acide *Myo*-inositol hexaphosphorique, dit acide phytique (SAUVEUR, 1989).

L'acide phytique, connu également sous le nom de *Myo*-inositol (1, 2, 3, 4, 5, 6) hexakisphosphate, constitue la principale forme de stockage de phosphore organique dans les tissus végétaux avec un pourcentage de la teneur totale en phosphore allant de 60 à 90% (Cosgrove, 1966). À cause de sa structure particulière, ce dernier est considéré comme un agent chélateur poly-anionique capable de se complexer avec divers cations divalents tels que le Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} et Mn^{2+} . Sa consommation peut conduire à une diminution de la biodisponibilité voire même de l'absorption de ces micronutriments. Outre son pouvoir chélateur, l'acide phytique est également connu pour sa capacité à se complexer avec certaines protéines, affectant ainsi leur structure et diminuant leur activité enzymatique (Kies *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2012).

Le phosphore phytique n'est pas assimilable par les animaux monogastriques, y compris l'Homme, en raison de l'absence ou de la faible activité phytasique présente au niveau de leur tube digestif (Bohn *et al.*, 2008). Conséquemment à une telle situation du phosphore inorganique est constamment ajouté comme additif dans l'alimentation des animaux, afin de satisfaire leur besoin nutritionnel en phosphore et d'assurer leur croissance. Cependant, cette supplémentation présente deux inconvénients majeurs. Le premier implique l'augmentation du coût de l'alimentation animale et le deuxième concerne la pollution environnementale. En effet, l'addition du phosphore exogène fait qu'une fraction importante du phosphore alimentaire, non utilisée par l'animal, sera éliminée dans leurs excréments. Ceci, conduit à une forte accumulation du phosphore dans le sol, causant ainsi de sérieux problèmes de pollution environnementale principalement dans les zones d'élevage massif (Bohn *et al.*, 2008; Raboy, 2009).

La libération du phosphore par hydrolyse de l'acide phytique est réalisée par des enzymes spécifiques appelées phytases. Il s'agit des phosphomonoestérases, appartenant à la classe des phosphatases et qui catalysent l'hydrolyse séquentielle du phytate en des dérivés de *Myo*-inositol moins phosphorylés, avec une libération concomitante de phosphate inorganique (Yao *et al.*, 2012). Ainsi, en dégradant l'acide phytique, les phytases contribuent à l'atténuation de son effet antinutritionnel, augmentant ainsi la biodisponibilité des ions minéraux de même que le phosphore inorganique.

En vertu de leur capacité à hydrolyser l'acide phytique, les phytases ont attiré une attention considérable des chercheurs dans les domaines de la nutrition, la protection de l'environnement et la biotechnologie. En effet, l'application de la technologie du génie génétique a permis la production et l'utilisation des phytases dans l'alimentation animale et humaine (Zhao *et al.*, 2021). Ceci favorise non seulement l'atténuation de l'effet antinutritionnel du phytate, mais améliore également la valeur nutritive des aliments d'origine végétale en facilitant la biodisponibilité des minéraux et de phosphore inorganique (Rao *et al.*, 2009). De ce fait, la supplémentation en phosphore inorganique peut être contournée en incluant des quantités adéquates de phytase ce qui pourrait réduire jusqu'à 50% les excréments fécaux de phosphore prévenant ainsi la pollution environnementale (El-Toukhy *et al.*, 2013).

Les phytases sont largement répandues dans la nature. En fonction de leurs caractéristiques structurales et catalytiques, ces dernières sont classées en quatre grandes classes à savoir les phosphatases acides histidine (HAP), les phytases à hélice bêta (BPP), les phosphatases acides pourpres (PAP) et phytase à cystéine (CP) (Mullaney & Ullah, 2003). Parmi celles-ci, les BPP principalement isolées des bactéries du genre *Bacillus*, sont beaucoup plus avantageuses pour des applications commerciales en raison de leur thermostabilité, leur résistance protéolytique et leur spécificité absolue du substrat. Compte tenu de ses propriétés intéressantes, les phytases synthétisées par les *Bacillus* constituent une solution prometteuse pour surmonter les problématiques rencontrées avec la consommation de l'acide phytique (Fu *et al.*, 2008a; Jorquera *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2021). Ainsi, de nombreuses bactéries appartenant à ce genre-là, ont été exploitées pour des applications potentielles en nutrition animale et santé humaines. Notamment, la souche industrielle *Bacillus licheniformis*, *Bacillus velezensis* et *Bacillus subtilis*.

Selon la base de données NCBI, les trois souches citées se caractérisent par la possession d'un gène d'environ 1143 pb codant pour une phytase thermostable, hautement spécifique pour les complexes calcium-phytates et avec une activité catalytique considérablement importante. C'est autour de ces trois bactéries que portera le présent travail. Nous nous sommes intéressés à

investiguer la capacité de trois souches bactériennes, isolées dans notre laboratoire (UM6P) à partir de différentes niches écologiques, *Bacillus licheniformis* (DN1), *Bacillus subtilis* (Z10) et *Bacillus velezensis* (Z16) à hydrolyser et utiliser l'acide phytique, en utilisant des approches moléculaires et biochimiques.

A la lumière de cet objectif nous avons adopté la stratégie suivante :

- ✚ Tout d'abord, nous avons évalué la capacité des souches DN1, Z10 et Z16 à utiliser l'acide phytique, en étudiant leur capacité à croître dans un milieu minimum avec comme seule source de phosphore le phytate ;
- ✚ Ensuite, nous avons entamé l'amplification et le clonage du gène de phytase des trois souches, pour transformer des souches de *E. coli*, inaptes à utiliser le phytate, afin de vérifier si ce gène est capable de leur conférer la capacité d'utiliser le phytate ;
- ✚ Par ailleurs, nous nous sommes intéressées à élaborer des protéines recombinantes, fusionnées soit à la GST ou à un motif poly-histidine (6 His), pour procéder par la suite à une purification de la protéine et l'étude des interactions possibles avec d'autres protéines.
- ✚ Finalement, nous avons tenté à muter le gène de la phytase en utilisant une stratégie basée sur l'utilisation d'un vecteur suicide.

Chapitre 1 :

Acide phytique : Un composé antinutritionnel

I. Phosphore phytique

1. Définition

L'acide *Myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphorique (IP6) couramment appelé acide phytique (AP), est une molécule d'origine végétale, de formule brute $C_6H_{18}O_{24}P_6$ et de masse moléculaire **660 g/mol**. Elle constitue la principale forme de stockage du phosphore (P) dans les plantes, avec un pourcentage allant de 60% jusqu'à 90% (POINTILLART, 1994a; Shahidi, 1997). Cette forme de P organique, correspond à un produit d'estérification d'un polyalcool cyclique (*Myo*-inositol) par l'acide phosphorique (Fig. 1). Suivant cette structure unique, l'AP est réputé comme étant un facteur antinutritionnel avec des propriétés de chélation importantes pour divers cations, notamment le Ca^{2+} , le Zn^{2+} et le Mg^{2+} . Ainsi, l'AP se trouve majoritairement sous forme de sels insolubles de calcium ou de magnésium dites phytate (Kumar *et al.*, 2010).

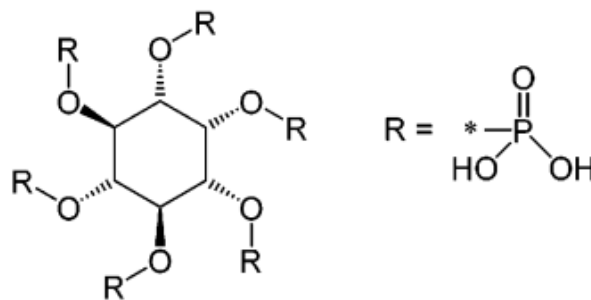


Figure 1 : Acide phytique : *Myo*-inositol hexakisphosphate (Kumar *et al.*, 2010)

2. Structure et aspect physico-chimique

Avant d'aborder la chimie de l'AP, il est important de pouvoir différencier entre ses différentes formes. **L'acide phytique** est la forme libre de *Myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. Il est composé d'un radical inositol (*Myo*-inositol) (Fig. 2A) dont les six groupes hydroxyles (OH) sont estérifiés par un phosphate $-O-PO(OH)_2$ (Reddy *et al.*, 1982).

A pH physiologique (6-7), les phosphates de l'AP sont partiellement ionisés et la molécule se présente sous une forme anionique dite **phytate** (Fig. 2B). Dans une telle forme, le phytate peut se complexer avec des ions cationiques principalement le K^+ , le Ca^{2+} et le Mg^{2+} formant ainsi des complexes peu soluble de sel de calcium, de potassium ou de magnésium appelé **la phytine** (Fig. 2C) (Reddy *et al.*, 1982).

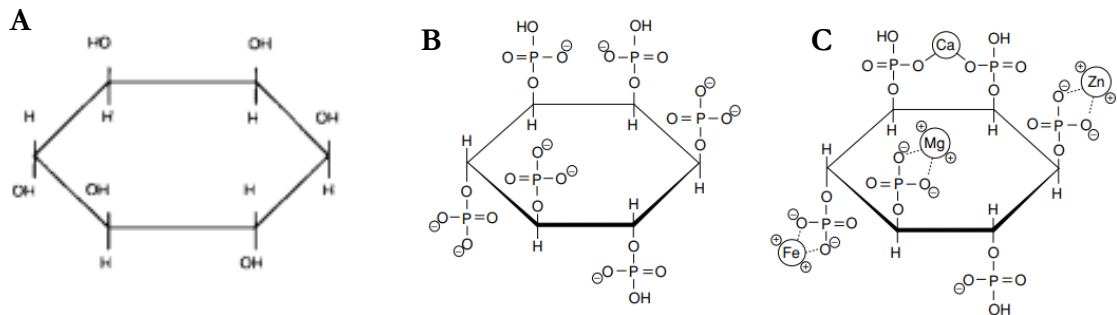


Figure 2 : Structure chimique de Myo-inositol (A), de la forme anionique de l'AP (B) et du chélate phytate à pH physiologique (C). De Ingelmann H-J, Rimbach G et Pallauf J (1993)

Structurellement, l'AP consiste en six groupes de phosphates liés aux six molécules de carbones. Il possède un totale de 12 protons, 6 d'entre eux sont fortement dissociés [pKa 2–3] alors que, les autres sont faiblement dissociés [pKa 5–9]. Conformément à cette structure, à pH neutre, les groupes phosphates de l'AP se trouvent chargés négativement, ce qui attribue à la molécule une grande capacité de chélation en facilitant la fixation des divers cations et par la suite, la formation de sels complexes très stables et insolubles (Sanz-Penella & Haros, 2014).

Certes l'AP représente une réserve de P, sa déphosphorylation se déroule d'une manière séquentielle et aboutit à de l'Ins-5 phosphates (IP5), -4 phosphates (IP4), -3 (IP3), -2, (IP2), - 1 phosphate (IP1). Les deux premiers produits, possèdent la capacité de chélater fortement les cations, tandis que les trois derniers se contentent d'une faible capacité de fixation aux minéraux qui les rend plus solubles et donc plus absorbables (Kumar *et al.*, 2010).

1. Occurrence de phytate dans les graines de plantes

L'AP est omniprésent dans une large variété d'aliments végétaux, en particulier dans les céréales et les légumineuses. Selon l'espèce, la quantité et la distribution des phytates sont être très variables. En effet, les sources les plus concentrées sont généralement les graines oléagineuses, les graines entières et les légumineuses. Les racines, les tubercules et d'autres légumes peuvent également contenir de l'AP, mais en faible quantité (Nissar *et al.*, 2017). Le tableau ci-dessous représente la quantité, en mg/g par pois sec, de l'AP dans certaines sources alimentaires.

Tableau 1 : Composition en AP dans certaines sources alimentaires (N. R. Reddy *et al.*, 1982)

Source		Acide phytique (mg/g de poids sec)
Céréales	Mais	7,2 – 22,2
	Blé	3,9 – 13,5
	Orge	3,8- 11,6
	Riz	0,6 – 10,8
Légumineuses	Lentilles	2,7 – 15,1
	Pois	2,2 – 12,2
	Haricot	6,1 – 2,38
Graines oléagineuses	Soja	10- 22,2
	Lin	21,5- 36,9
	Colza	25
	Sésame	14,4 – 53,6

II. Propriétés antinutritionnel de l'acide phytique

La principale préoccupation concernant la présence de l'AP dans l'alimentation, est sa forte capacité de chélation des nutriments, y compris l'amidon, les protéines et les minéraux. Cette chélation aboutit à une double conséquence, d'une part, la diminution de la biodisponibilité et l'absorption de l'élément auquel l'AP est complexé et, d'autre part, la diminution de la biodisponibilité du P-phytique (Bohn *et al.*, 2008; Nissar *et al.*, 2017).

1. Effet sur l'absorption des minéraux

La structure particulière de l'AP confère un grand pouvoir de chélation des minéraux cationiques. En effet, l'AP étant une molécule chargée négativement dans des conditions de pH gastro-intestinal, il se lie facilement à des cations di- et trivalents tels que le Zn^{2+} , le Fe^{2+} , le Ca^{2+} et le Mn^{2+} (Fig. 3) (Vohra & Satyanarayana, 2003). De cette interaction résultent des complexes de phytate de métal insoluble, rendant le métal indisponible pour l'absorption dans le tractus intestinal (POINTILLART, 1994a).

Cet effet négatif de l'AP sur l'absorption des minéraux, a été longuement démontré grâce à de nombreuses études ayant parvenu à indiquer l'existence d'une relation inverse entre la teneur en phytate et la disponibilité des minéraux. Il a été rapporté dans la littérature qu'une élimination de l'AP permet une augmentation significative de l'absorption du Fer, inversement, un ajout de l'AP s'accompagne d'une inhibition de nouveau de l'absorption de ce minéral (Hallberg *et al.*, 1989). Pour le Zinc, comme il forme le complexe le plus stable et le plus insoluble avec l'AP, il serait le minéral le plus affecté par les fortes concentrations en AP (Secco *et al.*, 2017; Shahidi, 1997).

2. Effet sur les macronutriments

Des épreuves solides ont pu prouver l'aptitude de l'AP à interagir avec les protéines dans des conditions acides, de même qu'alcalines. Ces interactions sont pH dépendantes. En fait, à des valeurs de pH inférieures à leur point isoélectrique, les protéines se trouvent chargées positivement et l'AP, chargé négativement, forme avec eux de puissants complexes insolubles. Par conséquent, cette interaction peut affecter la structure des protéines et diminue leur activité enzymatique (Cheryan & Rackis, 1980; Kumar *et al.*, 2010).

Au-dessus du point isoélectrique de la protéine, bien que celle-ci et l'AP soient chargés négativement, des interactions entre eux peuvent s'établir par l'intermédiaire des cations multivalents tel que le Ca^{2+} . Ainsi des complexes protéines-cation-phytates se produisent (Fig. 3) (Konietzny & Greiner, 2003).

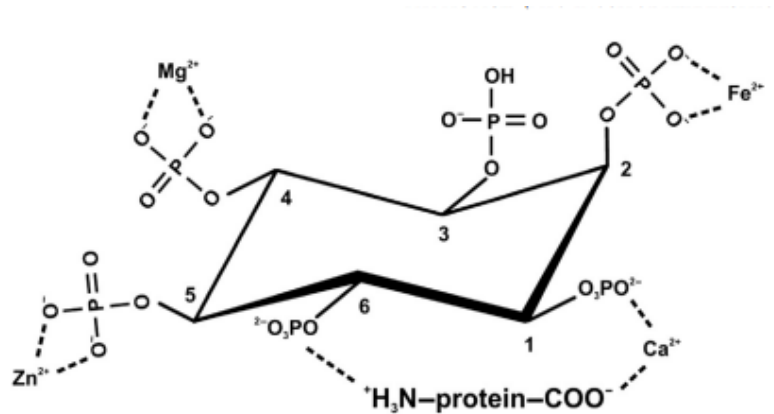


Figure 3 : Interactions possible de l'AP avec les minéraux et les protéines (Shabidi, 1997)

Chapitre 11 :

Les phytases

I. Phytases

1. Définition

Les phytases sont des phosphomonoestérases, connues chimiquement sous le nom de *Myo*-inositol (1,2,3,4,5,6)-hexakisphosphate phosphohydrolase. (Kumar & Sinha, 2018). Ce sont des enzymes ubiquitaires, appartenant à la sous-classe des estérases et qui catalysent l'hydrolyse séquentielle de l'AP en libérant du phosphore inorganique (Pi), des inositols phosphate (IP) moins phosphorylés et éventuellement le *Myo*-inositol (*Myo*-Ins) libre. (Yao *et al.*, 2012). En hydrolysant l'AP, la phytase joue un rôle essentiel dans le métabolisme du P végétal, de même que la libération des cations qui pourraient être liés à celui-ci par chélation. La figure 4 élucide la réaction d'hydrolyse catalysée par les phytases et les produits issus de cette réaction.

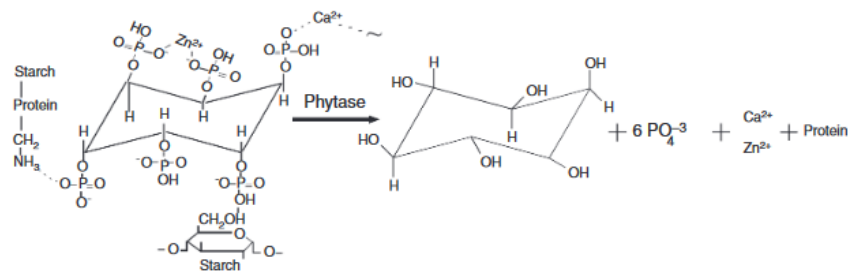


Figure 4 : Hydrolyse de l'AP par la phytase et libération de l'Ins, du phosphate et d'autres éléments divalents (Yao *et al.*, 2012)

2. Mécanisme d'hydrolyse

Lors de la dégradation complète de l'AP, les phytases catalysent la libération de l'Ins et de l'orthophosphate, par le biais de divers produits intermédiaires, notamment les mono-, di-, tri-, tétra- et penta-esters d'Ins (Vats & Banerjee, 2004). Elles initient une dégradation séquentielle des groupes orthophosphates à partir du cycle Ins de l'AP. Ainsi, du fait de la non-spécificité de la phytase vis-à-vis à l'IP6, les *Myo*-Ins intermédiaires (IP5 à IP1) vont être également hydrolysés par des déphosphorylations en cascade jusqu'à la libération de *Myo*-Ins comme produit final (Fig. 5) (Sandberg & Andlid, 2002).

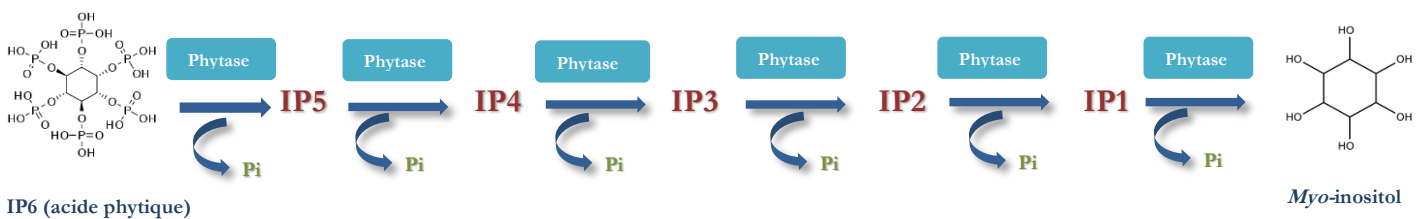


Figure 5 : Schéma résumant l'action des phytases sur l'AP et les InsP inférieures, avec la libération du Pi. Schéma inspiré de (R. Greiner *et al.*, 2002)

3. Sources, caractéristiques et propriétés physicochimiques

Les phytases sont des enzymes ubiquitaires, largement distribuées dans diverses formes de vie. Suivis des plantes, les microorganismes sont considérés comme étant la plus grande source potentielle de phytase (Kumar & Sinha, 2018).

a. Phytase végétale

De nombreuses plantes ont été signalées pour leur capacité à produire la phytase, y compris le blé, le riz, le colza, le soja, le maïs, etc... (Gibson & Ullah, 1988; Greiner *et al.*, 2001) Cette dernière se concentre principalement dans les compartiments de stockage tels que les graines, et agit lors de la germination des semences afin de permettre la libération de Pi nécessaire à la croissance et la germination des plantes (POINTILLART, 1994b; Sandberg & Andlid, 2002).

La majorité des phytases végétales se classent comme étant des phosphatases acides d'histidine, avec un pH optimal compris entre 4,5 – 6,0 et une température optimale oscillant entre 38°C et 55°C. Elles initient l'hydrolyse du phytate en position C6 du cycle *Myo*-Ins hexaphosphate et sont donc considérées comme des 6-phytases (Kumar & Sinha, 2018; Madsen & Brinch-Pedersen, 2019).

b. Phytase microbienne

De nombreux micro-organismes, ont été rapportés dans la littérature comme producteurs de la phytase, notamment les levures, les champignons et les bactéries. Cette production est le plus souvent induite par un manque de Pi.

Classés comme 3-phytases, la plupart des phytases produites par les champignons et les levures sont des phosphatases acides, glycosylées et actives pour une grande variété de substrats. Hormis la *phyB* de *Aspergillus niger* et celle de *Sporotrichum thermophile*, qui sont respectivement des protéines tétramères et pentamères, toutes les phytases fongiques sont des monomères avec un poids moléculaire allant de 40 à 500 kDa. En plus de la grande spécificité du substrat, les phytases fongiques se caractérisent par une activité catalytique stable à des températures élevées (44 – 70 °C) et dans une large gamme de pH (Balwani *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2020; Singh & Satyanarayana, 2015a).

Quant aux phytases bactériennes, elles sont soit des phosphatases acides d'histidines non glycosylées, ou des phytases alcalines avec une structure hélicoïdale (Lei *et al.*, 2007). Elles se différencient des phytases fongiques par leur pH optimal qui varie de l'acide à l'alcalin, leur forte dépendance aux ions Ca²⁺ et leur forte spécificité vis-à-vis au substrat. L'étude des caractéristiques moléculaires et physico-chimiques révèle que, ces enzymes se caractérisent par un poids moléculaire

compris entre 37 et 55 kDa et une activité catalytique dans des gammes de pH (4,5 - 8,5) et de température dans les intervalles (25 – 70°C) (Jain *et al.*, 2016).

La production des phytases bactériennes se fait généralement en phase stationnaire en réponse à un manque de Pi (Konietzny & Greiner, 2004). De même, il a été démontré que les cellules bactériennes sont capables de produire des phytases extracellulaires (*Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*), des phytases associées aux membranes cellulaires (*S. ruminantium* et *M. multiacidus*) de même que des phytases périplasmiques (*E. coli*, *Pantoea vagans*) (Gessler *et al.*, 2018; Konietzny & Greiner, 2004). En comparant les différentes sources de phytase, il s'est avéré qu'en matière de spécificité et d'affinité du substrat, les phytases microbiennes semblent avoir une grande affinité pour l'AP, tandis que, les phytases végétales et fongiques présentent une spécificité plus large de l'hydrolyse des P insolubles (InsP) inférieurs (Greiner *et al.*, 2002; Lei *et al.*, 2007; Wyss *et al.*, 1999).

II. Classification des phytases

Au cours des dernières décennies, de nombreux types de phytases, avec des structures et des propriétés différentes, ont été identifiées et isolées à partir de différents organismes. Elles ont été classées dans différentes catégories selon trois critères, leur pH optimal, le site d'initiation de la déphosphorylation du phytate et le mécanisme catalytique (Balwani *et al.*, 2017).

1. pH optimal

En fonction de leur pH optimal, les phytases sont regroupées en trois catégories : les phytases acides, neutres et alcalines. Leur activité optimale a été rapportée à pH 5,0 ; 7,0 ; et 8,0 respectivement (Kumar & Sinha, 2018). Pour les phytases acides, celles-ci sont produites par de nombreux micro-organismes et plantes, et démontrent une activité optimale dans des plages de pH comprises entre 2,0 et 6,0 (Singh & Satyanarayana, 2011, 2015b). Concernant les phytases neutres, ces dernières ne sont décrites que chez un nombre limité de bactéries et de champignons, y compris *Bacillus subtilis*, *Bacillus nealsonii* et *Penicillium oxalicum*, qui sécrètent des phytases avec une activité optimale à un pH égale à 7,0 (Jain *et al.*, 2018; Kaur *et al.*, 2017). La troisième, et dernière catégorie concernent les phytase alcalines. Signalées pour la première fois chez *Bacillus licheniformis*, l'activité catalytique de ladite phytase s'observe principalement dans des valeurs de pH de 7,5 à 8,0, et est liée étroitement à la présence et la disponibilité des ions Ca^{2+} (Azeem *et al.*, 2015).

2. Site d'initiation de l'hydrolyse

Sur la base de site d'initiation de la déphosphorylation de l'AP, l'UICPA-IUBMB (the International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) reconnaît actuellement trois classes de phytases. La 3-phytase (**EC 3.1.3.8**), qui initie la déphosphorylation de l'AP en C3 en produisant le 1,2,4,5,6- pentakisphosphate et du Pi. La 5-phytase (**EC 3.1.3.72**) catalysant la déphosphorylation de l'AP à partir de la position 5 sur le cycle inositol et générant ainsi le 1,2,3,4,6-pentakisphosphate et du Pi. La 6-phytase (**EC 3.1.3.26**) qui initie l'hydrolyse de l'AP en position C5 et libère le 1,2,3,4,5- pentakisphosphate et du Pi (Kumar *et al.*, 2010; Kumar & Sinha, 2018).

3. Mécanisme catalytique

Le mécanisme catalytique des phytases est déterminé par des sites conservés de l'enzyme, à savoir un site actif, un site de liaison au substrat, des sites de liaison aux ions ainsi que d'autres sites clés formant l'empreinte unique de l'enzyme. Conformément à leur mécanisme d'action, leur structure 3D ainsi que leurs séquences en acides aminés, les phytases se répartissent en quatre catégories : la phosphatase acide histidine (HAP), la β -propeller phytase (BPP, la phytase cystéine (CP, et finalement la phosphatase acide pourpre (PAP.

a. Phytase acide histidine (HAP)

La classe d'histidine acide phosphatases, regroupe l'ensemble des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de l'AP dans la gamme des pH acides (Zhao *et al.*, 2021). Elles se caractérisent par la présence de deux motifs conservés se localisant principalement dans le côté N- et C-terminale du site actif et correspondent respectivement à RHGX_RXP, comprenant les résidus **Arg16**, **His17**, **Gly18**, **Arg20** et **Pro44**, et HD formé par l' **His303** et **Asp 304** (Fig. 6) (Jia *et al.*, 2000). Ces deux séquences distantes se rejoignent, lors du repliement de la protéine, pour former le site catalytique de l'enzyme (Van Etten *et al.*, 1991). Ceci hydrolyse l'AP en deux étapes. Au cours de la première étape, une attaque nucléophile sur le phosphore est assurée par le résidu **His17** présent dans le motif conservé, donnant un intermédiaire phospho-Histidine, suivie dans une deuxième étape d'une hydrolyse de cet intermédiaire assurée par l'**Asp304** du motif HD (Mitchell *et al.*, 1997).

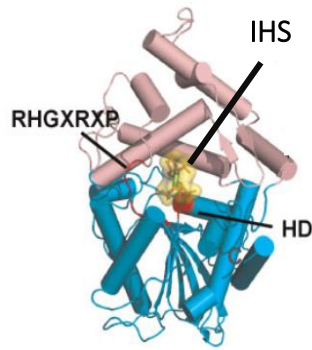


Figure 6 : Représentation structurelle de la phytase *AppA* d'*Escherichia coli* en complexe avec le Myo-Inositol hexasulfate (IHS : analogue du phytate) (PDB ID: 1DKN).

b. β -propeller phytase ou la phytase β -hélicoïdale (BPPs)

Etant considérée comme unique, la classe BPP, regroupe l'ensemble des phytases qui se caractérisent par une activité catalytique Ca^{2+} -dépendante, une spécificité strictement étroite envers les complexes phytate- Ca^{2+} et une activité catalytique à pH neutre voire même alcalin (Zhao *et al.*, 2021). Isolées et caractérisées majoritairement des espèces de *Bacillus*, les BPPs exigent la présence des ions Ca^{2+} pour leur thermostabilité et leur activité catalytique (Kumar *et al.*, 2017; B.-C. Oh *et al.*, 2001).

En ce qui concerne leur structure 3D, celle-ci se présente sous la forme de β -hélice à six lames, d'où vient la nomination phytase β -hélicoïdale. Ainsi, deux sites de liaison au phosphate ont été identifiés. « Un site de clivage » où l'hydrolyse de l'AP se déroule, et « un site d'affinité » qui attire le substrat et renforce sa liaison pour la catalyse (Mullaney & Ullah, 2003). La structure 3D et le mécanisme catalytique des BPPs sont décrit en détail dans la chapitre III.

c. Phytase à cystéine (CP)

Identifiée dans la première fois dans la bactérie *Selenomonas ruminantium* isolée du rumen, les CPs sont caractérisées par leur forte activité catalytique en milieu acide, de même que par la présence de quatre résidus conservés : **His 240**, **Cys241**, **Gly244** et **Arg247** au niveau du site actif HCXXGXXR(S/T) (Fig. 7) (Chen *et al.*, 2015). Le motif du site actif HCXXGXXR(S/T) forme une boucle à la base du domaine de liaison du substrat qui caractérise les protéines tyrosines phosphatases (PTP). La profondeur de cette poche constitue un élément critique, dans le sens où elle semble être impliquée dans la détermination de la spécificité du substrat. Suivant ce modèle, la CP, se dispose d'une poche plus large et plus profonde lui permettant de fixer le groupe Ins entièrement phosphorylé de l'AP (Chu *et al.*, 2004; Lei *et al.*, 2007; Singh & Satyanarayana, 2015b).

Le modèle élucidé actuellement stipule que, la liaison initiale du phytate à la poche du site actif des CPs est facilitée par la charge négative de l'AP. Cette fixation est suivie d'une hydrolyse qui met en jeu le **Asp212**, servant d'acide générale et le **Cys241**, de la boucle P, qui assure une

attaque nucléophile. L'hydrolyse se déroule d'une manière séquentielle et aboutit à la production de l'Ins 2-monophosphate comme produit finale (Chen *et al.*, 2015; Chu *et al.*, 2004).

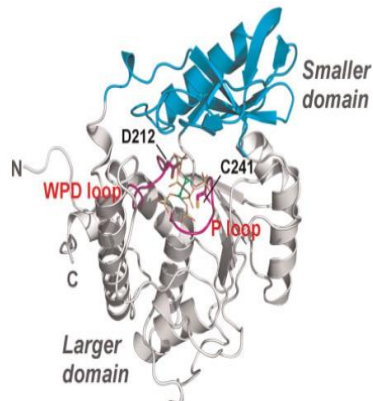


Figure 7 : Représentation de la structure secondaire de la PTP de *S. ruminantium* en complexe avec l'IHS (analogue de phytate). (PDB ID : 1U26). Les boucles qui hébergent les résidu catalytique sont indiquées et colorées en magenta (Chen *et al.*, 2015)

d. La phosphatase acide pourpre (PAP)

Les phytases acides violettes constituent une classe des métallophosphoestérases, qui se caractérisent par une coloration violette-rose, due à la présence d'un centre bimétallique renfermant soit un Fe^{3+} - Fe^{2+} , Fe^{3+} - Mn^{2+} ou encore un Fe^{3+} - Zn^{2+} . Outre leur faible activité catalytique, ces enzymes se distinguent par la présence de sept résidus d'acides aminés, **Asp162**, **Asp194**, **Try197**, **Asn232**, **His317**, **His354**, **His356** « DDYNHHH », liés à un métal et contenus dans cinq motifs conservés - DXG, GDXXY, GNH(D/E), VXXH et GHXH – impliqués dans la coordination du centre nucléaire bimétallique (Gontia & Tiwari, 2013; Singh & Satyanarayana, 2015b).

Tableau 2 : Classification des phytases selon leur mécanisme d'action

Classe	Gamme de pH	Motif conservé	Mécanisme catalytique	Cofacteur	Produit finale
Phytase acide histidine	4.0 – 4.5	Motif heptapeptidique RHGXRXP du côté N-terminale et motif dipeptidique HD du côté C-terminale	Hydrolyse en deux étapes avec formation d'un intermédiaire phospho-Histidine	EDTA	Myo-Ins monophosphate (InsP ₁)
la phytase β-hélicoïdale	7.0 – 8.0	β-hélice à six lames avec six sites de liaison au Ca ²⁺	Fixation du groupe phosphate au niveau de site d'affinité et attaque du groupe phosphate adjacent par le site clivage.	Ca ²⁺	Myo-Ins triphosphate (InsP ₃)
La phosphatase acide pourpre	4.0 – 5.5	Sept résidu conservés dans cinq motifs conservés : <u>D</u> XG, <u>G</u> <u>D</u> XXY, <u>G</u> <u>N</u> H(D/E), VXXH et <u>G</u> <u>H</u> X <u>H</u> . Intervenant dans la coordination du centre nucléaire bimétal	---	Metallo-enzyme	Myo-Ins 2,3,4,5-tetraphosphate ou Myo-Ins 1,2,5,6tetraphosphate (InsP ₄)
Cystéine phytase	4.5 – 6.5	Motif conservé HCXXGXXR(I/S) formant une boucle à a base du domaine de liaison du substrat.	Clivage de l'AP selon un mécanisme identique aux protéines tyrosines phosphatases, avec un site actif plus profond et adapté aux phytates.	Pb ²⁺	Myo-Ins monophosphate (InsP ₁)

III. L'activité phytasique

L'activité phytasique est généralement mesurée par la quantité de Pi libérée en une minute à partir d'un substrat donné. Elle s'exprime en unités de phytase (U) et correspond à la quantité de l'enzyme nécessaire pour libérer 1 μmol de Pi par minute. Cette activité enzymatique peut être modulée considérablement par divers facteurs, dont les principaux sont : la température, le pH et la présence ou l'absence des inhibiteurs/activateurs.

1. Effet de la température et du pH

La température et le pH sont parmi les facteurs qui affectent directement l'activité catalytique des enzymes. Généralement, la température optimale des phytases varie de 35°C à 77°C.

Les phytases d'*E. Coli*, *Enterobacter sp.* et *B. subtilis* démontrent une activité optimale à des températures aussi hautes que 50°C et 60°C, tandis que pour la phytase d'*Aerobacter aerogenes*, ces températures ont un effet inhibiteur sur son activité catalytique (Azeem *et al.*, 2015). Quant au pH, il existe principalement deux types de phytases, celles qui gardent leur fonctionnalité même à des pH alcalines, et celles qui ne fonctionnent qu'à des pH acides. Les premières sont généralement produites par les microorganismes et présentent une stabilité et une activité optimale à un pH dans les alentours de 8.0. Alors que les deuxièmes, ne dégradent le phytate que dans des gammes de pH acide et sont majoritairement des phytases végétales (Konietzny & Greiner, 2004).

2. Effet des métaux ioniques

L'effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique des phytases diffère largement d'une enzyme à une autre. D'une manière générale, les phytases alcalines exigent la présence d'un ou des ions métalliques pour leur activité et sont fortement inhibées par l'EDTA. Ainsi, la phytase de *Bacillus* DS11 a démontré une activité maximale en présence des ions Ca^{2+} , tandis que l'EDTA l'a fortement inhibée (Byung-Chul Oh *et al.*, 2001). Un cas totalement opposé des phytases acides, qui ne nécessitent aucun ion métallique et dont l'activité n'est pas affectée par la présence de l'EDTA (Vohra & Satyanarayana, 2003).

IV. Application des phytases

Comme les phytases sont des enzymes aptes à améliorer l'efficacité d'utilisation du P-phytique, elles suscitent un grand intérêt pour des applications nutritionnelles, environnementales et biotechnologiques.

1. Phytases comme additifs dans l'alimentation animale

De nombreuses études ont fait état d'applications potentielles de la phytase dans l'industrie alimentaire. En effet, l'adjonction de la phytase dans les rations des animaux a permis une augmentation nette de la digestion et de l'assimilation du P contenu dans les aliments végétaux. Ainsi, Natuphos®, la première phytase à être commercialisée, a fourni aux nutritionnistes animaliers un outil pour réduire considérablement l'excrétion de P par les animaux en substituant la supplémentation en P_i par la phytase microbienne (Kumar & Sinha, 2018; Lei *et al.*, 2007). Après la réussite de Natuphos®, d'autres produits ont vu le jour dans le marché de la phytase. Le tableau 3 présente quelques phytases qui sont actuellement commercialisées.

Tableau 3 : Caractéristiques de certaines phytases actuellement disponible dans le marché

Produit	Organisme donneur	Classe de l'enzyme	Organisme producteur	Fabricant
Natuphos®	<i>Aspergillus niger</i>	HAP 3-phytase	<i>Aspergillus niger</i>	BASF
Rovabio®	<i>Penicillium funiculosum</i>	HAP 3-phytase	<i>Penicillium funiculosum</i>	Adisseo
Quantum Blue® G	<i>Escherichia coli</i>	HAP 6-phytase	<i>Pichia pastoris</i>	AB Vista
Ronozyme® Hiphos GT	<i>Citrobacter braakii</i>	HAP 6-phytase	<i>Aspergillus oryzae</i>	DSM

Sans aucun doute, la phytase est l'enzyme d'actualité dans l'alimentation animale. Son usage réduit de façon substantielle le niveau usuel de compléments en P minéral. En parlant des suppléments en P minéral, l'OCP a mis sur le marché en 2013 un produit alimentaire à base de P et de calcium dit « PPP-Animal Feed ». Bien que ce dernier puisse se présenter comme une solution pour optimiser l'élevage des animaux, la supplémentation en P présente toujours un effet néfaste sur l'environnement. Pourtant, une addition de la phytase dans le dédit produit peut améliorer l'absorption de P toute en évitant la pollution environnementale. Concurrément à cette amélioration, les quantités de phosphore et de calcium synthétisés peuvent être diminuées réduisant ainsi le coût de fabrication du produit.

2. Phytases dans l'alimentation humaine

La transformation et la fabrication de l'alimentation humaine, constituent également un champ d'application potentiel pour les phytases. En fait, il a été démontré que la phytase contribue à l'amélioration de la qualité du pain par deux manières. D'un part, elle réduit la teneur en phytate et d'autre part, elle favorise l'activation de l' α -amylase endogène en rendant plus de calcium disponible (Kumar & Sinha, 2018).

Certes, une phytase pour laquelle il existe un intérêt commercial est celle qui satisfait une série de critères de qualité. Pour pouvoir l'utilisée comme additif alimentaire, la phytase doit démontrer une grande efficacité pour la libération de P-phytique, de même qu'une thermostabilité pour résister aux procédés de transformation industriels. La phytase produite par *les Bacillus* assouvi tous ces critères. Elle se caractérise par une résistance robuste à la chaleur, une puissante activité catalytique et une spécificité absolue pour le substrat. Toutes ces caractéristiques font d'elle une candidate prometteuse pour des applications biotechnologiques.

Chapitre III :

Phytases des Bacillus

I. Le genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* regroupe des bactéries à Gram positif, appartenant au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilles*, à l'ordre des *Bacillales* et à la famille des *Bacillacées*. Ce sont des bactéries sporulées, mobiles ou immobiles, aérobies strictes ou facultatives et qui se présentent sous forme de bâtonnets. Les *Bacillus* sont hétérotrophes, saprophytes et ubiquitaires. Elles forment un des genres les plus diversifiés avec 318 espèces identifiées ([Genus: Bacillus \(bacterio.net\)](#)), dont ceux qui nous intéressent dans cette étude sont : *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus velezensis*.

1. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis représente « l'espèce type » du genre *Bacillus* et la bactérie Gram positif la plus étudiée. Il s'agit d'une bactérie ubiquitaire, catalase positive, aérobie et pouvant se développer en anaérobiose. Cette espèce mobile est capable de former des endospores résistantes et protectrices, lui permettant de tolérer des conditions environnementales extrêmes (Borriss, 2020).

2. *Bacillus licheniformis*

Décrite en 1901 par Beijerinck et von Minkman, *Bacillus licheniformis* est une bactérie étroitement liée au *Bacillus subtilis*. Elle est ubiquitaire dans le sol, mobile et produisant des spores ovales non déformantes. A la différence de la majorité des *Bacillus* qui sont principalement aérobies, *Bacillus licheniformis* est anaérobie facultative, ce qui lui permet de se développer dans d'autres niches écologiques. Désignée comme étant une bactérie industrielle, ladite bactérie est largement utilisée en industrie biotechnologique pour la fabrication et la production des enzymes, d'antibiotiques et de produits chimiques (Rey *et al.*, 2004).

3. *Bacillus velezensis*

Bacillus velezensis constitue une nouvelle espèce du genre des *Bacillus* nommée en 2005 par Ruiz-García *et al.* (2005). Appartenant aux PGPR, cette bactérie est très étudiée et exploitée en vertu de son pouvoir favorisant la croissance des plantes. Ainsi, de nombreuses souches appartenant à cette espèce ont été reportées pour leur capacité à inhiber la croissance de divers microorganismes pathogènes, y compris les bactéries, les champignons et les levures (Rabbee *et al.*, 2019).

II. Phytase des *Bacillus*

Appartenant à la classe des BPPs, les phytases produites par les *Bacillus* sont des enzymes uniques, hautement conservatrices et hautement spécifiques. Elles ont été isolées, purifiées et caractérisées à partir de nombreuses espèces de *Bacillus*, notamment *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus subtilis*. De nombreuses études de génie génétique, de clonage moléculaire et d'expression protéique, ont permis une meilleure compréhension de leur mécanisme d'hydrolyse ainsi que leur propriétés biochimiques et enzymatiques.

1. Caractéristiques moléculaires, enzymatiques et propriétés biochimiques

a. Propriétés biochimiques et enzymatiques

Les phytases des *Bacillus*, sont des phytases extracellulaires, alcalines représentant la classe des β -propeller phytase. A la différence des autres enzymes, ces dernières catalysent une hydrolyse séquentielle de l'AP à un pH neutre et légèrement alcalin (pH 6.0 – 8.0)(Zhao *et al.*, 2021). Elles sont caractérisées par leur résistance aux traitements thermiques ainsi que leur thermostabilité dans des températures aussi haute que 80°C - 95°C (Kim *et al.*, 1998). D'après la littérature, les phytases des *Bacillus* sont actives d'une manière optimale dans un pH de 6.0 – 7.5 et même si elles démontrent une activité catalytique à pH alcalin, rarement sont ceux qui les gardent dans des valeurs de pH très élevées (Kumar *et al.*, 2017).

b. Substrat spécificité et effet des ions Ca^{2+}

Les phytases des *Bacillus* sont qualifiées comme étant Ca^{2+} dépendante, elles exigent la présence des ions Ca^{2+} pour leur activité de même que leur stabilité thermique et structurale. En fait, de nombreuses études ont confirmé que la présence des ions Ca^{2+} , contribue à une augmentation significative de la thermostabilité de l'enzyme (Fu *et al.*, 2008a; Kumar *et al.*, 2017). Ainsi, la concentration de ces ions peut moduler considérablement le pH et la température optimale de l'enzyme. Citant à titre d'exemple la phytase de *Bacillus sp.* KHU-10, qui, en présence de 10 mM de CaCl_2 , a présenté une activité optimale à 60°C et à un pH de 6 - 9,5. Tandis qu'en absence de CaCl_2 l'activité la plus élevée était à 40°C et à un pH de 6.5 – 8.5 (Zeng *et al.*, 2011).

Parallèlement à ce qui précède, il a été démontré que ces ions Ca^{2+} jouent un rôle primordial dans la liaison et l'hydrolyse de l'AP. D'une part, ils se fixent au site actif de l'enzyme par l'intermédiaire des groupes carboxyles des acides aminés chargés négativement, contribuant ainsi à la réduction des charges négatives. Et d'une autre part, ils se lient à deux groupes oxyanions des groupes phosphates de l'AP ce qui favorise la formation d'une distribution idéale de charges positives dans le complexe phytate-calcium (Fu *et al.*, 2008a; Kumar *et al.*, 2017).

Conséquemment à cette dépendance, ladite enzyme présente une stricte spécificité pour les complexes phytates-calcium et ne peut hydrolyser l'AP que lorsqu'il est complexé aux ions Ca^{2+} , tandis qu'aucune activité enzymatique n'est détectée sur les autres esters de phosphate (Choi *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2021). De cela, il apparut que, le complexe phytate-calcium est le véritable substrat des BPPs et le Ca^{2+} joue un rôle indispensable en tant qu'activateur du phytate.

2. Caractéristiques moléculaires et structurels

L'exploitation de la structure tridimensionnelle par la cristallographie aux rayons X, a révélé que l'enzyme se présente sous la forme d'une hélice à six lames. Chaque lame est formée de quatre à cinq feuilletts plissés β , interconnectés entre eux et alignés d'une manière à former un tunnel central. Le site de liaison de substrat est situé au sommet de l'hélice β (Fig. 8). Le site actif est composé de plusieurs résidus chargés positivement et négativement facilitant ainsi la liaison directe et indirecte du phytate (Fu *et al.*, 2008a).

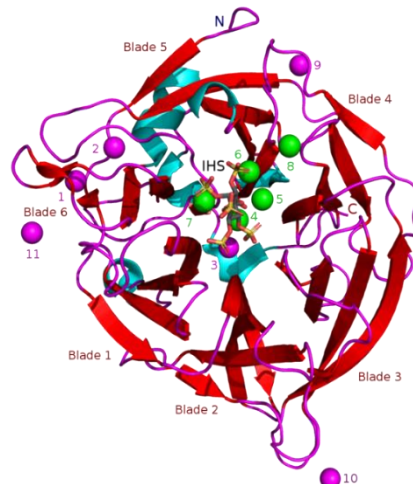


Figure 8 : Représentation de la structure en hélice à six lames de BPP de *Bacillus subtilis* avec l'IHS (analogue du phytate) lié au site actif de l'enzyme. (PDBID : 3AMR)

Ainsi, d'autres études structurales ont démontré que, les BPPs possèdent six sites de liaison au Ca^{2+} et deux sites de liaison aux phosphates. Un site de clivage (**Pho1**), responsable de l'hydrolyse du substrat, et un site d'affinité (**Pho2**) qui augmente l'affinité de liaison des groupes phosphates adjacents du substrat. (Fu *et al.*, 2008a; B.-C. Oh *et al.*, 2006). Ceci fait qu'uniquement les substrats qui occupent à la fois de site **Pho1** et **Pho2** seront hydrolysés expliquant ainsi la préférence de ces enzymes pour le phytate.

Concernant les six sites de liaison aux Ca^{2+} , desdits se subdivisent en trois sites à haute affinité (**Ca1 – Ca3**), jouant un rôle important dans la stabilité de l'enzyme, et trois sites à faible affinité (**Ca4 - Ca6**), formant le centre de la triade catalytique responsable de l'activité enzymatique (Fig. 9). En outre, ces ions assurent la neutralisation de la charge négative au niveau du site actif,

créant ainsi un environnement électrostatique favorable pour la liaison du phytate avec les résidus **Lys76**, **Lys77**, **Arg122**, et **Lys179**, qui contribue à la formation des complexes enzyme-substrat et éventuellement à l'hydrolyse du phytate (Kumar *et al.*, 2017; B.-H. Oh *et al.*, 2000).

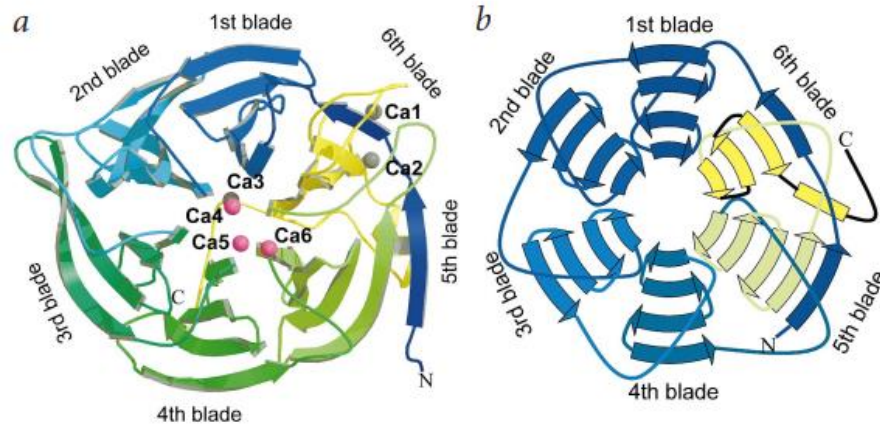


Figure 9 a) Diagramme en ruban b) Repliement topologique de la phytase TS-Phy de *B. amyloliquefaciens* (B.-H. Oh *et al.*, 2000)

3. Site actif

Une étude comparative de 44 séquences protéiques représentatives des BPPs a mis en évidence la présence de deux séquences très conservées dans l'ensemble des séquences analysées. La première correspond à **DDPAIW[VI][HN]PK[DN]P[ESA]KS** située dans le côté N-terminal, suivie de la séquence **NN[F/V]D[I/V/L]** (Fig. 10). La conservation de ces dernières suggère leur implication dans la formation et la coordination du site de liaison du phytate. (Zhao *et al.*, 2021). Le déchiffrement de ces deux motifs, montre qu'elles se composent des résidus suivants :

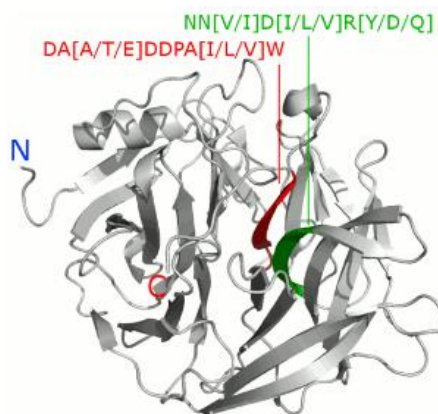


Figure 10 : Représentation de la structure cristalline de la BPP démontrant la présence des deux séquences conservées

- **DDPAIW[VI][HN]PK[DN]P[ESA]KS** : Asp55, Asp56, Pro57, Ala58, Ile59, Trp60, Pro63, Lys64, Pro66, Lys68, Ser79;
- **NN[F/V]D[I/V/L]** : Asn99; Asn100; Asp102.

4. Mécanisme catalytique

Le mécanisme d'hydrolyse du substrat Ca^{2+} -InsP₆ en Ins-P₃ a été bien élucidé chez la phytase *TS-phy* de *Bacillus amyloliquefaciens*.

- Dans un premier temps, le bidenté (P_3 - Ca^{2+} - P_4) de Ca^{2+} -InsP₆ interagit avec les deux sites de liaison Pho1 et Pho2. Cette interaction est réalisée d'une part avec les ions de Ca^{2+} qui occupent le site catalytique, et d'autre part avec les résidus chargés positivement (Lys76, Lys77, Arg122, Lys179) ;
- Par la suite, une hydrolyse se produit au niveau du groupe phosphate en position 3 avec une libération de l'intermédiaire Ins (1,2,4,5,6)P₅. A son tour, cet intermédiaire peut se lier de la même manière avec le site catalytique de l'enzyme et être hydrolysé cette fois-ci au niveau du groupe phosphore en position 1, générant ainsi l'Ins (2,4,5,6)P₄ ;
- Finalement, l'enzyme se lie au bidenté (P_5 - Ca^{2+} - P_4) de l'Ins(2,4,5,6)P₄ et hydrolyse éventuellement le groupe P en position 5 donnant comme produit final l'Ins(2,4,6)P₃ (Fu et al., 2008b; Greiner et al., 2007; B.-C. Oh et al., 2006; Zhao et al., 2021).

Le produit final obtenu peut encore une fois interagir avec la poche catalytique de l'enzyme, or cette fois-ci, aucune hydrolyse ne peut se produire en raison de l'absence de groupes phosphates voisins qui sont indispensables pour la formation d'une liaison bidentée avec les ions de calcium. La figure (Fig. 11) ci-dessous résume le mécanisme d'hydrolyse de phytate- Ca^{2+} proposé par Oh et al. (B.-C. Oh et al., 2006).

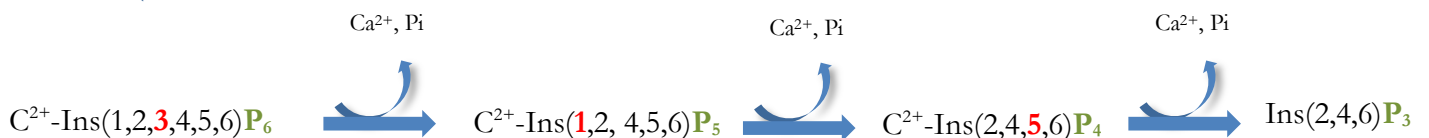


Figure 11 : Mécanisme de déphosphorylation du phytate- Ca^{2+} par la *TS-phy* de *Bacillus amyloliquefaciens* selon Oh et al

III. Application biotechnologies des phytases de *Bacillus*

1. Applications dans l'alimentation humaine et animal

a. Application dans l'alimentation animale

En raison de l'absence ou des faibles niveaux de phytases gastro-intestinales, les animaux monogastriques sont inaptes à utiliser le P-phytique présent dans leurs alimentations. Conséquemment, une supplémentation en Pi exogène est nécessaire pour répondre à leurs besoins nutritionnels. Ceci conduit à une augmentation du coût de l'alimentation, de même que la pollution par le P. Or la phytase, notamment celle des *Bacillus*, a révélé de fortes perspectives pour des applications dans l'industrie alimentaire. Grâce à son pH optimal, son excellence stabilité thermique

et sa forte spécificité pour le substrat, la phytase des *Bacillus* est très adaptée pour être utilisée comme additif dans l'alimentation animale (Balwani *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2008b; Kumar *et al.*, 2017).

b. Application dans l'alimentation humaine

Hormis sa majeure application dans l'alimentation animale, la phytase des *Bacillus* suscite un grand intérêt pour des utilisations en alimentation humaine. En effet, en assurant l'hydrolyse de phytate, ces dernières peuvent augmenter la valeur nutritionnelle des aliments en améliorant la biodisponibilité ainsi que l'absorption des minéraux (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} ...etc) au niveau de l'intestin. En plus, la grande thermostabilité de la phytase des *Bacillus*, fait d'elle la meilleure candidate pour la dégradation du phytate lors de processus de transformation des aliments (Haefner *et al.*, 2005).

2. Potentiel probiotique des bactéries productrices des phytases

Les microorganismes produisant la phytase sont très importants en nutrition. A cet égard, le potentiel probiotique de ces microorganismes sera un plus pour leur application dans l'alimentation humaine et animale. D'une part leur capacité à dégrader le phytate contribuera à l'amélioration de la biodisponibilité des minéraux et d'autre part, leurs propriétés probiotiques aideront à stabiliser la microflore intestinale. (Danilova & Sharipova, 2020; Kumar *et al.*, 2017) Ainsi, dans une telle tentative, Sharma *et al.*, ont rapporté trois souches probiotiques de *Bacillus* (*B. subtilis* P7, *B. subtilis* P6, *B. cereus* P1) avec des propriétés probiotiques robustes et une sécrétion maximale de phytase. (Sharma & Trivedi, 2015)

3. Synthèse des inositols phosphate (IP) inférieurs

Dans le système biologique, les phosphates d'Ins inférieurs jouent un rôle crucial dans le métabolisme énergétique, la régulation métabolique et la signalisation cellulaire (Vats & Banerjee, 2004). Ainsi, la voie de l'hydrolyse discutée dans la section qui précède, révèle que la déphosphorylation de l'AP par la phytase des *Bacillus* génère des dérivées du *Myo*-Ins à la fois en tant qu'intermédiaires et produits finaux. Par ailleurs, les BPPs des *Bacillus* produisant le *Myo*-Ins-P3 comme produit final de l'hydrolyse, sont utilisées pour la production et la préparation de différentes espèces de phosphate d'InsP (Fu *et al.*, 2008b; Kumar *et al.*, 2017).

Matériels et Méthodes

I. Objectif de ce mémoire

Cette étude a été menée dans l'objectif d'étudier et de caractériser le gène de la phytase de trois souches de *Bacillus* : *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus velezensis*. Pour y répondre, la stratégie adoptée consistait à cloner les trois gènes (*phyL*, *phyC BV* et *phyC BS*) et à exploiter les clones sélectionnés pour l'étude de l'activité phytasique au moyen d'un test de phytase.

II. Souches Bactériennes et milieux de cultures

1. Les souches *Bacillus*

Trois souches de *Bacillus*, provenant de différentes niches écologiques, ont été utilisées dans notre étude. *Bacillus subtilis* (Z10), *Bacillus velezensis* (Z16) et *Bacillus licheniformis* (DN1). Les deux premières ont été isolées à partir du produit laitier de berbérus (AZARIS), tandis que la troisième provenait d'excréments d'animaux.

2. *Escherichia coli*

Top10 et DH5- λ pir sont les souches d'*E. coli* qui ont été employées pour la transformation, la création et la conservation des clones lors des expériences de clonage. La souche DH5- λ pir a été spécifiquement utilisée pour permettre la réplication du vecteur suicide pSW23T ayant une origine de réplication *oriR6K*.

3. Milieux et conditions de cultures

Les souches ont été cultivées dans du TSB stérile et incubées, sous agitation (150 rpm), à 37°C pendant une nuit. Ou sur gélose riche TSA. Ainsi, lorsqu'une sélection est envisagée, un ou plusieurs antibiotiques ont été ajoutés au milieu à des concentrations finales de : Ampicilline (100 µg/mL), Chloramphénicol (100 µg/mL), Rifampicin (100 µg/mL).

III. Amplification des gènes de phytase par PCR « Polymerase Chain Reaction »

1. Principe

La PCR « Polymerase Chain Reaction », est une technique d'amplification enzymatique, *in vitro*, d'un fragment d'ADN spécifique. Elle met en œuvre un couple d'amorces délimitant la région à amplifier et une enzyme spécifique, la *Taq* polymérase qui assure l'élongation des amorces hybridées par complémentarité à la matrice de l'ADN, aboutissant ainsi à une amplification exponentielle de la région ciblée.

final de 20 μ L. Parallèlement un tube témoin négatif (sans ADN), a été toujours préparé pour contrôler le bon déroulement de la réaction. La composition du milieu réactionnel et le programme d'amplification sont décrits dans le tableau 5.

Tableau 5 : Composition du milieu réactionnel et programme utilisé pour la réaction PCR

Mélange pour une seule réaction (Vf = 20 μ L)	Programme d'amplification du thermocycleur VWR, E-THERMC-001
10 μ L de Master Mix (<i>DreamTaq</i> Green PCR)	Dénaturation initiale de 3 min à 95°C
7 μ L de l'eau pure	
1 μ L d'amorce Forward (10 μ M)	30 cycles comportant successivement :
1 μ L d'amorce Reverse (10 μ M)	
1 μ L (50 ng) de l'ADN matrice (ADN génomique)	
	Elongation finale à 72°C pendant 9min

Une fois que le produit de PCR est récupéré, une étape de contrôle qualité est entamée par une électrophorèse sur gel d'agarose.

3. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'analyse et la visualisation des produits de PCR ont été réalisés par le dépôt de 2 μ L des échantillons dans un gel d'agarose à 0.7% (p/v) dans un tampon TAE 1x (40 mM Tris-acétate, 5 mM acétate de sodium, 0,1 mM EDTA). Cependant, pour le fragment interne *phyLLn*, en vertu de sa petite taille qui fait 300 bp, un gel de 1% a été conçu pour pouvoir le visualiser.

Le gel d'agarose est élaboré en mélangeant 0.35 g d'agarose (pour un gel de 0.7%) ; ou 0.5 g d'agarose (pour un gel de 1%), avec 50 mL de tampon TAE. Le mélange est par la suite porté à ébullition. Une fois refroidis, 3 μ L de Bromure d'Ethidium (BET 0,5 μ g/ml) ont été ajoutés et le gel est coulé dans un support muni d'un peigne. Le marqueur de taille (1kb DNA Ladder) et les échantillons, chargés avec le tampon de charge 5x DNA Loading Dye, sont par la suite déposés dans les puits du gel. Après migration à voltage constant 100 V pendant 30 min, les bandes sont visualisées à la suite d'une exposition aux rayons UV à l'aide d'un Transluminateur.

Si la PCR est satisfaisante, on procède à la purification des amplicons pour éliminer les composants de la réaction (polymérase, dNTPs, amorces, tampons) afin d'éviter qu'ils n'influencent pas négativement les expériences en aval.

4. Purification de produits de PCR

Certes, la qualité et la pureté des produits de PCR comptent parmi les facteurs les plus critiques pour la réalisation d'un clonage, digestion enzymatique ...etc. Une étape de purification est donc toujours envisagée. Cette dernière est effectuée en suivant les recommandations du Kit PureLink™ PCR Purification Kit d'Invitrogen. L'ADN est purifié puis récupéré dans le tampon d'éluion à un volume final de 30 µL.

Même après leur purification, les amplicons peuvent encore contenir des contaminants (ARN, protéines, Sel, éthanol...etc) il est donc important de contrôler systématiquement la pureté de l'ADN. Pour cela, le dosage par spectrophotométrie d'absorption dans l'UV a été entamé.

5. Dosage par spectrophotométrie : Nanodrop ®

L'objectif de cette étape est de valider la pureté des ADN après leur purification toute en les quantifiant. Dans cet égard, le Nanodrop (spectrophotomètre à micro-volume) a été utilisé. Grâce à la mesure de l'absorbance des acides nucléiques à 260 nm, on parvient à quantifier nos échantillons. Parallèlement, la mesure de l'absorbance à 280 nm (protéines, ARN) et 230 nm (Sels, éthanol, phénol...) nous permet de valider ou non la pureté de nos échantillons. Ainsi, ces derniers sont qualifiés pure si le ratio 260/280 est compris entre 1,8 – 2,0 et le ratio 260/230 est situé entre 2,0 – 2,2.

IV. Clonage moléculaire

Le clonage moléculaire consiste à élaborer des molécules d'ADN recombinantes, en insérant un fragment d'ADN (insert), dans un plasmide (vecteur). La construction obtenue, est utilisée pour transformer des cellules hôtes, dans lesquelles elle est répliquée.

Dans la présente étude, diverses constructions plasmidiques ont été élaborées et introduites dans des cellules compétentes (Top 10 et *DH5-a λpir*). Les clonages de fragments d'ADN sont réalisés selon deux méthodes. La première, consiste à utiliser un Kit commercial (pJET 1.2/blunt) qui offre un clonage rapide et aisé du produit de PCR. La deuxième, adopte l'approche du « clonage directionnel ». Elle consiste à orienter le fragment d'ADN qu'on veut cloner en insérant deux sites de restrictions différents dans les extrémités 3' et 5'. Ces derniers sont introduits grâce aux amorces utilisées lors de la PCR (*Tab. 4*). Par la suite, le vecteur et l'insert sont digérés par les mêmes enzymes de restriction, aboutissant ainsi à des bouts cohésifs compatibles, permettant l'insertion du gène de manière orientée dans le vecteur.

A. Vecteurs de clonage

1. Le plasmide pJET1.2

Le pJET 1.2/blunt de Thermofisher, est un plasmide basé sur un système de sélection positive, utilisé pour le clonage de l'ensemble des produits amplifiés. Il porte un gène de résistance à l'ampicilline et un gène létal (*eco47IR*) dont la séquence est interrompue par la ligature de l'insert dans le site du clonage (Fig. 12). Par conséquent, uniquement les bactéries transformées par le plasmide recombinant seront capables de croître, tandis que celles transformées par le vecteur natif ne le pourront pas en raison de l'expression du gène létale.

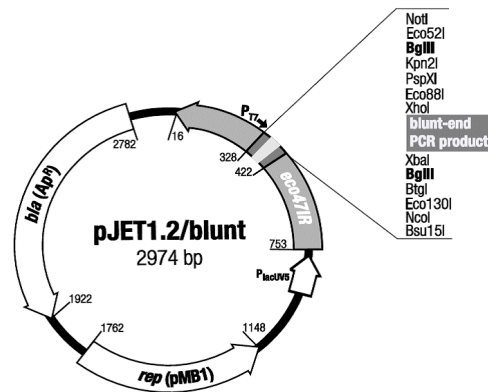


Figure 12 : Présentation du vecteur pJET1.2

2. Le plasmide pSW23T

Le plasmide pSW23T, est un vecteur suicide qui se caractérise par la présence d'une résistance au chloramphénicol et une origine de réplication *oriR6K* (Fig. 13). Cette dernière, nécessite pour sa fonction la présence d'une protéine appelée Pir codée par le gène *pir*. De ce fait, le plasmide sera incapable de se répliquer dans une cellule hôte n'hébergeant pas la protéine Pir. Cette particularité de pSW23T, a été exploitée dans notre étude pour élaborer une construction plasmidique qui servira pour muter le gène *phyL* de DN1 suivant le mécanisme de recombinaison homologue.

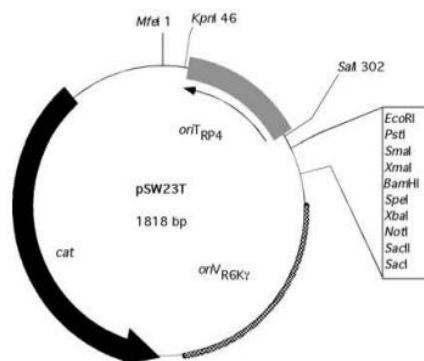


Figure 13 : Présentation du vecteur suicide pSW23T

3. Le plasmide pGEX-4T2

Le pGEX4T2 est un vecteur d'expression protéique qui utilise le système d'induction protéique IPTG/T7 et qui se caractérise par la présence d'un un gène de résistance à l'ampicilline comme marqueur de sélection. Il permet l'expression, chez *E coli*, des protéines recombinantes fusionnées à la glutathion-S-transferase (GST). Ce dernier a été utilisé pour le clonage du gène phyL de DN1 et éventuellement la production et la purification de la phytase de DN1 (Fig. 14).

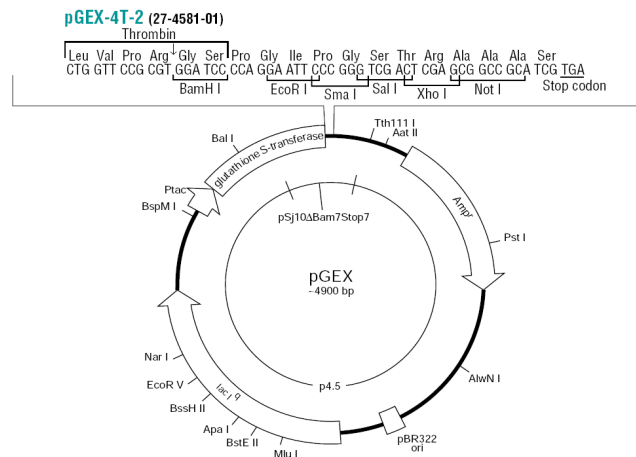


Figure 14 : Carte de restriction du vecteur pGEX4T2

Pour l'ensemble de constructions élaborées dans cette étude, un clonage *in silico* a été conduit en utilisant le logiciel [SnapGene® software](#) avant de procéder au clonage *in vitro*.

B. Clonage dans le pJET1.2/blunt

1. Constructions plasmidiques

Le vecteur pJET1.2 a été utilisé pour élaborer les constructions plasmidiques représentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Constructions plasmidiques élaborées en utilisant le plasmide pJET1.2

Constructions plasmidiques	Vecteur	Insert	Sites de restriction	Construction finale obtenu
pJET :: phyL	pJET 2974pb	<i>phyL</i> 1146 pb	<i>Hind</i> III - <i>Bam</i> HI	pAL1
pJET :: phyC BV		<i>phyC</i> BS 1149 pb	<i>Hind</i> III - <i>Bam</i> HI	pAL2
pJET :: phyC BS		<i>phyC</i> BV 1152 pb	<i>Hind</i> III - <i>Bam</i> HI	pAL3
pJET :: phyLIn		<i>phyLIn</i> 300 pb	<i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI	pAZ
pJET :: GST-phyL		<i>GST-phyL</i> 1146 pb	<i>Bam</i> HI - <i>Sal</i> I	pAL5
pJET :: phyL-His		<i>phyL-His</i> 1164 pb	<i>Xba</i> I - <i>Hind</i> III	pAL6

2. Blunting et ligation vecteur-insert

L'ensemble des produits de PCR purifiés, ont été cloné dans le vecteur pJET1.2/blunt. Ce dernier étant commercialisé sous une forme linéaire, ne nécessite pas une étape de préparation par digestion enzymatique. Cependant, vu que la *Taq* polymérase utilisée lors du PCR génère des extrémités cohésives, une étape de Blunting permettant l'obtention des bouts francs est effectuée avant d'entamer la ligation. A cet égard, à 6,6 ng de produit de PCR sont ajoutés, 1 μ L de Blunt enzyme, 10 μ L de tampon de réaction (2X) et de l'eau distillée stérile nucléase-free en quantité suffisante pour 18 μ L. Après une incubation à 70°C pendant 5 min, la ligation est par la suite menée en introduisant 1 μ L de plasmide pJET1.2 (50 ng) et 1 μ L de la T4 Ligase pour avoir un volume final de 20 μ L. L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 5 min avant d'être transféré dans les cellules Top10 chimio-compétentes.

3. Transformation du produit de la réaction de ligation

a. Préparation des cellules Top10 chimio-compétentes

L'introduction du plasmide recombinant dans la cellule hôte, nécessite une étape préalable de préparation des bactéries compétentes aptes à accepter l'ADN exogène. Pour cela, les cellules Top10 sont rendues compétentes par un traitement chimique au CaCl_2 permettant la création des pores dans la paroi bactérienne et facilitant l'entrée de l'ADN à l'intérieur de la bactérie.

Pour ce faire, une culture de nuit (CN) de 500 μ L de Top 10 est inoculé dans 500 mL de milieu TSB puis incubé à 37°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ comprise entre 0,3 et 0,4 (phase de croissance exponentielle). Une fois que la DO est atteinte, la culture est récupérée dans un tube de 50 mL et est placée sur glace pour arrêter la croissance bactérienne. Après centrifugation à 3000 g pendant 6 min à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot bactérien est délicatement repris dans 20 mL de CaCl_2 (0,1 M) froid. La solution est de nouveau centrifugée dans les mêmes conditions et le culot est ensuite resuspendu dans 10 mL de CaCl_2 (0,1 M). Une dernière centrifugation est réalisée dans les mêmes conditions et le culot bactérien obtenu est enfin resuspendu dans 1 mL de CaCl_2 (0,1 M) froid. La préparation est divisée en aliquote en raison de 100 μ L par microtube. Ainsi, les bactéries sont prêtes pour la transformation. Si la transformation n'est pas envisagée immédiatement, les bactéries sont conservées à -80°C avec 66 μ L du glycérol (40%).

b. Transformation des cellules Top10 chimio-compétentes

La transformation des Top10 compétentes est réalisée en condition stérile sur glace pour maintenir la compétence des bactéries. A 100 μ L des bactéries chimio-compétentes, préalablement décongelées, est ajouté la moitié du produit de la ligation (10 μ L). L'ensemble est incubé sur glace

pendant 30 min pour permettre la fixation de l'ADN sur les membranes bactériennes. Les bactéries subissent par la suite un choc thermique à 42°C pendant 90s. Ce choc thermique permet au plasmide de franchir l'enveloppe bactérienne et de pénétrer dans la cellule. Les bactéries sont remises immédiatement sur la glace pendant 2 min avant d'y ajouter 1 mL de milieu TSB stérile. Après une incubation pendant 1 h 30 min à 37°C sous agitation, la solution bactérienne est centrifugée à 5000 g pendant 5 min. 800 µL du surnageant sont éliminés et le culot est repris dans les 200 µL restants.

Un volume de 100 µL de la solution bactérienne est étalé sur une boîte TSB-agar à 100 µg/mL de l'ampicilline. Les boîtes sont ensuite incubées 24 h à 37°C. Sachant que les bactéries sont transformées par un plasmide recombinant contenant un gène de résistance à l'ampicilline, uniquement celles ayant incorporées le gène survivront.

4. Criblage et validation des clones recombinants

a. Extraction de l'ADN plasmidique : Miniprep classique

i. Principe

L'extraction de l'ADN plasmidique est basée sur une lyse alcaline permettant la récupération sélective de l'ADN plasmidique tout en éliminant l'ADN génomique. Son principe consiste à réaliser une lyse des cellules au moyen d'une solution basique contenant de la soude et un détergent anionique (SDS). Ainsi, à un tel pH (alcalin) l'ADN est dénaturé. Les deux brins de l'ADN génomique se séparent, alors que l'ADN plasmidique bien qu'il soit dénaturé, il n'est pas séparé. En neutralisant par la suite la solution, l'ADN plasmidique étant court parvient à se réappairier tandis que l'ADN génomique se trouve piégé dans le précipité et sera éliminé par centrifugation.

ii. Protocol

Pour procéder à une extraction de l'ADN plasmidique, un nombre suffisant de colonies en croissance sur la boîte de pétri est prélevées à l'aide d'une anse stérile puis inoculées dans 5 mL de TSB contenant de l'ampicilline (100 µg/mL). Les cultures sont incubées à 37°C pendant une nuit.

Un prélèvement de 1 mL de la CN est centrifugé à 16 000 g pendant 1 min. Le culot bactérien récupéré, est ensuite resuspendu dans 300 µL de la solution 1 (50 mM Tris-HCL, 10 mM EDTA, pH 8) provoquant ainsi une lyse bactérienne. L'ADN plasmidique est ensuite séparé de l'ADN chromosomique par ajout de 300 µL de la solution 2 (0,2 M NaOH, 1% SDS). Après 5 min d'incubation à température ambiante, 300 µL d'Acétate de potassium (3 M, pH 5,5) sont ajoutés et les tubes sont mélangés immédiatement mais délicatement par inversion plusieurs fois. Une

centrifugation à 13 000 g pendant 10 min est ensuite réalisée et le surnageant est récupéré dans un microtube neuf. L'ADN est par la suite précipité, pendant 3 min, par ajout de 650 µL de l'isopropanol. Après une centrifugation à 13 000 g pendant 5 min, le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est lavé avec 700 µL de l'éthanol 70%. Finalement, l'ADN plasmidique est séché dans un concentrateur sous vide puis récupéré dans 30 µL du tampon TE (500 µL de la solution 150 µL RNase).

b. Validation du clonage moléculaire

La validation du clonage est une étape préliminaire permettant d'un part de vérifier la qualité de clonage, et d'autre part, de s'assurer de la présence de l'insert dans le plasmide. Dans notre étude, nous avons entamé cette étape par le biais d'une digestion enzymatique pour libérer l'insert, puis un séquençage pour s'assurer de son intégrité.

i. Digestion enzymatique

L'ADN plasmidique, préparé par Miniprep classique, est digéré par deux enzymes adéquates permettant de vérifier la présence de l'insert. Les enzymes utilisées dans cette étude sont représentées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Liste des enzymes de restrictions utilisées et leur sites de restriction

Enzymes	Sites de restriction
<i>EcoRI</i>	5'...G/AATTC ...3' 3' ...CTTAA/G...5'
<i>BamHI</i>	5'...G/GATCC ...3' 3' ...CCTAG/G...5'
<i>HindIII</i>	5'...A/AGCTT ...3' 3' ...TTCGA/A...5'
<i>SaI</i>	5'...G/TCGAC ...3' 3' ...CAGCT/G...5'
<i>XbaI</i>	5'...T/CTAGA ...3' 3' ...AGATC/T...5'
<i>XhoI</i>	5'...C/TCGAG ...3' 3' ...GAGCTC/C...5'

Les digestions enzymatiques sont généralement réalisées dans un volume final de 15 µL comprenant :

- 5 µL de l'ADN plasmidique (10 µg /µL) ;
- 0,3 µL de chaque enzyme (10 U/µL) ;

- 1,5 de tampon universel (10X) ;
- 6,8 µL d'eau stérile.

Les mélanges réactionnels sont incubés à 37°C pendant 1 h. Le profil de la digestion est analysé sur gel d'agarose par séparation électrophorétique. Les clones positifs, sont ceux pour lesquels la digestion enzymatique abouti à deux fragments, un dont la taille correspond à celle du vecteur pJET1.2 et l'autre qui correspond à la taille de l'insert.

Les clones validés par la digestion enzymatique sont par la suite séquencés. Pour cela, l'ADN plasmidique desdites clones, est extrait en utilisant le Monarch® Plasmid Miniprep Kit de BioLabs. L'utilisation de ce kit permet d'obtenir des préparations d'ADN plasmidique avec une qualité et une pureté assez haute permettant de s'assurer de l'efficacité et du bon déroulement du séquençage. En suivant les recommandations du fournisseur, l'ADN plasmidique est extrait puis récupéré dans le tampon d'éluion dans un volume de 30 µL. La pureté et la quantité des échantillons sont évaluées avec le Nanodrope.

Les clones positifs sélectionnés sont conservés à -80°C dans des cryotubes contenant 600 µL de culture de nuits fraîchement préparer et 400 µL du glycérol 40%.

ii. Séquençage par Sanger

L'ensemble des constructions plasmidiques ont fait objet d'une validation par séquençage selon la méthode de Sanger sequencing en utilisant le kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Applied Biosystems™. Le séquençage a été effectué dans la plateforme Genomics de l'African Genome Center de l'UM6P.

Principe :

Le principe de la technologie de BigDye® Terminator repose sur l'amplification par PCR de la matrice d'ADN en présence des dNTPs et des ddNTPs couplés à un marqueur fluorescent (fluorophore). L'incorporation aléatoire d'un ddNTP provoque l'arrêt de l'extension de la chaîne en cours de synthèse, générant ainsi des fragments d'ADN de tailles différentes et dont chacun porte un fluorophore terminal appelé BigDye Terminator. Les différents fragments générés sont par la suite séparés à l'aide d'une électrophorèse capillaire au cours de laquelle une excitation par laser permettra l'identification du nucléotide au niveau duquel la synthèse s'est interrompue, donnant ainsi accès à la séquence nucléotidique.

Séquençage par BigDye® Terminator V3.1 :

Le séquençage a été réalisé en utilisant les amorces forward (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') et reverse (5'-

AAGAACATCGATT'TTCCATGGCAG-3') fournis avec le kit de pJET1.2. La composition du milieu réactionnel ainsi que le programme utilisé sont représentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Composition du milieu réactionnel et programme de la PCR

Composition	Mix	Mix	Programme de PCR	
	réactionnel du Forward	réactionnel du Reverse		
BigDye™ Terminator Mix	2 µL	2 µL	Incubation pendant une minute à 96°C	
5x Sequencing Buffer	1 µL	1 µL		
Eau désionisée	3 µL	3 µL	25 cycles comportant successivement :	
pJET1.2 forward primer	1 µL	-		Dénaturation à 95 °C pendant 10 s
pJET1.2 reverse primer	-	1 µL		Hybridation à 50 °C pendant 5 s
Produits purifiés	3 µL	3 µL	Elongation à 60 °C pendant 4 min	
Volume final = 10 µL			Stockage à 4°C jusqu'à purification	

Purification des produits de séquençage :

La qualité du séquençage peut être abusée par les sels, les ddNTPs et les dNTPs non incorporés. Pour cela, une étape de purification des produits de séquençage est donc nécessaire. Celle-ci est réalisée en utilisant le kit BigDye® Xterminator™. A 10 µL de produits de la réaction de PCR sont introduits 45 µL de SAM solution et 10 µL de BigDye XTerminator™ bead solution. Après un vortex à 1800 rpm pendant 20 min, l'ensemble est centrifugé à 1000 g pendant 2 min. Le surnageant est ensuite déposé et analysé par l'appareil SeqStudio™ Genetic Analyzer System with SmartStart.

iii. Alignement des séquences nucléotidiques

Les résultats du séquençage sont rendus sous forme d'un électrophorégramme. Le contrôle qualité et la correction des séquences nucléotidiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Bioedit et MEGAX11. La vérification de l'intégrité de nos inserts est entamée en alignant notre séquence avec celle du gène de référence. Pour cela, nous avons utilisé l'outil **BLASTn** révélant de **NCBI**, de même que **EMBOSS Needle** pour effectuer un alignement par paire.

C. Clonage dans le vecteur d'expression pGEX-4T2

Dans l'optique de procéder à une purification de la protéine phytase de la souche DN1, un clonage dans le vecteur d'expression protéique pGEX-4T2 a été envisagé. Ce dernier permet la

production d'une protéine recombinante fusionnée à la GST (glutathione S-transferase), qui sera éventuellement purifier par chromatographie d'affinité sur colonne glutathion. Afin de s'assurer de la bonne orientation de l'insert et pour que ce dernier soit en phase avec le gène de la GST, le clonage a été réalisé dans les sites *Bam*HI et *Sa*I au niveau du vecteur pGEX-4T2. Ainsi desdites sites de restrictions, ont été introduits dans les extrémités de l'insert (*phy*L), grâce à l'utilisation des amorces GST-*phy*L F et GST-*phy*L R lors de la PCR (Fig15).

Figure 15 : Amorces utilisées pour l'amplification du gène *phy*L de la souche DN1

Amorce	Séquence 5' – 3'	Site de restriction introduit
GST- <i>phy</i> LF	TGGGATCCAAC TTTTACAAAACGCTC	<i>Bam</i> HI
GST- <i>phy</i> LR	TTGGTCGACATCCGCGGGCATTCCCG	<i>Sa</i> I

1. Préparation du vecteur et de l'insert

Le clonage dans le pGEX-4T2 a été réalisé suivant la méthode classique décrite dans la section II. Ladite méthode, nécessite une étape de préparation durant laquelle l'insert et le vecteur sont digérés par les mêmes enzymes de restrictions.

a. Digestion enzymatique

La double digestion enzymatique du vecteur et de l'insert est effectuée par les enzymes restriction *Bam*HI et *Sa*I (10U/1µL) dans un volume final de 15 µL en suivant le protocole résumé dans le tableau 9.

Tableau 9 : Protocole adopté pour la double digestion enzymatique du vecteur et de l'insert

	pGEX-4T2	pAL5
ADN	5 µL	5 µL
<i>Bam</i> HI	0,3 µL	0,3 µL
<i>Sa</i> I	0,3 µL	0,3 µL
Tampon	1,5 µL	1,5 µL
H ₂ O Nucléase free	7,9 µL	7,9 µL
Incubation à 37°C pendant 1 h		

Le gène *phy*L a été re-isolé de la construction plasmidique *pAL5* par une digestion avec *Bam*HI et *Sa*I. L'utilisation de pAL5 au lieu du produit de PCR, est justifiée par le fait que, la digestion d'un produit de PCR ne peut pas être contrôlée, conséquemment de l'ADN non digéré peut gêner la réaction de la ligation. Par contre, lorsque l'insert est libéré à partir d'une construction

plasmidique, la digestion peut être contrôlée sur gel d'agarose et la bande correspondant à l'insert peut être par la suite purifiée.

b. Purification des fragments

La totalité de la réaction de digestion (15 µL) est déposée sur un gel d'agarose 0,7%. La bande d'ADN d'intérêt, qui correspond à l'insert ou au vecteur linéarisé, est découpée sous rayonnement (UV) puis purifié en suivant les recommandations de PureLink Quick Gel Extraction Kit d'Invitrogen. L'ADN purifié est récupéré dans 30 µL de tampon d'élution. La purification est par la suite contrôlée par le dépôt de 2 µL du produit purifié dans un gel d'agarose à 0,7%. Les concentrations des échantillons sont déterminées par dosage par Nanodrop. Ces dernières seront exploitées lors de la ligation pour calculer la quantité d'ADN à utiliser.

c. Ligation vecteur-insert

La réaction de la ligation a été réalisée dans un volume final de 20 µL en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase (1 Weiss U) de Thermofisher. Les quantités du vecteur et de l'insert sont ajoutées selon un ratio molaire (vecteur : insert) de 3 :1. Parallèlement, des contrôles de la ligation ont été préparés. Un contrôle sans insert, permettant d'évaluer la probabilité pour laquelle le vecteur se reforme sur lui-même. Un contrôle sans insert et sans ligase, permettant de contrôler les vecteurs non digérés. Les réactions sont ensuite incubées à 22°C pendant 10min.

Tableau 10 : Tableau résumant le protocole de la ligation vecteur-insert

	Vecteur	Insert	T4 ADN ligase	Buffer (10X)	H2O nucléase- free	Usage
Ligation	2 µL 59.33ng	10 µL 41.04 g	1 µL	2 µL	5 µL	Ligation pGEX4T2 :: phyL
Contrôle (-Ligase)	2 µL	-	-	2 µL	16 µL	Quantifie le vecteur non digéré
Contrôle (+Ligase)	2 µL	-	1µL	2 µL	15 µL	Quantifie le vecteur non digéré et le vecteur reliait sur lui-même

2. Transformation des bactéries Top10 chimio-compétentes et vérification des clones

La moitié de la ligation (10 µL) est utilisée par la suite pour transformer 100 µL des Top10 compétentes en suivant le Protocole décrit dans la section II.3.b. L'étalement de la solution

bactérienne transformée est effectué sur un milieu TSB gélosé contenant de l'Ampicilline (100 µg/mL) comme marqueur de sélection.

a. Vérification et screening des bons clones

Le screening pour les clones ayant intégré le plasmide recombinant a été réalisé, dans un premier temps, par une induction à l'IPTG (L'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Dans une boîte de pétrie contenant 25 mL du milieu minimum gélosé et du phytate, est ajouté de l'IPTG à une concentration finale de 1 mM. Des candidats de Top10 issus de la transformation, ont été re-isolés dans ladite boîte et incubé à 37°C. Après une semaine d'incubation, les clones ayant poussé ont été sujet d'une deuxième vérification par PCR en utilisant les amorces GST-phy L et phyLIn R afin de vérifier la présence ou non de l'insert.

D. Clonage dans le plasmide recombinant pSW23T

La stratégie de clonage dans le pSW23T a été entamée dans le but d'élaborer une construction plasmidique, pAZ (pSW23T :: phyLIn), pourvue d'un fragment interne du gène de *phyL* de DN1 (*phyLIn*) qui servira ultérieurement pour muter le gène de ladite souche.

Le vecteur suicide pSW23T est capable de se répliquer dans la souche *DH5-a λpir* en raison de la présence de la protéine Pir. Cependant, dans la souche DN1, n'hébergeant pas ladite protéine, le vecteur est incapable de se répliquer et il pourrait, grâce au mécanisme de recombinaison homologue, s'intégrer dans le chromosome de DN1 aboutissant ainsi à une souche mutée pour le gène *phyL*.

1. Elaboration de la construction plasmidique

Un fragment interne du gène *phyL* faisant 300 pb, est amplifié en utilisant les amorces, phyLIn F et phyLIn R, conçues pour avoir chacune des sites de restrictions uniques pour l'enzyme *EcoRI* et *BamHI*. Etant donné que le vecteur pSW23T possède dans son **MCS (Multiple Cloning Site)** ses deux sites de restrictions, *EcoRI* et *BamHI* sont donc utilisés pour la préparation du vecteur et l'insert.

Tableau 11 : Amorces utilisées pour l'amplification d'un fragment interne (*phyLIn*) du gène *phyL* de la souche DN1

Amorce	Séquence 5' – 3'	Site de restriction
phyLIn F	GCGAATTC CAACTCTTGCGGCATCCTTATTGT	<i>EcoRI</i>
phyLIn R	CGGGATCC CCATCGAGCGGAAAAATTGTAGC	<i>BamHI</i>

2. Ligation vecteur-insert

a. Préparation du vecteur et de l'insert

Les deux molécules d'ADN, vecteur et insert, ont subi une étape de préparation par une double digestion enzymatique dans un volume final de 15 μL (*Tab. 12*) en utilisant les deux enzymes de restriction *Bam*HI et *Eco*RI.

Tableau 12 : Composition du milieu réactionnel de la double digestion enzymatique

	pSW23T	pAL4
ADN	5 μL	5 μL
<i>Bam</i> HI (10 U/ μL)	0,3 μL	0,3 μL
<i>Eco</i> RI (10 U/ μL)	0,3 μL	0,3 μL
Tampon	1,5 μL	1,5 μL
H ₂ O Nucléase free	7,9 μL	7,9 μL
Incubation à 37°C pendant 1 h		

L'ensemble du produit de la digestion a été par la suite déposé sur un gel de 1% puis purifié en utilisant le PureLink Quick Gel Extraction Kit d'Invitrogen.

b. Réaction de ligation

La ligation du produit de digestion purifié a été réalisée dans un volume final de 20 μL à l'aide de T4 Ligase selon un ratio molaire (vecteur : insert) de 3 :1 (*Tab. 13*).

Tableau 13 : Protocole de la ligation du vecteur pGEX-4T2 et l'insert GST-phyL

	Vecteur	Insert	T4 ADN ligase	Buffer (10X)	H2O nucléase- free	Usage
Ligation	3 μL 47.84 ng	10 μL 102 ng	1 μL	2 μL	5 μL	Ligation pSW23T :: phyLIIn
Control (-Ligase)	3 μL	-	-	2 μL	15 μL	Quantifie le vecteur non digéré
Control (+Ligase)	3 μL	-	1 μL	2 μL	14 μL	Quantifie le vecteur non digéré et le vecteur relié sur lui-même

3. Transformation des bactéries *DH5 α λ pir* et vérification des clones

La préparation des chimio-compétentes *DH5- α λ pir* a été réalisée au moyen d'un traitement chimique au CaCl_2 en suivant le même protocole décrit dans la section II.3.a. La moitié du produit de la ligation (10 μL) a été utilisée pour transformer 100 μL des *DH5- α λ pir* chimio-compétentes. L'étalement a été réalisée sur milieu gélosé TSA avec du chloramphénicol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) comme marqueur de sélection.

4. Validation du clonage

La validation des clones et la confirmation de la présence de l'insert a été effectuée par deux méthodes. Dans un premier temps, une PCR sur des CN des clones a été réalisée en utilisant les amorces phyLin F et phyLin R. L'apparition d'une bande de 300 pb, après analyse dans un gel d'agarose 1%, indique la présence de l'insert. Dans un deuxième temps, l'ADN plasmidique des clones promoteurs a subi une double digestion enzymatique *EcoRI/BamHI*, permettant la libération de l'insert.

V. Test de phytase

Dans le but d'étudier la capacité du gène de phytase à conférer aux clones construits le pouvoir à utiliser le phytate et dans l'optique de caractériser les phytases des différentes souches, un test de phytase a été entamé. Ce dernier consiste à évaluer l'activité de la phytase dans différentes conditions en étudiant la croissance bactérienne dans un Milieu Minimum (MM) contenant le phytate comme seule source de P. Le test a été mené dans un milieu solide puis liquide en utilisant Top10 comme contrôle négatif, DN1, Z10 et Z16 comme contrôle positif.

1. Test sur milieu solide

Le test de phytase a été réalisé sur milieu solide, en ensemençant les clones étudiés (pAL1, pAL2 et pAL3) dans un MM gélosé contenant du phytate. Ce dernier est préparé en ajoutant 5 mg du phytate à 1 L de MM dont la composition est la suivante 1.5% glucose, 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% NaCl, 0.05% KCl, 0.001% FeSO_4 , 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.001% MnSO_4 . Le test a été conduit dans trois conditions de pH 6.5, 7 et 8. Et trois températures différentes 37°C, 42°C et 55°C. Les boîtes ont été par la suite incubées pendant 3 jours. L'ensemble des paramètres (pH, température et l'effet de la présence du phytate) ont été contrôlés en utilisant comme contrôle les milieux suivants : MM sans phytate et milieu gélosé TSB. La production du phytase et l'utilisation du phytate ont été évalué par la croissance bactérienne.

Les conditions où nous avons observé une croissance bactérienne ont été utilisées pour quantifier l'activité phytasique dans un milieu liquide.

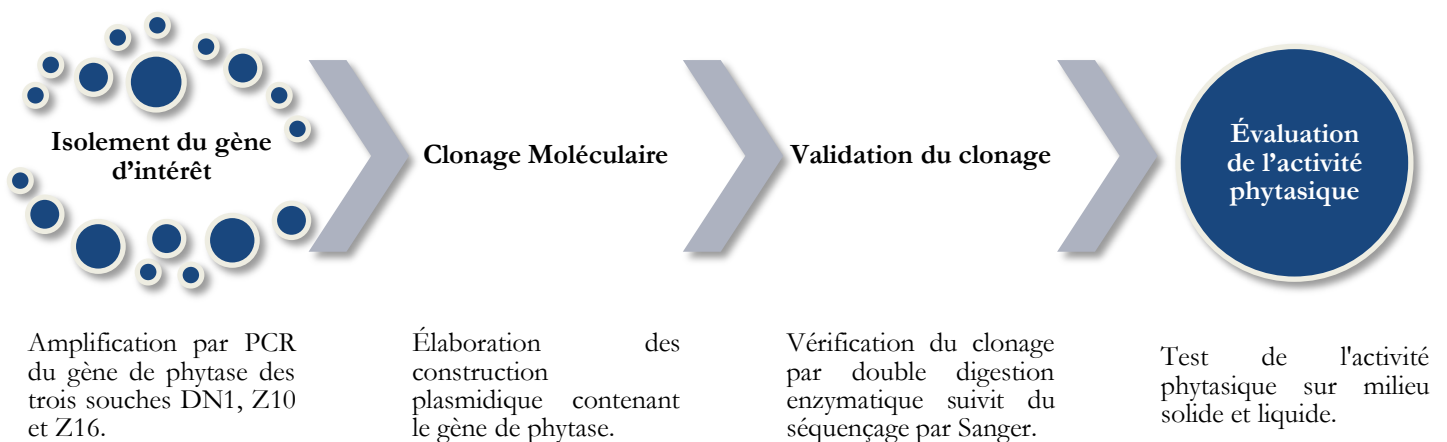
2. Test sur milieu liquide

La quantification de l'activité phytasique est basée sur le dosage colorimétrique du produit final, P_i , issu de la dégradation du phytate par la phytase en utilisant comme réactifs l'acide ascorbique et le molybdate.

Des CN ont été préparés, centrifugés à 5000 g pendant 10 min, puis lavé par le MM et récupéré dans un volume de 10 mL de MM. A partir de ces solutions bactériennes, une mesure de la DO_{600nm} nous a permis de déterminer le volume nécessaire pour réaliser une inoculation des milieux avec une DO de départ égale à 0.1. Les préparations ont été par la suite incubées à deux températures différentes, 37°C et 42°C. Après une incubation de 3 jours, les solutions bactériennes ont été centrifugées à 12 000 rpm pendant 10 min. 1mL du surnageant et par la suite mise en présence de 160 μ L de la solution réactionnelle fraîchement préparée en mélangeant 50 mL de l'acide sulfurique (5N), 5 mL de potassium antimonyl tartarate (8.44 mM), 15 mL d'ammonium molybdate (4%) et 30 mL de l'acide ascorbique (0.1 M). Une mesure de la DO à 880nm est réalisée après une incubation pendant 5 min.

La teneur de P soluble a été calculée sur la base d'une gamme d'étalonnage préparée avec des concentrations standard de KH_2PO_4 avec des concentrations de P allant de 0 à 1 $mg.L^{-1}$.

Workflow de l'étude



Résultats et discussion

I. Amplification des gènes de phytase par PCR « Polymerase Chain Reaction »

L'amplification par PCR du gène de la phytase a été réalisée à partir de l'ADN génomique extrait des souches étudiées (DN1, Z16 et Z10). L'analyse des produits d'amplification a été effectuée par un dépôt de 2 μ L de produit de PCR dans gel d'agarose. Les résultats de la migration électrophorétique des produits de PCR sont représentés dans la figure 16.

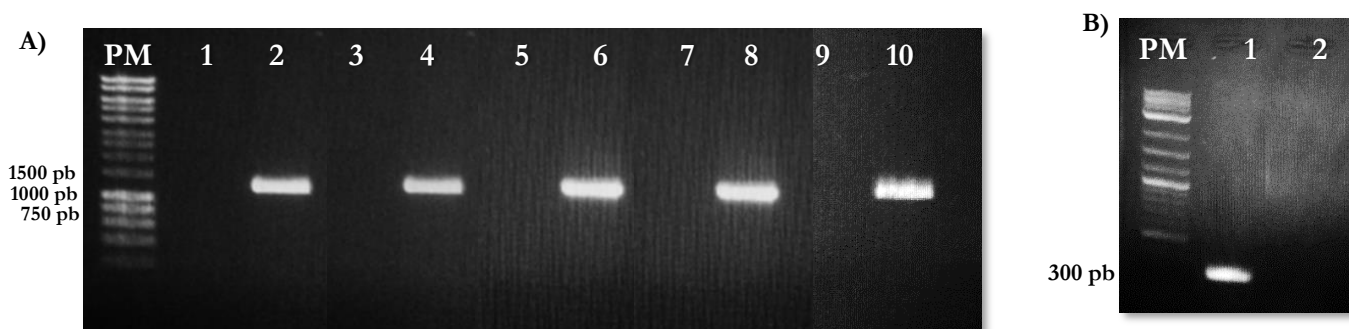


Figure 16 : Électrophorèse sur gel d'agarose 0,7% (A) et 1% (B) de 2 μ L de produits d'amplification par PCR. PM : poids moléculaire 1KB. Puits 1,3,5,7,9 : Contrôles négatifs ; Puits 2 : *phyL*(DN1) ; Puits 4 : *phyC* (Z10) ; Puits 6 : *phyC* (Z16) ; Puits 8 : *GST-pphyL* ; Puits 10 : *GST-phyL-His*

La migration du produit PCR, déposé dans les puits 2, 4, 6, 8 et 10 (Fig. 16A), nous ont montré la présence des bandes uniques et très abondantes, attestant l'amplification attendue des fragments d'ADN dont la taille s'accorde correctement avec celle obtenue par la stimulation *in Silico*. Dans les puits 2, 4 et 6 sont déposés 2 μ L de produits d'amplification des gènes *phyL* (DN1), *phyC* (Z10) et *phyC* (Z16) respectivement. Le profil de la migration nous a révélé la présence d'une bande dont la taille est d'environ 1146 pb correspondant à la taille attendue. La migration dans un gel d'agarose 1% (Fig. 16B) a été adoptée afin de pouvoir visualiser le fragment interne *phyLIn*, amplifié par les amorces *phyLIn F* et *phyLIn R*, ayant une taille égale à 300 pb. Notons également qu'au niveau des puits qui correspondent aux contrôles négatifs (1, 3, 5, 7,9), aucune bande n'a été détectée ce qui nous permet d'exclure la présence de toutes contaminations.

L'ensemble des produits de PCR a été par la suite purifié et contrôlé par une analyse électrophorétique en déposant 3 μ L dans un gel d'agarose de 0,7% (Fig. 17A) et 1% (Fig. 17B).

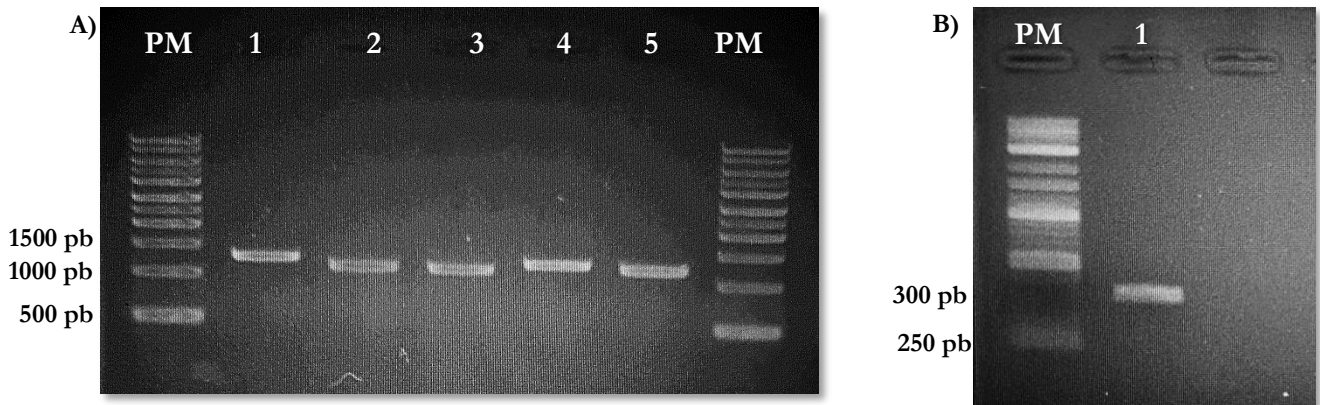


Figure 17 : (A) Analyse par électrophorèse en gel d'agarose 0,7 % de produits de PCR purifiés. Puits 1 : *phyL* (DN1), puits 2 : *GST-phyL* (D1), puits 3 : *GST-phyL-His*, puits 4 : *phyC* (Z10), puits 5 : *phyC* (Z16). (B) Analyse du produit de PCR purifié du fragment interne *phyLIn* en gel d'agarose à 1%

Nous nous pouvons observer dans la figure 17, des bandes nettes et claires qui correspondent aux produits de PCR purifiés témoignant ainsi, la bonne qualité de nos amplicons.

II. Clonage moléculaire

1. Etude *in silico*

Avant d'entamer le clonage *in vitro*, une stimulation du clonage moléculaire *in silico* a été tout d'abord conduite en utilisant le logiciel SnapGene. L'ensemble des séquences nucléotidiques des gènes et des vecteurs ont été importées à partir de la base de données NCBI. La stimulation *in silico* nous a aidés, en analysant le MSC des plasmides, de choisir les sites d'insertion de nos gènes afin que ces derniers soient insérés dans la bonne orientation. De même, elle nous a permis de déterminer le produit de clonage final, ainsi que les enzymes de restrictions à utiliser pour vérifier le sens de l'insertion de nos dans le cas de clonage dans le pJET1.2. Ces dernières sont présentées en annexe.

2. Clonage dans le pJET1.2

Les gènes *phyL* de DN1, *phyC* de Z10 et *phyC* de Z16 ont été amplifiés par PCR en utilisant des amorces permettant l'insertion des sites de restriction uniques de part et d'autre des produits amplifiés (Tab.4). L'insertion des gènes amplifiés dans le pJET1.2 a été permise par une ligation pendant 10 min à 22°C à l'aide de la T4 Ligase, tout en respectant une quantité de 6.6 ng pour l'insert et 50 ng pour le vecteur. Nous avons par la suite transformé des Top10 chimio-compétentes par la moitié du produit de ligation. La sélection des clones ayant incorporé le plasmide recombinant a été réalisée sur une boîte TSA en utilisant l'Ampicilline comme marqueur de

sélection (résistance conférée par le plasmide recombinant). Un nombre suffisant de colonies issus de la transformation des Top10 par le plasmide recombinant a été ré-isolée sur un milieu sélectif contenant l'ampicilline (100 µg/mL).

3. Criblage et screening pour des clones

Afin de vérifier si l'insertion de nos gènes dans le vecteur pJET1.2, l'ADN plasmidique de plusieurs candidats, préparé par Miniprep classique, a été sujet d'une digestion enzymatique par deux enzymes de restrictions différentes *Xba*I et *Bam*HI. La digestion par les dites enzymes nous a permis non seulement de vérifier la présence de l'insert mais également de déterminer son sens d'orientation dans le vecteur pJET1.2. Suite à cette digestion, plusieurs clones ont libéré deux fragments l'un dont la taille correspond à celle du vecteur (2974 pb) et l'autre à la taille de l'insert. Comme observé dans la Figure 18A, le profil de la double digestion enzymatique par *Bam*HI / *Xba*I, nous permet de valider le clonage du gène *phyL* dans le pJET1.2. Pareillement, la Figure 18B montre que, sur les 9 candidats testés, trois ont libérés deux fragments de taille 2974 bp (vecteur) et 300 bp ce qui correspondent aux tailles attendues suite au clonage.

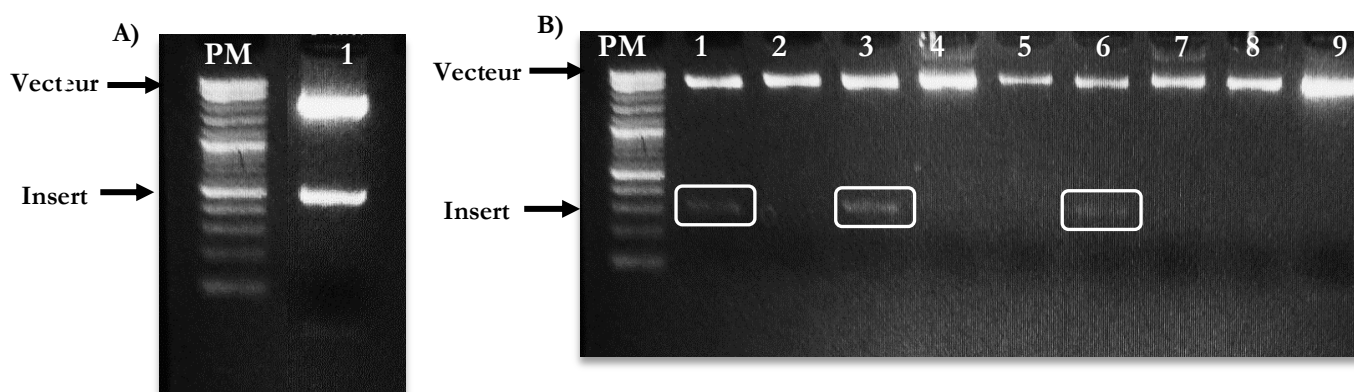


Figure 18 : Vérification du clonage par une double digestion enzymatique *Bam*HI / *Xba*I (A) pour le clonage du gène entier *phyL* et *Bam*HI / *Xba*I (B) pour le clonage du fragment interne (*phyLI*n). Les produits de digestion ont été analysés sur un gel d'agarose 1%

En ce qui concerne le clonage du gène *phyC* de Z10 et *phyC* de Z16, ce dernier a été validé par une double digestion enzymatique à l'aide des enzymes *Hind*III et *Bam*HI. Dans les puits 2 et 3 sont déposés les produits de la double digestion de la construction pJET1.2 :: *phyCBS*. Les deux fragments observés sont respectivement de 2974 pb et 1146 pb et correspondent aux tailles attendues. Cependant, les trois fragments obtenus pour la construction plasmidique pJET1.2 :: *phyCBV* (Fig. 9, puits#1) n'étaient pas prévisibles. On s'attendait uniquement à deux fragments, l'un du vecteur 2974 pb et l'autre de l'insert 1152 pb. Le troisième fragment obtenu indique qu'il se peut que notre insert ait été coupé par une des deux enzymes utilisées.

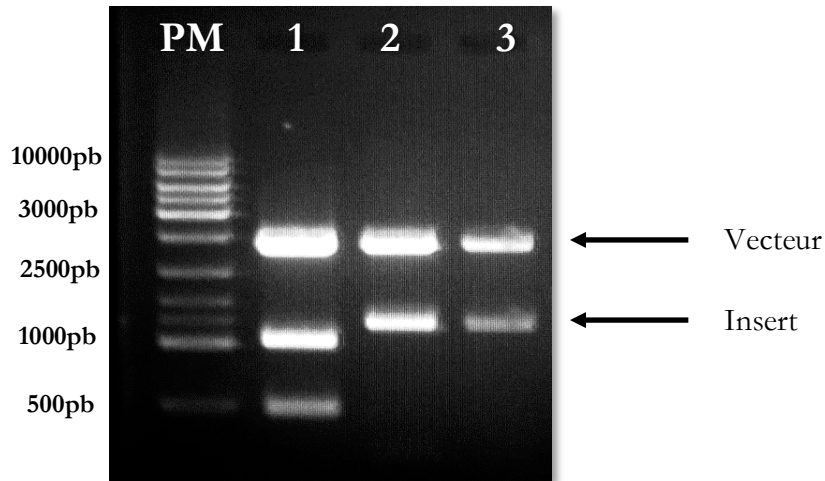


Figure 19 : Vérification du clonage des gènes *phyCBS* et *phyCBV* dans le pJET1.2 par une double digestion enzymatique *Bam*HI / *Hind*III. PM : poids moléculaire 1KB plus DNA Ladder. 1 : produit de la digestion de pJET1.2 :: *phyCBV* 2 et 3 : produits de digestion de pJET1.2 :: *phyCBS*

Concernant le clonage du gène *phyL* auquel sont introduits des 6 GTG, ce dernier a été validé par une double digestion enzymatique en utilisant les deux enzymes *Sal*I / *Bam*HI dont les sites de restriction ont été introduits dans les extrémités du gène lors de la PCR. Ainsi, parmi les nombreuses colonies issues de la transformation, dix ont été testés. Sur les dix testés, cinq ont libéré deux fragments dont l'un correspond à l'insert (Fig. 20).

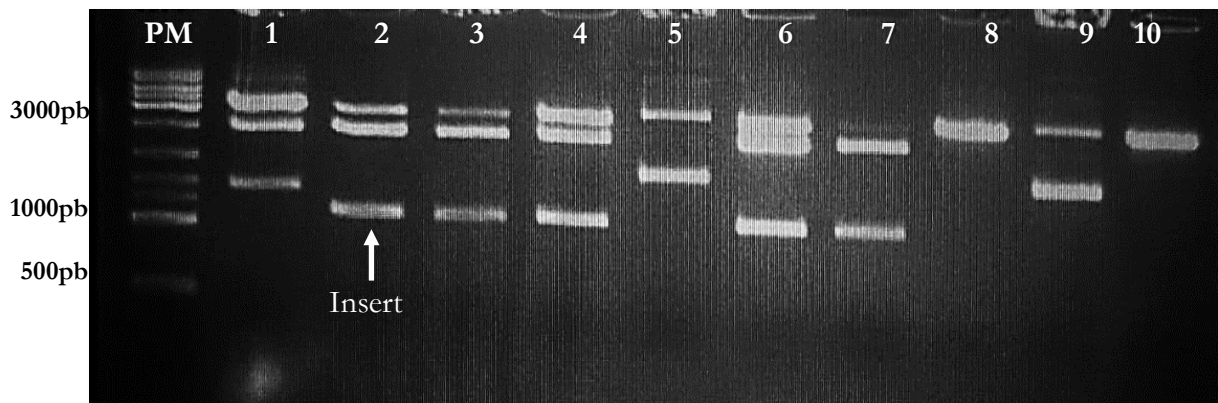


Figure 20 : Vérification du clonage du gène *phyL* amplifié par les deux amorces *GST-phyL R* et *phyL-His* par une double digestion enzymatique *Sal*I / *Bam*HI. PM : Poids Moléculaire 1KB plus DNA Ladder. 1,2,3,4,5,6,7,8,9 et 10 : profil de la digestion enzymatique des 10 clones

Parmi les clones validés par la digestion enzymatique, les candidats nommées pAL1 (*phyL*), pAL2 (*phyC* Z16), pAL3 et pAL4 (*phyC* Z10) ont été choisis pour la suite de notre étude.

4. Séquençage et alignement des séquences nucléotidiques

Après correction et alignement des séquences Forward et Reverse à l'aide du logiciel Bioedit et MEGA11, l'alignement de la séquence a été effectué en utilisant NCBI BLAST (Tab. 14).

Tableau 14 : Résultat de l'alignement des séquences nucléotidiques

	Score bits	Identité	Gaps
pAL1	244	137/137(100%)	0/137 (0%)
pAL2	278	169/177 (95%)	6/177 (3%)
pAL3	1310 bits(709)	808/851(95%)	35/851(4%)
pAL4	358 bits(919)	206/238(87%)	2/238(0%)

5. Traduction et alignement des séquences protéiques

Les séquences nucléotidiques ont été traduites et exploitées pour la recherche de cadre de lecture ouvert (ORF) qui correspond à notre protéine d'intérêt à l'aide de l'outil [Expasy](#). Une fois que l'ORF codant pour la protéine d'intérêt est déterminé, un alignement par paire de la séquence protéique du clone et celle de la souche d'origine a été réalisé, en utilisant l'outil [EMBOSS Needle](#).

En dépit de la qualité du séquençage qui nous a pas donné accès à la totalité de la séquence nucléotidique, il est à noter que en alignant la séquence protéique des différents clones avec celles des souches d'origine, nous constatons que la majorité de la séquence est conservée (*Annexe*).

6. Clonage dans le vecteur d'expression pGEX-4T2

L'insertion du gène *phyL* de DN1 dans le vecteur d'expression protéique pGEX-4T2 a nécessité l'ajout d'un site de restriction *SaI* et *Bam*HI dans les extrémités 5' et 3' du gène. Ceci a été possible grâce à l'utilisation des amorces GST-*phyL* et *phyL*-His. Le fragment amplifié a été dans un premier temps cloné dans le pJET1.2 puis reisolé du clone pAL4 par digestion enzymatique *SaI*/*Bam*HI (*Fig. 21B*). Afin de créer des bouts cohésifs compatibles pour la ligation, le vecteur pGEX-4T2 a été digéré par les mêmes enzymes *SaI*/*Bam*HI (*Fig. 21A*). Le vecteur digéré et l'insert libéré du clone pAL5, ont été purifiés puis ligaturés selon un ratio molaire 3 :1.

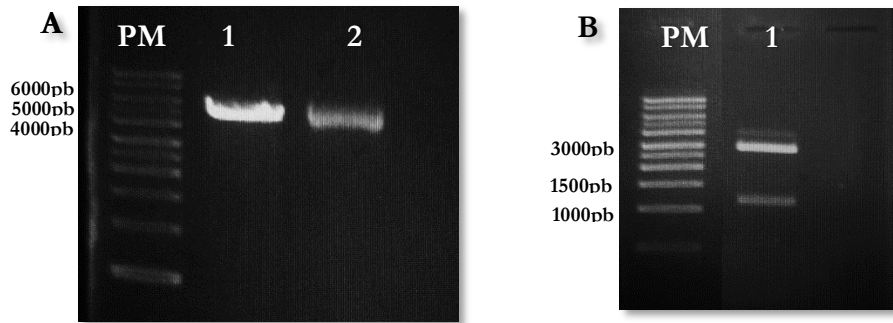


Figure 21 : Double digestion enzymatique du pGEX-4T2 (A) et pAL5(B) par *Sall*/*Bam*HI
 A-1 : pGEX-4T2 non digéré A-2 : pGEX-4T2 digéré *Sall*/*Bam*HI ; B-1 : pAL5 digéré par *Sall*/*Bam*HI

✚ Transformation et vérification de clonage

De nombreux candidats, issus de la transformation par le produit de la ligation ont été vérifiés pour l'intégration du plasmide recombinant à l'aide d'une induction par IPTG, neuf d'entre eux ont été testés pour la présence de l'insert par une PCR en utilisant les amorces GST-phyL et phyL-His. La migration des résultats de PCR sur gel d'agarose 0.7% nous montre une absence d'amplification pour l'ensemble des candidats. Ceci, nous indique que nous n'avons pas réussi de cloner le gène *phyL* le vecteur pGEX-4T2.

5. Clonage dans le vecteur suicide pSW23T

Dans un premier temps, à partir du clone pAZ le fragment interne a été isolé à l'aide d'une double digestion enzymatique par *Eco*RI et *Bam*HI (Fig. 22A). La digestion a été validée par une électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Dans un second temps, l'insert purifié et le vecteur digéré par *Bam*HI/*Eco*RI (Fig. 22B) ont été soumis à l'action de la T4 ligase.

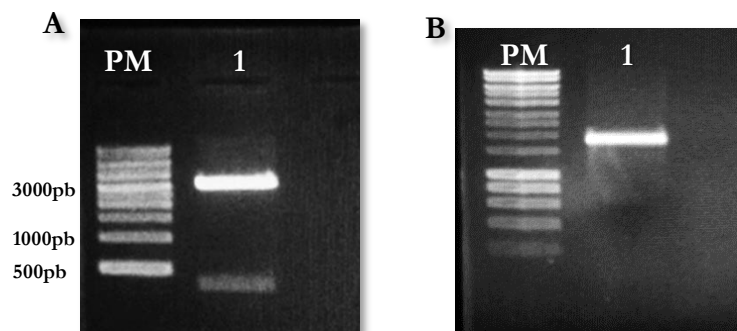


Figure 22 : Double digestion enzymatique *Bam*HI/*Eco*RI de pAL (A) et pSW23T (B)

L'ADN plasmidique de 12 candidats de *DH5-a λpir* ont été testés pour la présence de l'insert par le biais d'une PCR en utilisant les amorces phyLIn R. les résultats de la PCR nous révèle la présence, chez trois candidats, d'un fragment d'ADN dont la taille correspond à celle attendue 300 pb.

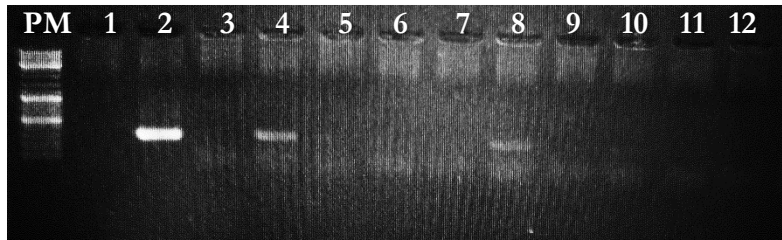


Figure 23 : Électrophorèse en gel d'agarose du produit de PCR des dix colonies (3-12) **1** : contrôle négatif **2** : contrôle positif

✚ Vérification des clones par digestion enzymatique :

Les trois clones sélectionnés par PCR ont été sujet d'une vérification par digestion enzymatique *EcoRI/BamHI*. L'analyse du gel ne montre qu'aucune bande n'a la taille attendue.

III. Test de phytase

1. Test sur milieu solide

La caractérisation de l'activité phytasique et l'étude de l'effet de pH et de la température sur l'aptitude des clones à utiliser le phytate a été conduite en milieu solide dans des conditions limitantes en P. les résultats de ce test nous indiquent que, hormis le milieu ayant un pH égale à 6.5 aucune croissance n'a été observée dans les autres milieux (pH 7 et pH 8). De plus, cette croissance n'a été constatée qu'à des températures égales à 37°C et 42°C. Intéressamment, ladite croissance a été plus élevée dans la température 42°C que 37°C et plus remarquable pour les clones que les souches d'origine (Fig. 24 ; Tab. 15). Notons également que, lorsque le phytate a été fournis comme seul source de P, la croissance de Top10 (contrôle négative) a été inhibée, a contrario aux souches DN1, Z10 et Z16 (contrôle positive) dont la croissance a été observée dans les mêmes conditions que les clones.

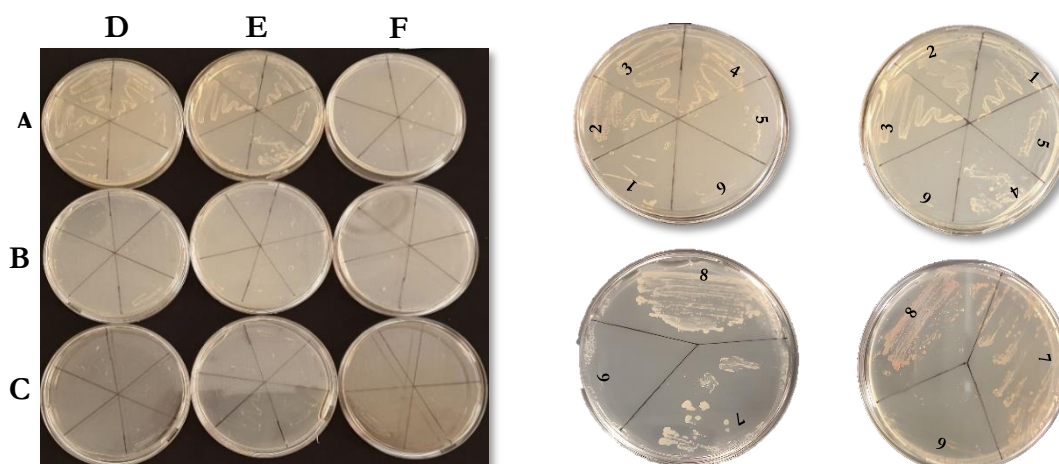


Figure 24 : Résultats de test de l'activité phytasique sur milieu solide à des pH et températures différentes.

A : pH 6.5 ; **B** : pH 7 ; **C** : pH 8. **D** : 37°C ; **E** : 42°C ; **F** : 55°C. **1** : pAL2 ; **2** : pALA ; **3** : pAL3 ; **4** : Z16 ; **5** : Z1 ; **6** : Top10 ; **7** : pAL1 ; **8** : DN1

Afin de pouvoir corrélérer la croissance observée à la consommation de l'AP, et pour investiguer tout effet de température et de pH sur la croissance des clones et des souches bactériennes, des contrôles sur milieu TSB et MM ont été adoptés. Les résultats nous indiquant que, Z1 et DN1 ont pu se développer dans toutes les conditions et que la variation de pH et de la température n'exerçaient aucune influence sur leur croissance (Fig. 25). Néanmoins, la température 55°C semblait avoir un effet inhibiteur sur la croissance des clones, de Top10 et de Z16. Il convient également de préciser que, aucune croissance n'a été détectée dans le MM.

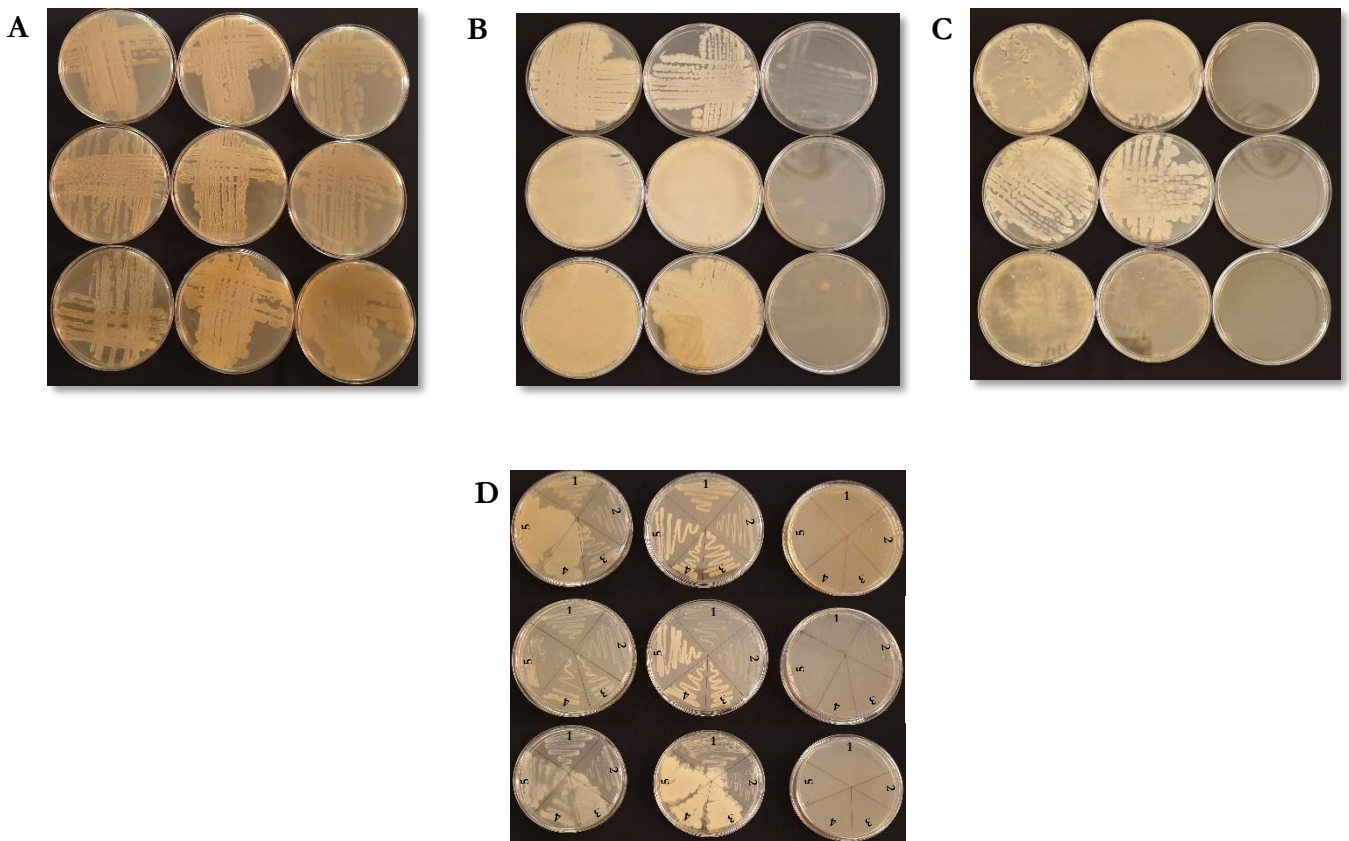


Figure 25 : Résultats de l'ensemencement des souches et des clones dans un milieu TSB.

A : DN1 ; B : Z10 ; C : Z16 ; D.1 : Top10 ; D.2 : pAL1 ; D.3 : pAL3 ; D.4 : pAL4 ; D -5 : pAL2 De droite à gauche : 37°C, 42°C, 55°C. Du haut en bas pH 6.5 ; pH 7 ; pH 8

Ces résultats confirment que, le gène de la phytase introduit dans les clones les a conférés la faculté de se développer en conditions limitantes en Pi, vraisemblablement par l'hydrolyse de l'AP présent dans le milieu et ceci grâce à l'activité de la phytase. De plus, ces résultats nous permettent de déduire que le pH 6.5 est le pH optimal pour l'activité phytasique des clones.

Tableau 15 : Résultats de teste de l'activité phytasique sur milieu solide dans différents conditions de pH et température

Souche	Milieu Minimum + phytate									Milieu TSB								
	pH 6.5			pH 7			pH 8			pH 6.5			pH 7			pH 8		
	37°C	42°C	55°C	35°C	42°C	55°C	37°C	42°C	55°C	37°C	42°C	55°C	37°C	42°C	55°C	37°C	42°C	55°C
pAL1	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	++	++	-	++	++	-
pAL2	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	-	+++	+++ (Sécréti ons)	-	+++	+++ (diffusi on)	-
pAL3	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	-	+++	+++ (sécréti ons)	-	+++	++	-
pAL4	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	-	+++	+++ (sécréti ons)	-	+++	+++ (diffusi on)	-
DN1	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	++	++	+++	++	++	+++	++ +
Z10	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+	Tapis	Tapis	-	Tapis	++++	+
Z16	++	++	-	-	-	-	-	-	-	+++ (Sécréti ons)	Tapis (Sécré tions)	-	+++	+++ (Sécréti ons)	-	Tapis	+++	-
Top10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	++	++	-	++	++	-

2. Test dans milieu liquide

La quantification de la consommation de l'AP ainsi que la croissance bactérienne ont été établies en se basant sur la concentration de Pi libéré dans le milieu de culture. Les conditions adoptées ont été choisies en basant sur les résultats du test de croissance en milieu liquide. La figure ci-dessus représente la concentration de Pi (mg/L) libéré dans le milieu à un pH 6.5 et une température égale à 37°C et 42°C.

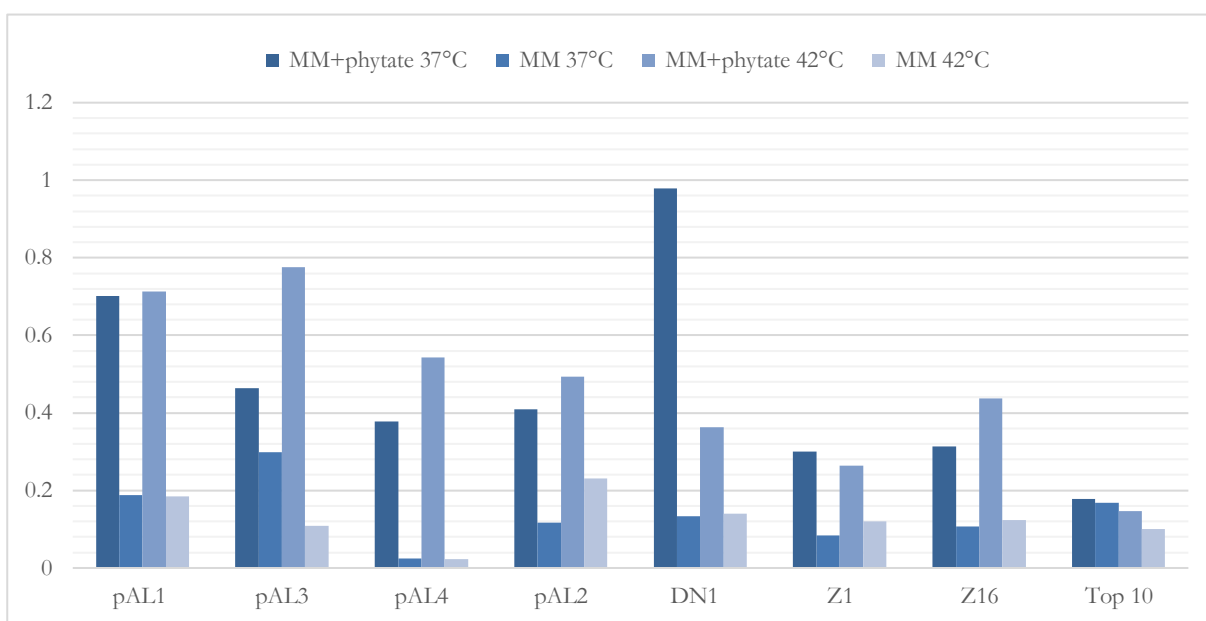


Figure 26 : Concentration de Pi (mg/L) libéré par les clones (pAL1, pAL2, pAL3 et pAL4) et les souches (DN1, Z10, Z16 et Top10) après une incubation de 3 jours dans un MM avec la phytate et sans phytate à un pH 6.5 et une température de 37°C et 42°C

D'après la figure 26, nous remarquons que, à l'exception de DN1 et de Z10, la quantité de Pi libérée à une température égale à 42°C est plus importante que celle libérée à 37°C. De plus, cette libération de Pi était d'autant plus élevée chez pAL3, pAL4 et pAL2 que chez les souches d'origine (Z10, Z16). Il est à remarquer également que, la souche DN1 et le clone pAL1 dérivée d'elle, ont libéré beaucoup plus de Pi dans le milieu que l'ensemble des clones et des souches étudiées. Ces résultats s'accordent parfaitement avec ceux obtenus dans le test en milieu solide.

Selon ce qui précède et sachant que, la quantité de Pi libérée dans le milieu est due à l'hydrolyse de l'AP qui elle-même est attribuée à l'activité phytasique des clones, les résultats obtenus nous permettent de conclure que la température 42°C est la température optimale pour l'activité phytasique desdits clones.

Discussion

Dans la présente étude, nous avons étudié l'activité phytasique de trois souches bactériennes appartenant au genre de *Bacillus*, notamment *Bacillus licheniformis* (DN1), *Bacillus subtilis* (Z10) et *Bacillus velezensis* (Z16). Ces souches avaient été isolées à partir de différentes niches écologiques et identifiées au laboratoire d'accueil. A cet égard, nous avons adopté la stratégie du clonage moléculaire afin de construire des plasmides recombinants qui serviront à l'étude et la caractérisation des gènes spécifiant la phytase desdites souches.

La stratégie adoptée dans notre étude a nécessité dans un premier temps l'isolement du gène de la phytase par PCR. Étant donné que les souches DN1, Z10 et Z16 ont été rapportées dans la littérature pour leur possession d'une phytase encodée par un gène de 1146 pb, l'analyse électrophorétique du produit de PCR nous a permis de confirmer l'amplification de la bonne région.

Le clonage des gènes d'intérêts a été réalisé en utilisant trois types de vecteurs différents pJET1.2, pGEX-4T2 et le vecteur suicide pSW23T. Initialement, les gènes d'intérêts ont été insérés dans le vecteur pJET1.2. Ce dernier étant basé sur un système de sélection positive due à la présence d'un gène létale *eco47IR* au niveau du site de clonage. Théoriquement, les transformants qui ont pu se développer dans le milieu de sélection devraient vraisemblablement correspondre à ceux ayant intégrés le plasmide recombinant. Mais pratiquement, il était nécessaire de procéder à une confirmation du clonage par le biais d'une digestion enzymatique pour libérer l'insert, suivi du séquençage pour vérifier sa séquence. Le choix des enzymes de restrictions à utiliser a été basé sur les sites de restrictions introduits de part et d'autre de l'insert. En effet, lors de l'amplification par PCR, deux sites de restrictions uniques ont été ajoutés au moyen du couple d'amorces utilisés. À la suite à la digestion enzymatique, nous avons constaté que la majorité des candidats ont libéré deux fragments, un dont la taille s'accorde avec celle du vecteur pJET1.2, 2974 pb, et l'autre avec celle de l'insert. Cependant, pour le clone relevant de la souche Z16, nous avons remarqué que, le profil de la digestion a montré la présence d'un troisième fragment de taille 500 pb, accompagner d'une diminution de la taille de notre insert. Ce résultat suggère que notre insert a été découpé par une des deux enzymes utilisées. Cette coupure peut être plausiblement expliquée par une erreur qui

s'est introduite au niveau de la séquence nucléotidique lors de l'amplification du gène par la *Taq* polymérase et qui a abouti à la création d'un nouveau site de restriction.

Le clonage des trois gènes *phL* (DN1), *phyC* (Z10) et *phyC* (Z1) dans le vecteur pJET1.2 a été conduit avec succès. Pour chaque construction plasmidique, les clones nommés pAL1 (pJET1.2 :: phyL), pAL2 (pJET1.2 ::phyC BS), pAL3 et pAL4 (pJET1.2 ::phyC BV) ont été choisis pour la suite de l'étude. Afin de valider la conservation de nos gènes, un séquençage desdits clones a été entamé.

Les alignements obtenus par l'outil BLASTn, ont permis de confirmer les résultats obtenus par la digestion enzymatique. De même, une analyse réalisée par l'algorithme BLASTP dont l'alignement est évalué par des scores, des pourcentages d'identité et de similarité, a rendu possible la définition d'une activité enzymatique phytasique. Celle-ci a indiqué la présence, pour l'ensemble des clones, d'un pourcentage d'identité très élevé avec la phytase de *Bacillus* allant jusqu'à 99% pour le clone pAL1. Bien que, la traduction des séquences nucléiques nous n'ayons pas donné accès à la totalité de la séquence protéique, en dépit de la qualité de la préparation d'ADN plasmidique, l'alignement de la partie protéique qu'on a pu traduire avec celle de la souche d'origine, nous a révélé que la totalité de la séquence a été conservée.

En outre, selon une étude comparative de 44 séquences protéiques représentatives des BPPs, les sites conservés ont été observés vers les extrémités N- et C- terminale de la protéine. Par ailleurs, dans toutes les séquences peptidiques étudiées un motif conservé "[D/A][S/T/A]DDPA[I/V]W[I/V/L]T[N/D/L]K" a été observé en aval de leur extrémité N, suivi d'une autre séquence "NN[F/V]D[I/V/L]". La conservation de ces dernières suggère leur implication dans la formation et la coordination du site de liaison du phytate (Kumar *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2021). Considérant ce qui précède, nous avons constaté la présence chez les deux clones pAL3 et pAL4 de deux séquences hautement conservées situées dans le côté N-terminal, « **DDAADDPAIWWHEKHPEKS** » et « **NNVDL** ».

En second lieu, la séquence protéique du clone pAL1 a révélé la conservation des deux aminoacides **E260** et **D314** qui jouent un rôle critique dans la fixation de l'AP au niveau du site catalytique. En effet, **Byung-Chul Oh et al** ont constaté qu'une mutation dirigée au niveau des acides aminés énoncés a causé une perte considérable de l'activité phytasique de *Bacillus amyloliquefaciens* (Byung-Chul Oh *et al.*, 2001). Quoique ces constatations nous autorisent à dire avec perplexité que nos clones ont pu conserver à la fois les sites catalytiques et les acides aminés clés impliqués dans l'activité enzymatique, il est impératif de refaire le séquençage et de déterminer le reste de la séquence protéique afin de s'assurer de l'intégrité totale des inserts.

Ayant validé la présence des gènes dans l'ensemble des constructions plasmidiques élaborées, et désirant caractériser et étudier l'activité phytasique des différents clones, nous avons opté pour un test de croissance dans des conditions limitantes en P. Dans un premier temps, le test a été conduit dans un milieu solide à des valeurs de pH et de températures différentes. Les résultats nous ont mis en évidence que, hormis le milieu à pH 6.5, aucune croissance bactérienne n'a été détectée dans les autres milieux de culture (pH 7 et pH 8). De manière intéressante, cette croissance n'a été observée que dans les températures 37°C et 42°C, tandis que la température 55°C semblait inhibée leur croissance. Cette inhibition s'expliquait par le fait que, la concentration en Ca²⁺ supplémentée dans le milieu de culture (1 mM) n'était pas assez suffisante pour que l'enzyme puisse garder son activité et sa stabilité. Ainsi, il convient de signaler que, la phytase des *Bacillus* est une enzyme Ca²⁺ dépendante, elle exige la présence des ions Ca²⁺ pour pouvoir catalyser l'hydrolyse du phytate. A ce propos, nombreuses sont les études ayant fait parvenir à confirmer le rôle critique de ces ions dans la prévention de la dénaturation thermique de l'enzyme. Dans des travaux menés par Kerovuo et al, ce dernier a observé qu'en présence de 5 mM de Ca²⁺, la phytase de *Bacillus sp DS 11* était stable jusqu'à 90°C. Cependant, en absence des ions Ca²⁺, l'activité de l'enzyme a été considérablement réduite au-dessus de 50°C. (Kerovuo *et al.*, 1998). De plus, après l'ajout de 10 mM de Ca²⁺, la gamme de pH optimale de la phytase KHU-10 a augmenté de 6.5 – 8.5 à 6.0 – 9.5. Ces constatations pourraient expliquer l'absence de la croissance bactérienne à 55°C et à pH égale 7 et 8.

Concernant le test de l'activité phytasique en milieu liquide, les résultats obtenus montrent qu'à l'exception de DN1 et Z10, la quantité de Pi libérée dans le milieu à une température égale à 42°C est remarquablement élevée que celle constatée à 37°C. De plus, cette quantité était beaucoup plus importante chez les clones que les souches d'origine. Cette amélioration de l'activité phytasique chez les clones pourrait être expliquée par la survenue d'une mutation ponctuelle induisant une élévation de l'activité phytasique. Cependant l'hypothèse de mutation reste encore à confirmer par l'analyse de la séquence protéique des clones en entière.

Notons également que, DN1 a excédé l'ensemble des souches étudiées en matière de quantité de Pi libérée. Sachant que, la libération de Pi reflète la capacité des souches à utiliser le phytate, qui elle-même traduit l'activité de leur enzyme. D'un point de vue catalytique, la phytase produite par DN1 serait donc beaucoup plus intéressante que celle des autres souches étudiées. Notre résultat, s'accordent parfaitement avec une étude réalisée par (Borgi *et al.*, 2015) durant laquelle la phytase produite par *B. licheniformis ATCC 14580* était beaucoup plus active que celle produite par d'autre *Bacillus*.

Concernant les expériences de clonage dans le vecteur suicide pSW23T, bien que la vérification des clones par PCR sur les clones issues de la transformation nous ait révélée l'amplification d'un fragment dont la taille correspond à celle attendue, 300 pb, la validation par digestion enzymatique nous a donné des résultats incompatibles à ceux obtenus par la PCR. Celui-ci nous a laissé penser qu'assurément les amorces utilisées ont permis l'amplification d'une région de l'ADN génomique de la cellule hôte, *DH5- λ pir*. Ainsi, en parcourant la littérature nous avons trouvé que la souche *E coli* K12 dispose d'un gène de 1299 bp codant pour une poly-inositol polyphosphatase (*AppA*) catalysant l'hydrolyse de l'AP. De ce fait, il semblait que les amorces utilisées, ont pu s'hybrider sur une partie de ladite région et provoquer l'amplification d'un fragment de 300 pb. Ce constat, a permis l'explication en partie, la non-concordance des résultats de la PCR avec ceux de la digestion enzymatique.

Quant aux expériences de clonage dans le vecteur d'expression pGEX-4T2. Il convient de noter les difficultés rencontrées lors de ces manipulations. En effet, malgré tous les essais d'optimisation des conditions de la ligation (ratio molaire, temps d'incubation, contrôle de ligation...), et bien qu'il ait des colonies issues de la transformation avec un bon ratio entre les boîtes de contrôles et celle de la ligation, nous nous sommes souvent rencontrés avec des faux positifs (colonies sans ADN). Ceci peut avoir différentes causes, considérant la concentration de l'antibiotique qui n'était pas assez suffisante pour stimuler la réplication du plasmide, la sélection des colonies satellites ou encore possiblement que notre insert soit toxique pour la cellule hôte.

Bien que les expériences de clonage dans le vecteur pGEX-4T2 et pSW23T n'ont pas abouti malgré tous les essais d'optimisation, les constructions plasmidiques intermédiaires obtenus par le clonage dans le pJET1.2 représentent un matériel et un outil permettant de poursuivre cette étude.

Conclusion et perspectives

Les précédents travaux menés au laboratoire avaient démontré que les souches probiotiques DN1, Z10 et Z16 sont capables de se développer dans un milieu **PSM** (**Phytate Screening Medium**). Cette capacité serait due à la présence d'une activité phytasique, qui sous-entend la présence d'un gène *phyC* (pour Z10 et Z16) et *phyL* (pour DN1) encodant pour une enzyme, nommée la phytase.

La caractérisation du gène de la phytase et l'étude de son activité phytasique ont été initiées au cours de cette étude pour les trois souches énoncées. Nous avons réussi, par le biais d'une amplification par PCR, à démontrer l'existence chez les dites souches d'un gène d'environ 1146 pb encodant pour une phytase. Les trois gènes extraits ont été clonés avec succès dans le vecteur de clonage pJET1.2. et pour chaque souche un clone a été choisi pour la suite de l'étude.

Les études de l'activité phytasique ont démontré la présence d'une activité optimale à un pH égale à 6.5 et une température de 37°C et 42°C. La favorabilité de nos souches et clones envers une telle température et pH est intéressante en matière d'application dans l'industrie alimentaire. Premièrement, notre enzyme est produite par un micro-organisme probiotique classé, selon le FDA, comme étant GRAS (Generally Recognized As Safe), autorisant ainsi son utilisation en tant qu'additif alimentaire. Deuxièmement, son pH optimal égal à 6.5 est particulièrement intéressant car l'endroit où l'enzyme est sensée agir (intestin grêle) a un pH proche de la neutralité. Troisièmement, l'activité de notre enzyme est stable à deux températures à savoir 37°C et 42°C. Celle-ci peut être la constatation la plus attirante, ouvrant la porte pour des applications potentielles non seulement dans l'alimentation humaine mais également animale notamment chez les volailles.

Les travaux menés au cours cette étude ont permis de caractériser, en partie, l'activité phytasique de trois souches de *Bacillus* et nécessitent d'être poursuivies. D'une part, il serait intéressant de compléter les résultats obtenus et d'étudier l'activité de la phytase dans d'autre gamme de pH et de température, en présence des concentrations adéquates en Ca^{2+} qui semble être un facteur primordial pour son activité. D'autre part, grâce au clonage dans le vecteur d'expression protéique pGEX-4T2, notre protéine d'intérêt pourrait être taguée et surexprimée sous forme d'une protéine recombinante fusionnée soit à la GST dans l'extrémité N-terminale, soit aux 6His à l'extrémité C-terminale, soit aux deux. Une fois purifiée, la protéine peut être éventuellement

soumise à des études approfondies permettant la déduction de ses interactions protéiques. De plus, grâce à un processus de recombinaison homologue et en s'aidant du vecteur suicide pSW23T, il pourrait être également envisagé d'élaborer une souche *Bacillus licheniformis* Knock-out (KO) dépourvue du gène phyL. Cette stratégie robuste nous permettra, non seulement de comprendre sur la fonction du gène, mais également de souligner l'importance de certaines régions dans l'activité catalytique de l'enzyme.

Références bibliographiques

- Azeem, M., Riaz, A., Chaudhary, A. N., Hayat, R., Hussain, Q., Tahir, M. I., & Imran, M. (2015). Microbial phytase activity and their role in organic P mineralization. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 61(6), 751-766. <https://doi.org/10.1080/03650340.2014.963796>
- Balwani, I., Chakravarty, K., & Gaur, S. (2017). Role of phytase producing microorganisms towards agricultural sustainability. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.08.010>
- Bohn, L., Meyer, A. S., & Rasmussen, S. K. (2008). Phytate : Impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 9(3), 165-191. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0710640>
- Borgi, M. A., Boudebbouze, S., Mkaouar, H., Maguin, E., & Rhimi, M. (2015). Bacillus phytases : Current status and future prospects. *Bioengineered*, 6(4), 233-236. <https://doi.org/10.1080/21655979.2015.1048050>
- Borriss, R. (2020). Bacillus. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (p. 107-132). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00007-1>
- Byung-Chul Oh, ‡, Byeong S. Chang, ¶, Kwan-Hwa Park, §, Nam-Chul Ha, ⊥, Hyung-Kwoun Kim, ‡, Byung-Ha Oh, ⊥ and, & Tae-Kwang Oh*, ‡. (2001, juillet 19). *Calcium-Dependent Catalytic Activity of a Novel Phytase from Bacillus amyloliquefaciens DS11* (world) [Research-article]. ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bi010589u>
- Chen, C.-C., Cheng, K.-J., Ko, T.-P., & Guo, R.-T. (2015). Current Progresses in Phytase Research : Three-Dimensional Structure and Protein Engineering. *ChemBioEng Reviews*, 2(2), 76-86. <https://doi.org/10.1002/cben.201400026>
- Cheryan, M., & Rackis, J. J. (1980). Phytic acid interactions in food systems. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 13(4), 297-335. <https://doi.org/10.1080/10408398009527293>

- Choi, Y. M., Suh, H. J., & Kim, J. M. (2001). *Purification and Properties of Extracellular Phytase from Bacillus sp. KHU-10*. 6.
- Chu, H.-M., Guo, R.-T., Lin, T.-W., Chou, C.-C., Shr, H.-L., Lai, H.-L., Tang, T.-Y., Cheng, K.-J., Selinger, B. L., & Wang, A. H.-J. (2004). Structures of *Selenomonas ruminantium* Phytase in Complex with Persulfated Phytate. *Structure*, 12(11), 2015-2024.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2004.08.010>
- Cosgrove, D. J. (1966). *The chemistry and biochemistry of inositol phosphates*.
<https://publications.csiro.au/rpr/pub?list=BRO&pid=procite:926bdd7a-0a17-44ef-9599-8024322d871c>
- Danilova, I., & Sharipova, M. (2020). The Practical Potential of Bacilli and Their Enzymes for Industrial Production. *Frontiers in Microbiology*, 11.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.01782>
- El-Toukhy, N. M. K., Youssef, A. S., & Mikhail, M. G. M. (2013). Isolation, purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* MJA. *African Journal of Biotechnology*, 12(20), 2957-2967. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.12304>
- Fu, S., Sun, J., Qian, L., & Li, Z. (2008a). *Bacillus* Phytases : Present Scenario and Future Perspectives. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(1), 1-8.
<https://doi.org/10.1007/s12010-008-8158-7>
- Fu, S., Sun, J., Qian, L., & Li, Z. (2008b). *Bacillus* Phytases : Present Scenario and Future Perspectives. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(1), 1-8.
<https://doi.org/10.1007/s12010-008-8158-7>
- Gessler, N. N., Serdyuk, E. G., Isakova, E. P., & Deryabina, Y. I. (2018). Phytases and the Prospects for Their Application (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54(4), 352-360. <https://doi.org/10.1134/S0003683818040087>
- Gibson, D. M., & Ullah, A. H. J. (1988). Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 260(2), 503-513. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90475-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90475-4)

- Gontia, I., & Tiwari, S. (2013). Molecular Characterization and Comparative Phylogenetic Analysis of Phytases from Fungi with Their Prospective Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 51, 313-326.
- Greiner, R., Larsson Alminger, M., Carlsson, N.-G., Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M. M., & Goyoaga, C. (2002). Pathway of Dephosphorylation of *myo*-Inositol Hexakisphosphate by Phytases of Legume Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6865-6870. <https://doi.org/10.1021/jf025620t>
- Greiner, R., Lim, B. L., Cheng, C., & Carlsson, N.-G. (2007). Pathway of phytate dephosphorylation by β -propeller phytases of different origins. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(4), 488-495. <https://doi.org/10.1139/W07-015>
- Greiner, R., Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M. M., & Goyoaga, C. (2001). Purification and Characterization of a Phytate-Degrading Enzyme from Germinated Faba Beans (*Vicia faba* Var. Alameda). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2234-2240. <https://doi.org/10.1021/jf0100806>
- Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M., & Zelder, O. (2005). Biotechnological production and applications of phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(5), 588-597. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0005-y>
- Jain, J., Kumar, A., Singh, D., & Singh, B. (2018). Purification and kinetics of a protease-resistant, neutral, and thermostable phytase from *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* JJBS250 ameliorating food nutrition. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 48(8), 718-724. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1487848>
- Jain, J., Sapna, & Singh, B. (2016). Characteristics and biotechnological applications of bacterial phytases. *Process Biochemistry*, 51(2), 159-169. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.12.004>
- Jia, Z., Lim, D., Golovan, S., & Forsberg, C. W. (2000). [No title found]. *Nature Structural Biology*, 7(2), 108-113. <https://doi.org/10.1038/72371>
- Jorquera, M., Martínez, O., Maruyama, F., Marschner, P., & de la Luz Mora, M. (2008). Current and Future Biotechnological Applications of Bacterial Phytases and Phytase-Producing Bacteria. *Microbes and Environments*, 23(3), 182-191. <https://doi.org/10.1264/jsme2.23.182>

- Kaur, R., Saxena, A., Sangwan, P., Yadav, A. N., Kumar, V., & Dhaliwal, H. S. (2017). Production and characterization of a neutral phytase of *Penicillium oxalicum* EUFR-3 isolated from Himalayan region. *Nusantara Bioscience*, *9*(1), 68-76.
<https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n090112>
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., & Apajalahti, J. (1998). Isolation, Characterization, Molecular Gene Cloning, and Sequencing of a Novel Phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(6), 2079-2085.
<https://doi.org/10.1128/AEM.64.6.2079-2085.1998>
- Kies, A. K., De Jonge, L. H., Kemme, P. A., & Jongbloed, A. W. (2006). Interaction between Protein, Phytate, and Microbial Phytase. In Vitro Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(5), 1753-1758. <https://doi.org/10.1021/jf0518554>
- Kim, Y.-O., Kim, H.-K., Bae, K.-S., Yu, J.-H., & Oh, T.-K. (1998). Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme and Microbial Technology*, *22*(1), 2-7.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00096-3](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00096-3)
- Konietzny, U., & Greiner, R. (2003). PHYTIC ACID | Nutritional Impact. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (p. 4555-4563). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00923-8>
- Konietzny, U., & Greiner, R. (2004). Bacterial phytase : Potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology*, *35*(1-2), 12-18.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000100002>
- Kumar, V., Singh, G., Sangwan, P., Verma, A. K., & Agrawal, S. (2014). Cloning, Sequencing, and *In Silico* Analysis of β -Propeller Phytase *Bacillus licheniformis* Strain PB-13. *Biotechnology Research International*, *2014*, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2014/841353>
- Kumar, V., & Sinha, A. K. (2018). General aspects of phytases. In *Enzymes in Human and Animal Nutrition* (p. 53-72). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00003-4>
- Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2010). Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition : A review. *Food Chemistry*, *120*(4), 945-959.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.052>

- Kumar, V., Yadav, A. N., Verma, P., Sangwan, P., Saxena, A., Kumar, K., & Singh, B. (2017). β -Propeller phytases : Diversity, catalytic attributes, current developments and potential biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *98*, 595-609. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.134>
- Lei, X. G., Porres, J. M., Mullaney, E. J., & Brinch-Pedersen, H. (2007). Phytase : Source, Structure and Application. In J. Polaina & A. P. MacCabe (Éds.), *Industrial Enzymes* (p. 505-529). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_29
- Madsen, C. K., & Brinch-Pedersen, H. (2019). Molecular Advances on Phytases in Barley and Wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(10), 2459. <https://doi.org/10.3390/ijms20102459>
- Mitchell, D. B., Vogel, K., Weimann, B. J., Pasamontes, L., & van Loon, A. P. G. M. (1997). The Phytase Subfamily of Histidine Acid Phosphatases : Isolation of Genes for Two Novel Phytases from the Fungi *Aspergillus Terreus* and *Myceliophthora Thermophila*. *Microbiology*, *143*(1), 245-252. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-1-245>
- Mullaney, E. J., & Ullah, A. H. J. (2003). The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *312*(1), 179-184. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.176>
- Nissar, J., Ahad, T., Hussain, S., & Naik, H. R. (2017). *A review phytic acid : As antinutrient or nutraceutical.*
- Oh, B.-C., Chang, B. S., Park, K.-H., Ha, N.-C., Kim, H.-K., Oh, B.-H., & Oh, T.-K. (2001). Calcium-Dependent Catalytic Activity of a Novel Phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. *Biochemistry*, *40*(32), 9669-9676. <https://doi.org/10.1021/bi010589u>
- Oh, B.-C., Kim, M. H., Yun, B.-S., Choi, W.-C., Park, S.-C., Bae, S.-C., & Oh, T.-K. (2006). Ca^{2+} -Inositol Phosphate Chelation Mediates the Substrate Specificity of β -Propeller Phytase. *Biochemistry*, *45*(31), 9531-9539. <https://doi.org/10.1021/bi0603118>
- Oh, B.-H., Ha, N.-C., Oh, B.-C., Shin, S., Kim, H.-J., Oh, T.-K., Kim, Y.-O., & Choi, K. Y. (2000). Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states. *Nature Structural Biology*, *7*(2), 147-153. <https://doi.org/10.1038/72421>

- POINTILLART, A. (1994a). Phytates, phytases : Leur importance dans l'alimentation des monogastriques. *INRA Productions Animales*, 7(1), 29-39.
- POINTILLART, A. (1994b). Phytates, phytases : Leur importance dans l'alimentation des monogastriques. *INRA Productions Animales*, 7(1), 29-39.
- Rabbee, M. F., Ali, Md. S., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. (2019). *Bacillus velezensis* : A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. *Molecules*, 24(6), 1046. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Raboy, V. (2009). Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. *Plant Science*, 177(4), 281-296. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.012>
- Rao, D. E. C. S., Rao, K. V., Reddy, T. P., & Reddy, V. D. (2009). Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases : An overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(2), 182-198. <https://doi.org/10.1080/07388550902919571>
- Reddy, N. R., Sathe, S. K., & Salunkhe, D. K. (1982). Phytates in Legumes and Cereals. In *Advances in Food Research* (Vol. 28, p. 1-92). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60110-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60110-X)
- Rey, M. W., Ramaiya, P., Nelson, B. A., Brody-Karpin, S. D., Zaretsky, E. J., Tang, M., de Leon, A. L., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I. G., Olsen, P. B., Rasmussen, M. D., Andersen, J. T., Jørgensen, P. L., Larsen, T. S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., ... Berka, R. M. (2004). Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biology*, 5(10), r77. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r77>
- Sandberg, A.-S., & Andlid, T. (2002). Phytogetic and microbial phytases in human nutrition. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(7), 823-833. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00641.x>
- SAUVEUR, B. (1989). Phosphore phytique et phytases dans l'alimentation des volailles. *INRA Productions Animales*, 2(5), 343-351.

- Secco, D., Bouain, N., Rouached, A., Prom-u-thai, C., Hanin, M., Pandey, A. K., & Rouached, H. (2017). Phosphate, phytate and phytases in plants : From fundamental knowledge gained in Arabidopsis to potential biotechnological applications in wheat. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(7), 898-910. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1268089>
- Shahidi, F. (Éd.). (1997). *Antinutrients and Phytochemicals in Food* (Vol. 662). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-1997-0662>
- Sharma, A., & Trivedi, S. (2015). Evaluation of *in vitro* probiotic potential of phytase-producing bacterial strain as a new probiotic candidate. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(2), 507-514. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12697>
- Singh, B., Boukhris, I., Pragya, Kumar, V., Yadav, A. N., Farhat-Khemakhem, A., Kumar, A., Singh, D., Blibech, M., Chouayekh, H., & Alghamdi, O. A. (2020). Contribution of microbial phytases to the improvement of plant growth and nutrition : A review. *Pedosphere*, 30(3), 295-313. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(20\)60010-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60010-8)
- Singh, B., & Satyanarayana, T. (2011). Phytases from thermophilic molds : Their production, characteristics and multifarious applications. *Process Biochemistry*, 46(7), 1391-1398. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.03.009>
- Singh, B., & Satyanarayana, T. (2015a). Fungal phytases : Characteristics and amelioration of nutritional quality and growth of non-ruminants. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(4), 646-660. <https://doi.org/10.1111/jpn.12236>
- Singh, B., & Satyanarayana, T. (2015b). Fungal phytases : Characteristics and amelioration of nutritional quality and growth of non-ruminants. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(4), 646-660. <https://doi.org/10.1111/jpn.12236>
- Takeda, E., Taketani, Y., Sawada, N., Sato, T., & Yamamoto, H. (2004). The regulation and function of phosphate in the human body. *BioFactors*, 21(1-4), 345-355. <https://doi.org/10.1002/biof.552210167>
- Van Etten, R. L., Davidson, R., Stevis, P. E., MacArthur, H., & Moore, D. L. (1991). Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 266(4), 2313-2319. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)52245-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)52245-6)

- Vats, P., & Banerjee, U. C. (2004). Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases) : An overview. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(1), 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.010>
- Vohra, A., & Satyanarayana, T. (2003). Phytases : Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(1), 29-60. <https://doi.org/10.1080/713609297>
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Rémy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M., & van Loon, A. P. G. M. (1999). Biochemical Characterization of Fungal Phytases (myo - Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases) : Catalytic Properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 367-373. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.2.367-373.1999>
- Yao, M.-Z., Zhang, Y.-H., Lu, W.-L., Hu, M.-Q., Wang, W., & Liang, A.-H. (2012). Phytases : Crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications: Engineering and application of phytase. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 1-14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05181.x>
- Zeng, Y.-F., Ko, T.-P., Lai, H.-L., Cheng, Y.-S., Wu, T.-H., Ma, Y., Chen, C.-C., Yang, C.-S., Cheng, K.-J., Huang, C.-H., Guo, R.-T., & Liu, J.-R. (2011). Crystal Structures of Bacillus Alkaline Phytase in Complex with Divalent Metal ions and Inositol Hexasulfate. *Journal of Molecular Biology*, 409(2), 214-224. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.03.063>
- Zhao, T., Yong, X., Zhao, Z., Dolce, V., Li, Y., & Curcio, R. (2021). Research status of Bacillus phytase. *3 Biotech*, 11(9), 415. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02964-9>

Annexes

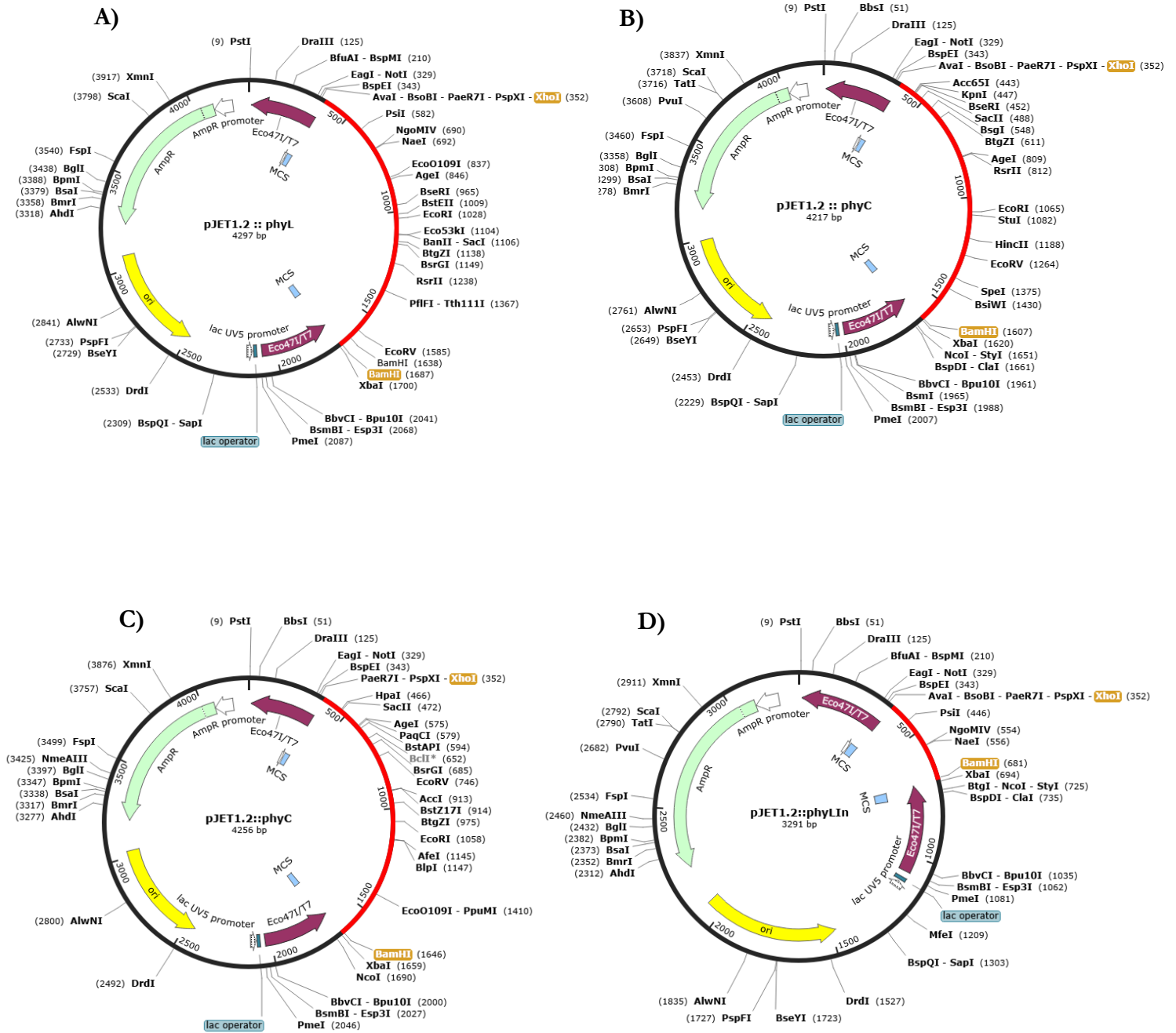


Figure 27 : La carte de restriction des constructions plasmidiques élaborés au cours de cette étude

A)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	phytase [Bacillus licheniformis]	Bacillus licheniformis	244	244	36%	8e-74	100.00%	381	WP_073426178.1
<input checked="" type="checkbox"/>	phytase [Bacillus licheniformis]	Bacillus licheniformis	243	243	36%	3e-73	99.27%	381	WP_144582372.1
<input checked="" type="checkbox"/>	phytase [Bacillus]	Bacillus	243	243	36%	4e-73	99.27%	381	WP_011197542.1
<input checked="" type="checkbox"/>	phytase [Bacillus licheniformis]	Bacillus licheniformis	241	241	36%	1e-72	99.27%	381	WP_044821576.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PhyL [Bacillus licheniformis]	Bacillus licheniformis	241	241	36%	1e-72	99.27%	381	AAT73627.1
<input checked="" type="checkbox"/>	phytase [Bacillus licheniformis]	Bacillus licheniformis	241	241	36%	1e-72	99.27%	381	WP_144564738.1

B)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus velezensis strain EN01 chromosome_complete genome	Bacillus velezensis	278	278	23%	1e-69	95.48%	4029600	CP053377.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus amyloliquefaciens strain WF02 chromosome_complete genome	Bacillus amyloliquefaciens	278	278	23%	1e-69	95.48%	4026648	CP053376.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus velezensis strain BY6 chromosome_complete genome	Bacillus velezensis	278	278	23%	1e-69	95.48%	3898273	CP051011.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus velezensis strain LPL061 chromosome_complete genome	Bacillus velezensis	278	278	23%	1e-69	95.48%	3907268	CP042271.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus velezensis strain FJAT-45028 chromosome_complete genome	Bacillus velezensis	278	278	23%	1e-69	95.48%	3986791	CP047157.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus amyloliquefaciens strain DH8030 chromosome_complete genome	Bacillus amyloliquefaciens	278	278	23%	1e-69	95.48%	3993985	CP041770.1

C)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Phytase [Bacillus subtilis QB928]	Bacillus subtilis QB928	281	350	81%	1e-88	69.85%	399	AFQ57925.1
<input checked="" type="checkbox"/>	phytase [Bacillus subtilis]	Bacillus subtilis	251	321	75%	2e-77	68.98%	382	WP_113712838.1
<input checked="" type="checkbox"/>	phytase [Bacillus subtilis]	Bacillus subtilis	251	321	75%	2e-77	68.57%	382	WP_123373177.1
<input checked="" type="checkbox"/>	phytase [Bacillus]	Bacillus	251	321	75%	2e-77	68.98%	382	WP_015251871.1
<input checked="" type="checkbox"/>	phytase [Bacillus subtilis]	Bacillus subtilis	251	320	75%	2e-77	68.98%	382	WP_192857790.1
<input checked="" type="checkbox"/>	phytase [Bacillus subtilis]	Bacillus subtilis	251	322	75%	3e-77	68.98%	382	WP_129133995.1

D)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Phytase [Bacillus subtilis QB928]	Bacillus subtilis QB928	353	353	73%	4e-117	86.44%	399	AFQ57925.1
<input checked="" type="checkbox"/>	phytase [Bacillus subtilis]	Bacillus subtilis	329	329	68%	8e-108	87.67%	382	WP_128441669.1
<input checked="" type="checkbox"/>	phytase [Bacillus subtilis]	Bacillus subtilis	329	329	68%	9e-108	87.67%	382	WP_032726004.1
<input checked="" type="checkbox"/>	phytase [Bacillus subtilis]	Bacillus subtilis	329	329	68%	1e-107	87.67%	382	WP_221776816.1
<input checked="" type="checkbox"/>	phytase [Bacillus subtilis]	Bacillus subtilis	329	329	68%	1e-107	87.67%	382	WP_015483350.1
<input checked="" type="checkbox"/>	phytase [Bacillus subtilis]	Bacillus subtilis	329	329	68%	1e-107	87.67%	382	WP_015383902.1

Figure 28 : Résultats de l'alignement dans l'outil BLASTn.

A : pAL1 ; B : pAL2 ; C : pAL3 ; D : pALA

A)

pAL1	1	-----MPNGGDKGKIVDRAG	15
		.	
AAU22048.2	201	RSFKMSSQTEGLAADDEYGKMYIAEEDAIIWSFSAEPNGGDKGKIVDRAG	250
pAL1	16	GPHLTADIEGLTIYYGEDGEGYLIASSQGDNRyaiYDRRGKNDYVDFSI	65
AAU22048.2	251	GPHLTADIEGLTIYYGEDGEGYLIASSQGDNRyaiYDRRGKNDYVADFSI	300
pAL1	66	DDGKEIDGTSDDTDGIDVIGFGLGKKYPYGFVAQDGENTENGQPANQNFK	115
AAU22048.2	301	DDGKEIDGTSDDTDGIDVIGFGLGKKYPYGFVAQDGENTENGQPANQNFK	350
pAL1	116	IVSWEKIADALDDKPDIDDQVNPRLKLRKAK	146
AAU22048.2	351	IVSWEKIADALDDKPDIDDQVNPRLKLRKAK	381

B)

pAL3	1	MKVSKTMLLSTAAGLLSLTATSVSahyvDEEHHFKVTAHTETDPVASGD	50
		.	
NP_389861.1	1	MKVPKTMLLSTAAGLLSLTATSVSahyvNEEHHFKVTAHTETDPVASGD	50
pAL3	51	DAADDPaiwVHEKHPEKSKLITTNKksGLVYDLGKQLHSYefGKLNMV	100
NP_389861.1	51	DAADDPaiwVHEKHPEKSKLITTNKksGLVYDLGKQLHSYefGKLNMV	100
pAL3	101	DLRYDFPLNGGKIDIAAASNRSEGKNTIEVYaidGDKGKLSITDPN---	147
NP_389861.1	101	DLRYDFPLNGEKIDIAAASNRSEGKNTIEVYaidGDKGKLSITDPNHPI	150

C)

pAL4	1	MKVSKTMLLSTAAGLLSLTATSVSahyvNEEHHFKVTAHTETDPVASGD	50
		.	
NP_389861.1	1	MKVPKTMLLSTAAGLLSLTATSVSahyvNEEHHFKVTAHTETDPVASGD	50
pAL4	51	DAADDPaiwVHEKHPEKSKLITTNKksGLVYDLGKQLHSYefGKLNMV	100
NP_389861.1	51	DAADDPaiwVHEKHPEKSKLITTNKksGLVYDLGKQLHSYefGKLNMV	100
pAL4	101	DLRYDFPLNGGKIDIAAASNRSEGKNTIEVYaidGDKGKLSITDPN---	147
NP_389861.1	101	DLRYDFPLNGEKIDIAAASNRSEGKNTIEVYaidGDKGKLSITDPNHPI	150

Figure 29 : Résultats de l'alignement par paire de la séquence protéique du clone pAL1 (A), pAL3 (B) et pAL4 (C) avec celle de la souche d'origine en utilisant l'outil EMBOSS Ndedee

