

Biologie Moléculaire ?

Etude des gènes portant l'information génétique et leurs transformations

Que faut il étudier ?

- Les complexes macromoléculaires de l'ADN, de l'ARN et des protéines
- Transfert de l'information: Réplication, Transcription, Traduction

Comment a-t-on pu procéder à ces études ?

Grâce à la technologie de l'ADN recombiné ou génie génétique, qui permet :

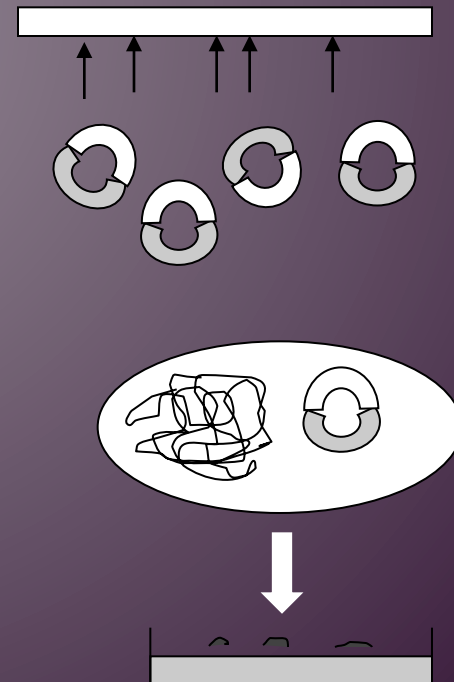
- de prélever un fragment spécifique d'ADN
- de manipuler ce fragment dans un tube à essai
- de le remettre dans un organisme (le même ou un autre)

Production de fragments d'ADN

Liaison de ces fragments à un support moléculaire
(= vecteur)

Introduction du vecteur dans une cellule hôte
pour en faire de multiples copies (= pour
l'amplifier)

Sélection du fragment que l'on veut étudier



Ex. de découvertes réalisées grâce aux bactéries:

- Recombinaison intra-génique ;
- Réplication de l'ADN ;
- Code génétique ;
- Régulation (opéron) ;
- Enzymes de Biologie Moléculaire : Enzymes de restriction, Ligases, Polymérases (ADN et ARN), Polymérases thermostables (PCR), etc..

Quelles sont les conséquences du développement de la biologie moléculaire ?

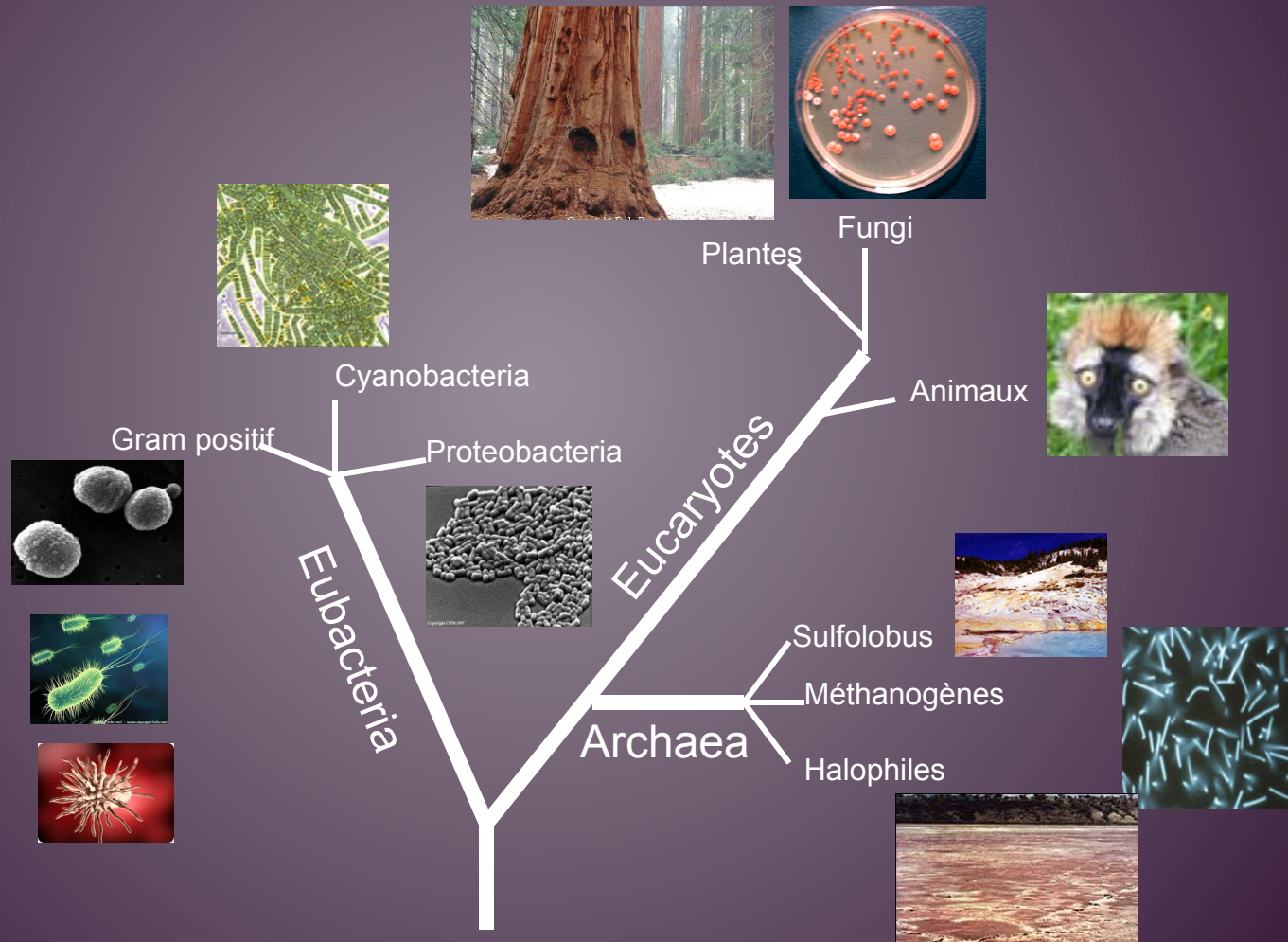
- des connaissances dans le domaine fondamental
- des applications pratiques :
 - production de protéines d'intérêt médical
 - vaccins
 - diagnostic en médecine
 - plantes et animaux transgéniques...

PLAN

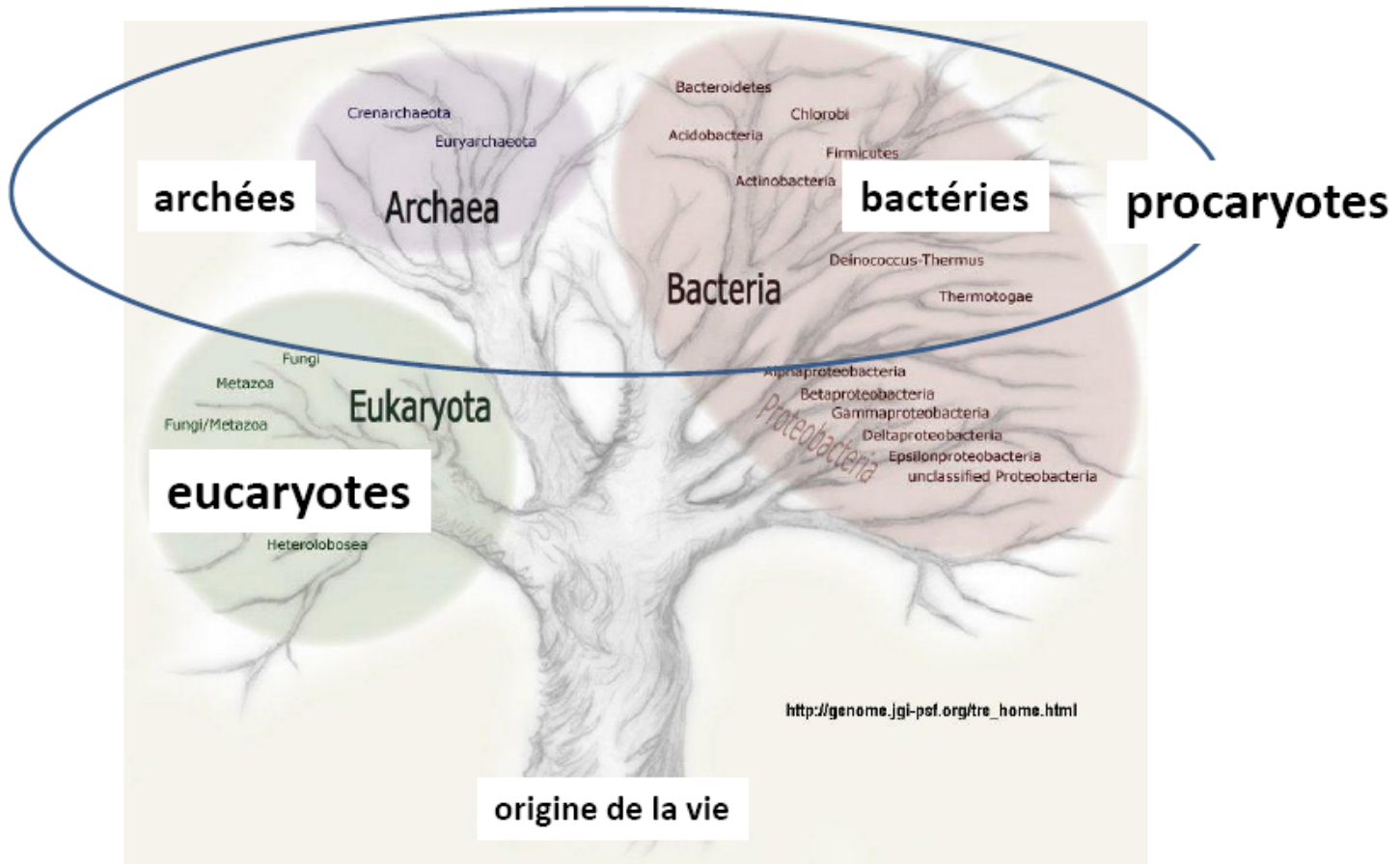
- Introduction
- Transmission d'information
- Expression génétique et régulation

I- Introduction

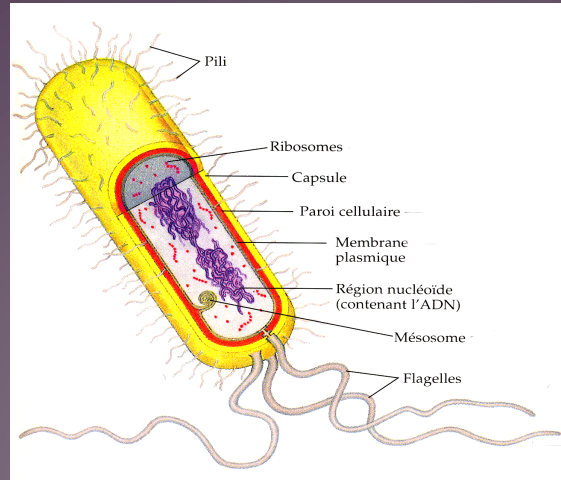
Les 3 domaines du vivant



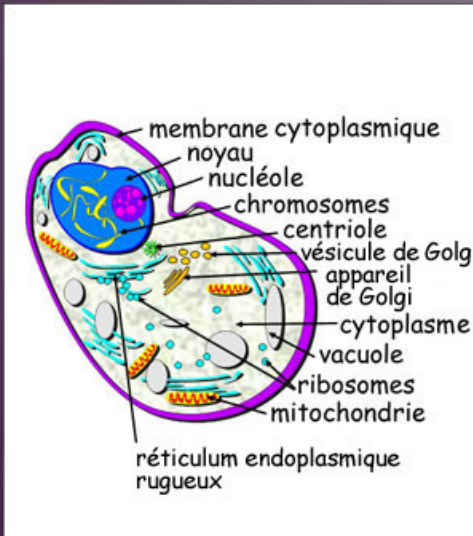
Les 3 domaines du vivant



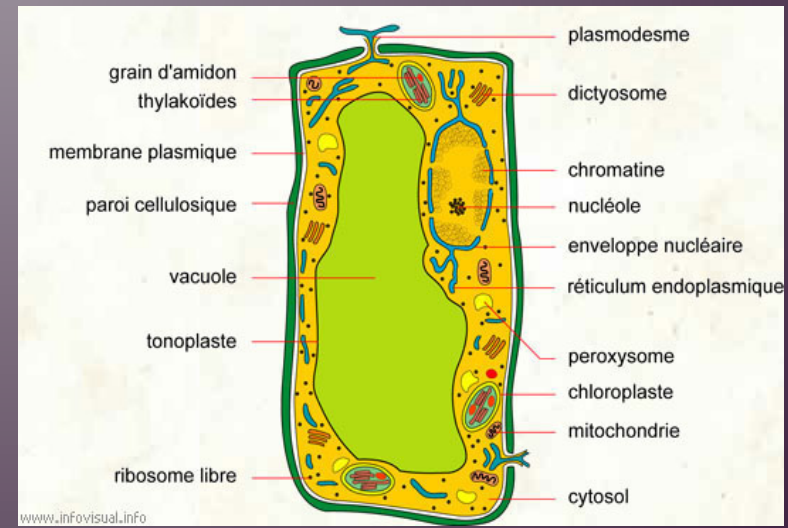
PROCARYOTE



Bactérie



Cellule animale



Cellule végétale

EUCARYOTE

Procaryotes ou Bactéries

Deux grands groupes, les eubactéries et les archaebactéries avec des fonctionnements différents au niveau moléculaire mais une organisation similaire

Structure:

- ❖ Petite taille généralement (avec des exceptions)
- ❖ Leur structure est très simple, le plus souvent sans cytosquelette ni réseau de membrane interne
- ❖ Présence d'une **paroi** complexe
- ❖ Dans le cytoplasme, il y a présence des ribosomes et d'une masse "plus claire", le **nucléotide** qui contient l'ADN sous forme d'un ou quelques chromosomes (svt circulaire)

Procaryotes ou Bactéries

Division binaire:

➤ Par **scissiparité** (fission binaire): 1 cellule donne par division 2 cellules filles génétiquement identiques (notion de clone)

➤ Pas d'individualisation de chromosomes visibles en cytologie à aucun moment de leur cycle de vie

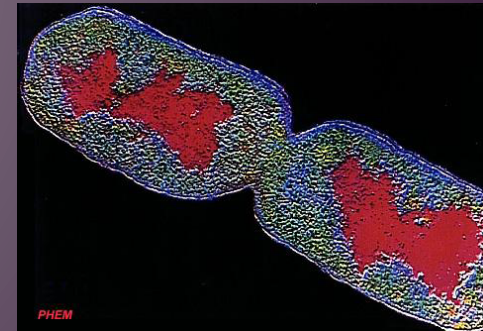
➤ Multiplication **exponentielle**:

$$X_n = 2^n X_0$$

X_0 : nombre de cellules au départ

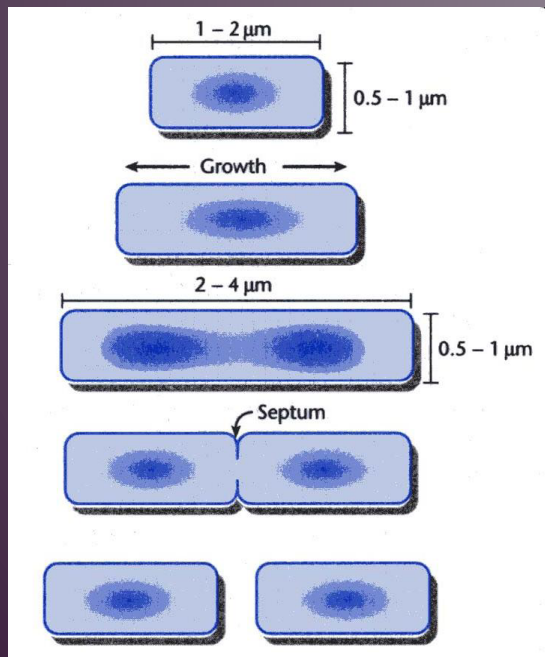
X_n : nombre de cellules obtenues à un temps donné

n : nombre de divisions ou de générations



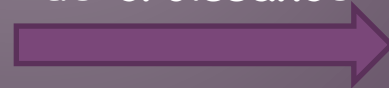
- Temps de Génération : 20 min (*E.coli*) dans des conditions optimales à quelques heures
- Taux de croissance : 2 divisions / h ou moins
- Echange génétique se fait par **transferts horizontaux** (transformation, conjugaison, transduction...)

0 min



cellule mère

18 heures
de croissance



10^9 bactéries/ ml

2 cellules filles
identiques

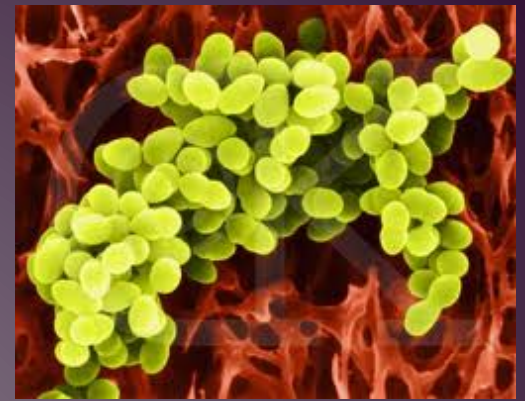
20-30 min

Grande complexité de métabolisme et de fonctionnement au niveau moléculaire

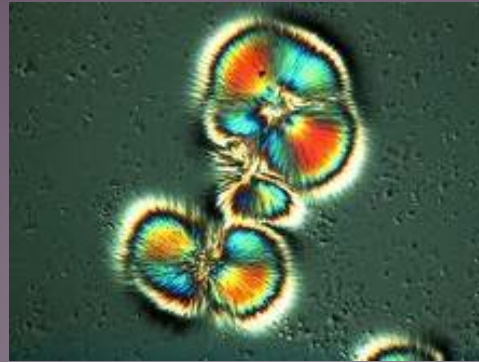
- Très diversifiées et présentes dans **TOUS** les milieux et Biotopes
- Adaptation rapide à diverses conditions et divers environnements (mers froides, sources thermales)
- Des plus dangereuses (pathogènes) au plus utiles et exploitables: **Biotechnologies**



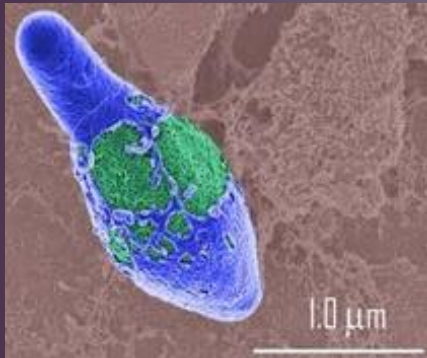
Escherichia Coli



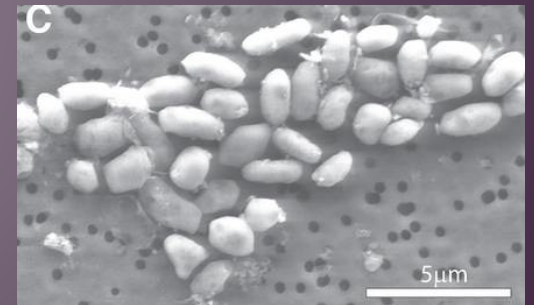
Legionella sp



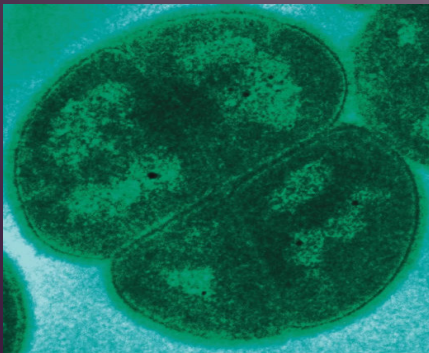
Bactérie du desert



Clostridium botulinum



GFAJ-1 (arsenic)
sédiments du lac Mono
en Californie



Deinococcus radiodurans



Lactococcus lactis

Les éléments génétiques dans une cellule

1- Le chromosome (unique et circulaire en générale) porte les gènes essentiels à la croissance

2- Les éléments génétiques non chromosomiques, principaux processus d'évolution rapide des bactéries

- Les plasmides
- Les transposons
- Les virus
- Le génome des organelles

II Transmission de l'information génétique

Forme la plus connue de transfert :

Recombinaison génétique: échange physique de gènes entre les éléments génétiques (chromosome, plasmide..)



Recombinaison homologue : échange réciproque entre une paire de séquence homologue d'ADN entre cellule donneuse et receveuse

Trois principaux mécanismes d'échange génétique chez les bactéries

1- Transformation

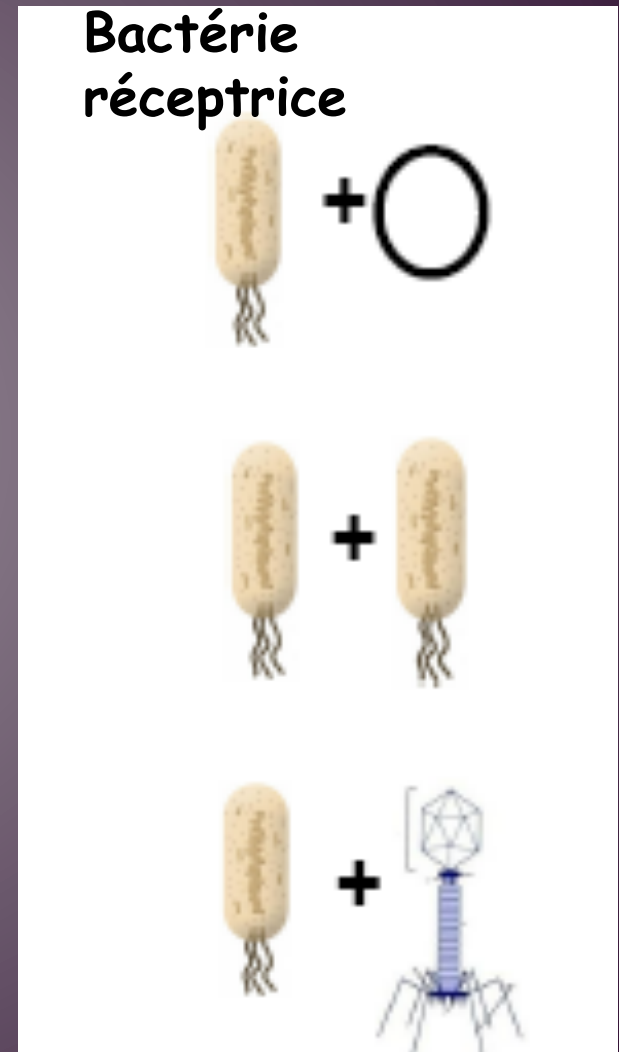
Bactérie + ADN libre

2- Conjugaison

Bactérie + bactérie

3- Transduction

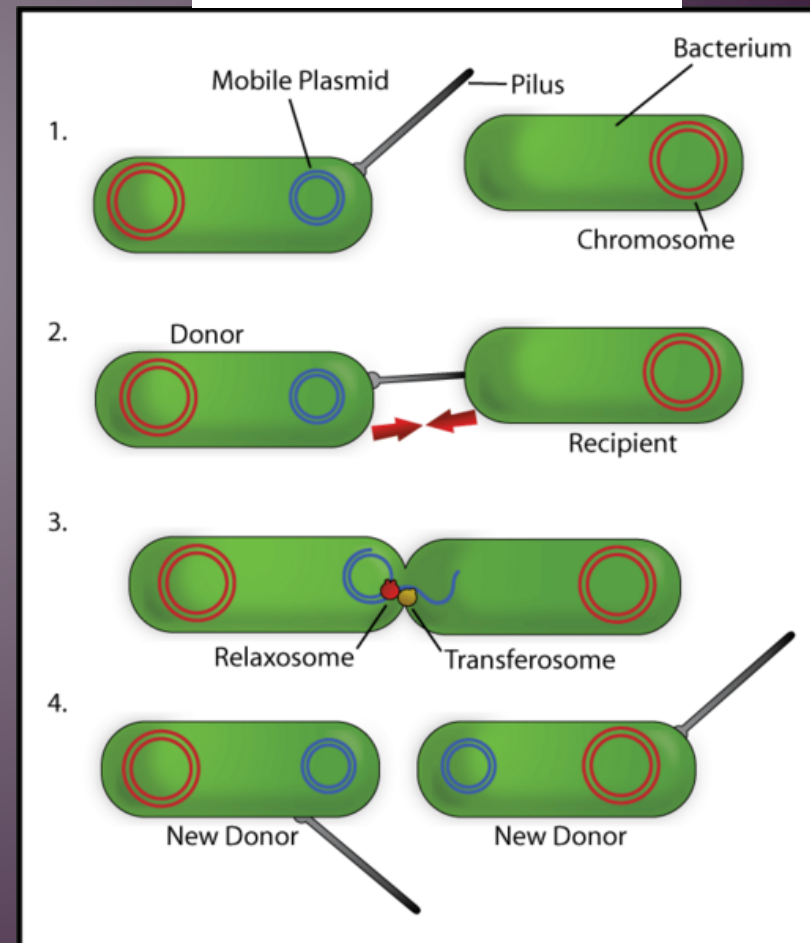
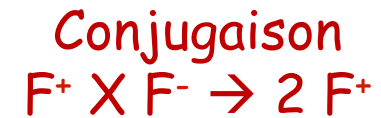
Bactérie + bactériophage



Transferts d'ADN par conjugaison

Le transfert entre les organismes donneur et accepteur de plasmide se fait en 4 grandes étapes :

- 1- **Reconnaissance** entre donneur (F⁺) et accepteur (F⁻) grâce à la synthèse du pili (tube creux)
- 2- **Transfert** d'un des deux brins du plasmide
- 3- **Synthèse** du brin complémentaire chez l'accepteur
- 4- **Re circulation** du plasmide chez l'accepteur



Objectifs du cours :

- Définir un plasmide ?
- Préciser les propriétés biologiques codées par les plasmides ?
- Les conséquences médicales de ce type de transfert ?
- définir la transposition et le transposon ?

I- Introduction générale

II- Transmission de l'information

A- Les Plasmides

I- Généralités

II- Méthodes d'étude: extraction, purification et curage des plasmides (TD)

III- Propriétés des plasmides

IV- Différents types de plasmides et rôles biologiques

V- Expression et régulation

VI- Utilisation des plasmides

B- Les transposons

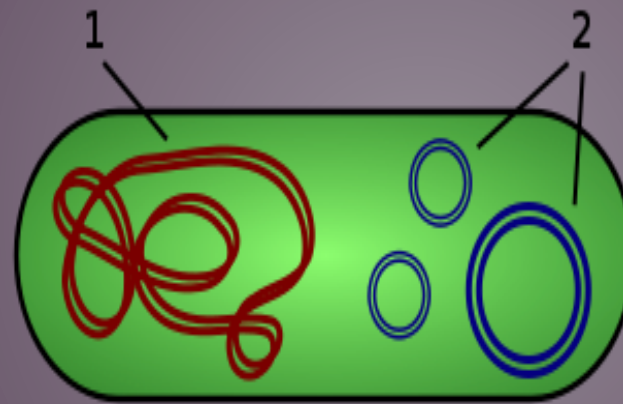
A- Les Plasmides

A- Les Plasmides

I- Généralités

Chromosome
bactérien circulaire
4millions pb

Plasmides
Milliers pb



Bactérie

En général circulaire, le nombre de copies par cellule peut varier de 1 à quelques centaines.

1- Définition:

➤ Molécules d'ADN **double brin libres** le plus souvent **circulaire**, à localisation **extra-chromosomique**, à capacité de **réplication autonome** et procure un **avantage sélectif**.

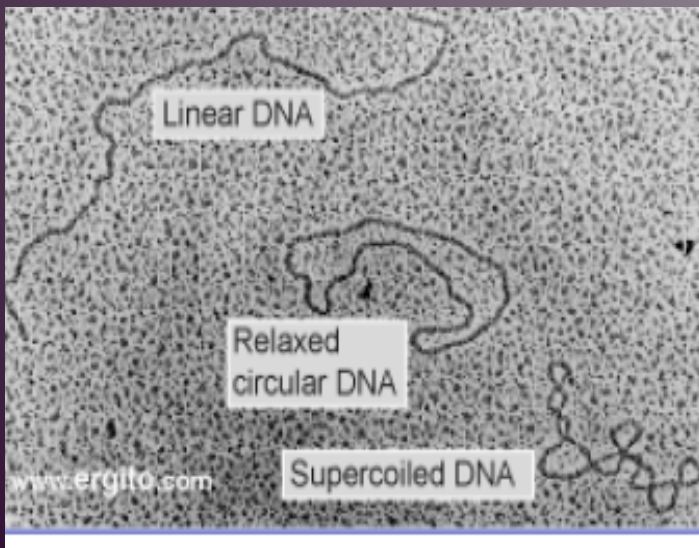
2- Caractéristiques générales:

- Ils sont **porteurs de gènes non essentiels** mais **utiles** et donc non indispensables au métabolisme normal de la cellule hôte.
- Leur **transmission naturelle** au cours des divisions cellulaires est stable et se fait habituellement par **conjugaison**.
- Ils possèdent plusieurs propriétés conférant aux bactéries une meilleure **adaptation à l'environnement**.

3- Structure et organisation:

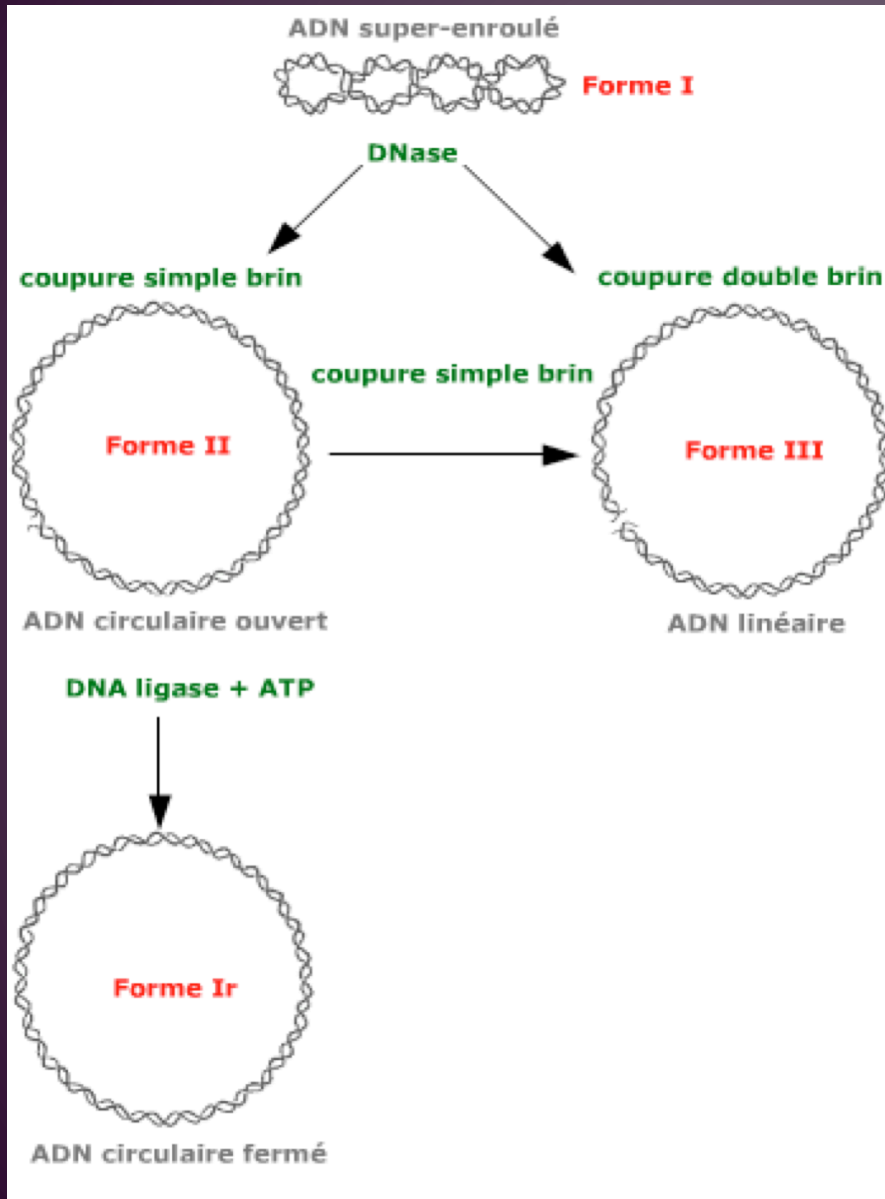
Présents chez la plupart des espèces bactériennes:

- Tailles très variables entre 1Kb à 1 mégabase (généralement inférieures à 5% de celle du chromosome)
- ADN double brin Superhélicale avec 3 formes:



- Confèrent à la bactérie-hôte une grande souplesse génétique.
- Augmentent son patrimoine génétique

Différentes formes des plasmides



Forme I: CCC: Circular

Covalently Closed

(circulaire, covalemment fermé)

Forme II: OC: Open

Circular (circulaire relâché, un des 2 brins coupé)

Forme III: Linéaire

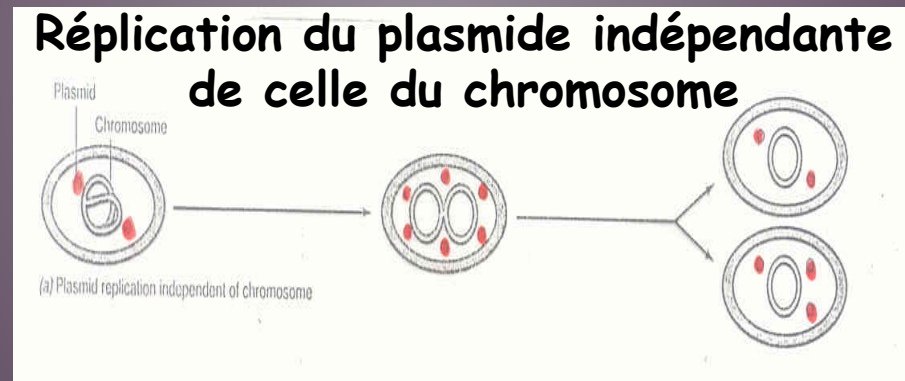
(2 brins coupés)

II- Méthodes d'études des plasmides : TD

III- Propriétés des plasmides:

Les plasmides sont des associations modulaires de gènes regroupés en unités fonctionnelles.

- 1/ Ils comportent une zone obligatoire de réplication: Origine de réplication



>>> Petit nombre de copies / cellule (1 à 3) = Plasmide Stringent /
Réplication stringente.

>>> Grand nombre de copies / cellule (20 à 2000) = Plasmide relâché /
Réplication relâchée

III- Propriétés des plasmides:

- 2/ Ils peuvent comporter aussi:
 - Une région de transfert (opéron *tra*) chez les plasmides conjugatifs codant pour: pili et protéines de conjugaison
 - Des éléments génétiques mobiles ou non (IS, Tn, Int)
 - Gènes divers (résistance aux antibiotiques, etc...)



- 1: Gène codant la résistance à un antibiotique
- 2: Gènes de transfert (opéron Tra)
- 3: Origine de réplication

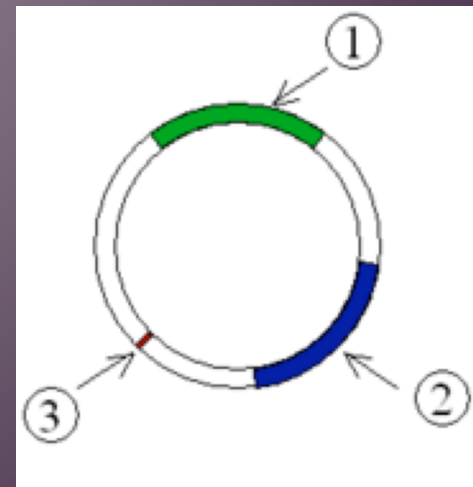


Schéma d'un plasmide

IV- Type de plasmides et rôles biologiques

➤ Plasmides cryptiques: aucun rôle connu

➤ Les plasmides peuvent coder pour diverses fonctions

Quelques plasmides célèbres:

◆ **Facteur R:** Plasmides de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds (conjugatifs le plus souvent)

◆ **Facteur F: (Rôle de fertilité)** gros plasmide conjugatif à petit nombre de copies, conférant la capacité de synthèse de Pili sexuels chez la bactérie dite F+ ou Hfr par rapport à F-

Rappel: Facteur F peut être soit

- absent des cellules (F-) ou

- présent sous 2 états possibles

» Autonome et indépendant du chromosome (cellules F+)

» Intégré dans le chromosome bactérien (cellule HFR)

◆ **pBR322:** Vecteur de clonage très utilisé aux premiers temps du clonage et du génie génétique

V- Expression génétique et régulation:

Gènes codant différentes fonctions

1- Les gènes impliqués dans la réplication

2- Les gènes de transfert: Plasmides conjugatifs

3- Les gènes conférant des propriétés supplémentaires à la cellule hôte

V 1- Les gènes impliqués dans la réplication :

La fonction ori : c'est l'origine de la réplication (initiation), elle est responsable du **contrôle du nombre de copies** d'un **même plasmide** présent dans une bactérie.



Ce système de régulation est à l'origine du phénomène d'incompatibilité

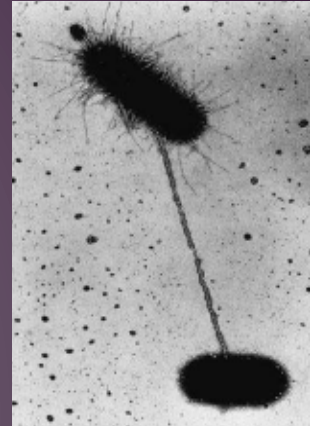
➤ Des plasmides **incompatibles** ne peuvent coexister dans la même cellule, car leur réplication est soumise au même système de régulation donc

»» ils sont fortement apparentés structurellement d'où présence de **fortes homologues ADN/ADN**

➤ Ces plasmides sont ainsi classés en groupe d'incompatibilité ou **groupe Inc.**

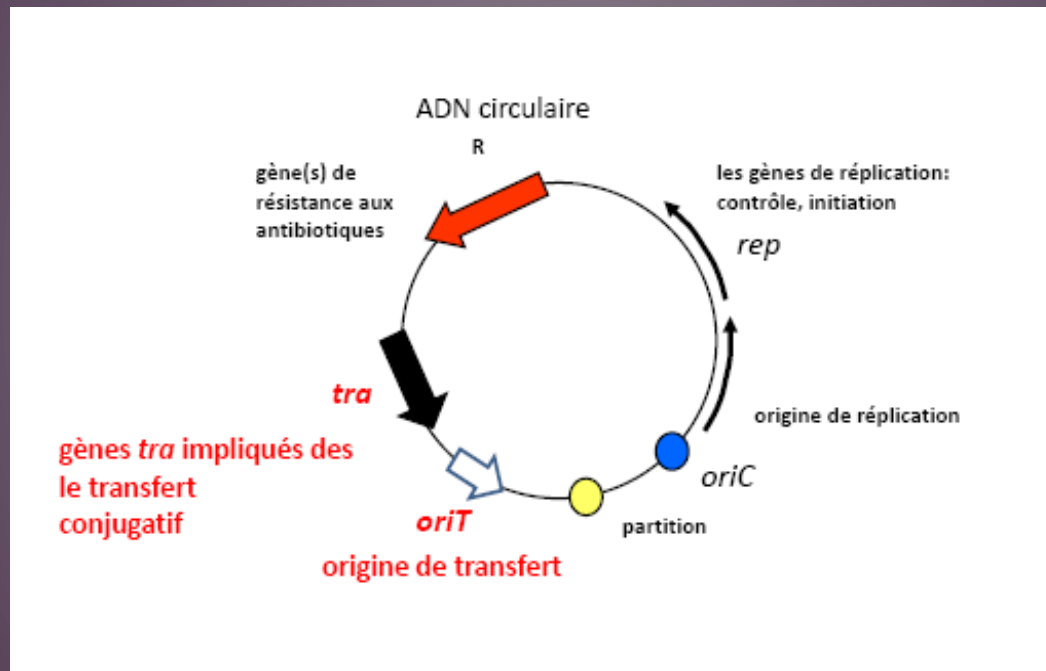
V 2- Les gènes de transfert, Plasmides conjugatifs:

- Un plasmide conjugatif est autotransférable d'une bactérie mâle à une autre femelle par conjugaison.
- Sa taille est supérieure à 30 kb,
Ex: chez Escherichia coli >> 90 kb , dont 30 à 50 kb pour les gènes nécessaires au transfert conjugatif.
- Ces plasmides sont en faible nombre de copies de 1 à 3 par cellule.



L'ensemble des gènes nécessaires à la conjugaison est organisé en un opéron *tra* codant pour les pili sexuels et les protéines de conjugaison

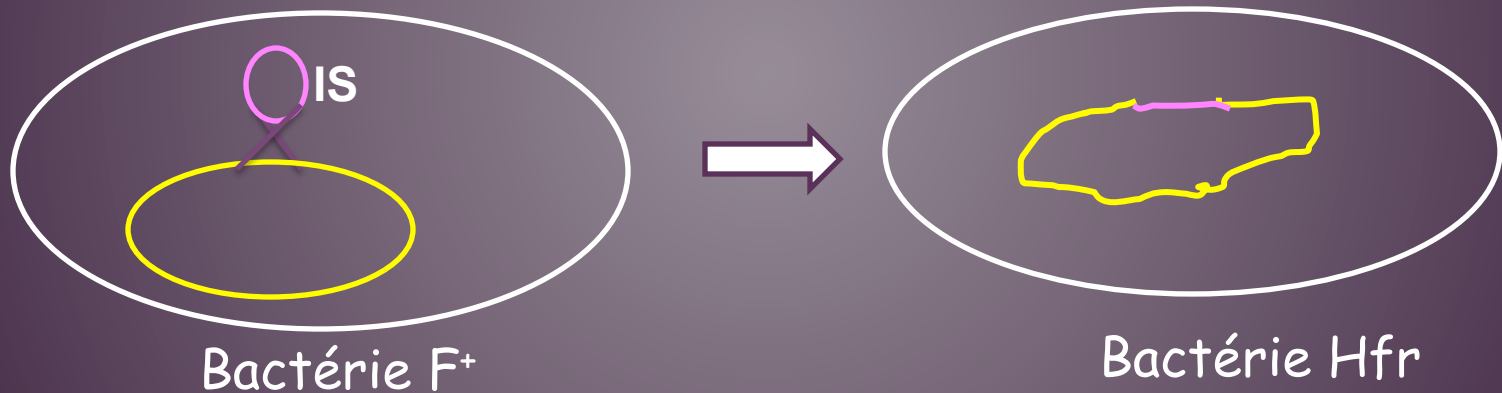
Principaux éléments des plasmides conjugatifs



Rôle très important dans la dissémination de l'information génétique et particulièrement des gènes de résistance aux antibiotiques.

Bactérie Hfr (Haute fréquence de recombinaison)

Grace à la présence des séquences IS (Insertion séquences), le facteur F peut s'intégrer dans le chromosome d'une bactérie F⁺, appelés **épisomes**, donc leur réplication est sous le contrôle du chromosome.



En effet, les séquences IS du plasmide F ont des séquences homologues sur le chromosome. L'insertion se fait par recombinaison site spécifique.

Conjugaison entre bactérie Hfr et bactérie F-

Synthèse des pili sexuels

traA, traL, traE, traK, traB, traV, traC, traW, traU, traF, traQ, TraH, traG

Exclusion de surface

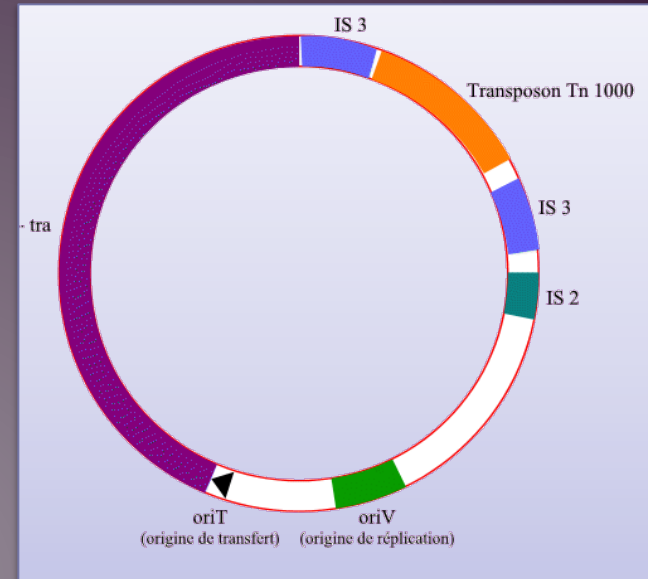
traS, traT

Transfert de l'ADN

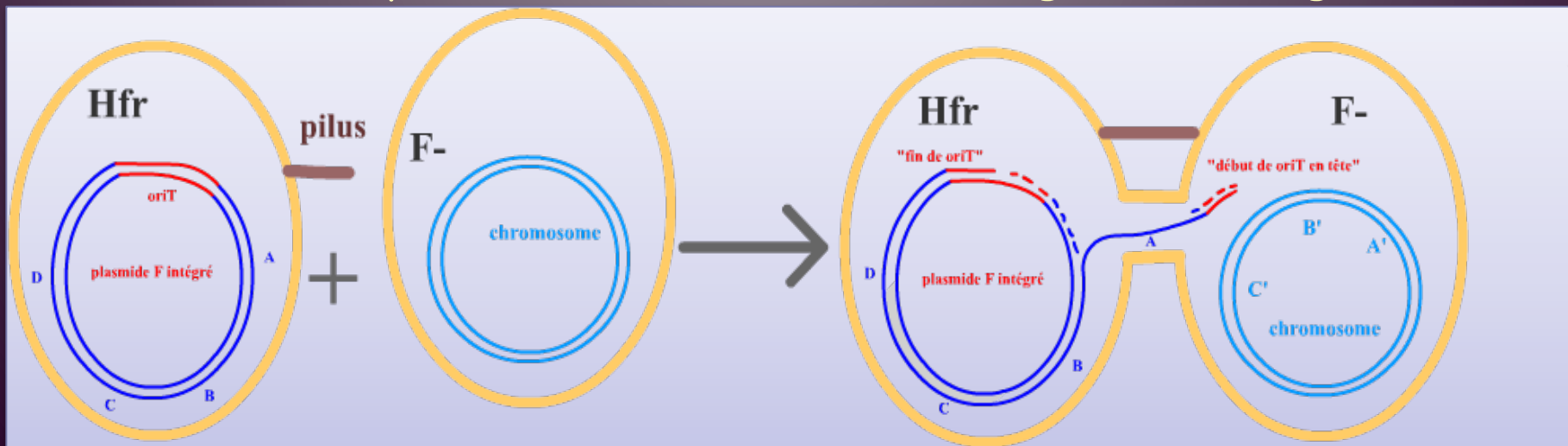
traM, traY, traD, traI, traZ

Régulation

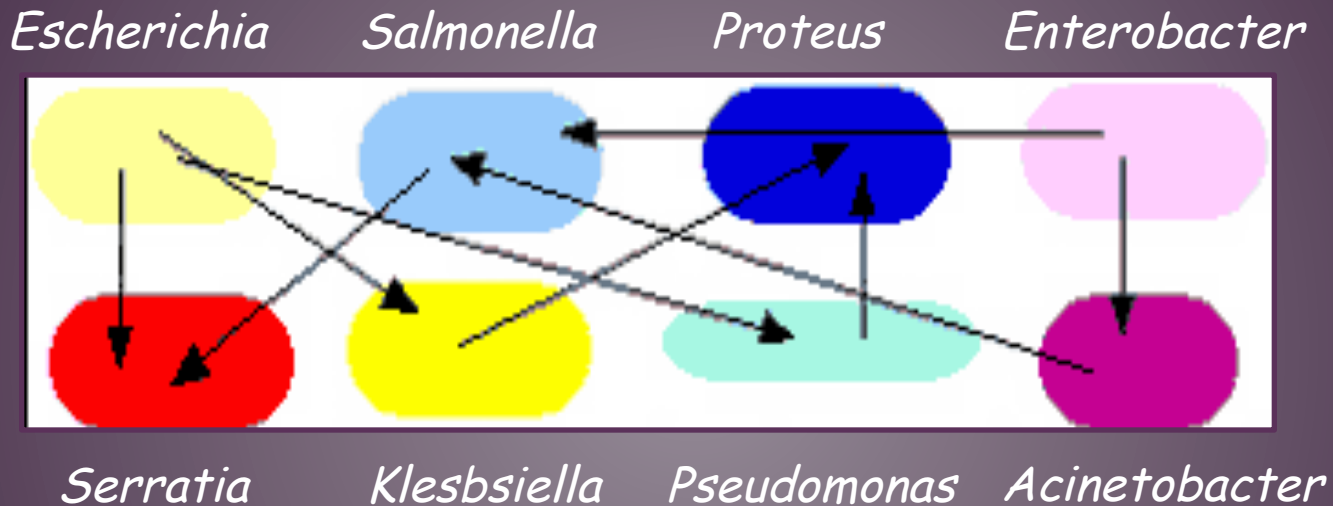
finP, finO, traJ



Dans ce cas, le plasmide peut mobiliser le transfert de l'ADN chromosomique d'une cellule vers une autre et être incorporé dans le chromosome par recombinaison entre les régions homologues.



Plasmides conjugatifs: Diffusion plasmidique au sein de la même espèce ou entre divers groupes



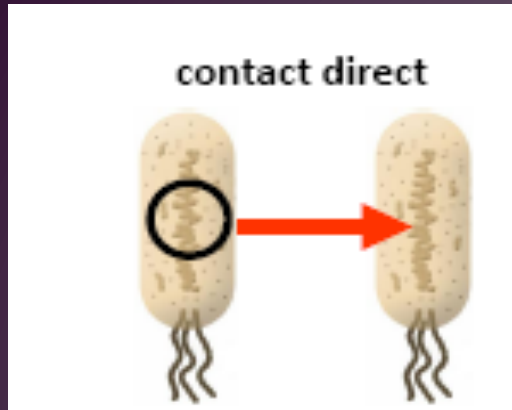
Transférables dans une large gamme d'hôtes

- intra spécifique (même espèce)
- intra générique (entre espèces)
- inter générique (phylogénétiquement différentes)

Notions importantes à retenir sur le transfert conjugatif du plasmide

- Contact direct entre les cellules est indispensable
- Transfert est orienté
 - Commence toujours en un point fixe (*OriT*)
 - Unidirectionnel: du donneur vers le receveur
- Transfert accompagné par la réplication de l'ADN transféré
- Suite au transfert
 - Le donneur garde sa copie du F
 - Le receveur est transformé en « mâle » car il porte une nouvelle copie du F
- Aucun transfert des gènes chromosomiques par le biais du plasmide F libre

Plasmide conjugatif



Transfert

Plasmide non conjugatif



Pas de transfert

Plasmides non conjugatifs

- Ne sont pas autotransférables.
- Taille plus petite de 1 à 70 kb, souvent cryptiques, et en grand nombre de copies (> 10), du fait d'un contrôle relâché de leur réplication.
- Transférés à une autre bactérie par deux autres mécanismes de transfert : la transduction et mobilisation grâce à la présence d'un plasmide "mobilisateur".

V 3- Gènes conférant des propriétés supplémentaires à la cellule hôte

3a- Les gènes métaboliques spéciales

- Les gènes métaboliques codent pour la synthèse de protéines permettant l'utilisation de nutriments
 - chez *E. coli*, gènes d'utilisation du **citrate** comme source de carbone, production de **soufre**, hydrolyse de **l'urée**
 - chez les Salmonelles, gènes de **dégradation du lactose**

- Gènes non indispensables à la vie de la bactérie qui peuvent être une cause d'erreur pour l'identification des souches.
- Grand intérêt sur le plan biotechnologique: dégradation des produits chimiques (polluants toxiques).

3b- Les gènes de résistance

- ✓ Les gènes de résistance peuvent être portés par des plasmides (svt conjugatif), des transposons ou des phages
- ✓ Ce sont des plasmides de grande taille (> 200 kb).
- ✓ Ils confèrent une résistance aux antibiotiques et à d'autres inhibiteurs de croissance

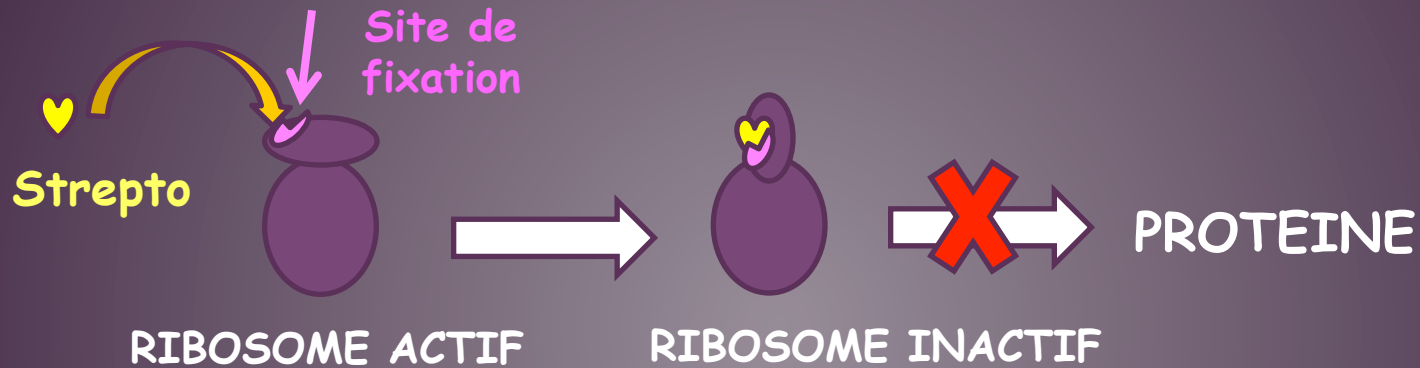
Les mécanismes de résistance aux antibiotiques

1- Résistance chromosomique:

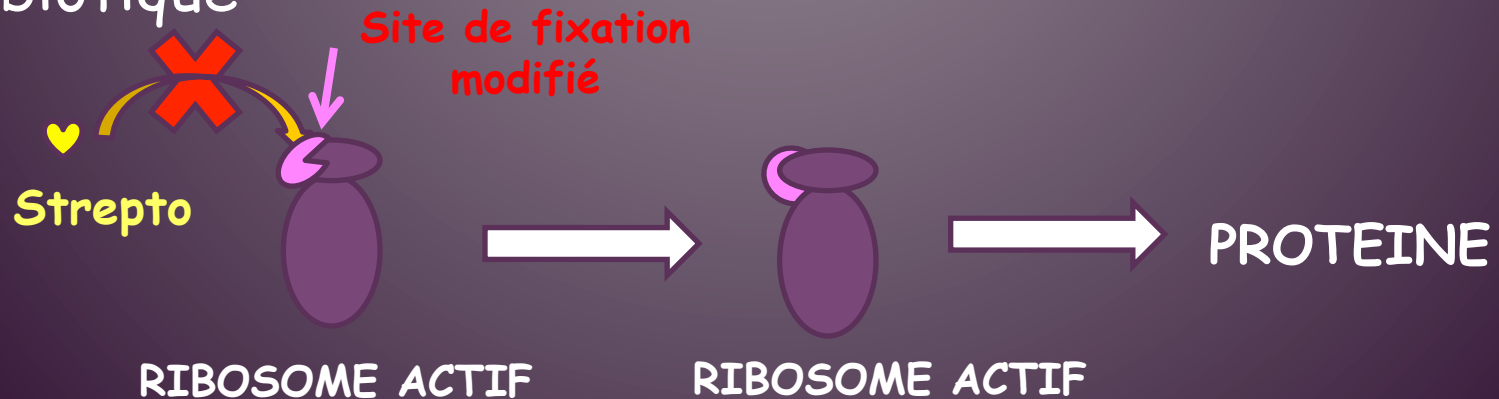
- Observée chez des mutants (spontanés ou artificiels)
- Elle est due :
 - aux changements de la perméabilité de la bactérie à l'antibiotique
 - à la modification de la cible ou du site d'action de l'antibiotique.

Exemple de mode d'action: Streptomycine

Mode d'action: Inhibition de la traduction par fixation sur la petite sous unité du ribosome



Mode de résistance: Modification du site de fixation de l'antibiotique



2- Résistance plasmidique:

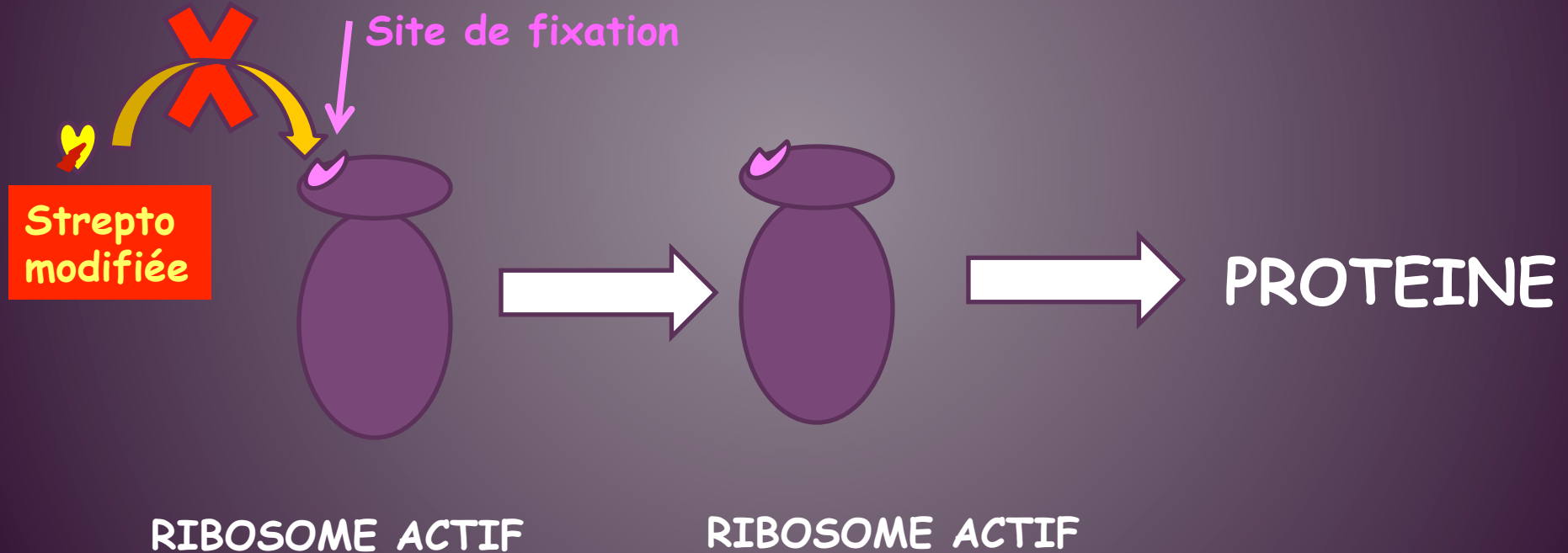
Gènes codant la synthèse de nouvelles enzymes qui soit:

- Inactivent l'antibiotique
- Empêchent sa pénétration dans la cellule
- Ou le rejettent activement en dehors de la bactérie

Selon divers mécanismes en fonction de la souche et le type de plasmide

Exemple: Streptomycine

Mode de résistance plasmidique: Phosphorylation ou Adénylylation de l'antibiotique et pour certains cas Acétylation



Plusieurs plasmides confèrent des résistances multiples aux antibiotiques



Un simple plasmide R peut contenir **plusieurs gènes** différents codant chacun une enzyme **d'inactivation d'antibiotique** différente.

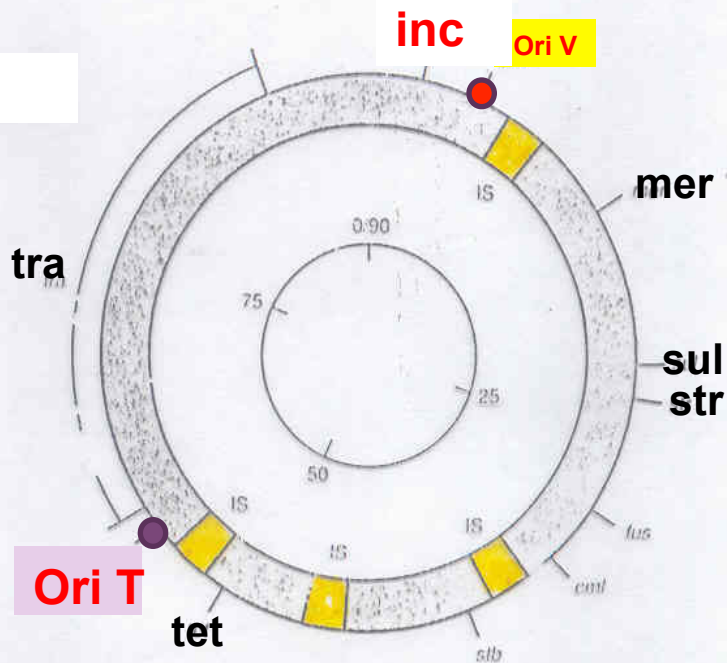
Les plasmides R:

Rôle de protection de la cellule

- 1. Synthèse d'une protéine de résistance à la substance toxique : elle va neutraliser l'activité toxique de la substance (en la dénaturant, hydrolysant, etc.)
- 2. Modification des propriétés d'enveloppe de la cellule et en la rendant impermeable à la substance toxique (métaux lourds).

Plasmide R₁₀₀ de 94,3Kpb

Fonction de répllication



Genetic map of the resistance transfer plasmid R100. The inner circle shows the size of the plasmid in kilobase pairs. The outer circle shows the location of major antibiotic resistance genes and other key functions. *inc*, incompatibility genes; *oriV*, origin of replication site; *oriT*, origin of conjugative transfer; *mer*, mercuric ion resistance; *sul*, sulfonamide resistance; *tet*, tetracycline resistance; *stb*, genes defining stability of plasmid in host; *tra*, transfer functions. The locations of insertion elements (*IS*) are also shown.

Résistance à :

- Sulfamides,
- Streptomycine,
- Spectinomycine,
- Acide fusidique,
- Chloramphénicol,
- Tétracycline
- Mercure

- Présence de gènes **Inc**: Exclusion de tout autre facteur R du même type.



- Présence d'un facteur R empêche le maintien d'un autre plasmide **apparenté**.

- Autres facteurs R, portant des gènes de résistance à:

- Kanamycine,
- Pénicilline,
- Tétracycline,
- Néomycine

- Plusieurs gènes de résistance portés par les facteurs R sont des éléments transposables, appelés aussi

TRANSPOSONS - Tn

- Marqueurs de sélection
- Mutagénèse dirigée

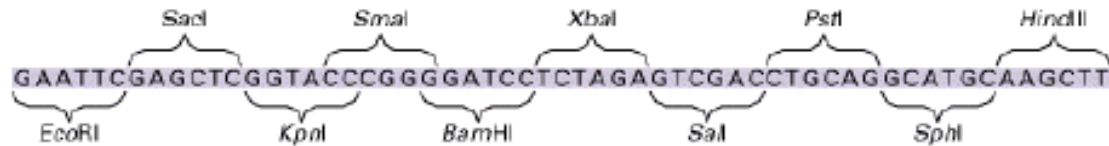
Rem: L'émergence de bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques a une importance médicale >>>> c'est corrélée avec l'augmentation de l'utilisation des antibiotiques pour les traitements des maladies infectieuses.

VI- Utilisation des plasmides

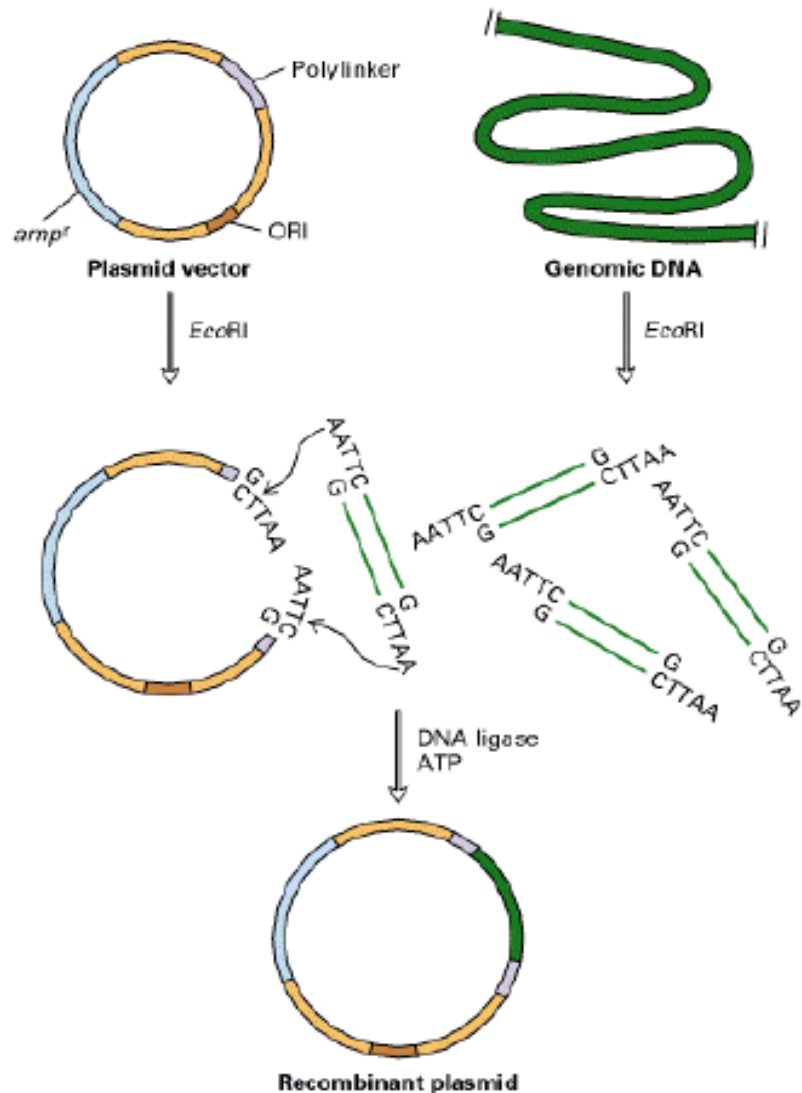
VI 1- Les plasmides sont utilisés comme vecteur de clonage

- Intégration d'un fragment d'ADN dans un plasmide par recombinaison *in vitro*: **P. recombiné** ou **P. chimère**.
 - L'ensemble des descendants d'une telle cellule constitue un clone: Clonage d'un fragment d'ADN
-
- ✓ Intégration de gènes d'**origines très variées** qui permet le transfert de matériel génétique en franchissant les **barrières d'espèces**

(a) Sequence of polylinker



(b) Insertion of *EcoRI* restriction fragments



Propriétés des vecteurs plasmidiques et exemple de construction d'un plasmide recombinant.

- (a) Des plasmides ont été modifiés de façon à faciliter l'insertion des fragments d'ADN à cloner. Une des modifications consiste à introduire une séquence dite polylinker qui contient plusieurs sites de restriction. Les plasmides contiennent aussi une origine de réplication (ORI) et un gène de résistance à un antibiotique.
- (b) Insertion d'un fragment de restriction d'ADN génomique dans un vecteur plasmidique. On choisit une enzyme de restriction dont le site est présent dans le polylinker ainsi qu'aux deux extrémités du fragment d'ADN génomique d'intérêt. Plasmide et ADN génomique sont digérés par cette enzyme ce qui génère des bouts collants compatibles. L'incubation du plasmide ouvert et de l'ADN génomique morcelé en présence d'un ligase permet d'obtenir le plasmide recombinant.

VI 2- Les plasmides sont utilisés comme vecteur d'expression

L'ADN cloné dans un plasmide peut exprimer les gènes qu'il porte dans les cellules d'*Escherichia coli*

Transcription et
traduction du messenger



Faire fabriquer à *E. coli* des protéines étrangères (l'insuline humaine, l'hormone de croissance humaine)

VI 3- Les plasmides sont utilisés comme vecteur pour la transformation de cellules eucaryotes

Introduire et faire exprimer de l'ADN dans des cellules eucaryotes

- levure, cellules de Mammifères en culture,
- cellules résultant des premières divisions de l'œuf d'un mammifère par exemple

Après clonage dans *Escherichia coli*



Réintroduire le gène cloné dans des cellules eucaryotes



Expression

Conclusion

- ✓ Les plasmides confèrent aux bactéries qui les hébergent de nombreux caractères génétiques par un mécanisme d'addition et non par un mécanisme de substitution.
- ✓ Ils représentent un élément essentiel d'adaptation bactérienne.
- ✓ Ils sont responsables d'épidémies de gènes (notamment de résistance aux antibiotiques), qui sont à la base de la découverte des transposons, appelés encore gènes sauteurs ou mobiles.

B- Les transposons (Tn)

B- Les éléments génétiques mobiles: les transposons (Tn)

Définition:

- ❖ Séquences d'ADN capables de changer de localisation dans le génome sans jamais apparaître à l'état libre.
- ❖ Ils ne peuvent se répliquer mais codent pour les déterminants de la transposition et ceux d'autres fonctions telle la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds .

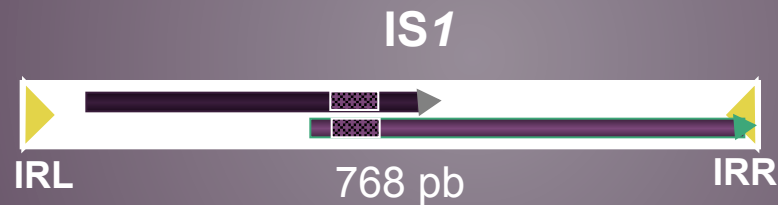
bêta-lactamines, aminosides, phénicolés,
cyclines, érythromycine, sulfamides et
triméthoprime

Transposition :

Mécanisme d'évolution rapide, c'est **l'addition d'une séquence de gènes** (ADN) de taille définie au sein d'un génome (chromosome bactérien ou plasmide) et en **l'absence d'homologie de séquence nucléotidique par recombinaison illégitime.**

Structure des transposons

- ✓ Le transposon est constitué d'un fragment d'ADN limité de part et d'autre par des séquences répétitives inversées (IR) appartenant à des séquences d'insertion (IS).



- ✓ Les séquences d'insertion portent **les gènes nécessaires à la transposition, transposase** (éléments régulateurs de la transposition) et **les marqueurs spécifiques** (ex: résistance aux antibiotiques).

RÔLE - INTÉRÊT

- Les transposons constituent un génome collectif ou un patrimoine génétique commun, dans lequel puisent les bactéries en fonction de leur nécessité d'adaptation ou de la pression de sélection.
- Ces éléments sont la preuve du "génie génétique *in vivo*".
- Ils sont très utilisés en mutagénèse *in vitro*, ou encore par les bactéries elles-mêmes pour moduler l'expression d'un gène.