

BPV
– UE VII. –
Le code génétique

<i>Semaine</i> : n°11 (du 16/11/15 au 20/11/15) <i>Date</i> : 17/11/2015	<i>Heure</i> : de 8h00 à 09h00	<i>Professeur</i> : Pr. Romond
<i>Binôme</i> : n°D3		<i>Correcteur</i> : n°D2
<i>Remarques du professeur</i> : R.A.S		

PLAN DU COURS

I) Introduction

II) Les mutations

A) Généralités

B) Rareté

C) Spontanéité

D) Discontinuité

E) Stabilité

F) Indépendance et spécificité

G) Au niveau de l'échelle moléculaire

III) Conjugaison

I) Introduction

On trouve deux sortes de transmissions de gène :

- La **transmission verticale** qui se fait d'une bactérie mère à une bactérie fille.
- La **transmission horizontale** qui se fait entre deux bactéries de même âge (conjugaison de plasmides, transduction pour les virus, la transformation ...)

Il faut faire la différence entre modification génétique et modification phénotypique.

Exemple : il suffit de mettre du lactose dans le milieu pour lever la répression de la galactosidase. Le gène n'avait pas disparu, il n'était juste pas exprimé, ce n'est donc pas une modification génétique. On a simplement un empêchement de la transcription grâce à un répresseur. C'est la régulation phénotypique. Si il y a une modification sur la partie promoteur ou directement sur la galactosidase, quand on va mettre du lactose, on ne va pas voir apparaître de galactosidase, on va pouvoir se poser la question de la modification génétique. Il faudra regarder si il n'y a pas du tout de protéine synthétisée ou si il y a une protéine synthétisée mais non fonctionnelle et donc qu'il y a du avoir une modification génétique.

Chez les bactéries, pour pouvoir faire la preuve d'une modification génétique, il faut mettre en œuvre un certain nombre d'approches qui ne sont pas exclusivement phénotypique.

II) Les mutations

A) Généralités

Les mutations peuvent s'exprimer à la fois sur le chromosome et sur le plasmide, on a donc deux possibilités. On va s'intéresser ici au chromosome, qui est la base de la mémoire génétique de la bactérie, on pourra ensuite reprendre ce que l'on a dit pour la mutation pour le chromosome et le dire pour le plasmide.

On va se placer du côté de la population bactérienne et on va définir les caractères liés aux mutations,

B) Rareté

On a entre une chance sur 10^8 et une chance sur 10^{10} bactéries d'avoir une bactérie qui a muté (on parle ici de population bactérienne et non de gène). C'est donc un phénomène qui, à l'échelle humaine, arrive peu souvent. Cependant à l'échelle bactérienne, **on va voir apparaître ces mutations car les populations bactériennes sont énormes dans des volumes petits**. En effet quand on est en bout de croissance, en phase stationnaire, on est aux alentours de 10^8 à 10^9 UFC/mL. (UFC = unité formant colonies)

La mutation est donc un phénomène rare, cependant on a ici des populations suffisamment grandes pour les voir apparaître.

On a aussi, en général, un seul chromosome dans les bactéries, donc pas besoin d'avoir les mutations sur 2 chromosomes pour mettre en évidence les mutations car on a un système haploïde (pas deux « doses » du même gène).

C) Spontanéité

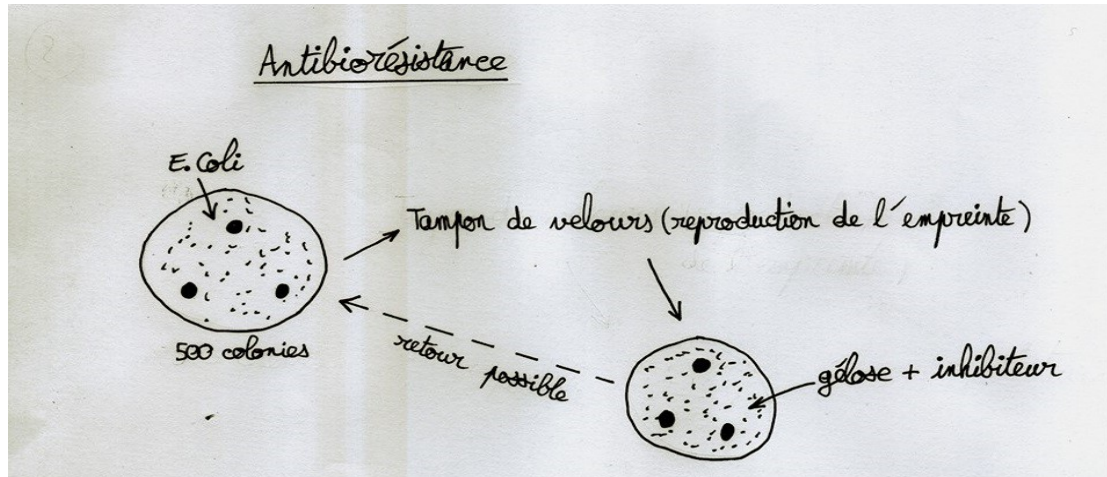
Quand on parle de résistance aux antibiotiques ce n'est pas parce que l'on prend un antibiotique que la bactérie va développer une résistance contre celui-ci.

Expérience de Luria et Delbruck : ils ont pris 10^3 bactéries dans un tube de 20 mL. Ils les ont séparées, la moitié dans un flacon de 10mL et l'autre moitié dans 50 tubes de 0,2mL. Cet ensemble va être intubé (obtention d'une courbe de croissance) à 37° pendant une nuit. On va ensuite ensemer en présence d'un inhibiteur (sélectionneur) les tubes dans des géloses. Si c'est l'inhibiteur qui induit la mutation, on devrait avoir le même nombre de colonies résistantes à l'inhibiteur dans le tube de 10mL que dans les tubes de 0,2mL. Hors on va avoir plus de colonies résistantes dans le tube de 10mL. En effet la probabilité d'avoir une mutation dans les tubes de 0,2mL est plus faible car on a moins de bactéries, il est donc presque impossible de développer une résistance à l'inhibiteur. Alors que dans le tube de 10mL la quantité de bactéries est beaucoup plus importante, on a donc plus de chance de développer une résistance à l'inhibiteur.

On n'induit pas la résistance, on l'observe. Elle est spontanée. Donc plus on travaille sur des grands volumes

plus on a de chance de voir apparaître un mutant.

Expérience de Lederberg : il va cultiver des escherichia coli sans sélecteur. Et il fait une croissance de celle-ci sur 48H. On va obtenir 500 colonies à peu près. Et quand il a une belle croissance (environ 10^9 bactéries dans les colonies) il va prendre un tampon de velours pour faire une empreinte exacte et va reproduire l'ensemencement avec ce tampon dans une gélose avec cette fois ci l'inhibiteur. Il va observer quelques colonies. C'est-à-dire que les clones des colonies de départ sont résistants à l'antibiotique. Donc avant même d'être en présence de l'antibiotique, les bactéries avaient développé une résistance contre celui-ci. **Elles étaient déjà naturellement antibiorésistantes avant même d'avoir été mises en contact avec l'antibiotique.**

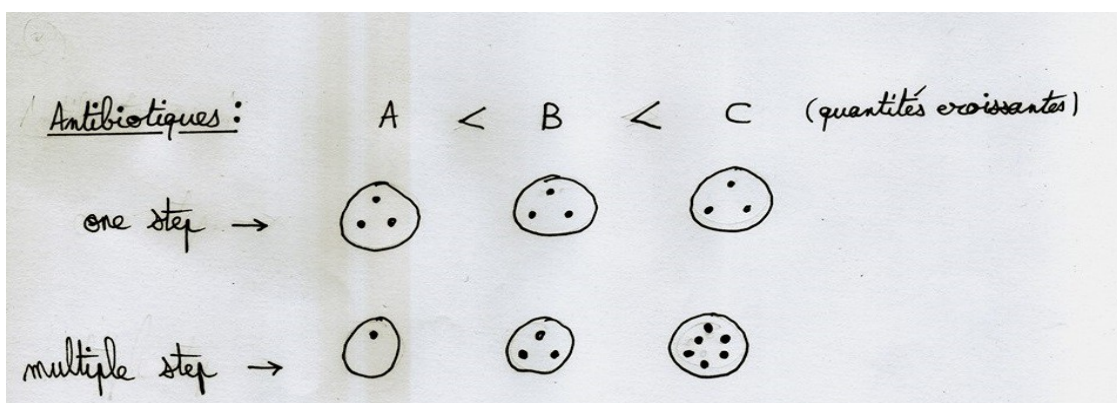


En laboratoire, on peut induire une modification de l'ADN avec des modificateurs de l'ADN mais cela est vraiment à part. Mais si on parle de résistance aux antibiotiques ou modifications génétiques dans la nature, il n'y a pas de système d'induction par la présence d'antibiotique. C'est spontané.

D) Discontinuité

On va avoir des types de résistance qui vont apparaître soit en une seule étape, c'est à dire qu'on est devant une population bactérienne qui n'a que des bactéries qui sont sensibles à une concentration d'antibiotique, et on va tester notre population bactérienne avec des concentrations croissantes en antibiotique. On va avoir notre antibiotique (sélecteur) à des concentrations différentes et on va avoir d'emblée des populations résistantes à des concentrations élevées. **On a ici une résistance de type élevée. C'est une résistance de type one step (= une étape).**

Au contraire, on peut avoir un système qui est **multiple step**, c'est-à-dire qu'au lieu d'avoir directement une acquisition de résistance d'emblée à des concentrations élevées d'antibiotiques, on va avoir une acquisition de repiquage en repiquage. On va d'abord avoir l'apparition de mutants qui vont résister à des concentrations faibles d'antibiotiques (faible résistance) puis ensuite en repiquant ces mutants dans une concentration plus élevée, on va avoir quelques colonies de mutants qui vont résister à cette concentration. On peut répéter l'opération dans des concentrations de plus en plus élevées en inhibiteur pour obtenir des bactéries de plus en plus résistantes. **On a une augmentation de plus en plus importante de la résistance.** On va acquérir de nouvelles mutations qui vont permettre de résister à ce sélecteur.



E) stabilité

Les mutations acquises sont stables, une bactérie résistante par un système de mutation ne va pas revenir en arrière.

F) Indépendance et spécificité

On a une indépendance et une spécificité des mutations, en effet l'apparition d'une mutation ne va pas favoriser l'apparition d'une deuxième mutation. Si il faut 10^8 à 10^{10} bactéries pour avoir une modification sur un gène (la voir apparaître), il faudra une population de l'ordre de 10^{16} à 10^{20} bactéries pour observer une deuxième mutation, c'est-à-dire de voir apparaître ce mutant avec une mutation sur le gène A et une mutation sur le gène B. Il n'y a pas d'induction de mutation sur des gènes qui sont aux quatre coins du chromosome. La mutation sur le gène A ne facilite pas la mutation sur le gène B.

Donc l'indépendance veut dire que ce n'est pas parce que je mute sur un gène que je vais induire la mutation de l'autre. Et chaque modification de séquence va être spécifique d'un gène donné.

Est ce que ces modifications (ces mutations) vont s'exprimer d'un point de vue phénotypique ?

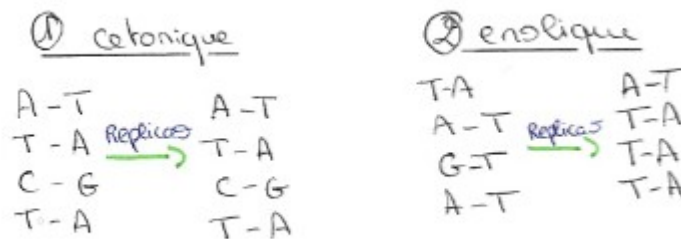
Il faut avoir un système d'identification qui nous permet de voir qu'on a un mutant (dans le monde du vaccin il est difficile d'observer une mutation).

G) Au niveau de l'échelle moléculaire

On a les mutations spontanées, mais on peut aussi provoquer des mutations grâce au NH_2OH (hydroxylamine)

En ce qui concerne les mutations spontanées, soit on vise le remplacement d'une base (ponctuelle) soit on va avoir une délétion d'un fragment.

Les mutations ponctuelles vont correspondre à la tautomérisation des bases, en générale une base va être sous forme cétonique, mais dans certaines conditions notre base peut passer en forme énolique. Quand la guanine est sous forme cétonique elle va se lier à la cytosine alors que sous forme énolique elle se lie à la thymine. La stabilité d'une guanine sous forme énolique est temporaire.



Cette modification ne porte pas forcément à conséquence, car ces mutations peuvent être sur une zone non codante. Quand on parle de mutation provoquée c'est ce type de mutation que l'on va provoquer car on va augmenter la fréquence de la tautomérisation en ayant plus de formes énoliques. Cela permettra d'avoir un peu plus de mutants avec des concentrations faibles en bactéries.

On peut avoir un fragment complet, et au moment où l'on fait la réplication, une erreur va se positionner. On a le brin avancé et le brin retardé, avec le brin retardé on a les fragments d'Okazaki. Et on va donc avoir un certain nombre d'erreurs comme les fragments qui peuvent se remettre à l'envers ou se déléter, c'est ce qui arrive dans les zones peu variables (où il y a par exemple quatre G ou quatre C), et donc à ce moment là, on a une mutation qui va apparaître dès la prochaine réplication et elle est irréversible. Il peut y avoir des erreurs augmentées quand on a des transposons qui viennent se mettre dans des endroits où ils n'étaient pas avant et vont ainsi favoriser les erreurs. Le morceau peut aussi être supprimé, ce qui peut entraîner une perte de fonctionnalité importante. Cela peut arriver en cas de pression importante d'antibiotique.

Il faut bien retenir la stabilité de l'acquisition. C'est-à-dire que toutes les générations en dessous, toutes les bactéries filles, ont acquis cette mutation. Les mutations sont donc de la transmission verticale.

III) Conjugaison

La conjugaison est un phénomène que l'on a découvert dans les années 50 avec Lederberg et Tatum.

Ils avaient deux populations de bactéries *Escherichia coli* :

-Une population A qui est biotine+, méthionine +, leucine - et thréonine -

-Une population B qui est biotine -, méthionine -, leucine + et thréonine +

Quand une bactérie est leucine- cela veut dire qu'il faut apporter de la leucine dans le milieu de culture.

Ils ont d'abord cultivé les bactéries A dans un milieu qui leur correspond et les bactéries B dans le milieu qui leur correspond. Puis ils ont ensemencé chacun des mutants dans des milieux sans aucun apport en composant cité ci-dessus et ils ont obtenu 0 colonie.

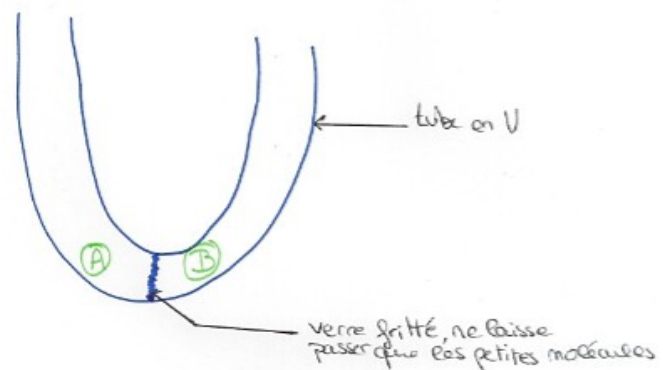
Ils ont ensuite mis une fraction de A et une fraction de B dans la MÊME culture et là après incubation de plusieurs heures, ils ensemencent dans un milieu sans biotine, méthionine, leucine et thréonine et ils observent des colonies se développer. On a une population assez faible de l'ordre de 10^7 . Cependant on a des bactéries qui sont devenues biotine +, méthionine +, leucine + et thréonine +. Hors il aurait fallu une population de l'ordre d'au moins 10^{16} pour avoir une double mutation, ce n'est donc pas une double mutation mais un autre phénomène.

On va faire la même expérience dans un tube en forme de U avec les deux populations séparées par du verre fritté qui ne va laisser passer que les petites molécules et non les bactéries.

Après incubation, ils vont ensemencer les bactéries A et B dans des milieux sans biotine, méthionine, leucine et thréonine et cette fois on n'aura pas de colonies qui vont se former.

Il faut donc un contact étroit entre les deux bactéries pour faire un transfert de code génétique (pour l'acquisition de gène)

Expérience de Davis



Est-ce que ce transfert est dirigé ou non ?

Voir le cours suivant