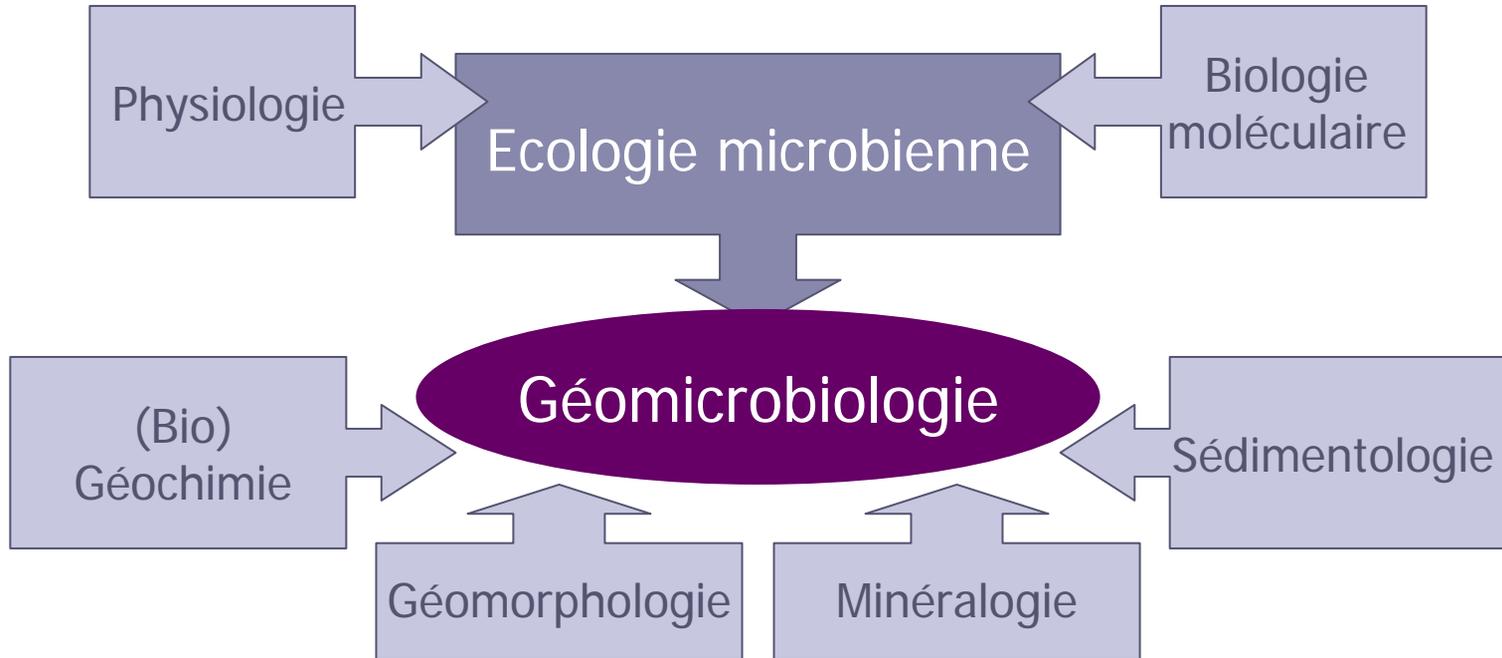


Une science interdisciplinaire



Intégration de phénomènes aux échelles de temps très différentes

Challenges et limitations

Identification d'un processus
(les microbes érodent activement les roches)



Démonstration de la présence
de microbes *in situ*



Isolation en culture pure



Reproduction du phénomène
par inoculation sur un substrat stérile

➡ Les processus sont lents

➡ Les roches sont dures,
les microbes petits et fragiles

➡ Toutes les espèces ne sont
pas cultivables/ symbiontes

➡ Les processus sont lents

Outils

Identification d'un processus
(les microbes érodent activement les roches)



Démonstration de la présence
de microbes *in situ*



Isolation en culture pure



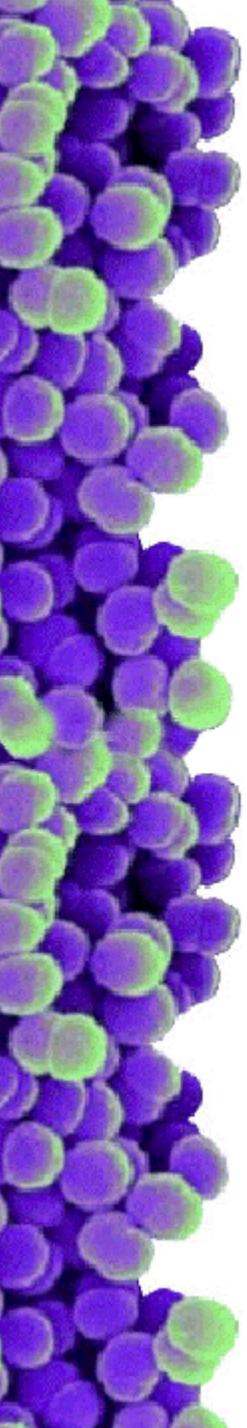
Reproduction du phénomène
par inoculation sur un substrat stérile

➡ Observations de terrains

➡ Techniques non destructives
Microscopie LN et électronique,
extractions de biomarqueurs ...

➡ Techniques moléculaires
alternatives

➡ Palette analytique et
expérimentale,
Analyses *in situ* (μsenseurs)



Rappels de Microbiologie

Les micro-organismes

➡ Organisme vivant unicellulaire ou à cellules non différenciées de taille micrométrique, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique :

- les procaryotes (bactéries et archées)
 - les champignons inférieurs : filamenteux, levures
 - les protozoaires
 - les algues
 - les parasites multicellulaires
- } protistes

+ agents infectieux non-vivants (ne possède pas de cellules) : parasites intracellulaires tels que les virus, prions qui ne peuvent se reproduire qu'en utilisant la machinerie cellulaire d'un autre organisme

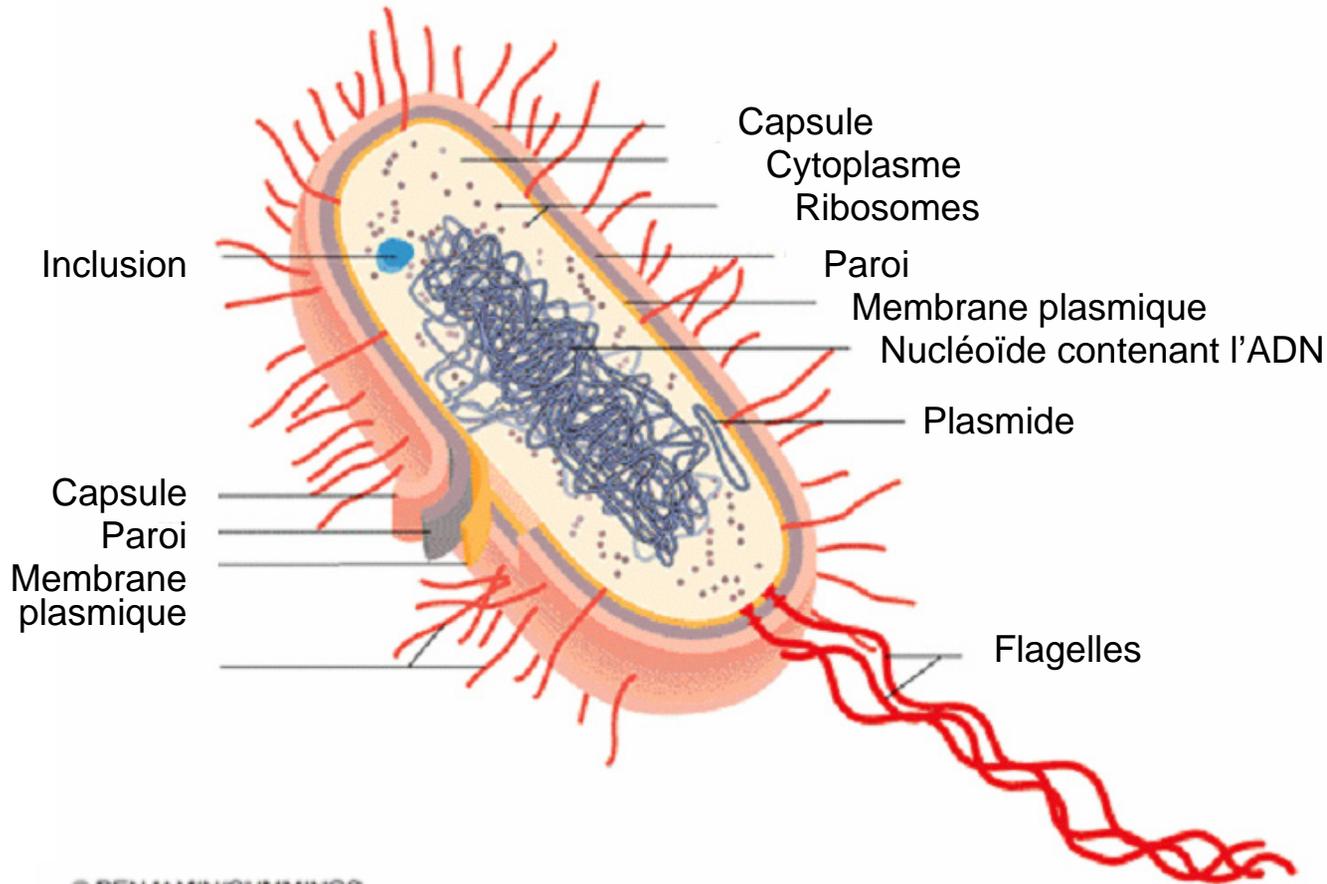
➡ Ubiquité des micro-organismes :

- le sol
- l'eau (les rivières, les mers, les lacs...)
- les organismes vivants (ils sont au nombre de 100 000 par cm² de peau)..
- même en conditions extrêmes de pression, température, salinité, etc.

➡ Types de métabolisme très variés :

Interagissent chimiquement avec de nombreux minéraux et fluides géologiques

La cellule procaryote



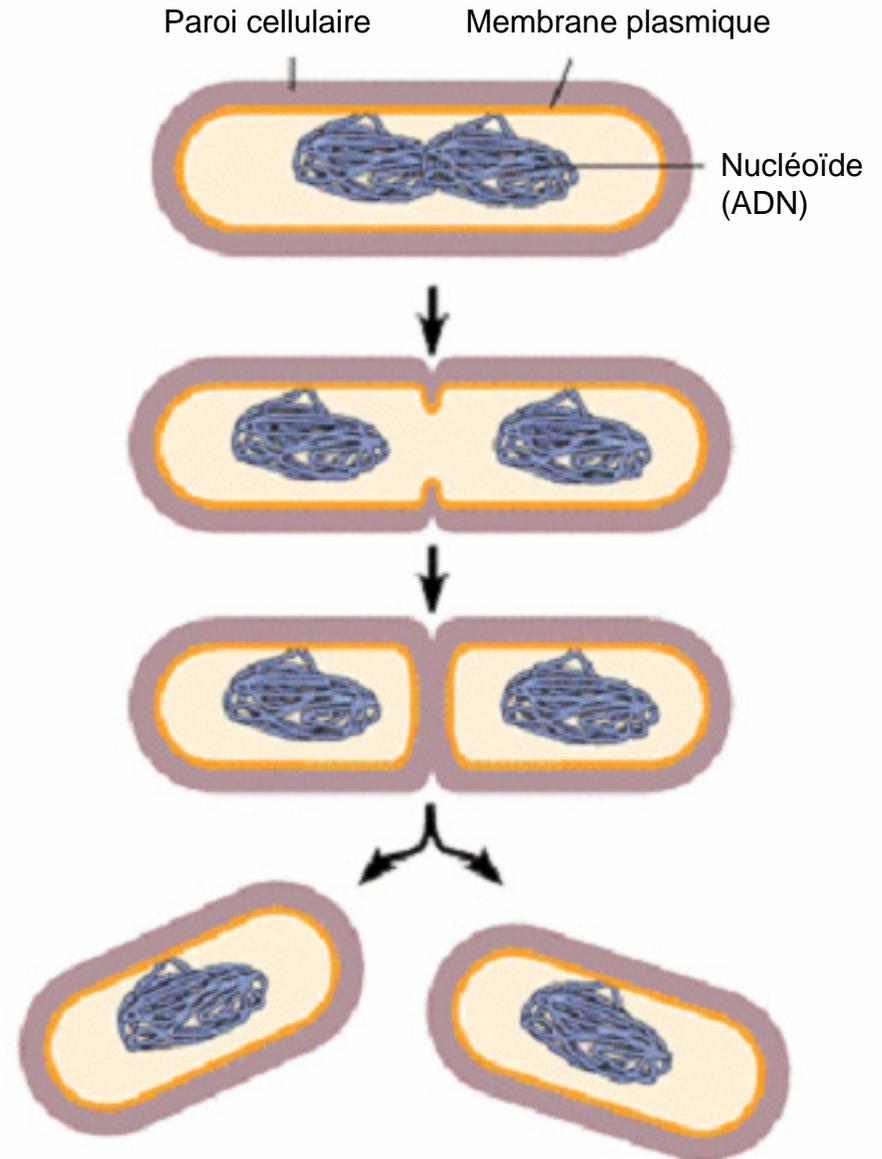
- ADN génomique circulaire et plasmidique baignant dans le cytoplasme avec les ribosomes
- encapsulé dans la membrane plasmique et la paroi cellulaire (bicouche de protéine contenant des lipides) semirigide et perméable
 - permettant à la cellule d'échanger avec le milieu extérieur
 - maintenant la forme de la cellule (préviendrait d'un éclatement éventuel)
- quelquefois entouré d'une capsule constituée d'une substance polysaccharidique complexe fermement attachée à la paroi cellulaire
- souvent mobile (nage à l'aide de cils ou d'une flagelle)

Caractères comparés des cellules procaryotes et eucaryotes

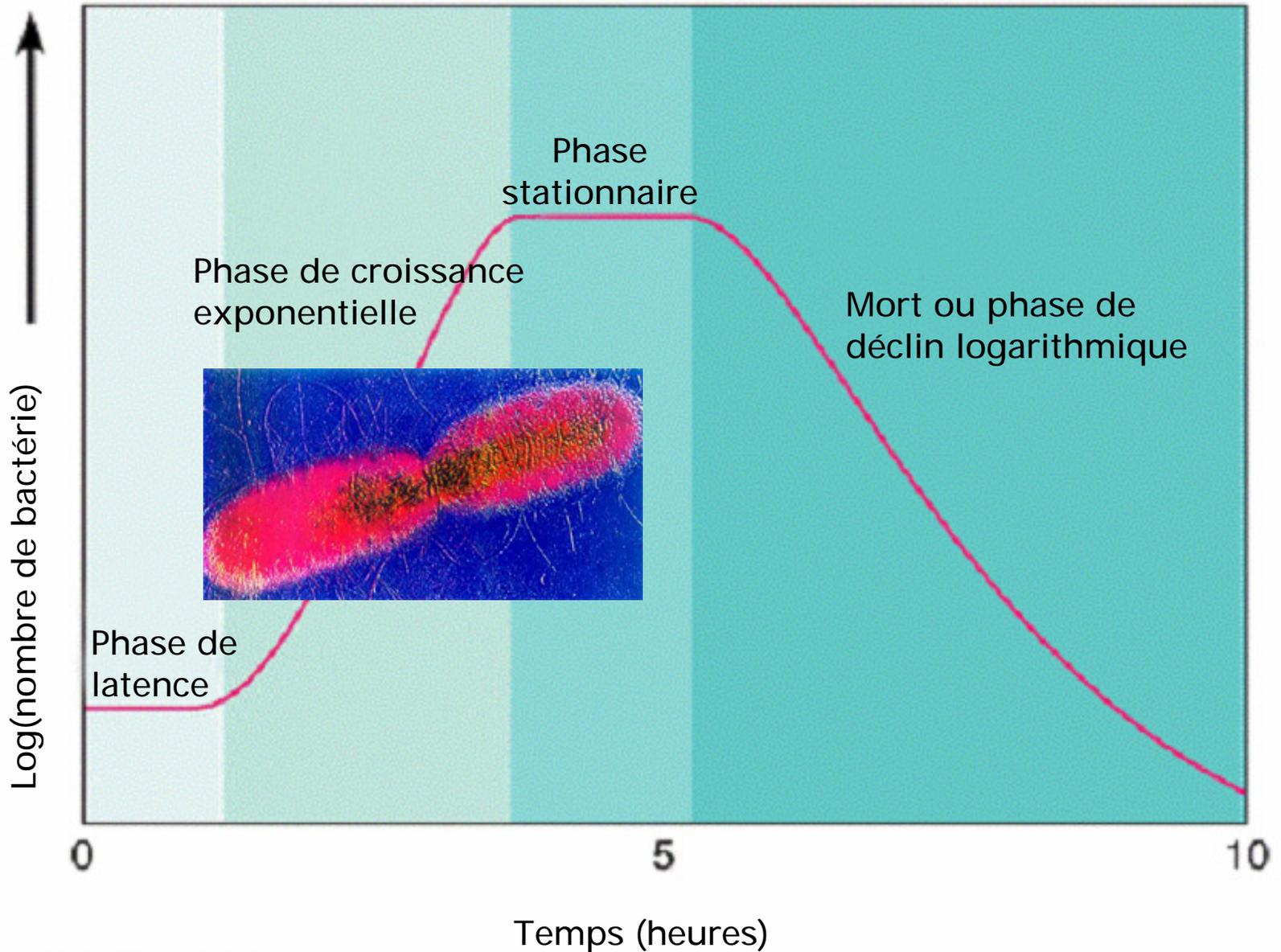
	Cellules procaryotes	Cellules eucaryotes
Taille des cellules (longueur)	Généralement 1 à 10 μm	Généralement 5 à 100 μm : beaucoup ont plus de 100 μm
Enveloppe nucléaire	Absente	Présente
ADN	Circulaire, en nucléoïde	Linéaire dans un noyau
Organites (ex : mitochondries, chloroplastes)	Absents	Présents
Cytosquelette	Absent	Présent
Taille des ribosomes	70S	80S dans le cytoplasme, 70S dans les mitochondries et les plastes

La fission binaire

- 1 Allongement de la cellule
Duplication de l'ADN et des autres constituants
- 2 Début de la division
- 3 Formation d'un septum de division avec de part et d'autre l'ADN divisé
- 4 Séparation des cellules



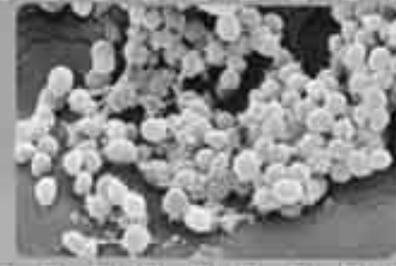
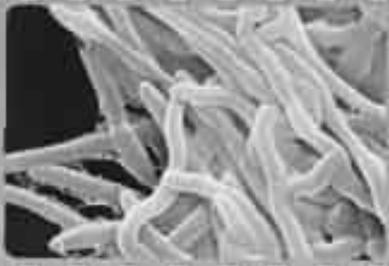
Les phases de la croissance microbienne



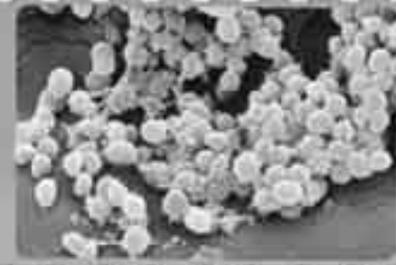
La croissance microbienne

Facteurs limitants

- Disparition d'un composé essentiel à la nutrition bactérienne
- Mécanisme de régulation (produit final de la réaction toxique, ...)
- Mécanisme de compétition entre les micro-organismes
- Variations physico-chimiques du milieu : pH, température...
- Présence d'agents chimiques ou bactériostatiques



Les biofilms

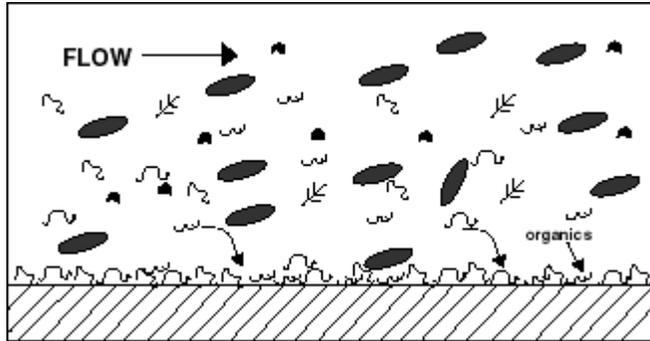


Les biofilms

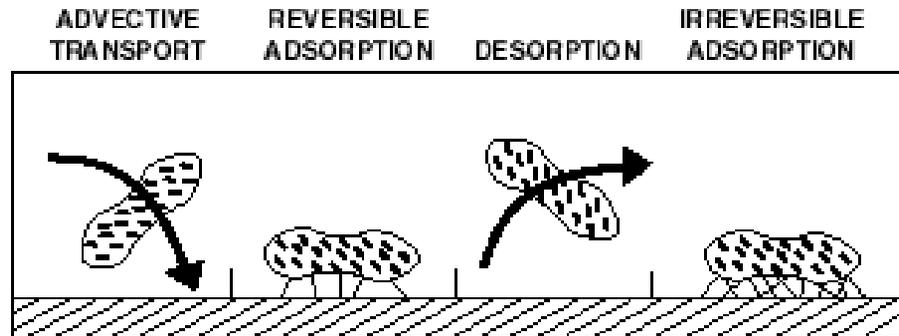
Assemblage constitué de colonies microbiennes fixées sur un support et enfermées dans une gangue polymère encapsulatrice (constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques,...) attachée à une surface inerte ou vivante

- Plus de 99% des bactéries vivent en communauté dans des biofilms
- Leur organisation et leur métabolisme dépendent de la nature de la surface et de l'environnement physico-chimique.
- Substances polymériques facilite l'attachement mais permet également les échanges ioniques pour concentrer les nutriments et prévenir de la déshydratation
- Dans un biofilm mature, 75-95% du volume est occupé par les EPS (substance polymérique extracellulaire) et 5-25% par les cellules bactériennes
- Caractérisé par de grandes hétérogénéités spatiales du fait des variations métaboliques importantes à l'intérieur du biofilms et à l'interface milieu liquide/milieu solide
- Aspect gélatineux du fait de la forte teneur en eau

Step 1.
Surface conditioning

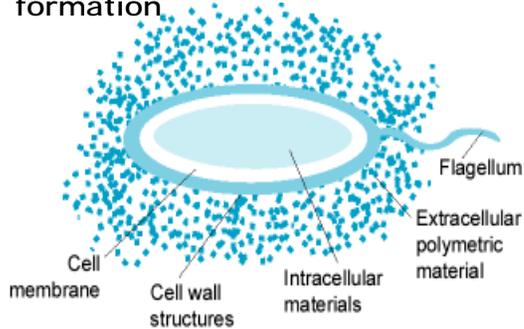


Step 2.
Adhesion of 'pioneer' bacteria

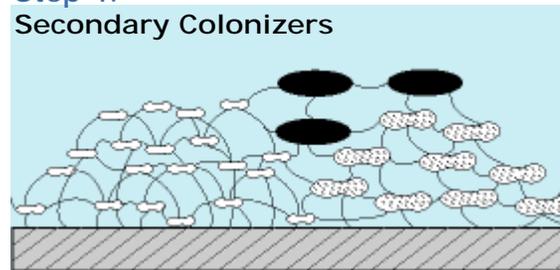


Neutralise les charges/énergie libre en surface

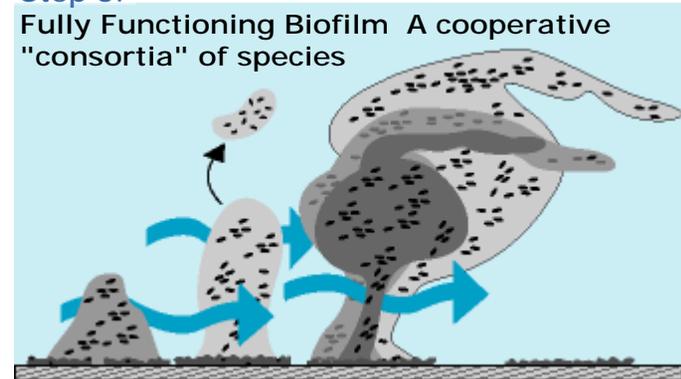
Step 3.
Glycocalyx or 'slime' formation



Step 4.
Secondary Colonizers



Step 5.
Fully Functioning Biofilm A cooperative "consortia" of species



Propriétés du microconsortium

L'organisation, la forme, la densité de ces entités sont des réponses aux variations des conditions écologiques

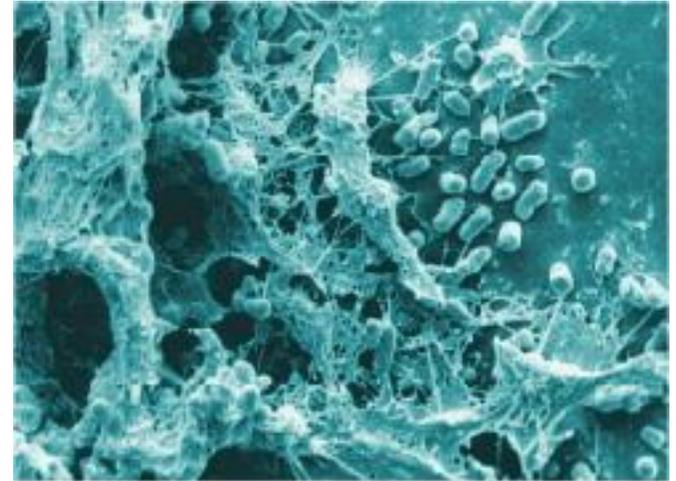
- très stable
- adapté et résistant au stress
- réseaux de pores et de canaux de circulation

accumulation de nutriments

concentration microbienne forte

communication entre les cellules

échanges génétiques



Grande diversité génétique et métabolique même au sein du même microenvironnement



Rôle écologique considérable des biofilms



Rappels de Biologie Moléculaire

Macromolécules biologiques = polymères constitués d'un grand nombre de sous-unités similaires (monomères) associés entre eux par des liaisons covalentes

Seulement 70 monomères sont utilisés par tous les êtres vivants sur Terre pour la construction d'une très grande variété de macromolécules

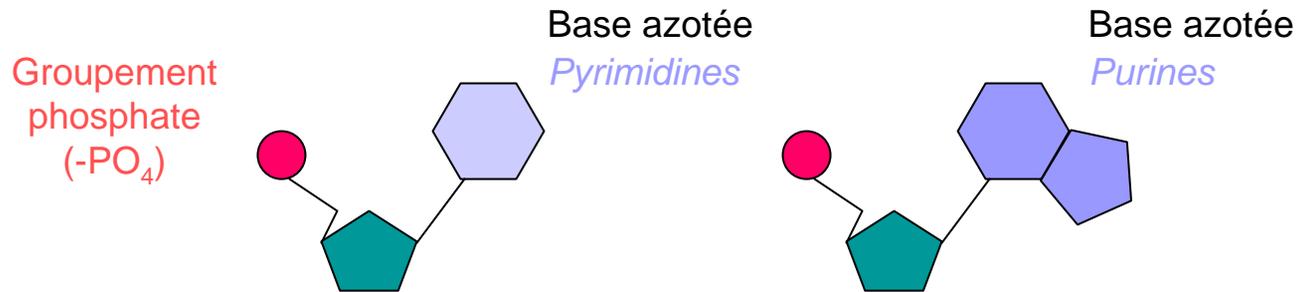
Macromolécule	Monomères
Carbohydrates	20-30 monosaccharides (ou sucres simples)
Protéines (chaînes polypeptidiques)	20 acides aminés
Acides nucléiques	4 nucléotides
Lipides	~ 20 acides gras et glycérol

Variation structurale des molécules = base de la diversité

Les Acides Nucléiques

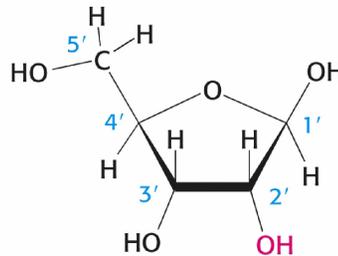
Contiennent et transmettent l'information génétique

= Polymères de nucléotides associés par des liaisons phosphodiester (covalentes)



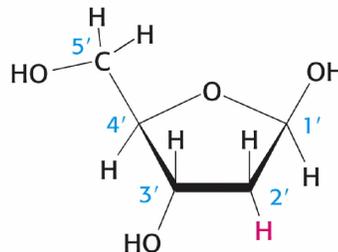
Sucre pentose (5 C)

-ribose



➡ Acide ribonucléique (ARN)

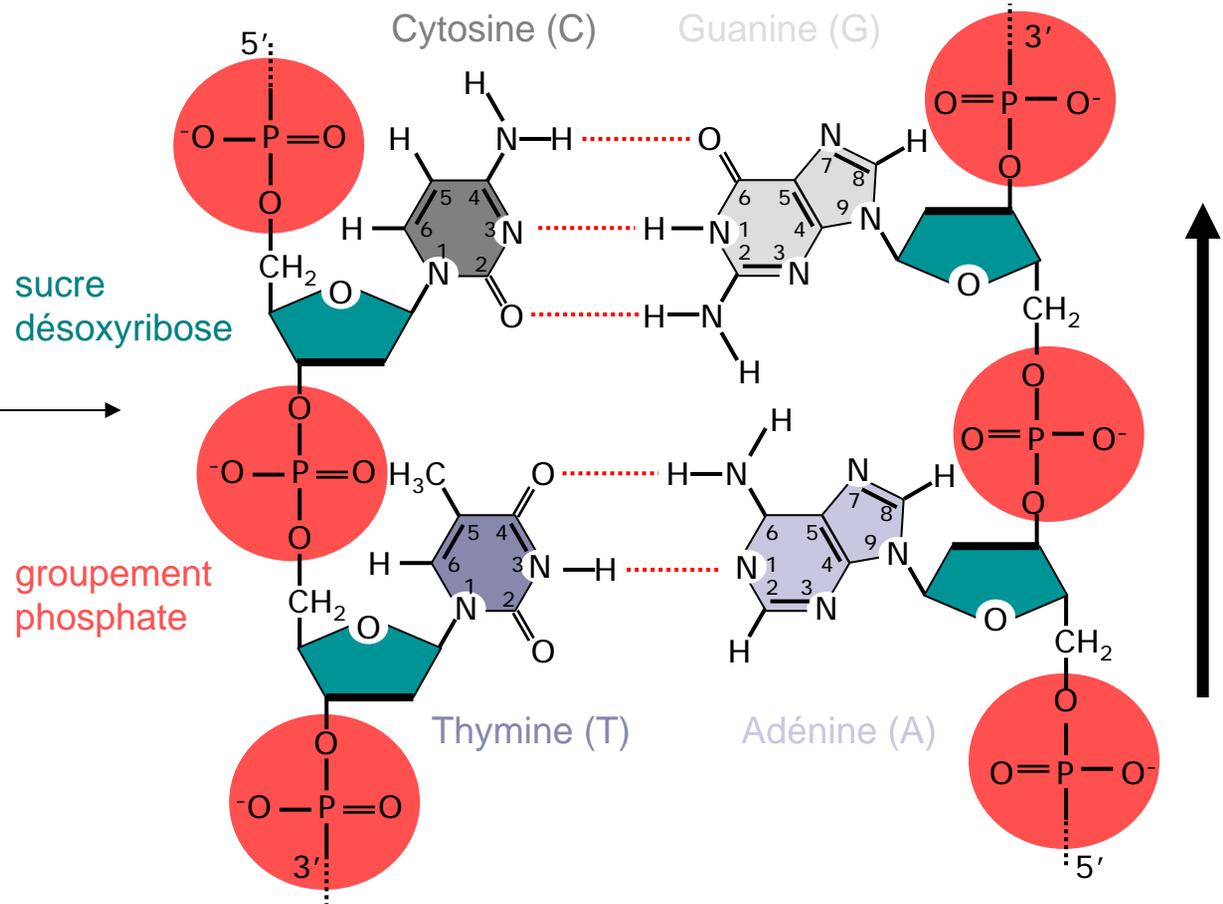
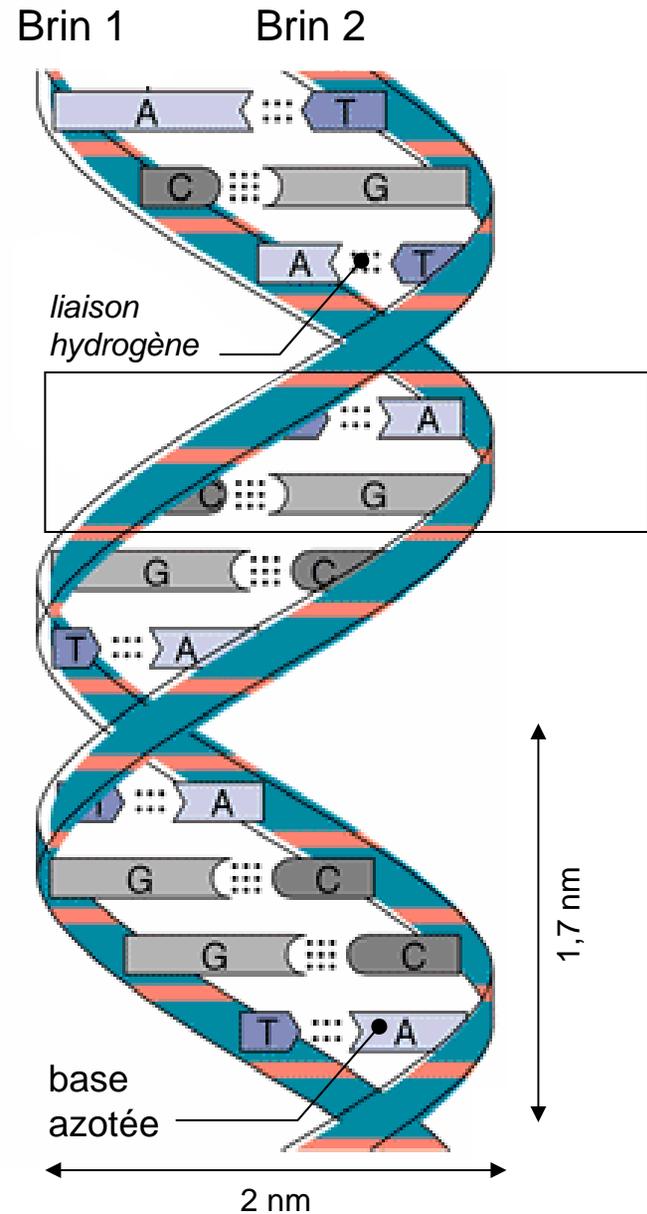
- désoxyribose



➡ Acide désoxyribonucléique (ADN)

L'Acide Désoxyribonucléique

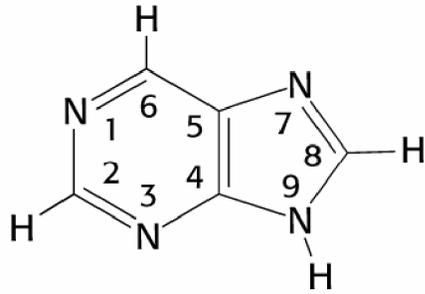
Macromolécule qui porte l'information génétique



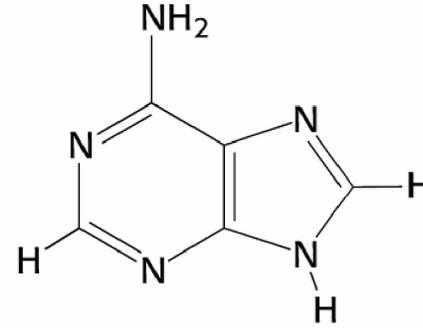
- Brins antiparallèles et complémentaires
- Double hélice
- Possède des segments appelés **gènes**
- Réplication à l'identique suite à la division cellulaire

Les bases azotées

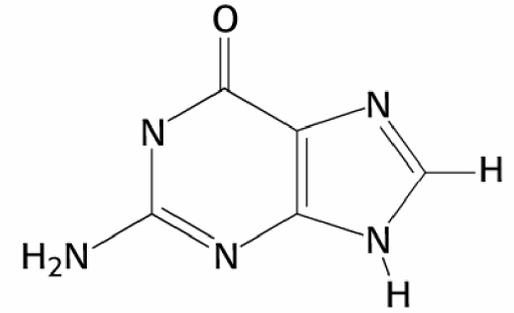
PURINES



Purine

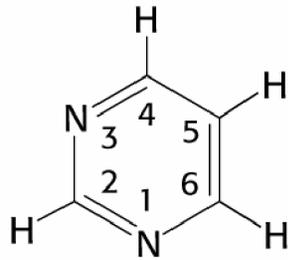


Adenine

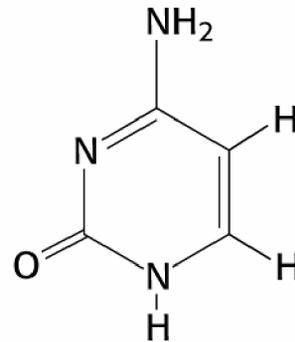


Guanine

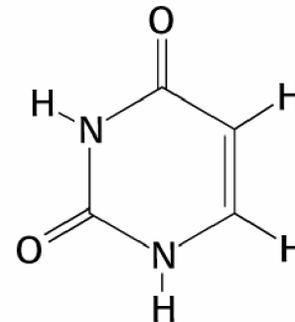
PYRIMIDINES



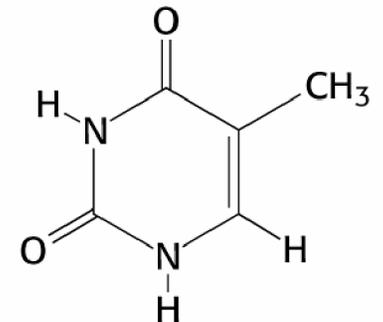
Pyrimidine



Cytosine



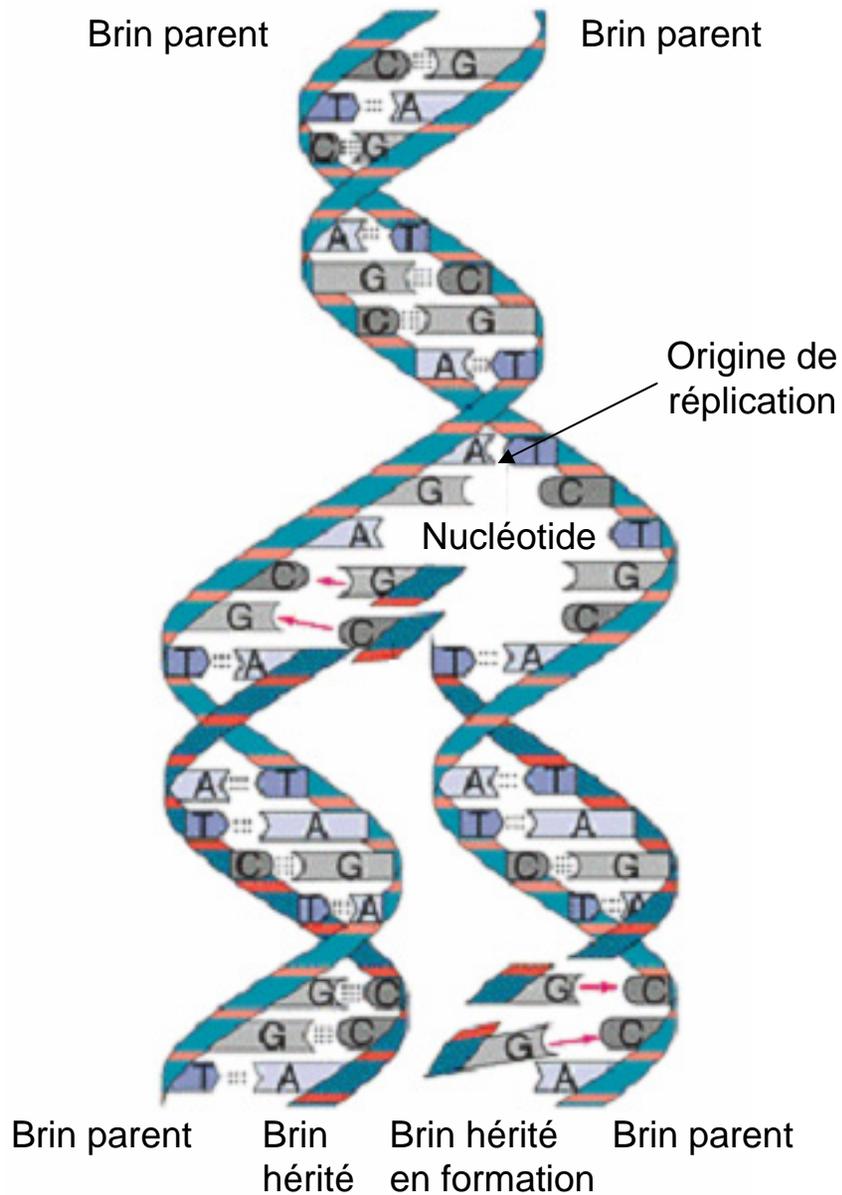
Uracil



Thymine

Association purine / pyrimidine par des liaisons Hydrogènes

La réplication



Les Acides RiboNucléiques

Molécules qui véhiculent et expriment l'information génétique

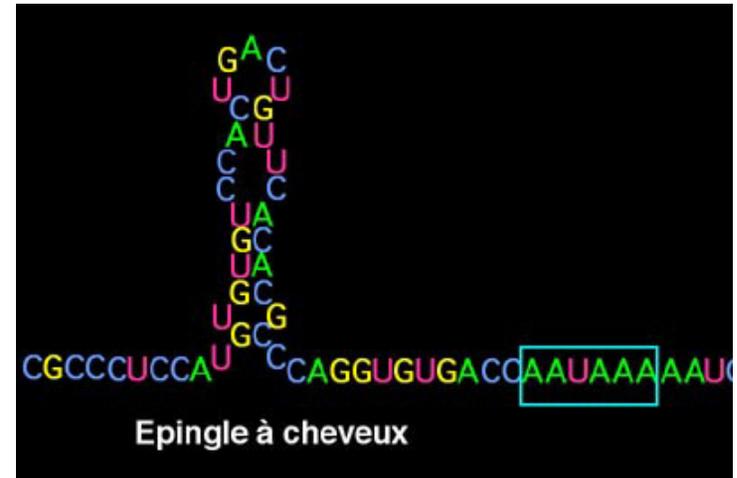
3 classes qui diffèrent suivant leur taille, localisation et fonction :

- ARN messenger (ARNm) } copie de la séquence codante d'un gène (=matrice pour l'expression en protéine)
- ARN ribosomiaux (ARNr) } fournissent les structures et les outils nécessaires à l'expression de l'ARN messenger en protéine
- ARN de transfert (ARNt) }

STRUCTURE :

- Base Uracil (U) (pas de Thymine)
- Sucre de type Ribose
- Simple brin

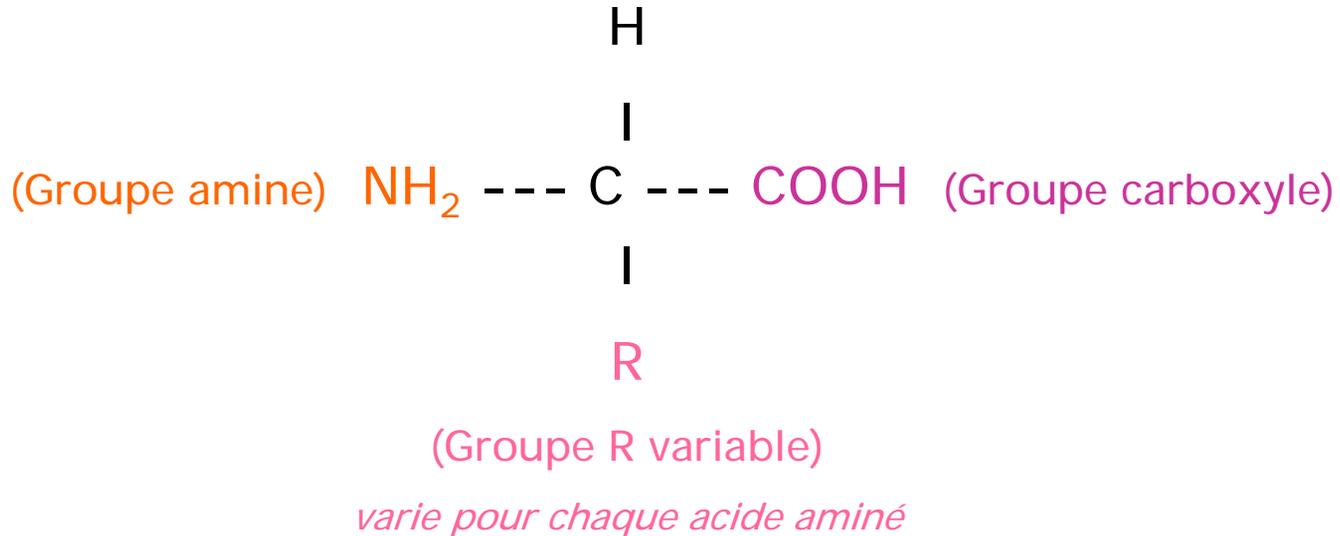
linéaire (ARNm) ou en épingle à cheveux et associé à des protéines spécifiques (ARNr, ARNt)



Chaîne polypeptidique

=

Polymère d'**acides aminés** connectés par des liaisons *peptides* (covalentes) en une séquence spécifique linéaire



Protéine

=

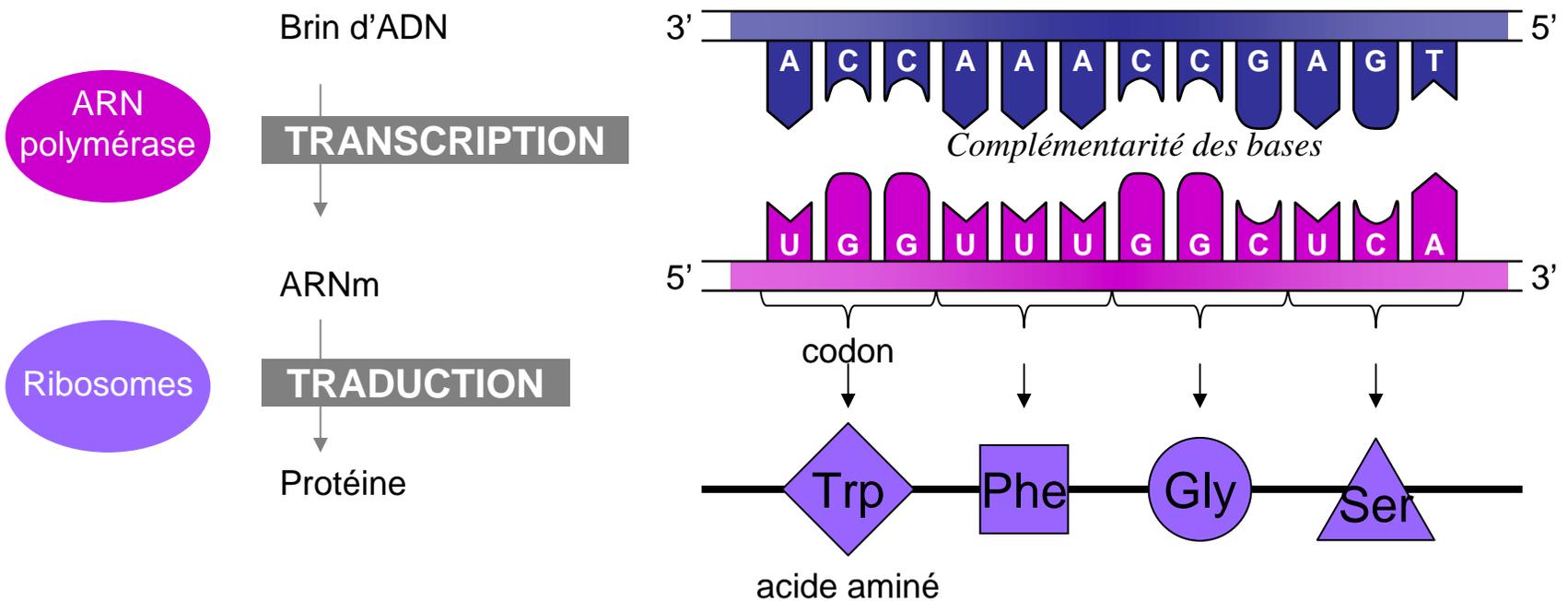
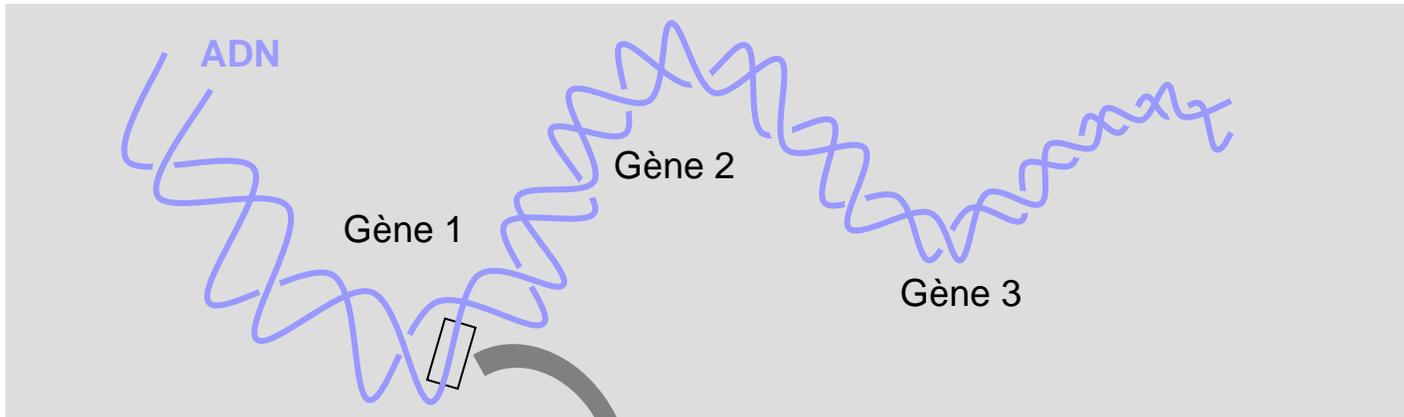
Macromolécules composées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques arrangées en une conformation **3D** spécifique et responsable de la plupart des fonctions cellulaires

Les fonctions variées des protéines

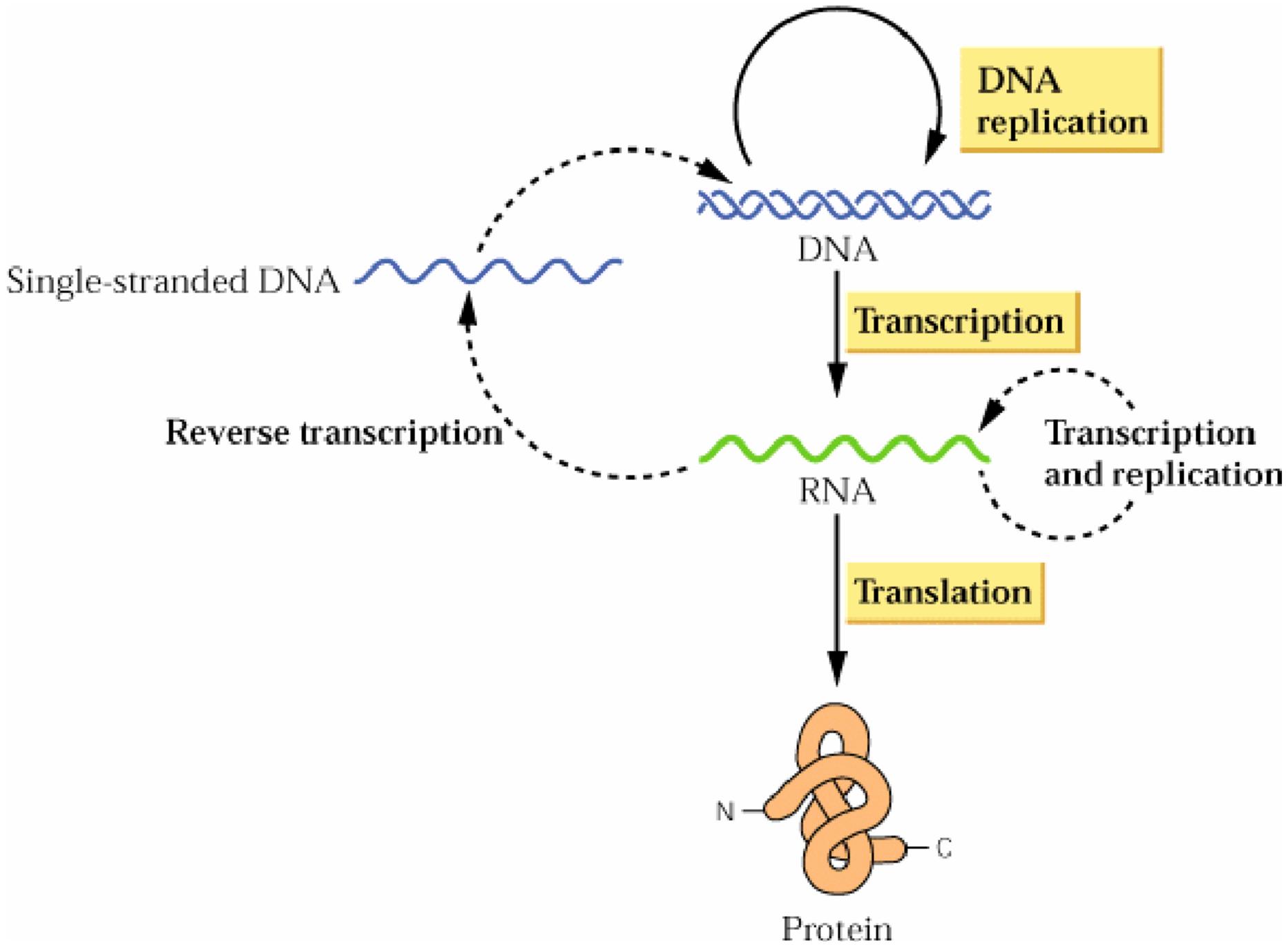
- **Enzymes:** catalyse des réactions cellulaires
- **Protéines structurales:** maintien de la morphologie
- **Transport:** dans la cellule, l'organisme et au travers de la paroi cellulaire
- **Communication:** messagers, hormones, récepteurs
- **Défense:** anticorps et autres molécules liant les molécules étrangères pour les détruire
- **Contraction:** mouvement musculaire
- **Réserve:** stockage des acides amines pour une utilisation ultérieure

La fonction d'une protéine dépend de sa structure 3D (conformation)

de l'ADN aux protéines : l'expression des gènes

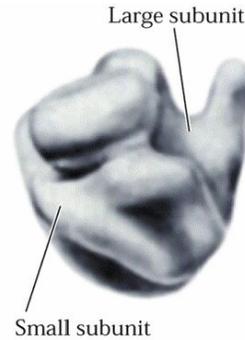


La séquence des nucléotides dans la molécule d'ADN dicte la séquence des acides aminés des chaînes polypeptidiques (protéines)

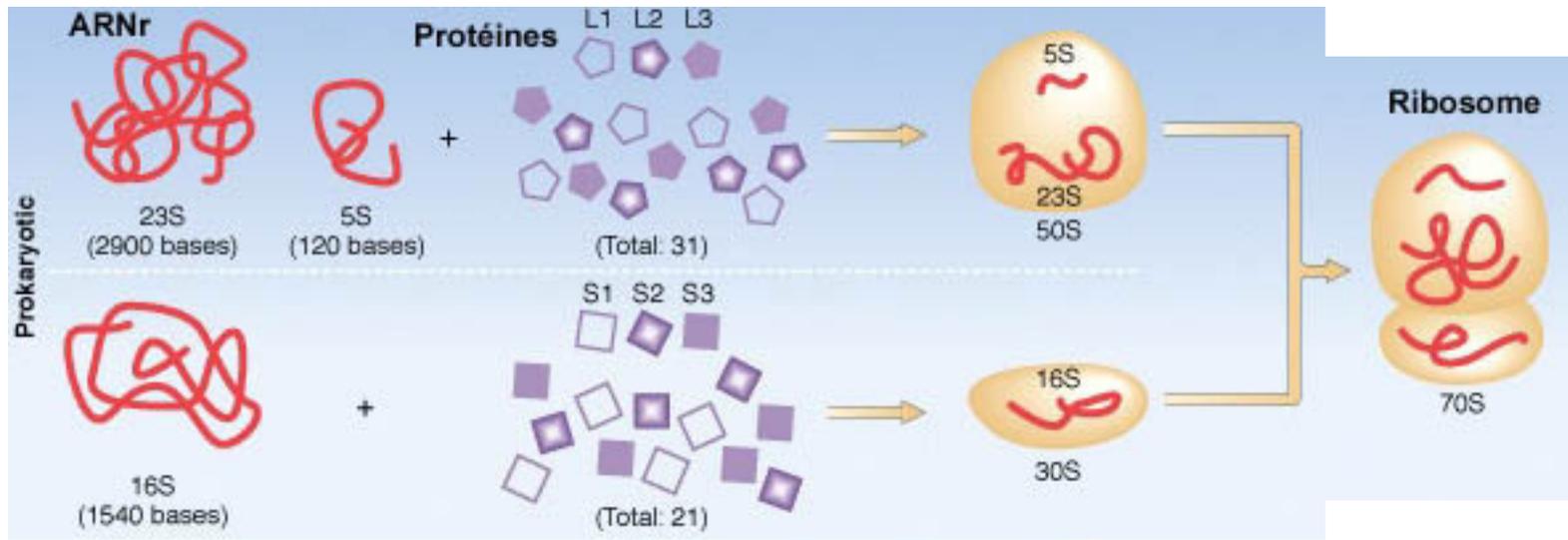


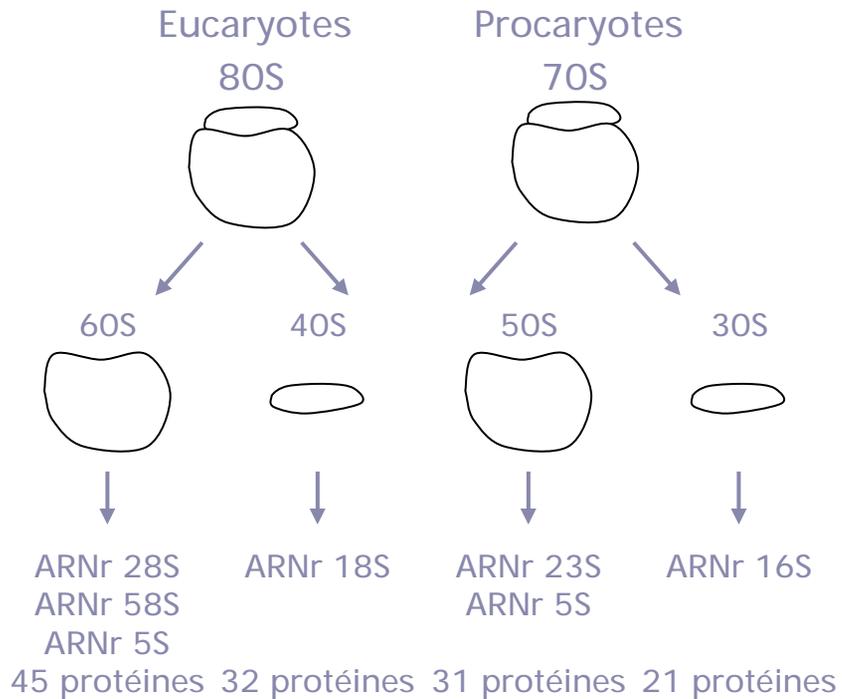
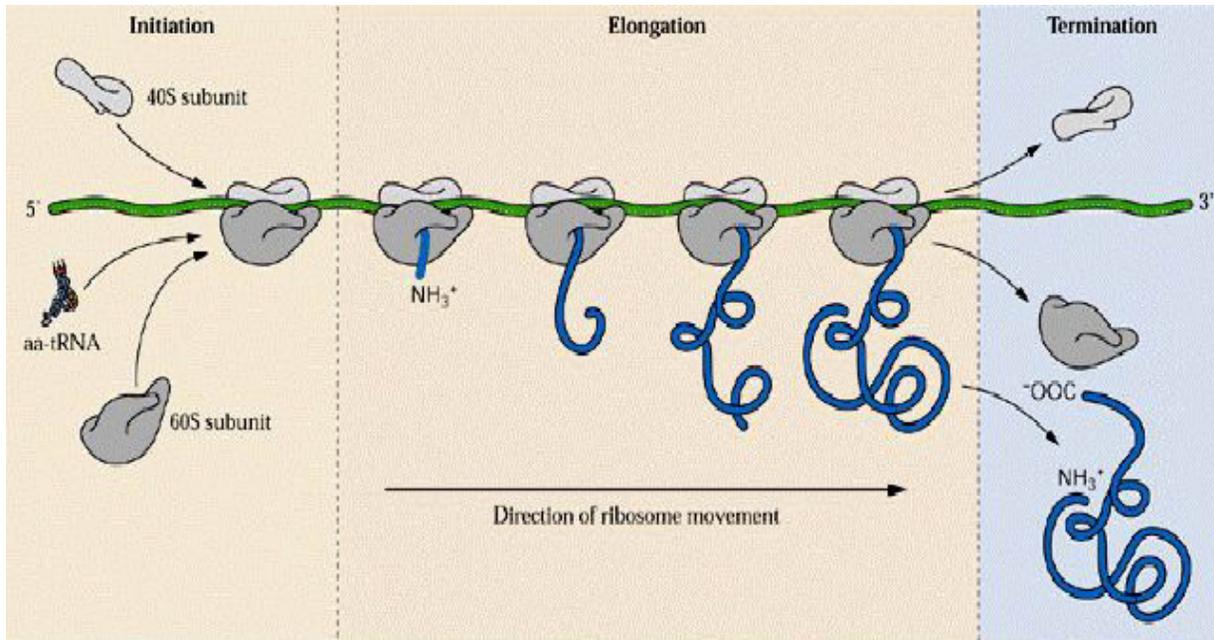
Les ribosomes

Organites (structure cellulaire de forme bien définie et qui remplit une fonction cellulaire déterminée) responsables de la synthèse des protéines



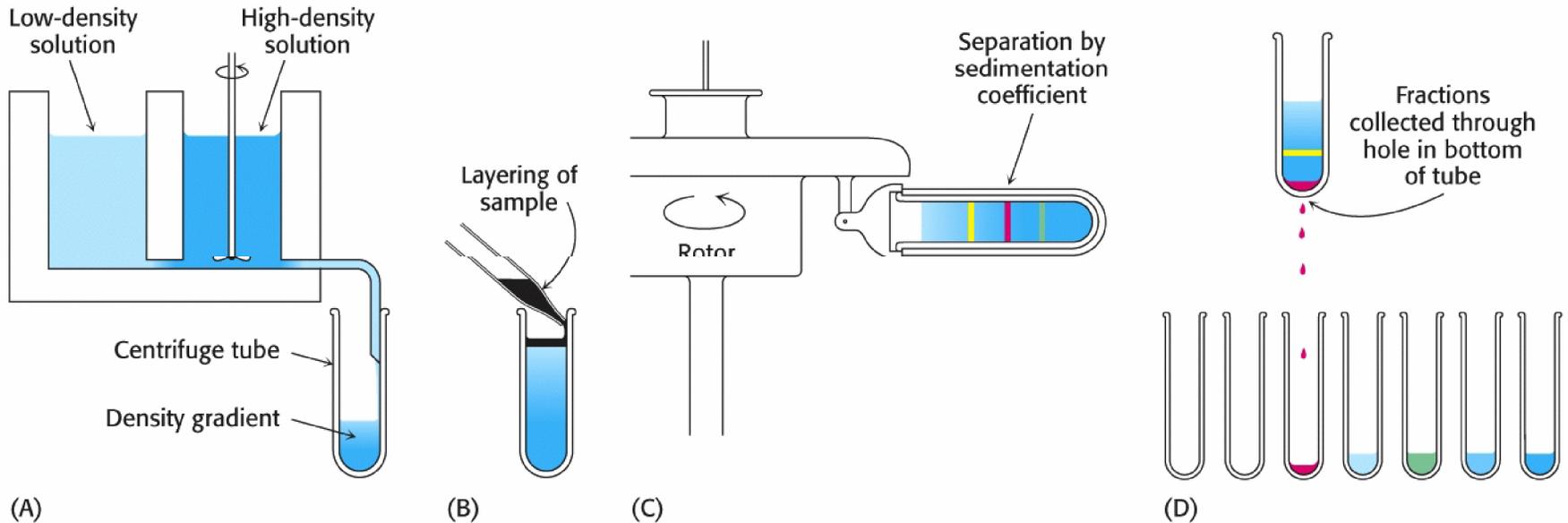
- Comprend 2 sous-unités de tailles différentes
- Association de **chaines d'ARN (ARNr)** et de **protéines**





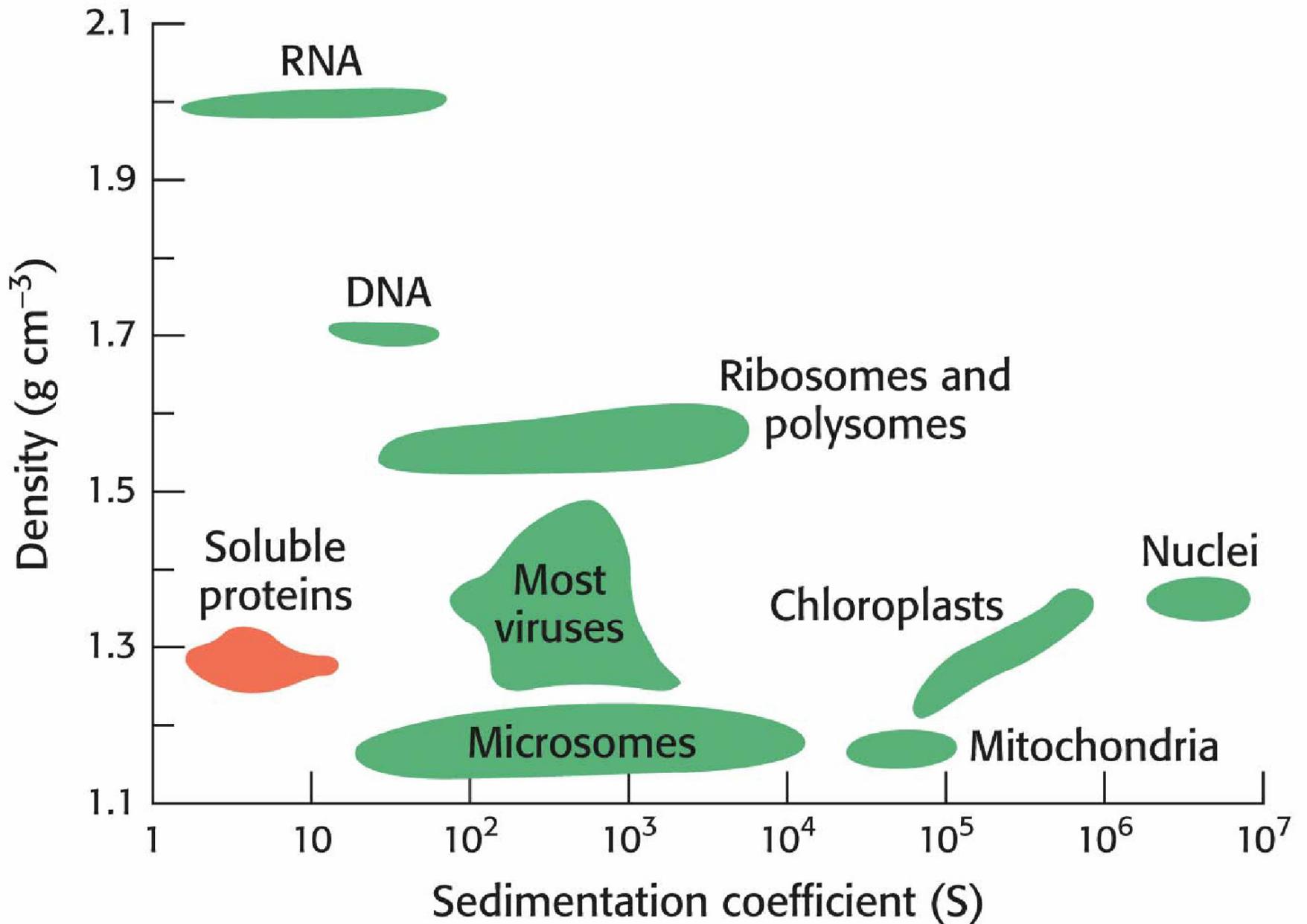
L'ARNr 16S est l'une des 3 molécules ARN associées aux ribosomes des procaryotes. 16S rend compte de sa taille.

Mesure de la vitesse de sédimentation d'une particule dans une ultracentrifugeuse



► Coefficient de sédimentation spécifique de chaque macromolécule

- fonction de sa taille et de son poids moléculaire
- s'exprime en unité de Sverdberg ($S = 10^{-13}$ secondes)



Carbohydrates

Oligosaccharides (< 30 monosaccharides/chaîne) et polysaccharides (> 30 monosaccharides/chaîne) fabriqués à l'intérieur de la cellule par une polymérase (transférase)

- Réserve d'énergie "fuel" biologique
- Composant structural (paroi cellulaire)
- Composant de l'ADN/ARN
- Formule générale : $(CH_2O)_n$
- Groupes fonctionnels -OH et =CO
- Différents groupes
 - Monosaccharides (glucose, galactose, fructose)
 - Disaccharides (maltose lactose sucrose)
 - Polysaccharides (cellulose, quitine)

Lipides

Graisses, phospholipides, stéroïdes

- Réserve d'énergie, "fuel" biologique
- Composant structural (paroi cellulaire)
- Hormones
- Composants : C, H, (O)

Caractérisation de la diversité microbienne d'un échantillon naturel

=

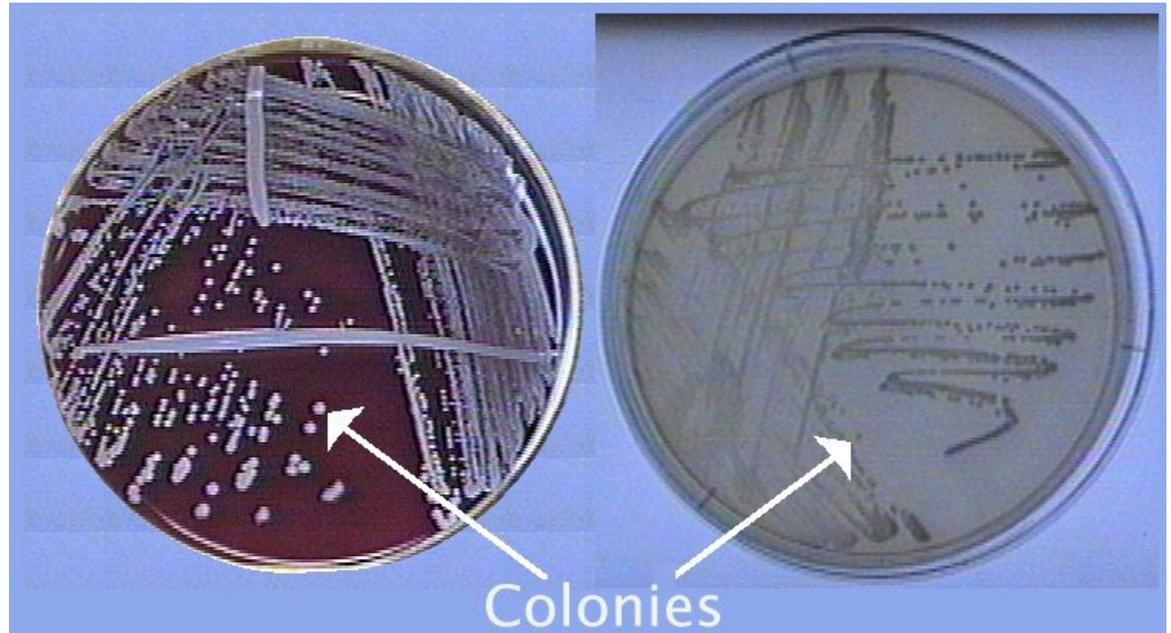
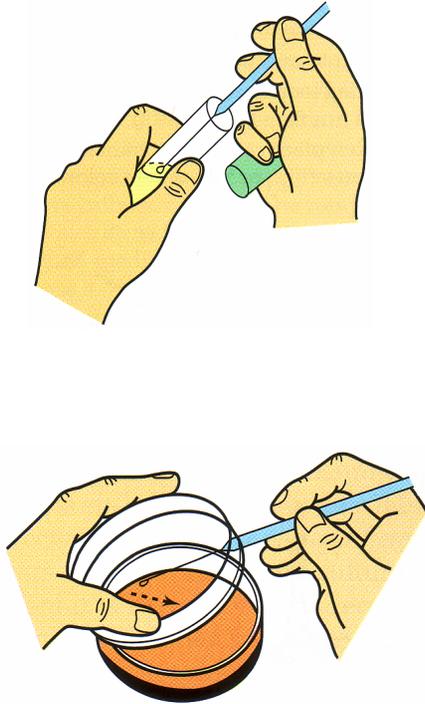
Détermination du nombre d'espèces et du nombre d'individus
par espèce dans un échantillon

+ Estimation des activités

Caractérisation de la diversité microbienne d'un échantillon naturel

Microbiologie classique =

Techniques d'isolement/de culture sur milieu sélectif pour obtenir des cultures pures (même espèce) et étudier leurs propriétés et rôles dans la nature



Identification et phylogénie basées sur des critères morphologiques, physiologiques et métaboliques

La **physiologie** étudie le fonctionnement mécanique, physique et biochimique des organismes vivants et de leurs interactions avec leur environnement.

Le **métabolisme** est l'ensemble des transformations moléculaires et des transferts d'énergie qui se déroulent de manière ininterrompue dans la cellule.

Caractérisation de la diversité microbienne d'un échantillon naturel

Isolement et culture

- ☆ Plus de 90% des micro-organismes présents dans la nature sont réfractaires à la culture en milieux enrichis
 - Les conditions de culture utilisées ne sont pas adaptées à certains taxons
 - Perte de la capacité à se multiplier suite à une situation prolongée de stress
 - Certaines espèces sont des symbiotes obligatoires d'autres espèces



Induction de large biais dans le recensement de la diversité microbienne

- ☆ La morphologie et les caractéristiques phénotypiques des microorganismes ne sont suffisamment informatives



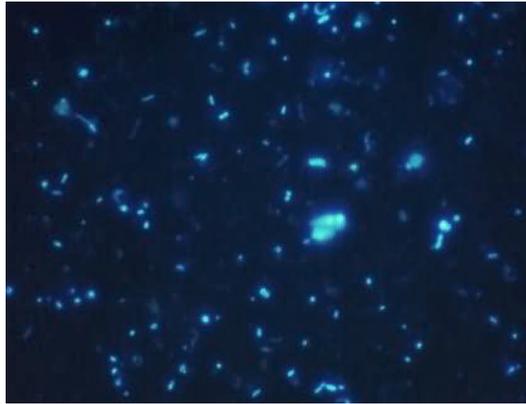
Difficulté de rattachement à des familles évolutives (classification phylogénétique)

Caractérisation de la diversité microbienne d'un échantillon naturel

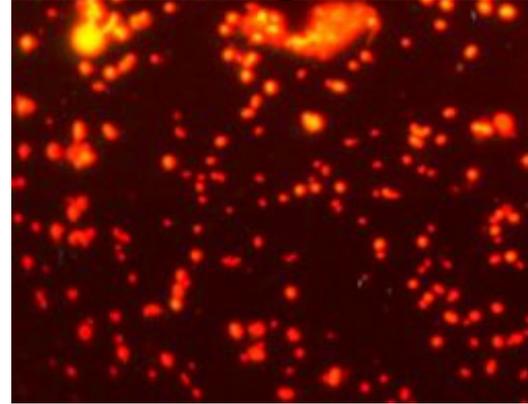
Approche moléculaire

Dénombrement effectué directement sur l'échantillon grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes se fixant sur l'ADN

DAPI



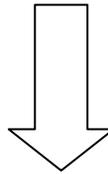
Acridine orange



(Nbre de cellules)_{comptage direct} > (Nbre de cellules)_{culture}

Type de microorganismes ?

Métabolisme ?



**Travail sur le matériel génétique (ADN/ARN)
caractéristique d'une espèce et
codant pour tous ces processus**

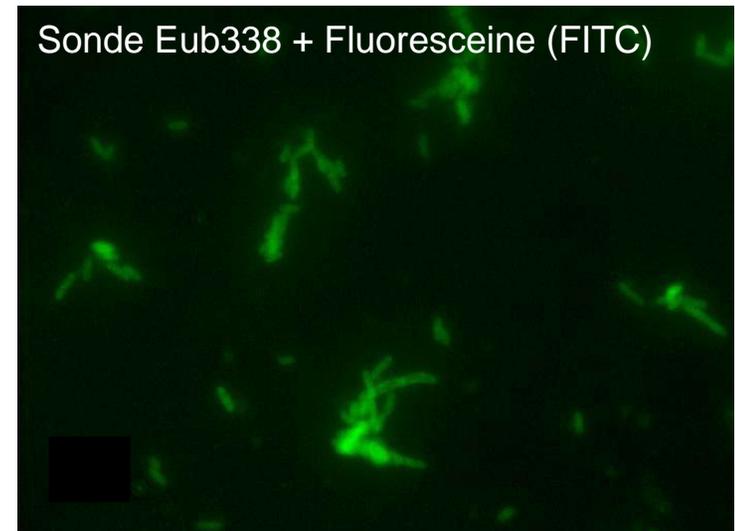
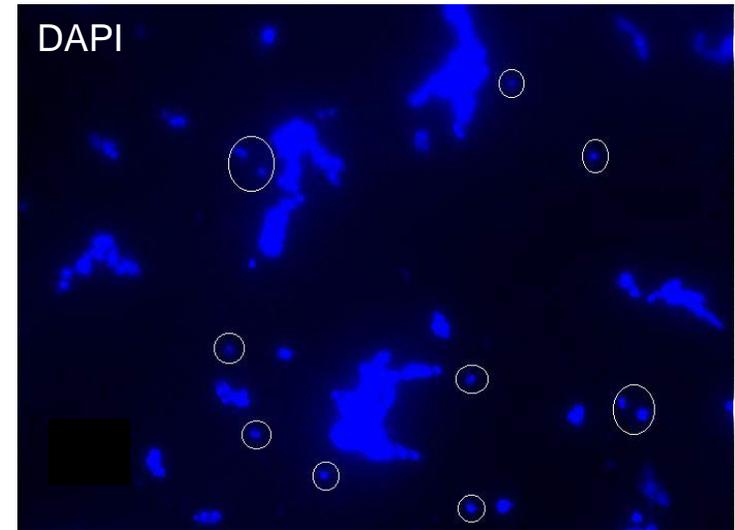
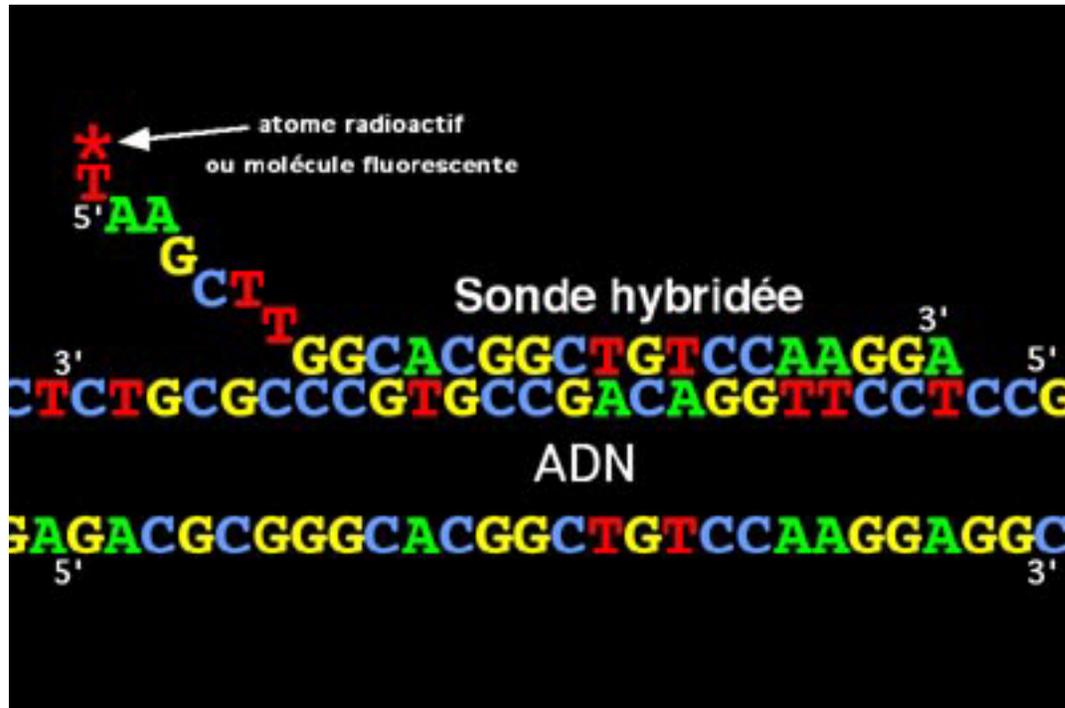
L'hybridation d'acides nucléiques ou de protéines

détection et identification d'une molécule d'ADN ou d'ARN, ou de protéine de séquence donnée dans un mélange

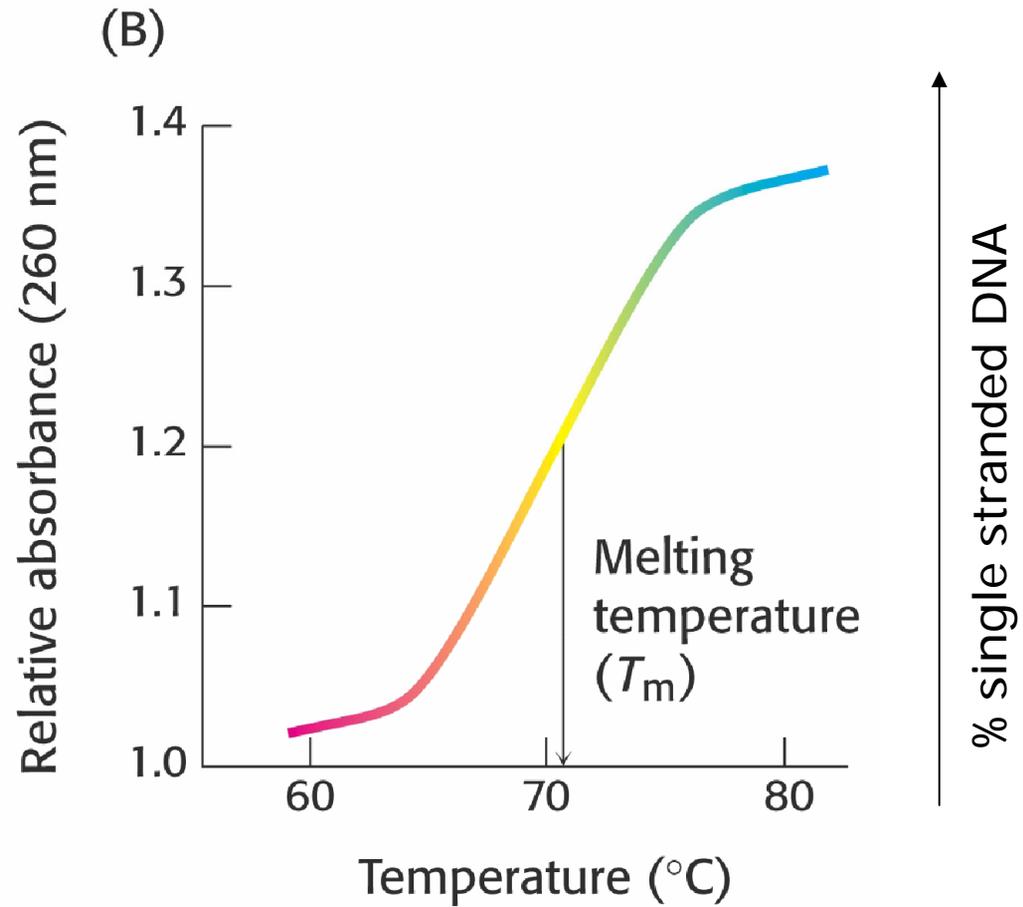
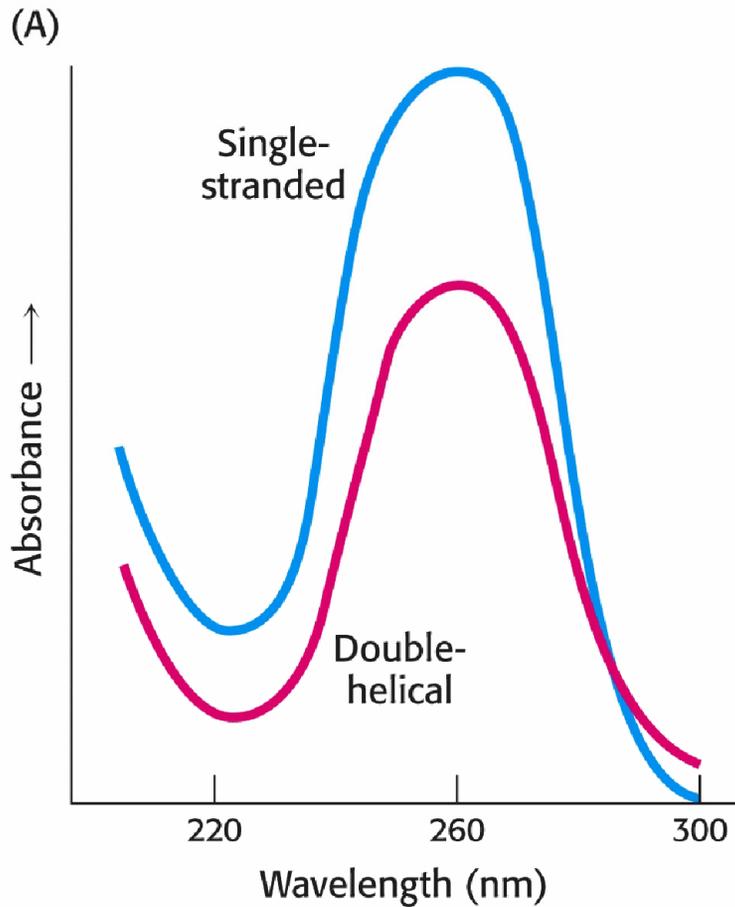
⇒ Utilisation de sondes complémentaires marquées (fluorescentes ou radioactives)

Caractérisation de la diversité microbienne d'un échantillon naturel

Approche moléculaire par hybridation



Fusion de l'ADN (réaction réversible)



T_m : température de fusion
= 50% des fragments sous forme simple brin

fonction de :

- longueur du fragment simple brin
- composition en bases
- présence de certains ions dans le milieu

L'hybridation d'acides nucléiques ou de protéines

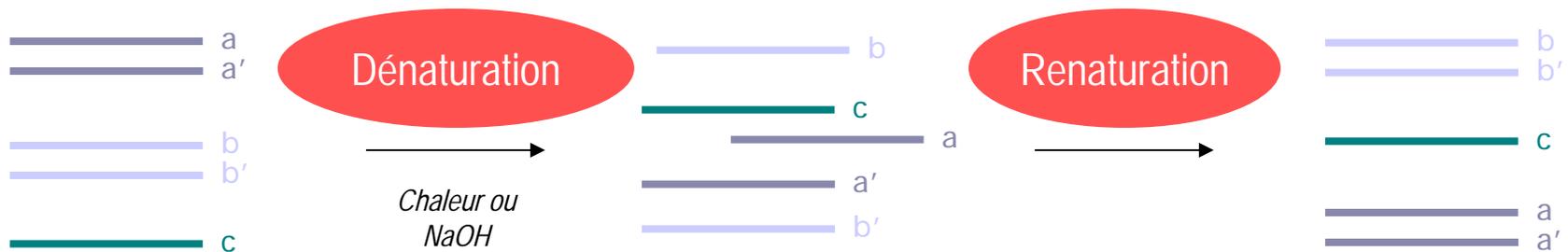
Principe

✓ Dénaturation d'ADN double brin de séquences différentes

séparation des brins par rupture des liaisons hydrogènes ($T > T_m$ ou $\text{pH} > 12$)

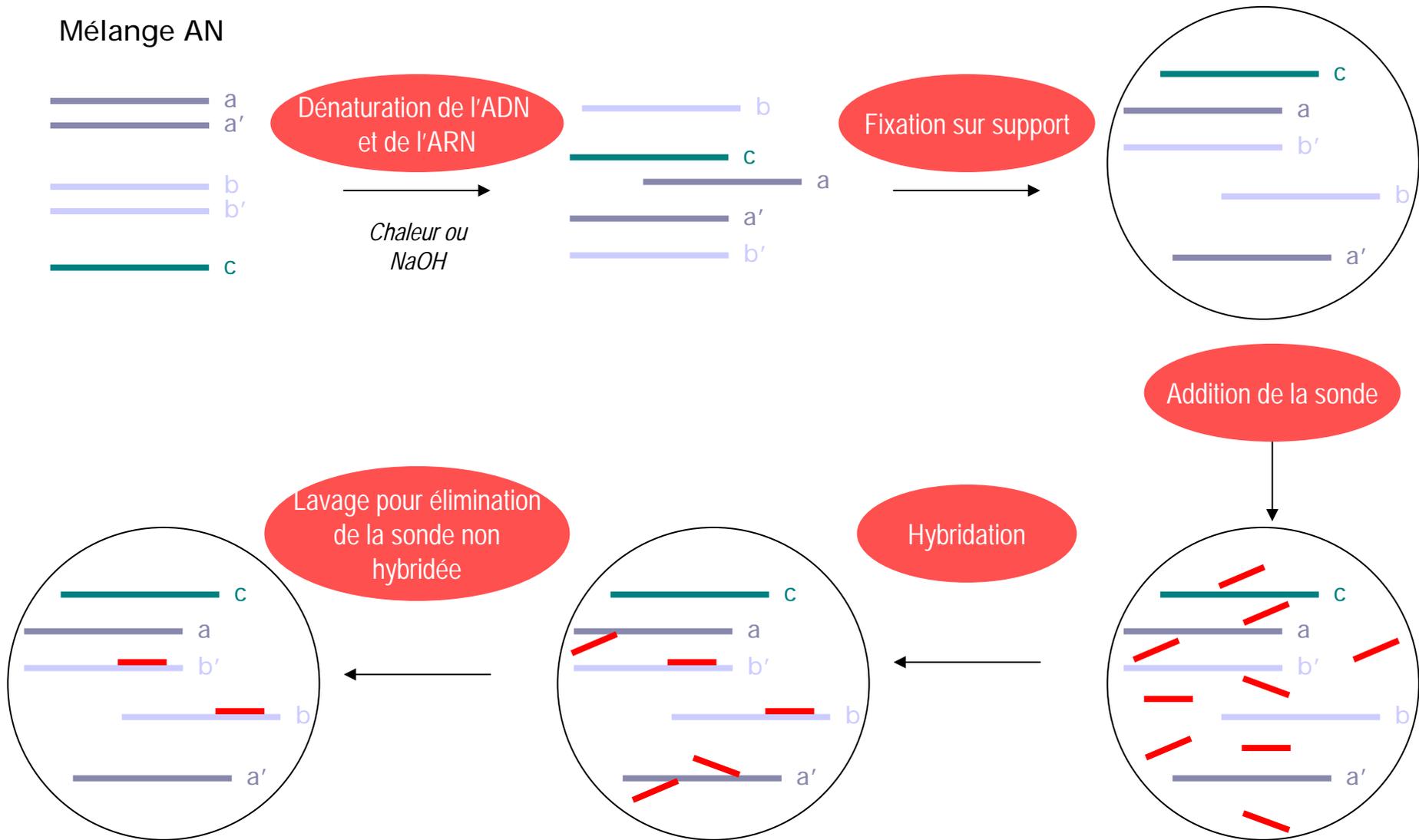
✓ Réassociation spécifique des ADN simple brin

conditions favorables température/pH



(a,a'), (b,b') séquences double brin complémentaires

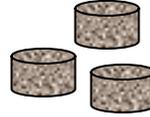
Mélange AN



Températures d'hybridation et de lavage < à T_m sonde (~ 5 à 10°C)

(favoriser et conserver l'association de la sonde sur sa cible et défavoriser les mésappariements de la sonde avec une séquence homologue)

Caractérisation de la diversité microbienne d'échantillons naturels



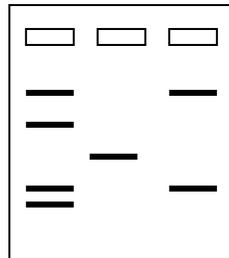
Echantillons environnementaux

Extraction de l'ADN
Amplification PCR du gène rrs



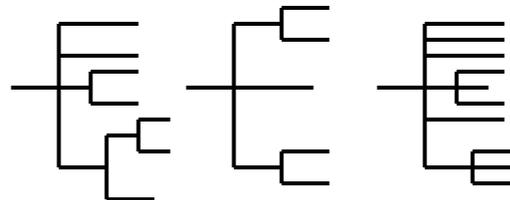
Analyse des amplicons
(produits de PCR)

DGGE/TGGE/RFLP/RISA
Avec ou sans agents dénaturants
thermique ou chimique



Populations microbiennes différentes
= différents bandes et positions

Clonage
+
Séquençage



Populations microbiennes différentes
= différents arbres

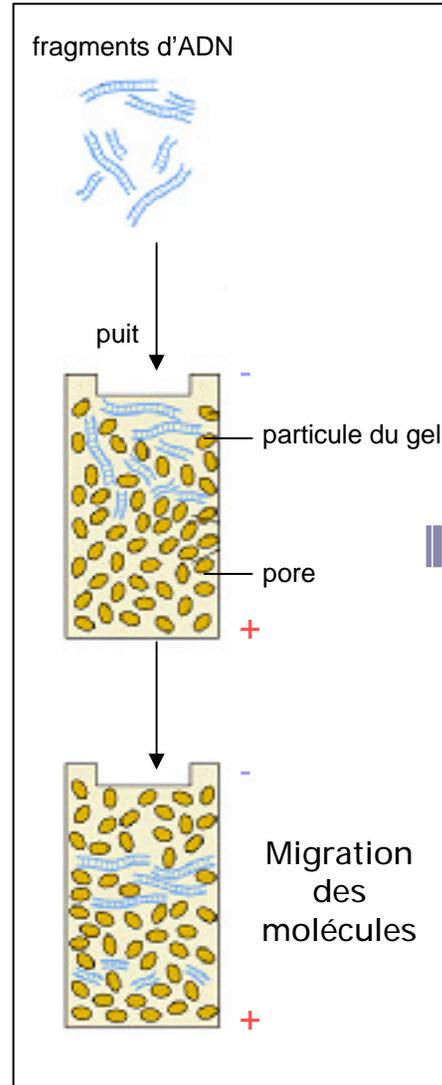
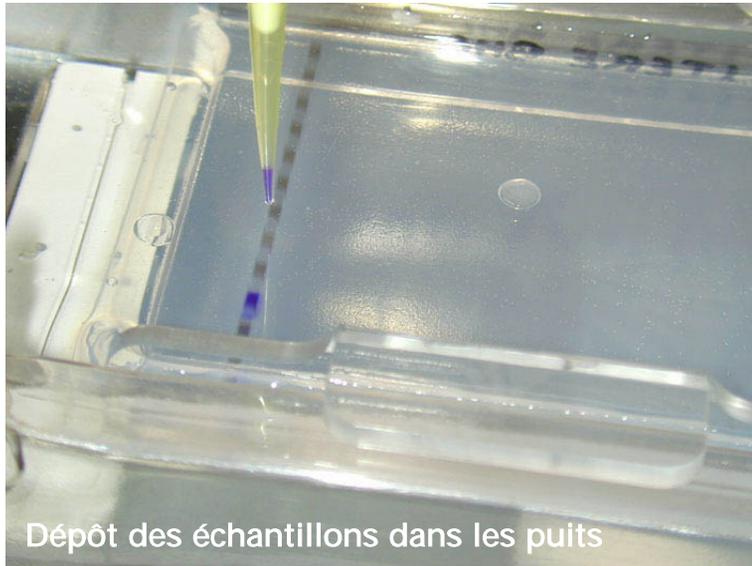
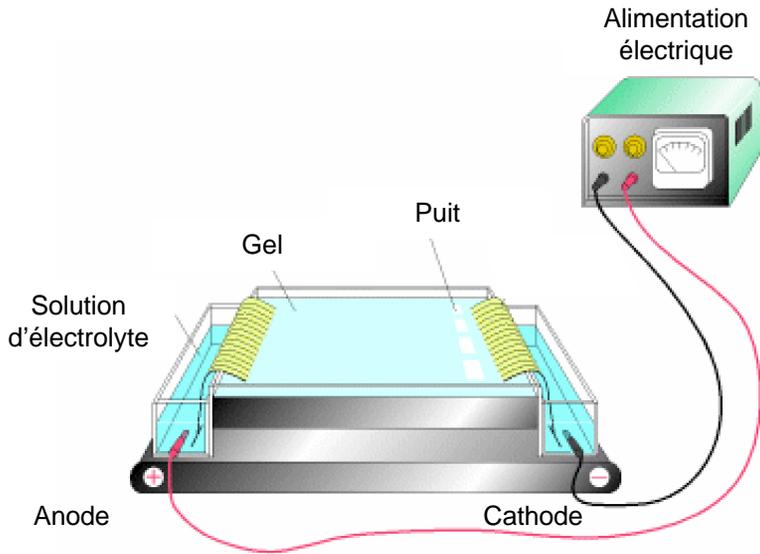
EXTRACTION DES MACROMOLECULES:

CAS DES ACIDES NUCLEIQUES

Problème 1 : «Visualisation » des acides nucléiques

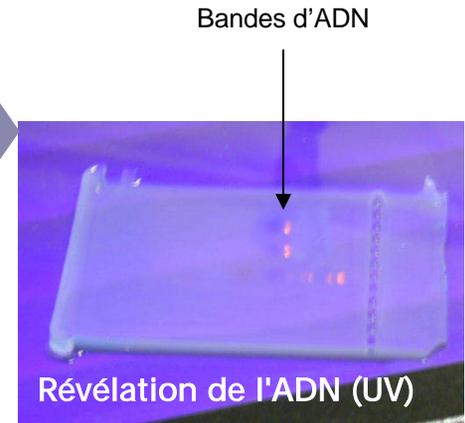
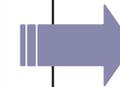
L'électrophorèse en gel

Visualisation des fragments d'ADN



ADN (anions) migrent vers le pôle + plus ou moins rapidement

Migration à travers les pores du gel (inversement proportionnelle à la longueur de leur chaîne)

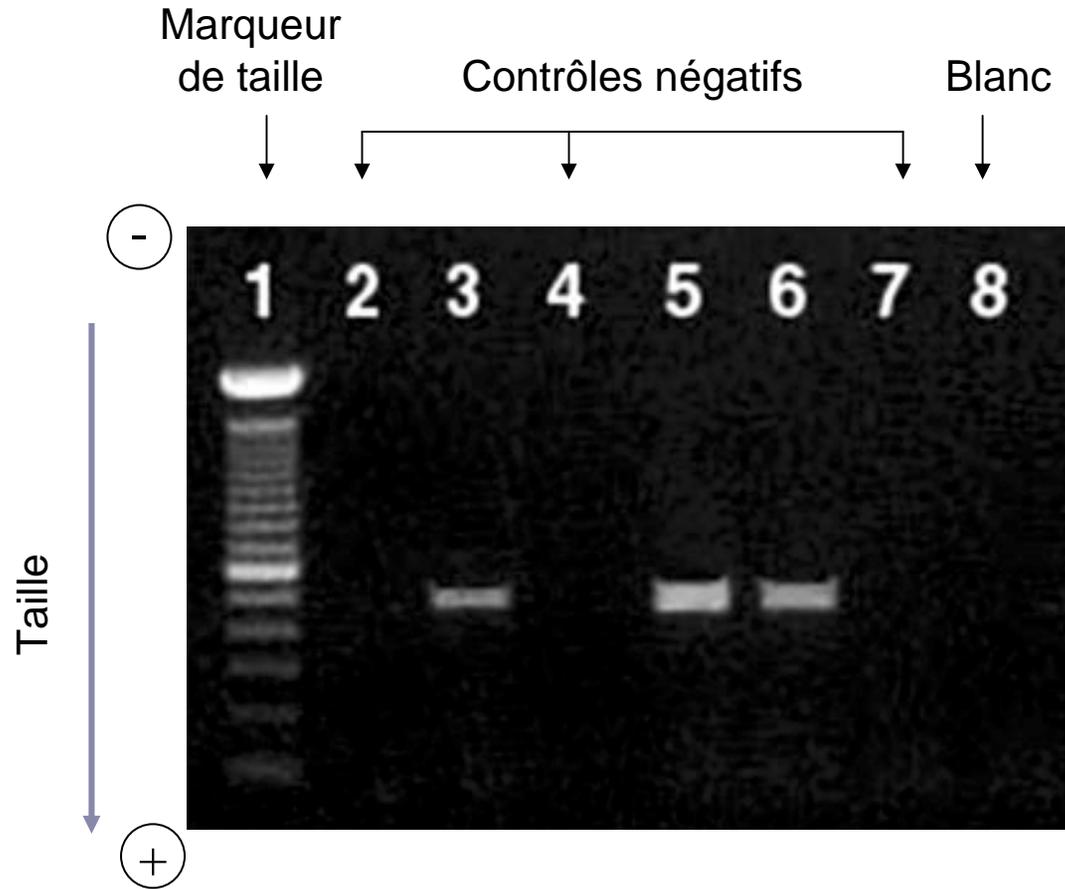


Quand ?

Contrôle de l'ADN total extrait d'un échantillon
Visualisation des produits de PCR

L'électrophorèse en gel

Estimation de la quantité et de la taille des fragments d'ADN



Les fragments d'ADN ont migré de manière inversement proportionnelle à la longueur de leur chaîne

Problème 2 : Faible quantité

Amplification par PCR

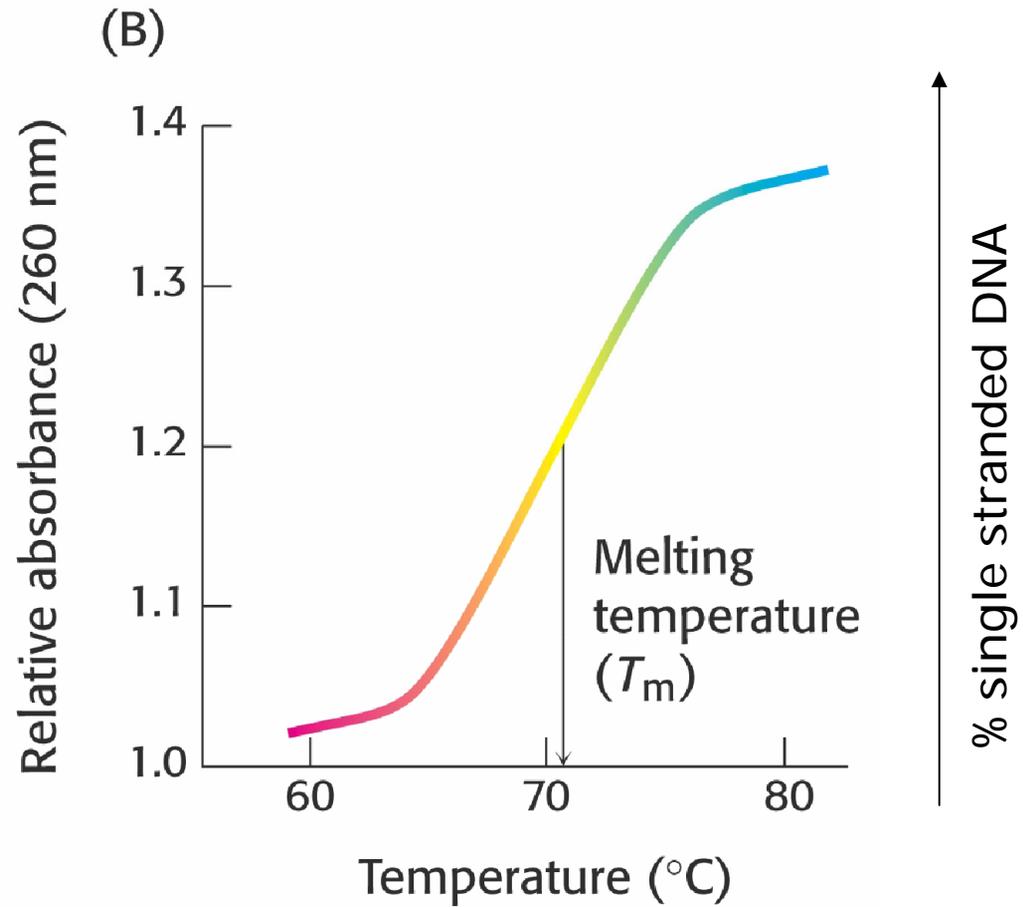
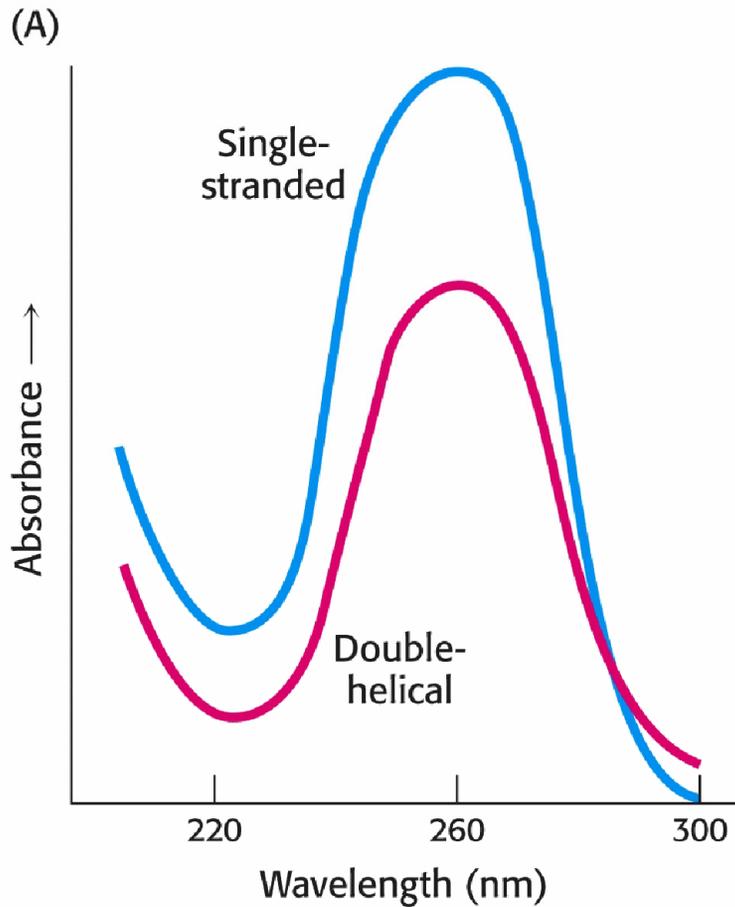
(Réaction en Chaîne de la Polymérase)

Amplification *in vitro* d'une séquence d'ADN à partir d'un échantillon peu abondant

Basé sur l'ADN polymérase : enzyme capable de catalyser la réaction d'élongation d'un brin d'ADN complémentaire

- Recherche d'OGM
- Criminalité
- Détection de mutation (maladie)
- Clonage de gène
- Etude de l'expression d'un gène (à partir des ARN : RT-PCR)
- Séquençage de l'ADN
- ...

Fusion de l'ADN (réaction réversible)



T_m : température de fusion
= 50% des fragments sous forme simple brin

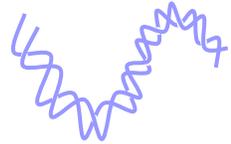
fonction de :

- longueur du fragment simple brin
- composition en bases
- présence de certains ions dans le milieu

Amplification par PCR

Principe

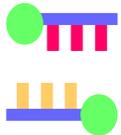
Tampon de réaction
apporte les sels et éléments
nécessaires à la réaction



Matrice
contient la séquence
à amplifier

pol

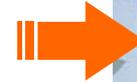
ADN polymérase
enzyme synthétisant le brin
complémentaire d'ADN



Amorces
séquences de 10-14
nucléotides, spécifiques de la
séquence à amplifier



dNTP
mélange des 4
désoxyribonucléotides
constitutifs de l'ADN

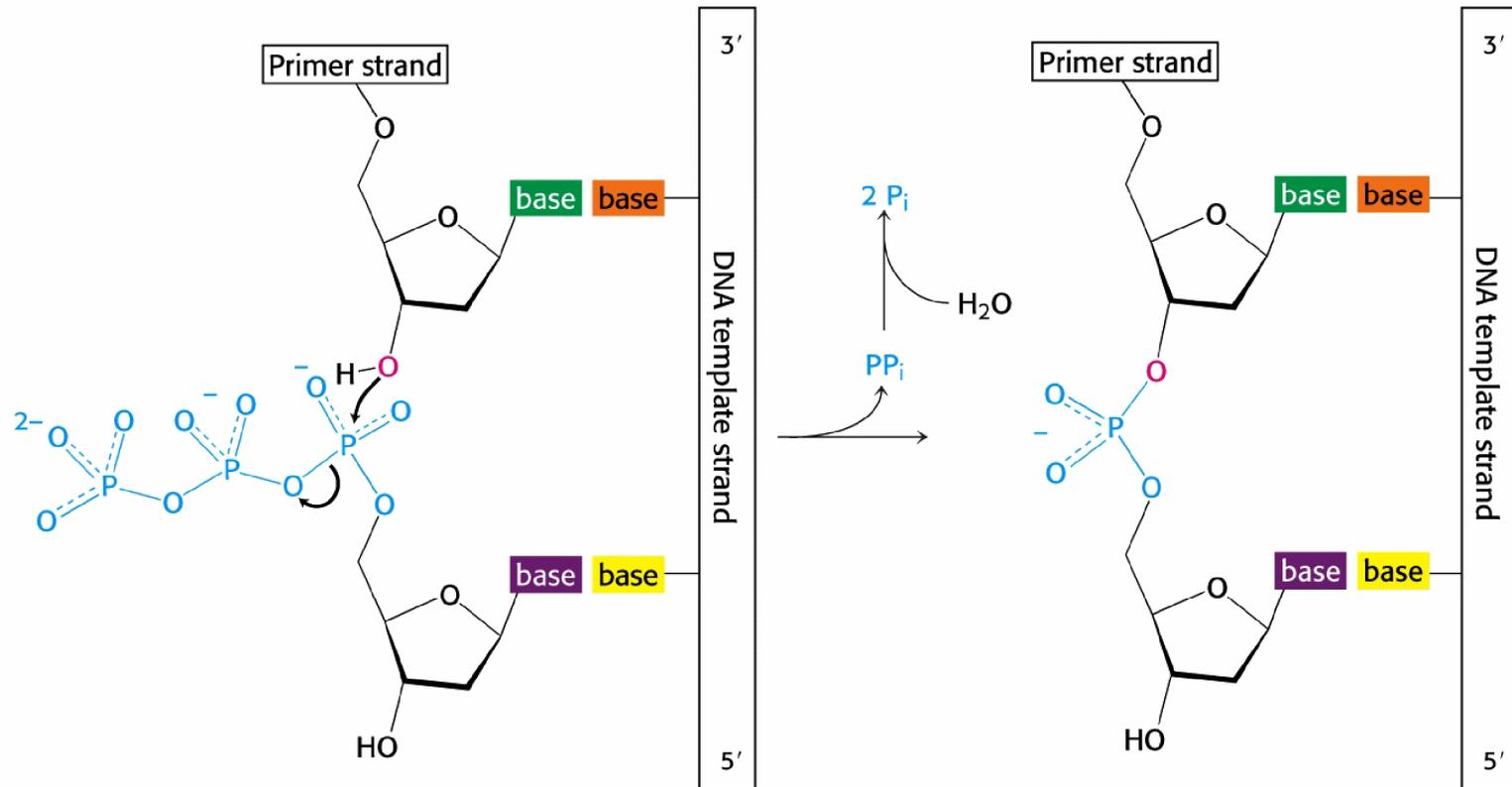


Thermocycleur

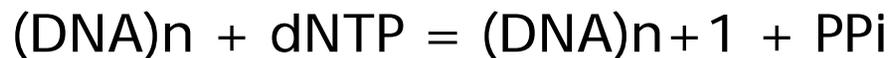


Réplication de l'ADN par l'ADN polymérase

(origine : bactéries ou phages)



- Ajout d'un dNTP (nucléotides triphosphates) à l'extrémité hydroxyle en 3' de l'ADN



- La nouvelle chaîne d'ADN est assemblée directement sur le brin modèle préexistant

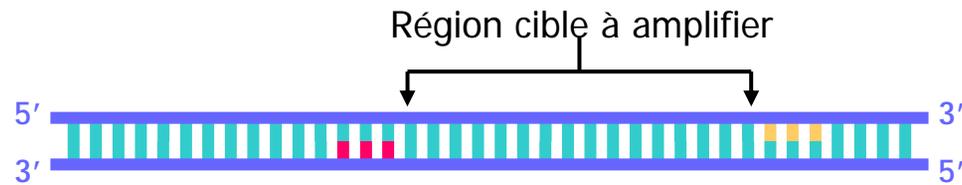
Amplification par PCR

Différent types de polymérase existent, avec

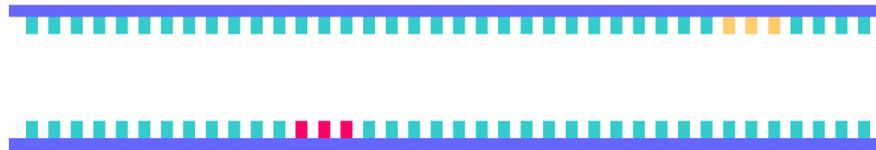
- des stabilités différentes
- des efficacités différentes
- des activités différentes

Enzyme	Organisme	Taux d'erreurs (x 10 ⁶)	stabilité
<i>Taq</i>	<i>T. aquaticus</i>	20-100	9 min à 97,5°C
<i>Taq</i> (fragment de Ztoffel)	<i>T. aquaticus</i>	50	21 min à 97,5°C
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furius</i>	1,6	240 min à 95°C

1^{er} cycle de PCR



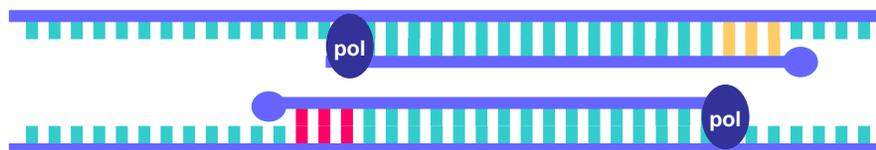
1 Dénaturation (95°C- 1 mn) : séparation des 2 brin d'ADN



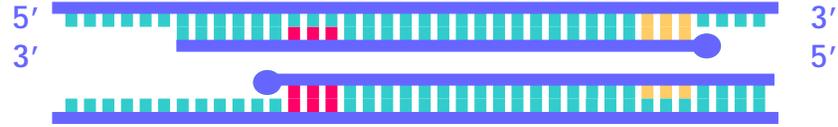
2 Hybridation spécifique des amorces (dépend des amorces env. 55°C)



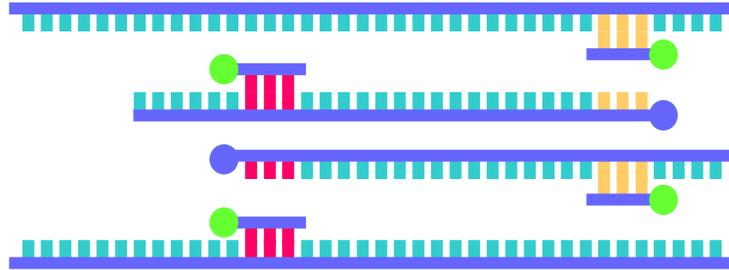
3 Elongation (72°C - 1mn) : synthèse d'un nouveau brin d'ADN par la polymérase



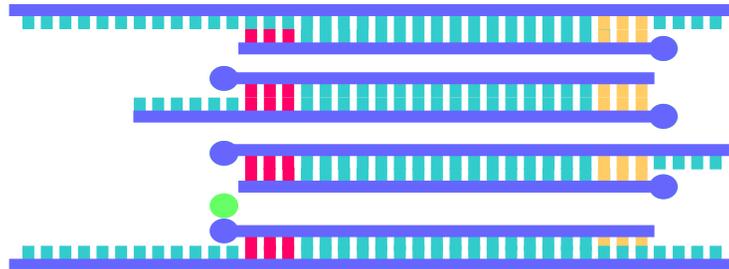
2^{ème} cycle de PCR



Dénaturation
+
Hybridation des amorces



Fin d'élongation

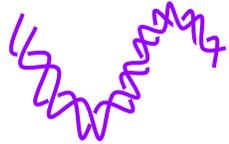


} apparition du produit de PCR

Amplification par RT-PCR

À partir de l'ARN

Tampon de réaction
apporte les sels et éléments
nécessaires à la réaction



ARNm

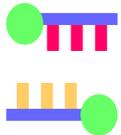
contient la séquence
à amplifier



ADN polymérase

enzyme synthétisant le brin
complémentaire d'ADN

Reverse
Transcriptase
enzyme



Amorces

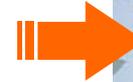
séquences de 10-14
nucléotides, spécifiques de la
séquence à amplifier



dNTP

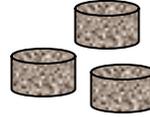
mélange des 4
désoxyribonucléotides
constitutifs de l'ADN

Thermocycleur

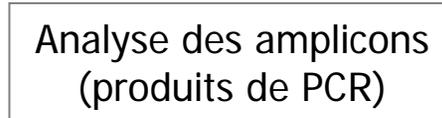
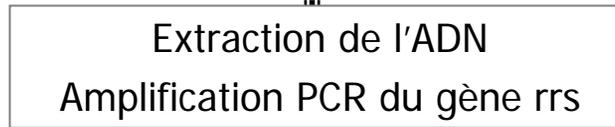


Problème 3 : Caractériser les fragments d'ADN/ARN

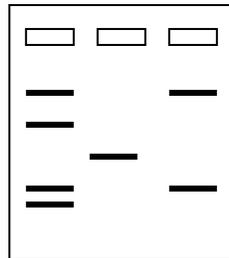
Caractérisation de la diversité microbienne d'échantillons naturels



Echantillons environnementaux

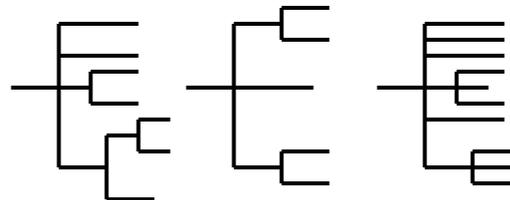


DGGE/TGGE/RFLP/RISA
Avec ou sans agents dénaturants
thermique ou chimique



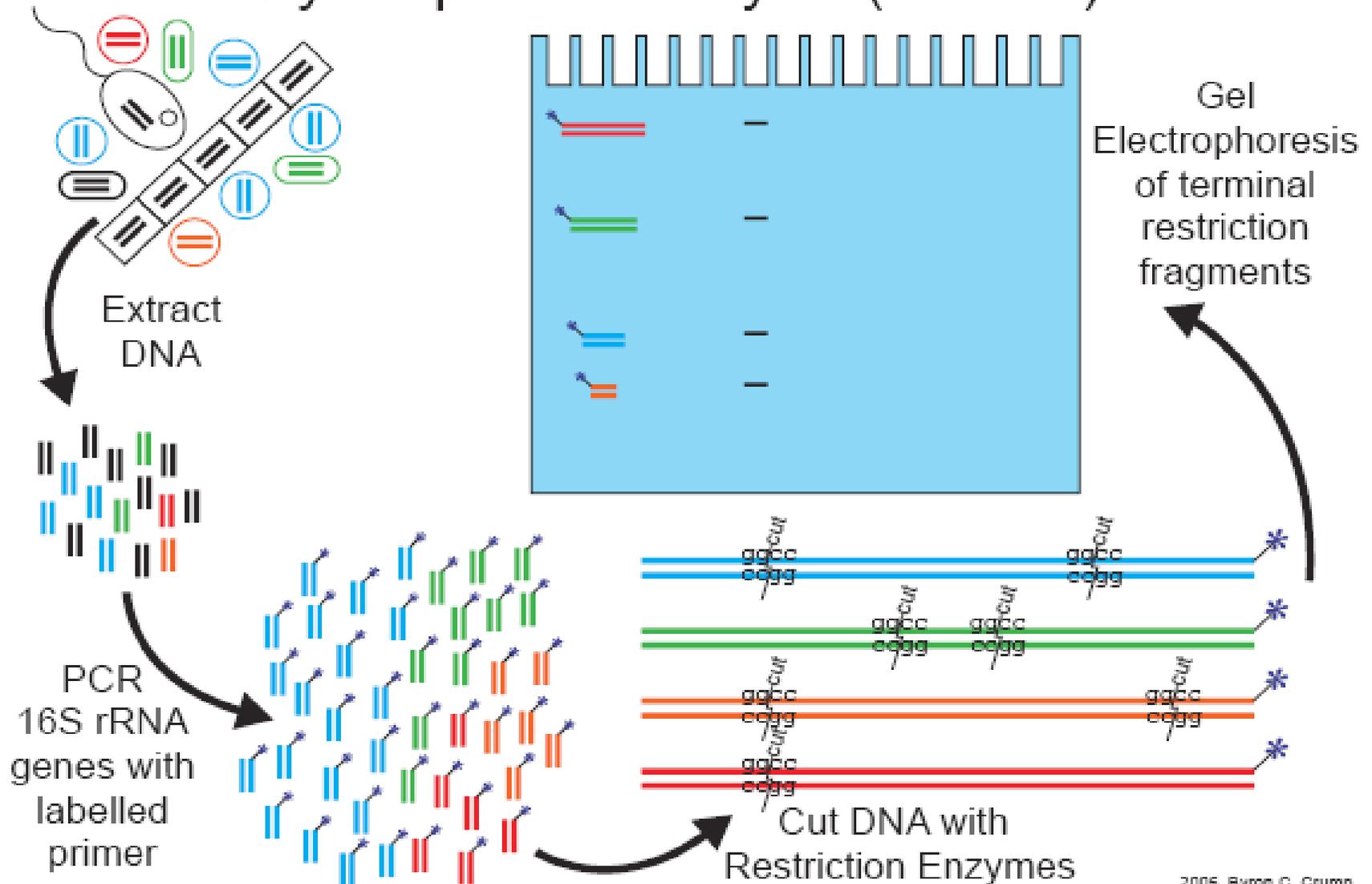
Populations microbiennes différentes
= différents bandes et positions

Clonage
+
Séquençage



Populations microbiennes différentes
= différents arbres

Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (TRFLP)



TRFLP

- *Révélation du polymorphisme par des enzymes de restriction :*

=Digérer l'ADN génomique par des enzymes de restriction. L'existence de différences de séquences entre les individus conduit à des différences dans les sites de digestion entre ces individus.

Après séparation des fragments obtenus par électrophorèse, on observe donc des fragments de tailles diverses selon les individus.

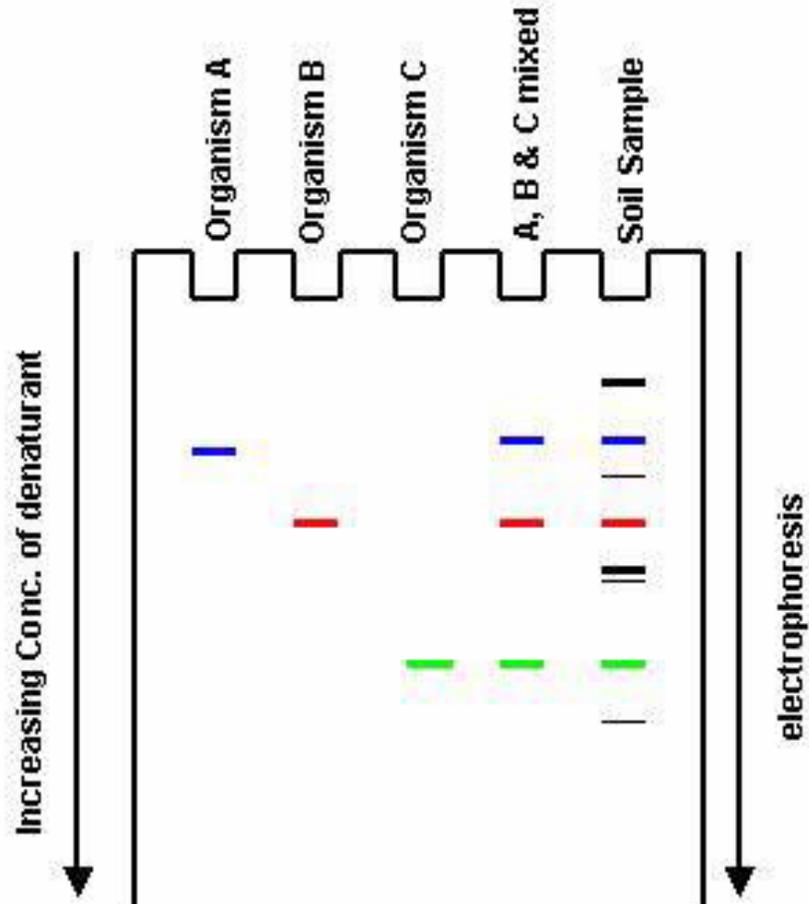
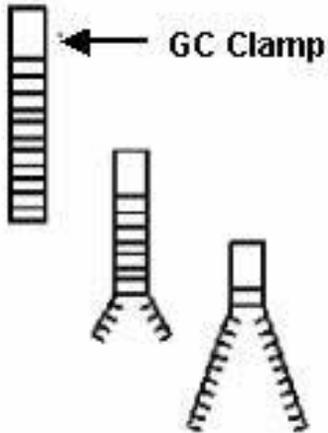
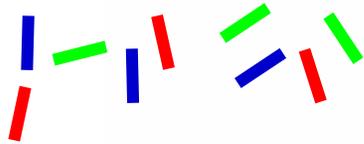
Detection of single base polymorphisms

DGGE/TGGE

Denaturing /Thermal gradient gel electrophoresis

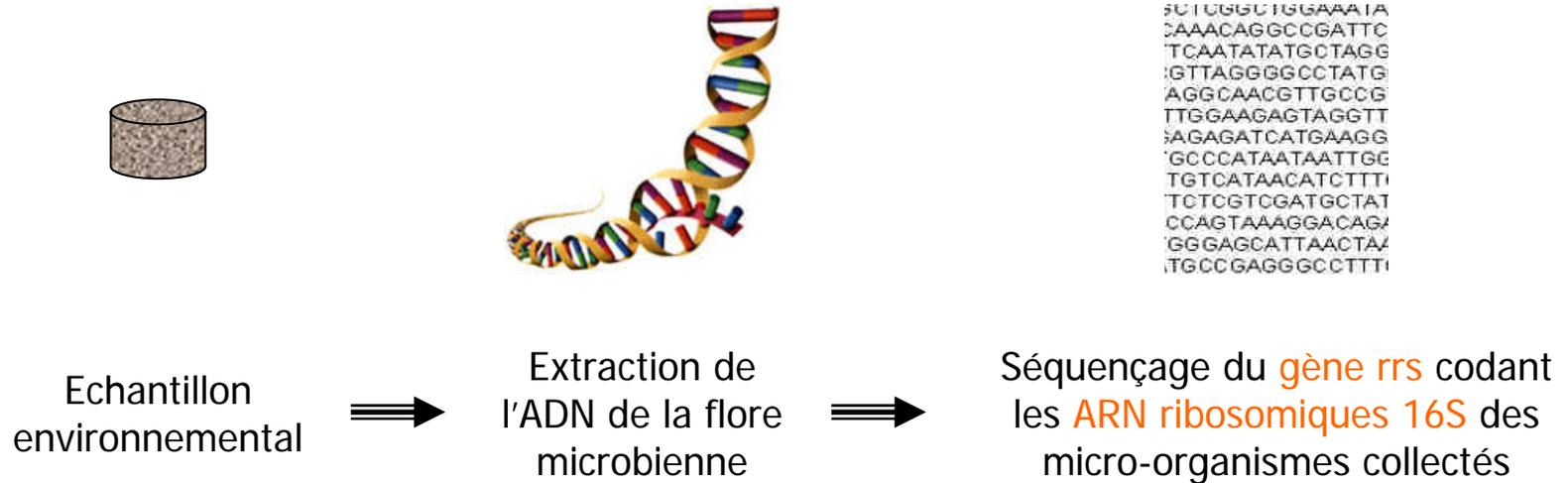
Utilisation d'un dénaturant chimique ou thermique

amplified 16S rRNA genes



La **DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)** est une technique d'électrophorèse permettant la séparation de molécules d'acides nucléiques (ADN ou ARN) de même taille. Son principe consiste à déposer un échantillon d'ADN (ou d'ARN) sur un gel d'électrophorèse contenant un agent dénaturant (par exemple l'urée). Dans un gel DGGE, les fragments d'ADN sont soumis à différentes concentration du dénaturants. Lorsque le T_m (T_m : melting temperature) caractérisant le domaine de fusion du fragment le plus bas est atteint, le fragment se dénature partiellement, ce qui stoppe sa migration.

Approche moléculaire par analyse précise des gènes



- Séquençage d'un grand nombre et comparaison du polymorphisme (variations entre individus dans la séquence des gènes) des séquences selon les différents échantillons extraits
- Nécessite une étape de **clonage** pour séparer chacun des gènes amplifiés et donc la réalisation de banque de clones que l'on peut comparer grâce à la construction d'arbres phylogénétiques

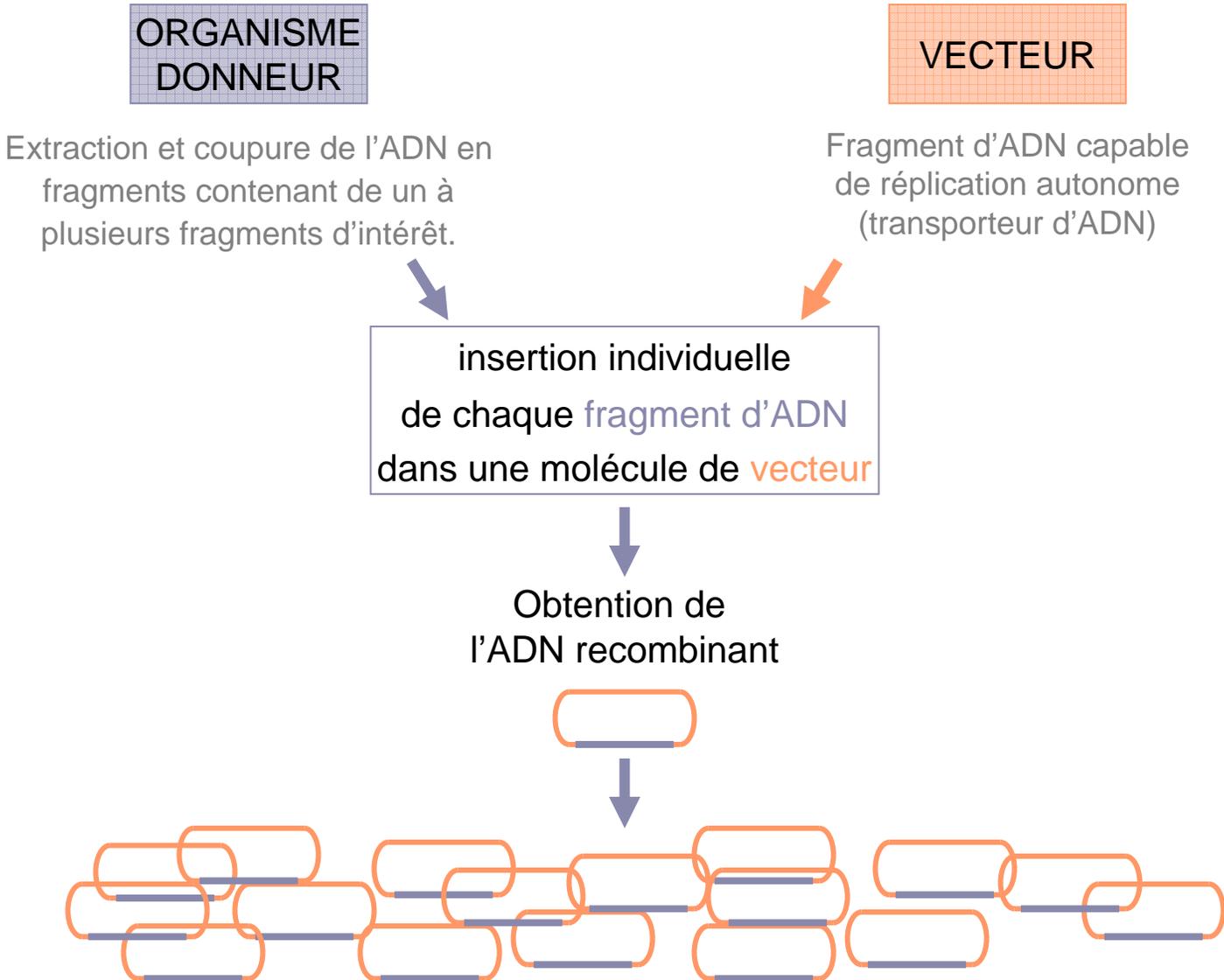
Le gène *rrs*

- Présent chez tous les procaryotes
- Possède des domaines hautement conservés qui n'ont fixé que très peu de mutations au cours de l'évolution
- Possède des domaines variables d'autant plus différents entre deux individus que ceux ci sont phylogénétiquement éloignés

Problème 4 : Décoder les séquences

Le clonage

Technique de l'ADN recombinant



Les vecteurs de clonage

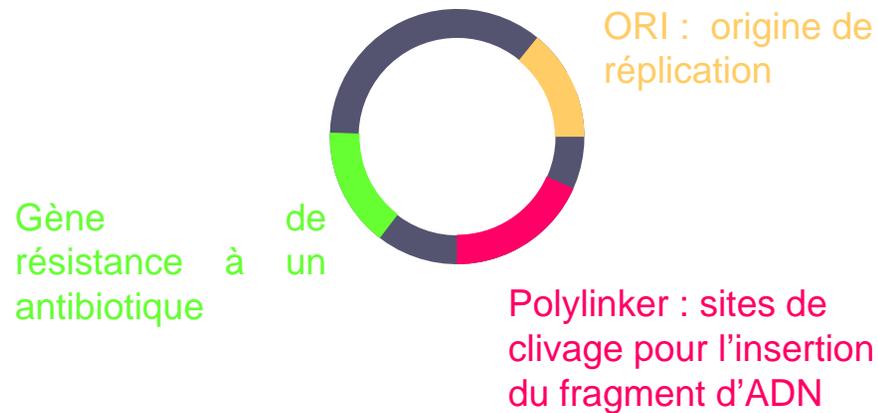
- capables de répllication autonome dans une cellule hôte donnée
- possède un polylinker ou site multiple de clonage
- supporte l'insertion d'un fragment d'ADN plus ou moins grand

Taille maximum approximative du fragment d'ADN qui peut être cloné dans chaque vecteur :

Type de vecteur	ADN cloné (en kb)
Plasmide	20
Phage lambda	25
Cosmide	45
Phage P1	100
BAC(bacterial artificial chromosome)	300
YAC (yeast artificial chromosome)	1000

Les plasmides comme vecteurs de clonage

- Molécule d'ADN circulaire de taille réduite et d'origine bactérienne
- Peut être considérée comme un minichromosome capable de réplication autonome
- Résistant à un ou plusieurs antibiotiques



Technologies de l'ADN recombinant

Basée sur l'enzymologie des acides nucléiques

(Besoins d'enzymes pour couper, lier, répliquer l'ADN et transcrire l'ARN en ADN)

- Les **nucléases** et **endonucléases** (enzymes de restriction) :

coupent de longs fragments d'ADN en morceaux plus petits et manipulables (de manière aléatoire ou ciblée)

- Les **ADN ligases**

lient les fragment d'ADN entre eux

- Les **ADN/ARN polymérases** :

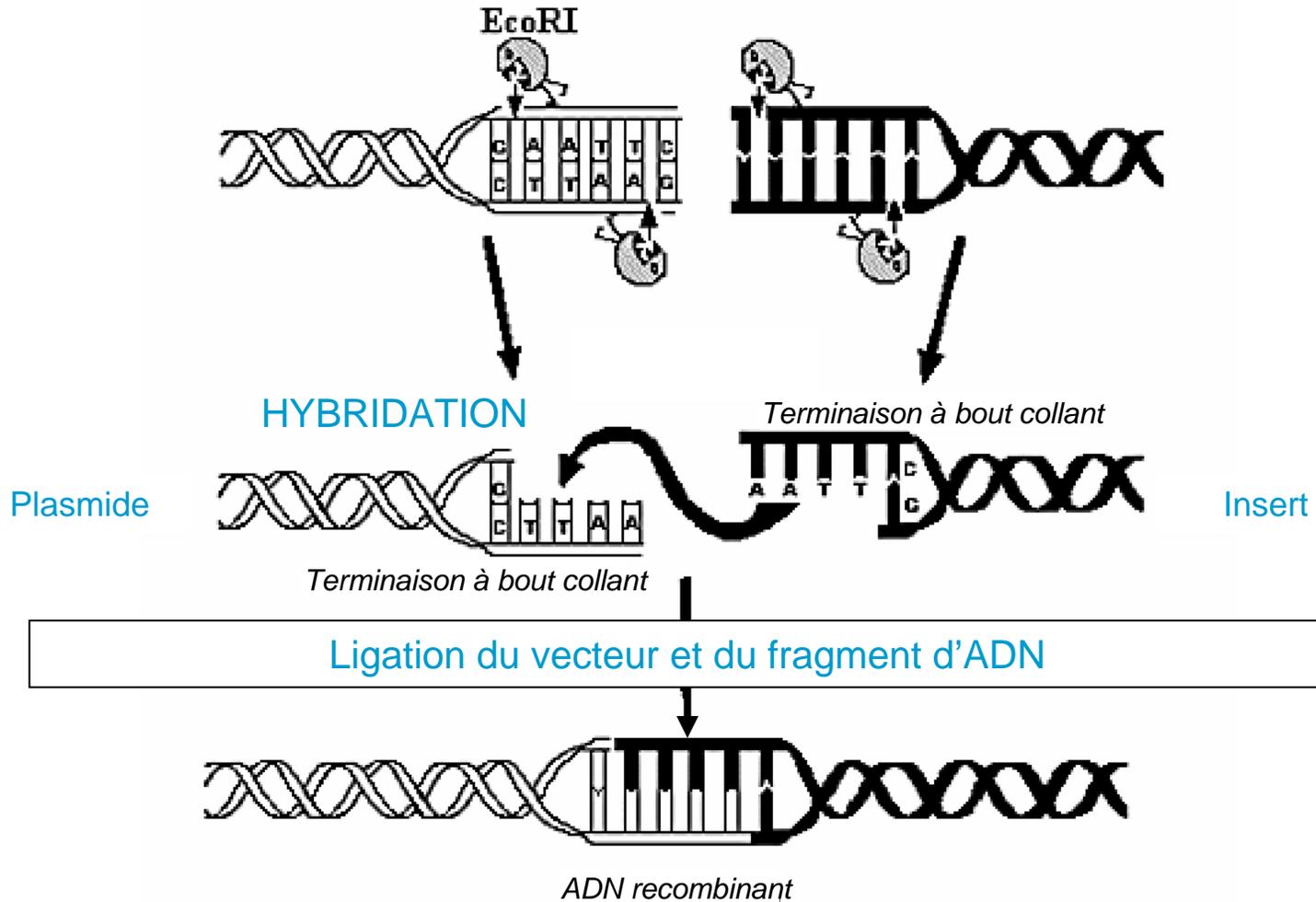
répliquent un fragment d'ADN à partir d'un brin modèle

- Les **transcriptases réverse** :

transcrivent de l'ARN en ADN complémentaire

Les enzymes de restriction et de ligation

Digestion des terminaisons par les enzymes de restrictions



Une enzyme, la ligase, est capable de lier de façon covalente deux molécules d'ADN en une.

digestion par
enzymes de
restriction
(endonucléase)

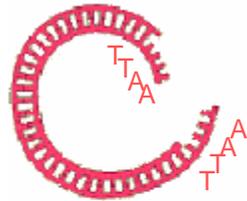
hybridation

ligation par
ADN ligase

vecteur
(plasmide)



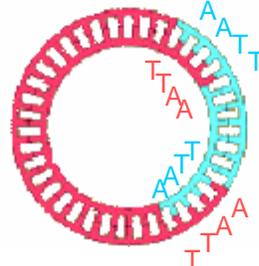
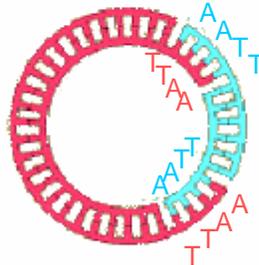
site de clivage



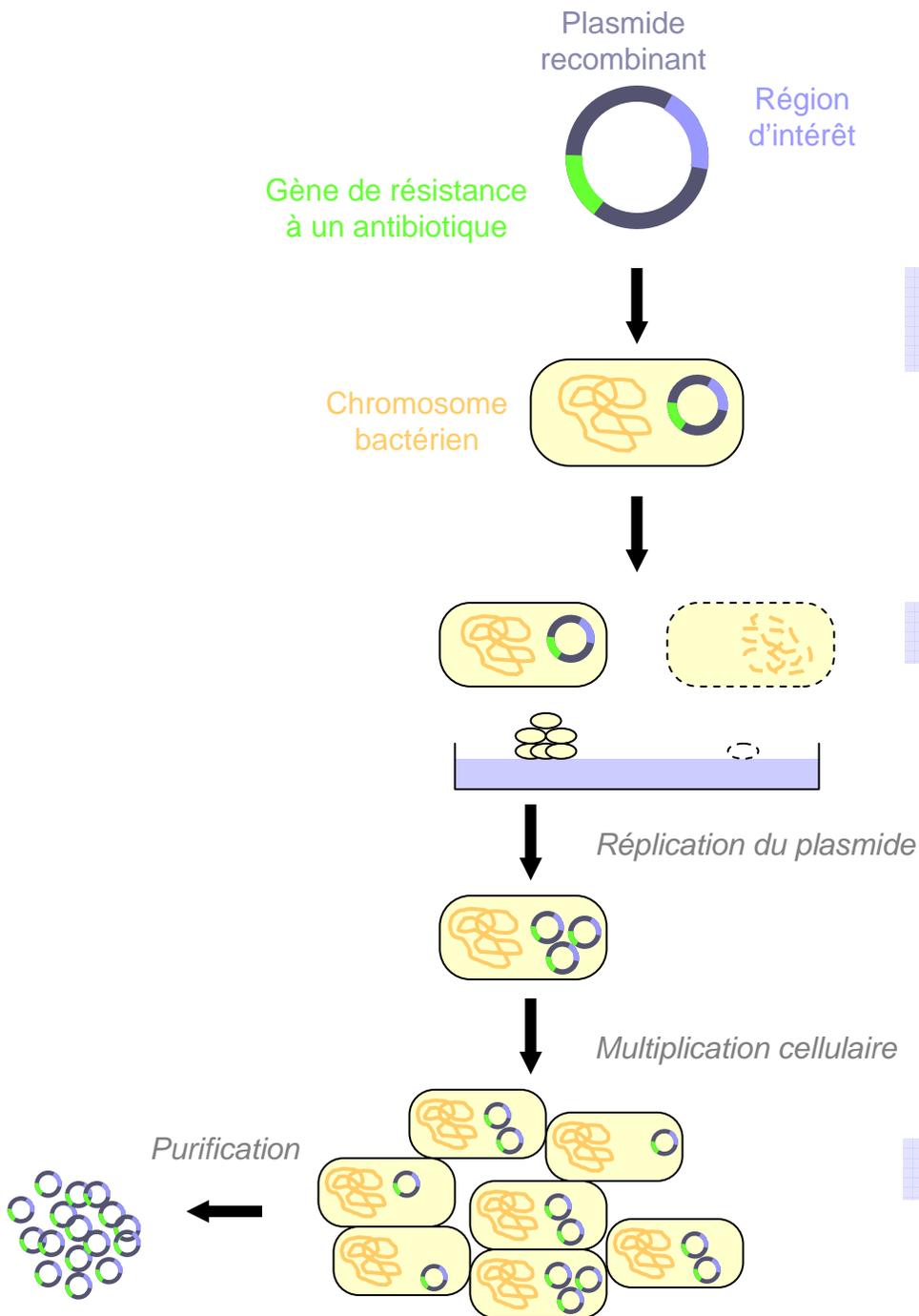
insert
(fragment d'ADN)



*sites de
clivage*



ADN
recombinant



Introduction de l'ADN recombinant dans les cellules hôtes de type procaryotique

l'ADN est introduit dans les bactéries compétentes (traitées par choc thermique ou électrique)

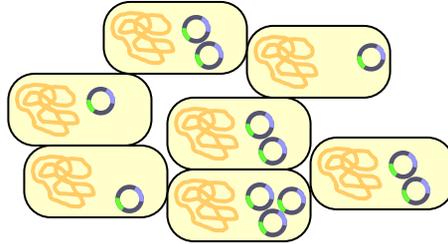
Culture sur milieu + antibiotique

Les cellules transformées survivent. Celles qui n'ont pas intégrées le plasmide meurent

Obtention des clones

Colonies dont les cellules contiennent des copies du même plasmide recombinant

Le clonage



- ⇒ amplification d'ADN
- ⇒ expression de protéines
- ⇒ séquençage
- ⇒ ...

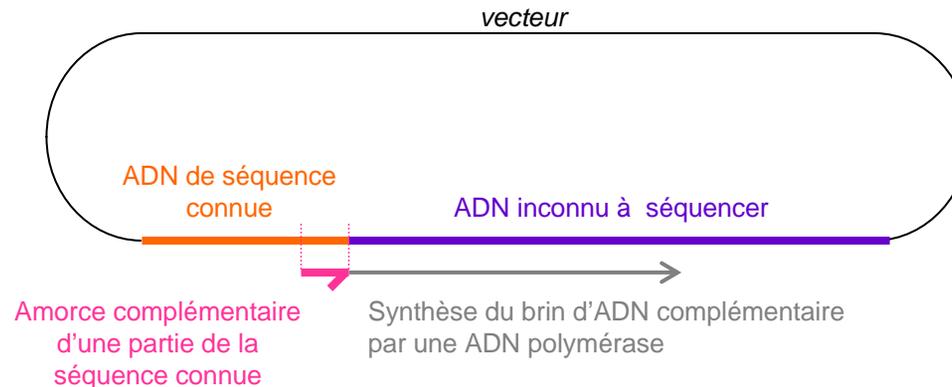
Le séquençage de l'ADN

=

détermination de la succession des nucléotides composant l'ADN

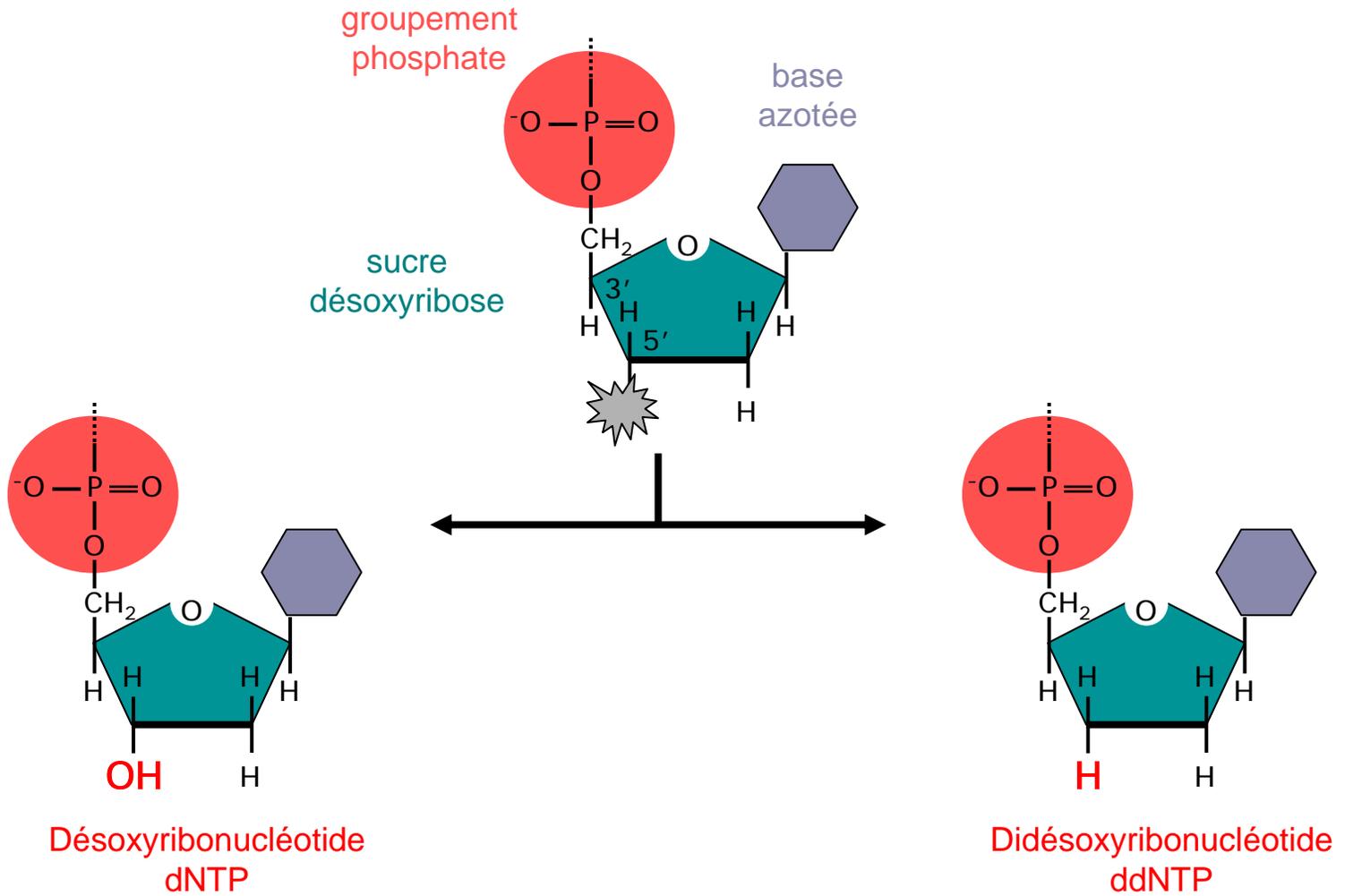
- Méthode de Maxam et Gilbert (chimique)
- Méthode de Sanger (enzymatique)

- 1- L'ADN à séquencer est fragmenté et cloné dans un vecteur.
- 2- Les vecteurs recombinants obtenus sont dénaturés sous forme simple brin.
- 3- Une amorce synthétique est hybridée à ce brin; elle servira de point de départ à la copie de l'ADN, à proximité de l'insert à séquencer :



Le séquençage de l'ADN

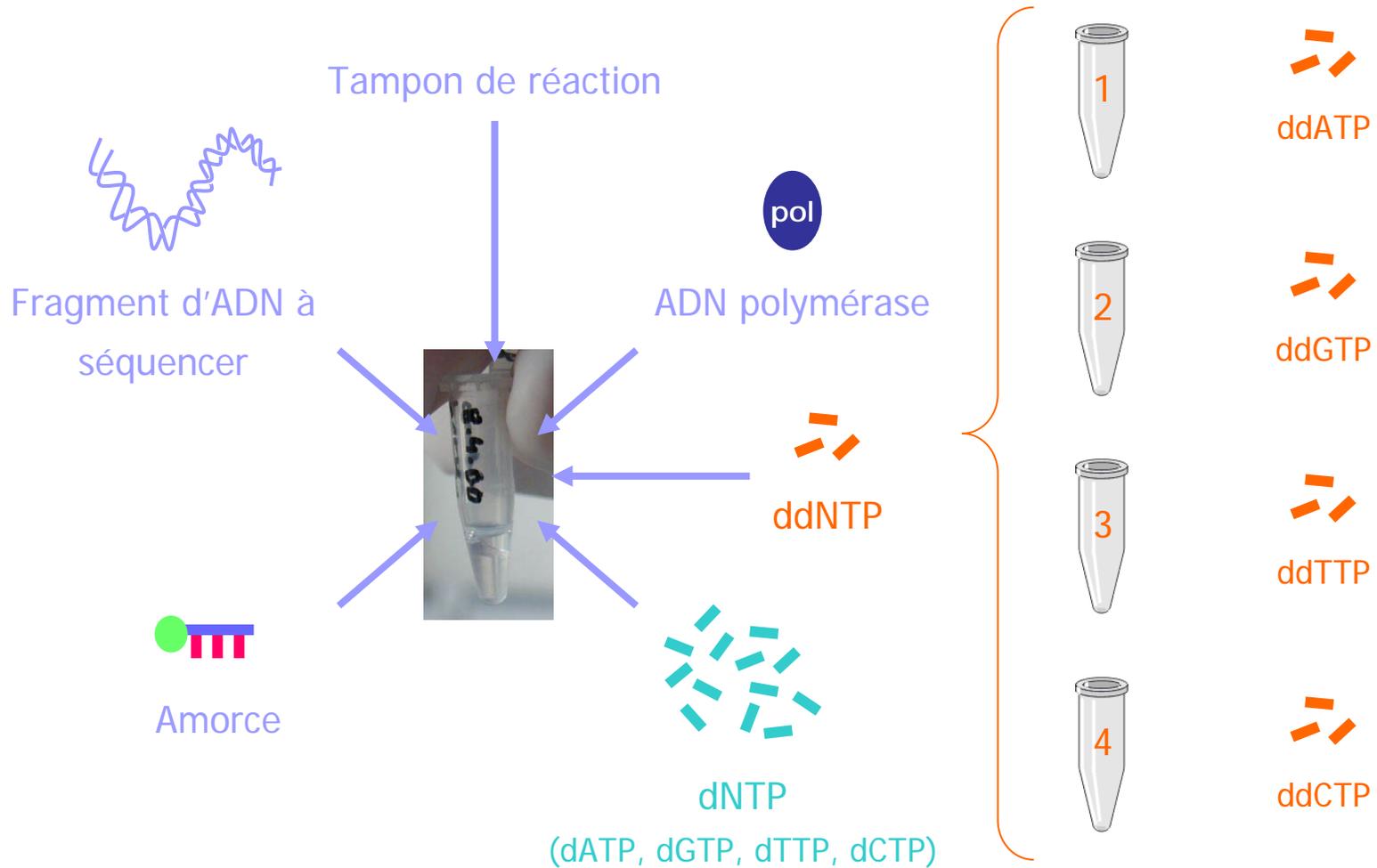
2 types de nucléotides triphosphates



➡ avec un ddNTP, la synthèse du brin d'ADN s'arrête

Le séquençage de l'ADN

Technique enzymatique de Sanger



➔ un ddNTP est ajouté aléatoirement à la chaîne en cours de synthèse par l'ADN polymérase

Le séquençage de l'ADN

Technique enzymatique de Sanger

ADN à séquencer (brin transcrit) : A A ⊙ C ⊙ G G G C ⊙ A ⊙ ⊙ C G G G C G ⊙



A (dATP) : prolongation de la synthèse

A* (ddATP) : arrêt de la synthèse

Synthèse du brin complémentaire : T T A G A*

T T A G A C C C G A T A A*

T T A G A C C C G A T A A G C C C G C A*

T T A*

T T A G A C C C G A T A*

T T A G A C C C G A*

➡ Obtention aléatoire d'un ensemble de fragments de tailles différentes

Le séquençage de l'ADN

Automatisation

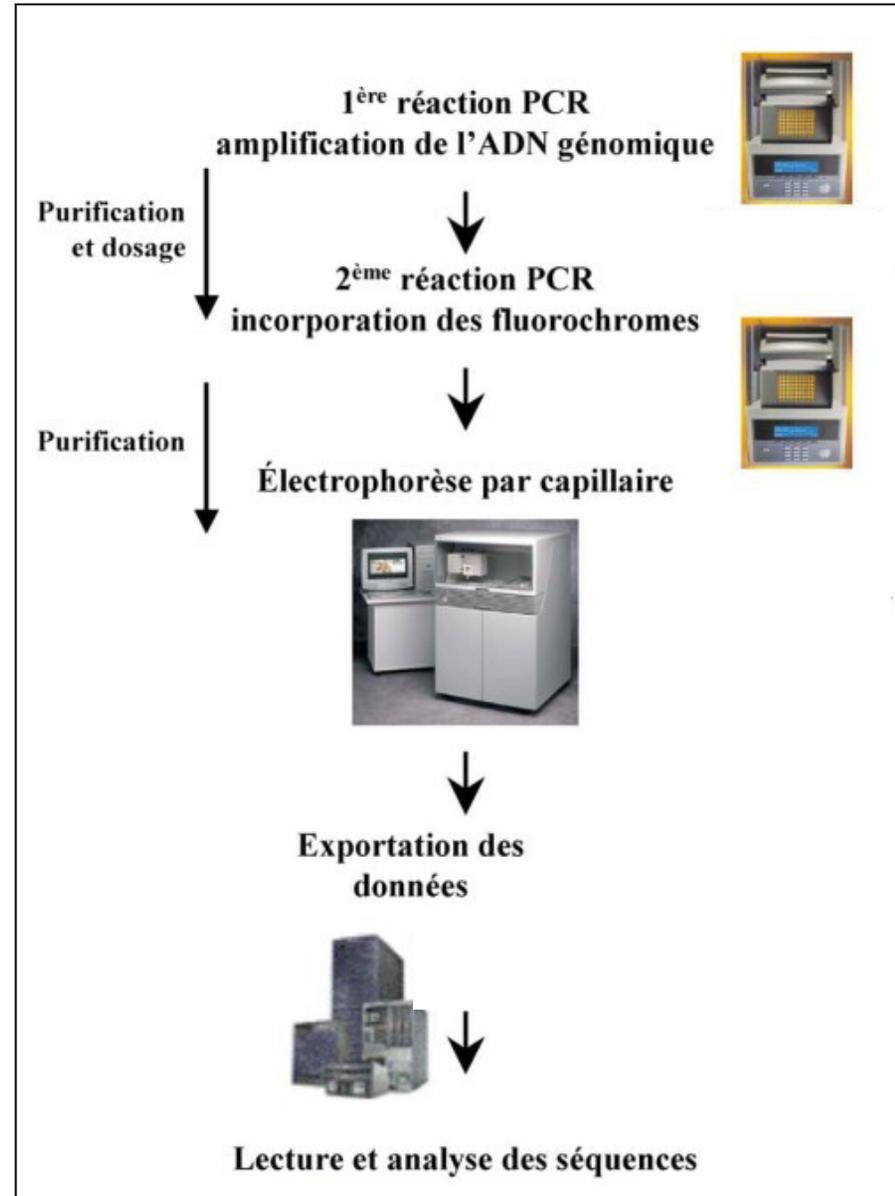
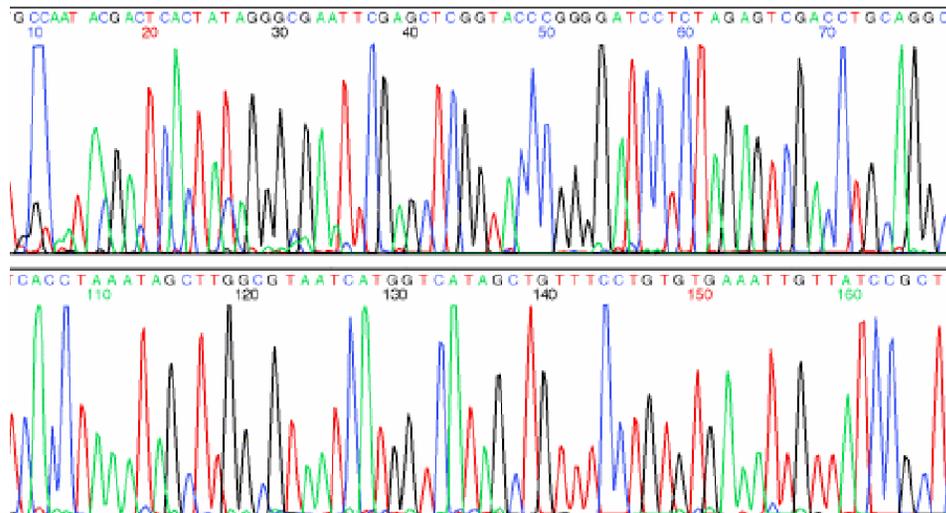
Mélange ADN

+ dNTP

+ ddNTP

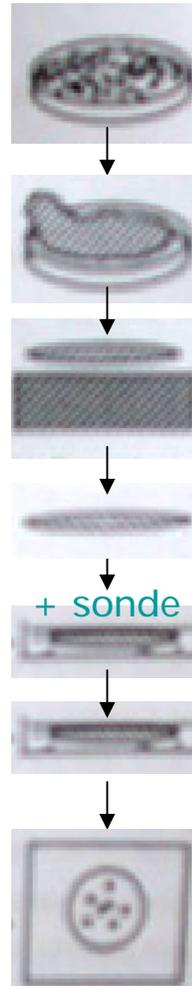
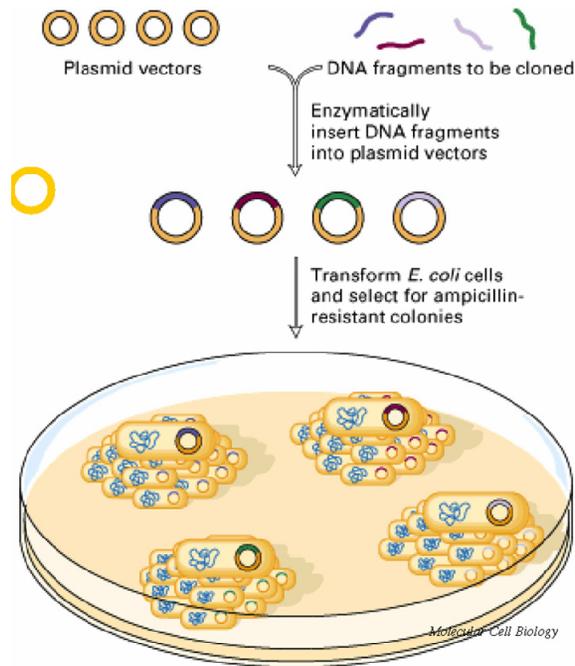
Séquenceur
automatique

Séquence :



Identification des clones intéressants

Criblage de banque = sélection parmi un très grand nombre de bactéries ou phages recombinants, des spécimens transformés avec le vecteur possédant l'insert recherché



Boîtes avec colonies -bactéries ou phages-
(milliers à millions)

Prise d'empreinte (réplication)
(nylon ou nitrocellulose)

Eclatement cellules + dénaturation ADN
(coussin de NaOH)

Fixation
(cuisson ou UV)

+ sonde
Hybridation

Lavages

Autoradiographie

⇒ Localisation des clones d'intérêt

Caractérisation de la diversité microbienne d'un échantillon naturel

=

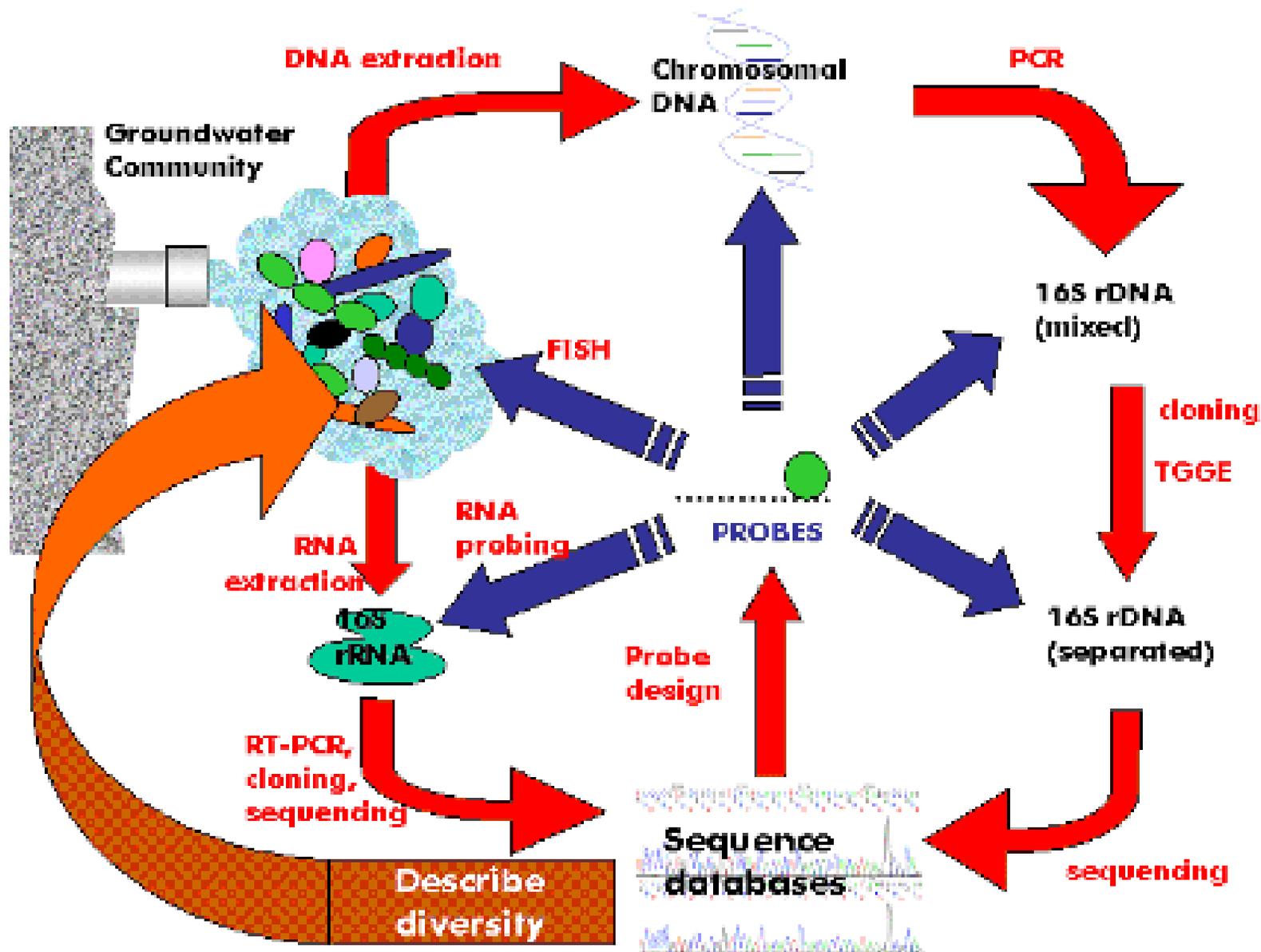
Détermination du nombre d'espèces et du nombre d'individus
par espèce dans un échantillon

+ Estimation des activités

- **Etudes microscopiques** : dénombrement direct, identification et suivi des activités aux travers des **techniques d'hybridation**
- **Enrichissement et cultures**
- **ADN/ARN** : isolation, amplification,
- **Analyses par T-RFLP** (ou autres)
- **Clonage et séquençage**
- **Analyse phylogénétique**

En résumé :

La biologie moléculaire, par les apports sans précédents qu'elle a permis dans le domaine de la phylogénie, a changé radicalement notre vision de l'arbre de la vie. Trois domaines du vivant sont maintenant reconnus, *Bacteria*, *Archaea* et *Eukarya*, les virus ayant quant à eux un statut incertain et étant souvent qualifiés de particules biologiques. L'utilisation des outils moléculaires est devenue une partie intégrante de l'écologie microbienne : la proportion d'articles utilisant ces techniques est maintenant majoritaire. L'une des raisons de ce succès résulte du fait que les outils moléculaires permettent d'identifier les organismes tels que les bactéries ou les petits protistes pour lesquels la morphologie ne fournit aucune information taxonomique discriminante. De plus, cette caractérisation génétique peut se faire soit sur des organismes cultivés soit sur des populations naturelles. Ce dernier point est capital car la plupart des micro-organismes qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes sont très difficilement isolables en culture.



Approche moléculaire

- a révolutionné la **phylogénie**
- a conduit à la découverte du 3^{ème} domaine du vivant : les **Archées**
- a conduit à la découverte d'une **diversité** de microorganismes inattendue dans des milieux très variés (dont les milieux extrêmes)

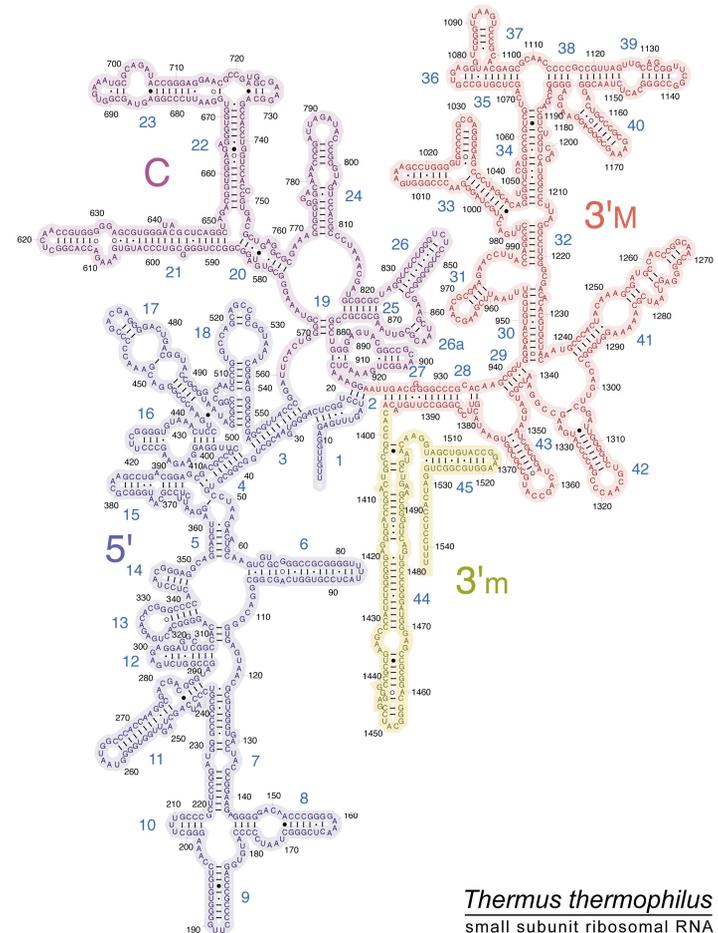
La phylogénie moléculaire

= *phylogénie par comparaison de gène*

Utilisation de l'**information évolutive** accumulée dans la séquence de nucléotides des acides nucléiques (ADN ou ARN) et dans la séquence d'acides aminés protéiniques

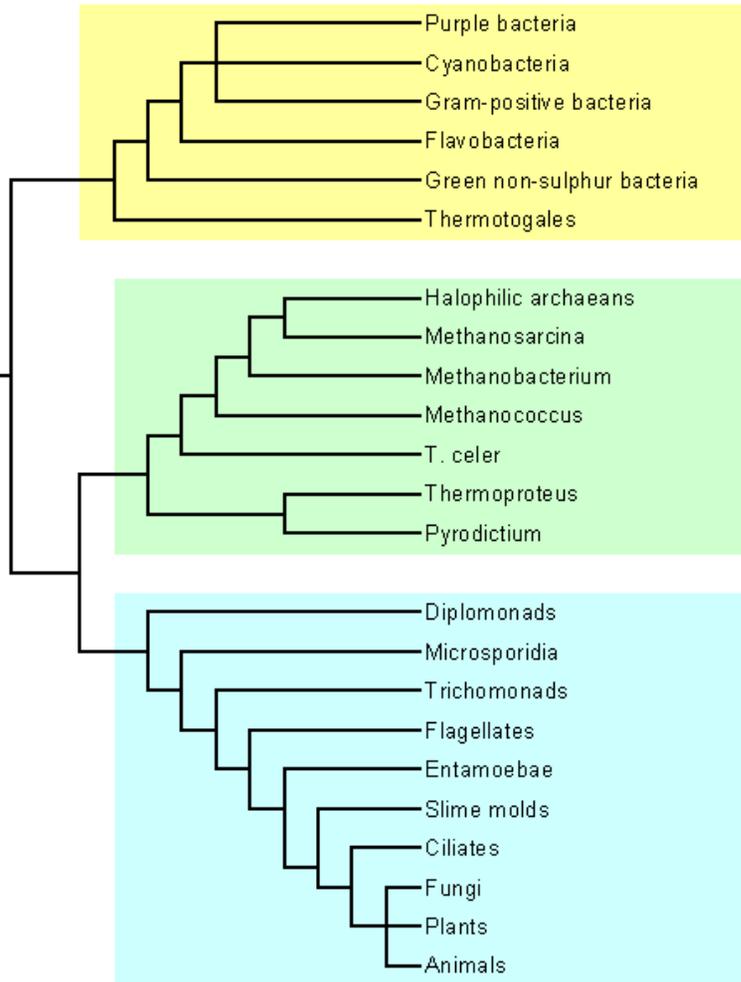
L'ARNr 16S : le marqueur moléculaire privilégié chez les procaryotes

- Abondant dans l'environnement (nombreuses copies par cellules)
- Molécule très conservée entre les différentes espèces (comparaison facile)
- Facilement séquençable (amorces universelles)
- Nombreuses données disponibles dans les banques
- Ne se transfère pas



Thermus thermophilus
small subunit ribosomal RNA

La phylogénie moléculaire



- Fournit un cadre de travail dans lequel les procaryotes peuvent être rapprochés objectivement : **arbre de vie universel** (Woese et Fox, 1977)

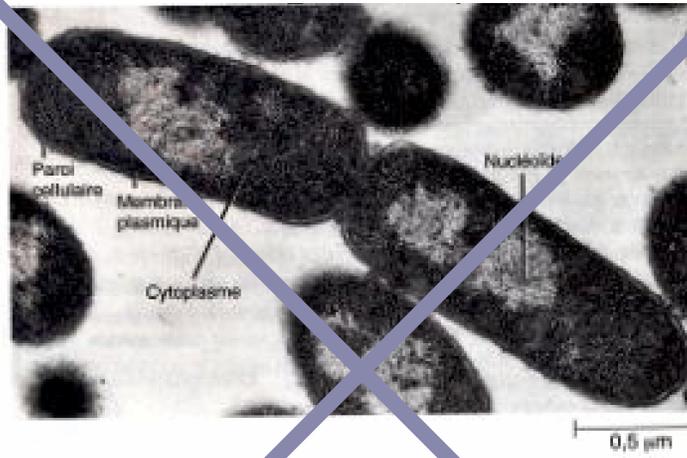
- Permet d'appréhender l'**évolution** des micro-organismes

➔ La distribution phylogénétique des différents phénotypes (métabolismes, formes, pigmentations...) des micro-organismes ne suit pas celle de l'ARNr16S. Cette absence de correspondance est interprétée par l'existence de **transferts horizontaux** (échanges de matériel génétique entre procaryotes)

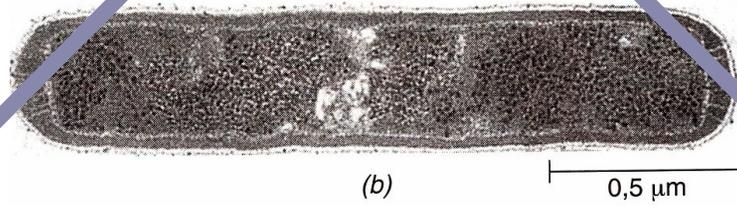
Approche moléculaire

- a révolutionné la **phylogénie**
- a conduit à la découverte du 3^{ème} domaine du vivant : les **Archées**
- a conduit à la découverte d'une **diversité** de microorganismes inattendue dans des milieux très variés (dont les milieux extrêmes)

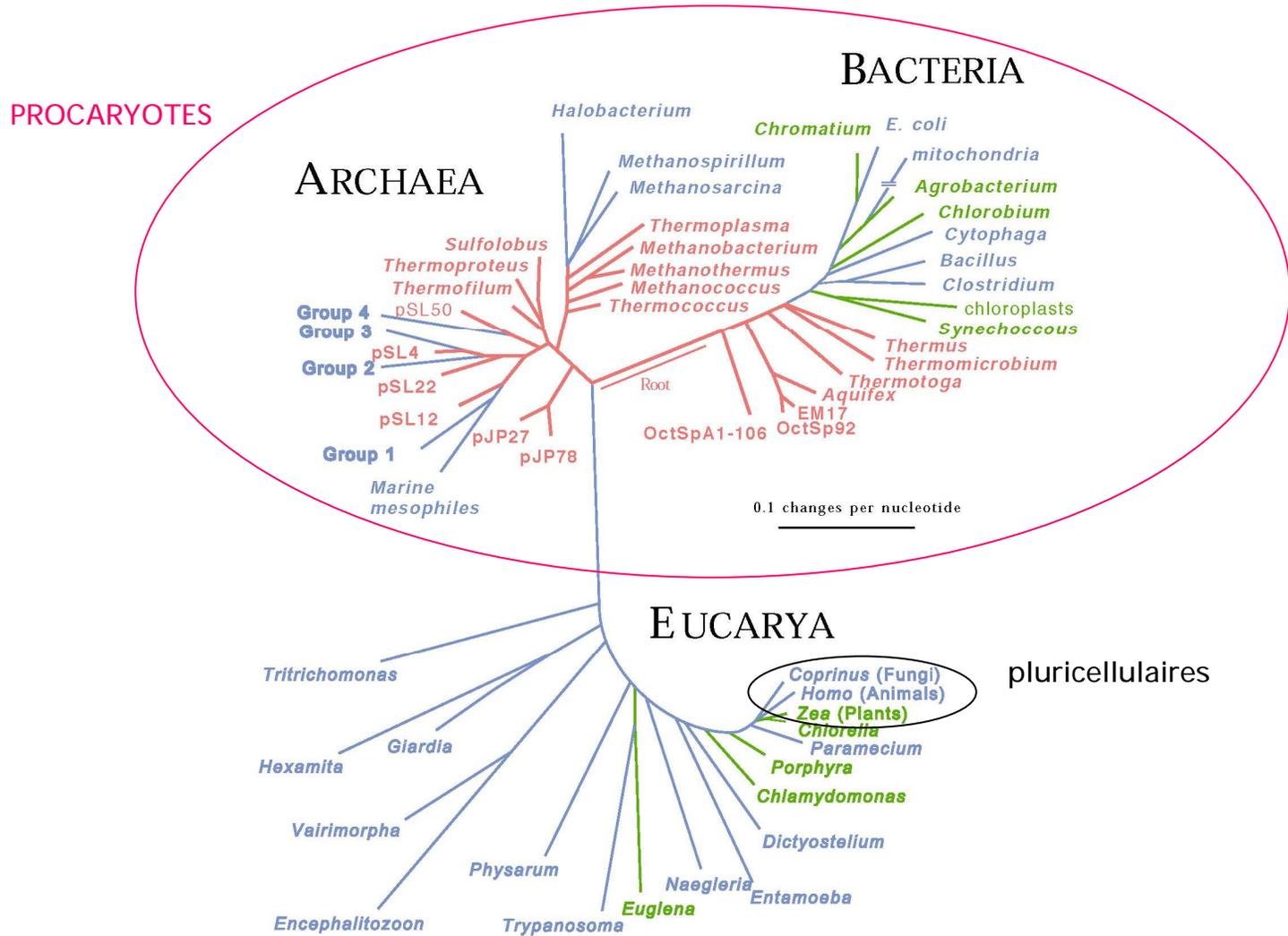
bactérie



archée

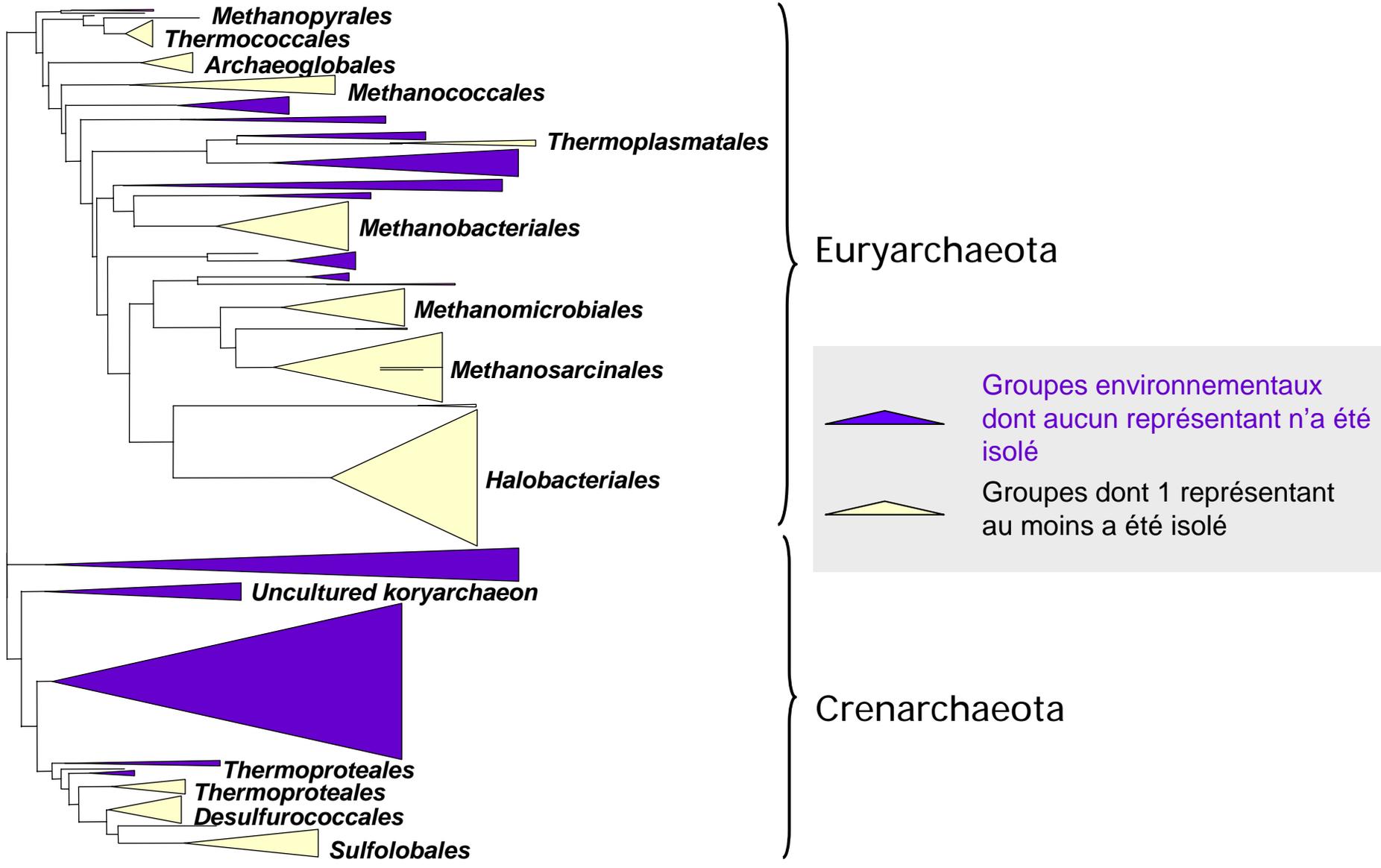


Les Archées : le 3^{ème} domaine du vivant



Woese, 1987

Diversité des Archées



Approche moléculaire

- a révolutionné la **phylogénie**
- a conduit à la découverte du 3^{ème} domaine du vivant : les **Archées**
- a conduit à la découverte d'une **diversité** de microorganismes inattendue dans des milieux très variés (dont les milieux extrêmes)

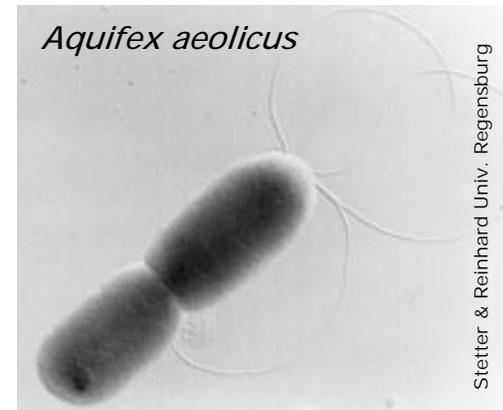
Découverte (encore partielle !) de nouveaux phyla

Dans les sources chaudes :

- Découverte d'*Aquifex aeolicus* (Octopus Spring, 1994), considéré comme le plus ancien lignage bactérien
- L'étude d'une très riche communauté d'Archées dans les sédiments d'Obsidian pool révèle des séquences très divergentes qui pourraient constituer un royaume à l'intérieur des Archées : Korarchaeota (1996)

Dans le plancton marin :

- Découverte de Crenarchaeota mésophiles et même psychrophiles (1997) qui représenteraient 39% du picoplancton marin



La multiplication des environnements étudiés révèle constamment de nouveaux groupes

- 1987 : 12 phyla bactériens reconnus
- 1997 : 25-30 phyla bactériens reconnus

Ecologie moléculaire

Utilisation de la phylogénie moléculaire (phylogénie par comparaison de gènes)
pour l'identification et l'étude des micro-organismes

● Discipline en pleine expansion

- on estime actuellement que 99% des micro-organismes ne sont pas cultivables simplement
- inventaire par séquençage de communautés microbiennes prélevées directement dans l'environnement sans culture et isolation
- ne nécessite de connaître que la séquence d'un seul gène
- permet d'appréhender l'incroyable diversité microbienne

● Limites de l'écologie moléculaire

- ne permet pas de connaître les caractéristiques métaboliques, physiologiques ...
- ne donne aucune information sur les relations qui structurent les écosystèmes

Génomique environnementale

(= *écogénomique/métagénomique*)

consiste à séquencer non pas un gène mais **des grands fragments de génomes**
(~ 40kb / ~ 40 gènes) à partir de prélèvements environnementaux



phylogénie (utilisation de marqueurs alternatifs à l'ARNr 16S)

organisation génomique (densité de gène, structures, ...)

transferts horizontaux

activité enzymatique, le métabolisme ou la physiologie

http://step.ipgp.jussieu.fr/wiki/index.php/Serveur_de_cours