

Université Mohamed Khider -Biskra-
Faculté des Sciences Exactes et des SNV
Département des SNV

TD N° 01 : Plasmides

Les plasmides, éléments facultatifs de la cellule bactérienne, sont des fragments d'ADN extra chromosomiques, capables d'autoréplication et bicaténaires. Certaines bactéries possèdent plusieurs plasmides différents, ils permettent à la bactérie une meilleure adaptation à son environnement. Leur réplication est uni ou bidirectionnelle, à partir d'une origine de réplication en utilisant l'équipement enzymatique de la bactérie.

1- Classification

On peut classer les plasmides en :

- 1) Plasmides conjugatifs, qui portent le gène responsable de la synthèse des pili sexuels, nécessaires à la conjugaison.
- 2) Plasmides R (facteurs de résistances) : ils permettent aux bactéries de résister aux antibiotiques.
- 3) Plasmides Col qui codent pour des protéines dites bactériocines, telle que la colicine d'*E. coli*. (effet antibiotique sur d'autres bactéries).
- 4) Plasmides de virulence qui codent pour des toxines responsables des symptômes causés par des bactéries pathogènes.
- 5) Plasmides métaboliques codent pour des enzymes qui catabolisent certains substrats (polluants, nutriments.....).

2- Propriétés

- Résistance aux antibiotiques (90% plasmidique) les 10% restant (chromosomique).
- Résistance aux métaux lourds (mercure, sels de cadmium, bismuth, de plomb, d'antimoine et arsénites).
- Le pouvoir pathogène Ex: codant pour des entérotoxines et des facteurs de colonisation permettant l'attachement des bactéries à la surface de l'intestin (épithélium intestinal).
- Production de bactériocines
- Caractères métaboliques : codent pour des caractères biochimiques

3- Extraction et purification de l'ADN plasmidique

a- La mise en évidence, l'extraction et la purification des acides nucléiques (extra-chromosomique) constitue l'une des étapes clés des études de génétique moléculaire.

Il existe différents protocoles expérimentaux pour extraire les acides nucléiques, qui suivent approximativement le même schéma de principe :

- Lyse des cellules
- Elimination des protéines et des lipides

- Elimination d'un acide nucléique donné : en effet, un « extrait acides nucléiques » brut contient en mélange ARN, ADN génomique et ADN plasmidique pour les bactéries.

La lyse mécanique est préférentiellement réservée aux cellules eucaryotes. Pour les cellules procaryotes on préférera une lyse chimique. Ce traitement crée des brèches dans la paroi par solubilisation des lipides membranaires. Avec la perte de protection assurée par la paroi contre la forte pression osmotique intracellulaire, la cellule gonfle (afflux d'eau vers l'intérieur de la cellule) jusqu'à rupture de la membrane plasmique. Les conditions de cette lyse chimique permettent de récupérer dans le lysat uniquement les plasmides sans l'ADN génomique, on parle alors de lysat clair.

Exemple : extraction du plasmide d'*E. coli* par lyse alcaline

-Cultiver à l'avance la souche d'*E. coli* dans un milieu de Bouillon Luria – Bertani (un milieu riche qui permet une croissance rapide ainsi que de bons rendements de croissance).

-Utiliser un tampon TE (Tris+ EDTA) pour contrôler le pH (8) et qui solubilise l'ADN en le protégeant de la dégradation. L'EDTA (Éthylène diamine tétra-acétique) se lie aux cations divalents de la paroi cellulaire (Mg^{2+} , Ca^{2+}), affaiblissant ainsi l'enveloppe cellulaire. Après la lyse cellulaire, l'EDTA limite la dégradation de l'ADN en liant les ions Mg^{2+} , cofacteurs nécessaires des nucléases bactériennes. De cette manière, il inhibe les nucléases et conduit à la rupture de la paroi cellulaire et de la membrane cellulaire.

-Pour maintenir une osmolarité isotonique et par conséquent protéger les cellules de l'éclatement, le glucose (solution de 5%) doit être ajouter.

La déprotéinisation (élimination des protéines) est effectuée soit par hydrolyse enzymatique par des protéinase ou par hydrolyse chimique en présence d'un détergent dénaturant comme le SDS (dodécylsulfate de sodium) ou un mélange de phénol et chloroforme.

-Le NaOH est ajouté pour rendre le milieu basique, ce qui va induire la dénaturation sans séparation des brins circulaires du plasmide, qui seront facilement renaturés dès que le NaOH est neutralisé. De cet effet la séparation de l'ADN plasmidique sera plus facile.

-La neutralisation des conditions alcalines ainsi que la renaturation rapide de l'ADN plasmidique sont réalisées par Acide acétique glacial.

Une centrifugation permet de récupérer l'ADN plasmidique qui se trouvera dans le surnageant.

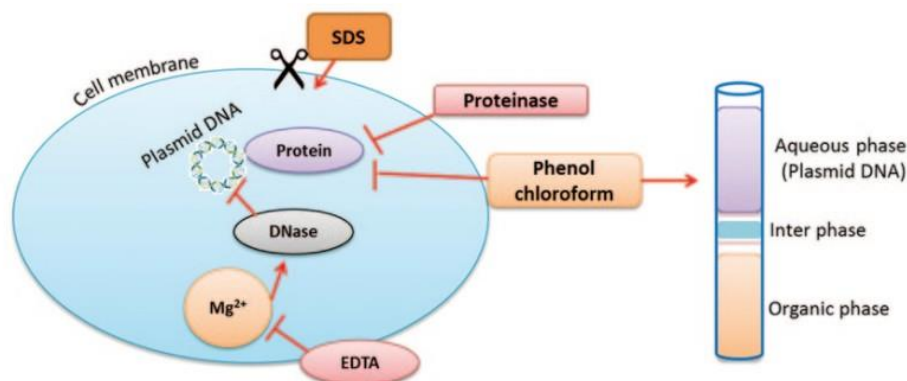


Figure 01 : Principe de l'extraction de plasmide par la lyse alcaline

4- Application des plasmides en génie génétique

Les plasmides sont utilisés en génie génétique pour amplifier ou produire de nombreuses copies de certains gènes. Dans le clonage moléculaire, un plasmide est un type de vecteur, qui est une séquence d'ADN qui peut transporter du matériel génétique étranger d'une cellule à une autre, où les gènes peuvent être davantage exprimés et répliqués.

Exemple : Le plasmide Ti (pour Tumor inducing) est un plasmide rencontré chez les populations d'*Agrobacterium fabrum*.

Un plasmide peut s'intégrer dans l'ADN chromosomique de la cellule hôte et former « un épisome ».

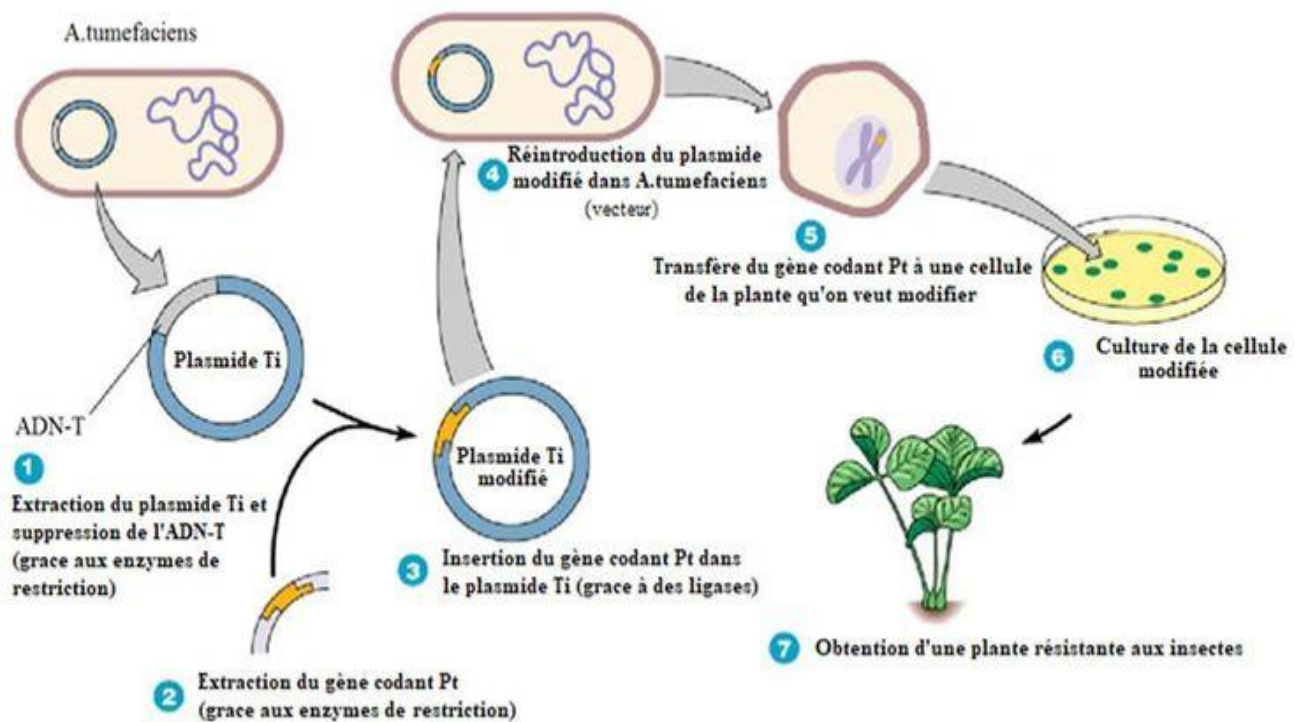


Figure 02 : Exemple d'une application de plasmide dans la transformation génétique des plantes

Enseignante : Benabdallah F.