

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique

Université Larbi Tébessi, Tébessa

Faculté des Sciences Exactes et sciences de la
Nature et la Vie

Département : Biologie Appliquée

GÉNÉTIQUE MICROBIENNE

3ÈME ANNÉE LICENCE MICROBIOLOGIE

Dr. Hind FENGHOUR

2021-2022



Semestre : 5

Unité d'enseignement Méthodologique 2 (UEM2(O/P)) :

Matière 2 : Génétique microbienne

Crédits : 4

Coefficient : 2

Objectifs de l'enseignement :

Connaissances préalables recommandées :

Contenu de la matière :

I- Structure et organisation du matériel génétique :

Chromosome, plasmides, matériel génétique viral.

II – mutation et mécanismes de réparation de l'ADN :

Taille de mutation, effet mutagène, agents mutagènes, mécanismes de réparation de l'ADN.

III- Recombinaison génétique et éléments génétiques transposables :

recombinaison homologue, recombinaison site spécifique, éléments génétiques transposables et applications

IV –Transferts génétiques chez les bactéries : analyse et construction génétiques :

conjugaison, transformation, transduction et phages transducteurs, applications, cartographie génétique.

V – Phénomène de restriction modification : système de restriction modification, enzymes de restriction, cartographie de restriction et applications.

VI – Régulation de l'expression des gènes : régulation transcriptionnelle (exemples : *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*), régulation traductionnelle.

VII – Génétique des bactériophages : réplication du génome viral, recombinaison génétique chez les virus, mécanismes de l'expression génétique en cascade chez les virus et maintien à l'état prophage.

MODULE : GENETIQUE MICROBIENNE

I. INTRODUCTION

II. Le GENOME BACTERIEN. Structure, Organisation et Réplication

III. MUTATIONS ET MECANISMES DE REPARATION DE L'ADN

IV. RECOMBINAISON, TRANSFERTS GENETIQUES, CARTES GENETIQUES

V. LES PLASMIDES

VI. LE PHENOMENE DE RESTRICTION MODIFICATION

* Les enzymes de restriction et la cartographie de restriction

VII. LES ELEMENTS TRANSPOSABLES

VIII. REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES

IX. GENETIQUE DES BACTERIOPHAGE

I. LE GENOME BACTERIEN. Structure, Organisation et Réplication

1. INTRODUCTION

L'examen même superficiel du monde microbien montre que les bactéries sont un des groupes les plus importants quel que soit le critère utilisé : nombre des organismes, importance écologique ou importance pratique pour les hommes. En outre, la plus grande partie de notre compréhension en biochimie et en biologie moléculaire vient de la recherche sur les bactéries.

Les bactéries sont des organismes microscopiques qui existent à l'état unicellulaire ou sous forme d'agrégats de cellules. Une cellule bactérienne est capable d'assumer toutes les fonctions vitales, telle que la croissance, la respiration (ou la fermentation), et la reproduction, indépendamment d'autres cellules. Les bactéries sont des procaryotes, caractérisés principalement par l'absence de membrane nucléaire. Le génome procaryote est constitué d'une grande molécule d'ADN, fortement condensée par son association avec des protéines. Cette structure est appelée *nucléotide* et elle est fonctionnellement équivalente au noyau des eucaryotes. Les procaryotes se distinguent également des eucaryotes par l'absence des organites spécialisés dans la réalisation de certaines fonctions cellulaires (respiration, photosynthèse...) qui, chez les bactéries, s'effectuent au niveau des structures membranaires internes ou associées à la membrane cytoplasmique, et l'absence des microtubules qui est à rapprocher de l'absence de mitose ou de méiose(1).

2. LE GENOME BACTERIEN

Le génome bactérien est constitué d'une seule molécule d'ADN circulaire. L'ADN bactérien est lié aux membranes cellulaires, ces dernières qui semblent être impliquées dans la séparation de l'ADN entre les cellules filles lors de la division. La taille du chromosome bactérien est entre 6.10^5 et $1,2.10^7$ paires de bases.

2.1. *Condensation et organisation*

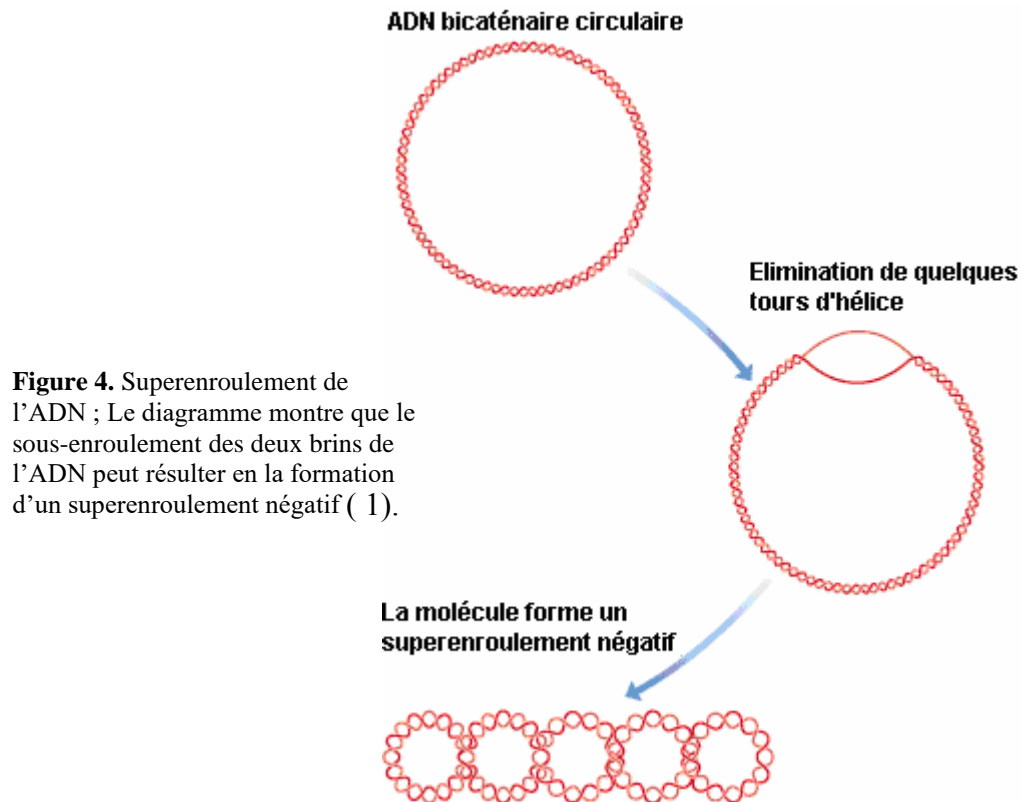
La double hélice circulaire de l'ADN bactérien est de plus enroulée en *superhélice* et est associée à des protéines basiques (qui ressemblent aux histones complexées à l'ADN des eucaryotes) ayant comme fonction d'organiser le chromosome bactérien en une structure enroulée de type chromatine .

La condensation de l'ADN est due en partie à son interaction avec des protéines de type histone, basiques et thermostables dont la mieux caractérisée, **HU**, est présente à 20 000 exemplaires par génome. Des interactions avec la membrane contribuent aussi à la condensation du chromosome. Jacob, Brenner et Cuzin (1963) ont proposé que l'association avec la membrane permette à celle-ci de jouer le rôle d'un fuseau mitotique qui assure la partition des chromosomes répliqués lors de la division cellulaires. Cette hypothèse est maintenant vérifiée ; des expériences sur *E. coli* montrent en effet que *oriC*, le site d'initiation de la réplication du chromosome est associé de façon transitoire à la membrane plasmique, pendant un temps qui serait suffisant à l'établissement de domaines membranaires précurseurs de la septation.

2.2. Superenroulement de l'ADN

Les deux brins de l'ADN sont enlacés sous forme d'une double hélice. L'axe de la double hélice peut lui-même s'enrouler dans l'espace pour former une hélice d'ordre supérieur. Dans un ADN bicaténaire, les deux brins font un tour complet l'un autour de l'autre toutes les 10 paires de bases, c'est-à-dire à chaque tour d'hélice. L'ADN bicaténaire circulaire peut former des superhélices si les brins sont sous-enroulés (superhélice négative) (**Figure 4**) ou superenroulés (superhélice positive).

L'ADN sous-enroulé a un nombre de tours inférieur à celui de l'ADN normal, tandis que le sur-enroulé présente un plus grand nombre de tours. L'ADN du nucléoïde présente un superenroulement négatif. Le superenroulement négatif introduit une contrainte de torsion qui favorise le relâchement et la séparation des deux brins de la double hélice de l'ADN, alors que le superenroulement positif surenroule cette hélice. La tension introduite par le superenroulement constitue un mode d'activation énergétique de l'ADN, favorisant les processus qui désenlacent l'ADN, comme la réplication et la transcription. Les bactéries possèdent des enzymes, les ADN topoisomérases, qui modifient le superenroulement de l'ADN. Les mieux connues sont l'ADN gyrase, qui surenroule l'ADN négativement, et l'ADN topoisomérase I qui diminue le superenroulement de l'ADN en augmentant le taux d'enlacement de ses deux brins(2).



Les topoisomérases de type I coupent transitoirement un seul des deux brins de l'ADN dans la double hélice; le brin coupé passe autour du brin intact, puis les topoisomérases I relient les deux extrémités reconstituant la continuité de l'ADN (**Figure 5**). Chaque cycle réactionnel supprime une boucle de surenroulement de l'ADN. Les topoisomérases I bactériennes n'éliminent que les superenroulements négatifs(2).

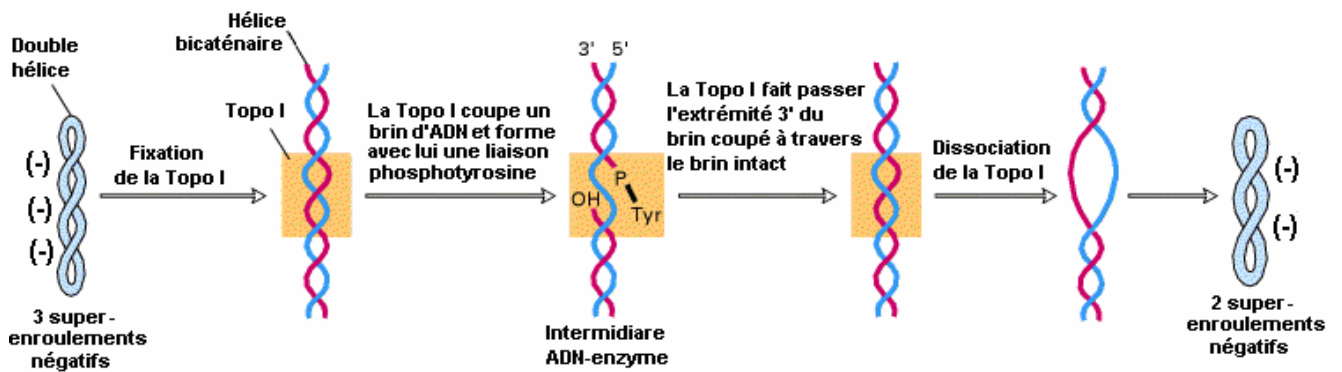
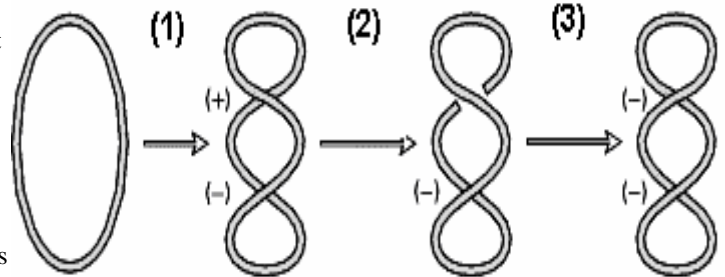


Figure 5. Action de la Topoisomérase de type I d'*E. coli*(2)

Les topoisomérases de la classe II coupent transitoirement les deux brins de la double hélice ce qui permet le passage d'une région bicaténnaire de la même molécule ou d'une autre molécule au travers de la brèche, éliminant indifféremment des superenroulements négatifs ou positifs. L'ADN gyrase bactérienne semble seule capable d'effectuer aussi la réaction inverse et d'introduire des superenroulements négatifs dans l'ADN (Figure 6).

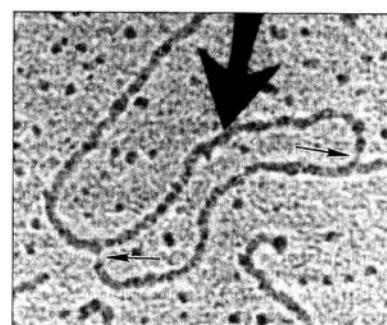
Figure 6. Action de l'ADN gyrase d'*E. coli* ; une topoisomérase de type II. (1) L'ADN gyrase, en se liant à l'ADN circulaire, crée des torsions (+) et (-), (2) elle coupe ensuite l'ADN double brin et se maintient lié d'une manière covalente aux extrémités coupées. (3) Un changement de conformation de l'enzyme permet le passage d'un segment d'ADN intact à travers la coupure puis la gyrase relie l'ADN. L'ADN circulaire reconstitué contient maintenant deux superenroulements négatifs (3).



3. REPLICATION DU CHROMOSOME BACTERIEN :

La réplication de l'ADN est un processus extraordinairement important et complexe, dont toute vie dépend. La réplication du chromosome bactérien commence à un seul endroit, l'origine de réplication (*oriC*). La synthèse a lieu à la fourche de réplication, là où l'hélice de l'ADN est déroulée et où les brins individualisés sont répliqués (Figure 7).

Figure 7. Micrographie électronique de la réplication de l'ADN. La grosse flèche indique une bulle de réplication. Remarquez les deux fourches de réplication qui délimitent la bulle ; chacune est caractérisée par une région plus fine, monocaténaire, sur l'une de ses deux branches (régions indiquées par les petites flèches) (2).



Deux fourches de réplication se déplacent à partir de l'origine jusqu'elles aient copié tout le *réplicon*, c'est-à-dire la portion du génome qui contient une origine et qui se réplique en une seule unité. Lorsque les fourches de réplication se déplacent autour du cercle, on obtient une structure ayant la forme de la lettre grecque téta (Θ). Finalement, comme le chromosome bactérien est un réplicon unique, les fourches se rencontrent de l'autre côté et deux chromosomes séparés sont libérés(3).

3.1. Caractéristiques générales de la réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN est semi-conservative ; elle consiste en la séparation des brins du chromosome parental qui servent de matrice pour la synthèse de brins complémentaires. La réplication de l'ADN est catalysée par des enzymes appelées ADN polymérase utilisant comme précurseurs des nucléotides triphosphates.

La réplication de l'ADN est bidirectionnelle ; A partir de l'origine de réplication, la réplication progresse dans les deux directions autour du chromosome circulaire, impliquant deux fourches de réplication qui avancent dans des directions opposées.

La réplication est semi-discontinue ; Les deux brins de l'ADN sont antiparallèles, et Comme les ADN polymérase ne polymérisent les nucléotides que dans la direction 5'→3', les deux brins doivent être synthétisés dans la direction 5'→3'. La copie du brin parental 3'→5' est donc synthétisée de façon continue; ce nouveau brin est appelé **brin avancé**. À mesure que l'hélice se déroule, l'autre brin parental (le brin dans la direction 5'→3') est copié de façon discontinue par synthèse d'une succession de fragments de 1000 à 2000 nucléotides appelés **fragments d'Okazaki**; le brin qui sera formé à partir de ces fragments est appelé **brin retardé**.

3.2. Mécanisme de la réplication de l'ADN chez *E. coli*

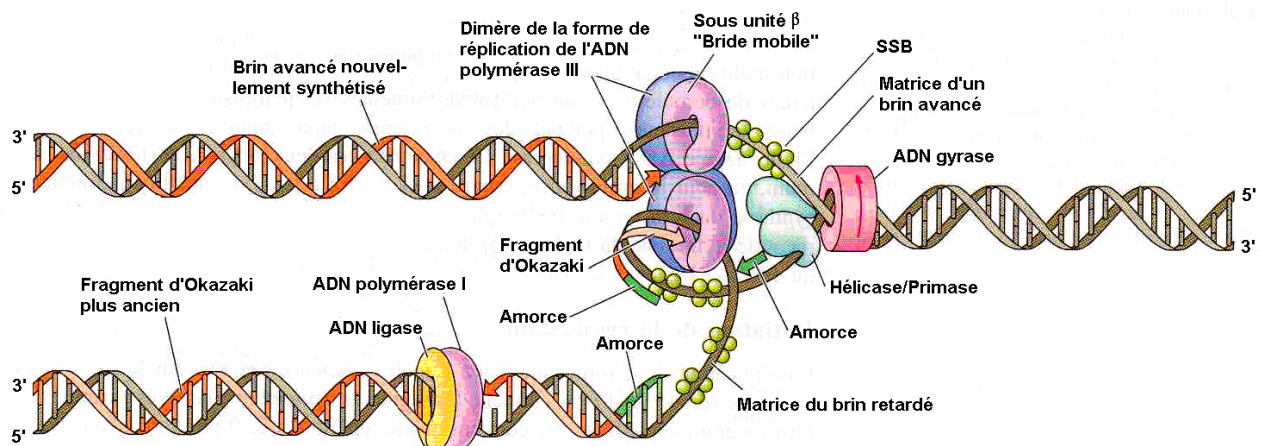


Figure 8 : Caractéristiques générales d'une fourche de réplication. L'ADN bicaténaire est déroulé par l'action de l'ADN gyrase et de l'hélicase, les régions monocaténares sont recouvertes par des protéines SSB. La primase amorce périodiquement les synthèses sur le brin retardé. Chaque moitié de la polymérase de réplication est un holoenzyme lié à son brin matrice par une bride mobile constituée par les sous-unités β . Derrière la fourche de réplication, l'ADN polymérase I agit sur le brin retardé pour éliminer l'ARN des amorces et le remplacer par de l'ADN, puis l'ADN ligase relie les fragments d'Okazaki(3).

La réplication de l'ADN démarre au locus *oriC*, la protéine DnaA se lie à *oriC*, ceci amorce le dénouement de la double hélice au site d'initiation. Ce dénouement se produit sous l'action de la protéine **DnaB** possédant une activité hélicase. Les deux brins séparés par la DnaB sont maintenus à l'état monocaténaire grâce à des protéines se liant à l'ADN simple brin dites **protéines SSB** (de "single-stranded binding proteins"). Le dénouement de la double hélice de l'ADN produit des tensions et aboutit à la formation de superenroulements en aval des fourches de réplication(3).

susceptibles de bloquer leur déplacement. Cette tension mécanique est éliminée par l'action de l'ADN gyrase. Dans chacune des fourches de réplication, la *primase* synthétise un ARN amorce, une amorce pour le brin avancé et une autre pour le brin retardé. Une ADN polymérase dimérique (*ADN polymérase III*) catalyse l'élongation de l'ADN à partir de l'extrémité 3' de l'amorce d'ARN. La synthèse des deux brins avancé et retardé a probablement lieu dans un seul complexe multiprotéique, *le réplisome*. La matrice du brin retardé doit former une boucle autour du complexe, les fragments obtenus sont appelés *fragments d'Okazaki*. Dès que le fragment d'Okazaki atteint une longueur donnée, l'*ADN polymérase I* retire l'amorce d'ARN et synthétise de l'ADN complémentaire pour remplir la brèche formée par l'élimination de l'ARN. Finalement, les fragments sont reliés par l'*ADN ligase* qui catalyse la formation des liaisons phosphodiester entre l'extrémité 3'OH du brin en croissance et l'extrémité 5' phosphate du fragment d'Okazaki.

La réplication de l'ADN s'arrête lorsque le complexe de la polymérase atteint un site de terminaison (*ter*). Des protéines **Tus** se fixent au site *ter* et stoppent la réplication. Au site de terminaison, les deux molécules d'ADN filles sont attachées l'une à l'autre par une courte région d'ADN parental non encore répliqué. La gyrase intervient à ce stade pour décaténer les duplexes circulaires (**Figure 9**).

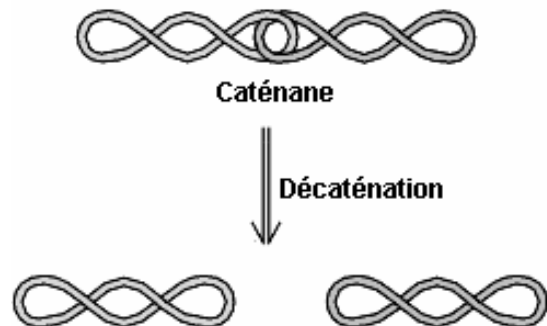


Figure 9. Réaction de décaténation catalysée par l'ADN gyrase d'*E. coli*(3).

II. MUTATIONS ET MECANISMES DE REPARATION DE L'ADN

1. DEFINITIONS DU GENE :

Le gène a été défini par différentes manières : les généticiens ont considéré le gène comme l'unité structurale et fonctionnelle de l'hérédité, ou encore l'entité responsable des traits phénotypiques d'un organisme. Avec la découverte et la caractérisation de l'ADN, le gène a été défini plus précisément comme une séquence linéaire de nucléotides ou *codons* avec un point précis de départ et de terminaison. Au départ, on pensait que les gènes ne contenaient que l'information nécessaire à la synthèse des protéines, mais il s'est avéré que certains d'entre eux codent pour de l'ARNr ou de l'ARNt. Dès lors, un gène peut être défini comme une séquence polynucléotidique codant pour un polypeptide, un ARNt ou un ARNr.

L'existence d'un gène est habituellement révélée par des mutations qui provoquent un phénotype mutant caractéristique. Ces mutations sont des marqueurs génétiques.

2. TYPES DE MUTATIONS :

Les mutations peuvent modifier le phénotype d'un micro-organisme de différentes manières. Les *mutations morphologiques* changent la morphologie de la colonie ou la cellule du micro-organisme. Les *mutations létales* entraînent la mort de l'organisme. Les *mutations conditionnelles* sont exprimées seulement dans certaines conditions de l'environnement. Ainsi, une mutation conditionnelle létale chez *E. coli* ne sera pas exprimée à basse température (*conditions permissives*), par contre elle s'exprimera lorsque la bactérie sera cultivée à température élevée (*conditions restrictives*). Les *mutations biochimiques* sont celles qui modifient la biochimie de la cellule. Puisque ces mutations inactivent fréquemment une voie biosynthétique, elles rendent le micro-organisme incapable de croître sur un milieu dépourvu du produit final de la voie de biosynthèse. Le mutant ne peut donc croître sur un milieu minimum ; il exige la présence de suppléments nutritifs. De tels mutants sont appelés *auxotrophes*, alors que les souches poussant sur milieu minimum sont appelées *prototrophes*. Un *mutant résistant* est un type particulier de mutant biochimique qui a acquis la résistance à un agent pathogène, une substance chimique ou un antibiotique.

Les modifications de l'ADN (mutations) ne produisent pas forcément un phénotype mutant, Certaines mutations touchent des régions de l'ADN qui ne remplissent aucune fonction connue, ces mutations sont dites *silencieuses*. D'autres mutations, qui modifient la dernière base de certains codons ne changent pas l'acide aminé qu'ils spécifient dans une protéine. Enfin, certaines substitutions d'acides aminés sont sans effet sur la fonction de la protéine dans laquelle elles apparaissent(4).

La mutation permet la variabilité génétique au sein d'une espèce, et avec le temps, l'apparition d'une nouvelle espèce. Les mutations changent la séquence des bases dans l'ADN soit par substitution,

élimination ou addition d'un seul nucléotide (mutations ponctuelles), soit par insertion, inversion ou délétion d'une séquence d'ADN.

3. NATURE MOLECULAIRE DES MUTATIONS

3.1. *Mutations ponctuelles* (Figure 11.a)

3.1.1. Substitutions

- Les mutations qui substituent une base à une autre base de même type (purine → purine ou pyrimidine → pyrimidine) sont appelées *transition*.
- Les substitutions de type purine → pyrimidine ou vice-versa sont des *transversions*.

Ces mutations peuvent résulter d'erreurs de réplication. Ces erreurs ont lieu lorsque la base purique ou pyrimidique d'un nucléotide servant de matrice prend une forme *tautomérique* rare. La tautomérisation résulte de l'équilibre chimique entre deux isomères structuraux interconvertibles. Les bases existent habituellement sous la forme amine ou cétone. Néanmoins, elles peuvent à certains moments prendre une forme soit imine, soit énol. Ces changements tautomériques modifient les caractéristiques des liaisons hydrogène des bases permettant des substitutions d'une purine par une purine ou d'une pyrimidine par une autre pyrimidine (mutation de transition). Les mutations de transversions sont plus rares en raison des problèmes stériques que soulève l'appariement d'une purine avec une purine ou d'une pyrimidine avec une pyrimidine.

Les substitutions des bases sont des mutations ayant les effets les moins sévères ; la substitution du troisième nucléotide de certains codons ne change pas l'acide aminé en question (*substitution silencieuse*). La substitution d'un nucléotide a souvent comme effet de remplacer le codon d'un acide aminé par un autre codon d'un autre acide aminé (*mutation faux-sens*). Les substitutions qui produisent un codon non-sens spécifiant la terminaison de la traduction provoquent la synthèse d'un produit presque toujours inactif (*mutations non-sens*).

3.1.2. Délétions/Additions

Les délétions ou additions d'un nucléotide dans une séquence codante provoquent un décalage du cadre de lecture, modifiant à la fois *la composition* et *la longueur* du produit du gène : le signal de terminaison normal n'est plus reconnu par la machinerie de traduction (produit plus long), ou un signal de terminaison apparaît prématurément dans le cadre de lecture décalé (produit plus court).

3.2. *Délétions, insertions, inversions et duplications* (Figure 11.b)(5).

L'addition ou l'élimination d'un segment d'ADN donnent naissance à des mutations beaucoup plus prononcées. Les délétions produisent souvent des phénotypes très marqués car elles éliminent tout ou partie d'un gène, voire plusieurs gènes ou groupes de gènes adjacents. *Les délétions* peuvent également créer de nouvelles juxtapositions de séquences pouvant conférer des propriétés nouvelles aux mutants (ex. des fusions de gènes peuvent produire des protéines multifonctionnelles performantes, et l'apparition de séquences promoteur peut provoquer l'expression de régions du

génomique qui ne sont que peu ou pas exprimés autrement). **Les insertions** sont, dans la plupart des cas, le fait de séquences spécifiques des éléments comme les transposons. Quand un segment d'ADN s'insère dans un gène, il en interrompt la séquence codante et l'inactive. **Les inversions** sont beaucoup moins fréquentes, elles peuvent aussi créer des propriétés nouvelles par de nouvelles juxtapositions. Il y en a également des **duplications**, qui ont touché plusieurs régions du génome bactérien au cours de l'évolution. Ce type de remaniement chromosomique rend une bactérie partiellement diploïde ! (4).

3.3. Mutations reverses

Les mutations reverses établissent le phénotype sauvage. Il s'agit de mutations **en retour** qui se produisent au même site de mutation initiale restaurant la séquence nucléotidique de l'allèle sauvage. Une seconde mutation à un site distinct de celui de la mutation initiale peut parfois rétablir le phénotype sauvage, on parle ici de la **suppression** ou de la **pseudoréversion**.

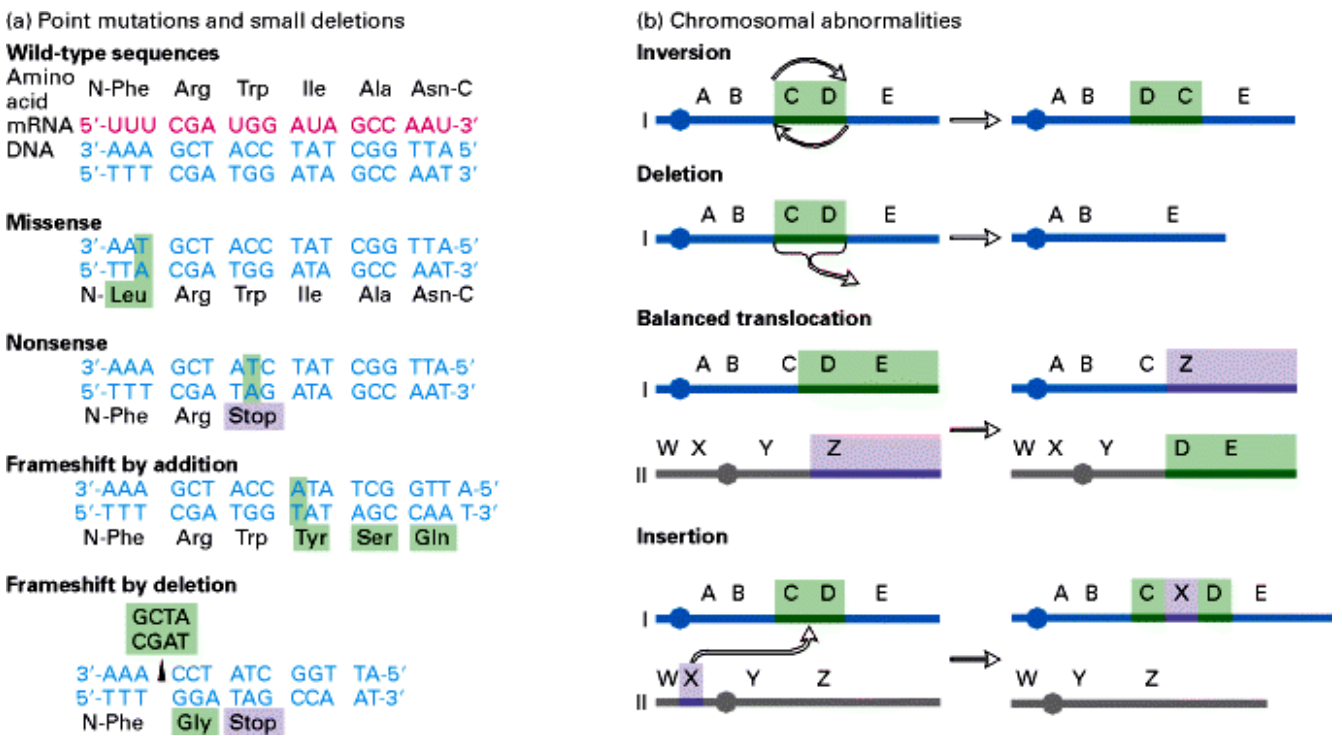


Figure 11: Schéma résumant les Modifications possibles des séquences d'ADN pouvant donner une mutation(5).

4. LES MUTATIONS SPONTANÉES :

Les mutations spontanées apparaissent sans qu'il y ait exposition à des agents externes. Elles peuvent résulter d'erreur dans la réplication de l'ADN (Figure 12), ou encore de l'action de transposons (décrits plus loin).

Les mutations spontanées peuvent être ponctuelles (substitutions), elles peuvent apparaître aussi suite au décalage du cadre de lecture causé par la délétion d'un segment d'ADN, ou encore suite à l'insertion dans le gène de segments d'ADN (ex. transposition). Ce dernier type de mutation est le plus fréquent chez *E. coli* et beaucoup d'autres bactéries.

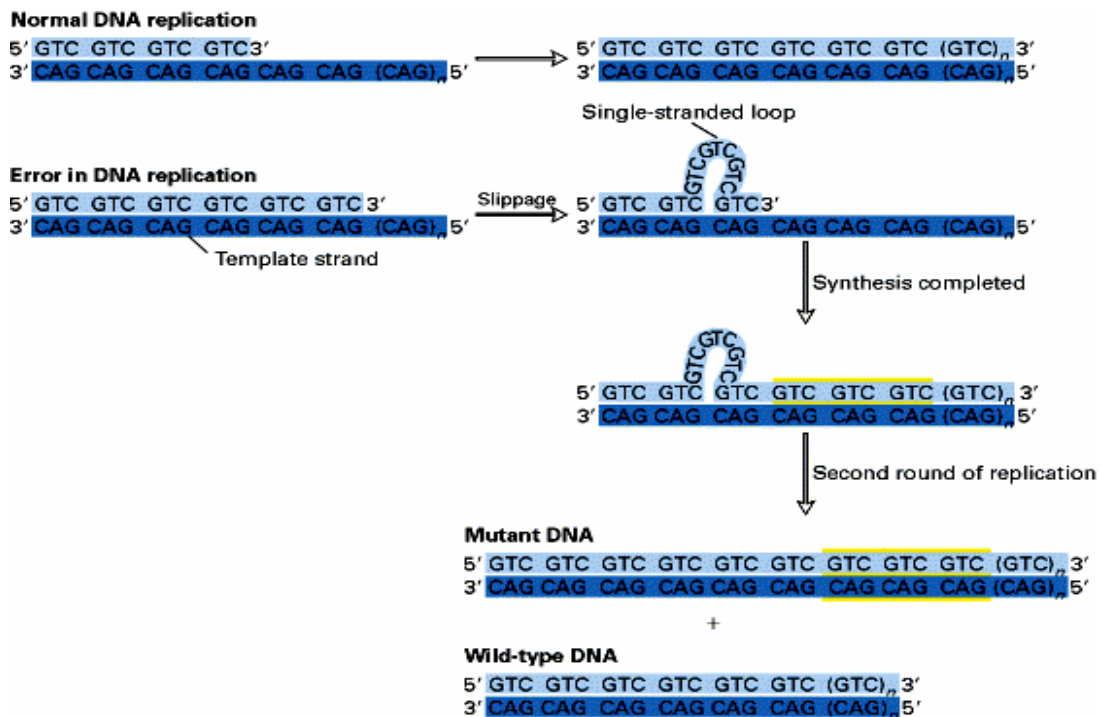


Figure 12. Un mécanisme par lequel des erreurs dans la réplication de l'ADN peuvent produire des mutations spontanées. La réplication d'un seul brin est schématisée ; l'autre brin est répliqué normalement. L'erreur de réplication peut avoir lieu dans les régions d'ADN contenant des séquences répétées en tandem (dans ce cas, GTC) quand une portion du brin nouvellement synthétisé (bleu clair) forme une boucle simple brin. Ce glissement déplace le brin nouvellement synthétisé en arrière le long du brin matrice (bleu foncé). Comme résultats, les enzymes de synthèse de l'ADN vont copier une région du brin matrice deux fois, conduisant à l'augmentation de la longueur de l'ADN par neuf nucléotides dans cet exemple (jaune). Le cycle suivant de réplication de l'ADN donnera naissance à une molécule d'ADN double brin normale, et une molécule mutante contenant les nucléotides additionnels.(5).

5. MUTAGENÈSE (MUTATIONS INDUITES) :

Tout agent qui altère directement l'ADN, modifie sa chimie, ou interfère avec ses mécanismes de réparation induira des mutations. Les agents mutagènes présentent une spécificité mutationnelle caractéristique qui provient du type de modification qu'ils induisent, mais aussi de leur préférences pour certains sites. Les mutagènes peuvent être classés selon leur mode d'action en :

5.1.1. Analogues de bases

Les analogues de bases ressemblent aux bases azotées normales et peuvent être incorporées dans la chaîne polynucléotidique en croissance, au moment de la réplication. Après incorporation, ces composés montrent un appariement différent de celui des bases qu'ils remplacent et peuvent provoquer des substitutions. Parmi ces analogues de bases, le plus utilisé est le 5-bromouracile (5-BU), analogue de la thymine. Cet analogue subit plus fréquemment que la base normale une modification tautomérique de la forme normale cétonique en une forme énolique. Cette forme énolique établit des ponts hydrogène comme la cytosine et appelle l'incorporation de guanine plutôt que d'adénine. D'autres analogues de bases ont un mécanisme d'action similaire à celui du 5-BU(5).

5.1.2. Mutagènes qui modifient les propriétés d'appariement des bases

Le mésappariement spécifique se produit lorsqu'un mutagène modifie la structure d'une base modifiant ainsi ses propriétés d'appariement, les transitions apparaissent au cours des réplications

ultérieures de l'ADN. L'oxydation par l'acide nitreux provoque la désamination de la cytosine qui produit de l'uracile, et celle de l'adénine qui produit de l'hypoxanthine. La chaleur produit aussi la désamination de la cytosine. Les agents alkylants modifient également les propriétés d'appariement des bases, l'hydroxylamine par exemple hydroxyle l'azote en C-4 de la cytosine, l'amenant à s'apparier comme la thymine. Les agents alkylant les plus couramment utilisés, à côté de l'hydroxylamine, sont l'éthylméthane sulfonate (EMS) (**Figure 13**), le diméthylsulfonate (DMS), la N- méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) et les nitrosamines.

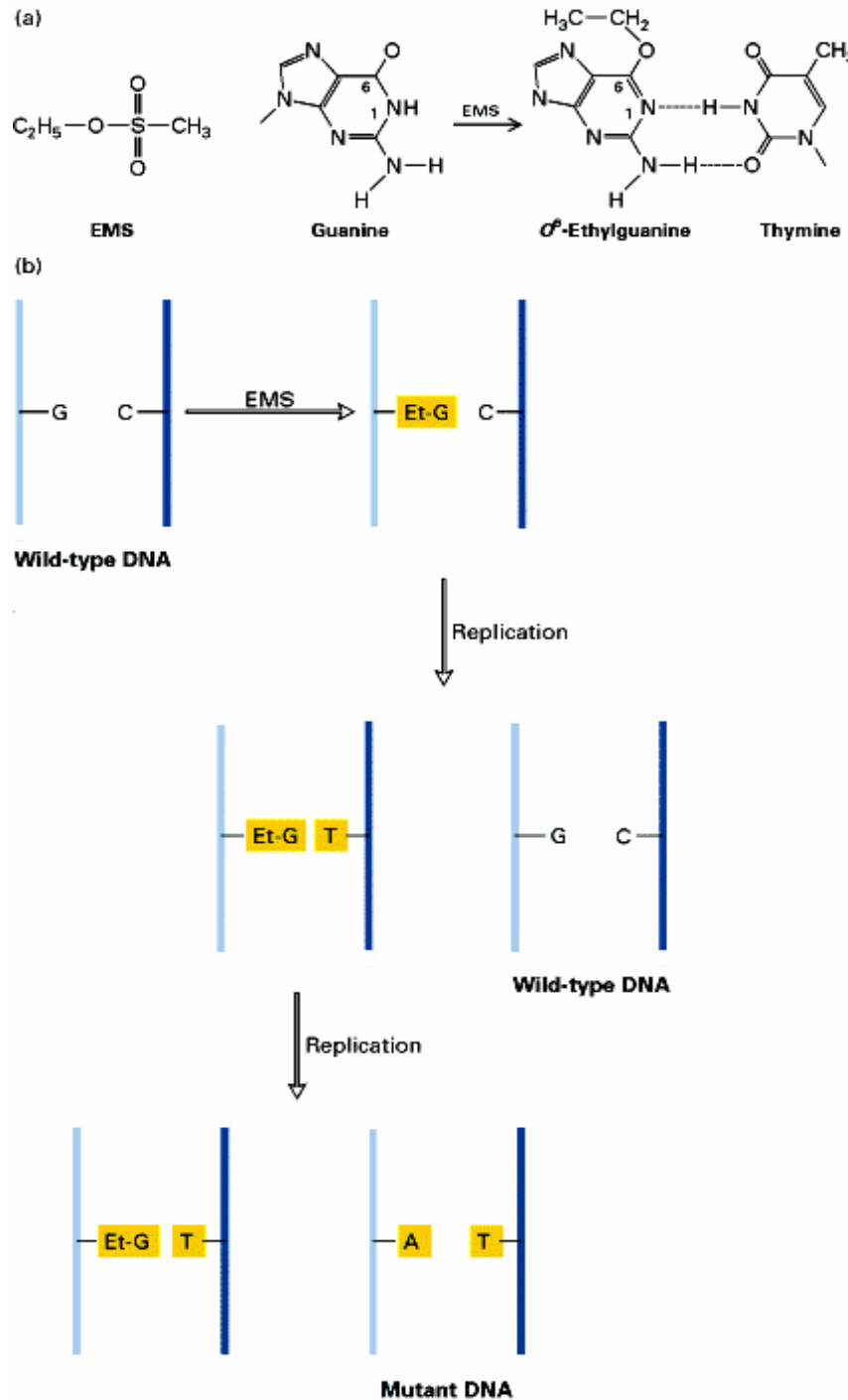


Figure 13. Mutations ponctuelles induites par l'éthylméthane sulfonate (EMS). (a) L'EMS provoque l'alkylation de la guanine au niveau de l'oxygène 6 du noyau purinique formant le O^6 -éthylguanine (Et-G) ayant la propriété de s'apparier à la thymine. (b) Deux cycles de réplication de l'ADN contenant l'Et-G produisent un ADN mutant dans lequel une paire de bases G-C est remplacée par une paire A-T(6).

5.1.3. *Agents intercalants*

Les agents intercalants déforment l'ADN et provoquent l'insertion ou la délétion d'une seule paire de nucléotides. Les acridines dont la proflavine, peuvent intercaler leurs cycles aromatiques entre les bases de l'ADN et provoquer des glissements d'un brin d'ADN par rapport à un autre, générant ainsi des délétions ou additions de nucléotides.

5.1.4. *Mutagenèse qui créent des lésions dans l'ADN*

Beaucoup de substances mutagènes comme les cancérigènes, altèrent les bases d'une manière si importante.

Les radiations UV provoquent différents types de lésions dont la dimérisation de pyrimidines voisines qui empêche leur appariement avec les purines correspondantes (**Figure 14**). Ces dimers constituent un obstacle à la réplication de l'ADN et sont létales s'ils ne sont pas éliminés.

Les agents cancérogènes comme l'aflatoxine B1 et le benzopyrène agissent après avoir été métabolisés en se fixant sur l'ADN et constituent également des obstacles bloquant la réplication de l'ADN.

Les radiations X induisent la formation de radicaux libres extrêmement réactifs qui provoquent des lésions très graves dans l'ADN, notamment des cassures simple et double brin. Le religation des fragments d'ADN ainsi produits entraîne des grandes délétions, des duplications et des inversions. Ces lésions ne sont que très rarement réparables et sont létales lorsqu'elles touchent des régions essentielles du chromosome. Les radiations UV induisent également le même type de lésion(6).

5.1.5. *Mutagenèse par des éléments génétiques transposables*

Les éléments génétiques transposables sont des segments mobiles d'ADN, capables de se transposer d'un site chromosomique à un autre, mais aussi d'un plasmide vers le chromosome ou vice-versa, sans qu'il y ait d'homologie de séquence importante entre l'élément et le site d'insertion. L'absence de spécificité d'insertion permet de mutagéniser pratiquement tous les gènes du chromosome bactérien. L'incorporation d'un transposon inactive complètement la fonction du gène.

6. **DETECTION ET ISOLEMENT DES MUTANTS :**

Lorsqu'on veut étudier des mutants de bactéries, on doit pouvoir les détecter aisément même s'ils sont rares, on doit également les séparer efficacement des cellules parentales et des autres mutants.

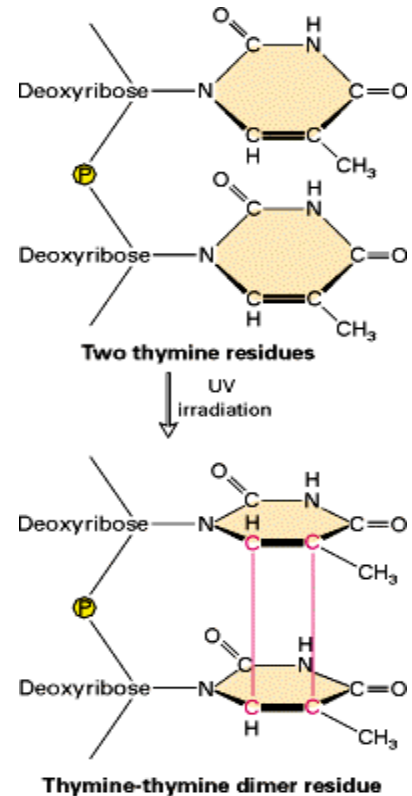


Figure 14. L'irradiation par les UV provoque un double pontage entre deux thymines adjacentes. La création de liaisons covalentes entre les atomes de carbone 5 et 6 des noyaux pyrimidiques forme un dérivé du cyclobutane. L'appariement normal de ces bases est rompu en présence du dimère(2).

De nombreux types de mutants peuvent facilement être isolés : des mutants auxotrophes, des mutants qui ne peuvent fermenter certaines sources de carbone, des mutants qui résistent aux antibiotiques ou à des substances toxiques tels que les métaux lourds, ou encore des mutants touchés dans un processus cellulaire important ou vital.

6.1. Détection des mutants

Les mutations sont des événements rares (une mutation pour 10^7 à 10^{11} cellules), leur détection nécessite des systèmes très sensibles. En induisant des mutations par un agent mutagène, on peut augmenter la probabilité d'obtenir des changements spécifiques à une fréquence allant de 1 pour 10^3 à 10^{10} . La détection des mutations nécessite également qu'on dispose de populations importantes, les bactéries satisfont parfaitement à cette condition.

Les systèmes de détection chez les bactéries sont simples et directes, ces organismes haploïdes vont exprimer tout nouvel allèle même s'il s'agit d'une mutation récessive. Deux systèmes sont utilisés pour la détection des mutants :

6.1.1. Milieux indicateurs

La fermentation de certains hydrates de carbone modifie le pH (acidification). Certains milieux contiennent des indicateurs colorés sensibles à de telles modifications. Ainsi, sur le milieu Mc Conkey contenant du lactose, les colonies de cellules qui fermentent le lactose sont pourpres, les autres qui ne le fermentent pas sont blanches.

D'autres milieux contiennent des substances très spécifiques dont l'hydrolyse libère un groupement coloré. C'est le cas de l'X-gal, un analogue synthétique des β -galactosides. L'hydrolyse de l'X-gal par la β -galactosidase (produit du gène *lac Z*) libère du 5-bromo-4-chloro-indigo d'une couleur bleue foncée. Les colonies de type sauvage sont bleues, celles des mutants *lac Z* sont blanches(6).

6.1.2. Répliques sur boîte (ou sur velours)

Cette méthode permet d'analyser un nombre élevé de colonies pour la présence de mutations.

Une culture contenant des cellules sauvages et mutantes est étalée sur un milieu riche. Après développement des colonies, une pièce de velours stérile tendu sur un support cylindrique est appliqué à la surface de la gélose pour y prélever des cellules de chaque colonie. Il est ensuite mis en contact avec la surface d'autres boîtes de milieux de compositions différentes, en gardant la même position. La comparaison de la croissance des colonies sur les différents milieux permet le repérage et une première caractérisation des mutants (**Figure 15**).

6.2. Sélection des mutants

Une sélection sera efficace si l'on connaît les conditions d'incubation permettant une croissance appropriée du mutant.

Les mutants auxotrophes sont décelés par l'absence de croissance du mutant sur un milieu minimum dépourvu du nutriment dont la mutation empêche la synthèse. Les mutations qui confèrent la résistance aux antibiotiques ou à une substance toxique sont sélectionnées directement par étalement sur un milieu contenant l'antibiotique ou la substance toxique en question. Les mutations touchant un processus vital peuvent être facilement décelées dans les conditions d'environnement dites non-permissives dont le phénotype résultant est la mort cellulaire. Les mutants correspondant sont produits et conservés dans des conditions permissives, mais analysés dans des conditions non-permissives(6).

6.3. Détection du pouvoir cancérigène (Test de Ames)

Les substances toxiques, cancérigènes sont considérées toutes comme mutagènes. L'étude de ces agents est d'une grande importance ; les identifier dans l'environnement nous permettra de les éviter. Le caractère mutagène de la plupart ces substances a servi de base à des tests de détection qui exploitent la rapidité de croissance des populations bactériennes. Le test de Ames, décrit par Bruce Ames dans les années 1970 est le plus utilisé dans ce domaine. Le test de Ames est basé sur la mesure des taux de **réversion** de diverses souches de *Salmonella typhimurium*, chacune ayant une mutation différente sur l'opéron de la biosynthèse de l'histidine. Ces bactéries sont donc incapables de synthétiser l'histidine (His⁻), leur culture n'est donc possible que sur des milieux pourvus d'histidine. La présence d'un agent mutagène provoque chez ces bactéries une mutation reverse (His⁺) qui permet

aux cellules mutantes de croître sur un milieu dépourvu d'histidine. Un composé est donc considéré mutagène s'il permet la croissance d'une souche de *S. typhimurium* (His^-) sur un milieu sans histidine (**Figure 16**). La disponibilité de diverses souches de *S. typhimurium* (His^-), ayant des mutations différentes sur l'opéron de synthèse de l'histidine permet de préciser le type de mutation induite.

En plus de la substance à tester, un extrait de foie de mammifères est souvent ajouté au milieu, l'extrait hépatique permet l'activation d'agents mutagènes qui requièrent une modification pour induire leur pouvoir cancérogène. Ce phénomène a lieu normalement lorsque les substances étrangères sont métabolisées dans le foie. Puisque les bactéries n'ont pas ce système, on ajoute l'extrait de foie afin de mimer les transformations ayant lieu chez les mammifères. Cette action permet de distinguer les composés qui possèdent une action mutagène intrinsèque de ceux qui requièrent une modification(5).

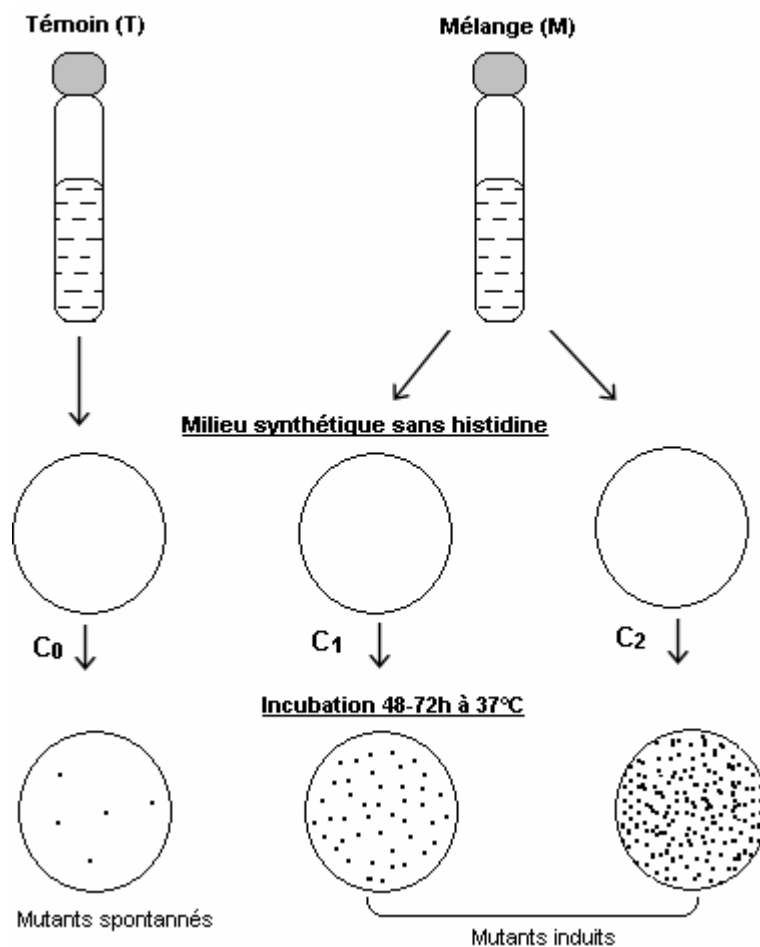


Figure 16. Test de Ames. Les bactéries His^- et l'agent étudié pour son pouvoir mutagène sont mélangés dans un milieu contenant une petite quantité d'histidine. Ce mélange (M) est ensuite étalé sur un milieu synthétique sans histidine, le tout est incubé à 37°C pendant 48 à 72h. Les bactéries entament leur croissance qui est rapidement limitée par l'épuisement de l'histidine du milieu. Seules continuent à croître les réverses (His^+). L'effet mutagène de la substance étudiée est d'autant plus important que le nombre de colonies développées en sa présence soit élevé, par rapport au témoin. Il est aussi proportionnel à la concentration de l'agent mutagène(7)

7. CORRECTION DES MUTATIONS ET REPARATION DE L'ADN :

Le taux des mutations chez les bactéries est déterminé par l'efficacité de la réplication de l'ADN, de la survenue des lésions de l'ADN et de l'efficacité des mécanismes de la réparation de l'ADN endommagé.

L'ADN polymérase I d'*E. coli* a une fonction de relecture et une fonction de correction

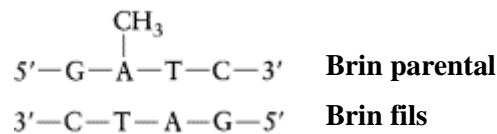
sur épreuve, elle serait activée lorsque l'appariement qui vient de s'effectuer n'est pas conforme. Cette fonction est assurée par une activité exonucléase 3' → 5', qui fonctionne donc en sens inverse de la direction de la synthèse.

7.1. Elimination des défauts d'appariement

Bien que les bactéries possèdent le système de correction sur épreuve assuré par les ADN polymérases, certains mésappariements échappent à cette correction.

Les cellules bactériennes possèdent un système de réparation des mésappariements qui reconnaît et répare les mauvais appariements des bases de l'ADN, ce système est appelé système de correction des mésappariements dirigée par la séquence GATC méthylée, ou encore le système *MutHLS*. Mais comment ce système peut-il distinguer le brin normal du brin muté et réparer ce dernier pour donner des paires de bases proprement appariées?

Dans l'ADN d'*E. coli*, les résidus adénine dans une séquence GATC sont méthylés en position 6. Lors de la réplication de l'ADN, les polymérases incorporent de l'adénine non-méthylée, dans une molécule d'ADN nouvellement répliqué, seul le brin parental contient les résidus adénine méthylés. Les adénines des séquences GATC du brin fils sont méthylées après un décalage de quelques minutes par une *Dam* méthyltransférase. Durant cette période de décalage, la molécule d'ADN nouvellement repliquée contient des séquences GATC semi-méthylées :



Une protéine appelée MutH d'*E. coli* qui se lie spécifiquement aux séquences semi-méthylées, est capable de distinguer entre le brin parental méthylé et le brin fils non-méthylé. Si une erreur d'appariement survient au voisinage d'une séquence GATC, une autre protéine, MutS, se lie au site du mésappariement (**Figure 17**). La fixation de MutS provoque la fixation de MutL, une protéine de liaison qui relie une MutS à une MutH voisine. Cette liaison croisée active une activité endonucléase latente de MutH qui coupe spécifiquement le brin non-méthylé. Suite à cette incision initiale, le segment du brin fils contenant la base erronée est excisé et remplacé par une séquence correcte d'ADN(7).

Les souches d'*E. coli* qui manquent des protéines MutS, MutH et MutL ont des taux de mutations spontanées plus élevés que les cellules de type sauvage. Les souches *Dam*⁻ qui ne peuvent pas synthétiser la *Dam* méthyltransférase ont aussi des taux élevés de mutations spontanées. Les souches *Dam*⁻ ne peuvent pas méthyler l'adénine des séquences GATC, le système *MutHLS* ne peut pas distinguer entre la matrice et le brin nouvellement synthétisé et ne peut donc pas réparer proprement les mésappariements.

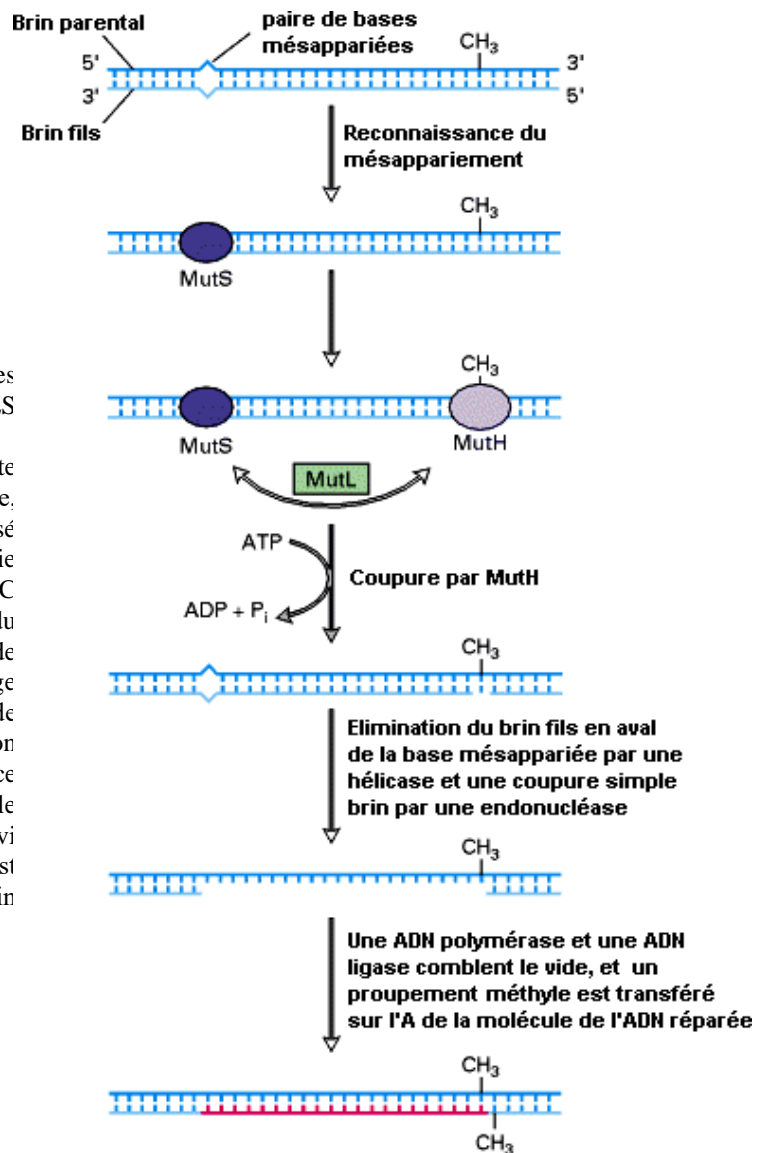


Figure 17. Model de la correction des mésappariements par le système MutHLS d'*E. coli*.

Ce système de réparation intervient juste après l'incorporation d'une base erronée, avant que le brin nouvellement synthétisé soit méthylé. La protéine MutH se lie spécifiquement à une séquence GATC semi-méthylée, MutS se lie au site du mésappariement. La fixation simultanée de la protéine MutL sur MutS et au voisinage de MutH active l'activité endonucléase de cette dernière, qui coupe alors le brin non méthylé (brin fils) au niveau de la séquence GATC. La partie du brin fils contenant le mésappariement est excisée, ceci est suivi par resynthèse de l'ADN, sa continuité est rétablie par l'action de l'ADN ligase, le brin fils est ensuite méthylé(7)

7.2. Réversion des dommages chimiques (Réparation des lésions de l'ADN)

7.2.1. La réparation des distorsions par excision-resynthèse chez *E. coli*

Les cellules utilisent la réparation par excision pour réparer les régions de l'ADN contenant des bases modifiées qui distordent localement la molécule de l'ADN. La clé de ce type de réparation est la capacité de certaines protéines de glisser le long de la molécule d'ADN double brin cherchant les formes irrégulières dans la double hélice. Ce système de réparation concerne les lésions affectant un seul brin, principalement dues à la formation accidentelle de dimères C-C ou T-T. Ces dimères entraînent une distorsion localisée de la structure hélicoïdale de l'ADN, avec la rupture à ce niveau des liaisons hydrogène entre les deux brins de l'ADN. L'exemple le plus illustratif de ce système de réparation est le système UvrABC d'*E. coli* (**Figure 18**)

Un complexe contenant deux molécules de la protéine UvrA et une molécule d'UvrB se forme et se lie à l'ADN. La formation de ce complexe et sa fixation sur l'ADN nécessitent de l'ATP. Il paraît que le complexe UvrA-UvrB se lie initialement à un segment d'ADN non endommagé et se déplace le long de l'hélice de l'ADN jusqu'à ce qu'il reconnaisse une distorsion. La molécule d'ADN subit un

changement de conformation ATP-dépendant au niveau de la région endommagée liée au complexe UvrA-UvrB. Ce changement conformationnel produit une courbure dans le squelette de l'ADN. Le dimère UvrA se dissocie, la protéine UvrC ayant une activité endonucléase se lie ensuite au site endommagé. L'interaction de l'UvrC avec l'ADN courbé aurait créé un espace dans l'ADN permettant aux résidus catalytiques de l'enzyme d'accéder à leur cible. La position précise du site de clivage est déterminée par la nature de la lésion de l'ADN. Dans le cas des dimères thymine-thymine, l'UvrC coupe le brin endommagé en deux sites séparés par 12 à 13 bases (étapes 5 et 6). Ensuite, UvrB et UvrC se dissocient et une hélicase II déroule la région endommagée (étape 7) libérant le fragment simple brin, contenant la lésion, qui sera dégradé en mononucléotides. Le vide résultant est comblé par action de l'ADN polymérase I et la continuité de l'ADN est rétablie par l'ADN ligase (8).

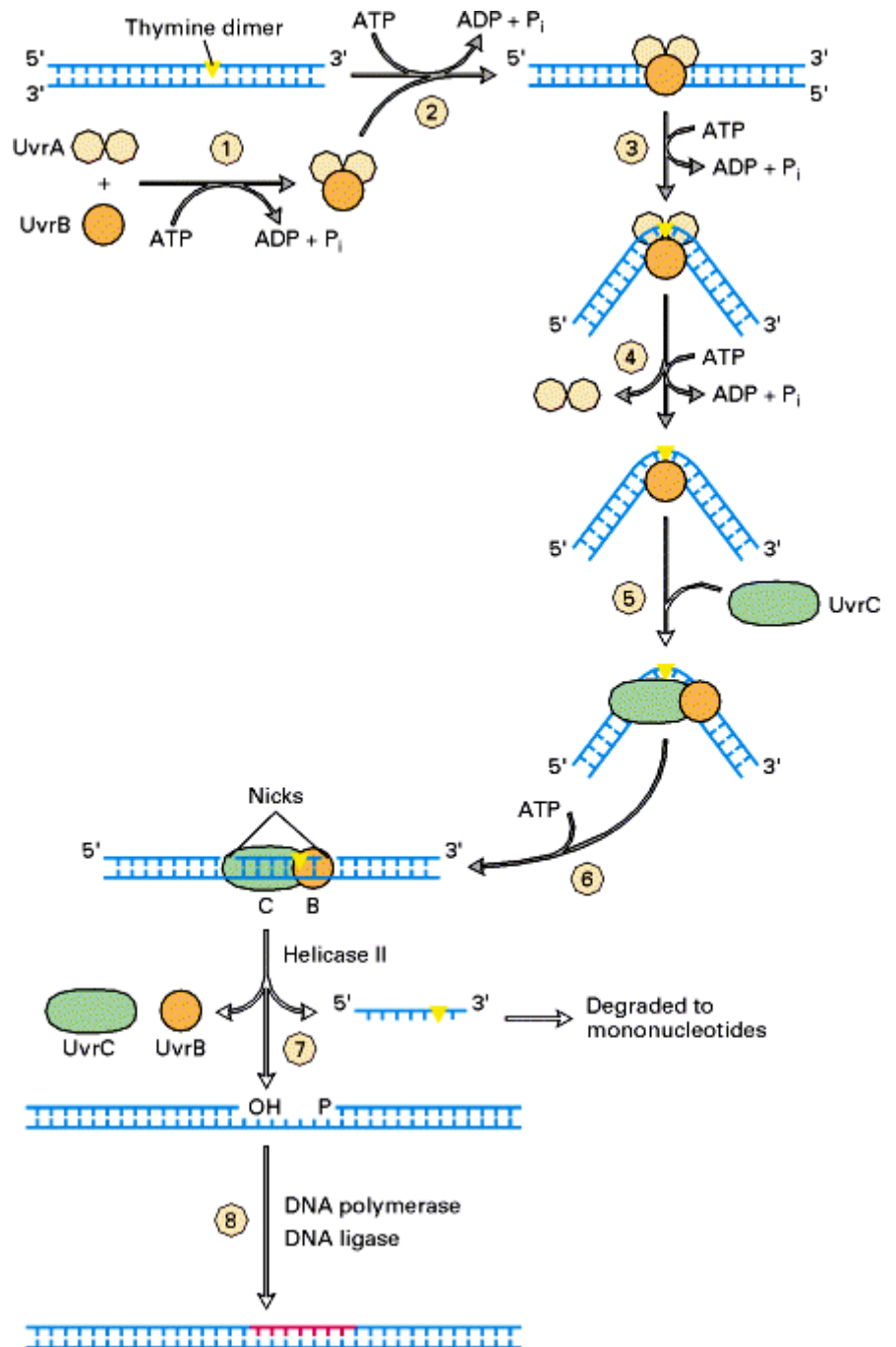


Figure 18. Mécanisme de la réparation par excision de l'ADN par le système UvrABC d'*E. coli*. Deux molécules de UvrA et une de UvrB forment un complexe qui se déplace aléatoirement le long de l'ADN (étapes 1 et 2). Une fois le complexe rencontre une lésion, des changements conformationnels de l'ADN entraîne sa dénaturation locale et une courbure de 130° (étape 3). Le dimère UvrA se dissocie (étape 4) et une endonucléase UvrC se lie et coupe le brin endommagé en deux sites séparés par 12 à 13 bases (étapes 5 et 6). Ensuite, UvrB et UvrC se dissocient et une hélicase II déroule la région endommagée (étape 7) libérant le fragment simple brin, contenant la lésion, qui sera dégradé en mononucléotides. Le vide résultant est comblé par action de l'ADN polymérase I et la continuité de l'ADN est rétablie par l'ADN ligase (8).

7.2.2. *La photoréactivation*

Le système de photoréactivation des dimères de thymine est basé sur la lumière visible qui active l'ADN photolyase qui dépolymérise les dimères cyclobutane-pyrimidine produits par la lumière ultraviolette. L'enzyme ADN photolyase n'absorbe pas la lumière par elle-même, elle ne se fixe non plus sur un composé qui absorberait la lumière, c'est le complexe formé par l'ADN et cette enzyme qui, d'une façon non encore élucidée, absorbe la lumière et utilise son énergie pour cliver les liaisons C-C des anneaux cyclobutyl.

7.2.3. *Réparation par recombinaison*

La réplication de l'ADN est bloquée par les photodimères ou les adduits volumineux. S'ils n'ont pas été éliminés par excision, la réplication reprend au-delà du site de lésion, faisant apparaître une discontinuité dans le brin néosynthétisé. Une recombinaison entre les deux bras de la fourche de réplication peut compléter ce brin en y introduisant la région équivalente provenant de l'autre brin parental. Cette région est resynthétisée en prenant le brin néosynthétisé comme matrice (**Figure 19**). Ce mécanisme fait intervenir plusieurs protéines parmi lesquelles RecA qui apparie les séquences flaquant la lésion avec leur complément intact.

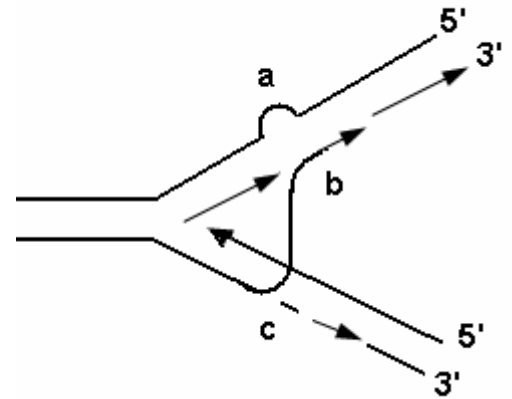


Figure 19. Réparation d'une brèche monocaténaire par recombinaison. (a) Lésion dans l'ADN parental qui provoque une interruption locale de la réplication et l'apparition d'une brèche dans le brin répliqué ; (b) L'autre brin parental est introduit dans la brèche et ligaturé avec le brin néosynthétisé ; (c) La brèche créée dans le brin parental est comblée sous l'action de l'ADN polymérase I(8).

7.3. *La réponse SOS*

Les lésions trop importantes de l'ADN rendent les systèmes de réparation précédemment décrits inopérants. Dans une situation pareille, la cellule utilise un système de réparation inductible dit Système SOS pour dépasser la lésion. La réponse SOS est un processus complexe, parfois aussi appelé réparation infidèle ou réparation mutagène parce qu'il génère des erreurs en réparant les lésions.

Les lésions importantes de l'ADN laissent de nombreuses brèches aux quelles se lie la protéine RecA initiant l'échange des brins, en même temps, RecA détruit la protéine LexA par son activité protéolytique, LexA étant un répresseur d'un nombre de gènes impliqués dans la réparation et la synthèse de l'ADN. La destruction de LexA permet l'expression de ces gènes accélérant les processus de réplication et de réparation. Parmi les gènes SOS, *umu D* et *umu C* codent pour des produits qui permettent à la réplication de franchir l'obstacle constitué par la lésion au prix d'une diminution de fidélité. Parmi les gènes SOS figurent également les gènes *uvr A, B, C* qui codent pour l'endonucléase du système d'excision, et *rec A* lui-même. Ces gènes sont déjà exprimés dans des conditions normales mais la réponse SOS accroît encore leur expression(6).

III. LES PLASMIDES

Les plasmides sont des petites molécules d'ADN circulaires qui peuvent exister indépendamment des chromosomes de l'hôte et sont présentes dans de nombreuses bactéries (on trouve aussi des plasmides chez la levure et chez certains protozoaires). Les plasmides ont leur propre origine de réplication, se répliquent de façon autonome et sont transmis aux cellules filles de manière stable. Les plasmides portent un nombre de gènes réduit, généralement moins d'une trentaine. Leur information génétique n'est pas essentielle pour l'hôte et les bactéries qui en sont dépourvues vivent normalement. Les plasmides peuvent exister en une seule copie par cellule (plasmides à copie unique) comme ils peuvent se présenter au nombre de quarante copies ou plus par cellule (plasmides à copies multiples). Un grand nombre de propriétés intéressantes de quelques espèces bactériennes (en médecine, agriculture, industrie et environnement) sont déterminées par les plasmides, relevons parmi ces propriétés : des formes de virulence (production d'exotoxines, d'hémolysine, résistance aux antibiotiques, tumorigénicité) ; formation de nodules sur les racines de légumineuses par les souches de *Rhizobium* fixatrices d'azote ; production d'antibiotiques, dégradation des polluants, conjugaison bactérienne..

La présence des plasmides est facilement mise en évidence par électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN extrait des bactéries. Les différentes molécules d'ADN (chromosome et plasmides éventuelles) migrent différenciellement dans le gel d'agarose en fonction de leur taille et de leur forme ; plus l'ADN est petit plus vite il migre.

1. STRUCTURE DES PLASMIDES

Les plasmides sont tous des molécules d'ADN bicaténaire extrachromosomique, ils sont de tailles différentes variant entre 5.10^5 à 4.10^8 Daltons, soit environ 1/1000 à 1/20 de la taille du chromosome bactérien (la taille du chromosome bactérien est d'environ $2,9.10^9$ Daltons). Ils sont formés de séquences de nucléotides sans homologie avec le chromosome bactérien, ce qui montre qu'ils lui sont étrangers.

Les plasmides ont une organisation génétique modulaire, chaque module étant un segment d'ADN comprenant un ou plusieurs gènes qui confèrent une propriété particulière au plasmide ou à la cellule hôte. Le site *rep* par exemple est un site essentiel dans le plasmide, responsable de sa réplication ; le module *tra* est responsable du transfert conjugatif (Facteur F) ; d'autres modules sont responsables de la résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds (Facteurs R). Beaucoup de plasmides contiennent des éléments génétiques transposables, d'autres contiennent des gènes codant pour des toxines (Plasmides de virulence)(7).

Certains plasmides ne confèrent aucun phénotype particulier à la cellule hôte et ne sont décelés que lors de l'analyse de l'ADN bactérien, ces plasmides sont dits *cryptiques*.

2. LES TYPES DE PLASMIDES

Selon les types et les propriétés de modules ou de gènes portés par les plasmides, on peut distinguer différents types qu'on décrira les plus importants (**Tableau 2**):

2.1. Facteur de fertilité (facteur F)

Ce type de plasmides joue un rôle important dans la conjugaison chez *E. coli* et fut le premier à être décrit. Le facteur F est une molécule d'ADN d'environ 100 Kpb, il porte les gènes nécessaires à l'attachement cellulaire et à son transfert entre souches bactériennes spécifiques au cours de la conjugaison. L'information requise pour le transfert du plasmide est contenue dans l'opéron *tra* qui contient au moins 28 gènes. Beaucoup de ces gènes déterminent la formation de pili sexuels qui attachent la cellule F⁺ (cellule donneuse contenant un plasmide

F) à une cellule F⁻. Les autres produits de gènes participent au transfert de l'ADN. Le facteur F contient également plusieurs séquences appelées "séquences d'insertion" qui permettent l'intégration du plasmide dans le chromosome de la cellule hôte (**Figure20**).

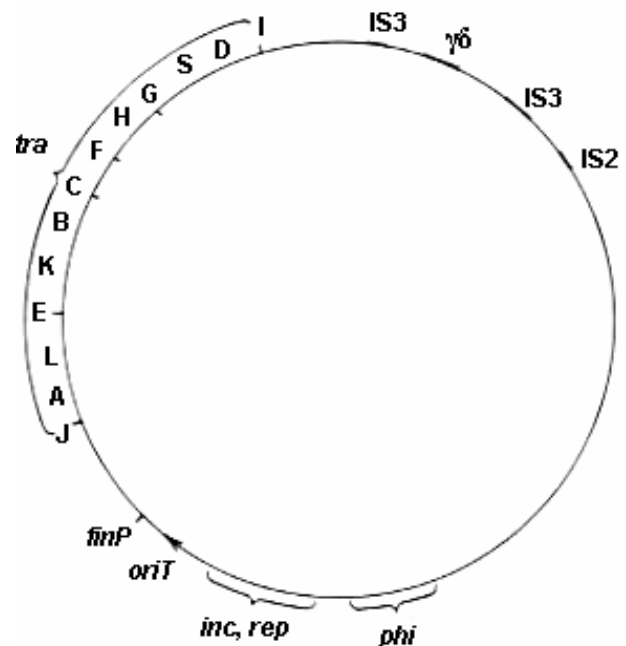


Figure 20. Carte génétique du plasmide F montrant la position relative des gènes codants pour les fonctions du transfert (*tra*), d'inhibition de fertilité (*finP*), origine de réplication (*oriT*), incompatibilité (*inc*), réplication (*rep*), et inhibition des phages (*phi*). La position des séquences d'insertion (IS2, IS3 et $\gamma\delta$) est également montrée(9).

2.2. Facteurs de résistances (facteurs R)

Les facteurs ou plasmides R confèrent la résistance aux antibiotiques chez les cellules bactériennes qui les contiennent ; ils ont des gènes qui codent pour des enzymes capables d'inactiver ou de modifier les antibiotiques. Certains plasmides R possèdent un seul gène de résistance alors que d'autres en ont jusqu'à huit. Souvent, les gènes de résistance sont contenus dans un transposon, il est donc possible pour des souches bactériennes d'acquérir rapidement des plasmides à résistance multiple. De nombreux plasmides R sont également des plasmides conjugatifs pouvant se propager dans une population bactérienne. Les facteurs F non conjugatifs passent souvent d'une bactérie à l'autre durant une conjugaison promue par un autre plasmide. Le transfert facile de ces facteurs R entre espèces favorise la propagation de la résistance. Lorsqu'un patient consomme des quantités importantes d'antibiotiques, *E. coli* et d'autres bactéries porteuses de facteurs R sont sélectionnées et deviennent prévalentes. Les facteurs R peuvent alors être transférés à des genres plus pathogènes tels que *Salmonella* ou *Shigella* entraînant des problèmes de santé publique encore plus graves(8).

2.3. Les plasmides Col

Les plasmides Col portent des gènes codant pour des *bactériocines* qui sont des protéines bactériennes qui détruisent d'autres bactéries donnant aux cellules qui les hébergent un avantage compétitif.

Les bactériocines agissent uniquement contre des souches apparentées, elles tuent souvent les cellules en formant des canaux dans la membrane plasmique, augmentant sa perméabilité. Elles peuvent également dégrader l'ADN et l'ARN ou hydrolyser les peptidoglycanes et fragiliser la paroi cellulaire. Manifestement, l'hôte n'est pas affecté par les bactériocines qu'il produit. Certains plasmides Col sont conjugatifs et peuvent en plus porter des gènes de résistance.

2.4. Les plasmides de virulence

Ces plasmides peuvent porter des gènes codant pour des toxines rendant la bactérie qui les porte pathogène. La pathogénicité de ces bactéries est accrue si elles sont résistantes aux défenses de l'hôte.

2.5. Les plasmides métaboliques

Ces plasmides portent des gènes d'enzymes qui métabolisent des substances telles que des composés aromatiques (toluène), des pesticides (acide 2, 4-dichlorophénoxyacétique) et des sucres (lactose).

Des plasmides métaboliques portent même des gènes nécessaires à certaines souches de *Rhizobium* pour induire la nodulation chez les légumineuses et effectuer la fixation d'azote(8).

3. REPLICATION DES PLASMIDES

La réplication des plasmides est initiée au niveau d'origines fixes. Les petits plasmides ont une seule origine de réplication, les grands ont plusieurs origines de réplication, mais la plupart d'entre eux n'en utilisent qu'une seule.

La réplication de certains plasmides est unidirectionnelle, pour d'autres elle est bidirectionnelle. Elle peut être assurée entièrement par les fonctions de la cellule hôte ou dépendre en partie des fonctions plasmidiques.

La réplication des grands plasmides est synchrone avec celle du chromosome de la cellule hôte, cette dernière qui n'en contient qu'une à deux exemplaires. Ce n'est pas le cas des petits plasmides qui se répliquent indépendamment et sans synchronisation avec la multiplication du chromosome de la cellule hôte, le nombre de copies est plus élevé (10 à 50).

4. TRANSEERT

Les plasmides sont *transmis verticalement* aux cellules filles, normalement en nombre égal au moment de la division cellulaire. Ils sont également *transmis horizontalement* ; c'est-à-dire de cellule à cellule, présentes dans le même milieu et appartenant ou non à la même espèce. Dans ce cas, le transfert se fait selon deux mécanismes : la conjugaison et la mobilisation.

4.1. La conjugaison

Certains plasmides sont conjugatifs, ce qui signifie qu'ils sont aptes à effectuer leur propre transfert durant le processus de conjugaison entre deux cellules. Ceci implique un contact physique entre les deux cellules, durant lequel la bactérie donatrice transfère une copie d'ADN de son plasmide à une bactérie réceptrice.

Ce mécanisme concerne généralement les plasmides de grande taille qui sont peu nombreux et codent en principe pour des propriétés importantes. Les plasmides conjugatifs les mieux connus sont les facteurs F issus d'*E. coli*.

4.2. La mobilisation

D'autres types de plasmides sont non conjugatifs, ils sont plus petits et bien plus nombreux dans la cellule bactérienne. Ils sont incapables d'assurer leur propre transfert qui ne peut se faire que par la mobilisation d'un plasmide conjugatif, cohabitant dans la même cellule.

En général, la mobilisation implique l'intégration, c'est-à-dire une insertion par liaison covalente du plasmide non conjugatif au plasmide conjugatif, donnant ainsi un ADN plasmidique hybride capable de conjugaison. Mais dans certains cas, la mobilisation se fait sans intégration, la liaison entre les deux plasmides est donc transitoire.

5. **GROUPES D'INCOMPATIBILITE**

Les transferts sont l'élément principal de la dissémination des plasmides, mais ces derniers ne sont pas transmis au hasard. Il existe parmi eux des **groupes d'incompatibilité**, génétiquement contrôlés qui induisent des transferts sélectifs. C'est-à-dire que la présence dans une bactérie de plasmides appartenant à un groupe d'incompatibilité donné empêche l'entrée d'autres plasmides, de nature définie et appartenant à d'autres groupes d'incompatibilité, avec lesquels ils ne peuvent coexister dans la même cellule.

Les groupes d'incompatibilité sont nombreux (plus de 25 chez *E. coli* seule) et sont plus ou moins spécifiques d'espèce. Les plasmides ubiquitaires peuvent se transférer chez une grande variété d'espèces de bactéries à GRAM négatif (ex. groupes de plasmides P, Q et W), la dissémination d'autres groupes de plasmides est par contre beaucoup plus restreinte(3).

IV. LES ELEMENTS GENETIQUES TRANSPOSABLES

1. DEFINITION ET GENERALITES

Les éléments génétiques transposables ou éléments génétiques mobiles sont des segments d'ADN qui se déplacent dans le génome, ils ont une capacité remarquable de translocation. Ils se rencontrent chez la plupart des organismes, des bactéries aux eucaryotes supérieurs.

Les éléments transposables jouent un rôle important dans les variations génétiques individuelles, c'est-à-dire au niveau d'une même cellule par la redistribution des gènes et sans rapport avec le transfert d'éléments génétiques d'une cellule à une autre.

Contrairement à d'autres mécanismes qui réorganisent l'ADN, la transposition ne requiert pas de zones étendues d'homologie entre le transposon et son site de destination.

Les éléments transposables sont essentiellement des parasites moléculaires, qui ne semblent avoir aucune fonction spécifique dans la biologie de leurs organismes hôtes, mais maintiennent seulement leur propre existence. C'est pour cette raison que Francis Crick les a appelé "ADN égoïste".

Les éléments transposables diffèrent des phages, car ils n'ont pas le cycle biologique typique des virus, et des plasmides, puisqu'ils sont incapables de se répliquer de manière autonome et d'exister indépendamment du chromosome.

Les éléments transposables furent découverts dans les années 1940 par Barbara McClintock, au cours de ses études de la génétique du maïs, une découverte qui lui valut le prix Nobel en 1983. Ils furent étudiés abondamment chez les bactéries et les virus(9).

2. GROUPES DE TRANSOSONS

Les éléments génétiques transposables bactériens se répartissent en trois groupes principaux, selon leur structure génétique et leur mode de transposition :

2.1. Les séquences d'insertion et les transposons composites

Les éléments transposables les plus simples sont les séquences d'insertion ou **éléments IS**. Un élément IS est une courte séquence d'ADN (de 750 à 1 600 pb) contenant uniquement les gènes qui assurent la transposition, et flanquée à chaque extrémité par des séquences nucléotidiques identiques ou très similaires appelées séquences répétées inverses ou **IR (Figure 21)**. Chaque type d'IS a des séquences IR qui lui sont propres. Entre les séquences IR se trouve un gène qui code pour une enzyme appelée *transposase* nécessaire à la transposition. Chaque type de ces éléments d'insertion est désigné par le préfix IS suivi d'un numéro. La transposition de ces éléments suit souvent un mécanisme conservatif.

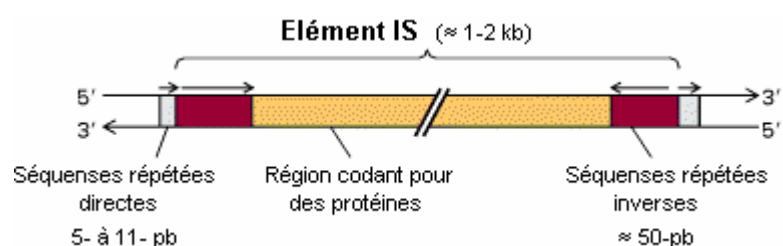
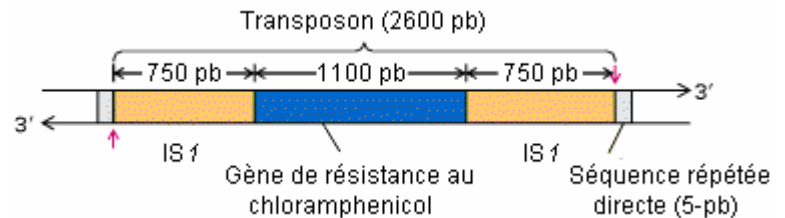


Figure 21. Structure générale d'un élément IS bactérien(9).

Les transposons composites contiennent, en plus des gènes de transposition, autres gènes, par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques ou des gènes de toxines. Les transposons composites ont souvent une région centrale contenant les gènes supplémentaires, flanqués de part et d'autre par des éléments IS (**Figure 22**). Les noms des transposons composites commencent par le préfix Tn. On pense que les transposons composites se forment lorsque deux éléments IS s'associent avec un segment d'ADN contenant un ou plusieurs gènes(10).

Figure 22. Structure générale du transposon composite Tn9 d'*E. coli*(10).



2.2. Les éléments de la famille du transposon 3 (Tn3)

Les éléments transposables de la famille de Tn3 contiennent, en plus d'un gène de transposase (*tnp A*), un gène de résolvasse (*tnp R*) ; une enzyme qui effectue une recombinaison spécifique lors de la transposition, ainsi que des gènes de résistance à des antibiotiques ou à des métaux lourds. La transposition de ces éléments suit un modèle réplcatif.

2.3. Le phage Mu et autres types de prophages apparentés

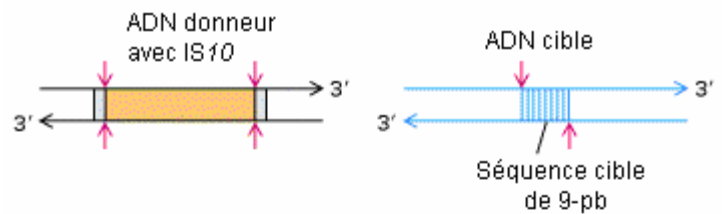
La multiplication du phage Mu et autres phages apparentés se fait par transposition réplcatif avec formation d'un co-intégrat intermédiaire. Plusieurs cycles de transposition produisent une centaine de copies du génome viral. En plus des protéines codées par le phage, la transposition de Mu dépend des fonctions réplcatives de l'hôte(10).

3. MECANISMES DE TRANSPPOSITION

Il existe deux modes de transposition : la transposition réplcatif et la transposition conservative.

3.1. La transposition conservative

Ce mécanisme concerne surtout les éléments d'insertion IS (**Figure 24**). L'élément est excisé et inséré dans un autre site. L'excision est assurée par la transposase. L'ADN hôte est également coupé. L'élément transposable s'insère au niveau du site de clivage, il est ensuite ligaturé à un brin d'ADN de l'hôte à chaque extrémité, laissant deux séquences simple-brin qui seront remplies par la suite donnant naissance à des séquences répétées de l'ADN de l'hôte encadrant les deux extrémités de l'élément transposé(8).

**Figure 23.**

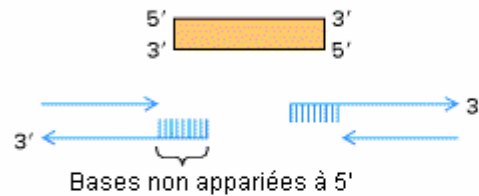
Model de la transposition conservative des séquences IS des bactéries.

Etape1: Une transposase, codée par l'élément IS (IS10 dans cet exemple), coupe les deux brins de l'ADN donneur entre les séquences répétées directes terminales et les séquences répétées inverses excisant l'élément IS. A un site aléatoire (séquence cible), la transposase coupe l'ADN cible générant des extrémités cohésives.

Etape2 : La ligature des extrémités 3' de l'élément IS excisé et de l'ADN cible est également catalysée par la transposase.

Etape3: Après ligature, des vides de 9 pb sont remplis par une ADN polymérase cellulaire, et finalement, une ADN ligase cellulaire forme les liaisons 3'→5' phosphodiester entre les extrémités 3' de l'ADN cible et 5' de l'élément IS. Ce processus résulte en une duplication de la séquence cible de part et d'autre de l'élément IS inséré(7).

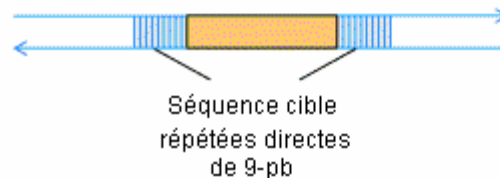
- ① La transposase effectue des coupures à extrémités franches dans l'ADN donneur, et des coupures à extrémités cohésives dans l'ADN cible



- ② La transposase joint les séquences IS10 aux extrémités 5' libres de l'ADN cible



- ③ L'ADN polymérase cellulaire prolonge les extrémités 3' de l'ADN cible et la ligase les relie aux extrémités 5' des séquences IS10



3.2. La transposition répllicative

Dans ce type de transposition, le transposon original reste au site parental, pendant qu'une copie répliquée s'insère dans l'ADN cible (**Figure 24a**). Cette transposition implique des événements d'autoréplication et de recombinaison. L'exemple le plus connu est celui du transposon Tn3 dont les étapes de transposition sont les suivantes :

1. Deux coupures simple brin, une sur chaque brin, éloignés de quelques bases sont pratiquées sur la séquence de l'ADN cible. L'ADN donneur subit les mêmes coupures simples brins de part et d'autre du transposon.
2. Chaque extrémité libre du transposon est ligaturée avec l'extrémité bordante de la séquence cible au niveau du site d'insertion. Il y a alors formation d'une fourche de réplication à chaque extrémité du transposon.

3. Le transposon est répliqué avec formation. Après répllication, les extrémités sont ligaturées pour former un co-integrat (structure intégrative). L'ensemble du transposon a été répliqué.
4. Une recombinaison a lieu entre les deux sites de résolution *res* portés par les deux copies du transposon par action de la résolvasse. Il en résulte deux molécules d'ADN portant chacun une copie du transposon.

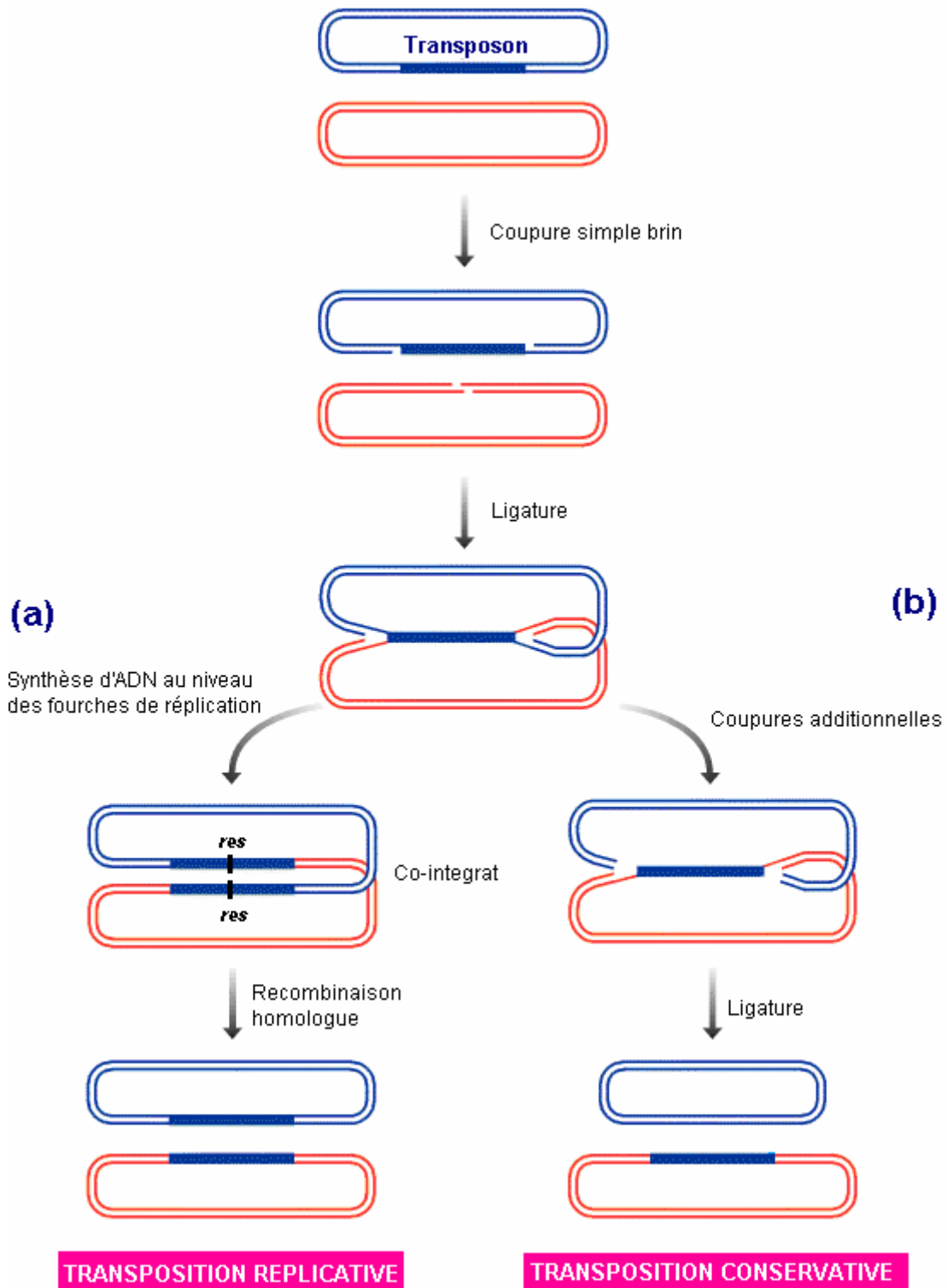


Figure 24. Model des deux mécanismes de transposition, (a) répllicative et (b) conservative (10).

4. CONSEQUENCES DE LA TRANSPPOSITION

Les éléments transposables produisent une variété importante d'effets :

- **Effets mutagènes** : Les éléments transposables peuvent s'intégrer au sein d'un gène et causer une mutation ou entraîner un réarrangement d'ADN menant à des délétions du matériel génétique. Ils peuvent bloquer la traduction ou la transcription parce que certains d'entre eux portent des codons STOP ou des séquences de terminaison.
- D'autres éléments transposables portent des promoteurs qui activent des gènes près du point d'insertion.
- Certains transposons sont situés dans des plasmides et participent dans l'insertion de ces derniers dans le chromosome de la cellule hôte.
- Les transposons qui portent des gènes de résistance aux antibiotiques participent dans la formation des bactéries résistantes en se transposant sur les plasmides de ces cellules.
- Les éléments transposables sont largement répandus dans la nature. Ils sont présents chez les eucaryotes, les bactéries, et les archéobactéries. On a ainsi identifié des éléments transposables chez la levure, le maïs, la drosophile et l'homme. Les éléments transposables jouent un rôle très important dans la génération et le transfert de nouvelles combinaisons génétiques

5. REGULATION DE LA TRANSPPOSITION

Tous les éléments transposables sont soumis à une ou plusieurs régulations dont la tendance générale est de maintenir un taux de transposition peu élevé. Les mécanismes de régulation peuvent être :

- des éléments régulateurs qui forment des complexes avec la transposase et l'inactivent ;
- une synthèse d'"ARN anti-sens", complémentaires à l'extrémité 5' de l'ARNm de la transposase qui bloque l'initiation de la traduction par appariement avec le messageur ;
- Des systèmes de méthylation *dam* de la bactérie ;
- En se liant au site *res* de résolution du co-intégrat, la résolvasse de Tn3 réprime la transcription des gènes *tnp A* et *tnp R* de ce transposon.
- Des mécanismes de régulation contribuant à limiter la synthèse de la transposase(8).

V. TRANSFERTS GENETIQUES, RECOMBINAISON, CARTES GENETIQUES

Le transfert du gène se réfère au mouvement de l'information génétique entre les organismes. Chez les bactéries, trois mécanismes de transfert de gènes sont rencontrés (**Figure 25**) : La transformation par laquelle une bactérie compétente incorpore de l'ADN dissout dans leur milieu ; la conjugaison qui est un transfert direct d'ADN entre deux bactéries établissant au préalable un contact physique entre elles ; et la transduction au cours de laquelle l'ADN est transféré par biais d'un bactériophage. Grâce à ces transferts génétiques, la bactérie peut être l'objet de variations génétiques autres que les mutations.

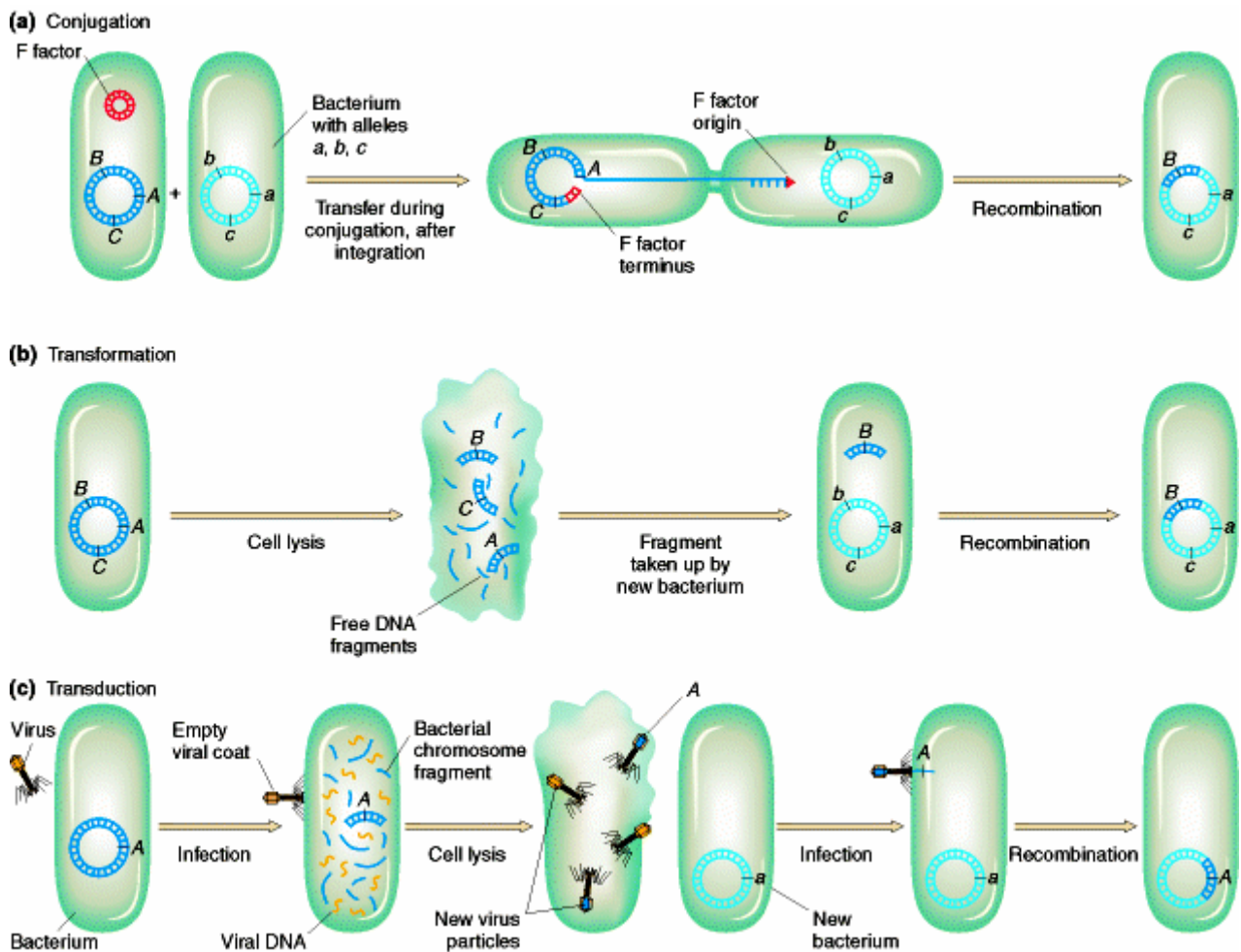


Figure 25. Transferts génétiques chez les bactéries(11).

L'incorporation de l'ADN transféré, par recombinaison avec le génome de la bactérie réceptrice est très souvent indispensable à l'acquisition d'un nouveau phénotype héritable. Cette recombinaison s'effectue par des mécanismes différents, selon le mode de transfert et la nature de l'ADN.

Des informations obtenues à partir de l'étude du transfert génétique entre les micro-organismes peuvent être appliquées à l'agriculture, à l'industrie et à la prévention et traitement des maladies infectieuses. Elles ont permis de comprendre certains problèmes médicaux liés aux mécanismes d'augmentation de la pathogénèse des bactéries par l'acquisition des résistances aux antibiotiques(5).

1. TRANSFERT GENETIQUE CHEZ LES BACTERIES

1.1. La transformation

1.1.1. La découverte de la transformation

La transformation a été découverte par Frederik Griffith au cours de ses expériences sur l'infection des souris par les pneumocoques (*Streptococcus pneumoniae*). Il en existe deux variétés : la première est la variété **S** pathogène (S = Smooth) dans laquelle les bactéries sont entourées d'une capsule polysaccharidique qui empêche leur destruction par les macrophages du sang. Cette variété donne sur un milieu solide des colonies dont les bords sont lisses. La deuxième variété (**R**) est représentée par des cellules sans capsules, non pathogènes qui donnent des colonies à bords rugueux et dentelés sur milieu gélosé (variété **R** pour Rough).

Griffith constata que l'injection de pneumocoques de type S à des souris provoque leur mort après 24 à 48 heures (**Figure 26 Expérience 1**), et que l'injection de pneumocoques de type R, ainsi que celle de type S inactivées (tuées par la chaleur) est inoffensive pour les souris (**Expérience 2 et 3**).

L'injection des bactéries R mélangées à des bactéries S tuées provoqua la mort des souris (**Expérience 4**). Des pneumocoques vivantes de type S fut retrouvées dans le sang de ces souris. Dans cette dernière expérience, Griffith réalisa que les bactéries S détruites transforment les bactéries R en S, et imagina que cette transformation est due à l'action des substances polysidiques, ce qui se révéla par la suite totalement faux(10).

Dawson et Sia démontrèrent par la suite que la transformation des pneumocoques non pathogènes R en pneumocoques pathogènes S pouvait se faire *in vitro*. En 1933, Halloway réalisa la transformation des

bactéries R en S par addition à la culture non pathogène d'extrait cellulaire obtenu à partir de cellules de souche S. le facteur transformant est donc une substance contenue dans cet extrait.

1.1.2. Nature de la substance transformante

Les travaux d'Oswald Avery, Colin MacLeod et Maclyn MacCarty, en 1944 ont permis de révéler la nature de la substance transformante. L'analyse systématique des extraits provoquant la transformation montra qu'il contenait des acides nucléiques (ADN ou ARN). D'autre part, en détruisant l'ARN par l'RNase, l'extrait cellulaire conservait son pouvoir transformant, tandis qu'il le perdait si l'on détruisait l'ADN par l'DNase. Ce résultat montra donc que le facteur transformant est de l'ADN, provenant des souches S, qui provoque immédiatement la synthèse de la capsule polysaccharidique chez les cellules R les transformant en bactéries pathogènes S.

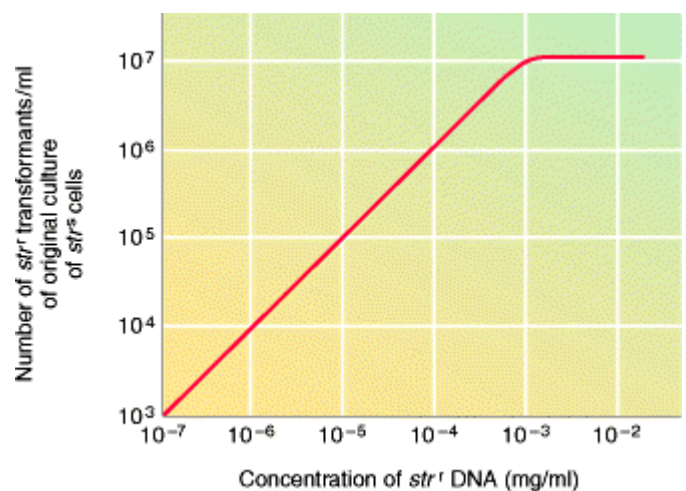
1.1.3. Les caractères de la transformation

La transformation naturelle est le premier modèle connu de transfert génétique. Elle correspond à la pénétration, puis l'intégration d'un ADN nu exogène dans le chromosome de la cellule réceptrice qui doit être physiologiquement compétente, c'est-à-dire capable de prendre de l'ADN et être transformée. La fréquence de transformation pour des cellules très compétentes se situe aux environs de 10^{-3} pour la plupart des espèces lorsqu'il y a un excès d'ADN. La compétence est un phénomène complexe qui dépend de plusieurs conditions. Les bactéries doivent atteindre un certain stade de croissance : Par exemple *S. pneumoniae* devient compétente durant la phase exponentielle lorsque la population atteint 10^7 à 10^8 cellules par ml. Lorsqu'une population devient compétente, des bactéries telles que les pneumocoques secrètent une protéine appelée facteur de compétence qui stimule la production de 8 à 10 nouvelles protéines requises pour la transformation.

La taille de l'ADN intégré ne représente en moyen qu'une toute petite fraction du génome total (<1%). La libération de l'ADN dans le milieu peut être par autolyse (rupture cellulaire spontanée de certaines cellules bactériennes vieilles), ou par sécrétion (chez *Neisseria*). L'ADN transformant ne peut s'exprimer phénotypiquement qu'après intégration dans l'ADN de la cellule hôte.

La fréquence de transformation augmente en fonction de la concentration de l'ADN et ceci jusqu'à saturation (**Figure 27**).

Figure 27. L'efficacité transformante de l'ADN exogène est fonction de sa concentration. [exemple pris des souches d'*E. coli* sensibles à la streptomycines (*str^s*) transformées en cellules résistantes (*str^r*)] (10).



1.1.4. Les bactéries naturellement transformables

L'aptitude à la transformation a été reconnue chez des espèces autres que les pneumocoques. Jusqu'à présent, on a mis la transformation naturelle en évidence chez un certain nombre de genres bactériens Gram-positifs et Gram-négatifs : *Streptococcus*, *Bacillus*, *Thermoactinomyces*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Azotobacter* et *Pseudomonas*.

1.1.5. Conditions de la transformation bactérienne

Pour que les bactéries puissent être transformables par un ADN transformant, il faut qu'elles soient dans un état physiologique déterminé nommé compétence.

La compétence est un état particulier des bactéries qui deviennent aptes à intérioriser des fragments d'ADN exogène, de les séquestrer sous une forme résistante à la DNase et qui ne peut être libéré par lavage. Cette compétence est indispensable au phénomène de transformation, elle varie selon les espèces et les conditions de culture (pH, température, équilibre ionique).

Développement de la compétence :

La compétence chez les bactéries Gram-positifs se développe lorsque la concentration d'un facteur protéique sécrété (facteur de compétence) atteint un certain seuil. Le mode d'action de ce facteur est comparable à celui des hormones ; il se lie à des récepteurs spécifiques. Ce facteur induit la synthèse de certaines protéines dont une **autolysine** qui pourrait attaquer les peptidoglycane de la paroi bactérienne et démasquer les protéines se liant à l'ADN présentes sur la membrane plasmique.

Chez les bactéries Gram-négatifs, l'état de compétence est en relation avec la synthèse d'un activateur protéique qui se fixe sur la paroi cellulaire. Ce facteur est excrété par la bactérie à la phase exponentielle de croissance(6).

1.1.6. Mécanisme de la transformation bactérienne

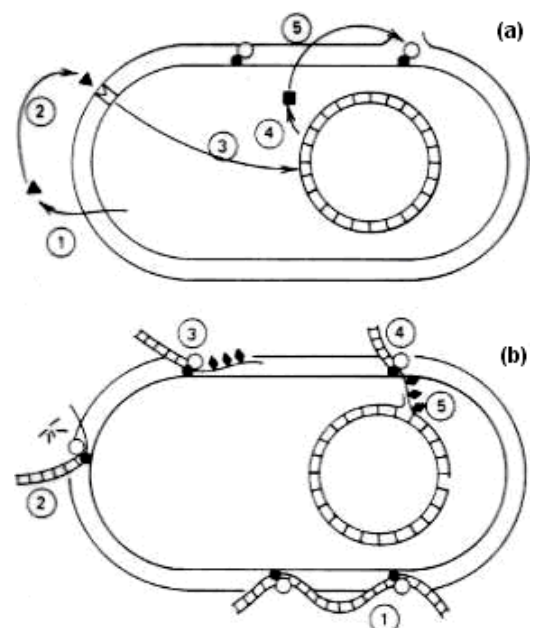
Une cellule compétente lie un fragment d'ADN double brin, le processus se fait au hasard puisque tous les fragments donneurs sont en compétition entre eux. La capture de l'ADN demande de l'énergie. Un brin est hydrolysé par une endonucléase associée à la membrane

cytoplasmique, l'autre brin est internalisé et peut alors s'aligner sur la région homologe du génome et être intégré (**Figure 28**).

Figure 28. Schéma des événements conduisant à la transformation de *Streptococcus pneumoniae*.

(a) développement de la compétence : (1) Les cellules produisent une protéine soluble appelée facteur de compétence (▲) qui (2) se fixe sur un site membranaire spécifique (M) induisant (3) l'expression de certaines protéines parmi lesquelles (4) une autolysine (■) qui expose les protéines liant l'ADN (○) et les endonucléases (●).

(b) La transformation : (1) Une longue molécule double brin d'ADN se fixe à la surface cellulaire grâce à la protéine liant l'ADN (○), (2) l'endonucléase (●) dégrade un des deux brins. (3) Le brin intact s'associe à une protéine spécifique de la compétence (◆). (4) L'ADN simple brin pénètre dans la cellule et est intégré dans le chromosome de l'hôte (5) en lieu et place de la région homologe de l'ADN de l'hôte(8).



1.1.7. La transformation artificielle

La transformation artificielle se réalise en laboratoire par des techniques variées. Parmi celles-ci, le traitement des cellules au chlorure de calcium rend la membrane plus perméable à l'ADN. Cette approche est couronnée de succès même avec des espèces qui ne sont pas naturellement compétentes comme *E. coli*. Afin d'augmenter la fréquence de transformation, on emploie des concentrations relativement élevées d'ADN, supérieures à celles que l'on trouve normalement dans la nature. Il est plus aisé de transformer des bactéries avec de l'ADN plasmidique parce que les plasmides sont moins facilement dégradés que des fragments linéaires et qu'ils peuvent se répliquer dans la cellule hôte. Il s'agit d'une méthode courante pour introduire de l'ADN recombinant dans les cellules bactériennes.

1.2. La conjugaison

1.2.1. Découverte de la conjugaison

La conjugaison est le processus par lequel de l'ADN est transféré de cellules donneuses à des cellules réceptrices avec lesquelles elles sont en contact étroit. La conjugaison bactérienne a été mise en évidence en 1946 suite à l'expérience effectuée par Lederberg et Tatum. Ces chercheurs mélangèrent deux souches auxotrophes d'*E. coli*, incubèrent la culture pendant plusieurs heures dans un milieu nutritif et les étalèrent sur une gélose de milieu minimum. Afin de réduire les chances que les résultats observés soient dues à une simple réversion, ils employèrent des doubles et triples auxotrophes présumant que deux ou trois réversions ne pouvaient pas avoir lieu simultanément. Des colonies recombinantes prototrophes apparurent sur le milieu minimum après incubation (**Figure 29**). Les chromosomes des deux souches auxotrophes étaient donc capables de s'associer et de se recombinaison.

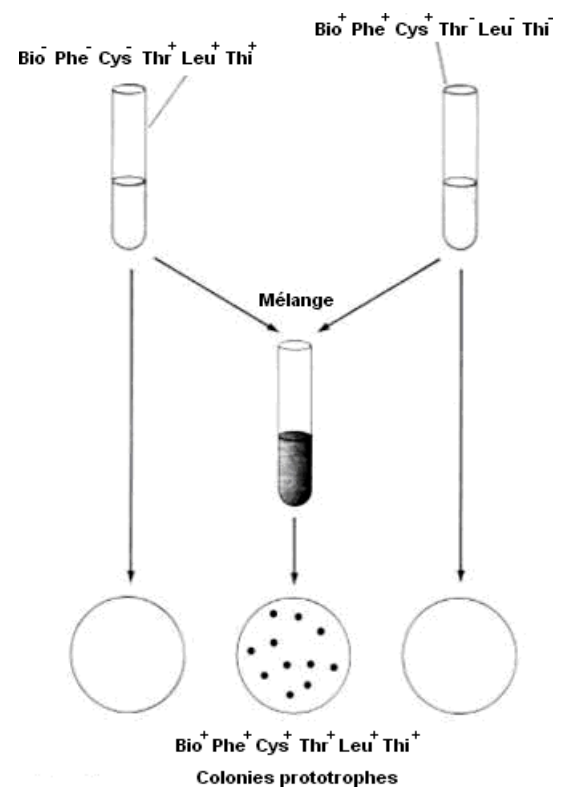


Figure 29. Mise en évidence de la conjugaison bactérienne. Démonstration par Lederberg et Tatum de la recombinaison bactérienne par l'usage d'auxotrophes multiples (12)

Lederberg et Tatum n'avaient pas directement prouvé que le contact physique des cellules était nécessaire au transfert des gènes. Ceci fut démontré par Bernard Davis (1950) qui construisit un tube en U consistant en deux branches reliées à leur base par un filtre de verre fritté. Le filtre permet le passage du milieu, mais pas des bactéries. Le tube en U fut rempli par des milieux nutritifs et chaque branche fut inoculée par une souche auxotrophe différente d'*E. coli* (**Figure 30**). Au cours de l'incubation, le milieu fut refoulé à plusieurs reprises à travers le filtre pour s'assurer qu'il y avait échange du milieu liquide entre les deux moitiés du tube en U. Après 4 heures d'incubation, les

bactéries furent étalées sur milieu minimum. Davis découvrit que lorsque les deux souches auxotrophes étaient séparées l'une de l'autre par un filtre, le transfert de gènes n'avait pas lieu. Un contact direct était donc requis pour la recombinaison que Lederberg et Tatum avaient observé.

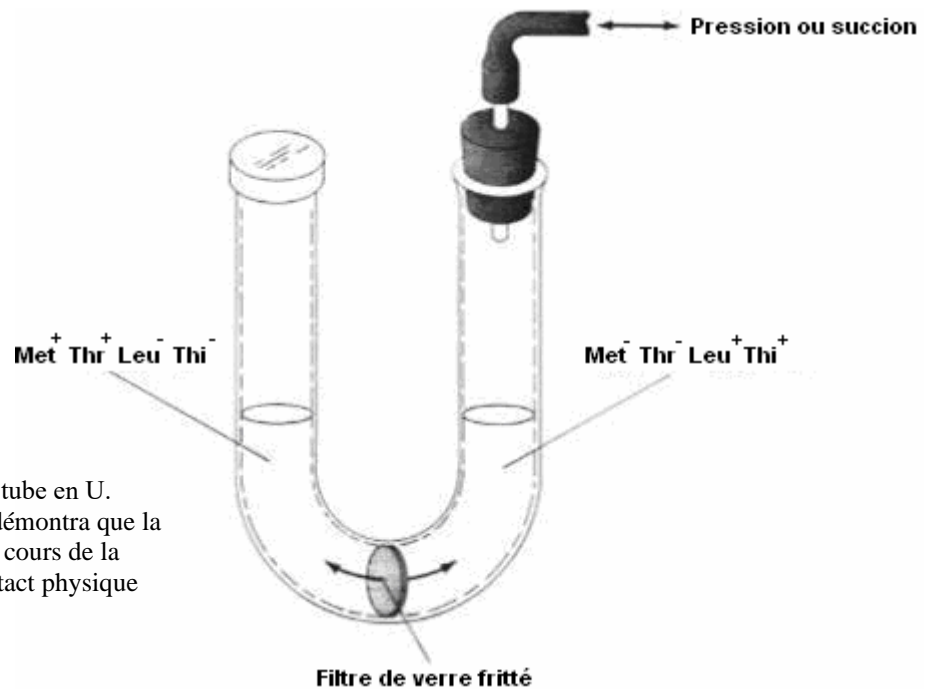


Figure 30. L'expérience du tube en U. L'expérience du tube en U démontra que la recombinaison génétique au cours de la conjugaison exigeait un contact physique direct entre bactéries (11).

En 1953, William Hayes démontra que le transfert de gènes observé par Lederberg et Tatum s'effectuait dans un sens déterminé. Il existe en fait des cellules définies comme donneuses (F^+) et receveuses (F^-), et le transfert de gènes n'est pas réciproque. La souche F^+ contient un facteur F extra-chromosomique qui porte les gènes pour la formation des pili et pour le transfert du plasmide.

1.2.2. *Facteurs plasmidiques conjugatifs*

Le facteur F est le plasmide conjugatif le mieux étudié, il se trouve à raison d'une à deux copies par cellule. Il porte des gènes pour une répllication autonome, des gènes compris dans le module *tra* impliqués dans le transfert, et des gènes codant pour la synthèse des pili. Il porte également des gènes codant pour une protéine d'exclusion qui empêche la conjugaison entre deux souches F^+ . Le facteur F porte aussi un site *OriT* (origine de transfert) et une ou plusieurs séquences d'insertion (IS) qui permettent l'intégration du plasmide dans le chromosome bactérien. Ces plasmides possèdent des propriétés remarquables :

1. Le plasmide F est capable de se répliquer, ce qui lui permet de se maintenir dans une population cellulaire en division (**Figure 31a**).
2. Le plasmide F porte les gènes pour la formation des pili à la surface de la cellule bactérienne. Le pilus sexuel unit le donneur et le receveur et peut se contracter pour les rapprocher, il s'agit d'un canal creux pour transfert d'ADN (**Figure 31b**).
3. Au cours d'un croisement $F^+ \times F^-$ ou conjugaison, le facteur F de la cellule F^+ se réplique par un mécanisme de cercle roulant et une copie migre vers la cellule receveuse F^- (**Figure 31c**). Une

copie du plasmide F demeure toujours dans la cellule donneuse, l'autre copie est transférée à la cellule réceptrice, cette dernière devient alors F^+ .

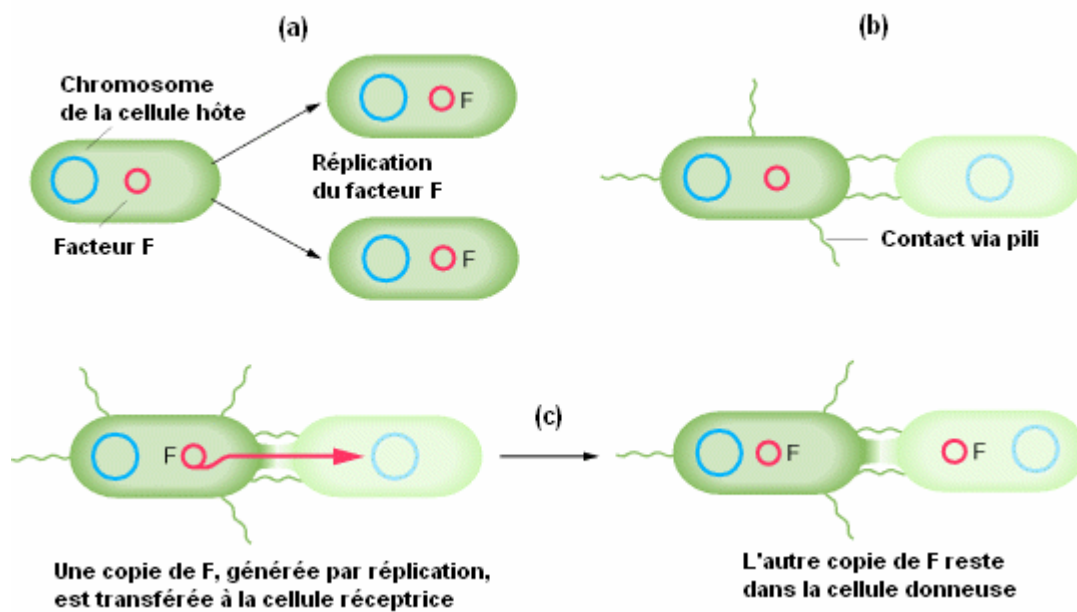


Figure 31. Propriétés du facteur de fertilité (F) d'*E. coli*(10).

- Le contact entre deux cellules F^+ est habituellement inhibé, ainsi, un plasmide F ne peut se transférer d'une cellule F^+ à une autre cellule F^+ .
- Le facteur F porte des séquences d'insertion IS. La présence de ces éléments mobiles dans le plasmide et le chromosome bactérien procure un site d'homologie permettant la recombinaison entre les deux molécules d'ADN et par conséquent l'intégration du plasmide dans le chromosome bactérien (Figure 32). Quand cette intégration apparaît, le plasmide F intégré, en se transférant à une cellule réceptrice, peut entraîner le transfert du chromosome entier.

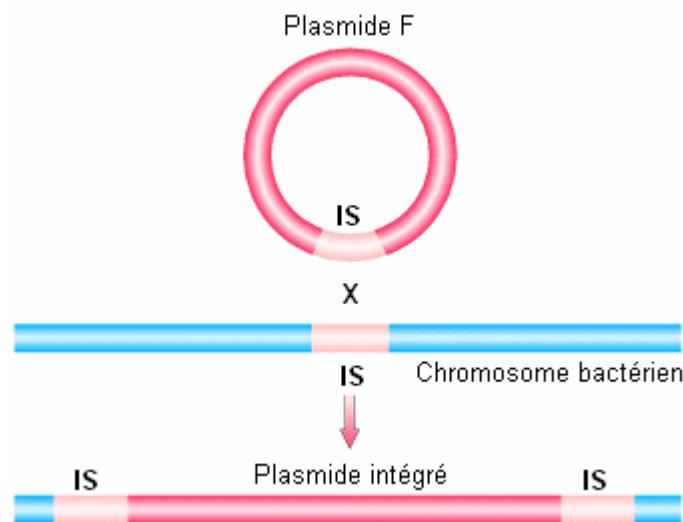


Figure 32. Intégration du facteur F dans le chromosome bactérien(8).

Dans ce dernier processus (transfert associé du facteur F et des gènes chromosomiques), les cellules donneuses, contenant le facteur F intégré dans le chromosome, peuvent transférer des allèles chromosomiques à d'autres souches durant le transfert du facteur F. La fréquence de recombinaison de

Dr FENGHOUR

ces cellules est beaucoup plus importante que celle des cellules portant un plasmide F non intégré. Ce type de cellule (portant un facteur F intégré) est appelé souche **Hfr** pour high frequency of recombination (haute fréquence de recombinaison) parce qu'il possède un grand pouvoir de transfert de gènes chromosomiques, comparé à celui des cellules F⁺.

6. Le facteur F intégré quitte occasionnellement le chromosome d'une cellule Hfr et revient au cytoplasme. Durant ce processus, le plasmide emporte une portion du chromosome et forme un plasmide F modifié appelé F'. Le plasmide F' se comporte comme le plasmide F, il ne peut se transférer qu'à une cellule F⁻. Les gènes bactériens sur le plasmides F' sont transférés avec celui-ci, la cellule receveuse devient F' ; c'est un mérozygote partiellement diploïde puisqu'elle a deux jeux des gènes portés par le plasmide. De cette manière, des gènes bactériens peuvent se répandre rapidement dans une population bactérienne. Un tel transfert de gènes bactériens est appelé *sexduction*.

1.2.3. *Étapes de la conjugaison bactérienne*

La conjugaison bactérienne comporte deux étapes majeures : la reconnaissance du partenaire et le transfert conjugatif. La recombinaison génétique dans la cellule réceptrice après le croisement Hfr x F⁻ constitue une étape supplémentaire.

a. La reconnaissance du partenaire

L'appariement entre couples de bactéries donatrices et réceptrices nécessite les pili sexuels chez les cellules F⁺ ou Hfr. Chaque cellule possède 1 à 3 pili sexuels, constitués d'un assemblage cylindrique de monomères de piline, une protéine codée par F. Les extrémités des pili reconnaissent les zones de contact à la surface des bactéries F⁻ et s'y fixent puis se rétractent par dépolymérisation, rapprochant les deux bactéries. Il paraît que le rôle essentiel du pilus est de rapprocher les deux cellules donatrice et réceptrice, favorisant ainsi le contact étroit entre les deux bactéries. Les pili ne sont pas indispensables pour transfert d'ADN, et ne constituent donc pas de ponts conjugatifs, mais rien n'exclue que la piline membranaire soit impliquée dans la formation d'un conduit intracellulaire. Le facteur F code aussi pour une protéine membranaire intervenant dans un mécanisme d'exclusion superficielle qui empêche les cellules F⁺ de former entre elles des paires conjugantes(9).

b. Le transfert conjugatif

Selon que le plasmide soit sous sa forme libre, intégrée ou tronquée, il existe trois types de transfert conjugatif :

b.1. Le transfert conjugatif F⁺ x F⁻ :

Dans le croisement, F⁺ x F⁻, le transfert du facteur F est initié par une coupure simple brin, au niveau d'une séquence spécifique *OriT* dans le plasmide F, par l'enzyme TraI. Le brin ouvert est déroulé dans le sens 5'→3' par une hélicase ATP-dépendante, et l'extrémité ainsi formée migre vers la cellule réceptrice, à travers un pont cytoplasmique pendant que se déroule la réplication du brin

complémentaire dans la cellule donatrice. La réplication est effectuée par la machinerie de synthèse de l'hôte, par un mécanisme de cercle roulant, la synthèse du brin complémentaire dans la cellule réceptrice est discontinue. La molécule linéaire qui résulte de la réplication reprend sa forme circulaire spontanément.

b.2. Le transfert conjugatif Hfr x F⁻ :

Lorsqu'une souche Hfr participe à la conjugaison, son chromosome commence à se répliquer au niveau de l'origine de transfert, un brin d'ADN monocaténaire s'allonge au fur et à mesure que la réplication progresse (réplication en cercle roulant). L'ADN simple brin est transféré à la cellule réceptrice à travers le pilus, les gènes proches de l'origine de transfert sont transférés en premier, le facteur F est le dernier à être transféré.

Le passage de tout le chromosome bactérien prend environ 100 minutes. Dans la plupart des cas, le transfert de cet ADN n'est pas complet, la destruction du pont cytoplasmique avant l'achèvement du transfert donne naissance à un diploïde partiel, la cellule réceptrice reste donc le plus souvent F⁻. Après être entré dans la cellule receveuse, l'ADN transféré peut être dégradé ou incorporé dans le génome de la bactérie F⁻ par recombinaison (**Figure 33**).

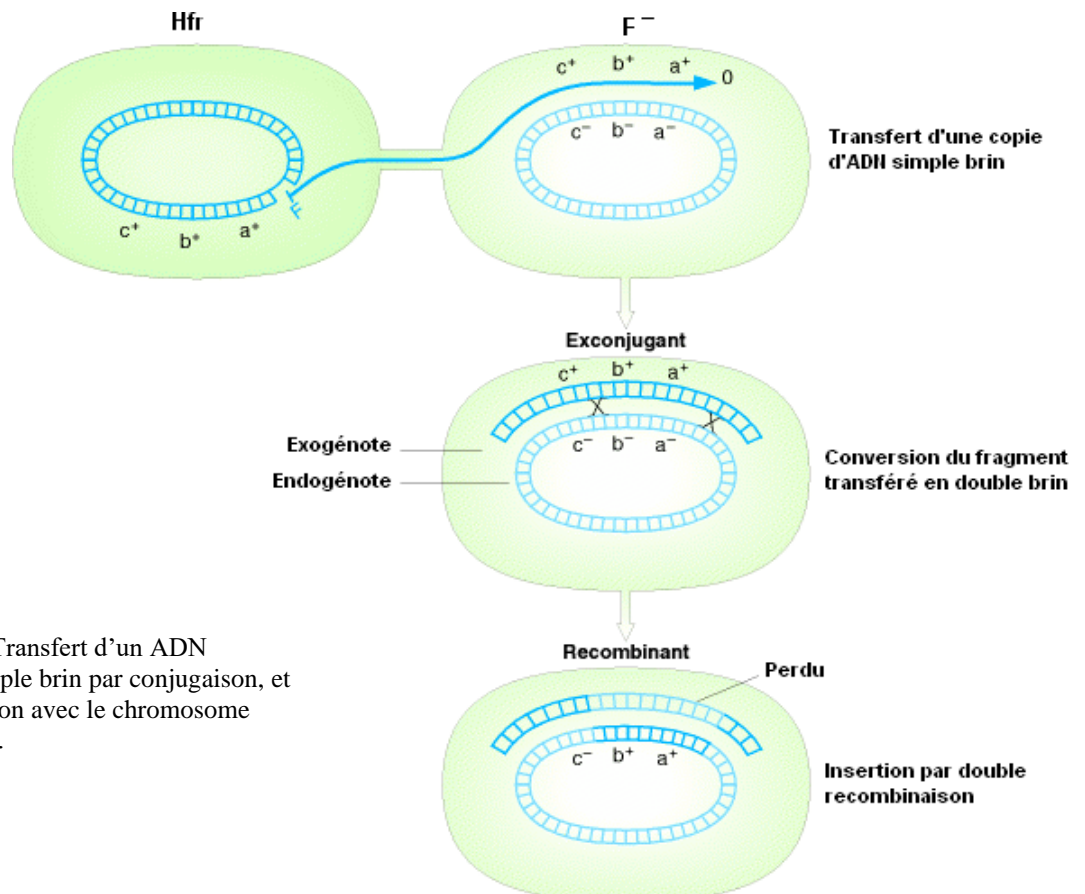


Figure 33. Transfert d'un ADN donneur simple brin par conjugaison, et recombinaison avec le chromosome receveur(3).

b.3. Le transfert conjugatif F' x F⁻ :

La séparation imprécise du facteur F intégré d'une souche Hfr entraîne le déplacement d'un fragment d'ADN chromosomique, donnant naissance au facteur F' (**Figure 34b-c**). Le facteur F' est dénommé d'après le gène qu'il porte (F'-lac pour notre exemple). Le transfert du facteur F' se fait selon un mode identique à celui du facteur F. Si les gènes transférés par F' s'intègrent dans le chromosome de la

bactérie réceptrice, on dit qu'il y a eu une recombinaison légitime. Une cellule exconjugante contenant un facteur F' devient partiellement diploïde (**Figure 34d**).

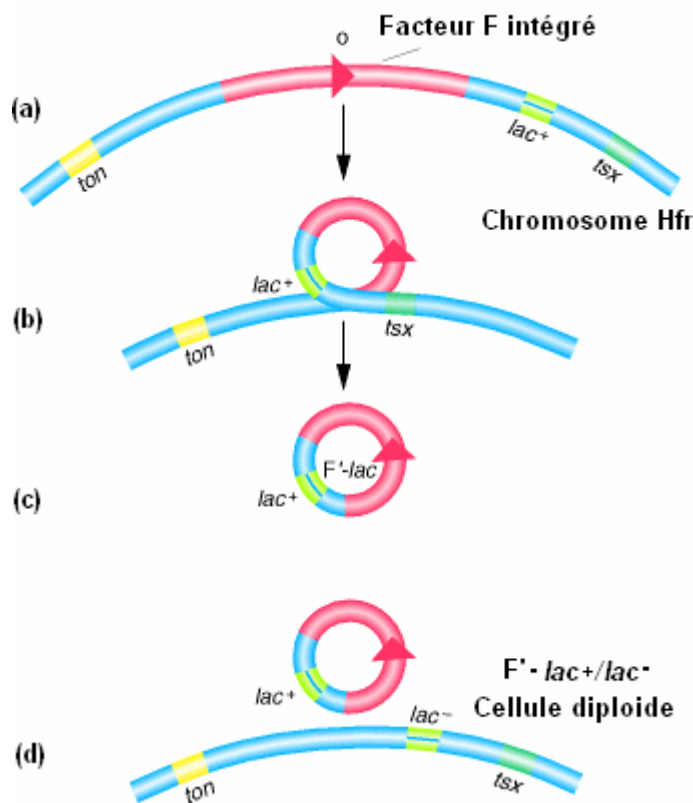


Figure 34. Origine et réintégration du facteur F'-lac (1)

1.3. La transduction

1.3.1. Découverte de la transduction

En 1952, Lederberg et Zinder croisèrent deux souches auxotrophes de *Salmonella typhimurium*, $phe^- trp^- tyr^- met^+ his^+$ et $phe^+ trp^+ tyr^+ met^- his^-$ pour déterminer si cette espèce faisait la recombinaison génétique par conjugaison comme *E. coli*. Ils obtinrent en effet des recombinants et, tel que prévu, une souche agissait comme donatrice et l'autre comme réceptrice. Mais ils furent surpris de constater que les gènes du donneur étaient transmis un à la fois, la fréquence d'apparition de cellules sauvages prototrophes n'était que de 1 pour 10^5 cellules. Le phénomène en cause n'avait pas l'apparence d'une conjugaison. En réalisant l'expérience du tube en U, Lederberg et Zinder observèrent l'apparition de recombinants prototrophes. En variant la taille des pores du filtre séparant les deux bras du tube en U, ils trouvèrent que l'agent responsable de la recombinaison avait la taille du virus P22, un phage tempéré de *Salmonella*. Des expériences complémentaires ont montré que l'agent filtrant vecteur de recombinaison était bien le phage P22. Ce type de transfert d'ADN entre cellules sans nécessité d'établir des contacts physiques est appelé Transduction(7).

La transduction est le transfert de l'ADN d'une cellule à une autre par un bactériophage. Ce dernier peut exister sous forme virulente ou tempérée.

Il existe deux sortes de transduction : la transduction généralisée et la transduction spécialisée.

1.3.2. La Transduction généralisée

Les phages transducteurs généralisés n'ont pas des sites d'attachement spécifiques sur le chromosome bactérien, et peuvent donc transférer n'importe quel gène de ce chromosome.

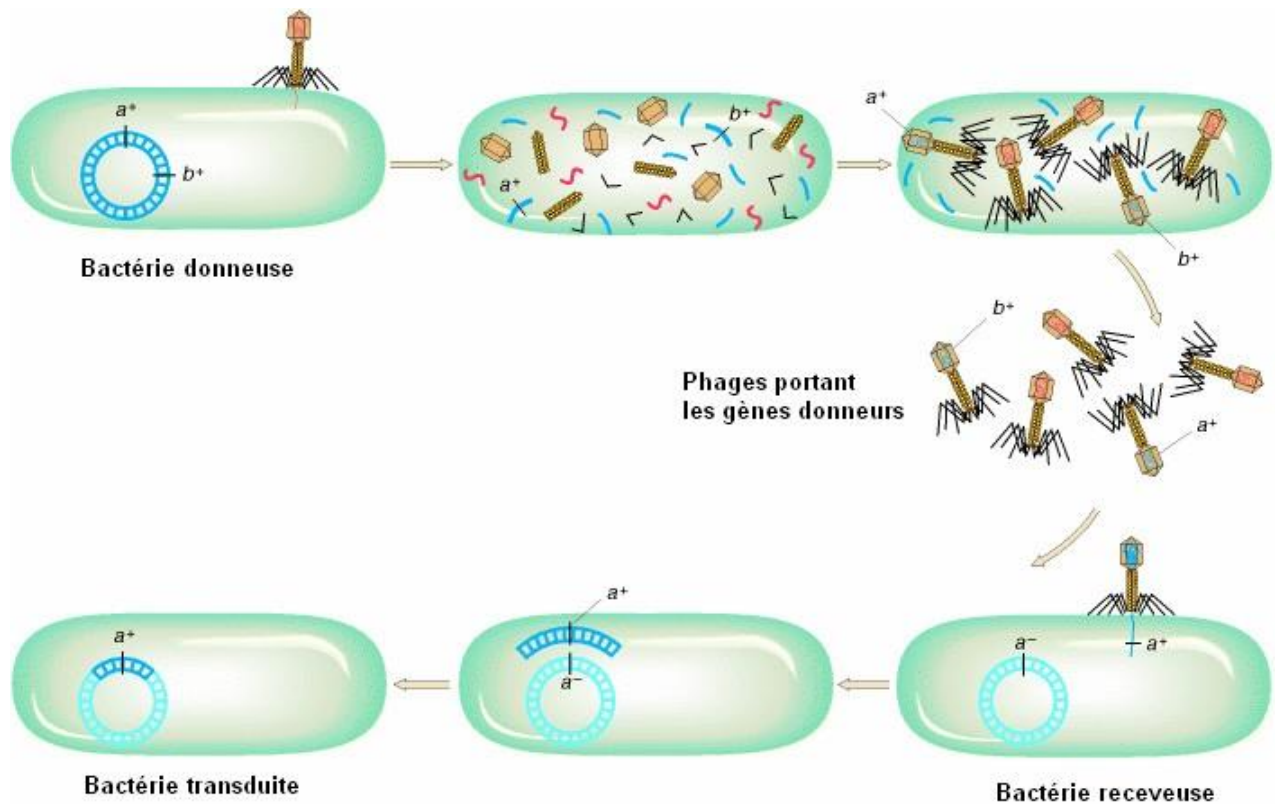


Figure 35. Mécanisme de la transduction généralisée (3).

La transduction généralisée (**Figure 35**) a lieu au cours du cycle lytique d'un phage virulent ou tempéré et transfère n'importe quelle partie du génome bactérien. Durant le stade d'assemblage, lorsque les chromosomes viraux sont empaquetés dans les capsides protéiques, des fragments aléatoires du chromosome bactérien partiellement dégradé sont également empaquetés par erreur. Parce que la capside ne peut contenir qu'une quantité limitée d'ADN, ces particules ne contiendront pas d'ADN viral. La quantité d'ADN bactérien transporté dépend principalement de la taille de la capside. Le phage P22 de *Salmonella typhimurium* contient habituellement de l'ordre de 1% du génome bactérien. Le phage P1 d'*E. coli* et diverses autres bactéries Gram-négatives contiennent de 2 à 2,5% du génome. La particule virale résultante injecte son ADN dans une autre cellule bactérienne sans initier de cycle lytique. Ce phage est appelé **particule de transduction généralisée**, et constitue simplement un transporteur d'information génétique d'une bactérie à une autre.

L'ADN injecté doit être intégré dans le chromosome de la cellule receveuse afin de préserver les gènes transférés. L'ADN reste sous forme double-brin durant le transfert et les deux chaînes sont intégrées dans le chromosome receveur. Des **transduits abortifs** sont des bactéries qui contiennent cet ADN transduit non intégré et sont des diploïdes partiels.

1.3.3. La Transduction spécialisée

Ce mode de transduction est une propriété des phages tempérés, elle résulte d'une erreur dans le cycle lysogènes de ces phages. Lorsqu'un prophage est induit et quitte le chromosome de l'hôte, l'excision est parfois erronée. Le génome du phage résultant contient des segments du chromosome bactérien (5 à 10% du chromosome bactérien) contigus au site d'intégration.

L'exemple de transduction spécialisée le mieux connu est celui du phage λ (**Figure 36**).

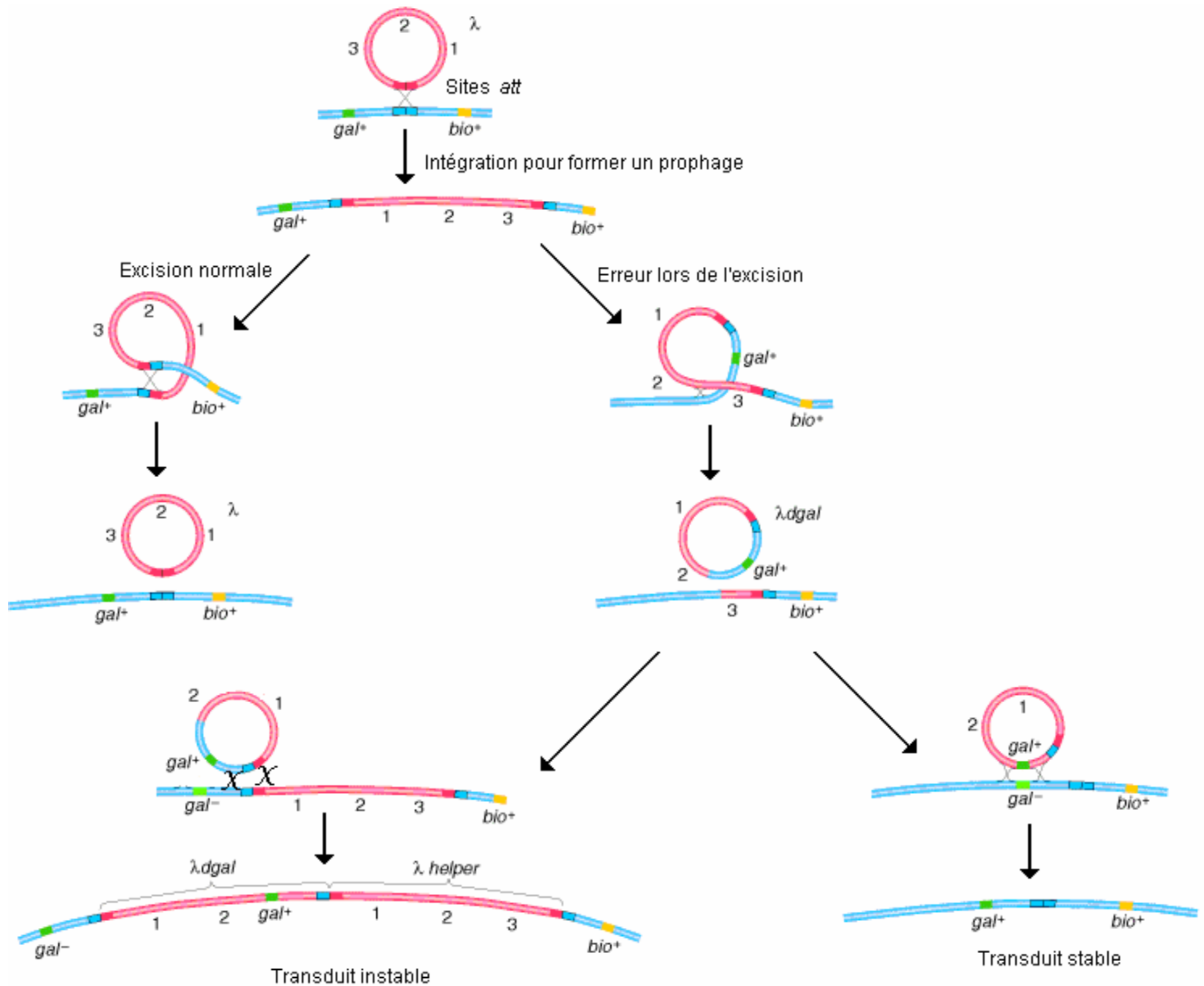


Figure 36. Le mécanisme de transduction pour le phage λ et *E. coli*. Le phage λ intégré est proche des gènes *gal*. Lorsqu'il s'excise normalement (en haut, à gauche), le nouveau phage est complet et ne contient aucun gène bactérien. En de rares occasions, l'excision se fait de façon asymétrique (en haut, à droite) et les gènes *gal* sont alors emportés tandis que les gènes de phage sont perdus. Il en résulte un phage λ déficient qui porte des gènes bactériens et peut les transférer à un nouveau receveur(10).

Le génome de λ s'insère dans le chromosome de l'hôte (sous forme de prophage) en un site spécifique d'attachement ou *att*. Le site *att* bactérien est situé entre les gènes *gal* et *bio* sur le chromosome d'*E. coli*. En conséquence, ce sont ces gènes bactériens que le phage λ transfère le plus fréquemment. L'induction d'*E. coli* lysogène conduit à la lyse de cette dernière et la libération de particules virales normales, et autres transductrices déficientes. Ces dernières sont appelées $\lambda.dgal$ parce qu'elles contiennent les gènes du catabolisme du galactose. Ces particules ont un site d'intégration hybride non

fonctionnel, en partie d'origine bactérienne et en partie d'origine virale. Le phage λ déficient porteur du gène *gal* peut s'intégrer dans le chromosome d'une cellule réceptrice par recombinaison entre le chromosome du phage et la bactérie lorsque les croisements ont lieu de part et d'autre du site *gal*. La bactérie résultante est un transduit stable parce que le phage intégré est incapable de se propager par lyse de la cellule à raison de la perte de certains gènes nécessaires à sa multiplication.

Un phage λ déficient porteur de gène *gal* peut également s'intégrer dans le chromosome d'une cellule réceptrice si un phage λ normal est présent dans cette même cellule. L'intégration du phage λ *gal* se fera au niveau d'un site *att* hybride (phage/bactérie) résultant de l'intégration du phage λ normal. Le phage normal dans cet exemple est appelé **phage auxiliaire (helper)** parce qu'il aide le phage déficient à s'intégrer et à se reproduire. Ces transduits sont instables car les prophages sont inductibles et s'excisent suite à une induction (radiation UV par exemple)(11).

2. RECOMBINAISON GENETIQUE. MECANISMES MOLECULAIRES

La recombinaison est un processus naturel par lequel une ou plusieurs molécules d'ADN sont réarrangées ou combinées (conduisant à des échanges entre molécules d'ADN ou remaniements à l'intérieur d'une molécule d'ADN) pour donner une nouvelle séquence nucléotidique. Habituellement, le matériel génétique des deux parents est combiné pour produire un chromosome recombinant, avec un génotype nouveau différent. Il en résulte un nouvel arrangement des gènes ou de parties de gènes et habituellement une modification phénotypique.

On distingue plusieurs modes de recombinaison selon la nature des substrats impliqués (ADN chromosomique, phagique ou plasmidique, élément transposable) et le degré d'homologie entre les séquences au niveau desquelles se produisent les échanges. Ces modes de recombinaison sont classés en trois groupes qui se différencient par leurs mécanismes : la recombinaison générale ou homologue, la recombinaison spécifique de site et la recombinaison illégitime ou transposition⁽⁸⁾.

2.1. Recombinaison générale

La recombinaison homologue est le phénomène qu'évoque le plus souvent le terme recombinaison, elle implique généralement un échange réciproque entre une paire de séquences d'ADN homologues. Le processus par lequel s'effectue la recombinaison homologue est appelé recombinaison générale car le système enzymatique qui intervient dans les échanges peut, en principe, utiliser comme substrat toute paire de séquences d'ADN homologues. Cela peut se produire à n'importe quel endroit du chromosome par un mécanisme de cassure et de réunion de la chaîne d'ADN, donnant un enjambement ou crossing over.

La recombinaison générale nécessite des étapes intermédiaires d'échange de chaînes d'ADN :

1. deux molécules d'ADN homologues subissent un enjambement, ce qui signifie que leurs double hélices sont rompues pour former deux double hélices intactes, chacune étant composée de parties des deux molécules d'ADN initiales.
2. Le site d'échange (c'est à dire le lieu où les deux double hélices se joignent) peut se placer n'importe où dans les séquences nucléotidiques homologues des deux molécules d'ADN impliquées.
3. Au niveau du site d'échange, une chaîne d'une molécule d'ADN s'apparie à la chaîne de la seconde molécule d'ADN créant une jonction décalée appelée jonction hétéroduplex. La région décalée peut s'étendre sur plusieurs milliers de paires de bases.
4. Aucune séquence nucléotidique n'est modifiée au niveau du site d'échange ; les événements de cassure et réunion se déroulent de façon précise.

La recombinaison générale crée des molécules d'ADN de séquences nouvelles. Plusieurs modèles ont été proposés pour décrire le mécanisme par lequel ce phénomène se déroule.

2.1.1. *Modèles de recombinaison homologue*

2.1.1.1. **Modèle de Holliday**

Ce modèle a été proposé en 1964 par Robin Holliday. D'après ce dernier (**Figure 37**), la recombinaison commence par une coupure des deux brins de même polarité appartenant à deux molécules d'ADN différentes et à des positions homologues (**Figure 37b**)(5).

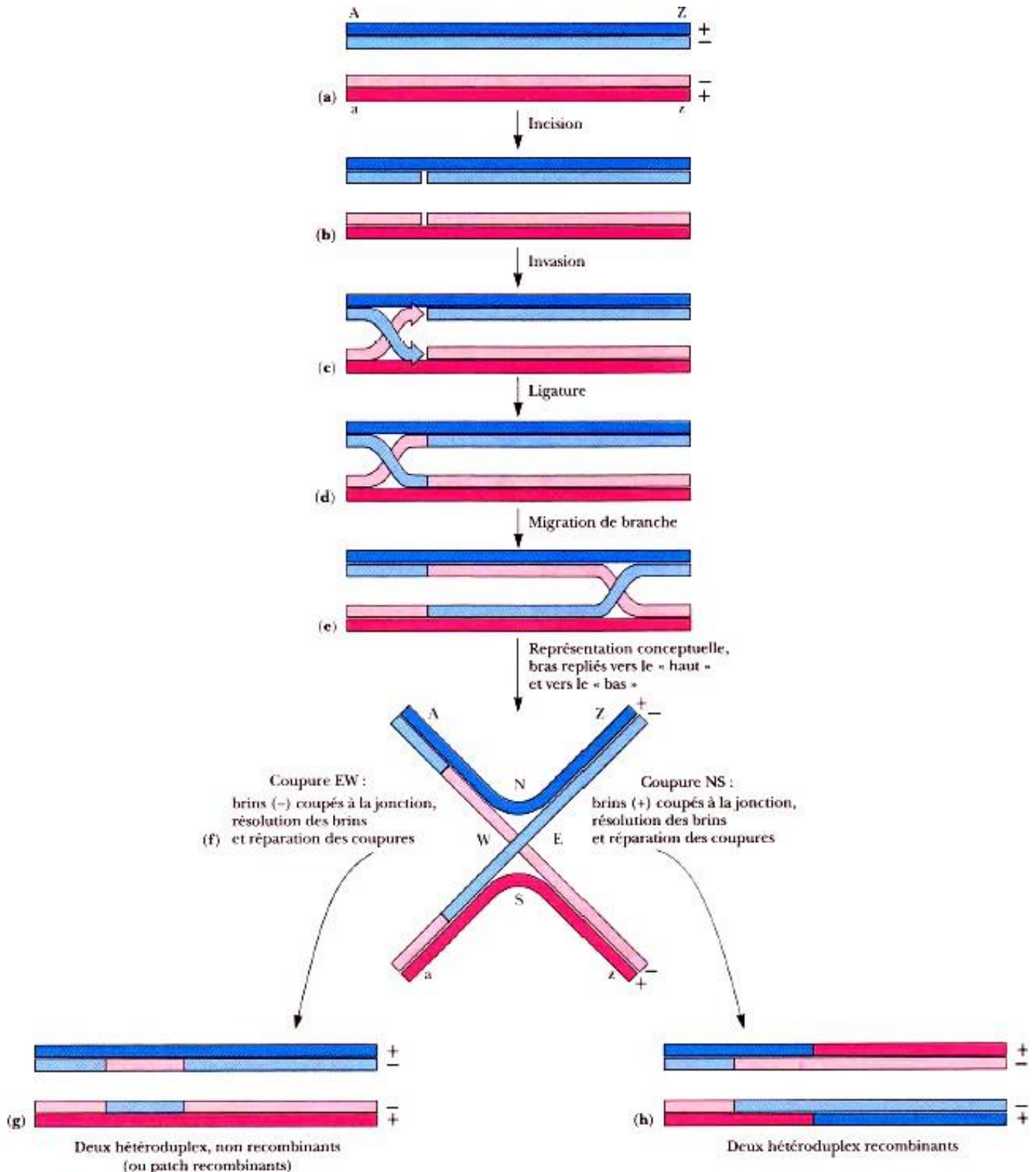


Figure 37. Modèle de recombinaison homologue proposé par Holliday. (Les signes + et - marquent les brins de même polarité) (5).

Les deux duplex se déroulent partiellement et, par un processus appelé *invasion*, l'extrémité libre d'un des brins du duplex s'apparie avec la région presque complémentaire du brin resté intact dans l'autre duplex (**Figure 37c**). Les bouts des brins croisés sont reliés ce qui crée une structure à brins croisés appelée *jonction de Holliday* (**Figure 37d**). Cette jonction peut migrer (migration de branche) par déroulement et ré-enroulement des deux brins du duplex (**Figure 37e**). La migration de branche provoque un échange de brins, il se forme des régions hétéroduplex plus ou moins longues.

La structure croisée peut adopter une configuration en croix appelée *structure chi* (χ) ou *structure de Holliday*. Le clivage de la structure de Holliday (résolution de la structure de Holliday) en deux molécules recombinantes se fait par deux coupures monocaténares suivies de ligatures covalentes. Les nouvelles coupures sont introduites soit dans les brins E et W (qui avaient déjà été coupés), soit dans les brins N et S (**Figure 37f**). La coupure des brins E et W donne des duplex dont l'un des deux brins est resté intact (**Figure 37g**). Si les nouvelles coupures ont lieu dans les brins N et S, il se forme des molécules d'ADN qui sont à la fois hétéroduple et recombinantes. Si les marqueurs compris dans les régions d'ADN hétéroduplex sont en situation hétérozygote, ils peuvent ségréger à la réplication suivante, ou faire l'objet d'une correction des défauts d'appariement, donnant lieu au phénomène de conversion génique(9).

2.1.1.2. Modèle de Meselson/Radding

Le modèle de recombinaison proposé par Holliday met en jeu un mécanisme strictement réciproque, qui n'a pas pu expliquer certains profils de ségrégation observés chez certains ascomycètes. Meselson et Radding ont proposé un modèle plus général dans lequel la première étape est un échange non réciproque qui génère une structure asymétrique. Les événements commencent par l'incision d'un brin d'une seule des deux molécules d'ADN (**Figure 38a**). L'entaille produite sert d'amorce à une réaction de polymérisation par la Pol I, et le brin déplacé (**Figure 38b**) est transféré dans l'autre molécule d'ADN (invasion, **Figure 38c**). Le brin transféré s'apparie avec le brin complémentaire dans l'autre molécule d'ADN déplaçant ainsi l'autre brin (**Figure 38d**), ce dernier est coupé favorisant la ligature des brins échangés et la formation d'une structure en croix (**Figure 38e**). Si l'échange s'arrête à ce stade, une seule des molécules contient une région d'ADN hétéroduplex (**Figure 38f**) après résolution par coupure dans le plan horizontal. La structure asymétrique peut subir une résolution dans le plan vertical (**Figure 38g**), les régions qui flanquent le site d'échange sont alors en configuration recombinante. De plus, si la branche se déplace, les deux molécules vont contenir des régions d'ADN hétéroduplex et l'échange deviendra réciproque (**Figure 38h**).

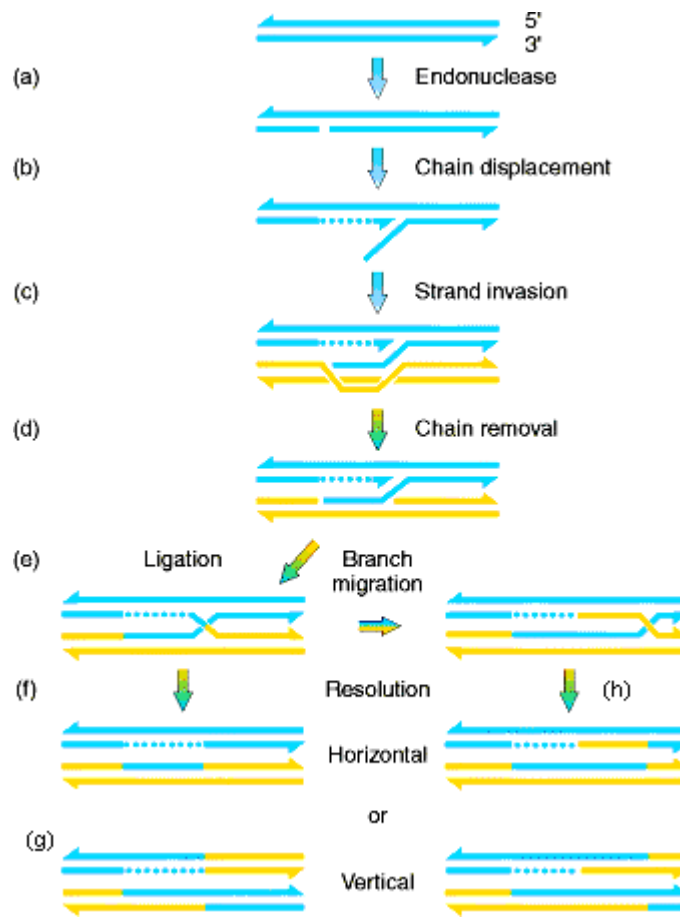


Figure 38. Modèle de recombinaison homologue proposé par Meselson et Radding (1975) (7).

2.1.1.3. Le modèle Fox pour la recombinaison générale non réciproque

Dans la transformation bactérienne, c'est une forme non réciproque de recombinaison générale qui se produit (Figure 39). Un fragment de matériel génétique est inséré dans le chromosome par l'incorporation d'un simple brin avec déplacement d'un brin chromosomique et formation d'une structure en boucle D (D-Loop). Une endonucléase coupe le brin du receveur et les brèches ainsi formées sont remplies, la ligase intervient ensuite pour lier les extrémités libres.

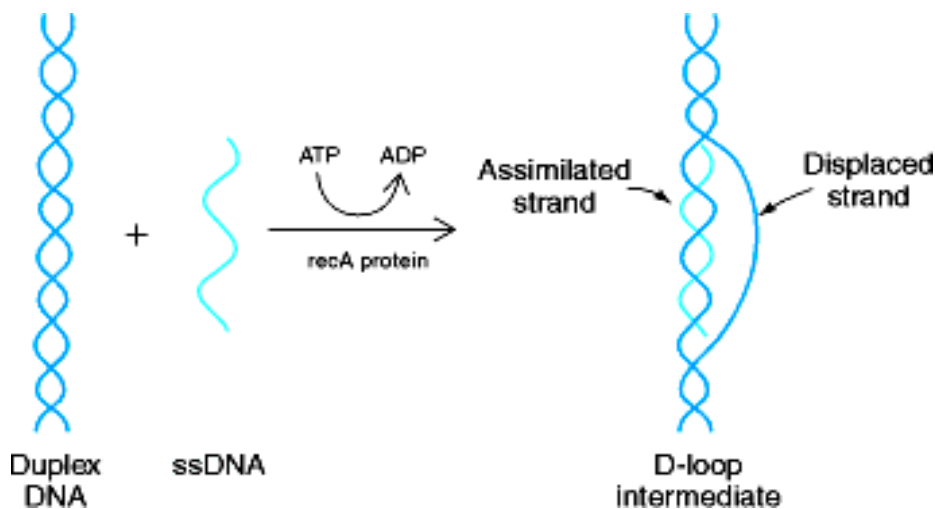


Figure 39. Modèle de la recombinaison générale non réciproque proposé pour la recombinaison lors de la transformation bactérienne(8).

2.1.2. *Enzymes de la recombinaison générale*2.1.2.1. **Initiation de la recombinaison par le complexe RecBCD**

Les protéines RecB, RecC et RecD forment un complexe enzymatique ayant une fonction à la fois hélicase et endonucléase. Ce complexe amorce la recombinaison en se liant à l'extrémité libre d'un duplex et en déroulant l'ADN double brin (**Figure 40a**).

En progressant le long du duplex, le complexe RecBCD génère localement des brins monocaténaire qui seront clivés par son activité endonucléase (**Figure 40b**). La protéine SSB s'associe rapidement à l'ADN monocaténaire au fur et à mesure de son apparition. Lors de sa progression, le complexe RecBCD rencontre une séquence nucléotidique particulière (5'-GCTGGTGG-3') appelée *site chi* (**site χ**) qui représente le point chaud de la

recombinaison. 1009 sites χ ont été identifiés dans le génome d'*E. coli* (en moyenne d'un site tous les 4,5 Kb). Quand le complexe RecBCD rencontre l'extrémité 3' d'une séquence χ , il coupe le brin d'ADN qui la contient, 4 à 6 bases en amont de l'extrémité 3'OH (**Figure 40c**). L'interaction de RecBCD avec le site χ provoque une modification dans le complexe qui n'exprime plus son activité endonucléase sur le brin 3', par contre l'activité nucléase sur le brin 5' est stimulée (**Figure 40d**).

Reprenant son activité hélicase, RecBCD déroule la molécule d'ADN double brin générant une queue d'ADN simple brin libre porteuse d'un site χ à son extrémité 3'OH. L'apparition de ce brin monocaténaire favorise la fixation de la RecA à la place des protéines SSB, ainsi se forme le filament nucléoprotéique (**Figure 40e**) qui enclenche le processus d'invasion et d'appariement avec une région

homologue d'une autre molécule d'ADN bicaténaire (9).

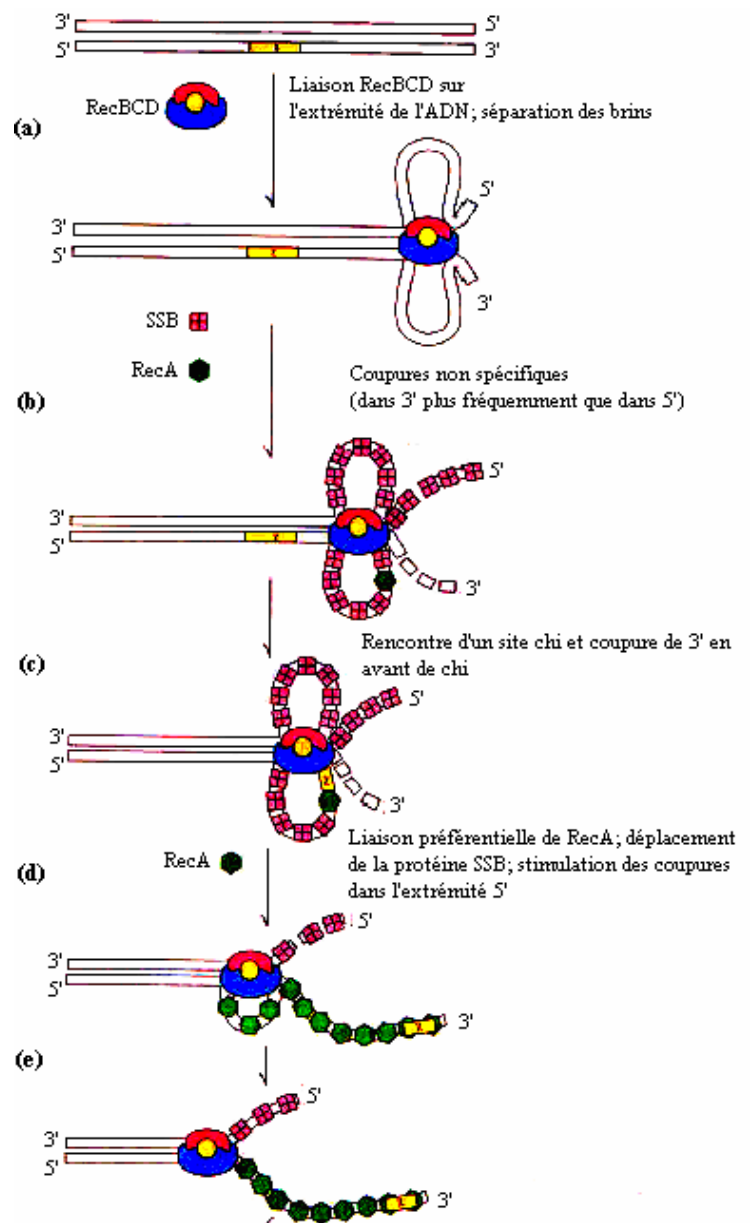


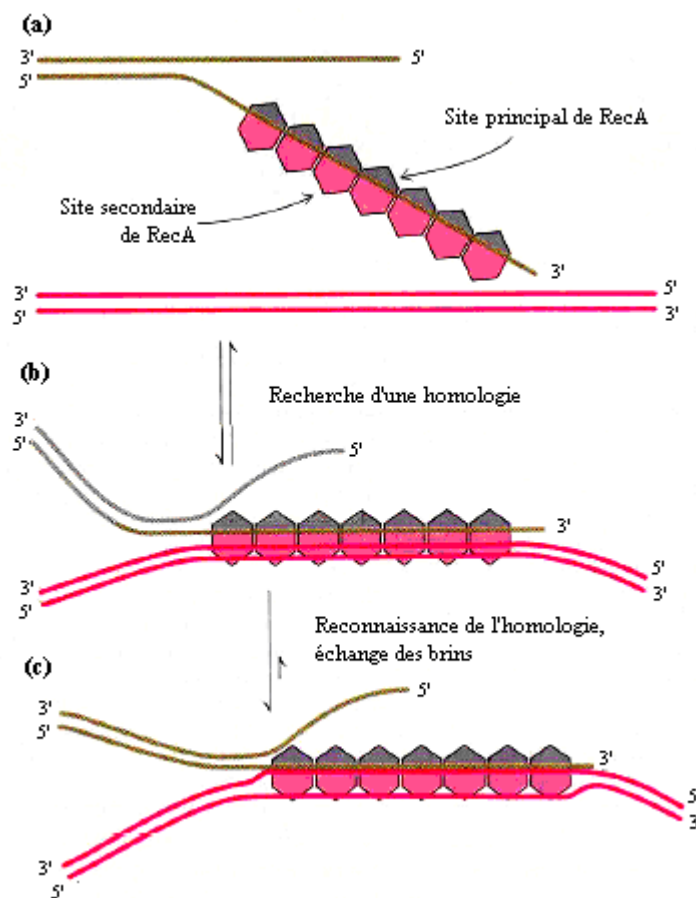
Figure 40. Modèle de la recombinaison homologue faisant intervenir le complexe enzymatique RecBCD, un site *Chi*, et la recombinase RecA (9).

2.1.2.2. Invasion, appariement homologue et formation de la structure de Holliday (Protéine RecA) Une

des enzymes principales de la recombinaison générale est la protéine RecA (ou recombinase RecA), elle catalyse la réaction d'échange des brins conduisant à la formation de la jonction de Holliday. La protéine RecA se lie à l'ADN monocaténaire et forme avec lui un filament nucléoprotéique, ce filament peut lier d'autres molécules d'ADN. Cette capacité à lier de multiples brins d'ADN est la fonction caractéristique la plus remarquable de la RecA.

RecA possède deux sites de liaison à l'ADN, un site à haute affinité pour l'ADN simple brin ou site principal (**Figure 41a**), et un second site se liant au duplex homologue. Lorsque le site principal lie un ADN simple brin, le filament formé s'associe à une autre molécule d'ADN par le site secondaire ayant une affinité à l'ADN double brin. La liaison entre le filament nucléoprotéique (RecA-ADNsb) et la molécule d'ADN double brin est transitoire, le filament se déplace alors dans la molécule d'ADN double brin jusqu'à ce qu'il rencontre une séquence homologue à l'ADN simple brin qu'il contient (**Figure 41b**). Lorsque cette homologie est rencontrée, il se forme un ADN duplex hybride entre l'ADN simple brin sur le site primaire et son brin complémentaire sur l'ADN double brin parcouru. Le duplex hybridé déplace ensuite le brin de la molécule double brin semblable à l'ADN simple brin porté sur le complexe RecA-ADNsb. Ce processus est à la base de l'échange des brins d'ADN (**Figure 41c**).

Figure 41. Modèle de la réaction d'échange des brins catalysée par RecA.



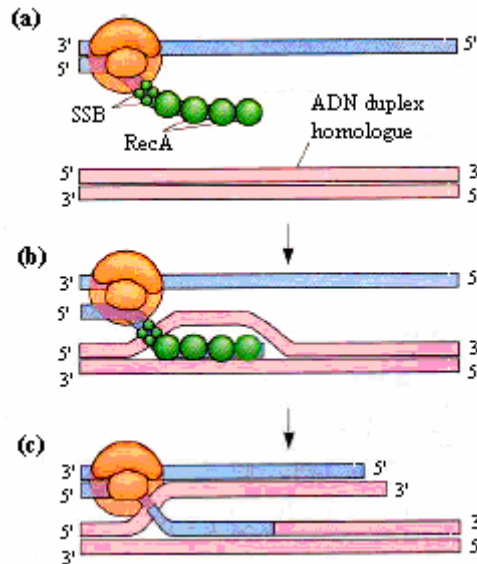


Figure 42. Modèle de la recombinaison homologue catalysée par RecA.(4).

L'invasion catalysée par la protéine RecA provoque la formation d'une boucle (D-Loop) qui est une structure triplex d'ADN (Figure 42b). Le brin déplacé par l'invasion et qui constitue la boucle s'apparie avec les bases du brin complémentaire du duplex d'origine ce qui forme la jonction de Holliday à mesure que l'invasion se poursuit (Figure 42c).

2.1.2.3. Migration de branche et résolution de la structure de Holliday (Protéines RuvA, RuvB et RuvC)

La structure de Holliday, formée par l'action de la RecA, représente un substrat pour deux protéines RuvA et RuvB qui catalysent la migration de branche; ces protéines forment un complexe ayant une activité

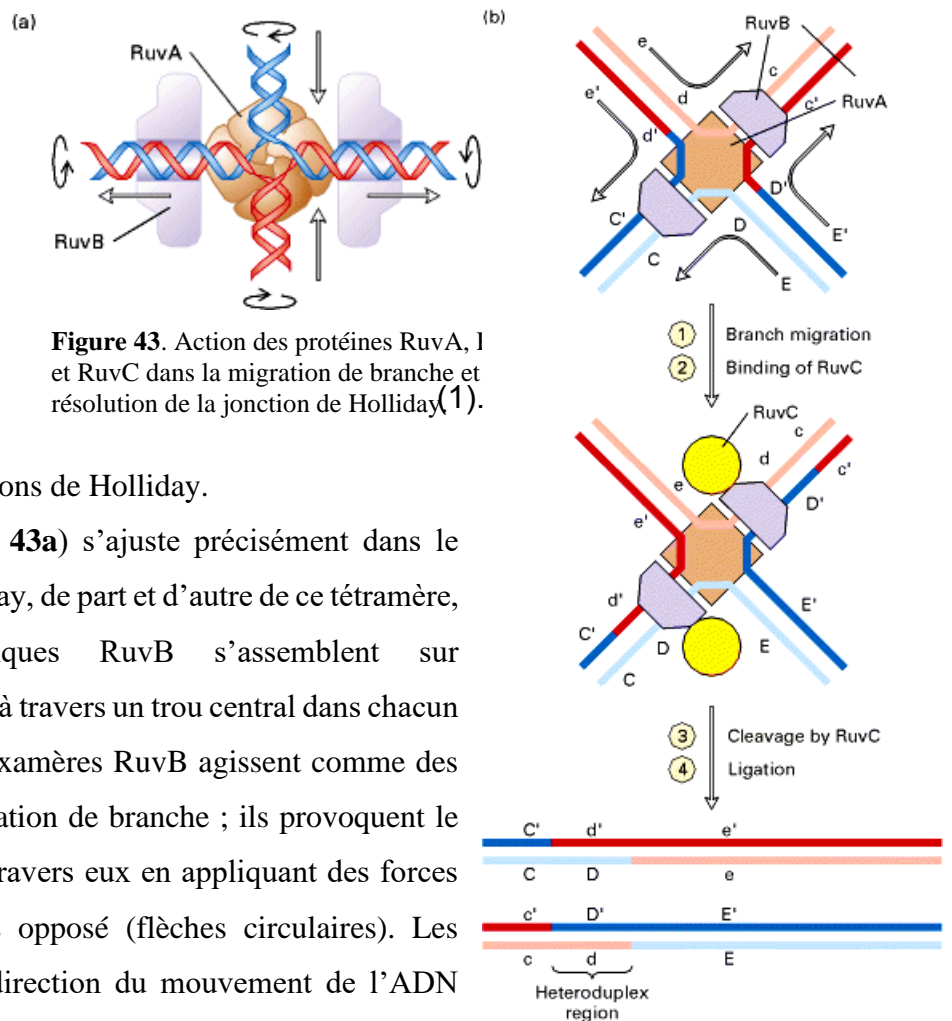


Figure 43. Action des protéines RuvA, RuvB et RuvC dans la migration de branche et résolution de la jonction de Holliday(1).

hélicase, spécifique des jonctions de Holliday.

Un tétramère RuvA (Figure 43a) s'ajuste précisément dans le centre de la jonction de Holliday, de part et d'autre de ce tétramère, deux structures hexamériques RuvB s'assemblent sur l'hétéroduplex. L'ADN passe à travers un trou central dans chacun des hexamères RuvB. Ces hexamères RuvB agissent comme des moteurs et favorisent la migration de branche ; ils provoquent le passage de l'ADN duplex à travers eux en appliquant des forces de rotation égales et à sens opposé (flèches circulaires). Les flèches droites montrent la direction du mouvement de l'ADN dans ce moteur protéique (Figure 43a).

Le mouvement de la jonction de Holliday, catalysé par le complexe RuvA-RuvB, génère des régions d'ADN hétéroduplex. La résolution de la jonction de Holliday est catalysée par une protéine RuvC, encore appelée *résolvase C*. Un dimère RuvC se lie au complexe RuvA-RuvB (**Figure 43b2**) et coupe simultanément deux brins d'ADN opposés, situés à 180° l'un de l'autre (**Figure 43b3**), puis une ADN ligase relie les extrémités libres (**Figure 43b4**) ; selon la paire des brins coupés, il en résulte un hétéroduplex recombinant (comme dans notre exemple) ou un hétéroduplex non recombinant.

La migration de branche ne semble pas être un processus aléatoire, elle s'arrête préférentiellement à la séquence $5' - \frac{A}{T} TT \frac{G}{C} - 3'$. Cette séquence apparaît fréquemment dans le génome d'*E. coli*,

vraisemblablement, la migration ne s'arrête pas en la première rencontre de ce motif. Une fois la migration arrêtée, la résolution de la jonction de Holliday se fait par coupure entre le second T et $\frac{G}{C}$

de la séquence d'arrêt ($5' - \frac{A}{T} TT \updownarrow \frac{G}{C} - 3'$)

2.1.2.4. Systèmes RecE et RecF

Les mutants *recB C* d'*E. coli* ne sont pas complètement déficients pour la recombinaison, la fréquence de cette dernière est cependant réduite de 10 à 100 fois. Il existe d'autres systèmes de recombinaison dont l'activité, normalement peu importante, peut augmenter à la suite de mutations.

Les mutants *sbc A* synthétisent l'endonucléase RecE (Exo VII) qui dégrade l'ADN bicaténaire à partir de l'extrémité 5'. L'extrémité 3'OH monocaténaire peut servir de substrat à RecA.

Il paraît que la RecF intervient quand la RecE est inactivée. Les trois systèmes RecBCD, recE et RecF font tous intervenir la protéine RecA, et probablement d'autres protéines (RecJ, RecO and RecQ) dont la fonction n'est pas encore élucidée.

Les systèmes RecBCD, recE et RecF agissent de manières similaires, mais seul le complexe RecBCD peut reconnaître des sites chi (χ) dans le génome d'*E. coli*, et RecF est la seule à pouvoir induire une recombinaison entre paires de plasmides(9).

2.2. Recombinaison à un site spécifique

En plus des systèmes de recombinaison homologue, les bactéries, leurs phages et leurs plasmides possèdent des systèmes qui effectuent des recombinaisons très spécialisées entre les régions d'ADN qui ne représentent qu'une homologie limitée.

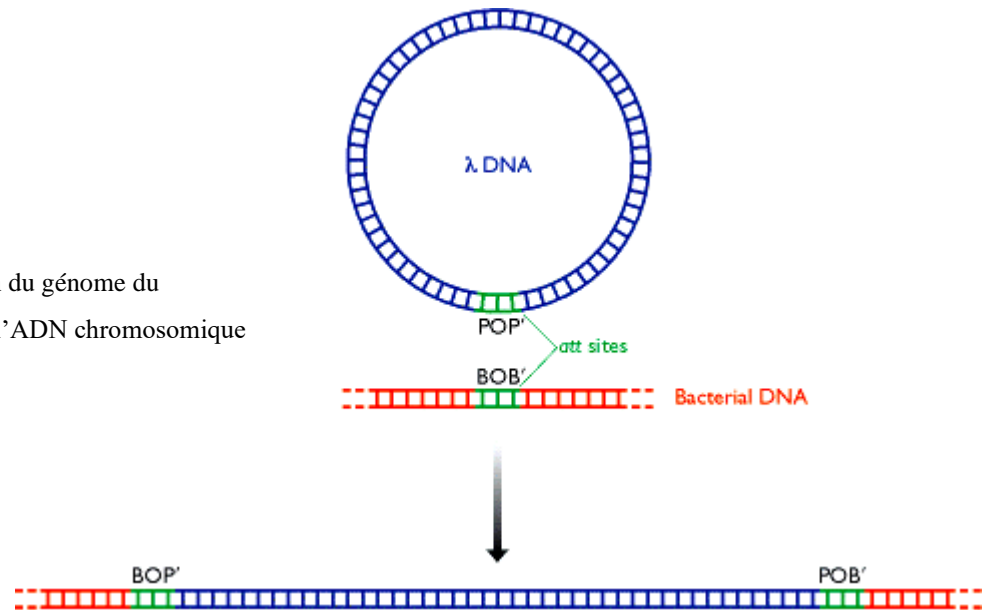
La recombinaison nécessite la présence des séquences d'ADN spécifiques à la fois dans l'ADN bactérien et dans l'ADN du phage. De courtes séquences homologues (souvent moins de 15pb) suffisent pour qu'une recombinaison spécifique de site ait lieu. Pour comprendre ce type de recombinaison, nous prendrons comme modèle illustratif le système d'intégration/excision du bactériophage λ .

Les systèmes d'intégration/excision du bactériophage lambda

En 1962, Campbell a proposé un modèle de recombinaison qui rend compte des diverses données génétiques de l'intégration du génome du bactériophage λ dans celui de *E. coli* qui induit la lysogénie. Ce modèle est basé sur la recombinaison entre des sites d'intégration uniques (séquences *att*) du chromosome bactérien (*attB* ou **BOB'**) et du bactériophage (*attP* ou **POP'**). La région **O** désigne la séquence commune de 15 nucléotides.

Des sites hybrides *attL* (**BOP'** à gauche) et *attR* (**POB'** à droite) se forment au moment de l'intégration (**Figure 35**).

Figure 35. Intégration du génome du bactériophage λ dans l'ADN chromosomique d'*E. coli*. (2).



Le site *attB* contient 25 pb dont la séquence cœur **O** de 15 pb où s'effectue l'échange. Le site *attP* est plus long (240 pb) et plus complexe, il contient, en plus d'un site **O** (situé au centre), plusieurs autres séquences disposées de façon asymétrique.

L'intégration est réalisée grâce à une enzyme virale, la λ intégrase, et à une protéine cellulaire, la IHF (facteur d'intégration de l'hôte). L'intégrase se lie spécifiquement aux sites **O**, elle possède d'autres sites de liaison sur le site *attP*. Il s'agit d'une topoisomérase de type I qui coupe et religature un brin d'ADN à la fois au niveau du site **O**. L'intégration ne peut se poursuivre qu'après interaction des séquences qui flament le cœur **O** du site *attP* avec plusieurs molécules d'intégrase et du facteur IHF formant une structure appelée intasome, qui donnerait à l'ADN phagique la topologie requise pour la recombinaison. L'excision du phage se fait par recombinaison spécifique entre les deux sites *att* hybrides qui ont été produits par l'intégration. En plus de l'intégrase et du facteur IHF, l'excision requière **Xis** (excisionase), une autre protéine qui lie l'ADN au niveau de séquences présentes dans un des sites *att* hybrides et qui active la recombinaison spécifique entre ces sites(2).

2.3. Les éléments génétiques mobiles (déjà évoqués dans le chapitre IV)

3. LA CARTOGRAPHIE DU GENOME

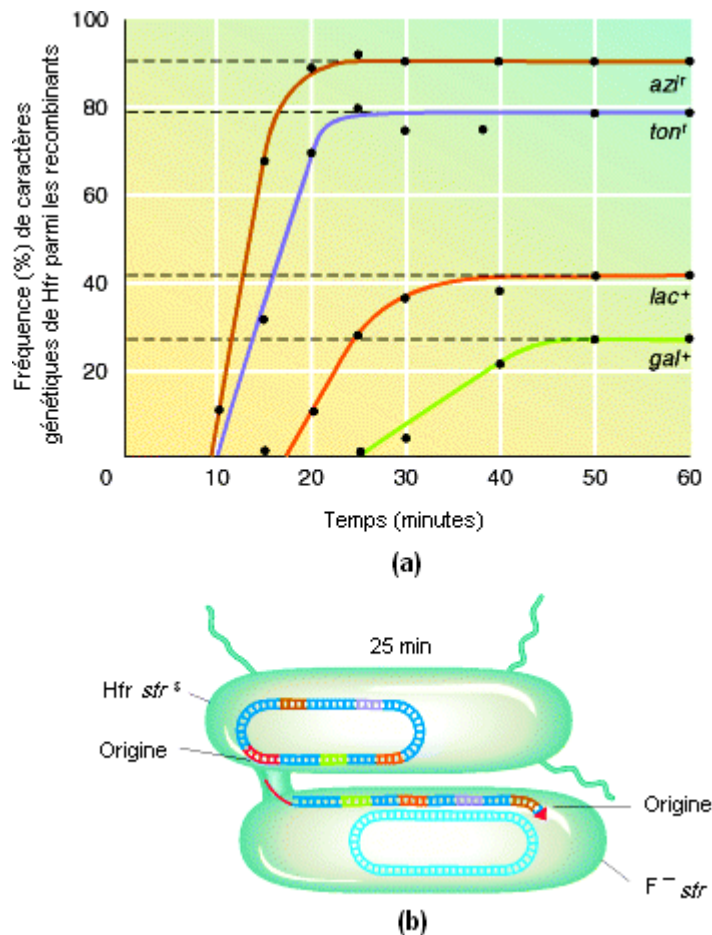
La cartographie d'un génome est la localisation des gènes dans ce génome. Parmi les principaux outils de la cartographie génétique chez les bactéries figure la conjugaison.

La conjugaison Hfr est fréquemment utilisée pour déterminer la localisation relative des gènes bactériens. Cette technique découle du fait que, durant la conjugaison, le chromosome linéaire passe d'un donneur à un receveur avec une vitesse constante.

Figure 36. Expérience du croisement interrompu chez *E. coli*. Les cellules F⁻ résistantes à la streptomycine (*str^r*) sont croisées avec des cellules Hfr *str^s* (sensibles à la streptomycine). Les cellules F⁻ ont un nombre de mutations (indiquées par les marqueurs génétiques *azi*, *ton*, *lac* et *gal*) qui les empêchent de mener des étapes métaboliques spécifiques, alors que les cellules Hfr en sont capables. Après début de la conjugaison entre les deux souches, des échantillons sont prélevés à différents temps et sont soumis à des agitations fortes pour interrompre la conjugaison entre les cellules, ces dernières sont ensuite étalées sur milieu contenant de la streptomycine. L'antibiotique tue les cellules Hfr, seules les cellules F⁻ vont survivre et seront ensuite étalées sur des milieux de sélection pour tester leur sensibilité au phage T1 (*ton*) et à l'azoture (*azi*), et leur capacité de croître sur galactose (*gal*) ou lactose (*lac*) comme seule source de carbone.

(a) Fréquence d'apparition des marqueurs génétiques *azi^r*, *ton^r*, *lac⁺* et *gal⁺*, parmi les recombinants en fonction de la durée de conjugaison.

(b) Transfert ordonné du chromosome Hfr au cours de la conjugaison(3).



Dans l'expérience du croisement interrompu (Figure 36), le canal de conjugaison est brisé et le croisement Hfr x F⁻ est arrêté à intervalles de temps réguliers après le début de la conjugaison, en soumettant les cultures à une agitation vigoureuse. L'ordre de la chronologie du transfert de gènes peut être déterminé parce qu'il reflète l'ordre des gènes dans le chromosome bactérien, la détermination des temps de pénétration permet d'établir une carte génétique divisée en minutes (Figure 37).

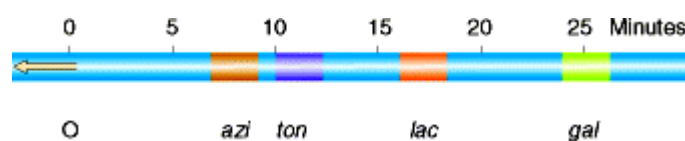


Figure 37. Carte génétique obtenue par cartographie de la figure 36 (4).

Il n'est pas possible d'établir la carte d'*E. coli* à partir d'une seule souche Hfr à cause de la trop grande taille de ce génome ; le transfert du chromosome ralentie progressivement . Dès lors, différentes souches Hfr ayant intégré un plasmide F à différents sites et orientations, doivent être utilisées et leurs cartes doivent être superposées. Cette approche a permis de prouver la circularité du chromosome d'*E. coli* (**Figure 38**).

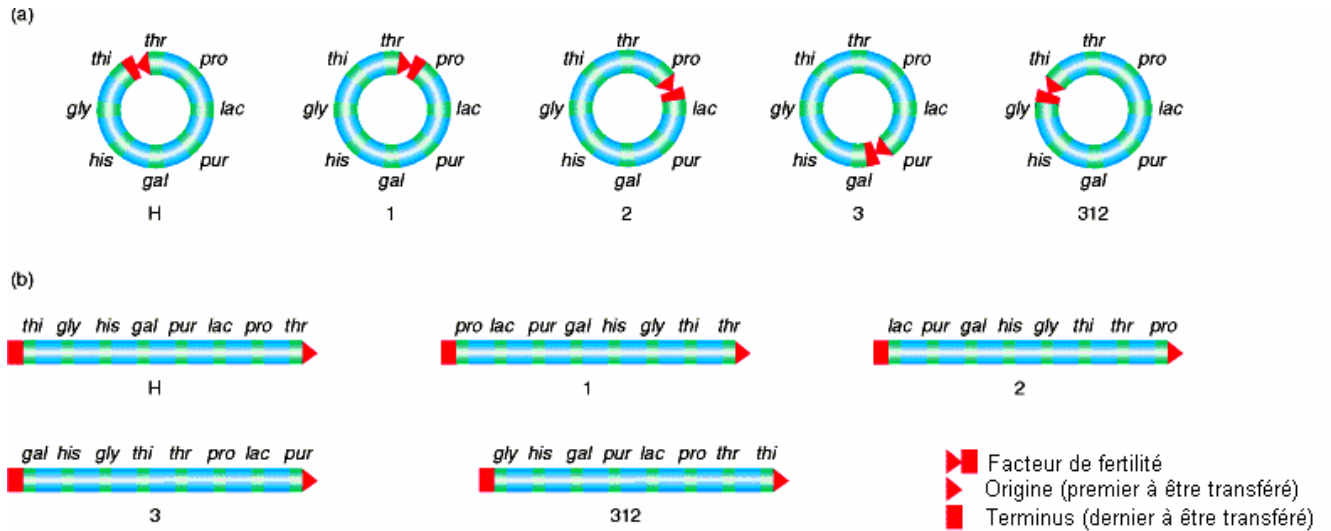


Figure 38. Circularité du chromosome d'*E. coli*.

- (a) Par utilisation de différentes souches Hfr (H, 1, 2, 3, 312) contenant le facteur F inséré dans le chromosome à différents points et positions, l'expérience du croisement interrompu montre la circularité du chromosome.
- (b) L'ordre linéaire des marqueurs du transfert de chaque souche Hfr indique l'origine et la direction de ce transfert (5).

En plus de préciser l'ordre des gènes, les cartes génétiques procurent des informations utiles. On observe par exemple un regroupement considérable de gènes dans *E. coli* (**Figure 39**). Dans la région entre 80 et 86 minutes, il y a beaucoup de gènes, alors que relativement peu de marqueurs génétiques sont trouvés dans la région de 33 minutes. Les zones apparemment dépourvues de gènes peuvent bien contenir des gènes non identifiés, mais peut être leur fonction n'est-elle pas principalement de coder de l'information génétique. Selon une hypothèse, la région de 33 minutes est impliquée dans l'attachement du chromosome d'*E. coli* à la membrane plasmique durant la réplication et la division cellulaire(9).

IV. PHENOMENES DE RESTRICTION ET MODIFICATION

I. ENZYMES DE RESTRICTION

Les enzymes de restriction (ou endonucléases de restriction) sont des enzymes bactériennes qui protègent normalement l'ADN de l'hôte en détruisant l'ADN de phages après sa pénétration.

Les cellules protègent leur propre ADN des enzymes de restriction en méthylant des nucléotides aux sites que ces enzymes reconnaissent. Un ADN étranger n'est pas méthylé aux mêmes sites et le plus souvent, il est clivé par les enzymes de restriction de l'hôte qu'il a envahi.

1.1. Types d'endonucléases de restriction

On classe les enzymes de restriction en trois types, **I**, **II** et **III**. Les enzymes de type **I** et **III** requièrent de l'ATP pour hydrolyser l'ADN non méthylé et peuvent catalyser la méthylation spécifique de certaines bases de l'ADN de l'hôte (le plus souvent dans la séquence de reconnaissance). Les endonucléases de restriction de type **I** clivent l'ADN étranger de façon aléatoire, loin du site de reconnaissance, ceux de type **III** coupent l'ADN dans ces sites, ou à leur proximité.

Les enzymes de restriction de type **II** sont largement utilisés pour le clonage et le séquençage des molécules d'ADN. Leur activité catalytique n'exige pas d'ATP et elles ne modifient pas l'ADN par méthylation ou par d'autres moyens. Elles coupent l'ADN à l'intérieur de la séquence qu'elles reconnaissent spécifiquement, ou à son voisinage immédiat. Ces séquences de reconnaissance ont le plus souvent de quatre à huit nucléotides et un axe binaire de symétrie. Par exemple, l'enzyme de restriction *EcoRI* isolée de *E. coli* reconnaît spécifiquement une séquence GAATTC et coupe l'ADN entre G et A dans cette séquence (**Figure 40**). Cette séquence est un *palindrome* ayant un axe de symétrie d'ordre deux : la séquence lue dans le sens 5'→3' est la même pour les deux brins. Le clivage de cette séquence entre G et A produit des fragments dans lesquels les extrémités 5' portent un prolongement monocaténaire, ces extrémités simple brin très complémentaires sont connues sous le nom de *bouts cohésifs* ou *collants*(4).

D'autres enzymes, comme *BalI*, coupe la séquence reconnue au niveau de son axe de symétrie, ce qui produit des extrémités non cohésives dites à **bouts francs**.

Il y a plusieurs centaines d'enzymes de restriction qui reconnaissent de nombreuses séquences spécifiques différentes (**Tableau 3**). Le nom de chaque enzyme de restriction commence par trois lettres indiquant la bactérie qui la produit(6).

Tableau 3. Quelques endonucléases de restriction de type II et leur séquence de reconnaissance

Source microbienne	Enzyme*	Séquence reconnue (↓)	Extrémités formées
<i>Arthrobacter luteus</i>	<i>AluI</i>	AG↓CT	Franche
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	<i>BamHI</i>	G↓GATCC	Cohésive
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	Cohésive
<i>Haemophilus gallinarum</i>	<i>HgaI</i>	GACGC+5↓	#
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>HindIII</i>	A↓AGCTT	Cohésive
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	<i>HphI</i>	GGTGA+8↓	#
<i>Nocardia otitiscaviarum</i>	<i>NotI</i>	GC↓GGCCGC	Cohésive
<i>Staphylococcus aureus</i> 3A	<i>Sau3AI</i>	↓GATC	Cohésive
<i>Serratia marcescens</i>	<i>SmaI</i>	CCC↓GGG	Franche
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>TaqI</i>	T↓CGA	Cohésive

* Les enzymes sont désignées par trois lettres indiquant les souches bactériennes desquelles elles proviennent ; les chiffres romains indiquent l'ordre de découverte de l'enzyme dans une souche donnée (par exemple, *AluI* était la première enzyme de restriction à être isolée de *Arthrobacter luteus*).

Les séquences reconnues sont écrites 5'→3' (un seul brin est montré), le site de clivage est indiqué par une flèche. Les enzymes produisant des bouts francs coupent les deux brins de l'ADN au site indiqué ; celles produisant des bouts cohésifs effectuent des coupures décalées entre les mêmes nucléotides sur chacun des brins de l'ADN (figure 40).

Les sites de clivage de *HphI* and *HgaI* se situent à quelques nucléotides de la séquence reconnue. *HgaI* coupe à 5 nucléotides du côté 3' de la séquence GACGC d'un brin, et à 10 nucléotides du côté 5' de la séquence complémentaire GTGCG de l'autre brin d'ADN. *HphI* coupe à 8 nucléotides du côté 3' de la séquence GGTGA du premier brin, et à 7 nucléotides du côté 5' de la séquence complémentaire CCACT de l'autre brin.

Cas des isoschizomères

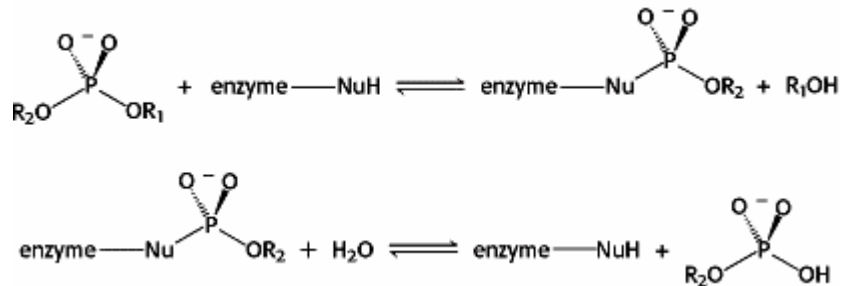
Les isoschizomères (du grec «iso»: égal, et «skhizein»: fendre) sont des enzymes de restriction qui proviennent de sources bactériennes différentes, (et qui portent donc des noms différents). Ils ont des constantes physiques différentes, mais ils coupent l'ADN au niveau d'un même site de restriction. Par exemple, *MboI* et *Sau3A* reconnaissent la même séquence de quatre nucléotides, 5'-GATC-3'. La séquence est clivée sur les deux brins à la même position, du côté 5' de G.

BamHI n'est pas un isoschizomère de *MboI* et *Sau3A*, mais il reconnaît la séquence hexanucléotidique GGATCC. IL clive entre les deux G, produisant des extrémités 5' cohésives qui peuvent s'apparier avec les fragments produits par *MboI* et *Sau3A*. On dit que *BamHI* et *MboI* (ou son isoschizomère *Sau3A*) sont des **enzymes compatibles** car, bien que ne reconnaissant pas le même site de restriction, ils génèrent des fragments à extrémités cohésives complémentaires.

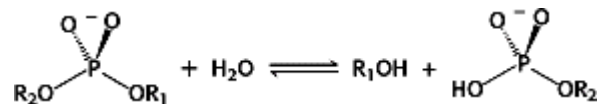
1.2. mécanismes réactionnels des endonucléases de restriction

La réaction fondamentale catalysée par les endonucléases de restriction est l'hydrolyse de la liaison phosphodiester du squelette de l'ADN. La liaison entre l'atome d'oxygène 3' et l'atome de phosphore est spécifiquement rompue. Les produits de cette réaction sont des brins d'ADN avec des groupes 3'-OH et 5'-phosphate libres. Cette réaction est initiée par une attaque nucléophile sur l'atome de phosphore. On considère deux types de mécanismes, dans le premier, l'endonucléase cliverait l'ADN en passant par un intermédiaire covalent en utilisant un nucléophile covalent (Nu), dans le deuxième mécanisme, le clivage se fait par hydrolyse directe.

Mécanisme 1. (intermédiaire covalent)



Mécanisme 2. (hydrolyse directe)



Dans le premier mécanisme, un nucléophile dans l'enzyme attaque le groupement phosphate pour former un intermédiaire covalent. La prochaine étape est l'hydrolyse de cet intermédiaire et la libération du produit final. Dans le deuxième mécanisme, une molécule d'eau activée attaque directement l'atome phosphore.

Les endonucléases, comme toute autre enzyme agissant sur des substrats contenant du phosphore, requièrent le Mg^{2+} , ou autres cations divalents similaires, pour leur activité. Ce métal est indispensable pour la catalyse, l'ion magnésium tient une molécule d'eau en une position qui lui permet d'attaquer le groupement phosphate et effectuer l'hydrolyse.

Les séquences reconnues par les endonucléases de restriction sont, en majorité, des séquences répétées inverses (palindromes). Cet arrangement de nucléotides donne à ces séquences là une structure tridimensionnelle symétrique (**Figure 41**). Les enzymes de restriction montrent une symétrie correspondante pour faciliter la reconnaissance(7).

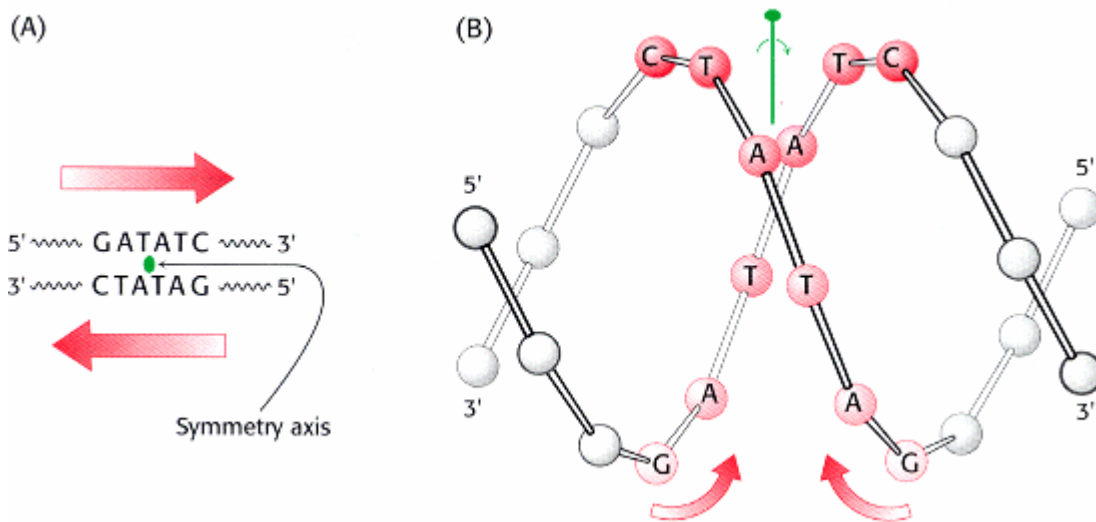


Figure 41. Structure du site de reconnaissance de l'endonucléase *EcoRV*. (A) séquence du site de reconnaissance qui représente une symétrie par rapport à un axe. (B) la répétition inverse dans la séquence reconnue par *EcoRV* fournie à l'ADN une structure tridimensionnelle avec un axe de symétrie d'ordre deux(8).

2. CARTES DE RESTRICTION

Les enzymes de restriction constituent un outil très intéressant permettant de dresser des cartes de molécules d'ADN de plusieurs milliers de paires de bases. Ces enzymes n'agissent que sur leurs sites spécifiques et produisent une série de fragments individuellement distincts. Les fragments de restriction forment une collection particulière de morceaux d'ADN de différentes tailles qu'il est possible de séparer par électrophorèse (**Figure 42**).

La taille des fragments produits par digestion avec une enzyme déterminée correspond exactement à la distance qui sépare les sites spécifiques de cette enzyme. L'analyse par électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide de fragments produits par plusieurs enzymes, utilisées séparément ou de façon combinée, permet de déterminer l'ordre des fragments dans la molécule originale (**Figure 43**).

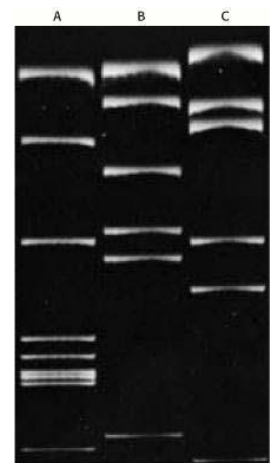


Figure 42. Électrophorèse des fragments de restriction(9).

L'établissement d'une carte de restriction est une étape préalable indispensable de la détermination de la séquence nucléotidique d'une région d'un génome, à fortiori de celle d'un génome en entier.

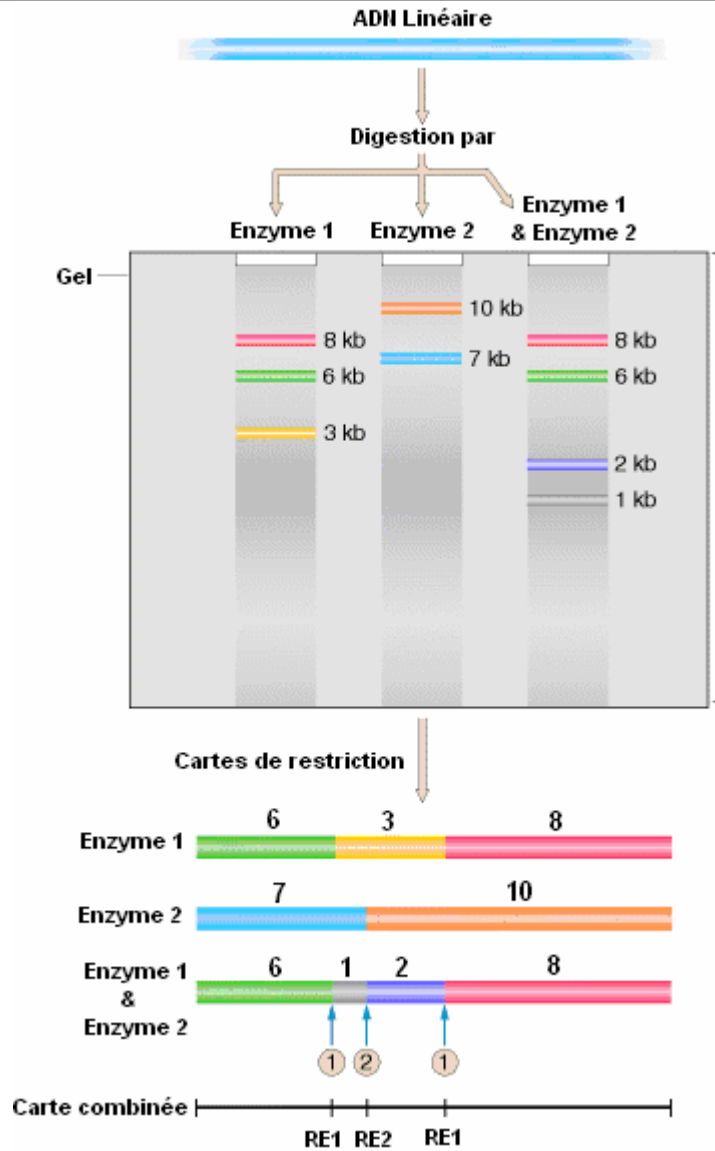


Figure 43. Carte de restriction d'un ADN déduite d'une électrophorèse des fragments obtenus après digestion par des enzymes de restriction. (5).

Dans cet exemple, une première digestion par l'enzyme 1 montre qu'il y a deux sites de restriction pour cette enzyme, mais rien ne montre l'ordre des fragments produits dans la molécule de 17 Kb digérée. Une digestion combinée par les enzymes 1 et 2 donne les segments de 6 et 8 Kb intacts, le segment de 3 Kb est clivé, ceci montre que l'enzyme 2 clive un des fragments produits par l'enzyme 1. Si le fragment de 3 Kb était situé à l'extrémité de la séquence étudiée, la digestion par l'enzyme 2 seule donnerait des fragments de 1 et 2 Kb. Puisque ce n'est pas le cas, des trois fragments produits par l'enzyme 2, le fragment de 3 Kb doit se situer au milieu. Le site de restriction de l'enzyme 2 (RE2) est plus proche de fragment de 6 Kb qu'au fragment de 8 Kb, comme ça on peut avoir deux fragments de 7 et 10 Kb après digestion par l'enzyme 2.

V. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES

Les micro-organismes sont capables de contrôler l'expression de leurs gènes. Le contrôle de l'expression des gènes permet essentiellement à la cellule d'ajuster ses synthèses en fonction des besoins nutritionnels, face à un environnement changeant, de façon à assumer la croissance et la division cellulaire. Cette régulation génétique sert à conserver l'énergie et les matières premières, à maintenir un équilibre entre les quantités des diverses protéines cellulaires et à adapter la cellule aux modifications à long terme de l'environnement.

Le contrôle du métabolisme bactérien se fait tant au niveau des activités des produits des gènes qu'à celui de leur synthèse. Le contrôle de l'activité des enzymes permet un ajustement rapide des activités métaboliques en réponse aux fluctuations des pools intracellulaires des sucres, d'acides aminés ou de nucléotides.

Certaines enzymes dont la production par des gènes est régulée par d'autres gènes, ne sont synthétisées que lorsque leurs substrats sont présents dans la cellule : ces enzymes et les systèmes auxquels elles appartiennent sont dits *inductibles*. D'autres enzymes dont la production par des gènes est aussi régulée par d'autres gènes, ne sont synthétisées que lorsque leur produit final est absent, et sont dites *répressibles*. Les enzymes inductibles, sont généralement impliquées dans le métabolisme d'un composé qui sert de source d'énergie comme le lactose, le galactose et l'arabinose, alors que les enzymes répressibles sont généralement impliquées dans la synthèse de quelque produit de fin de chaîne métabolique, comme le tryptophane, l'histidine ou l'arginine(5).

Enfin, certaines enzymes sont produites par des gènes qui ne sont pas régulés. Elles sont donc produites continuellement, que leur substrat soit présent ou pas. Ces enzymes et les systèmes auxquels elles appartiennent sont dits *constitutifs*. Les enzymes constitutives sont généralement celles dont la cellule a continuellement besoin, comme celles du métabolisme du glucose. Celles qui sont inductibles ou répressibles, c'est à dire qui sont produites par des gènes régulés, ne sont requises qu'à certains stades du cycle cellulaire, et au cours de son histoire la cellule a développé les mécanismes requis pour les produire seulement lorsque nécessaire.

1. REGULATION AU NIVEAU DE LA TRANSCRIPTION

1.1. *Le modèle de l'opéron*

Chez les bactéries, les gènes codant pour les enzymes d'une voie métabolique particulière sont souvent regroupés, adjacents les uns aux autres, formant un segment continu sur le chromosome. Ces ensembles ainsi que les séquences régulatrices qui contrôlent leur transcription sont appelés *opérons*. Ce type d'organisation permet l'expression coordonnée de tous les gènes de l'opéron par leur transcription dans un ARNm polycistronique codant pour toutes les enzymes de la voie métabolique concernée (Un ARNm polycistronique est un ARNm qui code pour plusieurs protéines, un cistron est une région d'ADN qui représente une protéine ; c'est l'équivalent d'un gène).

Une séquence régulatrice en amont de cette unité détermine si l'opéron sera ou non transcrit. Cette séquence est appelée *l'opérateur* (Figure 44). L'opérateur est voisin du *promoteur*. L'interaction d'une protéine régulatrice avec l'opérateur contrôle la transcription de l'opéron en favorisant ou en empêchant l'accès de l'ARN polymérase au promoteur. L'induction active la transcription ; la répression la prévient.

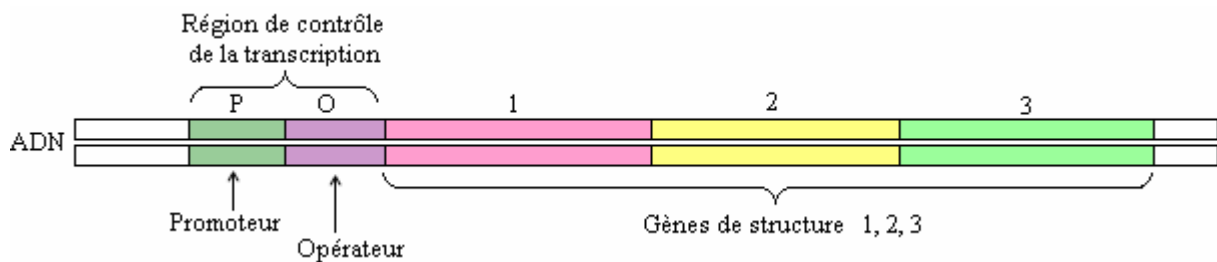


Figure 44. Organisation générale des opérons(1).

1.2. Induction et répression, régulations négatives et positives

A. OPERON LACTOSE, EXEMPLE D'ENZYMES INDUCTIBLES

Si on cultive des colibacilles (*E. coli* par exemple) sur un milieu contenant du glucose, les colibacilles se multiplient sans aucun problème. Si maintenant on supprime le glucose et que l'on mette les bactéries sur milieu contenant du lactose (β -galactosido-glucose) au lieu du glucose, elles ne poussent plus, c'est comme si elles sont incapables d'utiliser le lactose. Après un certain temps, la croissance reprend. Les bactéries peuvent maintenant utiliser le lactose (pour libérer le glucose) grâce à une β -galactosidase qu'elles synthétisent à cet effet (Figure 45).

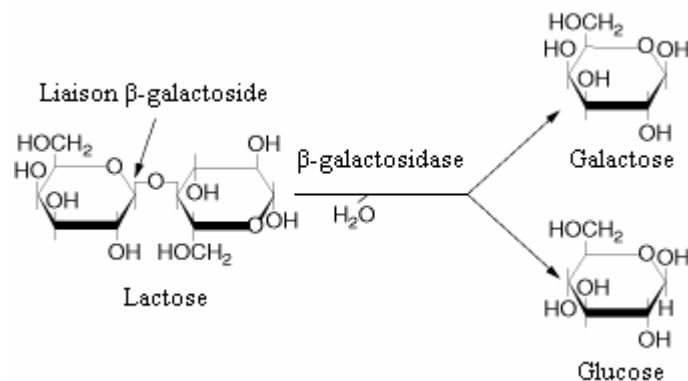


Figure 45. Métabolisme du lactose par la β -galactosidase(2).

1. Structure de l'opéron lac

Le gène de la β -galactosidase (*LacZ*) fait partie de l'*opéron Lac* qui comprend 2 autres gènes de structure (*LacY*) et (*LacA*) qui codent respectivement pour la β -galactoside perméase (responsable de l'entrée du lactose dans la cellule) et la thiogalactoside transacétylase qui n'est pas nécessaire au métabolisme du lactose, et qui acétyle les β -galactosides non métabolisables. Un seul *opérateur* (O) et un seul *promoteur* (P) contrôlent l'ensemble de cette unité de transcription (*Lac Z*, *LacY* et *Lac A*) (Figure 46). Le gène régulateur (*I*) situé à l'extrémité de l'opéron *lac* code pour une protéine qui joue le rôle de répresseur. Ce répresseur peut inactiver l'opéron *lac* en se liant à son opérateur(6).

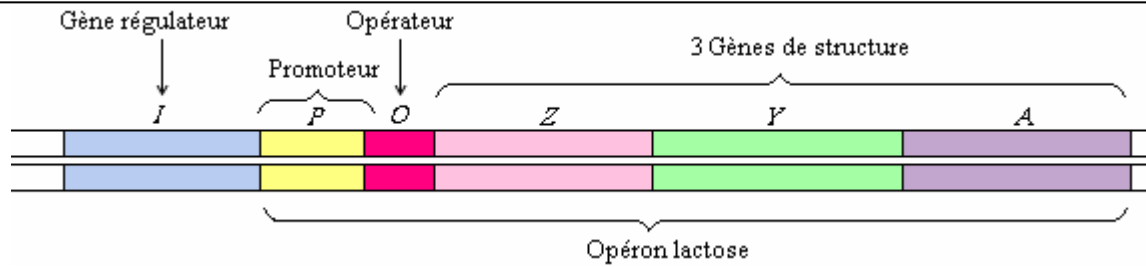


Figure 46. Structure de l'opéron *lac*.

2. Régulation négative et positive de l'opéron *lac* (3).

La synthèse des trois enzymes (la β -galactosidase, la β -galactoside perméase et la thiogalactoside transacétylase), chez *E. coli*, est rapidement induite si ces bactéries sont placées dans un milieu contenant le lactose comme seule source d'énergie. Cette synthèse est réprimée si l'on place les bactéries dans un milieu dépourvu de lactose.

Le gène *lac I* code pour une protéine, le **répresseur *lac***, qui se lie à l'opérateur et inactive l'opéron *lac*, empêchant ainsi la synthèse des enzymes qui métabolisent le lactose. Pour que l'opéron *lac* soit activé et que les gènes *lac Z*, *lac Y* et *lac A* soient transcrits, il faut que soit présent un métabolite spécifique appelé **inducteur** (ici du lactose) qui inactive le répresseur et permet la transcription des trois gènes de structure (***Lac Z*, *Lac Y* et *Lac A***) (Figure 47).

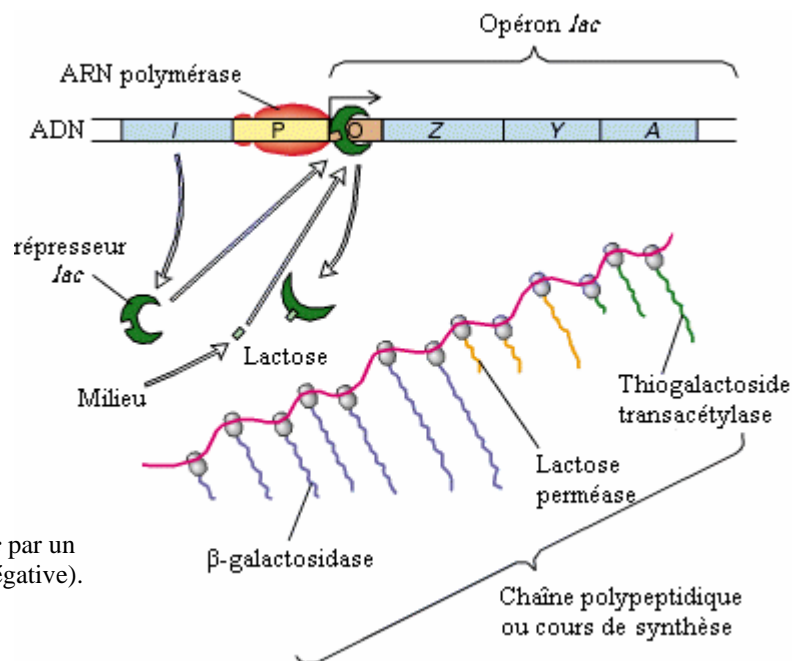


Figure 47. Régulation de la transcription de l'opéron *lac* par un répresseur *lac* (régulation négative).

Certains analogues de substrats peuvent induire la synthèse d'enzymes, bien que ces enzymes soient incapables de les métaboliser. Ces analogues de substrats sont des **inducteurs gratuits**. Divers thiogalactosides comme l'**IPTG** (isopropyl- β -D-thiogalactoside, Figure 48) sont d'excellents inducteurs gratuits de la synthèse de la β -galactosidase chez *E. coli*.

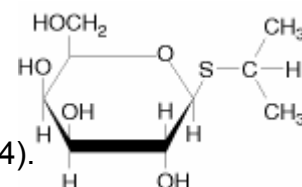


Figure 48. Structure de l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside)(4).

La régulation de l'opéron lactose par Lac I est une **régulation négative**, c'est-à-dire que les gènes de l'opéron *lac* sont transcrits sauf si la transcription est bloquée par le produit du gène *lac* I. Le répresseur *lac* est une protéine tétramérique, elle a deux sites de liaison, un pour l'inducteur, l'autre pour l'ADN. En l'absence de l'inducteur, le répresseur *lac* bloque l'expression des gènes *lac* ; il se lie à l'ADN du site O (opérateur *lac*) en amont des gènes de structure *lac*, avec pour conséquence la répression de la transcription par l'ARN polymérase à partir du promoteur *p_{lac}*.

La dérégulation de l'opéron *lac* s'effectue quand un inducteur se fixe sur le répresseur *lac*. Il s'en suit un changement de conformation dans la protéine, ce qui abaisse l'affinité du répresseur pour le site opérateur, le complexe répresseur-inducteur se dissocie de l'ADN, et l'ARN polymérase peut alors se lier au promoteur et transcrire les gènes structuraux (**Figure 47**).

Le modèle de la régulation négative explique la régulation spécifique de l'opéron lactose, mais pas sa répression par le glucose qui est en fait une régulation générale, appelée **régulation catabolique** ou **régulation positive**.

En présence d'un mélange glucose + lactose, la bactérie choisit de métaboliser d'abord le glucose, puis quand le glucose s'épuise, elle utilisera le lactose. Ici, en présence du de glucose, l'utilisation du lactose est réprimée. Ce phénomène est connu sous le nom de **répression catabolique**(7).

Dans la **régulation positive**, le fonctionnement de l'opéron *lac* est soumis à une régulation par la protéine activatrice du catabolisme (CAP), et par l'AMPc (adénosine 3'-5' monophosphate cyclique) ainsi que par le répresseur protéique Lac I. Le promoteur *lac* possède un site CAP sur lequel l'activateur CAP doit se fixer avant que l'ARN polymérase ne puisse s'attacher au promoteur et commencer la transcription. La protéine CAP n'est capable de se fixer sur le promoteur *lac* que lorsqu'elle est complexée à l'AMPc. La concentration de l'AMPc est régulée par le glucose. Le transport du glucose dans la cellule s'accompagne d'une inactivation de l'adénylate cyclase d'*E. coli*, ce qui aboutit à la diminution de la concentration de l'AMPc. L'action de CAP en tant que régulateur positif est dépendante de l'AMPc. CAP, qui est encore désigné **CRP** (pour *cAMP receptor protein*) est un dimère constitué de deux chaînes polypeptidiques identiques. Chaque sous unité contient un site de liaison à l'ADN et un autre pour l'AMPc. Le complexe CAP-(AMPc)₂ se lie à la région comprise entre -72 et -52 de l'opéron *lac* et entraîne la formation du complexe fermé ARN polymérase-*p_{lac}*. L'ARN polymérase et le complexe CAP-(AMPc)₂, seuls, ont une affinité relativement faible pour leurs sites de liaison sur *p_{lac}*, cependant, l'interaction entre la protéine CAP et la sous unité α de l'ARN polymérase forme un complexe protéine-protéine ayant une affinité plus élevée et forme un complexe plus stable avec la région *p_{lac}* (**Figure 49**). La **figure 50** résume les différents mécanismes qui régulent l'expression des gènes de l'opéron lactose.

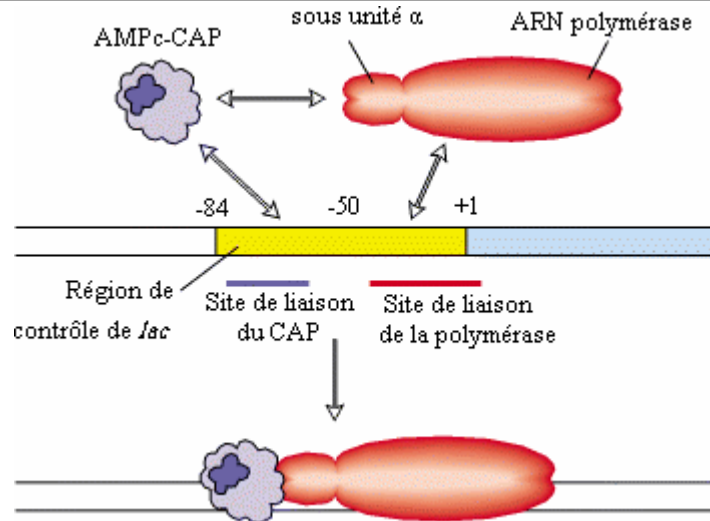


Figure 49. Liaison coopérative de l'ARN polymérase et du complexe AMPc-CAP sur le promoteur de l'opéron *lac*(5).

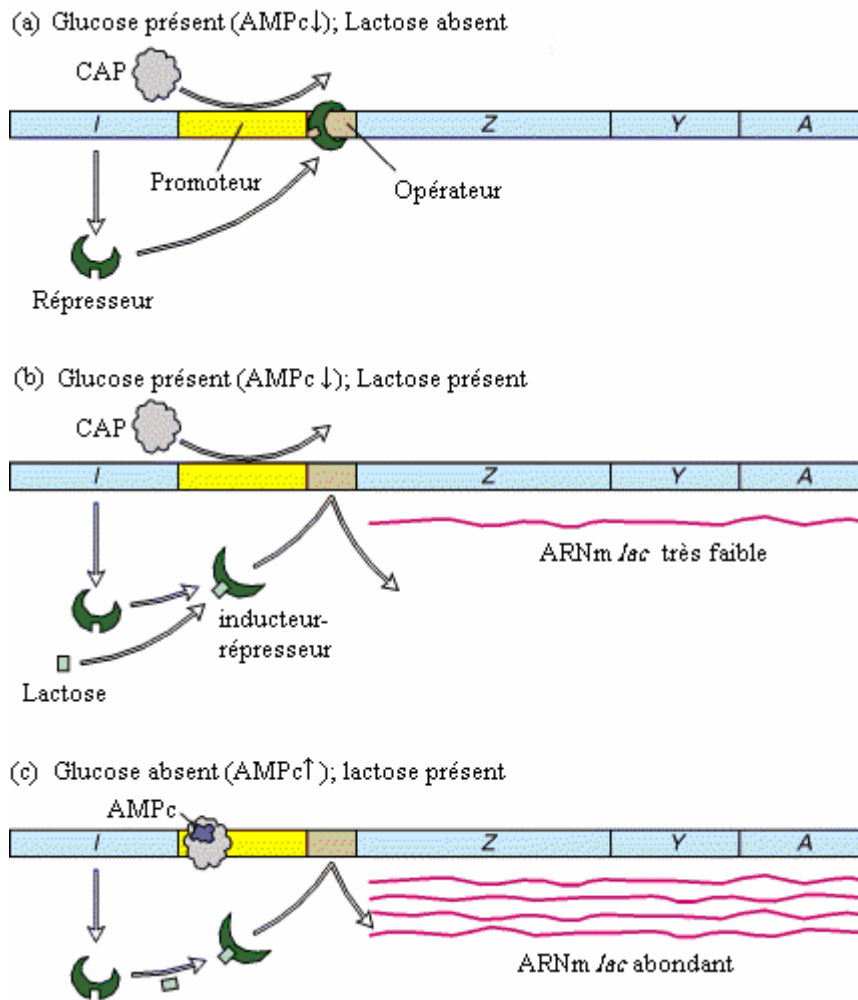


Figure 50. Contrôle négatif et positif de la transcription de l'opéron *lac* par le répresseur *lac* et l'AMPc-CAP respectivement(6).

(a) En absence du lactose, il n'y a pas formation d'ARNm des gènes *lac* à cause de la liaison du répresseur *lac* sur l'opérateur empêchant la transcription. (b) En présence de glucose et de lactose, ce dernier se lie sur le répresseur entraînant des changements de conformation qui préviennent la liaison du répresseur à l'opérateur. Toutefois, l'AMPc est en très faible quantité à cause de la présence du glucose, ainsi, le complexe AMPc-CAP n'est pas formé et en conséquence, la fixation de l'ARN polymérase sur le promoteur est peu efficace et seule une faible quantité d'ARNm est synthétisée. (c) En présence de lactose et absence de glucose, une transcription maximale des gènes *lac* survient. Le répresseur *lac* ne peut pas se lier à l'opérateur, et la concentration de l'AMPc augmente ce qui favorise la formation du complexe AMPc- CAP

et la fixation simultanée de ce complexe sur le site CAP de l'opéron *lac* et sur l'ARN polymérase. La transcription dans ce cas est multipliée par un facteur 50.

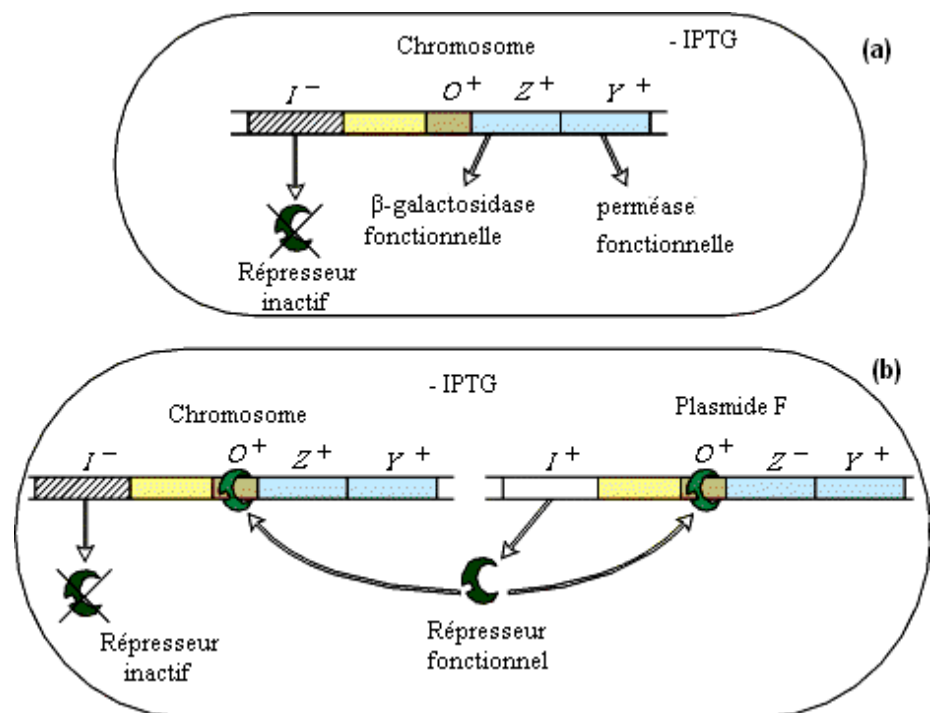
3. Les découvertes qui ont abouti à l'énoncé du modèle de l'opéron *lac*

L'énoncé du modèle de l'opéron (par Jacob et Monod, 1961) pour expliquer le contrôle de la voie de dégradation du lactose chez *E. coli*, constitue une étape décisive de l'étude de la régulation de l'expression des gènes. La compréhension des mécanismes de cette régulation est devenue possible grâce à des analyses par mutations.

Après isolement des premiers mutants de régulation qui synthétisent la β -galactosidase de manière constitutive, la découverte que des analogues non métabolisés du lactose peuvent induire le système (les inducteurs gratuits) et que de bons substrats pour la β -galactosidase peuvent n'être que de faibles inducteurs montrait que l'activité enzymatique et la cible de l'induction étaient des entités distinctes. Ceci permettait d'écarter l'idée que l'induction consistait en l'adaptation d'un précurseur de la β -galactosidase déjà présent dans la cellule favorisant la théorie d'une expression sélective des gènes *lac* en présence d'inducteur. Des mesures d'incorporation de précurseurs radioactifs des protéines a ensuite confirmé que l'induction implique une synthèse nouvelle d'enzyme. Cette dernière expérience, réalisée par Monod, consistait à un marquage radioactif (par ^{35}S) des protéines d'*E. coli*, puis transfert des bactéries marquées dans un milieu non-radioactif et ajout de l'inducteur. La β -galactosidase néoformée était non-radioactive et devait avoir été synthétisée après l'addition de l'inducteur.

Les mutations dans *lac I* avaient un effet pléiotrope (action en *trans*) sur l'expression des gènes *lac Z* et de *lac Y*. L'expérience de Jacob et Monod (1958) (**Figure 51**) montrait dans des exconjugants mérodiplloïdes, l'existence de signaux régulateurs diffusibles. Elle conduisait à postuler que l'inducteur agissait en inactivant un répresseur (inhibiteur) de la synthèse des enzymes du système lactose.

Figure 51. Démonstration expérimentale de l'action en *trans* du gène *lac*⁺. Les régions hachurées de l'ADN indiquent les gènes et régions de contrôle qui portent des mutations. (a) Les cellules portant des mutations *lac I* produisent un répresseur inactif, ceci résulte en une expression continue des gènes *lacZ* et *lacY* (production continue de la β -galactosidase et de perméase). (b) Si l'on introduit à ces cellules (*I*⁻ *O*⁺ *Z*⁺ *Y*⁺) un plasmide F portant le gène *lacI*⁺ sauvage, les cellules transformées produisent un répresseur actif qui peut se lier aux deux opérateurs *lac* (sur le chromosome et sur le plasmide). Le résultat est une répression de l'expression des gènes de la β -galactosidase et de la perméase en absence de l'inducteur (- IPTG) (7).

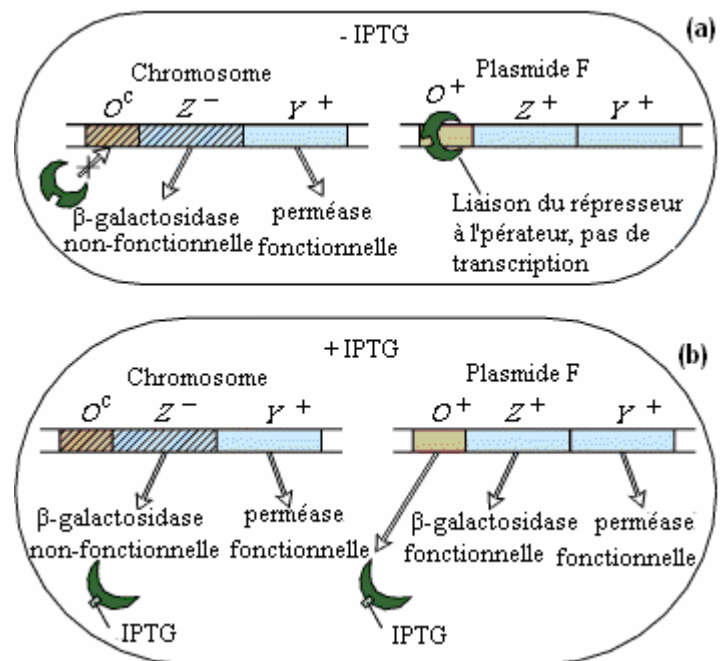


Des expériences complémentaires dans des mérodiplôides contenant des $F'lac$ permettaient ensuite de distinguer un site opérateur (O), où le répresseur du système lac se fixe pour bloquer l'expression des gènes, du gène $lac I$ qui code pour ce répresseur. Des mutations dans ces deux loci provoquent une synthèse constitutive des enzymes de dégradation du lactose, mais les mutations dans l'opérateur (**mutants O^c** ou mutants opérateurs constitutifs) sont *cis*-dominantes (**Figure 52**) alors que les mutations dans le gène du répresseur, qui code pour une molécule diffusible, sont *trans*-récessives.

Figure 52. Démonstration expérimentale de l'action en *cis* des mutations O^c .

Des cellules d'*E. coli* contenant deux copies de l'opéron lac , sur le chromosome bactérien, porte une mutation O^c sur son opérateur et une autre mutation sur le gène $lacZ$ ($lacZ^-$) qui conduit à la production d'une β -galactosidase inactive. L'opéron lac sur le plasmide F est de type sauvage ($O^+Z^+Y^+$).

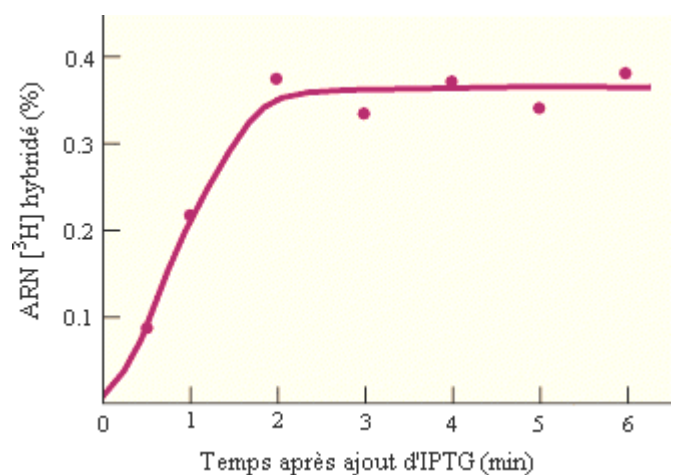
- (a) En absence d'inducteur (-IPTG), les cellules produisent continuellement une perméase fonctionnelle mais une β -galactosidase inactive. Ces résultats indiquent que les mutations O^c affectent seulement les gènes sur la même molécule d'ADN (opéron lac du chromosome). Si la mutation O^c agissait en *trans*, l'expression du $lacZ^+$ du plasmide aurait donné une β -galactosidase active.
- (b) En présence d'inducteur (+IPTG), les deux activités perméase et β -galactosidase sont observées ; la transcription du gène $lacZ^+$ du plasmide a donné une β -galactosidase fonctionnelle (8).



Pour renforcer leur modèle du contrôle de l'expression des gènes lac par un répresseur (modèle basé sur des études génétiques en utilisant des souches mutantes d'*E. coli*), Jacob et Monod réalisaient une expérience biochimique qui a confirmé le rôle de l'inducteur dans l'augmentation de la synthèse de l'ARNm à partir des gènes lac (**Figure 52**).

Figure 52. Démonstration biochimique de l'augmentation de la transcription des gènes de l'opéron lac en présence d'inducteur.

Des cellules d'*E. coli* poussant sur milieu riche en glucose sont prélevées juste avant, et après addition de l'IPTG à des intervalles de temps différents. De l'uridine radioactif [3H] est ajouté immédiatement aux cellules après chaque prélèvement. Après 20 secondes, les cellules sont lysées et leur ARN est isolé. Chaque échantillon d'ARN est incubé avec une membrane sur laquelle est fixé un ADN lac en excès. Après hybridation, la radioactivité retenue sur la membrane est mesurée. Une représentation graphique du pourcentage d'ARN [3H] hybridé en fonction du temps après addition d'IPTG montre que le taux de synthèse de l'ARNm augmente rapidement après addition de l'inducteur, atteignant un maximum vers la deuxième minute (9).



B. L'OPERON TRYPTOPHANE

a. La répression

Les gènes de structure de l'opéron *trp* chez *E. coli* codent pour une séquence guide (*trpL* pour leader) et cinq polypeptides *trpE*, D, C, B et A (Figure 53).

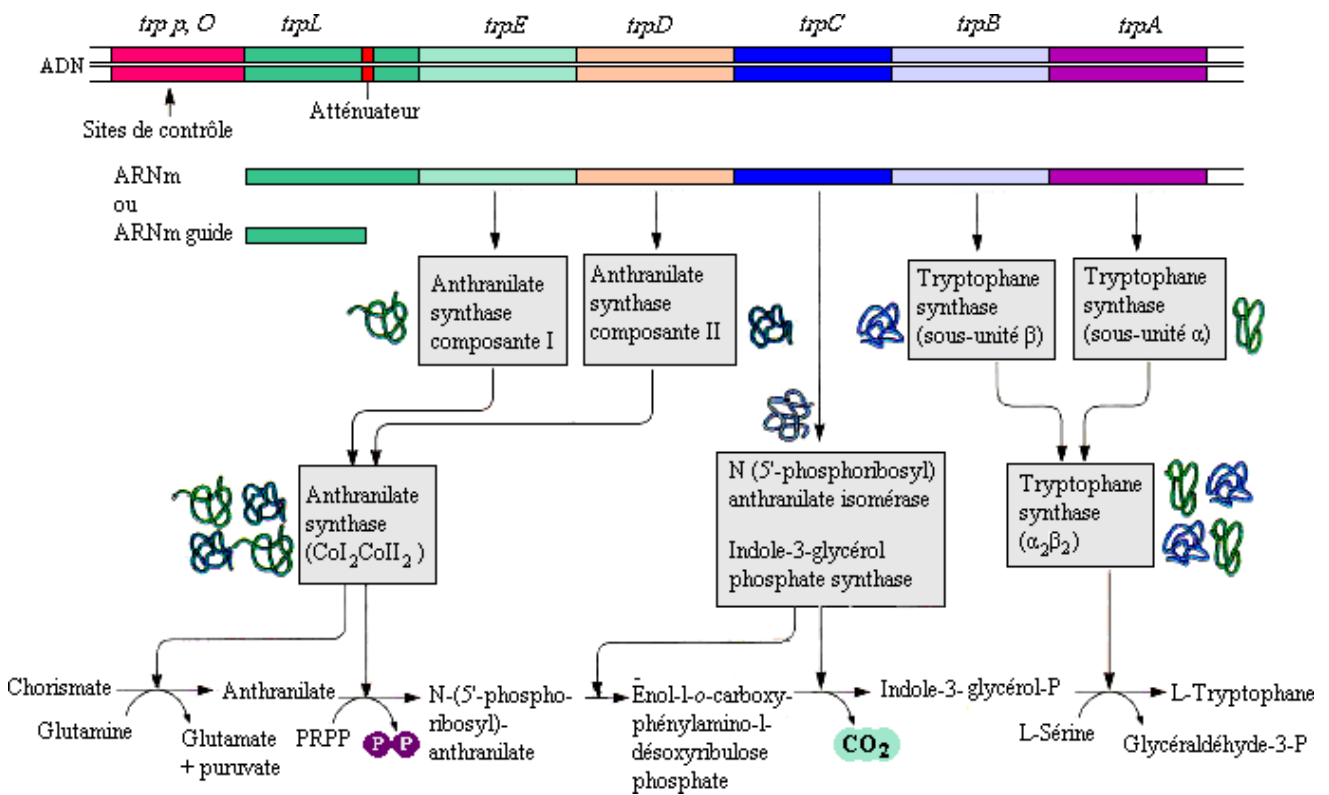


Figure 53. L'opéron *trp* chez *E. coli*.(6)

Ces cinq peptides se répartissent dans la constitution des trois enzymes qui participent à la synthèse du tryptophane à partir du chorismate. L'expression de l'opéron tryptophane est sous le contrôle du répresseur *Trp* codé par le gène *trpR* très éloigné de l'opéron *trp*. Quand il y a suffisamment de tryptophane, le répresseur *Trp* lie deux tryptophanes et s'associe à l'opérateur *trpO* inclus dans la séquence du promoteur *trp*. La présence du répresseur empêche la liaison de l'ARN polymérase sur le site promoteur et donc la transcription de l'opéron *trp* (le tryptophane agit comme un co-répresseur en activant le répresseur *Trp* le rendant capable de se fixer sur l'opérateur). Lorsque le tryptophane devient limitant, la répression est

levée ; en absence de tryptophane, le répresseur *Trp* n'a plus d'affinité pour le site opérateur. La régulation de l'expression des gènes de l'opéron *trp* par ce répresseur est donc une **autorégulation**, c'est-à-dire une régulation de l'expression d'un gène par le produit de ce gène.

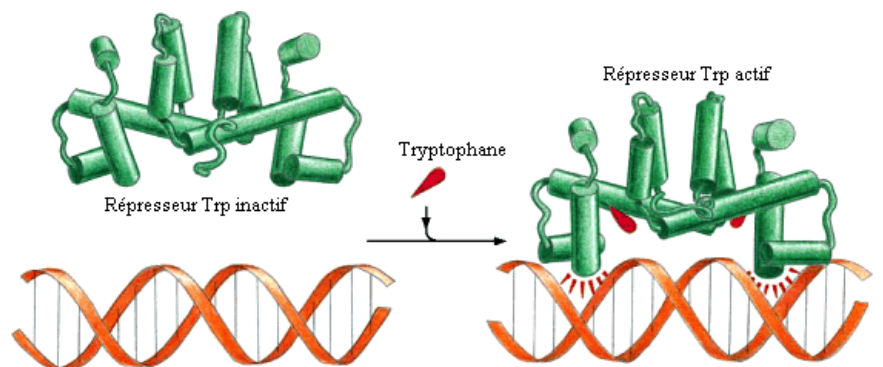


Figure 54. Activation du répresseur *Trp* après liaison de deux tryptophanes(6).

b. L'atténuation

En plus de la répression, l'opéron *trp* est soumis à une régulation par une **atténuation de la transcription**. L'atténuation, à la différence de la répression qui s'exerce à l'initiation de la transcription, régule la transcription après qu'elle a commencé.

Entre l'opérateur et le premier gène de structure de l'opéron, le gène *trpE* se trouve une **séquence guide** (ou leader) qui contrôle la continuation de la transcription après fixation de l'ARN polymérase sur le promoteur. La séquence guide contient un **atténuateur** et une séquence qui code pour un peptide guide. L'atténuateur est un site de terminaison contenant un petit segment riche en GC suivi d'une séquence de huit uridines (**Figure 55a**). Les régions numérotées de 1 à 4 ont des séquences nucléotidiques complémentaires et peuvent s'apparier entre elles pour former des structures en épingle à cheveux. En l'absence de ribosome, les régions 1 et 2 s'apparient et forment des épingles à cheveux, les régions 3 et 4 en forment une autre à proximité de la séquence poly-U. Cette deuxième structure suivie de la séquence poly-U terminera la transcription. Si la région 1 ne peut s'apparier avec la région 2, cette dernière peut s'apparier avec la région 3. En conséquence, la région 4 reste monocaténaire et ne peut servir de terminateur de la transcription. Il est important de constater que la séquence encodant le peptide guide contient deux codons adjacents déterminant le tryptophane. La cellule ne peut donc fabriquer le peptide complet qu'en présence d'une quantité suffisante de tryptophane⁽¹²⁾.

Le comportement du ribosome au cours de la traduction de l'ARNm régule l'activité de l'ARN polymérase pendant la transcription de la séquence guide. Ce processus est possible parce que la traduction et la transcription sont étroitement couplées. En l'absence de répresseur actif, l'ARN polymérase se fixe sur le promoteur et se déplace le long de la séquence guide en synthétisant l'ARNm. S'il n'y a pas de traduction de l'ARNm après le début de la copie de la séquence guide par l'ARN polymérase, les régions 3 et 4 forment une épingle à cheveux et la transcription s'arrête avant que la polymérase n'atteigne le gène *trpE*. En présence de tryptophane (**Figure 55b**), il y a suffisamment de tryptophanyl-ARNt pour la synthèse protéique. Par conséquent, le ribosome synthétisera le peptide guide et continuera à se déplacer le long de l'ARNm jusqu'à ce qu'il atteigne un codon d'arrêt UGA placé entre la région 1 et 2. Le ribosome s'arrête sur ce codon et masque suffisamment la région 2 pour l'empêcher de s'apparier correctement avec la région 3. Les régions 3 et 4 forment une épingle à cheveux et l'ARN polymérase s'arrête au niveau de l'atténuateur comme si aucune traduction ne s'était déroulée. Si le tryptophane fait défaut, le ribosome s'arrête au niveau des deux codons tryptophane adjacents à séquence du peptide guide et empêchera l'appariement des régions 1 et 2, car les codons tryptophane sont situés dans la région 1. Si cela se produit pendant que l'ARN polymérase est occupée à transcrire la séquence guide, les régions 1 et 3 s'associent avant que la région 4 ne soit synthétisée. Par conséquent, la région 4 restera monocaténaire et l'épingle à cheveux

terminatrice ne se forme pas. Donc, en l'absence de tryptophane, l'ARN polymérase poursuit son chemin et transcrit les gènes de l'opéron tryptophane.

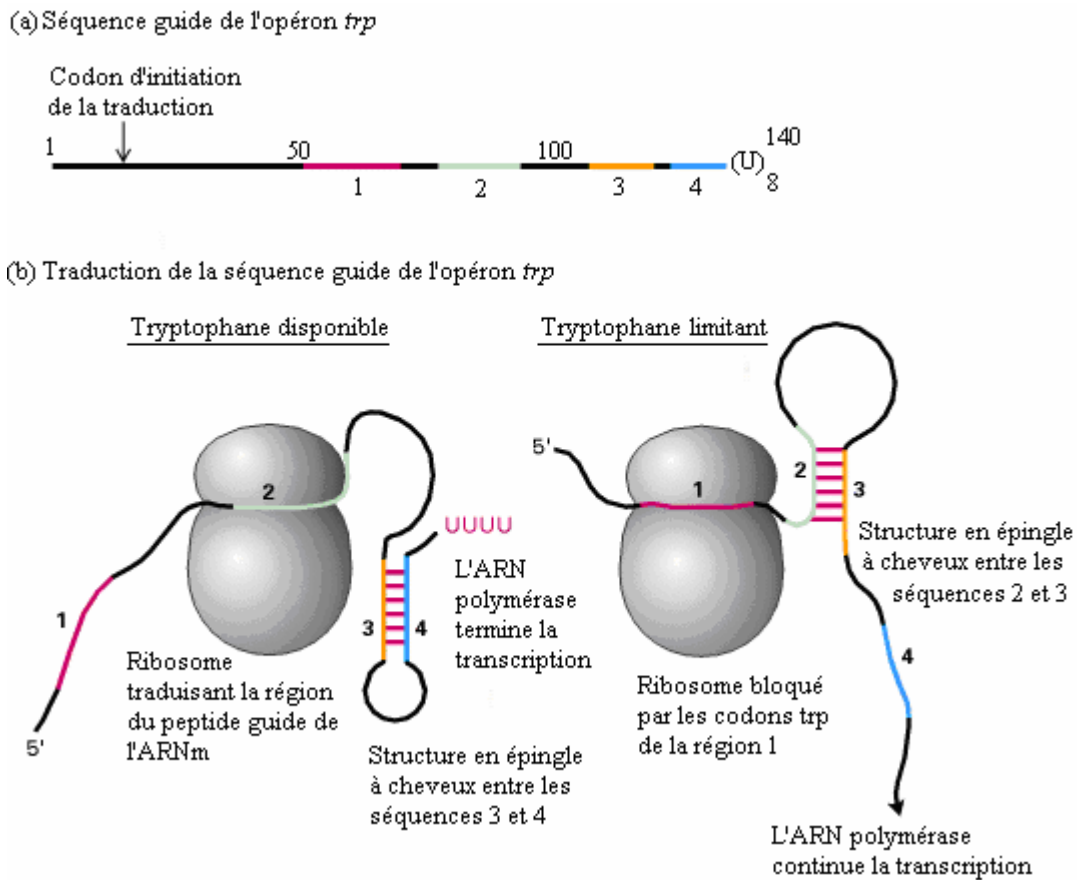


Figure 55. Mécanisme de l'atténuation de la transcription de l'opéron *trp*(6).

2. REGULATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES

L'expression des gènes peut être régulée au niveau de la traduction des ARNm en protéines par les ribosomes. Les cibles de ces régulations sont très variées : l'attachement des ribosomes à l'ARNm, le relargage des ribosomes, l'instabilité programmée d'ARNm ou de parties d'ARNm

2.1. Contrôle de la traduction

2.1.1. Régulation de l'initiation de la traduction. Régulation de la synthèse des protéines ribosomiques

Les ribosomes d'*E. coli* contiennent plus de cinquante protéines différentes et trois sortes d'ARNr. Les gènes des protéines ribosomiques sont groupés en treize opérons différents. Un contrôle s'exerce sur la transcription de ces opérons, dans lequel des sous unités ribosomiques pourraient être impliquées. Cependant, la synthèse des protéines ribosomiques fait aussi l'objet d'une autorégulation négative. Une protéine de chaque opéron peut se fixer à une séquence régulatrice sur l'ARNm et empêcher l'initiation de la traduction par les ribosomes. Le facteur décisif est la quantité d'ARNr disponible pour l'assemblage des ribosomes.

2.1.2. Atténuation de la traduction

La traduction déjà initiée peut faire l'objet d'une régulation. La terminaison normale de la traduction au niveau des codons stop nécessite l'intervention de facteurs qui aident au relargage de la chaîne polypeptidique. Le **facteur de relargage RF-2** intervient dans la terminaison de la traduction au niveau des codons UAA et UGA. La séquence codante de son propre gène contient un codon UGA en 26^{ème} position (RF-2 contient 315 résidus d'acides aminés). Si RF-2 est abondant dans la cellule, il contribue à catalyser le relargage du polypeptide naissant à cette position, produisant un polypeptide "**atténué**". Si RF-2 est peu abondant, le ribosome change de cadre de lecture en sautant un nucléotide et complète la synthèse de la protéine RF-2.

2.2. **Contrôle de l'expression d'un gène depuis un site situé en aval. Rétrorégulation**

Les mécanismes de régulation représentés jusqu'ici agissent initialement sur l'initiation des processus d'expression génique ou sur leur terminaison précoce. Il existe cependant des régulations post-transcriptionnelles qui s'exercent à des sites situés en aval (du côté 3') des gènes concernés. Un exemple de régulation de ce type se rencontre chez le bactériophage lambda, où elle contribue à renforcer le choix du développement lytique. Dans le cycle lytique, *xis* et *int* (qui codent respectivement pour l'excisionase et l'intégrase du bactériophage lambda) sont transcrits à partir de p_L (**Figure 56**). La synthèse d'intégrase est contre-productive, puisqu'elle risque de provoquer des intégrations inutiles du génome du phage. La destruction préférentielle de l'ARNm *int* par rétrorégulation assure une production excessive d'excisionase (Xis) par rapport à l'intégrase (Int). L'ARN polymérase qui transcrit *xis* et *int* à partir de p_L est modifiée par la fixation du facteur d'anti-terminaison N, et elle franchit le terminateur de *int* pour transcrire la séquence *sib*, 260 pb en amont de *int*. La séquence *sib* peut adopter une structure en épingle à cheveux caractéristique des sites d'attaque de la ribonucléase III (RNase III) d'*E. coli*. La RNase III et d'autres nucléases de l'hôte dégradent l'ARNm de 3' vers 5' et détruisent la partie *int* avant la partie *xis*, assurant ainsi la production de Xis en large excès par rapport à Int(11).

Lors de l'établissement de la lysogénie, par contre, Int est requise, mais pas Xis. Une protéine CII active l'initiation de la transcription à p_{int} (**Figure 56**). Comme p_{int} se trouve dans *xis*, le messenger produit ne code que pour Int, et ne comporte pas *sib* puisque la polymérase n'a pas été modifiée par N et qu'elle arrête la transcription au terminateur de *int*.

Dans le cas de l'induction d'une bactérie lysogène, l'excision du prophage requiert à la fois Xis et Int, et l'ARNm transcrit à partir de p_L est stable parce que l'intégration a séparé physiquement *sib* de *int* (**Figure 56**).

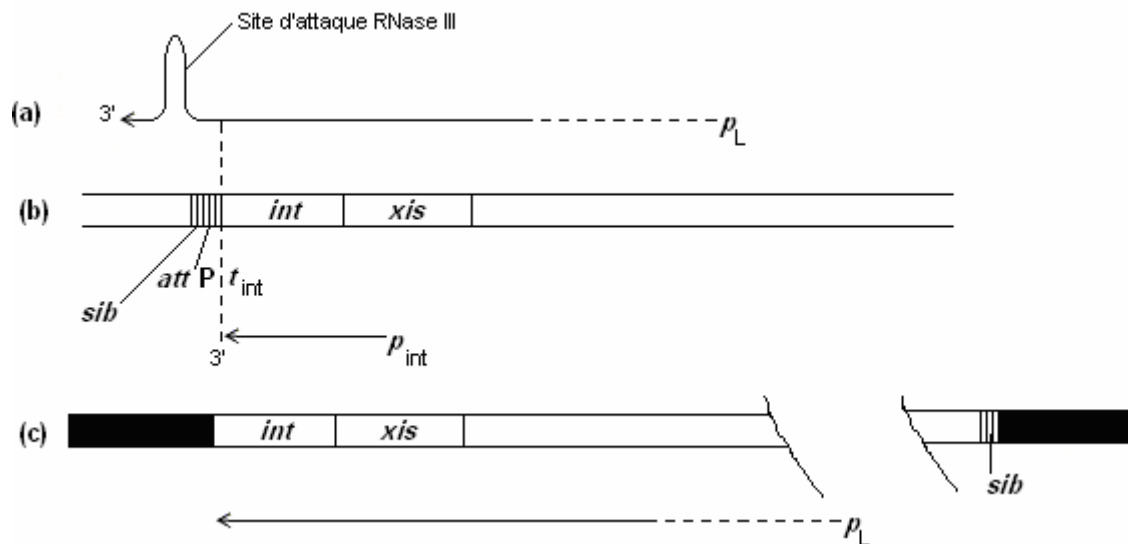


Figure 56. Rétrorégulation de *int*. **(a)** Développement lytique. *Xis* et *int* sont exprimés à partir de p_L par un complexe de transcription qui a fixé le facteur d'anti-terminaison N. le complexe franchit le terminateur situé en aval de *int* et transcrit *sib* qui est un site d'attaque de l'ARNm par la RNase III. **(b)** Développement lysogénique. *int* est transcrit à partir de p_{int} par une polymérase qui n'a pas fixé de facteur d'anti-terminaison et qui termine la transcription au terminateur de *int*, sans transcrit *sib*. **(c)** Induction d'un prophage. *int* et *xis* sont transcrits à partir de p_L , mais *sib* a été séparé physiquement de *int* par la recombinaison entre *att P* et le chromosome bactérien (en noir)(6).

2.3. Régulation par des ARN antisens

Certaines molécules régulatrices sont des ARN. Dans des systèmes biologiques très divers, la fonction d'un ARN peut être inhibée par son interaction avec un ARN complémentaire. Comme ce dernier est nécessairement transcrit dans le sens opposé de l'ARN qu'il inhibe, on l'appelle **ARN antisens**.

La réplication du plasmide Cole1 est contrôlée par un ARN antisens (**ARNI**). L'ARNI s'hybride avec le précurseur de l'ARN qui sert d'amorce à la réplication (ARNII), l'empêchant ainsi de s'hybrider avec l'ADN plasmidique. Le contrôle de la réplication de certains autres plasmides par des ARN antisens s'effectue au niveau de la traduction des ARNm des protéines de réplication(10)

Chez *E. coli*, la protéine réceptrice de l'AMPc, CRP, qui active l'expression de plusieurs opérons cataboliques (soumis à la répression catabolique) régule sa propre synthèse en activant l'initiation de la transcription d'un ARN antisens *tic*, complémentaire de l'extrémité 5' du messenger *crp* avec laquelle il s'hybride pour bloquer la poursuite de la transcription.

VII. Bactériophages

7.1. Historique

Il est bien difficile de ne pas considérer l'œuvre de Pasteur comme un lieu entre la notation historique de virus et la découverte ultérieure de leurs caractères particuliers. En effet si un certain nombre de maladies à virus des plantes étaient connues depuis fort longtemps, et certains de leurs caractères spécifiques précocement décrits, ce n'est qu'après les découvertes de Pasteur qu'Iwanowski fut capable, en 1892, d'apporter la preuve certaine qu'une maladie du tabac était due à un agent infectieux ultra filtrable. En réalité, ce n'était que la suite logique des observations antérieures de Mayer et lui donna en 1886 le nom de «mosaïque du tabac».

En 1998, Beyerinck conclut que la mosaïque du tabac était pas due à une toxine ou un micro-organisme classique, mais a une substance particulière soluble, capable de se multiplier dans des cellules vivantes. Une nouvelle étape fut franchie grâce à Edward Twort en 1915 et Flix d'Herelle en à 1917, qui rapportèrent indépendamment l'isolation d'entité filtrable capable de détruire les cultures bactériennes et de produire des petites zones claires sur le tapis bactérien. Twort contamina une colonie normale pour voir cette dernière devenir à son tour translucide et liquide et cela en touchant les colonies transparentes avec une spatule stérile puis une colonie normale. D'Herelle observa un phénomène analogue sur des cultures de Shigella provenant d'un malade de dysenterie. Il interpréta la disparition des bactéries comme le résultat de la multiplication de virus auquel il donna le nom de bactériophages(11).

7-2. Définition

Les bactériophages connus aussi sous le nom de phage, sont des parasites obligatoires intracellulaires, qui infectent les cellules bactériennes. Leur définition rejoint celle de tous les autres virus, elle est résumée en 1953, selon Woff qui donna une définition, de la particule virale ou virion qui est maintenant universellement adoptés, il régla pratiquement tous les problèmes :

Le virion ne procède qu'un seul type d'acide nucléique : soit de l'ARN., soit de l'ADN.

- 1) Le virion se produit à partir de son seul acide nucléique alors que les autres êtres se reproduisent à partir de la somme de leurs constituants.
- 2) Le virion est incapable de croître et de subir des divisions binaires.
- 3) Le virion n'a aucune information génétique concernant les enzymes du métabolisme intermédiaire (susceptibles de produire de l'énergie).
- 4) La multiplication des virions implique l'utilisation des structures de la cellule hôte, et spécialement de ses ribosomes.

7.3. Classification des bactériophages

Pendant très longtemps, les virus n'ont été identifiés que par les symptômes des maladies qui provoquaient. En 1939 Burnett proposa que les virus soient classés selon les anomalies morphologiques et cytologiques dont ils étaient responsables.

Le système proposé était évidemment critiquable, mais on ne savait encore que peu de choses sur les virions, alors que l'on possédait déjà beaucoup de données sur les manifestations cliniques qu'ils provoquaient. C'est Bawden qui suggéra ultérieurement en 1941 que toute classification soit fondée sur les propriétés des virions et non sur les manifestations de leur pouvoir pathogène. En 1962, Lwoff, Horne et Tournier ont proposé un système dans lequel le monde des virus était considéré dans son ensemble, et où ils s'étaient efforcés de ne retenir comme critères distinctifs que ceux qui

concernaient le virion et lui seul, car en 1953 les travaux de Lwoff ont permis de faire disparaître la division basée sur la spécificité de l'hôte.

Quatre critères essentiels sont retenus:

- La nature des matériels génétiques (ADN ou ARN) ;
- le type de symétrie suivant lequel le virus est construit (hélicoïdale, icosaédrale, combiné) ;
- le caractère nu ou enveloppé de la nucléo capside ;
- les données quantitatives concernant le virion a symétrie icosaédrale, longueur et épaisseur des nucléo capside pour les virus a symétrie hélicoïdale.

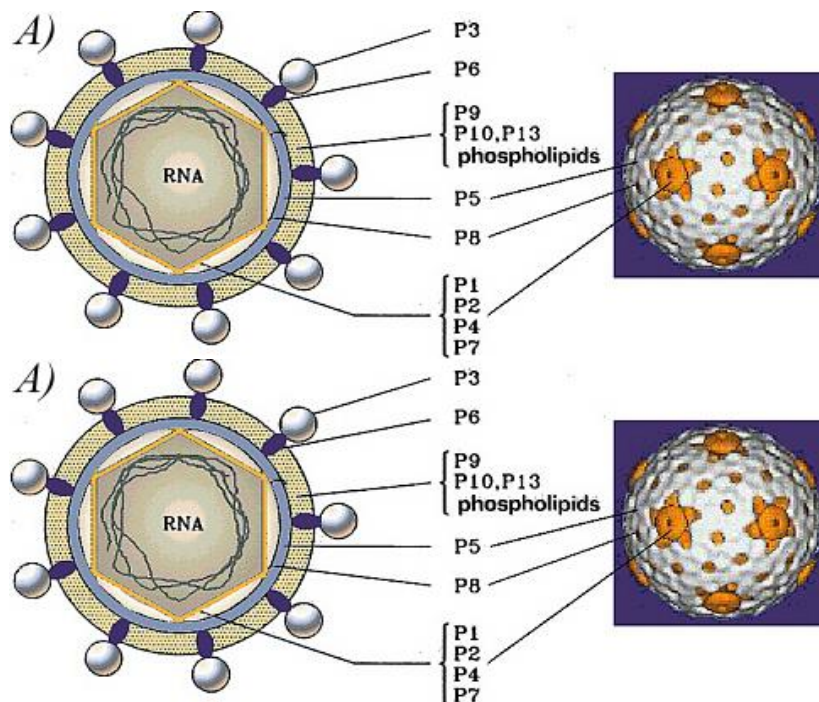
7.4. Structures du bactériophage

Depuis les surprenantes images de bactériophages "en forme de têtards" observées au microscope électronique par les premiers expérimentateurs (Ruska, en 1941 Lurai Delburck et Anderson en 1941), le développement considérable des recherches sur la structure des bactériophages a conduit à la description de nombreuses variétés morphologiques et à l'élaboration d'une véritable anatomie ultrastructurale de ces virus (figure 46).

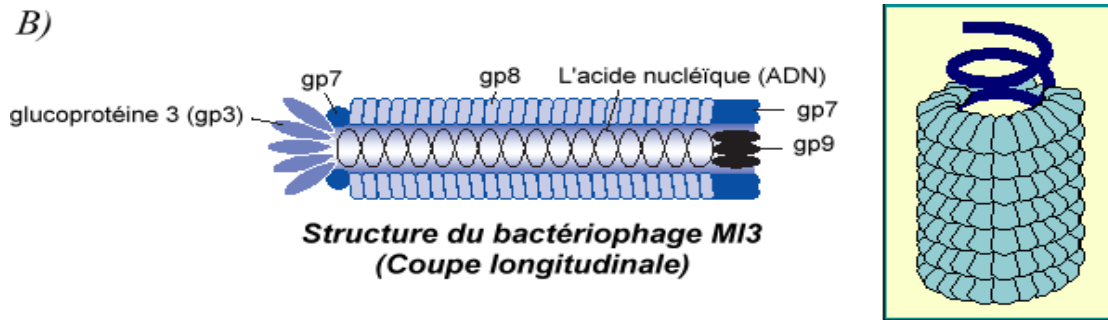
Actuellement en peut réunir les bactériophages en trois grands groupes morphologiques :

- cubique.
- Filamenteux.
- Mixte.

Le phage lambda (λ) par exemple et un virus à structure mixte. Le diamètre de la tête et de 100 mm. Les virions sont constitués par 12 protéines structurales localisées dans l'enveloppe (P9, P10 et P13), Peplomers (P3 et P6), nucléocapside (P8 et P5), complexe polymérase (P1, P2, P4 et 97) et une protéine non structurale P12. Les protéines constituent environ 70% du poids de la particule(12).



Structure du Bactériophage Ø6



Structure du Bactériophage lambda

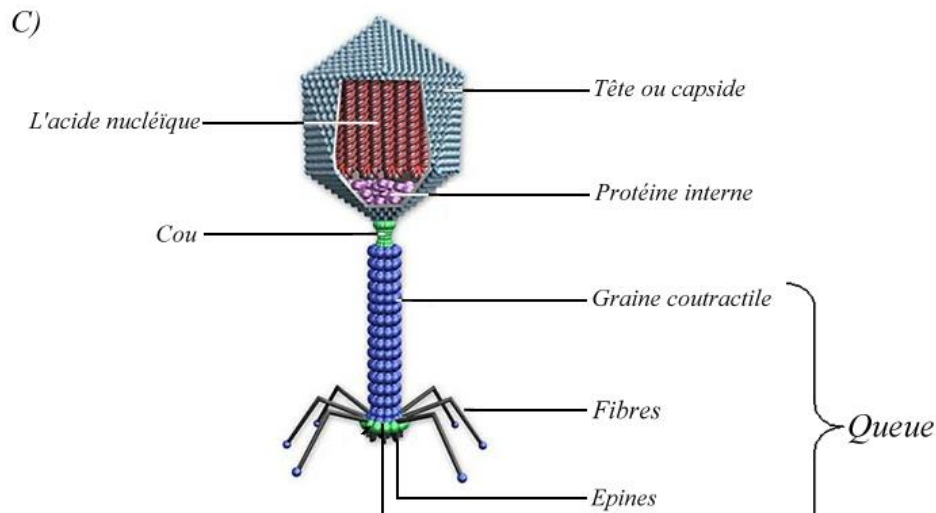


Figure 46: Différentes structures de Bactériophages (A) cubique (B) Filamenteux (C) Mixte(12).

7.5. Cycle de multiplication du bactériophage

L'infection de la cellule hôte par un bactériophage présente deux aspects (fig. 47):

Le bactériophage se reproduit aux dépens de la bactérie, et la détruit: c'est l'infection lytique.

Les bactériophages qui lysent ainsi toutes les bactéries qu'ils infectent sont appelés des bactériophages virulents.

L'acide nucléique injecté par le phage, au lieu de se répliquer d'une façon autonome, il s'attache au chromosome bactérien. Il se comporte comme un gène bactérien et se réplique en parfaite harmonie avec le génome. Pour bien marquer ces caractères on lui donne le nom de prophage. Ces bactéries qui survivent à l'infection sont dites Lysogènes parce qu'elles sont capables dans certaines circonstances, de se lyser en libérant des virions. Ces genres de bactériophages sont appelés des bactériophages tempérés.

7.5.1. Le cycle de vie de lambda (λ)

Quels que soient les types de virus, leur cycle de multiplication comprend plusieurs étapes communes. Les étapes du cycle de vie du phage λ sont les suivants:

7.5.1.1 L'adsorption du phage λ

L'identification de la bactérie hôte par le phage s'effectue par l'adsorption de ce dernier à une structure spécifique sur la surface de la cellule. λ se fixe sur une protéine de la membrane externe appelée: Lam B via une protéine qui réside dans l'extrémité de la queue phagique, La protéine J.

7.5.1.2 L'injection de l'ADN λ

D'abord, λ se fixe sur la protéine Lam B, cette fixation est réversible. Puis le phage subit un changement de sorte que cette fixation soit irréversible. La nature de ce changement est inconnue mais nécessite l'attachement de la tête phagique à la queue. Quand l'ADN λ sort de la tête pour être injecté, c'est l'extrémité droite qui sort en première. En plus de Lam B, λ utilise aussi une protéine membranaire interne PstM pour atteindre l'entrée du cytoplasme.

Comment l'ADN traverse-t-il physiquement le peptidoglycane et le périplasma et arrive à la protéine PstM? Cela est inconnu.

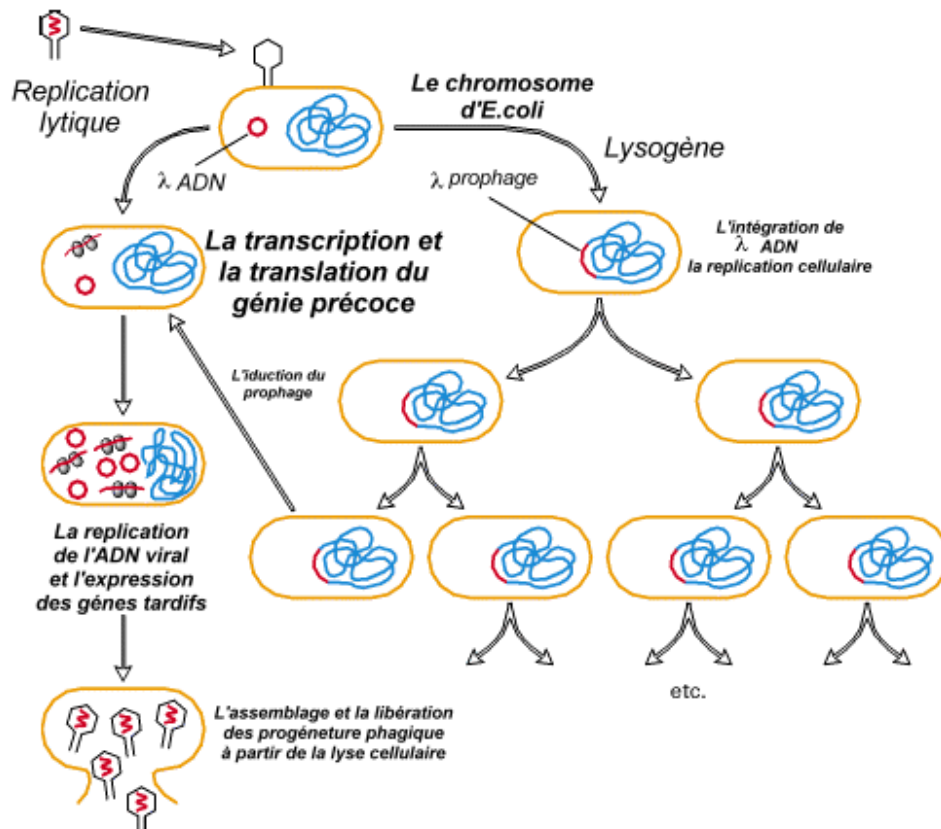


Figure 47: Cycle de vie d'un bactériophage tempéré (Ex: phage lambda (λ)) (6).

7.5.1.3 Protection du génome λ dans le cytoplasme

Dans le cytoplasme bactérien, la molécule d'ADN est sujette à la dégradation par les exonucléases, qui ont besoin d'une extrémité libre d'ADN pour le digérer. Or, l'ADN récemment injecté est circularisé pour qu'il ne soit pas dégradé.

Le site *cos* situé de part et d'autre des extrémités du génome λ est une séquence de 12 pb coupée asymétriquement. Quand l'ADN est assemblé, le site *cos* ainsi coupé aura une séquence de 12 pb nécessaire à la circularisation. Une fois l'ADN λ est injecté dans le cytoplasme, les sites *cos* coupés sur les deux extrémités du génome linéaire s'hybrident. L'enzyme DNA ligase de l'hôte colle les bouts des sites *cos* de manière covalente rendant la molécule circulaire. L'enzyme bactérien DNA gyrase, surenroule la molécule λ qui sera ainsi protégée des exonucléases.

7.5.1.4. Que se passe-t-il au Génome λ Après sa stabilisation ?

Le génome λ Contient 6 promoteurs majeurs nommés comme suit :

P_L : promoteur vers la gauche.

P_R : promoteur vers la droite.

P_{RM} : promoteur pour le maintien du répresseur.

P_{RE} : promoteur pour l'établissement du répresseur.

P_I : promoteur d'intégration.

$P_{R'}$: promoteur par la droite secondaire. (fig 48).

Après la circularisation et le surenroulement du génome, la transcription commence à partir de P_L et P_R . Les gènes précoces sont d'abord transcrits et les produits de gènes sont des protéines nécessaires pour favoriser le développement ultérieur du phage⁽⁷⁾.

L'ARN polymérase d'E.coli interagit avec P_L pour donner lieu à une transcription d'ARN m court qu'est traduit en une protéine N. Celle-ci interagit, d'une part avec P_R pour donner lieu à la protéine Cro.

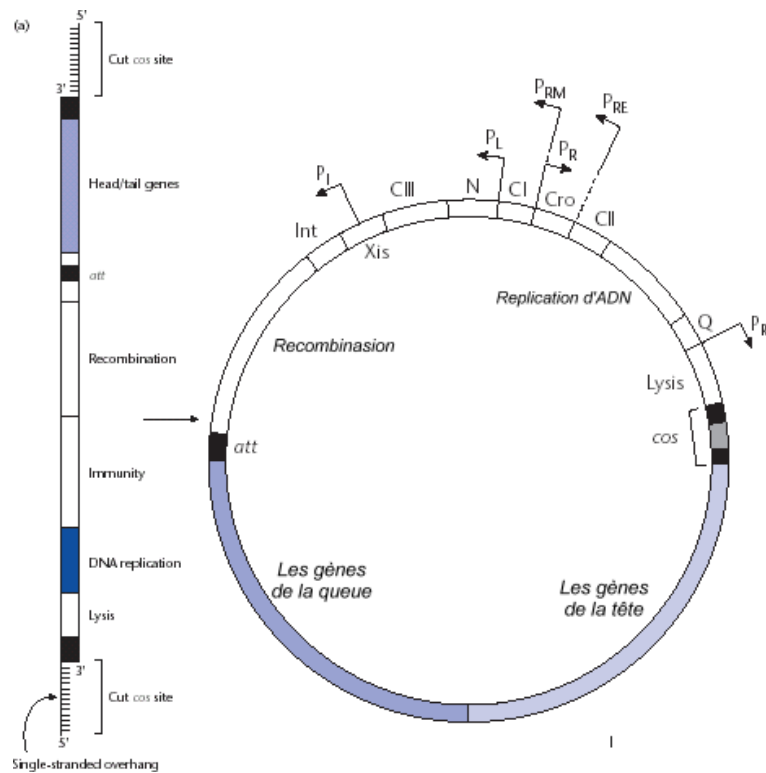


Figure 48: Organisation génétique du génome λ (7).

La protéine N est capable d'étendre la transcription jusqu'à ce que l'ARN polymérase rencontre une séquence dans l'ADN qui lui ordonne de s'arrêter. Pour cette raison, elle est appelée : "protéine anti-terminaison". Cette dernière permet à l'ADN polymérase de se transcrire à travers les signaux de terminaisons en T_1 et T_2 conduisant à la synthèse de plus longs ARN m.

Les plus longs transcrits à partir de P_R codent pour les protéines O, P et C_{II} , est une petite quantité d'une autre protéine anti-terminaison, la protéine Q. À partir de P_L et C_{II} , les protéines de recombinaison Gam et Red, en plus d'une petite quantité de Xit et Int sont synthétisées. N bloque,

par sa fixation, l'ARN polymérase après une séquence de paires de bases spécifiques, localisée en amont du site terminaison en deux transcriptions, cette séquence est appelé nut pour (N utilization). D'autres protéines d'E.coli contribuent au blocage de la terminaison. Ces protéines ont été nommées Nus pour (N utilization substances) (fig:49).

À ce point, les facteurs nécessaires pour la décision lytique, lysogénique, sont déjà synthétisés. Pour la voie lysogénique, on a besoin de C_{II} et C_{III} par contre pour la voie lytique de Cro et O. O et P sont utilisés pour la réplication d'ADN phagique.

7.5.1.5 λ et la décision lytique-lysogénique

La décision dépend sur la quantité de deux protéines phagiques nommée C_I (C-un) et Cro. Ces dernières synthétisées respectivement à partir de P_{RE} ou P_{RM} et à partir de P_R, et aussi sur leur fixation sur des régions de contrôle de leur promoteur. Elles se fixent sur le même opérateur.

λ contient deux opérateurs qui fixent Cro et C_I, le premier nommé O_R qui chevauche avec les promoteurs P_{RM} et P_R et joue un rôle majeur dans la décision lytique - lysogénique, l'autre nommée O_L, situé derrière le promoteur P_L, et ne prend pas part à cette décision. (fig:50).

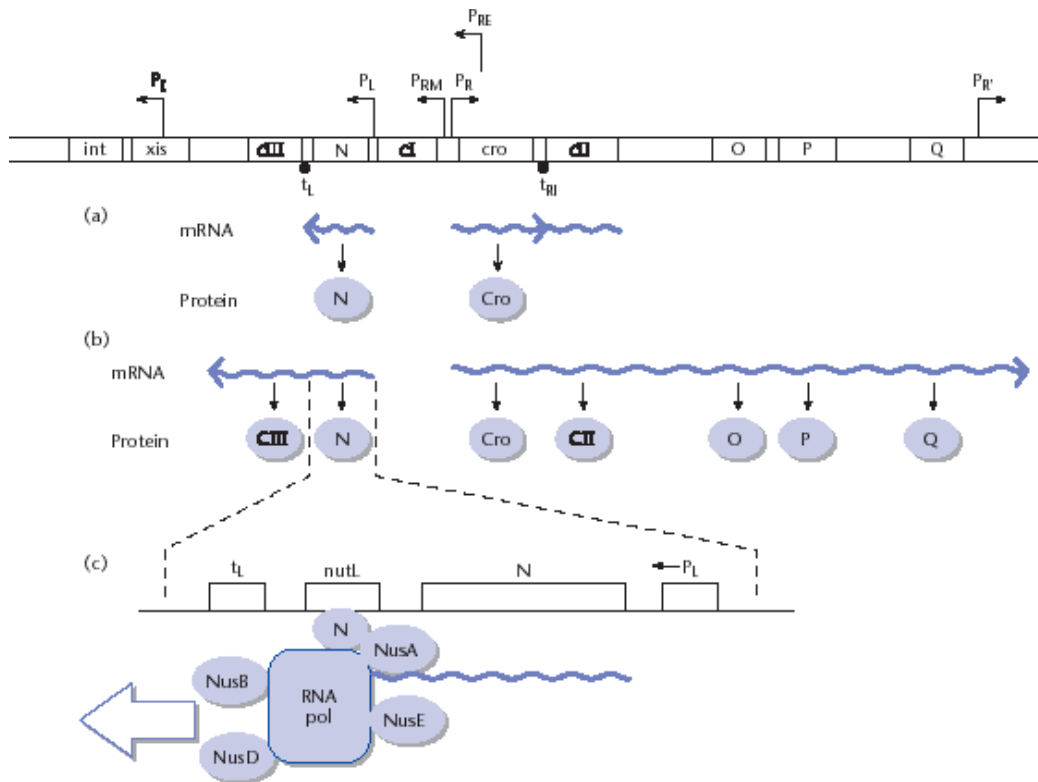


Figure 49: Evénements transcriptionnels ayant lieu après l'infection par le phage λ (8).

- a) Transcription à partir de P_L et P_R.
- b) La synthèse des protéines régulatrice.
- c) Décision: "lytique - lysogénique" du phage.

Le répresseur C_1 se lie à O_{R1} avec une affinité dix fois supérieure qu'avec O_{R2} ou O_{R3} .

Quand C_1 se fixe à O_R , il stimule le promoteur P_{RM} et la production du Cro. Ceci conduit à une voie lysogénique.

Cro se lie également à O_{R1} , O_{R2} , O_{R3} mais dans un ordre inverse du répresseur C_1 . Cro se lie en premier sur O_{R3} puis à O_{R2} et finalement avec une concentration élevée à O_{R1} . Quand Cro est fixée à O_R il inhibe le promoteur P_{RM} et la production de C_1 , ce qui conduit à un cycle lytique.

La protéine majeure impliquée dans ce passage est une autre protéine phagique nommée C_{II} . Le gène C_{II} est localisé juste à droite du gène Cro. Quand λ infecte la cellule, la transcription commence systématiquement à partir de P_L et P_R en utilisant les protéines de l'hôte. La transcription à partir de P_R conduit à la production de deux protéines Cro et C_{II} . Si C_{II} est active, elle conduira à une production de C_1 et l'Intégrase nécessaires à la lysogénie. Si elle est inactive la protéine Cro réprimera P_{RM} prévenant l'expression de C_1 et conduit à une croissance lytique (fig:51).

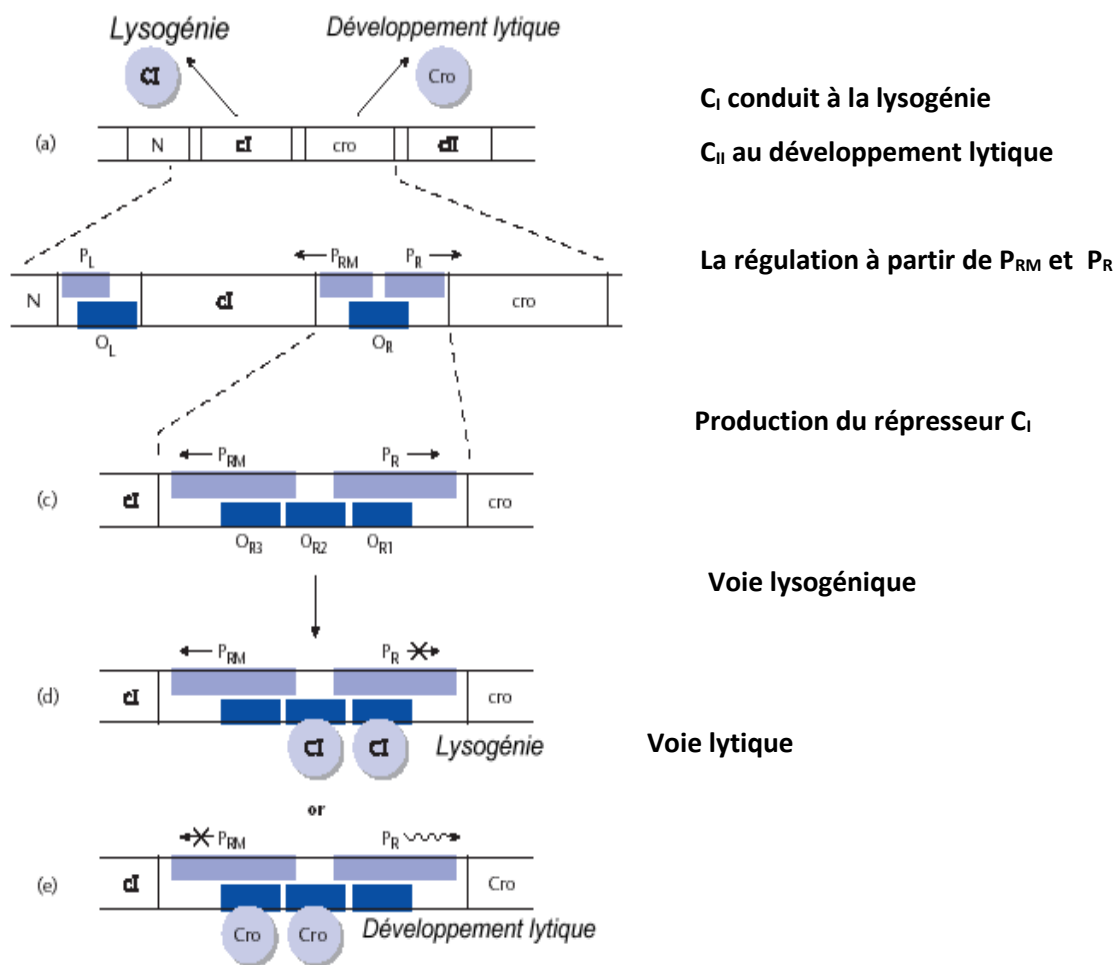
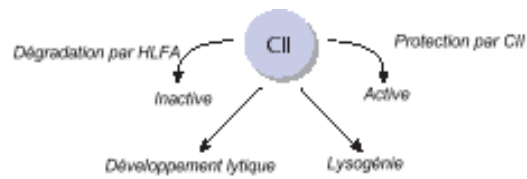


Figure 50 : transcriptions qui conduisent à prendre une décision lytique ou lysogénique . O_R est composé de trois séquences de 17 paires de bases O_{R1} , O_{R2} , O_{R3} (9).

(a)



(b)

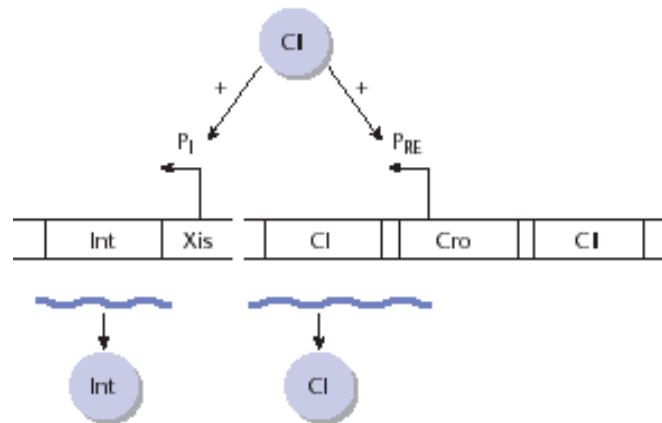


Figure 51: La protéine C_{II} facteur majeur de la décision cycle lytique ou lysogénique (7).

a) La décision lytique - lysogénique du phage λ .

La protéine C_{II} est instable. Elle est dégradée par la protéase bactérienne, HflA. Lorsque les cellules croissent dans un milieu riche en nutriments, la quantité d'HflA est élevée dans les cellules, menant à la dégradation de C_{II} et donc à une multiplication à travers un cycle lytique. C_{II} est aussi stabilisée par une protéine phagique C_{III}. Elle est produite à partir de P_L quand le phage infecte la cellule.

C'est ainsi que C_{II} est utilisée pour contrôler le devenir de la cellule, par conséquent l'impact de la décision lytique ou lysogénique sur cette dernière.

7.5.1.6 La voie lysogénique de λ

Si C₂ prédomine C₁ sera produit initialement à partir du promoteur P_{RE} et éventuellement par le promoteur P_{RM}. C₁ active P_{RM} assurant ainsi la continuité de sa synthèse, et active aussi le promoteur P₁, ce qui conduit à la production de l'Intégrase(7).

La recombinaison d'ADN λ à lieu à un site spécifique sur le chromosome phagique nommée attP et sur le chromosome bactérien nommée attB, situé entre les deux gène β -gal (β -galctosidase) et Bio (Biotine, vitH), elle nécessite l'Intégrase et IHF (facteur d'intégration de l'hôte) codée par l'hôte.

Une fois dans le chromosome, L'ADN phagique est fixé par les sites hybrides att nommée attL et attR. L'excision du prophage à partir du chromosome bactérien exige: Int, IHF, en plus d'une troisième protéine Cis (fig:52).

Quand l'ADN λ est recombiné dans le chromosome, il est répliqué et transmis à travers les générations de manière stable aux cellules filles comme une partie de leurs chromosomes. Il se trouve dans un état quiescent à l'exception de la production continue de C₁ à partir de P_{RM}. L'expression des gènes retardés codés pour la fonction du cycle lytique et bloquée par l'action du répresseur C₁. La fixation de ce dernier sur la séquence d'opérateur O_R et O_L bloque la transcription à

partir de P_L et de P_R . Puisque P_R est bloqué, la protéine λ Q n'est pas synthétisée et la transcription des gènes retardés n'aura pas lieu.

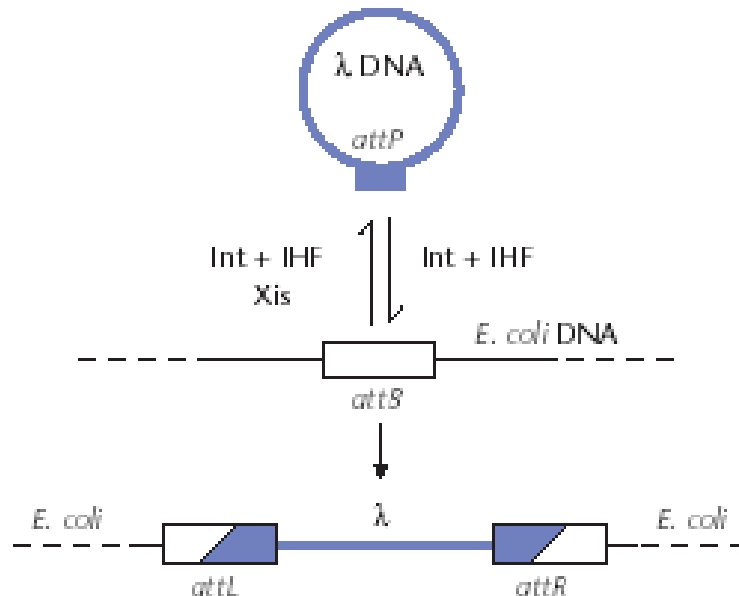


Figure 52: Les sites de recombinaison entre le phage λ et E.coli(7)

7.5.1.7 La voie lytique de λ :

Si la protéine Q s'accumule et atteint un certain seuil l'ARN polymérase continuera sa transcription à partir du troisième promoteur localisé devant le gène Q. Ceci étend la transcription aux gènes tardifs localisés en aval du gène Q. Ces gènes codent pour les protéines nécessaires à l'achèvement de l'infection lytique y compris : les protéines de la tête, la queue, et celle de la lyse (fig:53).

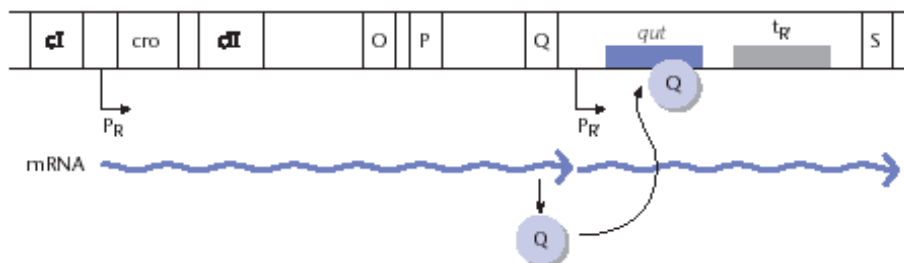


Figure 53: Initiation du cycle lytique du phage λ Par la protéine Q(6).

7.5.1.8 La réplication d'ADN durant la voie lytique :

Après que l'ADN λ infectant a été converti en une molécule cellulaire double brins, il se réplique à partir d'une origine spécifique utilisant les deux protéines phagique O et P, et les protéines bactériennes. La réplication progresse d'une manière bidirectionnelle comme pour les chromosomes d'E.coli, elle produit les molécules qui ressemblent à la lettre grecque thêta (θ), nommé la réplication thêta (fig. 54).

Le cycle lytique du phage change en un deuxième mode de réplication : la réplication en cercle rouleront d'ADN. Cette dernière commence quand une endonclase phagique, coupe un brin de la molécule d'ADN double brin circulaire, le bras clivé et nommé brin positive, son extrémité '5' se détache du brin négatif intact. L'ADN polymérase incorpore les désoxyribonucleotides à l'extrémité 3'-OH du brin positif coupé en utilisant le brin négatif comme matrice. Cela produit de nouveaux brins positifs à travers un processus continu d'élongation. Ces brins sont utilisés à leur tour comme

matrice pour synthétiser de nouveaux brins négatifs(11)

La réplication en cercle roulant produit les molécules d'ADN longues contenant de multiples génome phagique appelés : Concatémères.

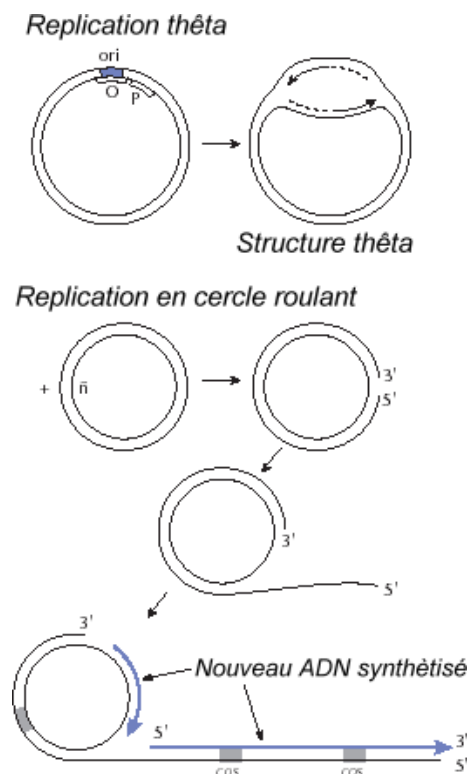


Figure 54: La réplication de l'ADN λ (7).

Bibliographie

1. Carter, J. B. and Saunders, V. A. 2007. **Virology principles and applications**. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England.
2. Chen J. and Novick, R. P. 2009. **Phage-Mediated Intergeneric Transfer of Toxin Genes**. *Science*. 323 : 139-141.
3. Dale J. W. and Park S. F. 2010. **Molecular Genetics of Bacteria**. 5th edition. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication.
4. Garrett, R. H. and Grisham, C. M. 2010. **Biochemistry**. Fourth edition, Brooks/Cole, Cengage Learning. ISBN-13: 978-0-495-10935-8
5. Griffiths A. J.F., Wessler S. R., Lewontin R. C., Gelbart W. M., Suzuki D. T., Miller J. H. 2004. **An Introduction to Genetic Analysis**, Eighth Edition.
6. Lang, A. S., Zhaxybayeva, O. and Beatty, J. T. 2012. **Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange**. *Nature Reviews Microbiology* , 10: 472-482. doi:10.1038/nrmicro2802
7. Lang, A.S., Beatty, J. T. *Microbiol.* 2007. **Importance of wide spread gene transfer agent genes in alphaproteobacteria**; 15(2):54-62.
8. Madigan, M.T. , Martinko, J. M., Stahl, D.A. and Clark D. P. 2012. **Brock-Biology of Microorganisms** Thirteenth Edition. ISBN-13: 978-0-321-64963-8.
9. Prescott L. M. 2002. **Microbiology**. 5th Edition . The McGraw–Hill Companies, ISBN: 0-07-282905-2
10. Primrose, S.B. and Twyman R.M. 2006. **Principles of Gene Manipulation and Genomics**. Seventh edition. Blackwell Publishing.
11. Sakaguchi, K. and Okanishi, M. 1980. **Molecular Breeding and Genetics of Applied Microorganisms**. Kodansha Ltd. ISBN 0-12-615050-8.
12. Tortora, G. J., Funke, B. R. and Case, C.L. 2010. **Microbiology: an introduction / - 10th ed.** Publishing as Pearson Benjamin Cummings.