

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La recherche Scientifique
Université Abbès Laghrou – Khenchela
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département De Biologie Moléculaire et cellulaire



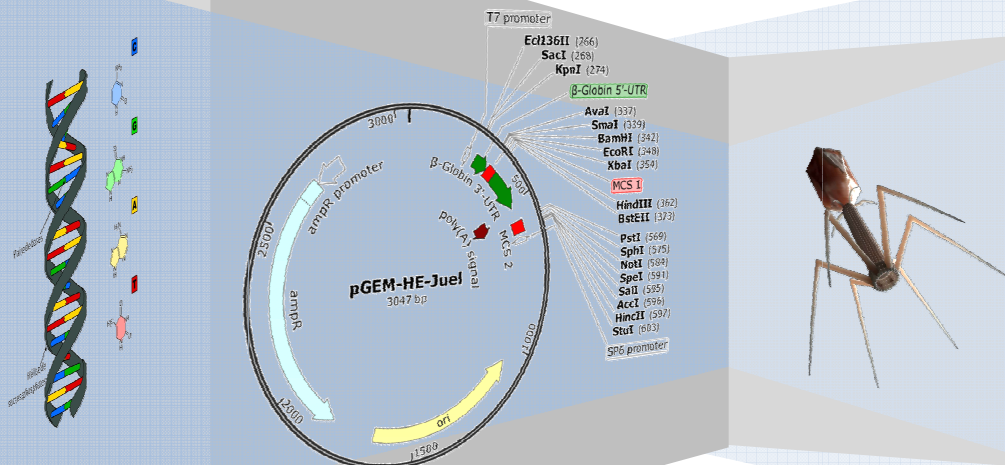
POLYCOPIÉ DE COURS

GÉNÉTIQUE MICROBIENNE

Elaboré par :

Dr. KHEDDOUMA A.

Pour les étudiants de troisième année licence
microbiologie



Avant-propos

La nature d'une cellule et toutes ses activités, proviennent d'instructions présentes dans la cellule sous la forme d'une information génétique. Chez les bactéries comme chez la plupart des êtres vivants, cette information est inscrite dans une molécule qui est l'acide désoxyribonucléique (ADN) qui forme le chromosome de la cellule. L'ADN et l'acide ribonucléique ARN sont des macromolécules classées dans la catégorie des acides nucléiques, ces deux molécules jouent un grand rôle en génétique microbienne.

Après la découverte de la structure en double hélice de l'ADN en 1953 par James Watson (1928-), Francis Crick (1916-2004), Maurice Wilkins (1916-2004) et Rosalind Franklin (1920-1958), la génétique microbienne a connu d'importants développements pour devenir un outil incontournable de la biologie moderne.

La génétique microbienne est une sous-discipline de la génétique qui traite les mécanismes et les processus génétiques des micro-organismes, elle a pour objet l'étude du génome des micro-organismes à savoir les gènes, leurs variations génotypiques et de leurs expressions phénotypiques.

Ce polycopié est un support de cours de la matière génétique microbienne ; unité d'enseignement méthodologie (UEM1) destiné aux étudiants de troisième année LMD (Licence microbiologie) avec un volume horaire semestriel de 12 à 14 semaines.

Le polycopié englobe sept grands chapitres concernent les différents mécanismes génétiques chez les microorganismes permettant aux étudiants de comprendre la structure et l'organisation du génome (ADN et plasmide) avec toute sa complexité de conjugaison, recombinaison et régulation transcriptionnelle et traductionnelle. Ainsi que les enzymes de restriction et la génétique des bactériophages.

Semestre : 05

Unité d'enseignement Méthodologie 1 (UEM)

Matière 1 : Génétique microbienne

Crédits : 5

Coefficient : 3

Objectifs de l'enseignement

Connaître les concepts de base de la génétique microbienne

Connaissances préalables recommandées :

Connaissances acquises en Microbiologie - Unité fondamentale - (2^{ème} année)- au semestre 4.

Contenu de la matière

I. Structure et organisation du matériel génétique

1.1. Structure des acides nucléiques

1.2. Acides nucléiques

1.3. Organisation du Matériel génétique bactérien

1.3.1. Le chromosome bactérien : Structure, Organisation et Réplication

1.3.2. Les plasmides

1.5. Extraction et purification et élimination de l'ADN plasmidique

1.4. Matériel génétique viral

II. Les Mutations et les mécanismes de réparation de l'ADN

2.1. Mutations

2.2. Définition

2.3. Caractères des mutations

2.4. Mécanismes de la mutation

2.4.1. Substitutions

2.4.2. Délétions et Insertions

2.4.3. Transposition

2.5. Types de Mutations

2.5.1. Mutations naturelles

2.5.2. Mutation Induite

2.6. Mécanismes de réparation des mutations

2.6.1. Réversion directe (retour à l'état antérieur)

2.6.1.1. Réparation des photodimères pyrimidiques par photo réactivation

2.6.1.2. Alkyltransférases

2.6.2. Systèmes dépendant d'homologies pour la réparation

2.6.2.1. Voies de réparation par Excision

2.6.2.2. MMR mismatch repair ou réparation des mésappariements (post réplcatif)

2.6.3. Réparation des coupures double brins (CDB)

2.6.3.1. NHEJ

2.6.3.2. Réparation par recombinaison

2.2.4. Réparation SOS (Save Our Selves) ou by pass

III. Recombinaisons génétiques et éléments génétiques transposables

Introduction

3.1. Recombinaison générale ou homologue

3.2. Transposition

3.3. Recombinaison spécifique de site (RSS)

3.3.1. Rôles biologiques de la Recombinaison spécifique de site

3.3.2. Événements impliquant une RSS

3.3.3. Les recombinaisons

3.3.4. Recombinaison spécifique de site

3.3.5. La recombinaison illégitime

IV. Transferts génétiques chez les bactéries

Introduction

4.1. Transformation

4.2. La conjugaison

4.2.1. Caractères de la conjugaison

4.2.2. Conjugaison F⁺ x F⁻

4.2.3. Conjugaison Hfr x F⁻

4.2.4. Conjugaison F' x F⁻

4.3. Transduction

4.3.1. Lyse et lysogénie

4.3.2. Recombinaison des phages

4.3.3. Phénomènes de Transduction

4.4. Cartographie

4.5. Nouveaux transferts génétiques horizontaux chez les bactéries

V. Enzymes de restriction

Introduction

5.1. Les systèmes de restriction/modification

5.2. Nomenclature

5.3. Séquences cibles et modes de clivage.

5.4. Rôle des systèmes de restriction/modification

5.5. Applications des enzymes de restriction

VI. Régulation de l'expression des gènes

6.1. Régulation transcriptionnelle

6.1.1. Notion d'opéron et Régulon

6.1.2. Contrôle négatif de la transcription "Répression et induction"

- Régulation de l'expression de l'opéron *lacZYA*

- Régulation de l'expression de l'opéron *argCBH*

6.1.3. Contrôle positif de la transcription

- Régulation de l'expression de l'opéron *malEFG*

6.1.4. Régulation positive et négative de l'opéron *araBAD*

6.1.5. Régulation de la transcription chez *Saccharomyces*

6.2. Régulation traductionnelle

6.2.1. Contrôle de la transcription des gènes structuraux de l'opéron Tryptophane (*trp*) par Atténuation chez *Escherichia Coli*.

VII. Bactériophages

Historique

7.2. Définition

7.3. Classification des bactériophages

7.4. Structures du bactériophage

7.5. Cycle de multiplication du bactériophage

7.5.1. Le cycle de vie de lambda λ et M13

7.5.2. Recombinaison génétique chez les virus

7.5.3. Mécanisme de l'expression génétique en cascade chez les virus et maintien à l'état prophage.

Travaux Dirigés (TD)

Séries d'exercices en relation avec le contenu du cours

Mode d'évaluation :

Contrôle continu et Examen semestriel

CHAPITRE I. STRUCTURE ET ORGANISATION DU MATERIEL GENETIQUE

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | <u>LES ACIDES NUCLEIQUES</u> | 1 |
| 1.1 | <u>STRUCTURE DES ACIDES NUCLEIQUES</u> | 1 |
| 1.1.1 | <u>LES BASES AZOTEES</u> | 1 |
| 1.1.2 | <u>LES SUCRES</u> | 3 |
| 1.1.3 | <u>L'ACIDE PHOSPHORIQUE</u> | 3 |
| 2 | <u>ORGANISATION DU MATERIEL GENETIQUE BACTERIEN</u> | 4 |
| 2.1 | <u>LE CHROMOSOME BACTERIEN</u> | 4 |
| 2.1.1 | <u>MECANISME DE LA REPLICATION DU CHROMOSOME BACTERIEN</u> | 4 |
| 2.1.2 | <u>CARACTERISTIQUES DE LA REPLICATION DU CHROMOSOME BACTERIEN</u> | 6 |
| 2.2 | <u>LES PLASMIDES</u> | 7 |
| 2.2.1 | <u>TYPES DE PLASMIDES</u> | 7 |
| 2.2.2 | <u>LA REPLICATION DES PLASMIDES</u> | 9 |
| 3 | <u>EXTRACTION ET PURIFICATION ET ELIMINATION DE L'ADN PLASMIDIQUE</u> | 10 |

CHAPITRE II. MUTATIONS ET MECANISMES DE REPARATION

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | <u>TYPES DE MUTATIONS</u> | 11 |
| 1.1 | <u>LES MUTATIONS MORPHOLOGIQUES</u> | 11 |
| 1.2 | <u>LES MUTATIONS LETALES</u> | 11 |
| 1.3 | <u>LES MUTATIONS CONDITIONNELLES</u> | 11 |
| 1.4 | <u>LES MUTATIONS BIOCHIMIQUES</u> | 11 |
| 1.5 | <u>LES MUTATIONS SILENCIEUSES</u> | 12 |
| 2 | <u>MECANISMES DE MUTATIONS (NATURES MOLECULAIRES DE MUTATIONS)</u> | 12 |
| 2.1 | <u>MUTATIONS PONCTUELLES</u> | 12 |
| 2.1.1 | <u>SUBSTITUTIONS</u> | 12 |
| 2.1.2 | <u>DELETIONS OU ADDITIONS</u> | 14 |
| 2.2 | <u>MUTATIONS DE SEGMENTS</u> | 14 |
| 2.3 | <u>MUTATIONS REVERSES</u> | 15 |
| 3 | <u>CARACTERES DE MUTATIONS</u> | 15 |
| 3.1 | <u>MUTATIONS SPONTANEEES</u> | 15 |
| 3.2 | <u>MUTATIONS INDUITES</u> | 15 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.2.1 | <u>MUTAGENESES CHIMIQUES</u> | 15 |
| 3.2.2 | <u>MUTAGENESES PHYSIQUES</u> | 16 |
| 4 | <u>DETECTION DE MUTATIONS</u> | 17 |
| 4.1 | <u>L'UTILISATION D'UN MILIEU INDICATEUR</u> | 17 |
| 4.2 | <u>REPLIQUE SUR VELOURS</u> | 18 |
| 5 | <u>MECANISMES DE REPARATIONS DE MUTATIONS</u> | 19 |
| 5.1 | <u>ELIMINATION DES DEFAUTS D'APPARIEMENT</u> | 19 |
| 5.2 | <u>SYSTEME NER (NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR) OU EXCISION RE-SYNTHESE</u> | 20 |
| 5.3 | <u>REPARATION DES COUPURES DOUBLE BRINS (CDB)</u> | 22 |
| 5.3.1 | <u>REPARATION PAR RECOMBINAISON</u> | 22 |
| 5.3.2 | <u>REPARATION SOS (SAVE OUR SELVES)</u> | 23 |

CHAPITRE III. RECOMBINAISONS GENETIQUES ET ELEMENTS GENETIQUES TRANSPOSABLES

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | <u>LA RECOMBINAISON GENETIQUE</u> | 24 |
| 1.1 | <u>RECOMBINAISON GENERALE</u> | 24 |
| 1.1.1 | <u>MODELES DE RECOMBINAISON HOMOLOGUE</u> | 25 |
| 1.1.2 | <u>ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE</u> | 27 |
| 1.2 | <u>RECOMBINAISON A UN SITE SPECIFIQUE</u> | 30 |
| 2 | <u>LES ELEMENTS GENETIQUES TRANSPOSABLES (LA TRANSPOSITION)</u> | 31 |
| 2.1 | <u>LA TRANSPOSITION CONSERVATIVE</u> | 32 |
| 2.2 | <u>LA TRANSPOSITION REPLICATIVE</u> | 33 |

CHAPITRE IV. TRANSFERT GENETIQUE CHEZ LES BACTERIES

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | <u>LA TRANSFORMATION BACTERIENNE</u> | 35 |
| 1.1 | <u>LES CARACTERES DE LA TRANSFORMATION</u> | 35 |
| 1.1.1 | <u>LA COMPETENCE DE LA BACTERIE RECEPTRICE</u> | 35 |
| 1.1.2 | <u>LA TAILLE DE L'ADN</u> | 36 |
| 1.1.3 | <u>LA SATURATION</u> | 36 |
| 1.2 | <u>MECANISME DE LA TRANSFORMATION</u> | 36 |
| 2 | <u>LA CONJUGAISON BACTERIENNE</u> | 37 |

| | | |
|--|--|-----------|
| 2.1 | <u>L'EXEMPLE DU FACTEUR F</u> | 39 |
| 2.2 | <u>ETAPES DE LA CONJUGAISON BACTERIENNE</u> | 39 |
| 2.2.1 | <u>LA RECONNAISSANCE DU PARTENAIRE</u> | 39 |
| 2.2.2 | <u>LE TRANSFERT CONJUGATIF</u> | 41 |
| 3 | <u>LA TRANSDUCTION</u> | 42 |
| 3.1 | <u>LA TRANSDUCTION GENERALISEE</u> | 43 |
| 3.2 | <u>LA TRANSDUCTION SPECIALISEE</u> | 44 |
| 4 | <u>LA CARTOGRAPHIE</u> | 46 |
| 4.1 | <u>EXPERIENCE DU CROISEMENT INTERROMPU CHEZ <i>E. COLI.</i></u> | 46 |
| <hr/> CHAPITRE V. ENZYMES DE RESTRICTION <hr/> | | |
| 1 | <u>LES SYSTEMES DE RESTRICTION/MODIFICATION</u> | 48 |
| 2 | <u>NOMENCLATURE DES ENZYMES DE RESTRICTION</u> | 48 |
| 3 | <u>SEQUENCES CIBLES ET MODES DE CLIVAGE</u> | 49 |
| 4 | <u>ROLE DES SYSTEMES DE RESTRICTION/MODIFICATION</u> | 50 |
| 5 | <u>APPLICATIONS DES ENZYMES DE RESTRICTION (CARTE DE RESTRICTION)</u> | 52 |
| <hr/> CHAPITRE VI. REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES <hr/> | | |
| 1 | <u>REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE</u> | 53 |
| 1.1 | <u>LE MODELE DE L'OPERON</u> | 53 |
| 1.2 | <u>L'OPERON LACTOSE</u> | 54 |
| 1.2.1 | <u>LA REGULATION NEGATIVE</u> | 55 |
| 1.2.2 | <u>LA REGULATION POSITIVE</u> | 56 |
| 1.3 | <u>L'OPERON TRYPTOPHANE</u> | 57 |
| 1.3.1 | <u>LA REPRESSION</u> | 58 |
| 1.3.2 | <u>L'ATTENUATION</u> | 58 |
| 2 | <u>REGULATION TRADUCTIONNELLE</u> | 61 |

CHAPITRE VII. GENETIQUE DES BACTERIOPHAGES

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| <u>1</u> | <u>STRUCTURES DE BACTERIOPHAGES</u> | 63 |
| <u>2</u> | <u>CLASSIFICATION DES BACTERIOPHAGES</u> | 64 |
| <u>3</u> | <u>CYCLE DE MULTIPLICATION DU BACTERIOPHAGE</u> | 66 |
| <u>3.1</u> | <u>LE CYCLE LYTIQUE</u> | 67 |
| <u>3.2</u> | <u>LE CYCLE LYSOGENIQUE</u> | 67 |

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

| | |
|---|----|
| Figure 1. Schéma représente le Noyau pyrimidine et le Noyau purine. | 1 |
| Figure 2. Composition des petites bases..... | 2 |
| Figure 3. Composition des grandes bases..... | 2 |
| Figure 4. Schémas de riboses | 3 |
| Figure 5. L'acide phosphorique. | 3 |
| Figure 6. Les enzymes impliquées dans la réplication des procaryotes. | 6 |
| Figure 7. Carte génétique du facteur F | 7 |
| Figure 8. Mode de réplication unidirectionnelle | 9 |
| Figure 9. Mutation silencieuse | 13 |
| Figure 10. Mutation faux-sens | 13 |
| Figure 11. Mutation par insertion..... | 14 |
| Figure 12. La désamination par l'acide nitreux..... | 16 |
| Figure 13. Formation des dimères de thymines sous action des rayons ultraviolets | 17 |
| Figure 14. Expérience de Lederberg (1952) démontrant la réplique par tampon velours | 18 |
| Figure 15. Correction des mésappariements par le système MutHLS d' <i>E. coli</i> | 20 |
| Figure 16. Mécanisme de la réparation par excision de l'ADN par le système UvrABC d' <i>E. coli</i> | 21 |
| Figure 17. Réparation des CDB par recombinaison | 22 |
| Figure 18. Modèle de recombinaison homologue proposé par Holliday | 25 |
| Figure 19. Modèle de recombinaison homologue proposé par Meselson et Radding | 27 |
| Figure 20. Modèle de recombinaison homologue | 28 |
| Figure 21. Invasion du brin homologue par Rec A | 29 |
| Figure 22. Intégration du génome du bactériophage λ dans l'ADN chromosomique d' <i>E. coli</i> | 30 |
| Figure 23. Structure générale d'un élément IS bactérien. | 32 |
| Figure 24. Model de la transposition conservative des séquences IS des bactéries | 33 |
| Figure 25. Model des deux mécanismes de transposition, (a) répllicative et (b) conservative. | 34 |
| Figure 26. L'efficacité transformante de l'ADN exogène est fonction de sa concentration | 36 |
| Figure 27. Schéma des événements conduisant à la transformation de <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 37 |
| Figure 28. Mécanisme de la conjugaison bactérienne observé par un microscope électronique | 37 |
| Figure 29. L'expérience du tube en U | 38 |
| Figure 30. Mécanisme de la conjugaison bactérienne $F^+ \times F^-$ | 40 |
| Figure 31. Le transfert conjugatif Hfr x F^- (recombinaison) | 42 |
| Figure 32. Mécanisme de la transduction généralisée | 43 |
| Figure 33. Le mécanisme de transduction pour le phage λ et <i>E. coli</i> | 45 |

| | |
|---|-----------|
| Figure 34. Transfert ordonné du chromosome Hfr au cours de la conjugaison..... | 46 |
| Figure 35. Expérience du croisement interrompu chez <i>E. coli</i> | 47 |
| Figure 36. Le mode d'action de l'endonucléase <i>EcoRI</i> d' <i>E. coli</i> | 49 |
| Figure 37. Le mode d'action de l'endonucléase <i>Hae III</i> | 50 |
| Figure 38. Mécanismes réactionnels des endonucléases de restriction | 51 |
| Figure 39. Les étapes suivies pour établir une carte de restriction..... | 52 |
| Figure 40. Organisation générale de l'opéron | 53 |
| Figure 41. Structure et fonctionnement de l'opéron Lac chez <i>E. coli</i> | 55 |
| Figure 42. Régulation négative de la transcription de l'opéron <i>lac</i> par un répresseur <i>lac</i> | 55 |
| Figure 43. Régulation négative de la transcription de l'opéron <i>lac</i> | 57 |
| Figure 44. L'opéron tryptophane chez <i>E. coli</i> | 58 |
| Figure 45. Mécanisme de répression dans l'opéron <i>trp</i> chez <i>E. coli</i> | 59 |
| Figure 46. Séquence guide de l'opéron <i>trp</i> | 59 |
| Figure 47. Mécanisme de l'atténuation de la transcription de l'opéron <i>trp</i> | 60 |
| Figure 48. Structures de phage T4 d' <i>E.coli</i> | 62 |
| Figure 49. Structures morphologiques de bactériophages..... | 63 |
| Figure 50. Les différentes morphologies associées aux familles de bactériophages..... | 65 |
| Figure 51. Cycle infectieux du bactériophage T4 d' <i>E. coli</i> | 66 |
| Figure 52. Cycles de multiplication de bactériophages | 68 |

Tableau I. Phénotypes des souches d'*E. coli* utilisées dans l'expérience de Lederberg et Tatum..... **38**

Tableau II. Quelques endonucléases de restriction de type II et leur séquence de reconnaissance **49**

Tableau III. Caractéristiques de groupes de bactériophages..... **65**

Structure et organisation du matériel génétique

1 Les acides nucléiques

Acide nucléique (acides désoxyribonucléiques ADN et/ ou acides ribonucléiques ARN) s'agit d'une macromolécule formée par polymérisation de nucléotides.

Les acides nucléiques sont des substances présentes, non seulement dans le noyau mais aussi dans le cytoplasme des cellules. Du point de vue chimique les acides nucléiques sont des acides faibles.

1.1 Structure des acides nucléiques

L'ADN est une molécule d'une grande importance biologique car elle est le support de l'information génétique. Le message transmis par l'ADN spécifie la reproduction et le fonctionnement de chaque organisme vivant. L'ADN est localisé principalement dans le noyau, cependant il existe un ADN dans le cytoplasme c'est l'ADN mitochondrial responsable de l'hérédité mitochondriale et l'ADN des procaryotes.

L'ARN est une molécule monocaténaire, c'est-à dire simple brin. Cependant il existe des structures où il y a un repliement en « doubles brins ». L'ARN ou acides ribonucléiques est localisé essentiellement dans le cytoplasme, mais il existe aussi dans le noyau.

Les acides nucléiques sont formés par la répétition de sous unités appelées nucléotides. Chaque nucléotide est constitué à son tour de 3 parties :

- Une base azotée
- Un sucre ou ose à cinq carbones ribose ou désoxyribose
- Un groupement phosphate

1.1.1 Les bases azotées

Sont des molécules aromatiques dont le noyau est soit une purine soit une pyrimidine. Il existe deux types de bases suivant l'hétérocycle (noyau) : Noyau pyrimidine (1 cycle) ou bien Noyau purine (2 cycles) = noyau pyrimidine + noyau imidazole.

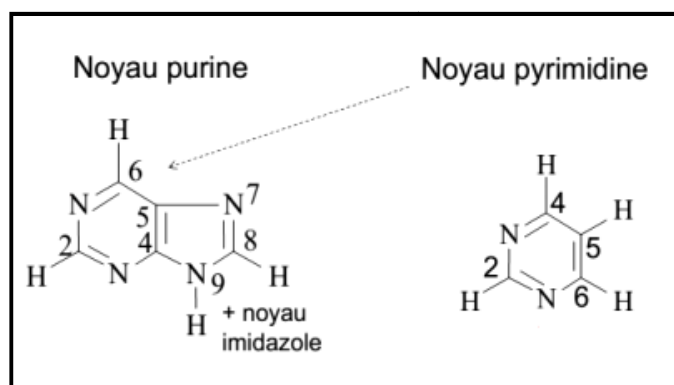


Figure 1. Schéma représente le Noyau pyrimidine et le Noyau purine.

a) Les bases pyrimidiques (petites bases)

Elles dérivent du noyau pyrimidine, noyau hétérocycle azoté dont la structure porte deux atomes d'azote. La numérotation s'effectue dans le sens horaire en partant de l'azote 1 en bas (**Fig.2**). Si on remplace les atomes d'hydrogène en 2, 4 et 5 par des radicaux on obtient les 3 bases pyrimidiques : Uracile, Thymine et Cytosine (U, T et C).

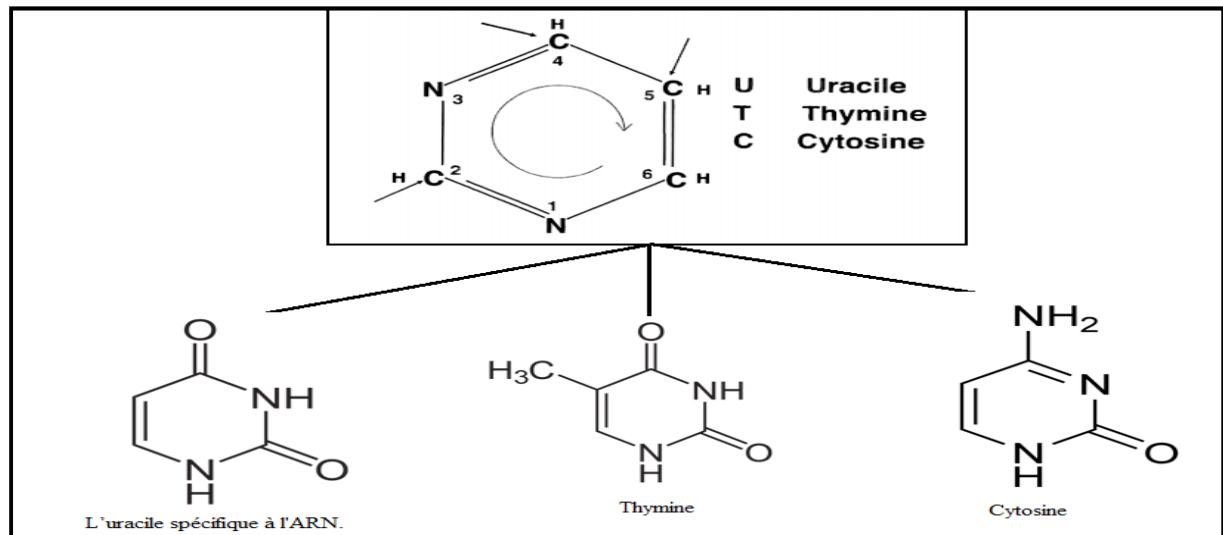


Figure 2. Composition des petites bases.

b) Les bases puriques (grandes bases)

Elles dérivent du noyau purique (ou purine) qui est aussi un hétérocycle azoté constitué de l'accolement de deux cycles azotés : un cycle pyrimidine à 6 sommets et à 2 atomes d'azotes, et un cycle imidazole à 5 sommets et à 2 atomes d'azote également. La numérotation est antihoraire dans le cycle pyrimidine et horaire dans le cycle imidazole (**Fig. 3**).

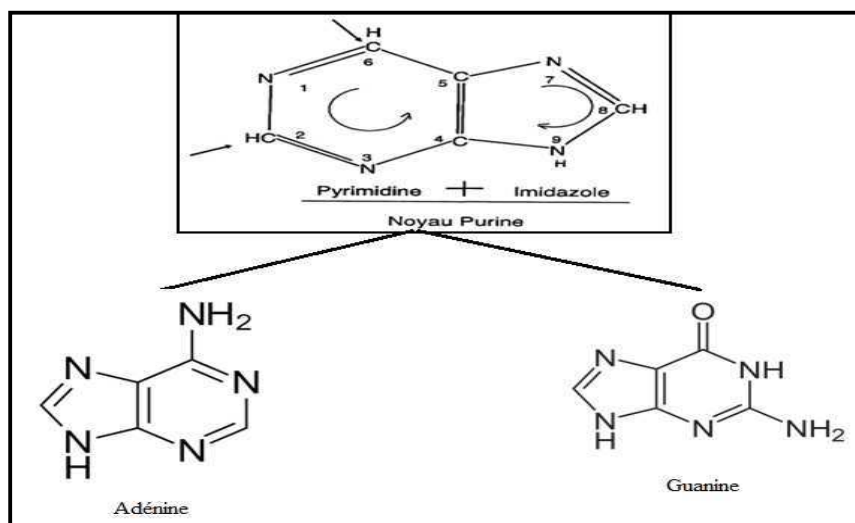


Figure 3. Composition des grandes bases

1.1.2 Les sucres

Le ribose est un pentose de la série D, dont tous les hydroxyles sont orientés à droite (représentation de Fisher).

Le désoxyribose, composant des acides désoxyribonucléiques (ADN) est dérivé du ribose par une réduction de la fonction alcool secondaire du carbone n°2. Le désoxyribose confère à cet acide nucléique une plus grande stabilité propre à sa fonction de conservation de l'information génétique (Fig.4).

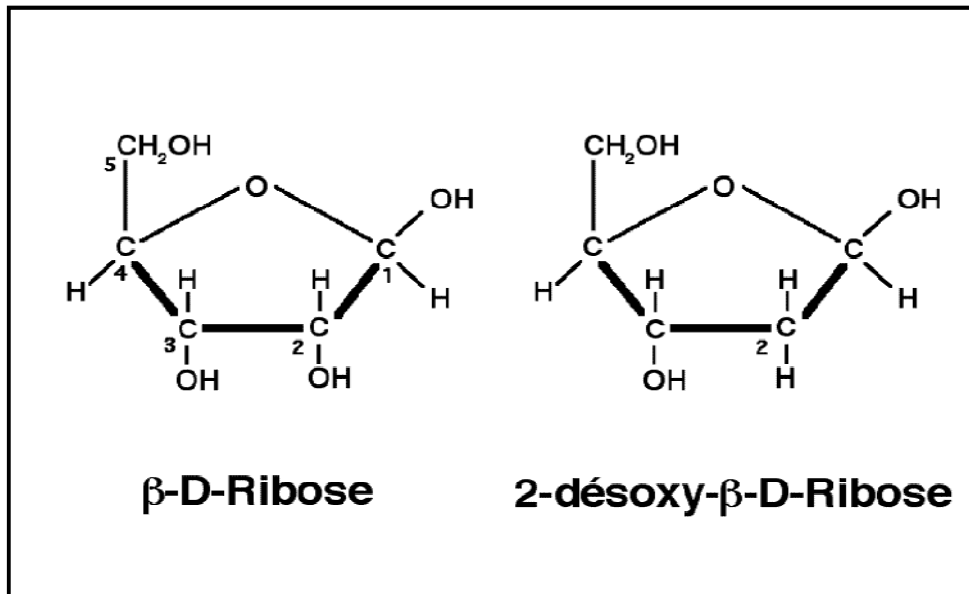


Figure 4. Schémas de riboses

1.1.3 L'acide phosphorique

C'est un triacide dont une fonction acide est dissociée permettant de donner une charge négative à l'ADN, et dont les deux autres peuvent former des liaisons phosphodiester.

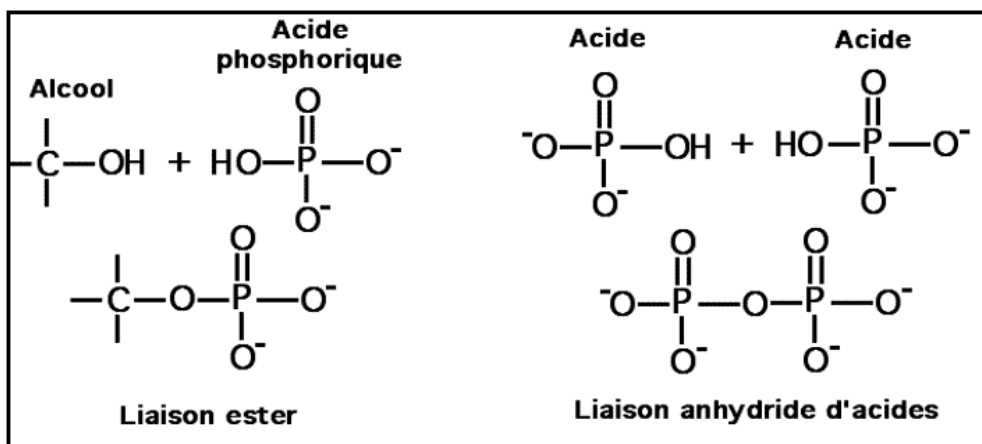


Figure 5. L'acide phosphorique.

2 Organisation du Matériel génétique bactérien

La composition génomique de nombreuses bactéries peut consister en deux composantes, à savoir un chromosome qui porte des gènes pour toutes les fonctions essentielles et leur régulation, et une composante extra-chromosomique mais « autonome » : plasmide initialement identifié pour réaliser les fonctions requises pour sa propre réplication, son maintien et sa distribution.

2.1 Le chromosome bactérien

Le génome bactérien est organisé en une seule molécule d'ADN qu'on appelle le **chromosome**. Ce chromosome est circulaire ; il a environ **1mm** de longueur et une masse molaire d'environ **3.10^9 daltons**, il est composé de 2 chaînes poly nucléotidiques de polarité inversée dont les éléments sont liés par covalence de même que les extrémités.

La double hélice circulaire de l'ADN bactérien est de plus enroulée en **superhélice** et est associé 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.

Le chromosome est condensé plus de 1000 fois grâce à son association avec ces protéines (ex: le chromosome d'*E. coli* contient $4,4.10^6$ paires de bases et mesure 1,4 mm, ce chromosome est fermement empaqueté dans la cellule qui mesure environ 2 à $6\mu\text{m}$). Le chromosome condensé et associé avec des protéines forme une structure visible au microscope qui est fonctionnellement équivalent au noyau des eucaryotes.

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.

2.1.1 Mécanisme de la réplication du chromosome bactérien

Chez les procaryotes comme chez les eucaryotes, les cellules grandissent puis se divisent, et donnent des cellules filles capables de faire de même. Il est important de transmettre aux cellules-filles la même information génétique, car si l'une en obtient trop et l'autre trop peu, cela affectera la survie de cette dernière et donc de l'espèce. 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.

La réplication débute par l'ouverture de la double hélice au locus *oriC*. Ce site est très riche en nucléotides AT, ce qui entraîne une moins bonne cohésion entre les chaînes. Cette ouverture est due à l'action d'une protéine DnaA qui se lie à *oriC*, ceci amorce le désenroulement de la double hélice au site d'initiation. Ce désenroulement se produit sous l'action de la protéine DnaB possédant une activité hélicase (DUE) qui est ATP dépendante, dans certains cas il y a intervention de la sous unité β de la gyrase ou du produit Dna A.

Les brins séparés sont stabilisés par des protéines dites **protéines SSB** « single strand binding protein » ; il s'agit également de tétramères. Le désenroulement de la double hélice de l'ADN produit des tensions et aboutit à la formation de superenroulement en aval des fourches de réplication 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 (**Fig.6**). La réplication se fait donc de manière asymétrique sur les deux chaînes, dans la croissance discontinue. 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 s'effectue dans le sens permis (5'→3') par courts brins 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.

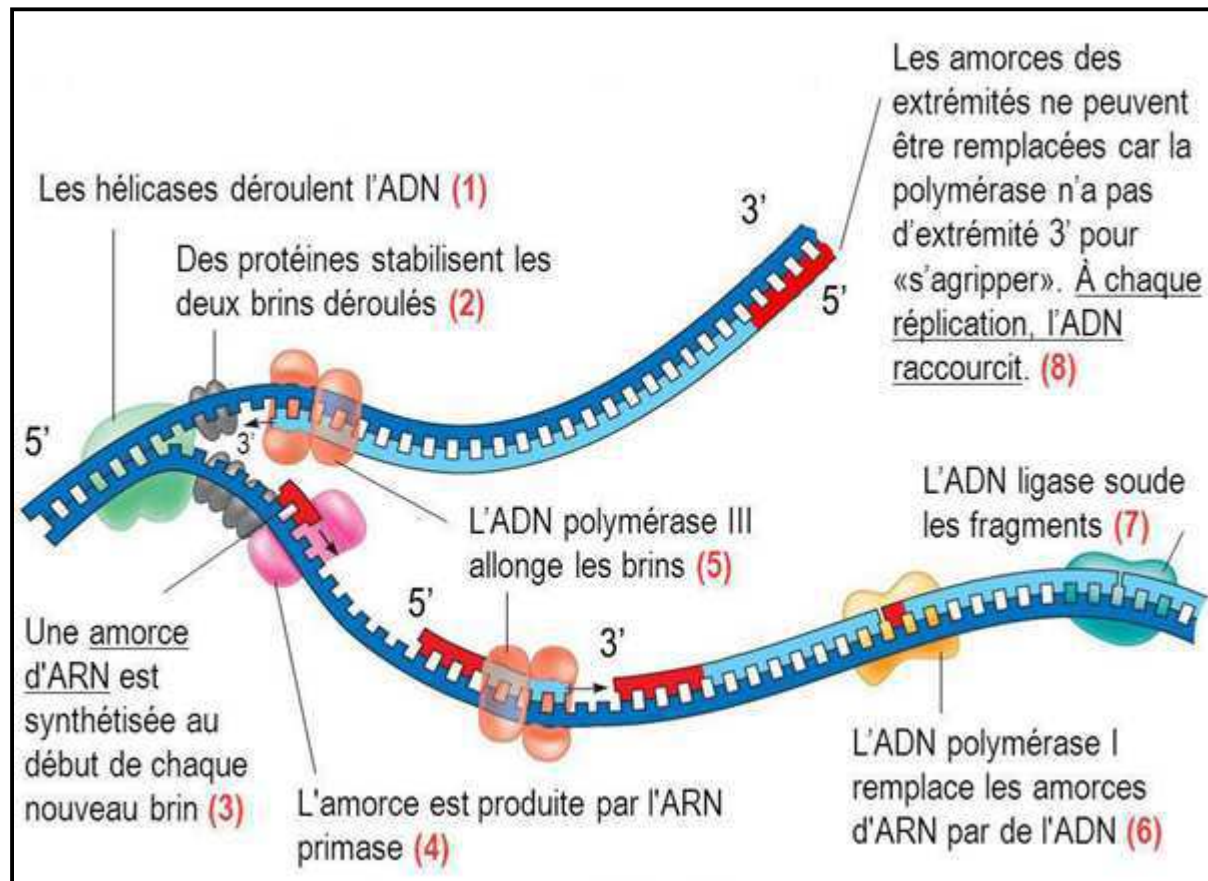


Figure 6. Les enzymes impliquées dans la réplication des procaryotes.

2.1.2 Caractéristiques de la réplication du chromosome bactérien

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**.

2.2 Les plasmides

Petites molécules d'ADN double-brin, habituellement circulaires qui peuvent exister indépendamment du chromosome de l'hôte. 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). 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).

2.2.1 Types de plasmides

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) (**Fig. 7**); 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).

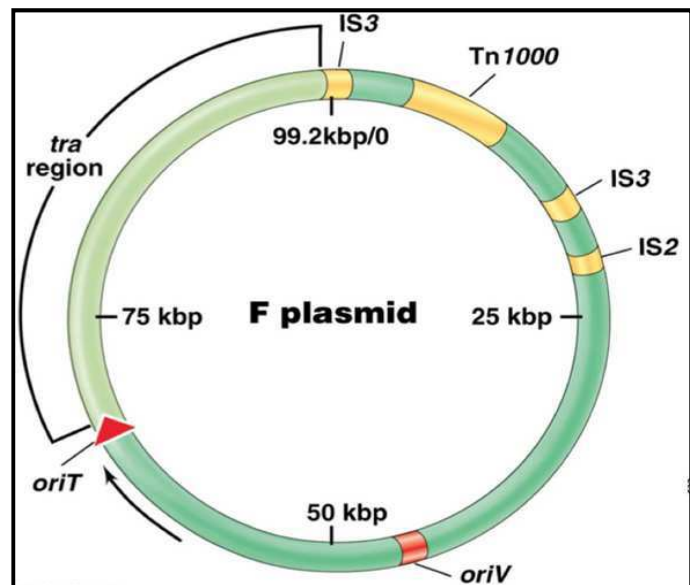


Figure 7. Carte génétique du facteur F (*tra*) des gènes codants pour les fonctions du transfert, (*finP*) d'inhibition de fertilité, (*oriT*) origine de réplication. (*IS2*, *IS3*) des séquences d'insertion

2.2.1.1. Facteur de fertilité (facteur F)

Les plasmides conjugatifs sont les premiers plasmides qui ont été découverts chez la bactérie *Escherichia coli* dans les années 1950. On les appelle aussi facteurs de fertilité ou plasmides F. Ces plasmides confèrent à la bactérie hôte la capacité de synthèse de *pili* dit sexuels. Par l'intermédiaire de ces *pili*, la bactérie donneuse peut transférer une copie du plasmide F par processus de conjugaison bactérienne. L'information requise pour le transfert du plasmide est contenue dans l'opéron *tra* qui contient au moins 28 gènes (**Fig. 7**). Les plasmides F possèdent au minimum une origine de réplication et tous les gènes nécessaires à la synthèse des *pili* et du transfert du plasmide.

2.2.1.2. Facteur 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.

2.2.1.3. Facteur de virulence

Il s'avère que les bactéries pathogènes hébergent très souvent des plasmides conjugatifs qui participent à la pathogénicité. Les plasmides de virulence portent des gènes codant des facteurs de virulence, ayant un rôle dans le pouvoir pathogène des bactéries.

Par exemple, chez les bactéries pathogènes (*Salmonella*), ces plasmides codent un complexe protéique situé sur la paroi de la bactérie : c'est le complexe *pili-adhésine* qui permet à la bactérie d'adhérer sur des récepteurs hydrocarbonés situés à la surface de certaines cellules eucaryotes notamment les entérocytes.

2.2.1.4. Facteur métabolique

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.

2.2.1.5. Facteur 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.

2.2.2 La réplication des plasmides

La réplication de certains plasmides est unidirectionnelle dit *model du cercle roulant*. Dans le mécanisme du cercle roulant (**Fig. 8**), un brin de la molécule d'ADN est incisé et l'extrémité hydroxyle 3' libre s'agrandie grâce aux enzymes de la réplication. Comme l'extrémité 3' est allongée tandis que le point de croissance tourne autour de la molécule circulaire, l'extrémité 5' du brin est déplacée et forme une queue qui grandie. La queue simple brin peut être convertie en double brin par la synthèse du brin complémentaire.

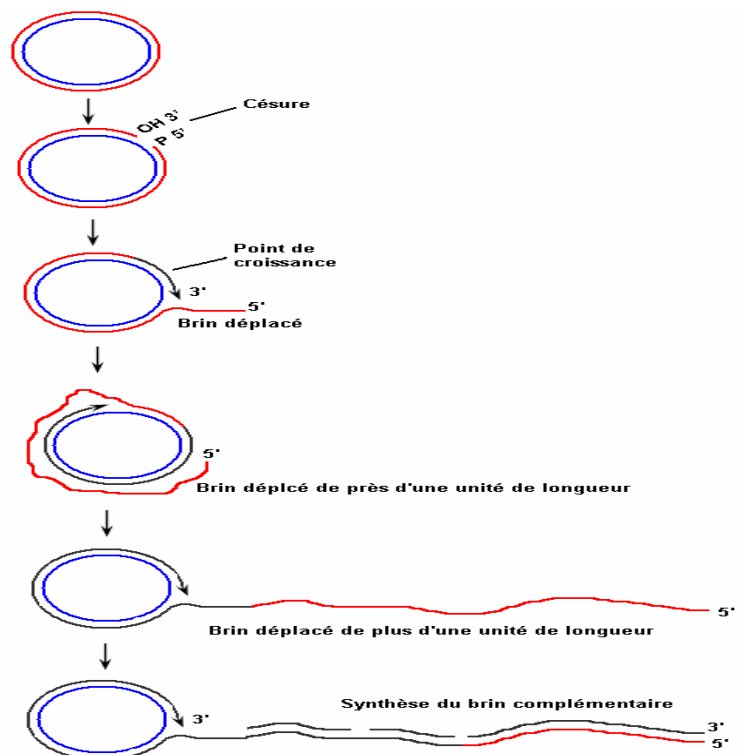


Figure 8. Mode de réplication unidirectionnelle

3 Extraction et purification et élimination de l'ADN plasmidique

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire et dans toutes les techniques de génie génétique.

L'objectif des méthodes d'extraction des acides nucléiques dans le cas présent est d'obtenir des acides nucléiques purifiés, tirés de sources diverses, afin de pouvoir mener une analyse spécifique comme la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse PCR. Afin d'obtenir des acides nucléiques hautement purifiés exempts de tout contaminant visible, des méthodes d'extraction adéquates devraient être appliquées.

L'élimination de plasmide des cellules hôtes est appelée curage. Le curage peut se produire de façon spontanée ou être induit " Spontané/Induit ".

Principe: le curage est obtenu par des traitements inhibant la réplication des plasmides sans affecter la reproduction des cellules hôtes (Plasmides inhibés progressivement & dilués au cours de la multiplication bactérienne). Parmi les traitements utilisés pour le curage citons : " Mutagènes dérivés de l'acridine " Radiations UV ou ionisantes " Privation de thymine ".

La désorganisation des membranes: Le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) appelé aussi laurylsulfate de sodium, le triton X100, et le sarcosyl sont des détergents qui vont solubiliser les lipides membranaires sous forme de micelles.

La précipitation des protéines: en utilisant un agent chaotropique ; un sel (acétate de sodium) modifie la solubilité des molécules protéiques ou des acides nucléiques, et provoque leur précipitation par neutralisation de certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité ou par interférer dans les interactions que les protéines établissent avec l'eau et modifier la solubilité des protéines.

Electrophorèse sur gel d'agarose et visualisation de l'ADN plasmidique. Physiquement, les plasmides peuvent être détectés par électrophorèse sur gel d'agarose soit d'un lysat acellulaire brut ou d'une préparation purifiée. La séparation est basée sur les différences de mobilité sur gel relativement des molécules d'ADN fermées circulaires (CCC) de manière covalente plus petite, tel que la majorité des plasmides, par rapport aux fragments linéaires du chromosome générés lors de la préparation.

Mutations et mécanismes de réparation

Une mutation peut être définie comme étant une altération dans la séquence de bases nucléotidiques du gène. C'est une variation :

- Rare : La mutation est un phénomène rare qui n'affecte qu'une faible fraction de l'ensemble des cellules bactériennes au sein d'une large population.
- Discontinue : la mutation ne s'effectue pas à la suite d'une longue période d'adaptation progressive, avec des formes intermédiaires, mais habituellement en une seule étape.
- D'emblée héréditaire.

1 Types de mutations

Les mutations peuvent modifier le phénotype d'un micro-organisme de différentes manières.

1.1 Les mutations morphologiques

Changent la morphologie de la colonie ou la cellule du micro-organisme.

1.2 Les mutations létales

Entraînent la mort de l'organisme.

1.3 Les mutations conditionnelles

Elles 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*).

1.4 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.

1.5 Les mutations silencieuses

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.

2 Mécanismes de mutations (Natures moléculaires de mutations)

Certaines substitutions d'acides aminés sont sans effet sur la fonction de la protéine dans laquelle elles apparaissent. 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.

2.1 Mutations ponctuelles

Ce sont des modifications qui touchent une seule paire de base à la fois ou un nombre très faible de paires de bases. Il y'a deux types de mutations ponctuelles: les substitutions et les délétions/additions.

2.1.1 Substitutions

C'est le changement d'une paire de base par une autre. Au niveau de la molécule d'ADN quatre types de bases sont présentes: La cytosine et la thymine qui sont des pyrimidines, La Guanine et l'Adénine qui sont des purines. Quand la substitution consiste en le changement de purines par des purines (exemple A/G ou G/A) ou le changement d'une pyrimidine par une pyrimidine (T/C ou C/T), on dit que c'est une transition. Quand la substitution consiste en le changement d'une purine par une pyrimidique (G/T ou A/C...) ou inversement changement d'une pyrimidine par une purine (T/A ou T/G...), on dit que c'est une transversion.

Les substitutions de bases conduisent à des mutations qui peuvent avoir des conséquences différentes au niveau du phénotype. On distingue trois types de mutations par substitutions selon leur conséquence au niveau de la protéine et donc au niveau du phénotype.

Mutation silencieuse: le changement au niveau du génome est imperceptible au niveau du phénotype car le changement de l'acide aminé, induit par la substitution au niveau de la protéine, n'a pas d'effet sur l'activité de cette dernière. L'absence du changement au niveau du phénotype peut être due au fait que le codon initial et le codon mutant codent tous les deux pour le même acide aminé (**Fig. 9**).

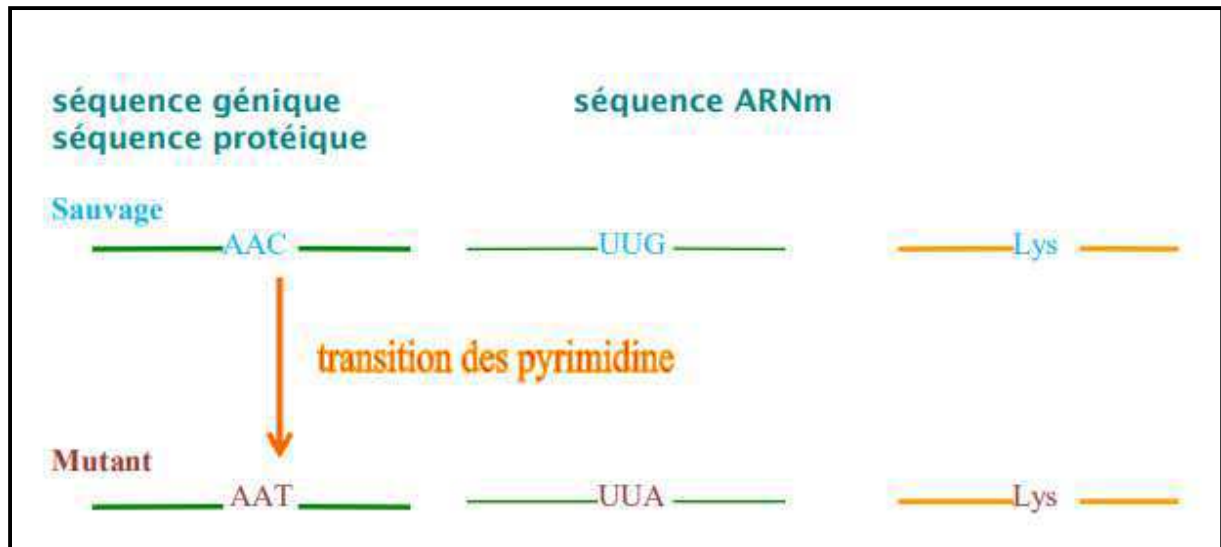


Figure 9. Mutation silencieuse

Mutation faux-sens (miss-sens): Le codon mutant spécifie un aminoacide différent de celui spécifié par le codon initial. L'effet de ce changement au niveau du phénotype dépend de la nature de l'aminoacide échangé, par rapport à celui d'origine (aminoacide de même groupe chimique ou nom: aminoacide acide, basique ou neutre), et de l'emplacement de l'aminoacide échangé (site actif de l'enzyme ou en dehors du site actif). Selon la nature chimique de l'aminoacide mutant et son emplacement au niveau de la protéine le résultat peut être une enzyme mutante inactive, moins efficace ou thermosensible (**Fig.10**).

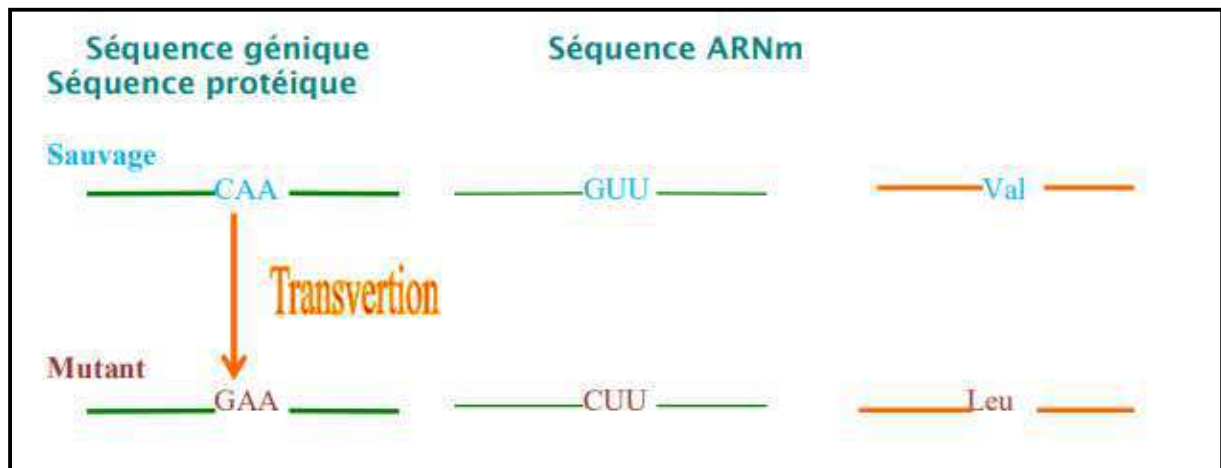


Figure 10. Mutation faux-sens

Mutation non-sens (no-sens): Les mutations non-sens consistent en la transformation du codon initial en l'un des trois codons non-sens (UAG, UAA ou UGA) qui ne codent pas l'aminoacide et détermine la fin de la synthèse protéique. Les effets des mutations non-sens sur le phénotype sont beaucoup plus dramatiques que les mutations faux-sens. Les mutations

non-sens provoquent l'arrêt prématuré de la synthèse protéique ce qui aboutit à des protéines tronquées qui sont de plus souvent inactives. Le phénotype mutant va dépendre de la position des mutations: plus la position de la mutation est proche du codon d'initiation de la traduction, plus son effet est dramatique sur le phénotype.

2.1.2 Délétions ou 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).

2.2 Mutations de segments

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 génome 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 interrompe 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.

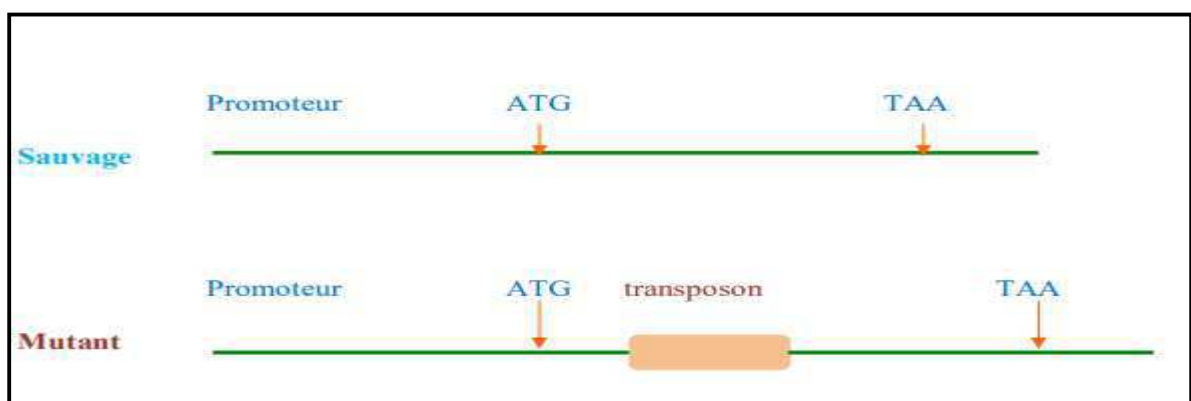


Figure 11. Mutation par insertion

2.3 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*.

3 Caractères de mutations

Les mutations peuvent survenir dans des conditions physiologiques normales ce sont des mutations naturelles ; comme elles peuvent survenir sous l'influence de facteurs externes (physiques et/ou chimiques) on parlera alors de mutations induites.

3.1 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, 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.

3.2 Mutations induites

Le taux de mutation peut être augmenté par l'action de produits mutagènes : génotoxiques. Tels que certaines substances chimiques comme les analogues des bases; des agents physiques (rayons UV, X)

3.2.1 Mutagenèses chimiques

a) La désamination

De nombreux agents chimiques interagissent avec l'ADN de manière à produire des altérations de sa séquence. Parmi ceux-ci, les agents qui agissent en modifiant chimiquement une des bases de l'ADN. Par exemple, d'acide nitreux provoque une désamination oxydative dans laquelle les groupes amino sont convertis en groupes cétoniques ; les résidus cytosine sont ainsi convertis en 5méthyl cytosine (uracile) qui s'apparie à l'adénine plutôt que la guanine. De même la désamination des adénines en hypoxanthines qui sont préférentiellement complémentaires de la Cytosine plutôt que de la Thymines (**Fig. 12**).

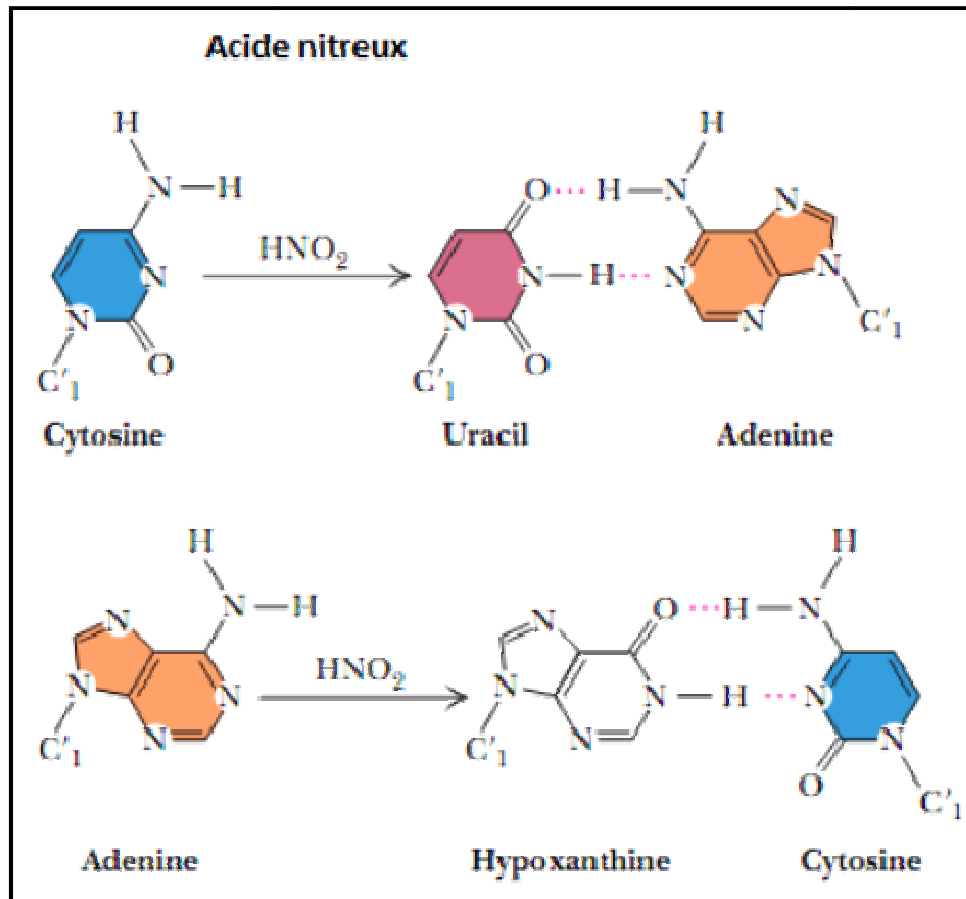


Figure 12. La désamination par l'acide nitreux.

b) Les analogues des bases

Certains analogues de base sont aussi à l'origine de mésappariement. Ainsi le 5bromo-uracile, un analogue de la cytosine s'hybride préférentiellement à l'Adénine ; et le 2aminopurine un analogue de l'adénine s'apparie avec la cytosine.

c) Les agents intercalant

Les agents intercalant 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.

3.2.2 Mutagenèses physiques

Les radiations UV provoquent différents types de lésions dont la dimérisation de pyrimidines voisines qui empêche leur appariement avec les purines correspondantes (**Fig. 13**). Ces dimers constituent un obstacle à la réplication de l'ADN et sont létales s'ils ne sont pas éliminés.

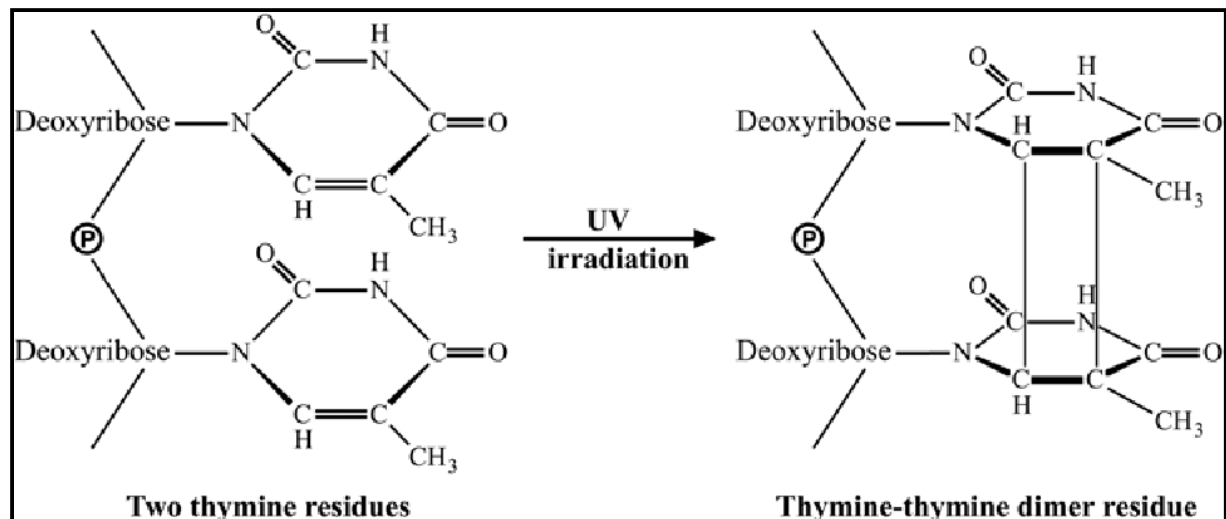


Figure 13. Formation des dimères de thymines sous action des rayons ultraviolets.

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. La 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.

4 Détection de mutations

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.

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.

4.1 L'utilisation d'un milieu indicateur

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.

4.2 Réplique sur velours

Un morceau de velours stérile est tendu sur un cylindre de métal ou de bois dont le diamètre est légèrement plus petit qu'une boîte de Pétri. En appuyant légèrement le velours sur une gélose en boîte de Pétri contenant des colonies bactériennes, une fraction de chaque colonie est transférée sur le velours. En appliquant ensuite la surface du velours sur une autre gélose vierge, on obtient d'un seul coup un repiquage colonie par colonie de la première gélose, et, en répétant les « répliques », on peut repiquer l'ensemble des colonies d'une boîte de Pétri sur de multiples boîtes.

On peut démontrer par cette technique que les mutations surviennent indépendamment du facteur de sélection (**Fig.14**). Pour cela on étale un grand nombre d'*E.coli* sur une gélose sans antibiotique. Lorsque la culture a poussé en donnant des colonies confluentes, on fait, à partir de cette gélose, des répliques sur d'autres boîtes contenant un antibiotique. Des colonies de mutants résistants à l'antibiotique apparaissent sur ces boîtes repiquées dont quelques unes occupent une position identique sur chaque boîte.

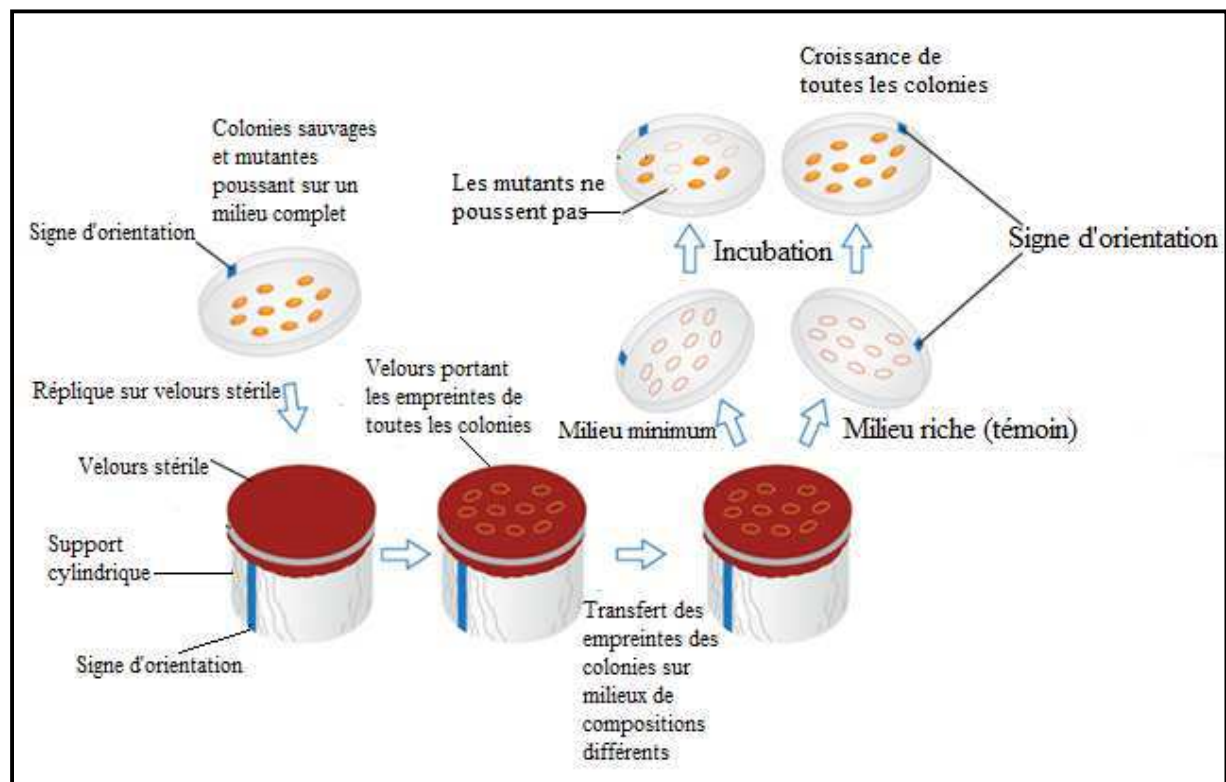


Figure 14. Expérience de Lederberg (1952) démontrant la réplique par tampon velours.

5 Mécanismes de réparations de mutations

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.

5.1 Elimination des défauts d'appariement

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*

La réparation d'un mésappariement se fait en trois étapes : la reconnaissance du mésappariement, la discrimination de brin permettant de distinguer le brin néosynthétisé du brin parental, la réparation par excision d'un long fragment d'ADN et la resynthèse et ligation.

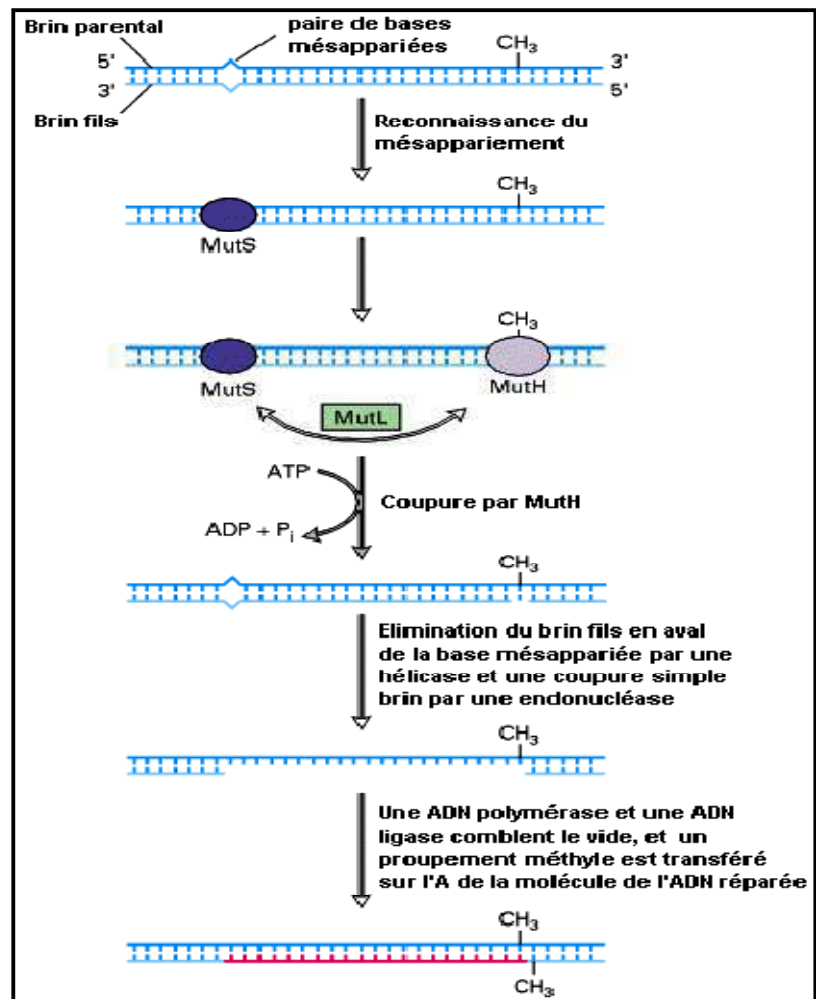
Dans l'ADN d'*E. coli*, les résidus adénine dans une séquence GATC sont méthylés en position 6. Lors de la réplication de l'ADN, les polymérases incorporent de l'adénine non-méthylée, dans une molécule d'ADN nouvellement répliqué, seul le brin parental contient les résidus adénine méthylés. Les adénines 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 :

MutS reconnaît sept des huit mésappariements avec une affinité variable (C/C étant le mésappariement non reconnu). La présence d'ATP provoque le départ de MutS du mésappariement. L'homodimère MutL se fixe sur MutS dans une réaction qui dépend de l'hydrolyse de l'ATP, ce complexe va alors rechercher un site d(GATC) hémiméthylé occupé par l'endonucléase MutH le plus proche en 5' ou en 3' du mésappariement. L'interaction entre MutL et MutH via MutS va activer de façon ATP-dépendante l'endonucléase qui va cliver le brin néosynthétisé au niveau du site d(GATC) en 5' de l'adénine non méthylée. MutL interagit aussi avec l'ADN hélicase II (appelée aussi UvrD ou MutU) et promeut la

fixation de cette protéine sur la coupure simple brin. Le mécanisme de réparation des mésappariements chez *E. coli* est schématisé sur la **figure 15**.

Figure 15. 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.



5.2 Système NER (nucleotide excision repair) ou excision re-synthèse

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* (**Fig. 16**)

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 l'ADN de part et d'autre de la lésion, elle hydrolyse le 8ème lien phosphodiester situé en 5', et le 4ème au 5ème lien situé en 3' de la lésion. Le fragment coupé est éliminé par une hélicase puis dégradé. La brèche ainsi créée est comblée par l'action combinée de l'ADN polymérase I et l'ADN ligase.

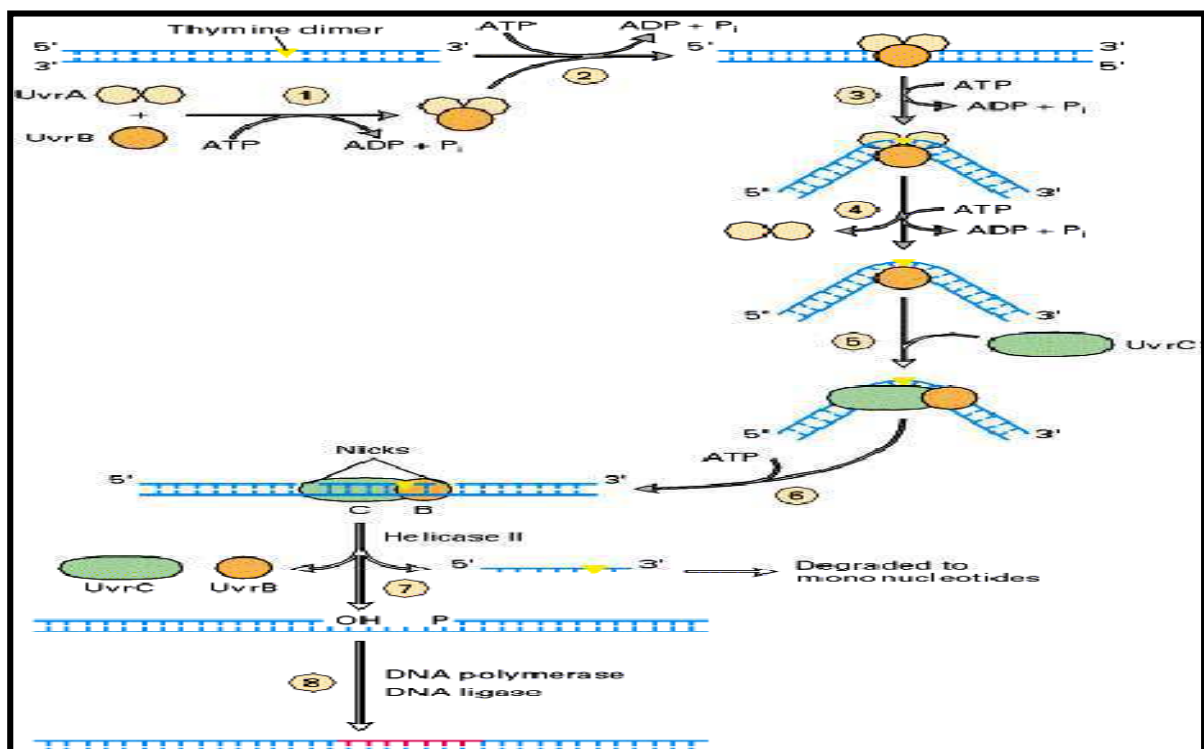


Figure 16. Mécanisme de la réparation par excision de l'ADN par le système UvrABC d'*E. coli*.

5.3 Réparation des coupures double brins (CDB)

Jusqu'ici tous les systèmes de réparation ont utilisé le brin complémentaire comme matrice pour la correction. Mais dans le cas d'une coupure double brin comment la cellule corrige-t-elle la lésion? Et pourtant de nombreux processus cellulaires sont dépendants de telles coupures.

5.3.1 Réparation par recombinaison

Une CDB peut survenir lors de la réplication de l'ADN. Ce qui provoque le décrochage de la fourche de réplication. Lorsqu'une lésion survient dans le brin continu (**Fig.17a**) ceci est en cause du décrochage de la synthèse de celui-ci (**Fig.17b**). La continuation de la synthèse du brin retardé résultera en la synthèse d'une région simple brin à l'avant- du brin modèle (ligature des fragments d'Okazaki, **Fig.17c**). Le brin continu va envahir (invasion) le nouveau duplex du brin retardé (médiée par RecA) crée une boucle en D (**Fig.17c**), et la synthèse du brin continu est dirigée par le modèle du brin retardé (**Fig.17d**) qui rétablit la fourche de réplication (**Fig.17e**). Le site de la lésion est réparé par la suite, par excision nucléotidique.

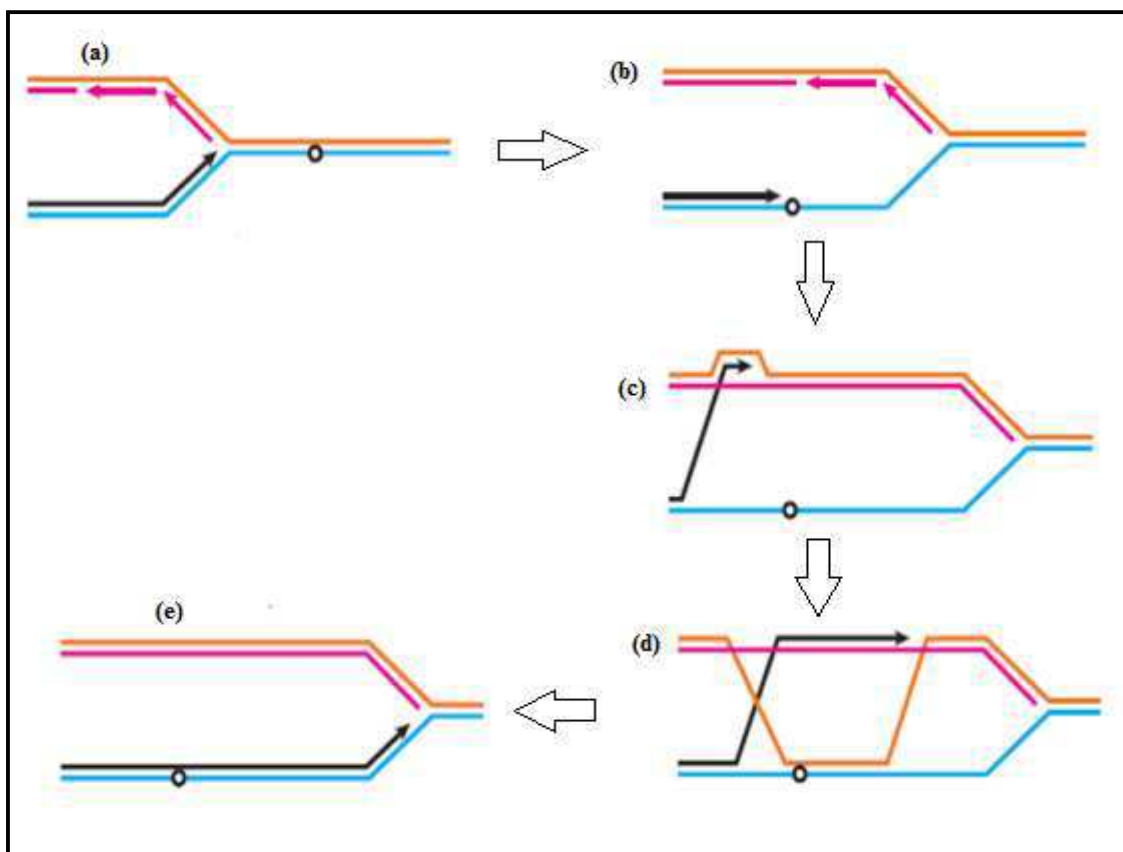


Figure 17. Réparation des CDB par recombinaison

5.3.2 Réparation SOS (Save Our Selves)

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.

Recombinaisons génétiques et éléments génétiques transposables

1 La recombinaison génétique

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.

1.1 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 doubles hélices sont rompues pour former deux doubles 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 doubles 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.

1.1.1 Modèles de recombinaison homologue

1.1.1.1. Modèle de Holliday

Ce modèle a été proposé en 1964 par Robin Holliday. D'après ce dernier (**Fig. 18**), la recombinaison commence par une coupure des deux brins de même polarité appartenant à deux molécules d'ADN différentes et à des positions homologues.

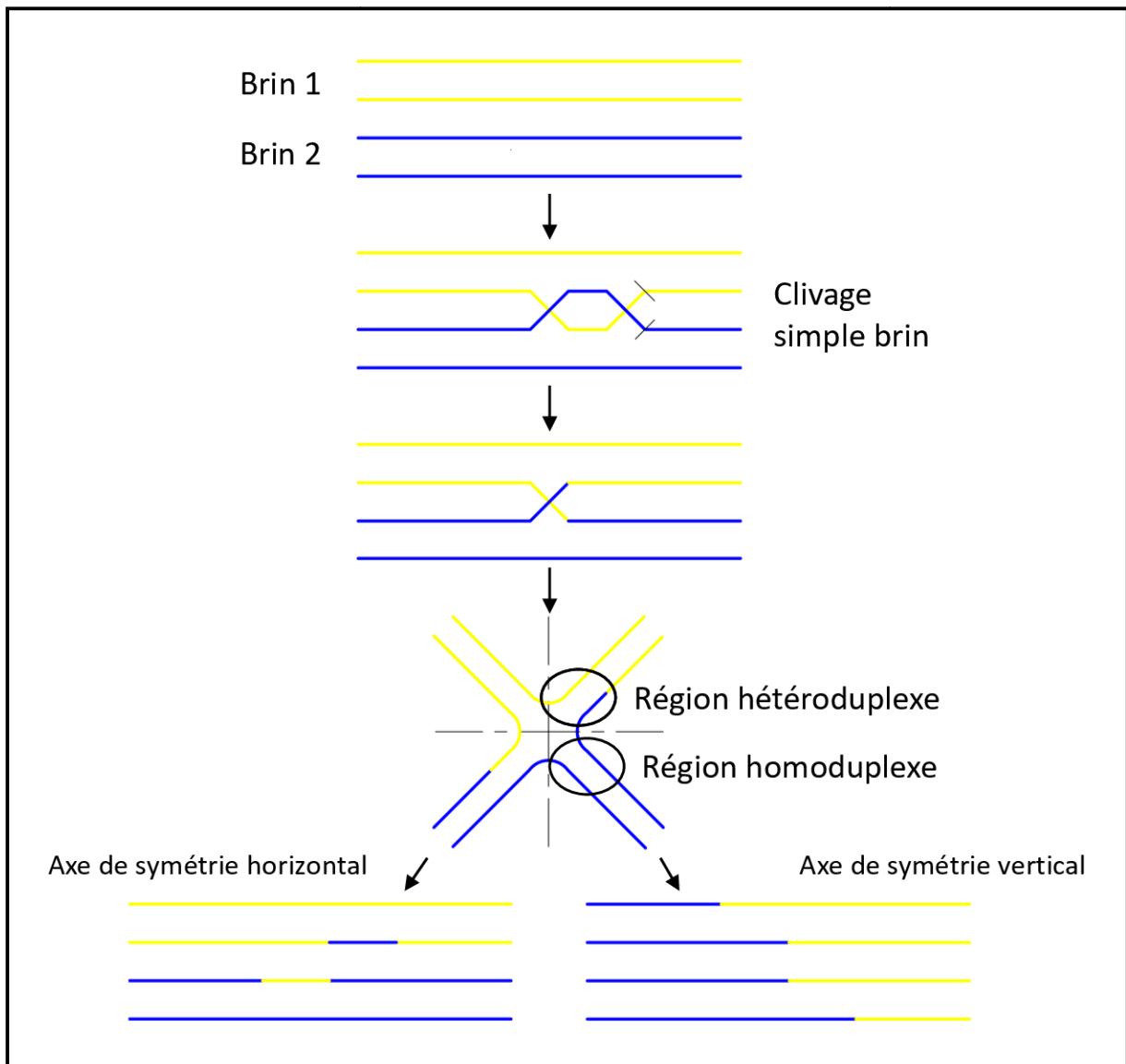


Figure 18. Modèle de recombinaison homologue proposé par Holliday

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. Les bouts des brins croisés sont reliés ce qui crée une structure à brins croisés appelée *jonction de Holliday*.

Cette jonction peut migrer (migration de branche) par déroulement et ré-enroulement des deux brins du duplex. 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. Lorsque la coupure se fait « est- ouest »: un échange de fragment de DNA entre les deux chromosomes est obtenu, Alors que la coupure « nord- sud »: un échange complet des DNA des deux chromosomes s'effectue au delà du point de croisement.

1.1.1.2. 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 (**Fig. 19a**). L'entaille produite sert d'amorce à une réaction de polymérisation par la Pol I, et le brin déplacé (**Fig. 19b**) est transféré dans l'autre molécule d'ADN (invasion, **Fig. 19c**). Le brin transféré s'apparie avec le brin complémentaire dans l'autre molécule d'ADN déplaçant ainsi l'autre brin (**Fig. 19d**), ce dernier est coupé favorisant la ligature des brins échangés et la formation d'une structure en croix (**Fig. 19e**). Si l'échange s'arrête à ce stade, une seule des molécules contient une région d'ADN hétéroduplex (**Fig. 19f**) après résolution par coupure dans le plan horizontal. La structure asymétrique peut subir une résolution dans le plan vertical (**Fig. 19g**), 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 (**Fig. 19h**).

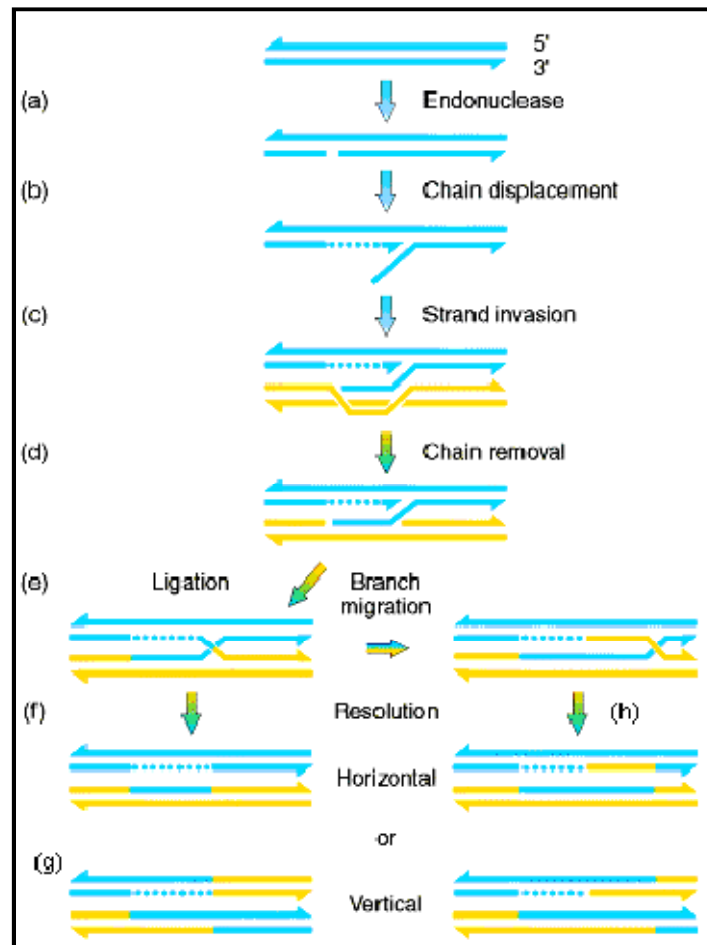


Figure 19. Modèle de recombinaison homologue proposé par Meselson et Radding

1.1.2 Enzymes impliquées dans la recombinaison homologue

Les principaux acteurs du processus de la recombinaison homologue chez *E. coli*, sont le complexe enzymatique RecBCD, qui initie la recombinaison; la protéine RecA qui se lie au brin d'ADN monocaténaire, formant un filament de nucléoprotéine capable d'invasion et d'appariement du brin homologue. Les protéines RuvA et RuvB, qui conduisent à la migration du branchement (jonction de Holliday) qui sera ensuite résolue par RuvC en produits recombinants.

1.1.2.1. Initiation de la recombinaison

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 (**Fig. 20a**).

En progressant le long du duplex, le complexe RecBCD génère localement des brins monocaténaires qui seront clivés par son activité endonucléase (**Fig. 20b**). 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 (**Fig. 20c**).

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 (**Fig. 20d**). 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 (**Fig. 20e**) qui enclenche le processus d'invasion et d'appariement avec une région homologe d'une autre molécule d'ADN bicaténaire.

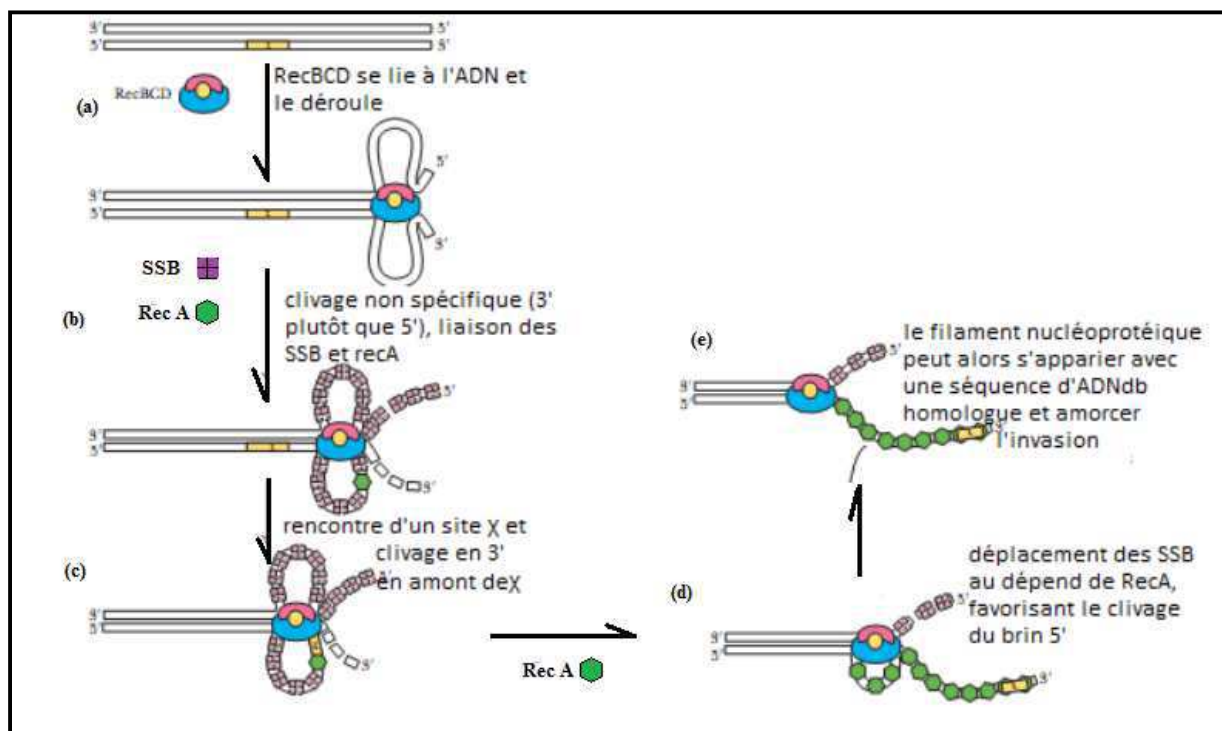


Figure 20. Modèle de recombinaison homologue faisant intervenir le complexe enzymatique RecBCD, un site *Chi*, et la recombinase RecA

1.1.2.2. Invasion du brin homologue

La protéine RecA, ou recombinase, est une protéine multifonctionnelle qui agit dans la recombinaison homologue. RecA amorce la réaction d'échange conduisant à la formation d'une jonction de Holliday. En présence d'ATP et d'ADNss, RecA formant le filament hélicoïdal sert d'échafaudage (pont) sur lequel les événements de recombinaison ont lieu (**Fig. 21a**). Ce filament est assez grand pour recevoir 3 filaments d'ADN sur deux sites.

Le premier site (laire) recevra le brin monocaténaire et le site secondaire recevra l'ADN db envahi, l'ADNsb est alors prêt à rechercher l'homologie de séquence qui mène à l'échange. La progression de la séparation des brins d'ADN double brin et le ré-appariement en brins hybrides le long du duplex d'ADN initie la migration de branche (**Fig. 21b**). La migration entraîne le déplacement du brin d'ADN homologue de l'ADN duplex et de son remplacement par le brin ssADN, Le brin d'ADN déplacé par l'invasion de l'extrémité 3' - terminale de l'ADNss peut alors s'apparier avec le 5'-terminal dans l'ADN d'origine, une étape qui est également médiée par la protéine RecA et SSB (**Fig. 21c**). Le résultat est une jonction de Holliday, l'intermédiaire classique de la recombinaison génétique.

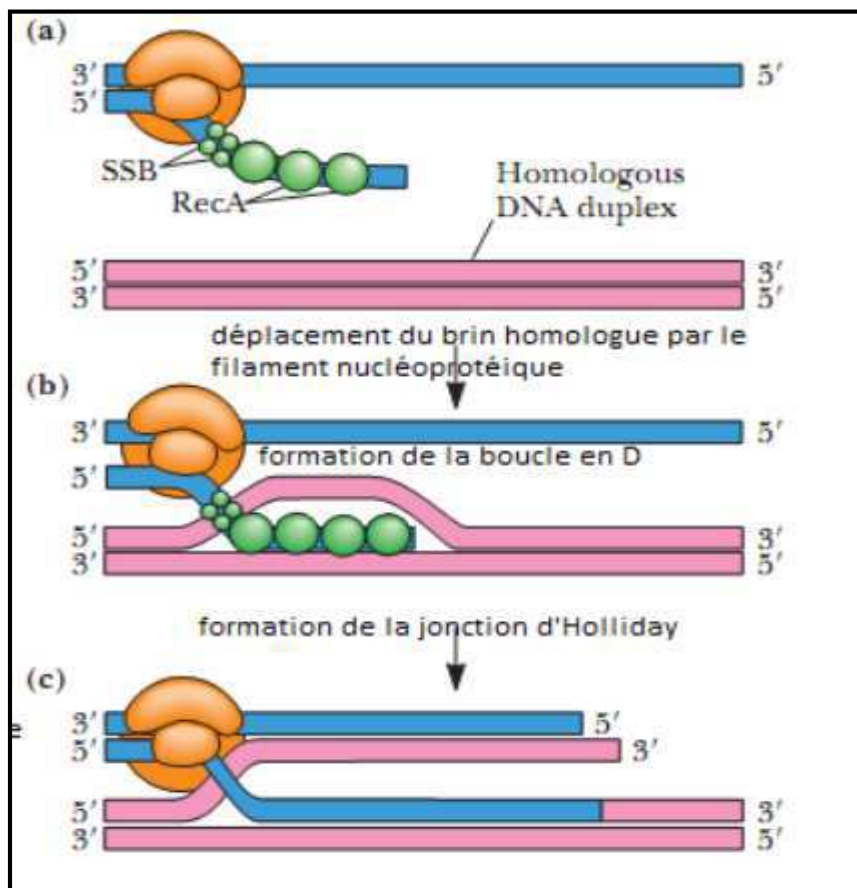


Figure 21. Invasion du brin homologue par Rec A

1.2 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.

Ce mode de recombinaison concerne en général des événements programmés ou permettant une adaptation rapide au milieu environnant. C'est le cas de:

- L'intégration/excision des bactériophages tempérés ou plasmides intégratifs.
- La résolution des dimères de réplicons, chromosomes, plasmides ou virus, permettant une ségrégation correcte dans les cellules filles.
- Le contrôle de la réplication de plasmides de levure, permettant leur maintien à haut nombre de copies dans la cellule.
- L'assemblage de gènes, composant les îlots de pathogénicité.
- Le contrôle de l'expression génique, permettant d'adapter la spécificité d'hôtes dans le cas de certains bactériophages.

Pour comprendre ce type de recombinaison, nous prendrons comme modèle illustratif le système d'intégration/excision du bactériophage λ .

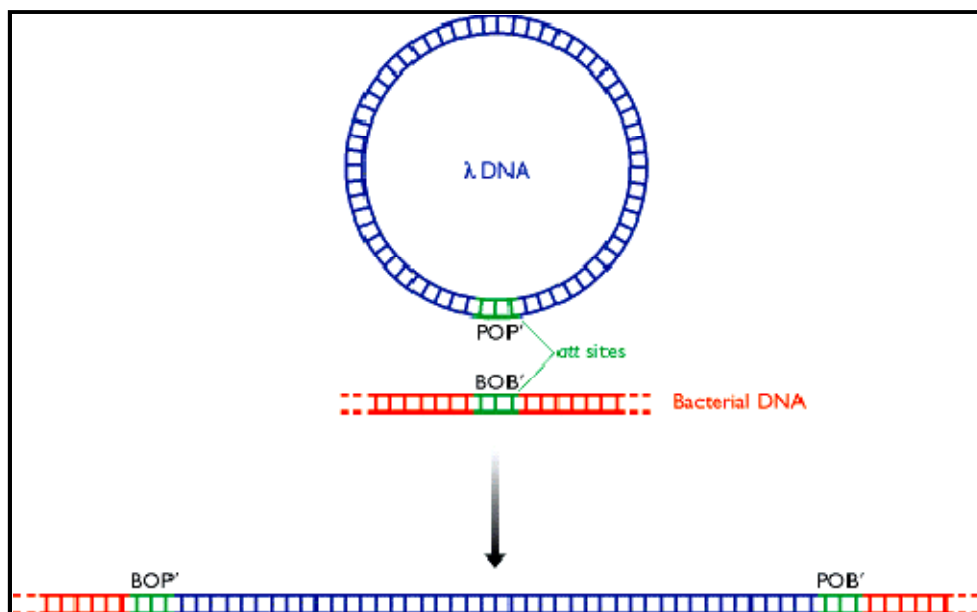


Figure 22. Intégration du génome du bactériophage λ dans l'ADN chromosomique d'*E. coli*

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 flanquent 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 Les éléments génétiques transposables (La transposition)

L'insertion dans un nouveau site peut provoquer une mutation si un gène ou une région régulatrice sur le site est perturbé. Les sites cibles sont des séquences spécifiques de cinq à neuf paires de bases. Quand un transposon s'insère dans un site cible, la séquence cible est dédoublée de sorte que les courtes répétitions, à séquence directe flanquent les séquences répétées inversées terminales du transposon.

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.

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 (**Fig.23**). 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.

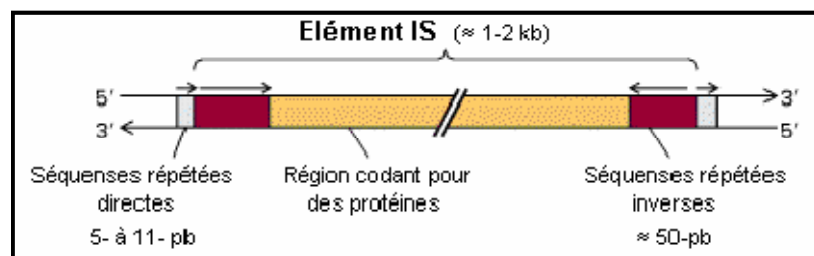


Figure 23. Structure générale d'un élément IS bactérien.

Deux mécanismes de transposition ont été décrits: une transposition conservative et une répllicative. Dans les deux mécanismes la transposase insère le transposon dans l'ADN du receveur. Dans la transposition conservative, l'ADN donneur perd son transposon. En revanche, après la transposition répllicative, le donneur et le receveur possèdent une copie du transposon chacun.

2.1 La transposition conservative

Ce mécanisme concerne surtout les éléments d'insertion IS (**Fig. 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.

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.

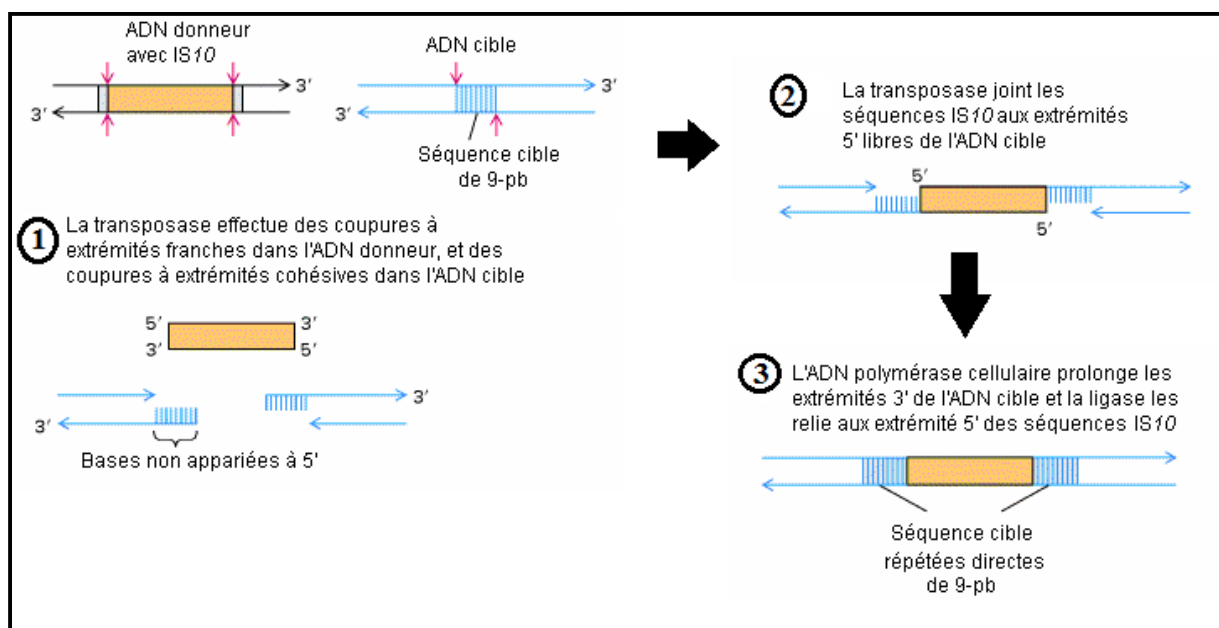


Figure 24. Model de la transposition conservative des séquences IS des bactéries.

2.2 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 (**Fig. 25a**). Cette transposition implique des événements d'auto-réplication 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 réplication, les extrémités sont ligaturées pour former un co-intégrat (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.

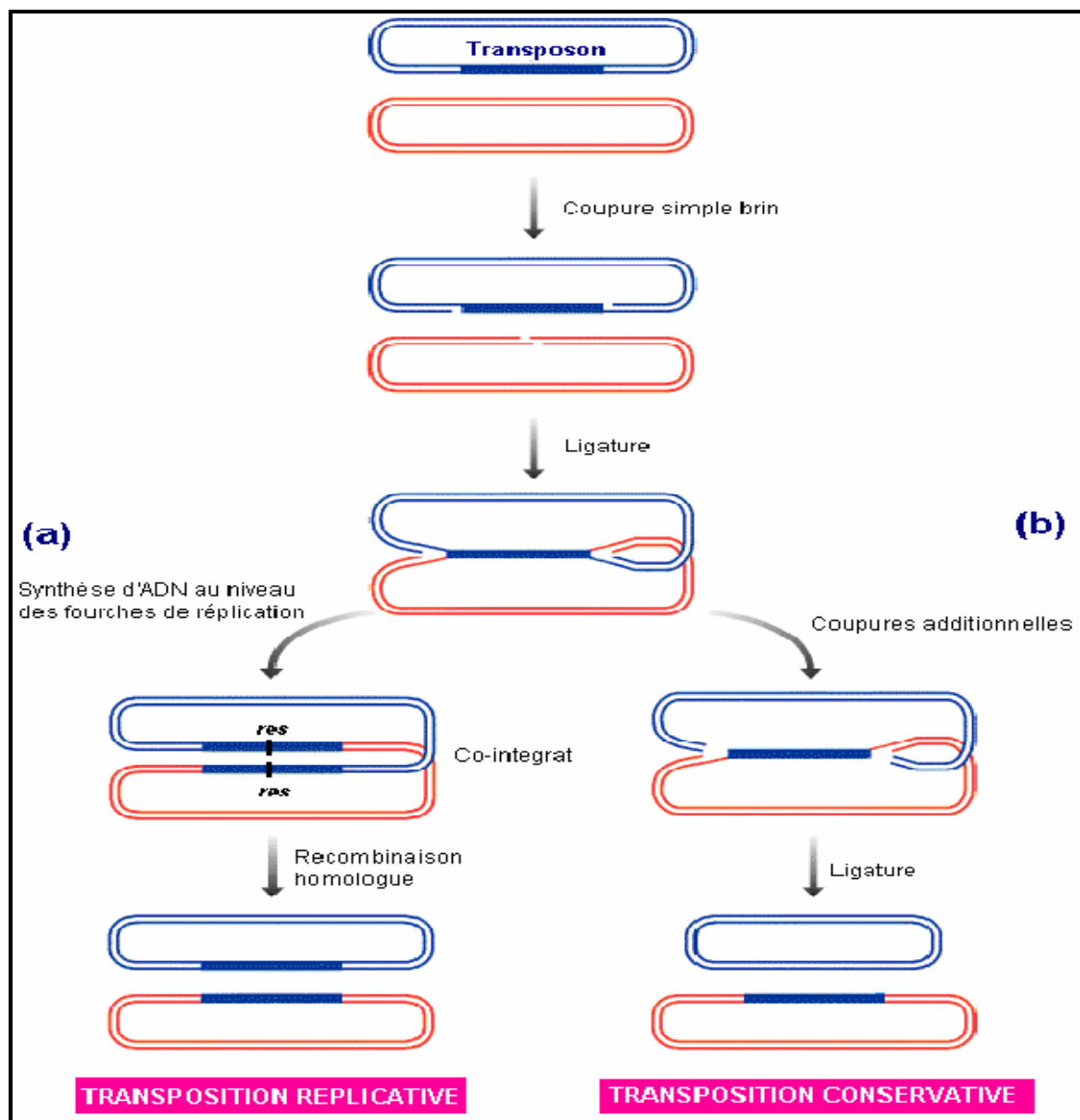


Figure 25. Model des deux mécanismes de transposition, (a) répllicative et (b) conservative.

Transfert génétique chez les bactéries

La biodiversité est le résultat des modifications du génome des différentes espèces au cours de l'évolution. Ces modifications chez les populations bactériennes peuvent poser un problème dans le traitement des infections bactériennes. Car ces dernières ont acquis des gènes de résistance à certaines molécules antibactériennes. Non seulement ces résistances sont un problème, mais les bactéries possèdent des mécanismes permettant le transfert de ces gènes à d'autres bactéries. Ainsi, une résistance (ou une mutation) apparaissant dans une cellule peut être transmise aux autres cellules.

C'est ainsi que la bactérie peut être l'objet de variations génétiques autres que la mutation, par des processus aussi différents que **la transformation, la transduction et la conjugaison.**

1 La transformation bactérienne

La transformation naturelle est le premier modèle connu de transfert génétique. Elle a été découverte par Frederik Griffith au cours de ses expériences sur l'infection des souris par les pneumocoques (*Streptococcus pneumoniae*). 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.

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 Les caractères de la transformation

Le transfert, qui est partiel et limité à quelques espèces bactériennes, entraîne l'acquisition par la bactérie réceptrice de nouveaux caractères génétiques stables et transmissibles.

1.1.1 La compétence de la bactérie réceptrice

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.

1.1.2 La taille de l'ADN

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.

1.1.3 La saturation

La fréquence de transformation augmente en fonction de la concentration de l'ADN et ceci jusqu'à saturation (Fig. 26).

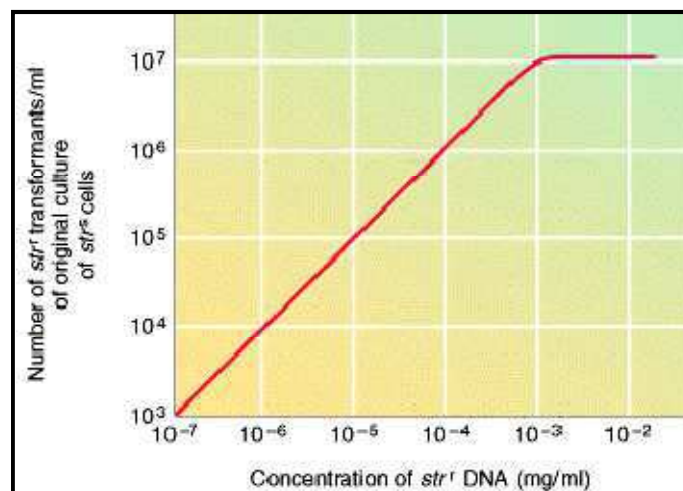


Figure 26. L'efficacité transformante de l'ADN exogène est fonction de sa concentration. (Exemple pris des souches d'*E. coli* sensibles à la streptomycines (*str*^s) transformées en cellules résistantes (*str*^r)).

1.2 Mécanisme de la transformation

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 homologue du génome et être intégré (Fig. 27).

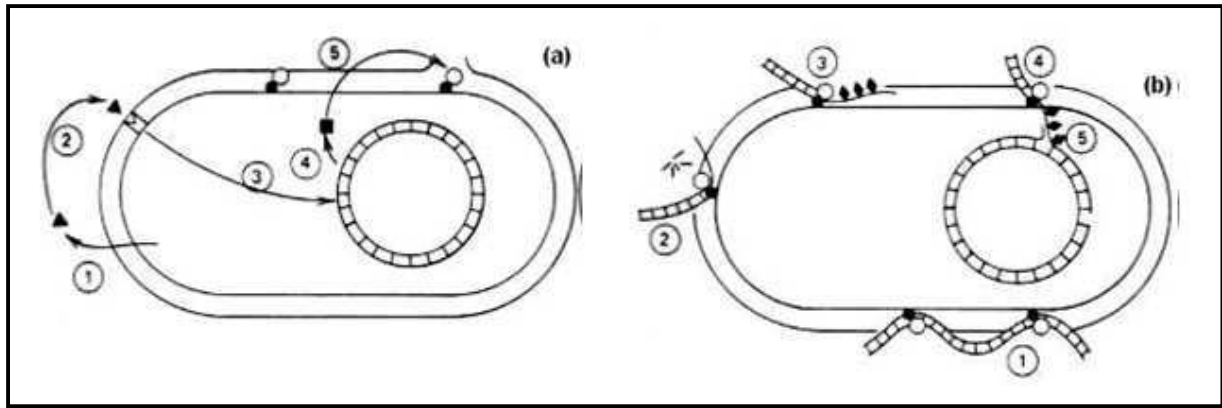


Figure 27. Schéma des événements conduisant à la transformation de *Streptococcus pneumoniae*.

(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 homologue de l'ADN de l'hôte.

2 La conjugaison bactérienne

La conjugaison est un mécanisme de transfert unidirectionnel de matériel génétique par contact entre deux cellules bactériennes (**Fig. 28**). Elle a été mise en évidence en 1946 suite à l'expérience effectuée par Lederberg et Tatum.

Lederberg et Tatum mélangèrent en milieu liquide des bactéries d'une souche *E.coli* biotine-, phénylalanine-,cystéine-, thréonine+, leucine+, thiamine+ et des bactéries d'une souche *E.coli* biotine+, phénylalanine+,cystéine+, thréonine-, leucine-, thiamine- (**Tab. I**). En étalant le mélange sur un milieu synthétique sans biotine ni phénylalanine ni cystéine ni thréonine ni leucine ni thiamine on obtenait une colonie pour environ 10^7 bactériesensemencées. Les bactéries formant ces colonies sont donc Biotine +, Phe +, Cys +, Thr +, Leu + et Thiamine +. Ces bactéries sont dites recombinantes car il y a obligatoirement eu transfert d'information génétique entre les deux souches initiales.

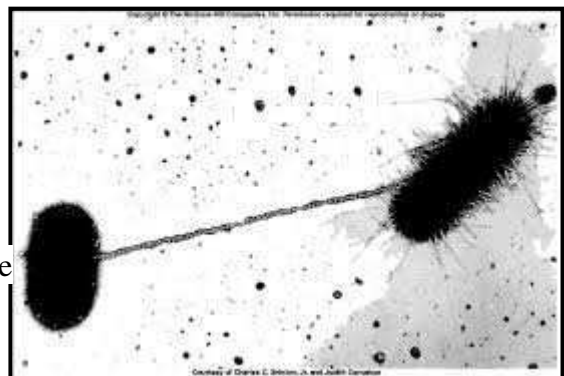


Figure 28. Mécanisme de la conjugaison bactérienne observé par un microscope électronique.

Tableau I. Phénotypes des souches d'*E. coli* utilisées dans l'expérience de Lederberg et Tatum

| Facteur de croissance | Souche 1 | Souche 2 |
|-----------------------|----------|----------|
| Biotine | - | + |
| Phénylalanine | - | + |
| Cystéine | - | + |
| Thréonine | + | - |
| Leucine | + | - |
| Thiamine | + | - |

Lederberg et Tatum n'avaient pas directement prouvé que le contact physique des cellules fût 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* (Fig. 29). 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 observée.

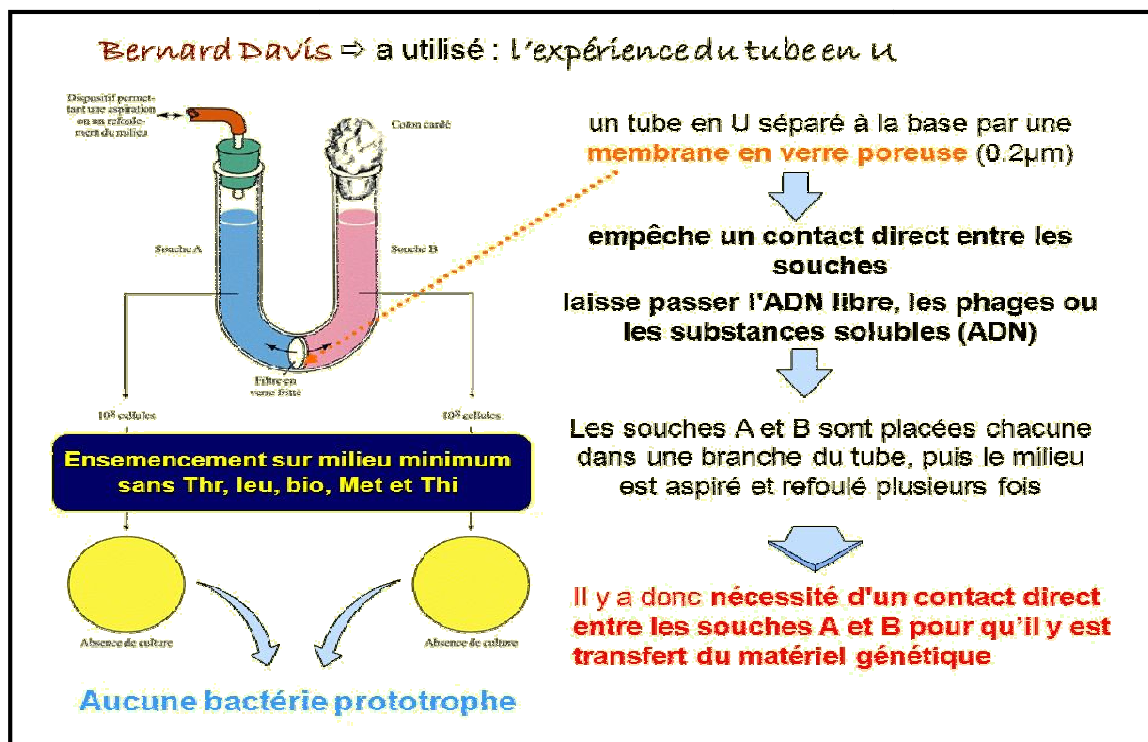


Figure 29. L'expérience du tube en U.

2.1 L'exemple du facteur F

A la suite des expériences de Lederberg et Tatum, Hayes montra en 1952 que le transfert de gènes s'effectue dans un sens déterminé, d'une cellule donneuse à une cellule receveuse. Le facteur F, ou facteur de fertilité, est un plasmide portant les gènes nécessaires à l'attachement cellulaire et au transfert de matériel génétique. Certains de ces gènes sont impliqués dans la formation des *pili* sexuels, responsables de la première étape de la conjugaison.

La souche donneuse est dite «F⁺» car elle possède ce facteur F. La souche receveuse est dite «F⁻» car elle ne le possède pas (et ne produit donc pas de *pili* sexuels). Au cours de la conjugaison (c'est à dire le croisement F⁺ x F⁻), le facteur F est répliqué et c'est une copie du plasmide qui est transférée (sous forme simple-brin) dans la cellule receveuse. Au terme de ce transfert (après répllication et recircularisation du plasmide), la cellule receveuse est devenue à son tour F⁺.

Dans ces conditions, la fréquence de recombinaison des gènes chromosomiques est faible, car le chromosome bactérien n'est que très rarement transféré dans la cellule receveuse. Le facteur F contient des séquences d'insertion permettant l'intégration du plasmide dans le chromosome de la cellule hôte (ce qui fait du facteur F un épisode). Dans le cas où le facteur F est intégré au chromosome bactérien, la cellule hôte est dite «Hfr», pour haute fréquence de recombinaison.

Cette cellule possède en effet un grand pouvoir de transfert de gènes chromosomiques. Au cours du croisement Hfr x F⁻, l'intégralité de la copie du chromosome de la cellule Hfr est rarement transférée à la souche F⁻, car le temps de contact nécessaire est trop important (100 minutes chez d'*Escherichia coli*). Le contact entre cellules est souvent rompu (rupture du pont cytoplasmique permettant le transfert) avant la fin du processus.

2.2 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.

2.2.1 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 (Fig. 30), 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. 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.

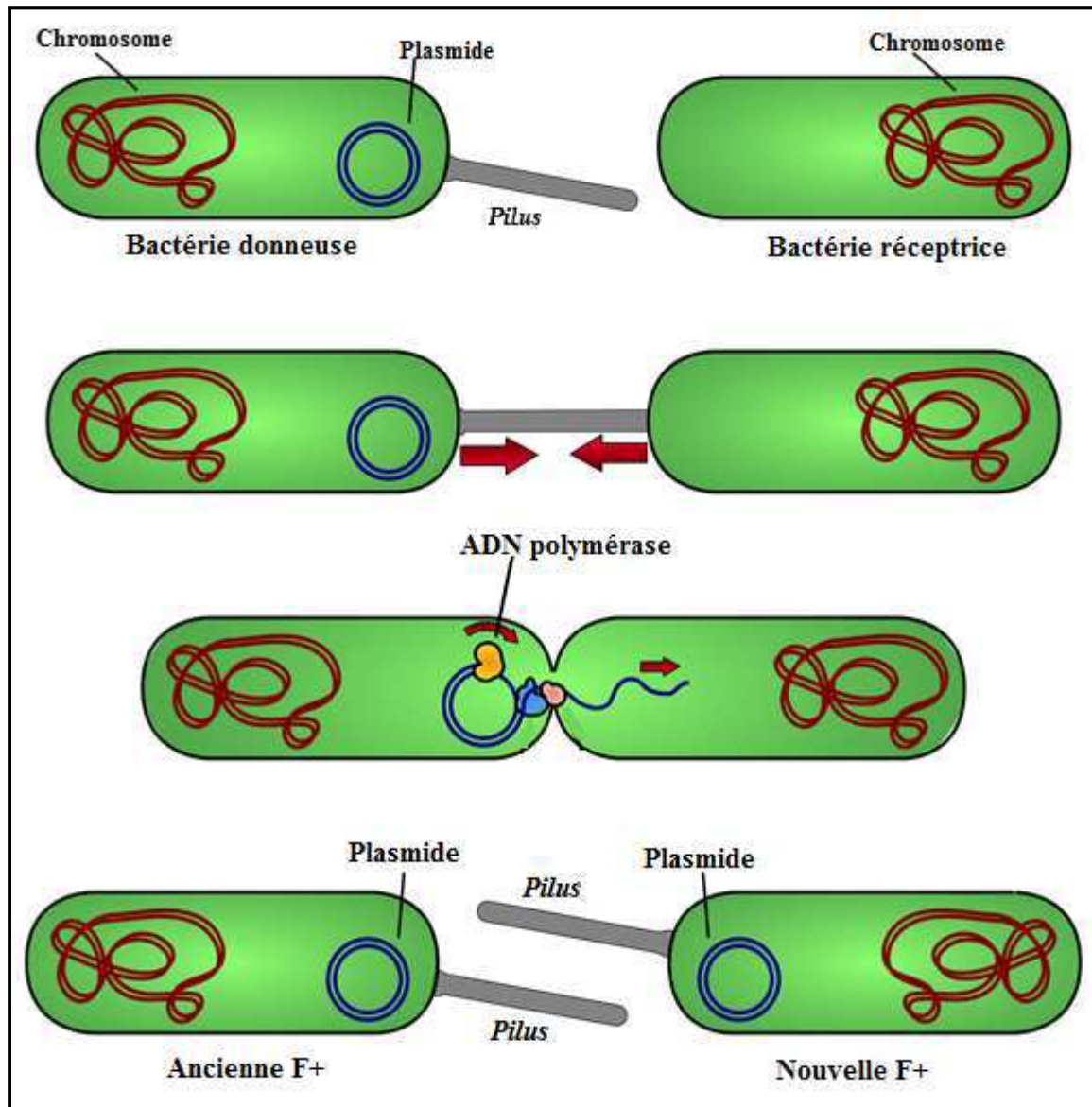


Figure 30. Mécanisme de la conjugaison bactérienne $F^+ \times F^-$

2.2.2 Le transfert conjugatif

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

2.2.2.1. 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 $5' \rightarrow 3'$ 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 (**Fig. 30**). 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.

2.2.2.2. Le transfert conjugatif Hfr x F^-

Une souche Hfr (Haute fréquence de recombinaison) résulte de l'intégration du facteur F dans le chromosome. L'insertion du facteur F se fait par crossing-over (**Fig. 31**). La recombinaison se fait entre deux sites IS (RSS). La conjugaison Hfr x F^- est un transfert d'ADN chromosomique qui est à sens unique, orienté, progressif et quelquefois total, a beaucoup de similitudes avec le transfert d'ADN extra chromosomique (plasmidique). La cellule bactérienne 'femelle' qui vient de se conjuguer avec une cellule bactérienne 'mâle' et qui contient un fragment d'ADN mâle (après recombinaison) est dite exconjugant.

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' (F prime).

Le facteur F' est dénommé d'après le gène qu'il porte. 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

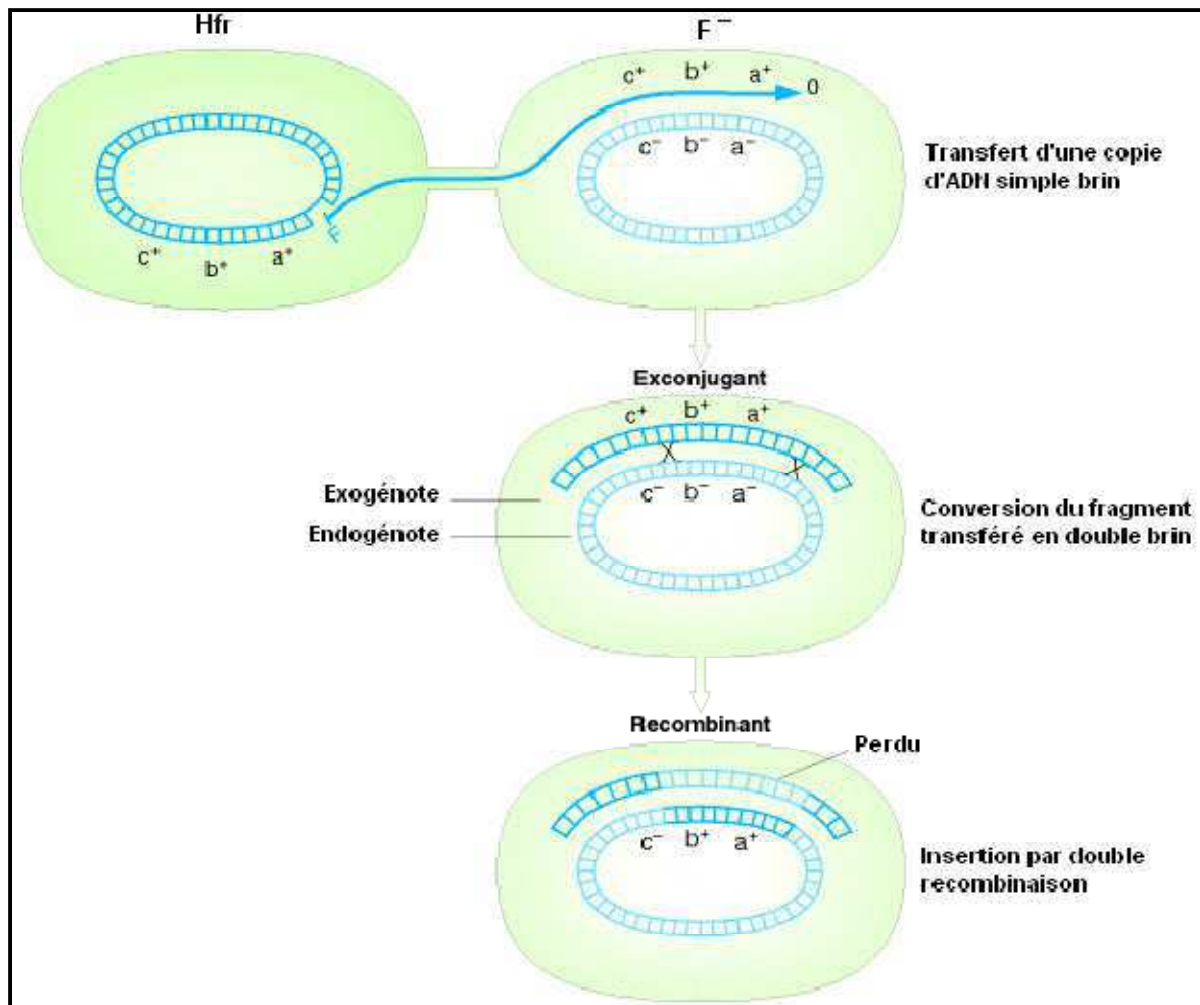


Figure 31. Le transfert conjugatif Hfr x F⁻ (recombinaison)

3 La transduction

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.

Les bactériophages (virus bactériens) participent à ce mode de transfert de gènes bactériens. Ils possèdent une capsidie protéique qui protège leur génome. Lorsqu'un phage infecte une bactérie, il introduit uniquement son matériel génétique dans le cytoplasme de celle-ci. Le génome viral a la capacité de forcer la bactérie à synthétiser de nouveaux constituants viraux (acides nucléiques et protéines) qui s'assemblent en nouveaux phages. La lyse de la bactérie libère les nombreux phages produits au cours de ce cycle lytique. Ces phages sont dits virulents. Au cours du cycle lysogénique par contre, le génome viral reste dans le chromosome de la cellule hôte sans s'exprimer et il est reproduit en même temps que le chromosome bactérien.

Ces phages sont dits tempérés car ils résident dans leur hôte sans le détruire, à l'état de prophage. Cependant, les conditions de l'environnement (ex : UV) peuvent modifier cet état et déclencher la multiplication du phage (induction).

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

3.1 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.

La transduction généralisée (**Fig. 32**) 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.

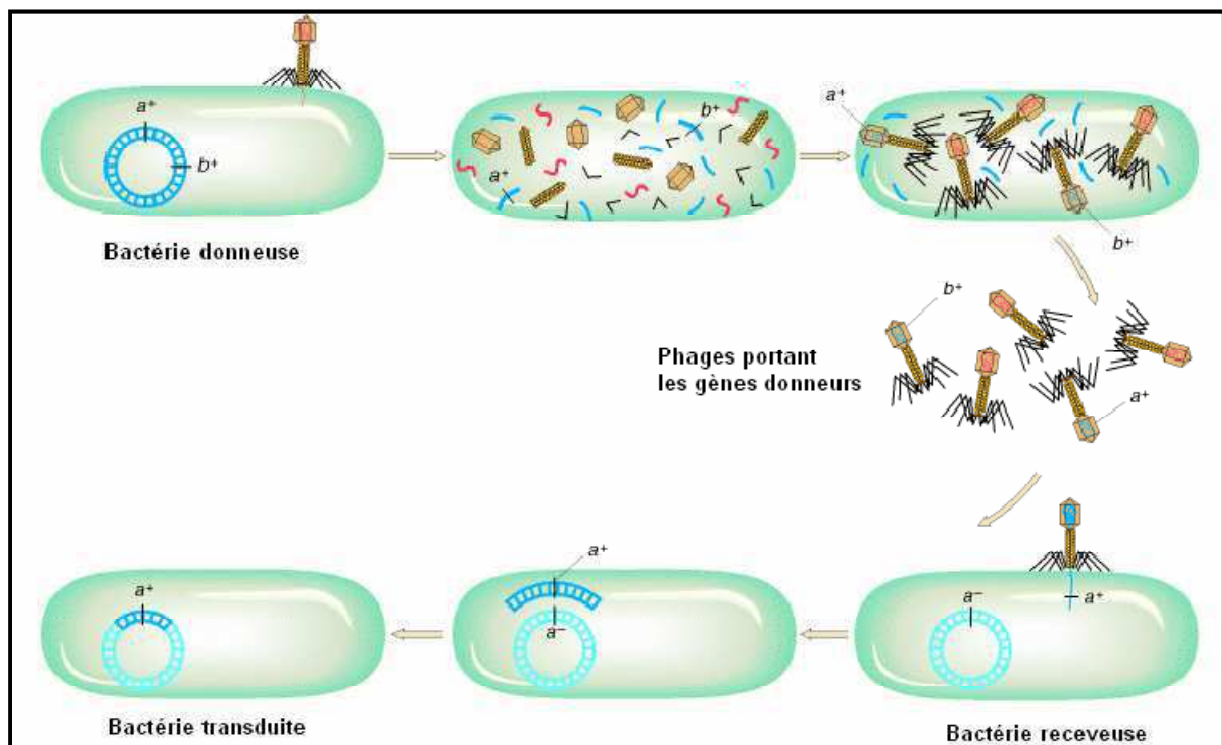


Figure 32. Mécanisme de la transduction généralisée.

Parce que la capsid 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 capsid. 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.

3.2 La Transduction spécialisée

La transduction spécialisée ou restreinte résulte d'une erreur dans le cycle lysogénique. Les gènes bactériens qui entourent le génome viral incorporé au nucléoïde, peuvent être incorporés dans les nouvelles capsides phagiques après induction. Ces nouveaux virus vont alors transporter ces gènes d'une bactérie à une autre : ce sont des transducteurs. Au moment de l'induction, l'excision du prophage est erronée et une partie adjacente du chromosome bactérien (5 à 10 % de l'ADN bactérien) est excisée également. Ce sont des phages transducteurs incomplets, car ils ne transportent qu'une partie du génome viral.

L'exemple de transduction spécialisée le mieux connu est celui du phage λ (**Fig. 33**). 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* bactériens 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 défectives. Ces dernières sont appelées **λ gal** 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 défectif 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 transduct 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_{dgal} 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 inducibles et s'excisent suite à une induction (radiation UV par exemple).

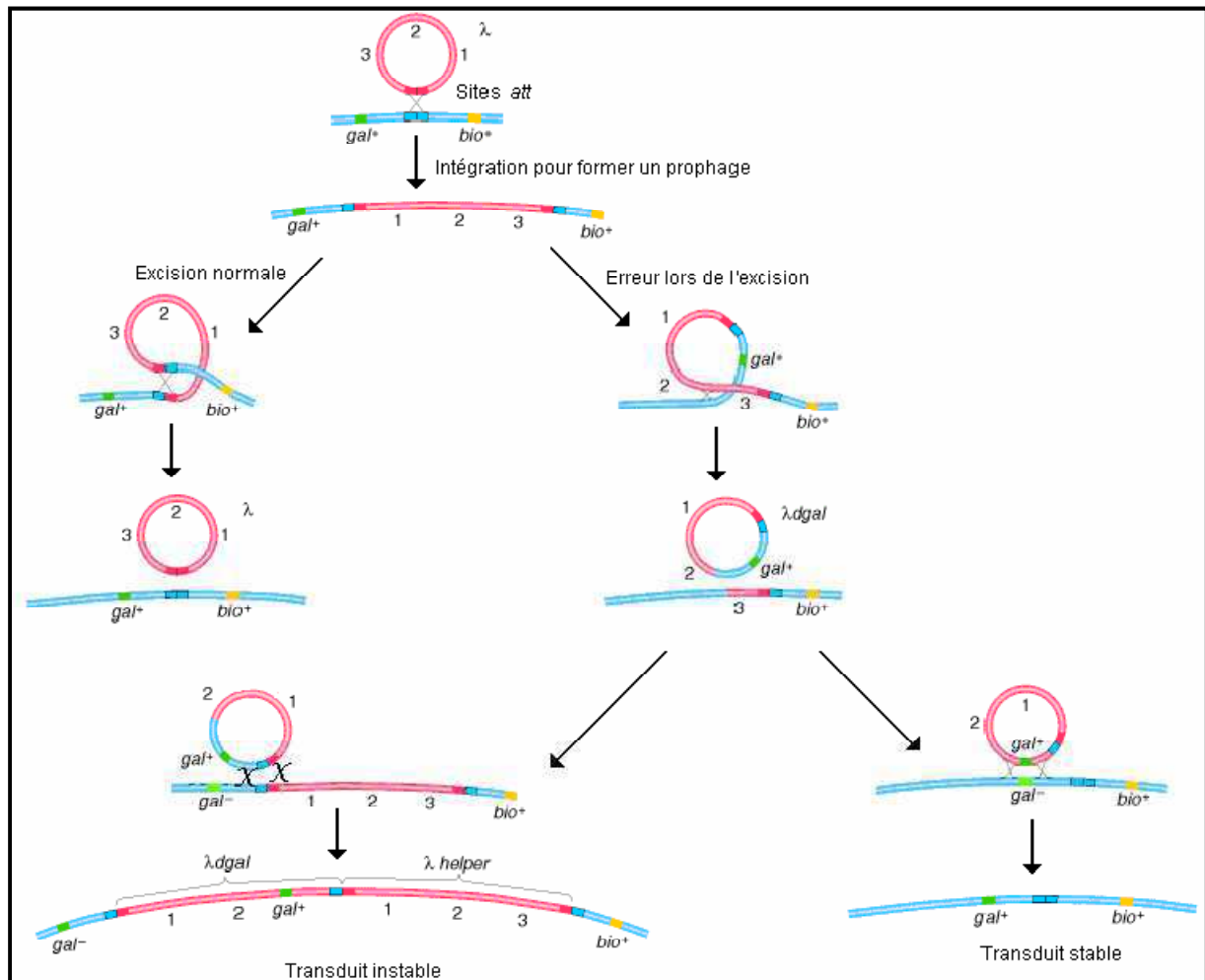


Figure 33. Le mécanisme de transduction pour le phage λ et *E. coli*.

*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.*

4 La cartographie

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.

4.1 Expérience du croisement interrompu chez *E. coli*.

Dans l'expérience du croisement interrompu, 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.

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 empêche de mener des étapes métaboliques spécifiques, alors que les cellules Hfr en sont capables (**Fig. 34**).

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'azote (*azi*), et leur capacité de croître sur galactose (*gal*) ou lactose (*lac*) comme seule source de carbone.

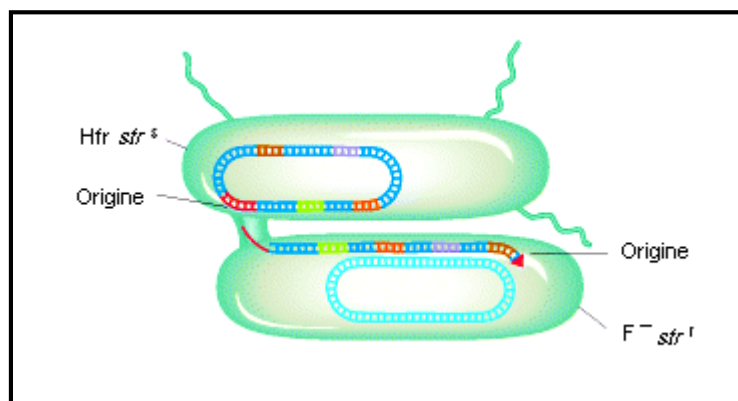


Figure 34. Transfert ordonné du chromosome Hfr au cours de la conjugaison.

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 (**Fig. 35**).

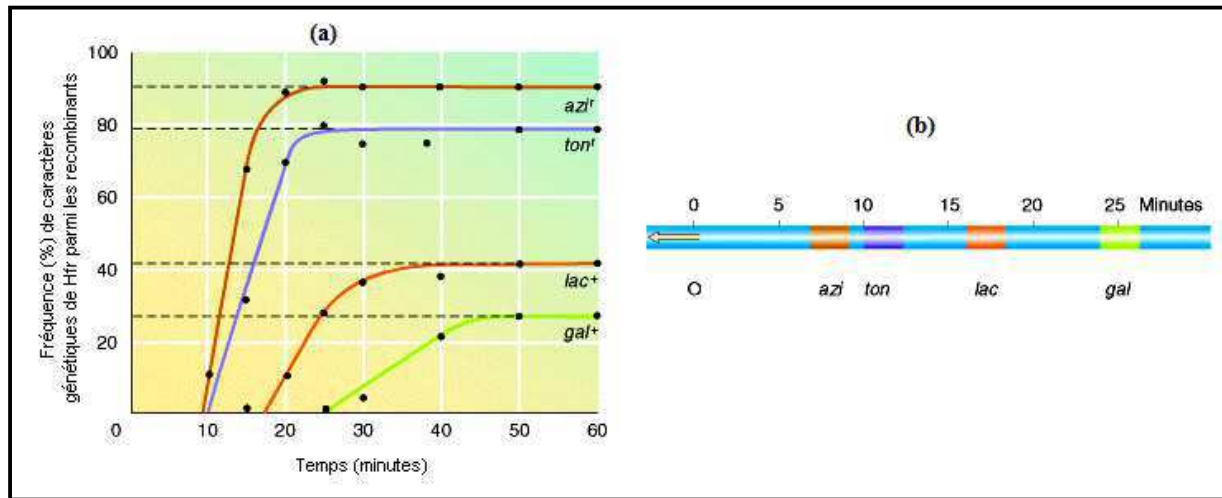


Figure 35. Expérience du croisement interrompu chez *E. coli*.

(a) Fréquence d'apparition des marqueurs génétiques *azir*, *tonr*, *lac⁺* et *gal⁺*, parmi les recombinants en fonction de la durée de conjugaison. (b) Carte génétique obtenue.

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 ralentit 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*.

Enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des protéines synthétisées par des bactéries pour se protéger des infections de virus (bactériophages). Ces enzymes coupent l'ADN viral à des endroits spécifiques. Ce mécanisme de résistance aux bactériophages, dénommé restriction, fut étudié par W. Arber à l'Université de Genève dans les années 60. Il obtint avec D. Nathans et H. Smith le prix Nobel de Médecine en 1978 pour la découverte et les applications des enzymes de restriction.

1 Les systèmes de restriction/modification

Trois systèmes de restriction/modification ont été décrits, selon leurs modes et sites d'action. Cependant un seul système est largement exploité dans les manipulations génétiques *in vitro* ; c'est le type II pour la précision du clivage, et son indépendance *vis-à-vis* des cofacteurs énergétiques.

Type I: Dont l'action nécessite la présence de Mg⁺⁺, d'ATP comme cofacteur, et de S-Adénosyle-méthionine. Leur site de coupure est éloigné de leur site de reconnaissance (jusqu'aux plusieurs milliers de nucléotides, plus loin dans certain cas).

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.

Type III: Ressemblent à celles du type I pour la séparation des sites de reconnaissance et de coupure, mais qui s'apparentent à celles du type II par leur mode d'action.

2 Nomenclature des enzymes de restriction

Comme toutes les enzymes, celles-ci portent des noms spécifiques qui ont été simplifiées depuis leurs découvertes. Cette nomenclature suit toutefois certaines règles :

- La première lettre du nom de genre, par exemple E (*Escherichia*)
- Les deux premières lettres du nom de l'espèce, par exemple co (*coli*).
- La quatrième concerne la souche bactérienne d'où est extraite l'enzyme en question.
- Le chiffre romain: indique l'ordre de la caractérisation de l'enzyme chez la même souche.

Exemple : **Hind III** c'est la troisième (**III**) Enzyme de restriction isolée et caractérisée de la souche bactérienne *Haemophilus influenza*.

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

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

3 Séquences cibles et modes de clivage

La plupart des endonucléases de restriction de type II, reconnaissent et clivent l'ADN dans des séquences particulières de quatre à huit nucléotides. Ces séquences ont un double axe de symétrie de rotation, sont similaires mais inversées : appelés palindromes. Ces enzymes reconnaissent et modifient et clivent des séquences différentes.

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 (**Fig. 36**). 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*.

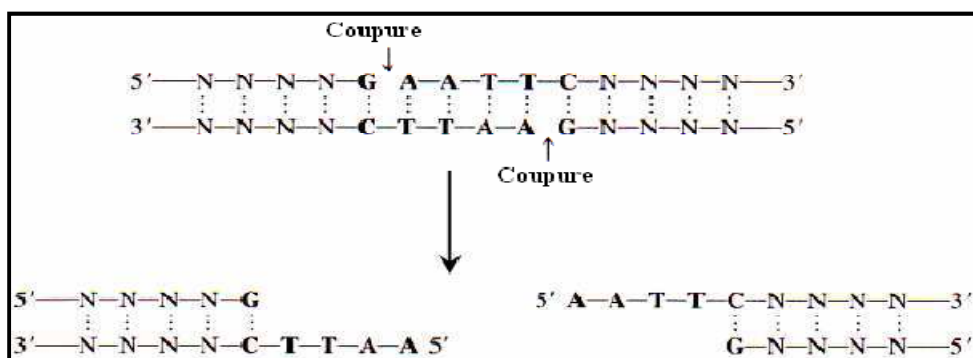


Figure 36. Le mode d'action de l'endonucléase *EcoRI* d'*E. coli*.

D'autres enzymes, comme *Hae III*, coupe la séquence reconnue au niveau de son axe de symétrie, ce qui produit des extrémités non cohésives dites *à bouts francs*. (Fig. 37).

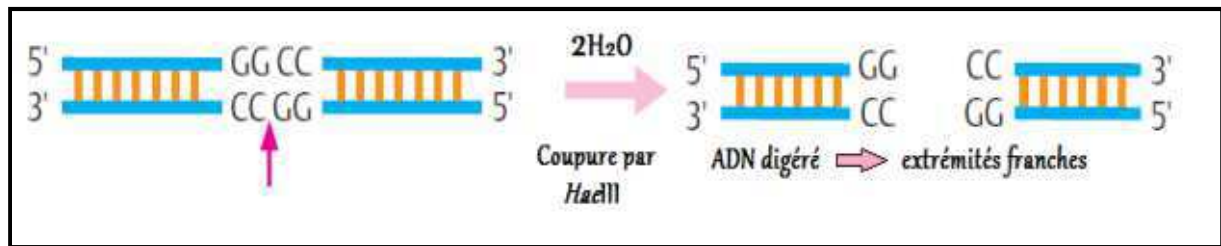


Figure 37. Le mode d'action de l'endonucléase *Hae III*.

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.

4 Rôle des systèmes de restriction/modification

Les systèmes de restriction permettent aux bactéries de surveiller l'origine de l'ADN entrant et de le détruire s'il est reconnu comme étrangère. Les endonucléases de restriction reconnaissent spécifiquement des séquences dans l'ADN entrant et clivent l'ADN en fragments, soit à des sites spécifiques ou plus aléatoire. La méthylation peut réduire la sensibilité des ADN au clivage par des endonucléases de restriction et l'efficacité de la transformation de l'ADN.

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.

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).

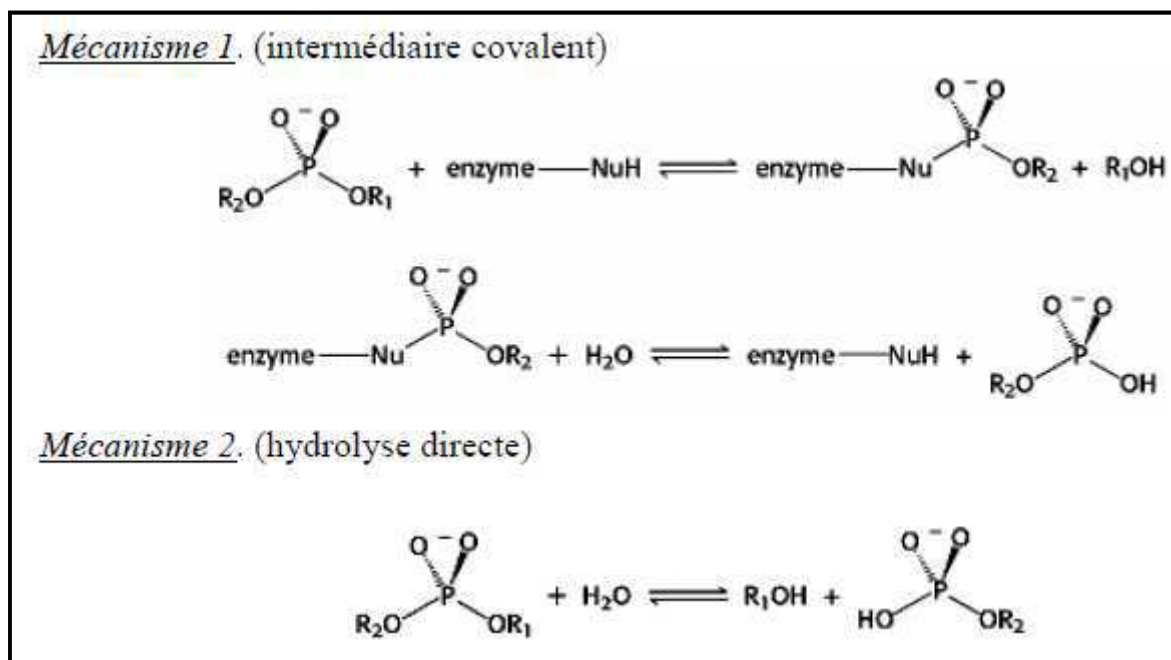


Figure 38. Mécanismes réactionnels des endonucléases de restriction.

5 Applications des enzymes de restriction (Carte de restriction)

Les enzymes de restriction peuvent être utilisées pour établir une carte génétique (appelée « carte de restriction ») d'une molécule d'ADN. La carte de restriction donne l'ordre des sites de restriction le long de cette molécule, et la taille des fragments produits.

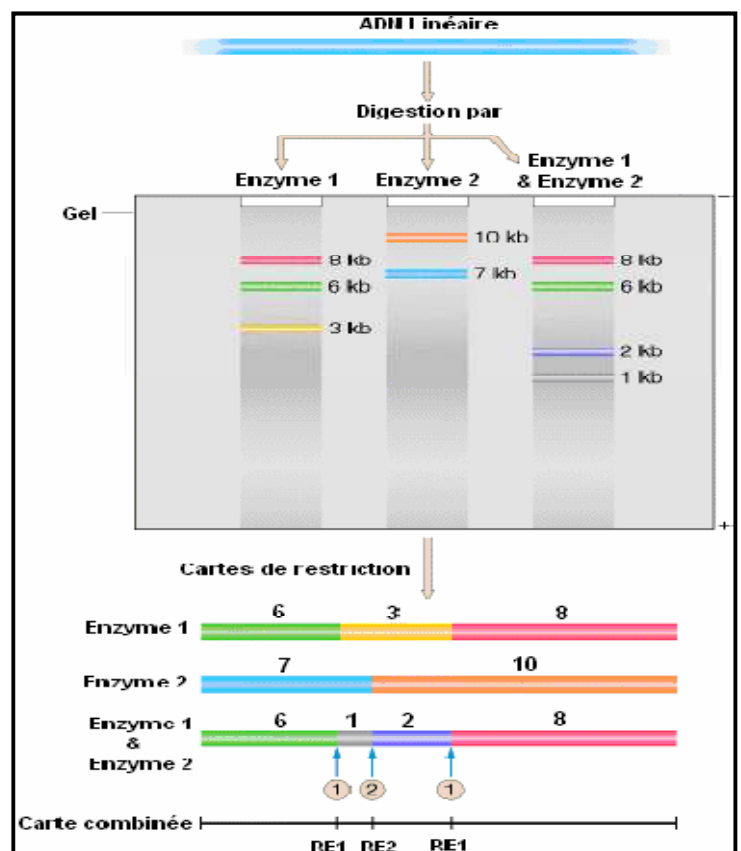
Cette cartographie a trouvée de nombreuses applications, comme la détection d'une maladie génétique, en médecine légale, recherche de la paternité. En effet, la RFLP (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction) couplé à une PCR permet l'établissement de l'empreinte génétique. Après isolement et purification de l'ADN, celui-ci est incubé avec différentes enzymes de restriction. Les produits de digestion sont alors séparés par électrophorèse et comparés avec un marqueur de taille lorsqu'il s'agit de déterminer les fragments d'un gène donné.

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 (**Fig. 39**).

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 39. Les étapes suivies pour établir une carte de restriction.

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.



Régulation de l'expression des gènes

Pour transcrire leurs gènes, les bactéries possèdent une ARN polymérase. Il s'agit d'un complexe enzymatique de 450 kDa, constitué de 5 sous-unités (α , α , β , β' , σ).

Le facteur σ est capable de reconnaître les séquences consensus des promoteurs qui permettent le démarrage de la transcription. Cependant, seuls les gènes codant pour les protéines constitutives sont exprimés de manière constante, les enzymes de la glycolyse par exemple. Il existe donc une régulation permettant à la cellule de ne synthétiser que les enzymes qui lui sont nécessaires, en fonction de la nature du milieu. Ce contrôle est effectué au niveau transcriptionnel selon deux modes principaux : l'induction et la répression.

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.

1 Régulation transcriptionnelle

1.1 Le modèle de l'opéron

Un opéron est une unité d'ADN fonctionnelle regroupant des gènes qui opèrent sous le signal d'un même promoteur, une section d'ADN qui déclenche leur transcription. Les gènes sont ainsi transcrits en ARN messager ensemble et concourent à la réalisation d'une même fonction

Une séquence régulatrice en amont de cette unité détermine si l'opéron sera ou non transcrit. Cette séquence est appelée l'opérateur (**Fig. 40**). 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.

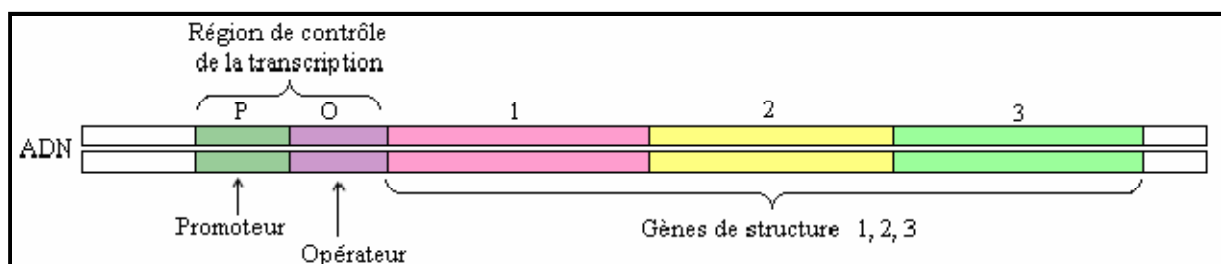


Figure 40. Organisation générale de l'opéron.

1.2 L'opéron lactose

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.

Lorsqu'une souche d'*E. coli* est cultivée dans un milieu contenant du glucose puis transférée dans un milieu contenant du lactose, elle se met à synthétiser une enzyme jusqu'alors indétectable : la β -galactosidase (qui catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose). On dit que le lactose est un inducteur : sa présence dans le milieu augmente la quantité de β -galactosidase, mais aussi de β -galactoside perméase et de thiogalactoside transacétylase

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***) (Fig. 41).

Au laboratoire, le déficit en β -galactoside perméase est mis en évidence par le test ONPG: une souche bactérienne apparaissant lactose⁺ sur milieu lactosé (Kligler-Hajna, BCP-lactose, Drigalski...) possède les deux enzymes (β -galactosidase et β -galactoside perméase), dans ce cas le test ONPG est inutile. Par contre, une souche bactérienne apparaissant lactose⁻ sur milieu lactosé peut être soit ONPG⁺ (β -galactosidase⁺ et perméase⁻) ; soit ONPG⁻ (β -galactosidase⁻ et perméase⁻).

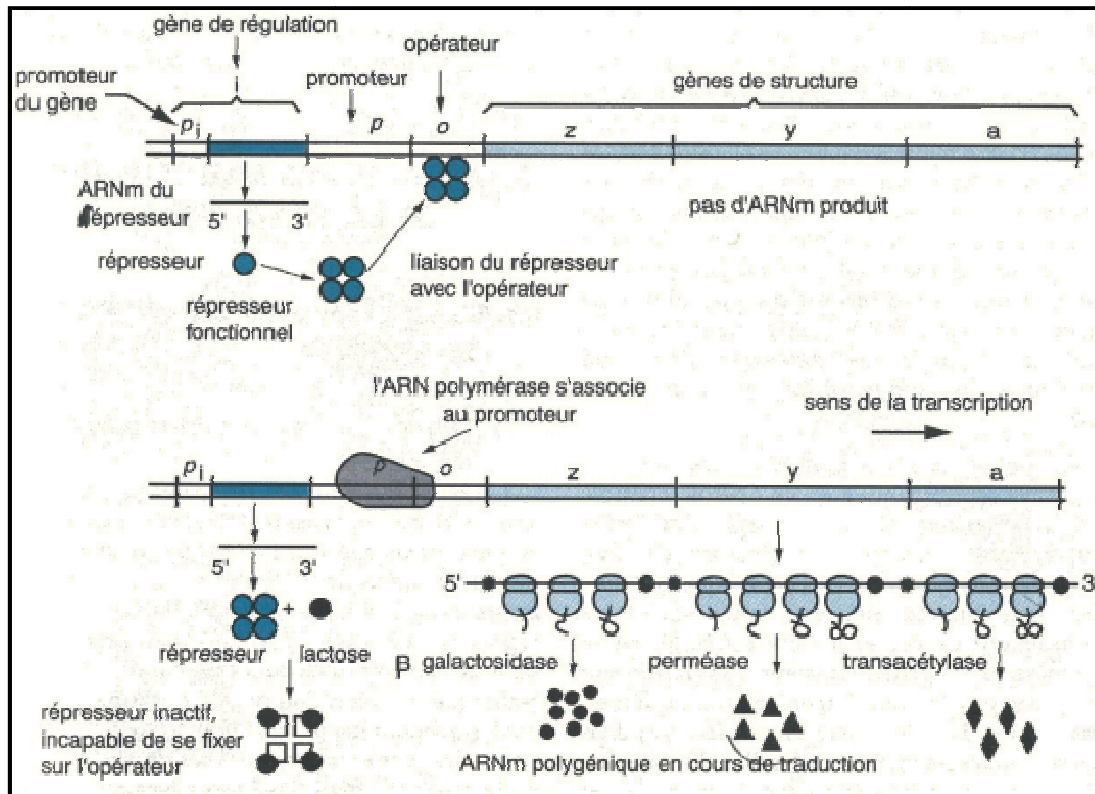


Figure 41. Structure et fonctionnement de l'opéron Lac chez *E. coli*.

1.2.1 La régulation négative

La transcription des Opérons chez les procaryotes est contrôlée par induction et répression. L'expression de l'opéron est déterminée par l'accès de l'ARN polymérase au promoteur, et l'occupation de l'opérateur par des protéines régulatrices influençant cet accès. L'induction active la transcription à partir du promoteur ; alors que la répression l'empêche.

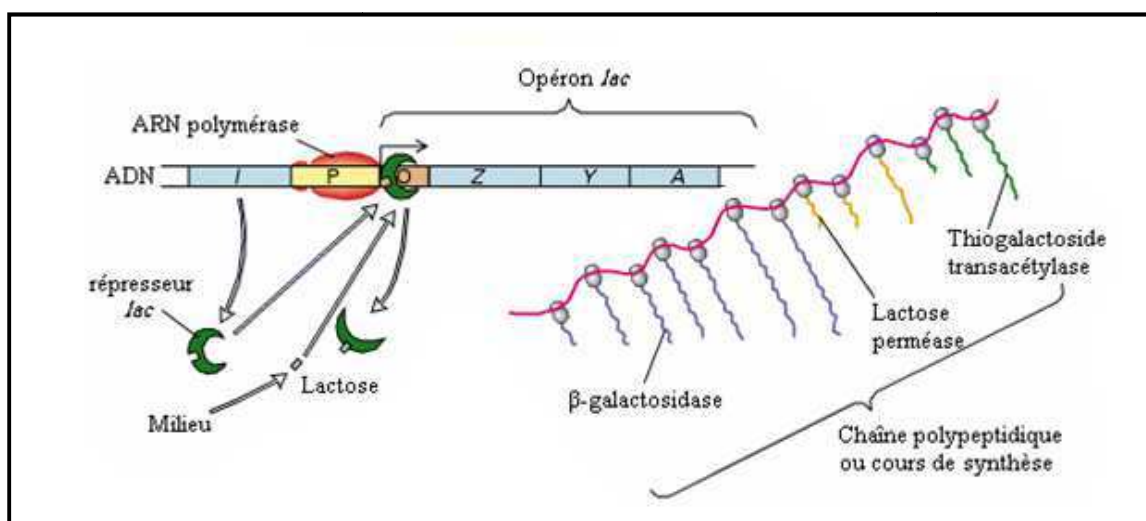


Figure 42. Régulation négative de la transcription de l'opéron *lac* par un répresseur *lac*.

La répression 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 (**Fig. 42**).

1.2.2 La régulation positive

La transcription par l'ARN polymérase de certains promoteurs se fait avec une faible efficacité, à moins d'être assistée par une protéine accessoire qui agit comme un régulateur positif. Une telle protéine est dite CAP, ou protéine activatrice du catabolisme.

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 glucose, l'utilisation du lactose est réprimée. Ce phénomène est connu sous le nom de *répression catabolique*.

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 (**Fig. 43**).

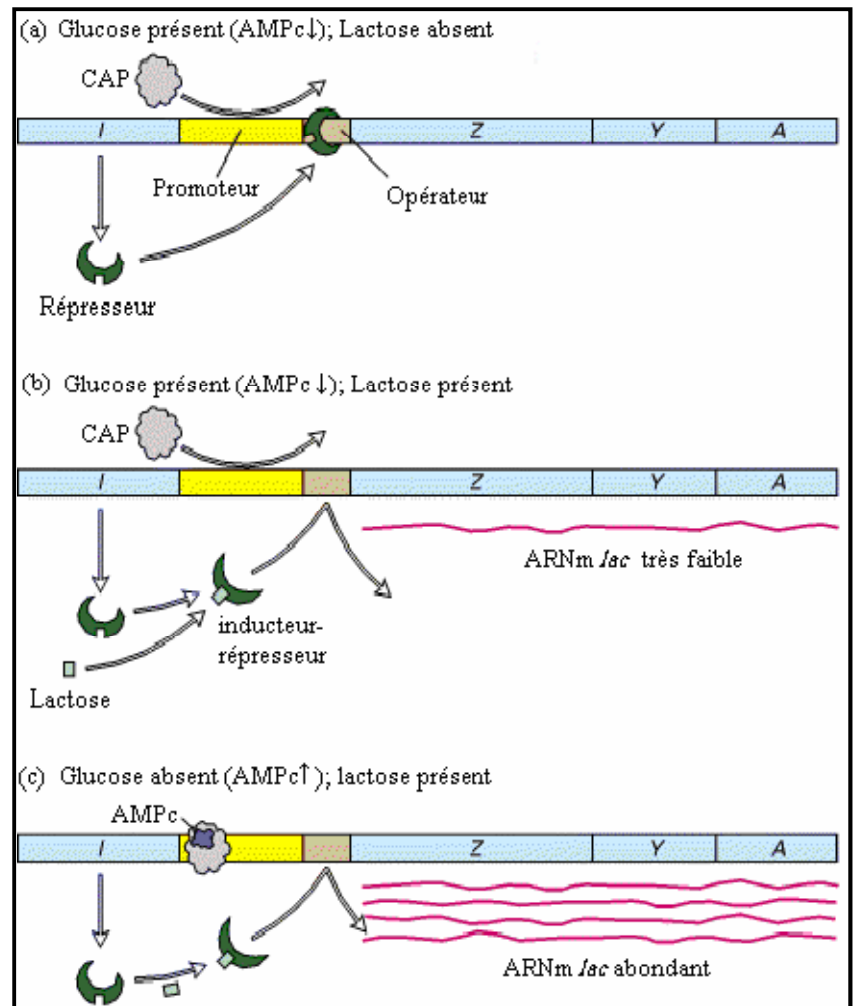
La concentration de l'AMPc est régulée par le glucose. Le transport du glucose dans la cellule s'accompagne d'une inactivation de l'adénylate cyclase d'*E. coli*, ce qui aboutit à la diminution de la concentration de l'AMPc. L'action de CAP en tant que régulateur positif est dépendante de l'AMPc.

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-*plac*.

L'ARN polymérase et le complexe CAP-(AMPc)₂, seuls, ont une affinité relativement faible pour leurs sites de liaison sur *plac*, 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 *plac*.

Figure 13. Régulation négative de la transcription de l'opéron *lac*.

(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.



1.3 L'opéron tryptophane

Lorsqu'une souche prototrophe d'*E. coli* est cultivée dans un milieu minimum, elle fabrique tous ses constituants organiques à partir de la seule source de carbone disponible. Si du tryptophane est ajouté à ce milieu minimum, la cellule cesse de fabriquer les enzymes qui interviennent dans la synthèse de cet acide aminé. Les gènes codant pour ces enzymes font partie de l'opéron tryptophane. 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 (**Fig. 44**).

Un gène régulateur commande la synthèse d'un répresseur inactif qui n'est capable de se fixer sur l'opérateur qu'en présence de tryptophane, qui constitue le corépresseur. La présence du complexe répresseur – corépresseur sur l'opérateur empêche la transcription des gènes intervenant dans la biosynthèse du tryptophane.

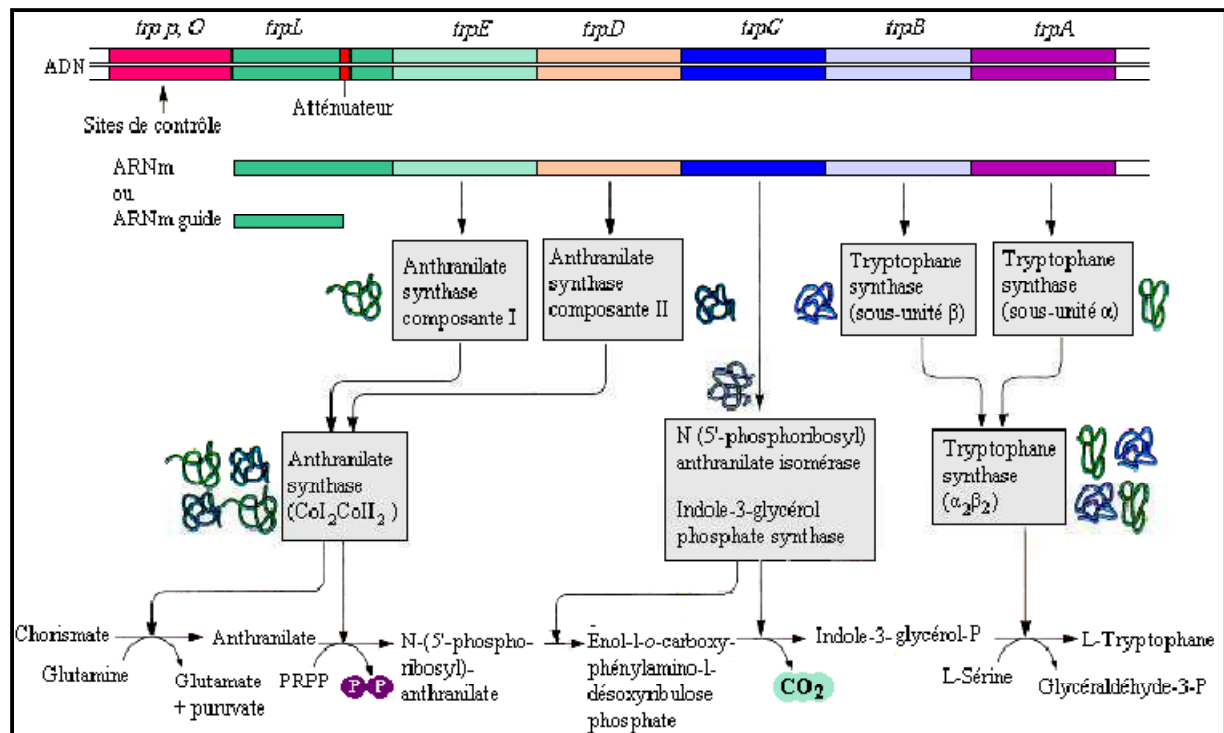


Figure 44. L'opéron tryptophane chez *E. coli*.

1.3.1 La répression

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 (Fig. 45).

1.3.2 L'atténuation

L'atténuation dépend du fait que la transcription et la traduction sont étroitement couplées. Chez *E. coli* les opérons de biosynthèse des acides aminés (Ex. Tryptophane) sont contrôlés par ce mécanisme. Le phénomène d'atténuation contrôle la décision de transcrire un ARNm entier. Si les taux de tryptophane sont élevés, la plupart des transcrits terminent leur synthèse de façon Activateur/Répresseur

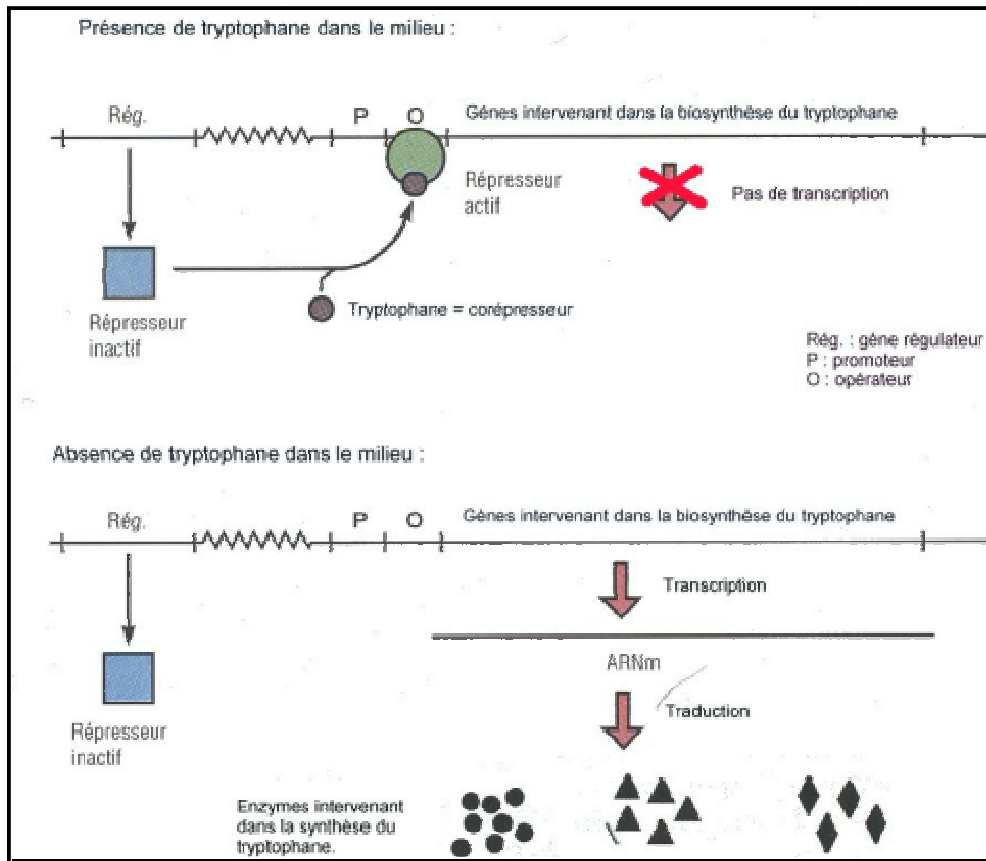


Figure 45. Mécanisme de répression dans l'opéron *trp* chez *E. coli*.

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 (**Fig. 46**). 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.

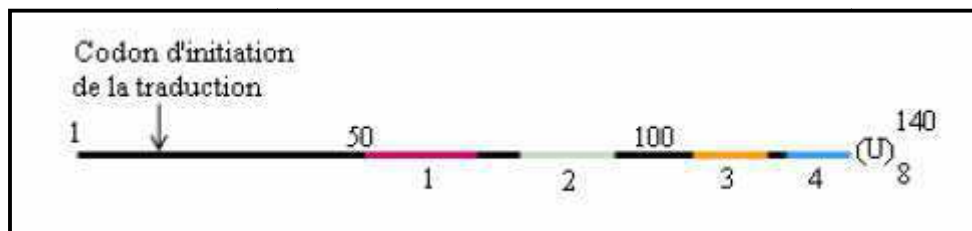


Figure 46. Séquence guide de l'opéron *trp*.

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 un 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.

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 (**Fig. 47**), il y a suffisamment de tryptophanyl-ARNt pour la synthèse protéique.

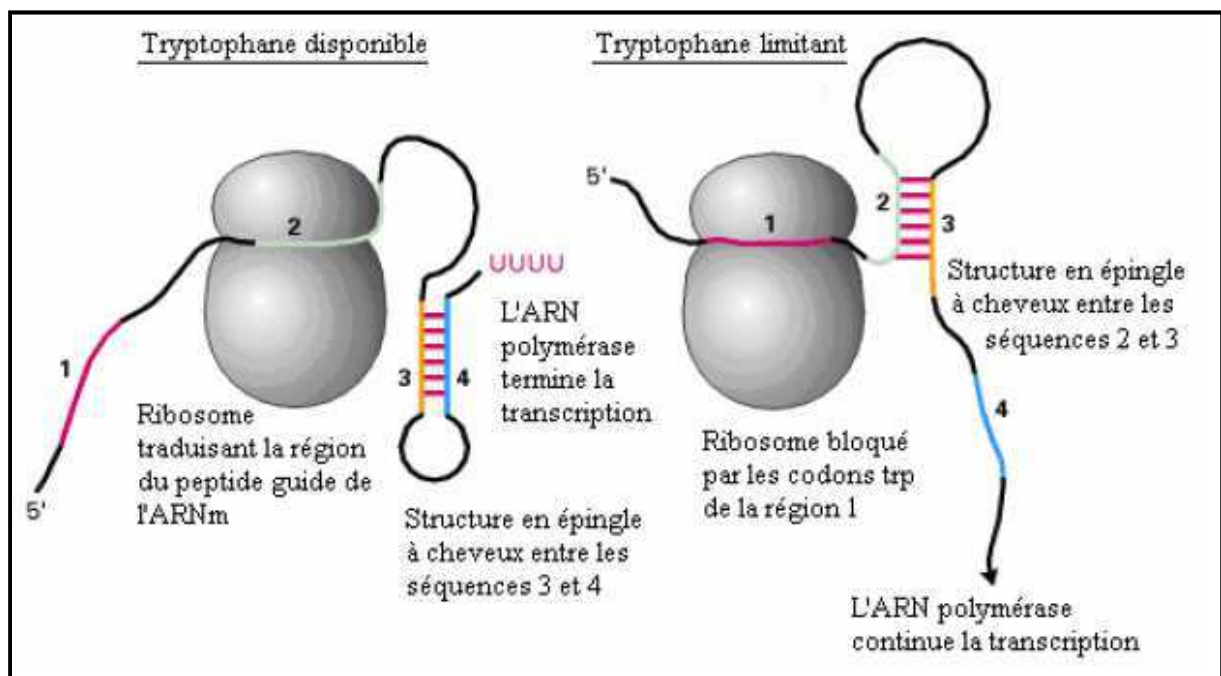


Figure 47. Mécanisme de l'atténuation de la transcription de l'opéron *trp*.

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.

2 Régulation traductionnelle

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.

Génétique des bactériophages

Par définition, ce sont les virus des bactéries. Chaque bactérie possède son propre phage. Ils sont facilement isolables car ils se développent parallèlement aux bactéries. Ils se retrouvent dans les déchets, sols, excréments des Hommes et animaux et même dans des zones extrêmes (dorsales océaniques, sources thermiques, ...).

Les bactériophages sont mis en évidence en 1896 par HANKIN qu'il travaillait sur le Gange (Inde) où il avait remarqué qu'il y avait peu de bactéries par rapports aux risques de contamination. En travaillant sur *Vibrio cholerea* il a isolé un « potentiel anti-bactérien » par filtration sur un filtre de porcelaine (absence de bactéries sur le filtre mais présence d'un « potentiel anti-bactérien »).

Ces travaux ont été repris par Félix d'HERELLE qui a mis en évidence qu'il s'agit « d'entités biologiques » qui sont capables de détruire des cultures bactériennes, en 1922 ces entités sont nommées « **Bactériophage** ».

Les phages sont constitués d'une molécule d'acide nucléique (ADN mono ou bicaténaire ou ARN monocaténaire) qui constitue leur génome, incluse dans une enveloppe protéique, la capside.

La plupart des phages se placent dans l'un des groupes morphologiques suivants : les phages icosaédriques sans queue, les virus à queue contractile, les virus à queue non contractile et les phages filamenteux. Il existe quelques phages avec enveloppe. Les formes les plus complexes sont les phages portant une queue contractile, comme le phage T4 d'*E. coli* (**Fig. 48**).

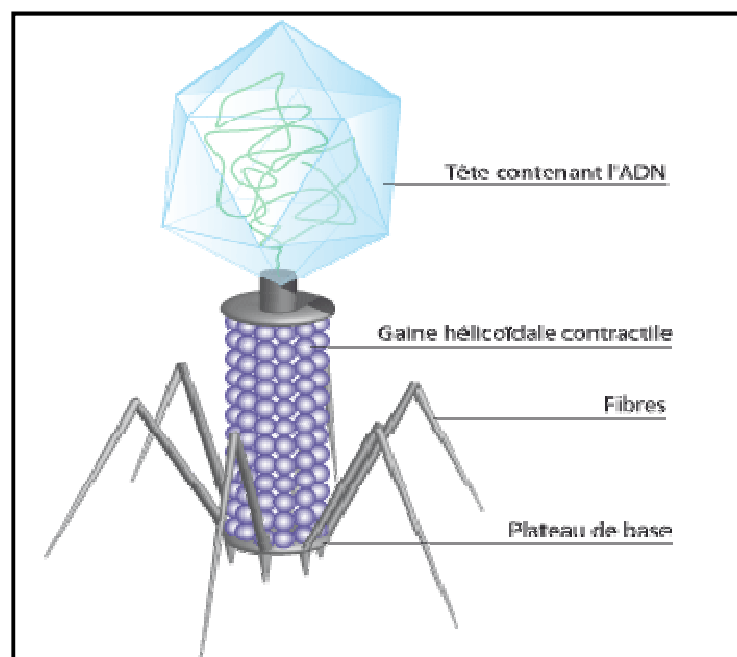


Figure 48. Structures de phage T4 d'*E.coli*.

1 Structures de bactériophages

Depuis les surprenantes images de bactériophages "en forme de têtards" observées au microscope électronique par les premiers expérimentateurs (Ruska, en 1941, Luray 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 ultra-structurale de ces virus (**Fig. 49**).

Actuellement on peut réunir les bactériophages en trois grands groupes morphologiques: cubique, filamenteux et mixte.

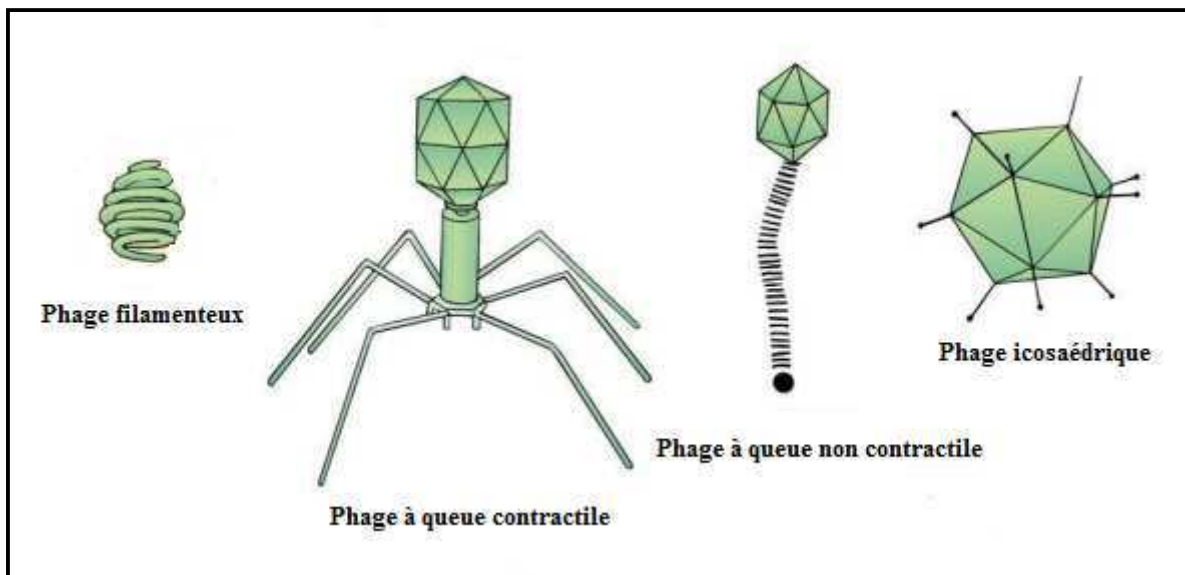


Figure 49. Structures morphologiques de bactériophages.

- **La taille:** La plupart des phages ont des tailles situées entre 24 et 200 nm de longueur. T4 est parmi les phages les plus gros ; il fait approximativement 200nm de long et 80 à 100nm de large. D'autres phages sont plus petits.

- **Tête et capsid:** Tous les phages contiennent une structure appelée tête qui varie en taille et en forme. Certaines sont icosaédrales (20 faces) et d'autres sont filamenteuses. La tête ou capsid est composée de différentes copies d'une ou plusieurs protéines. À l'intérieur de la tête on trouve l'acide nucléique. La tête agit comme une couverture protectrice de l'acide nucléique.

- **La queue:** Une grande partie mais pas tous les phages possèdent une queue attachée à la tête du phage. La queue est un tube creux à travers lequel passe l'acide nucléique lors de l'infection. La taille de la queue peut varier et certains phages n'ont même pas de structure en

queue. Dans les phages plus complexes comme T4 la queue est entourée par une gaine contractile qui se contracte pendant l'infection de la bactérie. A la fin de la queue, les phages plus complexes comme T4 possèdent une lame basale et une ou plusieurs fibres caudales attachées à cette structure. La lame basale et les fibres caudales sont impliquées dans l'attachement du phage à la cellule bactérienne. Tous les phages n'ont pas de lame basale et de fibres caudales. Dans ces cas là d'autres structures sont impliquées dans l'attachement de la particule de phage à la bactérie.

- **Matériel génétique:** Les phages sont constitués d'une molécule d'acide nucléique (ADN mono ou bicaténaire ou ARN monocaténaire) qui constitue leur génome, incluse dans une enveloppe protéique, la capsid. La taille des génomes de phages varie de 4 000 bases (le génome est un ARN monocaténaire pour MS2) à 200 000 paires de bases environ (phage T2).

2 Classification des bactériophages

Le monde scientifique a rapidement cherché à jeter les bases d'une classification des phages. La description morphologique a été possible grâce à l'avènement de la microscopie électronique à partir de 1942. Cependant la nature des critères à prendre en compte dans la description des morphotypes n'étant pas définie, des redondances sont apparues dans les travaux.

En 1962, Lwoff, Horne et Tournier ont proposé un schéma de classification basé sur la morphologie des virions, ainsi que la nature de leur acide nucléique, et une nomenclature utilisant des noms en latin

Les bactériophages sont divisés en six grands morphotypes (groupe A à F), selon l'aspect de leur capsid et la nature biochimique de leur génome (**Tab. III**).

Le groupe A : Regroupe les phages ayant une tête icosaédrique, et possédant une queue contractile munie de fibres et de spicules.

Le groupe B : Regroupe les phages différents de ceux du groupe A par la présence d'une queue non contractile, dotée de fibres plus courtes.

Le groupe C : Les phages de ce groupe sont également caudés mais l'appendice est court, et non contractile.

Les groupes D et E : Regroupent les phages qui sont dépourvus de partie caudale et ressemblent plus à certains virus humains. Ils possèdent une tête icosaédrique, et se

différencient l'un de l'autre par la nature biochimique de leur acide nucléique. Les premiers sont à ADN et les seconds à ARN.

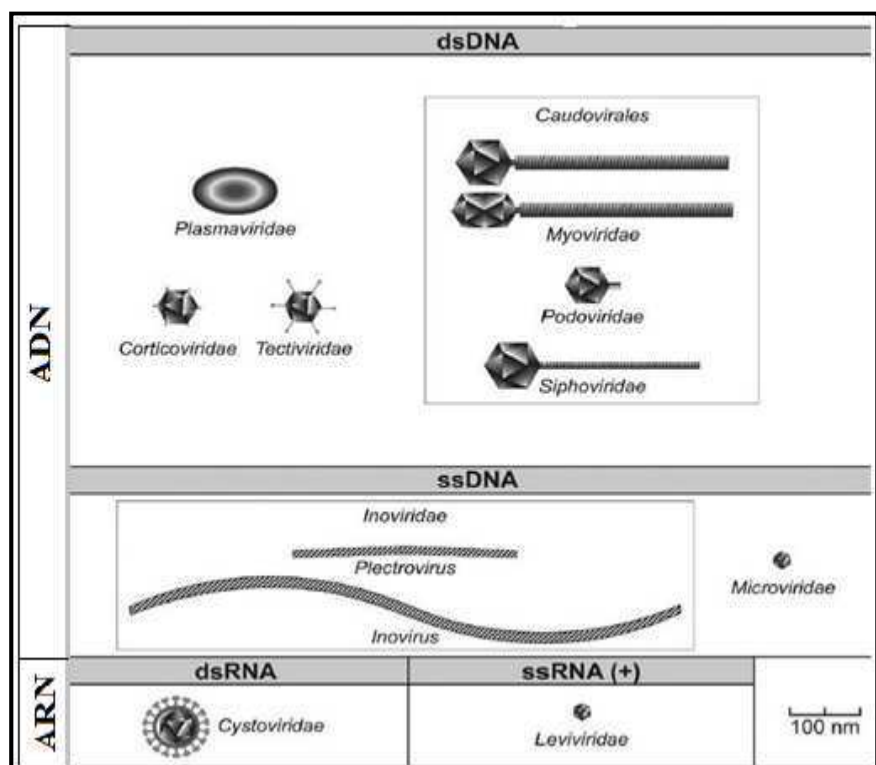
Le groupe F : Regroupe les phages filamenteux, qui, à l'époque n'avait qu'un seul représentant.

Tableau III. Caractéristiques de groupes de bactériophages.

| Groupe | Caractéristiques | | Exemples |
|--------|--------------------------------|------------------------------|---------------------|
| | Forme | Acide nucléique | |
| A | Queue contractile | ADN bicaténaire linéaire | Phage BP-I et T4 |
| B | Queue non contractile | ADN bicaténaire linéaire | Phage λ, T3, T5, T7 |
| C | Sans queue, tête icosaoédrique | ADN monocaténaire circulaire | Phage φ×174 |
| D | Sans queue | ARN monocaténaire linéaire | Phage R17, ZIK/Z |
| E | Filamenteux | ADN monocaténaire circulaire | Phage M13 |

Les bactériophages sont classés en 10 familles, dont trois constituent l'ordre des *Caudovirales* ; cet ordre constitue 96,3 % de ces phages, et est composé des familles *Myoviridae*, *Siphoviridae*, et *Podoviridae*. Ces familles correspondent respectivement au groupe A, B et C de la classification de Bradley. Leur matériel génétique est constitué d'un ADN double brin (**Fig. 50**). Les membres de la famille des *Siphoviridae* sont de loin les plus abondants (57,3 %).

Figure 50. Les différentes morphologies associées aux familles de bactériophages (King et al., 2012).



Les sept familles supplémentaires de la classification (**Fig. 50 ; Tab. III**) sont représentées par les phages filamenteux, polyhédriques et pléomorphiques, et ont un contenu en acide nucléique et une morphologie variables. En effet les virions de ces familles peuvent contenir des lipides dans leur capsid, ou une enveloppe lipoprotéique.

3 Cycle de multiplication du bactériophage

Les bactériophages sont des parasites obligatoires. Leur cycle de vie peut se décomposer en plusieurs étapes : l'adsorption, l'injection de l'acide nucléique, l'expression et la réplication de ce dernier, l'assemblage des virions et leur libération de la cellule permettant une nouvelle infection (**Fig. 51**).

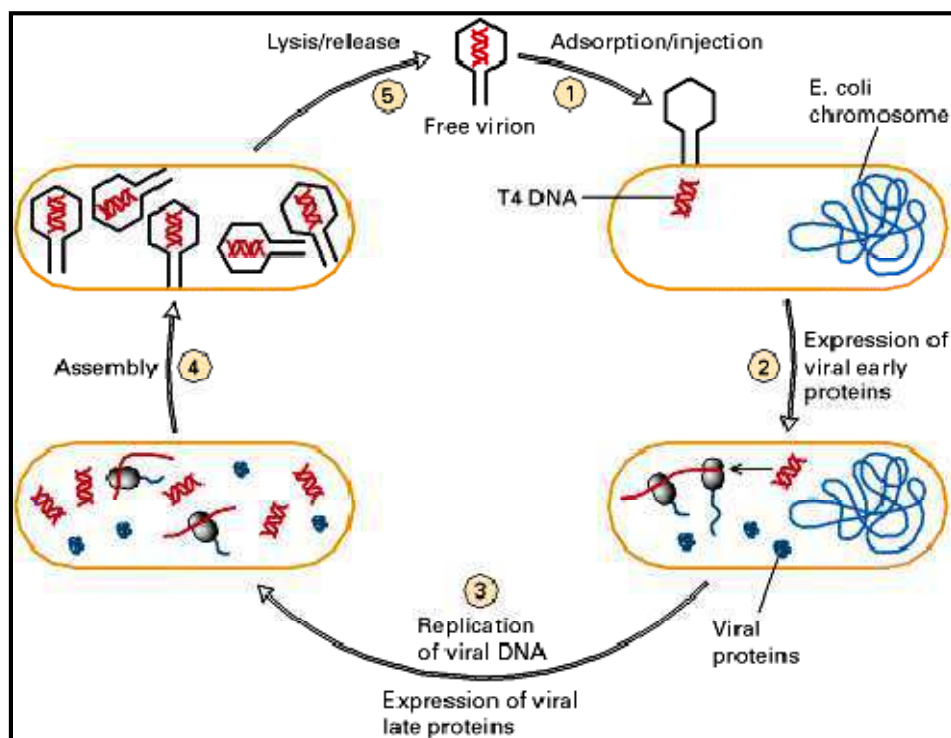


Figure 51. Cycle infectieux du bactériophage T4 d' *E. coli*.

L'étape 1 : Correspond à l'adsorption du phage sur son hôte bactérien. Elle peut être favorisée par la présence de certains cations (Ca^{2+} , Mg^{2+}). L'adsorption requiert la reconnaissance entre des récepteurs présents à la surface de la bactérie et des anti-récepteurs présents sur la particule virale. Une grande variété de composants de l'enveloppe peut servir de récepteurs chez les bactéries. Chez les bactéries à Gram négatif, ils correspondent à des protéines de surfaces, des lipopolysaccharides, des polysaccharides, des flagelles ou encore des *pili*. Chez les bactéries à Gram positif, les motifs polysaccharidiques sont souvent utilisés comme récepteurs.

Etape 2 : Expression des gènes viraux et synthèse des protéines virales précoces par les enzymes de la cellule hôte

Etape 3 : Les protéines précoces vont répliquer l'ADN viral et induire l'expression de protéines virales tardives. Les protéines virales tardives incluent les protéines de la capsid, d'assemblage et des enzymes qui dégradent l'ADN de la cellule hôte pour fournir les nucléotides nécessaires à la synthèse de l'ADN viral.

Etape 4 : Assemblage des particules virales et libération des nouveaux virions par lyse de la bactérie.

3.1 Le cycle lytique

Le cycle lytique est caractéristique des bactériophages dit virulents. Ce type de phage prédomine en milieu aquatique. Après adsorption et injection de l'ADN dans la cellule, l'expression de certains gènes précoces initie le cycle lytique. La réplication du génome phagique se fait par détournement de la machinerie de synthèse de la bactérie hôte.

Les ADNs néosynthétisés sont ensuite introduits dans des capsides virales, préalablement assemblées. Les néo-virions sont formés par l'assemblage de la tête mature (capsid et ADN) avec la partie caudale du phage. La lyse bactérienne et la libération des particules néoformées se font par hydrolyse de la membrane grâce à l'endolysine (ou lysine) phagique (**Fig. 52a**). La lysine est libérée dans le compartiment pariétal, sur la couche de peptidoglycane, grâce à des pores formés par des oligomères d'une protéine appelée *holine*. Les virions sont libérés dans l'environnement et peuvent immédiatement initier un cycle infectieux sur un nouvel hôte.

3.2 Le cycle lysogénique

Les phages tempérés sont capables d'effectuer un cycle alternatif au cycle lytique qui est la lysogénie (**Fig. 52b**). Après son entrée dans la cellule, l'ADN d'un phage tempéré doit faire le choix entre deux modes de vie, le cycle lytique, ou le cycle lysogénique. Brièvement, la décision du cycle de vie est faite grâce à deux répresseurs phagiques *CI* et *Cro* qui peuvent se lier à un opérateur nommé *OR*. La protéine *CI* favorise la lysogénie, en réprimant les gènes impliqués dans le cycle lytique, tandis que la protéine *Cro* permet la situation inverse.

La décision lyse/lysogénie est donc fonction du ratio entre ces deux protéines. Une fois le choix de la lysogénie faite, l'ADN viral est intégré au génome de son hôte. Il sera répliqué comme partie intégrante du génome bactérien et transmis verticalement aux nouvelles générations bactériennes.

La bactérie est devenue "lysogène" et le phage est appelé "prophage". La lysogénie est maintenue grâce à l'expression du répresseur *CI*. Cet état a pour conséquence directe l'immunisation de la bactérie lysogène *vis-à-vis* de tout phage virulent, ou tempéré, munis d'un répresseur homologue.

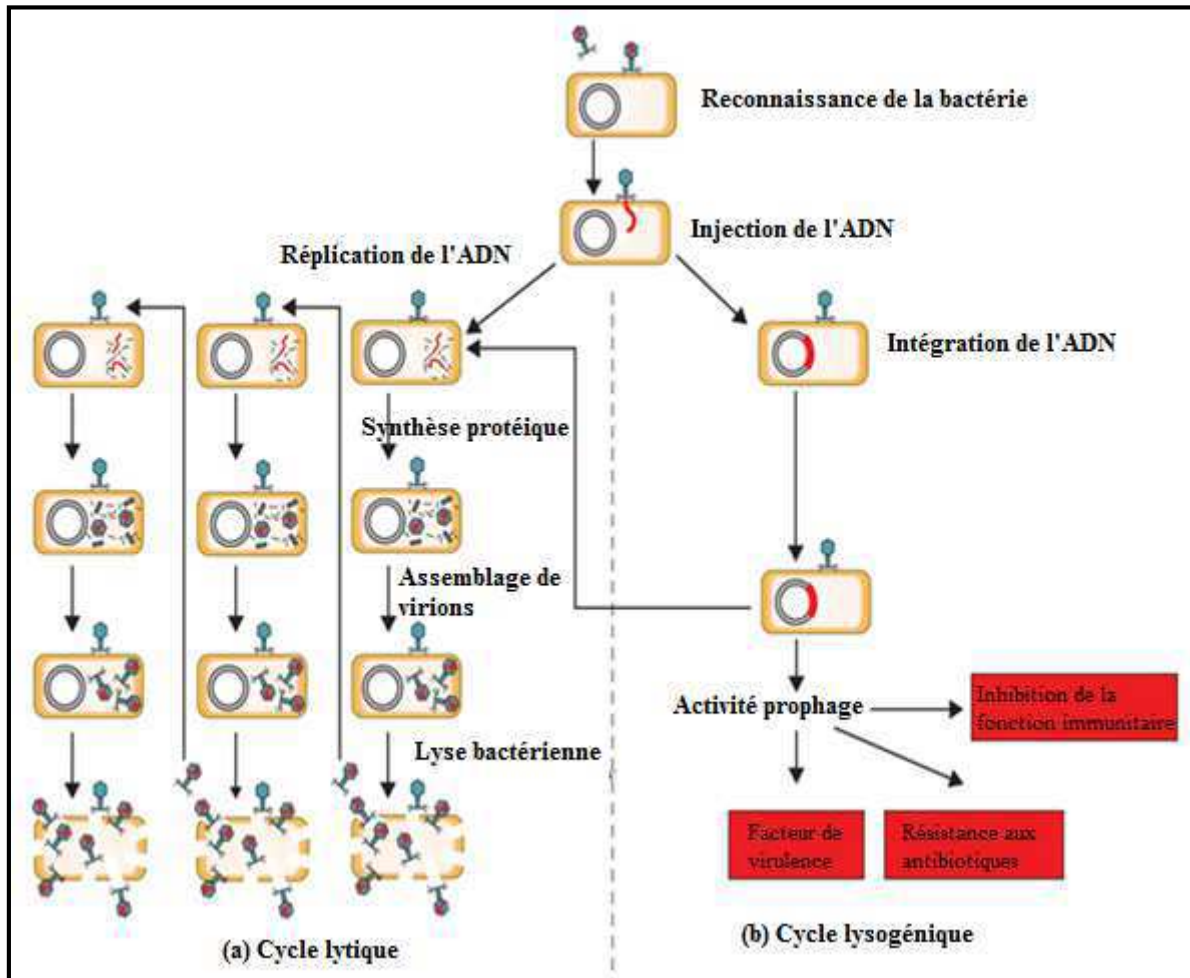


Figure 52. Cycles de multiplication de bactériophages.

- Buckhout-White, S., Person, C., Medintz, I. L., & Goldman, E. R. (2018). Restriction Enzymes as a Target for DNA-Based Sensing and Structural Rearrangement. *ACS Omega*, 3(1), 495–502. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01333>
- Castagné, P., Guingand, A., Moderc, A., & Monard, S. (2018). Ingénierie du génome bactérien grâce à l’outil CRISPR/Cas12a. *Médecine/Sciences*, 34(5), 399–400. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183405009>
- Da Re, S., & Ploy, M.-C. (2012). Antibiotiques et réponse SOS bactérienne. *Médecine/Sciences*, 28(2), 179–184. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012282016>
- Hoonhorst, F., & Pivert, G. (2013). Biologie moléculaire. *IRBM News*, 34(1), 19–22.
- Khellaf M., (2016). Polycopié support pédagogique soutient au cours Eléments de Génétique Moléculaire des Microorganismes. *Université 8 Mai 45 Guelma*
- King AMQ., Adams, M., EB.Carstens, & EJ., Lefkowitz. (2012). Introduction, in *Virus Taxonomy (S. D. Elsevier (Ed.); 1st ed.)*.
- Labie, D., & Denamur, E. (2012). Évolution adaptative des bactéries. *Médecine/Sciences*, 28(6–7), 588–590. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012286011>
- Lamoril, J., Bogard, M., Ameziane, N., Deybach, J.-C., & Bouizegarène, P. (2007). Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007. *Immuno-Analyse & Biologie Spécialisée*, 22(1), 5–18. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2006.11.003>
- Le Floch, R., Naux, E., & Arnould, J. F. (2015). L’infection bactérienne chez le patient brûlé. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 28(2), 94–104.
- Loenen, W. A. M., Dryden, D. T. F., Raleigh, E. A., Wilson, G. G., & Murray, N. E. (2014). Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 3–19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt990>
- Mercier, R., Espéli, O., & Boccard, F. (2009). L’organisation à grande échelle du chromosome bactérien. *Médecine/Sciences*, 25(11), 885–887. <https://doi.org/10.1051/medsci/20092511885>
- Prescott M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2007). *Microbiologie (De Boek (Ed.); 2nd ed.)*. Université de Paris. 1137 p.
- Ravat, F., Jault, P., & Gabard, J. (2015). Bactériophages et phagothérapie : Utilisation de Virus Naturels pour traiter les infections bactériennes. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 28(1), 13–20.

- Shintani, M., Sanchez, Z. K., & Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00242>
- Sifi K., (2011). Cours de génétique de 2^{ème} année Médecine Structure des acides nucléiques, Université "Salah Bounider" Constantine 3
- Ullmann, A. (2009). *Escherichia coli* Lactose Operon. In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000849.pub2>
- Yanofsky, C., & Horn, V. (1994). Role of regulatory features of the trp operon of *Escherichia coli* in mediating a response to a nutritional shift. *Journal of Bacteriology*, 176(20), 6245–6254. <https://doi.org/10.1128/JB.176.20.6245-6254.1994>
- Yildirim, N., & Mackey, M. C. (2003). Feedback Regulation in the Lactose Operon: A Mathematical Modeling Study and Comparison with Experimental Data. *Biophysical Journal*, 84(5), 2841–2851. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)70013-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)70013-7)