République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abbes LAGHROUR –Khenchela
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Support de cours

# GENETIQUE DES PROCARYOTES

Destiné aux étudiants Licence

Spécialité Génétique

Docteur *SEBIHI Fatima Zohra*

Maitre de conférences (A)

**Année universitaire**

**2022/2023**

**Matière 1 : Génétique des Procaryotes (G.P)**
**Crédits : 6**

**Coefficient : 3**

**Contenu de la matière:**

**I- Structure, organisation et réplication du matériel génétique bactérien :**

- chromosome,
- plasmides
- bactériophages

**II- Mutations et Réparation de l'ADN**

**III- Recombinaison génétique et éléments génétiques mobiles**

- Recombinaison homologue,
- Recombinaison site spécifique,
- Eléments génétiques mobiles et applications

**IV- Echanges génétiques entre bactéries. Cartographie, analyse et constructions génétiques**

- Conjugaison
- Transformation,
- Génétique des bactériophages et transduction
- Restriction et modification contrôlées par l'hôte

**V- Expression et régulation de l'information génétique chez les bactéries et bactériophages**

**V.1. La transcription chez les procaryotes** : Définition, l'ARN polymérase, les promoteurs bactériens, déroulement de la transcription.

**V.2. La traduction chez les procaryotes** : Initiation, élongation, terminaison

**V-3. Régulation de l'expression génétique**

**V.3.1. Au niveau transcriptionnel**

- Notion de force du promoteur
- La reconnaissance du promoteur (rôle des facteurs sigma dans la régulation)
- Disponibilité du promoteur (modèle de variation de phase chez les bactéries)
- Régulation par les facteurs de transcription : régulation positive et négative
    - Modes d'action des différentes classes de répresseurs et d'activateurs
    - Régulation négative inductible : opéron lactose
    - Régulation négative répressible : opéron tryptophane
    - Régulation positive par l'activateur CAP/AMPc, cas de l'opéron lactose
    - Régulation positive et négative : opéron arabinose

- Régulation par l'atténuation : opéron tryptophane
- Régulation par anti terminaison de la transcription : bactériophage lambda

# Table des matières

**Liste des Figures et des Tableaux**

## Chapitre 1 : Structure et organisation du matériel génétique

**1-1- Constituants des Nucléosides et Nucléotides**

**1-1-1- Bases azotées**

**1-1-2- Pentoses**

**1-1-3- Acide phosphorique**

**1-2- Structure Des Nucléosides Et Nucléotides**

**1-2-1-Nucléoside :**

**1-2-2- Nucléotides :**

**1-3-Structure de la molécule d'ADN** :

**1-4- Le chromosome bactérien**

**1-5- L'ADN extra-chromosomique :**

**1-5-1- Le facteur sexuel ou facteur F :**

**1-5-2- Les plasmides de résistance aux antibiotiques (ou facteurs R) :**

**1-5-3- Les autres plasmides :**

**1-6- Le bactériophage :**

## Chapitre 2 : Réplication de l'ADN

**2-1- Le réplicon**

**2-2 Réplication bidirectionnelle**

**2-3- Polymérisation unidirectionnelle et réplication semi-conservative**

**2-4- Réplication semi-discontinue**

**2-5- Les ADN polymérases**

**2-5-1- Généralités :**

**2-5-2- Activités des ADN polymérases :**

**2-5-3- ADN polymérases procaryotes dans la réplication :**

**2-6- Mécanismes de la réplication procaryote chez E-Coli**

**2-6-1- Les différentes protéines mise en jeu**

**2-6-2- Origines et terminaisons chez E-Coli**

**2-6-3- Les étapes de la réplication procaryote**

**2-6-4- Régulation de la réplication chez E-Coli**

**2-7- La réplication du matériel génétique des rétrovirus**

## Chapitre 3 : Réparation de l'ADN :

**3-1- Mutations : altérations de l'information génétique**

**3-1-1-Additions ou délétions de bases :**

**3-1-2- Substitutions de bases :**

**3-2- Lésions ou dommages de l'ADN Lésions endogènes sans agents exogènes**

**3-2-2- Lésions provoquées par des agents pathogènes**

**3-2-2-1- Les lésions dues à des mutagènes physiques :**

**3-2-2-2- Les lésions dues à des mutagènes chimiques :**

**3-3- Mécanismes de réparation procaryote (E-Coli)**

**3-3-1- Mécanismes prenant place en dehors de la période de réplication :**

**3-3-1-1 Réparation par réversions des lésions :**

**3-3-1-2- Réparation par excision de base (système BER) :**

**3-3-1-3- Réparation par excision de nucléotides (système NER) :**

**3-3-2- Mécanismes de réparation liés à la période de réplication :**

**3-3-2-1 Réparation de mésappariements par le système Mut HLS :**

**3-3-2-2- Réparation par recombinaison :**

## Chapitre 4 : Recombinaison génétique et éléments génétiques transposables

**4-1- Recombinaison générale ou homologue**

**4-1-1-Modèle de Holliday**

**4-1-2-Enzymes impliquées dans la recombinaison homologue**

**4-1-2-1 Initiation de la recombinaison**

**4-1-2-2 Invasion du brin homologue**

**4-1-2-3 Migration du branchement et résolution de la jonction d'Holliday** :

**4-2- Transposition**

**4-2-1-Structure des transposons**

**4-2-2- Mécanismes de la transposition**

**4-2-2-1- Transposition réplicative**

**4-3- Recombinaison spécifique de site (RSS)** :

**4-3-1-Rôles biologiques de la Recombinaison spécifique de site** :

**4-3-2- Événements impliquant une RSS** :

**4-3-2-1- Intégration** :

**4-3-2-2- L'excision ou la résolution :**

**4-3-2-3- Inversion** :

**4-3-3-Les recombinases** :

**4-3-4- Recombinaison spécifique de site**

**4-3-4-1- Intégration et excision du bactériophage lambda (ʎ)**

**4-3-4-2- Acquisition des gènes de résistance aux antibiotiques** :

**4-3-4-3- Variation de l'expression génique (variation de phase)** :

## Chapitre 5 : Transfert d'information génétique

**5-1-Transformation :**

**5-1-1- Facteurs affectant la transformation**

**5-1-1-1- Taille de l'ADN** :

**5-1-1-2- Compétence du receveur** :

**5-1-2- Etapes de la transformation**

**5-1-2-1- Absorption de l'ADN :**

**5-1-2-2- Recombinaison légitime/homologue/générale :**

**5-2- Conjugaison :**

**5-2-1- Types de reproducteurs chez les bactéries**

**5-2-1-1- Donneur** :

**5-2-1-2- Receveur :**

**5-2-2- Etats physiologiques du facteur F :**

**5-2-2-1- Autonome (F+)** :

**5-2-2-2- Intégré (Hfr) :**

**5-2-2-3- Autonome avec gènes chromosomiques (F') :**

**5-3- Mécanisme de conjugaison**

**5-3-1- Croisement F+ x F-**

**5-3-2- Croisement Hfr x F-**

**5-3-3- Croisement F' x F-** :

**5-4- Transduction :**

**5-4-1- Lyse et lysogénie**

**5-4-1-1-La lyse** :

**5-4-1-2- Lysogénie** :

**5-4-2- Types de transduction**

**5-4-2-1- Transduction généralisée :**

**5-4-2-2- Transduction spécialisée :**

## Chapitre 6: la synthèse protéique

**6-1 -Transcription de l'ADN procaryote**

**6-1-1- Pré-initiation :**

**6-1-2- Initiation :**

**6-1-3- Elongation :**

**6-1-4- Terminaison :**

**6-1-5- Maturation des transcrits primaires :**

**6-2- La traduction de l'ADN**

**6-2-1- Le code génétique :**

**6-2-2- Les acteurs de la traduction :**

**6-2-2-1- Les ribosomes :**

**6-2-2-2- Les ARNt :**

**6-2-2-3- Chargement de l'acide aminé sur l'ARNt :**

**6-3- Les différentes étapes de la traduction procaryote :**

**6-3-1- Initiation :**

**6-3-2- Elongation :**

**6-3-2-1- Réaction de couplage :**

**6-3-2-2- Formation de la liaison peptidique et libération du premier ARNt :**

**6-3-2-3- Translocation :**

**6-3-2-4- Terminaison :**

## Chapitre 7 : Régulation de l'ADN

**7-1- Régulation de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel :**

**7-1-1- Régulation de l'expression des gènes impliqués dans les voies cataboliques**

**7-1-1-1- Les inducteurs de l'opéron lac :**

**7-1-2- Régulation de l'expression des gènes impliqués dans les voies anaboliques :**

**7-2- Régulation de l'expression des gènes au niveau traductionnel :**

## Liste des Figures et des Tableaux

**Figure 1** : les bases pyrimidines
**Figure 2** : les bases purines
**Figure 3** : les pentoses
**Figure 4** : schéma de l'acide phosphorique
**Figure 5** : Schéma du Nucléoside
**Figure 6** : le nucléotide
**Figure 7 :** Un simple brin d'ADN
**Figure 8 :** Les deux paires de bases de l'ADN
**Figure 9 :** La double hélice de l'ADN.
**Figure 10 :** La structure du bactériophage.
**Figure 11 :** Fourche de réplication.
**Figure 12 :** La réplication d'ADN.
**Figure 13 :** Réparation par excision de base (système BER)
**Figure 14** : Mécanisme de réparation par excision de nucléotide (système NER)
**Figure 15** : Modèle de la réparation par le système Mut SLH
**Figure 16 :** Model de la recombinaison selon Holliday**.**
**Figure 17 :** Mécanisme de la recombinaison homologue**.**
**Figure 18 :** Mécanisme de la transposition réplicative**.**
**Figure 19** : Evénements impliquant une Recombinaison spécifique.
**Figure 20** : Intégration/excision de lambda .
**Figure 21** : Structure d'un Intégron .
**Figure 22** : Variation de phase chez les salmonelles.
**Figure 23** : Recombinaison générale.
**Figure 24** : Transformation bactérienne, (a) fixation de l'ADN nu, (b) intégration du fragment d'ADN après recombinaison homologue.
**Figure 25 :** La conjugaison entre $F^+$ et $F^-$ .
**Figure 26 :** La conjugaison entre HFr et $F^-$
**Figure 27:** Caractéristiques de la conjugaison entre **$F^+$ et $F^-$**
**Figure 28:** Caractéristiques du croisement HFr X F-
**Figure 29:** Caractéristiques du croisement F' X F-
**Figure 30 :** Transduction généralisée.
**Figure 31:** Mécanisme de la transduction spécialisée.
**Figure 32** : Traduction, ARNm, ARNt ; et ribosome.
**Figure 33** : Structure de l'opéron.
**Figure 33** : Représentation des différents inducteurs de l'opéron Lactose.
**Figure 34** : l'opéron en absence du Lactose.
**Figure 35** : L'opéron en présence du Lactose.
**Figure 36** : l'opéron en présence de Glucose et le Lactose.
**Figure 37** : Structure de l'opéron Tryptophane.

**Tableau1 :** Nomenclature des nucléotides et nucléosides

## Préambule

La génétique des procaryotes est une sous-discipline de la génétique qui traite les mécanismes et les processus génétiques des micro-organismes, elle a pour but 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 GENETIQUE DES PROCARYOTES, qui est une d'enseignent fondamentale destiné aux étudiants de troisièmes année LMD (Licence génétique). Il peut constituer un support pédagogique pour les étudiants désireux de comprendre la génétique bactérienne.

Ce polycopié comporte sept chapitres concernant les différents mécanismes génétiques chez les procaryotes permettant aux étudiants de comprendre la structure et l'organisation du génome avec toute sa complexité de réparation, et recombinaison ainsi les différents mécanismes de transfert qui peuvent y avoir, et enfin le processus de l'expression de ces gènes et leurs régulation.

# Chapitre 1 : Structure et organisation du matériel génétique

Les acides nucléiques sont des macromolécules présentes dans toutes les cellules vivantes et également chez les virus. Ils constituent le support de l'information génétique (sous la forme de l'ADN) ; le moyen d'expression de cette information (sous forme de l'ARN). Ce sont des polymères d'unités élémentaires appelées **nucléotides**. Du point de vue structural, les nucléotides se distinguent des monomères des autres macromolécules car ils peuvent être eux-mêmes **hydrolyses en 3 constituants** : une base hétérocyclique azotée, un acide phosphorique, et un pentose, c'est sur la base de la nature du pentose (ribose ou désoxyribose) que l'on distingue les **2 types d'acides nucléiques : ADN ou ARN.**

- **Les acides désoxyribonucléiques (ADN**) : sont présents essentiellement dans le **noyau** des cellules eucaryotes, associés à des protéines pour former les chromosomes. Certains virus contiennent aussi de l'ADN. On trouve également de l'ADN dans les mitochondries et dans les chloroplastes des cellules photosynthétiques.
- **Les acides ribonucléiques (ARN) :** sont principalement situés dans le **cytoplasme**. On distingue les ARN messagers (ARNm), les ARN de transfert (ARNt) et les ARN ribosomiques (ARNr). Le génome de certains virus est constitué d'ARN (rétrovirus).

**Les Nucléosides et Nucléotides** : Les nucléotides sont les monomères des Acides nucléiques. Leur hydrolyse totale aboutie à 3 types de constituants : 1 base, 1 pentose, 1 acide phosphorique.

Base + Pentose = Nucléoside

Base + Pentose + Acide Phosphorique = Nucléotide

### 1-1- Constituants Des Nucléosides Et Nucléotides

**1-1-1- Bases azotées** : Elles sont de 2 types, dérivant de bases hétérocycliques : Pyrimidine et Purine. On distingue ainsi 2 séries de bases :

- les *bases pyrimidiques*, dérivées de la pyrimidine :

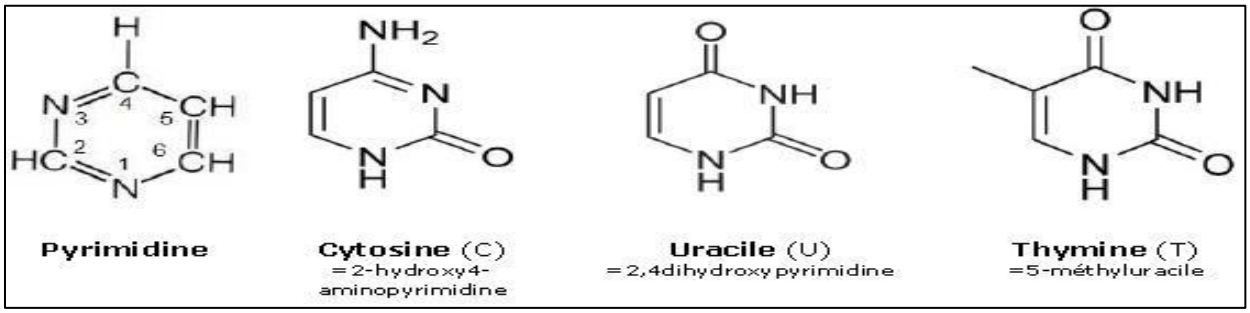



**Figure1** : les bases pyrimidines

- les *bases puriques*, dérivées de la purine:

Il existe quelques bases "rares" que l'on trouve dans certains ARN (notamment chez ARNt). Citons l'hypoxantine.

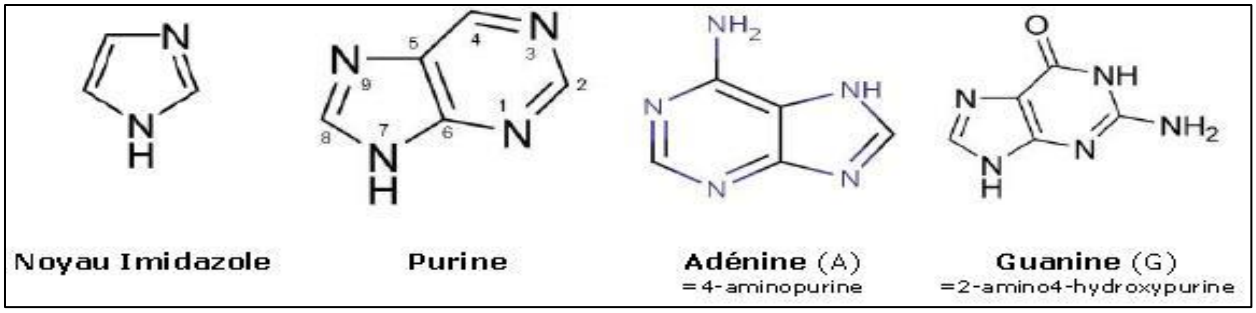



**Figure2** : les bases purines

**1-1-2- Pentoses :** Il s'agit :

- du ribose (sous forme β-D ribofuranose): constitutif de l'ARN
- du désoxyribose (sous forme β-D 2-désoxy ribofuranose): constitutif de l'ADN Les atomes de C ont la particularité d'être numérotés de 1' à 5'.

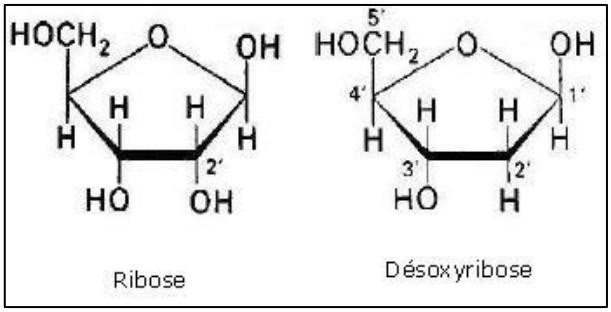



**Figure3** : les pentoses

**1-1-3- Acide phosphorique**

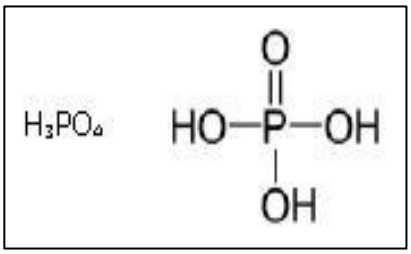



**Figure 4** : schéma de l'acide phosphorique

### 1-2- Structure Des Nucléosides Et Nucléotides

**1-2-1-Nucléoside :** Ils résultent de la liaison entre une base azotée et un pentose. On dit que ce sont des hétérosides azotés. Avec une liaison N-glycosidique qui se fait toujours entre le C1' du sucre et l'azote N9 de la base purique ou bien l'azote N1 de la base pyrimidique.

**Nucléoside = ose + base purique ou pyrimidique**

Nomenclature : chaque nucléoside est désigné par un nom a suffixe :

- « osine » pour les bases puriques
- « idine » pour les bases pyrimidines

Pour les désoxyribonucléotides on fait précéder le nom du préfixe "désoxy" (abréviation: d)
ex: (désoxy ) adénosine, guanosine, cytidine, uridine, thymidine.

Convention : on numérote les C du pentose par 1', 2', 3'... pour qu'il n'y ait pas de confusion avec la numérotation des atomes (C et N) de la base.

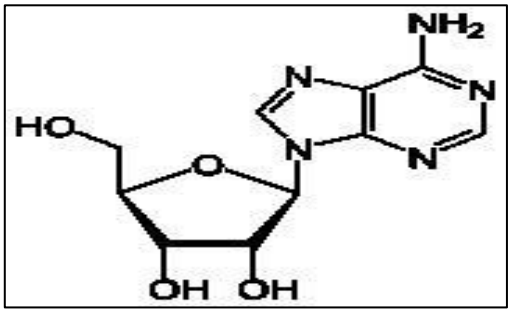



**Figure 5** : Schéma du Nucléoside

**1-2-2- Nucléotides :** Ils résultent de la condensation d'un nucléoside avec 1, 2 ou 3 acides phosphoriques= ce sont des esters phosphoriques des nucléosides. Les nucléotides sont donc des nucléosides mono, di ou tri-phosphates. Le premier phosphate est lié au C5' (ou C3') du pentose. Les autres phosphates se lient au 1er groupement par liaisons **"anhydride acétique".**

**Nucléotide = nucléoside + acide(s) phosphorique(s)**

- on utilise le nom du nucléoside, suivi de mono-, ou di-, ou tri-phosphate.
- chaque nucléotide monophosphate est appelé :

acide + radical de la base + suffixe

Les abréviations sont XMP ou XDP ou XTP
ex: CMP = cytidine monphosphate = acide cytidylique
AMP = adénosine monophosphate = acide adénylique

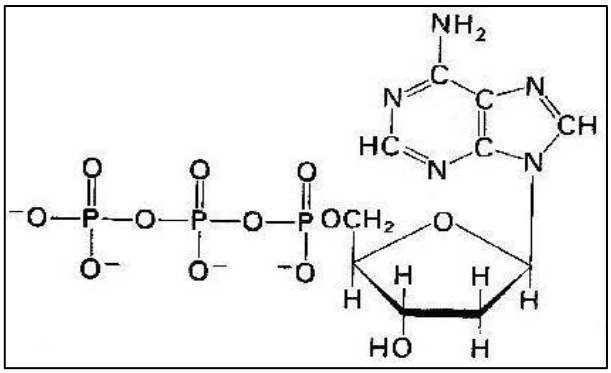


**Figure 6** : le nucléotide

| BASE | NUCLEOSIDE | NUCLEOTIDE |
|---|---|---|
| | = base + (d)ribose | = base + ose + acide phosphorique |
| Adénine | (d)Adénosine | Adénosine-5'-monophosphate<br>Acide 5'adénylique |
| Guanine | (d)Guanosine | Guanosine-5'-monophosphate<br>Acide 5'guanylique |
| Uracile | Uridine | Uridine-5'-monophosphate<br>Acide 5'uridylique |
| Cytosine | (d)Cytidine | Cytidine-5'-monophosphate<br>Acide 5'cytidylique |
| Thymine | (d)Thymidine | Thymidine-5'-monophosphate<br>Acide 5'thymidylique |

**Tableau1 :** Nomenclature des nucléotides et nucléosides

Les nucléotides s'enchaînent dans un ordre qui paraît quelconque, Sur un squelette Phosphate-Sucre-Phosphate-Sucre- sont branchées les bases azotées. Leur ordre de succession constitue la structure primaire de l'ADN que l'on appelle sa séquence.

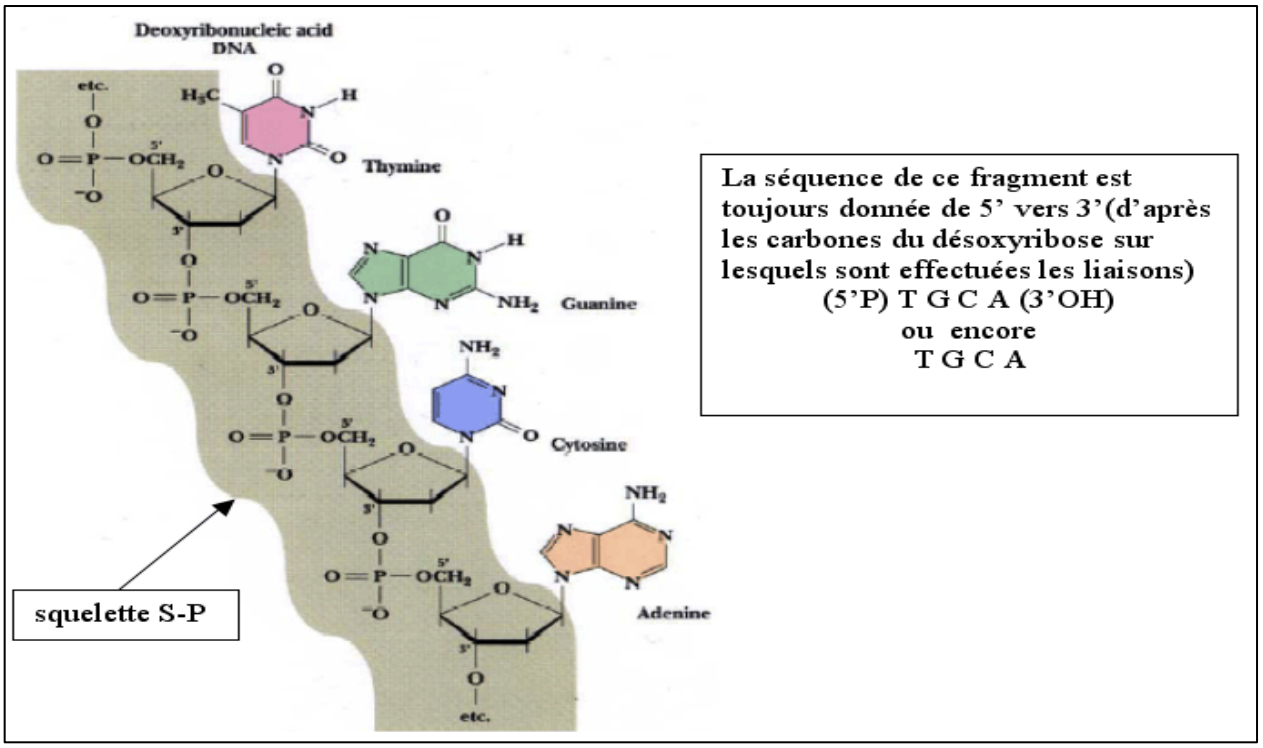



**Figure 7 :** Un simple brin d'ADN

**1-3-Structure de la molécule d'ADN** :

Bien que les acides nucléiques aient été découverts en 1868 par Michener, il a fallu attendre1953 pour que les progrès techniques permettent à Watson et Crick de découvrir la structure de la molécule d'ADN. Les bases sont associées par paires. Dans chaque paire il y a toujours une purine associée à une pyrimidine. L'association se fait par des liaisons faibles : les liaisons hydrogènes, deux liaisons pour une paire AT ; trois liaisons pour une paire GC. Lorsque l'on connaît la séquence d'un brin on peut en déduire la séquence de l'autre brin. Les deux brins sont orientés de manière opposée par rapport aux extrémités 3' et 5' (les brins sont dits antiparallèles).

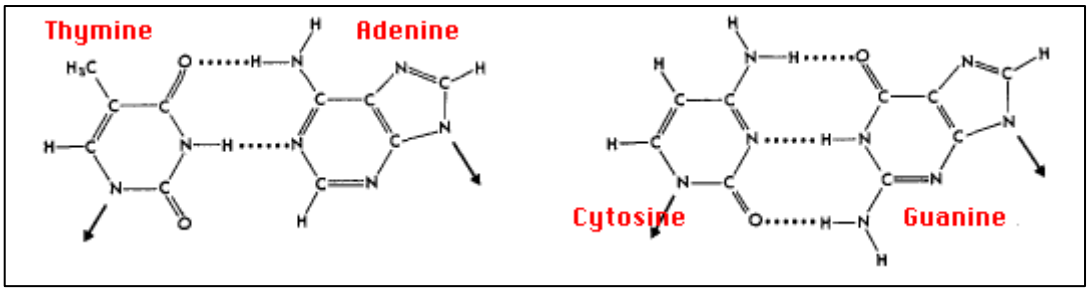



**Figure 8 :** Les deux paires de bases de l'ADN

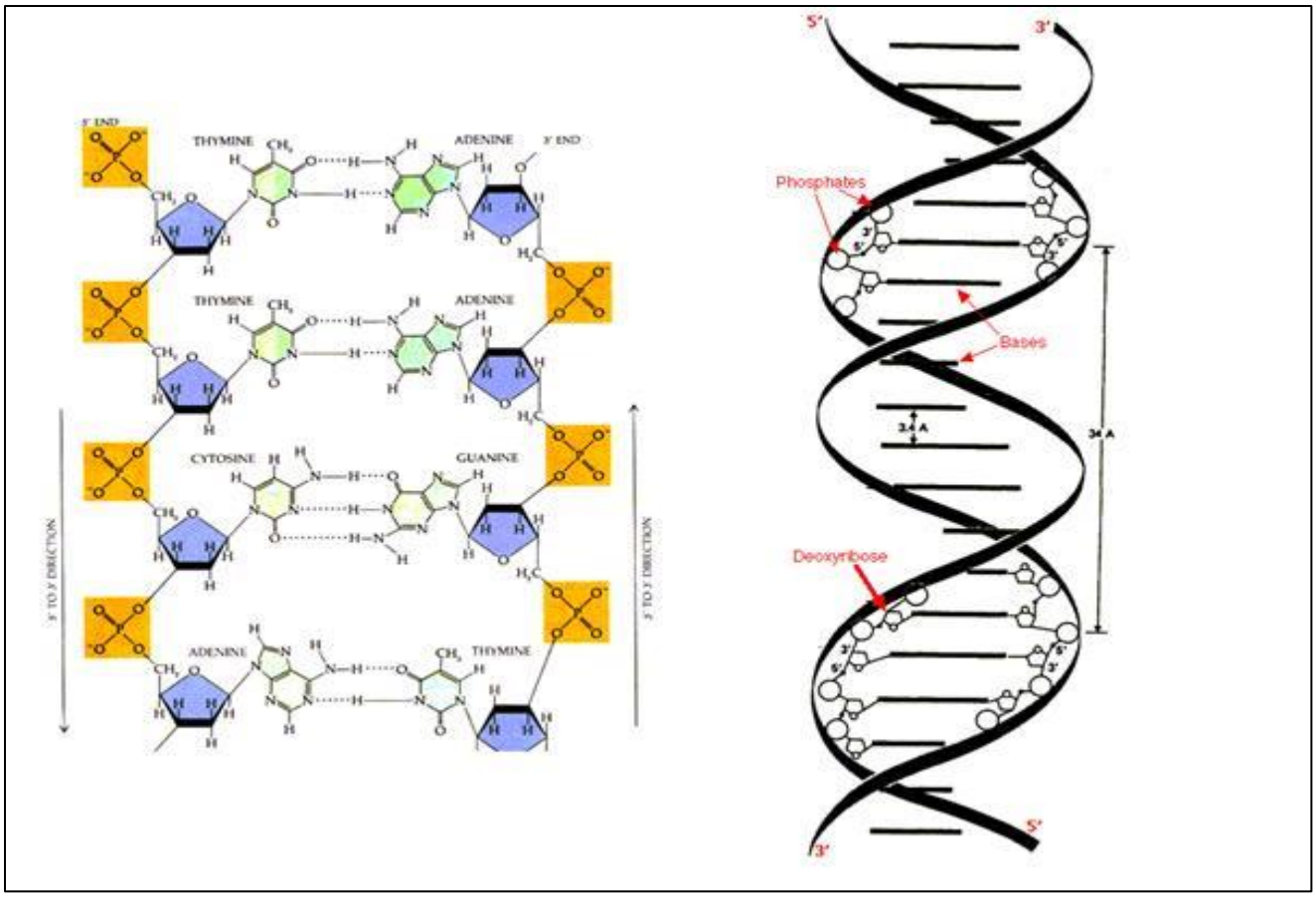



**Figure 9 :** La double hélice de l'ADN.

**1-4- Le chromosome bactérien :**

Les bactéries possèdent un appareil nucléaire constitué d'acide desoxyribonucléique (ADN) qui est le support de l'information génétique. L'ADN chromosomique est constitué d'une double hélice d'ADN circulaire. Cette double hélice est pelotonnée, surenroulée dans le cytoplasme grâce à l'action des topoisomérases (au nombre de 4 chez les bactéries). Déplié, le chromosome bactérien a près de 1 mm de long (1000 fois la longueur de la bactérie) et 3 à 5 nanomètres de large. Les deux chaînes de nucléotides se répliquent selon le schéma de Watson et Crick, chaque chaîne assurant la réplication de la chaîne complémentaire selon un mode semi-conservatif. L'analyse chimique de l'appareil nucléaire indique qu'il est composé à 80 % d'ADN (le chromosome), à 10 % d'acide ribonucléique ou ARN (rôle de structuration) et à 10 % de protéines. Ces dernières sont représentées en particulier par les ADN polymérases qui copient les doubles brins d'ADN, les topoisomérases, surtout les ADN gyrases, qui les déroulent pour permettre l'action des polymérases, et des ARN polymérases qui assurent la synthèse des divers ARN. Les constituants de l'appareil nucléaire sont la cible d'action de plusieurs antibiotiques : les quinolones inhibent les topoisomérases et les rifamycines inhibent les ARN polymérases, tandis que les nitromidazolés entraînent la fragmentation de l'ADN chez les anaérobies stricts.

**1-5- L'ADN extra-chromosomique :** A côté du chromosome, support de l'hérédité, la bactérie peut contenir des éléments génétiques (ADN) de petite taille (0,5 à 5 % du chromosome bactérien), extra-chromosomiques. Ces 6 éléments, appelés plasmides, ne sont pas indispensables à la vie de la bactérie dans les conditions habituelles de croissance. Ils se répliquent indépendamment et en général plus rapidement que le chromosome bactérien. On les détecte lorsque les gènes qu'ils transportent confèrent à la bactérie de nouvelles propriétés. Les plus connus de ces plasmides sont les suivants :

**1-5-1- Le facteur sexuel ou facteur F** : Le facteur sexuel ou facteur F assure le transfert de fragments de chromosome bactérien par conjugaison (appariement de deux bactéries).

**1-5-2- Les plasmides de résistance aux antibiotiques (ou facteurs R) :** Ils portent des gènes qui confèrent aux bactéries la résistance à divers antibiotiques. Au contraire de la résistance conférée par une mutation chromosomique, la résistance conférée par un plasmide peut concerner des antibiotiques appartenant à plusieurs familles si le plasmide porte plusieurs gènes de résistance. La résistance codée par les gènes plasmidiques est souvent liée à la production d'enzymes qui inactivent les antibiotiques. Par exemple des plasmides de résistance très fréquents chez les staphylocoques portent un gène qui code pour la production d'une pénicillinase qui inactive la pénicilline G et les pénicillines du groupe A (ampicilline) ce qui rend la bactérie résistante à ces pénicillines (idem chez E.coli, gonocoque,...). Les gènes peuvent être organisés dans le plasmide au sein de transposons.

**1-5-3- Les autres plasmides :** Certains plasmides sont responsables de la virulence (ex. : production de toxines), de la résistance aux antiseptiques, du métabolisme de certains composés (lactose, lysine, etc...), et de la dégradation de substances, par exemple le toluène, l'octane et l'acide salicylique.

**1-6- Le bactériophage :** (également nommés phages) sont des virus qui infectent spécifiquement les bactéries**.** Chaque type de phages reconnait une espèce, voir une sous-espèce de bactérie. Un bactériophage ne va donc pas infecter et éliminer toutes les bactéries mais uniquement celles qui vont être reconnues par le phage et permettre sa multiplication. De par sa grande spécificité, un bactériophage ne pourra jamais infecter une de nos propres cellules.

Les bactériophages sont des particules microscopiques (Les plus petits ont un diamètre de 20 nm seulement), ayant une tête et une queue. La tête contient l'e génome du virus (peut être fait d'**ADN** ou d'**ARN,** bicaténaire ou monocaténaire, et peut être **linéaire** ou **circulaire).** Les plus petits virus n'ont que quatre gènes alors que les plus gros en ont plusieurs centaines.

La coque de protéines (tète) qui entoure le génome viral est appelée **« capside ».** Selon le type de virus, elle peut avoir différentes formes. D'autres structures aussi apparaissent chez certains virus : **« la gaine » ; « les fibres ».**

Les capsides les plus complexes sont celles des virus qui infectent les bactéries.

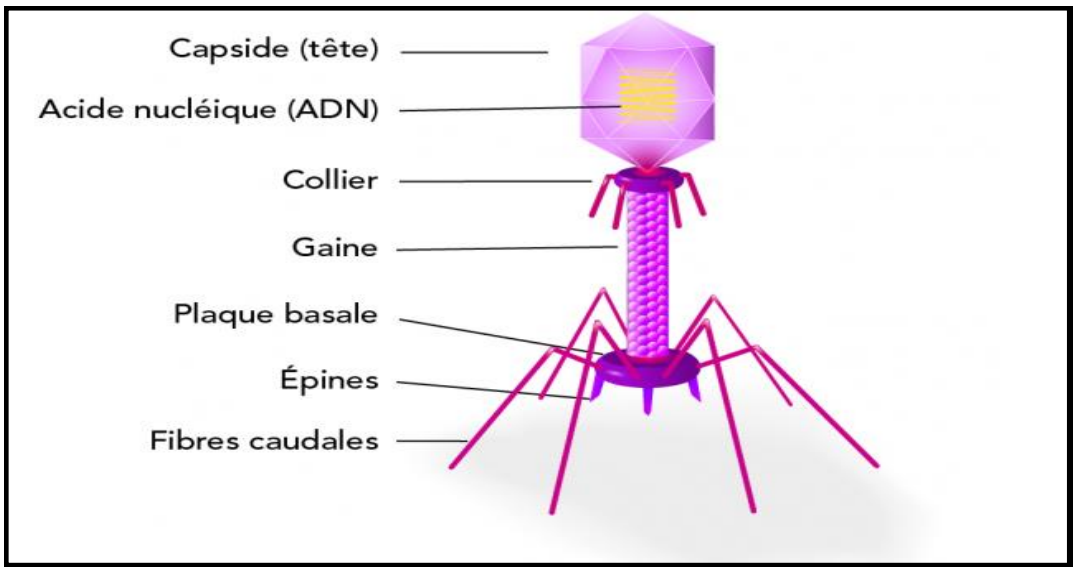



**Figure 10 :** La structure du bactériophage.

## Chapitre 2 : Réplication de l'ADN

La phase de réplication est rapide et fiable, et correspond à la reproduction de l'ADN à l'identique. La réplication s'effectue entre la phase G1 et G2 du cycle cellulaire, c'est la phase « S ».

La réplication de l'ADN doit respecter deux principes :

- l'ensemble du génome doit être répliqué à chaque division cellulaire
- chaque molécule d'ADN n'est répliquée qu'une seule fois par cycle cellulaire.

### 2-1- Le réplicon

Le réplicon est l'unité de réplication de l'ADN eucaryote, il contient une origine et une terminaison (Remarque : L'ADN procaryote est circulaire et présente une seule origine de réplication). En effet l'ADN peut être répliqué à plusieurs endroits en même temps, sans cela la réplication de l'ADN eucaryote durerait 800 heures.

### 2-2 Réplication bidirectionnelle

A chaque origine de réplication, il y a formation d'un œil de réplication qui s'agrandit tout le long de l'avancement au niveau des fourches de réplication. Il y a ainsi deux systèmes de réplication qui évoluent en sens opposés. On dit que la réplication est **bidirectionnelle**.

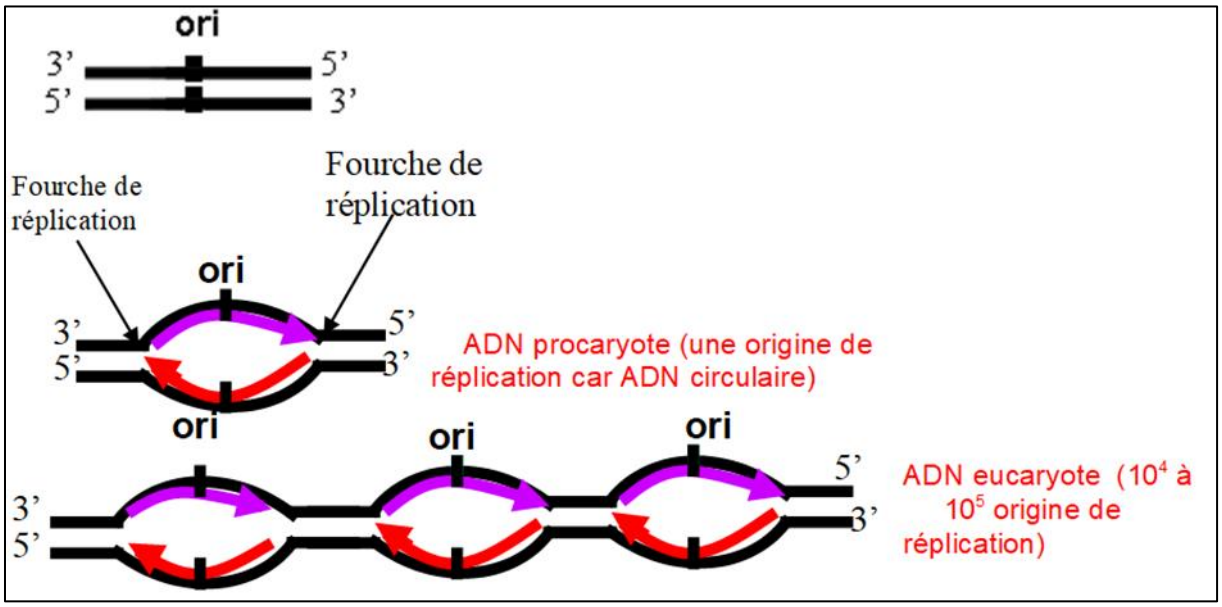



**Figure 11 :** Fourche de réplication.

### 2-3- Polymérisation unidirectionnelle et réplication semi-conservative

L'ADN bicaténaire est stabilisé par des appariements stricts de bases : d'une part l'adénine (A) et la thymine (T) par 2 liaisons hydrogènes, et d'autre part la guanine (G) et la cytosine (C) par 3 liaisons hydrogènes.

Les deux brins d'ADN sont associés de manière antiparallèle, chacun d'eux possédant une extrémité 5'- phosphate et une extrémité 3'-OH libre.

La polymérisation est **unidirectionnelle**, en effet les brins étant polarisés la polymérisation se fera toujours dans le même sens : 5' vers 3'. Il y a formation d'une liaison phosphodiester entre l'extrémité 3'OH du brin en voie d'élongation et l'extrémité 5'phosphate du nucléotide ajouté.

La réplication se fait par copie de l'ADN matriciel. Chaque molécule d'ADN initialement présente se séparera en deux brins d'ADN qui serviront de matrice aux brins néo-synthétisés, il y aura donc un brin parent et un brin fils qui constitueront ensemble la nouvelle molécule d'ADN de la future cellule. La réplication est ainsi **semi-conservative**.

### 2-4- Réplication semi-discontinue

Nous avons vu précédemment que la synthèse de l'ADN est bidirectionnelle à partir de l'origine de réplication et qu'il y avait formation de fourche de réplication par écartement de deux brins parents. De plus au niveau d'une fourche de réplication les deux brins fils sont synthétisés simultanément.

Nous savons également que la synthèse de l'ADN se fait toujours dans le sens 5' vers 3', ceci nécessite donc la présence d'un **brin précoce** (ou primaire) qui est le brin lu dans le sens de la fourche et d'un **brin tardif** (ou secondaire) qui est le brin lu dans le sens inverse de la fourche et qui est dit **brin discontinu**. On parle ainsi de **réplication semi-discontinue**.

### 2-5- Les ADN polymérases

**2-5-1- Généralités :** Les ADN polymérases sont les enzymes responsables de la polymérisation des nucléotides lors de la réplication de l'ADN. Elles sont ADN dépendantes, c'est-à-dire qu'elles ont besoin d'une matrice d'ADN pour produire le brin néo-synthétisé, et pour se faire elles lisent le brin matriciel de 3' vers 5' pour synthétiser de l'ADN dans le sens 5' vers 3'. Les ADN polymérases procaryotes sont de 3 types (I, II et III) et les ADN polymérases eucaryotes de 5 types (α, β, δ, ε et γ). Les ADN polymérases nécessitent un certain nombre de conditions d'activités :

- Les 4 désoxy-ribo-nucléotides 5' tri-phosphate (dATP, dTTP, dCTP et dGTP) en quantité équimolaire.

- Des ions magnésiums (Mg2+) qui stabilisent l'ADN et les protéines.
- Une matrice d'ADN (mono ou bicaténaire).
- Une amorce d'ADN ou d'ARN ayant une extrémité 3'OH libre.

**2-5-2- Activités des ADN polymérases :** Lors de la formation de la liaison phosphodiester entre un désoxy-ribo-nucléotides 5' tri-phosphate et le brin en voie d'élongation, il y a hydrolyse de la fonction triphosphate et formation de pyrophosphate (PPi).

Les ADN polymérases ont des activités bien spécifiques :

- Une **activité polymérasique 5' vers 3'** qui est leur activité principale.
- Une **activité exo-nucléasique** qui correspond à la dégradation d'une des extrémités du brin néo-synthétisé de l'ADN lors de la réplication et qui peut être de 2 types :

  - De 3' vers 5', qui correspond à la dégradation à partir de l'extrémité 3'OH.

  - De 5' vers 3', qui correspond à la dégradation à partir de l'extrémité 5'phosphate.

**2-5-3- ADN polymérases procaryotes dans la réplication :** Les ADN polymérases procaryotes sont de 3 types et pour la réplication nous allons principalement étudier le fonctionnement des ADN polymérases I et III.

- Les **ADN polymérases I** (ou **enzyme de Kornberg**) sont les plus nombreuses (400 molécules/cellule). Elles présentent l'activité polymérasique 5' vers 3' ainsi que les activités exo-nucléasique 5' vers 3' et 3' vers 5'. Elles sont utilisées dans la réparation de l'ADN ainsi que pour combler les brèches laissées par l'ADN polymérase III.
- Les **ADN polymérases III** (ou **enzyme cœur**) sont des multimères hétérogènes qui sont responsables de la synthèse des fragments longs de l'ADN. Elles présentent les activités polymérasique 5' vers 3' et exo-nucléasique de 3' vers 5' mais pas exo-nucléasique de 5' vers 3'.

**2-6- Mécanismes de la réplication procaryote chez E-Coli**

La synthèse doit respecter certaines propriétés : les deux fourches réplicatives doivent migrer dans des sens opposés, la synthèse de l'ADN se fait dans la direction 5' vers 3' et ainsi le brin matriciel est lu de 3' vers 5', les deux brins de l'ADN sont antiparallèles et synthétisés simultanément.

**2-6-1- Les différentes protéines mise en jeu**

- Les **protéines de reconnaissance** reconnaissent les sites d'initiation et de terminaison.

- Les **hélicases** (ou DNA B) déroulent la double hélice par rupture des liaisons hydrogènes présentes entre les deux brins de l'ADN, avec consommation d'**ATP**.
- Les **protéines SSB** (pour *single stranded binding protein*) ont une forte affinité pour l'ADN simple brin et l'empêche ainsi de se réenrouler lors de la migration des fourches réplicatives.
- La **primase** est une ARN polymérase ADN dépendante qui synthétise l'amorce.
- Les **topo-isomérases** relâchent les contraintes de torsion de l'ADN, elles sont de deux types et seule la topo-isomérase de types II consomme de l'**ATP**. La topo-isomérase de type II d'E-Coli s'appelle l'ADN-gyrase.
- Les **ADN ligases** (ou DNA G) catalyse la formation de la liaison phosphodiester, mais est incapable de placer les nucléotides. Lors de réparation de l'ADN les nucléotides en place ne sont plus triphosphatés, l'ADN ligase à donc besoin d'un apport en **ATP**.

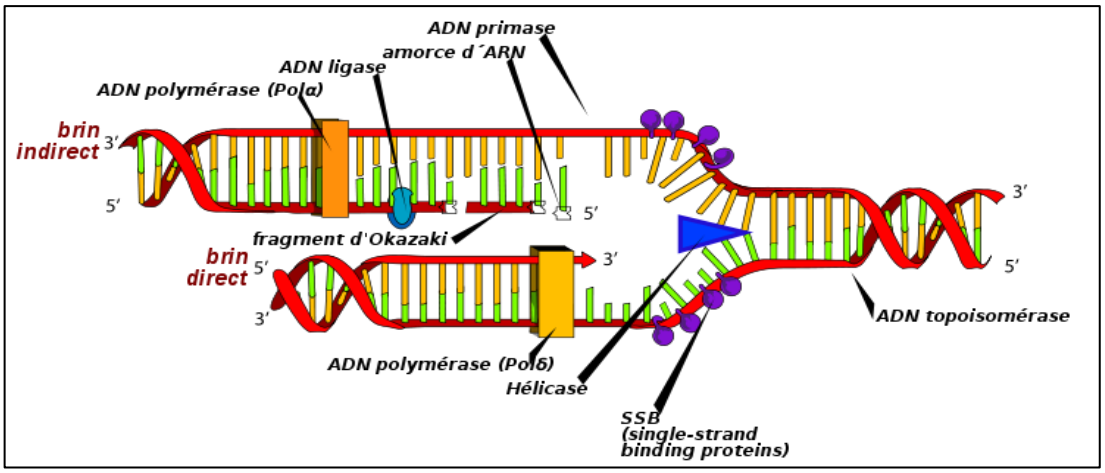



**Figure 12 :** La réplication d'ADN.

### 2-6-2- Origines et terminaisons chez E-Coli

L'origine de réplication possède une séquence répétée de 13 pdb riche en thymine (T), ainsi qu'une séquence GATC présente une dizaine de fois.

Le terminateur mesure environ 350 kb et est composé de 7 séquences quasi identiques de 23 pdb.

### 2-6-3- Les étapes de la réplication procaryote

- **Ouverture de la double hélice et formation de la fourche réplicative :** L'ouverture de la double hélice sur 40 pdb est permise par reconnaissance de l'origine de réplication par les **DNA A**. Les topo-isomérases relâchent les contraintes topologiques appliqués à la double

hélice par son ouverture.L'ouverture de l'ADN entraîne la formation de l'œil de réplication et des deux fourches de réplication. Les hélicases (DNA B) se mettent alors en place pour permettre le déroulement des deux brins ; les topo-isomérases, elles, sont présentent en aval (en avant) de la fourche permettant d'enlever les contraintes essentiel à l'avancée de l'hélicase. D'autre part les protéines SSB protègent les ADN simples brins pour les empêcher de se réenrouler.

- **Elongation du brin précoce dans le sens de déplacement de la fourche :**Le brin qui servira de matrice au brin précoce est lu dans le même sens que l'avancée de la fourche, c'est-à-dire de 3' vers 5'. Au niveau de l'origine de réplication les ADN polymérases nécessitent une amorce qui sera mise en place par les primases. Cette amorce sera ici de l'ARN, l'ADN pouvant être utilisé in vitro. L'ADN polymérase III sera responsable de l'initiation et de l'élongation du brin précoce.

- **Elongation du brin tardif dans le sens inverse du déplacement de la fourche :** Le brin qui servira de matrice pour le brin tardif doit également être lu dans le sens 3' vers 5', mais comme nous l'avons déjà vu précédemment, la fourche se déplace dans le sens inverse et donc l'ADN polymérase III qui sera également responsable de l'élongation du brin tardif. De cette manière sa synthèse sera segmentée en fragment de taille relativement constante à chaque fois que le brin matriciel sera assez « découvert » et ainsi on respectera le sens d'élongation de 5' vers 3'. Ces fragments sont appelés **fragments d'Okasaki**.Les fragments d'Okasaki eucaryote mesurent 100 à 200 pdb et les procaryotes 1000 à 2000 pdb. A chaque segment il y a recrutement d'une primase pour la synthèse d'une amorce d'ARN constitué de 10 à 50 nucléotides selon l'espèce.Par la suite les amorces vont être détruites par des protéines à activité ribonucléasique telles que des RNases, et l'ADN polymérase I va compléter la brèche entièrement. La dernière liaison phosphodiester entre l'extrémité 5' du premier fragment et l'extrémité 3' du deuxième fragment, ce qui correspond à l'épissage, sera réalisée par la ligase.

- **Terminaison :** Le terminateur est le site de fixation de protéines « Tus » qui reconnaît les régions Ter. Chez E-Coli, la partie entre les deux terminateurs n'est d'abord pas répliqué, les deux ADN circulaires sont ainsi associés, on utilise alors la topo-isomérase II pour les dissociés. L'ADN polymérase I complètera ensuite les parties non répliquées.

### 2-6-4- Régulation de la réplication chez E-Coli

- **Méthylations des séquences GATC au niveau de l'origine de réplication :** L'initiation de la réplication nécessite la méthylation des séquences GATC sur les deux brins par la protéine **Dam** (pour DNA adénine méthylase). L'hémi-méthylation bloque la réinitiation.
- **Rôle de la DNA A :** L'accumulation de Dna A induit l'initiation de la réplication. Le promoteur de Dna A contient aussi des séquences GATC.

### 2-7- La réplication du matériel génétique des rétrovirus

Les rétrovirus sont des virus à ARN monocaténaire dont le génome passe au cours du cycle viral, par une intégration sous la forme d'ADN, dans le génome de la cellule hôte. Le plus connu de ces rétrovirus est virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou **virus du SIDA**.

La réplication du matériel génétique des rétrovirus permet ainsi le passage d'une ARN simple brin à un ADN double brin et ceci grâce à 3 principales enzymes :

- Une **ADN polymérase ARN dépendante**, qui n'est autre que la **transcriptase inverse** responsable de la transcription reverse de l'ARN virale. Elle a la caractéristique de synthétiser dans la direction 5′ vers 3′, et nécessite une amorce, une matrice, ainsi que les désoxyribonucléosides triphosphate ; elle ne présente par contre pas d'activité exo-nucléasique 3' vers 5'.
- Une **RNase** responsable de la lyse de l'ARN virale.
- Une **ADN polymérase ADN dépendante** responsable de la formation de l'ADN double brin qui sera intégré dans le génome de la cellule hôte.

## Chapitre 3 : Réparation de l'ADN

Face aux différents dommages de l'ADN la cellule a dû mettre en place deux types de protection : les mécanismes de sauvegarde (transformation de substances dégradantes en molécules inoffensives) et les mécanismes de réparation de l'ADN.

Après réparation il y aura une mutation pour 109 nucléotides. Les mécanismes de réparation sont de différents types et permettent tous tant que possible de rétablir la viabilité d'une cellule.

### 3-1- Mutations : altérations de l'information génétique

La **mutation** est une modification héritable de la séquence du génome d'un organisme. Ces évènements modifient la séquence d'ADN et ainsi le phénotype de l'individu.

Le **phénotype** correspond à l'ensemble des caractères observables de l'individu.

Les mutations peuvent être transmises à la descendance si elles se réalisent dans des génomes de cellules germinales ou précurseurs de cellules germinales. Les mutations de cellules somatiques entraînent des modifications au sein même de l'individu.

Ces mutations permettent l'évolution de l'espèce, mais malheureusement elles sont responsables d'un grand nombre de maladies. Le plus souvent ces modifications sont des mutations ponctuelles : substitution, additions et délétion de bases.

**3-1-1-Additions ou délétions de bases :** Les additions et les délétions de bases correspondent respectivement, comme leurs noms l'indiquent, à des ajouts ou pertes de bases. Si l'addition ou la délétion de nucléotides n'est pas un multiple de 3, il y aura décalage du cadre de lecture (*frame-shift*). En effet si l'addition ou la délétion est un multiple de 3 il y aura addition ou délétion d'acides aminés au niveau de la protéine finale.

Le décalage du cadre de lecture peut entraîner des séquences d'acides aminés totalement différentes et des apparitions de codons stop.

**3-1-2- Substitutions de bases :** Les substitutions de bases peuvent être de deux types : transition ou transversion de base.

- La **transition** correspond au remplacement d'une purine par une purine ou d'une pyrimidine par une pyrimidine. Ainsi une paire de bases A-T est remplacée par une paire de bases G-C.

- La **transversion** correspond au remplacement d'une purine par une pyrimidine ou d'une pyrimidine par une purine.

Les mutations entraînant le changement d'acides aminés sont des mutations faux-sens. Lorsque la mutation n'entraîne pas de modification d'acides aminés, et ceci dû à la redondance du code génétique en position 3, on parle de mutation silencieuse. Lorsque la substitution entraîne l'apparition d'un codon stop (UAA, UGA et UAG), la mutation est une mutation non-sens.

**3-2- Lésions ou dommages de l'ADN :** Les lésions sont soit endogènes sans agents exogènes, soit provoquées par des agents pathogènes (ou mutagènes) qui peuvent être physiques ou chimiques. Les **agents mutagènes** sont des agents capables de produire des lésions de l'ADN par effet direct ou indirect.

Les **agents mutagènes physiques** correspondent aux rayonnements X ou γ, aux rayonnements UV et à la chaleur. Les **agents mutagènes chimiques** sont essentiellement sous la forme de radicaux super-oxydes ($O_2$-) qui peuvent oxyder de manière non catalytique les molécules biologiques et les engager dans des réactions chimiques incontrôlées.

- **Lésions endogènes sans agents exogènes** : Ces lésions ne sont pas soumises à des agents exogènes et sont ponctuelles. On observe :
- **Des mauvaises incorporations de bases :** association de l'adénine avec la cytosine et de la thymine avec la guanine…
- **Des dépurinations et dépyrimidations :** qui correspondent à des pertes de bases par hydrolyse de la liaison β-N-glycosidique. Ces pertes sont spontanées à pH acide par rupture de la liaison N-glycosidique. Suite à ces pertes d'informations la polymérase ne sait pas quelle base incorporer, il y a ainsi formation d'un site AP.
- **Des désaminations** qui correspondent à des pertes de groupement amine sur les bases C, A et G. Les désaminations sont dues à des excès de chaleur. L'adénine est transformée en hypoxanthine, la guanine en xanthine et la 5-méthylcytosine en thymine.
- **Des erreurs de méthylations**, en effet les méthylations sont normales, participent à l'expression du gêne et se réalisent souvent au niveau des îlots CpG. Les erreurs de méthylations donnent des alkylations sur le carbone C6 au lieu du carbone C5 entraînant des absences de formation de liaisons H entre bases.

**3-2-2- Lésions provoquées par des agents pathogènes**

**3-2-2-1- Les lésions dues à des mutagènes physiques :**

- **Formation de dimères de Thymine** (TpT) qui correspondent à la formation de liaisons covalentes entre deux Thymine. Ces dimères de Thymine créent des distorsions de l'hélice d'ADN et peuvent être fixés par action de l'UV.

- **Ionisation de bases et coupures simple ou double brin de l'ADN par rupture du D-ribose** dus aux rayonnements ionisants : rayons X et rayons γ.
- **Désamination**, en effet les excès de chaleur peuvent également avoir une origine exogène.

**3-2-2-2- Les lésions dues à des mutagènes chimiques :**

- **Formation de lésions oxydatives** par des ERO (espèces réactives oxygénées) qui peuvent être exogène ou endogène. Elles correspondent à des oxydations de bases provoquées par des agents super-oxyde (°O2-, H2O2 et °OH).

- **Addition de molécules exogènes** qui créent également des distorsions de l'ADN. On compte les aflatoxines, les benzantracènes, les agents alkylants, les agents intercalants, le cis-platine …

**3-3- Mécanismes de réparation procaryote (E-Coli)**

**3-3-1- Mécanismes prenant place en dehors de la période de réplication :**

**3-3-1-1 Réparation par réversions des lésions** : Ce type de réparation utilise très peu de protéines et restore immédiatement les liaisons.

- **Photo-réactivation** : les photolyases sont des enzymes activées par l'énergie lumineuse et qui participent à la réparation de l'ADN par coupure des liaisons covalentes au niveau des dimères de thymine.
- **Réversion de coupure simple brin** : par une ADN ligase lorsqu'il n'y a pas de pertes de bases.
- **Réversion de dépurination par une purine insertase** : restore la liaison osidique, enzyme spécifique d'une base.

**3-3-1-2- Réparation par excision de base (système BER) :** Ce mécanisme est présent chez les procaryotes et les eucaryotes et essentiellement impliqué dans les réparations de mutations endogènes jusqu'à 4 nucléotides. Le système BER permet l'élimination des bases anormales et la réparation du site AP.

L'**ADN glycosylase** coupe la liaison N-glycosidique entre la base anormale et le désoxyribose, entraînant l'apparition d'un site AP. Il y a uniquement extraction de la base sans coupure de liaison phosphodiester. Il existe de nombreuses glycosilases dans la cellule, chacune reconnaît une (plusieurs) base(s) modifiées différentes.

Une endonucléase 3'-5' coupe la liaison phosphodiester adjacente au site AP, l'ADN-polymérase I enlève le site AP et synthétise le morceau d'ADN manquant, puis l'ADN-ligase met en place la liaison Phosphodiester manquante.

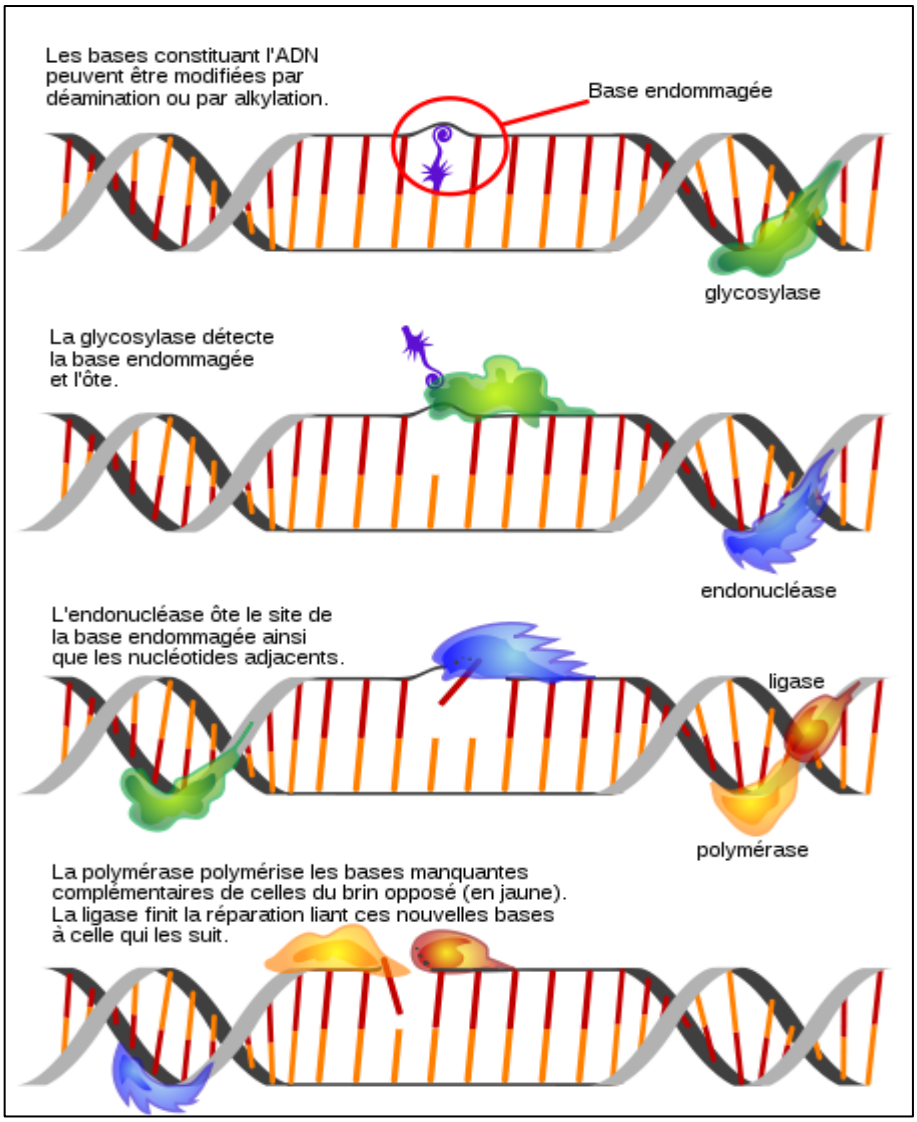



**Figure 13 :** Réparation par excision de base (système BER)

### 3-3-1-3- Réparation par excision de nucléotides (système NER) :

Ce mécanisme est présent chez les procaryotes et les eucaryotes et permet la réparation de plusieurs nucléotides. Il prend également en compte une endonucléase 3'-5', l'ADN-polymérase I et l'ADN-ligase. Le système NER correspond au mécanisme de réparation par les UV (UVr). Le complexe UVr A, B, C, D reconnaît les distorsions de l'ADN.

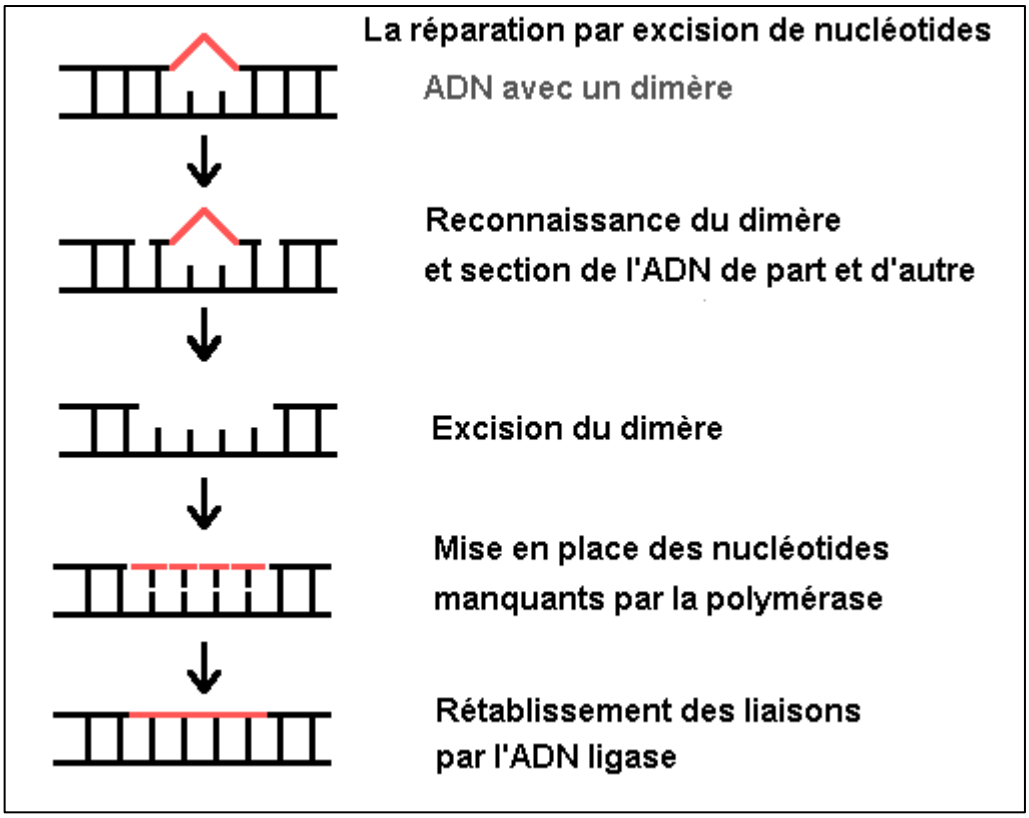



**Figure 14** : Mécanisme de réparation par excision de nucléotide (système NER)

**3-3-2- Mécanismes de réparation liés à la période de réplication :**

**3-3-2-1 Réparation de mésappariements par le système Mut HLS :** Ce mécanisme est également présent chez les procaryotes et les eucaryotes et est post-réplicatif. Il permet la réparation des erreurs d'appariement entre les chaînes d'ADN après la réplication ainsi que les petites délétions ou additions. Le mécanisme Mut HLS nécessite la reconnaissance du brin néosynthétisé de l'ADN grâce aux méthylations des adénines du brin anciennement synthétisé de l'ADN, ceci permettant la distinction entre les deux brins. Une endonucléase rompt ensuite le brin néosynthétisé et la partie portant la lésion est éliminée.

Mut S reconnaît le mésappariement, Mut L se lie et active Mut H et Mut H est une endonucléase qui coupe en aval de l'erreur du mésappariement. Il y a ensuite action d'une exonucléase et d'une Hélicase, puis de l'ADN-polymérase I et finalement de la ligase.

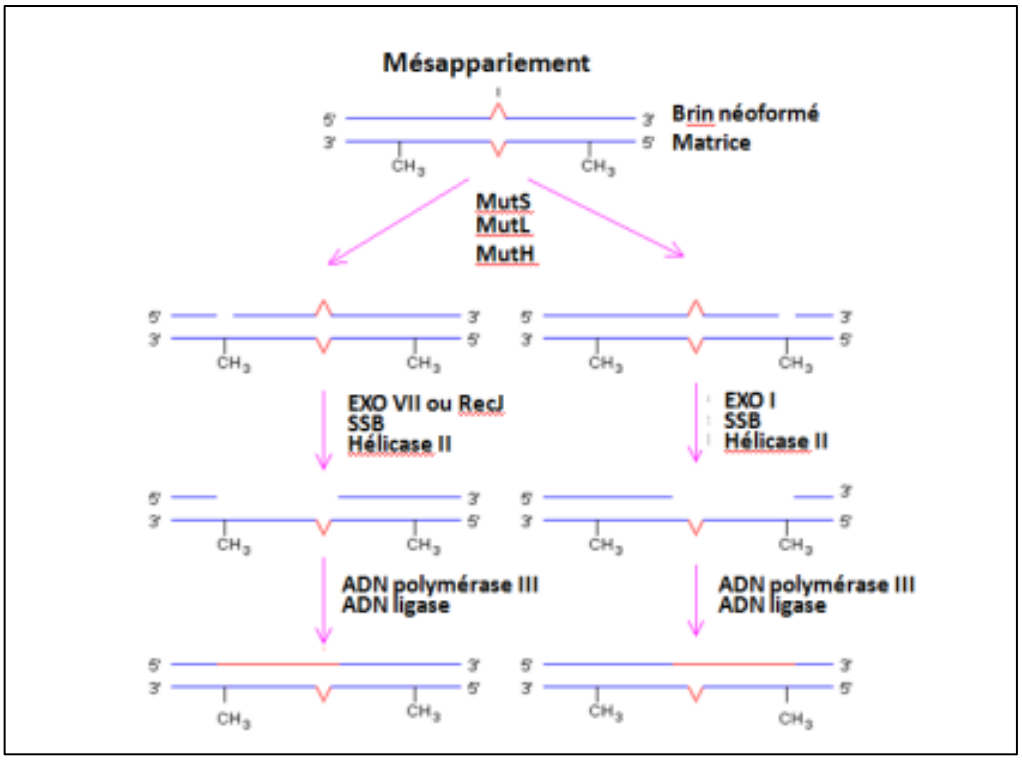



**Figure 15** : Modèle de la réparation par le système Mut SLH

**3-3-2-2- Réparation par recombinaison :** La réparation par recombinaison correspond à la synthèse translésionnelle (**TLS**) qui consiste à poursuivre la réplication de l'ADN au niveau d'une lésion du brin matriciel de l'ADN ne permettant aucun appariement. Elle se réalise en même temps que la réplication.

L'ADN-polymérase II a un rôle important dans la reprise de la synthèse d'ADN après la lésion, l'ADN-polymérase III est alors transitoirement expulsée pour que la réplication puisse continuer.

L'ADN-polymérase III arrive au niveau d'une erreur et est éjectée par les enzymes de la TLS qui remplacent la base erronée ou alors qui permet la poursuite de la réplication un peu plus loin (ceci suivant l'ADN-polymérase utilisé (II, IV ou V).

# Chapitre 4 : Recombinaison génétique et éléments génétiques transposables

La recombinaison génétique (ou recombinaison factorielle) désigne une recomposition des gènes d'un individu ou d'une cellule qui découle de l'association des gènes parentaux. Chaque personne contient 23 paires de chromosomes hérités du père et de la mère. Ces chromosomes sont constitués de petits fragments (gènes) qui, comme les chromosomes, s'associent au cours de la méiose (production des cellules sexuelles). Ces différents échanges permettent des millions de nouvelles combinaisons possibles : c'est ce qu'on appelle la recombinaison génétique.

Les génomes de tous les organismes (tous les règnes du vivant) ont la capacité de réarranger les génomes, qui vont permettre la diversification de leurs gènes mais parfois aussi leur niveau d'expression. Ces mécanismes de recombinaison génétique, essentiels à l'évolution, peuvent être classés en :

- **Recombinaison homologue** : lorsque cette recombinaison implique la réaction entre des séquences homologues de l'ADN

- **Recombinaison transpositionnelle** : transposition-insertion enzymatique d'un transposon dans un nouvel emplacement dans le génome.

- **Recombinaison spécifique de site** : insertion de phages entre deux sites de recombinaison spécifique.

La recombinaison illégitime est l'incorporation d'un segment d'ADN, ne répondant à aucune des règles régissant les trois mécanismes précédents.

### 4-1- Recombinaison générale ou homologue

Le processus de la recombinaison homologue est aussi appelé recombinaison générale parce que la machinerie enzymatique qui médie l'échange peut utiliser une paire quelconque de séquences d'ADN homologues comme substrats.

La recombinaison homologue implique un échange de séquences d'ADN entre chromosomes homologues, résultant en l'arrangement des gènes dans de nouvelles combinaisons. La recombinaison homologue est généralement utilisée pour fixer l'ADN de sorte que les informations ne soient pas perdues. C'est le cas des lésions dans l'ADN qui sont réparées par recombinaison du chromosome endommagée avec un chromosome homologue.

La recombinaison homologue se produit chez les bactéries (transformation, transduction générale et conjugaison HFrxF-). En effet, même les chromosomes viraux subissent une recombinaison.

### 4-1-1-Modèle de Holliday

En 1964, Robin Holliday a proposé un modèle de la recombinaison homologue qui s'avère le plus cohérent avec les découvertes suivantes.

- Les deux duplex d'ADN homologues sont juxtaposés de sorte que leurs séquences sont alignées. Ce processus d'appariement des chromosomes est appelé synapse.
- Il avait suggéré que la recombinaison commence avec l'introduction de coupures simple brin dans l'ADN au niveau des sites homologues sur les deux chromosomes appariés.
- L'ouverture d'une brèche dans un brin de DNA et le déroulement de la double hélice permet à des fragments de DNA simple brin de s'hybrider de façon anormale. L'existence de séquences homologues sur l'autre chromosome de la même paire peut conduire ce brin libre à s'hybrider avec la séquence complémentaire du chromosome homologue.
- Dans ce cas les brèches au bout des deux brins échangés peuvent être refermées par la DNA ligase. Une telle structure avec entrecroisement de brins de deux DNA homologues est appelée **Jonction de Holliday.**
- Cette structure est mobile et l'échange peut se propager par glissement de la structure le long des deux hélices en allant dans le même sens.
- La structure de Holliday est représentée par des hélices en croix après isomérisation (rotation de la moitié de la molécule de 180° ou **demi-chiasma**) les hélices seront résolues de deux façons :

  - 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.

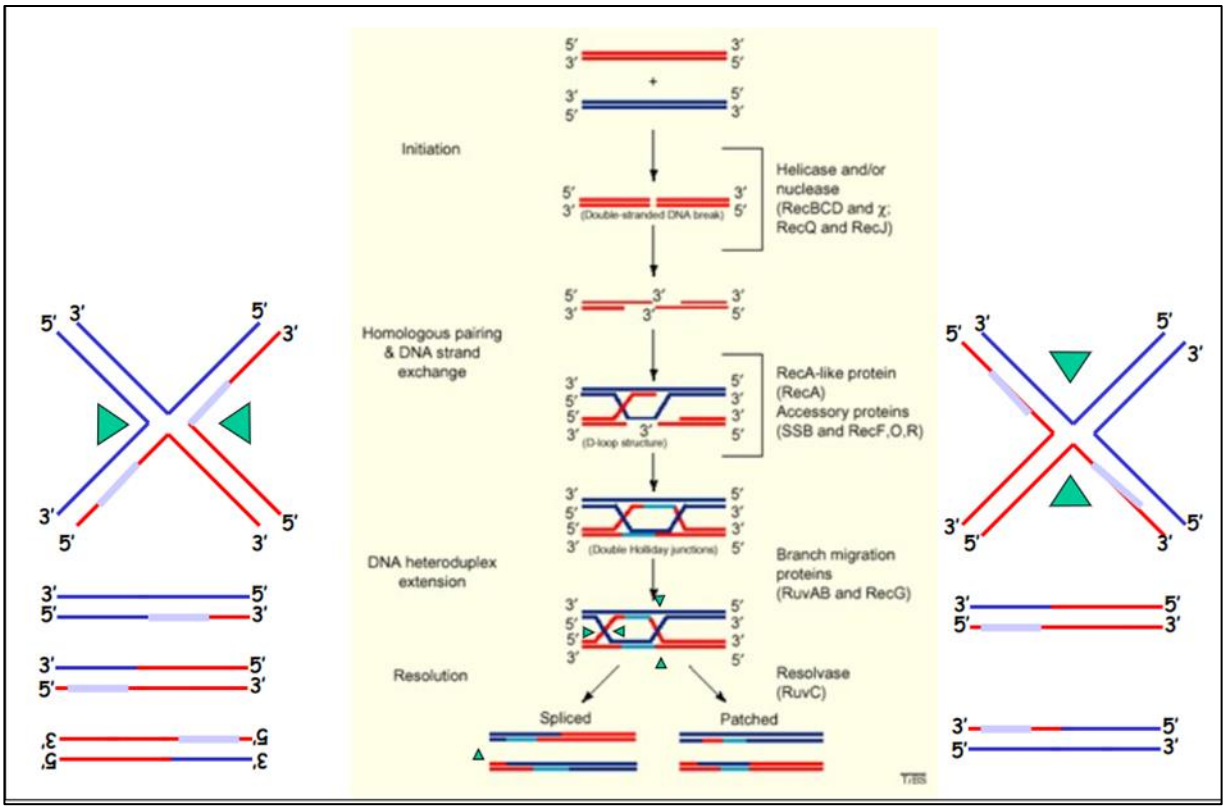



**Figure 16 :** Model de la recombinaison selon Holliday**.**

### 4-1-2-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.

**Nb:** des protéines similaires à celles-ci ont été identifiées chez les eucaryotes. Ceci indique que le processus fondamental de la recombinaison homologue est conservé à travers tous les organismes.

#### 4-1-2-1 Initiation de la recombinaison

Le complexe RecBCD possède à la fois une activité hélicase et nucléase et initie la recombinaison en se fixant à l'extrémité d'un duplex d'ADN. RecB et RecD sont des hélicases fonctionnant par hydrolyse de l'ATP; RecD ouvre la voie car il est plus rapide que RecB. Cette grande vitesse de RecD provoque l'apparition d'une boucle d'ADN entre RecD et RecB. RecBCD progresse le long du duplex, les SSB se lient rapidement aux simples brins émergents. Tôt ou tard, RecBCD rencontre une séquence nucléotidique particulière Chi (ou) siteχ, caractérisée par la séquence 5'-

GCTGGTGG-3’. Lorsqu'une telle séquence est rencontrée, RecBCD clive les brins d'ADN en amont de quatre à six bases sur le brin 3’ (Fig. 17). RecBCD bascule de telle sorte que l'activité nucléase envers le brin 5’-terminale augmente .

### 4-1-2-2 Invasion du brin homologue

La protéine RecA (recombinase), est une protéine multifonctionnelle qui agit dans la recombinaison homologue. En présence d'ATP et d’ADNss, RecA formant le filament hélicoïdal sert d’échafaudage (pont) sur lequel les événements de recombinaison ont lieu. Ce filament est assez grand pour recevoir 3 filaments d’ADN sur deux sites. Le premier site (1aire) 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. 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. Le résultat est **une jonction de Holliday**, l’intermédiaire classique de la recombinaison génétique.

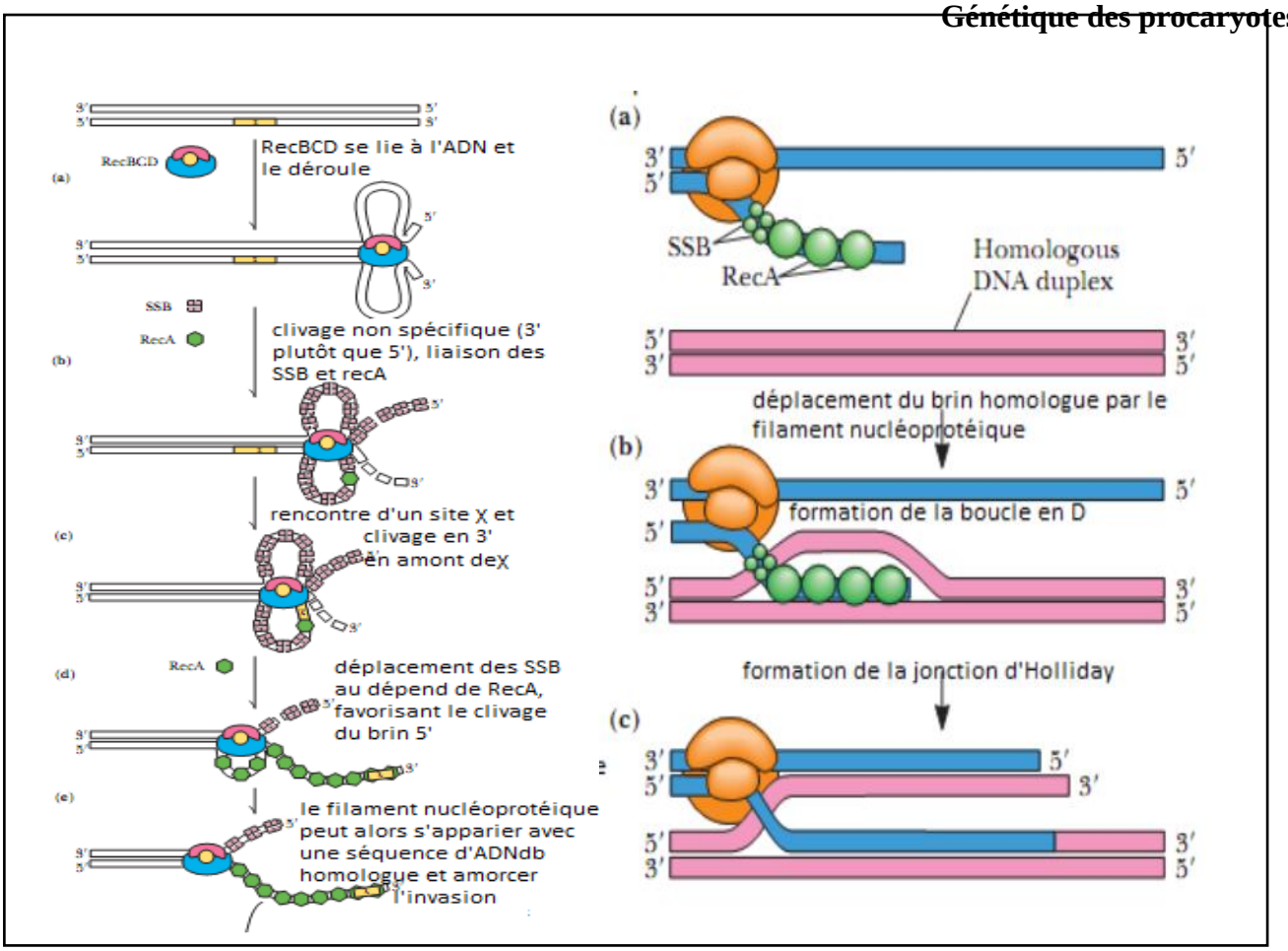



**Figure 17 :** Mécanisme de la recombinaison homologue**.**

**4-1-2-3 Migration du branchement et résolution de la jonction d'Holliday** :

RuvA et RuvB travaillent ensemble comme hélicase spécifique de la jonction de Holliday qui dissocie le filament et RecA et catalyse la migration de branchement. Le tétramère RuvA se fixe précisément dans le point de jonction, et médie l'assemblage de RuvB (2 hexamères) autour des bras opposés de la jonction de l'ADN. La Rotation des ADNdb par les anneaux hexamériques de RuvB tire l'ADNdb traversant (RuvB) et déroule les brins d'ADN à travers la "bobine" de RuvA.

Le tétramère RuvA est une structure «disc like » dont une face a une charge globale positive, à l'exception de quatre pointes négative centrales (une de chaque monomère RuvA). Ces quatre broches sont ancrées dans le trou au centre de la Jonction de Holliday.

Les squelettes sucre-phosphate chargés négativement des quatre brins d'ADN de la jonction de Holliday sont enfilés le long de la face des rainures de RuvA avec les broches centrales chargées négativement situés de manière à séparer transitoirement les molécules ADN double brin en simples brins par des interactions électrostatiques répulsives.

Les brins séparés de chaque duplex parental sont ensuite acheminés à travers les rainures de la face de RuvA , où ils établissent des liaisons hydrogène avec des bases des autres brins de l'ADN parental pour former les deux complexes hybrides sortant du complexe RuvAB. Un dimère RuvC se lie à la

jonction de Holliday et coupe les paires de brins d'ADN de polarité similaire, par son activité endonucléasique (résolvase) en produits recombinants hétéroduplexes.

### 4-2- Transposition

En 1950, Barbara McClintock a rapporté les résultats de ses études sur un gène activateur dans le maïs (*Zea mays*) qui avait la capacité à provoquer des mutations dans un second gène.

Ces Gènes activateurs étaient donc une source interne de mutation , capable de générer le plus de diversité. Une propriété plus curieuse était leur capacité à se déplacer relativement librement sur le génome.

C'est grâce aux travaux du biologiste moléculaire GIST, qu'en 1983, Barbara McClintock avait enfin reçu le prix Nobel de physiologie et médecine.

Il n'y a en effet aucune similitude de séquence entre les sites échangés. Le système est Rec indépendant. Les réarrangements provoqués auront donc un très fort caractère aléatoire. En dépit de leurs effets mutateurs dus à leur déplacement aléatoire, aussi bien les bactéries que l'homme, possèdent des "gènes sauteurs » en mesure de se déplacer d'un site à l'autre dans le génome: **E**léments **T**ransposables (ET), ou simplement transposons.

#### 4-2-1-Structure des transposons

Les transposons sont des molécules d'ADN double brin, variant de quelques centaines de paires de bases à plus de 10000. Ils comprennent un gène codant pour une enzyme (transposase) nécessaire pour l'insertion dans un chromosome et pour la remobilisation du transposon à des endroits différents. Ces mouvements sont appelés événements de transposition.

Les plus petits sont appelés séquences d'insertion, ou IS, signifiant leur capacité à s'insérer au hasard dans le génome. Et sont flanqués de part et d'autre par des séquences de répétitions inversées (IR).

Les transposons composés peuvent contenir des gènes autres que celui de la transposase telle que la résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds, des toxines ……. Ces gènes situés dans la région centrale sont flanqués de modules IS (séquences IS).

#### 4-2-2- Mécanismes de 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'insert 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. Deux mécanismes de transposition ont été décrits: une transposition conservative et une réplicative. Dans les deux mécanismes la transposase insère le transposon dans l'ADN du receveur.

(i) Dans la transposition conservative, l'ADN donneur perd son transposon.

(ii) en revanche, après la transposition réplicative, le donneur et le receveur possèdent une copie du transposon chacun.

**4-2-2-1- Transposition réplicative**

- Les deux molécules d'ADN sont d'abord entaillées pour former des extrémités libres.
- **a- h**. Les extrémités **a** et **f** sont jointes, de même que **g** et **d**. Cela laisse **b , c, e ,** et **h** libres.
- Deux de ces extrémités libres restantes du donneur (**b** et **c**) servent comme amorces pour la réplication (synthèse) de l'ADN, jusqu'à ce que **b** atteigne **e** et **c** atteigne **h**. Ces extrémités sont ligaturées pour compléter le co-intégrat (le transposon entier a été dupliqué). Un crossing over se produit entre les deux sites *res* (résolution) des deux copies du transposon, laissant deux molécules d'ADN indépendantes, portant chacune une copie du transposon (Fig.18).

**Nb :** Les éléments transposables se distinguent des phages car dépourvu de cycle de vie; et des plasmides car incapables de se reproduire de manière autonome et d'exister en dehors du chromosome.

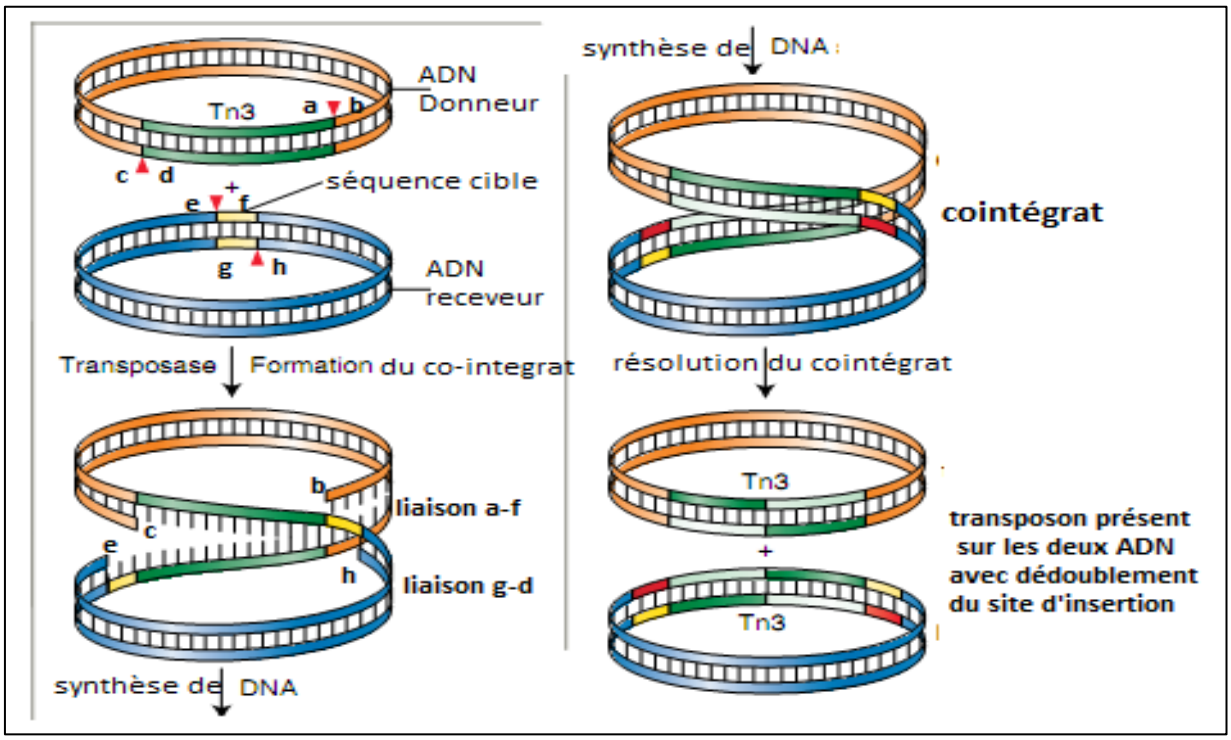



**Figure 18 :** Mécanisme de la transposition réplicative**.**

**4-3- Recombinaison spécifique de site (RSS)** : La recombinaison spécifique de site est un mode de plasticité génomique extrêmement bien conservé évolutivement. On la retrouve non seulement dans les trois règnes du vivant, Eucaryotes, *Archaea* et Bactéries, mais également dans le monde viral (bactériophages et virus d'archaea). À l'inverse de la transposition ou de la recombinaison homologue, la RSS est conservative puisqu'elle n'engendre ni synthèse ni dégradation des fragments d'ADN impliqués.

Le premier processus biologique identifié pour cette voie de recombinaison a été l'intégration du bactériophage lambda dans le chromosome d'*E. coli*, dès les années 60. C'est à ce jour un des mécanismes de recombinaison les plus étudié tant *in vivo* qu'*in vitro*. Cette recombinaison est Rec indépendante (d'autres enzymes sont impliquées).

**4-3-1-Rôles biologiques de la Recombinaison spécifique de site** : Ce mode de recombinaison concerne en général des évènements 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 ilots de pathogénicité.

*Le contrôle de l'expression génique, permettant d'adapter la spécificité d'hôtes dans le cas de certains bactériophages.

**4-3-2- Événements impliquant une RSS** : Trois types d'événements impliquent une recombinaison spécifique de site : l'**intégration** (bactériophage ʎ chez *E. coli*), **excision** (bactériophage ʎ chez *E. coli*), **inversion** (variation de phase chez les salmonelles).

**4-3-2-1- Intégration** : C'est le cas des phages ou plasmides intégratifs, et des intégrons permettant de séquestrer des gènes dans une région du génome. L'intégration nécessite que la recombinase réunisse dans l'espace deux sites de recombinaison, les maintienne dans une synapse catalytique, et procède à l'événement de recombinaison entre les deux partenaires (fig.19a).

**4-3-2-2- L'excision ou la résolution :** Les deux sites de recombinaison sont portés par le même réplicon initial, et doivent être en répétition directe. Après synapse par la recombinase, deux

réplicons indépendant seront produits, soit identiques dans le cas de la résolution de dimères, soit différents dans le cas de l'excision de phages ou plasmides intégratifs (fig.19b).

**4-3-2-3- Inversion** : Nécessite également que les deux sites de recombinaison soient portés par le même réplicon. Cependant, pour qu'une inversion ait lieu, il faut que ces sites soient en répétition inversée. Leur assemblage dans la synapse va engendrer des contraintes topologiques qui conduiront à l'inversion du matériel génétique situé entre les deux sites plutôt qu'à leur délétion (fig.19c).

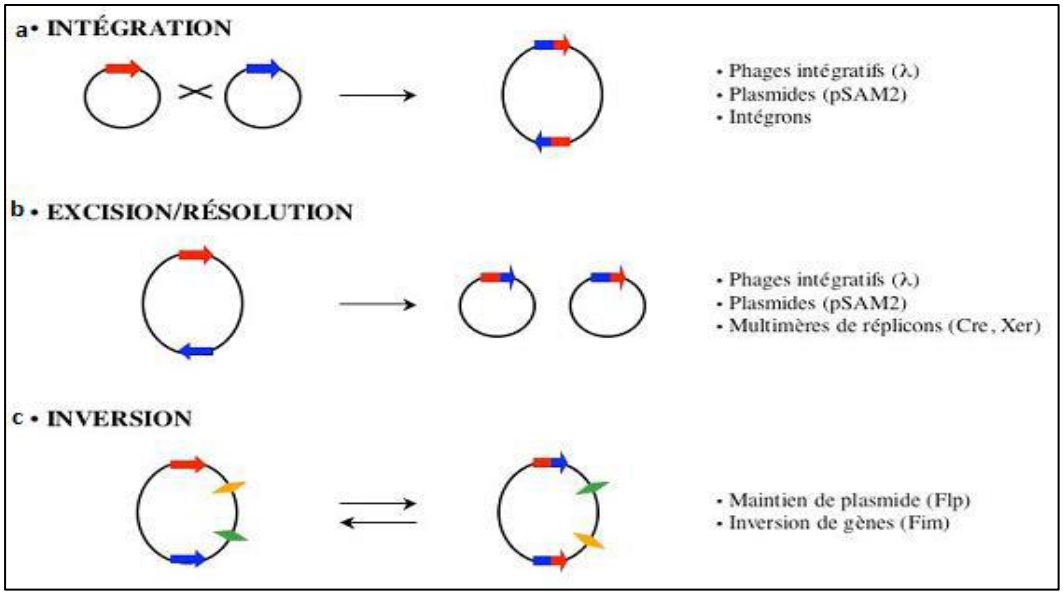



**Figure 19** : Evénements impliquant une Recombinaison spécifique

**4-3-3-Les recombinases** : On distingue deux familles de recombinases spécifiques de site, sur la base des résidus impliqués dans la catalyse : les recombinases à tyrosine et les recombinases à sérine. Ces deux familles présentent quelques rares points communs en termes de catalyse, comme une très haute spécificité de sites de recombinaisons, l'indépendance vis à vis de cofacteurs énergétiques, ou la formation d'intermédiaires réactionnels covalents avec les ADN cibles.

Aussi bien les tyrosines que les sérines recombinases clivent l'ADN par un déplacement nucléophile de l'hydroxyle d'ADN à l'aide du site actif sur leur chaine latérale (où se trouve la sérine ou la tyrosine). Le mécanisme utilisé est analogue à celui d'une topoisomérase en ce sens où les brins d'ADN sont coupés non pas par hydrolyse mais bien par un transfert de phosphoryle directement vers la chaîne latérale de la recombinase.

Parmi les tyrosines recombinases les plus étudiées on trouve λ Int et bien d'autres phage-intégrases, IntI, Cre, XerC/D, FimB FimE et Flp. Ces recombinases remplissent des fonctions d'intégration,

d'excision ou d'inversion. Concernant les recombinases à sérine on trouve les invertases Gin du bactériophage Mu et Hin de *Salmonella* sp. et les résolvases TnpR de Tn3/γδ et d'autres transposons.

### 4-3-4- Recombinaison spécifique de site

#### 4-3-4-1- Intégration et excision du bactériophage lambda (ʎ)

L'intégration de lambda, dans le chromosome de son hôte est spécifique de site. L'intégrase, de la famille des recombinases à tyrosine, codée par le phage, va reconnaître et synapser deux sites de recombinaison, *att*B (site d'attachement bactérien) et *att*P (site phagique). Après recombinaison, le génome viral sera intégré dans le génome de l'hôte encadré par deux sites recombinants *att*L et *att*R, qui seront reconnus et recombinés lors de l'excision (fig. 20).

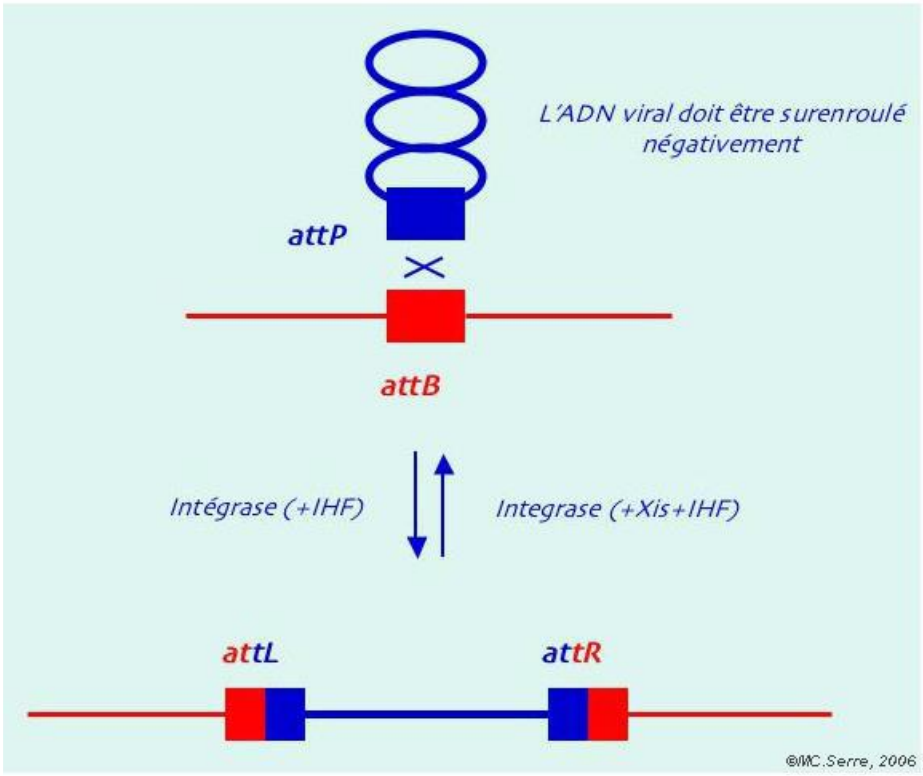



**Figure 20** : Intégration/excision de lambda .

**4-3-4-2- Acquisition des gènes de résistance aux antibiotiques** : La plupart des gènes de résistance ont été acquis par des transferts horizontaux. Les gènes de résistances seraient encadrés par des séquences similaires voire identiques dans certains cas: les **Integrons**. Un intégron minimal est constitué d'une plateforme codant une intégrase IntI, localisée à proximité d'un site de recombinaison *att*I, et d'une cassette contenant un gène de résistance et un site de recombinaison *att*C. Les cassettes vont s'intégrer à *att*I, se réarranger dans l'intégron résultant, et finalement se

propager dans une population par transfert horizontal. A ce jour, plus de 70 différents gènes de résistance ont été identifiés dans des intégrons (fig.21).

**4-3-4-3- Variation de l'expression génique (variation de phase)** : Cette variation est une inversion contrôlée par une invertase **HIN** (de la famille des sérines recombinases), reconnaissant et recombinant deux sites responsables de la synthèse de flagelline, *hix*L et *hix*R, bordant la région de 1 kpb subissant l'inversion. L'inversion de la région comprise entre les deux sites *hix* va changer l'orientation d'un promoteur. Dans une orientation (phase 2), il permet la transcription du gène H2 et d'un gène codant un répresseur ayant comme cible le promoteur du gène H1. Après inversion (phase 1) les gènes H2 et le represseur ne sont plus transcrits, ce qui lève la répression du gène H1, et permet de modifier la composition des flagelles (Fig.22).

***La recombinaison illégitime** (ou non-homologue) est un processus cellulaire conduisant à la réunion de deux fragments d'ADN ne présentant pas ou très peu d'homologie de séquence. Elle est à l'origine de diverses anomalies du génome (délétion, insertion, translocation, amplification génique, intégration virale) impliquées dans l'apparition de maladies génétiques ou le développement tumoral. Elle permet aussi l'élimination des cassures double-brin accidentelles de la chaîne nucléotidique, consécutives à des erreurs du métabolisme normal de l'ADN (réplication, transcription, réparation) ou à la présence de lésions sur l'ADN produites par les agents génotoxiques.

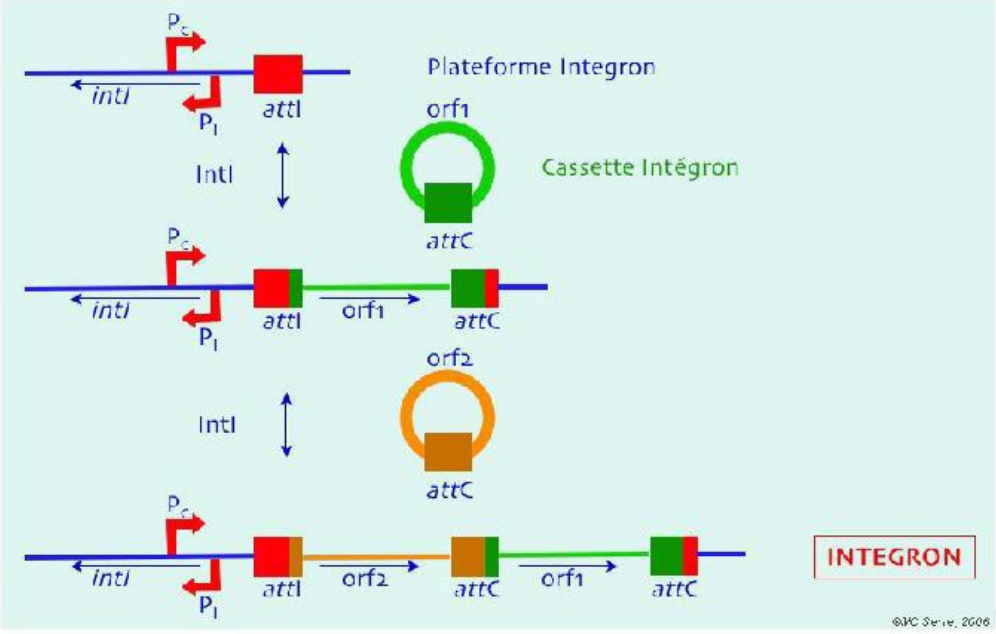



**Figure 21** : Structure d'un Intégron .

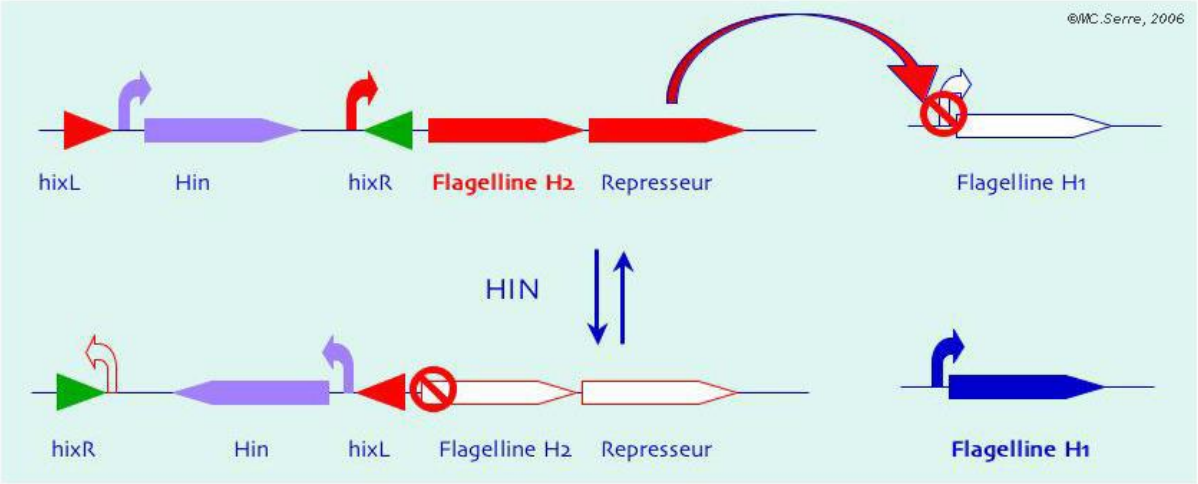



**Figure 22** : Variation de phase chez les salmonelles.

## Chapitre 5 : Transfert d'information génétique

Le transfert de gène chez les bactéries est unidirectionnel d'une cellule donneuse à une cellule receveuse et le donneur donne généralement seulement une petite partie de son ADN au receveur. Ainsi, non pas des zygotes complets mais plutôt zygotes partiels sont formés. Les gènes bactériens sont généralement transférés à des membres de la même espèce mais occasionnellement le transfert vers d'autres espèces peut avoir lieu.

**5-1-Transformation :** est le premier modèle connu de transfert de matériel génétique. Ce modèle a permis de démontrer que l'ADN était le support chimique de l'hérédité en 1944. La transformation est le transfert de gènes résultant de l'absorption d'ADN nu par une cellule receveuse à partir d'une cellule donneuse. Certaines bactéries peuvent absorber de l'ADN à partir de l'environnement et l'ADN absorbé peut être incorporé dans le chromosome du receveur.

### 5-1-1- Facteurs affectant la transformation

**5-1-1-1- Taille de l'ADN** : L'ADN double brin qui fonctionne le mieux pour la transformation fait au moins 5 X $10^5$ daltons. En conséquence, la transformation est sensible aux nucléases de l'environnement.

**5-1-1-2- Compétence du receveur** : Certaines bactéries sont capables d'absorber de l'ADN naturellement. Cependant, ces bactéries prennent seulement de l'ADN à un moment précis de leur cycle de croissance quand elles produisent une protéine spécifique appelée facteur de compétence. A cette étape on dit que les bactéries sont compétentes. D'autres bactéries ne sont pas capables d'absorber de l'ADN naturellement. Cependant, dans ces bactéries, la compétence peut être induite in vitro par traitement chimique (ex : CaCl2).

### 5-1-2- Etapes de la transformation

**5-1-2-1- Absorption de l'ADN :** L'absorption d'ADN diffère pour les bactéries en fonction qu'elles soient Gram + ou Gram -. Dans les bactéries Gram+ l'ADN est absorbé sous la forme d'une molécule simple brin et le brin complémentaire est fabriqué chez le receveur. Par contraste, les bactéries Gram – absorbent l'ADN sous forme de double brin.

**5-1-2-2- Recombinaison légitime/homologue/générale :** Après que l'ADN du donneur ait été internalisé, un évènement de recombinaison réciproque a lieu entre le chromosome et l'ADN donneur. Cette recombinaison nécessite une homologie entre l'ADN donneur et le chromosome ce qui résulte en la substitution de l'ADN entre le receveur et le donneur comme illustré sur la figure 23.

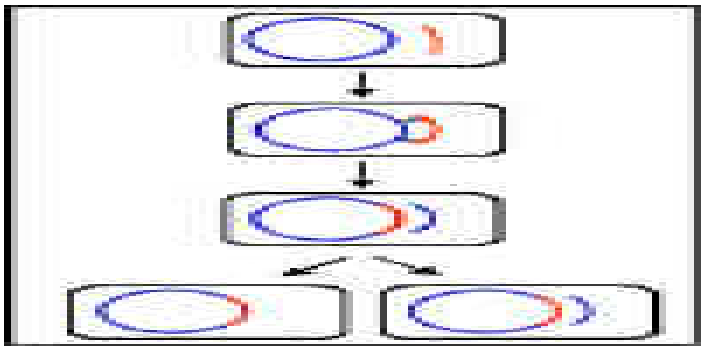


**Figure 23** : Recombinaison générale.

La recombinaison nécessite les gènes de recombinaison bactériens (recA, B et C) et une homologie entre les ADN impliqués. Ce type de recombinaison est appelé légitime ou homologue ou générale. A cause de la nécessité d'une homologie entre les ADN du donneur et de l'hôte, c'est seulement l'ADN de bactéries fortement apparentées qui peut se transformer de manière efficace, bien que dans de rares cas le transfert de gènes entre des bactéries peu apparentées a déjà été mis en évidence.

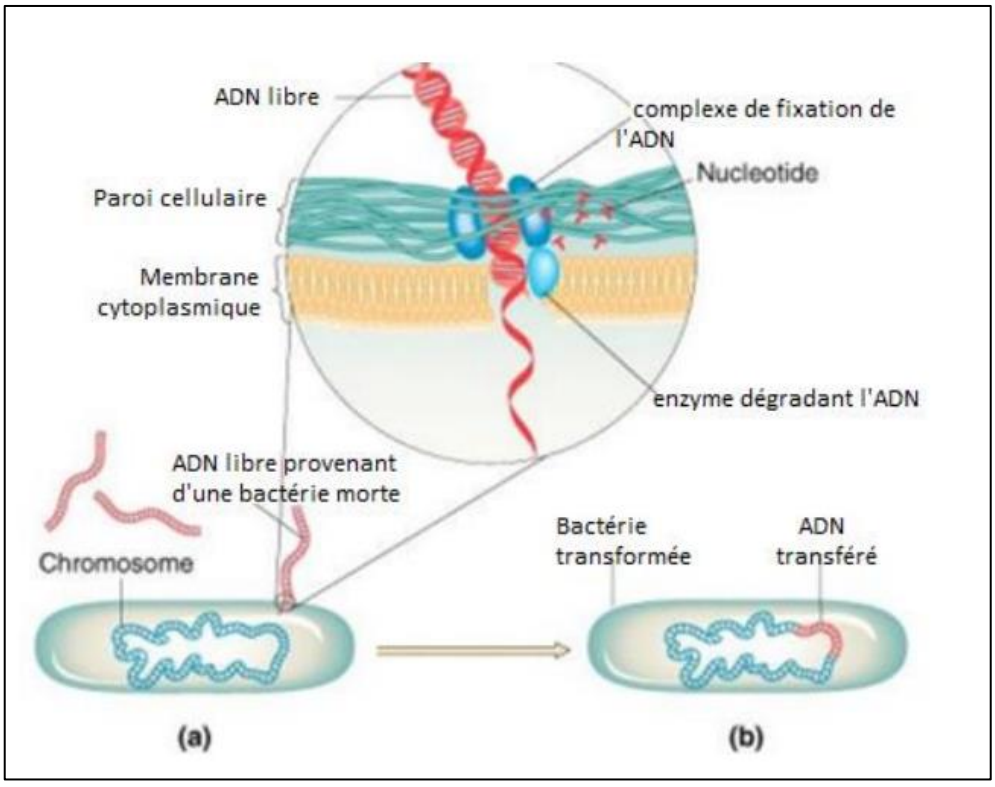



**Figure 24** : Transformation bactérienne, (a) fixation de l'ADN nu, (b) intégration du fragment d'ADN après recombinaison homologue.

**5-2- Conjugaison :** Il s'agit du transfert d'ADN d'un donneur à un receveur par contact physique direct entre les cellules. Chez les bactéries il y a deux types de reproducteurs, un donneur (mâle) et un receveur (femelle) et la direction de transfert du matériel génétique est unidirectionnelle ; l'ADN est transféré du donneur au receveur.

**5-2-1- Types de reproducteurs chez les bactéries**

**5-2-1-1- Donneur** : La capacité d'une bactérie à être un donneur est la conséquence de la présence dans la cellule d'un morceau supplémentaire d'ADN appelé facteur F ou facteur de fertilité ou facteur sexuel. Le facteur F est un morceau d'ADN circulaire qui peut se répliquer de manière autonome dans la cellule ; c'est un réplicon indépendant. Les morceaux d'ADN extra-chromosomiques qui peuvent se répliquer de manière autonome ont le nom générique de plasmide. Le facteur F porte des gènes qui sont nécessaires à sa réplication et pour sa capacité à transférer de l'ADN au receveur. L'une des choses pour laquelle code le facteur F est la possibilité de produire un pilus sexuel (pilus F) à la surface de la bactérie. Ce pilus est important pour le processus de conjugaison. Le facteur F n'est pas seulement un plasmide qui peut médier la conjugaison mais il est généralement utilisé comme modèle.

**5-2-1-2- Receveur :** La capacité à agir comme un receveur est une conséquence de l'absence du facteur F.

**5-2-2- Etats physiologiques du facteur F :**

**5-2-2-1- Autonome (F+)** : Dans cet état le facteur F porte seulement les gènes nécessaires pour sa réplication et pour le transfert d'ADN. Il n'y a pas de gène chromosomique associé avec le facteur F dans les souches F+. Lors de croisements entre les types F+ et F- le F- devient F+ alors que le F+ reste F+. Ainsi, le facteur F est infectieux. De plus, il y a seulement un faible taux de transfert de gènes chromosomiques

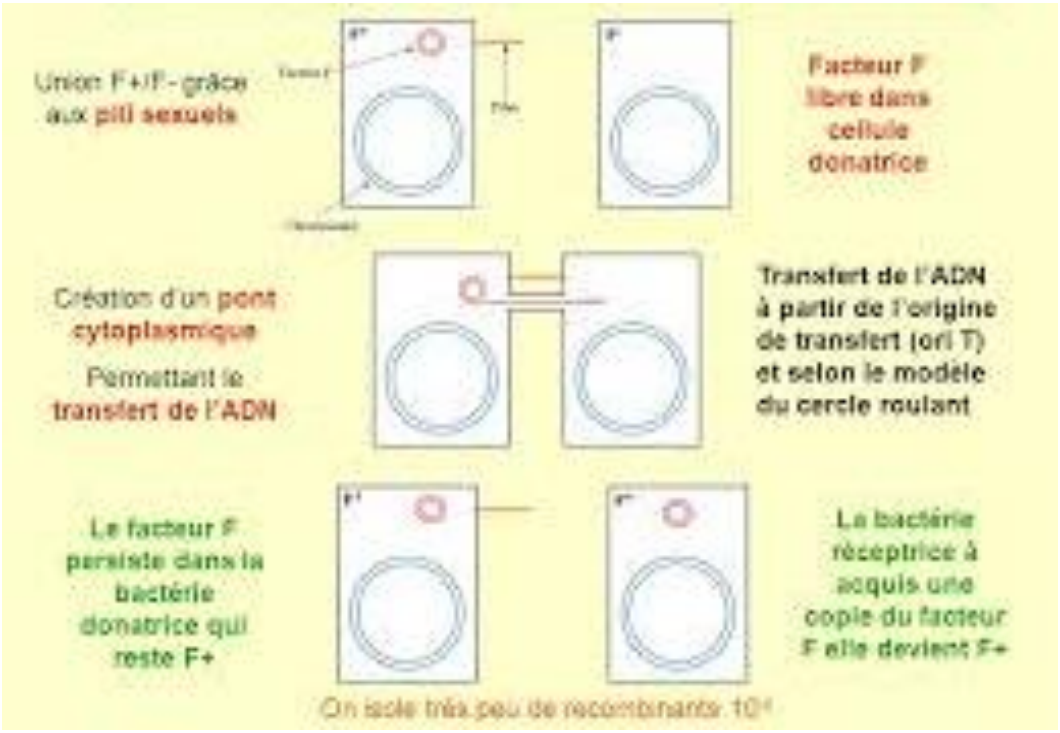



**Figure 25 :** La conjugaison entre $F^+$ et $F^-$ .

**5-2-2-2- Intégré (Hfr) :** Dans cet état le facteur F est intégré dans le chromosome bactérien via un évènement de recombinaison comme. Lors de croisements entre les types Hfr et F-, le F- devient rarement Hfr et Hfr reste Hfr. De plus, il existe une forte fréquence de transfert de gènes chromosomiques du donneur.

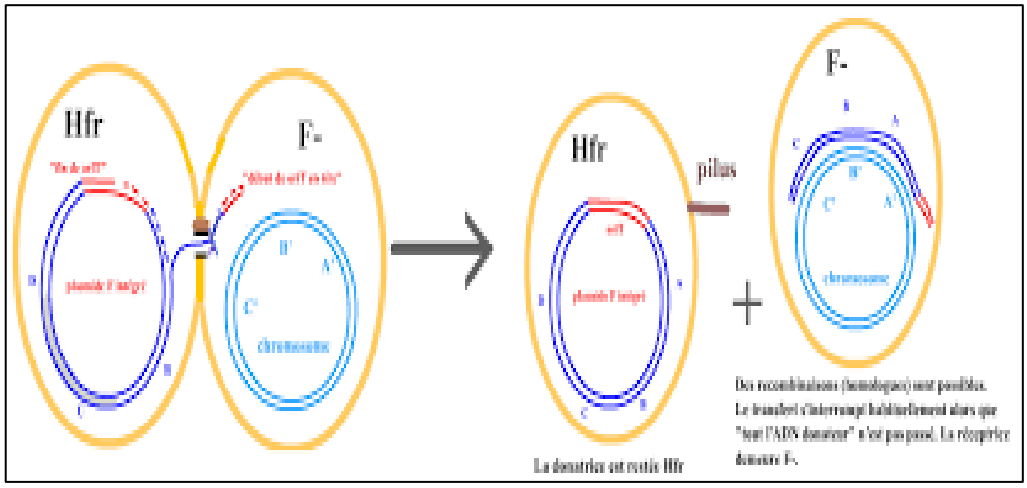



**Figure 26 :** La conjugaison entre HFr et $F^-$

**5-2-2-3- Autonome avec gènes chromosomiques (F') :** Dans cet état le facteur F est autonome mais il porte cette fois quelques gènes chromosomiques. Les facteurs F' sont produits par excision du

facteur F d'un Hfr, comme illustré sur la figure 5b. Occasionnellement quand le facteur F est excisé d'un chromosome Hfr, les gènes du donneur situés de part et d'autre du facteur F peuvent être excisés avec le facteur F générant un F'. Les facteurs F' sont nommés selon les gènes chromosomiques qu'ils portent.

Lors de croisements entre F' et $F^-$ , le $F^-$ devient F' alors que le F' reste F'. De plus il y a de fortes fréquences de transfert des gènes chromosomiques de F' et de faibles fréquences de transfert des autres gènes chromosomiques du donneur.

### 5-3- Mécanisme de conjugaison

#### 5-3-1- Croisement F+ x F-

i) **Formation de pair** : Le bout du pilus sexuel vient au contact du receveur et un pont de conjugaison se forme entre les deux cellules. C'est par ce pont que l'ADN va passer du donneur vers le receveur. Ainsi, l'ADN est protégé des nucléases de l'environnement. Les couples appariés peuvent être séparés par des forces de cisaillement et la conjugaison est alors interrompue. Ainsi les couples appariés restent associées seulement pour un court moment.

ii) **Transfert d'ADN** : L'ADN plasmidique est entaillé à un site spécifique appelé origine de transfert et est répliqué par un mécanisme de « cercle roulant ». Un ADN simple brin passe dans le pont de conjugaison et entre dans le receveur où le second brin est synthétisé.

iii) **Ce processus** explique les caractéristiques du croisement F+ x F-. Le receveur devient F+, le donneur reste F+ et il y a un faible taux de transfert de gènes chromosomiques du donneur. En effet, comme décrit dans la figure 7 il n'y a pas de transfert de gènes chromosomiques du donneur.

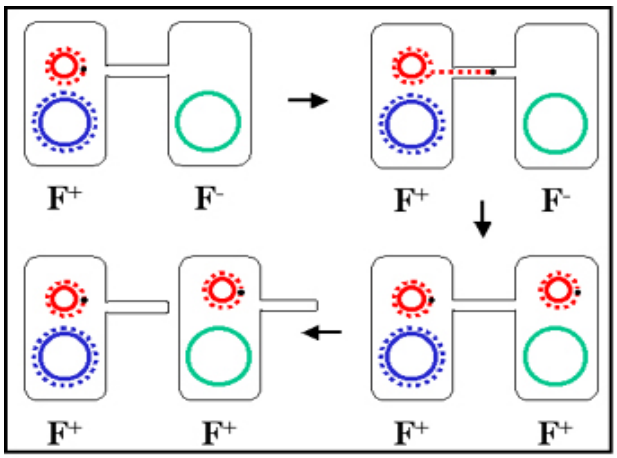



**Figure 27:** Caractéristiques de la conjugaison entre **$F^+$ et $F^-$**

### 5-3-2- Croisement Hfr x F-

i) **Formation de paire**

ii) **Transfert d'ADN** : L'ADN est entaillé au niveau de l'origine de transfert et est répliqué par un mécanisme de cercle roulant. Mais l'ADN qui est transféré est le chromosome. En fonction d'où le facteur F s'est intégré dans le chromosome et de son orientation, différents gènes chromosomiques seront transférés à différents moments. Cependant, l'ordre et les distances relatives des gènes resteront toujours les mêmes. C'est seulement quand l'ensemble du chromosome est transféré que le facteur F est transféré. Puisque des forces de cisaillement séparent les couples appariés il est rare que l'ensemble di chromosome soit transféré. Ainsi, le receveur ne reçoit pas le facteur F lors d'un croisement Hfr x F-.

iii) **Recombinaison légitime** : La recombinaison entre l'ADN transféré et le chromosome résulte en l'échange de matériel génétique entre le donneur et le receveur.

iv) **Ce mécanisme explique** les caractéristiques du croisement Hfr x F-. Le receveur reste F-, le donneur reste Hfr et il y a une forte fréquence de transfert de gènes chromosomiques du donneur

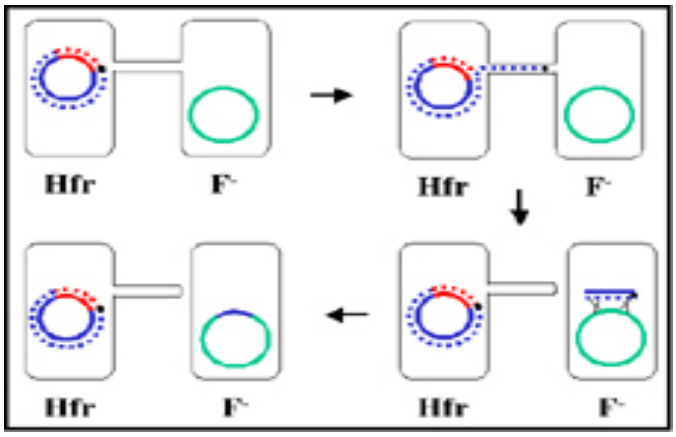



**Figure 28:** Caractéristiques du croisement HFr X F-

### 5-3-3- Croisement F' x F- :

i) **Formation de paire**

ii) **Transfert d'ADN** : Ce processus est similaire au croisement F+ x F-. Cependant, comme le F' porte quelques gènes chromosomiques ils seront aussi transférés.

iii) **La recombinaison homologue** n'est pas nécessaire bien qu'elle puisse se produire.

iv) **Ce mécanisme** explique les caractéristiques du croisement F' x F-. Le F- devient F', le F' reste F' et il y a une forte fréquence de transfert de gènes du donneur sur le F' mais une faible fréquence de transfert des autres gènes chromosomiques du donneur.

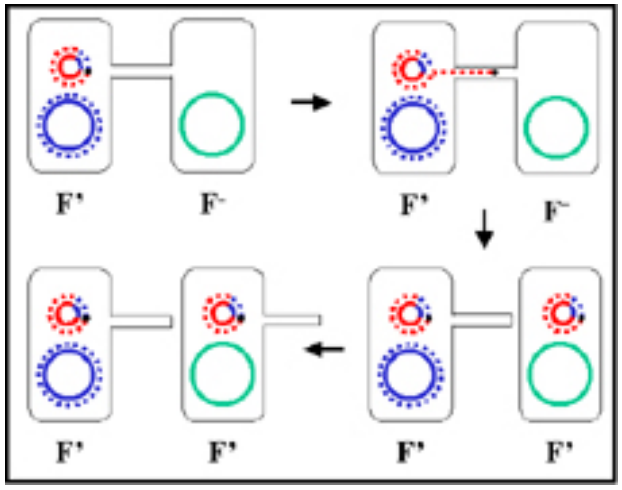



**Figure 29:** Caractéristiques du croisement F' X F-

**5-4-Transduction :** est le transfert d'information génétique à partir d'un donneur vers un receveur via un bactériophage. La paroi du phage protège l'ADN de l'environnement et de cette manière la transduction, contrairement à la transformation, n'est pas affectée par les nucléases de l'environnement. Tous les phages ne peuvent pas médier la transduction. Dans la plupart des cas le transfert de gène a lieu entre des membres de la même famille de bactéries. Cependant, si un phage particulier possède une large gamme d'hôtes alors le transfert entre espèces peut avoir lieu. La capacité d'un phage à médier la transduction est reliée au cycle de vie du phage.

Un phage se compose d'un «chromosome» d'acide nucléique (ADN ou ARN), entouré d'une paroi de protéines : capside. Le tout forme une nucléocapside.

La plupart des bactéries sont sensibles à l'attaque par des bactériophages. Ces derniers sont utilisés dans la lysotypie, et on rencontre deux types :

-**Les Phages virulents** : suivent un cycle lytique.

-**Les Phages tempérés** : suivent un cycle de lysogénie, restent intégrés dans l'ADN bactérien sous forme de prophage (ne détruisent pas leurs gites et leurs couverts).

### 5-4-1- Lyse et lysogénie

**5-4-1-1- La lyse** : est la rupture et la mort d'une cellule bactérienne à la suite de la libération de la descendance d'un phage infectant

**5-4-1-2- Lysogénie** : Lorsque des bactéries sont infectées par des phages, une petite fraction de cellules infectées ne se lysent pas, mais deviennent lysogènes. Les bactéries lysogènes contiennent un prophage dont la présence protège la cellule de l'infection par un autre phage, ou surinfection, et qui est dupliqué et transmis aux cellules filles lors de la division. Chez une petite fraction des cellules lysogènes, le prophage est induit, ou activé, produisant ainsi des phages infectieux. Les phages peuvent donc être virulents, suivant un cycle infectieux qui est toujours lytique, ou ils peuvent être tempérés, suivant un cycle lysogène au cours duquel le phage est présent dans la cellule bactérienne sous la forme d'un prophage.

### 5-4-2- Types de transduction

**5-4-2-1- Transduction généralisée :** est une transduction au cours de laquelle potentiellement n'importe quel gène bactérien de donneur peut être transféré à un receveur. Le mécanisme de la transduction généralisée est illustré dans la figure suivante.

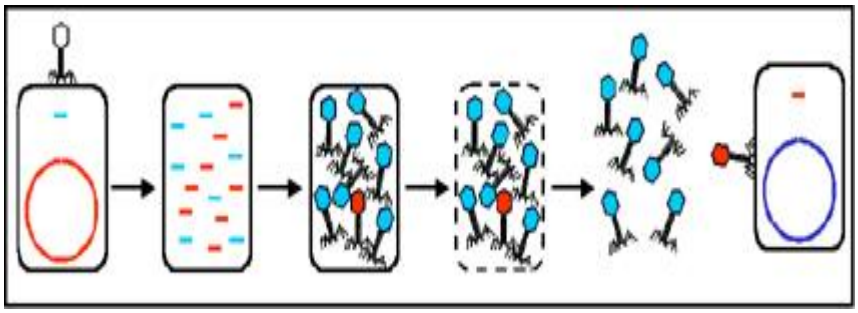


**Figure 30 :** Transduction généralisée.

Les phages qui permettent la transduction généralisée découpent généralement l'ADN de l'hôte en plus petits morceaux et encapsident cet ADN dans une particule phagique par un mécanisme d'encapsidation fortuite. Occasionnellement, un des morceaux de l'ADN de l'hôte est accidentellement empaqueté dans la capside du phage. Ainsi, n'importe quel gène du donneur peut potentiellement être transféré mais ne sera transféré qu'autant d'ADN que peut contenir une tête de phage. Si une cellule réceptrice est infectée par un phage qui contient de l'ADN du donneur, l'ADN du donneur entre dans le receveur. Dans la cellule réceptrice un évènement de recombinaison généralisée qui substitue l'ADN du donneur à l'ADN du receveur peut avoir lieu.

**5-4-2-2- Transduction spécialisée :** est une transduction au cours de laquelle seulement certains gènes du donneur peuvent être transférés au receveur. Différents phages peuvent transférer différents gènes mais un phage individuel peut seulement transférer certains gènes. La transduction spécialisée est médiée par des phages lysogéniques ou tempérés et les gènes qui sont transférés dépendent d'où le prophage est inséré dans le chromosome. Le mécanisme de la transduction spécialisée est illustré dans la figure suivante.

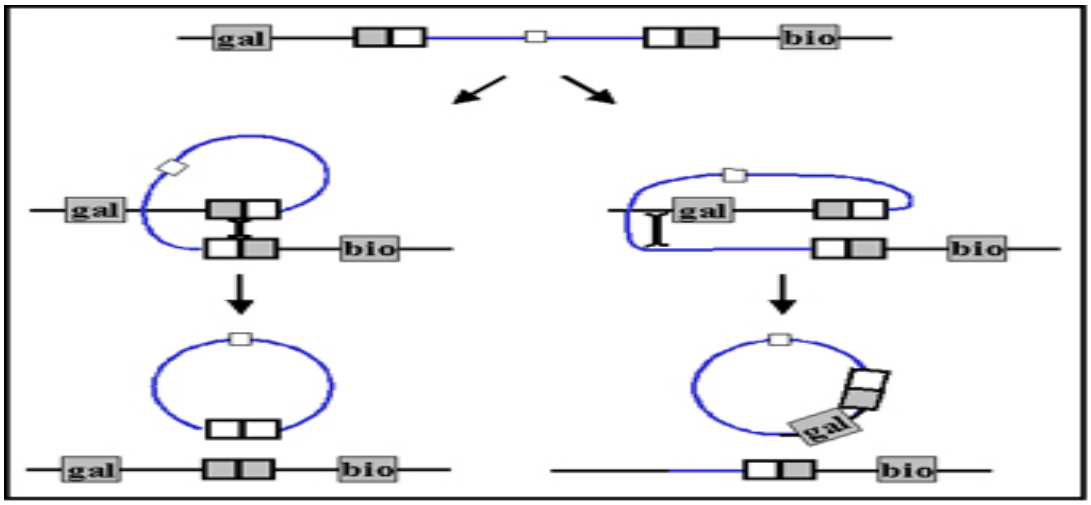



**Figure 31:** Mécanisme de la transduction spécialisée.

Pendant l'excision du prophage, occasionnellement une erreur peut se produire quand une partie de l'ADN de l'hôte est excisée avec celui du phage. C'est seulement l'ADN de l'hôte situé de part et d'autre de l'endroit où le phage est inséré qui peut être transféré (d'où la transduction spécialisée). Après réplication et libération du phage et infection du receveur, la lysogénisation du receveur peut avoir lieu, ce qui résulte en un transfert stable des gènes du donneur. Le receveur va alors avoir deux copies des gènes qui ont été transférés. La recombinaison légitime de gènes entre le donneur et le receveur est aussi possible.

# Chapitre 6 : la synthèse protéique

Le gène (ou **cistron**) est un segment d'ADN qui constitue l'unité d'expression menant à la formation d'un produit fonctionnel qui peut être sous la forme d'ARN ou de polypeptide.

Chez les procaryotes plusieurs gènes peuvent faire partie d'une même unité de transcription, on parle d'unité **polycistronique** dont l'exemple le plus classique est l'opéron lactose (cf. chapitre de régulation de l'expression des gènes).

Chez les eucaryotes les unités de transcription sont **monocistronique** (exception chez certains vertébrés).

## 6-1- Transcription de l'ADN procaryote

L'ARN polymérase est une protéine ADN dépendante, multimérique possédant les sous-unités α, β, β' et σ. Elle est présente sous deux formes l'**enzyme-cœur** (α2ββ') et l'**holoenzyme** (α2ββ'σ). Les ARN polymérases ne nécessitent pas d'amorce et ne possèdent pas d'activité exo-nucléasique et donc de correction d'erreur, le taux d'erreur est ainsi plus important que pour les ADN-polymérases, mais ce taux est supporté.

Les nucléotides triphosphates sont additionnés à l'extrémité 3' de la chaîne en cours de synthèse par complémentarité de la matrice d'ADN. L'hydrolyse de la liaison anhydride fournit l'énergie pour la synthèse de la liaison phosphodiester.

La réaction est réalisée en milieu tamponné à pH neutre, contenant du sel de $Mg^{2+}$, un agent de protection des groupements SH de l'enzyme, les 4 ribonucléotides (rNTP) et de l'ADN bicaténaire contenant un promoteur comme matrice.

La molécule d'ADN est composée d'un **brin matriciel** (ou **brin anti-codant**) dirigé par définition de 3' vers 5' et servant comme son nom l'indique de matrice à l'ARN-polymérase, ainsi que d'un **brin codant** dirigé par définition de 5' vers 3' et ayant une séquence identique à l'ARN transcrit mise à part le fait que la thymine est changée par l'uridine. L'ARN messager est lui monocaténaire et dirigé tout comme le brin codant de 5' vers 3'.

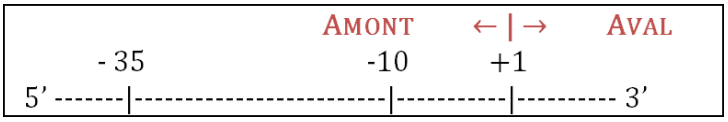
Chez E-coli, **une seule ARN-polymérase catalyse la synthèse de tous les ARN** de la cellule (en mettant à part l'ARN des amorces nécessaire à la réplication de l'ADN).

La transcription est divisée en plusieurs étapes : la pré-initiation, l'initiation, l'élongation et la terminaison.

**6-1-1. Pré-initiation :** Le promoteur est une séquence d'une centaine de nucléotides située dans la région régulatrice et désignant le début de la transcription. Il est situé en amont du site d'initiation et porte des éléments de séquence reconnus par l'ARN-polymérase et déterminant le sens de la transcription.

Le promoteur est constitué de courtes séquences conservées d'une unité de transcription à l'autre et appelées séquences consensus :

- En -10 du site d'initiation on trouve la **TATA box** ou **boîte de Pribnow** : « TATAAT »
- En -35 du site d'initiation on trouve : « TTGACA »




La **force** (ou efficacité) **intrinsèque d'un promoteur** est définie par le nombre relatif d'initiation par unité de temps (vitesse de la transcription). Elle dépend de la proportion des paires de bases A-T par rapport aux paires de bases C-G, de la position des séquences en -35 et en -10, en effet plus les séquences consensus sont proches du site d'initiation plus le promoteur sera fort et finalement de la force d'interaction de l'ARN-polymérase avec le promoteur.

L'affinité de l'ARN-polymérase pour l'ADN dépend de la forme de l'enzyme : l'enzyme-cœur a une affinité faible et non spécifique, l'holoenzyme a une affinité très forte et spécifique pour le promoteur. On peut faire la remarque que la sous-unité sigma σ à l'état libre ne se fixe pas sur l'ADN. La sous-unité β' étant basique et l'ADN étant acide, ce sera elle qui facilitera l'interaction du complexe avec le promoteur.

La **sous-unité sigma σ** permet donc une reconnaissance spécifique du promoteur par l'ARN-polymérase et diminue l'affinité de l'enzyme pour les régions non promotrices. Il agit de manière cyclique, en effet après l'initiation faite, le facteur sigma se détache pour être recyclé et réutilisé pour d'autres initiations de gènes.

L'ARN-polymérase entraîne la dénaturation des deux brins d'ADN sur 14 paires de nucléotides, on parle de complexe ouvert qui augmente encore l'affinité de l'enzyme pour la double hélice.

**6-1-2- Initiation :** L'initiation correspond à la synthèse de la première liaison phosphodiester réalisé par la sous-unité β qui correspond à la sous-unité catalytique de l'ARN-polymérase.

L'interaction de cette sous-unité est inhibée par la **rifampicine** qui inhibe ainsi de manière irréversible la transcription de l'ADN, c'est le cas de la tuberculose. Une mutation dans la SU β induit l'apparition de souches bactériennes résistantes à la rifampicine.

Le déroulement des premières étapes de la transcription est donc :

1. liaison non spécifique de l'holoenzyme.
2. formation d'un complexe fermé au niveau du promoteur
3. formation du complexe ouvert (déroulement sur 14 nucléotides)
4. Mise en place du premier nucléotide (très souvent A ou G)
5. Allongement de 4 à 5 nucléotides
6. Détachement du facteur sigma, après la transcription des 4-5 premiers nucléotides.

**6-1-3- Elongation :** L'élongation correspond au déplacement de la bulle de transcription le long de la molécule d'ADN. La région désappariée est alors de 70 paires de bases. Pendant la transcription, l'ARN forme un court appariement avec le brin matriciel de l'ADN formant une hélice hybride ADN-ARN sur une dizaine de paires de bases.

L'élongation est inhibée par des aminosides ou amino-glucosides.

**6-1-4- Terminaison :** La terminaison se fait lorsque l'enzyme arrive au niveau d'une séquence spécifique appelée **terminateur**.

Le terminateur se présente sous la forme d'un **palindrome** qui peut être parfait ou imparfait. Ce palindrome entraîne une complémentarité de séquence au niveau de l'ARNm qui permet la mise en place d'une structure en épingle à cheveux (ou tige-boucle) qui est un appariement intra-chaîne qui déstabilise l'ARN-polymérase jusqu'à dissociation.

Elle peut être facilitée par un **facteur rho ρ** suivant la séquence du terminateur, on met ainsi en évidence des **terminateurs rho indépendant** (environ les 2/3) et des **terminateurs rho dépendant** (environ 1/3) :

- Pour les terminateurs rho indépendant on trouve une structure en épingle à cheveux riche en paires de bases G-C, suivie d'une séquence poly-U d'environ 6 nucléotides permettant une dissociation plus facile de l'hybride ADN-ARN.

- Pour les terminateurs rho dépendant on trouve une structure en épingle à cheveux plus courte et qui n'est pas riche en paires de bases G-C et qui est non-suivie d'une séquence poly-U. Il y a donc nécessité du facteur rho qui a une affinité pour les ARN en court de synthèse, le parcourant de 5' vers 3' jusqu'à trouver l'ARN-polymérase. Le facteur rho est **ATP** dépendante, dont l'hydrolyse permettra la dissociation du complexe.

**6-1-5- Maturation des transcrits primaires :** Le **transcrit primaire** correspond à l'ARN non mature qui nécessite une maturation sous forme de clivages ou de modifications de bases. Cette maturation n'est pas obligatoire. Après maturation on obtient l'ARN mature. On peut prendre quelques exemples comme la maturation du transcrit primaire donnant les ARNr (transcrit primaire 45 S) ou les ARNt par des ribonucléases, ou la maturation du transcrit primaire codant les ARNm. Généralement, il y a peu de modifications pour les ARNm ; beaucoup d'ARNm sont traduits en protéines alors qu'ils sont encore transcrits (Attention : il n'y a pas de noyau chez les procaryotes).

Le transcrit primaire code soit pour un produit, on parle d'**ARN monocistronique**, soit plusieurs produits, on parlera alors d'**ARN polycistronique** .

### 6-2- La traduction de l'ADN

La traduction correspond au fait que l'ARNm est traduit en protéine : passage de séquences de nucléotides à des séquences d'acides aminés par respect du code génétique. La traduction s'effectue dans le cytoplasme de la cellule.

**6-2-1- Le code génétique :** est un code qui permet la conversion d'une séquence de nucléotides (ADN puis ARN) en séquence d'acides aminés (protéines). Le code implique les bases A, C, T et G ainsi que les 20 acides aminés. Le code génétique possède différentes caractéristiques :

- **Les codons sont des triplets de nucléotides** et ils codent pour un acide aminé.
- **La séquence du gène et la séquence de la protéine codée sont colinéaires**, c'est-à-dire que la longueur du gène et la longueur de la structure primaire de la protéine finale sont proportionnelles.
- **Le code génétique est universel**. En effet chaque acide aminé dispose d'un ou plusieurs codons et ceci au niveau d'une multitude d'organismes vivants procaryote et eucaryote.

- **Le code génétique est redondant** (**ou dégénéré**). Plusieurs codons codent pour un même acide-aminé : on trouve 64 codons et 20 acides aminés. Souvent se sont les deux premiers nucléotides du codon qui définissent l'acide aminé, la redondance est donc due au troisième nucléotide du codon.

- **Le code génétique est non-chevauchant**. Les nucléotides d'un codon ne participe qu'au code d'un seul acide aminé, ainsi le prochain acide-aminé sera codé par le prochain codon présent sur l'ARNm. On parle du **cadre de lecture**.

- **Le code possède un système de ponctuation**. Le codon d'initiation est le codon AUG (GUG pour ma mitochondrie) et les codons de terminaison sont les codons UAA (ocre), UAG (ambre) et UGA (opale). Le codon UGA (opale) n'est pas présent au niveau de la mitochondrie.

**6-2-2- Les acteurs de la traduction :** Les acteurs de la traduction sont l'ARN messager (ARNm), les ARN de transfert (ARNt), les ribosomes, les acides aminés, les amino-acyl tRNA synthétases, le $Mg^{2+}$, le GTP et l'ATP.

**6-2-2-1- Les ribosomes :** Les ribosomes sont constitués d'ARN ribosomiques (ARNr) et de protéines et sont structurés sous forme de deux sous-unités que ce soit chez les procaryotes ou chez les eucaryotes (*cf. également chapitre généralités*). Leur taille est définie en unité Svedberg.

- Les ribosomes procaryotes (70S) sont constitués d'une petite sous-unité 30S et d'une grande sous-unité 50S.
- La sous-unité 30S est constituée d'un ARNr 16S (1541 nucléotides) et de 21 protéines.
- La sous-unité 50S est constituée des ARNr 23S (2904 nucléotides) et 5S (120 nucléotides) ainsi que de 32 protéines.

**6-2-2-2- Les ARNt :** Les ARNt ont une structure secondaire en forme de trèfle à 3 feuilles et une structure tertiaire en forme de L à l'envers. Lors du mécanisme de traduction il y a un appariement antiparallèle entre l'ARNm et l'ARNt : reconnaissance codon-anticodon au niveau de la boucle de l'anticodon.

Il existe une flexibilité dans l'appariement des bases en position 3 du codon et en position 1 de l'anticodon, cette flexibilité s'appelle le **wobble**.

| Codon position 3 | Anticodon position 1 |
|---|---|
| U | A, G, I |
| C | G, I |
| A | U, I |
| G | C, U |

**Remarque :** *I est une base purique qui peut s'apparier avec U, C et A mais pas G.*

Les ARNt possèdent également un bras de l'acide aminé qui le fixe en 3' (CCA) sur le ribose, il s'agit d'une liaison covalente : liaison ester riche en énergie. Les acides aminés ne vont ainsi par arriver libre sur le ribosome mais associés à leurs ARNt respectifs. On trouve 40 à 60 ARNt différents par cellule, il existe donc plusieurs ARNt différents pour un acide aminé, on les appelle **ARNt iso-accepteurs**. (Ecriture : tARN leu 1)

**6-2-2-3- Chargement de l'acide aminé sur l'ARNt :**

La formation du complexe **amino-acyl-tARN** (**aa-tARN**) nécessite une **Amino-acyl-tRNA-synthétase** spécifique de l'acide aminé, qui doit ainsi reconnaître toutes les formes de codon de cet acide aminé. Le chargement correct de l'ARNt est un élément important dans la fidélité de la traduction. L'acide aminé (aa) est tout d'abord activé et cette activation nécessite de l'énergie sous forme d'**ATP** pour permettre la formation d'aa-AMP (liaison anhydride mixte).

La liaison formée entre l'ARNt et l'acide aminé est une liaison covalente de type carboxy-ester. Les Amino-acyl-tRNA-synthétase sont au nombre de 20 dans la cellule, autant qu'il y a d'acides aminés qui rentrent en compte dans la traduction. L'acide aminé complexé peut ainsi s'associer à la chaîne.

**6-3- Les différentes étapes de la traduction procaryote :**

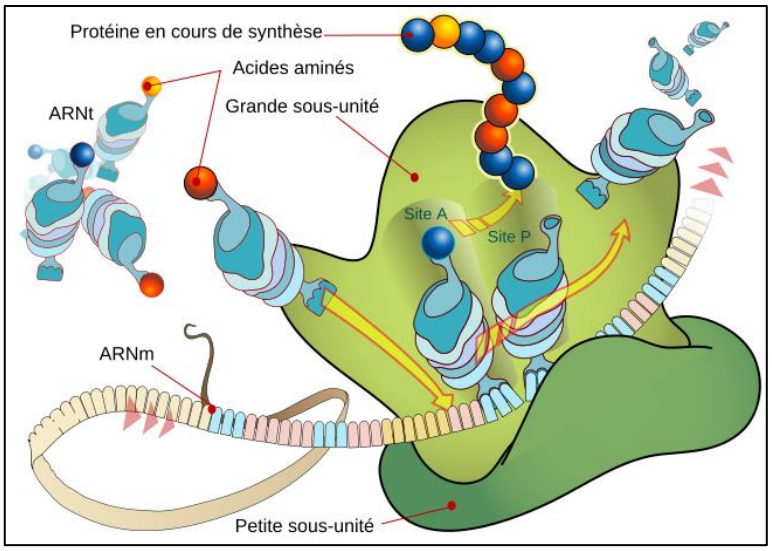



**Figure 32** : Traduction, ARNm, ARNt ; et ribosome.

**6-3-1- Initiation :** Un ribosome reconnaît le début de la séquence codante, il utilise des signaux d'adressage en amont entre -8 et-13 du codon initiateur (AUG) qui correspond à la **séquence de Shine-Dalgarno** ou **RBS** (AGGAGG). Il y a appariement antiparallèle de bases entre l'ARNm et la petite sous-unité (30S) du ribosome, dû à une complémentarité de séquences entre l'ARNm et l'ARNr 16S. Les bactéries nécessitent un acide aminé particulier pour l'initiation ; cet acide aminé est la méthionine et elle nécessite une **formylation** sur l'extrémité $NH_2$ (ajout d'un formyl) pour former la f-Met, c'est un phénomène pré-traductionnel. Cette formylation est réalisée par un cofacteur, la vitamine B9 (ou tétrahydrofolate) qui reconnaît l'ARNt caractéristique et responsable du transport de la f-Met. La particularité de conformation de cet ARNt lui permet d'être placé directement dans le site P et non pas dans le site A.

L'initiation est permise grâce à la présence de **facteurs d'initiation** (IF pour *Initiation Factor*) :

- **IF 1** est le facteur de dissociation du ribosome 70S.
- **IF 2** est un facteur assurant la fidélité de reconnaissance entre l'ARNt et l'acide aminé. Il possède également une activité GTPasique (c'est-à-dire d'hydrolyse du GTP).
- **IF 3** est un facteur nécessaire à la fixation spécifique de 30S sur l'ARNm et de contrôle de l'équilibre entre la forme associé et dissocié du ribosome (facteur anti-réassociation).

Par la suite le complexe 70S est reformé : lorsque l'ARNt fixé à la formyl-méthionine est fixé à la petite sous-unité de l'ARNr, il y a hydrolyse du GTP et la grande SU se fixe sur le complexe.

**6-3-2- Elongation :** L'élongation correspond à une synthèse protéique par ajout d'acides aminés à l'extrémité C-Terminale de la chaîne peptidique naissante, réaction catalysée par l'activité **peptidyl-transférase** de la grande SU des ribosomes. La lecture de l'ARNm par le ribosome se fait de 5' vers 3'. Il y a formation d'une liaison amide particulière appelée **liaison peptidique**, les deux fonctions formant la liaison étant portées par le carbone-α de deux acides aminés différents. Cette réaction entraîne l'élimination d'une molécule d'eau.

L'élongation également est permise par la présence de **facteurs d'élongation** (EF pour *Elongation Factor*) : **EF-Tu** ; **EF-Ts** et **EF-G**.

Pour chaque liaison peptidique formée on peut caractériser 3 étapes : la réaction de couplage, la formation de la liaison peptidique et la translocation.

**6-3-2-1- Réaction de couplage :** L'étape de couplage correspond au transfert de l'acide aminé complexé à l'ARNt sur la chaîne protéique en voie d'élongation. On peut faire la remarque que durant la traduction c'est l'extrémité N-terminal (fonction amine) qui sort en premier du ribosome. Ainsi c'est l'extrémité C-terminale (fonction carboxyle) du premier acide-aminé qui permettra la formation de la liaison peptidique avec la fonction amine du deuxième acide-aminé. Ainsi le deuxième complexe aa-ARNt arrive dans le site A, la f-Met étant positionnée dans le site P.

**6-3-2-2- Formation de la liaison peptidique et libération du premier ARNt :** La liaison riche en énergie qui lie le premier ARNt avec la f-Met se rompt amenant l'énergie pour permettre la formation de la liaison peptidique, ceci étant uniquement possible à ce moment-là car la fonction COOH était jusqu'alors engagée dans la liaison à l'ARNt. L'ARNt est alors expulsé vers le cytoplasme où il sera recyclé, en même temps que la formation de la liaison peptidique, réaction catalysée par l'activité peptidyl-transférase de la grande sous-unité.

**6-3-2-3- Translocation :** Comme dit précédemment la lecture de l'ARNm se fait de 5' vers 3', de ce fait le ribosome se déplace de 3 nucléotides (ou d'un codon) dans cette direction de telle sorte que l'ARNt portant les deux premiers nucléotides se retrouve dans le site P, il y a translocation. L'ARNt portant le troisième peut ensuite prendre place dans le site A à nouveau libre.

Ce cycle de trois étapes va donc se reproduite autant de fois qu'il est nécessaire jusqu'au codon stop.

- Le premier **GTP** est utilisé lors du positionnement du complexe aa-ARNt dans la loge A du ribosome. En effet l'acide aminé-ARNt forme un complexe avec EF-Tu, qui lui permet de se fixer sur le ribosome (site A). Après fixation du complexe, le GTP est hydrolysé en GDP et le facteur EF-Tu-GDP se détache.

- Le deuxième **GTP** est utilisé lors de la translocation, également par un facteur d'élongation ayant une activité GTPasique sur le même principe que précédemment.

**6-3-2-4- Terminaison :** La terminaison de la traduction se fait au niveau des codons stop UAA, UAG et UGA qui ne codent pour aucun acide aminé. Ces codons stop sont reconnus par les facteurs de terminaison RF 1, RF 2 et RF 3 (RF pour *Releasing Factor*) :

- **RF 1** reconnaît UAA et UAG.
- **RF 2** reconnaît UAA et UGA.
- **RF 3** stimule l'activité des 2 autres facteurs.

La liaison ester unissant l'ARNt au dernier acide aminé de la chaîne peptidique est hydrolysée par la peptidyl-transférase. Le ribosome se redissocie en deux sous-unités qui pourront recommencer de nouvelles lectures d'ARNm.

## Chapitre 7 : Régulation de l'ADN

L'expression génétique est l'ensemble des phénomènes qui permettent à un gène d'être exprimé en ARN puis, en protéine. Cette expression se diffère d'un organisme vivant à l'autre (procaryote et eucaryote) la raison pour laquelle existe un phénomène appelé la régulation de l'expression génétique.

La régulation génétique est un moyen pour la cellule de développer des mécanismes qui lui permettent de réprimer les gènes qui codent pour des protéines inutiles et de les activer au moment où ils deviennent nécessaires. Le contrôle de l'expression génique peut se faire au cours de la transcription, la traduction ou bien les deux

La régulation des gènes se fait aux différentes étapes de l'expression (synthèse du produit d'un gène, ARN ou protéines) et permet son activation ou sa répression. La régulation peut être positive grâce à des **activateurs** ou négative grâce à des **répresseurs**.

Au niveau de l'ADN il existe des séquences régulatrices qui peuvent être amplificatrices, extinctrices ou isolantes. Ces séquences régulent les gènes qui leurs sont adjacents sur le même chromosome, on dit que ces séquences sont actives en « cis » et on parle d'**élément cis-régulateurs**. Sur ces séquences vont se fixer des facteurs de régulations, dit **trans-régulateurs**, ne provenant pas de séquences adjacentes mais de l'expression d'un autre gène situé ailleurs sur le génome.

- **Trans :** les produits sont libres de diffuser pour trouver une cible (activateur, répresseur)
- **Cis :** pour toute séquence d'ADN non transformée en une autre molécule, elle agit in situ et touche l'ADN auquel elle est liée (promoteur et opérateur)

Cette régulation peut s'effectuer au niveau de la transcription, de la traduction ou des deux.

Chez les Procaryotes les gènes sont groupés en unités fonctionnelles appelées **OPERONS**. Chaque opéron comporte un nombre variable de gènes de structure appelés **CISTRONS** et des séquences d'ADN responsables de la régulation. L'opéron possède un promoteur et un opérateur.

Il existe deux grands types d'opérons :

- **Les opérons inductibles :** codent pour des enzymes de la voie catabolique (voie de dégradation). Exemple : opéron lactose.

- **Les opérons répressibles** : codent pour les enzymes de la voie anabolique (biosynthèse). Exemple: opéron tryptophane.

**L'opéron :** est l'unité constituée d'un ensemble de gènes structuraux transcrits en un messager polycistronique traduit cependant en plusieurs protéines différentes, ainsi que des régions régulatrices adjacentes qui influencent la transcription de ce messager.

Un opéron est constitué de 3 composants principaux :

• **Le promoteur** : c'est une séquence de nucléotides qui permet la transcription du gène en ARNm. Il est reconnu par l'ARN polymérase qui initie la transcription. Lors de la synthèse de l'ARN, le promoteur indique quel gène doit s'exprimer et donc quelles protéines la cellule doit produire. Dans un opéron il est commun à tous les gènes. (Fixation du RNA polymérase)

• **L'opérateur** : est un segment d'ADN sur lequel se lie une protéine régulatrice qui va moduler l'expression des gènes en aval. La liaison de cette protéine à l'opérateur peut soit stimuler, soit inhiber la production du produit du gène ainsi contrôlé, on parle d'activateur dans le premier cas et de répresseur dans le second cas. (Contrôle de la transcription)

• **Les gènes structuraux** : ce sont les gènes contrôlés de manière coordonnée grâce à l'opérateur, c'est-à-dire co-transcrits sous forme d'un ARN messager polycistronique.

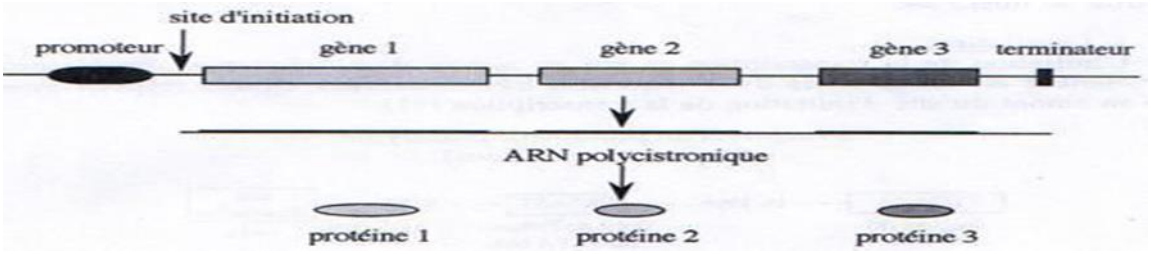



**Figure 33** : Structure de l'opéron.

### 7-1- Régulation de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel :

La transcription est souvent régulée par des facteurs protéiques qui se lient à l'ADN. Les gènes soumis à ces régulations sont impliqués dans différentes voies métaboliques :

#### 7-1-1- Régulation de l'expression des gènes impliqués dans les voies cataboliques

Parmi ces gènes nous prendrons celui qui est sans aucun doute le plus utilisé pour illustrer ce type de régulation, celui de l'**opéron lactose** dans le génome d'E-coli qui est un exemple de **gène**

**inductible** (c'est-à-dire que les gènes sont exprimés quand cela est nécessaire par inactivation d'un répresseur).

**Opéron Lactose :** La cellule bactérienne a besoin d'une source de carbone, qu'elle trouve dans le catabolisme des sucres. Le lactose n'étant pas utilisable comme source directe, on a besoin d'un clivage du lactose (grâce à une β-galactosidase) pour obtenir du glucose et secondairement du galactose.

**7-1-1-1- Les inducteurs de l'opéron lac :**

- **Lactose**, (substrate de l'opéron), converti en son isomère (par transglycosylation), l'allolactose.
- **Allolactose**, inducteur naturel (ou inducteur physiologique, isomère du lactose).
- **Inducteur gratuit** : induit l'opéron mais pas métabolisé. Par exemple : isopropylthiogalactoside (IPTG)

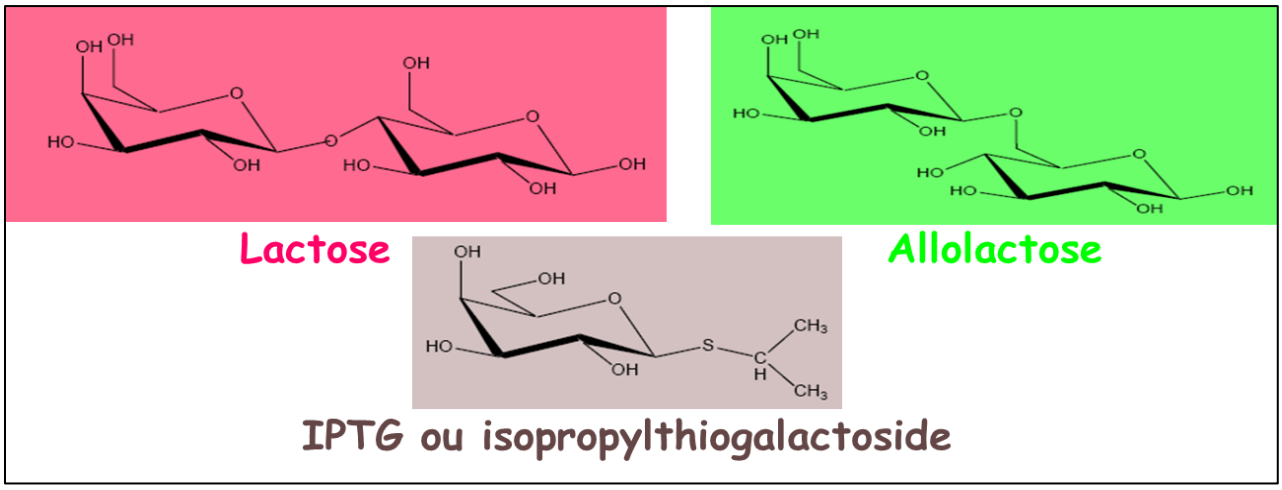



**Figure 33** : Représentation des différents inducteurs de l'opéron Lactose.

Au niveau de l'opéron lactose on peut mettre en évidence trois gènes de structures : les gènes Lac Z, Lac Y et Lac A, codant pour des protéines différentes. Les gènes de ces protéines faisant partie d'une même unité de transcription, on parle alors d'**unité polycistronique**.

- Le gène **Lac Z** code pour la **β-galactosidase** qui hydrolyse le lactose en galactose et en glucose,
- le gène **Lac Y**code pour la **β-galactoside-perméase** qui permet l'entrée du lactose dans les bactéries
- et le gène **Lac A** code pour la **β-galactoside-transacétylase (**rôle inconnu de l'acétylation**)**.

Le **promoteur** de ces trois gènes possède :

- En amont : un **site CAP** fixant une protéine CAP activée par l'AMPc : la fixation induit l'activation du promoteur et donc la transcription des gènes de structure.
- En aval : un **opérateur,** qui est une séquence d'ADN sur laquelle se fixe des protéines régulatrices permettant la régulation transcriptionnelle de l'opéron.
- Un gène de l'inhibition de la voie, **Lac I**, qui est un **répresseur** de la transcription sous forme **tétramérique** qui va se fixer sur l'ADN opérateur et bloquer la transcription. Le répresseur peut se lier au lactose et devient alors inactif. Le gène Lac I possède son propre promoteur.

Le gène de structure est **doublement contrôlé** :

- **Le tétramère Lac** I fixe le lactose, et quand il est fixé au lactose, il ne peut pas se fixer à l'opérateur. Il ne bloque donc pas la transcription alors la répression est levée.
- **Le glucose inhibe l'AMPc**, qui n'active donc pas la protéine CAP.

Les bactéries *E. coli* cultivées dans un milieu contenant du glucose ne produiront qu'une très faible quantité des enzymes de l'opéron lac. Si les bactéries sont transférées dans un milieu contenant du lactose, l'activité de la β-gal et de la perméase augmentera de 1000 fois en 20 minutes ! Cette augmentation d'activité est due à l'augmentation de la quantité des protéines correspondantes. À l'inverse, si ces bactéries sont de nouveau transférées dans un milieu contenant du glucose, l'activité de la β-gal, de même que celle de la perméase, diminuera rapidement dans les cellules. Il en va de même pour la transacétylase, dont la quantité de protéine sera induite ou réprimée selon la présence ou l'absence de l'inducteur, ici le lactose.

**7-1-1-2- Fonctionnement de l'opéron lactose :**

Comme dit précédemment le produit du gène Lac I est le répresseur. Le répresseur est produit sous la forme d'un tétramère qui est actif et lie l'opérateur avec une grande affinité.

- **En présence de glucose et absence de lactose,** lorsque la bactérie se trouve dans un milieu dépourvu de lactose le gène, Lac I est transcrit ensuite traduit ce qui va entrainer la synthèse du répresseur monomérique de la protéine. Cette protéine s'assemble pour former un complexe tétraédrique (04 sous unités identiques) ce complexe va se fixer sur l'opérateur empêchant l'avancé de transcription de l'ARN polymérase (fixe sur l'opérateur), par conséquence : pas d'expression des enzymes charges de métabolisme du lactose (la bactérie utilise que le glucose).

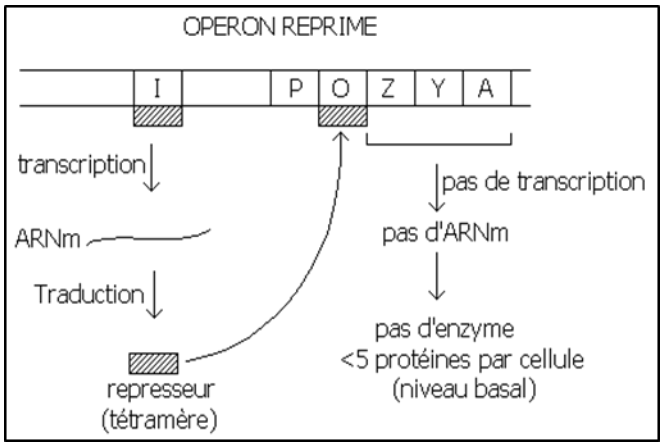



**Figure 34** : l'opéron en absence du Lactose.

**-En présence de lactose**, Grace à la perméase (une petite quantité présente dans la cellule), le lactose pénètre dans la cellule et va être transformé en allolactose qui procède une affinité pour le répresseur. L'allolactose se fixe sur un site spécifique localisé sur le répresseur tetramérique s'accompagnant d'une modification de la conformation du répresseur et son détachement alors il ne pourra plus se fixer sur l'opérateur et donc permettant à l'ARN polymérase de progresser et d'entamer la transcription et par la suite la production des enzymes chargées de métabolisme du lactose. Donc : le lactose agit comme inducteur des enzymes chargées de son métabolisme

**Remarque** : le **lactose** est l'inducteur physiologique, l'inducteur synthétique est l'**IPTG** (isopropylthiogalactoside) qui n'est lui pas métabolisable par la β-galactosidase. L'absence du glucose induit l'accumulation de l'AMP cyclique qui va entrainer la fixation du complexe CAP-AMPc au niveau du promoteur.

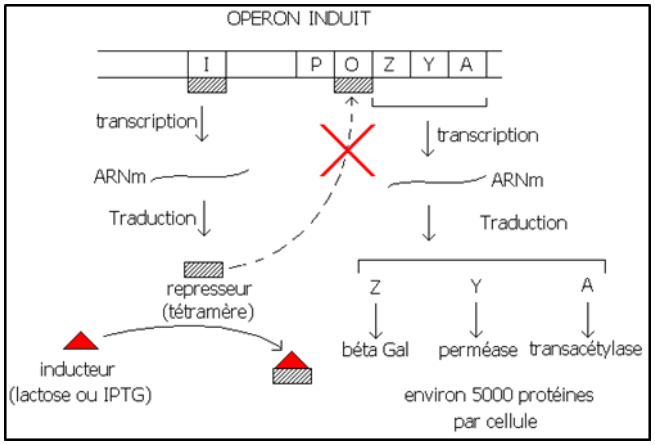



**Figure 35** : L'opéron en présence du Lactose.

**- En présence de glucose et de lactose**, dans ce cas la bactérie utilise préférentiellement le glucose.

L'augmentation de taux de glucose va entrainer la diminution de concentration de l'AMPc donc pas de fixation de l'AMPc à la protéine CAP et par la suite pas de fixation de l'ARN polymérase donc pas d'expression de l'opéron lactose.

Après l'épuisement du glucose, la bactérie se trouve privée d'une source d'énergie, elle accumule l'AMPc qui va se lier à la protéine CAP formant le complexe CAP-AMPc qui va se fixer sur le promoteur permettant ainsi la transcription de l'ARN polymérase et la production des enzymes chargées (l'allolactose est fixé sur le répresseur exprimé par le gène LacI).

Donc :

- le complexe CAP-AMPc est un régulateur positif
- le répresseur est un régulateur négatif

**<u>Un tableau récapitulatif</u>** :

| **Glucose** | **lactose** | **Opéron lactose** |
|---|---|---|
| + | + | Inactif car CAP non fixé au promoteur (pas d'AMPc) |
| + | - | Inactif car le récepteur est fixé à l'operateur et le CAP est non fixé au promoteur |
| - | - | Inactif car le récepteur est fixé à l'operateur |
| - | + | Actif car le récepteur n'est pas fixé à l'operateur et l'AMPc-CAP est fixé au promoteur |

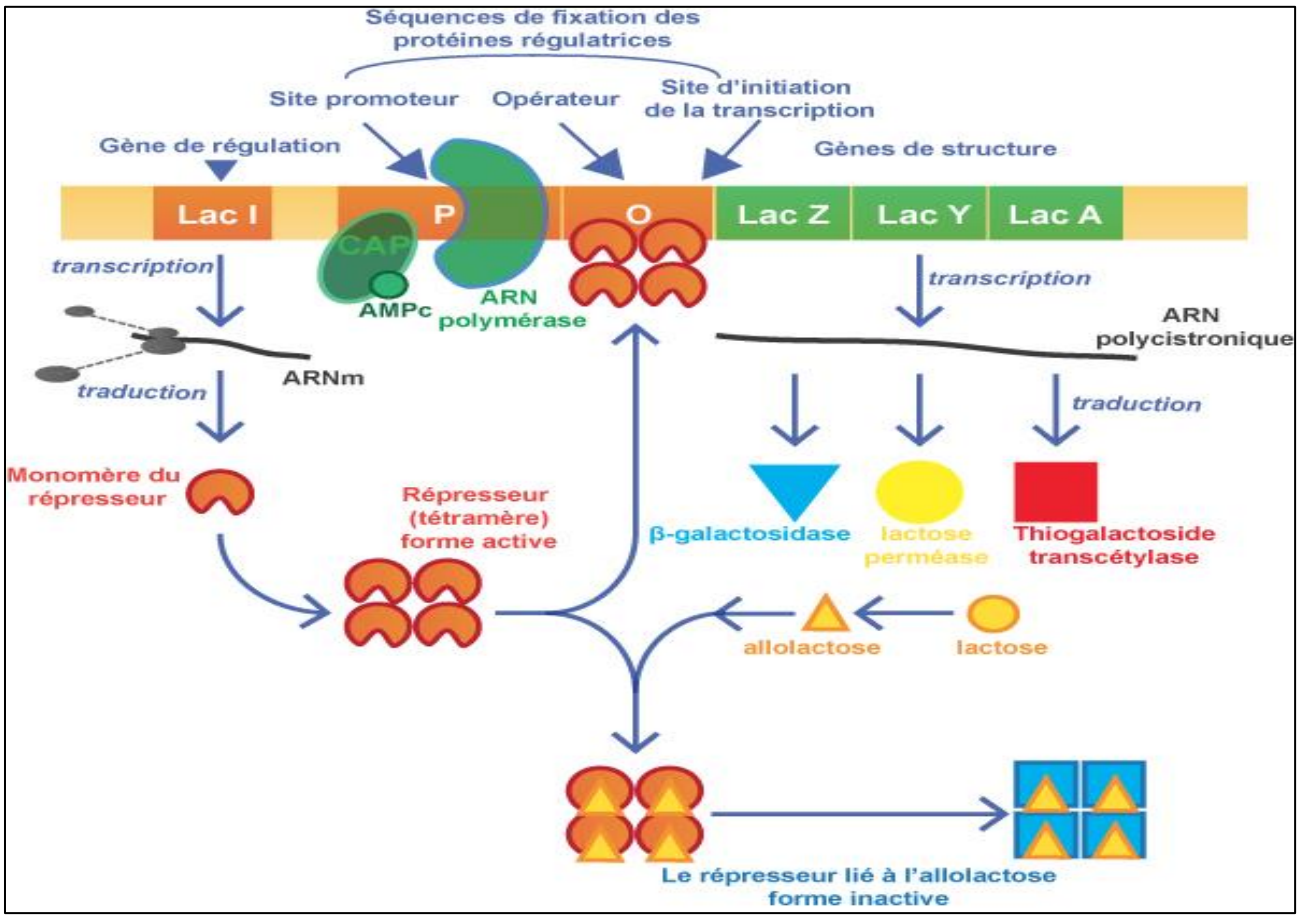



**Figure 36** : l'opéron en présence de Glucose et le Lactose.

On peut faire la remarque que de nombreux gènes impliqués dans le transport et le catabolisme des sucres sont regroupés en opérons (exemple des opérons arabinose, maltose et galactose).

**7-1-2- Régulation de l'expression des gènes impliqués dans les voies anaboliques :**

Pour les voies anaboliques on prendra comme exemple l'**opéron tryptophane** (acide aminé essentiel) qui est un exemple de **gène répressible**.

- **Le tryptophane** est un acide aminé nécessaire à la synthèse des protéines qui est peu fréquent dans les protéines.
- **Régulation à différents niveaux :** Activation/répression de la transcription. Atténuation de la transcription.

- **L'opéron trp** code pour les enzymes requises pour la synthèse du tryptophane **(trpA et trpE)**
- **La synthèse de l'ARNm de l'opéron** est contrôlée par un répresseur qui bloque la transcription lorsqu'il est lié par le tryptophane **(co-répresseur).**

Dans l'opéron on visualise différents gènes : **Trp A**, **Trp B**, **Trp C**, **Trp D** et **Trp E** qui sont des gènes de structure qui permettent de transformer le **chorismate** en tryptophane) ; ainsi que les éléments de contrôle et le répresseur.

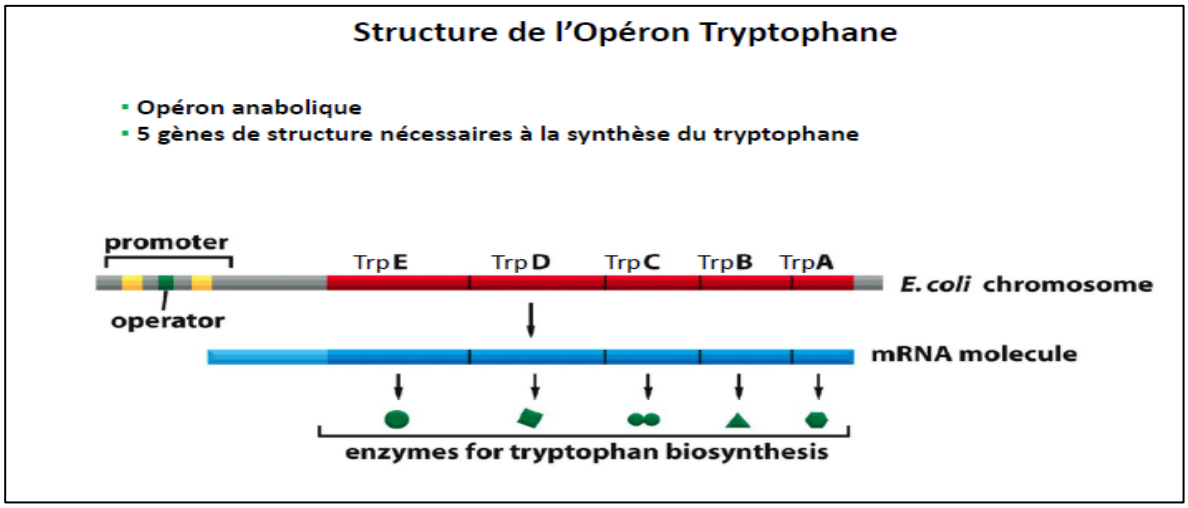
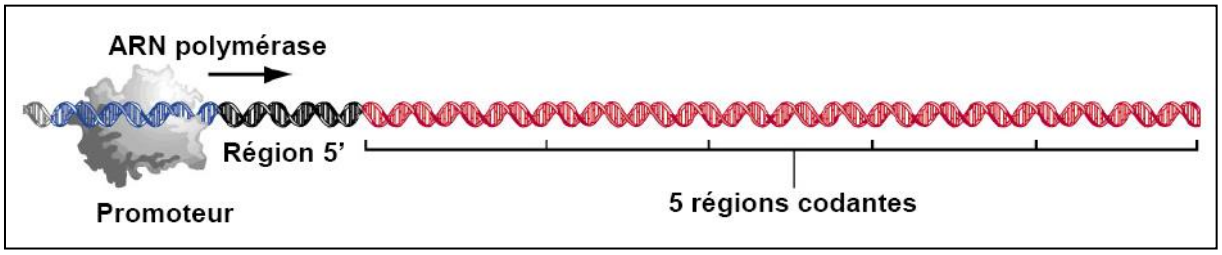
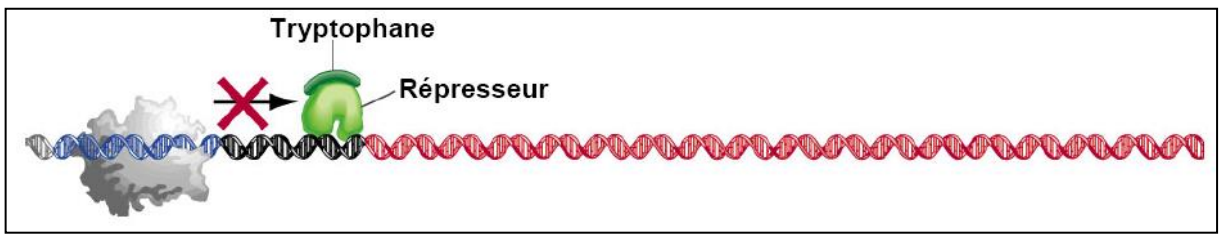



**Figure 37** : Structure de l'opéron Tryptophane.

En absence de tryptophane, le répresseur ne se lie pas à l'opérateur ce qui entraîne la transcription des gènes de structure de l'opéron.




En présence de tryptophane, le répresseur se lie au tryptophane et devient ainsi « actif », pouvant se lier à l'opérateur, ce qui entraîne l'inhibition de la transcription des gènes de structure de l'opéron.



Le tryptophane est ici un **co-répresseur**.

### 7-2- Régulation de l'expression des gènes au niveau traductionnel :

La régulation au niveau traductionnel est peu utilisée chez les procaryotes. On pourra donner l'exemple de la régulation de la synthèse de protéines ribosomiques dont les gènes sont organisés en opérons. Un excès de celles-ci entraîne l'inhibition de leur propre traduction.

## Références bibliographiques :


1. Aouf Abdelhakim, 2016. Cours de Biologie moléculaire et génie génétique. Université Ferhat-Abbas Setif 1, 133p.
2. Beaumont Simon, 2007. Biologie moléculaire PCEM1, Dunod, Paris 279-286p.
3. Clark D. 2005. Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution. Southern Illinois University. USA Elsevier Academic Press.784p.
4. D. Tagu, C. Moussard, 2003. Principes des techniques de biologie moléculaire, , 2e éd., INRA-Quæ (ISBN 2-7380-1067-9).
5. EBERHARD PASSARGE. Atlas de poche de Génétique. Médecine Sciences Flammarion 2003.
6. KLUG William, CUMMINGS Michael et SPENCER charlotte. Génétique 8ème edition. Pearson Education 2006.
7. Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. (2003).Molecular Cell Biology. 6th Ed. 937p.
8. Maftah A, Petit Jm, Julien R. Mini Manuel de Biologie moléculaire 4ème édition. Dunod 2018.
9. Medraoui Leila. 2015. Cours Biologie Moléculaire ; Initiation aux techniques usuelles de biologie moléculaire. Faculté des sciences. Université Mohamad V Rabat 132p.
10. Passarge E. 2007.Color Atlas of Genetics. 3rdEd. Flexibook. Thieme Stuttgart, NY. USA. 486p.
11. Perrin-Schmitt Fabienne, 2011. Biotechnologies et applications (génie génétique), PACES.
12. Petit Jm, Arico S, Julien R. 2011. Mini Manuel de Génétique 2ème édition. Dunod.
13. Primose S. B., R. M. Twyman and R.W. Old. 2002. Principles of Gene Manipulation. 6th Ed. Blackwell Scientific Publishing, Oxford. UK. 319p.
14. Strachan Tom, Read Andrew. 2004. Génétique Moléculaire Humaine. Hybridation des acides nucléiques : principes et applications. 4 e édition ; Médecine Sciences publications. Lavoisier 16p.

UE2. Ellipses 21-46p.

15. Vincent Ecochard, Didier Fournier, Laurence Nieto, Laurent Paquereau. 2011. Techniques et Stratégies en Biologie Moléculaire. Première partie. Université Paul Sabatier, Toulouse, 201p.