

## IV. Génétique microbienne

### IV.1. Génotype/Phénotype

L'information génétique d'un organisme est la séquence exacte de nucléotides de L'ADN, souvent appelée *génotype*. Cette séquence dicte quelles protéines ou molécules d'ADN peuvent être produites par l'organisme, comment les gènes peuvent être régulés et la fonction de la protéine une fois synthétisée. Pas toutes les protéines ne sont synthétisées en même temps et le génotype complet d'un organisme ne peut être découvert, à moins que le génome ne soit séquencé. Ce qui est observable et mesurable constitue le *phénotype* de l'organisme, c'est-à-dire la manifestation de génotype par des caractéristiques comme la capacité à produire une capsule ou la résistance à un antibiotique. Des altérations du génotype peuvent donc retentir sur le phénotype. Différentes nomenclatures/abréviations sont utilisées pour décrire les gènes et les mutations dans différents organismes mais, chez la bactérie, la convention utilisée est la suivante :

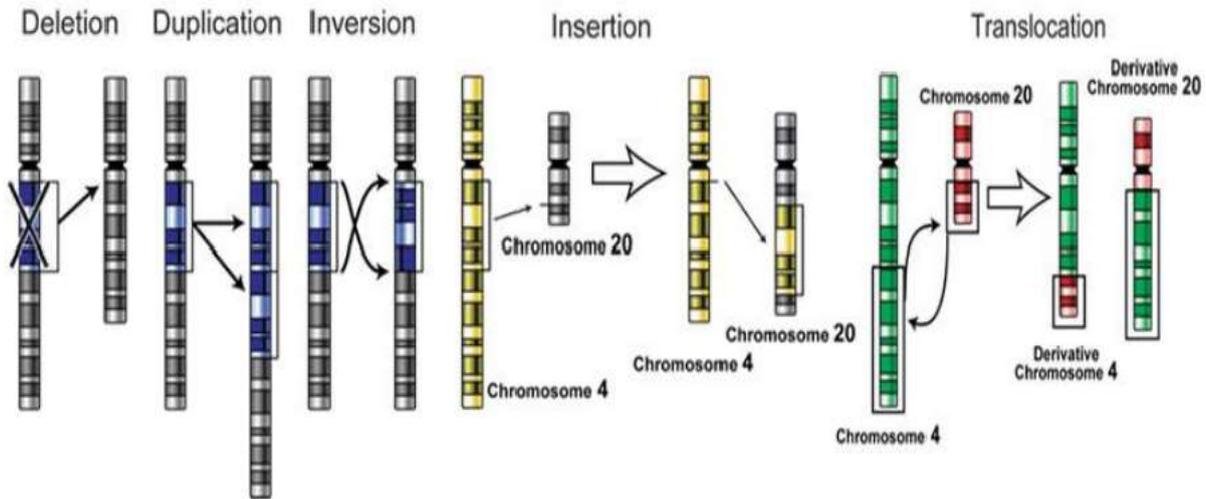
- Le phénotype est décrit en utilisant une abréviation en trois lettres romanes avec la première lettre en capital. Un suffixe + ou - est utilisé pour désigner la présence ou l'absence de ce phénotype, par exemple. Phe - indique l'incapacité à synthétiser de la phénylalanine, Lac - indique la capacité à utiliser le lactose comme source de carbone. Les lettres 's' et 'r' peuvent aussi être utilisées et signifient sensible ou résistant.
- Le génotype est indiqué par trois lettres en minuscule (reflétant souvent le phénotype) avec une quatrième lettre en majuscule qui indique les gènes spécifiques impliqués, elles sont toutes en italique, par exemple, *phe A* ou *lac Z*.

### IV.2. Mutation

Une mutation est un changement dans la séquence nucléotidique de l'ADN de la cellule. Ce changement peut se voir par : une altération du phénotype de la cellule, mais peut être silencieux s'il survient sur une partie non essentielle de la séquence protéique ou sur une partie non codante du génome. Des mutations au niveau des gènes essentiels comme ceux nécessaires à la réplication de l'ADN peuvent être létales et ne sont donc jamais isolées.

Les changements dans la séquence d'ADN vont d'un changement d'une base isolée, appelé mutation ponctuelle, à des réarrangements étendus du génome, parfois appelés mutations multisites, qui comprennent des segments courts ou longs d'ADN et peuvent atteindre plusieurs gènes. Ces mutations multisites peuvent être des substitutions et des duplications des séquences,

comme cela est présenté dans la Figure 1; ils sont le résultat de recombinaison ou de transcription du génome.



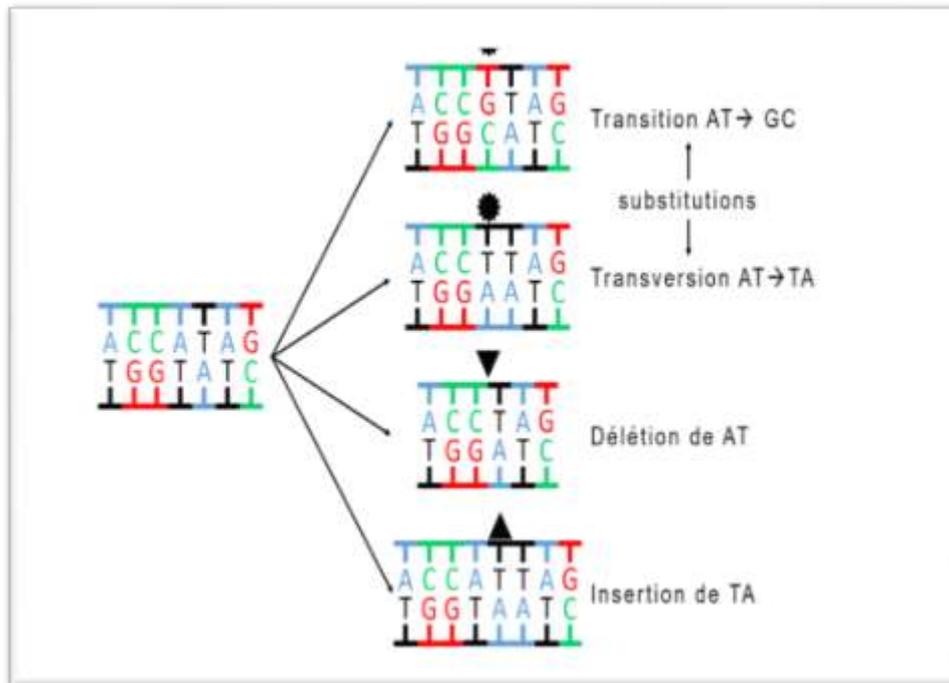
**Figure 1 :** Modification possibles des séquences d'ADN pouvant donner une mutation.

#### IV.2.1. Mutations ponctuelles

Les mutations ponctuelles peuvent consister en un changement d'une purine par une purine ( $A \rightarrow G$ ) ou d'une pyrimidine par une autre pyrimidine ( $C \rightarrow T$ ), et sont appelées *transitions*, tandis que les changements d'une purine par une pyrimidine ou l'inverse sont appelés *transversions*. L'effet d'un changement de base du génotype sur le phénotype dépend de la nature de la mutation et de son site. Il existe quatre types de mutations ponctuelles illustrés dans la Figure 2 et décrits ci-dessous.

1. **Les mutations silencieuses** sont liées à la redondance du code génétique : le même acide aminé est inséré dans la protéine et donc aucun changement n'est observé au niveau du phénotype.
2. **Les mutations faux-sens** surviennent lorsqu'un acide aminé différent est inséré dans la chaîne. La conséquence de ce changement dépend de la localisation de l'altération sur une partie essentielle ou non essentielle de la protéine. Dans le premier cas, la fonction de la protéine peut être altérée ou perdue, dans l'autre cas, aucun changement au niveau du phénotype ne sera observé.
3. **Les mutations non-sens** se caractérisent par le changement d'un codon codant par un acide aminé en un codon STOP (UAA, UAG, UGA) La synthèse protéique s'arrête prématurément, donnant une protéine tronquée.

4. **Les mutations par décalage** « frame shift » surviennent lorsqu'un ou deux nucléotides sont délétés ou insérés dans la séquence d'ADN, alternant par conséquence la lecture lors de la traduction et produisant une séquence d'acides aminés complètement altérée en aval du point de changement.



**Figure 2** : Mutations ponctuelles.

#### IV.2.2. L'isolement des mutants

Bien que des mutations surviennent spontanément chez les bactéries, elles se font à une fréquence très faible. Ainsi, il est souvent souhaitable d'utiliser un mutagène comme la lumière UV pour augmenter la chance d'isoler la mutation à laquelle on s'intéresse. L'identification de la présence de cette mutation dépend de la nature du gène auquel on s'intéresse, généralement, on distingue trois catégories

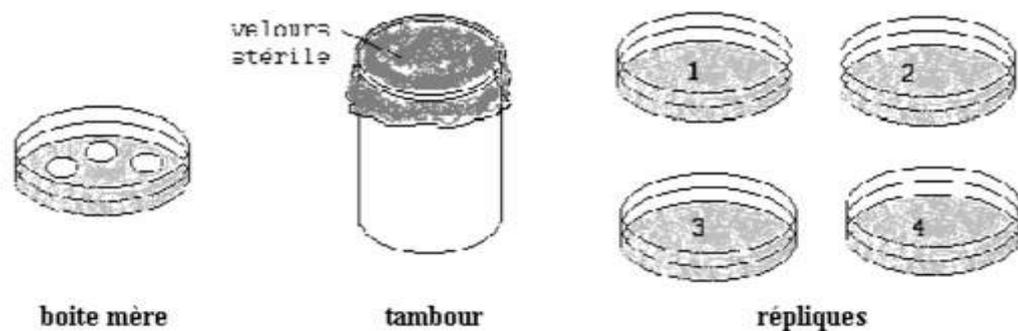
- 1- Des mutants résistants à certains composés toxiques comme les antibiotiques ou à une infection par le bactériophage. Ces mutations peuvent être sélectionnées par une culture en présence de cet agent toxique. Seules les souches de mutants résistants croîtront.
- 2- Des mutants auxotrophes incapables de synthétiser un composé essentiel à la croissance comme un acide aminé ou une vitamine. Ces mutants ne peuvent être isolés directement mais peuvent être repérés par une réplique sur boîte décrite ci-dessous.
- 3- Des mutants incapables d'utiliser des substrats particuliers comme le lactose ou le

maltose pour leur croissance. Ils peuvent aussi être identifiés par la réplique sur boîte.

### IV.2.3. Réplique sur boîte

C'est une méthode qui permet de détecter, au sein de nombreuses colonies, la présence d'une mutation particulière. Les bactéries sont étalées dans des boîtes, contenant un milieu dans lequel le parent et les mutants vont croître à une dilution où les colonies isolées peuvent être vues dans la boîte. Après incubation, les bactéries sont transférées en utilisant une pièce de *velours stérile*, dans des boîtes contenant un milieu qui permet la détection de mutation, (Figure 3).

La nature du milieu dépend de la mutation recherchée. En cas de mutations auxotrophiques, les colonies peuvent se répliquer sur les boîtes avec ou sans un facteur de croissance particulier. Des souches de mutants incapables de synthétiser ce facteur ne croîtront pas dans un milieu minimal, mais le feront dans un milieu qui contient ce facteur de croissance. Après avoir identifié la colonie mutante par son absence de croissance, elle peut être enlevée et purifiée à partir de la boîte dans laquelle elle s'est multipliée.



**Figure 3** : Réplique sur boîte

### IV.2.4. Mutants conditionnels

Il existe plusieurs gènes dans la cellule dont le produit est essentiel à la croissance cellulaire comme les protéines nécessaires à la réplication d'ADN. Il est ainsi impossible d'isoler des mutations dans ces gènes, car elles inactivent totalement la fonction du gène et provoquent la mort cellulaire. Des mutants conditionnels peuvent être utilisés dans ces circonstances, Il existe des mutations qui s'expriment seulement sous certaines circonstances,

la plus fréquente étant la croissance à haute température. Ces mutants thermosensibles ont un phénotype sauvage à basse température mais, à haute température, la mutation se manifeste et peut alors être étudiée.

#### IV.2.5. Réversion des mutations

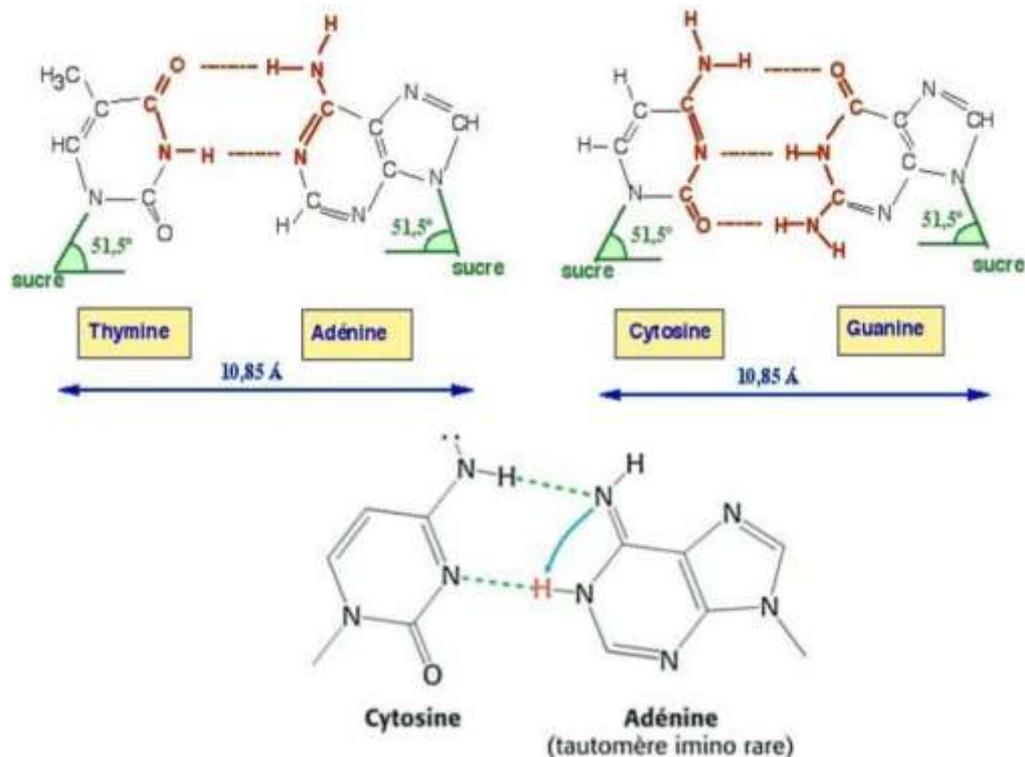
L'effet d'une mutation peut être inversé par plusieurs moyens. Le plus simple est la réversion où une seconde mutation survient et reconvertit la séquence mutée en séquence initiale (type sauvage). La sélection des réversions est un bon test pour indiquer que la mutation initiale était une mutation ponctuelle, car les délétions ne s'inversent pas facilement.

Un autre moyen pour revenir au phénotype sauvage est la suppression, mécanisme pendant lequel une seconde mutation survient à un point différent du génome et compense l'effet de la première mutation. La seconde mutation peut être au niveau d'un site différent du même gène et, dans ce cas, sera appelée mutation *suppresseur intragénique* ou sur un gène complètement différent, on l'appellera alors mutation *suppresseur extragénique*.

#### IV.2.6. Mutations spontanées

Des mutations surviennent à tous les niveaux du génome tout le temps, mais certaines régions sont plus destinées à des changements que d'autres. Celles-ci sont appelées « *hot spots* ». Le taux de mutation dans un gène peut varier d'une mutation par gène tous les  $10^4$  tours de réplication à une tous les  $10^{11}$ , avec une moyenne d'environ une mutation par gène tous les  $10^6$  tours de réplication.

Des mutations peuvent surgir pour de nombreuses raisons, comme les erreurs faites par l'ADN polymérase durant la réplication, les lésions physiques de l'ADN, la recombinaison et la transcription. Cependant, il est important de savoir que l'ADN est protégé par un grand nombre de systèmes de réparation qui réduisent le taux de mutation. La principale cause de mutation spontanée est liée au fait que des bases peuvent exister sous différentes formes, appelées *tautomères*, et ce capables de former des paires de bases différentes. Ainsi, durant la réplication l'adénine qui normalement s'apparie avec la thymine sous sa forme amine normale, prend sa forme imine rare (*tautomérisation*) et s'apparie avec la cytosine, ce qui signifie qu'une cytosine est insérée dans l'ADN à la place d'une thymine. Si cela n'est pas réparé lors de la réplication suivante, la paire de base A-T adénine-thymine sera changée en G-C (Figure 4).



**Figure 4 :** Mutation spontanée d'une paire de base A-T en G-C .

Des mutations spontanées peuvent aussi être secondaires, à un glissement des brins d'ADN au niveau de séquences courtes répétitives de nucléotides répétés durant la réplication de l'ADN, aboutissant à l'insertion ou la délétion d'une courte portions d'ADN et donc à un endommagement de la molécule. Très rarement une base peut être ôtée d'un nucléotide laissant une lacune, appelée *site apurinique* ou *apyrimidique*, qui normalement ne sera pas capable de s'apparier avec une base lors de la réplication suivante.

Une raison pouvant expliquer cela est la désamination naturelle de la cytosine pour donner de l'uracile. Celle-ci est reconnue par les systèmes de réparation de l'ADN comme une erreur et l'uracile est ôté pour laisser un *site apyrimidique*. Enfin, une autre cause majeure de mutation spontanée est en rapport avec les éléments transposables qui peuvent s'insérer aléatoirement dans le génome provoquant une mutation, si deux ou plusieurs copies sont présentes, ils servent de sites pour des recombinaisons homologues, dont il peut résulter des délétions, une duplication et des inversions des portions du génome.

#### IV.2.7. Mutagènes

Les agents chimiques et physiques qui se lient à l'ADN peuvent augmenter le taux de mutagenèse. Les mutagènes chimiques peuvent agir de différentes façons :

1. **Des analogues de bases** comme le 5-bromouracile et le 2-aminopurine sont incorporés dans l'ADN durant la réplication normale, subissent des modifications tautomériques similaires aux bases normales mais à des fréquences plus élevées, ce qui aboutit à une mutation.
2. **Des agents intercalants** sont des composés plats, à trois anneaux similaires en structure à une paire de bases. Ils peuvent s'intercaler dans l'ADN, provoquant une distorsion de l'hélice et donc un glissement durant la réplication et insertion et la délétion de bases. Le bromure d'éthidium et l'orange acridine en sont des exemples.
3. **Des agents alkylants** sont des composés qui modifient la structure d'une base et donc ses propriétés d'appariement lors de la réplication suivante. Par exemple, l'hypoxanthine qui transforme la cytosine en hydroxylaminocytosine qui s'apparie avec l'adénine, provoquant la transition de G-C en A-T
4. **Les radiations ionisantes** peuvent provoquer des lésions d'ADN. La lumière UV est fréquemment utilisée en laboratoire pour induire des mutations et son mécanisme d'action est le plus connu. La lésion principale provoquée par la lumière UV est la formation de dimères de pyrimidine, les plus fréquents étant les dimères de thymine, entre des bases adjacentes, ceci provoque une distorsion de l'hélice de l'ADN. Ce n'est pas un mutagène proprement dit mais des mutations surviennent lorsque la cellule essaie de réparer la lésion en utilisant le système de réparation SOS.
5. *La mutagenèse in vitro* est fréquemment utilisée pour modifier des séquences précises de l'ADN, lorsque la séquence d'ADN est connue. Une copie de la séquence mutée est synthétisée chimiquement et utilisée pour remplacer le type sauvage dans le génome.

### IV.3. Recombinaison

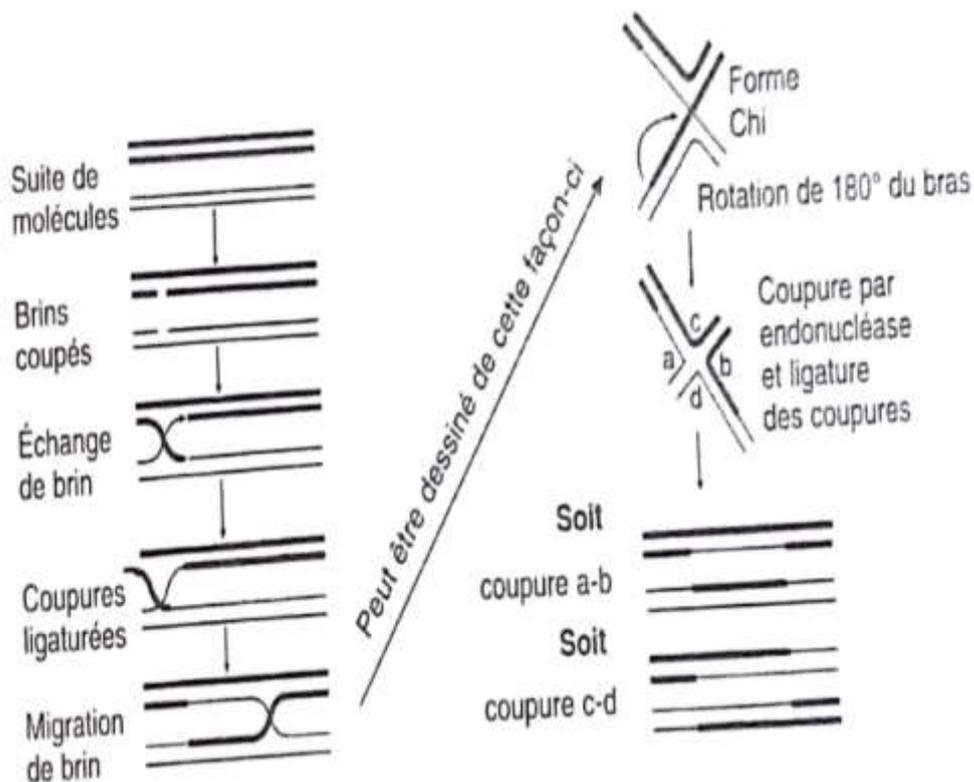
#### IV.3.1. Recombinaison générale

La recombinaison générale (ou homologue) est l'échange de l'information génétique entre deux molécules d'ADN double brin avec des séquences identiques ou très similaires. Dans les cellules diploïdes, ce type de recombinaison est responsable de l'échange de l'information génétique entre les chromosomes homologues durant la méiose.

Dans les organismes haploïdes, comme les bactéries, il existe aussi des circonstances où des régions homologues d'ADN peuvent être présentes dans la cellule (comme pendant la réplication chromosomique ou lorsque des plasmides ou phages sont présents) permettant la possibilité d'une recombinaison homologue. Chez les bactéries, l'échange génétique est médié par une protéine appelée *RecA* qui a plusieurs rôles pivots dans la cellule. Un schéma de ce

mécanisme qui permet cet échange des brins est présenté dans la Figure 5.

Il se réfère souvent au *modèle de Holliday* pour décrire la recombinaison générale réciproque, d'après le nom de la personne qui proposa ce mécanisme en premier. Les deux molécules d'ADN se lient ensemble et une coupure est faite au niveau d'un brin de chacune. L'invasion du brin, médiée par la protéine RecA, implique la complémentarité des bases entre le brin coupé d'une molécule et le brin intact de l'autre pour former un « cross-over ». Les coupures sont ligaturées par l'ADN ligase, formant une réunion de deux molécules d'ADN en un *hétéroduplex*, appelé *structure de Holliday*. Le cross-over peut se déplacer sur la molécule, ce processus est appelé *migration de l'embranchement*, créant des portions courtes ou longues de duplex d'ADN hybride. La séparation des deux molécules pour produire des recombinants est réalisée par des endonucléases qui coupent la molécule d'ADN. La nature des produits dépend du niveau de coupure de l'ADN, puisque la molécule hybride peut prendre la forme d'une croix appelée *forme chi* (Figure 5). Si des coupures sont faites aux points a et b, deux molécules d'ADN seront libérées, dans lesquelles seulement un seul brin d'ADN a été échangé.



**Figure 5** : Modèle de Hollidays pour la recombinaison généralisée (homologues).

L'effet de la recombinaison sur les molécules d'ADN dépend de la nature circulaire ou linéaire de l'ADN et si la recombinaison se fait à un ou deux sites. Un événement de recombinaison « cross-over » permet la réunion de deux molécules linéaires ou de deux molécules circulaires. Deux événements de recombinaison à deux sites différents aboutissent à l'intégration d'une nouvelle séquence dans la molécule d'ADN.

### IV.3.2. Recombinaison à spécificité de site

Ce type de recombinaison se fait dans un certain nombre de situations spéciales comme l'intégration d'un phage, comme le  $\lambda$ , dans le génome des bactéries. La protéine RecA n'est pas requise, l'intégration est médiée par une enzyme codée par le phage et une enzyme bactérienne appelée facteur d'intégration de l'hôte (UHF). Ces protéines interagissent avec des séquences homologues courtes appelées *sites att*, que l'on trouve dans le chromosome bactérien et sur la molécule de phage, formant une structure de Holliday. L'échange génétique au niveau de ces sites aboutit à l'intégration du phage dans le génome. Selon un processus similaire, l'excision du phage se fait à l'inverse de ce processus.

### IV.4. Transposition

Les éléments transposables sont des pièces mobiles de l'ADN qui peuvent se déplacer à l'intérieur d'une molécule d'ADN ou entre deux molécules d'ADN à une faible fréquence (entre  $10^0$  et  $10^1$ /génération). Ce mouvement ne nécessite pas d'homologie entre les séquences, ni la présence de la protéine *RecA*. La capacité à se mouvoir est médiée par une enzyme appelée *transposase* qui est portée par l'élément transposable. Ces éléments sont trouvés chez tous les organismes et ont probablement un rôle majeur dans l'évolution des génomes en transportant des gènes entre des molécules d'ADN.

Les éléments transposables les plus simples sont les séquences d'insertion (*éléments SI*) trouvées chez les bactéries. Elles ont une taille d'environ 1 à 2 kb et sont constituées d'une portion d'ADN qui code pour l'enzyme transposase avec une paire de répétitions inversées aux deux extrémités d'une taille évaluée à 9-41 bases. Ces séquences peuvent s'insérer de manière aléatoire dans le génome par un mécanisme qui aboutit à la duplication d'une courte séquence au niveau du site cible.

Il existe un grand nombre de copies d'éléments SI différents dans le génome et les plasmides bactériens, par exemple, le S12 est présent en cinq copies dans le chromosome d'*E. coli* et en une copie dans son plasmide F.

Un second groupe d'éléments transposables chez les bactéries est appelé transposase. Fréquemment, ces gènes sont des gènes de résistance aux antibiotiques, ce qui peut expliquer pourquoi ces gènes peuvent se répandre rapidement l'intérieur des populations de bactéries donnant des souches résistantes à un grand nombre d'antibiotiques. Les transposons peuvent être divisés en deux groupes

- **les transposons composites**, constitués d'une région centrale contenant les gènes supplémentaires situés entre deux copies d'un élément SI. Des exemples sont le Tn10 qui porte les gènes de résistance aux tétracyclines et le Tn1681 qui code pour une endotoxine thermostable.
- **les transposons type Tn-3** n'ont pas d'éléments SI mais permettent la transposition par un mécanisme qui implique la duplication qu'une copie reste sur le de l'élément de façon à ce site original et la nouvelle copie soit insérée à un autre site. Un exemple est le Tn-3 qui porte les gènes de résistance à la pénicilline

Le troisième groupe d'éléments transposables trouvés chez les bactéries est le groupe des bacteriophages Mu et D108, qui se répliquent par transposition. Enfin, les éléments transposables sont mutagènes. S'ils s'insèrent au milieu d'un gène, ils inactivent sa fonction et provoquent donc une mutation. Ils sont souvent présents dans le génome en plusieurs copies et peuvent être aussi des sites de recombinaison homologue. Ceci peut favoriser divers types de réarrangements chromosomiques comme les duplications, les inversions et les délétions, qui peuvent être responsables de grands changements dans le génotype des cellules.

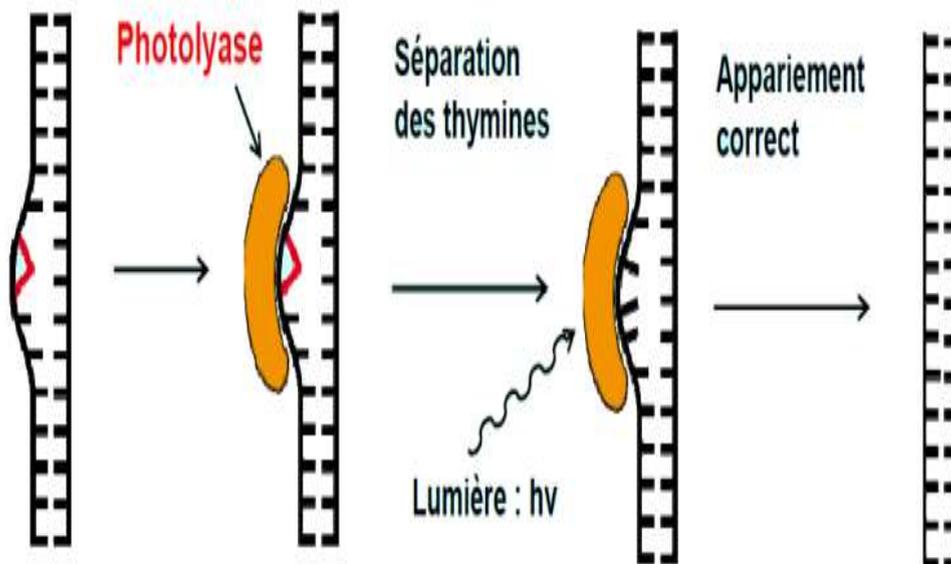
#### IV.5. Mécanisme de réparation de l'ADN

Des erreurs de réplication de l'ADN et des lésions de l'ADN secondaires à l'exposition à des mutagènes surviennent régulièrement; les micro-organismes ont mis au point au cours de leur évolution des systèmes très complexes pour reconnaître et réparer ces lésions. Dans le meilleur des cas, l'organisme répare directement le dommage initial, sans induire de changement de la séquence des bases mais parfois le degré des dommages est si grand que la synthèse d'ADN ne peut continuer.

Dans ces conditions, un système de réparation SOS est activé et permet la réparation rapide et étendue de l'ADN mais aux dépens de l'exactitude car on peut avoir une accumulation de mutations. La réparation des dommages secondaires aux UV chez l'*E. coli* est la plus connue. Une cellule d'*E. coli* normale peut supporter environ 30 lésions par molécule et au moins quatre systèmes de réparation différents sont présents pour rectifier ces dommages et résoudre ce problème.

### IV.5.1. Photoréactivation

Dans un mécanisme de réparation lumière-dépendante, l'enzyme photolyase avec l'aide de la flavine adénine dinucléotide (FAD) coupe l'anneau cyclobutane entre deux pyrimidines adjacentes pour restaurer les monomères initiaux. Ceci est le mécanisme de défense premier vis-à-vis des dommages liés aux UV (Figure 6).



**Figure 6:** Photoréactivation

### IV.5.2. Réparation par excision

La réparation par excision est appelée réparation « sombre », en opposition à la photoréactivation. C'est un système général utilisé pour réparer un certain nombre de dommages d'ADN comme ceux causés par des dimères de pyrimidine et des erreurs d'appariement de bases. Les produits des gènes *uvr A*, *B* et *C* se lient pour former une endonucléase qui reconnaît les distorsions de l'hélice de l'ADN causées par des modifications des bases. L'endonucléase *UvrABC* coupe l'ADN aux deux côtés de la lésion et l'ADN polymérase I enlève et remplace les bases. L'ADN ligase comble la lacune (Figure 7).

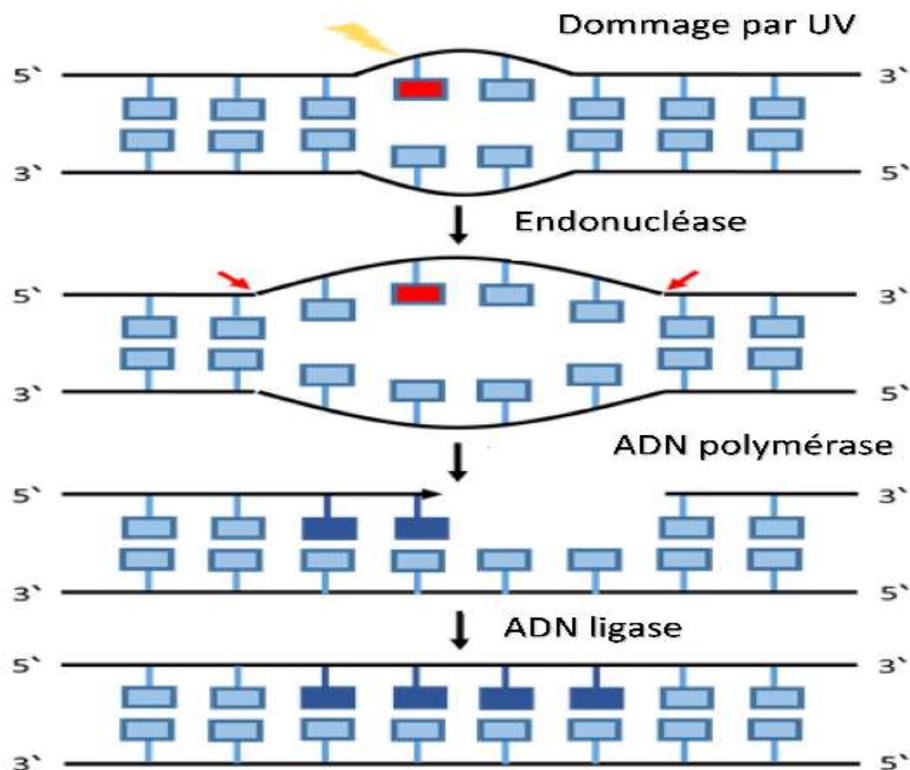
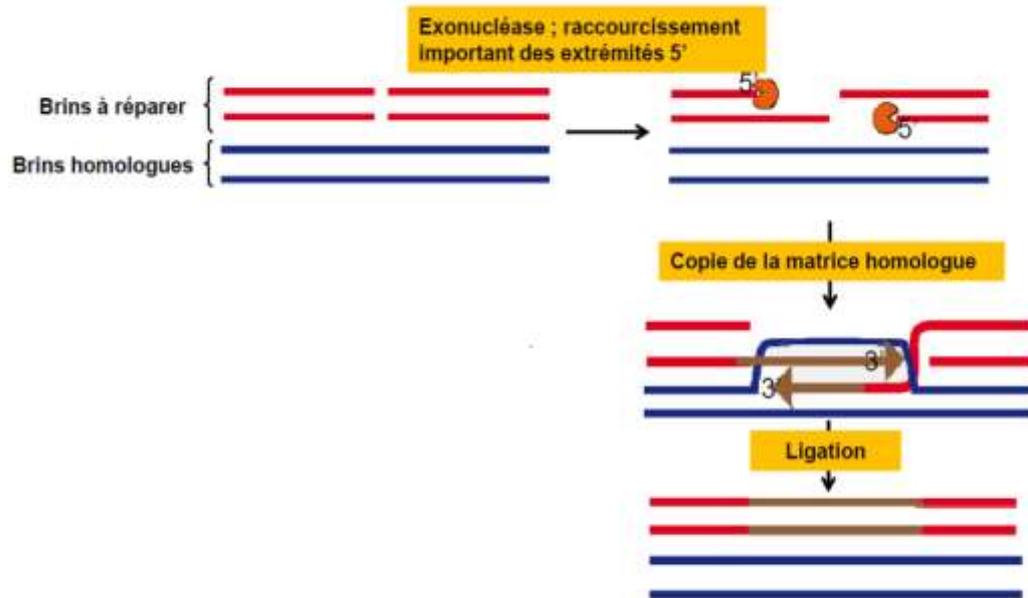


Figure 7 : Réparation par excision

#### IV.5.3. Réparation par recombinaison (postréplication)

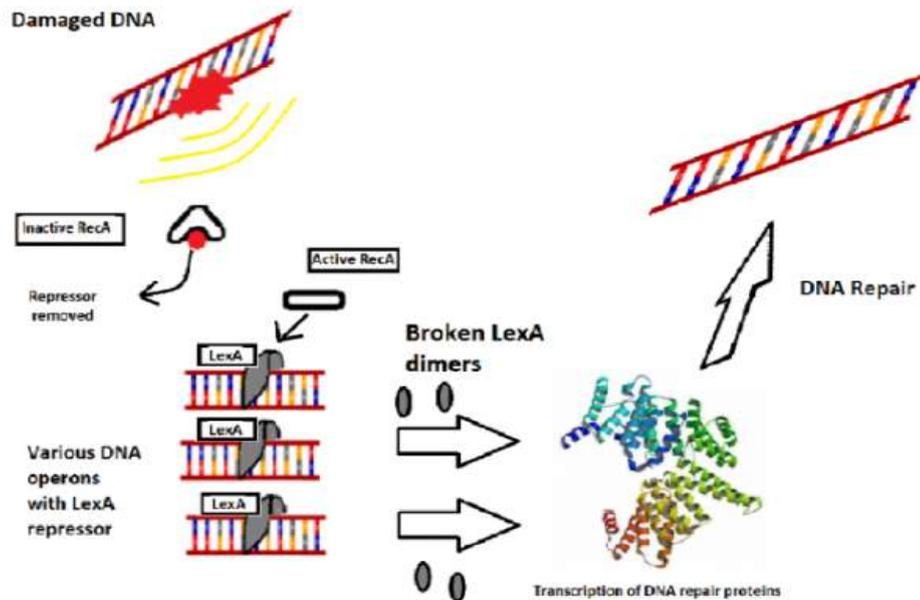
Les dimères de thymine ne peuvent être répliqués; au niveau de ces sites, l'ADN polymérase peut sauter la lésion sans s'arrêter et continuer la synthèse à partir de l'ADN matrice. Ceci laisse en place une lacune dans le brin d'ADN synthétisé situé en regard du dimère. Elle ne peut pas être réparée par l'excision qui nécessite un brin intact, la matrice. La lacune peut être comblée par une recombinaison médiée par la protéine *RecA* avec l'hélice de l'ADN sœur qui contient la séquence intacte et qui devrait être en face du dimère. Bien que la recombinaison ne répare pas la lésion, elle permet aux deux molécules neuves d'ADN d'être réparées par le mécanisme de réparation par excision (Figure 8).



**Figure 8** : Réparation par recombinaison (Figure8).

#### IV.5.4. Réparation SOS

Il existe un grand nombre de gènes et d'opérons dans la cellule qui sont régulés par la protéine *RecA* et un inhibiteur de la transcription, le *LexA*. Ceux-ci sont impliqués dans la réparation de l'ADN et sont appelés systèmes de réparation SOS. Il s'agit d'un système de réparation reconnaissant les erreurs, qui interagit avec l'ADN polymérase et lui permet de continuer la réplication de l'ADN en aval d'un dimère de pyrimidine. Cette capacité de lecture dans le sens 3' 5' de l'enzyme est inhibée afin que des bases puissent être insérées de façon aléatoire en regard du dimère sans complémentarité des bases. Ce mécanisme explique la principale raison pour laquelle la lumière UV est mutagène, puisque la plupart des autres systèmes réparent l'ADN correctement. La réparation SOS est induite par la protéine *RecA* activée par une modification de la conformation de l'ADN secondaire à la lésion. Les protéines *RecA* activées provoquent le clivage protéolytique de la protéine *LexA* qui ne pourra être un inhibiteur de la transcription. Les gènes dans le système peuvent ensuite être exprimés aussi longtemps que la lésion de l'ADN est présente dans la cellule. Une fois la lésion réparée, la protéine *RecA* n'est plus activée et n'induit pas la protéolyse de la *LexA*; ainsi, la protéine *LexA* s'accumule dans la cellule et inhibe la transcription des gènes codant pour le système de réparation SOS.



**Figure 9** : Réparation SOS (Figure 9).

## IV.6. Plasmides

Les cellules bactériennes contiennent souvent un ou plusieurs types d'ADN chromosomiques, appelés plasmides. Ceux-ci sont généralement des molécules d'ADN fermées de façon covalente, circulaires et superenroulées, capables de se répliquer de façon indépendante par rapport au chromosome bactérien. Jusqu'à ce jour, un grand nombre de plasmides ont été isolés à partir de chaque espèce de bactéries et certaines levures. La taille des plasmides peut aller de très petite à très grande.

### IV.6.1. Fonction

Les plasmides portent souvent des gènes utiles aux bactéries mais non essentiels à la croissance normale et à la division de la cellule. Un grand nombre de plasmides sont isolés à partir des bactéries et semblent ne pas avoir de fonction.

### IV.6.2. Réplication

De très petits plasmides utilisent la machinerie de réplication de l'hôte pour faire des copies d'eux-mêmes. Tout ce dont ils ont besoin est une origine de réplication où l'ADN polymérase et la machinerie de synthèse d'ADN polymérase peuvent se lier pour permettre au plasmide de se répliquer. Des plasmides plus grands peuvent porter des gènes supplémentaires codant pour des protéines nécessaires à la réplication du plasmide. Certains plasmides,

appelés *épisomes*, peuvent s'intégrer dans le chromosome et se répliquer lorsque le chromosome est copié.

Le nombre de copies d'un plasmide dans la cellule varie en fonction du mécanisme qui contrôle la réplication plasmidique. Certains plasmides sont contrôlés de manière souple, ceci permet de multiples tours de réplication plasmidique, donnant un grand nombre de copies de plasmides présents dans la cellule au même moment (jusqu'à 40 copies).

Des plasmides plus grands sont contrôlés de façon plus stricte, s'assurant qu'une à trois copies du plasmide sont présentes dans la cellule en même temps. Lors de la division cellulaire, les grands plasmides sont distribués aux cellules filles par attachement à des sites membranaires par un mécanisme similaire à la ségrégation du chromosome, mais les plasmides en multiples copies sont distribués aux cellules filles par ségrégation aléatoire.

### IV.6.3. Incompatibilité plasmidique

Les plasmides similaires ne peuvent survivre dans la même cellule à moins qu'il y ait une forte pression de sélection. On les décrit comme incompatibles. La raison n'est pas complètement comprise, mais on pense que les plasmides incompatibles pourraient partager un mécanisme commun de contrôle de la réplication, ce qui signifie qu'après quelques tours de réplication un des types de plasmides est perdu par la cellule.

Cette incompatibilité entre les plasmides est à la base d'un système de classification où des plasmides ne pouvant coexister ensemble sont mis dans le même groupe d'incompatibilité. Il existe au moins 30 groupes d'incompatibilité différents chez *E. coli*. D'un autre côté, des plasmides issus de groupes différents d'incompatibilité peuvent exister dans la même cellule, jusqu'à sept différents types de plasmides sont présents chez *E. coli*.

### IV.6.4. Plasmides conjugatifs

Un groupe important de plasmides est constitué par les plasmides conjugatifs, trouvés chez un grand nombre de bactéries. Ce sont des plasmides capables de se transférer entre des bactéries par un mécanisme appelé conjugaison. Le plus simple étant le facteur F, issu de *E. coli* qui a été isolé en premier puisqu'il provoquait le transfert de gènes entre des bactéries. D'autres plasmides conjugatifs comme les *plasmides R* portent des gènes supplémentaires comme les gènes de résistance aux antibiotiques. Les plasmides conjugatifs sont généralement grands et leur réplication est contrôlée de façon stricte, sauf celle du plasmide RK6.

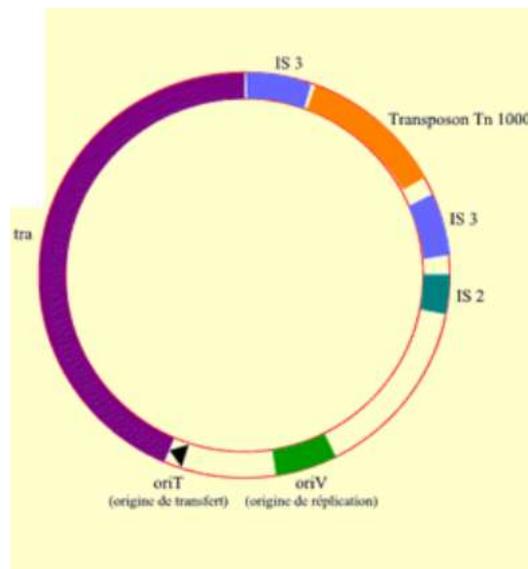
De nombreux plasmides conjugatifs se transfèrent entre les bactéries de la même espèce, mais un groupe important est capable de se transférer entre un grand nombre de bac-

téries Gram négatives. Ils sont appelés *plasmides sexuels* dont le plus typique est le plasmide de résistance aux antibiotiques *RP4* chez le *Pseudomonas putidia*. Tous les plasmides R, particulièrement les plasmides sexuels, posent un problème dans le domaine médical en raison de leur potentialité à répandre les gènes de résistance aux antibiotiques parmi des bactéries cliniquement pathogènes.

#### IV. 6.5. Plasmide F et conjugaison

##### IV.6.5.1. Conjugaison

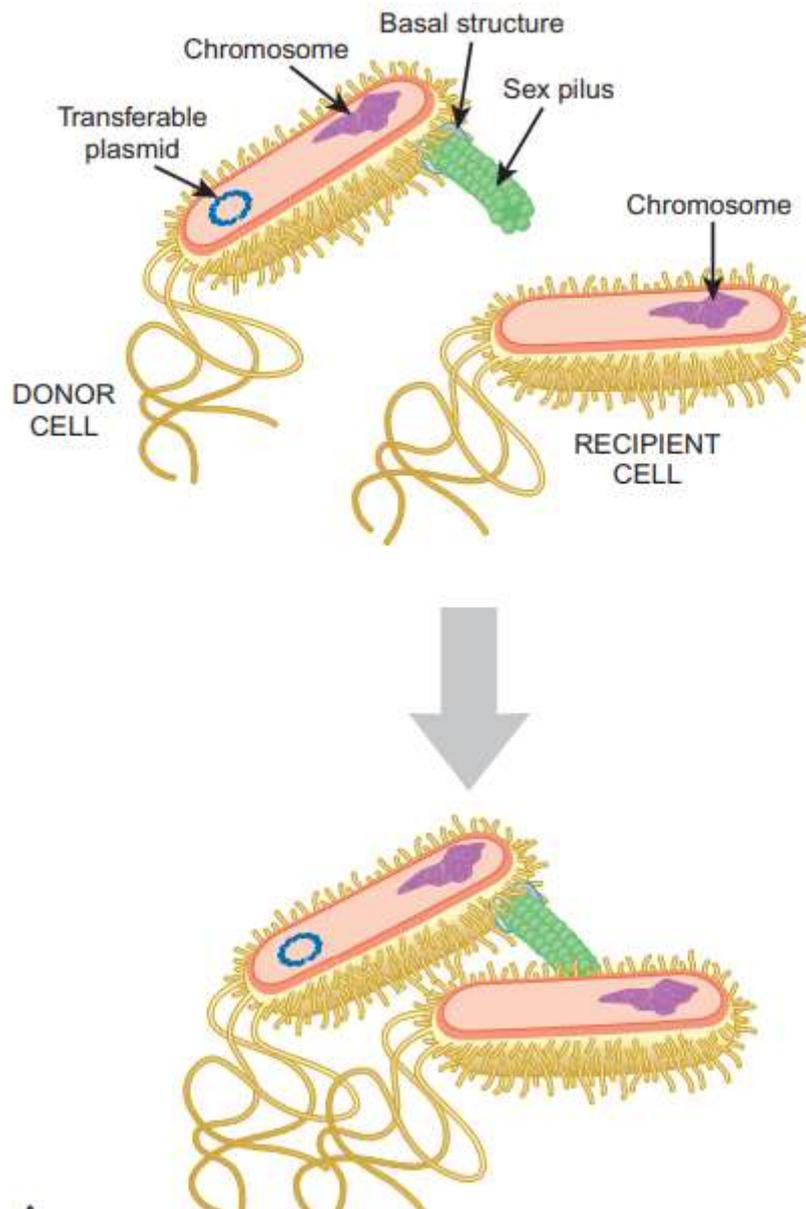
Un mécanisme important par lequel l'ADN peut être transféré entre des cellules est appelé conjugaison, médiée par certains plasmides et qui nécessite un contact direct entre les cellules. Les plasmides conjugatifs, types par le plasmide F de l'*E. coli*, ont la capacité de se transférer entre les cellules et, dans certains cas, de transférer des segments d'ADN chromosomique. Les plasmides F et leurs apparentés portent un groupe de gènes appelé gènes *tra* qui codent pour toutes les protéines requises pour l'appariement avec une autre bactérie ne contenant pas de plasmide F. Une carte du plasmide F de l'*E. coli* est présentée Figure 10.



**Figure 10** : Schéma simplifié d'un plasmide F.

L'ADN est ensuite transféré de la cellule  $F^+$  au receveur, la cellule  $F^-$ . Le plasmide est grand, de taille évaluée à 95 kb, et existe en une ou deux copies dans la cellule. La répllication végétative du plasmide lors de la division cellulaire consiste en la synthèse semi-conservative et bidirectionnelle de l'ADN commençant à l'*oriV*, suivie par la ségrégation du plasmide dans les cellules filles. Le plasmide F contient aussi un certain nombre de séquences d'insertion

distribuées sur toute la molécule. Les cellules contenant des plasmides F ( $F^+$ ) produisent des pili spéciaux à leur surface, codés par des gènes *tra*. Ce sont des structures filamenteuses protéino-aqueuses qui se lient à la surface des cellules  $F^-$  pour former une paire (Figure 11). Ils ne forment pas de paires avec des cellules  $F^+$  en raison d'un phénomène appelé exclusion surface; ceci est médié par une paire de gènes *tra* qui codent pour des protéines de surface des cellules  $F^+$ . Le pili F se rétracte au contact, mettant les deux cellules très proches l'une de l'autre.



**Figure 11** : Conjugaison.

#### IV.6.5.2. Transfert d'ADN

Une copie simple brin du plasmide de F est transférée dans la cellule receveur. Elle est

produite par une réplication en cercle roulant. Une coupure est faite sur un seul brin de l'ADN au niveau d'un site, appelé *oriT* (origine du transfert) qui est localisé à côté des gènes *tra*. L'extrémité 3' de l'ADN coupé est utilisée comme amorce pour commencer la synthèse, le brin intact sert de matrice à la réplication en cercle roulant. La synthèse d'un brin complémentaire d'ADN se fait dans la cellule receveur. Le plasmide F est transféré de façon à ce que les derniers gènes à transférer soient les gènes *tra*. Le plasmide devient circulaire dans le receveur pour donner une cellule F et la paire se sépare.

#### IV.6.5.3. Conjugaison et souches Hfr

Comme il a été mentionné précédemment, le plasmide F possède un certain nombre de séquences d'insertions répandues dans la molécule, comme c'est le cas dans le chromosome de l'*E. coli*. Parfois, la recombinaison entre ces séquences homologues aboutit à l'intégration du plasmide F dans le génome au niveau de sites spécifiques. Les souches qui ont un plasmide F intégré dans leur chromosome sont appelées souches Hfr (high-frequency recombination). Une fois intégré, le plasmide F est transféré dans le receveur. Les gènes chromosomiques les plus proches de F est toujours capable de former des paires et d'initier la réplication au niveau d'*orit* pour lancer le transfert (Figure 12).

Cependant, dans ce cas, le chromosome plus le plasmide forme un grand facteur F; ainsi, le plasmide F associé au chromosome de l'*E. coli* est transféré dans le receveur. Les gènes chromosomiques les plus proches de *lorit* sont transférés en premier. L'ordre du transfert peut être dans le sens des aiguilles d'une montre ou inversement dépendant de l'orientation dans laquelle le plasmide F est inséré.

Le nombre de gènes transférés dépend de la durée pendant laquelle la paire de cellules est maintenue ensemble, mais en théorie le transfert de tout le chromosome de l'*E. coli* dure 100 min. Les derniers gènes transférés sont les gènes *tra*. En pratique, la paire de cellules se sépare de façon aléatoire et, normalement, seulement une partie de l'ADN est transférée. Cet ADN chromosomique simple brin incomplet ne pourra pas redevenir circulaire pour former un plasmide ou un second chromosome.

Cependant, il peut s'intégrer dans le chromosome du receveur par recombinaison homologue et donc permettre le transfert de gènes du donneur au receveur. C'est la raison pour laquelle ces souches sont appelées souches de recombinaison à haute fréquence (Hfr), car elles permettent le transfert de gènes chromosomiques d'une souche à une autre à haute fréquence. Les souches Hfr sont utilisées dans la cartographie génétique pour déterminer la position des gènes sur le chromosome de l'*E. coli*, car l'ordre des gènes peut être déterminé

par le temps quand il entre dans la cellule receveur durant l'accouplement.

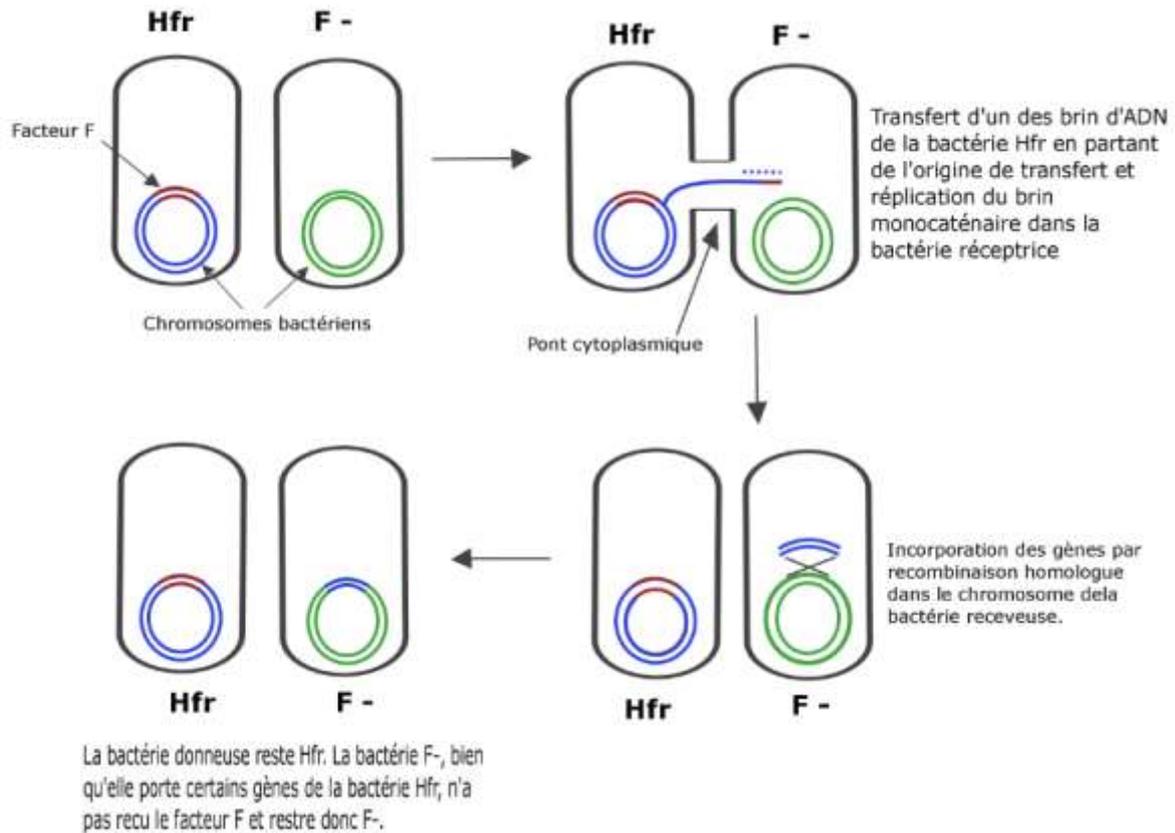


Figure 12 : Etapes des a conjugaison.

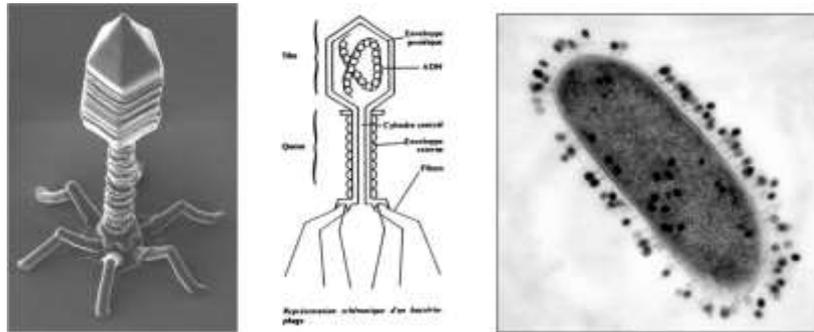
#### IV.6.5.4. Facteurs F'

Les facteurs F s'excisent eux-mêmes sur le chromosome par un processus qui est l'inverse de l'intégration. Normalement, ce processus se passe correctement mais parfois une erreur est faite et le plasmide emporte un segment adjacent du chromosome pour former un facteur F'. Ces facteurs F peuvent être utilisés pour transférer des gènes chromosomiques dans une cellule receveur et sont utilisés les généticiens bactériologistes, en particulier, pour créer des diploïdes partiels des gènes dans une cellule pour étudier la relation dominante/récessive entre les allèles du même gène.

#### IV.7. Bactériophages

Les bacteriophages, normalement appelé phages, sont des virus qui infectent les bactéries. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires, capables d'exister sous forme de particules virales à l'extérieur de la bactérie mais ne se reproduisent qu'à l'intérieur de la cellule. Ils sont constitués d'un génome d'acide nucléique entouré d'une couche protéique appelée *capside*. Le

phage a la capacité d'infecter une bactérie et d'obliger la cellule à synthétiser des composés phagiques (Figure 13).



**Figure 13:** Morphologie typique de bactériophage

#### IV.7.1. Structure

Comme les virus, les phages ont plusieurs formes. Ils peuvent être *icosaédriques*, sphériques constitués de 20 faces triangulaires ou filamenteux ou de structures complexes formées de têtes icosaédriques avec queues hélicoïdales. Le génome peut être de l'ADN ou ARN, simple brin ou double brin, circulaire ou linéaire. Certains phages sont très petits comme le phage ARN simple brin de l'*E. coli*, MS2 dont le génome contient des informations seulement pour quatre protéines, alors que d'autres sont grands comme le T4 dont le génome code 125 protéines différentes.

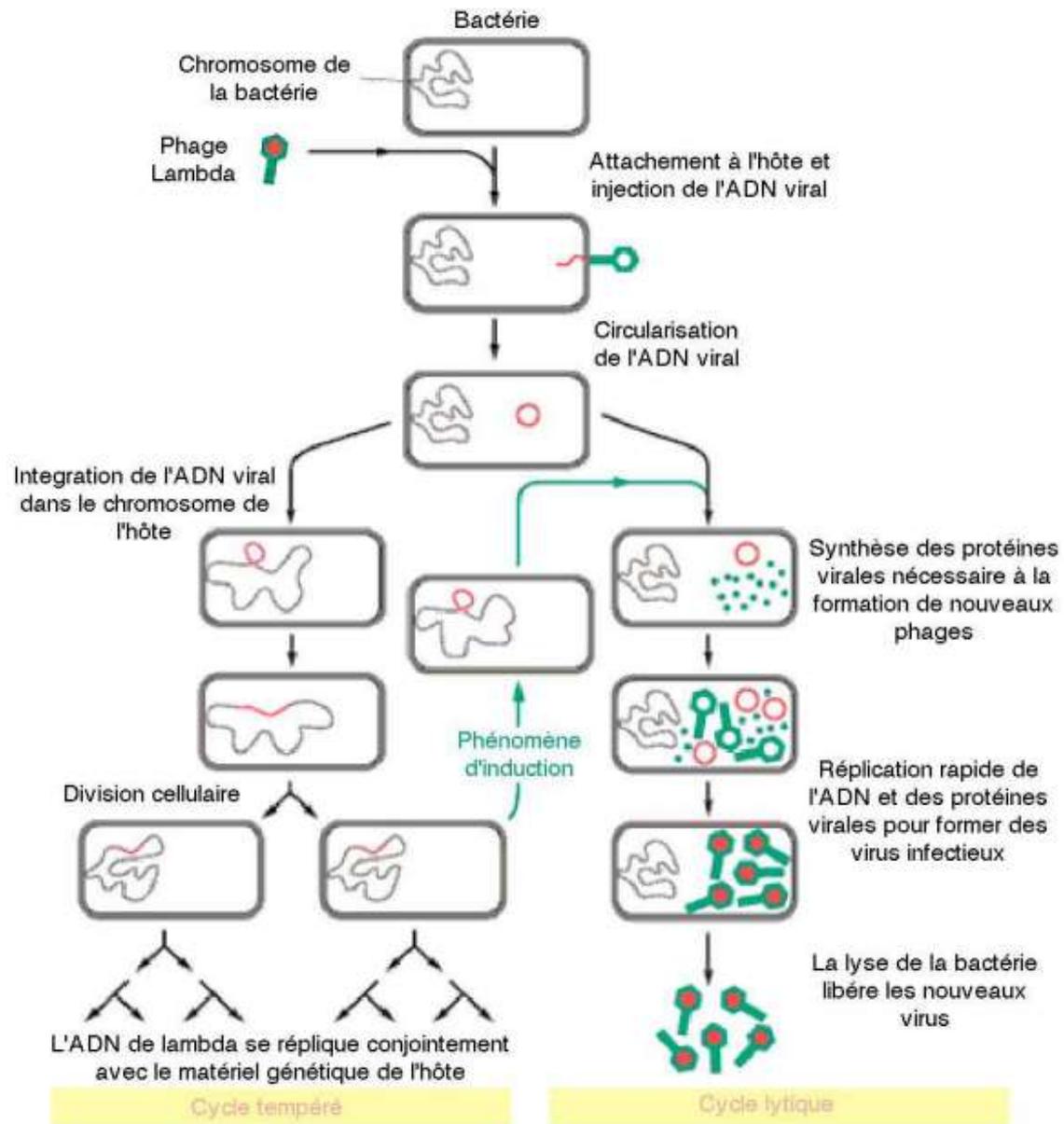
#### IV.7.2. Cycle biologique

Le cycle biologique typique d'un phage commence par la fixation du phage sur un récepteur spécifique à la surface de la cellule bactérienne suivie par la pénétration du matériel génétique dans l'hôte. Les bactéries contiennent des systèmes de restriction/modification désignées pour dégrader l'ADN étranger, ainsi de nombreuses infections ne sont pas réussies. Des enzymes codées par le phage sont synthétisées, il s'ensuit une réplication de l'acide nucléique. Finalement, les protéines de la capsid du phage sont synthétisées et assemblées en un phage contenant une copie du génome. Les phages sont ensuite libérés normalement après lyse de la cellule dans le milieu environnant.

##### IV.7.2.1. Cycle lysogène

Certains phages, le plus typique étant le phage  $\lambda$ , produisent des protéines répressives qui arrêtent la réplication du phage, au lieu de commencer le cycle typique après entrée dans la cellule. Le phage entre dans un état appelé lysogénie pendant lequel son génome se réplique en même temps que le chromosome de l'hôte et passe d'une génération à la suivante.

Le phage peut être activé spontanément et entrer dans le cycle lytique. Pour répliquer en même temps que l'hôte, certains phages lysogènes (parfois appelés tempérés) s'intègrent dans le chromosome pour former un prophage, cependant, certains phages comme le P1 existent dans le cytoplasme sous forme de plasmide.



**Figure 14** : Cycle biologique d'une phage lytique et lysogène.

### IV.7.3. Culture et titrage des phages

Le nombre de particules de phages infectieux peut être mesurée utilisant la culture en plaque pour déterminer le nombre d'unit formatrices de phages (UFP) sur un échantillon en culture. Une plaque est une région claire dans une culture bactérienne trouble où des phages

libérés ont lysés des bactéries dans le milieu en environnant. Une plaque est donc équivalente à la multiplication d' phage dans l'échantillon initial.

## IV.8. Transduction

La transduction est le transfert de l'ADN d'une cellule bactérienne (donneur) à une autre cellule (receveur) par un bactériophage (Figure 16).

### IV.8.1. Transduction généralisée

La transduction généralisée résulte d'une erreur rare lors de l'assemblage d'un phage, où un segment du génome de l'hôte est emporté au lieu de l'ADN du phage dans la tête du phage. Ce phage transducteur est capable d'infecter de nouveaux be d'injecter l'ADN du phage mais, comme ce n'est pas l'ADN du phage est en général perdu, à moins qu'il ne soit intégré dans le génome de l'hôte par recombinaison.

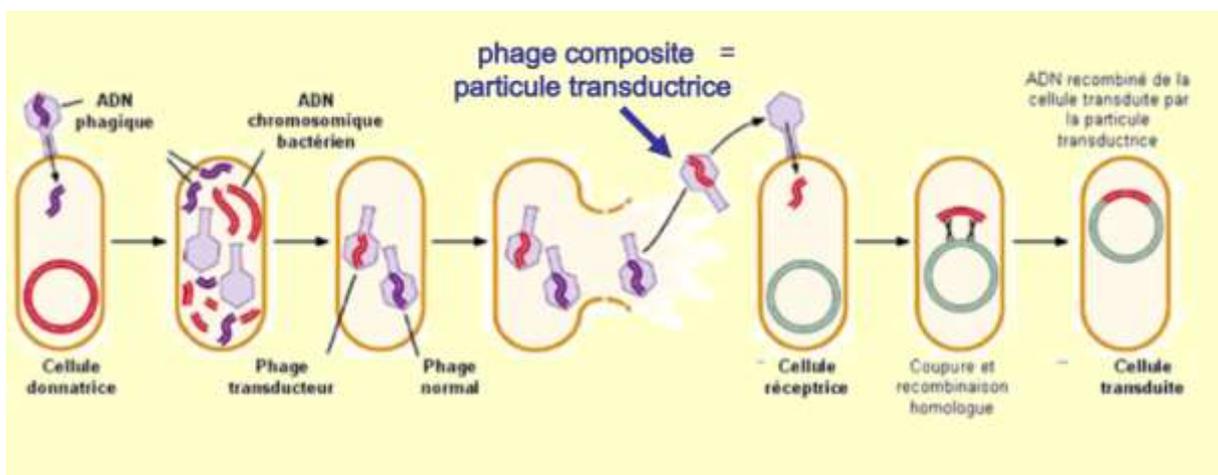


Figure 15: Transduction généralisée.

### IV.8.2. Transduction spécialisée

C'est une des caractéristiques de certains phages lysogènes qui sont restés intégrés dans le chromosome de l'hôte un certain temps. A l'activation, le génome viral n'est pas excisé complètement, et un segment adjacent du chromosome est emporté. Les particules virales qui contiennent ces gènes vont infecter de nouvelles cellules dans lesquelles tout le phage peut s'intégrer chromosome pour former un lysogène, ou juste l'ADN chromosomique est intégré par recombinaison

#### IV.9. Transformation

La transformation consiste en l'absorption d'ADN libre du milieu environnant et son incorporation dans le génome. Un certain nombre de bactéries comme le *Bacillus*, le *Streptococcus*, *Neisseria* et l'*Haemophilus* sont capables de transformation naturelle. La capacité d'une cellule à absorber de l'ADN dépend d'un état particulier de la cellule, appelé compétence. La compétence liée à la présence de récepteurs à l'ADN à la surface de la cellule. D'autres bactéries comme l'*E. coli* peuvent devenir compétente après apport d'un traitement chimique dans des conditions froides. En fonction de l'espèce, la liaison et le transfert de l'ADN à la cellule peut concerner des séquences spécifiques ou non spécifiques. Normalement, l'ADN est sous forme de double brin mais dans la plupart des cas, lorsqu'il entre dans la cellule, il est en simple brin. L'ADN est alors intégré dans le chromosome par recombinaison.

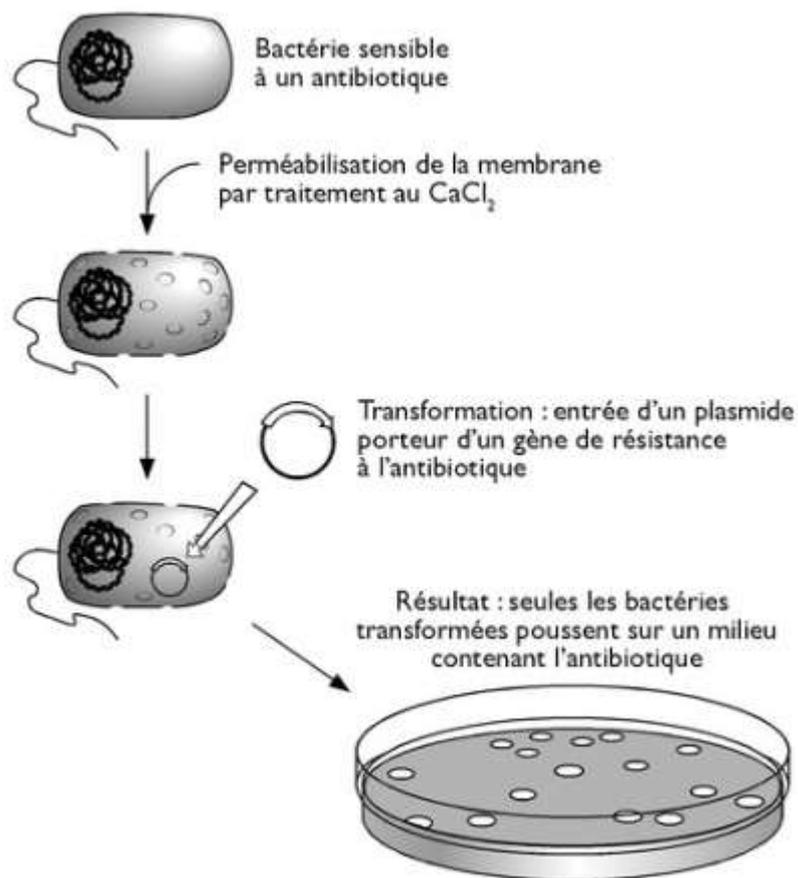


Figure 16: Transformation bactérienne.