

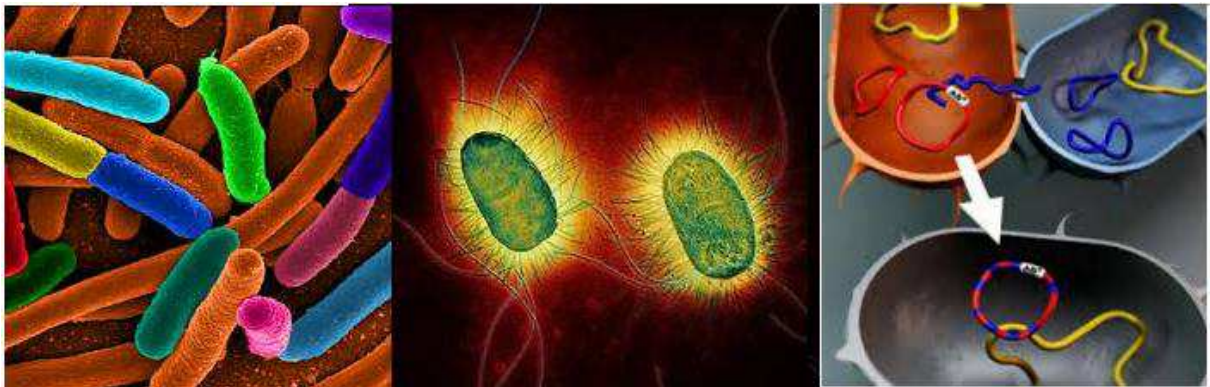


GÉNÉTIQUE MICROBIENNE

3^{ÈME} ANNÉE LICENCE MICROBIOLOGIE

DR. S. MÉZAACHE-AICHOUR

2016-2017



I– Structure et organisation du matériel génétique	1
1-1-Structure des acides nucléiques	1
1-2-Acides nucléiques	2
1-3- Organisation du Matériel génétique bactérien	2
1-3-1- Le chromosome bactérien	4
1-3-2- Les plasmides	6
1-4- Matériel génétique viral	7
1-5-Extraction et purification et élimination de l'ADN plasmidique	7
<u>II Les Mutations et les mécanismes de réparation de l'ADN</u>	9
2-1- Mutations	9
2-2-Définition	9
2-3-Caractères des mutations	9
2-4- Mécanismes de la mutation	10
2-4-1- Substitutions	10
2-4-2- Délétions et Insertions	11
2-4-3- Transposition	11
2-5- Types de Mutations	12
2-5-1- Mutations naturelles	12
2-5-2- Mutation Induite	12
2-6- Mécanismes de réparation des mutations	15
2-6-1-Réversion directe (retour à l'état antérieur)	16
2-6-1-1-Réparation des photodimères pyrimidiques par photo réactivation	16
2-6-1-2- Alkyltransférases	16
2-6-2- Systèmes dépendant d'homologies pour la réparation	16
2-6-2-1- Voies de réparation par Excision	16
2-6-2-2- MMR mismatch repair ou réparation des mésappariements (post réplicatif)	18
2-6-3- Réparation des coupures double brins (CDB)	20
2-6-3-1- NHEJ	20
2-6-3-2- Réparation par recombinaison	20
2-2-4- Réparation SOS (Save Our Selves) ou by pass	20
<u>III- Recombinaisons génétiques et éléments génétiques transposables</u>	22
Introduction	22
3-1- Recombinaison générale ou homologue	22
3-2- Transposition	25
3-3- Recombinaison spécifique de site (RSS)	27
3-3-1-Rôles biologiques de la Recombinaison spécifique de site	28
3-3-2- Événements impliquant une RSS	28
3-3-3-Les recombinaisons	29
3-3-4- Recombinaison spécifique de site	29
*La recombinaison illégitime	30
<u>IV- Transferts génétiques chez les bactéries</u>	31
Introduction	31
4-1- Transformation	32
4-2- La conjugaison	33
4-2-1-Caractères de la conjugaison	33

4-2-2- Conjugaison F ⁺ x F ⁻	34
4-2-3- Conjugaison Hfr x F ⁻	36
4-2-4- Conjugaison F'X F ⁻	36
4-3- Transduction	36
4-3-1- Lyse et lysogénie	37
4-3-2- Recombinaison des phages	37
4-3-3-Phénomènes de Transduction	38
4-4-- Cartographie	40
4-5- Nouveaux transferts génétiques horizontaux chez les bactéries	40
<u>V- Enzymes de restriction</u>	40
Introduction	40
5-1- Les systèmes de restriction/modification	41
5-2-Nomenclature	41
5-3- Séquences cibles et modes de clivage.	42
5-4- Rôle des systèmes de restriction/modification	42
5-5- Applications des enzymes de restriction	42
<u>VI – Régulation de l'expression des gènes</u>	44
6-1- Régulation transcriptionnelle	44
6-1-1-Notion d'opéron	44
6-1-2- Régulation négative	45
6-1-3- Régulation positive	45
6-1-4- Les systèmes de contrôle négatifs et positifs sont fondamentalement différents (Opéron lactose et Opéron arabinose)	45
6-1-5- Régulation de la transcription chez <i>Saccharomyces</i>	46
6-2- Régulation traductionnelle	49
6-2-1-Contrôle de la transcription des gènes structuraux de l'opéron Tryptophane (trp) par Atténuation chez <i>Escherichia Coli</i> .	50
<u>VII. Bactériophages</u>	51
Historique	51
7.2. Définition	51
7.3. Classification des bactériophages	51
7.4. Structures du bactériophage	52
7.5. Cycle de multiplication du bactériophage	53
7.5.1. Le cycle de vie de lambda (λ)	53
Références bibliographiques	61

I– Structure et organisation du matériel génétique

1-1-Structure des acides nucléiques

1-1-1-Composants des acides nucléiques

Les molécules biologiques qui contiennent l'information génétique sont les acides nucléiques. Qui sont composés de molécules simples comme l'acide phosphorique (PO_4H_3 , fig.1a), des oses à 5 carbones (pentoses, fig.1b) et des bases azotées (purines ou pyrimidines, fig.1c).

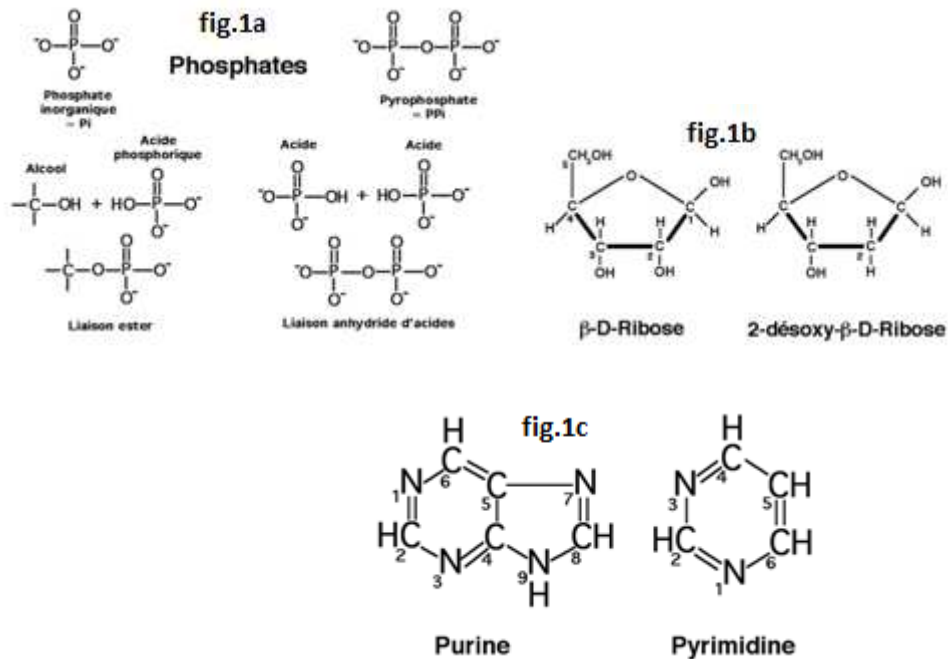


Figure 1 : Composants des Acides nucléiques

La liaison d'une base azotée avec un des sucres donne un nucléoside. Un nucléoside est donc formé d'une base et d'un sucre liés par une liaison N-osidique. La liaison d'un nucléoside avec un phosphate se fait par une estérification de la fonction alcool primaire (carbone n°5') du sucre et une des trois fonctions acides du phosphate. L'ester obtenu est un nucléotide. **Un nucléotide est donc formé d'une base azotée, liée par une liaison osidique avec un sucre, lui-même lié par une liaison ester avec un phosphate.**

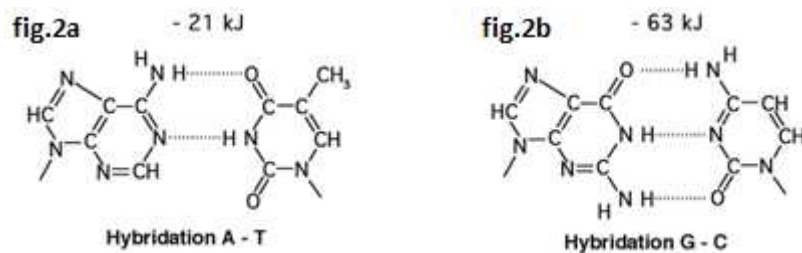
Les acides nucléiques sont formés par une polycondensation de nucléotides AMP, CMP, GMP et UMP pour les acides ribonucléiques, dAMP, dCMP, dGMP et dTMP pour les acides désoxyribonucléiques tableau 1.

1-1-2-Hybridation des nucléotides.

Lorsqu'un acide nucléique est en solution les molécules forment des liaisons hydrogènes associant les nucléotides deux par deux, de sorte qu'un nucléotide à adénine se lie avec un nucléotide à thymine (ou à uracile dans un RNA, fig.2a) et un nucléotide à guanine avec un nucléotide à cytosine (fig.2b).

Tableau 1 : Nucléotides et nucléosides

Bases	Nucléosides	Nucléosides 5'-mono, di, triphosphates	Unités nucléotidiques des acides nucléiques
A = Adénine	(désoxy-) adénosine	AMP, ADP, ATP dAMP, dADP, dATP	(d-) adénylate
G = Guanine	(désoxy-) guanosine	GMP, GDP, GTP dGMP, dGDP, dGTP	(d-) guanylate
C = Cytosine	(désoxy-) cytidine	CMP, CDP, CTP dCMP, dCDP, dCTP	(d-) cytidylate
U = Uracile	uridine	UMP, UDP, UTP	uridylate
T = Thymine	désoxy-thymidine	dTMP, dTDP, dTTP	d-thymidylate

**Figure 2 : Hybridation des nucléotides**

1-2-Acides nucléiques

Pour former un acide désoxyribonucléique les nucléotides (GMP, AMP, TMP, CMP), sont condensés les uns sur les autres avec des liaisons phospho-diester entre le carbone 3' d'un premier nucléotide et le carbone 5' du nucléotide suivant. De sorte que ces liaisons définissent un sens à la molécule : le début étant le nucléotide dont le phosphate en 5' ne serait lié à aucun autre nucléotide et la fin correspond au nucléotide dont la fonction alcool en 3' n'est pas estérifiée (fig.3).

La structure secondaire du DNA est telle que les deux brins sont enroulés l'un autour de l'autre (fig.4). Chacun des deux brins est orienté (5'→3') dans le sens opposé à celui de l'autre brin (3'→5'). On dit qu'ils sont antiparallèles. Les bases azotées sont tournées vers l'intérieur de la double hélice de façon à ce que chacune s'hybride avec une base de l'autre brin (A avec T, C avec G, etc..). On dit que les bases successives de chacun des brins sont complémentaires. La double hélice a un « pas » de 3,4 nm c'est à dire qu'il y a environ 10 paires de nucléotides pour chaque tour d'hélice.

1-3- Organisation du Matériel génétique bactérien

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

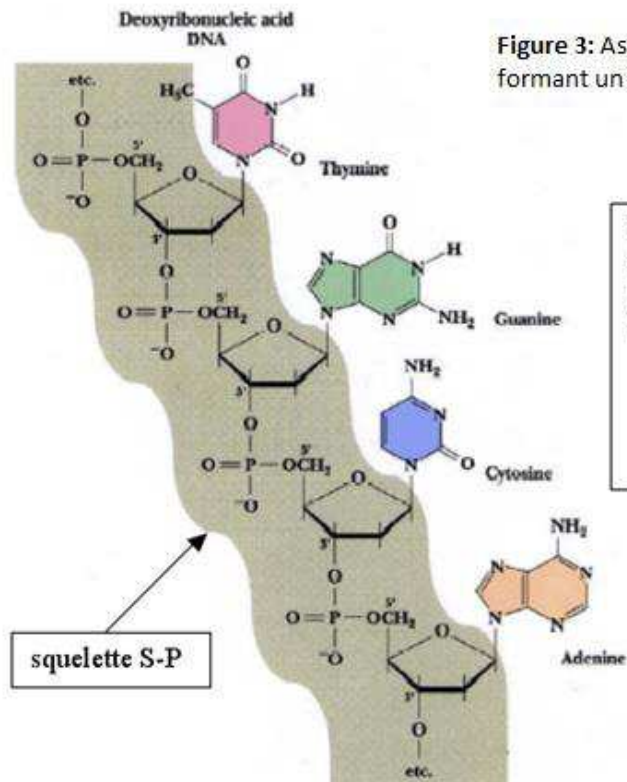


Figure 3: Association des nucléotides formant un brin d'ADN

La séquence de ce fragment est toujours donnée de 5' vers 3' (d'après les carbones du désoxyribose sur lesquels sont effectuées les liaisons)
(5'P) T G C A (3'OH)
ou encore
T G C A

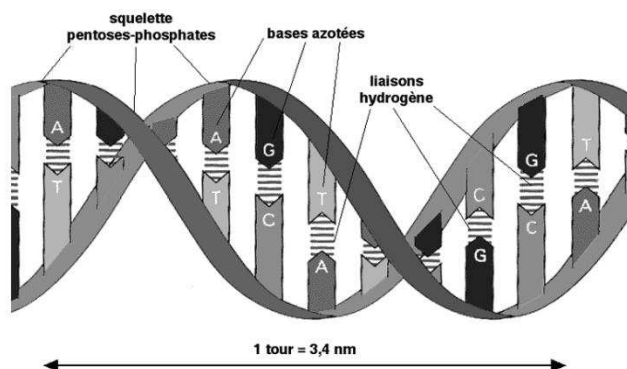


Figure 4 : Enroulement des brins d'ADN

1-3-1- Le chromosome bactérien est constitué d'acide désoxyribonucléique (ADN) dont les caractéristiques structurales sont bien connues. L'ADN bactérien est circulaire (nucléotide) Contient entre 1 000 000 et 4 500 000 paires de bases, 800 et 4300 gènes 0.1% du génome humain ; il peut exister sous trois formes (super-enroulée, relâchée, linéaire) objectivées par plusieurs techniques telle l'ultracentrifugation, la microscopie électronique ou tout simplement l'électrophorèse en gel d'agarose (fig.5).

Les deux chaînes ou alpha hélices sont maintenues entre elles (A-T, C-G) par les deux ou trois liaisons "hydrogène". Le chauffage permet leur séparation en brins monocaténaires = fusion ou dénaturation. Cette séparation est réversible (renaturation ou hybridation) selon le principe de la complémentarité des bases (A-T, C-G). Lors de la séparation, il y a augmentation de la DO à 260 nm (effet hyper-chromique), et celle-ci est fonction du nombre de paires GC. Il est possible de calculer un paramètre quantitatif (T_m). Ainsi la détermination du GC% est un critère taxonomique ou de classification des bactéries qui peut être calculé selon l'espèce bactérienne (fig.6). Il peut varier largement selon les groupes bactériens.

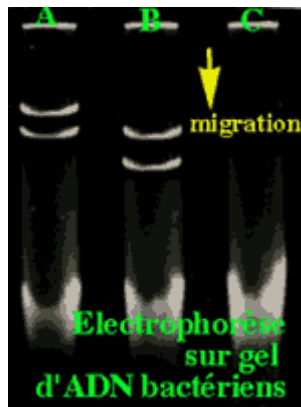


Figure 5 a : Electrophorèse d'ADN bactérien sur gel d'agarose.

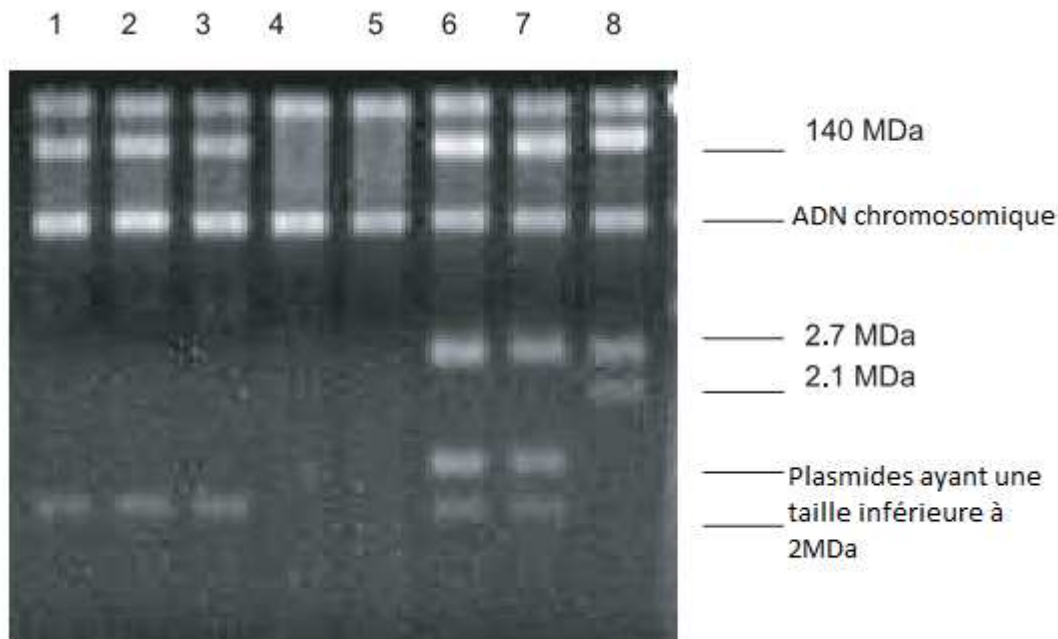
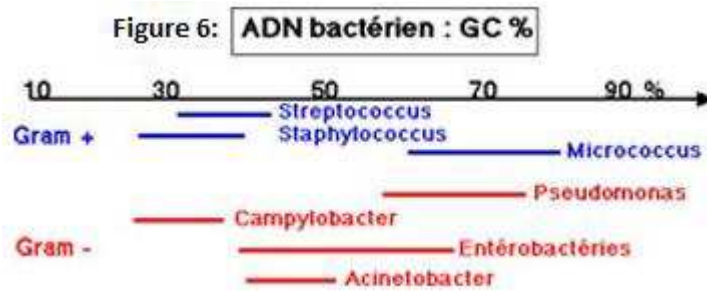


Figure 5b : Profils plasmidiques de cellules traitées et de type sauvages. Piste 1, 2, 3 - E. coli 212587 traitée par l'acridine orange (75µg / ml), **piste 4, 5** - E. Coli 208366 traitée par le bromure d'éthidium (125 pg / ml), **Piste 6** - E. coli 212587, piste 7 E. coli 208366 et **piste 8** E. coli PDK-9 marqueur de taille.

Le nucléoïde très condensé se trouve dans un pseudo compartiment qui se caractérise par l'absence de ribosomes Certains brins d'ADN s'étendent vers l'extérieur dans le cytoplasme comme une «boule de fils serrés. Ces extensions contiennent la majeure partie de l'ADN transcriptionnellement actif. Le chromosome est apparu comme une structure fortement repliée contenant presque tout l'ADN cellulaire, certaines protéines et ARN naissant.

Les images de microscopie Electronique du chromosome d'E. coli a révélé un noyau central à partir duquel 12400 boucles indépendantes (domaines de surenroulement, fig.7) ont été observées. La structure entière est apparue comme une rosette ininterrompue. Cette organisation est sensible à la RNase, suggérant que l'ARN est impliqué dans le maintien de la l'intégrité de la structure de base (Tous les domaines possèdent le même niveau de surenroulement).

Toutefois l'entaille de l'un des brins abolit le surenroulement dans ce domaine particulier uniquement, en laissant le reste du chromosome non affecté. Le chromosome est logé dans un petit espace à l'intérieur de la cellule ce qui nécessite son repliement. Un nuage d'ADN enroulé est généré au hasard avec un diamètre de $10\ \mu\text{m}$ * dans une bactérie, tel qu'*E. coli*. Sa subdivision en plusieurs boucles indépendantes de * 10 kb donne un autre niveau de compactage. C'est le surenroulement négatif des boucles par l'ADN topoisomérase qui réduit encore le diamètre du chromosome replié. Celle-ci empêche les brins de s'entremêler.

Le DNA a besoin d'être protégé par des protéines lorsqu'il n'est pas utilisé comme modèle pour l'expression des gènes ou la réplication. Cette protection se fait chez **les eucaryotes** par enroulement autour de protéines basiques (cationiques) capables de se lier avec le DNA qui est un polyanion. Des octamères d'histones sont au centre de particules qu'on trouve tous les 200 nucléotides et autour desquels le DNA s'enroule. La structure évoque un « collier de perles ». Des études récentes ont montré que les différentes régions de l'ADN bactérien ne sont pas seulement interconnectés mais aussi organisé dans l'espace par un complexe de maintenance de la structure (SMC). Ce SMC serre et maintient le chromosome dans un état compatible avec la réplication et la ségrégation de l'ADN.

Cependant, un des plus important composants pour la condensation de l'ADN bactérien est un groupe de protéines, qui peuvent modifier sa forme (compactage) et influencent ainsi sa transcription.

1-3-1-1- Les NAP " protéines associées au nucléoïde " : sont nombreuses et possèdent une activité de liaison à l'ADN et une capacité à modifier la trajectoire de la molécule d'ADN dans la cellule par pliage, emballage, ou pontage; mais aussi influent positivement ou négativement sur la transcription.

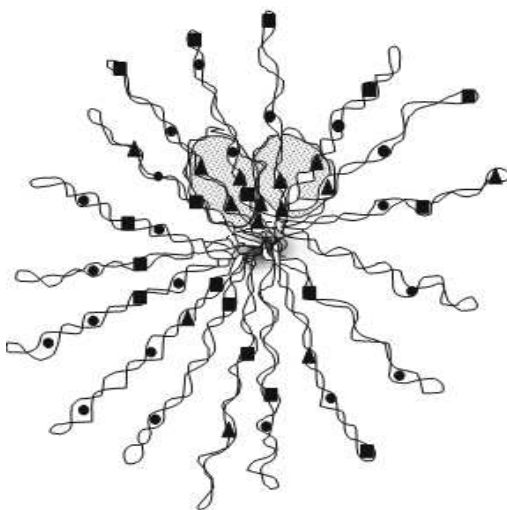


Figure 7 : Représentation schématique d'un chromosome super-enroulé avec les protéines associées au nucléoïde (NAP).

Le complexe de transcription polymérase au promoteur. ▲



complexe de l'ARN

Fis ■ H-NS ●

- (i) Certaines ont une propriété de marquage du début et de la fin d'un domaine chromosomique. Les protéines dotées d'activité de pontage d'ADN sont les plus aptes à la réalisation d'une telle fonction. C'est le cas de la **H-NS** (histone-like-nucleoid) protéine qui se lie à des régions riches en A-T dans le génome de *E. coli* et *Salmonella enterica*, sur des sites coïncidant avec les extrémités d'un domaine donné.

- (ii) Fis: " facteur de stimulation de l'inversion, est une protéine abondante au début de la phase exponentielle de croissance, pour former des ponts ADN-protéine-ADN. Les sites de liaison potentiels pour Fis, sont constitués d'une séquence consensus, de 17 pb riches en AT.

Fis se lie à ces sites en tant qu'homodimère et (introduit) des coudes dans l'ADN. Ces protéines contribuent à de nombreuses activités cellulaires, tels que la transcription, la réplication et la recombinaison.

- (iii) HU, une autre classe de NAP, constituée de deux sous-unités HU α et HU β . Les interactions HU-DNA ne sont pas spécifiques, mais la protéine a une préférence pour les régions déformées de l'ADN, tels: les repliements ou les jonctions à quatre voies. HU joue un rôle important dans la recombinaison, la topologie de l'ADN et la gestion de l'expression génique. Cette protéine interagit avec la topoisomérase I qui peut conduire à une altération dans de superhelicité de l'ADN, et peut être impliqué à la fois dans la structure du nucléoïde et l'expression des gènes. Elle forme des multimères octamérique ayant le potentiel de former des filaments en spirale autour desquels L'ADN est surenroulé négativement. Enfin, HU contribue aussi à la flexibilité de l'ADN en courbant le duplex, pour faciliter la formation de la boucle d'ADN.
- (iv) Le facteur d'intégration de l'hôte (IHF), initialement identifié comme cofacteur dans la recombinaison à site spécifique du phage λ . Cette protéine est étroitement liée à HU du point de vue séquence d'acides aminés, mais se lie à une séquence nucléotidique bien conservée. Sa liaison au site introduit un demi-tour dans l'ADN, et aide dans le remodelage de l'ADN à un niveau local. IHF influence la transcription globale, la réplication du chromosome, et sert en tant qu'élément du site- spécifique du système de recombinaison, affectant ainsi la transposition.

Le nucléoïde compact occupe le centre de la cellule procaryote, avec les ARN polymérases (RNAPs) sur sa périphérie, et les ribosomes refoulés vers les bords où ils interagissent avec la membrane plasmique intérieure. Le degré de condensation dépend également de la phase de croissance, avec le plus haut niveau de compactage pendant une croissance rapide, par rapport à une croissance sous des conditions limitantes. A l'état primaire, RNAP sont concentrés dans les foyers de la transcription, alors que sous croissance réduite elles sont réparties dans le chromosome. Ceci suggère qu'une corrélation étroite existe entre la structure du nucléoïde et l'organisation du génome. Cela se produit par l'intermédiaire de la distribution de gènes hautement exprimés et dont la transcription affecterait le surenroulement.

1-3-2- Les plasmides

Les bactéries contiennent souvent un ou plusieurs plasmides, qui sont des molécules d'ADN extra-chromosomique. Ces plasmides peuvent conférer certains avantages aux bactéries, comme la résistance à des antibiotiques ou des métaux, ou pour la production d'antibiotiques, de pigments, ou peut fournir des capacités cataboliques inhabituelles comme des facteurs de virulence (toxines), fertilité, etc. Ils peuvent également induire des tumeurs végétales, et d'autres réponses symbiotiques et pathogènes chez les plantes et les animaux.

Parfois, les bactéries peuvent partager les plasmides avec différentes espèces bactériennes (transfert horizontal de gènes). Ces plasmides sont dits conjugatifs (permettent la conjugaison), sont généralement grands et ont en plus des gènes nécessaires pour la répllication autonome des gènes de transfert d'ADN au receveur (ex : gènes du pilus sexuel : F). Mais peuvent être non-conjugatifs (ne peuvent pas médier la conjugaison), sont généralement plus petits et il leur manque un ou plusieurs gènes nécessaires au transfert d'ADN.

Les Plasmides ont souvent été assimilés avec des organismes. Ainsi, un organisme " est l'élément unitaire d'une lignée continue avec histoire de l'évolution individuelle ". Cette définition s'applique aussi pour les virus, et certains transposons, qui appartiennent tous à une famille d'organismes primitifs. La caractéristique commune entre ces unités est leur répllication, leur maintenance et leur diffusion. Les plasmides se répliquent indépendamment du chromosome.

Les Plasmides ont ainsi joué un rôle significatif dans l'évolution bactérienne ; en effet une cellule contenant le plasmide peut avoir un avantage adaptatif sur celles sans plasmide. Au cours des dernières années, leur signification a considérablement augmenté en raison de leur application dans la recherche en génie- génétique en tant que porteur de la molécule étrangère (recombinant ADN). Une cellule bactérienne peut ou non comporter un ou plusieurs copies d'un même type de plasmide ou des plasmides différents.

La plupart des plasmides sont des fragments d'ADN fermés de manière covalente circulaire (ccc), dont la taille varie de quelques milliers à des centaines de milliers de paires de bases. Ceux-ci se trouvent dans une cellule surenroulé négativement. Sont appelés épisomes. Le caractère distinctif, la nature de répllication autonome suggère qu'un plasmide peut être essentiellement assimilé à un réplicon et doit coder pour une partie ou plusieurs fonctions requises pour sa répllication. Pour être autonome, ils doivent avoir au moins une origine de répllication (Ori), un site en *cis*, et code également pour des protéines spécifiques nécessaires à la reconnaissance du site *ori* et l'initiation de la répllication. Le gène *rep* porté par le plasmide, code une protéine (Rep) spécifique de l'initiation de la répllication agissant en *trans*.

Dans certains plasmides linéaires, comme chez *Borrelia burgdorferi*, les extrémités peuvent porter des séquences de télomères-like, ces extrémités de l'ADN peuvent être répétées et peut même être jointe de manière covalente les unes aux autres. De même, chez *Streptomyces*, les extrémités plasmidiques peuvent être liées à une protéine.

1-4- Matériel génétique viral

A la différence des génomes de toutes les cellules, qui sont composés d'ADN, les génomes de virus peuvent être codés dans l'ADN ou l'ARN. Le génome peut être simple ou double brin; comme il peut être linéaire, circulaire, ou segmenté. Les virus simple brin peuvent être soit de sens positif (+) (même polarité que la séquence nucléotidique de l'ARNm), sens négatif (-), ou ambisens (un mélange des deux) génomes. Les Virus varient en taille environ 3500 nucléotides (les bactériophages de la famille Leviviridae, comme MS2 et Qb) à environ 1,2 million de pb (Nt 2.400.000), comme le Mimivirus: plus grand que le plus petit génome bactérien (mycoplasme).

1-5-Extraction et purification de l'ADN plasmidique

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

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

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

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

b-Curage des plasmides

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

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

Exemple : Provoquer la perte d'un plasmide de résistance aux antibiotiques par culture de la souche en présence d'un agent curant utilisé à une concentration sub-inhibitrice (proche de la CMI).

1^{ere} étape Désorganisation des membranes

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

2^{ème} étape Précipitation des protéines en utilisant un agent chaotrope

Un sel (acétate de sodium) modifie la solubilité des molécules protéiques ou des acides nucléiques, et provoque leur précipitation. Soit :

- par Neutralisation de certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité.
- Interférer dans les interactions que les protéines établissent avec l'eau et modifier la solubilité des protéines.

Electrophorèse sur gel d'agarose et visualisation de l'ADN plasmidique

Physiquement, les plasmides peuvent être détectés par électrophorèse sur gel d'agarose soit d'un lysat acellulaire brut ou d'une préparation purifiée. La séparation est basée sur les différences de mobilité sur gel relativement des molécules d'ADN fermées circulaires (ccc) de manière covalente plus petite, tel que la majorité des plasmides , par rapport aux fragments linéaires du chromosome générés lors de la préparation (fig. 5b).

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

2-1- MUTATIONS

Une mutation introduit une modification dans l'information génétique, dans le génotype d'une cellule : elle est transmissible à sa descendance. Les mutations sont des événements très rares. Une mutation peut toucher au hasard n'importe quel gène, de n'importe quelle cellule, à n'importe quel moment. C'est un événement aléatoire. Pour un organisme, les conséquences d'une mutation seront différentes selon le type cellulaire qui est affecté. Si une mutation survient dans une cellule somatique, cela peut parfois déclencher le développement d'une tumeur cancéreuse. Si c'est une cellule germinale qui est touchée, l'individu lui-même ne sera pas affecté mais certains de ses descendants pourront l'être. Chez l'homme, une telle mutation peut ainsi être à l'origine d'une maladie génétique, héréditaire, la copie défectueuse du gène étant ensuite transmise de génération en génération

2-2- Définition : Une mutation est une modification (changement permanent) héréditaire dans la séquence nucléotidique du matériel génétique (dans le génome d'une cellule eucaryote ou procaryote ou d'un virus), qui peut engendrer des modifications phénotypiques. C'est donc une modification de la séquence de l'ADN, ou bien dans l'ARN pour un virus à ARN. C'est l'une des causes principales de l'évolution des espèces.

Elle est consécutive à :

Une erreur survenue dans la reproduction conforme au cours de la réplication de l'ADN ;

Ou bien une instabilité des bases nucléiques (tautomères) ou des liaisons N-glycosidiques ;

Ou encore des lésions diverses provoquées par des agents chimiques ou physiques.

2-3- Caractères des mutations

Les mutations se caractérisent par leurs : spontanéité, rareté, discontinuité, stabilité, spécificité et indépendance. Les mutations peuvent survenir dans des conditions physiologiques normales ce sont des mutations naturelles ; comme elles peuvent survenir sous l'influence de facteurs externes (physiques, chimiques.....) on parlera alors de mutations induites.

3-1- Spontanéité

Lederberg (1952 ; fig.8A), a mis en évidence le caractère spontané de la mutation en cultivant par réplique velours (Fig.8B) les bactéries sur un milieu contenant un antibiotique (un moyen sélectif), où il avait démontré que la mutation précède la sélection.

3-2-Discontinuité (brusque)

La mutation s'effectue habituellement en une seule étape (loi du tout ou rien).

Il existe, cependant des mutations pleitropes qui affectent plusieurs gènes successivement. Un opéron (ensemble de gènes qui fonctionnent ensemble) et qui se traduisent par l'apparition d'un seul caractère (exemple : résistance de haut niveau à un antibiotique qui apparaît suite à des mutations successives au niveau de plusieurs gènes).

3-3- Rareté

La mutation est un phénomène rare qui n'affecte qu'une faible proportion de l'ensemble de la population bactérienne. C'est la probabilité d'apparition d'une mutation dans un intervalle de temps compris entre 2 divisions. Il varie entre 10^{-3} et 10^{-20} selon le caractère considéré et la bactérie.

NB : Il ne faut pas confondre le taux de la mutation et le taux des mutants qui varie dans le temps. Plus la population est importante plus la probabilité d'observer une mutation donnée est grande.

3-4- Stabilité

Le caractère acquis est alors transmissible à la descendance, donc héréditaire même en l'absence de **l'agent sélecteur** qui ne fait que **révéler** la mutation.. La stabilité n'exclut cependant pas la réversibilité de la mutation. La mutation reverse présente les mêmes caractères que la première mutation.

3-5- Indépendance et spécificité

La mutation n'affecte habituellement qu'un seul caractère. La mutation d'un caractère donné **ne modifie pas la probabilité** de mutation d'un autre caractère. **Il y'a indépendance des mutations.** Il en résulte que la probabilité qu'une bactérie mute pour deux caractères en même temps est égale au produit des deux probabilités individuelles. **Exemple : Si** la probabilité de la mutation de **Mycobacterium tuberculosis** à la streptomycine = 10^{-6} et celle à l'isoniazide = 10^{-6} , la probabilité de la mutation **double** aux deux anti-tuberculeux à la fois sera = 10^{-12} .

2-4- Mécanismes de la mutation

Tout changement dans la séquence nucléotidique d'un gène constitue une mutation (Tableau 2). Ce changement peut se faire :

*soit par **substitution** (échange) d'une paire de bases par une autre paire de bases, cette mutation survient dans des points on parlera de mutation **ponctuelles**.

*soit par **cassure** de l'ossature sucre-phosphate de la molécule d'ADN avec perte, addition ou inversion de séquences d'ADN entre les deux cassures.

2-4-1- Substitutions

La substitution est le remplacement d'un nucléotide par un autre dans la structure primaire de l'acide nucléique. Une substitution peut aboutir à des résultats très différents après la traduction. Cela dépend de sa position par rapport au cadre de lecture. Les transversions résultant de la substitution d'un nucléotide par un autre d'une autre famille chimique (Purine \leftrightarrow pyrimidine) ; causent plus de mutations que les transitions. En effet, ces dernières résultent de la substitution d'un nucléotide par un autre mais de la même famille chimique (purine \leftrightarrow purine ou pyrimidine \leftrightarrow pyrimidine).

Une substitution dans un codon peut se traduire par le même acide aminé : on dit qu'elle est **synonyme** (dégénérescence du code génétique). Lorsque l'acide aminé est différent : on dit qu'elle est **non-synonyme** ou **faux-sens**. Si l'acide aminé est remplacé par un acide aminé appartenant à la même famille chimique on parlera de mutation **faux sens conservative**, par contre si l'acide aminé est différent on parlera de **faux-sens non conservative**. Elle sera d'autant plus délétère pour les fonctions de la protéine que le nouvel acide aminé sera différent de celui qui aurait dû être traduit. Comme elle peut se traduire par un codon de terminaison : on dit qu'elle est **non-sens**. La protéine traduite sera tronquée à cet endroit.

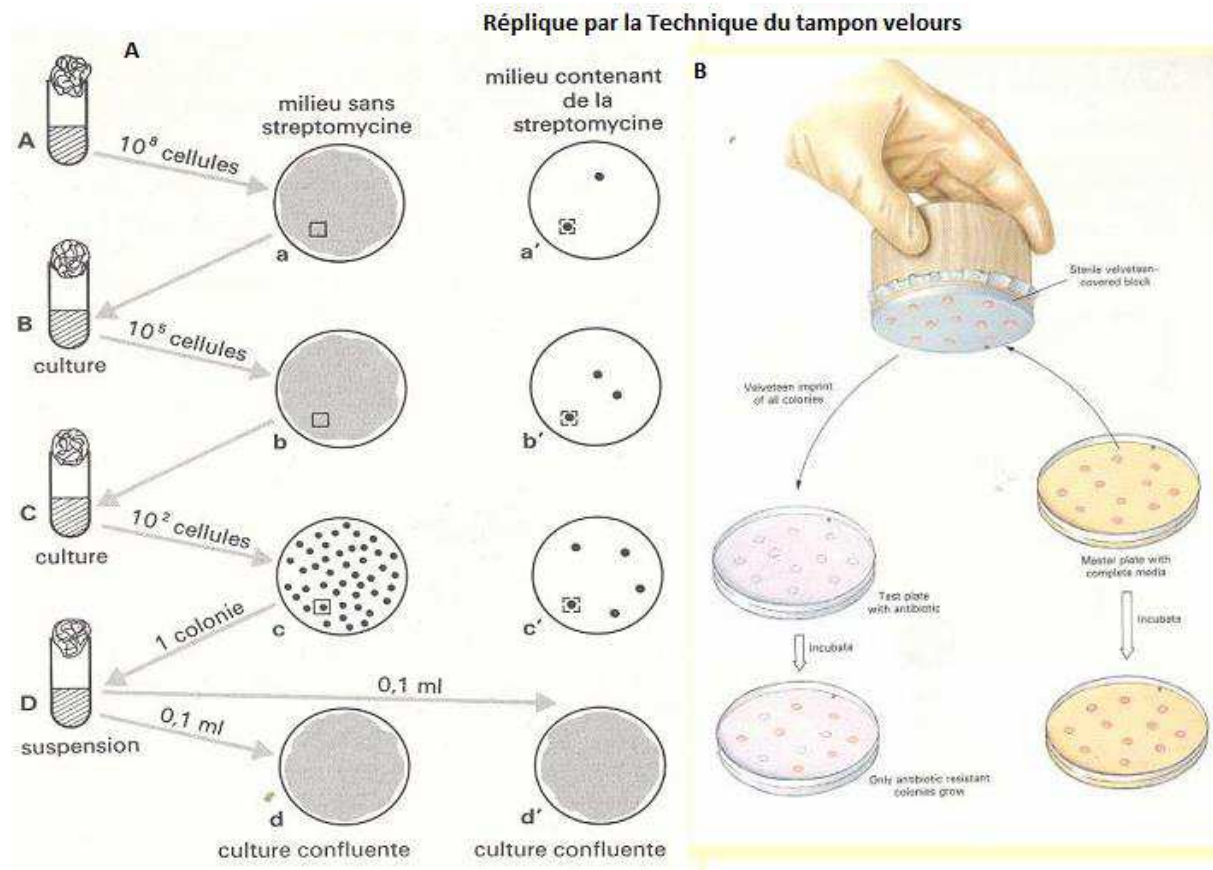


Figure 8 : Expérience de Lederberg (1952) **(A)** démontrant le caractère spontané et stable de la mutation, en utilisant **(B)** la réplique par tampon velours. NB : pas de contact entre les bactéries et l'antibiotique : **la mutation précède la sélection.**

2-4-2- Délétions et Insertions

Les délétions et insertions sont respectivement la suppression ou l'addition de nucléotides dans la séquence primaire d'un acide nucléique. Ces mutations sont d'importance variable selon leurs longueurs. Lorsqu'il s'agit de 1 ou 2 nucléotides, elles décalent le cadre de lecture (frame-shift). Quand elles atteignent 3 nucléotides, elles aboutissent à la suppression (délétion) ou à une addition (insertion) d'un acide aminé dans la protéine exprimée. Lorsqu'elles sont plus longues, elles peuvent supprimer l'expression d'une ou de plusieurs protéines, voire la fonction d'un gène entier (Ces délétions et insertions ne sont pas réversibles).

2-4-3- Transposition

Les transpositions résultent de l'incorporation d'acides nucléiques synthétisés hors du génome, par une transposase qui incorpore ces acides nucléiques dans le génome de la cellule, ce qui augmente les chances de produire des caractères nouveaux. Ces acides nucléiques peuvent être :

- (i) des segments d'ADN codant pour une résistance aux antibiotiques (exemple Tn5) ou aux métaux lourds , ces transposons sont largement utilisés pour la mutagenèse *in vitro*.
- (ii) incorporation d'ADN viral,

2-5- Types de Mutations

Les mutations peuvent être naturelles ou induites. Les premières surviennent naturellement dans la cellule, en l'absence de toute induction externe. Alors que, les mutations induites surviennent suite à une induction (stimulation) externe, sous l'influence de facteurs environnementaux, physiques ou chimiques.

2-5-1- Mutations naturelles : Les modifications des bases peuvent entraîner des mutations.

* **Les Tautomères :** Les mutations spontanées apparaissent suite aux erreurs de la réplication de l'ADN. En effet, des formes de tautomères rares sont à l'origine de ces mutations. Le passage des bases de la forme **amino** à la forme tautomère **imino**, et de la forme **ceto** à la forme **enol**. Ces mutations n'apparaîtront qu'après deux cycles réplicatifs. Exemple, une guanine sous une forme enol s'apparie incorrectement avec une thymine (1^{er} cycle, fig.9), si ce mésappariement n'est pas corrigé au cours du cycle suivant (2nd cycle) ce mésappariement aboutira à une **transition** GC/AT.

* **Désamination spontanée :** certaines bases sont spontanément désaminées c'est le cas de l'adénine qui est désaminée en hypo-xanthine, cette dernière s'apparie préférentiellement avec la cytosine.

* Dans des conditions physiologiques des bases se détachent et il se forme alors des sites AP: **(i) Apuriniques** qui s'appariera incorrectement ; **(ii) Apyrimidique** suite à la désamination de la cytosine en uracile qui sera ensuite éliminé. Les systèmes de réparation introduisent des erreurs en comblant les vides retrouvés (le plus souvent ces systèmes comblent le vide par une purine).

* **Les formes réactives d'oxygène** (les radicaux superoxydes ($O_2 \cdot^-$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et les radicaux hydroxyles ($\cdot OH$), sont des sous-produits du métabolisme aérobie) qui altèrent les bases d'ADN en provoquant leurs oxydation. La thymine est convertie en Thymidine-glycol et la guanine est convertie en 8-oxo-7,8-dihydro-deoxyguanine (GO), qui s'apparie incorrectement. Cette dernière s'apparie préférentiellement avec l'adénine durant la réplication, aboutissant ainsi à une **transversion (G : T)**.

2-5-2- Mutation Induite Le taux de mutation peut être augmenté par l'action de produits mutagènes : génotoxiques. Tels que (i) certaines substances chimiques comme les analogues des bases; (ii) des agents physiques (rayons UV, X)

a-Mutagènes chimiques

* **Désamination** De nombreux agents chimiques interagissent avec l'ADN de manière à produire des altérations de sa séquence. Parmi ceux-ci, les agents qui agissent en modifiant chimiquement une des bases de l'ADN. Par exemple, d'acide nitreux provoque une désamination oxydative dans laquelle les groupes amino sont convertis en groupes cétoniques ; les résidus cytosine sont ainsi convertis en 5méthyl cytosine (uracile) qui s'apparie à l'adénine plutôt que la guanine. De même la désamination des adénines en hypoxanthines qui sont préférentiellement complémentaires de la Cytosine plutôt que de la Thymine (fig.10).

* **Analogues des bases** certains analogues de base sont aussi à l'origine de mésappariement. Ainsi le 5bromo-uracile, un analogue de la cytosine s'hybride préférentiellement à l'Adénine ; et le 2amino-purine un analogue de l'adénine s'apparie avec la cytosine.

Tableau 2: Mutations ponctuelles au niveau moléculaire

Type of mutation	Result and examples
<u>At DNA level</u>	
Transition	Purine replaced by a different purine, or pyrimidine replaced by a different pyrimidine: $A \cdot T \rightarrow G \cdot C \rightarrow G \cdot C \rightarrow A \cdot T$ $C \cdot G \rightarrow T \cdot A$ $T \cdot A \rightarrow C \cdot G$
Transversion	Purine replaced by a pyrimidine, or pyrimidine replaced by a purine: $A \cdot T \rightarrow C \cdot G$ $A \cdot T \rightarrow T \cdot A$ $G \cdot C \rightarrow T \cdot A$ $G \cdot C \rightarrow C \cdot G$ $T \cdot A \rightarrow G \cdot C$ $T \cdot A \rightarrow A \cdot T$ $C \cdot G \rightarrow A \cdot T$ $C \cdot G \rightarrow G \cdot C$
insertion /deletion	Addition or deletion of one or more base pairs of DNA (inserted or deleted bases are underlined): $AAGACTCCT \rightarrow AAGAGCTCCT$ $AAGACTCCT \rightarrow AAACTCCT$
<u>At protein level</u>	
Synonymous mutation	Codons specify the same amino acid: $AGG \rightarrow CGG$ Arg Arg
mutation Faux sens	Codon specifies a different amino acid
Conservative :	Codon specifies chemically similar amino acid: $AAA \rightarrow AGA$ Lys Arg (basic) (basic)
Nonconservative	Does not alter protein function in many cases Codon specifies chemically dissimilar amino acid: $UUU \rightarrow UCU$ Hydrophobic Polar phenylalanine serine
Nonsense mutation	Codon signals chain termination: $CAG \rightarrow UAG$ Gln Amber termination codon
Frameshift mutation	One base-pair addition (underlined) $AAG \text{ ACT CCT} \rightarrow AAG \text{ AGC TCC T...$ One base-pair deletion (underlined) $AAG \text{ ACT CCT} \rightarrow AAA \text{ CTC CT...}$

***Les agents alkylants** les agents qui réagissent avec les bases en ajoutant des radicaux alkyles tels que : EMS (éthyle méthane sulfonate), la 2-méthyl nitrosamine la nitroso-guanidine ou le gaz moutarde ; les bases nucléotidiques s'apparient alors incorrectement. L'O6 méthyle-guanine s'apparie alors avec la thymine au lieu de s'apparier avec la cytosine.

***Agents intercalant** ces agents sont des molécules planes qui s'intercalent entre les bases créant des déformations qui peuvent causer des délétions ou insertions aboutissant à des décalages du cadre de lecture. C'est le cas de l'acridine orange, du bromure d'éthidium, et de l'actinomycine D.

*Mutagènes physiques

La chaleur engendre des réactions d'hydrolyse des bases, surtout des purines, aboutissant à des sites **AP** ou des sites apuriques (sans purines).

Les rayonnements sont aussi à l'origine de certaines lésions qui affectent la molécule d'ADN :

- les rayons UV sont à l'origine de mutations résultant de liaisons anormales (covalentes) entre les bases de pyrimidines voisines ou adjacentes (sur le même brin), comme les dimères de thymine (fig11).
- les rayons X en interagissant avec l'ADN donnent naissance à des radicaux libres (molécules d'oxygène réactives) qui peuvent rompre la double hélice.

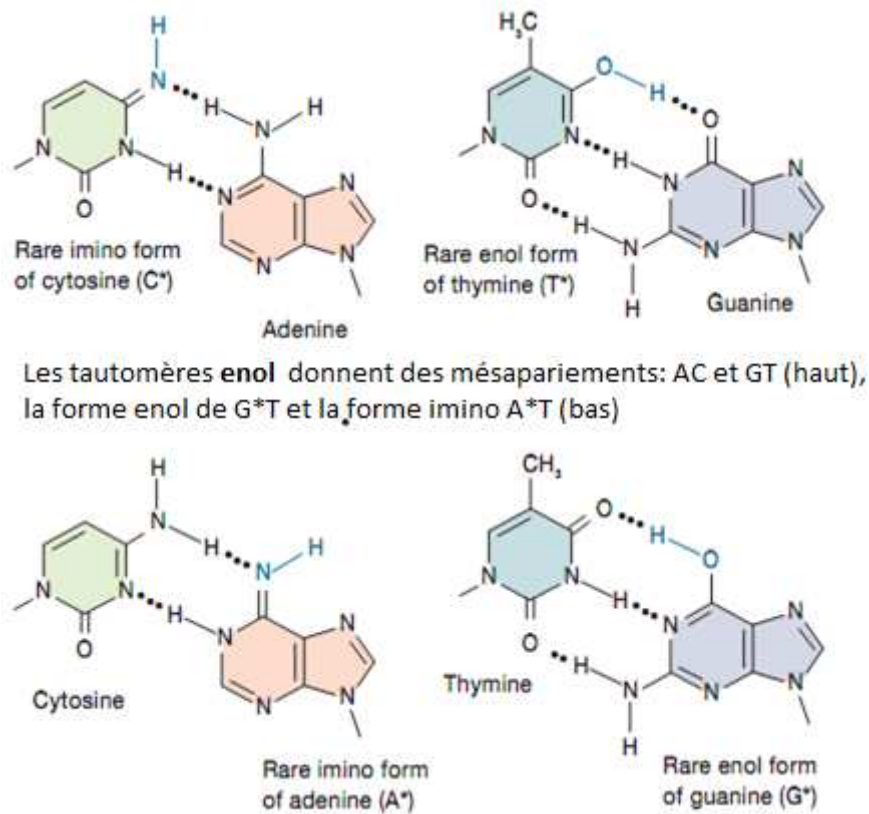


Figure 9 : Mésappariements du aux formes tautomères des bases.

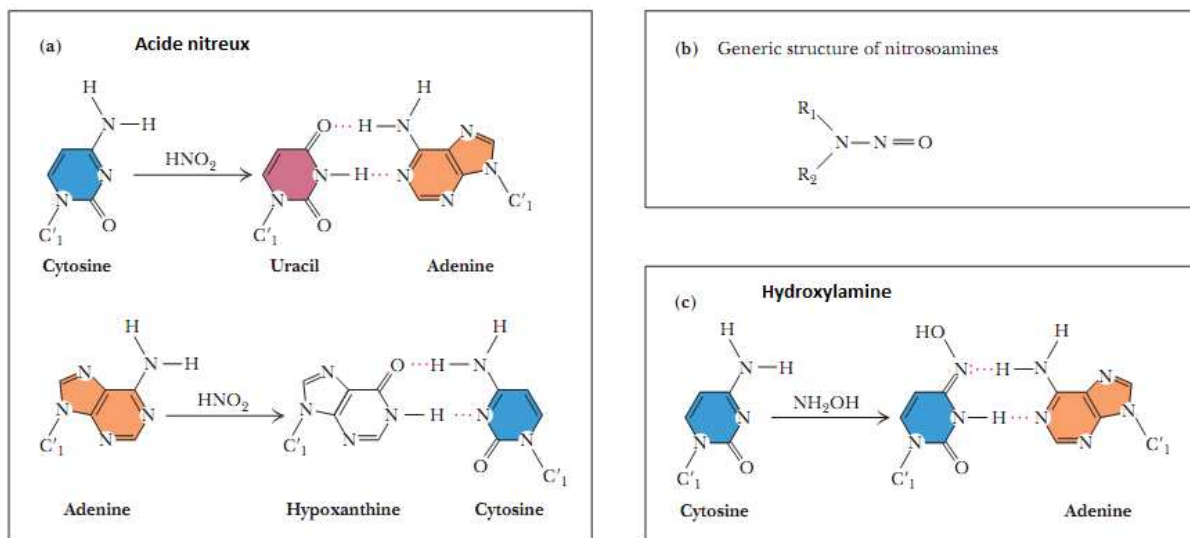


Figure 10 : Mésappariements dus à la désamination des bases par des substances chimiques.

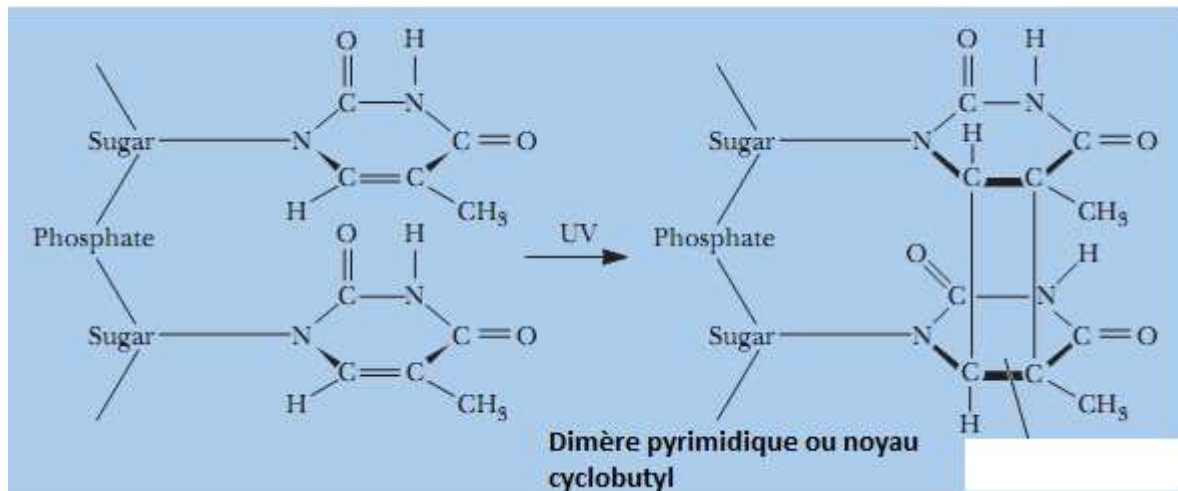


Figure 11 : Formation de dimère pyrimidique (noyau cyclo-butyle) sous l'action des UV.

2-2- MECANISMES DE REPARATION DES MUTATIONS

L'ADN est continuellement soumis à des modifications qui atteignent son intégrité. Le nombre de lésion par jour et par cellule est compris entre 1000<lésions<1000000. À titre d'exemple, une cellule de mammifères perd spontanément environ 10.000 purines de son ADN dans une période cellulaire de 20 heures à 37 ° C.

Ces modifications peuvent survenir dans des conditions physiologiques normales telles que la tautomérisation, la dépurination (pertes spontanées de bases puriques) et la déamination. À des facteurs physiques environnementaux tels que les radiations UV, rayonnements ionisant X ou gamma ; ou encore chimiques tels les agents alkylants, les acides et autres agents mutagènes.....

Les mécanismes de réparation de l'ADN regroupent un ensemble de phénomènes que toute cellule (eucaryote ou procaryote) met en œuvre pour identifier (reconnaitre) et corriger les dommages de son ADN génomique. La faible fréquence de mutations spontanées est indicative de l'efficacité de ces systèmes réparations.

La vitesse et le taux de réparation de l'ADN dépend de nombreux facteurs, comme le type de cellules, l'âge de la cellule et l'environnement extracellulaire. Une cellule qui a accumulé une grande quantité de dommage sur son ADN, ou une cellule qui n'est plus capable d'effectuer efficacement les réparations des dommages subis sur son ADN, peut entrer dans l'un des trois états suivants :

- un état de dormance irréversible, connu sous le nom de sénescence
- une apoptose ou mort cellulaire programmée
- une division cellulaire non contrôlée qui va conduire à la formation d'une tumeur cancéreuse.

La capacité de réparation de l'ADN d'une cellule est donc essentielle à son fonctionnement normal.

Remarque : de nombreux gènes impliqués dans les mécanismes de réparation ont été identifiés (souvent appelés gènes mutateurs), On appelle gène mutateur : gène dont la fonction normale est d'éviter les erreurs d'où un phénotype dit « mutateur » quand ils sont mutés.

Parfois ces systèmes de réparation introduisent des erreurs afin de préserver la vie de la cellule, c'est le cas du système SOS ou du NHEJ. Toute fois la plupart des systèmes réparent fidèlement ces erreurs c'est le cas des :

- La voie qui répare chimiquement les dégâts de la base d'ADN (1).

- La voie qui coupe (élimine) la portion d'ADN endommagé et utilise une séquence complémentaire en tant que modèle pour restaurer la séquence normale (2).

2-2-1-Réversion directe (retour à l'état antérieur)

La manière la plus rapide de corriger une lésion est de l'inverser, régénérant ainsi la base d'origine. Toutefois, certaines lésions sont tout simplement irréversibles. Cependant, un petit nombre de lésions peuvent être réparées par une réversion directe.

2-2-1-1-Réparation des photodimères pyrimidiques par photo réactivation

Le photodimère Pyrimidine cyclobutane peut être réparé par une photolyase. L'enzyme se lie à la photodimère et coupe les liaisons covalentes entre les bases adjacentes, en présence de certaines longueurs d'onde de la lumière visible, pour régénérer les bases d'origine. Ce mécanisme est aussi appelé photoréparation ou photoréactivation car la photolyase ne peut pas fonctionner dans l'obscurité, et ainsi d'autres voies de réparation sont nécessaires pour éliminer les dommages dus aux UV en l'absence de lumière visible, mais aussi les lésions plus importantes.

2-2-1-2- Alkyltransférases

Les Alkyl transférases sont également des enzymes qui inversent directement les lésions. Ces enzymes éliminent certains groupes alkyles qui ont été ajoutés aux positions O-6 de la guanine par des substances mutagènes telles que la nitrosoguanidine et l'éthyl-méthanesulfonate (EMS). Cette enzyme (ici une O6-méthyle-guanine-méthyle-transférase ou **MGMT**) transfère le groupe méthyle de l'O-6-méthyle-guanine à un résidu cystéine situé sur la protéine. Cependant, ce transfert inactive l'enzyme, de sorte que ce système de réparation peut être rapidement saturé si le niveau d'alkylation est suffisamment élevée.

2-2-2- Systèmes dépendant d'homologies pour la réparation

Ces systèmes de réparation exploitent les propriétés de complémentarité antiparallèle pour restaurer les segments d'ADN endommagés. D'où leur appellation **systèmes de réparation homologie-dépendante**. Dans ces systèmes, un segment d'une chaîne d'ADN est éliminé et remplacé par un segment nucléotidique nouvellement synthétisé complémentaire au brin modèle. Ces systèmes assurent une réparation avec une grande fidélité (cette réparation est exempt d'erreurs). Il existe deux systèmes de réparation homologie dépendante qui ne sont pas sujet à erreur. Un système (réparation par excision : exemple le **BER**) de réparation des dommages qui sont détectés avant la réplication. L'autre (post réplcatif) système de réparation des dommages détectés au cours ou après la réplication.

2-2-2-1- Voies de réparation par Excision

À la différence des mécanismes précédents ces mécanismes enlèvent et remplacent les bases nucléotidiques.

2-1-1 Excision et réparation des bases

* Correction d'épreuves Les systèmes de réparation de l'ADN agissent tout au long de l'interphase, et notamment en phase G2 pour contrôler les possibles erreurs de réplication. Ces systèmes permettent de réparer l'ADN, ou de détruire la cellule si la mutation n'est pas réparable. De nombreuses ADN-polymérases possèdent une activité exonucléase capable de limiter les mésappariements. Cette activité intervient directement lors de la polymérisation : correction d'épreuves ou PROOF READING. Les enzymes ont donc deux ou trois activités :

- (i) polymérise dans le sens 5' vers 3'
- (ii) exonucléase dans le sens 3' vers 5' (**proof reading**)
- (iii) mais aussi exonucléase dans les sens 5' vers 3'

(i) Grace à cette activité, l'ADN pol I permet une réplication vingt fois plus conservative. Alors que l'ADN pol3 réduit par mille le même type d'erreurs.

(ii) L'activité 3'-exonuclease élimine les nucléotides de l'extrémité 3' de la chaîne polymérisée, dans le sens opposé de l'activité polymérase. L'activité 3'-exonuclease est relativement lente par rapport à la polymérisation, mais la polymérase ne peut pas allonger improprement, c'est ce qui permet relativement à la 3' exonuclease d'agir et d'éliminer le nucléotide mésapparié. Ainsi le site actif de la polymérase joue le rôle de relecteur (**proof-reader**), et l'activité 3'-exonuclease est l'**éditeur**.

(iii) L'activité 5'-exonuclease de l'ADN polymérase I agit sur le duplex DNA, le dégradant de l'extrémité 5'-en libérant des mono nucléotides et des oligo nucléotides. Cette activité peut éliminer des segments mésappariés (distordus) présents dans la voie d'avancement de la polymérase

*Réparation par excision de bases est réalisée par des ADN glycosylases qui clivent les liaisons entre la base et le sucre, libérant ainsi les bases **modifiées** (par déamination, alkylation.... ; à partir de **A**, fig.12), et générant des sites AP (apurinique ou apyrimidiques). C'est alors qu'une autre enzyme : AP endonucléase coupe alors la liaison entre le sucre et le phosphate au niveau du site AP dans l'ossature d'ADN. Une deoxyribo-phosphodiesterase (exonucléase), élimine les nucléotides voisins en éliminant les sucres et les phosphates associés. L'ADN polymérase peut alors combler les vides par des nucléotides complémentaires à l'autre brin. L'ADN ligase scelle alors le nouveau nucléotide dans le squelette (Fig. 12). De nombreuses ADN glycosylases existent. L'uracile- ADN glycosylase, supprime les résidus uracile à partir de l'ADN. Les sites AP qui apparaissent suite à la perte de bases sont aussi corrigés par cette voie (à partir de **B**, fig.12).

Exemple de substance donnant naissance à un site AP : L'Aflatoxine B1 (AFB1) est un puissant cancérigène originalement isolé à partir d'arachides infectées par *Aspergillus*. L'Aflatoxine se fixe à la guanine en position N-7 (fig.13). La formation de ce produit d'addition conduit à la rupture de la liaison entre la base et le sucre, libérant ainsi la base et résultant en une Site apurinique (Figure 12-B). Des études sur des sites apuriniques générés *in vitro* ont démontré que la réparation par le système SOS (by-pass) conduit souvent à l'insertion d'un résidu adénine dans le site apurinique (AP). C'est ainsi que tout agent impliquant la dépurination au niveau des résidus de guanine devrait donner des transversions G · C: T · A.

*Système BER (nucleotide excision repair) ou excision re-synthèse

Le système précédent ne répare que lorsque les bases sont modifiées et fait intervenir des glycosylases spécifiques. Cependant, il y aurait plus de dommages que de glycosylases. D'autres systèmes réparent les dommages où les glycosylases ne peuvent intervenir. Plutôt que de reconnaître une base particulière endommagée, le système BER ou NER détecte les **déformations** de la double hélice provoquées par la pression d'une base anormale.

Les mutations donnant ces déformations comprennent les dimères de pyrimidine provoqués par la lumière UV (qui n'ont pas été corrigés par inversion directe), les résidus alkylés (non corrigés), l'ajout d'une aflatoxine à un résidu Guanine (qui n'a pas été corrigé par le système précédent).....ainsi que toute déformation provoquée par des composés intercalants..... Où la détection d'une déformation initie un processus de réparation se déroulant en plusieurs étapes et impliquant de nombreuses protéines (fig.14). Chez *E. coli*, ce complexe est composé de trois activités enzymatiques codées par les gènes *uvrABC*, détecte la déformation et coupe la partie endommagée dans deux sites de part et d'autre de la lésion.

L'*uvrABC* exonuclease, excise (coupe ou élimine) précisément 12 nucléotides : 8 nucléotides d'un côté du dommage et 4 de l'autre côté (chez l'homme entre 27 à 30 nucléotides sont éliminés par un système similaire). L'écart de 12 nucléotides est ensuite comblé par l'ADN polymérase I, en utilisant le brin matrice pour produire une copie exacte de la séquence d'ADN d'origine. L'ADN ligase scelle alors le nouvel oligonucléotide.

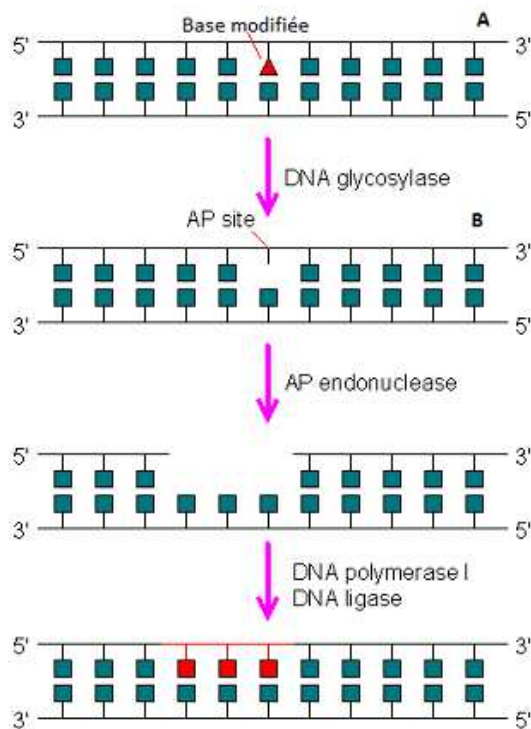


Figure 12: Réparation par excision de bases

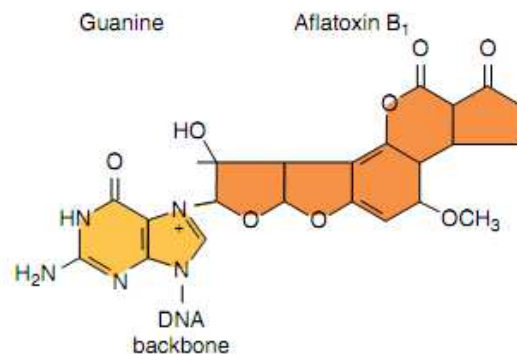


Figure 13: Aflatoxine B₁ en position N7 sur un résidu Guanine

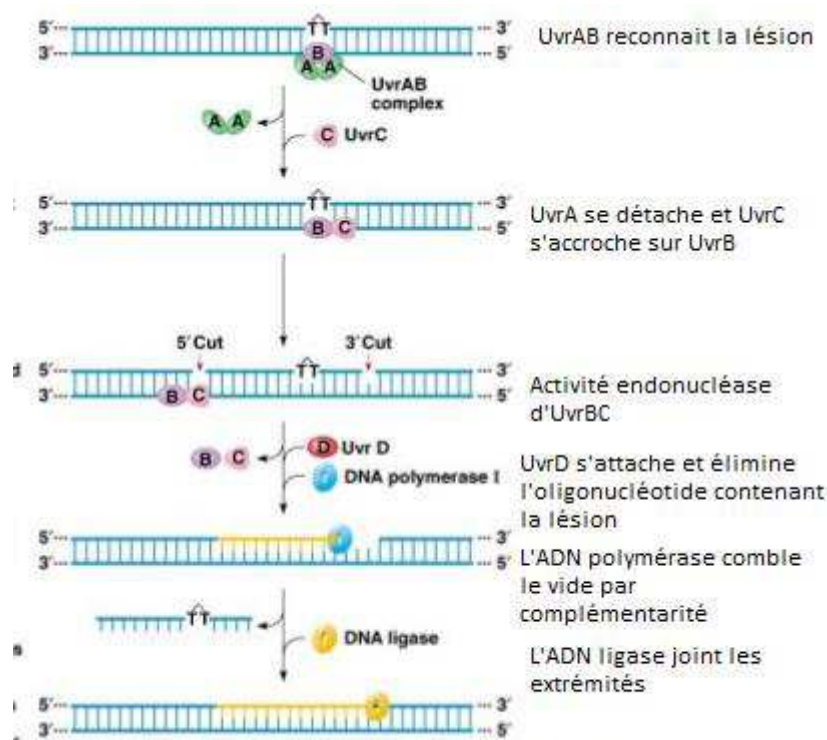


Figure 14: BER ou NER Nucléotide excision repair

NB: chez les levures les protéines similaires aux Uvr's sont nommées RADxx ("RAD" stands for "radiation"), comme la RAD3, RAD10. etc.

2-2-2-2- MMR mismatch repair ou réparation des mésappariements (post réplcatif)

Les précédents systèmes de réparation reconnaissent les bases modifiées, les déformations de la double hélice.....et la corrigent. Toute fois certaines erreurs commises lors de la réplcation sont reconnues mais ne peuvent être réparées par les fonctions 3'-5' de relecture de la polymérase,

car il n'y a ni modification des bases ni déformations de l'ADN, mais il y a mésappariement entre les bases.

Un autre système appelé Mismatch repair (MMR) est alors mis en œuvre, et qui accomplira :

1. la reconnaissance des paires de bases mésappariées
2. la détermination de la base incorrecte.
3. l'excision de la base incorrecte et promouvoir la réparation par synthèse

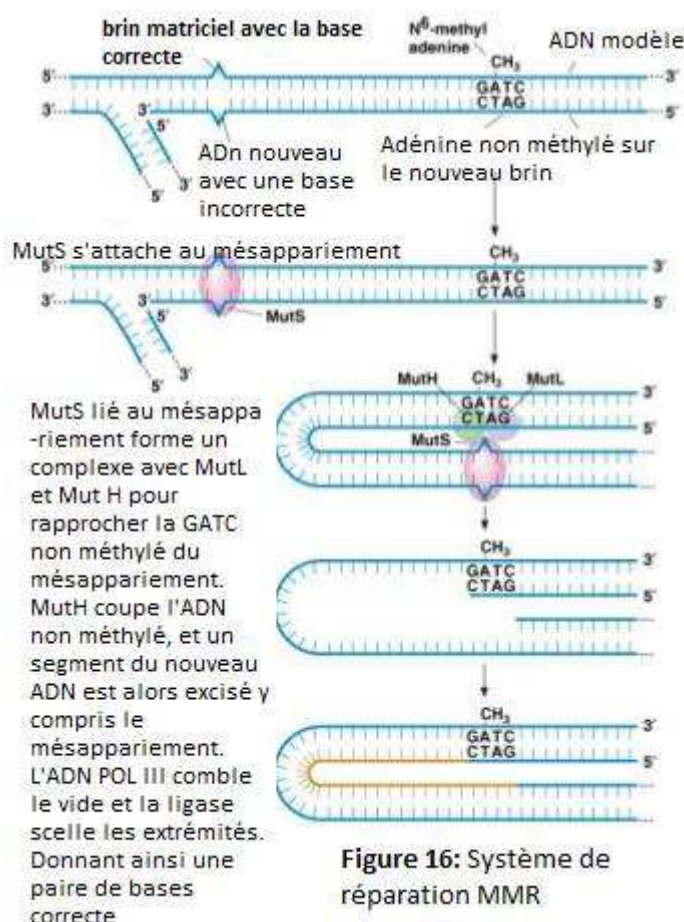
Comment ce système va distinguer la bonne de la mauvaise base s'il rencontre un mésappariement suite à une erreur de réplication, exemple G : T, les deux bases sont normales !!

Cependant, les erreurs de réplication produisent des mésappariements sur le brin nouvellement synthétisé. Ce système de réparation reconnaît que c'est la base sur ce brin qui doit être excisée.

Ce système de réparation se focalise sur le degré de méthylation d'une séquence particulière sur l'ADN bactérien : GATC (fig.15). En effet, le brin parental (matriciel) est méthylé sur toute sa longueur alors que le brin néo-synthétisé est moins méthylé (la méthylation est effectuée par la Dam-méthylase, et est décalée par rapport à la réplication dans le temps et dans l'espace).

5'-G-A-T-C-3'
3'-C-T-A-G-5'

Figure 15: Séquence méthylée sur le résidu Adénine



Ce système de réparation est aussi un système multienzymatique (fig.16). MutS patrouille sur l'ADN à la recherche de mésappariement, et détecte le brin porteur de l'erreur en distinguant le degré de méthylation des deux brins.

- L'hélicase, MutU déroule la double hélice en hydrolysant les liaisons hydrogènes.
- L'endonucléase MutH incise et coupe le brin muté à une certaine distance de part et d'autre de la base erronée.
- L'ADN pol III resynthétise le fragment manquant.
- La ligase permet de réassembler les deux morceaux.

La distance entre le site GATC et le mésappariement peut avoir une longueur de 1,000 paires de bases. C'est pourquoi le mismatch repair est très chère pour la cellule et parfois inefficace.

NB : Un système similaire a été mis en évidence chez l'homme, des mutations affectant les composantes de ce système seraient à l'origine de certaines maladies, spécialement des cancers.

2-2-3- Réparation des coupures double brins (CDB)

Jusqu'ici tous les systèmes de réparation ont utilisé le brin complémentaire comme matrice pour la correction. Mais dans le cas d'une coupure double brin comment la cellule corrige-t-elle la lésion? Et pourtant de nombreux processus cellulaires sont dépendants de telles coupures. C'est le cas des réarrangements pour la diversité génétique : de l'ADN responsable de la synthèse d'Anticorps, et la recombinaison lors de la méiose.

Toutefois, ces CDB peuvent survenir spontanément suite à l'exposition à des radiations ionisantes, ou encore plus simple en réponse à la présence de molécules d'oxygène réactives produits du métabolisme oxydatif. Deux mécanismes complètement différents opèrent pour corriger ces lésions létales : NHEJ (non-homologous end joining) et la recombinaison homologue.

2-2-3-1- NHEJ

En l'absence de complémentarité et de chromatide sœur, les conséquences d'une correction imparfaite sont moins dangereuses que de laisser les lésions sans réparation. Dans ce cas, il est préférable de mettre les extrémités libres ensemble afin qu'ils initient des réarrangements chromosomiques, même si cela signifie qu'une séquence peut être perdue. Ceci est possible par le système NHEJ (Fig.17) se déroulant en trois étapes : **(i)** les extrémités endommagées sont liées (par juxtaposition) par trois protéines : une protéine hétéro dimérique Ku70/Ku80 et une ADN kinase, **(ii)** les réparent parfois par réduction, et **(iii)** les relie sans l'utilisation d'un modèle de réparation. Certaines protéines impliquées dans la réparation des CDB sont aussi impliquées dans les réarrangements des gènes des immunoglobulines.

L'absence d'un modèle pour NHEJ signifie qu'il est sujet aux erreurs.

2-2-3-2- Réparation par recombinaison

Une CDB peut survenir lors de la réplication de l'ADN. Ce qui provoque le décrochage de la fourche de réplication. Lorsqu'une lésion survient dans le brin continu (fig.18a) ceci est en cause du décrochage de la synthèse de celui-ci (fig.18b). La continuation de la synthèse du brin retardé résultera en la synthèse d'une région simple brin à l'avant- du brin modèle (ligature des fragments d'Okazaki, fig.18c). Le brin continu va envahir (invasion) le nouveau duplex du brin retardé (médiée par RecA) crée une boucle en D (fig.18c), et la synthèse du brin continu est dirigée par le modèle du brin retardé (fig.18d) qui rétablit la fourche de réplication (fig.18e). Le site de la lésion est réparé par la suite, par excision nucléotidique.

2-2-4- Réparation SOS (Save Our Selves) ou by pass

Si les NHEJ ou les systèmes homologues de recombinaison ne parviennent pas à agir, le génome peut être préservé par ce qui est connu sous le terme "d'error prone". Ce mode de réplication permet à la lésion d'être contournée. La synthèse d'un tel ADN translésionnelle est plus un mécanisme de tolérance qu'un mécanisme de réparation, car il permet la réplication sans réparer les dommages nécessairement. L'arrêt de la Réplication, ainsi que certains types de dommages majeurs de l'ADN, activent le système de réparation SOS. Chez Escherichia coli ce dernier régule la transcription d'environ 40 gènes situés partout dans le chromosome qui sont impliqués dans la réparation des lésions de l'ADN mais aussi de la tolérance.

Même si aucun modèle (matrice) n'est disponible pour permettre l'insertion des bases correctes, il est moins dangereux de combler le vide que de le laisser.

Par conséquent, la synthèse translesionnelle génère de nombreuses erreurs. Chez *E. coli*, les deux polymérases sujettes à l'erreur (error-prone) sont l'ADN Polymérase V codée par les gènes *umuCD*, et l'ADN polymérase IV, codée par *dinB*. Les deux sont induites dans le cadre du système de réparation SOS. Chez l'homme l'ADN polymérase **ETA** est une polymérase translesionnelle qui permet aussi la continuation de la réplication de l'ADN.

NB : Le système SOS initie un certain nombre de processus de réparation d'ADN, dont certains sont exempts d'erreurs.

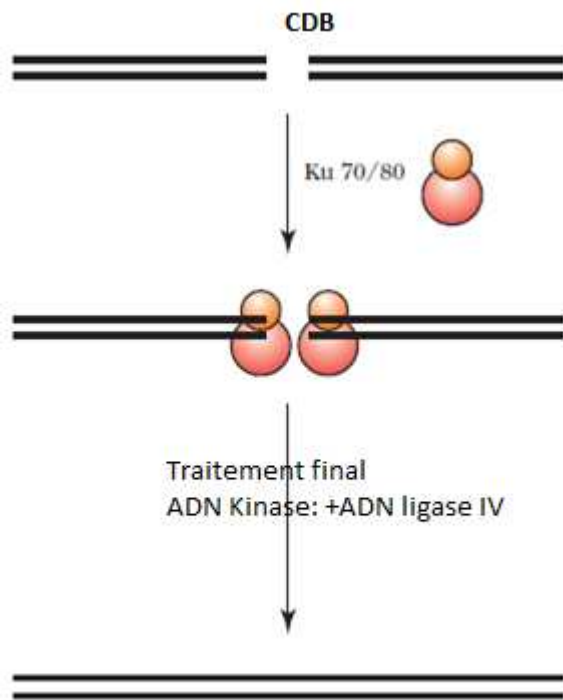


Figure 17: Réparation des CDB par NHEJ

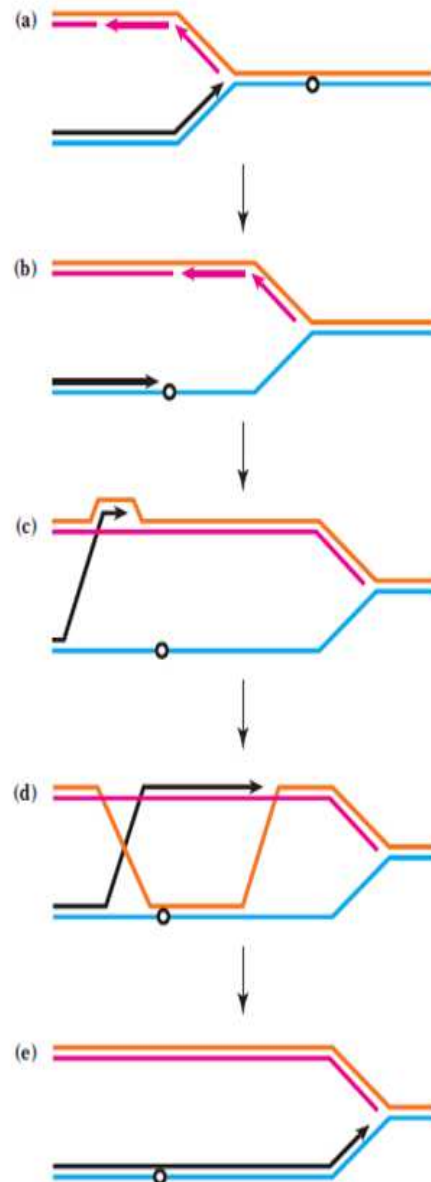


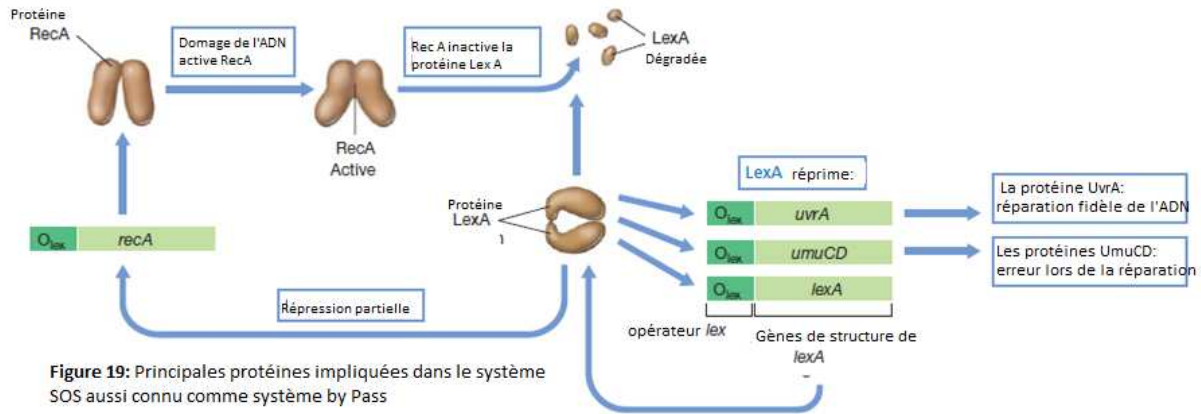
Figure 18 : Réparation des CDB par recombinaison (ci-contre).

Le système SOS est régi par deux protéines, LexA et RecA. LexA est un répresseur qui empêche normalement l'expression du régulon SOS (Fig.19).

La protéine RecA, qui fonctionne normalement dans la recombinaison homologue, est activée par la présence d'ADN simple brin résultant de l'arrêt de la réplication ou de lésions de l'ADN. La forme activée de RecA stimule l'activité protéasique de LexA, qui conduit à son autoclivage: LexA réprime normalement les activités du gène *recA* et les gènes de réparation d'ADN *uvrA* et *umuCD*: les protéines UmuCD font partie de l'ADN polymérase V. Ceci conduit à la dé-répression du système SOS

qui se traduit par la coordination de l'expression d'un certain nombre de protéines qui participent à la réparation de l'ADN.

NB : La répression de *recA* par Lex A n'est pas complète. Certaines protéines RecA sont produites même en présence de la protéine LexA. Lorsque LexA est inactivé, ces gènes deviennent très actifs.



III- Recombinaisons génétiques et éléments génétiques transposables

INTRODUCTION

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 :

- (i) 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.

Ces trois types de recombinaison se distinguent par les mécanismes mis en œuvre, les protéines impliquées et la nature de l'ADN recombiné.

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

3-1- 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 endommagé 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.

NB : La Recombinaison homologue se produit chez tous les organismes, et est particulièrement répandue pendant la production de gamètes (méiose) chez les organismes diploïdes comme les **levures**. En plus la recombinaison se produit également dans l'ADN des cellules somatiques chez l'homme responsables de l'expression des protéines de la réponse immunitaire, telles que les immunoglobulines. Cette recombinaison somatique réorganise les gènes d'immunoglobulines.

3-1-1-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 (fig.20a). 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 (fig.20b)

- * 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 (fig.20c).

- * Dans ce cas les brèches au bout des deux brins échangés peuvent être refermées par la DNA ligase (fig.20d).

- * 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 (fig.20e).

- * La structure de Holliday est représentée par des hélices en croix (fig.20f) après isomérisation (rotation de la moitié de la molécule de 180° ou **demi-chiasma**) les hélices seront résolues de deux façons :

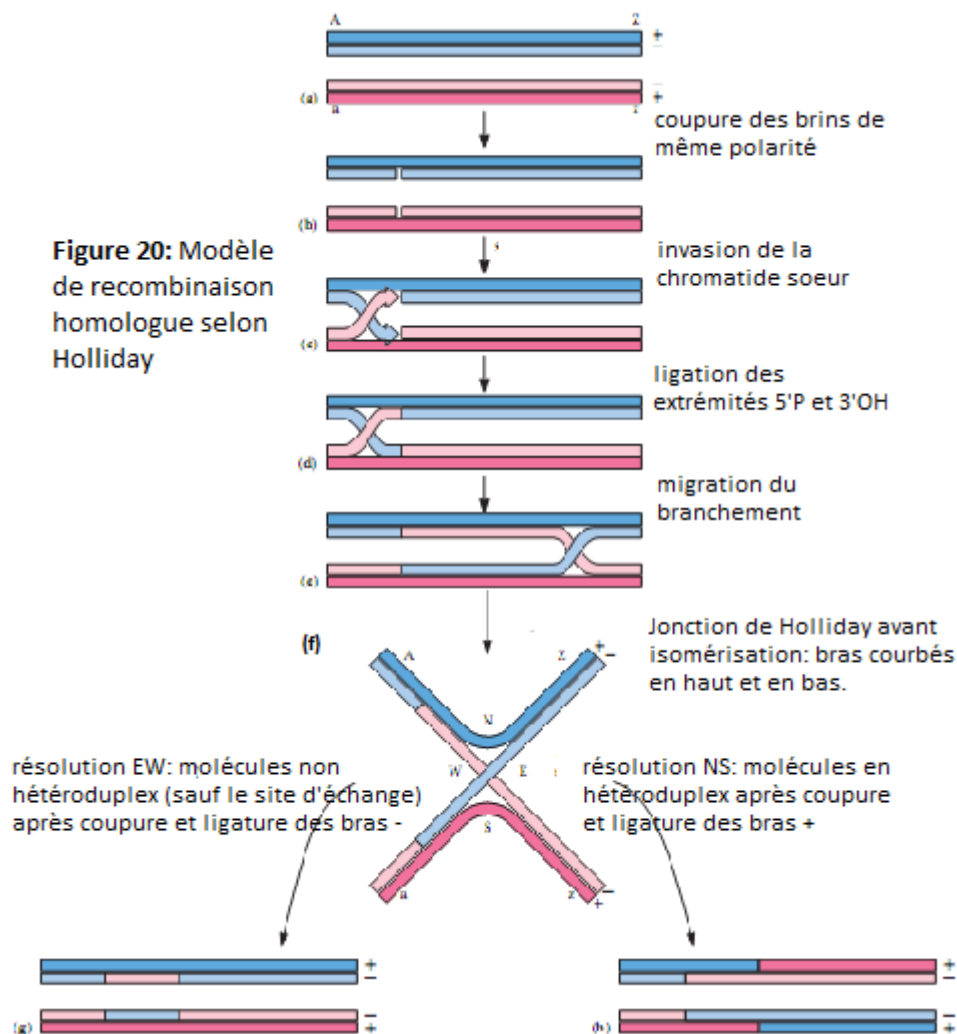
Lorsque la coupure se fait « est- ouest »: un échange de fragment de DNA entre les deux chromosomes est obtenu (fig.20g),

Alors que la coupure « nord- sud »: un échange complet des DNA des deux chromosomes s'effectue au delà du point de croisement (fig.20h).

3-1-2-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.



3-1-2-1 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 (ou à une cassure double brin dans l'ADN : CDB, Fig. 21Aa). 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 (et quelques protéines RecA, fig. 21Ab) se lient rapidement aux simples brins émergents. Tôt ou tard, RecBCD rencontre une séquence nucléotidique particulière Chi (ou) site_x, caractérisée par la séquence 5'-GCTGGTGG-3' (Fig. 21Ac). Ces sites sont des «points chauds»: re-combinatoires. Lorsqu'une telle séquence est rencontrée, RecBCD clive les brins d'ADN en amont de quatre à six bases sur le brin 3' (Fig. 21Ad). RecBCD bascule de telle sorte que l'activité nucléase envers le brin 5'-terminale augmente (Fig. 21Ae).

Nb: le brin 3' du site d'entrée est plus rapidement clivé que le brin 5'.

3-1-2-2 Invasion du brin homologue

La protéine RecA, ou recombinase, est une protéine multifonctionnelle qui agit dans la recombinaison homologue. **RecA amorce la réaction d'échange** conduisant à la formation d'une jonction de Holliday. En présence d'ATP et d'ADNss, RecA formant le filament hélicoïdal sert

d'échafaudage (pont) sur lequel les événements de recombinaison ont lieu (Fig. 21Ba). 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 (Fig. 21Bb). La migration entraîne le déplacement du brin d'ADN homologue de l'ADN duplex et de son remplacement par le brin ssADN, Le brin d'ADN déplacé par l'invasion de l'extrémité 3' - terminale de l'ADNss peut alors s'apparier avec le 5'-terminal dans l'ADN d'origine, une étape qui est également médiée par la protéine RecA et SSB (Fig. 21Bc). Le résultat est **une jonction de Holliday**, l'intermédiaire classique de la recombinaison génétique.

3-1-2-3 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.

3-2- 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: **Éléments Transposables (ET)**, ou simplement transposons.

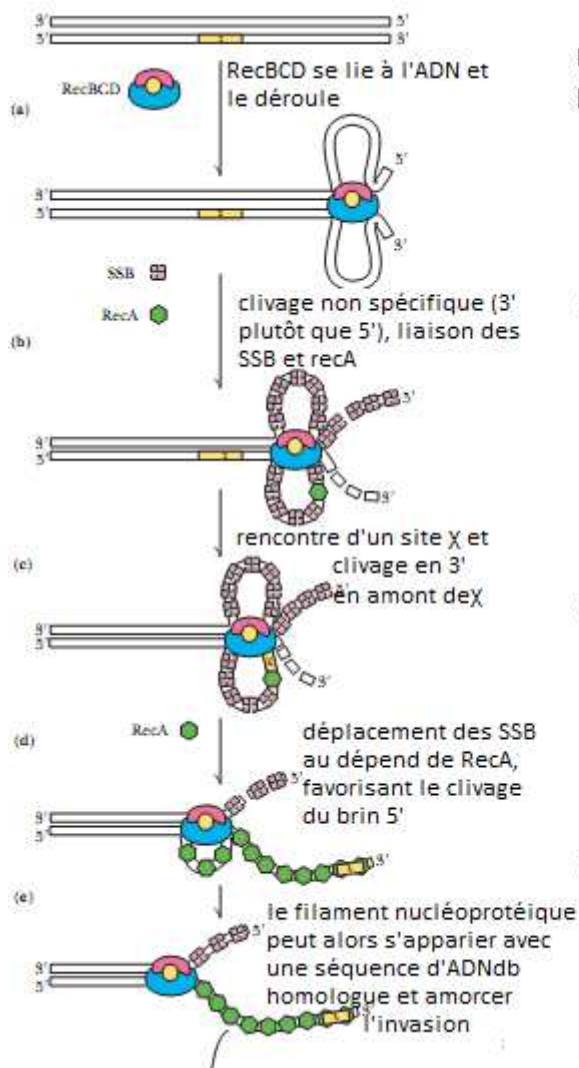


Figure 21 A: Initiation de la recombinaison par le complexe RecBCD

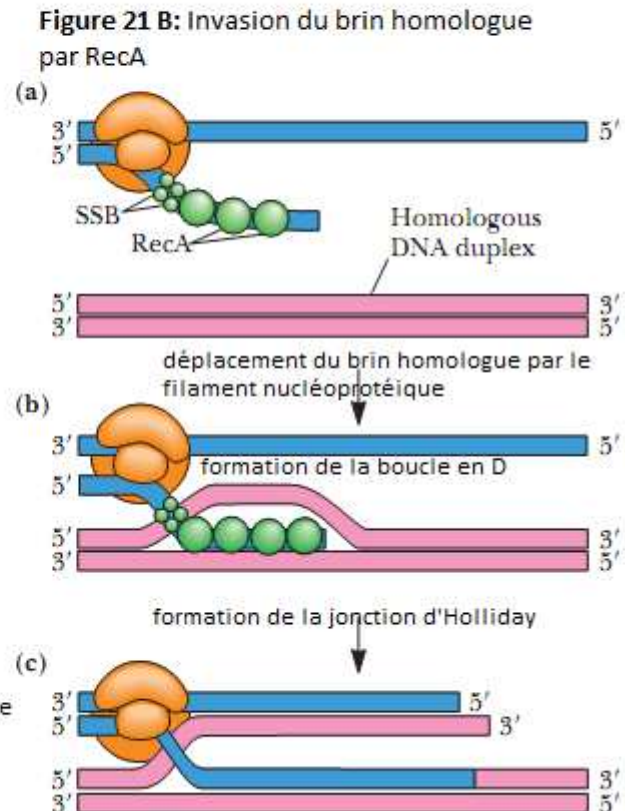


Figure 21 B: Invasion du brin homologue par RecA

3-2-1-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 (fig.22 a). Et sont flanqués de part et d'autre par des séquences de répétitions inversées (IR).

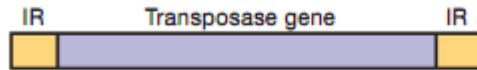
Les transposons composés peuvent contenir des gènes autres que celui de la transposase telle que la résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds, des toxines (fig.22 b). Ces gènes situés dans la région centrale sont flanqués de modules IS (séquences IS).

3-2-2- 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'insère dans un site cible, la séquence cible est dédoublée de sorte que les courtes répétitions, à séquence directe flanquent les séquences répétées inversées terminales du transposon.

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

(a) Insertion sequence



(b) Transposon composé

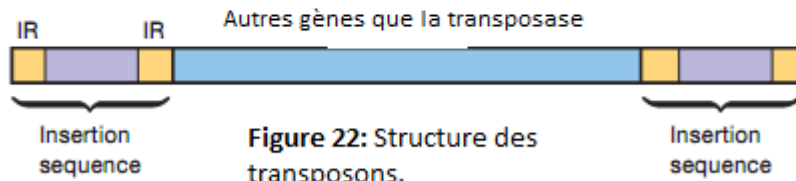


Figure 22: Structure des transposons.
a: transposon simple
b: transposon composé

3-2-2-1- Transposition répllicative

(i) 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. (iii) 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.23).

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.

3-3- 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 étudiés tant *in vivo* qu'*in vitro*.

Cette recombinaison est Rec indépendante (d'autres enzymes sont impliquées).

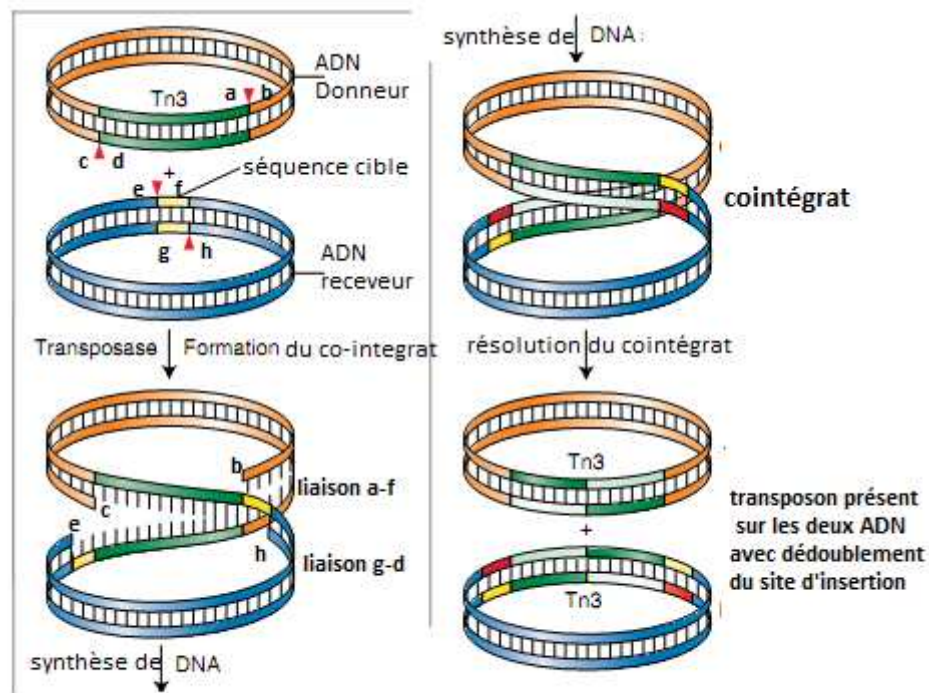


Figure 23: Mécanisme de la transposition répllicative

3-3-1-Rôles biologiques de la Recombinaison spécifique de site

Ce mode de recombinaison concerne en général des événements programmés ou permettant une adaptation rapide au milieu environnant.

C'est le cas de:

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

3-3-2- Événements impliquant une RSS

Trois types d'événements impliquent une recombinaison spécifique de site : l'**intégration** (bactériophage λ chez *E. coli*), **excision** (bactériophage λ chez *E. coli*), **inversion** (variation de phase chez les salmonelles).

3-3-2-1- 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.24a).

3-3-2-2- 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 indépendants 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.24b).

3-3-2-3- 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.24c).

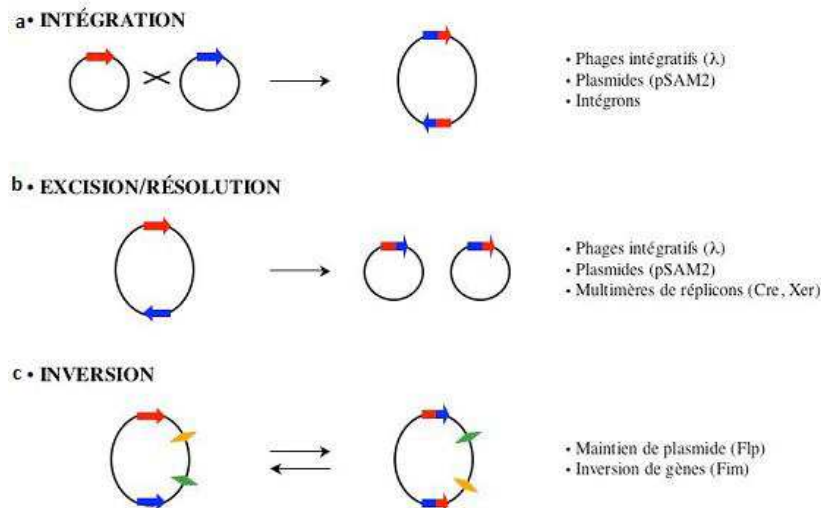


Figure 24 : Événements impliquant une Recombinaison spécifique de Site (Serre, 2006)

3-3-3-Les recombinaisons

On distingue deux familles de recombinaisons spécifiques de site, sur la base des résidus impliqués dans la catalyse : les recombinaisons à tyrosine et les recombinaisons 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 recombinaisons clivent l'ADN par un déplacement nucléophile de l'hydroxyle d'ADN à l'aide du site actif sur leur chaîne 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 recombinaison.

Parmi les tyrosines recombinaisons les plus étudiées on trouve λ Int et bien d'autres phage-intégrases, IntI, Cre, XerC/D, FimB FimE et Flp. Ces recombinaisons remplissent des fonctions d'intégration, d'excision ou d'inversion. Concernant les recombinaisons à sérine on trouve les invertases Gin du bactériophage Mu et Hin de *Salmonella* sp. et les résolvas TnpR de Tn3/ $\gamma\delta$ et d'autres transposons.

3-3-4- Recombinaison spécifique de site

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

L'intégration de lambda, dans le chromosome de son hôte est spécifique de site. L'intégrase, de la famille des recombinaisons à tyrosine, codée par le phage, va reconnaître et synapser deux sites de recombinaison, *attB* (site d'attachement bactérien) et *attP* (site phagique). Après recombinaison, le génome viral sera intégré dans le génome de l'hôte encadré par deux sites recombinants *attL* et *attR*, qui seront reconnus et recombinaisonnés lors de l'excision (fig. 25).

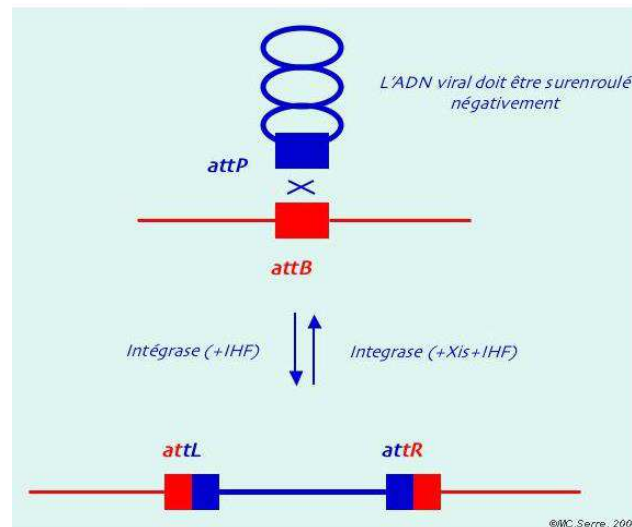


Figure 25 : Intégration/excision de lambda.

3-3-4-2- 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 **Intégrons**. Un intégron minimal est constitué d'une plateforme codant une intégrase *IntI*, localisée à proximité d'un site de recombinaison *attI*, et d'une cassette contenant un gène de résistance et un site de recombinaison *attC*. Les cassettes vont s'intégrer à *attI*, 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.26).

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

Cette variation est une inversion contrôlée par une invertase **HIN** (de la famille des [sérine recombinases](#)), reconnaissant et recombinant deux sites responsables de la synthèse de flagelline, *hixL* et *hixR*, 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 répresseur ne sont plus transcrits, ce qui lève la répression du gène H1, et permet de modifier la composition des flagelles (Fig.27).

***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.

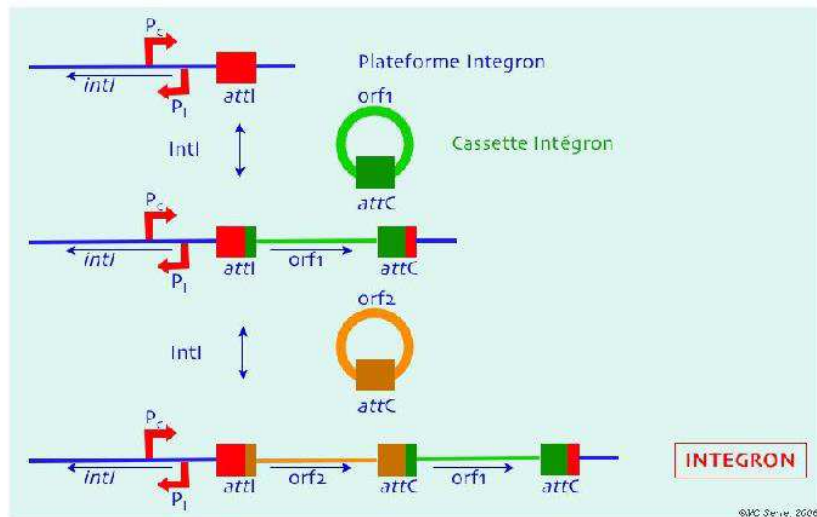


Figure 26 : Structure d'un Intégron.

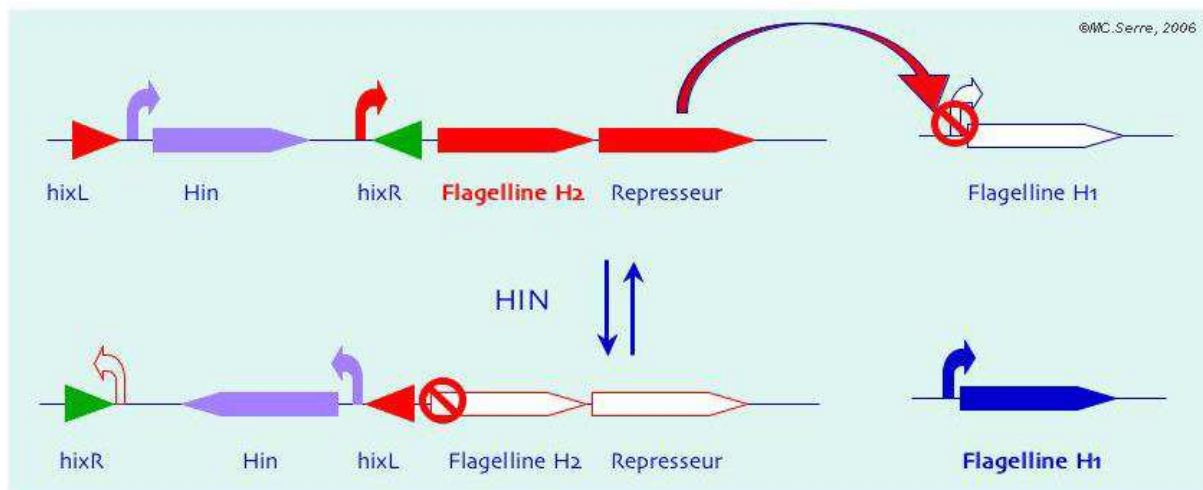


Figure 27 : Variation de phase chez les salmonelles.

IV- Transferts génétiques chez les bactéries

Introduction

La biodiversité est le résultat des modifications du génome des différentes espèces au cours de l'évolution. Ces modifications chez les populations bactériennes peuvent poser un problème dans le traitement des infections bactériennes. Car ces dernières ont acquis des gènes de résistance à certaines molécules antibactériennes. Non seulement ces résistances sont un problème, mais les bactéries possèdent des mécanismes permettant le transfert de ces gènes à d'autres bactéries. Ainsi, une résistance (ou une mutation) apparaissant dans une cellule peut être transmise aux autres cellules. C'est ainsi que la bactérie peut être l'objet de variations génétiques autres que la mutation, par des processus aussi différents que la **transformation**, la **transduction** et la **conjugaison**.

Ces transferts d'acide désoxyribonucléique (ADN) bactérien doivent être suivis de recombinaison génétique (qui provient d'une même espèce mais occasionnellement le transfert vers d'autres espèces peut avoir lieu). Dans d'autres circonstances, l'ADN peut ne pas se recombiner (plasmide).

Ces transferts de gènes chez les bactéries sont unidirectionnels, le plus souvent partiels (1 à 2 % du génome transféré) et d'efficacité faible (fréquence de recombinaison de l'ordre de 10^{-6}). Le donneur cède généralement une petite partie de son ADN au receveur. Ainsi, on n'obtiendra pas des zygotes complets mais plutôt des zygotes partiels ou **mérozygotes**.

4-1. Transformation

Par Définition, la transformation "naturelle" ou physiologique est le premier modèle connu de transfert de matériel génétique, qui est fixé et absorbé par des bactéries réceptrices, dites en état de compétence. Ce modèle a permis de démontrer que l'ADN était le support chimique de l'hérédité en 1944.

4-1-1- Découverte de la transformation.

En 1928, Frederick Griffith démontre que l'inoculation sous-cutanée à la souris d'un mélange de pneumocoques capsulés (virulents) tués par la chaleur et de pneumocoques acapsulés (non virulents) vivants, entraîne une septicémie mortelle à pneumocoques capsulés vivants. Il y a donc eu transformation ou « réversion » des pneumocoques acapsulés (R) en pneumocoques capsulés (S). En 1944, Avery MacLeod et McCarty démontrent que le « principe transformant » est l'ADN bactérien. Ils réussissent à reproduire in vitro la transformation en présence d'ADN fortement polymérisé. L'activité transformante est perdue en présence de désoxyribonucléase.

1. Facteurs affectant la transformation

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

a. Taille de l'ADN

L'ADN double brin nécessaire pour la transformation doit faire au moins 5×10^5 daltons.

b. 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. Cet état de compétence qui n'apparaît seulement que chez une fraction de la population bactérienne.

La transformation naturelle ne peut s'observer chez un nombre limité d'espèces bactériennes à Gram positif (*Pneumococcus*, *Streptococcus* et *Bacillus*) ou à Gram négatif (*Neisseria*, *Branhamella*, *Acinetobacter*, *Haemophilus*).

La transformation *artificielle* est précédée du traitement chimique ou enzymatique de la paroi bactérienne avant sa mise en contact avec l'ADN exp: la compétence d'*E.coli* peut être induite in vitro par traitement chimique (CaCl_2 à 0°C).

2- Développement de l'état de compétence

Chez les bactéries à Gram positif, la bactérie excrète un activateur spécifique d'espèce, qui se fixe à la surface de la bactérie. Il y a ensuite synthèse d'une protéine fixatrice de l'ADN, d'une autolysine et une endonucléase. L'ADN fixé est ensuite partiellement hydrolysé puis converti en un fragment monocaténaire (fig.28 a). Chez les bactéries à Gram négatif, l'état de compétence est aussi en relation avec la synthèse d'un activateur de paroi qui est excrété par la bactérie à la phase exponentielle de croissance chez *H. influenzae*, ou à la phase stationnaire comme c'est le cas d'*Acinetobacter*.

3- Étapes de la transformation Elle se produit selon les phases suivantes :

(i) apparition de l'état de compétence (fig 28 a), (ii) fixation puis pénétration, (iii) et intégration de l'ADN donneur dans le génome de la bactérie réceptrice par recombinaison homologue (fig. 28 b).

Les bactéries transformables sont capables de fixer des ADN de multiples sources mais ne sont capables de former des recombinaisons génétiques que si la bactérie donatrice et la bactérie réceptrice sont génétiquement très proches. Cette relative spécificité est liée à l'homologie des séquences nucléotidiques endogènes et exogènes.

NB : L'ADN donneur se fixe sur la paroi au niveau de sites récepteurs, dans des conditions strictes de métabolisme cellulaire, de pH, de température et d'osmolarité.

Bien que la transformation ne permette que le transfert d'une petite fraction du génome bactérien (<1 %), soit d'efficacité relative (la fréquence de transfert est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-6}) et soit limitée à quelques espèces bactériennes, elle est d'un grand intérêt théorique et pratique.

La transformation a permis de comprendre le mécanisme de la synthèse de la capsule, le contrôle génétique de la résistance aux antibiotiques, l'établissement de cartes génétiques, etc...

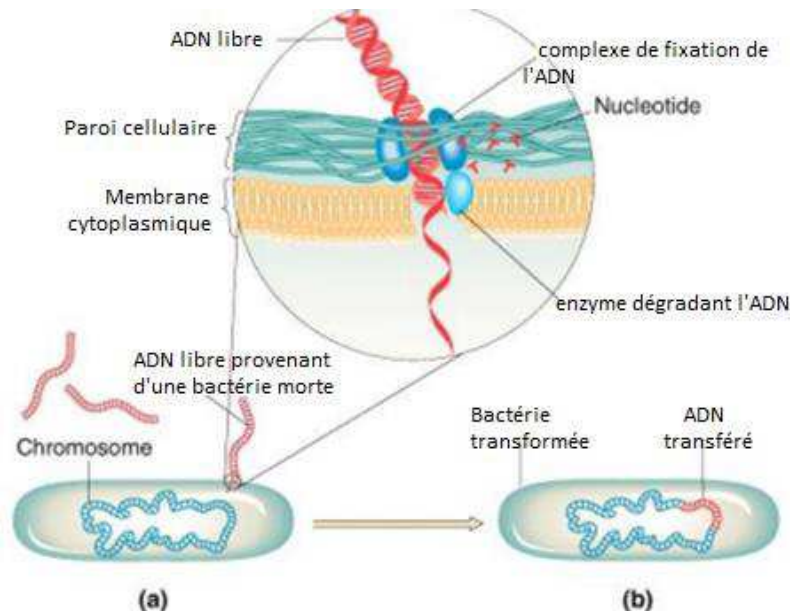


Figure 28 : Transformation bactérienne, (a) fixation de l'ADN nu, (b) intégration du fragment d'ADN après recombinaison homologue.

4-2. La conjugaison

L'expérience de Lederberg et Tatum (1946) est à l'origine de la découverte de la conjugaison. Dans un milieu de culture liquide, ces auteurs ont mélangé deux types de mutants auxotrophes d'*E.coli*. Après plusieurs heures de contact entre les mutants, Lederberg et Tatum ont isolé des *E.coli* $T^+ L^+ M^+ B^+$ (environ 100 pour 10^8 *E.coli*). et en ont conclu que la recombinaison s'était produite avec une faible fréquence (10^{-6}) et exigeait en plus le contact entre les deux types de mutants auxotrophes.

4-2-1-Caractères de la conjugaison

a- Spécificité

Le transfert d'ADN chromosomique par conjugaison ne se produit qu'entre bactéries d'une même espèce (spécificité), et surtout chez les bactéries à Gram négatif telles que les entérobactéries (*E.coli*, *Salmonella*... et *Pseudomonas aeruginosa*). Alors que le transfert d'ADN plasmidique est plus répandu, et est moins spécifique d'espèce.

b- Différentiation sexuelle

Le transfert du facteur sexuel qui est à sens unique, est le premier plasmide connu. L'information génétique qu'il porte code pour la biosynthèse de pili sexuels, pour son insertion possible dans le chromosome bactérien et pour son transfert de ce dernier vers des bactéries réceptrices (F^-).

c- Contact ou appariement

Le transfert chromosomique n'est possible qu'après appariement par un couple de bactéries donatrice et réceptrice. Il fait d'abord intervenir les pili sexuels (2 à 3 par bactérie F^+) qui reconnaissent par leurs extrémités les récepteurs à la surface des bactéries F^- et s'y fixent puis se

rétractent en rapprochant les deux bactéries. Ils permettent ainsi leur contact et la formation d'un pont cytoplasmique de 100 à 300 μm par lequel va s'opérer le transfert chromosomique.

d- Transfert de l'ADN

Le transfert du brin d'ADN dure alors une centaine de minutes à 37°C. Son interruption artificielle par agitation mécanique permet de déterminer la séquence des gènes transférés et d'établir la carte chromosomique.

e- Caractères chromosomiques transférés

Tous les caractères codés par le chromosome peuvent être transférés. En effet, le facteur F peut être intégré dans le chromosome bactérien à certains sites. Dans cette position il permet le transfert de gènes chromosomiques proches de ces sites d'une bactérie à une autre mais ne transfère que rarement le facteur lui-même (fig. 29).

Le facteur F peut rester autonome dans le cytoplasme. Dans cette position il ne transmet à la bactérie réceptrice que le facteur F mais pas de gène chromosomique. Lors du passage de l'état intégré à l'état autonome, le facteur F peut emporter avec lui des gènes bactériens. Le résultat en est un plasmide F' qui contient ces gènes et capable de les transférer à une bactérie réceptrice de nouveaux gènes : c'est la F-duction ou sex-duction.

Si les gènes transférés par le facteur F' s'intègrent dans le chromosome de la bactérie réceptrice, on dit qu'il y a eu recombinaison légitime (chromosomique). S'ils ne s'intègrent pas, ils deviennent de véritables gènes mobiles d'une bactérie à une autre.

f- Plasmides conjugatifs

Certains plasmides sont capables d'assurer tous seuls leur transfert par conjugaison. On les appelle alors plasmides conjugatifs.

4-2-2- Conjugaison F⁺ x F⁻

La conjugaison est un transfert d'ADN entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice, qui nécessite le contact et l'appariement entre les bactéries, et repose sur la présence dans la bactérie donatrice ou mâle d'un facteur de sexualité ou de fertilité (facteur F). Celui-ci permet la synthèse de pili sexuels et donne la polarité au chromosome. Le facteur F réside habituellement sur un plasmide. Les souches donneuses sont appelées F⁺ tandis que les souches dépourvues sont appelées F⁻.

Le pont cytoplasmique formé, le transfert génétique peut commencer. Il ne porte d'abord que sur un brin d'ADN, ce qui permet de restaurer l'intégrité du génome de la bactérie donatrice par un processus de réplication asymétrique. Ce processus de réplication asymétrique a lieu tout près du pont cytoplasmique et met en jeu un site de réplication spécifique (fig. 29).

4-2-2-1 Modèle de réplication du plasmide : Une queue simple brin est générée par une endonucléase au niveau du site *ori T*, l'extrémité 5' migre vers la cellule réceptrice, et peut être converti en la forme double brin par la synthèse d'un brin complémentaire (fig. 30). Alors que le DNA du côté 3' sera répliqué par complémentarité de manière continue, l'extrémité 5' est répliquée de manière discontinue par les Fragments d'Okazaki.

Ce modèle du cercle roulant (fig. 30) s'applique aussi pour la réplication des bactériophages à ADN, qui donnera d'abord naissance à un long concatémaire qui sera ensuite clivé en unités phagiques.

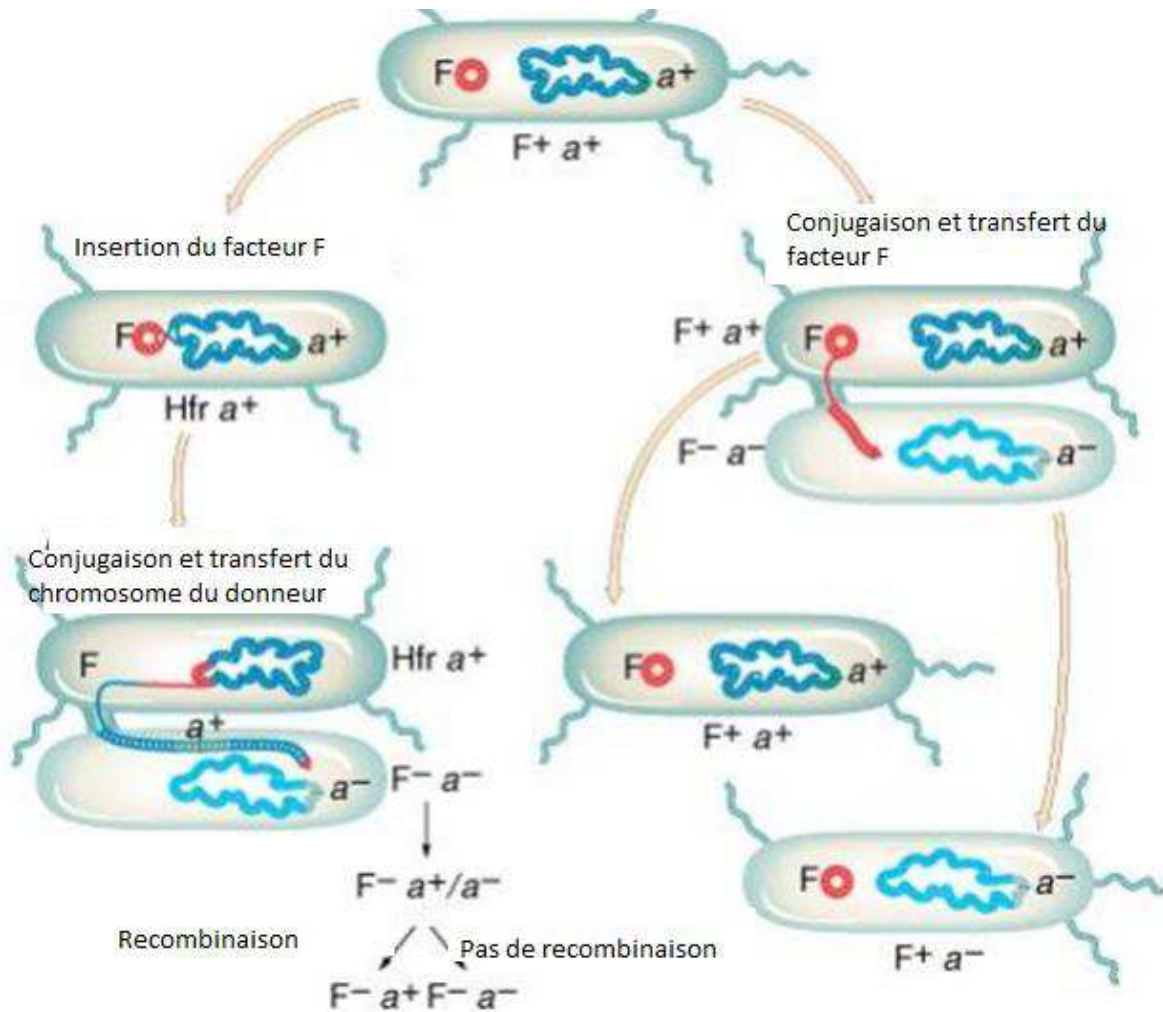


Figure 29 : Conjugaison $F^+ \times F^-$ (à droite) et $Hfr \times F^-$ (à gauche).

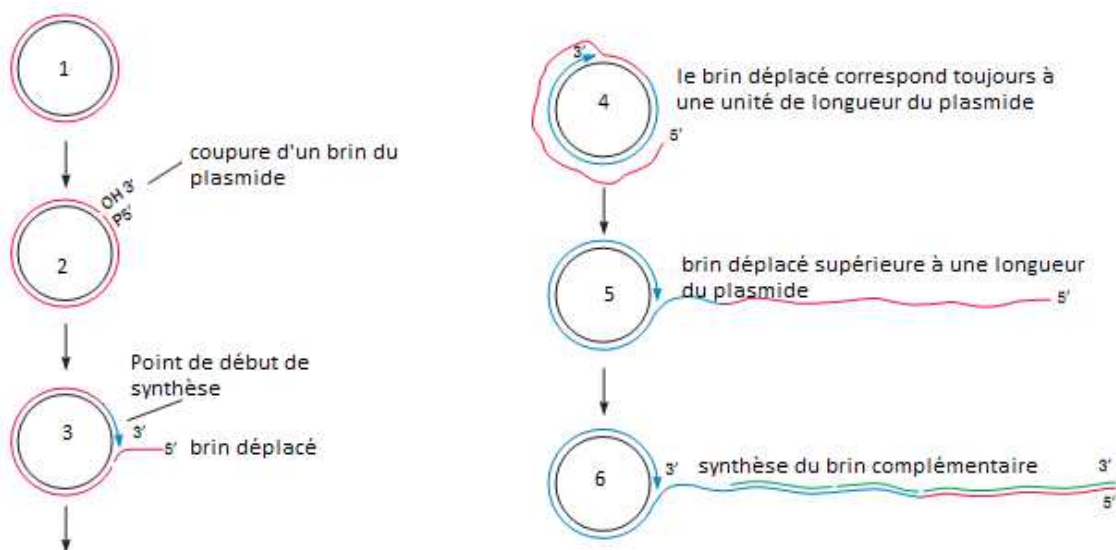


Figure 30 : Modèle de réplication des plasmides dit « du cercle roulant ».

4-2-3- Conjugaison Hfr x F⁻

Une souche Hfr (Haute fréquence de recombinaison) résulte de l'intégration du facteur F dans le chromosome. L'insertion du facteur F se fait par crossing-over (fig. 29). La recombinaison se fait entre deux sites IS (RSS).

La conjugaison Hfr x F⁻ est un transfert d'ADN chromosomique qui est à sens unique, orienté, progressif et quelquefois total (fig. 29), a beaucoup de similitudes avec le transfert d'ADN extra chromosomique (plasmidique). La cellule bactérienne 'femelle' qui vient de se conjuguer avec une cellule bactérienne 'mâle' et qui contient un fragment d'ADN mâle (après recombinaison) est dite **exconjugant**.

4-2-3-1-La conjugaison Hfr x F⁻ permet de déterminer la liaison génétique et d'établir les cartes génétiques

La conjugaison interrompue permet de déterminer quels gènes sont transmis de Hfr à F⁻ et dans quel ordre. En effet, chaque allèle du donneur apparaît chez le receveur à un instant précis après le début du croisement (fig. 31). De plus, les allèles du donneur apparaissent dans un ordre déterminé à partir d'un point appelé origine (O).

Le transfert de gènes linéaire est arrêté par rupture du pont de conjugaison pour étudier l'ordre d'entrée dans la cellule receveuse (fig. 31A). L'orientation dans laquelle F s'insère détermine la polarité du transfert du chromosome Hfr. À une extrémité du facteur F intégré se trouve l'origine (fig. 31B). Le terminus du transfert, proche de l'autre extrémité de F, n'est transféré qu'après que tout le chromosome l'ait été.

4-2-4- Conjugaison F'X F⁻.

Lorsque F s'insère entre les gènes *ton* et *lac* dans une séquence répétitive IS1, il donne une souche Hfr. L'excision anormale de F, par recombinaison avec un autre élément IS2, inclue le locus *lac*. La résultante est le F' *lac*. Lorsque ce dernier est transmis dans une autre cellule (réceptrice) par conjugaison F'x F⁻, il en résulte un diploïde partiel F'*lac*⁺ / *lac*⁻.

NB : Le plasmide F ne possède pas un seul site d'insertion, il peut recombiner avec plusieurs IS.

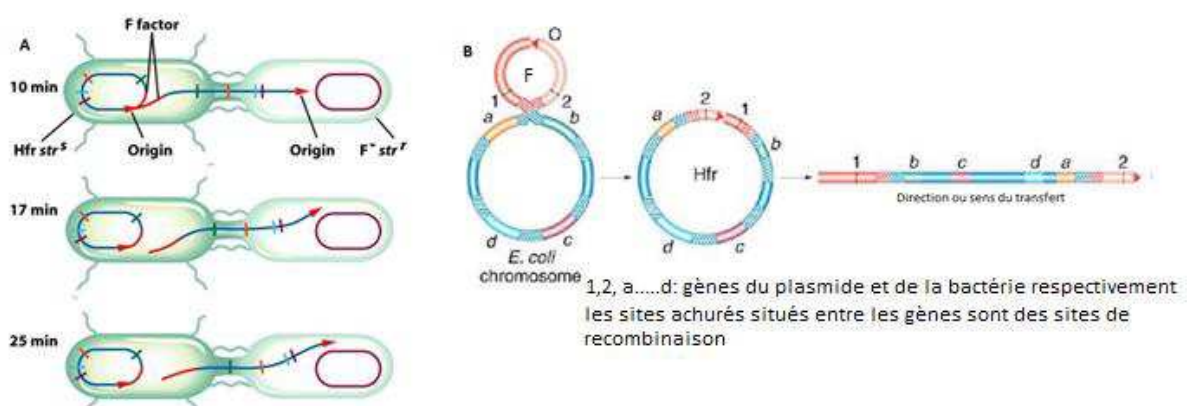


Figure 31 : (A) Transfert des gènes par conjugaison Interrompue Hfr x F⁻,
(B) insertion du plasmide dans le chromosome bactérien par RSS entre deux IS1.

4-3- Transduction

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 .

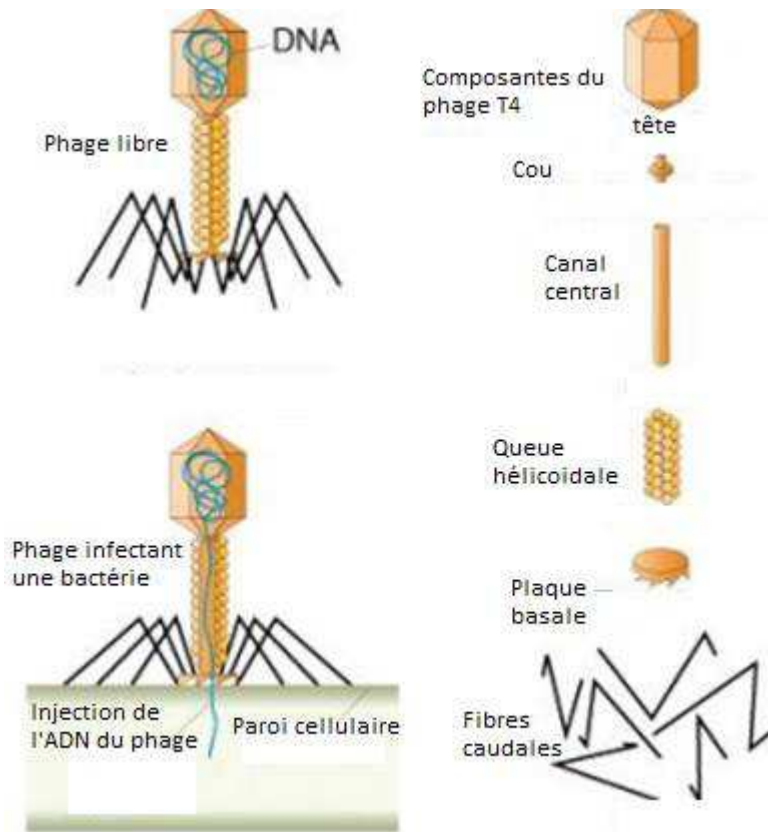


Figure 32 : Structure du phage T4 d'E. coli.

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 gîtes et leurs couverts).

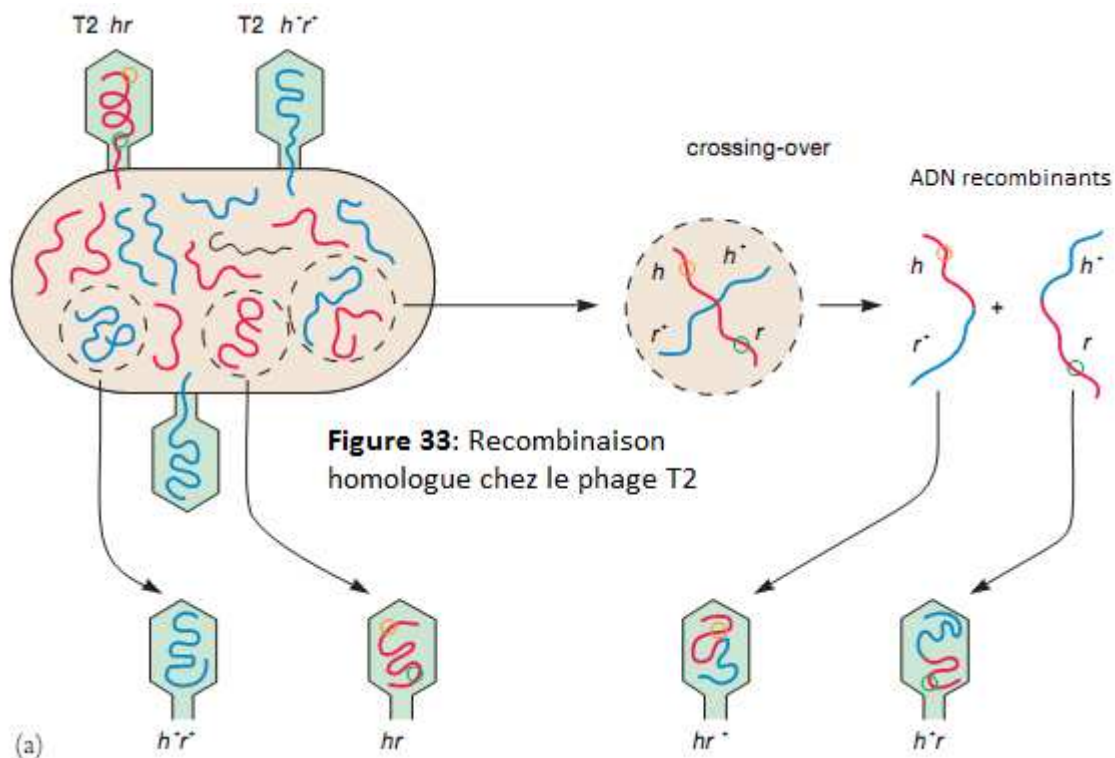
4-3-1- Lyse et lysogénie

4-3-1-1- 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. Les plages de lyse sont en fait, le résultat de ce cycle lytique. La morphologie de la plage de lyse est un caractère du phage utilisable pour l'analyse génétique. De même, le spectre d'hôtes peut être analysé. Les phages diffèrent entre eux par le spectre de souches bactériennes qu'ils peuvent infecter et lyser.

4-3-1-2- 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.

4-3-2- Recombinaison des phages

La recombinaison entre les ADN phagiques peut être observée entre les molécules parentales de deux virus dans une même cellule hôte, par le biais d'une infection mixte. C'est une recombinaison homologue entre des séquences des deux molécules virales, générant une molécule recombinante (fig.33).



4-3-3-Phénomènes de Transduction

En 1952, N. ZINDER et J. LEDERBERG tentent d'obtenir des recombinants après croisement de mutants auxotrophes de souches de *Salmonella typhimurium* (LA22, LA2) responsables de toxico-infections d'origine alimentaire. La fréquence des recombinants histidine+ tryptophane+, de l'ordre de 10^{-6} , n'est pas modifiée lorsque les souches parentales, séparées par un filtre en verre fritté, ne sont plus en contact (Fig. 34 A). L'existence d'un agent filtrable, vecteur de l'information génétique est démontrée (bactériophage tempéré produit par la souche parentale lysogène, LA 22).

Certains phages sont capables de mobiliser des gènes bactériens et de les transporter d'une cellule à une autre. Ce phénomène est appelé transduction. Il existe deux types de transduction: généralisée et spécialisée. Dans la transduction générale, les phages peuvent transporter n'importe quelle région du chromosome (fig.34 B), alors que dans la transduction spécialisée ou spécifique, les phages transfèrent des parties bien précises du chromosome bactérien.

Quand il est excisé normalement (fig. 35 B), le nouveau phage est complet et ne contient pas de gènes bactériens. Rarement l'excision se produit de manière asymétrique (Fig. 35 B), et les gènes *gal* sont assimilés et certains gènes phagiques sont perdus. Le résultat est un phage lambda défectueux qui porte des gènes bactériens et peuvent être transférés à une autre cellule.

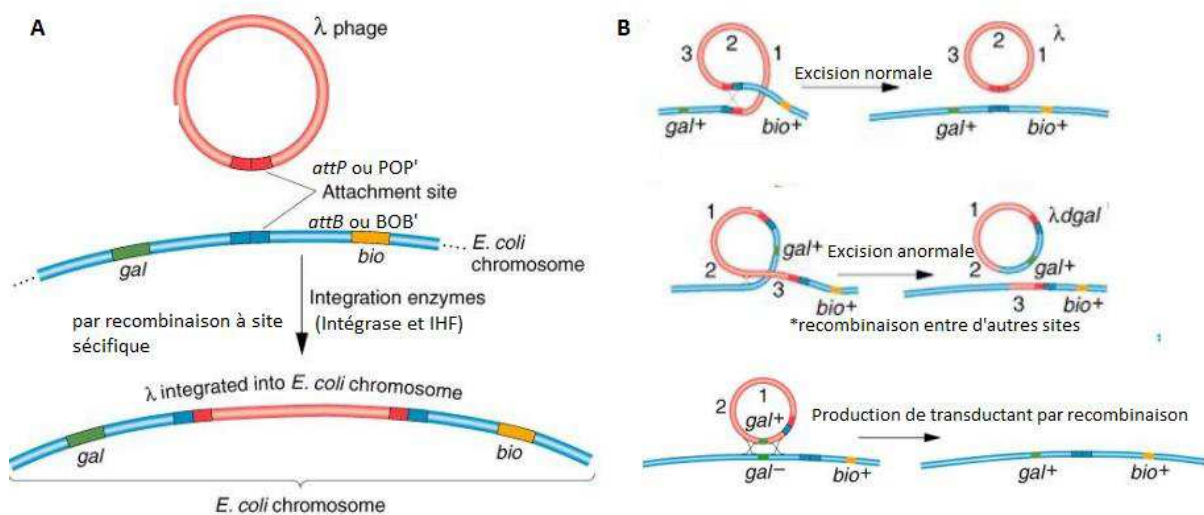
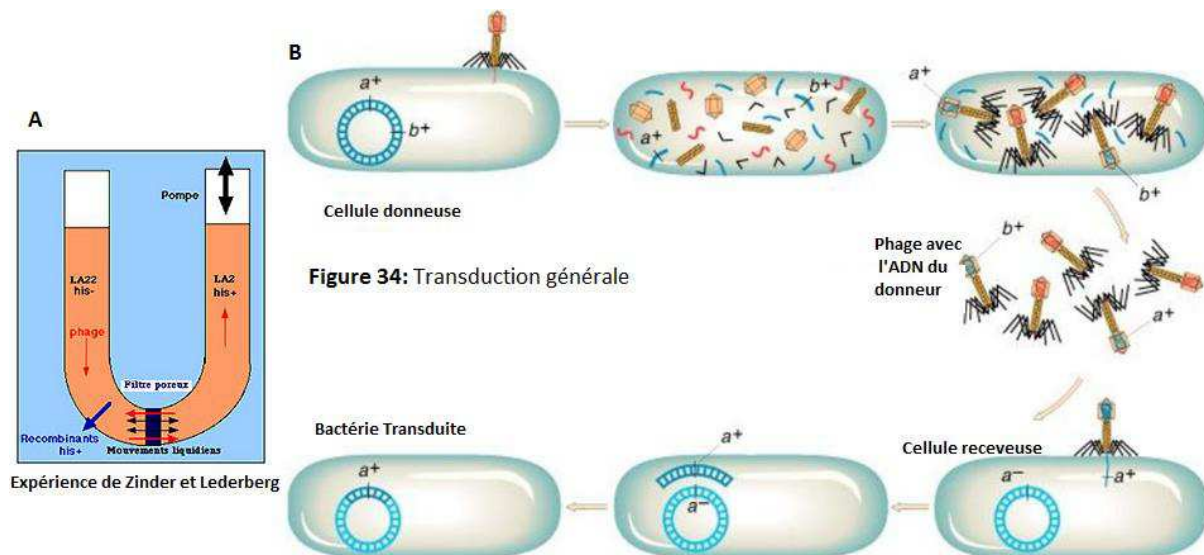


Figure 35 : Transduction spécialisée, A : Insertion de l'ADN du phage, B : Excision de l'ADN du phage et transduction spécialisée.

4-3-3-1- Transduction et virulence

Lorsque les gènes transférés par transduction spécialisée codent des facteurs de virulence, la bactérie réceptrice voit son pouvoir pathogène augmentée.

Conversion lysogénique :

On a noté une interdépendance totale entre les caractères lysogène et toxigène chez quelques bactéries suite à une conversion lysogénique, où la perte du prophage s'ensuit par une perte de virulence (la bactérie perd la capacité à produire la toxine).

*exemple les gènes *stx* (Shigella like toxines) d'*Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC). Ces gènes sont localisés dans des séquences des bactériophages lambda, ces souches entérohémorragiques auraient émergées par conversion lysogénique.

*toxine de *Vibrio cholerae* portée par le phage CTX,

*Toxine érythrogyne de *Streptococcus pyogenes* responsable de la scarlatine.

4-3-3-2- Transduction *in situ*

Le transfert d'îlot de pathogénie (SaPis) par un bactériophage (qui ne forme pas de plages de lyse) : comportant la toxic shock toxine entre *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* dans le lait cru (Chen et Novick, 2009).

4-4- Cartographie

Dans une conjugaison interrompue (des suspensions contenant des concentrations similaires du donneur et du receveur, sont réparties dans 100 tubes à essai), expérimenter le pont cytoplasmique est cassé (rompu) : est arrêté à divers intervalles de temps après le début de la conjugaison par le mélange de la culture vigoureusement (à chaque intervalle deux ou trois tubes sont répliqués sur milieux spécifiques pour analyse). Pour qu'un exconjugant puisse acquérir les gènes du donneur le fragment d'ADN doit se recombiner avec le chromosome du receveur. L'ordre et le temps de transfert des gènes peuvent être déterminés parce qu'ils sont le reflet direct de l'ordre des gènes sur le chromosome bactérien. La carte globale est ajustée en 100 minutes, bien que le transfert complet puisse exiger plus de 100 minutes. En un sens, les minutes sont une indication de distance sur la carte et non pas strictement une mesure du temps. D'ailleurs le temps zéro est fixé à l'entrée du locus de la thréonine (Thr).

4-5- Nouveaux transferts génétiques horizontaux chez les bactéries

Les GTA (gene transfer agent) ont été mis en évidence pour la première fois chez *Rhodobacter capsulatus*, répandu chez les alphas protéobactéries dans les milieux marins. Plus petits que des phages, ces particules virales qui ont sans doute perdu leurs capacité de propagation : ni infection, ni lyse possèdent des gènes homologues aux gènes viraux, et une structure similaire. Les ADN transférés peuvent varier de 4.1 à 14 Kpb. Ces GTA semblent fonctionner uniquement pour la médiation de l'échange de gènes (Lang et Beatty, 2007).

V- Enzymes de restriction

Introduction

Les nucléases sont des enzymes spécialisées dans la dégradation des acides nucléiques par découpages non aléatoire de génome. Il existe deux grandes catégories de nucléases caractérisées selon leur mode d'action. (i) Les **exonucléases** qui dégradent par excision du nucléotide situé en extrémité de chaîne, habituellement à partir de l'extrémité 3' ; (ii) et les **endonucléases** qui coupent des liaisons phosphodiester à l'intérieur même de la chaîne d'ADN.

Parmi ces endonucléases, certaines sont non spécifiques et hydrolysent des liaisons phosphodiester au hasard, tandis que d'autres hydrolysent des liaisons phosphodiester uniquement à l'intérieur de sites spécifiques reconnue par l'enzyme. Cette dernière est communément appelée **endonucléase de restriction**.

Dans les années 1960, les biologistes ont élucidé la base biochimique du phénomène restriction et de modification de l'hôte, par la purification de l'endonucléase de restriction d '*Escherichia coli* K12 par Yuan et Meselson (1968). Cela a soulevé la perspective d'une manipulation contrôlée de l'ADN. Cette endonucléase a été utilisé pour couper l'ADN non modifié *in vitro*. Malheureusement, celle-ci clive l'ADN à un site "aléatoire" éloigné du site de reconnaissance de plusieurs kilobases (Yuan et al., 1980). Ce qui a suscité l'exploration pour la mise en évidence d'enzymes plus précises.

5-1- Les systèmes de restriction/modification

Quatre systèmes de restriction/modification ont été décrits, selon leurs modes et sites d'action (tableau : 3). Cependant un seul système est largement exploité dans les manipulations génétiques *in vitro* ; c'est le type II pour la précision du clivage, et son indépendance vis-à-vis des cofacteurs énergétiques.

Tableau 3: Les caractéristiques des différents types d'endonucléases (Primrose, 2006)

Type I : Une enzyme avec différentes sous-unités de reconnaissance, le clivage et la méthylation. Reconnaît et méthyle une seule séquence, mais clive l'ADN jusqu'à 1000 pb plus loin (nécessite de l'ATP)

Type II : deux enzymes différentes qui reconnaissent à la fois la même séquence cible qui est symétrique. Les deux enzymes clivent et/ou modifie ou non la séquence de reconnaissance(ne nécessite pas d'ATP, et coupe au niveau de courtes séquences palindromiques de 4 à 8 pb)

Type III: Une enzyme avec deux sous-unités différentes, l'une pour la reconnaissance et la modification et une pour le clivage. Reconnaît et méthyle la même séquence, mais clive 24-26 pb plus loin (nécessite de l'ATP)

Type IIS : Deux enzymes différentes, mais la séquence de reconnaissance est asymétrique. Le clivage se produit sur un côté de la séquence de reconnaissance jusqu'à 20 pb plus loin.

5-2-Nomenclature

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

- Le nom de l'espèce de l'organisme hôte est identifié par la première lettre du nom du genre et des deux premières lettres de l'épithète spécifique pour une abréviation de trois lettres (tableau 4). Cette abréviation est toujours en italique.

Exemple: *EcoR1*

Genre: *Escherichia*

espèce: *coli*

Souche: R

Ordre de découverte: 1

- Lorsqu'une souche particulière a été la source de cette enzyme, celle-ci est alors identifiée.
- Lorsqu'il est nécessaire de faire la distinction entre les activités de restriction et de méthylation, les préfixes "R" et "M" respectivement sont utilisés, exemple: R.SmaI et M.SmaI.

Nb : Les endonucléases codées par un intron ont le préfixe "I-" (par exemple I-CeuI) ou l'intéine ont le préfixe "PI-" (par exemple PI-PspI).

Tableau 4 : Exemples de nomenclature des enzymes de restriction (Primrose, 2006).

Enzyme	Origine de l'Enzyme
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i> , 1ère enzyme
<i>HaeIII</i>	<i>Hemophilus aegyptius</i> , 3ème enzyme
<i>HindII</i>	<i>Hemophilus influenzae</i> , souche d, 2ème enzyme
<i>HindIII</i>	<i>Hemophilus influenzae</i> , souche d, 3ème enzyme
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , souche H, 1ère enzyme

5-3- Séquences cibles et modes de clivage.

La plupart des endonucléases de restriction de type II, reconnaissent et clivent l'ADN dans des séquences particulières de quatre à huit nucléotides. Ces séquences ont un double axe de symétrie de rotation, sont similaires mais inversées : appelés palindromes (fig. 36 a). Ces enzymes reconnaissent modifient et clivent des séquences différentes.

La position à laquelle l'enzyme de restriction coupe est généralement représenté par le symbole "/" et les nucléotides méthylés (fig. 36 b) par l'enzyme de modification sont habituellement marqué d'un astérisque(*). EcoRI génère des brins monocaténaire à quatre bases complémentaires avec des extrémités 5' libres. D'autres enzymes comme *XmnI*, génèrent des extrémités franches (fig.36 c). Ce clivage est une hydrolyse directe par l'attaque nucléophile de l'atome de phosphore en présence de Mg^{2+} .

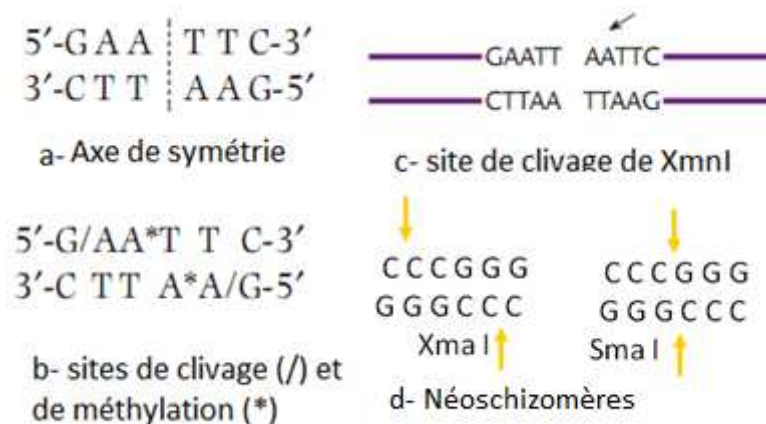


Figure 36 : Séquence Palindromique cible des enzymes de restriction.

(a et b) : d'*EcoRI*, (c) : de *XmnI*, (d) Néoschizomères.

Les enzymes de restriction qui possèdent le même site de reconnaissance et clivent ce site de manière similaire sont des **Isoschizomères**. Par contre, celles qui possèdent le même site de reconnaissance mais clivent différemment l'ADN sont des **Neoschizomères**. Exp: *SmaI* et *XmaI* (fig.36 d)

5-4- Rôle des systèmes de restriction/modification

Les systèmes de restriction permettent aux bactéries de surveiller l'origine de l'ADN entrant et de le détruire s'il est reconnu comme étranger. Les endonucléases de restriction reconnaissent spécifiquement des séquences dans l'ADN entrant et clivent l'ADN en fragments (fig. 37a), soit à des sites spécifiques ou plus aléatoire. La méthylation peut réduire la sensibilité des ADN au clivage par des endonucléases de restriction et l'efficacité de la transformation de l'ADN (fig.37 b). Quelques sites sinon tous sont résistants au clivage par les endonucléases, lorsqu'ils proviennent de souches possédant les méthylase Dcm (méthyle les résidus cytosine) ou Dam (méthyle les résidus adénine).

5-5- Applications des enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des ciseaux moléculaires et qui sont largement utilisés dans de nombreux domaines. Dans ce qui suit nous détaillerons les principaux domaines de leurs utilisations.

5-5-1- Technologie de l'ADN recombinant

Les enzymes de restriction sont utilisés en biotechnologie pour l'insertion de gènes ou de fragment d'ADN dans des molécules appartenant à d'autres organismes. Ces enzymes génèrent des extrémités

qui peuvent s'apparier entre elles. Ainsi un gène de résistance aux champignons est cloné dans un plasmide.

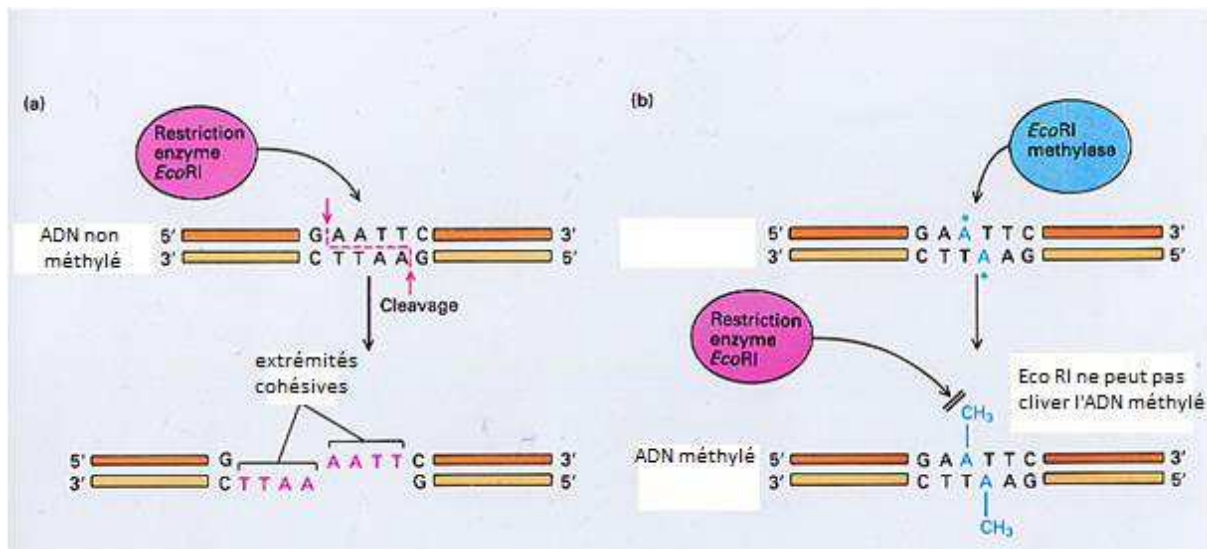


Figure 37 : Système restriction/modification *Eco RI*, (a) restriction, (b) modification.

5-5-2- Cartographie de restriction

En utilisant les propriétés des enzymes de restriction, qui reconnaissent des points précis du génome au nucléotide près, l'identification des sites de coupure permet d'établir une carte extrêmement détaillée appelée carte de restriction. Ce qui fournit des informations utiles pour la caractérisation des molécules d'ADN (fig.38). Cette cartographie a trouvée de nombreuses applications, comme la détection d'une maladie génétique, en médecine légale, recherche de la paternité. En effet, la RFLP (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction) couplé à une PCR permet l'établissement de l'empreinte génétique. Après isolement et purification de l'ADN, celui-ci est incubé avec différentes enzymes de restriction. Les produits de digestion sont alors séparés par électrophorèse et comparés avec un marqueur de taille lorsqu'il s'agit de déterminer les fragments d'un gène donné. Ou avec les produits de digestion de l'ADN (i) d'une personne saine (prévalence d'une maladie) ; (ii) du suspect (médecine légale) ; (iii) de l'ADN parental (paternité).

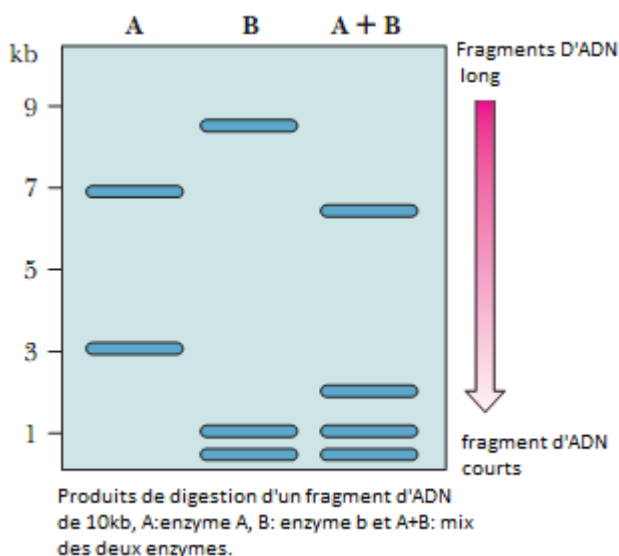


Figure 38 : Fragments d'ADN obtenus après digestion avec l'enzyme (A), (B) et (A+B).

VI – Régulation de l'expression des gènes :

La régulation de l'expression d'un gène (la synthèse de son produit protéique), est souvent appelé régulation génique. Cette régulation concerne soit la transcription de l'ADN en ARN, ou la traduction d'ARN en protéine. En fait, la régulation des gènes s'effectue à de nombreux autres niveaux : la stabilité de l'ARNm, les modifications post-traductionnelles des protéines. Cependant, la plupart des régulations s'effectuent au niveau de la transcription génique.

Les protéines peuvent directement ou indirectement aider l'ARN polymérase à se lier au site d'initiation de la transcription (au Promoteur), comme elles peuvent réprimer la transcription par la liaison de l'ARN polymérase (fig. 39).

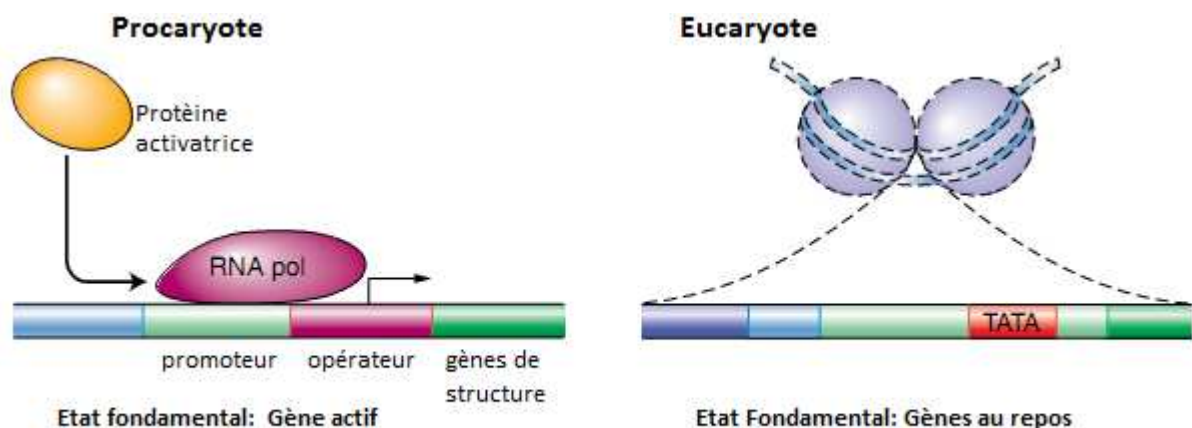
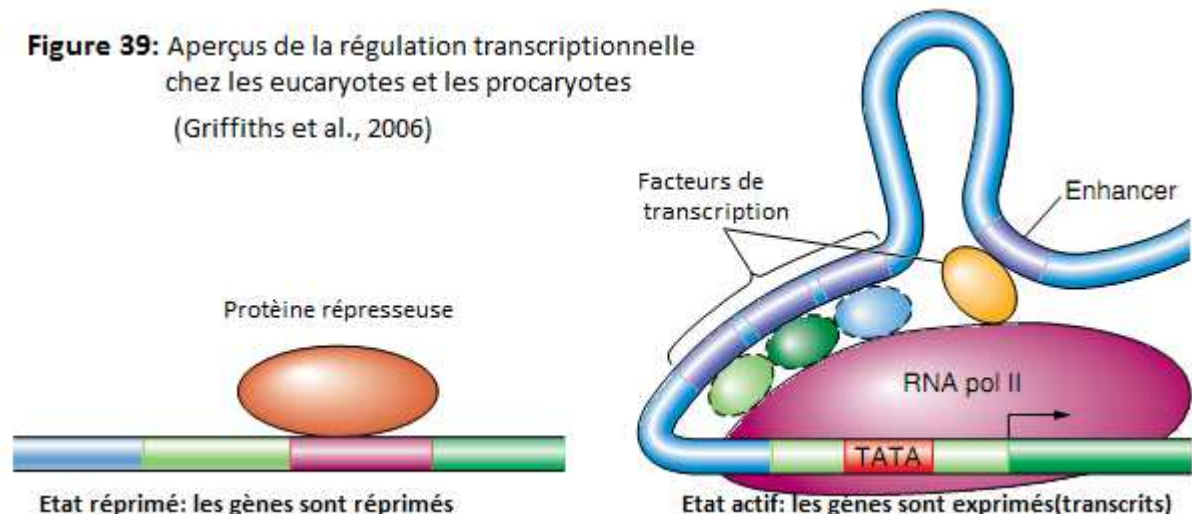


Figure 39: Aperçus de la régulation transcriptionnelle chez les eucaryotes et les procaryotes (Griffiths et al., 2006)



6-1- Régulation transcriptionnelle

6-1-1-Notion d'opéron

En 1961, François Jacob et Jacques Monod ont proposé l'hypothèse de l'opéron pour expliquer la régulation coordonnée des enzymes métaboliques. L'opéron est considéré comme étant l'unité d'expression génique, consistant en deux classes de gènes : les gènes de structure pour les enzymes et les gènes de régulation qui contrôlent l'expression des gènes structuraux. Les deux types de gènes ont pu être distingués par mutation. Des mutations dans un gène de structure aboliraient une activité enzymatique particulière, mais des mutations dans un gène régulateur auraient une

incidence sur l'ensemble des différentes enzymes sous son contrôle. Des mutations de ces deux types sont connues chez *E. coli* pour le métabolisme du lactose.

Chez les bactéries, les gènes codant pour les enzymes d'une voie métabolique particulière sont souvent groupées adjacents les uns aux autres dans une structure sur le chromosome.

Ce modèle d'organisation permet à tous les gènes du groupe d'être exprimé de manière coordonnée et transcrits en un seul **ARNm polycistronique** codant pour toutes les enzymes de la voie métabolique.

Une séquence régulatrice se trouvant adjacente aux gènes détermine si la transcription a lieu ou non. Cette séquence est appelée **opérateur**. L'opérateur est situé à côté d'un **promoteur**. L'interaction d'une protéine régulatrice avec le groupe de gènes contrôle la transcription par l'opérateur, et donc l'accès de l'ARN polymérase au promoteur.

6-1-2- Régulation négative

La transcription des Opérons chez les procaryotes est contrôlée par **induction** et **répression**. L'expression de l'opéron est déterminée par l'accès de l'ARN polymérase au promoteur, et l'occupation de l'opérateur par des protéines régulatrices influençant cet accès. L'**Induction** active la transcription à partir du promoteur ; alors que la **répression** l'empêche (fig.40).

6-1-3- Régulation positive

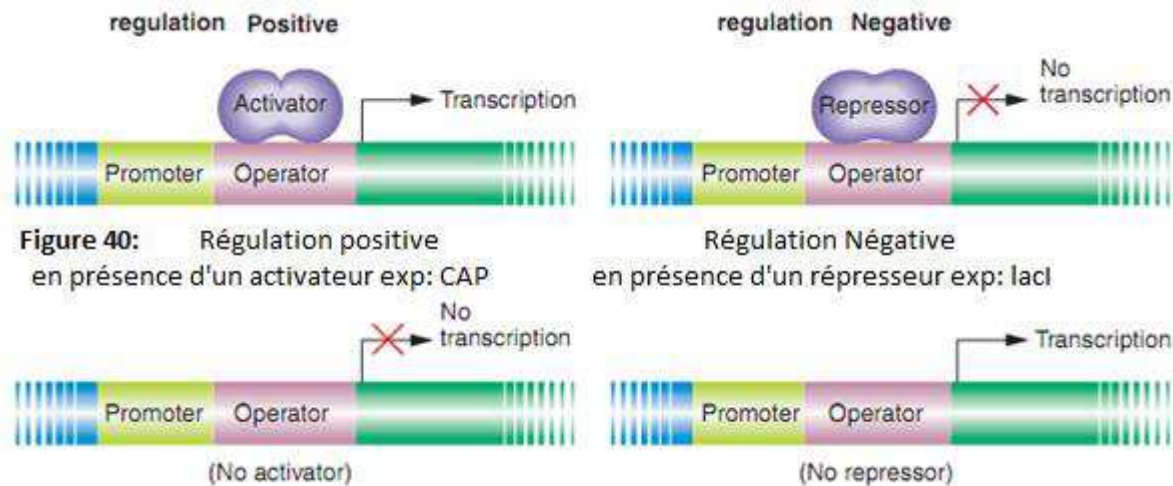
La transcription par l'ARN polymérase de certains promoteurs se fait avec une faible efficacité, à moins d'être assistée par une protéine accessoire qui agit comme un régulateur positif. Une telle protéine est dite CAP, ou protéine activatrice du catabolisme. La CAP forme un complexe avec deux unités d'AMP cyclique, ce complexe fait que l'ADN se courbe à plus de 90 °. Cette courbure de l'ADN près du promoteur aide à la liaison de l'holoenzyme de l'ARN polymérase au complexe fermé du promoteur. Les contacts établis entre le complexe CAP- (cAMP) 2 et le sous-groupe de L'holoenzyme de l'ARN polymérase active ainsi la transcription (fig.40).

6-1-4- Les systèmes de contrôle négatifs et positifs sont fondamentalement différents

L'opéron Lac sert de modèle à tous les opérons. Les systèmes de contrôle négatif et positif fonctionnent de manière fondamentalement différente. Bien que dans certains cas ils régissent l'expression du même gène. Les gènes sous contrôle négatif sont transcrits à moins qu'ils ne soient en présence d'un Répresseur. Souvent, l'activation de la transcription survient simplement suite à la libération de la molécule impliquée dans le contrôle négatif. En revanche, les gènes sous contrôle positif ne sont exprimés que si une Protéine régulatrice est présente. L'opéron lac illustre ces différences. L'action du répresseur lac est négative. Il se lie à l'opérateur et bloque la transcription. En revanche, la régulation de l'opéron lac par CAP est positive: La transcription de l'opéron par l'ARN polymérase est stimulée par l'action de la CAP qui est le régulateur positif (fig.40).

6-1-4-1- Opéron lactose

Le répresseur *lacI* est un régulateur négatif de l'opéron lactose. Autrement dit, les gènes de structure (*lacZ*, *lacY* et *LacA*) de l'opéron lactose sont transcrits en un ARNm, à moins d'être désactivés par le produit du gène *lacI*. Ce produit génique est le répresseur lac, une protéine tétramère (360 résidus/monomère) ; où chaque monomère peut lier une molécule inductrice (lactose), induisant ainsi un changement de sa conformation et aboutissant à son détachement de l'opérateur.



Les bactéries avec des mutations soit dans le gène *lacZ* ou le gène *lacY* ne peuvent plus métaboliser le lactose (souches *lacZ*-, absence de l'activité β -galactosidase et les mutants *lacY* parce que le lactose n'est plus transporté dans la cellule). Les mutants *lacI* différents, car ils expriment l'activité β -galactosidase de manière constitutive et le Lactose est immédiatement transporté, sans exposition préalable à un inducteur (fig. 44).

Nb: Inducteurs et co-répresseurs sont de petites molécules ou métabolites; alors que les répresseurs sont des protéines.

6-1-4-2- L'opéron arabinose

Les gènes B A et D ensemble de gènes de structure, constituent, en plus d'un gène codant une protéine dimère régulatrice AraC situé en amont, avec les sites I et O l'opéron arabinose. La protéine AraC possède un **Double Contrôle** (positif et négatif), sur l'opéron arabinose. L'opéron arabinose a trois Sites de liaison pour AraC: *araO1*, *araO2* et *ara I*: promoteur *araBAD*. Le site *araI* se compose de deux «demi-sites»: *araI1* et *araI2*.

En présence d'arabinose, les sous unités de la protéine AraC sont liés d'une part à l'arabinose et le complexe CAP-APMc2, et d'autre part sont liés au promoteur dans la région *araI*. Le complexe CAP-cAMP se lie aussi à un site adjacent à *araI*. Cette liaison stimule la transcription des gènes *araB*, *araA* et *araD* (contrôle positif) par la médiation de la fixation de l'ARN polymérase au promoteur.

En absence d'arabinose, le dimère de la protéine AraC change de conformation et se lie à la fois aux régions *araI* et *araO*, formant ainsi une boucle dans l'ADN. L'ARN polymérase ne peut plus accéder au promoteur. Cette liaison empêche la transcription de l'opéron (fig. 44).

Nb : Tant que le glucose est présent, **TOUTES** les enzymes cataboliques sont réprimées. Le glucose inhibe la synthèse de l'AMPc par l'adénylate cyclase, et favorise son transport à l'extérieur de la cellule : c'est une répression catabolique par diminution de l'AMPc.

6-1-5- Régulation de la transcription chez *Saccharomyces*

Nombreuses sont les caractéristiques de la transcription et sa régulation, communes aux Procaryotes et aux Eucaryotes. Comme les gènes procaryotes, la plupart des gènes eucaryotes sont contrôlés au niveau de la transcription, et certains mécanismes de régulation transcriptionnelle sont semblables à ceux trouvés chez les bactéries.

Cependant certaines différences existent.

- (i) Chez les procaryotes, tous les gènes sont transcrits en ARN Par la même ARN polymérase, alors que trois ARN Polymérases fonctionnent chez les eucaryotes, et sont constituées de 10 sous unités (voir plus), la plupart de petites sous-unités, elles ont cependant en commun deux grandes sous-unités homologues aux $\beta\beta'$ procaryotes.
- (ii) ARN Polymérase II, qui transcrit les ARNm, les extrémités 5' et 3' sont modifiées et les introns sont épissés.
- (iii) L'ARN polymérase II, est beaucoup plus grand et plus Complexe que son homologue procaryote.
- (iv) Les trois enzymes se trouvent dans le noyau, chacune d'entre elles synthétisant une classe différente d'ARN. ARN polymérase I est localisé dans le nucléole et transcrit les principaux gènes d'ARN ribosomique. L'ARN polymérase III transcrit les gènes de l'ARNt, l'ARNr 5S, et une variété d'autres petits ARN, la modification des ARNm et le transport des protéines.

La régulation chez les eucaryotes repose également sur des protéines régulatrices qui se lient à des séquences cibles régulatrices agissant en cis sur la molécule d'ADN, ces protéines régulatrices déterminent le niveau de transcription d'un gène en contrôlant la liaison de l'ARN polymérase au promoteur du gène.

6-1-5-1- Éléments agissant en Cis

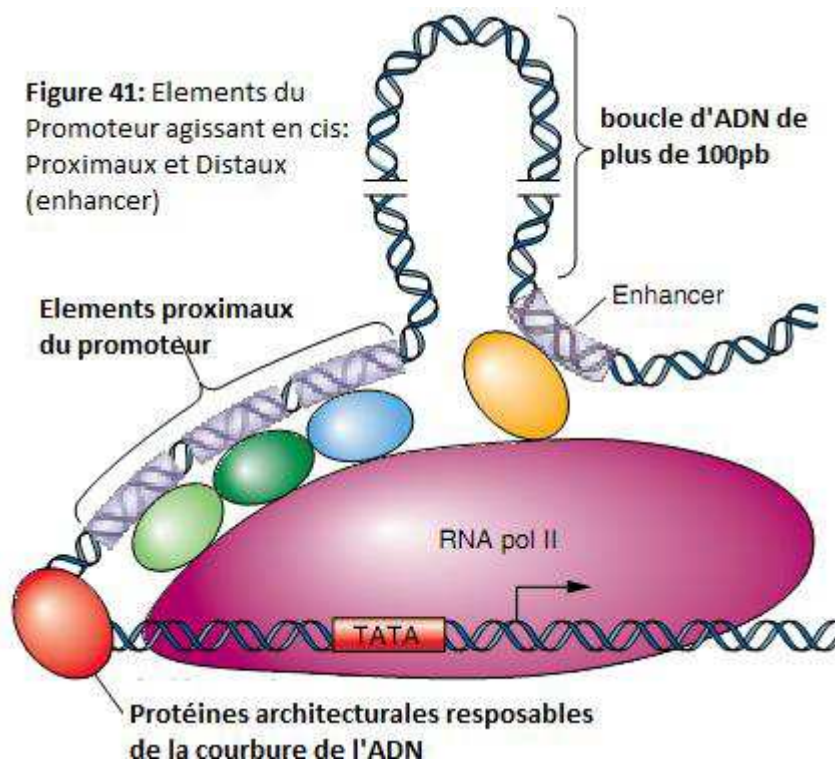
Les gènes eucaryotes sont généralement exprimés à des niveaux élevés dans seulement un ensemble de tissus ou en réponse à un signal tel qu'une hormone ou un agent pathogène. Chez les Eucaryotes, on distingue deux classes d'éléments agissant en *cis*, qui peuvent exercer leurs effets sur le promoteur (fig.41). Les amplificateurs (*Enhancers*) sont des séquences d'ADN qui peuvent augmenter considérablement les taux de transcription à partir de promoteurs sur la même molécule d'ADN; Ainsi, ils activent, ou régulent positivement, la transcription. Les *Silencers* ont un effet inverse, ce sont aussi des séquences auxquelles sont liés des répresseurs, réprimant ainsi les activateurs et réduisant la transcription.

Les amplificateurs et les silencers sont semblables aux régions proximales du promoteur: ce sont des séquences auxquelles s'attachent des protéines régulatrices (MARs : Matrix Attachment Regions, permettant de délimiter différentes régions chromosomiques). Elles se distinguent des éléments proximaux du promoteur, par leur capacité d'agir à distance (régions régulatrices distales), parfois 50 kb ou plus, et par leur capacité à opérer soit en amont ou en aval du promoteur qu'ils contrôlent. Les éléments amplificateurs sont structurés (composés) en de multiples sites de liaison pour de nombreuses protéines régulatrices agissant en *trans*. Les interactions entre les protéines régulatrices ou entre les protéines régulatrices et le complexe ARN polymerase II détermine le taux de transcription.

6-1-5-2- Mécanisme de régulation

La liaison de l'ARN polymerase II à son promoteur ne produit pas une transcription efficace par elle-même. La transcription est améliorée lorsque des facteurs de transcription se lient aux éléments promoteurs-proximaux (Upstream Promoteurs Éléments ou **UPE**) qui se trouvent dans une région de -100 à -200 pb en amont du site d'initiation de la transcription. Un de ces **UPE** est la boîte CCAAT, et souvent un autre segment riche en GC- plus en amont (fig.42). Les facteurs de transcription qui se lient aux éléments proximaux du promoteur sont constitutivement exprimés, dans toutes les cellules en tout temps. Ils peuvent activer la transcription dans tous les types de cellules.

Cette région régulatrice proximale correspond au « core promoteur » où vient se fixer la machinerie responsable de la transcription des gènes.



Une boucle d'ADN regroupe des protéines activatrices liées à des UPE, d'autres protéines activatrices liées aux enhancers distaux, leurs permettent ainsi d'interagir afin d'améliorer leur efficacité en stabilisant le complexe d'initiation de l'ARN polymérase II lié à la Boîte TATA et l'ADN environnant. La courbure ou la boucle d'ADN nécessite une classe spéciale de protéines, connues sous le nom de protéines architecturales (fig.41).

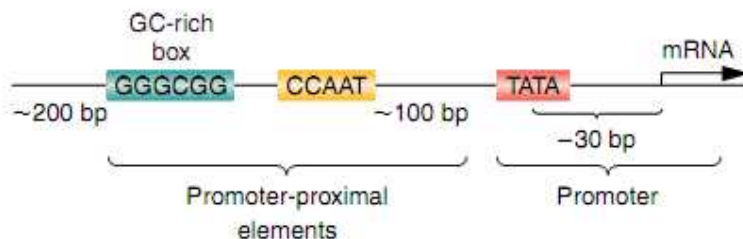


Figure 42: Séquences proximales du promoteur (UPE)

6-1-5-3- Rôle du Médiateur dans la régulation de la transcription des gènes eucaryotes.

La clé de l'activation des gènes eucaryotes est l'assemblage des facteurs de transcription (enzymes architecturales) en un *enhanceosome* ou médiateur à 100pb en amont de la boîte TATA et du site d'initiation de la transcription. Cet *enhanceosome* est une grande protéine complexe d'une vingtaine de sous unités avec de multiples sites de liaison, qui agit de manière synergique pour activer la transcription à des niveaux très élevés, ou encore la réprimer.

En effet, pour l'activation de la transcription le médiateur sert de pont entre les co-activateurs de transcription spécifiques liés aux amplificateurs (enhancers) et l'ARN polymérase II / GTF (general transcription factors) liés au promoteur (fig. 43 a) .

Alors que lorsqu'il est présent en tant que répresseur, il interagit avec un co-répresseur lié à un silencer, il relie le sous-complexe répressif (MED12 MED13 CycC / CDK8), et ne peut lier l'ARN polymérase II et les GTF au promoteur, l'expression du promoteur est alors réprimée (fig. 43 b).

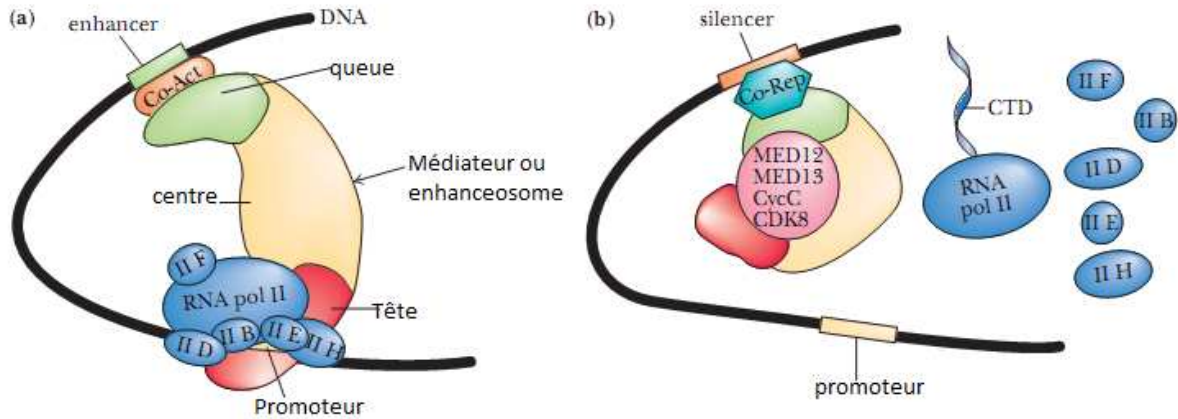


Figure 43: a) Pont formé par l'enhanceosome entre le co-activateur lié à l'enhancer, et l'ARN pol II/GTF liés au promoteur (**activation**) b) liaison de l'enhanceosome au co-répresseur lié au silencer (**répression**)

6-2- Régulation traductionnelle.

L'opéron tryptophane est un opéron impliqué dans l'anabolisme régulé par deux **mécanismes distincts** (i) par régulation négative : association du tryptophane (produit final de la voie anabolique) avec une protéine régulatrice répresseur jusqu'alors inactive qui réprime cette voie (fig. 44); (ii) par atténuation : terminaison précoce de la traduction.

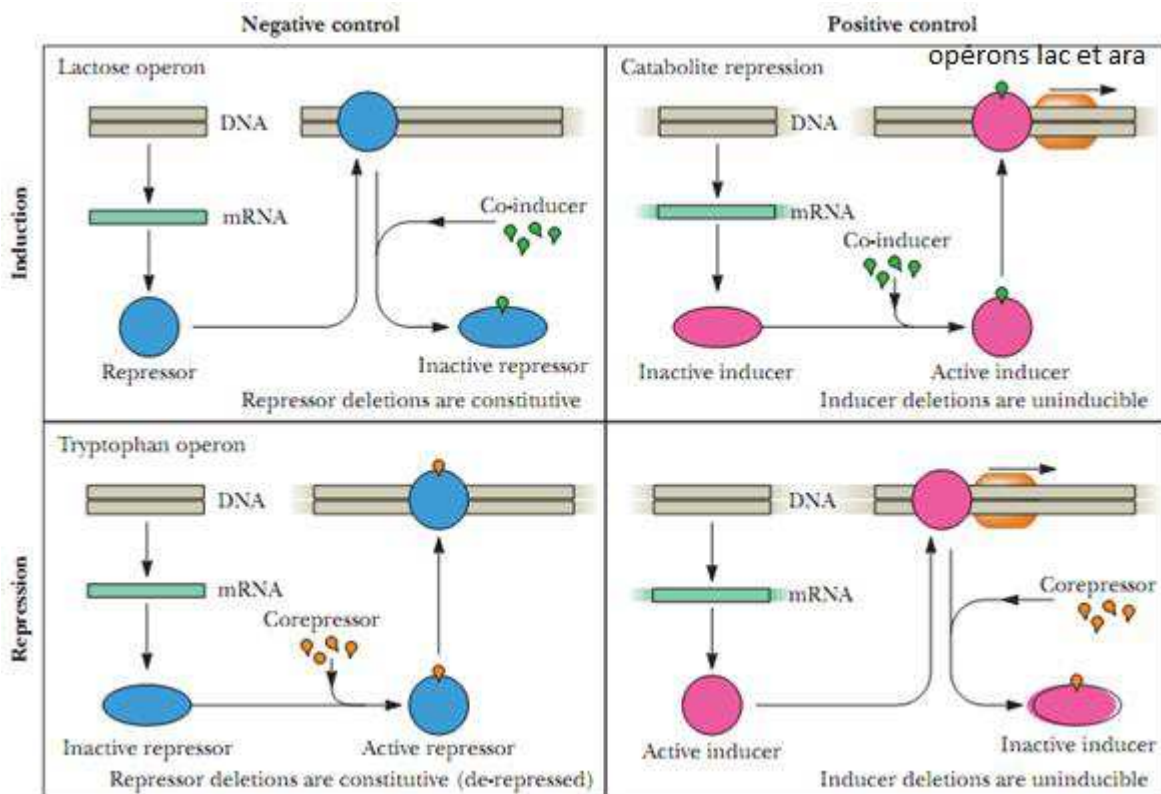


Figure 44 : Régulation des opérons par répression et activation catabolique (lac :lactose et ara :arabinose).

Comme les autres opérons déjà étudiés, l'opéron tryptophane est constitué de gènes régulateurs (P, O et L) situés en amont de gènes de structure (*trpE*,, *trpA*). La séquence guide ou leader (L) code pour un peptide court contenant deux résidus tryptophane, et possédant près de son extrémité un codon stop après un résidu Serine. Cette séquence serait impliquée dans l'atténuation de la traduction des ARNm.

6-2-1-Contrôle de la transcription des gènes structuraux de l'opéron Tryptophane (*trp*) par Atténuation chez *Escherichia Coli*.

Lorsque les concentrations en acides aminés (histidine, thréonine, phénylalanine, tryptophaneetc), sont suffisantes la cellule bactérienne fait appel à un mode de régulation pour stopper la synthèse de cet acide aminé. En plus de la répression induite par le tryptophane lorsqu'il se fixe sur le répresseur, la cellule va atténuer la traduction de l'ARNm (fig. 45).

Chez la bactérie transcription et traduction se font en chœur, dès que l'ARNm apparaît les ribosomes s'y associent et initient la traduction. La première séquence traduite est une séquence non codante située en aval du promoteur appelée séquence guide, celle-ci est la clé de cette atténuation.

La séquence d'ARN m transcrite comprend quatre régions complémentaires notées : 1, 2, 3 et 4. Le peptide leader est codé par les régions 1 et 2 de l'ARNm. Des régions de la chaîne d'ARNm en croissance sont capables de s'apparier et de former des chaînes à double brin (épingles à cheveux): 2:3 (anti-terminateur), 3:4 (terminateur).

Lorsqu'il ya excès de tryptophane, le ribosome traduit le peptide leader au complet, et donc la région 2 ne peut pas s'apparier avec la région 3. Ce sont les régions 3 et 4 qui s'apparient pour former une épingle qui termine la transcription (car le ribosome rencontre une séquence poly UU).

Le manque de tryptophane bloque la traduction, le ribosome s'arrête momentanément en 1, une boucle se forme par appariement de la région 2 avec la région 3, l'ARN polymérase continue sa transcription et passe au-delà de la séquence leader.

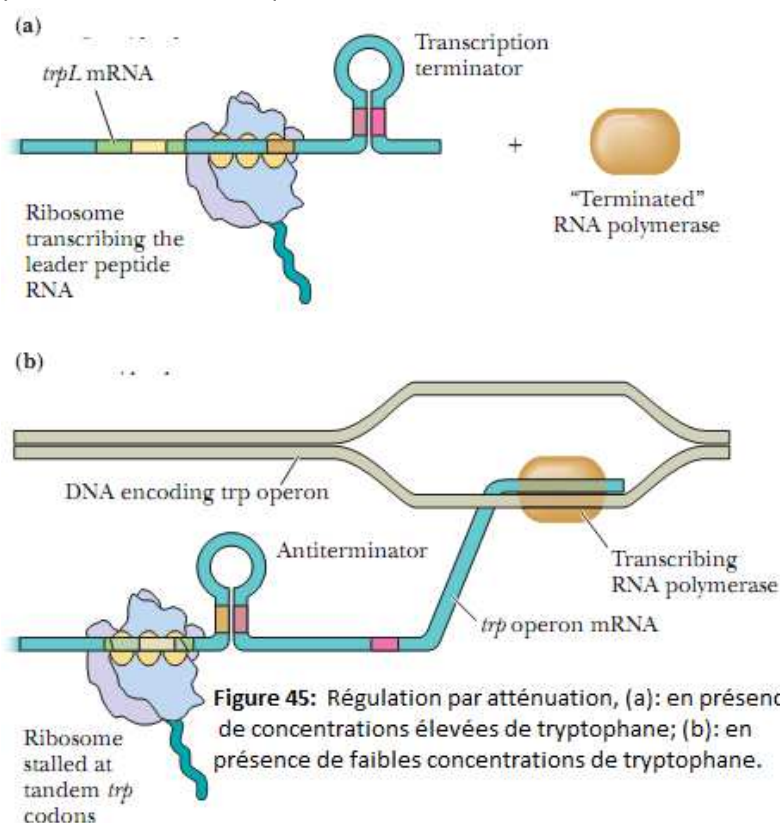


Figure 45: Régulation par atténuation, (a): en présence de concentrations élevées de tryptophane; (b): en présence de faibles concentrations de tryptophane.

VII. Bactériophages

7.1. Historique

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

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

7-2. Définition

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

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

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

7.3. Classification des bactériophages

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

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

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

Quatre critères essentiels sont retenus:

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

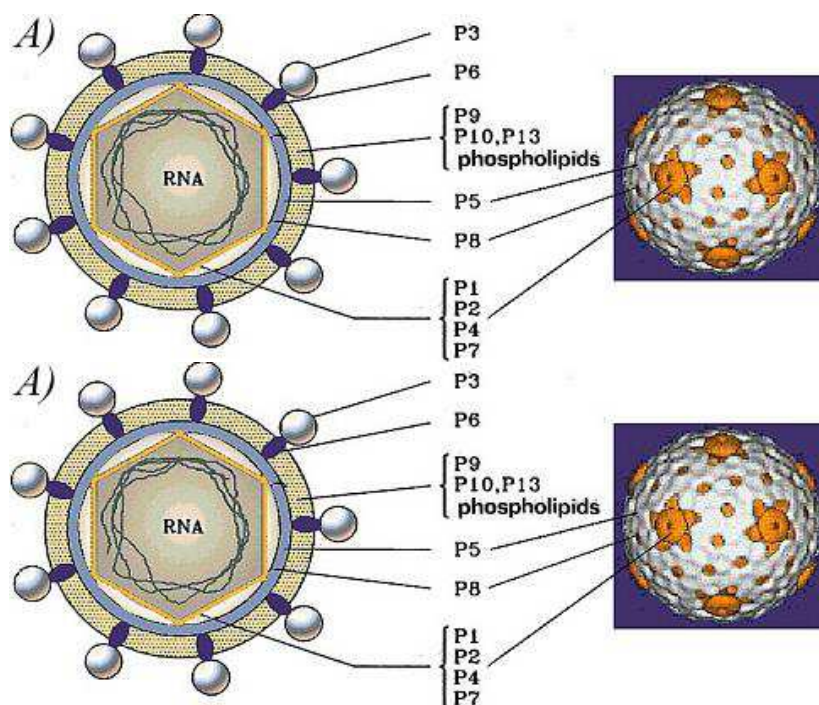
7.4. Structures du bactériophage

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

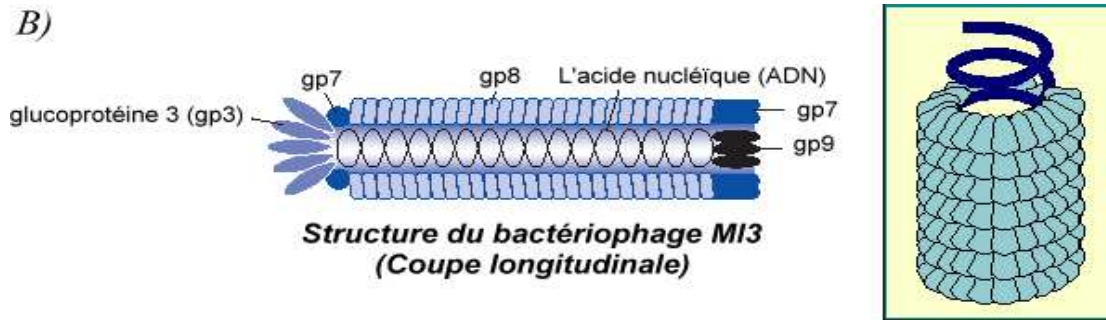
Actuellement on peut réunir les bactériophages en trois grands groupes morphologiques :

- cubique.
- Filamenteux.
- Mixte.

Le phage lambda (λ) par exemple est un virus à structure mixte. Le diamètre de la tête est de 100 nm. Les virions sont constitués par 12 protéines structurales localisées dans l'enveloppe (P9, P10 et P13), Peplomers (P3 et P6), nucléocapside (P8 et P5), complexe polymérase (P1, P2, P4 et P7) et une protéine non structurale P12. Les protéines constituent environ 70% du poids de la particule.



Structure du Bactériophage Ø6



Structure du Bactériophage lambda

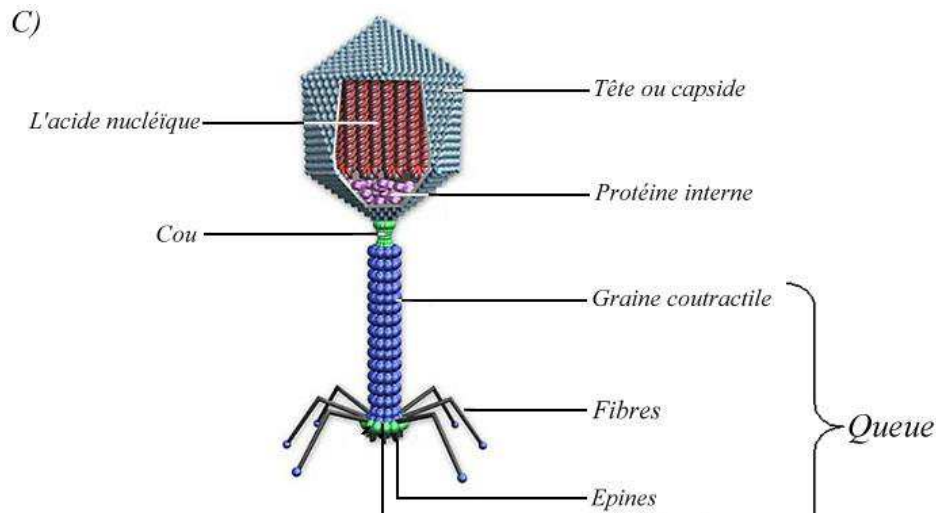


Figure 46: Différentes structures de Bactériophages (A) cubique (B) Filamenteux (C) Mixte

7.5. Cycle de multiplication du bactériophage

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

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

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

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

7.5.1. Le cycle de vie de lambda (λ)

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

7.5.1.1 L'adsorption du phage λ

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

7.5.1.2 L'injection de l'ADN λ

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

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

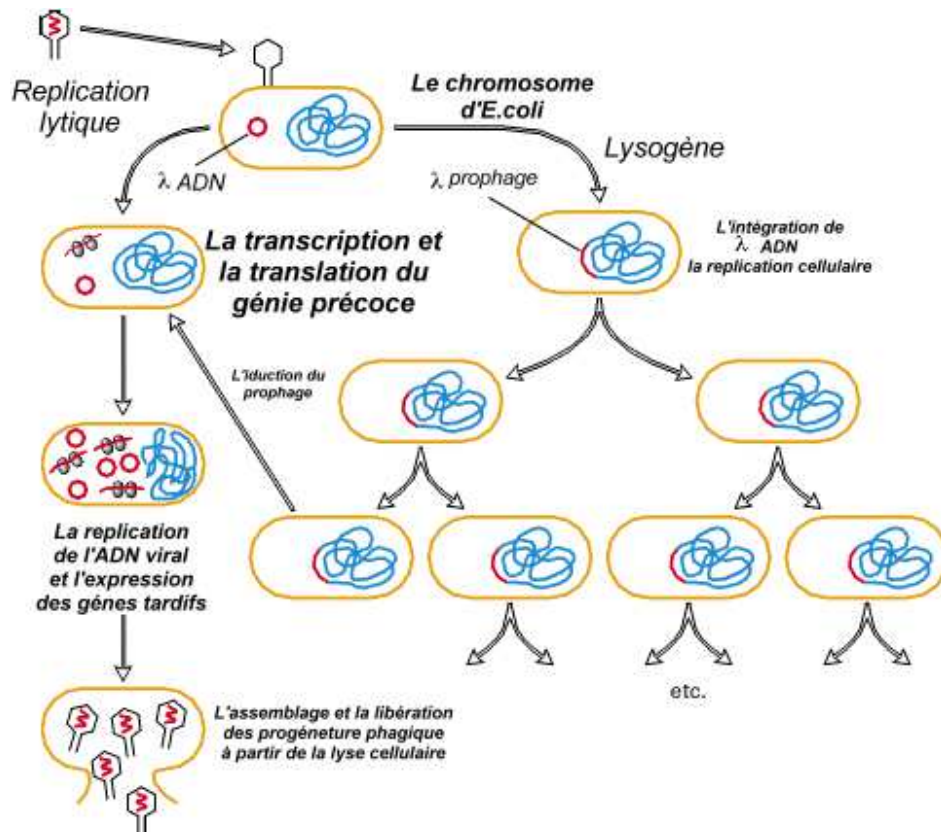


Figure 47: Cycle de vie d'un bactériophage tempéré (Ex: phage lambda (λ))

7.5.1.3 Protection du génome λ dans le cytoplasme

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

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

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

Le génome λ Contient 6 promoteurs majeurs nommés comme suit :

P_L : promoteur vers la gauche.

P_R : promoteur vers la droite.

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

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

P_I : promoteur d'intégration.

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

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

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

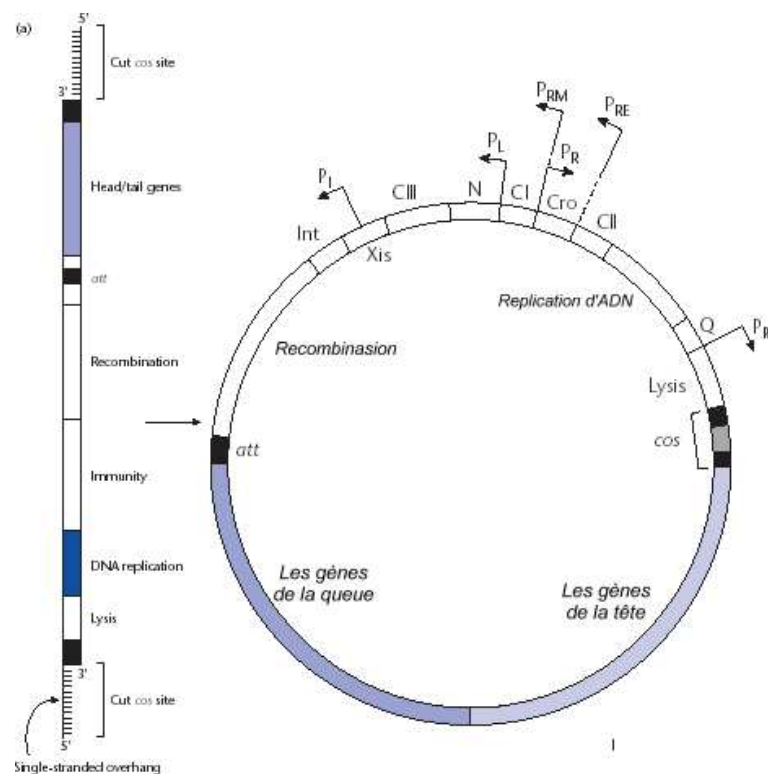


Figure 48: Organisation génétique du génome λ

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

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

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

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

7.5.1.5 λ et la décision lytique-lysogénique

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

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

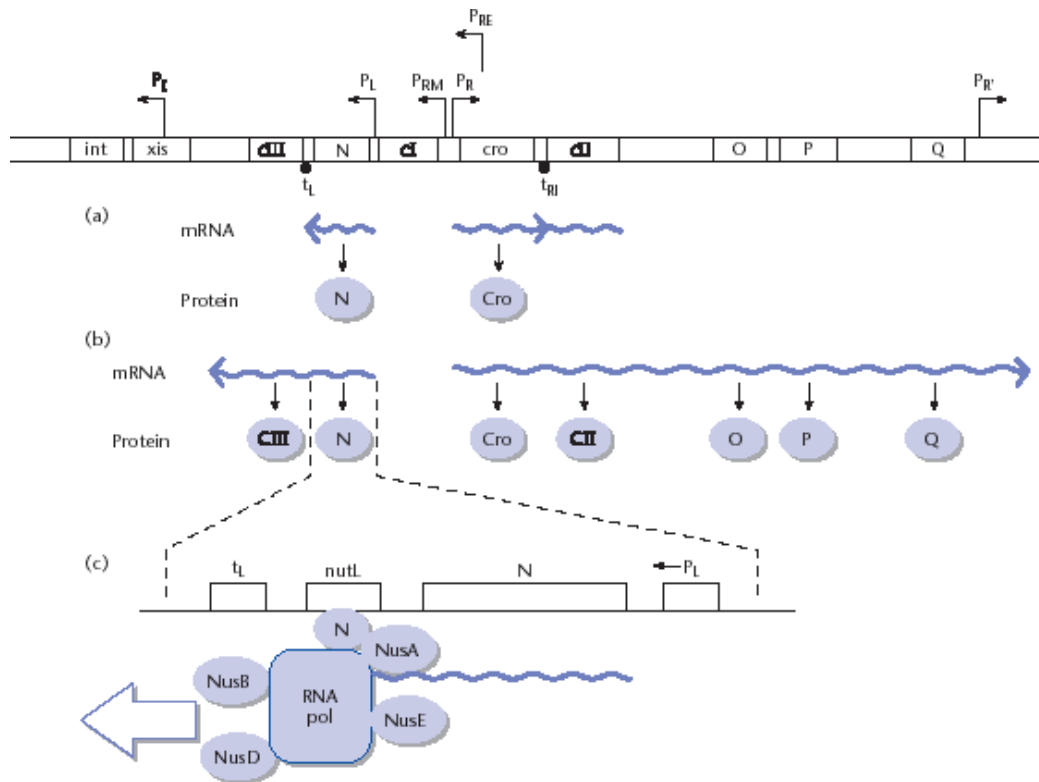


Figure 49: Événements transcriptionnels ayant lieu après l'infection par le phage λ

- Transcription à partir de P_L et P_R .
- La synthèse des protéines régulatrices.
- Décision: "lytique - lysogénique" du phage.

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

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

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

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

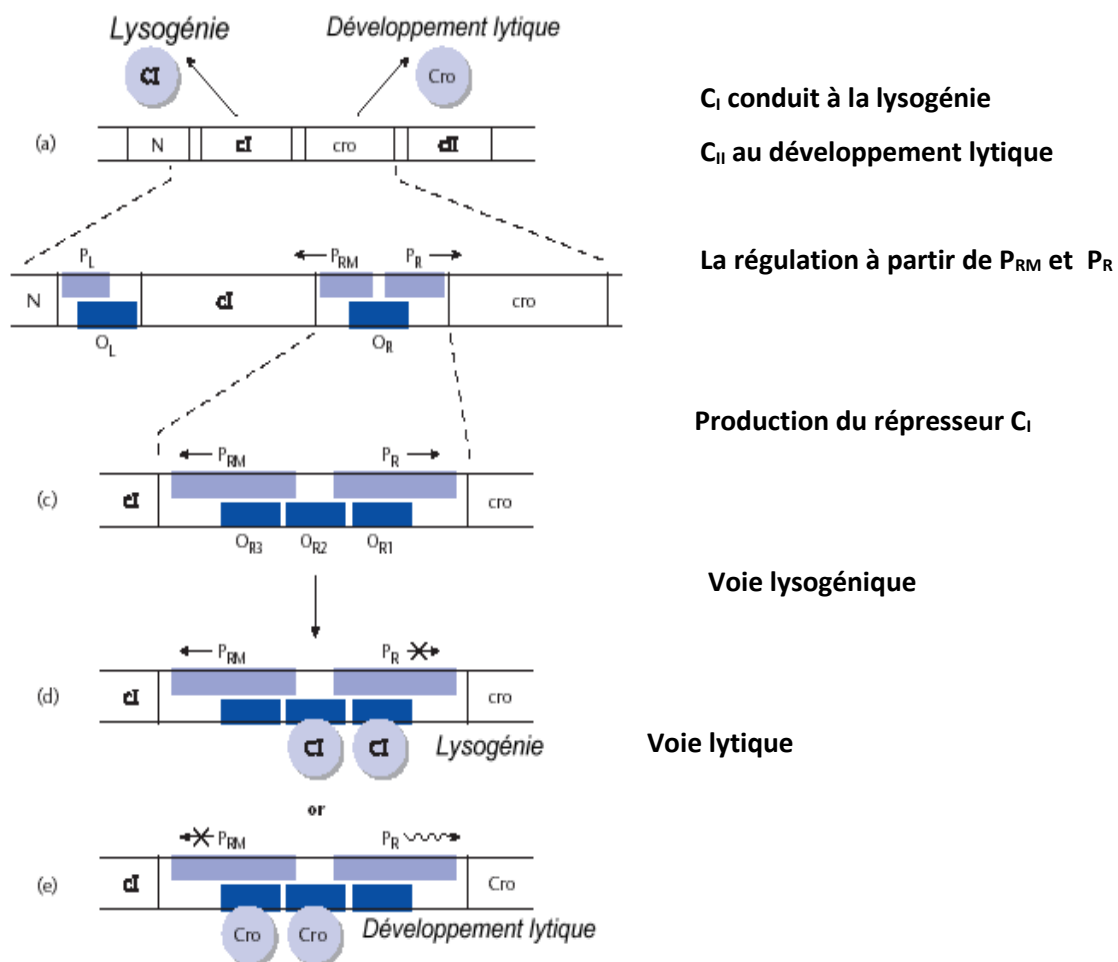
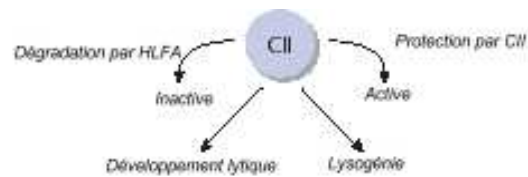


Figure 50 : transcriptions qui conduisent à prendre une décision lytique ou lysogénique . O_R est composé de trois séquences de 17 paires de bases O_{R1} , O_{R2} , O_{R3} .

(a)



(b)

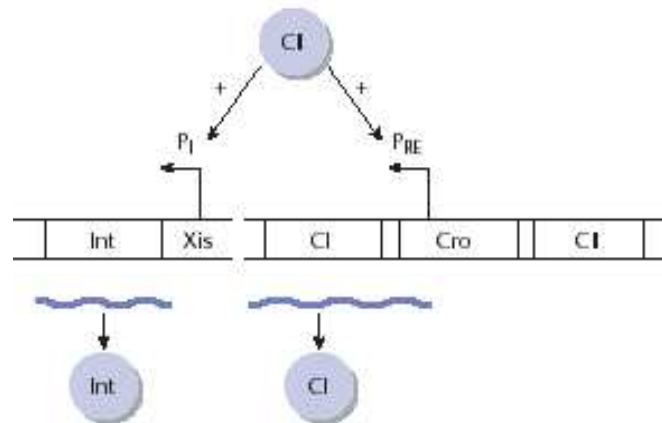


Figure 51: La protéine C_{II} facteur majeur de la décision cycle lytique ou lysogénique

a) La décision lytique - lysogénique du phage λ .

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

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

7.5.1.6 La voie lysogénique de λ

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

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

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

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

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

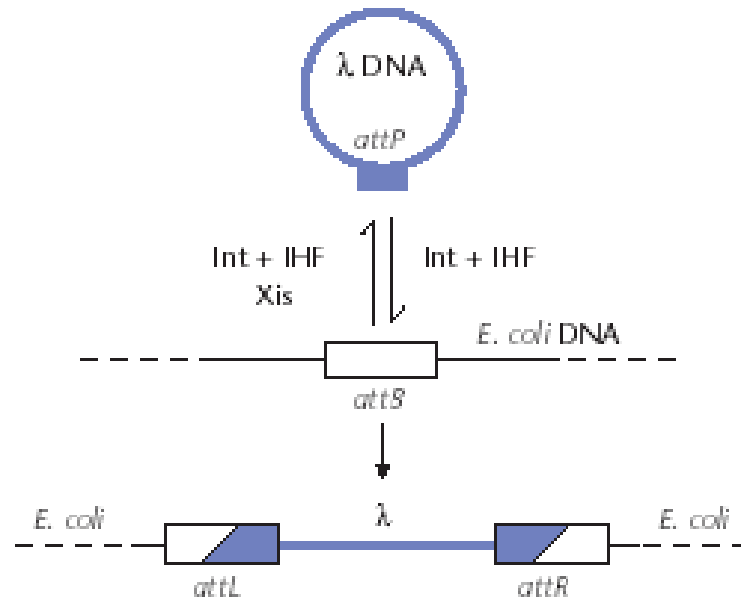


Figure 52: Les sites de recombinaison entre le phage λ et *E. coli*.

7.5.1.7 La voie lytique de λ :

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

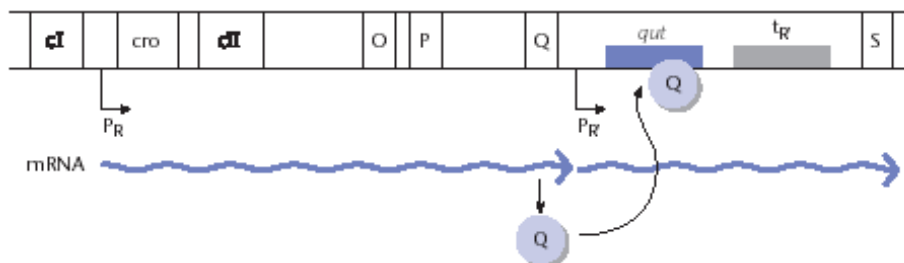


Figure 53: Initiation du cycle lytique du phage λ Par la protéine Q.

7.5.1.8 La réplication d'ADN durant la voie lytique :

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

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

matrice pour synthétiser de nouveaux brins négatifs.

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

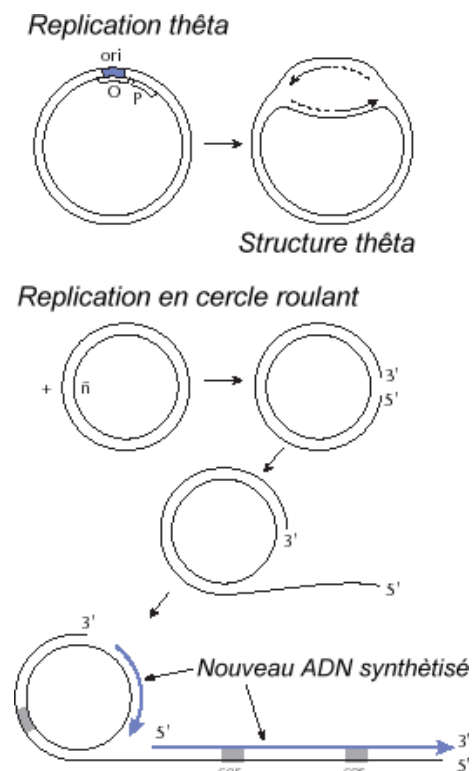


Figure 54: La réplication de l'ADN λ

Bibliographie

Carter, J. B. and Saunders, V. A. 2007. **Virology principles and applications**. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England.

Chen J. and Novick, R. P. 2009. **Phage-Mediated Intergeneric Transfer of Toxin Genes**. Science. 323 : 139-141.

Dale J. W. and Park S. F. 2010. **Molecular Genetics of Bacteria**. 5th edition. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication.

Garrett, R. H. and Grisham, C. M. 2010. **Biochemistry**. Fourth edition, Brooks/Cole, Cengage Learning. ISBN-13: 978-0-495-10935-8

Griffiths A. J.F., Wessler S. R., Lewontin R. C., Gelbart W. M., Suzuki D. T., Miller J. H. 2004. **An Introduction to Genetic Analysis**, Eighth Edition.

Lang, A. S., Zhaxybayeva, O. and Beatty, J. T. 2012. **Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange**. Nature Reviews Microbiology , 10: 472-482. doi:10.1038/nrmicro2802

Lang, A.S., Beatty, J. T. Microbiol. 2007. **Importance of wide spread gene transfer agent genes in alphaproteobacteria**; 15(2):54-62.

Madigan, M.T. , Martinko, J. M., Stahl, D.A. and Clark D. P. 2012. **Brock-Biology of Microorganisms** Thirteenth Edition. ISBN-13: 978-0-321-64963-8.

Prescott L. M. 2002. **Microbiology**. 5th Edition . The McGraw-Hill Companies, ISBN: 0-07-282905-2

Primrose, S.B. and Twyman R.M. 2006. **Principles of Gene Manipulation and Genomics**. Seventh edition. Blackwell Publishing.

Sakaguchi, K. and Okanishi, M. 1980. **Molecular Breeding and Genetics of Applied Microorganisms**. Kodansha Ltd. ISBN 0-12-615050-8.

Tortora, G. J., Funke, B. R. and Case, C.L. 2010. **Microbiology: an introduction** / - 10th ed. Publishing as Pearson Benjamin Cummings.