

**Université IBNOU ZOHR
Faculté des Sciences
Département de Biologie**

Filière : Sciences de la Vie

**Semestre 5
(2014-2015)**

Module de Microbiologie II

Génétique Microbienne

**Eléments de Cours & Illustrations
Travaux dirigés**

F. BOUBRIK

Nomenclature et définitions.

Un locus : (pluriel=loci), est un emplacement donné, de fonction définie sur le chromosome. Il se désigne par un groupe de 3 lettres en italique. Exemples :

his = locus de biosynthèse de l'histidine. *lac* = locus de dégradation du lactose.

Si le locus est formé par plusieurs gènes, on identifie chaque gène par une lettre capitale.

Ex : le locus *his* est un opéron contenant plusieurs gènes, *hisA*, *hisB*, ... etc.

Le génotype : Le génotype d'une souche est la liste des gènes qui nous intéressent en indiquant si le gène est du type sauvage ou muté.

Exemples : *hisA* ou *hisA⁻* : gène mutant. *hisA⁺* : gène sauvage.

le phénotype : Ensemble des propriétés observables d'un organisme. La nomenclature est la suivante :

His⁻ (H majuscule) : la souche est incapable de croître sans histidine.

Une souche : une culture pure de bactéries (toutes les cellules bactériennes de la culture sont identiques).

Une souche sauvage de référence : souche constituée à partir d'un échantillonnage effectué dans la nature.

un mutant : souche portant une mutation dans son génome.

Une souche parentale : souche d'origine du mutant.

Un milieu : solide ou liquide spécialement préparé pour la croissance ou le stockage des bactéries.

Facteur de croissance : peut être un acide aminé ou une base ou une vitamine qu'on doit ajouter au milieu pour que la bactérie puisse pousser.

Inoculation : addition de cellules bactériennes au milieu. Les bactéries ajoutées s'appellent l'inoculum.

Une culture : milieu liquide ou solide contenant des bactéries qui ont poussé ou entraîné le pousser.

Incubation : processus de maintien de la température et autres conditions désirées pour la croissance bactérienne.

Milieu Minimum : C'est un milieu non supplémenté qui contient une source unique de carbone et d'énergie (glucose) ; une source d'azote et de souffre ex $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$; une source de potassium et de phosphore ex K_2HPO_4 ; une source de Magnésium (MgCl_2) de Calcium (CaCl_2) de Fer (citrate de Fer) ; des sels minéraux : sels de Cu, Zn, Co, Ni, Ti, ... ; l'eau et un tampon pH (K_2HPO_4). Les bactéries qui se développent sur MM sont prototrophes.

Milieu supplémenté: Milieu auquel on ajoute des substances organiques pour obtenir la croissance (AA, nucléotides, vitamines). C'est un milieu pour les bactéries auxotrophes.

Milieu complet: milieu qui contient tous les nutriments utilisés pour les bactéries auxotrophes.

Opéron : unité fonctionnelle d'ADN regroupant un promoteur, un opérateur et plusieurs gènes sous le contrôle d'un même régulateur. Ces gènes sont co-transcrits en ARN polycistronique à partir du promoteur et interviennent dans une même fonction physiologique.

Cours

La Génétique est la science de la variation et de l'hérédité, née de l'étude chez les organismes doués de reproduction sexuée, du croisement ou hybridation entre races ou variétés de la même espèce (petit pois, maïs, mouche).

La génétique bactérienne a commencé depuis la découverte du Microscope optique, les bactéries sont devenues un matériel de choix à cause de leur division rapide : *Escherichia coli* (20 min) ou encore de leur encombrement "limité" (dans un tube de 22 mm).



Chapitre I : Les mutations.

A/ Variations phénotypiques: phénomènes d'adaptation , Induites, réversibles, instables, non fixées héréditairement, affectent l'ensemble d'une population. Les cellules subissent un changement physiologique en réponse directe à une modification du milieu, les rendant mieux aptes à survivre.

Ex: Variation de la Morphologie d'*Arthrobacter* au cours de sa croissance (cytomorphose) selon les conditions de la culture.

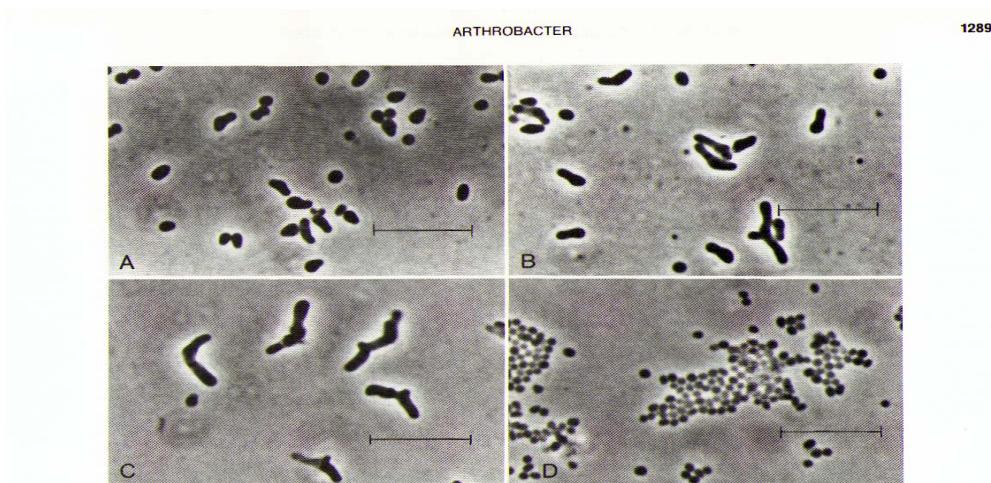


Figure 15.4. *Arthrobacter globiformis* (ATCC 8010) when grown on medium EYGA at 25°C; inoculum coccoid cells as in part D. A, after 6 h, showing outgrowth of rods from coccoid cells; B, after 12 h; C, after 24 h; and D, after 3 days (bar, 10 µm). (Reproduced with permission from R. M. Keddie and D. Jones. In Starr, Stolp, Trüper, Balows and Schlegel (Editors), *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, Springer-Verlag, New York, p 1848, 1981.)

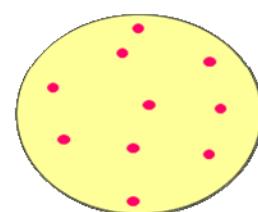
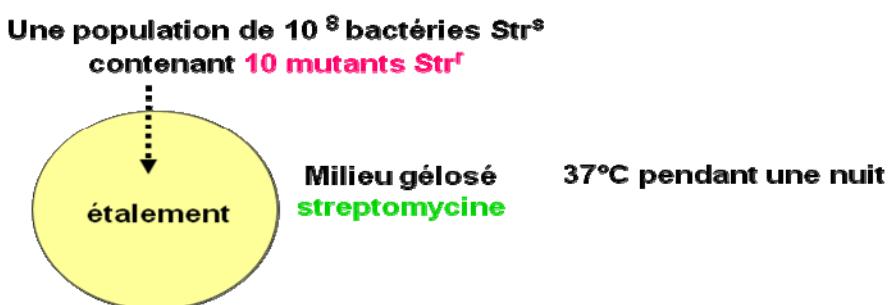
B/ Les variations génotypiques ou mutations : peuvent toucher tous les caractères des bactéries: aspect des colonies, sensibilité aux antibiotiques, aux phages, virulence, etc... N'affectent que quelques individus d'une population (rares), spontanées (parfois induites), fortuites, stables, fixées et transmissibles héréditairement

1- Repérage et isolement des mutants

1-1 Mutants résistants à un ATB

Mutation sélectionnable, Avantage particulier en terme de croissance

Exemple : sélection de mutants résistants à la streptomycine, isolement de mutants parmi 10^6 à 10^9 bactéries



1-2 Mutants non sélectionnables, identifiables sur milieu indicateur.

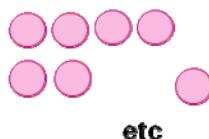
- Pas d'avantage particulier en terme de croissance, identification par « Screening » ou criblage sur milieu indicateur (différencie les mutants et les parents)

Ex de milieu indicateur pour les Lac+ : milieu complet +X-gal (BCIG: bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside)

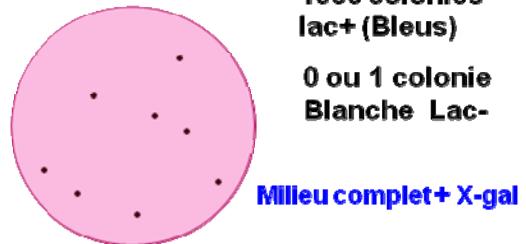


Une population de 10^8 bactéries Lac+
contenant **10 mutants Lac-**

↓
Étalement de
500 colonies par boîte
sur $2 \cdot 10^5$ boîtes



37°C - 24 heures



1-3 Mutants conduisant à une auxotrophie:

Procéder d'abords à un enrichissement de la culture, en ces mutants. Ensuite utiliser la méthode des répliques pour les isoler.

1-3-1 technique d'enrichissement en pénicilline

10^8 His⁺ et 10 His⁻

↓
Milieu Minimum liquide sans histidine + pénicilline

10^6 His⁺ et 10 His⁻

Lavage ↓
Milieu liquide sans histidine + pénicilline

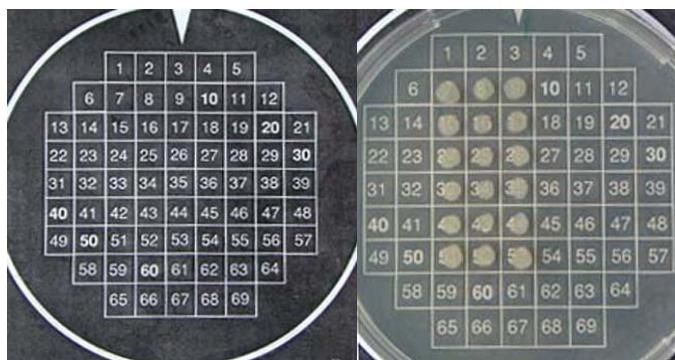
10^4 His⁺ et 10 His⁻

Lavage ↓
Milieu liquide sans histidine + pénicilline

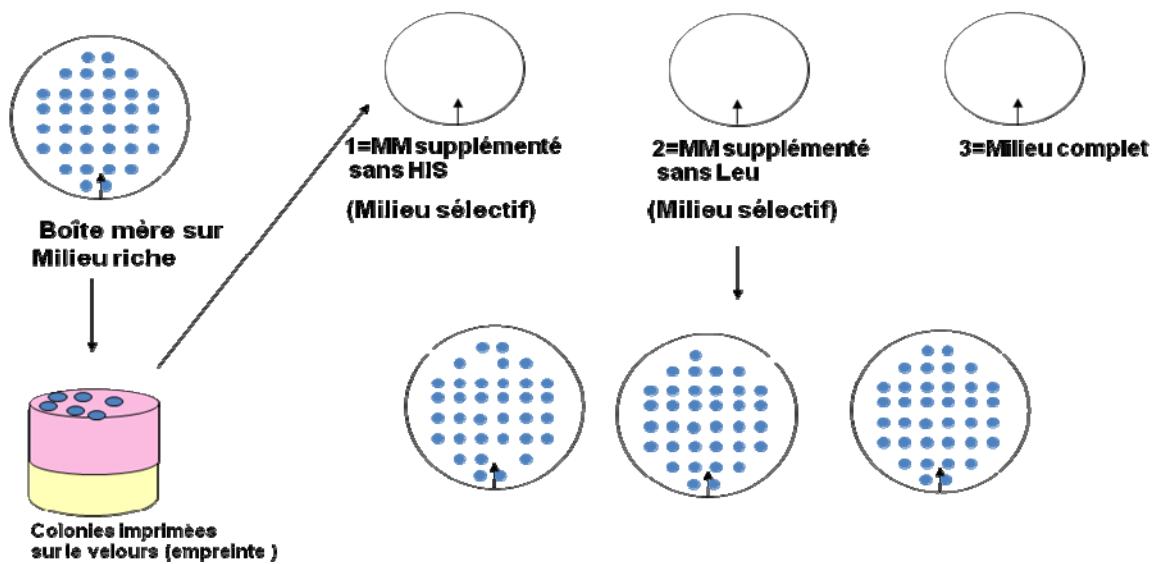
10^2 His⁺ et 10 His⁻

Identification des His⁻ par la méthode des répliques

1-3-2 la méthode des répliques



Méthode des répliques: recherche des mutants His- et Leu-



2- Obtention de lignées pures.

les mutants obtenus sont ré-isolés par la méthode des quadrants. Les lignées pures sont conservées

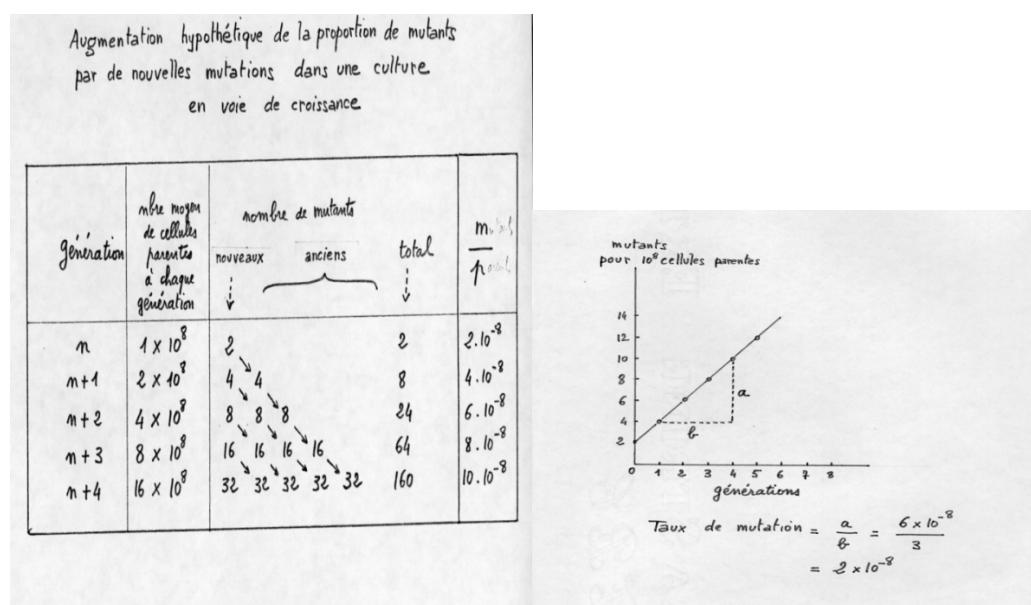
3- Caractéristiques d'une mutation.

Hérédité, spontanéité, stabilité, spécificité, discontinuité, rareté, indépendance.

3-1 Rareté des mutations

La mutation n'affecte qu'un tout petit nombre d'individus d'une population bactérienne. Le taux de mutation est la probabilité pour une bactérie de muter pendant le temps d'1 génération. Le taux de mutation est de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-9} . Le taux de mutation ne doit pas être confondu avec la fréquence des mutants, qui est la proportion de mutants trouvés dans une culture à un moment donné.

La fréquence des mutants dépend du taux de mutation et de la sélection qui s'exerce en faveur ou au détriment du mutant.



3-2 Indépendance des mutations

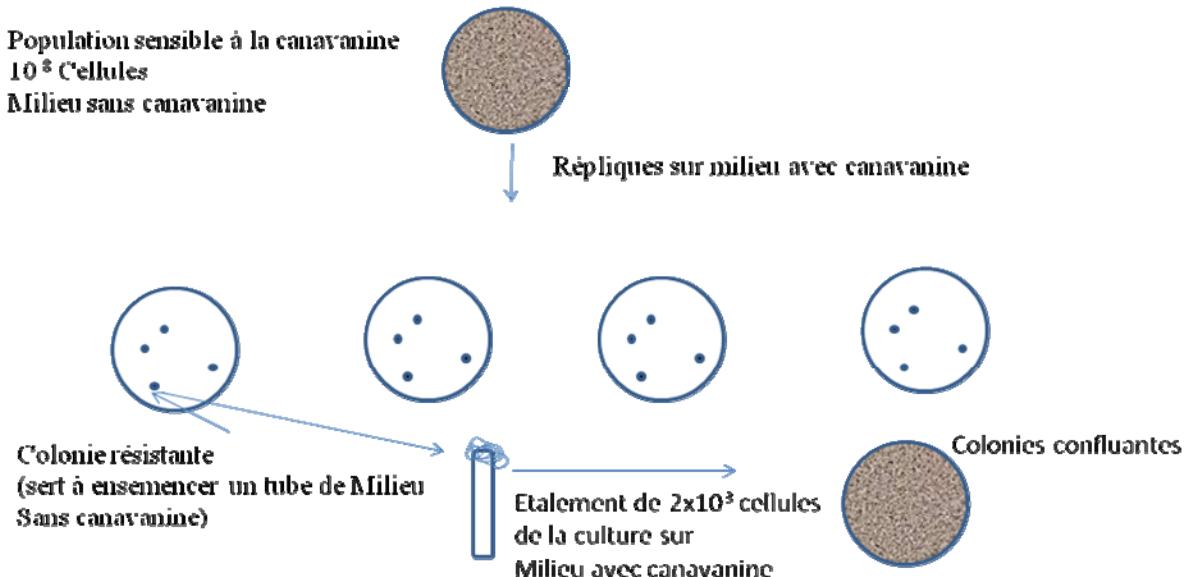
Une mutation ne modifie pas l'aptitude d'une bactérie à subir une autre mutation affectant un autre caractère. Ex: *Escherichia coli* lac⁺his⁺

mutation lac⁺ --> lac⁻ taux= 10^{-7}

mutation his⁺ --> his⁻ taux= 10^{-6}

probabilité lac⁺his⁺ --> lac⁻his⁻ $10^{-7} \times 10^{-6} = 10^{-13}$

3-3 Spontanéité d'une mutation



Constatations :

- Le nombre (rare) et l'emplacement des colonies résistantes est toujours le même dans une série de répliques à partir d'une même boîte mère.
- Les individus mutants existent avant la mise en présence de l'agent sélectif (spontanéité de la mutation).
- Le caractère résistant n'est pas lié à la présence de l'agent sélectif

4- Les types de mutants.

*Mutants morphologiques :caractères morphologiques: les flagelles, les dimensions de la cellule, la forme de la colonie.

*Mutants nutritionnels : apparition ou disparition d'un besoin nutritionnel

*Mutants résistants aux agents antimicrobiens : mutants résistants aux antibiotiques, métaux lourds.

*Mutants léthales conditionnels : mutation dans un gène dont le produit est indispensable à la cellule.

phénotype des mutants = mort cellulaire ne s'exprime que dans des conditions de croissance bien définies dites « non permessives ».

Ces mutants sont produits et conservés dans des conditions permessives. Ex : mutants cryosensibles et thermosensibles

Mutations pléïotropes

C'est une mutation qui affecte un seul gène mais donne plusieurs phénotypes mutants (effet de la mutation touche différentes fonctions de la cellule)

-les mutations polaires : effet en cis, agissent seulement sur les gènes contigus au gène muté (opérons)

- les mutations à effet en trans, gènes de protéines diffusibles, agissent sur des gènes loin (protéines régulatrices).

5- Agents mutagènes.

Agents chimiques, physiques ou biologiques: à l'origine des mutations induites (augmentation de la fréquence d'apparition des mutations à 10^{-3})

5-1 Agents chimiques:

5-1-1 Agents intercalants:Acridines, bromure d'éthidium

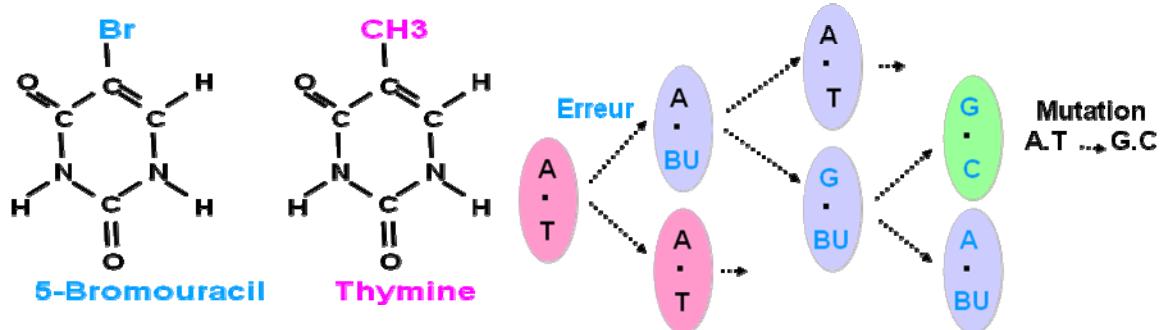
Molécules planes qui s'intercalent dans le plan entre deux paires de base, provoquent des microinsertions ou microdélétions et entraînent des mutations de changement de cadre de lecture

5-1-2 Analogues des bases:Même structure que les bases, défauts d'appariement, substitutions de base.

Ex, 5-BU : deux formes existent en solution

-non ionisée (forme céto), la plus fréquente, s'apparie avec A

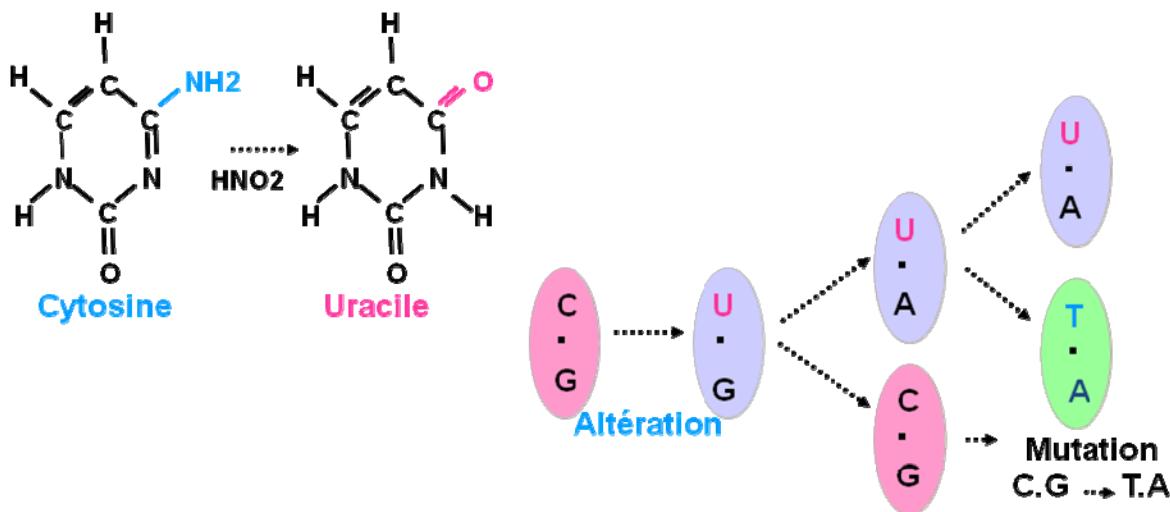
- ionisée (forme énol) très rare s'apparie avec G



5-1-3 Agents Désaminants (Acide nitreux), alkylants (Méthyl méthane sulfonate, Ethyl méthane sulfonate...)

Interagissent avec l'ADN. Provoquent un changement chimique d'une base et un mauvais appariement.

Mutagènes puissants, fréquence de mutation plus forte qu'avec les analogues des bases

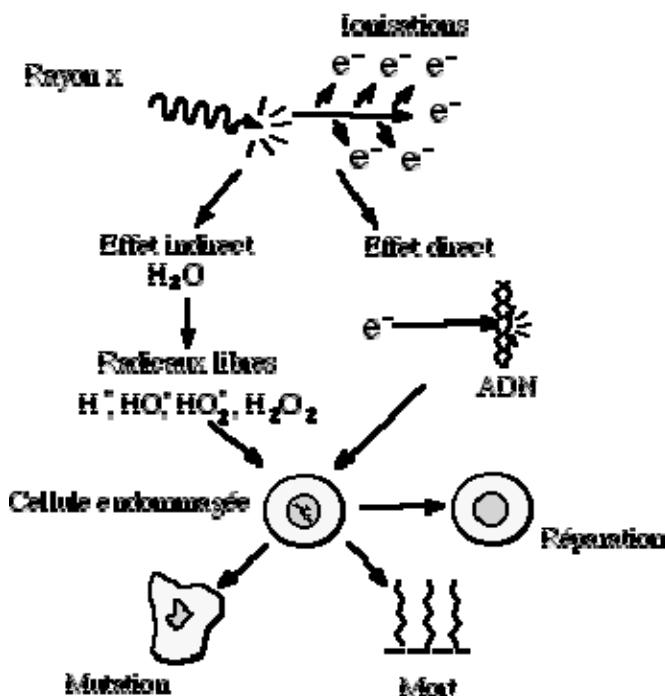


5-2 Les agents physiques : Radiations, mutagènes très puissants

5-2-1 Radiations ionisantes : ionisent la substance qu'elles traversent et on a formation de particules chargées et excitées.

- Changement de la structure de l'eau (molécules ionisées et excitées, génération de radicaux libres: OH^- , O_2^- , H_2O_2)

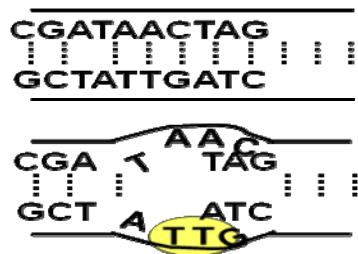
- Cassure des brins, dommages des bases.
- les bases modifiées sont éliminées par des glycosylases: rupture des liaisons N-Glycosidiques (création de sites AP= sites apurinique ou apyrimidinique)
- Effet létal.



5-2-2 Radiations non ionisantes

- Pas de changement de la structure de l'eau

- Absorption par les bases (pic d'absorption de l'ADN et ARN à 260 nm), formation de dimères de thymine T-T, progression de l'ADN polymérase impossible



5-3 Les agents biologiques: mutations par insertion d'éléments transposables

5-4 Mutagénèse dirigée:

- Technique *in vitro*- utilisation d'ADN synthétique- qui permet le remplacement d'une base à une position précise par une autre base; remplacement d'un AA par un autre AA.

- Analyse des interactions entre protéines ou entre protéine et ADN.

7-Test d'Ames pour les carcinogènes:

Pour l'identification des produits naturels ou artificiels potentiellement carcinogènes pour l'homme.

- ❖ Principe: Tous les carcinogènes (agents provoquant le cancer par lésion de l'ADN), sont des mutagènes.

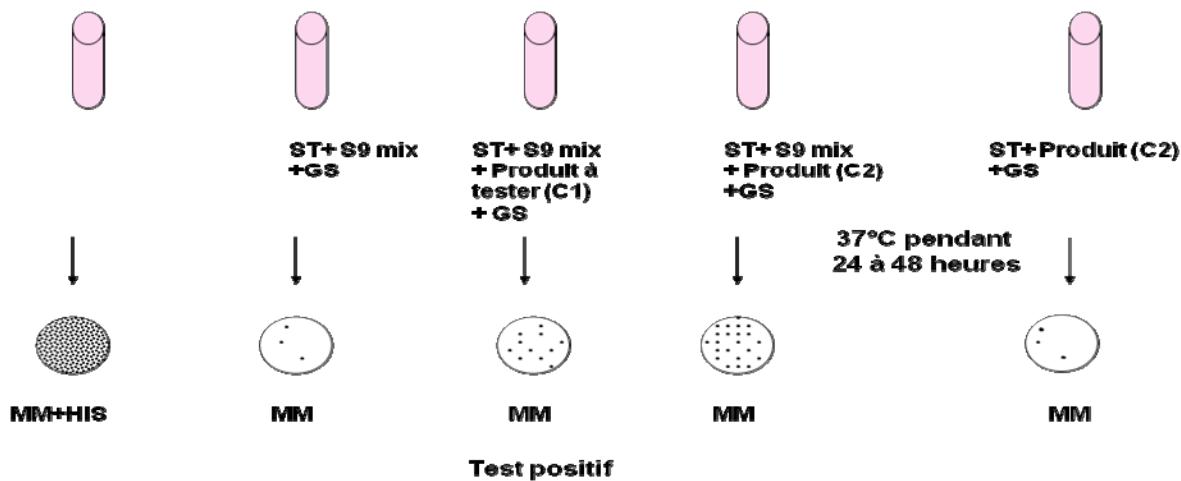
Développement d'un test bactérien rapide: résultat en 48h

Organisme test: *Salmonella typhimurium* (typhoïde), His-.

ST ne se multiplie pas sur milieu synthétique dépourvu d'Histidine.

Le test mesure la réversion vers la prototrophie en présence du mutagène.

- S9 mix: préparation d'enzyme de foie du rat (broyage, centrifugation). Le surnageant contenant les enzymes monooxygénases est conservé à - 80°C. Cette préparation est utilisée pour s'approcher le plus de la réalité de l'homme (le foie est le siège des réactions métaboliques de détoxification).

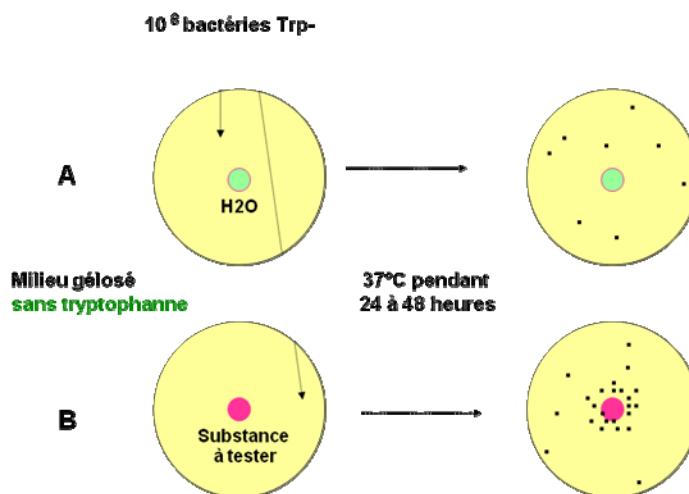


GS : gélose de surcouche qui sert pour l'étalement de la préparation.

C2 est le double de la concentration C1 du produit mutagène à tester.

Le test est positif si le nombre de mutants avec le produit C1 est au moins le double du nombre de mutants spontanés.

8- Variante du test d'Ames



Chapitre 2: Les Antibiotiques

1- Définition

- Produit naturel, synthétique ou semi synthétique qui inhibe (effet bactériostatique) ou tue (effet bactéricide) les bactéries.

- Toxicité sélective: Cellules animales ou humaines ne sont pas affectées.

2- Types d'ATB, mécanismes d'action

- 2-1 β -lactamines
- pénicillines, céphalosporines, ...etc.
- Action: inhibent la synthèse du peptidoglycane, lyse cellulaire.
- Peu d'effet sur les bactéries Gram-.
- Les *mycoplasma* qui n'ont pas de paroi cellulaire sont résistantes.

2-2 Aminoglycosides

- Gentamicine, Kanamycine, néomycine, streptomycine...etc.
- Action: interfèrent avec la synthèse des protéines (fixation à la sous-unité 30S),

Actifs contre les Gram+ et les Gram-.

2-3 Tétracyclines

- ATB bactériostatiques à large spectre.
- Action: interfèrent avec la synthèse des protéines (fixation à la sous-unité 30S),

Actifs contre les Gram+ et les Gram-.

Utilisés contre *Brucella*, *Chlamydia*, *Mycoplasma* et *Rickettsia*.

2-4 Macrolides, chloramphénicol, streptogramines

- Action: interfèrent avec la synthèse des protéines (fixation à la sous-unité 50S),

2-5 Polymixines

*Action: augmentent la perméabilité de la membrane plasmique, endommagent la membrane externe.

Effet sur les Gram-

2-6 L'acide nalidixique, les Quinolones ,Novobiocine

*Action: Interagissent avec la gyrase et bloquent la réPLICATION de l'ADN.

2-7 Rifamycines (Rifampicine)

*Action: Inhibent l'ARN polymérase donc synthèse d'ARN.

2-8 Sulfamides, triméthopim

*Action: inhibent la synthèse du folate, une coenzyme.

3- Stratégies des bactéries pour résister aux antibiotiques.

Brouillage:

- Présence d'une enzyme, la β -lactamase chez les bactéries Gram+ qui dégrade les β -lactamines.
 - Les *mycoplasma* qui n'ont pas de paroi cellulaire sont naturellement résistantes aux β -lactamines.
 - Solution: Fabrication d'ATB semi-synthétiques comme l'Augmentin (Amoxicilline+ acide clavulique inhibiteur de β -lactamase).

- Pour les Aminoglycosides, Macrolides, chloramphénicol, : inactivation de l'ATB par des enzymes

bactériennes (O-phosphorylation, N-acétylation)

Blindage:

Pour les Tétracyclines, pompage de l'ATB à l'extérieur grâce à une pompe

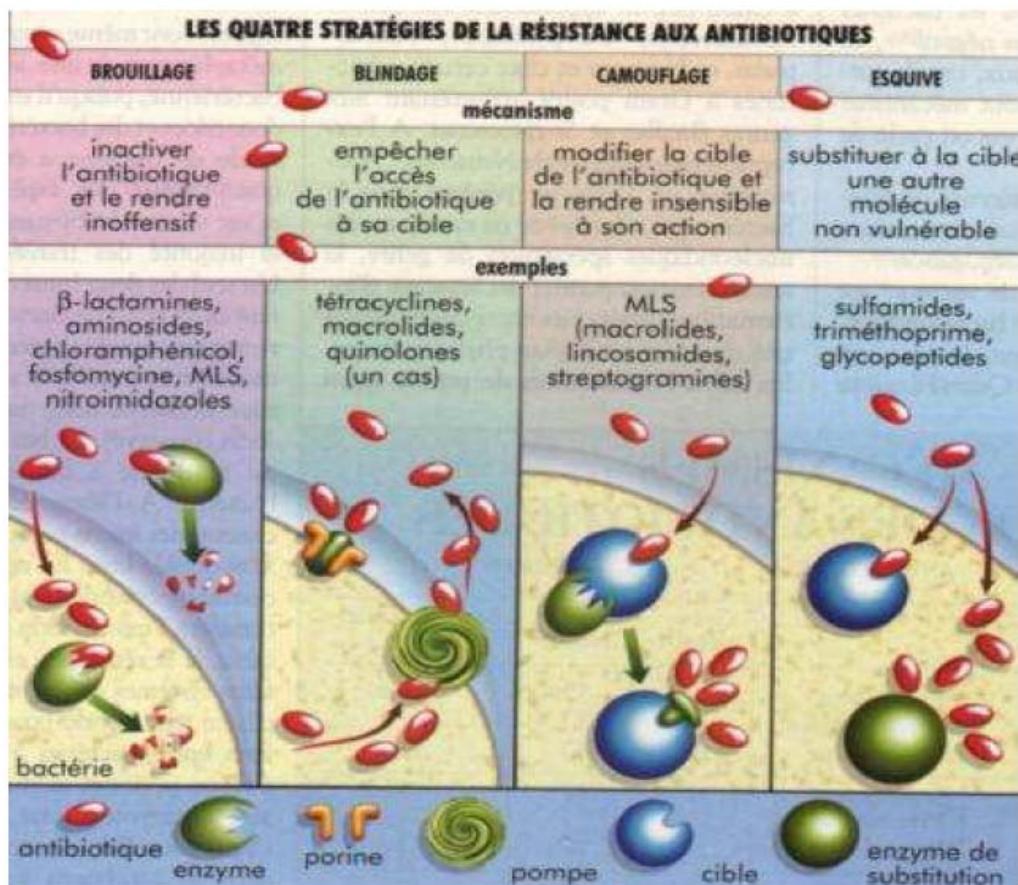
Pour les quinolones, réduction de la perméabilité cellulaire.

Camouflage:

Pour les Macrolides, aminoglycosides, Streptogramines, mutations dans les protéines ribosomiques. La cible est ainsi modifiée. Pour l'acide nalidixique, apparition d'une gyrase mutée.

Esquive:

Pour les sulfamides (inhibent la synthèse du folate, une coenzyme). les bactéries utilisant une source extérieure du folate ou apparition de formes mutées d'enzymes qui interviennent dans la synthèse du folate.



4- L'Antibiogramme

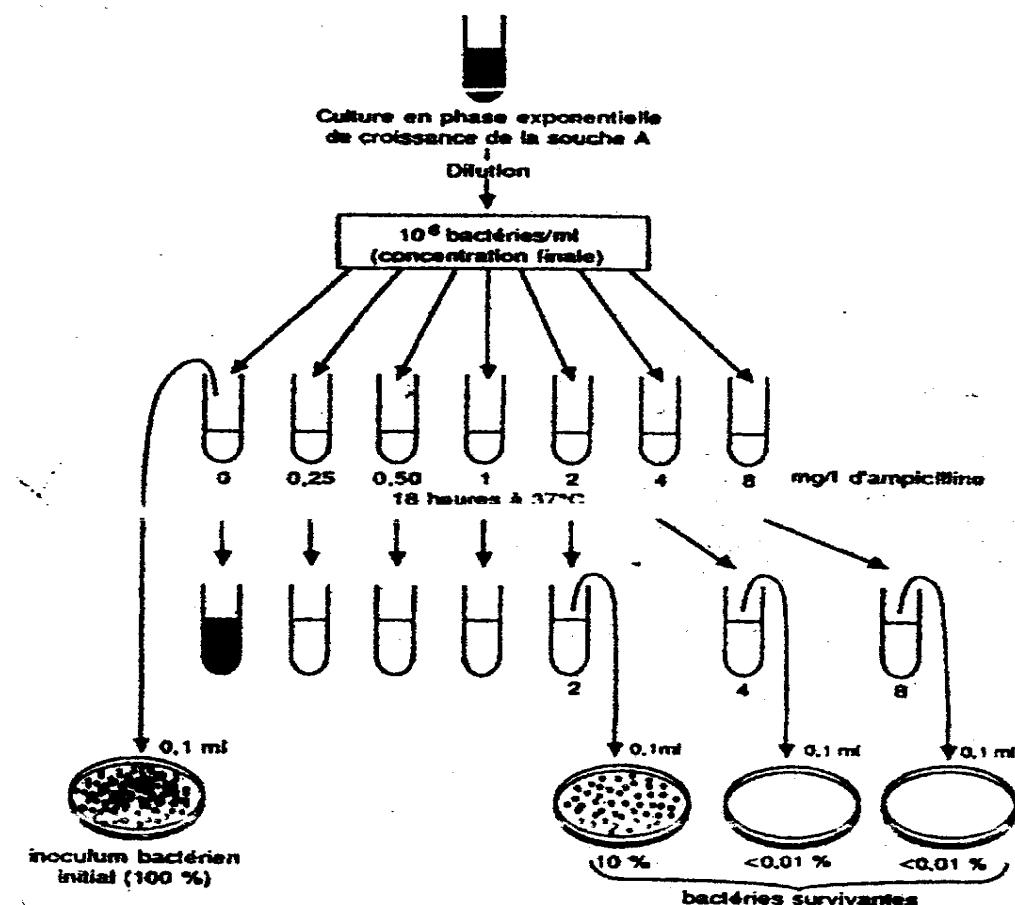
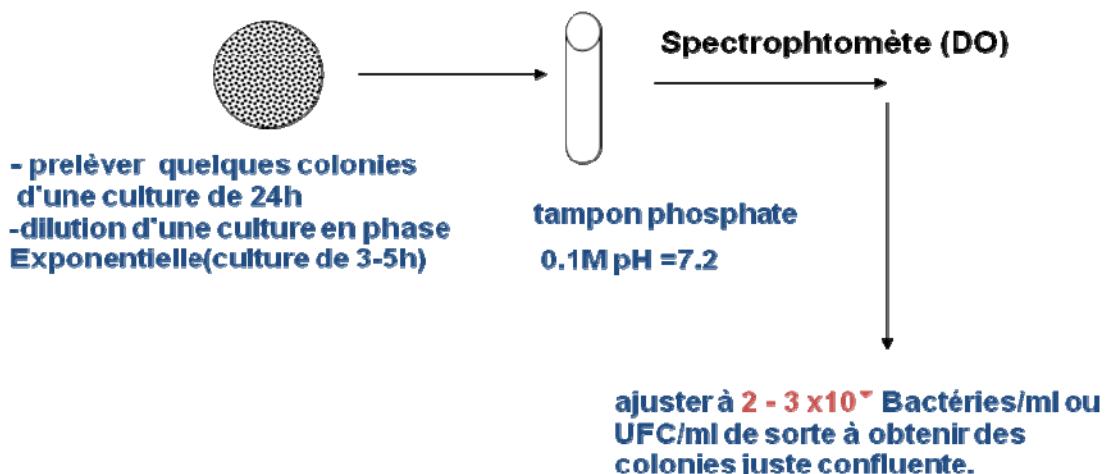
*Test qui permet de déterminer le profil des sensibilités d'une souche (une culture pure est nécessaire)

donnée à une série d'ATB.

*Choix des ATB les plus actifs pour la chimiothérapie.

*Deux méthodes pour réaliser ce test: méthode de dilution et méthode de diffusion

4-1 Méthode de dilution.



CMI: concentration minimale inhibitrice, correspond à la concentration d'antibiotique où aucune croissance bactérienne n'est visible à l'œil nu (pas de trouble visible). CMI=2 mg/l d'Ampicilline.

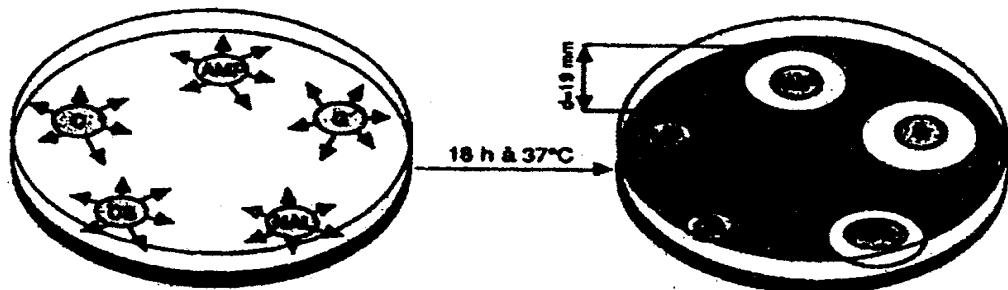
CMB: concentration minimale bactéricide, correspond à la concentration d'antibiotique où le pourcentage de survie est inférieur ou égal à 0,01%. La CMB peut être de 2, 4 ou 8 mg/l (dans notre cas CMB=4 mg/l).

4-2 Méthode de diffusion.

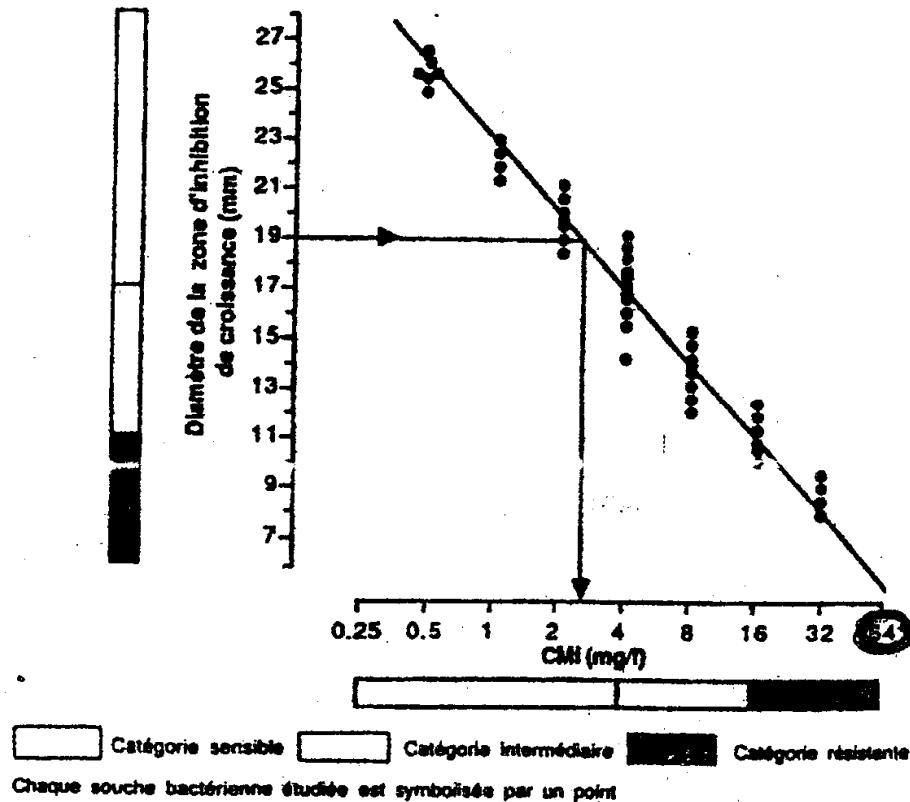
ensemencement avec une culture pure d'organisme pathogène.

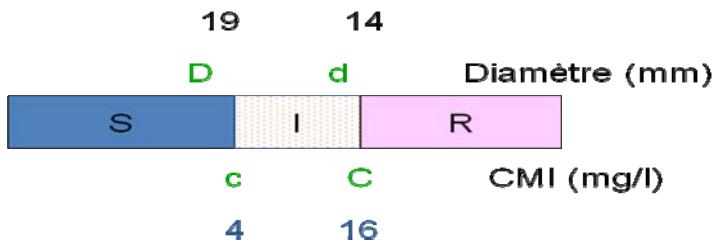
L'inoculum est étalé par un écouvillon ou par inondation (on sèche la boîte 10min à 37°C).

On dépose ensuite les disques imprégnés chacun d'un ATB différent. Une croissance quasi confluente va se développer après incubation.



4-2 Méthode de diffusion.





S = souche sensible: CMI<c; diamètre >D

Traitements à dose habituelle par voie générale.

I = intermédiaire: c<CMI<C; d< diamètre <D

Traitements locaux, augmentation de la dose par voie générale.

R = résistance: CMI>C; diamètre <d

Ne répond pas au traitement.

5- Exemples de types de zones observées au niveau des disques:

1/ Résistance : Aucune zone d'inhibition de croissance n'est observée.

2/ Intermédiaire : Une étroite zone sans croissance entoure le disque.

3/ Sensible : une large zone sans croissance entoure le disque.

4/ Inactivation enzymatique : une étroite zone sans croissance simulant la sensibilité entoure le disque. Cette zone a un contour nettement défini car les colonies ont une taille normale à grande à la différence de la zone intermédiaire.

Ex : *staphylococcus aureus* code pour une β -lactamase inducible. Les cellules proches du disque sont tuées avant d'avoir pu synthétiser une quantité suffisante d'enzyme.

5/ Mutants résistants : L'inoculum contient une petite proportion de cellules mutées capables de former des colonies dans des conditions qui inhibent les non mutées.

6/ Contamination : l'inoculum est fait d'un mélange d'organismes dont un au moins est résistant à l'ATB.

7/ Synergie : Chacun des deux disques contient un ATB différent. La zone d'inhibition traduit un effet inhibiteur qui est plus important que l'effet de chaque ATB pris séparément.

8/ Antagonisme : Chacun des deux disques contient un ATB différent. La présence d'un ATB inhibe l'activité de l'autre.

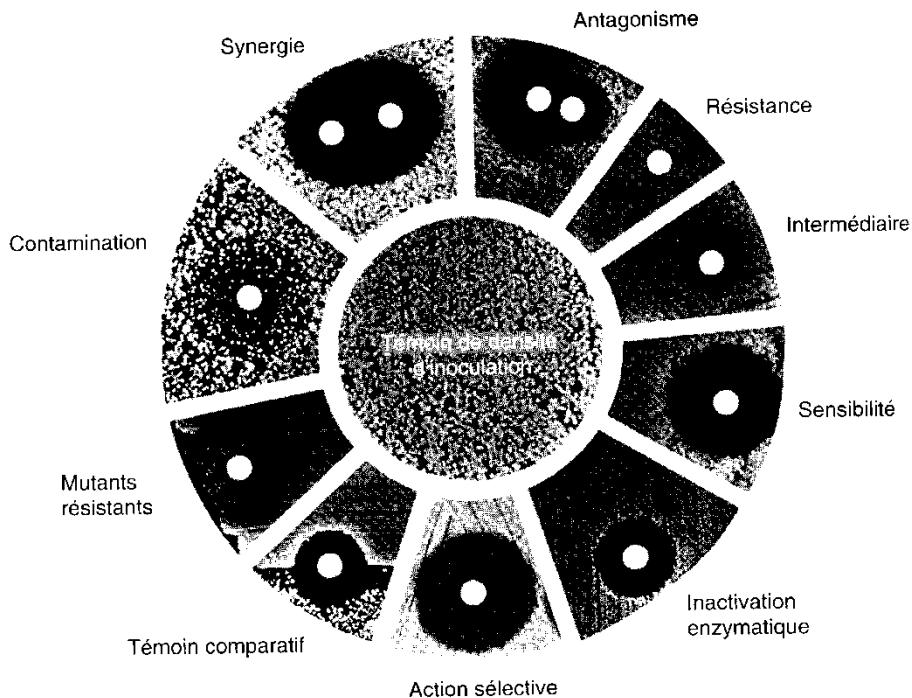


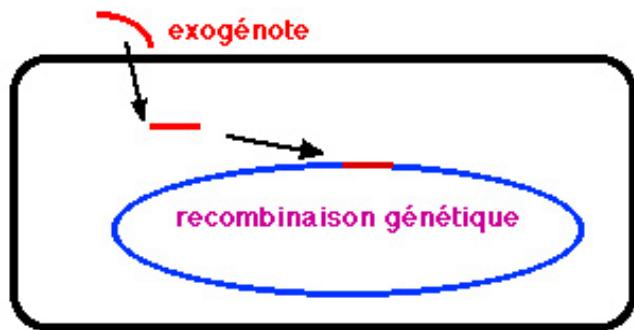
Planche 15.1 : Test de sensibilité aux antibiotiques (test de diffusion).

Chapitre 3 : les transferts génétiques.

Transfert génétique: Transmission de caractères héréditaires d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice de génotype différent.

Exogénote: Matériel génétique transféré de la donatrice à la réceptrice.

Endogénote: Matériel génétique complet de la réceptrice.



Les mécanismes par lesquels le transfert génétiques chez les bactéries s'effectue sont :

1- La Transformation: pénétration dans une bactérie d'ADN nu, libre, se trouvant dans le milieu et changement permanent des propriétés de cette bactérie.

Les bactéries transformées sont appelées transformants.

2- La Conjugaison : transfert d'ADN entre 2 bactéries reliées physiquement.

Les bactéries recombinantes sont appelées transconjuguants.

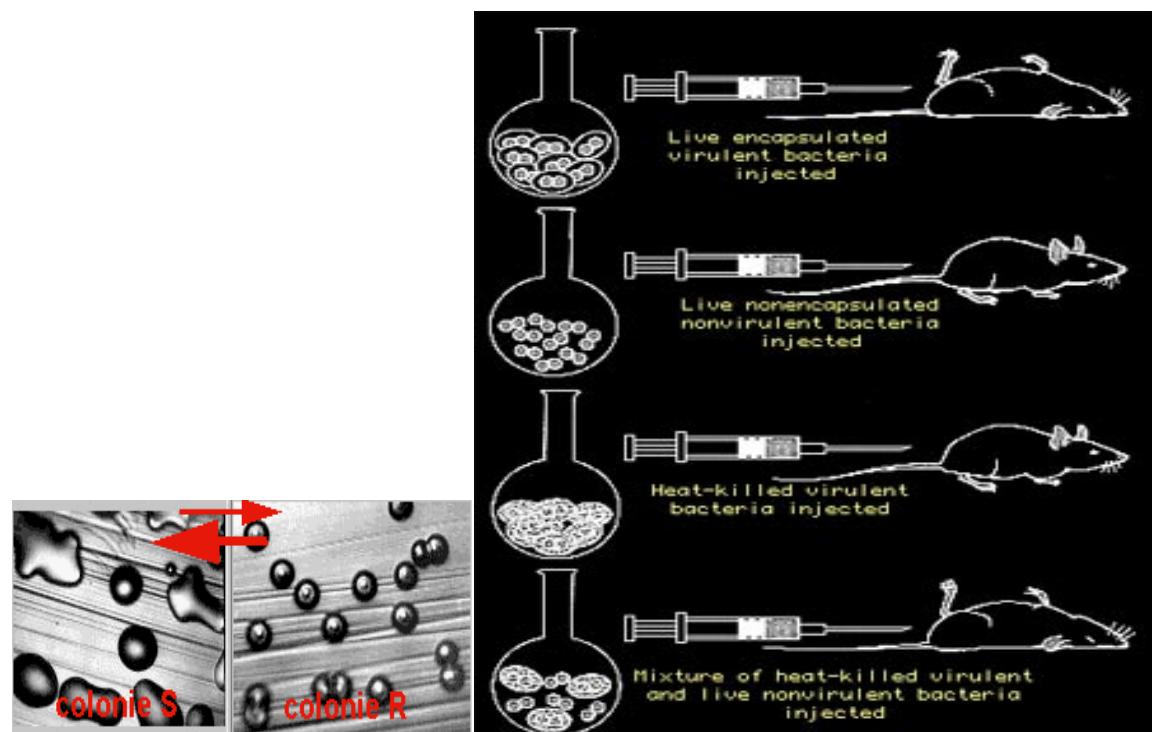
3- La Transduction : transfert d'ADN par l'intermédiaire d'un bactériophage.

Les bactéries recombinantes sont appelées transductants.

3-1 La transformation.

Historique :

Griffith(1928), Virulence chez les Pneumocoques.



PNEUMOCOQUE			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>			
Morphologie microscopique	Capsule (polysacch.)	Aspect colonies	Virulence souris
	+	Smooth (lisse)	+
	0	Rough (rugueux)	0

S1 tuées + R3 vivantes = Virulence

Conclusion (Expérience de Griffith) : Transformation des bactéries R3 vivantes et non capsulées (non pathogènes) en bactéries capsulées et pathogènes par l'ADN libéré. (AVERY, Mc LEOD, Mc CARTHY 1944)

Espèces naturellement transformables :

Gram +: *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*

Gram -: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *E. coli* : cas particulier
(Transformation artificielle)

La fréquence du phénomène est variable selon les espèces.

2- Conditions de la transformation :

2-1 Compétence:

Une bactérie compétente: c'est une bactérie capable d'absorber un ADN étranger présent dans son environnement (ADN libéré par autolyse ou par sécrétion) et d'acquérir de nouvelles propriétés.

La compétence = état physiologique génétiquement programmé.

Elle est provoquée par des conditions de croissance particulières. On observe l'activation des gènes de compétence « *com* » et une synthèse des Protéines de compétence :

* Autolysine membranaire

* Présence de sites (10 à 50 sites) de fixation de l'ADN.

* Protéine membranaire fixant l'ADN

* Différentes nucléases

*Chez les bactéries Gram+: *Bacilles, pneumocoques*

- Fin de la phase exponentielle (densité max, milieu pauvre et hostile)

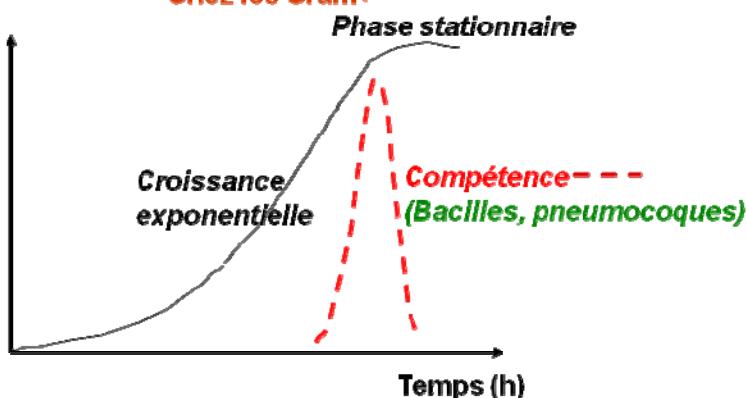
Sécrétion de peptides signaux = phéromones de compétence par certaines bactéries et activation de la compétence d'une proportion (10-15%) de la population

*Chez les bactéries Gram-: *Néisseria gonorrhoeae, Haemophilus influenzae*

- La compétence est constitutive tout au long du cycle mais présence de séquences signaux qui permettent la fixation spécifique à la surface de la cellule, ce qui limite la transformation entre bactéries de la même espèce.

Évolution de la compétence durant la croissance

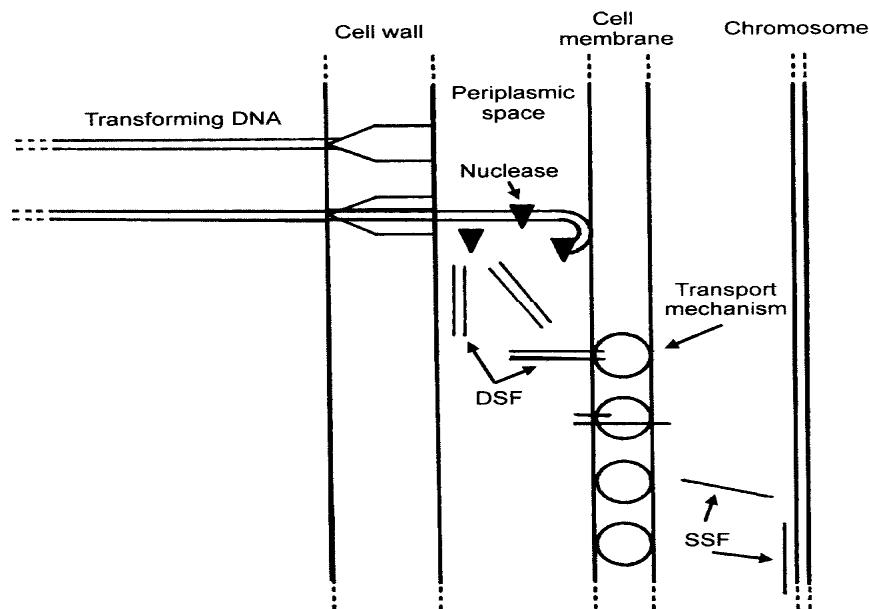
Chez les Gram+



3- Mécanisme de la transformation chez les Gram+ :

4 étapes pour la transformation:

1. fixation de l'ADN: l'ADN double brin se fixe sur des récepteurs ou sites (10-50 sites) à la surface de la cellule.
2. Fragmentation (entrée) de l'ADN : une endonucléase (Mg^{2+} , Ca^{2+}) présente dans l'espace périplasmique fragmente l'ADN ($DSF < 15$ kb). ADN toujours sensible aux Dnases.
3. Absorption : 1 à 2 min après ajout de l'ADN, il devient résistant aux Dnases. L'ADN est transporté (canal de transport) de la surface de la cellule vers la membrane plasmique. Une exonucléase dégrade l'un des brins.
4. Intégration : recombinaison homologue RecA dépendante.



4- Mécanisme de la transformation chez les Gram⁻:

VOL. 58, 1994

DNA TRANSLOCATION ACROSS MEMBRANES 305

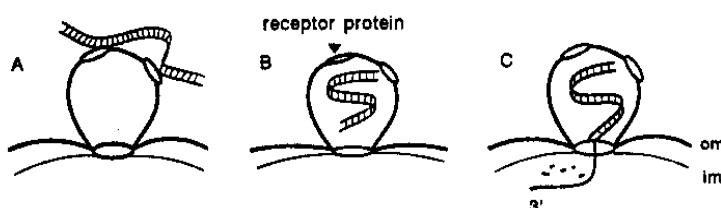


FIG. 6. Transformasome-mediated uptake of DNA during transformation of *H. influenzae* (147). (A and B) Double-stranded donor DNA is bound sequence specifically (A) and is taken up into the transformasomes (B) by an unknown mechanism. (C) The DNA transfer into the cytoplasm is linked to the degradation of one strand as in gram-positive bacteria. Abbreviations: om, outer membrane; im, inner membrane.

5- Transformation artificielle :

Pas de transformation naturelle pour de nombreuses bactéries, notamment *Escherichia coli*

- Besoins pour les techniques de biologie moléculaire
- Recherche de conditions permettant l'entrée de l'ADN plasmidique dans une bactérie sans utiliser le système de transformation naturelle:

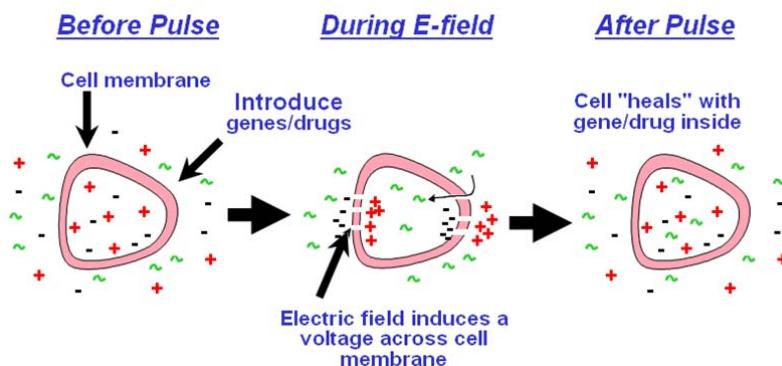
❖ Traitement au CaCl_2 et choc chaud/choc froid

Si on place *E. coli* dans une solution glacée de calcium, elle acquiert la compétence. Le calcium provoque un changement de la structure lipidique de la membrane. Tout se fait à froid. L'ADN transformant est ajouté sous forme de solution froide. Le shift de 4°C à 37°C crée des pores dans les membranes et permet l'entrée de l'ADN. La mortalité des cellules est élevée lors du choc thermique (sortie également des nutriments vitaux).

❖ Electroporation

- Mises au point des conditions d'électroporation pour chaque espèce
- Pas d'entrée de petits fragments d'ADN linéaires simple ou double brin

On soumet un mélange ADN-bactéries à un champ électrique de 16 KV/cm pendant une seconde. Le courant provoque des trous au niveau de la paroi et des membranes par lesquels l'ADN passe.



6- Devenir de l'ADN transformant (Transformation Naturelle) :

*ADN chromosomique:

-Homologue, recombinaison et modification génétique permanente.

-Hétérologue, dégradation ou dilution.

7- Paramètres de la transformation

*Nombre total des cellules viables.

*Quantité d'ADN transformant en μg .

*Nombre de transformants obtenus en utilisant un marqueur de sélection.

*Efficacité de transformation: c'est le nombre de transformants/ μg d'ADN

* Fréquence de co-transformation: fréquence avec laquelle les marqueurs non sélectionnés sont obtenus.

8- Applications de la transformation :

*Cartographie génétique:

Idée sur la liaison entre les gènes.

* Génie génétique:

Introduction dans une bactérie d'un ADN modifié *in vitro* (ex : gène cloné dans un plasmide) pour lui faire produire une molécule d'intérêt trop peu abondante dans les cellules d'origines.

*Intérêt pour la bactérie:

Source énergique de C et d'N. Réparation des lésions accidentnelles.

Recombinaisons génétiques favorisant l'évolution

Chapitre 4 : la conjugaison.

1- Définition et Historique :

La conjugaison est un transfert polarisé de matériel génétique d'une bactérie à une autre, de type sexuel différent, avec possibilité de recombinaison génétique.

LEDERBERG et TATUM, *Escherichia coli* K-12, 1946 :

Isolement de mutants auxotropes à partir d'*E. coli*, prototrophe, par mutagenèse (UV)

* mutant 1 : *met*⁻ *phe*⁻ *cys*⁻

* mutant 2 : *thr*⁻ *leu*⁻ *thia*⁻

Ces mutants ne poussent pas sur un milieu minimum.

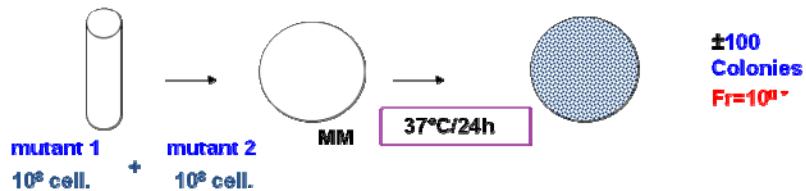
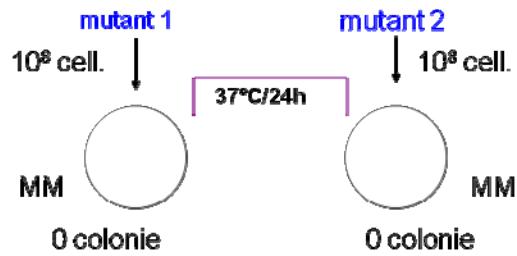
Milieu Minimum :

Liquide

Eau
glucose
NH₄Cl
K₂HPO₄
MgSO₄
FeSO₄
CaCl₂

Solide

Eau
glucose
NH₄Cl
K₂HPO₄
MgSO₄
FeSO₄
CaCl₂
Agar



- Pour obtenir des recombinants prototrophes, il faut un contact physique entre les 2 mutants
- Les recombinants prototrophes (*met*⁺*phe*⁺*cys*⁺*thr*⁺*leu*⁺*thia*⁺) sont relativement rares: environ 10⁻⁶ mais ce ne sont pas des mutants spontanés.

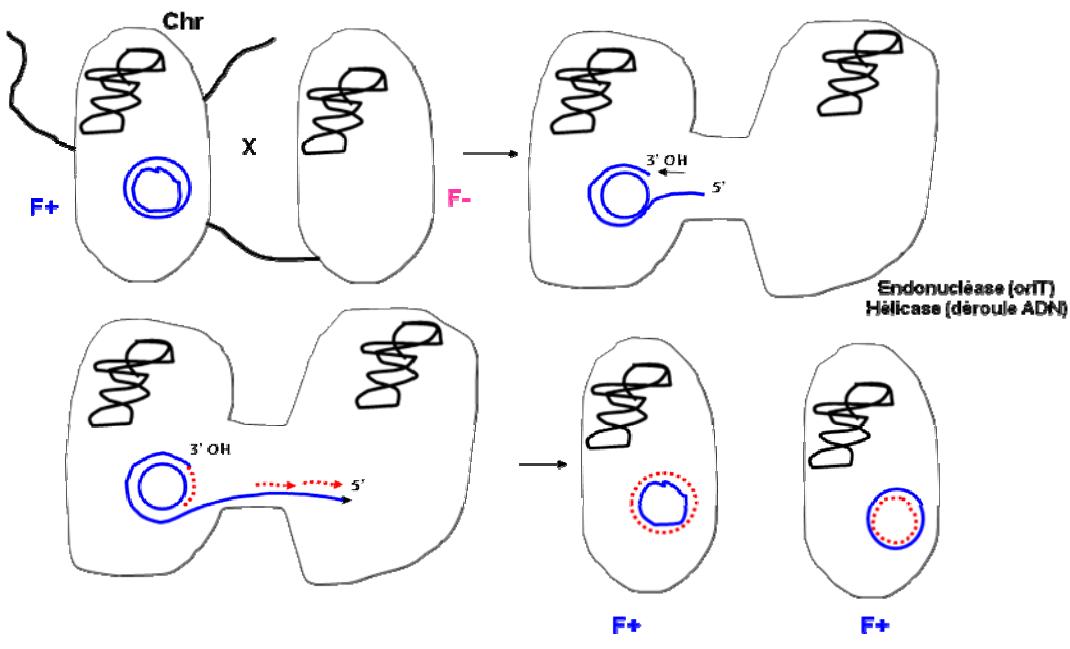
D'autres expériences ont montré qu'on a transfert du matériel génétique du mutant 1 au mutant 2. Il y a donc polarité sexuelle (différentiation sexuelle). Le mutant 1 possède un facteur sexuel « F » de Fertilité. Les bactéries donatrices sont F⁺ « mâles ». Les bactéries réceptrices sont F⁻ « femelles ».

mutant 1 = cellule donatrice F⁺

mutant 2 = cellule réceptrice F⁻ dans laquelle se produit la recombinaison génétique.

2-Mécanisme du transfert .

Mécanisme



Contact paroi à paroi entre F+ et F- et formation d'un pore par lequel s'effectue le transfert.

- coupure par une endonucléase codée par F en un site spécifique (oriT) sur un brin spécifique .
- L'hélicase déroule le duplex à partir de l'extrémité 5' libre.
- L'ADN polymérase utilise le brin non coupé comme matrice et prolonge l'extrémité 3' du brin coupé par addition des nucléotides dans le sens 5'-3'; l'extrémité 5' étant déplacée progressivement.
- Le brin coupé pénètre dans la cellule réceptrice où il sert de matrice pour un synthèse de fragments d'Okazaki. Dans la donneuse, le brin perdu est remplacé par synthèse d'ADN (modèle du cercle roulant). F- devient F+.

3- Insertion de F dans le chromosome

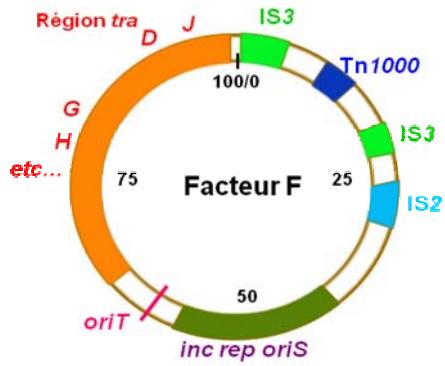
Région tra: fonctions de transfert (pilis, endonucléase, hélicase).

Rep: fonctions de réPLICATION, oriS: origine de réPLICATION végétative, oriT: origine de réPLICATION conjugATIVE, inc: incompatibilité

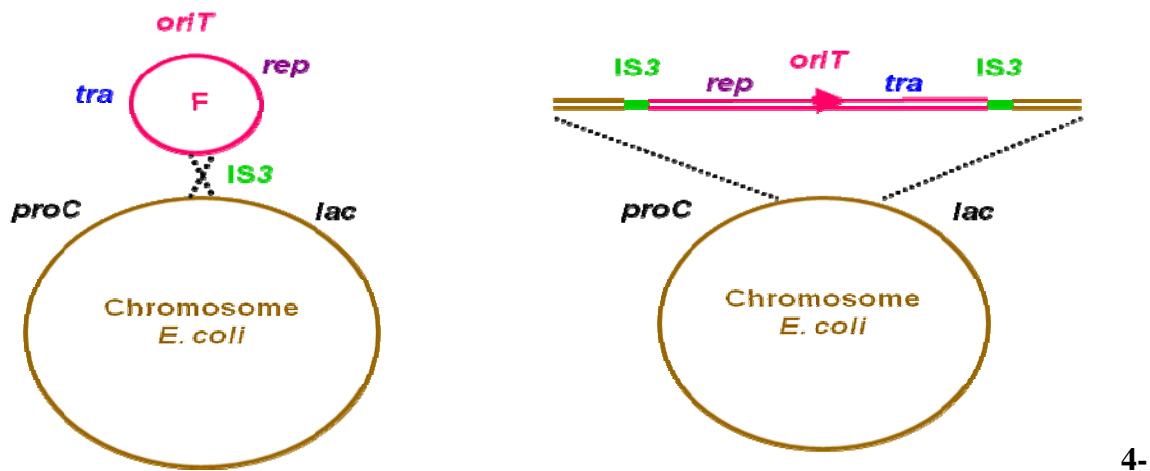
Trois éléments transposables dans son génome : IS2, IS3 et Tn1000 (pas de rôle dans la réPLICATION et le transfERT, rôle pour l'insertion du F dans le chromosome d '*E. coli*)

- Le génome d '*E. coli*(présence d 'éléments transposables

- Régions d homologie entre le chromosome bactérien et le F



F s'insère dans le chromosome bactérien au niveau des régions d'homologie



4.

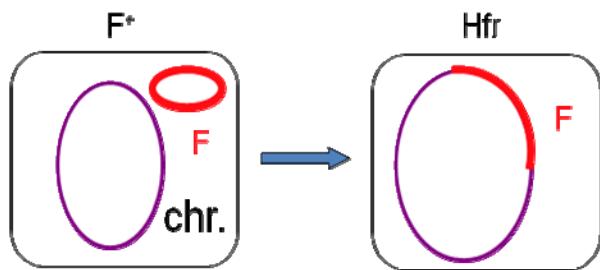
Les souches Hfr

Découverts par CAVALLI et HAYES (1950). Dans la souche Hfr, le plasmide F s'est intégré dans le chromosome bactérien (probabilité de 10^{-5}).

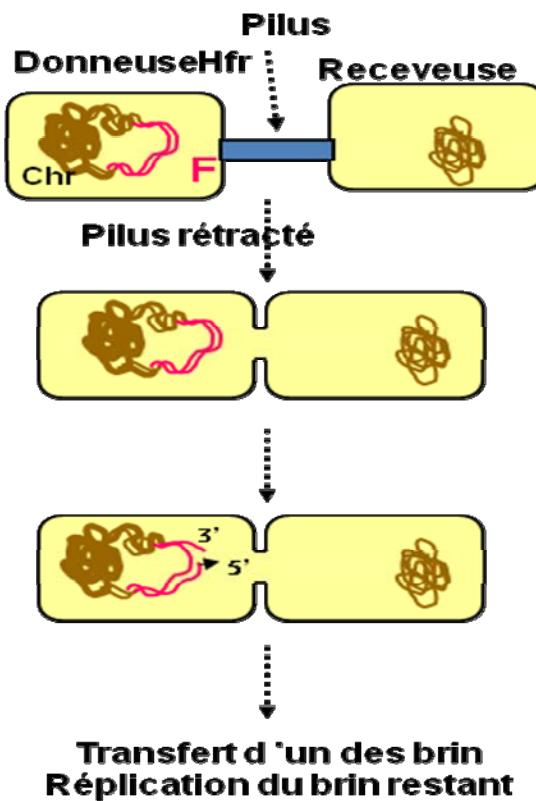
Ce sont des mutants de bactéries F⁺ capables de transférer certains caractères génétiques (marqueurs chromosomiques) à une fréquence beaucoup plus élevée que lors des croisements F⁺ x F⁻ (Fr = 10^{-6}).

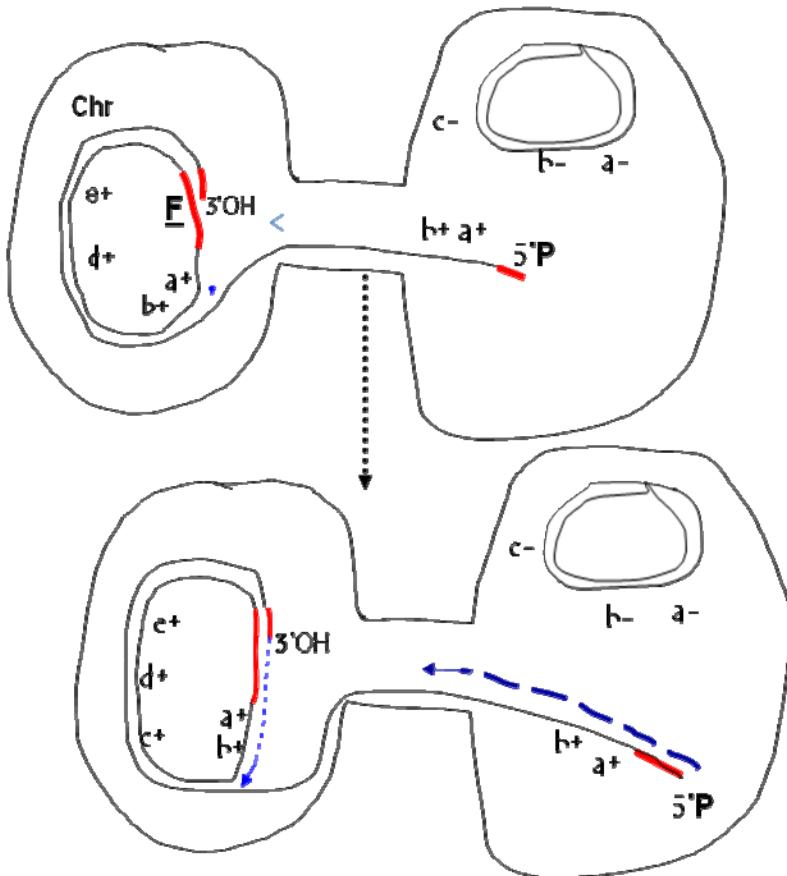
Les bactéries F⁺ sont capables de transférer le facteur F à haute fréquence, mais ne donnent des recombinaisons avec les bactéries F⁻ qu'à faible fréquence

Hfr = haute fréquence de recombinaison. La fréquence de recombinaison est 100 à 1000 fois plus élevée.



5- Croisement Hfr x F-



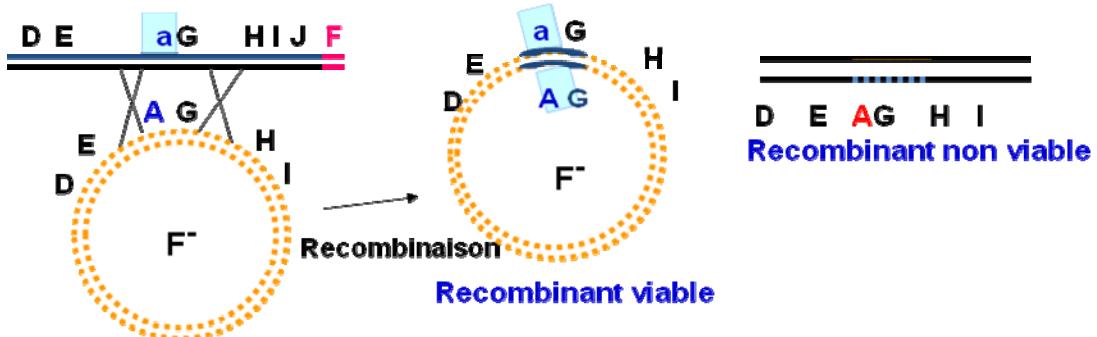


- coupe de F par une endonucléase codée par F en un site spécifique (oriT) sur un brin spécifique .
- L'hélicase déroule le duplex à partir de l'extrémité 5' libre.
- L'ADN polymérase utilise le brin non coupé comme matrice et prolonge l'extrémité 3' du brin coupé par addition des nucléotides dans le sens 5'-3'; l'extrémité 5' étant déplacée progressivement.
- Le brin coupé pénètre dans la bactérie réceptrice où il sert de matrice pour un synthèse de fragments d'Okazaki. Dans la donnatrice (HFr), le brin perdu est remplacé par synthèse d'ADN (modèle du cercle roulant). Si les bactéries ne se séparent pas, la moitié de F est transférée suivi du transfert de marqueurs chromosomiques a, b,...etc. Le transfert s'arrête avec la séparation des bactéries.

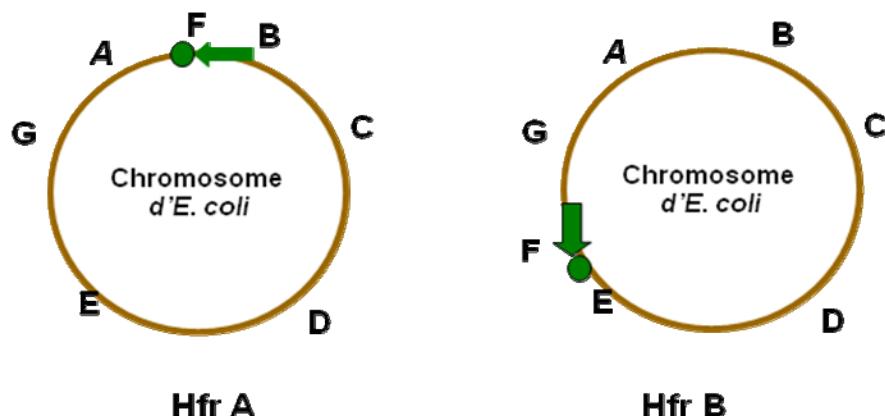
5-1 Devenir de l'ADN transféré:

C'est une portion du chromosome bactérien et du plasmide F- (pas d'origine de réPLICATION circularisation et réPLICATION impossible) donc soit on a dégradation par des nucléases ou recombinaison homologue et on obtient une bactérie recombinante. Pour cette recombinaison, il faut:

- Deux crossing over ou nombre pair de CO
- Intégration d'un seul brin
- Receveuse *rec+*



5-2 Souches Hfr et position proximale et distale



- Plus de 20 sites d'insertion de F. Présence de séquences IS; intégration orientée.

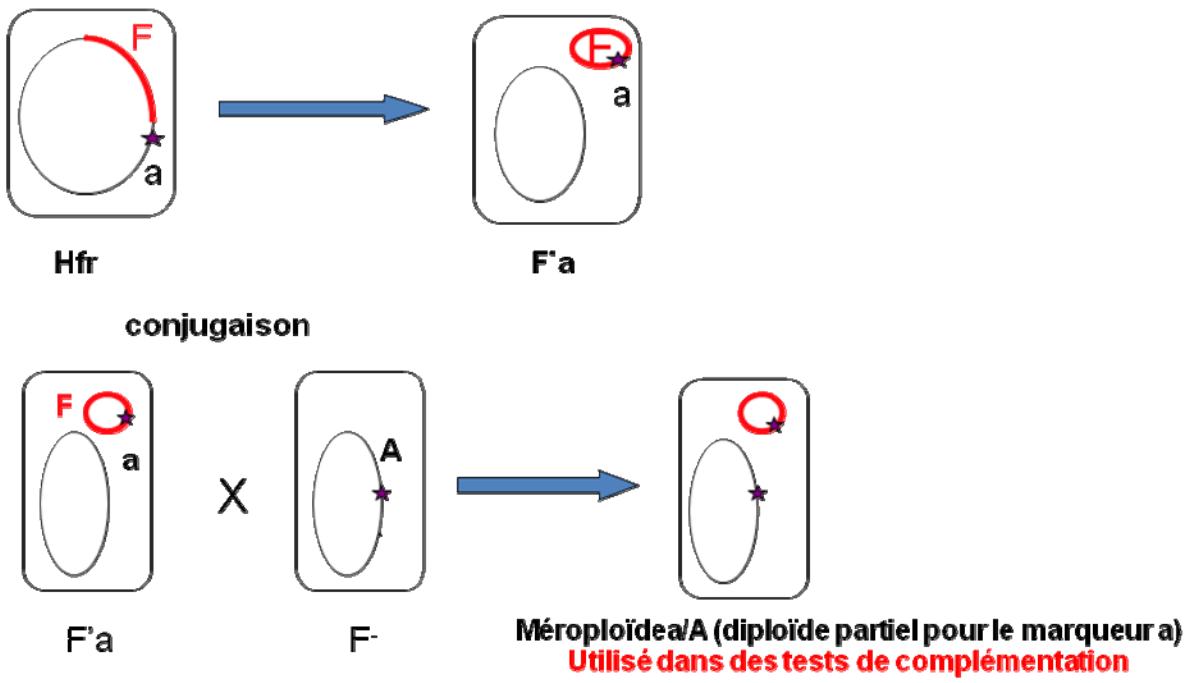
Formation de souches Hfr différentes.

- La souche Hfr A transfère ses marqueurs dans l'ordre BCDEGAF.
- La souche Hfr B transfère ses marqueurs dans l'ordre GABCDEF.
- Un gène en position proximal avec la souche Hfr A pourra être en position distale

Avec la souche Hfr B

6- Les souches F'

- a) Excision normale: Hfr --> F+
- b) Excision anormale: Hfr --> F'



12

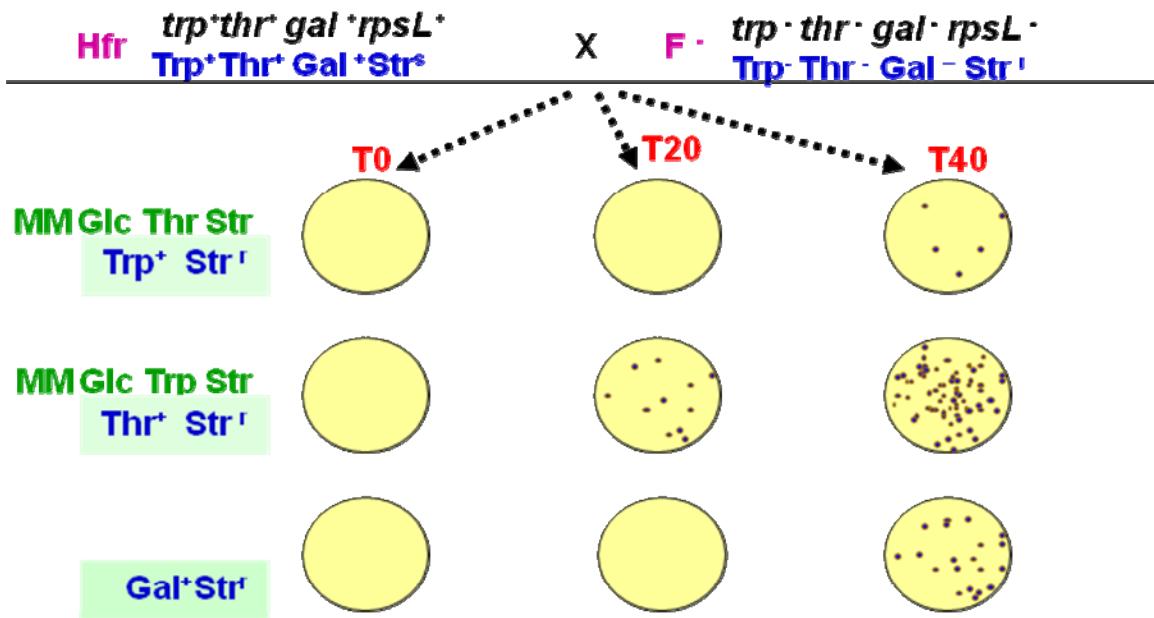
7-1 Détermination de l'ordre d'entrée des gènes

7-1-1 La conjugaison interrompue.

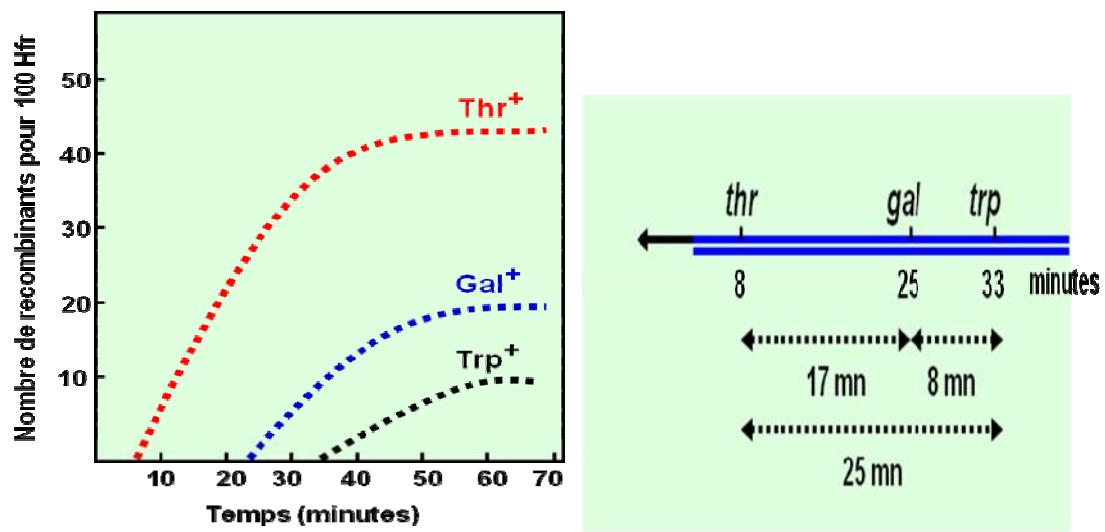
On croise une Hfr prototrophe sensible à la streptomycine et une F- auxotrophe et résistante à la streptomycine.

A intervalles réguliers ; des échantillons sont prélevés et placés dans un mixeur de cuisine pour arrêter la conjugaison. Les échantillons sont étalés sur milieux supplémentés contenant la streptomycine (Hfr sont tuées).

Des courbes de fréquence de recombinants pour chaque marqueur sont représentés en fonction du temps.



- Augmentation du nombre de recombinants avec le temps
- Chaque allèle du donneur apparaît pour la 1ere fois à un instant précis après le début du croisement chez le receveur.
 - Les allèles du donneur apparaissent chez le receveur dans un ordre précis.
 - Plus l'allèle pénètre plus tard, plus le nombre maximal de recombinants est faible.- La valeur plateau(nombre max de recombinants pour l'allèle) dépend de
 - l'efficacité de transfert
 - Probabilité de recombinaison
- Augmentation du nombre de recombinants avec le temps
- Chaque allèle du donneur apparaît pour la 1ere fois à un instant précis après le début du croisement chez le receveur.
 - Les allèles du donneur apparaissent chez le receveur dans un ordre précis.
 - Plus l'allèle pénètre plus tard, plus le nombre maximal de recombinants est faible.- La valeur plateau(nombre max de recombinants pour l'allèle) dépend de
 - l'efficacité de transfert
 - Probabilité de recombinaison



- Localisation de 2000 gènes d' *E. coli* , précision à une minute près maximum , 30 à 50 gènes dans une minute
- Cartes génétiques d' *E. coli* et *S. typhimurium* en utilisant la minute (instant d'apparition de l'allèle) comme unité de distance. Etalonnage du chromosome bactérien en 100 minutes .

7-1-2 La conjugaison continue (2h).

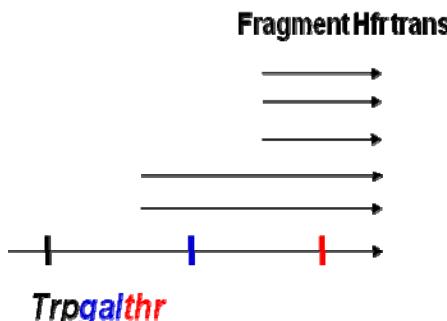
La séparation spontanée peut se produire à n'importe quel moment. Ce qui crée un gradient naturel de transfert. Permet de déterminer l'ordre des gènes à partir du gradient . Donc un marqueur proximal (proche de l'origine de transfert) a plus de probabilité d'être transféré qu'un marqueur distal.

- Pour déterminer l'ordre des gènes, il faut sélectionner dans la souche F- les recombinants ayant reçu le marqueur proximal.
- Supposons une Hfr : Ordre *thr⁺ gal⁺ trp⁺ StrpS*.
- F-: *thr⁻ gal⁻ trp⁻ StrpR*.
- On sélectionne pour les recombinants *thr⁺* et on analyse ces recombinants pour voir s'ils ont reçus d'autres marqueurs.
- Analyse typique:

$$Thr^+ = 100\%$$

$$Gal^+ = 60\%$$

$$Trp^+ = 20\%$$



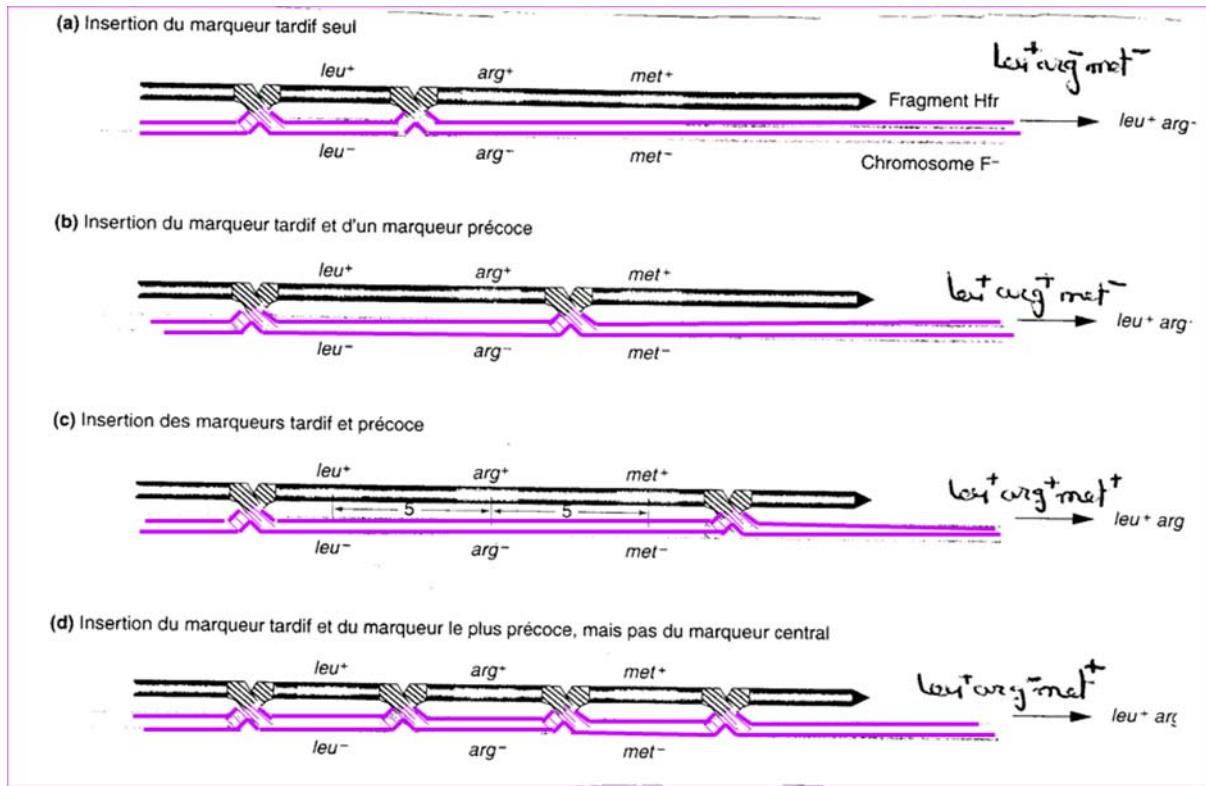
7-2 Détermination du lien entre les gènes (cartographie fine) .

- Choix de la conjugaison continue et on sélectionne pour le marqueur distal (tous les marqueurs ont une probabilité égale d'être transmis).
 - les fréquences de recombinaison ne dépendent que de la distance entre les gènes étudiés et non du gradient du transfert. Unités : pourcentage de recombinaison
 - On utilise des croisements réciproques (fréquence des différentes classes de recombinants donne l'ordre des gènes).
 - simplification: établir les classes de recombinants dans un croisement trifactoriel.
 - La classe la plus faible est celle qui nécessite 4 CO.

Exemple de détermination du lien entre les gènes.

Hfr leu⁺ arg⁺ met⁺ Str^s x F⁻leu⁻ arg⁻ met⁻ Str^r.

- Marqueur sélectionné= leu (sélection des recombinants Leu⁺)
- Marqueurs non sélectionnés= arg et thr.
- Nécessité de 2 CO pour incorporer n'importe quel fragment transmis, dans le chromosome F⁻.



Interprétation de la Fig

- Recombinants Leu+: un CO doit se produire à gauche de leu et le second à droite. Selon le site du second CO, les marqueurs précoce seront ou non insérés.

Supposons que la distance cartographique entre chaque marqueur est de 5% de recombinaison.

- (a) Dans 5% des Leu+, un CO aura lieu entre leu et arg : Recombinants leu+ arg- met-.
- (b) Dans 5% des Leu+, un CO aura lieu entre leu et met : Recombinants leu+ arg+ met-.
- (c) Dans 90% des Leu+, un CO aura lieu en dehors de l'intervalle leu arg met: Recombinants leu+ arg+met+.
- (d) Les recombinants leu+ arg- met+ auront besoin de 4 CO.
- 8-Tableau comparatif

Chapitre 5 : La transduction

1- Définition.

La transduction est un transfert d'ADN bactérien d'une bactérie vers une autre par l'intermédiaire d'un bactériophage. Un grand nombre de bactéries subissent la transduction :

- *Desulfovibrio, Escherichia, Pseudomonas, Rhodococcus, Rhodobacter, Salmonella, Staphylococcus, Xanthobacter...*
- Archaebactéries

Deux types de transduction:

- La transduction spécialisée ou restreinte (*Escherichia coli*)
- La transduction généralisée (P22 chez *Salmonella typhimurium*), (P1 chez *Escherichia coli*)

2 La transduction restreinte

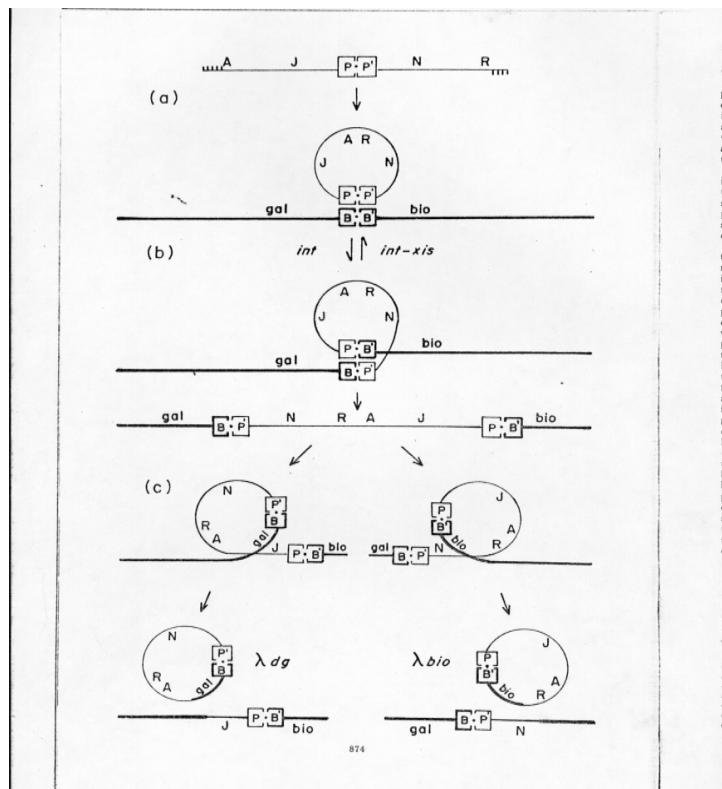
Produite par un phage « tempéré » Ex: le phage λ d'*E.coli*

Selon les conditions du milieu, le phage opte pour la lysogénie ou la lyse.

* Si le milieu est pauvre, CI qui est le répresseur du cycle lytique est activé. Le phage opte pour la lysogénie:

- La bactérie survit, le prophage est répliqué avec le chromosome.
- Lorsque la bactérie subit des dommages de son ADN (UV), le phage quitte la cellule.

* Si le milieu est riche, CI n'est pas synthétisé et le phage opte pour la lyse.

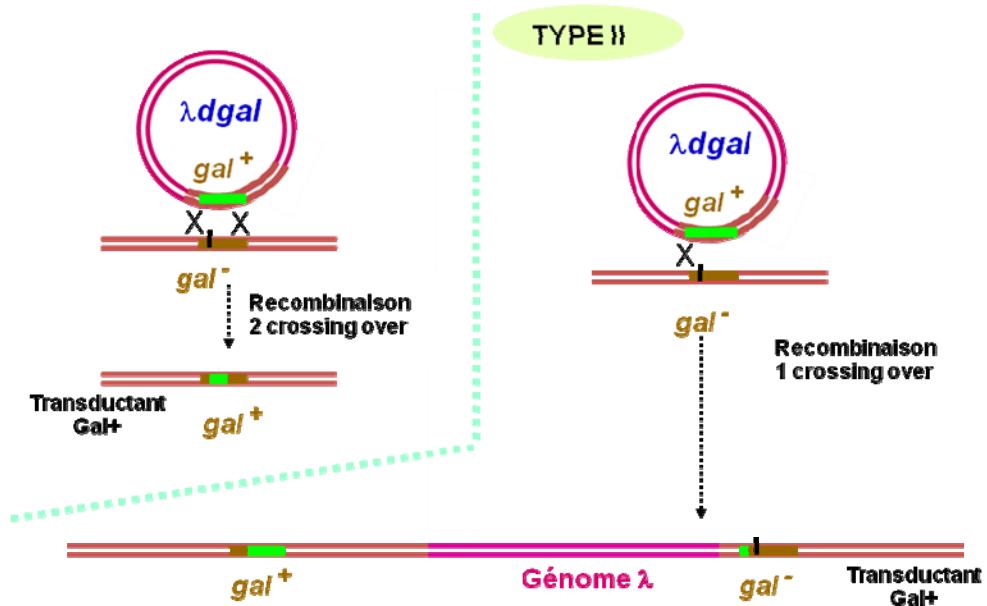


Lysat BFT = basse fréquence de transduction

-Induction UV d'une bactérie lysogène pour λ . Le lysat obtenu contient 10^{-5} à 10^{-6} phages transducteurs (une particule $\lambda dgal^+$ sur 10^6 l normaux car ils sont incapables de se répliquer seuls).

-Ce lysat est appelé lysat BFT = basse fréquence de transduction

- L'addition de ce lysat à une culture de bactéries gal^- permet d'obtenir quelques transductants gal^+

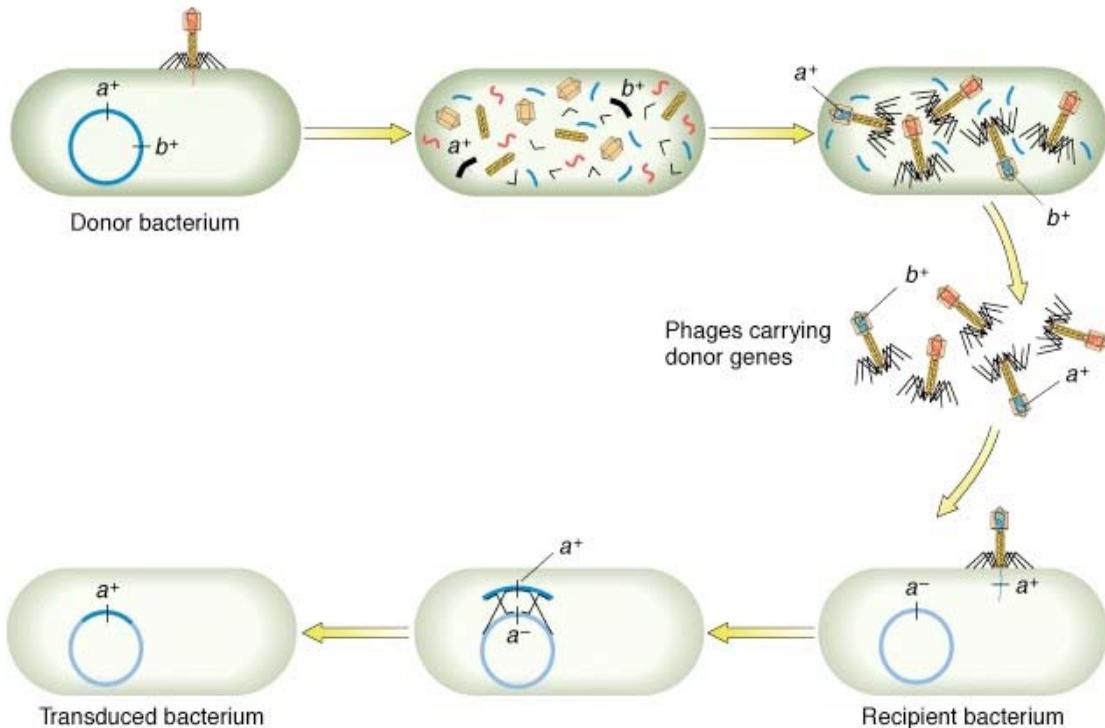


Les transductants *gal⁺* obtenus sont instables

Il y a addition du caractère *gal⁺* dans la réceptrice *gal⁻*

3- La transduction généralisée.

N'importe quel gène peut être transduit. Les caractères très liés peuvent être co-transduits. L'ADN bactérien de la bactérie donneuse est fragmenté par une nucléase phagique aussitôt après l'infection par le phage. Les fragments d'ADN bactérien sont encapsidés par erreur à la place d'ADN phagique lors de la maturation des phages durant le cycle lytique. Le lysat phagique produit contient quelques particules transductrices (10^{-3}) mêlées aux phages normaux. Les particules transductrices ne contiennent que de l'ADNbactérien (<10% ADN phagique). Elles peuvent se fixer et injecter l'ADN mais ne peuvent pas réaliser un cycle lytique.



Le lysat phagique est utilisé pour infecter une bactérie receveuse a^- avec une multiplicité d'infection très faible (moi= nombre de phage/nombre de bactérie=0.1).

On a 3 cas possibles dans la population bactérienne receveuse:

- Bactéries non infectées.
- Bactéries infectées par un phage P1 normal (cas le plus fréquent), le cycle lytique démarre.
- Bactéries infectées par le P1 transducteur défectif (cas rare mais c'est ce qui nous intéresse). L'ADN injecté subit une recombinaison homologue et s'intègre. On obtient des bactéries transductantes ayant acquis un phénotype nouveau sélectionnable. On parle de transduction complète. Si la recombinaison ne se fait pas, on a une recombinaison abortive.

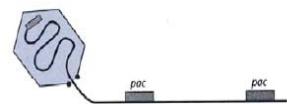
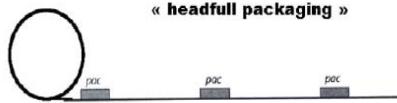
Pour éviter que les phages P1 normaux issus de cycles lytiques normaux ne viennent réinfecter les bactéries transductantes, deux paramètres sont importants :

- On utilise un moi faible à la première étape de l'infection de la souche receveuse.
- On ajoute du trisodium citrate à la fin de l'étape de l'infection de la souche receveuse. Pour s'adsorber à la bactérie, P1 exige du calcium libre dans le milieu. Ce calcium sera totalement complexé par le trisodium citrate et le P1 normaux libérés ne peuvent plus réinfecter les bactéries (transductantes et non transductantes).

Bactériophage tempéré P1 remplissage des capsides

NORMAL -

- réPLICATION par le mécanisme de cercle roulant
- reconnaissance des sites *pac* et empaquetage par le mécanisme « headfull packaging »

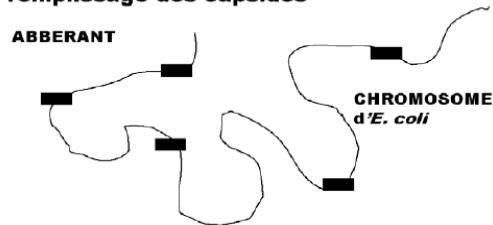


formation des particules infectieuses



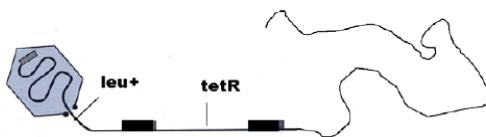
Bactériophage tempéré P1 remplissage des capsides

ABBERANT

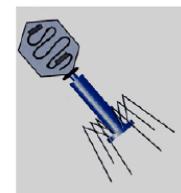


CHROMOSOME d'*E. coli*

■ ---- les séquences pseudo *pac* chromosomiques



formation des particules portant l'ADN d'*E. coli*

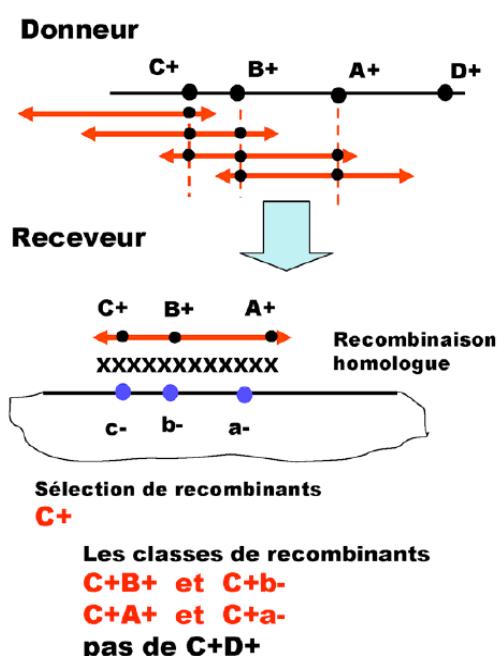


transduction généralisée

3-1 Fréquence de cotransduction:

fréquence avec laquelle un marqueur non sélectionné est apporté en même temps qu'un marqueur sélectionné, lien entre les gènes. Si distance est sup à 100 Kb (2 min) pas de cotransduction

**Transduction généralisée
par le bactériophage P1
recombinaison chez le receveur**

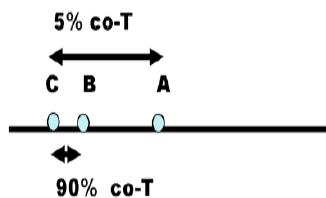


**Transduction généralisée
par le bactériophage P1 –
La distance génétique**

Fréquence de CO-transduction

$$= \frac{\text{C}+\text{B}+}{\text{total } (\text{C}+\text{B}+ \text{ et } \text{C}+\text{b}-)} \times 100\%$$

la fréquence varie entre 100% pour les gènes très liés et 0% pour les gènes non co-transductibles



4- Bilan Transduction généralisée et spécialisée.

Transduction Généralisée	Transduction Spécialisée
ADN des particules transductrices	ADN bactérien
Gènes bactériens transférés	Tous les gènes
Production des particules transductrices	Cycle lytique
Lysat enrichi	Impossible
	Gènes qui entourent le site att
	Induction UV d'une souche lysogène
	Erreur d'encapsidation
	Erreur d'excision
	Possible

Chapitre 6 : Recombinaison génétique

1- Définitions.

La recombinaison est l'ensemble des processus qui conduisent à des échanges entre molécules d'ADN et produisent de nouvelles combinaisons de chromosomes ou de gènes. On distingue plusieurs modes de recombinaison, selon

- La nature des substrats(ADN chromosomique, phagique, plasmidique, transposon)
- La structure des substrats (ADN mono- ou bicaténaire, linéaire ou circulaire).
 - Le degré d'homologie.

Trois types de recombinaisons

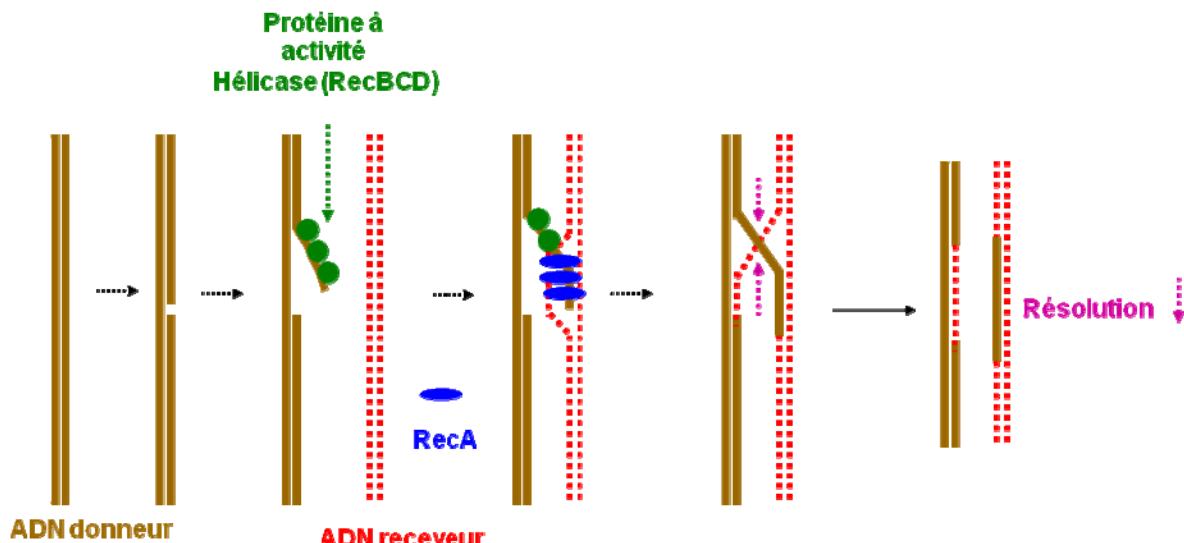
1- Recombinaison homologue ou générale: Les séquences qui interagissent doivent présenter de grandes régions d'homologie (quelques dizaines de paires de bases).

2- Recombinaison spécialisée: La séquence identique peut être seulement de quelques paires de bases.

3- Recombinaison illégitime: regroupe un ensemble d'événement rare.

1-1 Recombinaison homologue:

Schéma simplifié d'un des mécanismes de recombinaison homologue



Plusieurs modèles ont été proposés (celui montré est celui de Meselson et Radding). Dans chacun d'eux, la recombinaison est initiée par l'apparition d'une discontinuité (simple coupure ou brèche mono- ou bicaténaire) dans l'une des molécules d'ADN impliquées ou dans les deux. Grâce à cette discontinuité (queue 3'OH libre), les monomères de la protéine RecA polymérisent sur l'ADN monocaténaire (utilisant la queue 3'OH libre) pour former un filtre de nucléoprotéine et recherche des régions d'homologie dans l'autre molécule

d'ADN homologue, quelle soit coupée ou non, et la formation de nouvelles jonctions. La résolution de ces jonctions permet d'avoir l'ADN recombinant.

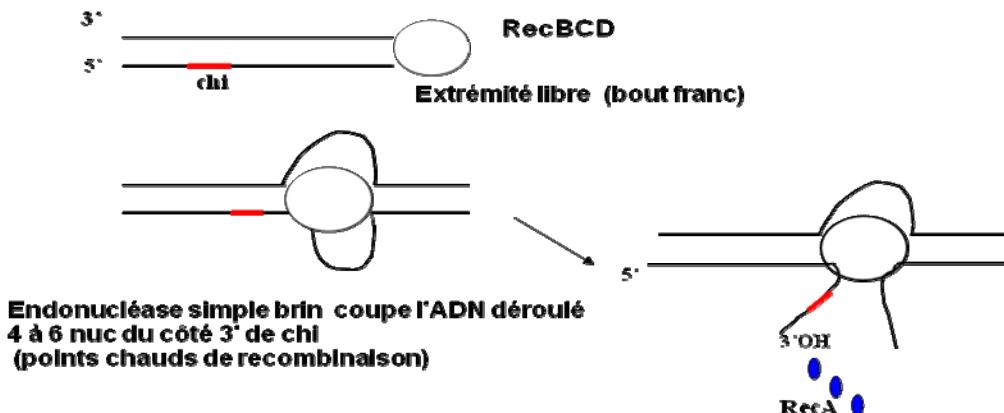
D'autres activités enzymatiques telles que l'ADN polymérase I et la ligase participent à la recombinaison pour réparer les brèches monocaténaires.

*La protéine RecA:

permet:

- l'appariement de deux ADN monocaténaires homologues.
- L'introduction d'un ADN monocaténaire dans un ADN duplex circulaire homologue.
- L'échange d'un brin entre un duplex linéaire et un ADN monocaténaire circulaire.
- Transfert réciproque de brins entre deux ADN duplex linéaires.

*Le complexe multienzymatique RecBCD : C'est un complexe à activité hélicase, exonucléase simple et double brins, endonucléase simple brin). Crée des régions simples brins.



*la voie RecE (Exonucléase VII):

C'est une voie alternative à RecBCD. RecE digère l'ADN double brin à l'extrémité 3' produisant une « queue » 3' qui est utilisée par RecA. Dans les conditions normales (voie RecBCD fonctionnelle), la voie RecE est réprimée.

3- Analyse par recombinaison

- Outil pour étudier la distance entre les gènes
- Probabilité qu'une même opération de recombinaison implique deux gènes est proportionnelle à la distance entre ces gènes

- Localisation de deux gènes l'un par rapport à l'autre sur le chromosome

3-1 Limites de l'analyse par recombinaison

Problème si deux mutations conduisant à un même phénotype sont localisées dans le même gène ou dans deux gènes différents très proches et on n'obtient pas de recombinants.

Comment trancher ?

á Test de complémentation

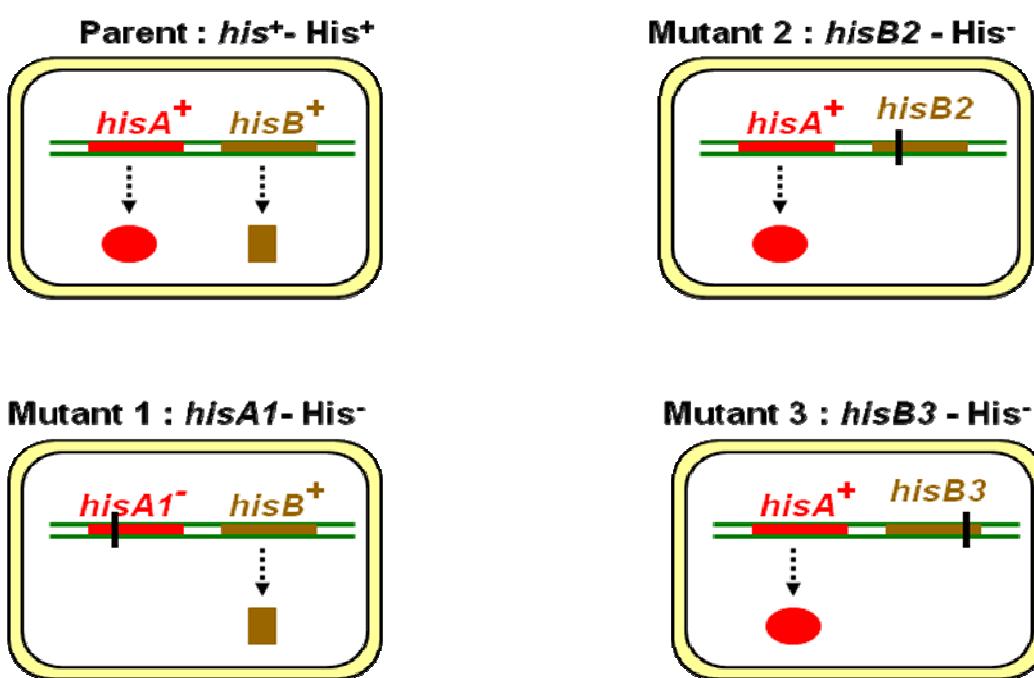
4 -Test de complémentation

- Construction de souches diploïdes partielles (mérodiploïde) sachant que la bactérie est haploïde

- Pour cela, utilisation de plasmides recombinants ou de bactériophages transducteurs

Dans une souche réceptrice *recA* (*pas de recombinaison*)

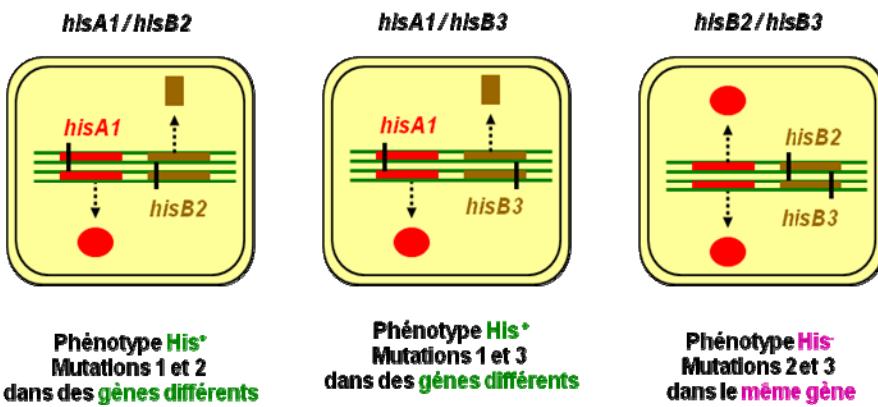
Exemple: Présence d'un parent sauvage His⁺ et trois mutants isolés His⁻



Construction de diploïde : allèle mutant /allèle mutant

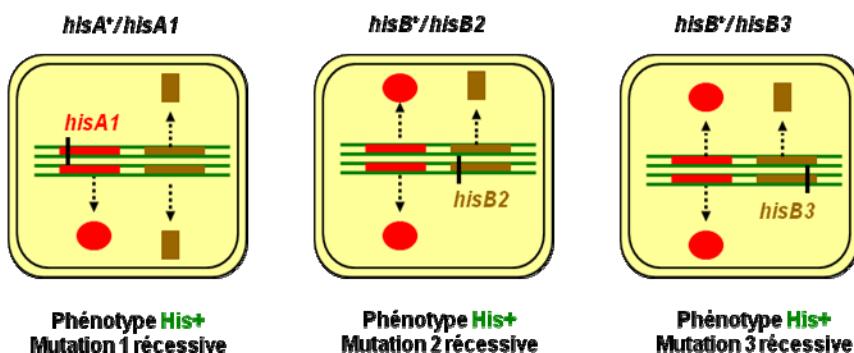
á Le diploïde a le phénotype sauvage = Complémentation = Les mutations sont dans des gènes différents

á Le diploïde a le phénotype mutant = Pas de complémentation = Les mutations sont dans le même gène



4-1 Analyse de la dominance/la récessivité

- á Construction de diploïde : allèle sauvage / allèle mutant
 - á Le diploïde a le phénotype sauvage = Allèle mutant récessif par rapport à l'allèle sauvage
 - á Le diploïde a le phénotype mutant = Allèle mutant dominant par rapport à l'allèle sauvage



Chapitre 7 : La transposition

Définitions

Les gènes sont-ils fixes sur le chromosome ? découverte de l'existence de séquences bien particulières capables de se déplacer. C'est la transposition (Événement rare: fréquence de 10^{-5} à 10^{-7} par génération. TE: Élément Transposable). Evolution du concept de génome statique vers le concept de génome en mouvement. Découverte d'éléments transposables chez le maïs (B. McClintock) puis partout dans la nature.

*Transposition = transfert d'un petit morceau spécialisé d'ADN ou d'une copie de ce morceau d'un site à un autre. Le morceau d'ADN est un « élément transposable » ou « gène Sauteur ».

- Il se trouve dans le chromosome bactérien, ADN du phage et les plasmides.
- Il peut engendrer une variété de réarrangements (Délétions, insertions,inversions).
- Il existe trois groupes d'éléments transposables selon leur structure génétique et leur mode de transposition:

1- Les séquences d'insertion « IS »

2- Transposon composite

3- Transposon famille « TnA »

1- Séquence d'Insertion IS

Nomenclature IS1, IS2 etc , présence de séquences IR (répétées inverses)

5'-CTGACTA.....TAGTCAG- 3'

3'-GACTGAT.....ATCAGTC- 5'

Fonctions de transposition (élément cryptique), fréquence de transposition 10^{-3} à 10^{-4}

Présence d'IS dans les plasmides et le génome des bactérieset des bactériophages

- *E. coli* - nombreuses IS1, IS2 et IS3
- Facteur F - une IS2, deux IS3 et un Tn1000
 - Création de souchesHfr

Séquence d'insertion

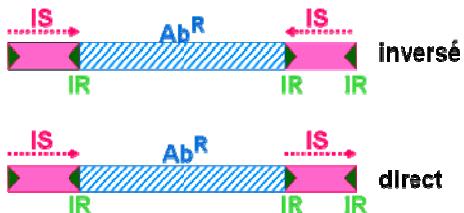


IR = Séquence répétée inversée
Un gène de la transposase

IS	Taille bp	IR bp
IS1	768	23
IS2	1327	41
IS3	1258	
IS10R	1329	22
IS50R	1531	9
IS903	1057	18

2- Transposon composite

- Code pour une ou plusieurs fonctions en plus de la transposition (phénotype différent)
- Paire d'éléments IS inversée ou directe(fonctions de transposition)
- Transposition : chaque IS peut transposer individuellement ou en même temps. On a alors mobilisation de la séquence centrale
- Fréquence de transposition : diminue avec la distance séparant les deux IS
- Transposons composites les plus étudiés chez *E. coli* : Tn5, Tn9 et Tn10



Transposon	Taille bp	IS	Sens IS	Résistance
Tn5	5818	IS50	Inversé	<i>kan</i>
Tn9	2638	IS1	Direct	<i>cam</i>
Tn10	9300	IS10	Inversé	<i>tet</i>
Tn1681	2088	IS1	Inversé	<i>ent</i>

3- Famille des TnA

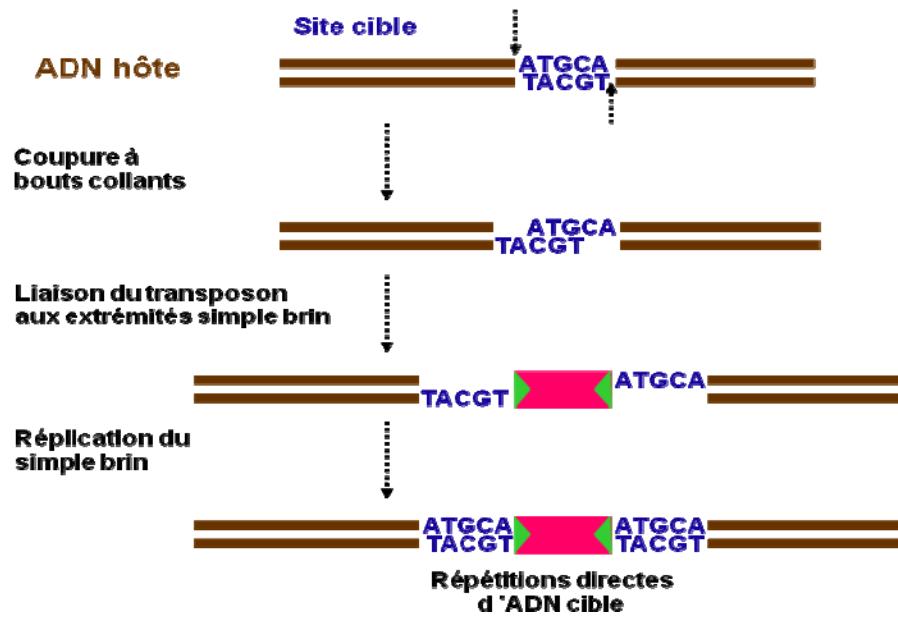
Ex:Tn3 : plus proche d'une IS que d'un transposon composite.Les gènes de résistance sont à proximité des gènes de transposition. Tn1 est le plus petit

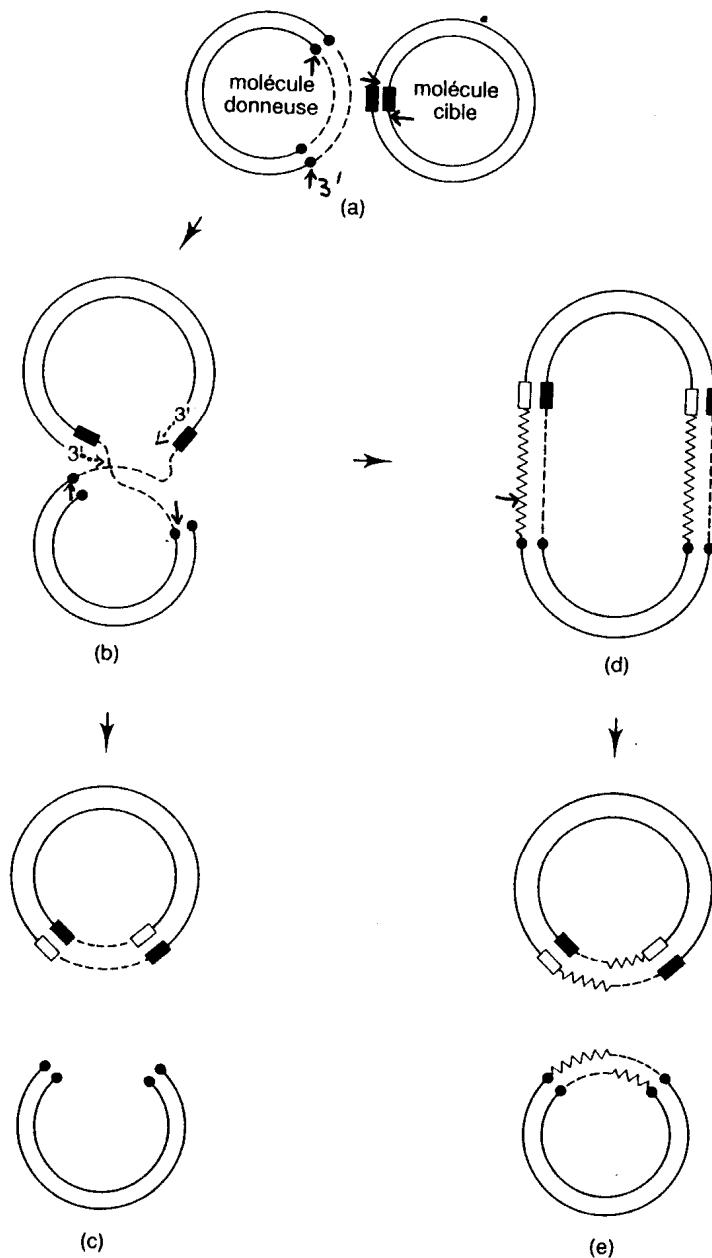
Transposition



Le phage Mu est un bactériophage qui transpose. Sa réplication se fait selon un mécanisme proche de la transposition. Existence extrachromosomique en temps que bactériophage

4-1 Crédit de répétition directe





b à c : transposition non réplicative (transposase uniquement) ex : Tn10

b à e : transposition réplicative (transposase et résolvase) ex : Tn3

Exemple de transposition réplicative

-Famille des TnA(gros transposons 5 kb)

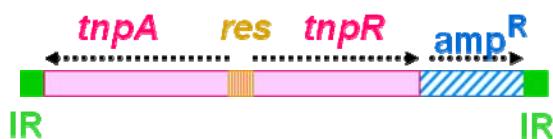
-Tn3 et Tn1000. Pour le Tn3

- 4957 bp - DR de 5 bp
- Une paire d'IR de 38 bp
- Trois gènes

- *tnpA* : transposase (TnpA 1015 AA)
- *tnpR* : résolvase (TnpR 185 AA)
- *res* : site de résolution interne
- Amp : béta-lactamase

Transposition en deux étapes

- Formation de cointégrat par TnpA
- Echange site spécifique au niveau du site interne de résolution par TnpR

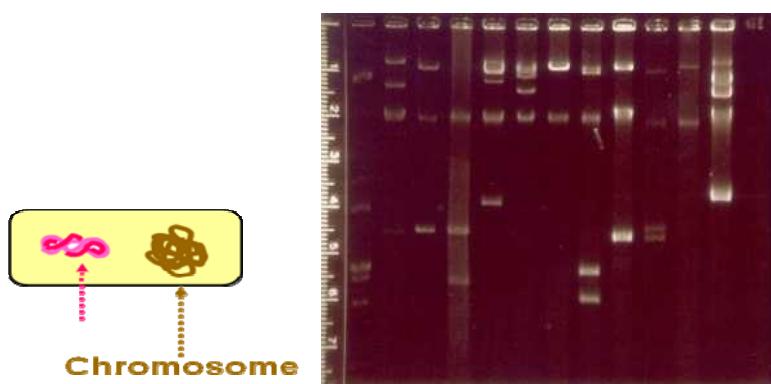


Chapitre 7: Les plasmides

1- Structure et rôle d'un plasmide.

- Elément génétique dans le cytoplasme de la bactérie
- ADN double brin circulaire - linéaire possible (Taille 1 à 1000 kb)
- En moyenne 0,2 à 4% de la taille du chromosome, forme superenroulée dans la cellule
- Des milliers de plasmides différents dans la nature. 300 plasmides naturels chez *E. coli*
- Rôle des plasmides dans le transfert de matériel génétique
- Construction de diploïdes partiels
- Véhicule de clonage

2- Techniques d'isolement des plasmides, propriétés physiques, migration en gel d'agarose



3- RéPLICATION DES PLASMIDES

Se fait dans la cellule hôte en utilisant la machinerie enzymatique de l'hôte

3-1 RéPLICATION DES PLASMIDES CHEZ LES BACTÉRIES À gram⁻

- Mécanisme analogue à la réPLICATION DU CHROMOSOME
- Initiation de la réPLICATION À UN POINT FIXE: L'ORIGINE DE RÉPLICATION
- RÉPLICATION BIDIRECTIONNELLE (INTERMÉDIAIRE EN Q) - PARFOIS UNIDIRECTIONNELLE

3-2 RéPLICATION DES PLASMIDES CHEZ LES BACTÉRIES À gram⁺

- RÉPLICATION SELON LE MÉCANISME DU CERCLE TOURNANT

4- CONTRÔLE DU NOMBRE DE COPIES

- Contrôle au niveau de la vitesse d'initiation de la réPLICATION

- Plasmide stringent - faible nombre de copies (1 à 2 copies par cellule)
- Plasmide relâché - fort nombre de copies (10 à 100 copies par cellule)

5- RÉPARTITION DES PLASMIDES (DANS LES CELLULES FILLES LORS DE LA DIVISION)

- Plasmide à faible nombre de copies

- Régulation très stricte
- Si répartition au hasard, environ 37% des cellules filles sans plasmide

- Plasmide à fort nombre de copies

- Répartition au hasard

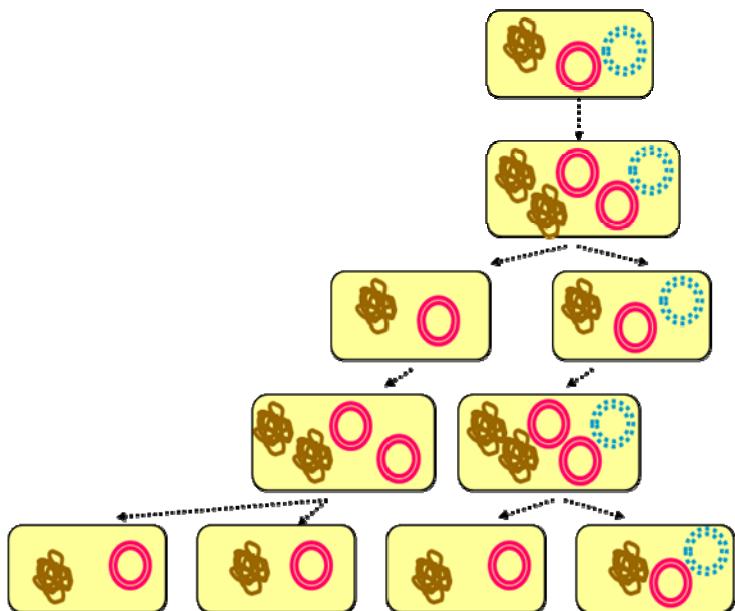
6- INCOMPATIBILITÉ ENTRE PLASMIDES

- Plusieurs plasmides différents dans une même souche

- *Borrelia burgdorferi*: 17 plasmides

- Transfert d'un plasmide dans une cellule hôte qui héberge déjà un autre plasmide

- Pas de réPLICATION DU PLASMIDE ENTRANT
- Perte lors des divisions ultérieures de la bactérie
- Les deux plasmides sont INCOMPATIBLES



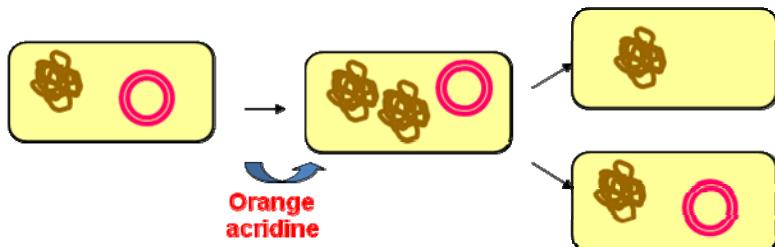
7- Classement en groupes d'incompatibilité

- Actuellement 25 groupes
- Pas de coexistence entre des plasmides du même groupe (incompatibles car même mécanisme de régulation de la réplication)
- Coexistence entre des plasmides de groupes différents (compatibles car mécanisme différent pour la régulation de la réplication)

Ex de compatibilité : plasmides F et ColE1 (deux répresseurs différents, réplication indépendante de chacun des plasmides)

8- Elimination d'un plasmide Guérison de la bactérie « curing »

- Action de composés qui inhibent spécifiquement la réplication du plasmide (acridine orange). On a dilution du plasmide lors des divisions successives (bactéries guéries). Guérison spontanée possible mais rare



9- Transfert d'un plasmide.

- ✓ Pas d'existence en dehors d'une cellule hôte
- ✓ Transfert possible au moment de la division cellulaire (Mécanisme le plus fréquent) ou par transformation naturelle (peu probable)

-Transfert par conjugaison est spécifique de certains plasmides : plasmide F (pilus F), plasmide R (pilus R)

10- Efficacité du transfert

- Transfert très efficace des plasmides conjuguatifs (100 % de transfert). Leur propagation rapide a un impact écologique très important car dispersion très rapide des résistances aux antibiotiques et très graves problèmes pour la chimiothérapie des maladies infectieuses

- Perte spontanée de plasmides dans une population naturelle en l'absence de pression de sélection

11-Rôle biologique des plasmides

Gènes intervenant dans des fonctions très diverses à condition qu'ils ne bloquent pas la réplication et la survie de la souche hôte. Soit on a :

- ✓ Absence de phénotype particulier (plasmide cryptique)
- ✓ Apport d'un phénotype nouveau avantageux et décelable [production d'antibiotiques, dégradation de certains composés, résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds (Cadmium, Cobalt, Mercure, Nickel, Zinc), virulence, production de bactériocines]

12- Plasmide de résistance.

-Découverts pour la première fois au Japon lors de l'épidémie de dysenterie (*S. dysenteriae* avec une multirésistance)

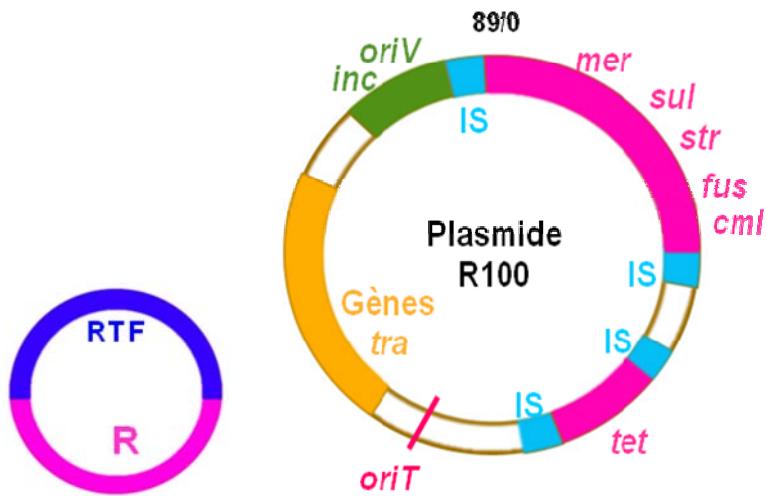
-Structure des plasmides R: R1, R6, R100

-Deux fragments d'ADN contigus : fragment RTF = Resistance Transfer Factor (Gènes *tra* du F) donc incompatibles avec F. Déterminant R à taille très variable (résistance ATB)

Le plasmide R100 :

- ✓ ADN double brin circulaire (89,3 kb)
- ✓ Gènes de résistance
 - Sulfonamides, streptomycine, spectinomycine, acide fusidique, chloramphénicol, tétracycline, mercure
- ✓ Au niveau d'éléments transposables
 - Transfert de la résistance par conjugaison ou transposition

Transfert par conjugaison entre les entérobactéries du genre *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* et *Shigella*



12-2 Intérêt médical des plasmides R

Plasmide self transmissible, dispersion très rapide au sein d'une population, transfert possible entre bactéries responsables d'épidémies et entre bactéries responsables d'infections nosocomiales. L'antibiothérapie a conduit à une augmentation considérable du nombre de plasmide R et à l'émergence de bactéries à résistances multiples.

Ex : Pénicilline introduite en 1940

- 1946 - 14% des *S. aureus* Pen^r
- 1947 - 38% «
- 1969 - 59% «
- 1970 - 100% «

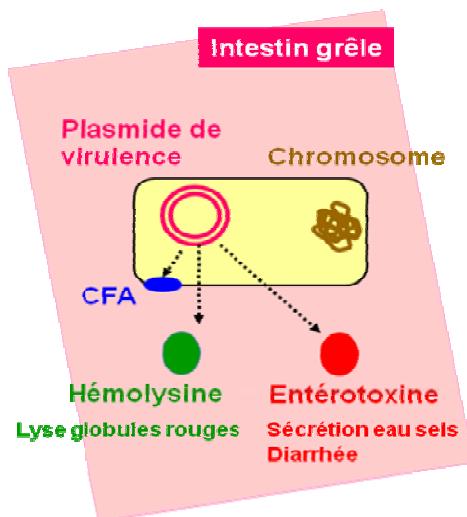
13- Plasmide de virulence

Présent chez les microorganismes pathogènes

- Fixation du microorganisme sur une cellule
- Colonisation de certains sites spécifiques
 - Synthèse de substances telles que toxines, enzymes...
 - Destruction de la cellule hôte

Ex: Souche enthéopathogène d'*E. coli*

- Colonisation de l'intestin grêle grâce au facteur antigénique de colonisation CFA et production de deux toxines (hémolysine et entérotoxine)



14- Plasmide producteur de bactériocine

-On a présence de gènes de structure, de dégradation et de transport

-La bactériocine est un peptide synthétisé par les bactéries contenant ce plasmide. Elle inhibe ou tue les cellules qui ne la produisent pas

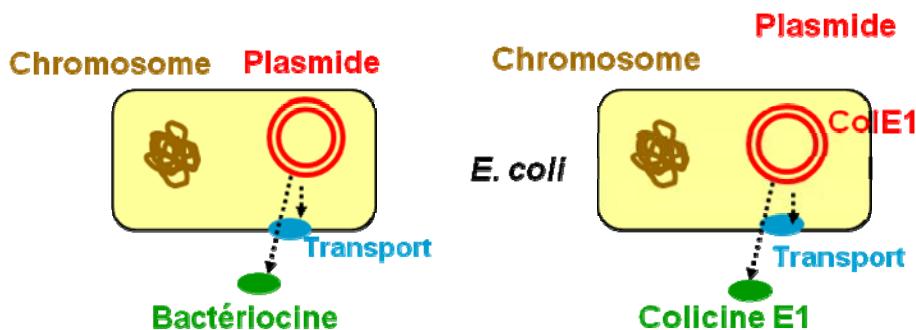
- Présence d'un gène codant pour une protéine immunité spécifique à la bactériocine, Localisée dans la membrane interne (protection de la bactérie productrice)

-Le nom de la bactériocine dérive de l'espèce qui la produit

- Colicine chez *E. coli*
- Subtilisine chez *B. subtilis* etc...

Chez *E. coli*

- Plasmides ColE1, ColE2, ColE3, ColA ...
- Colicines E1, E2, E3..



14-1-1 Structure d'une colicine

Trois domaines distincts

- Domaine N terminal
 - Translocation au travers de l'enveloppe cellulaire de la souche cible
- Domaine central
 - Fixation sur le récepteur de la souche sensible
- Domaine C terminal
 - Activité colicinogénique
 - Formation de pores (colicine E1) ou activité DNase (E2) ou RNase (E3)
 - Interaction avec la protéine immunité de la souche productrice



Bactériocines des bactéries à gramfonctionnelle

- Exemple : la bactériocine Nisin A
 - Production par des bactéries lactiques acides
 - Inhibition de la croissance de nombreuses bactéries à gram⁺
 - Utilisation comme conservateur dans l'industrie alimentaire

15- Plasmide de laboratoire

- Utiles dans les techniques du génie génétique

- Facilement manipulables
- Non self transmissibles
- Nombre de résistance limité

- Construction *in vitro* de nombreux plasmides à partir des plasmides de la nature

- Dérive de plasmides de résistance
- Délétions des fonctions de transfert et de certains gènes de résistance

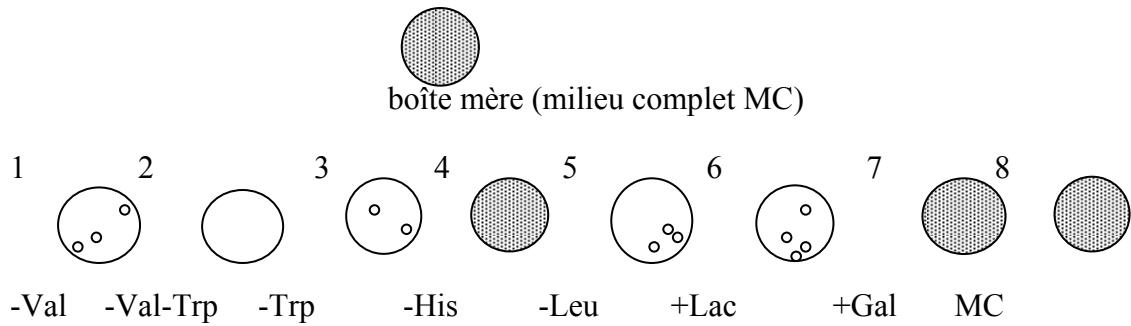
Module MICRII

TD de Génétique microbienne (SV5)

1/ On a étalé 10^8 cellules d'*E. coli* mutante sur un milieu complet. Après incubation 24h à 37°C, on obtient un film bactérien. On réalise ensuite des répliques de ce film sur différents milieux :

1, 2, 3, 4, 5 : milieux minimums supplémentés avec tous les acides aminés sauf ceux indiqués, le glucose est la source de carbone.

6,7 : milieux minimums supplémentés avec tous les acides aminés, le lactose ou le galactose est l'unique source de carbone. Après incubation, on obtient les résultats suivants :



- a) Quel est le but de cette manipulation et pourquoi on a fini par une réplique sur un milieu complet ?
- b) Expliquer l'apparition des colonies sur les boîtes répliques.

2/ le test d'Ames a été réalisé sur l'Ethinylestradiol (ET), un produit utilisé dans l'industrie pharmaceutique.

Le résultat du test après 48h d'incubation à 37°C est le suivant :

Boîte 1 (MM+His) : 10^6 UFC/ml

Boîte 2 (MM sans His) : 10 UFC/ml

Boîte 3 (MM sans His + 50 µg/ml D'ET + S₉ mix) : 100 UFC/ml

Boîte 4 (MM sans His + 100 µg/ml D'ET + S₉ mix) : 200 UFC/ml

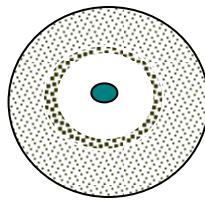
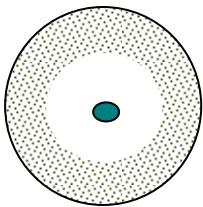
Boîte 5 (MM sans His + 50 µg/ml D'ET, sans S₉ mix) : 80 UFC/ml

a/ Quel est le but de ce test ?

b/ Préciser l'utilité de chacune des boîtes (faire les calculs nécessaires).

c/ Conclure sur le produit en argumentant.

3/ Deux souches bactériennes, *E. coli* et *Staphylococcus aureus* ont été soumises à un antibiogramme sur milieu solide pour voir leur sensibilité vis à vis de l’Ampicilline. Le résultat après une incubation de 18 h à 37°C est le suivant :



E. coli : Diamètre = 21 mm S. A : Diamètre = 18 mm (Zone avec un contour net et présence de colonies de grande taille)

19	14	diamètre (mm)
4	16	CMI (mg/l)

a) Quel est le type de zone observée pour chacune des deux souches ? (justifiez votre réponse)

b) Laquelle des deux souches on va utiliser pour effectuer une transformation avec un plasmide pBR₃₂₂ portant la résistance à l’Ampicilline?

On a transformée la souche choisie par 50 ng du plasmide pBR₃₂₂. On a sélectionné pour la résistance à l’Ampicilline en étalant 0.1 ml de la culture (la culture a un volume total de 1 ml) sur des boîtes de milieu complet contenant l’Ampicilline.

Le résultat de la transformation est le suivant :

Souche non transformée	Souche transformée avec le PBR ₃₂₂
10^{-3} : 280 colonies	10^{-2} : 290 colonies
10^{-4} : 34	10^{-3} : 35

c) Calculer le nombre de cellules viables/ml, le nombre de transformants/ml et l’efficacité de transformation pour pBR322.

4/ Deux souches F⁻ et Hfr ont été incubé à 37°C.

F⁻ est lac⁻ mal⁻ pro⁻ leu⁻ Strp^R. Hfr est lac⁺ mal⁺ pro⁺ leu⁺ Strp^S. Après 40 min d’incubation , un aliquot de la culture a été étalé sur un milieu minimum en présence de proline et de streptomycine. Les transconjugants obtenus sont ensuite étalés par la méthode des répliques sur les milieux indiqués. Les résultats sont les suivants :

MM + Pro, avec Strp	300 colonies
MM	126 colonies

MacKonkey +Mal	216 colonies roses et 84 blanches
Milieu complet+Xgal	96 colonies bleus 204 colonies blanches

- a) Quel est le marqueur de sélection et celui de contre sélection ?
- b) Quel est le génotype des colonies roses et blanches sur MacKonkey ? des colonies bleues et blanches sur X-gal ?
- c) Déterminer l'ordre des gènes.

X-gal : 5-Bromo-4 chloro-3-Indol- β -Galactoside 20 mg/ml dans le NN diméthylformamide.
Ajouté dans les milieu à raison de 40 μ g/ml.

Milieu MacConkey agar : milieu solide additionné de sucre à 0.4% final.

6/ Chez *E. coli*, quatre souches Hfr transfèrent une série des marqueurs génétiques dans l'ordre suivant :

Souche 1 : Q W D M T.

Souche 2 : A X P T M.

Souche 3 : B N C A X.

Souche 4 : B Q W D M.

Toutes ces souches sont dérivées de la même souche F⁺.

Quel est l'ordre des marqueurs sur le chromosome circulaire de la F+ d'origine ?

7/ On veut réaliser une transduction du marqueur lac⁺ porté par une souche *E. coli* mal+, Leu+, dans une souche lac⁻ mal⁻, leu⁻. Pour ce faire, on a utilisé le bactériophage P1. On a obtenu 50 transductants après manipulation, étalement sur milieu sélectif approprié et incubation de 24h à 37°C. Afin de voir la fréquence de co-transduction des marqueurs non sélectionnés. Une boîte mère a été préparée à partir des 50 transductants obtenus et on a réalisé des répliques. Les résultats après incubation 24h à 37°C sont les suivants :

Résultats des marqueurs non sélectionnés :

mal+ leu+ 3 colonies

mal+ leu- 10 colonies

mal- leu+ 24 colonies

mal- leu- 13 colonies

Total 50 colonies

- a) Quel est le milieu de sélection qui a permis l'obtention des 50 transductants.
- b) Au cours de la manipulation, préciser le rôle du trisodium citrate.
- c) Calculer la fréquence de cotransduction des gènes mal+, leu+.

d) Etablir l'ordre des gènes *lac*⁺, *mal*⁺ et *leu*⁺.

8/ On croise une souche Hfr *lac*⁺ *mal*⁺ *leu*⁺ Str^S avec une F⁻ *lac*⁻ *mal*⁻ *leu*⁻ Str^R. Des expériences de conjugaison interrompue montrent que le marqueur *lac*⁺ entre en dernier. On sélectionne donc les recombinants *lac*⁺ sur milieu approprié.

a/ Indiquer la composition du milieu de sélection (argumenter).

b/ Préciser le génotype des recombinants *lac*⁺ vis à vis des autres marqueurs ?

On a préparé une boîte mère des recombinants *lac*⁺ sur milieu complet + X-Gal et on a recherché la présence des autres marqueurs. Pour chaque génotype, on a compté le nombre d'individus:

lac⁺ *mal*⁺ *leu*⁺ : 330

lac⁺ *mal*⁻ *leu*⁺ : 10

lac⁺ *mal*⁻ *leu*⁻ : 60

lac⁺ *mal*⁺ *leu*⁻ : 0

c/ Quelle est la couleur des colonies Lac⁺ sur le milieu complet + X-Gal (argumenter)

d/ Quel est l'ordre des gènes (argumenter)?

e/ Quelle est la distance cartographique en unités de recombinaison entre les locis *lac* et *leu* ?

9/ analyse par complémentation dans des bactéries méroploïdes.

Il y'a 5 mutations liées qui affectent la capacité de la bactérie à synthétiser l'arginine. Pour déterminer les groupes de complémentation, les mutations *arg*⁻ sont combinées par paires (une sur un F' *arg*, l'autre dans le chromosome de la bactérie réceptrice).

Le tableau donne les phénotypes Arg des méroploïdes combinant différentes paires de mutations *arg*.

Mutation <i>arg</i>	1	2	4	5	9
1	-	-	+	+	-
2	-	-	+	+	-
4	+	+	-	-	+
5	+	+	-	-	+
9	-	-	+	+	-

Déterminer les groupes de complémentation.