



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE TAHRI MOHAMMED BECHAR

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

GENETIQUE MICROBIENNE

Polycopié à l'usage des étudiants de 3^{ème} année Licence

- Microbiologie

- Biologie moléculaire

DR. MEBARKI LAKHDAR

2017

AVANT PROPOS

La génétique est née dans le monde eucaryote, le fondement de son analyse repose sur l'observation des diploïdes issus de croisements conçus par l'expérimentateur (test de dominance ou test de complémentation fonctionnelle) puis l'étude des produits de la méiose chez ces diploïdes (test de la ségrégation 2/2 ou de la liaison génétique).

Par l'ensemble de ce dispositif expérimental, le généticien peut, à partir de plusieurs mutants indépendants, dont le phénotype diffère d'un phénotype de référence, déterminer si ce sont des mutants simples ou multiples, lesquels sont mutés dans le même ou un même gène, dénombrer ainsi le nombre minimal de gènes impliqués dans le phénotype ou le phénomène biologique étudié, cartographier les gènes liés, voire les sites de mutations au sein d'un même gène.

Or aucun de ces principes expérimentaux, observation des diploïdes ou analyse des produits de leurs méioses, ne peut s'appliquer à l'analyse génétique chez les procaryotes pour une raison simple et évidente: les procaryotes, et, parmi eux, les eubactéries comme *Escherichia coli*, ne sont jamais diploïdes.

Aussi la génétique bactérienne se fonde sur des propriétés spécifiques des bactéries pour entreprendre sa démarche analytique. Celle-ci est utile parce que des mécanismes fondamentaux à tout le monde vivant y sont souvent plus simples à étudier que chez la souris ou la drosophile, mais aussi parce que la variété extrême du monde bactérien est une mine de découvertes, pour la biologie fondamentale et pour les biotechnologies du futur.

Toute étude génétique d'un phénomène suppose d'en voir des variants, ce qui est assez facile chez les bactéries qui, comme tous les organismes unicellulaires, peuvent être facilement cultivées dans un milieu simple (milieu minimum) liquide ou solide, au sein duquel on peut cribler des mutants du métabolisme, de résistance à des toxiques, ou mutés dans des fonctions cellulaires plus essentielles (en général des mutations létales conditionnelles ou associées à un suppresseur conditionnel).

En conclusion, la génétique bactérienne présente un apport considérable en biologie moléculaire. Elle a participé à la naissance de cette nouvelle et importante discipline. Elle est devenue d'application banale par son usage quotidien :

- tests de mutagénèse induite (agro-alimentaire)
- mutagénèse par insertion
- techniques de clonage de gènes

- transfert de gènes
- séquençage.....

Le présent document est destiné aux étudiants de 3^{ème} année microbiologie et biologie moléculaire et il fera une présentation d'un rappel des notions essentielles de la génétique microbienne.

SOMMAIRE

I– Structure et organisation du matériel génétique	Page 01
II – Mutation et mécanismes de réparation de l’ADN.....	Page 13
III- Eléments génétiques transposables.....	Page 27
IV –Transferts génétiques chez les bactéries.....	Page 36
V – Phénomène de restriction modification.....	Page 47
VI – Régulation de l’expression des gènes.....	Page 54
VII – Génétique des bactériophages.....	Page 63

Chapitre I :

Structure et organisation du matériel génétique

Chapitre I : Structure et organisation du matériel génétique :

1. Définition : « C'est la somme des gènes et des facteurs cytoplasmiques gouvernant l'hérédité chez une espèce bactérienne . Il comporte les gènes et les séquences intergéniques portés par le chromosome et les plasmides (lorsque les plasmides sont naturellement présents dans l'espèce bactérienne). Le génome code pour des déterminants phénotypiques qui correspondent à des protéines métaboliques, des facteurs de virulence, et des marqueurs de résistance. L'expression de ces protéines permet à la bactérie de se multiplier dans son milieu, d'infecter un hôte, et de résister à l'action de certains antibiotiques. Elle définit un phénotype sauvage. Le phénotype sauvage se distingue du phénotype acquis qui se caractérise par de nouveaux caractères phénotypiques provenant de l'expression de gènes endogènes mutés ou de gènes exogènes nouvellement acquis ».

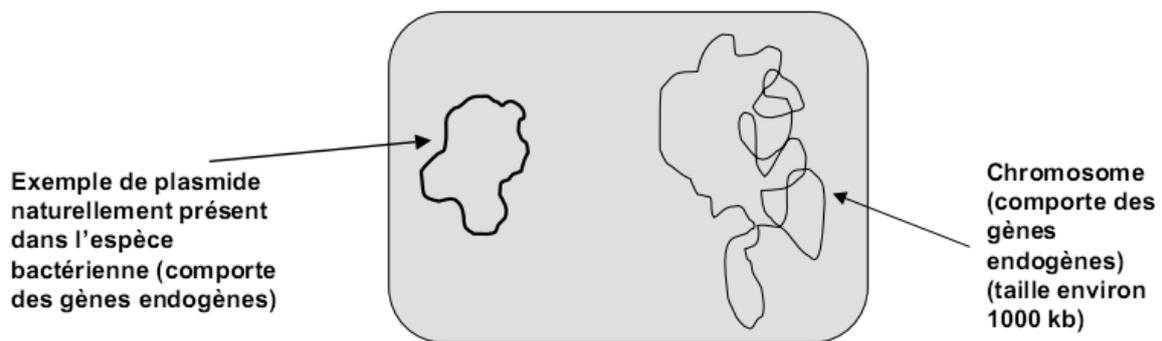


Figure 01: Supports de l'information génétique chez la bactérie (Mammeri, 2016).

2. Nature chimique du matériel génétique : En 1928, Fred Griffith découvre le phénomène de "transformation": une coinjection chez une souris de pneumocoques non pathogènes (R) et de pneumocoques virulents (S) mais tués préalablement entraîne la mort de l'animal. Les pneumocoques non pathogènes sont ainsi transformés par un facteur issu des pneumocoques virulents. En 1944, la purification du facteur transformant par Avery aboutit au résultat suivant: ce n'est pas une protéine, mais un acide desoxyribonucléique (ADN), mettant ainsi en évidence le rôle de l'ADN comme support de l'information génétique. Cependant, l'ADN est alors considéré comme un homopolymère dont l'élément de base serait ATGC et semble donc beaucoup trop rudimentaire pour être le support de l'information génétique.

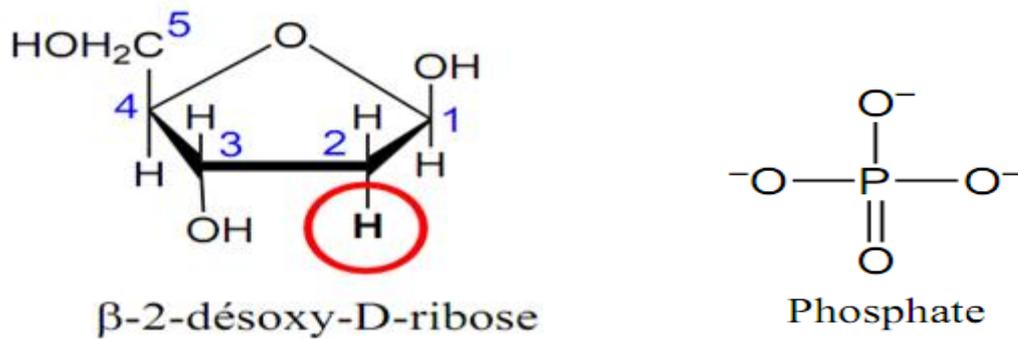
3. Structure de l'ADN :

a. est un polymère formé de l'enchaînement d'unités plus simples appelées nucléotides. Chaque nucléotide est formé d'un assemblage de trois types de molécules :

- Une molécule de sucre (désoxyribose)

- Une molécule d'acide phosphorique
- Une molécule d'une base azotée différente selon les nucléotides.

On rencontre des bases puriques (Adénine et Guanine) et des bases pyrimidiques (Cytosine et Thymine). Il existe donc quatre types possibles de nucléotides selon que la base organique est l'adénine, la guanine, la cytosine ou la thymine.



Bases azotées

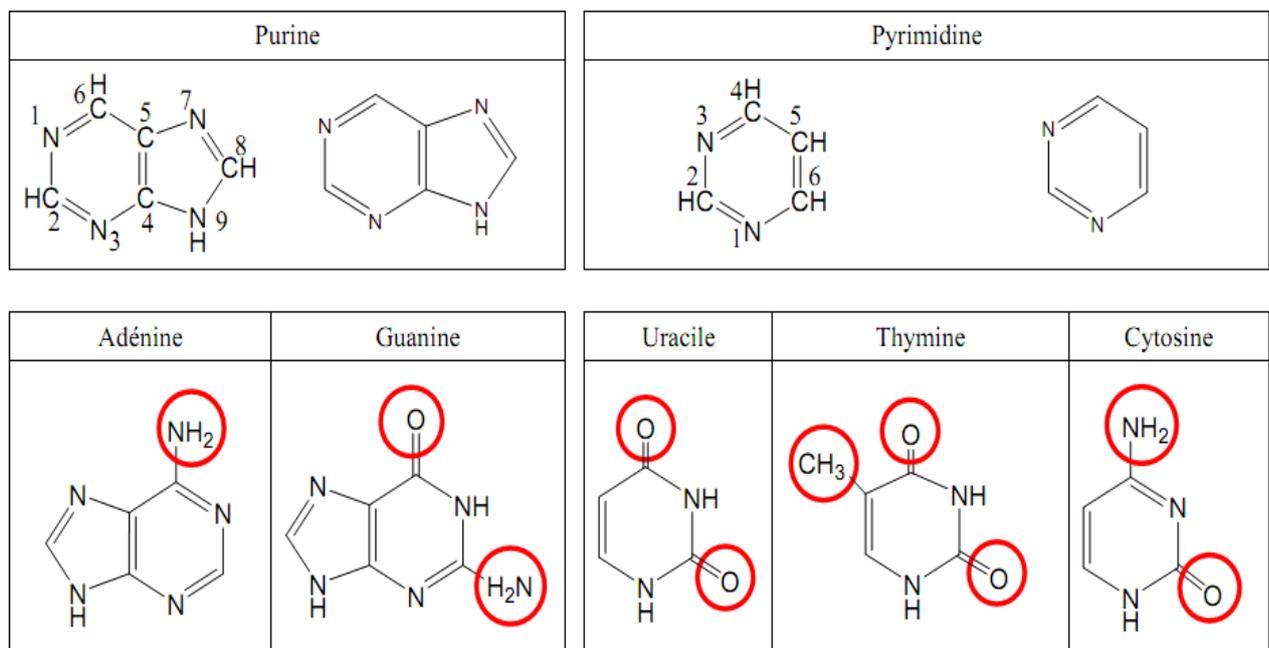


Figure 02: Molécules constitutives de l'ADN (Amrani. 2016).

b. : Le phosphore est attaché au carbone C'5 du désoxyribose et la base au carbone C1. La séquence des trois molécules est : base-sucre-acide phosphorique. Les nucléotides sont reliés les uns aux autres par des acides phosphoriques. Une même molécule d'acide phosphorique est d'une part au C5 d'un sucre et d'autre part au C3 d'un autre sucre par des liaisons phosphoester. Dans la chaîne poly nucléotidique, le sucre et l'acide phosphorique alterne tandis que les bases sont portées latéralement par des sucres.

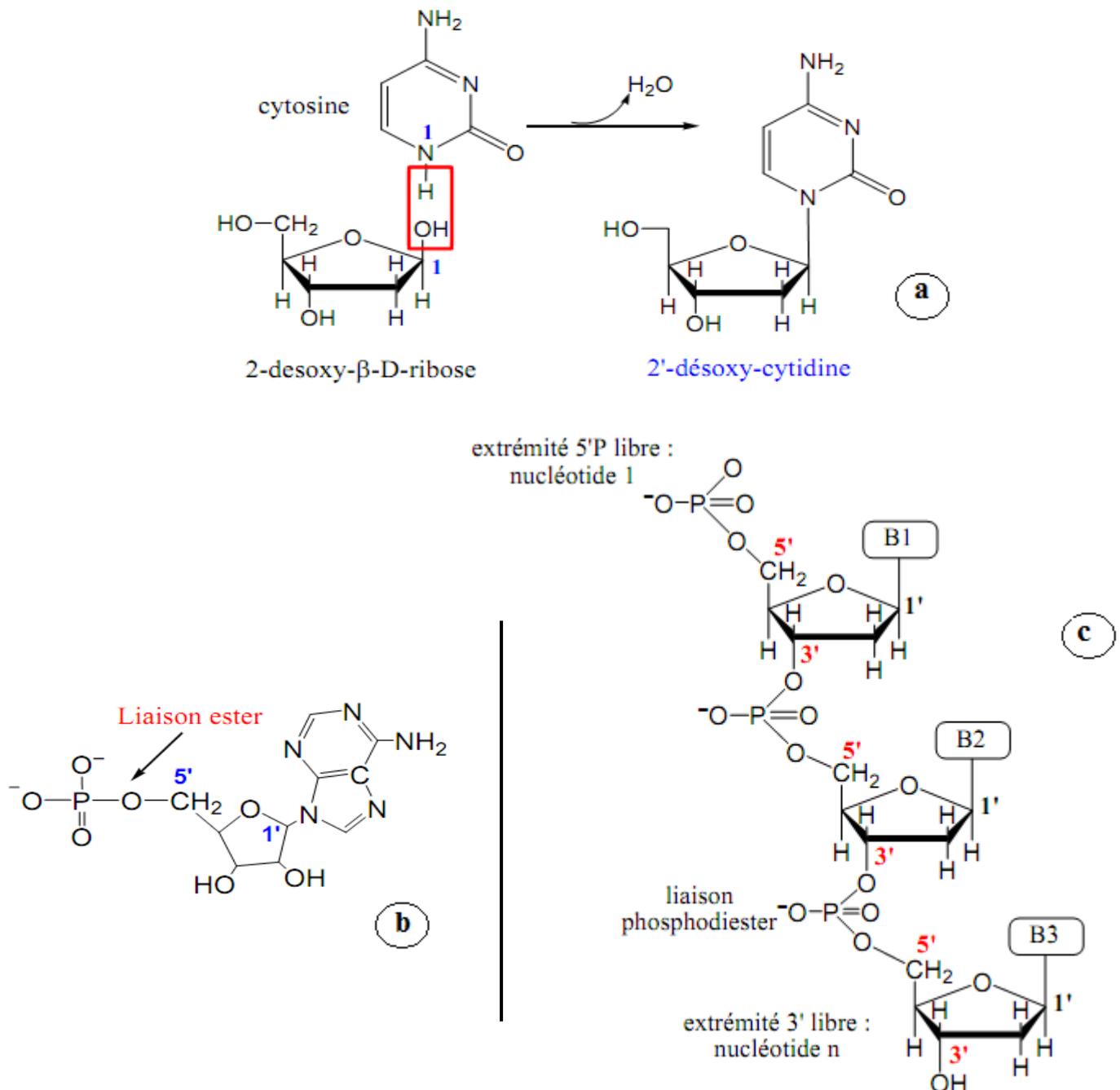


Figure 03: Formation des nucléotides et polynucléotides (Amrani. 2016).

- a- Formation de nucléoside
- b- Nucléotide
- c- Polynucléotides

c. Structure moléculaire de l'ADN : De tous les ADN rencontrés à l'exception de ceux de certains bactériophages, les chaînes de polynucléotides sont toujours associées par deux. Ces deux chaînes sont reliées par des liaisons hydrogènes établies entre les bases azotées. Mais l'appariement des bases se fait de telle manière qu'une purine soit en face d'une pyrimidine et plus précisément que l'adénine soit associée à la thymine et la guanine à la cytosine. Il y a donc une contrainte totale entre les deux chaînes puisque la séquence de l'une détermine celle de l'autre. Les deux chaînes sont dites complémentaires. D'autre part, elles sont orientées en sens inverse c'est à dire l'extrémité phosphorylée de l'une faisant face à l'extrémité hydroxylée de l'autre. Elles sont alors dites antiparallèles.

5'-ATTGCCGTATGTATTGCGCT-3'

3'-TAACGGCATAACGCGA-5'

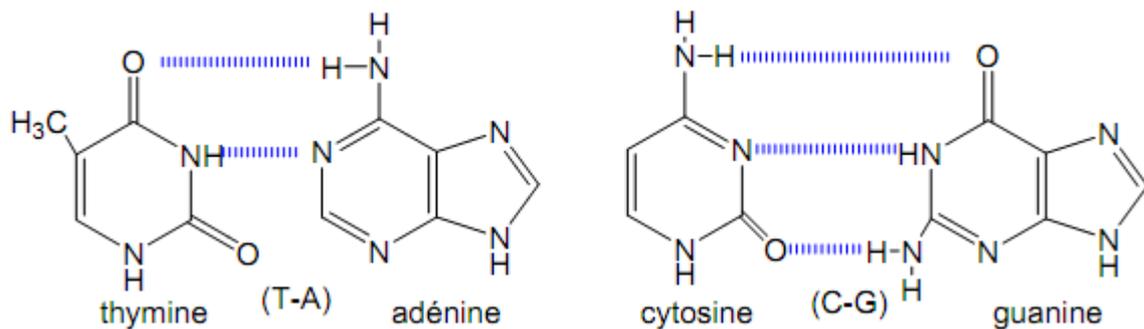


Figure 04: Appariement complémentaire entre bases azotées (Amrani. 2016).

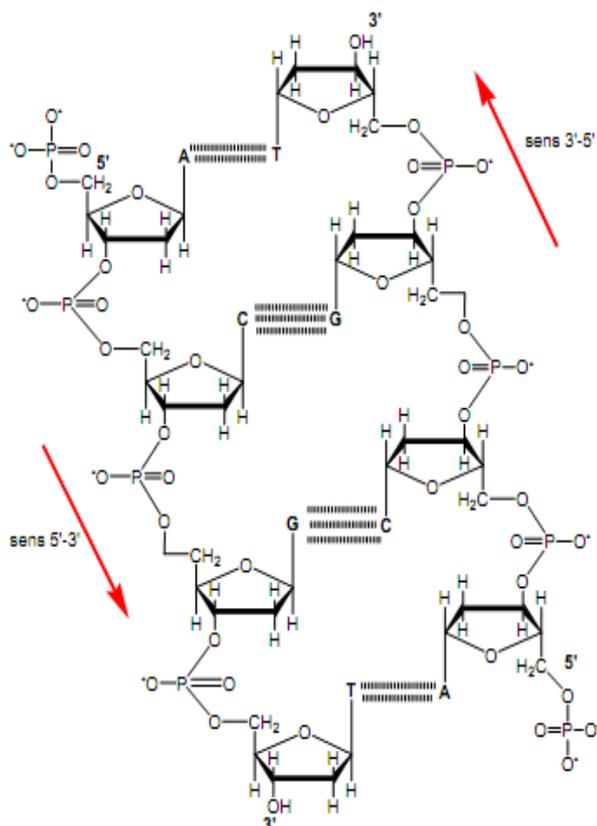


Figure 05: Complémentarité des bases dans la double hélice de l'ADN (Amrani. 2016).

Le modèle de Watson et Crick: les deux chaînes enroulées en spirale forment la double hélice. Les bases sont des molécules planes. Les plateaux de paires de bases sont empilés perpendiculairement au grand axe de la molécule. Leur espacement est de 3.4 Å, le pas de l'hélice étant de 34 Å. Chaque tour comporte dix paires de nucléotides.

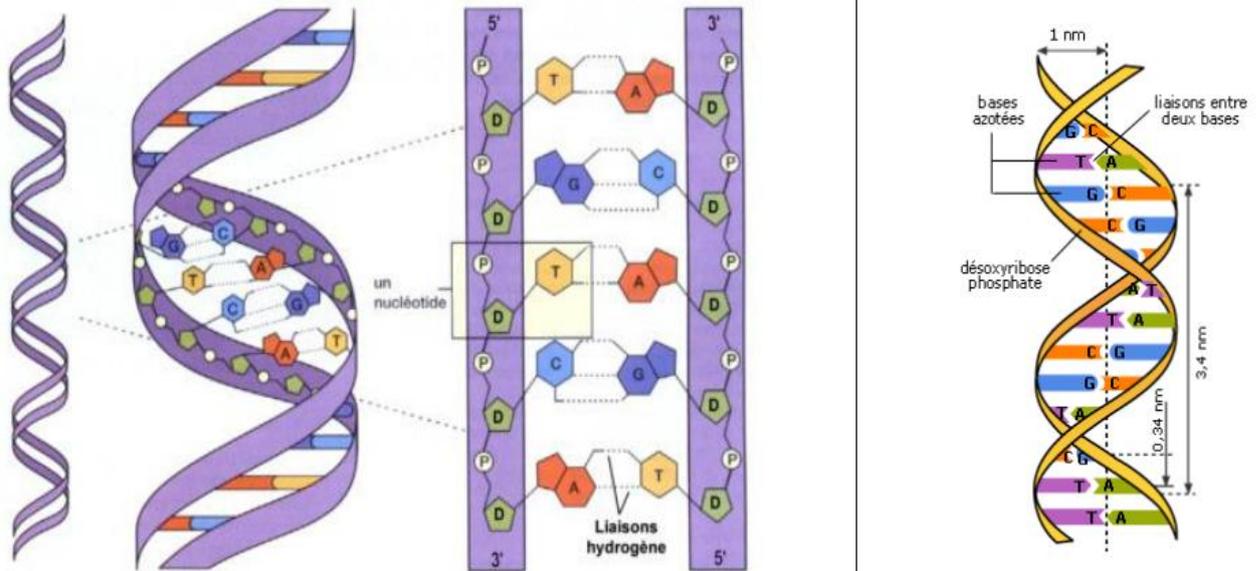


Figure 06: Structure de l'ADN selon le modèle de Watson et Crick (Don et al., 2002).

- **Séparation ou dénaturation :** 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 monocaténaire = 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 densité optique (DO) à 260 nm (effet hyperchromique), 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. Il peut varier largement selon les groupes bactériens.

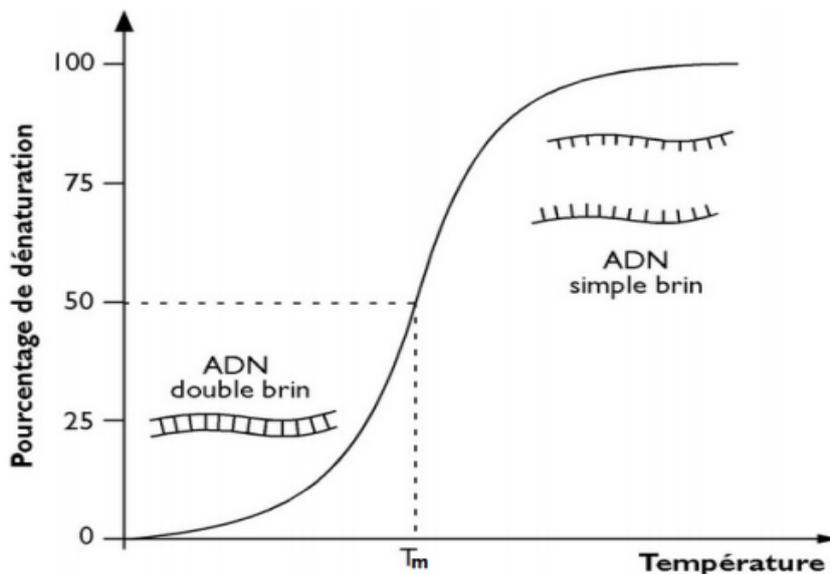


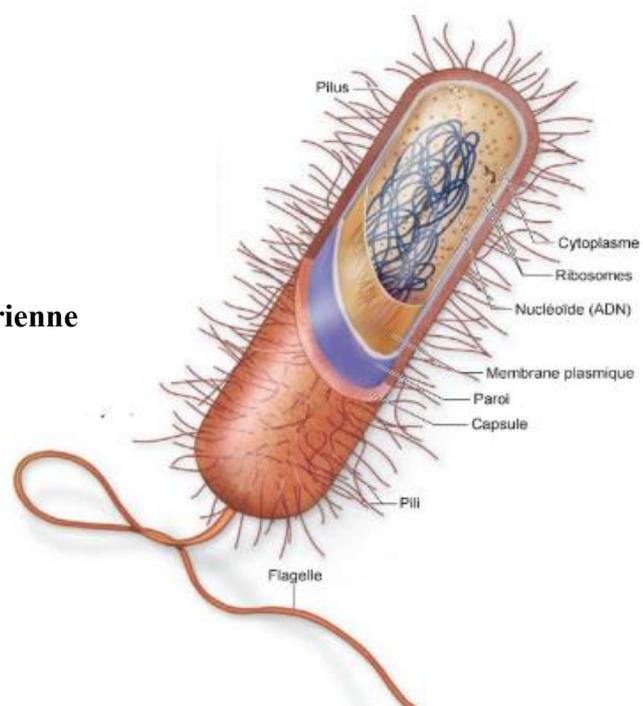
Figure 07: Effet du chauffage progressif sur la structure de l'ADN (Clark, 2005).

La température correspondant à la moitié de l'effet hyperchromique est appelée *température de fusion* ou T_m (**M**elting **T**emperature). L'effet hyperchromique correspond à une rupture des liaisons hydrogènes entre les deux brins d'ADN. La séparation entre les deux chaînes avec perte de la structure secondaire de l'ADN est appelée *dénaturation thermique* de l'ADN. Cette propriété est couramment utilisée en biologie pour analyser par spectrophotométrie la structuration des acides nucléiques en fonction de paramètres physico-chimiques (température, pH, ions ...).

4. Organisation de l'ADN en chromosome bactérien: L'ADN d'une cellule bactérienne, comme *E. coli*, est une molécule circulaire double brin souvent assimilée à un chromosome bactérien. Chez *E. coli*, cette molécule d'ADN contient 4,6 millions de paires de bases. L'ADN circulaire est emballé dans une région de la cellule appelée le nucléoïde (visible comme un amas, ou une série d'amas, qui occupe $\approx 1/3$ du volume de la cellule) où il s'organise dans environ 50 boucles (ou domaines) liés à une protéine squelette attachée à la membrane cellulaire. A l'intérieur de cette structure l'ADN n'est pas en réalité une molécule d'ADN à double brin circulaire, mais il est super-enroulé négativement ; c'est-à-dire qu'il est enroulé autour de lui-même et il est aussi associé à plusieurs protéines liées à l'ADN, les plus communes d'entre elles étant les protéines HU, HLP-1 et H-NS. Ce sont des protéines de type histone. Cette organisation permet à l'ADN de participer de façon simultanée à la réplication, la transcription, la traduction et à la recombinaison et permet une réponse adaptée et rapide aux variations de l'environnement. Dans la plus part des cas l'ADN s'organise sous forme de chromosome unique et circulaire, ou dans quelques cas très rares en plusieurs chromosomes, et parfois en chromosome linéaire.

Figure 08: Structure d'une cellule bactérienne

(Raven et al., 2017).



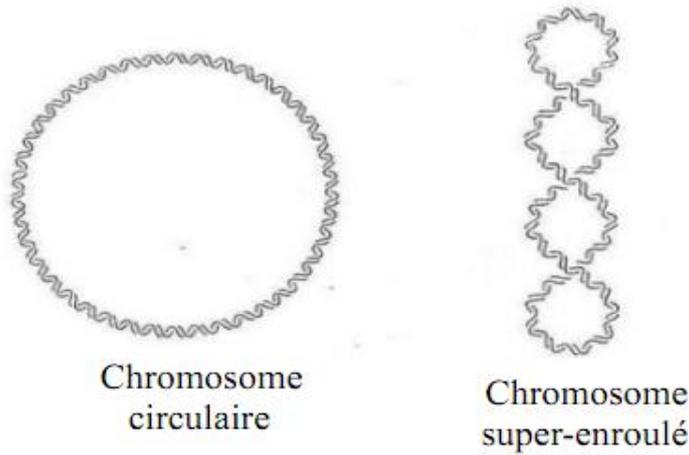


Figure 09: Enroulement du chromosome bactérien
(Gaillardin et Tinsley, 2007).

	Chromosome (Nombre, forme, taille en (Mb))
<i>Escherichia coli</i>	1 chromosome circulaire (4,6)
<i>P. aeruginosa</i>	1 chromosome circulaire (6,3)
<i>Vibrio cholerae</i>	2 chromosomes circ. (2,9+1,1)
<i>Brucella suis 1</i>	2 chromosomes circ. (2+1)
<i>Brucella suis 3</i>	1 chromosome circulaire (3,1)
<i>A. tumefaciens</i>	1 chro. circ. (3), 1 chro. lin. (2,1)
<i>Borrelia</i>	1 chromosome linéaire (0,9)

Tableau 01: Exemples d'état des chromosomes chez quelques bactéries.

	Nombre de paires de Bases	Nombre de protéines
<i>Mycoplasma genitalium</i>	580073	467
<i>Treponema pallidum</i>	1 138 011	1031
<i>Haemophilus influenzae</i>	1 830 138	1709
<i>Neisseria meningitidis MC58</i>	2 272 325	2025
<i>Vibrio cholerae</i>	4 033 464	3827
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4 411 529	3918
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 264 403	5565

Tableau 02: relation entre taille du génome et nombre de protéines synthétisées.

5. L'ADN extra-chromosomique (Les plasmides):

5.1. Définition et structure : Les plasmides sont des petits fragments d'ADN circulaire et cytoplasmiques (quelques fois linéaires) présents dans la cellule bactérienne et indépendants du génome bactérien. Ils sont beaucoup plus petits qu'un chromosome et de taille variable (0,5 kb à 500 kb). Peuvent exister sous forme de copie unique ou multiple. Ils sont médiateurs de nombreuses propriétés permettant une meilleure adaptation des bactéries, bien que non indispensables au métabolisme normal de la cellule-hôte. Cependant, il existe des plasmides « obligatoires » qui ont longtemps été considérés comme des chromosomes secondaires et qui sont présents dans environ une espèce bactérienne sur dix. Parmi ces espèces, on trouve notamment celles qui appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Brucella*, *Rhizobium*, *Ochrobactrum*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Vibrio* et *Leptospira*. Le terme de plasmide a été créé en 1952 par Lederberg pour désigner tout élément génétique cytoplasmique, comme le facteur F. Les plasmides de résistance aux antibiotiques ont été découverts en 1956 au Japon à l'occasion d'une épidémie de dysenterie bacillaire (*Shigella dysenteriae*) à bacilles résistants. Ils peuvent être visualisés par microscopie électronique ou plus simplement par électrophorèse en gel d'agarose et révélation au bromure d'éthidium (substance fluorescente).

5.2. Réplication et transmission: Ce sont des unités de réplication autonome (sont des réplicons). Ils possèdent leur propre origine de réplication et se répliquent en général de manière indépendante du chromosome bactérien. C'est cependant la machinerie de la cellule qui assure leur réplication. La transmission des plasmides d'une cellule à l'autre s'effectue habituellement par conjugaison, ou encore transduction ou transformation

5.3. Propriétés biologiques portées par les plasmides : Les plasmides confèrent aux bactéries qui les hébergent de nombreux caractères génétiques. Les gènes portés par les plasmides peuvent coder pour la synthèse de protéines qui confèrent des propriétés biologiques diverses:

- Résistance aux antibiotiques (bêta-lactamines, aminosides, pénicillins, cyclines, macrolides), résistance aux antiseptiques mercuriels, aux métaux lourds (antimoine, argent, bismuth...) et aux bactériophages. (**Plasmides de résistance**).
- Les plasmides permettent ainsi aux bactéries de s'adapter à un environnement hostile.
- La virulence des bactéries peut aussi être à médiation plasmique : pouvoir pathogène des colibacilles entéropathogènes (diarrhées des voyageurs), pouvoir pathogène des staphylocoques dans l'impétigo. (**Plasmides de virulence**).

- Les plasmides peuvent également coder pour la synthèse de bactériocines qui inhibent la croissance d'autres bactéries (ex. : colicines létales pour les entérobactéries). (**Plasmides de bactériocines**).
- Ils peuvent aussi porter les gènes qui codent pour le métabolisme du lactose ou de la lysine chez les *Proteus*, la production de HS chez *E.coli*, la dégradation du toluène ou de l'octane chez les *Pseudomonas*... (**Plasmides métaboliques**).
 - Les plasmides possèdent des gènes qui assurent leur réplication autonome. Certains plasmides possèdent aussi des gènes qui assurent leur transfert par conjugaison (**Plasmides conjugatifs**).

5.4. Intérêt des plasmides en biotechnologie et en génie génétique :

Les plasmides présentent un certain nombre d'applications en génie génétique et en biotechnologie ;

- Ils sont utilisés comme vecteur de clonage.
- Ils sont utilisés comme vecteur d'expression et la production des molécules.
- Ils sont utilisés comme vecteur pour la transformation de cellules eucaryotes.
- Ils sont utilisés dans le séquençage de l'ADN.

6. Matériel génétique viral :

La structure des virus est très variable. La taille, la morphologie et la composition peuvent varier. Les acides nucléiques sont entourés d'une *capside* protéique. La *capside* est composée de monomères appelés *capsomères*. Capside et acides nucléiques forment la *nucléocapside*. Les virus "nus" ne sont composés que d'une nucléocapside. La forme extracellulaire des virus (acides nucléiques entourés d'une capsidie protéique) est appelée le *virion*. La taille de la plupart des virions varie de 20 à 300 nm.

Les génomes viraux sont très petits. Ils ne codent que quelques fonctions. Pour leur réplication ils dépendent donc totalement de la cellule hôte; il en va de même, pour la transcription et la traduction ou les ribosomes de l'hôte sont employés. Le génome des virus est assez particulier. Il peut être constitué d'ADN, d'ARN (à polarité positive (+) (même polarité que l'ARNm) ou à polarité négative (-)). Le génome viral peut être simple brin ou double brin, constitué d'une molécule linéaire ou circulaire. Il y a des virus à ARN monocaténaire diploïdes et d'autres à ARN monocaténaire segmenté.

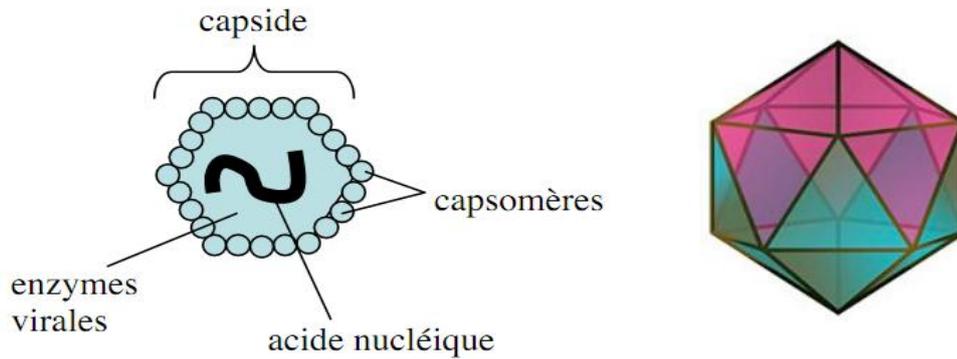


Figure 10: Virus nu à symétrie icosaédrique (David, 2016).

Les capsides de certains virus possèdent une symétrie icosaédrique alors que d'autres possèdent une symétrie hélicoïdale. Par exemple, le virus de la mosaïque du tabac (TMV) est un virus à ARN dont les 2130 capsomères sont arrangés en hélice. Chaque virion mesure 18 x 300 nm. La longueur des virus hélicoïdaux dépend de la longueur de leurs acides nucléiques.

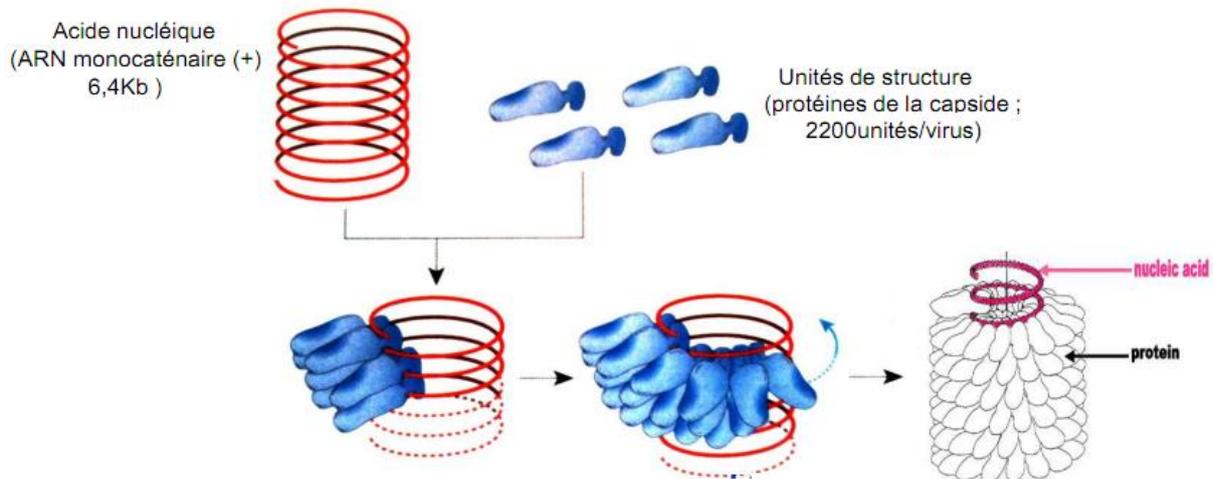


Figure 11: Virus à symétrie hélicoïdale (TMV) (Bakri, 2013).

La nucléocapside des virus peut être enveloppée (**virus enveloppés**) est entourée d'une bicouche lipidique. Cette bicouche provient de la cellule hôte infectée. On trouve ces virus essentiellement chez les animaux. Par exemple, le virus de la grippe (le virus *Influenza*).

La bicouche lipidique des virus enveloppés possède des glycoprotéines avec lesquelles les virus peuvent reconnaître et donc infecter leurs cellules hôtes. Les protéines membranaires sont généralement "codées" par des gènes présents dans le génome du virus.

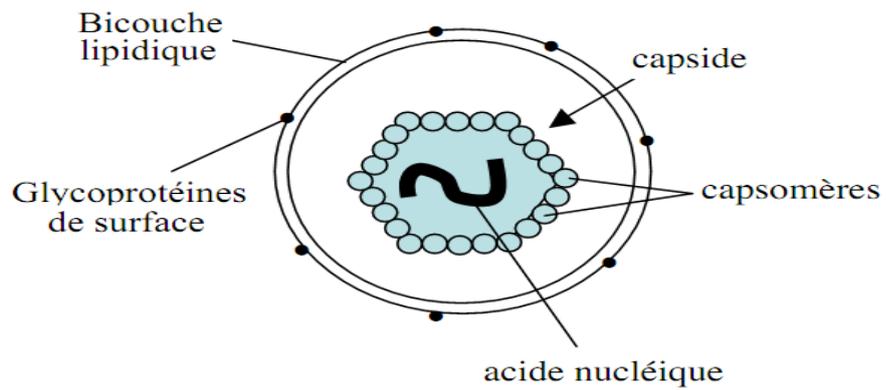


Figure 12: Virus enveloppé (David, 2016).

Les virus peuvent être de structure complexe c. à. d possédant une tête icosaédrique et une queue hélicoïdale. Ce sont généralement des virus de bactéries. La queue hélicoïdale possède des fibres caudales qui permettent au virus de s'attacher aux parois des bactéries. Par exemple, le bactériophage T4 chez *E. coli*.

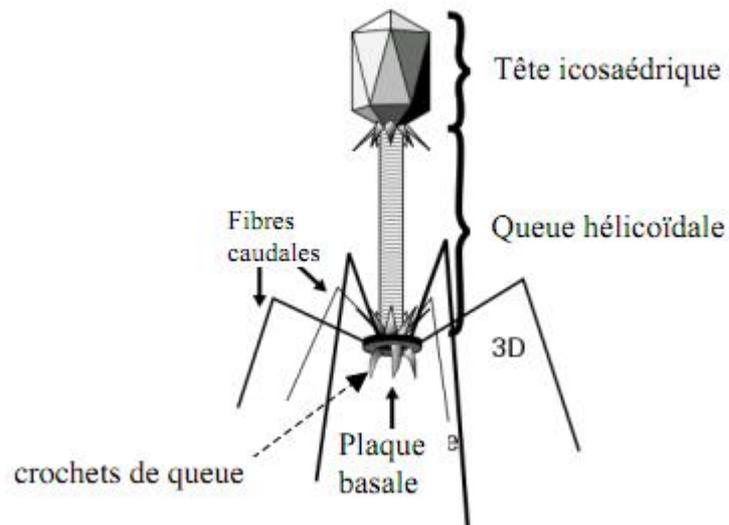


Figure 13: Virus à structure complexe (David, 2016).

Chapitre II :

Mutation et mécanismes de réparation de l'ADN.

Chapitre II : Mutation et mécanismes de réparation de l'ADN.

1. Introduction : La mutation d'un gène ou mutation génique est un évènement spontané mais qui peut être induit expérimentalement. C'est un évènement universel car il intéresse tous les êtres vivants. C'est un évènement fortuit parce qu'il arrive par hasard, par accident d'une manière imprévue, exceptionnel car il est rare et se définit par sa fréquence mesurée par le taux de mutation. Cet évènement modifie le contenu du message héréditaire. Il peut entraîner de ce fait un changement qualitatif ou quantitatif de la protéine dont la biosynthèse est contrôlée par ce message.

2. Taille de mutation : Selon la partie d'ADN affectée, les mutations sont regroupées en deux grandes catégories, soit les mutations ponctuelles et les mutations grandes (ou large mutation).

2.1. Mutations ponctuelles : Les mutations ponctuelles sont des modifications chimiques qui affectent une paire de bases azotées d'une séquence d'ADN et donc, un seul gène. Elles sont classées en deux grandes catégories.

a. Mutations par substitution : est le résultat du remplacement d'un nucléotide par un autre

La substitution peut être de type ;

- **Transition :** Une base purique ou pyrimidique est remplacée par une autre du même type. Remplacé A (purine) par G (purine) et remplacé T (pyrimidine) par C (pyrimidine).
- **Transversion :** Une pyrimidine est remplacée par une purine et vice-versa.

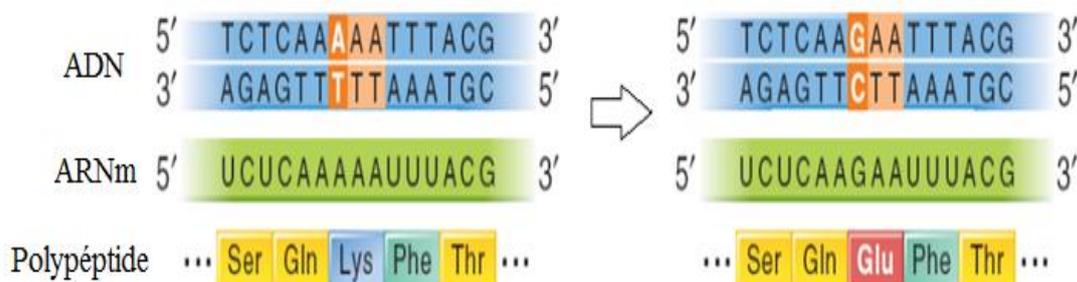


Figure 14: Exemple de mutations par substitution (Melki, 2016).

Effet de la mutation par substitution (effet sur les protéines): la substitution peut avoir des effets ou non sur les protéines et on distingue :

- **Mutation synonyme (silencieuse):** substitution d'un codon par un autre codon qui code pour le même acide aminé (ce qui est le plus souvent pour les modifications affectant la troisième base du triplet) à cause de la dégénérescence du code génétique.

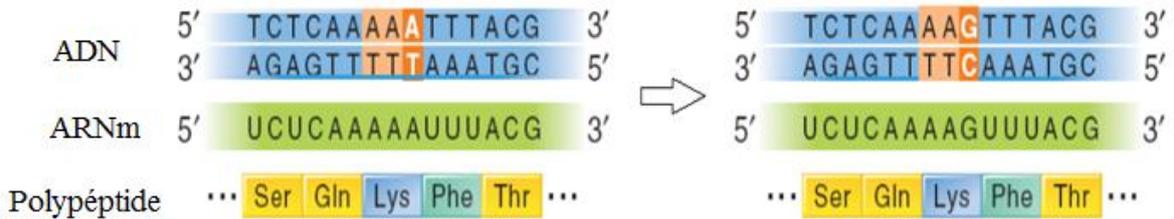


Figure 15: Exemple de mutation silencieuse (Melki, 2016).

- **Mutation non-sens:** mutation d'un codon spécifiant un acide aminé en codon stop.

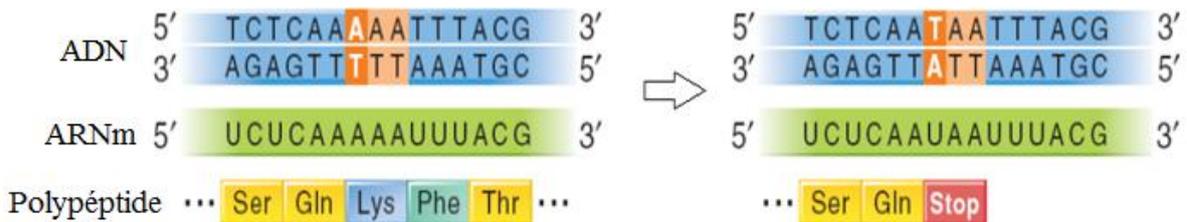


Figure 16: Exemple de mutation non-sens (Melki, 2016).

- **Mutation faux-sens:** mutation d'un codon spécifiant un acide aminé en un codant spécifiant un autre acide aminé.

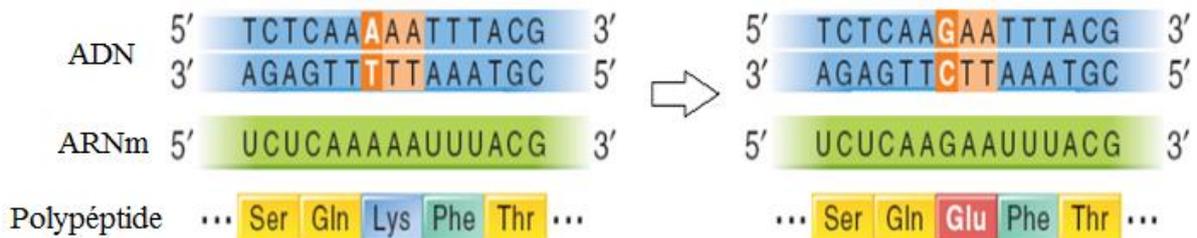


Figure 17: Exemple de mutation faux-sens (Melki, 2016).

b. Mutations par insertion ou par délétion : sont le résultat de l'ajout (+) ou le retrait (-) d'une paire de nucléotides d'un gène. L'une ou l'autre des situations entraîne un décalage dans la lecture et la traduction des codons en acides aminés.

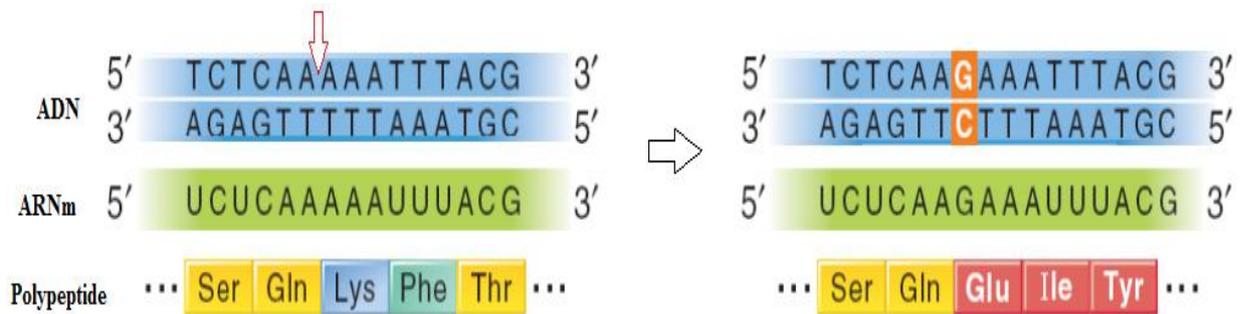


Figure 18: Exemple de mutations par insertion (Melki, 2016).

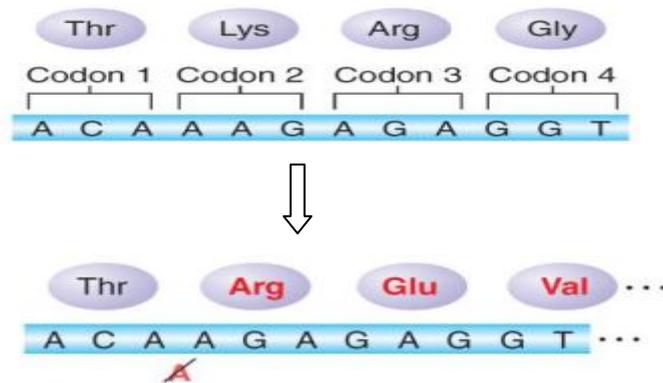


Figure 19: Exemple de mutations par délétion (Melki, 2016).

Effet de l'insertion et la délétion (effet sur les protéines): l'insertion et la délétion d'un nucléotide entraîne un décalage du cadre de lecture (déphasage): mutation affectant la séquence codante d'un gène par délétion ou insertion une paire de bases, générant ainsi un nouveau cadre de lecture.

2.2 Les mutations grandes (ou large mutation) : Il s'agit de mutations qui affectent une séquence de bases. On distingue plusieurs catégories :

a. **Réarrangement :**

- Inversion : inversion d'une séquence,
- Translocation : excision d'un fragment puis sa réintégration dans un autre endroit.

b. **Duplication :** un segment d'ADN est présent en double.

c. **Délétion :** perte d'un fragment d'ADN.

d. **Insertion :** gain d'un fragment d'ADN.

N.B : Les mutations sont plus fréquentes dans certaines régions de l'ADN que dans d'autres (ce sont les « points chauds »).

3. Origines de la mutation : Selon l'origine de la mutation on distingue :

3.1. Les mutations spontanées : Une mutation spontanée résulte d'un processus naturel dans des conditions «normales». Toutefois les mutations qui résultent d'erreurs de réplication sont vraiment spontanées.

3.2. Les mutations induites : résultent d'une interaction provoquée entre l'ADN et un agent extérieur ou mutagène.

4. Les agents mutagènes: Un mutagène est un agent naturel ou résultant de l'activité humaine, physique ou chimique qui peut altérer la structure de l'ADN. Il élève ainsi le nombre de mutations génétiques au dessus du taux naturel.

On distingue deux catégories de mutagènes : les mutagènes physiques et les mutagènes chimiques.

4.1. Les agents physiques mutagènes :

- Les rayons UV (env. 260 nm) induisent une dimérisation des bases pyrimidiques adjacentes, notamment s'il s'agit de deux thymines.
- Les radiations ionisantes (rayons X et gamma ; sont assez énergétiques pour produire des ions réactifs quand ils interagissent avec les molécules biologiques) ont des effets différents sur l'ADN selon le type de rayonnement et son intensité : mutations ponctuelles, insertions/délétions, ou des lésions plus graves et importantes de l'ADN.
- La chaleur provoque des coupures de l'ADN par hydrolyse.

N.B. les dimères comme la majeure partie des lésions, bloquent la transcription et la réplication. Elles sont létales si elles ne sont pas réparées.

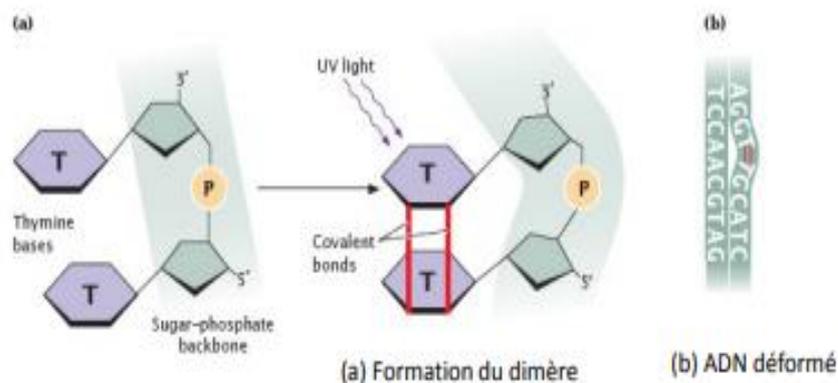


Figure 20: Phénomène de dimérisation (Ozoux, 2013).

4.2. Les agents chimiques mutagènes :

4.2.1. Les analogues des bases : Produits chimiques qui sont structurellement semblables aux bases d'ADN, mais peuvent avoir un appariement de base avec des propriétés différentes ; le bromo-uracil (BrdU) est structurellement semblable à la thymine et sera ainsi incorporé dans un brin croissant d'ADN au lieu de T, mais en raison de ses propriétés il s'apparie plus fréquemment avec G.

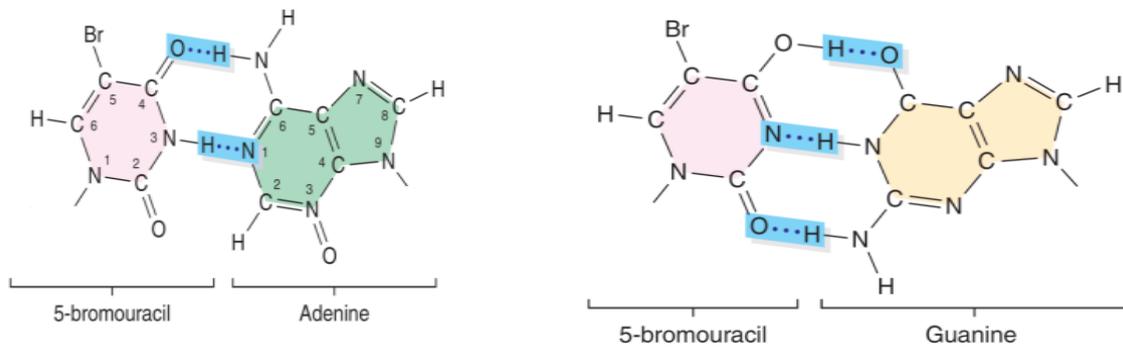
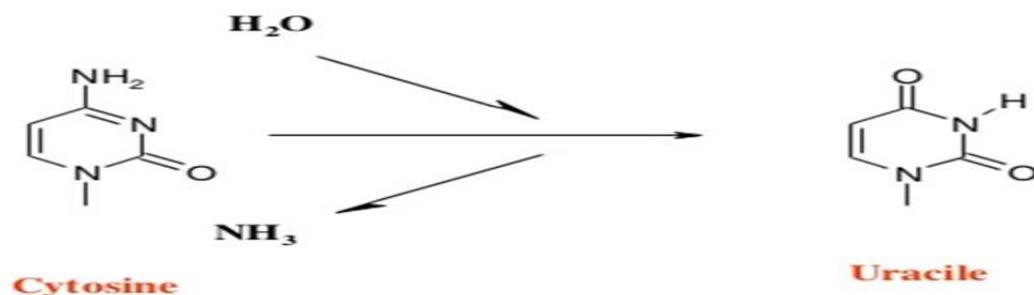


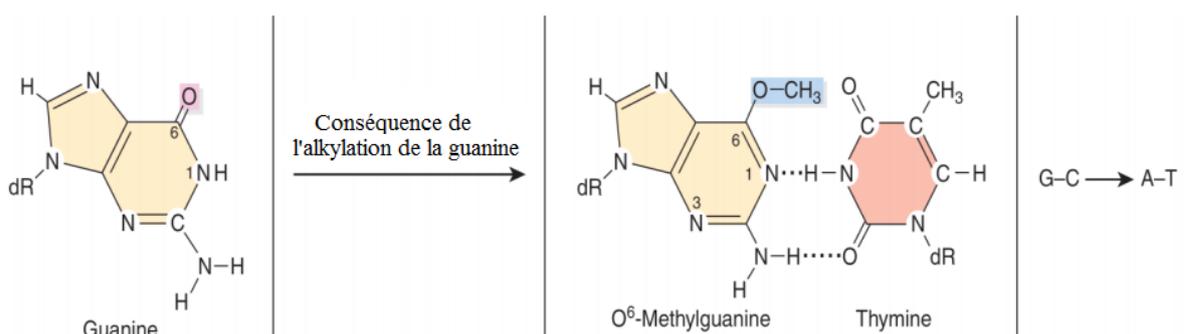
Figure 21: Exemple d'analogue de base, le bromo-uracil (BrdU) (Melki, 2016).

4.2.2. Les substances chimiques altérant la structure et l'appariement des bases : substances chimiques qui font des changements à une base spécifique changeant sa capacité de s'appareiller correctement ; par exemple,

- La désamination de la cytosine crée une base uracile qui s'appareillera avec A au lieu de G précédemment cité par le C original,



- Ou les agents alkylants qui ajoutent un groupe méthylique causant le mauvais appariement de la guanine avec la thymine.



- La dépurination correspond à l'élimination d'une base purique (A ou G) qui peut se produire spontanément à des températures physiologiques, par rupture de la liaison N glycosidique d'une purine.

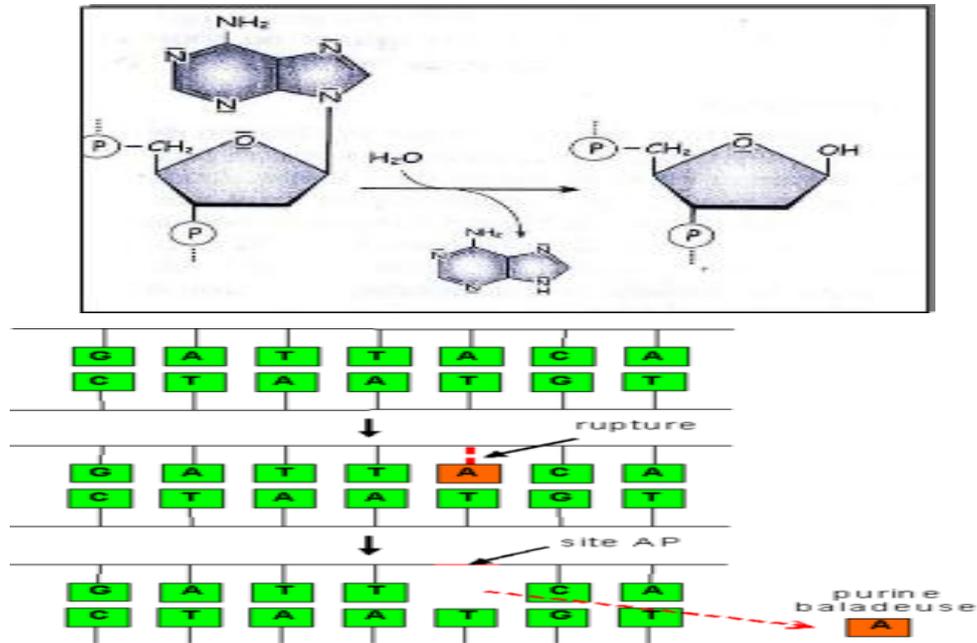


Figure 22: Phénomène de dépurination (Florian *et al.*, 2005).

4.2.3. Les agents intercalant : Produits chimiques qui s'insèrent dans l'hélice d'ADN causant des problèmes de réplication et de transcription d'ADN ; habituellement résultant en des délétions ou des insertions. EX : Acridine, proflavine, bromide d'ethidium sont des molécules qui s'insèrent entre les bases de l'ADN. Ceci entraîne un étirement de l'ADN. La polymérase insère alors une base surnuméraire en face de la molécule étrangère.

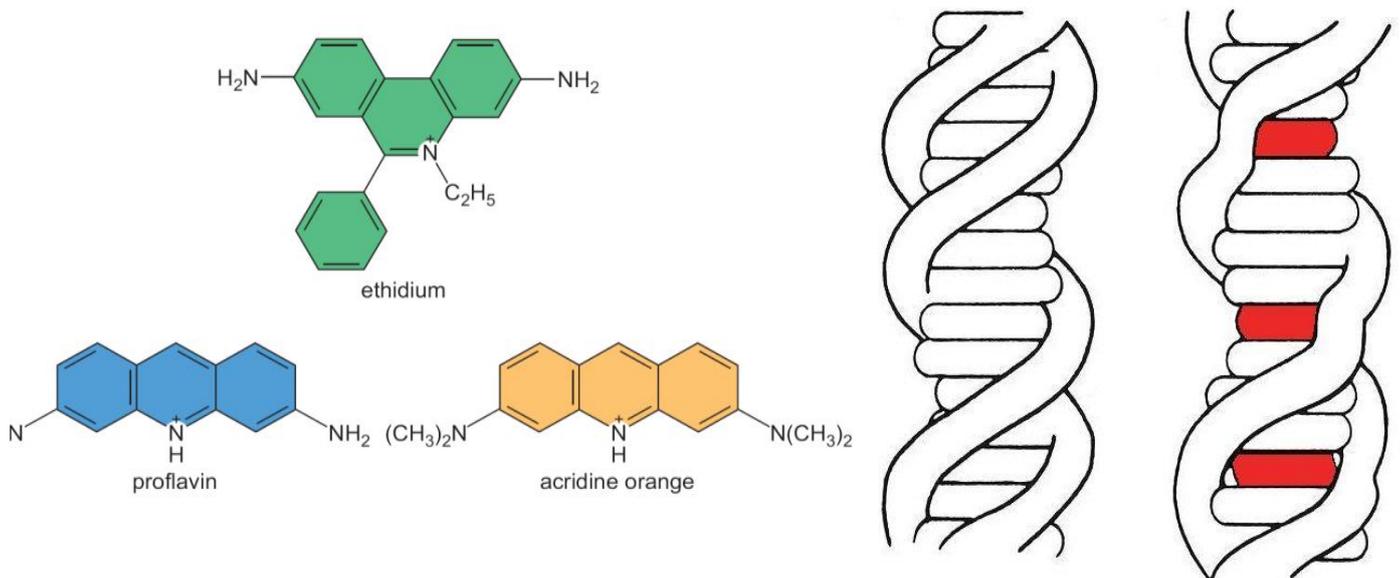


Figure 23: Exemple d'agents intercalant (Melki, 2016).

5. Exemples de mutations chez les bactéries :

L'étude des mutations et des mutants est très importante en biologie car elle permet de comprendre le fonctionnement de la cellule et l'organisation des gènes.

5.1. Mutants auxotrophes : la mutation induit une exigence par rapport au milieu de culture. Par exemple un mutant peut être auxotrophe pour la thréonine. Ces mutants sont nommés thr-. Les mutants sauvages sont dits thr+. Un mutant peut être auxotrophe pour différents nutriments (acides aminés, vitamines, bases puriques...). L'auxotrophie peut être multiple.

5.2. Mutants résistants : certains mutants sont résistants à des agents toxiques comme l'azoture (NaN_3) ou les métaux lourds car ils possèdent des gènes de résistance. Ces gènes de résistance ne sont pas obligatoires. Les bactéries les possédants sont capables de résister aux agents toxiques correspondants. Comme n'importe quel gène ces gènes de résistance peuvent muter. Les mutants seront donc incapables de survivre dans un milieu comportant la substance toxique en question. Pour l'azoture il s'agit du gène *azi*. Les bactéries résistantes sont dites *azi^R*, les bactéries sensibles étant *azi^S*. Il existe également des gènes de résistance à des antibiotiques et à des bactériophages (*E. coli* est résistant au phage T2 grâce au gène *ton* : *ton^S* et *ton^R*).

5.3. Mutants cataboliques : Les mutants cataboliques sont incapables d'utiliser (de dégrader) une substance, par exemple le galactose ou le lactose. On parle donc de bactéries *gal-*, *gal+*, *lac-* et *lac+*.

6. Mécanismes de réparation de l'ADN :

Les mécanismes de réparation de l'ADN jouent un rôle crucial dans la préservation de l'intégrité du génome. Il est donc un ensemble de processus par lesquels une cellule identifie et corrige les dommages aux molécules d'ADN qui codent son génome. Les principaux mécanismes de réparation de l'ADN utilisent le fait que l'information génétique existe en deux exemplaires (sur les deux brins). Un dommage sur l'un des brins de l'ADN peut être réparé à partir de l'information portée sur le brin complémentaire intact. Les mécanismes de réparation sont complexes mais on peut en distinguer ces principaux types:

6.1. Réparation par excision (Excision / Réparation) : C'est un système complexe qui probablement représente la forme la plus commune de réparation de l'ADN. Principe : ADN double brin, les 2 brins contiennent la même information. 1 seul brin endommagé sera excisé puis remplacé en utilisant le brin intact comme matrice.

6.1.1. Réparation par excision de base (BER) : est un mécanisme de réparation d'un dommage au niveau d'une base individuelle de l'ADN. Dans ce système de réparation, l'excision des bases modifiées est catalysée par un ensemble d'enzymes appelées ADN

glycosylases, dont chacune reconnaît et retire une base modifiée spécifique en coupant la liaison base-sucre, par exemple, l'Uracile glycosylase pour l'uracile produit par la désamination de la cytosine.

- a- Lorsque la base endommagée est retirée par l'ADN glycosylase, une enzyme appelée endonucléase AP (AP= apurinique ou apyrimidinique) coupe ensuite le squelette sucrephosphate auquel la base modifiée a été retirée (coupe la liaison phosphodiester du côté 5') donnant une extrémité 3'-OH. Une exonucléase coupe la liaison phosphodiester du côté 3'.
- b- L'ADN polymérase (ADN polymérase I chez les procaryotes) comble la brèche en ajoutant les nucléotides complémentaires à l'autre brin. L'ADN ligase scelle les deux segments du brin.

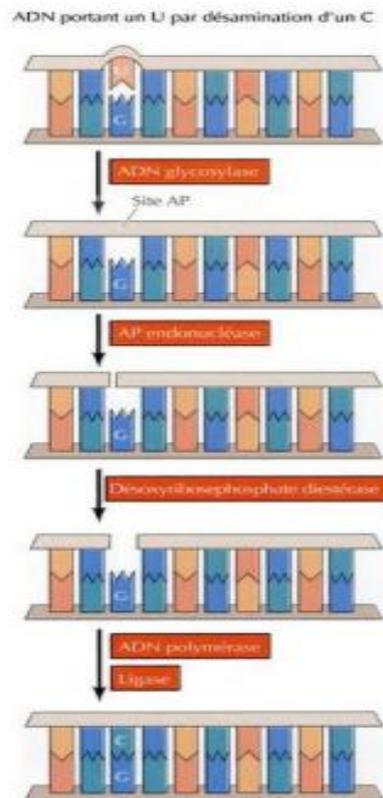


Figure 24: Réparation par excision de base (Geoffrey et Cooper, 1999).

6.1.2. Réparation par excision de nucléotides (NER): C'est un des processus les plus importants de réparation, on le retrouve aussi bien chez les procaryotes que les eucaryotes. Ce système enzymatique complexe, d'abord mis en évidence chez *E. coli*, sert entre autres à exciser des nucléotides après formation de dimère de pyrimidine par irradiation aux UV. Cette forme de réparation se distingue de la photo-réactivation car elle ne nécessite pas de lumière pour avoir lieu. Un complexe de gènes dénommés *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* et *uvrD* codant pour

quatre activités enzymatiques est impliqué dans la reconnaissance et la réparation des lésions. La détection d'une déformation déclenche un processus de réparation multi-étapes impliquant plusieurs protéines:

a- Un complexe de deux protéines *UvrA* et *UvrB* parcourt l'ADN, et lorsqu'une lésion est repérée, la protéine *UvrA* se dissocie et une autre protéine *UvrC* se lie à la protéine *UvrB* au niveau de la lésion. Le complexe *UvrBC* provoque une coupure à 4 nucléotides du côté 3' (par *UvrB*) dans le brin endommagé, et une coupure à 7 nucléotides du côté 5' (par *UvrC*).

b- La protéine *UvrB* est libérée puis la protéine *UvrD* se lie au site de coupure 5'. C'est une *hélicase* qui enlève le segment simple brin entre les deux sites de coupure (segment de 12 nucléotides chez les procaryotes et de 24 à 32 nucléotides chez les eucaryotes).

c- L'*ADN polymérase I* utilise le brin matrice pour combler la brèche créée en synthétisant une copie complémentaire dans le sens 5'-3'.

d- L'*ADN ligase* soude ensuite le nouvel oligonucléotide aux bases voisines.

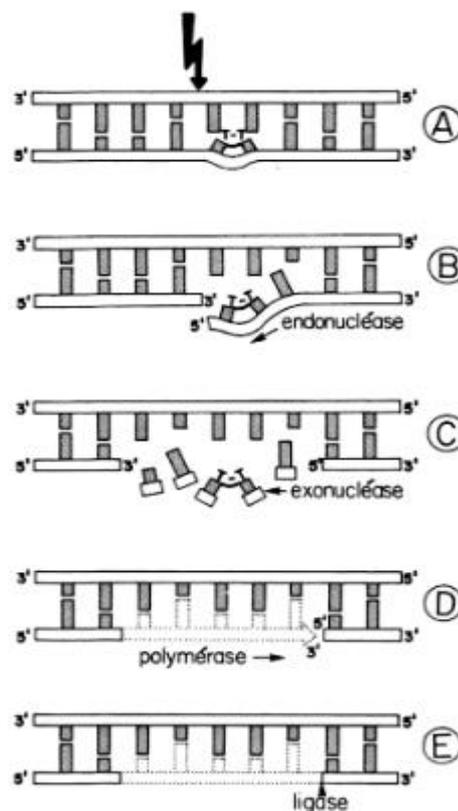


Figure 25: Réparation par excision de nucléotides (Eduardo et al., 1983).

6.1.3. Système de réparation des mésappariements : Le système de réparation des mésappariements reconnaît les mésappariements de bases pouvant se produire lors de la réplication. Chez les Eubactéries, le mésappariement est repéré par la protéine Mut S,

stabilisée sur la lésion par la protéine Mut L. La double hélice d'ADN est ouverte au niveau de la lésion par l'hélicase Mut U. L'endonucléase Mut H repère alors un site hémiméthylé proche de la lésion et coupe le brin nouvellement synthétisé dans la séquence GATC non méthylée. L'ADN endommagé est dégradé et la lacune réparée par l'ADN polymérase I et l'ADN ligase.

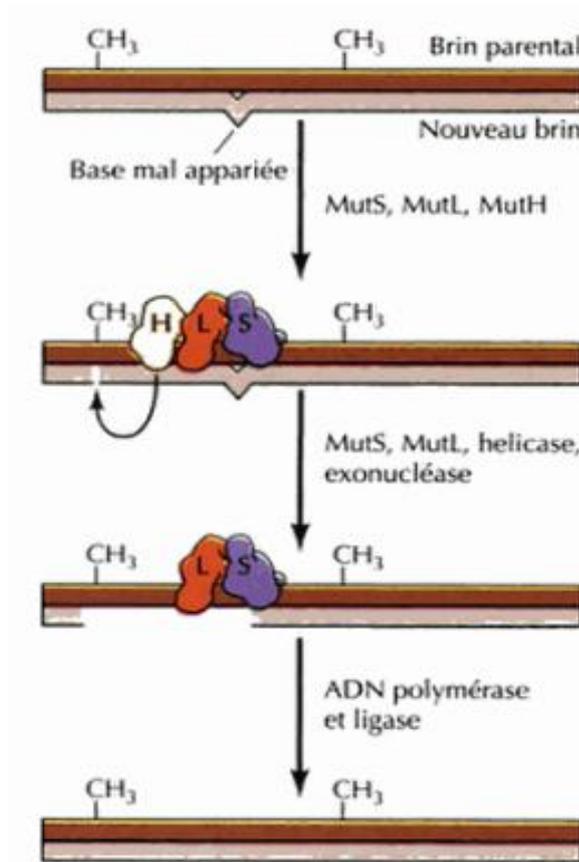


Figure 26: Réparation des mésappariements (Geoffrey et Cooper, 1999).

6.2. La photoréactivation : La réparation des dimères pyrimidiques induit par une exposition aux UV dépend d'un système utilisant la lumière visible pour dissocier ses dimères. Ce clivage est effectué par une enzyme de photoréaction, la photolyase activé par la lumière du soleil. La lumière solaire est indispensable, mais son rôle sur l'activité enzymatique demeure inconnu.

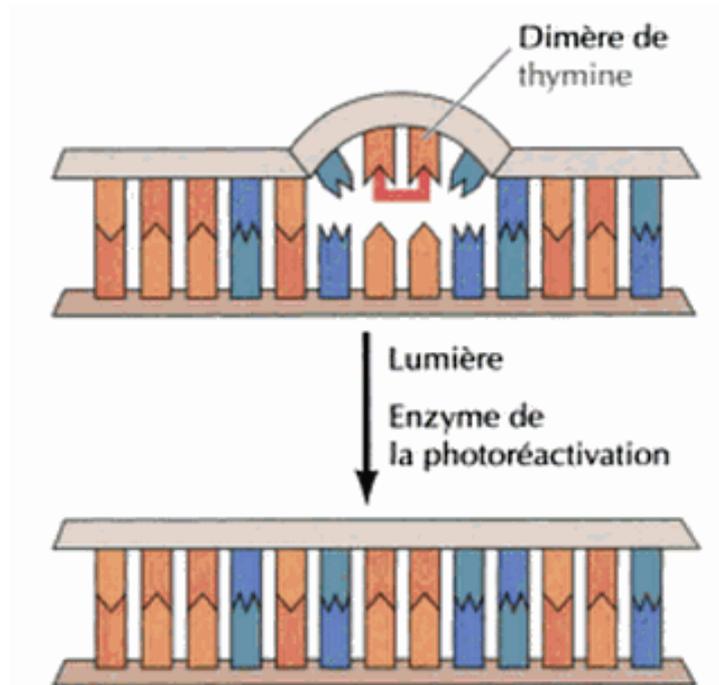


Figure 27: La photoréactivation (Geoffrey et Cooper, 1999).

6.3. Le système de réparation SOS (*Save-Our-Souls*):

Certains systèmes de réparation semblent avoir été élaborés pour empêcher l'apparition de lésions potentiellement graves telles que la mort cellulaire ou le cancer. Quand l'ADN polymérase arrive à la zone mutée, elle va s'arrêter et ne pourra plus progresser normalement. Cet arrêt peut déclencher la voie de la mort cellulaire que la cellule évite en activant le système S.O.S. Ce système porte son nom car il apparaît comme un système de secours pour empêcher la mort cellulaire en présence d'une lésion importante. Son induction par la cellule se fait en dernier ressort. Dans ce système d'urgence, il arrive que ça ne soit pas le bon nucléotide qui soit éliminé, on parle alors de réparation mutagène. Ce mécanisme chez les procaryotes est caractérisé par les étapes suivantes:

- Lorsque l'ADN polymérase III assurant la réplication s'arrête au niveau d'un site de lésion sur l'ADN, l'ADN situé devant la polymérase continue à être déroulé, exposant des régions d'ADN simple-brin.

- Ces zones monocaténares sont reconnues par l'enzyme de réparation et de recombinaison appelée *RecA* qui forme un filament ADN-protéine. *RecA* agit en hydrolysant, par une activité protéolytique, la protéine *LexA*, qui est un répresseur des gènes SOS.

Exercices d'application :

Exercice 1:

Soit une culture *d'E.coli*, sensible à la streptomycine, dont la dilution 10^{-7} , étalée à raison de 0,1 ml sur un milieu gélosé en boîte de Pétri, donne après incubation, 10 colonies.

1) 0,1 ml de cette culture est étalé sur un milieu gélosé additionné d'un antibiotique, la streptomycine, à une dose supérieure à la CMI. Après incubation, la boîte de Pétri montre 4 colonies.

a - Quel est le phénotype de ces quatre colonies ?

b - Quel est le taux de mutation des résistants à la streptomycine?

2) La culture initiale est traitée par un agent mutagène, la nitrosoguanidine, puis étalée comme précédemment à raison de 0,1 ml sur le même milieu gélosé à la streptomycine (GN + Stp). Après incubation, la boîte de Pétri montre 40 colonies.

- Calculez le taux de mutation (Tm_2) des résistants. Comparez cette valeur à celle trouvée précédemment et conclure.

Solution :

1-a- Les quatre colonies sont des *E. coli* résistant à la streptomycine. Cette résistance est apparue spontanément au sein de la population analysée (10^8 UFC).

1-b - $Tm_1 = \text{Nombre de mutants} / \text{nombre total des individus composant la population analysée}$

$$Tm_1 = 4 \text{ UFC} / 10^8 \text{ UFC}; Tm_1 = 4 \times 10^{-8}$$

NB : le taux de mutation est sans unité.

$$2- Tm_2 = 40 / 10^8 ; Tm_2 = 4 \times 10^{-7} \text{ On remarque que } Tm_2 > Tm_1$$

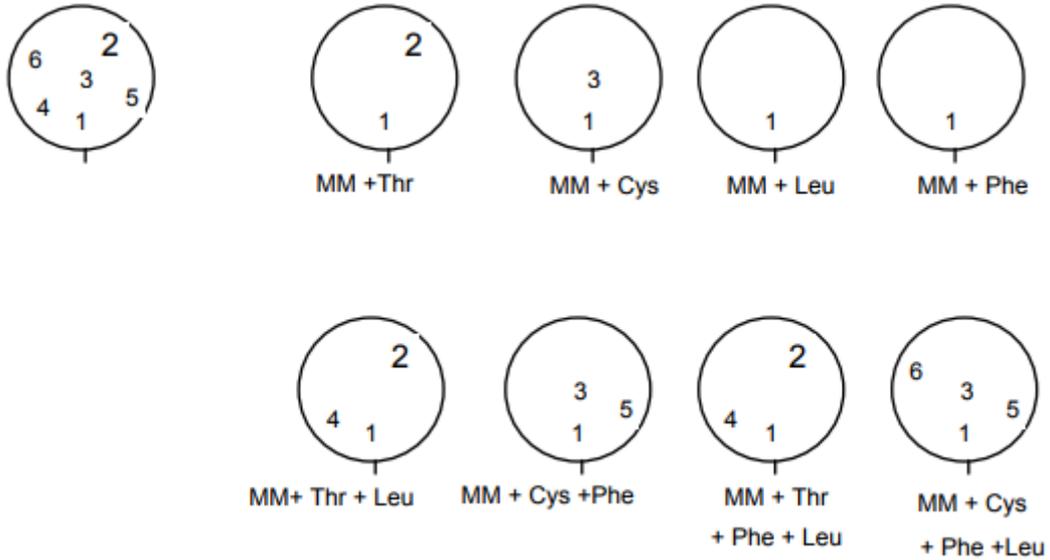
Au niveau de la dernière expérience, nous avons en plus des mutants spontanés, d'autres mutants «induits» par l'agent mutagène. La nitroso-guanidine a augmenté la probabilité des modifications de l'ADN et par conséquent le nombre de bactéries devenues résistantes à la streptomycine.

Exercice 2:

Six clones *d'E.coli* numérotés de 1 à 6, sont cultivés sur milieu minimum MM additionné de thréonine (Thr), leucine (Leu), Phénylalanine (Phe) et cystéine (Cys), puis repiqués par la technique du tampon de velours sur huit milieux minima MM diversement additionnés d'un

ou de plusieurs de ces quatre acides aminés, comme indiqué sur la figure. Les clones qui poussent sur les boîtes de Pétri sont indiqués par leurs numéros.

- Indiquer quels sont les phénotypes qui correspondent à ces 6 clones.



Solution :

Les phénotypes qui correspondent à ces 6 clones sont :

Clone n°1 : Thr+ Cys+ Leu+ Phe+

Clone n°2 : Thr - Cys+ Leu+ Phe+

Clone n°3 : Thr+ Cys- Leu+ Phe+

Clone n°4 : Thr - Cys+ Leu - Phe+

Clone n°5 : Thr + Cys- Leu + Phe

Clone n°6 : Il pourrait donc être Cys- Leu- ou Cys- Phe- Leu- .

Chapitre III :

Les éléments génétiques transposables des procaryotes

Chapitre III : Les éléments génétiques transposables des procaryotes

1. Définition :

« Les théories de la génétique classique, qui postulent l'association d'un gène à un locus invariant sur le chromosome, ont été bouleversées par la découverte d'éléments génétiques, moyennement répétés, présents sur les chromosomes et capables de se déplacer de manière autonome à l'intérieur du même chromosome ou d'un chromosome à un autre (segments d'ADN qui ont la capacité de bouger à partir d'une position à une autre). Ces éléments sont connus sous plusieurs noms : éléments génétiques mobiles, gènes sauteurs, transposons, etc.

La transposition est l'intégration directe d'une séquence de gènes (de taille limitée) au sein d'un génome (chromosomique ou plasmidique), en l'absence d'homologie de séquence nucléotidique (recombinaison illégitime). Les gènes qui s'ajoutent de cette manière sont dits transposables et s'organisent en structures appelées *transposons* (Tn) qui portent les déterminants de la transposition (excision, intégration, transposition) et des gènes qui codent pour d'autres fonctions, par exemple la résistance aux antibiotiques. »

2. Mise en évidence de la transposition :

Chez les bactéries, des éléments génétiques mobiles comme les plasmides, épisomes et phages, en particulier le phage Mu, ont été découverts au cours des années 1955-65, puis, la découverte des séquences IS (insertion séquences) en 1968 dans l'opéron *gal* de *E. coli* et d'un transposon porteur de résistance à l'ampicilline chez *Pseudomonas aeruginosa* en 1971.

3. Structure et diversité des transposons procaryotes :

Les classifications les plus courantes des éléments procaryotes de classe II sont basées plus sur leur structure et le type d'enzymes impliquées dans leur mobilité que sur leur mode de transposition.

3.1. Les séquences d'insertion (ou IS pour insertion sequence en anglais):

Les séquences d'insertion sont de courts brins d'ADN de moins de 2,5 kb qui possèdent à leurs extrémités des séquences répétées inversées (ITR : Inverted Tandem Repeat) de 9 à 40 pb, qui sont impliquées dans la transposition. Entre les séquences répétées terminales se trouvent des gènes impliqués dans la transposition (code pour une enzyme de la transposase) et des séquences qui contrôlent l'expression de ces gènes mais aucun autre gène non essentiel n'est présent.

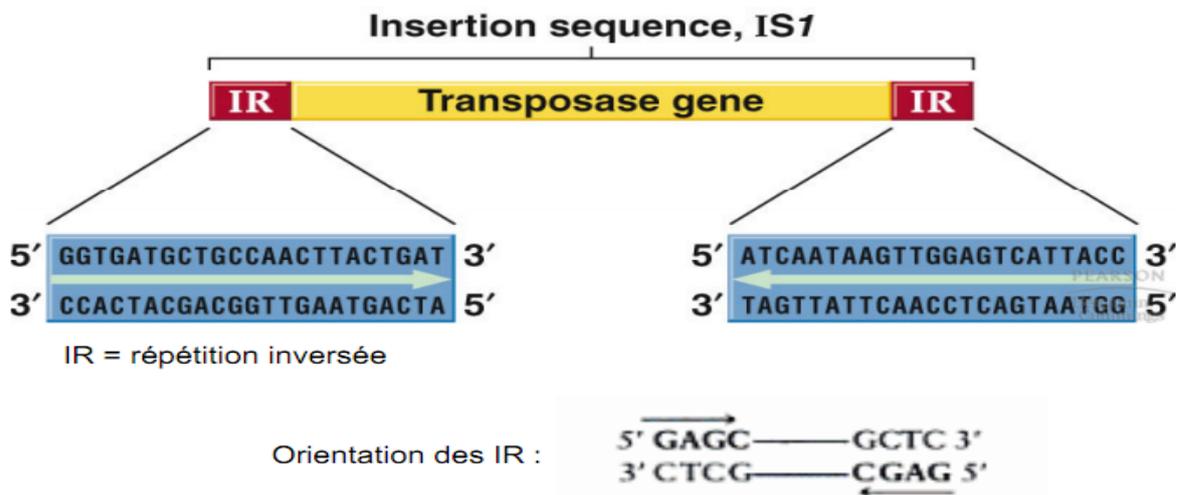


Figure 28: L'élément transposable *IS1* (Insertion Sequence) des bactéries (Melki, 2016). Selon les différences dans leurs séquences, les *IS* ont été cataloguées en 17 familles (**Nomenclature** : Les séquences d'insertion sont appelées *IS* suivi d'un numéro ; **ex** : *IS1*) dont les membres des 12 entre elles contiennent une seule phase de lecture ouverte, ou cadre de lecture ouvert (open reading frame ou **ORF** en anglais) qui code pour la transposase, à partir de ce même cadre ouvert de lecture, les *IS* de certaines familles codent pour une autre protéine, une version tronquée de la transposase mais douée d'une activité régulatrice pour la transposition. Pour les membres de la famille *IS3*, la synthèse de la transposase (ORF AB) résulte d'un déphasage programmé de la traduction entre deux cadres de lecture ouvert qui codent pour une protéine régulatrice de la transposition (ORF A) et une protéine de fonction inconnue (ORF B). La séquence du site d'insertion varie pour une même *IS* mais pas sa longueur, aussi, certains éléments manifestent une spécificité pour une séquence en palindrome (par exemple elle est 5'-CTAG pour *IS5*), lors de l'intégration d'une *IS* une duplication du site cible se produit, ce qui conduit à en trouver une copie à chaque extrémité de l'élément.

Tableau 03: Exemples de séquences d'insertion *IS*

Séquence IS	Occurrence	longueur (bp)	IR (bp)*	Sequence cible (bp)
IS1	Chromosome d' <i>E. coli</i> (5 à 8 copies) de <i>Salmonella</i> (40 copies), nombreux plasmides, phage P1, Tn951	768	18/23	9
IS2	Chr d' <i>E.coli</i> (5 copies), facteur F (1 copie), nombreux plasmides	1327	32/41	5

IS50	constituant de Tn5	1534	8/9	9
IS101	plasmide pSC101 de <i>E. coli</i>	1209	30/36	5

* le 1er nombre représente le degré de perfection du palindrome, le 2ème sa longueur.

3.2. Transposons composites :

Ils sont des entités avec des structures complexes (peuvent compter jusqu'à plusieurs milliers de paires de bases). Les transposons sont désignés par Tn suivi d'un numéro ; **ex** : *Tn5*), ils contiennent une variété de gènes encadrés par deux *IS* en direction directe ou inverse, très souvent seule une des deux séquences d'insertion code une transposase fonctionnelle, tandis que l'autre code majoritairement pour un régulateur de la transposition, le choix de transposition d'un *Tn* entier ou d'une seule *IS* se fait en fonction de la taille de la séquence située entre les deux *IS* c'est-à-dire que plus un *Tn* est court plus qu'il a tendance à être mobilisé en entier. Le segment d'ADN bordé par les deux *IS* peut coder pour n'importe quelle fonction comme la résistance aux antibiotiques (kanamycine chez *Tn5*, tétracycline chez *Tn10*), ou une fonction métabolique (catabolisme du citrate chez *Tn3411*).

Tableau 04: Exemples de transposons.

Transposon	Marqueur*	Origine	longueur	IR bp	Séquence cible bp
Tn1	ampicilline	plasmide RP4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5kb	38	
Tn3	ampicilline	plasmide R1 de <i>Salmonella typhimurium</i>	4957bp	38	5
Tn4	ampicilline, streptomycine, sulfonamide	plasmide R1 de <i>Salmonella typhimurium</i>	20,5kb		
Tn5	kanamycine	plasmide JR67 de <i>Klebsiella</i>	5,7kb	1450 (IS50)	9
Tn9	chloramphénicol	plasmide pSM14 de	2638bp	23 (IS1)	9

		<i>Shigella</i>			
Tn10	tétracyclines	plasmide pR100 de <i>Shigella</i>	9,3kb	1400 (IS10)	9
Tn501	sels de mercure	plasmide pVS1 <i>Pseudomonas</i>	5,2kb	38	5
Tn551	erythromycine	p1258 de <i>Staphylococcus aureus</i> (gram+)	5,3kb	37/40	5
Tn951	opéron lac	plasmide pGC1 de <i>Yersinia enterocolitica</i>	16,6kb	41	
Tn1696	gentamycine, streptomycine sulfamidés, chloramphénicol, ions mercuriques	plasmide R1033 de <i>Pseudomonas</i>	13,6kb		

* marqueur de résistance à un antibiotique ou autre

Ces transposons peuvent passer du chromosome bactérien au génome d'un phage ou dans un plasmide conjugatif. Pour ces raisons, ces transposons peuvent être transmis à d'autres bactéries. Ce type de transposon est une cause naturelle d'acquisition de résistance aux antibiotiques pour les bactéries.

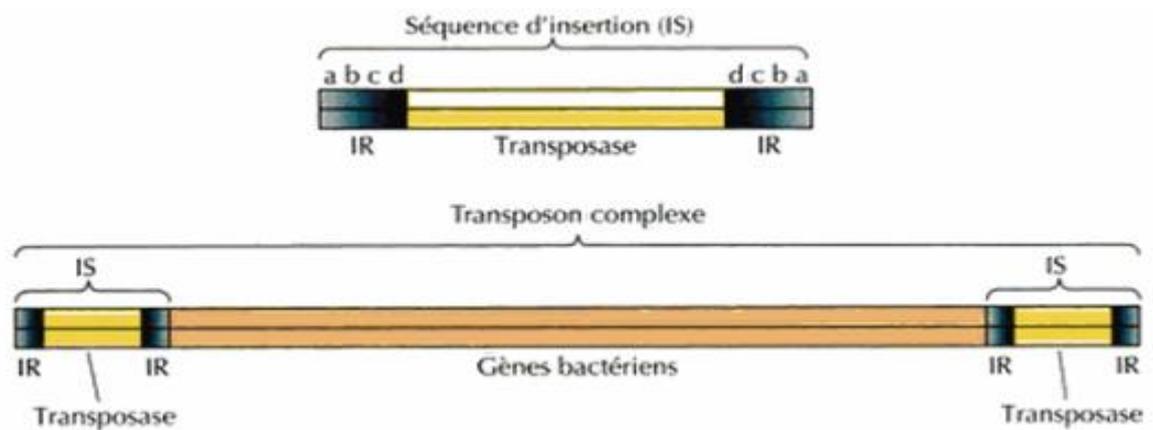


Figure 29: Structure d'un transposon composite (Geoffrey et Cooper, 1999).

3.3. Les transposons non composites : Les éléments non composites codent pour une transposase et pour des protéines accessoires de la transposition. Ils ne contiennent pas d'IS mais des séquences terminales inversées (ITR) de 35 à 48 pb. Parmi les éléments non composites, les plus étudiés sont les transposons bactériens Tn3 et Tn7.

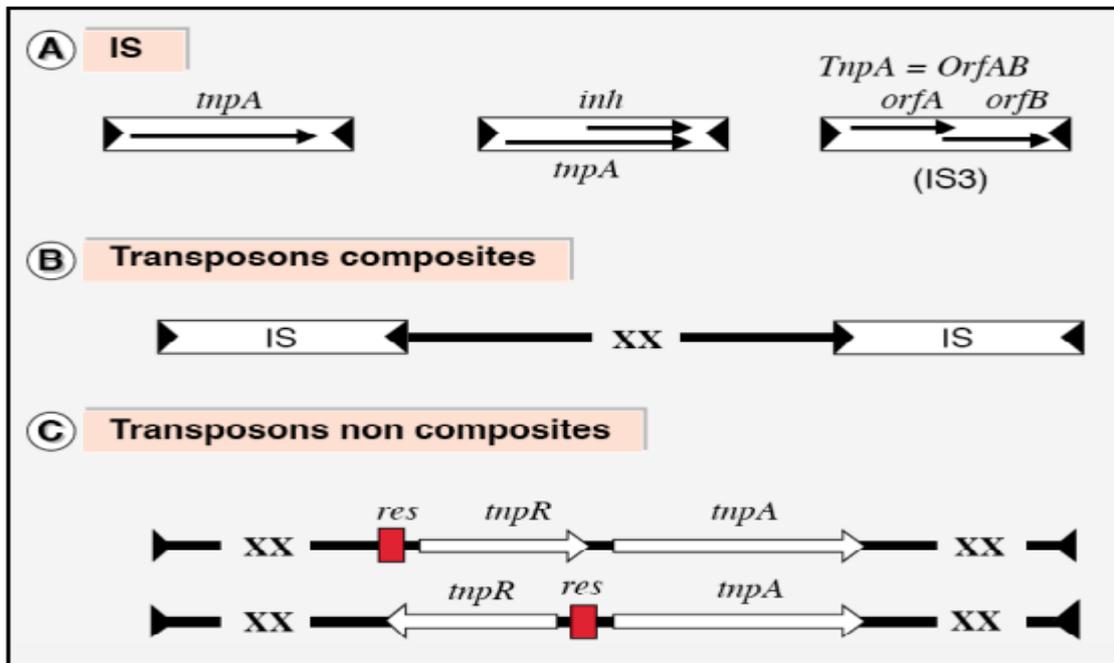


Figure 30 : Représentation schématique de quelques exemples de transposons procaryotes (Merlin, 1999). Les triangles noirs représentent les séquences terminales répétées et inversées (IR). (A) Les IS existent sous une forme simple portant uniquement le gène de la transposase (*tnpA*) ou sous une forme contenant un ORF (Open Reading Frame ou cadre de lecture ouvert) codant pour la transposase *tnpA* et une version tronquée de cette transposase (*inh*), qui agit comme un inhibiteur de la transposition. Dans l'exemple de IS3, la transposase est constituée d'une protéine régulatrice de la transposition (*OrfA*) et d'une protéine de fonction inconnue (*OrfB*). (B) La séquence interne des transposons composites (symbolisée par XX) contient des séquences pouvant correspondre à des gènes de résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds. Cette séquence est encadrée par 2 IS. (C) Les ORF *tnpR* et *tnpA* codent respectivement pour une transposase et une résolvasse. La position relative de ces 2 ORF permet de distinguer 2 types d'organisation. Le site d'action de la résolvasse est indiqué par le rectangle rouge.

3.4. Les bactériophages transposables : Les bactériophages sont considérés comme transposables lorsqu'une partie de leur génome s'intègre dans celui de la bactérie qu'ils infectent. Le bactériophage Mu transpose chez *Escherichia coli* une séquence d'ADN contenant les extrémités attL et attR encadrant les gènes codant pour une transposase et une protéine activatrice.

4. Mécanismes de transposition :

Les éléments transposables bactériens se déplacent dans leur génome hôte selon 2 mécanismes : un mode conservatif ou un mode réplcatif. Certains éléments sont capables d'utiliser alternativement le mode réplcatif ou le mode conservatif.

4.1. La transposition conservative: "non réplcatif" "couper-coller":

Dans la transposition conservative, les deux brins d'ADN sont coupés de façon à libérer le transposon sous une forme linéaire. Dans certains cas, les extrémités 3'-OH se lient provisoirement au brin opposé du transposon pour former des structures d'épingle à cheveux. L'intégration du transposon dans sa cible est initiée par l'attaque nucléophile des extrémités 3'-OH, libres ou libérées par l'ouverture des épingles, générant des extrémités 5' sortantes. Après insertion du transposon, les séquences d'ADN simple brin flaquant l'élément inséré sont réparées par réplcation.

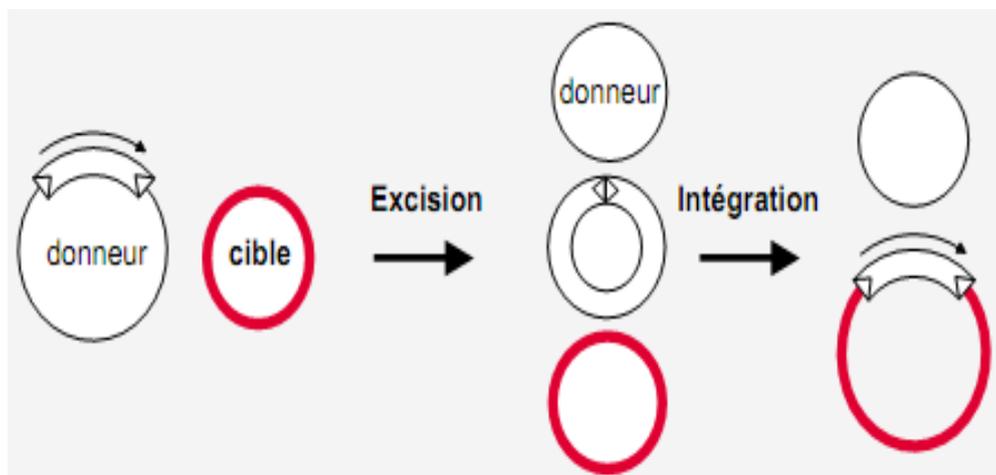


Figure 31: Représentation schématique de l'excision intégration (Merlin, 1999).

4.2. La transposition réplcatif: (appelé aussi la co-intégration ou copier-coller).

Dans la transposition réplcatif, seule l'extrémité 3' du transposon est coupée sur chaque brin. Comme précédemment, ces extrémités 3'-OH attaquent et clivent le site cible en générant des extrémités 5' sortantes. Les extrémités 3' du transposon se lient à ces extrémités 5' de la cible. La structure ainsi formée, appelée STC (Strand Transfer Complex), subit une réplcation semi-conservative à partir des extrémités 3' de la cible. Il en résulte un co-intégrat

dont la résolution par la résolvasse (codée par le transposon) aboutit à la libération de deux molécules portant chacune une copie de l'élément transposable.

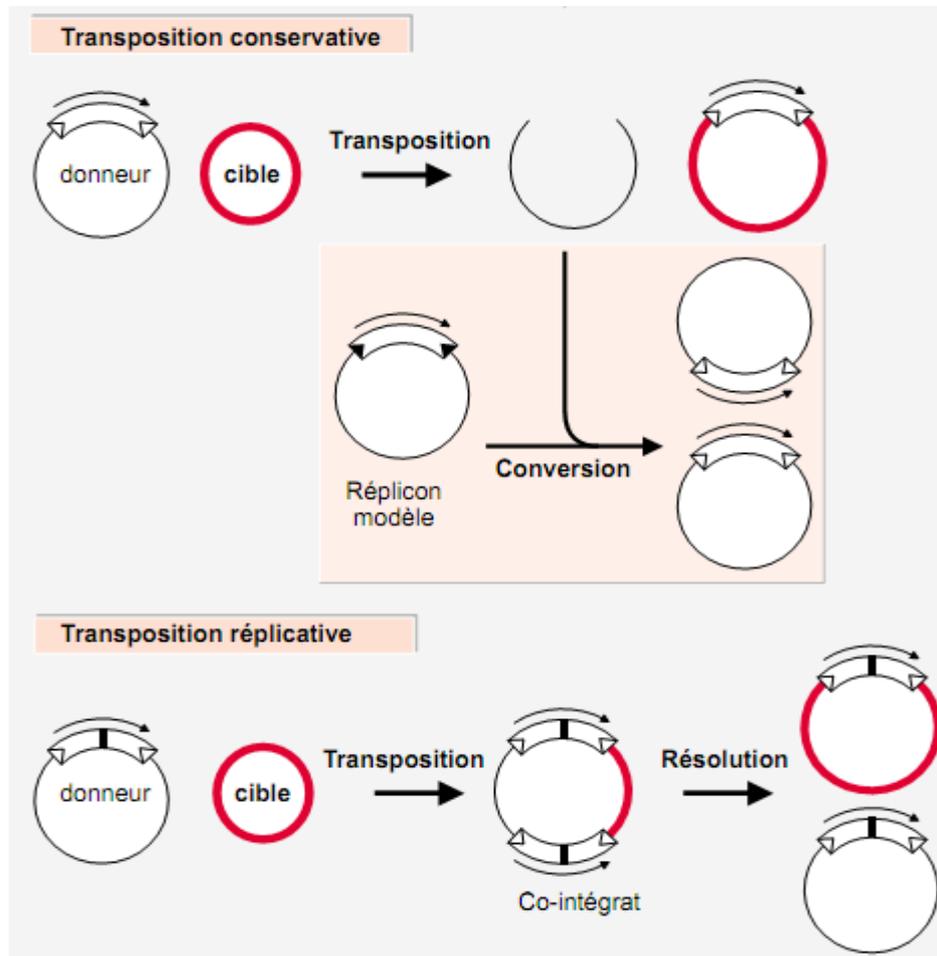


Figure 32: Représentation schématique de la transposition. a) conservative, b) répllicative (Merlin, 1999).

5. Fréquence de transposition : chez les bactéries, dans un génome stabilisé, la fréquence de transposition est égale à la fréquence d'une mutation spontanée: environ 10^{-6} . La fréquence de réversion, correspondant à l'excision d'un transposon qui causait une mutation, et qui entraîne donc retour au phénotype sauvage, est de l'ordre de 10^{-6} par génération (mesurée chez *E. coli* avec les séquences IS).

6. Conséquence de la transposition :

- Les éléments transposables, par leur mobilité, sont responsables d'une proportion élevée des mutations par la contribution à des réarrangements de portions du génome:
 - ✓ Inversions
 - ✓ Translocations

- ✓ Duplications
- ✓ délétions
- L'expression de certains gènes peut être altérée suite à l'intégration d'un transposon dans un gène ou à proximité (effet délétère de la transposition). Un gène peut ainsi être transformé en pseudogène, par changement du cadre de lecture ou altération de la séquence d'acides aminés. La restauration de la fonctionnalité est possible à condition qu'il y ait par la suite une excision parfaite de l'élément transposable, ce qui est rare. Le plus souvent le transposon s'excise de manière incomplète, conduisant à l'insertion ou à la délétion de nucléotides. Il peut parfois y avoir augmentation de l'expression de certains gènes en aval de l'insertion d'éléments transposables, s'ils contiennent des séquences régulatrices ou promotrices.
- L'insertion d'un élément transposable dans les séquences régulatrices des gènes, peut induire la modulation de son expression.
- Chez les bactéries, ils permettent la transmission de gènes de résistance.

Chapitre IV :

Transferts génétiques chez les bactéries.

Chapitre IV : Transferts génétiques chez les bactéries.

La bactérie peut être l'objet de variations génétiques autres que la mutation. Celles-ci peuvent résulter du transfert horizontal de matériel génétique (échange entre fragments d'ADN) d'une bactérie à une autre, c'est la recombinaison génétique. Ce phénomène se produit grâce à la conjugaison bactérienne, la transformation bactérienne, ou la transduction bactérienne.

1. La conjugaison bactérienne :

1.1. Découverte de la conjugaison (expérience de Lederberg et Tatum en 1946):

Lederberg et Tatum en 1946 ont mélangé dans un milieu liquide, 2 types de mutants polyauxotrophes d'*E. coli* (10^8+10^8): La souche A est auxotrophe pour la méthionine et la biotine et prototrophe pour la leucine et la thréonine ; son phénotype est donc : met⁻, bio⁻, leu⁺, thr⁺. La souche B est auxotrophe pour la thréonine et la leucine et prototrophe pour la méthionine et la biotine ; d'où son phénotype : met⁺, bio⁺, leu⁻, thr⁻. Après plusieurs heures de contact, l'étalement de 10^8 bactéries sur un milieu minimum (sans T, L, M et B) est suivi, après incubation, de la croissance d'une centaine de colonies à la surface du milieu. Ces clones ainsi que leur descendance sont T⁺ L⁺ M⁺ B⁺. Par contre, aucune colonie n'est visible sur les boîtes témoins ensemencées avec des bactéries A ou B.

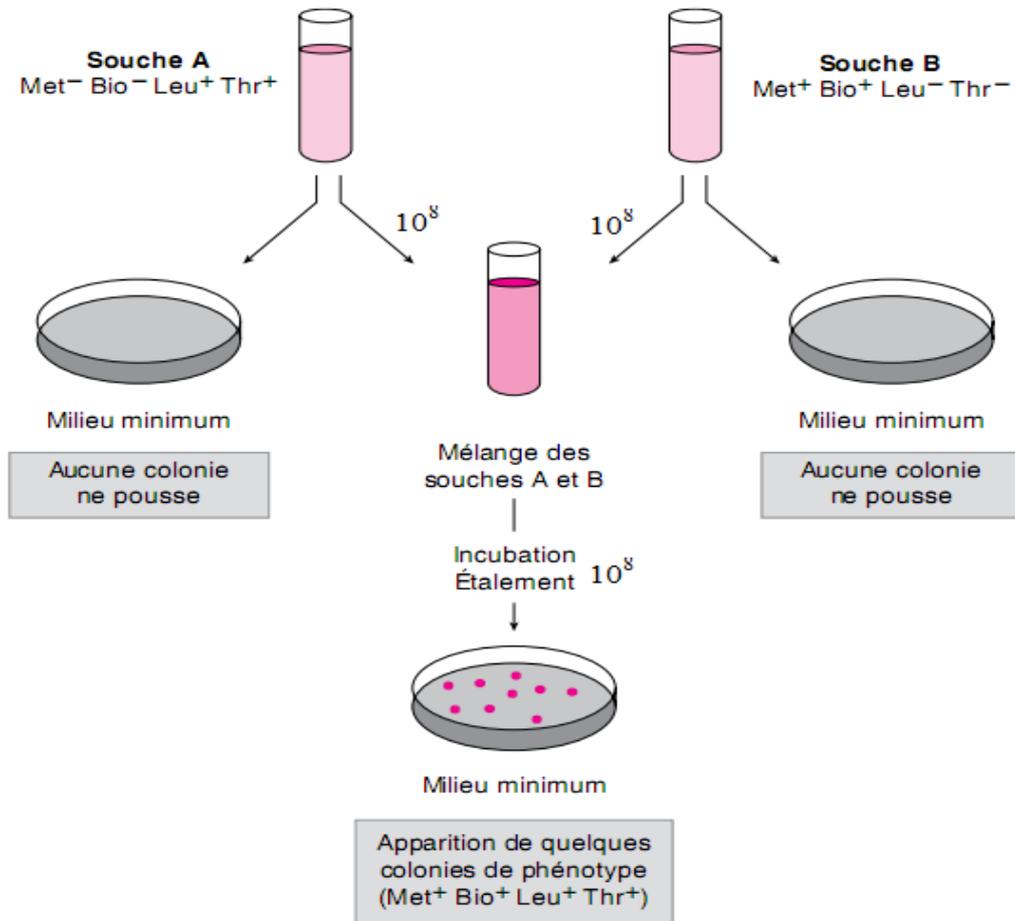


Figure 33: Expérience de Lederberg et Tatum en 1946.

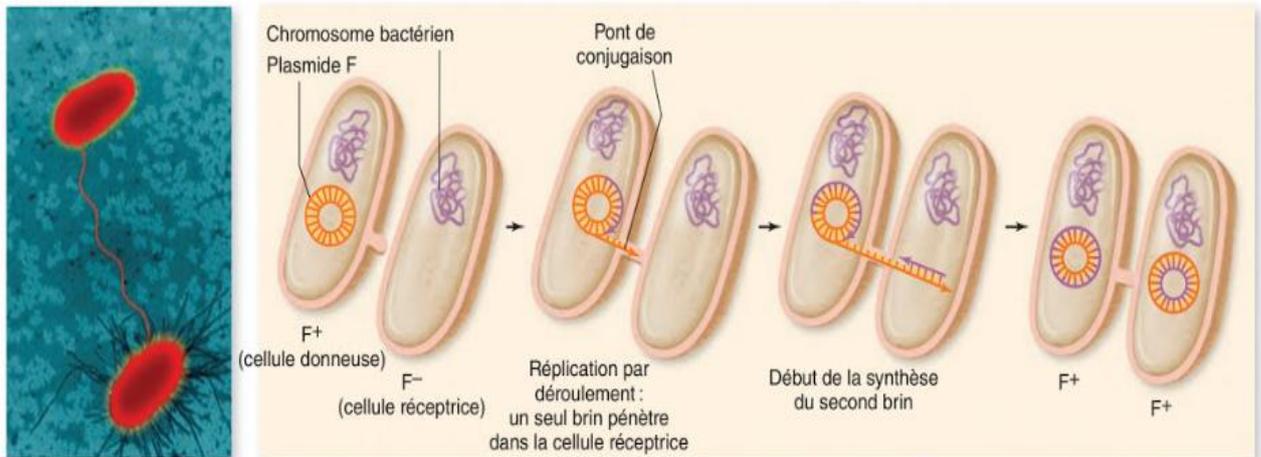
Analyse des résultats :

Aucune des deux souches auxotrophes n'est capable de se développer sur milieu minimum. Par contre, l'étalement d'une partie de la suspension du mélange des deux souches sur milieu minimum donne des colonies. Cette expérience suggère qu'il y a eu échange (de A vers B ou de B vers A) de matériel génétique entre les deux souches, aboutissant à la formation de cellules "met+ bio+ thr+ phe+ thi+", capables de se développer sur milieu minimum. En effet, il est impossible d'obtenir un tel résultat par le seul jeu des mutations; la fréquence des mutations est très faible, de l'ordre de 10^{-7} (1 mutation pour 10 millions de cellules) pour chaque caractère. Pour observer deux mutations simultanément dans une cellule de souche A par exemple, il faudrait étaler au moins 10^{14} cellules.

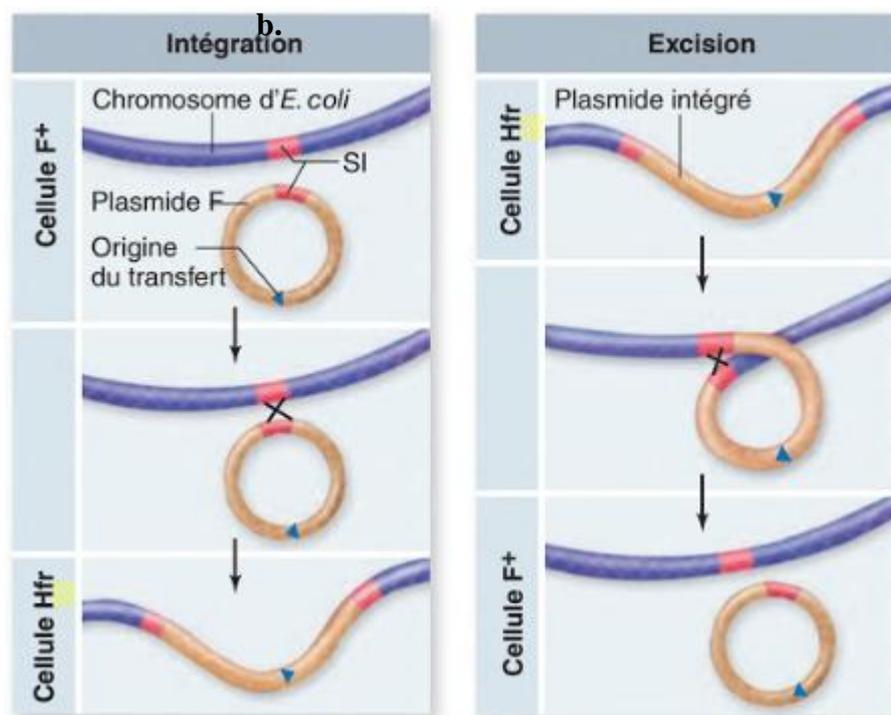
D'autres expériences ont permis, par la suite, de démontrer que le transfert génétique est unidirectionnel (polarisé); il se fait toujours de A vers B. En effet, la souche A possède un facteur F (Fertilité) qui la rend capable de donner des gènes. Il s'agit d'un plasmide dit conjugatif, qui porte les gènes responsables de la synthèse des pili sexuels et du transfert des gènes vers la réceptrice. Seules les bactéries possédant un plasmide conjugatif (ex: facteur F) sont capables de donner des gènes.

1.2. Mécanisme de la conjugaison : Quand on mélange des bactéries donatrices et des bactéries réceptrices, le pili sexuel reconnaît des sites récepteurs pariétaux de la réceptrice et s'y attache. Ensuite, il se rétracte pour mettre les bactéries en contact. Il se forme alors un pont cytoplasmique par lequel se fait le transfert des gènes. Qu'un seul brin de l'ADN F est transféré dans le cytoplasme de la cellule réceptrice où il va servir de matrice pour la synthèse du second brin. L'autre brin d'ADN resté dans la cellule donneuse lui permettra de la même façon de reconstituer par synthèse du brin complémentaire un facteur F fonctionnel.

Le facteur F peut rester libre dans le cytoplasme ou s'intégrer dans le chromosome bactérien et se comporter par la suite comme une partie du chromosome (dans ce cas la bactérie est dite Hfr pour Haute fréquence de recombinaison).



a. Mécanisme de la conjugaison



b. Intégration et excision du plasmide F

Figure 34: la conjugaison bactérienne (Raven et al., 2017).

1.3. La conjugaison interrompue : La conjugaison peut être interrompue artificiellement par agitation mécanique. Cette interruption 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. De plus, les allèles du donneur apparaissent dans un ordre déterminé à partir d'un point appelé origine (O) ce qui permet d'établir la carte chromosomique.

2. Transformation génétique :

2.1. Mise en évidence de la transformation (Expérience de Griffith (1928)) :

Griffith décrit deux souches de pneumocoques *Diplococcus pneumomiae* : la souche R (rough, car lorsque cette souche est cultivée sur milieu de culture artificiel, les colonies obtenues ont un aspect rugueux) et la souche S (smooth, car les colonies ont au contraire un aspect lisse). La souche S doit son aspect à une capsule polysaccharidique qu'elle synthétise autour d'elle. Cette souche est mortelle pour la souris lorsqu'elle lui est injectée. A l'inverse, la souche R ne synthétise pas une telle capsule, et elle n'est pas nocive lorsqu'elle est injectée à une souris. On sait aujourd'hui que cette différence entre les deux souches est due à une mutation, chez la bactérie R, du gène codant l'enzyme responsable de la synthèse de la capsule. Griffith observe tout d'abord que l'injection de bactéries S, si elles ont été préalablement tuées par la chaleur, n'est plus létale pour la souris. Pour une raison qui nous est toujours inconnue, Griffith décide alors d'injecter conjointement des bactéries S chauffées mélangées à des bactéries R vivantes. Cette fois, les souris meurent de septicémie. Les bactéries R, au contact des bactéries S tuées, ont donc acquis un caractère pathogène qu'elles ne possédaient pas précédemment. Ce phénomène a été appelé transformation bactérienne.

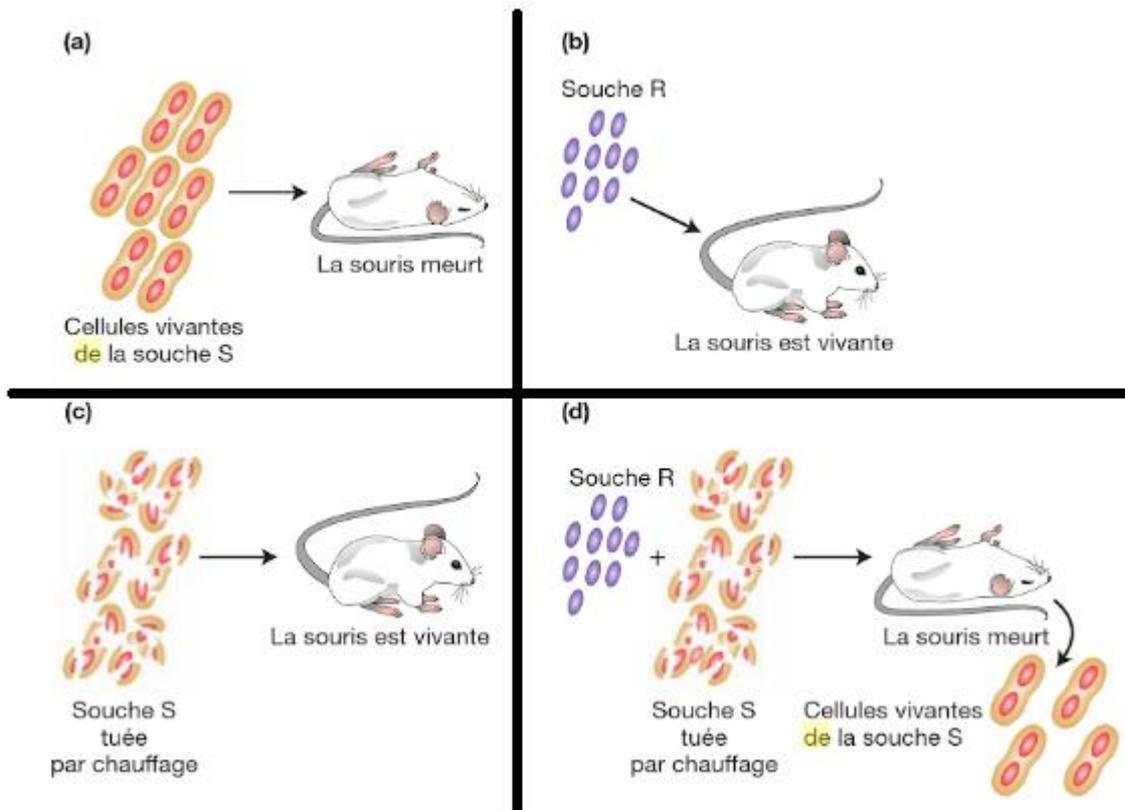


Figure 35: Expérience de Griffith (Griffith et *al.*, 2013).

2.2. Définition : « La transformation est le transfert de gènes résultant de l'absorption d'ADN nu par une cellule receveuse à partir d'une cellule donneuse. Certaines bactéries (ex : *Bacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pneumococcus*) peuvent absorber de l'ADN à partir de l'environnement et l'ADN absorbé peut être incorporé dans le chromosome du receveur. L'introduction de l'ADN se fait sans aucune aide extérieure ni phage, ni système spécifique de transfert. La bactérie donatrice est le plus souvent de même espèce que la bactérie réceptrice, la réceptrice n'est réceptrice que pendant un temps donné (compétence due à des facteurs de compétence protéiques). »

2.3. Mécanisme de la transformation : elle s'effectue selon les étapes suivantes :

- Fixation covalente de l'ADN à un complexe protéique membranaire : le "Transformasome"
- Absorption de l'ADN : L'absorption d'ADN diffère pour les bactéries en fonction qu'elles soient Gram + ou Gram -. Dans les bactéries Gram+ l'ADN est absorbé sous la forme d'une molécule simple brin et le brin complémentaire est fabriqué chez le receveur. Par contraste, les bactéries Gram – absorbent l'ADN sous forme de double brin.
- Recombinaison légitime/homologue/générale : Après que l'ADN du donneur ait été internalisé, un évènement de recombinaison réciproque a lieu entre le chromosome et l'ADN donneur. Cette recombinaison nécessite une homologie entre l'ADN donneur et le chromosome ce qui résulte en la substitution de l'ADN entre le receveur et le donneur.

La transformation a lieu dans la nature, mais, est couramment utilisée dans les laboratoires de biologie moléculaire. Elle permet d'introduire un gène d'intérêt chez la bactérie.

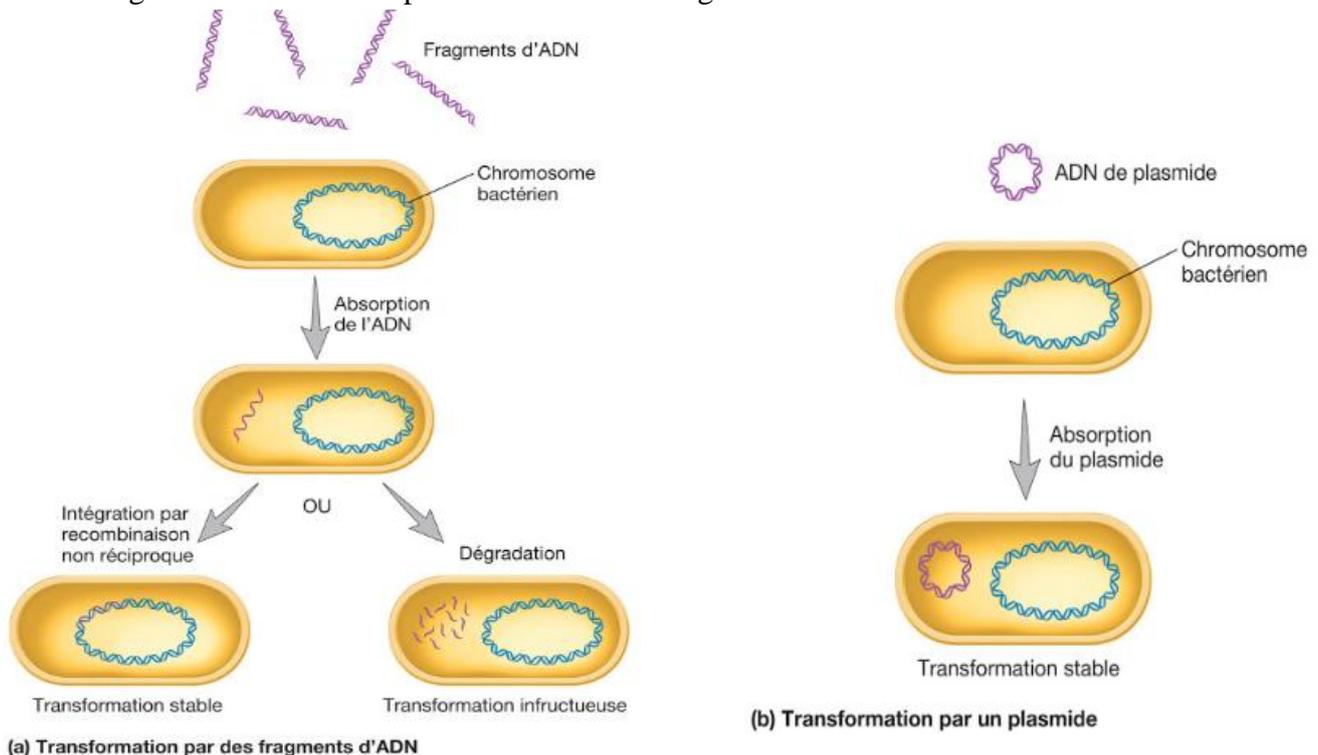


Figure 36: La transformation bactérienne (Willey et al., 2017).

2.4. Applications scientifiques de la transformation bactérienne

La transformation a un grand intérêt historique :

- Il a permis l'établissement des premières cartes génétiques partielles chez les bactéries, et donc des études plus précises sur la virulence, la résistance aux antibiotiques...
- C'est une technique de base du génie génétique, utilisée quotidiennement dans les laboratoires lors de clonage.
- Le concept de transférer de l'ADN par simple contact a été développé avec des ADN viraux dans les années 65, d'où le terme de transfection.
- La découverte ultérieure de la transformation "artificielle" a permis alors de transférer divers ADN sous forme de chimère ou hybride comme un plasmide sur lequel sont clonés des gènes bactériens, animaux ou humains à des bactéries non transformables naturellement comme *E. coli*.
- Pour les espèces non transformables, la technique d'électroporation liée à la "création de pores" dans la paroi bactérienne lorsque des impulsions électriques à haute tension sont appliquées lors de la culture a été proposée par la suite. La durée et l'intensité de l'impulsion sont à définir pour chaque espèce.
- En bactériologie médicale, son intérêt est lié à l'émergence d'espèces résistantes aux antibiotiques comme le pneumocoque ou récemment, le méningocoque. Cette émergence de la résistance, à la pénicilline G par exemple, a été lente depuis l'introduction des antibiotiques. En fait ce phénomène n'a été possible qu'après sélection de mutants résistants (streptocoques buccaux) lors d'antibiothérapie puis de transfert du ou des gènes de cette résistance par transformation naturelle à l'espèce pathogène potentielle en situation de portage.

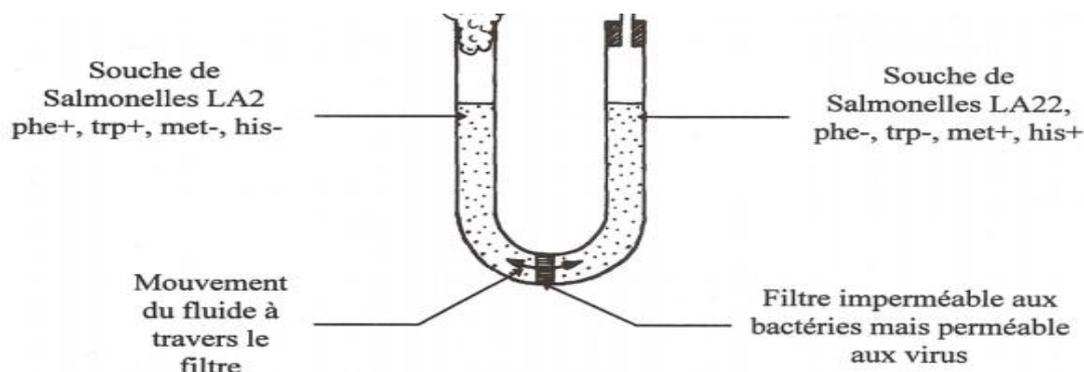
3. La Transduction :

3.1. Mise en évidence de la transduction (Expérience de Zinder et Lederberg (1951)):

Une culture de la souche LT-2 de *Salmonella typhimurium* (souche auxotrophe pour l'histidine) et une culture de la souche LT-22 de *Salmonella typhimurium* (souche auxotrophe pour le tryptophane) sont placées chacune dans une branche d'un tube en U séparé par une membrane en verre fritté qui interdit tout contact entre les deux souches bactériennes. Des bactéries prototrophes pour le tryptophane sont obtenues à une fréquence de 10^{-5} . Ces bactéries prototrophes appartiennent toujours à la souche LT-22 et aucune bactérie de la souche LT-2 ne devient prototrophe.

La fréquence d'apparition des prototrophes exclut une mutation. La présence d'un filtre en verre fritté élimine la possibilité d'une conjugaison. L'addition de l'ADNase dans le milieu n'inhibe pas l'apparition des prototrophes ce qui exclut une transformation. La seule

explication possible était celle d'un transfert génétique faisant intervenir de l'ADN sous une forme suffisamment petite pour traverser le verre fritté et sous une forme suffisamment protégée pour résister à l'ADNase. Des études complémentaires ont permis de montrer que le transfert était dû au phage P22 et que ce transfert pouvait être aboli par des anticorps neutralisants dirigés contre le phage P22.



Résultat : Il apparaît des souches prototrophes (phe+, trp+, met+, his+) dans la branche droite (celle de LA22)

Figure 37: Expérience de Zinder et Lederberg (1951)

3.2. Définition : La transduction est le transfert d'ADN bactérien à partir d'un donneur vers un receveur par l'intermédiaire d'un bactériophage. Dans la plupart des cas le transfert de gène a lieu entre des membres de la même famille de bactéries. Cependant, si un phage particulier possède une large gamme d'hôtes alors le transfert entre espèces peut avoir lieu. La capacité d'un phage à médier la transduction est reliée au cycle de vie du phage.

3.3. Types de transduction :

3.3.1. Transduction généralisée :

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

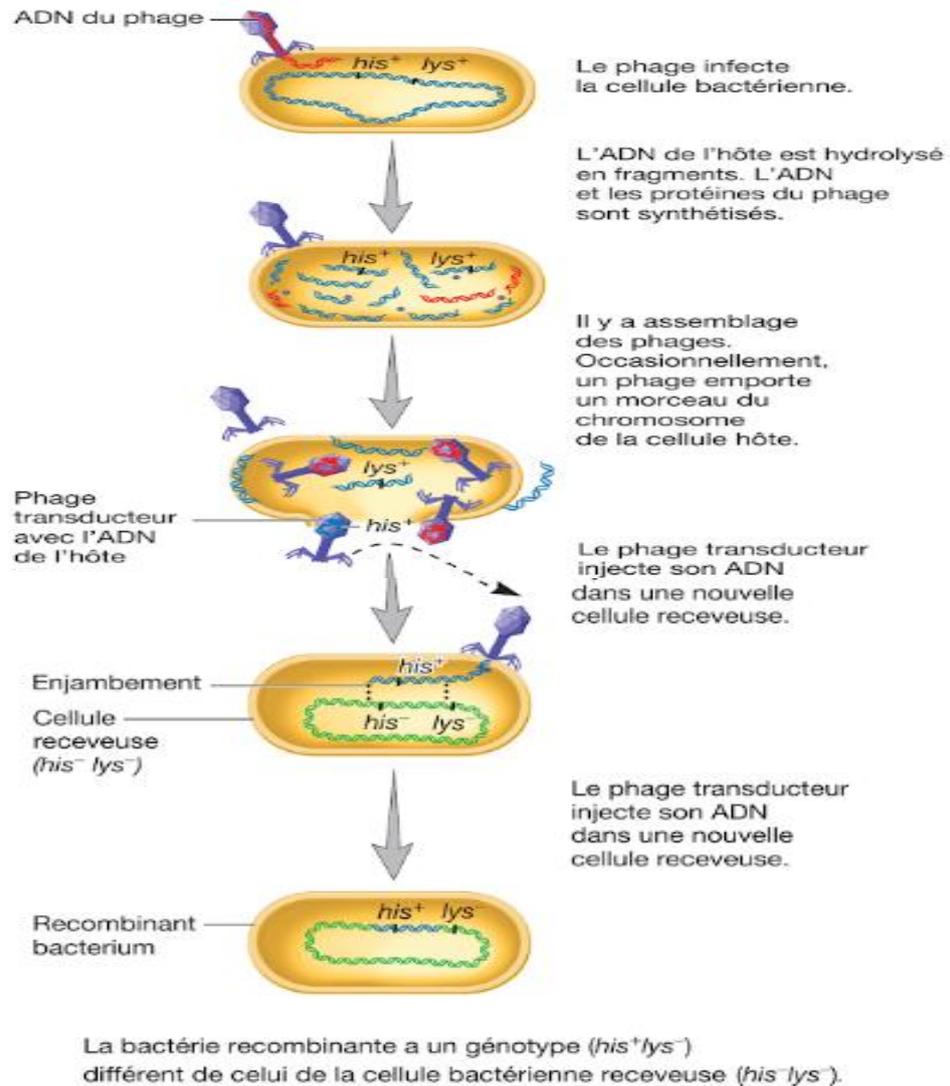


Figure 38: Transduction généralisée (Willey et al., 2017).

3.3. 2. Transduction spécialisée :

La transduction spécialisée est une transduction au cours de laquelle uniquement certains gènes du donneur peuvent être transférés au receveur. Différents phages peuvent transférer différents gènes mais un phage individuel peut seulement transférer certains gènes. La transduction spécialisée est assurée par des phages lysogéniques ou tempérés et les gènes qui sont transférés dépendent d'où le prophage est inséré dans le chromosome. Pendant l'excision du prophage, occasionnellement une erreur peut se produire lorsqu'une partie de l'ADN de l'hôte est excisée avec celui du phage (excision anormale). C'est seulement les gènes de forte proximité du site de l'intégration du phage peuvent être transférés (d'où la transduction spécialisée). Après répllication et libération du phage et infection du receveur, la lysogénisation du receveur peut avoir lieu, ce qui résulte en un transfert stable des gènes du donneur. Le receveur va alors avoir deux copies des gènes qui ont été transférés. La recombinaison légitime de gènes entre le donneur et le receveur est aussi possible.

3.4. Intérêt de la transduction :

La transduction généralisée est un moyen puissant de cartographie des gènes et même de cartographie fine (sites de mutations très proches, voire intragéniques). Si, par transduction, une souche porteuse de plusieurs mutations peut être recombinaisonnée pour toutes celles-ci, cela prouve qu'il y a eu cotransduction (la multiplicité d'infection est inférieure à 1) et que tous les sites de mutations sont localisés sur un fragment de génome dont la taille maximale est égale au génome viral, soit environ 100000 pb. La co-transduction permet, en fonction des génomes donneurs et receveurs, et des fréquences des différents recombinants, de réaliser un « test trois points » et de définir entre trois sites lequel est central.

La transduction est aussi un outil efficace pour construire des souches par transfert de mutations de l'une à l'autre.

Exercices d'application:

Exercice 1 :

On croise une souche *d'E. coli* Hfr sauvage, prototrophe pour l'arginine et la proline, et sensible à la streptomycine, avec une réceptrice auxotrophe pour ces deux acides aminés, et résistante à cet antibiotique. Puis on prélève, toutes les minutes, deux petits volumes de la coculture qu'on étale, après les avoir fortement agités afin de rompre les ponts cytoplasmiques, le premier sur un milieu minimum additionné de streptomycine et de proline, le deuxième sur un milieu minimum additionné de streptomycine et d'arginine.

On observe le résultat suivant, des colonies apparaissent sur le premier milieu à partir du quatrième prélèvement, tandis que des colonies n'apparaissent sur le second milieu qu'à partir du dixième prélèvement.

- 1- Justifier l'ajout de la streptomycine aux milieux de culture après la conjugaison.
- 2- Analyser les résultats et donner la distance entre les sites de mutation arg et pro.

Solution :

- 1- La streptomycine joue le rôle de marqueur de sélection des réceptrices et permet de bloquer la croissance des Hfr sauvages prélevées dans la coculture et qui, en absence de l'antibiotique, donneraient des colonies dans toutes les boîtes d'étalement, les rendant ininterprétables.
- 2- Il faut attendre quatre minutes pour voir apparaître des recombinants [arg+], toute conjugaison interrompue avant quatre minutes ne permet pas d'en avoir; le site muté chez la réceptrice est donc localisé entre trois et quatre minutes de temps minimal de conjugaison, à partir du site de l'origine de transfert de la Hfr;

Il faut attendre dix minutes pour voir apparaître des recombinants [pro+], toute conjugaison interrompue avant dix minutes ne permet pas d'en avoir ; le site muté chez la réceptrice est donc localisé entre neuf et dix minutes de temps minimal de conjugaison à partir du site de l'origine de transfert de la Hfr;

La distance entre les sites de mutation arg et pro est égale à 6 minutes (environ 240 000 pb puisqu'il faut environ 100 minutes pour faire passer les 4,2 millions de pb du génome d'*E.coli*, soit environ 40 000 pb par minute).

Exercice 2: On mélange une souche d'*E.coli* K12 **Hfr** portant les marqueurs (T+ L+): pouvoir de synthétiser la thréonine et la leucine, (T1^S): sensible au phage T1, (Lac+): fermentant le lactose, (Gal +): fermentant le galactose, (Str^S): streptomycine sensible et une souche **F** portant les marqueurs (T- L-), (T1^r), (Lac-), (Gal-), et (Str^r). On interrompt la conjugaison aux temps indiqués ci-contre et on étale pour chaque temps des échantillons sur des milieux qui permettent de cribler les recombinants. Les résultats sont:

10 mn : (T+L+) (Gal-) (Lac-) (Str^r) (T1^r)

15 mn : (T+L+) (Gal-) (Lac-) (Str^r) (T1^S)

20 mn : (T+L+) (Gal-) (Lac+) (Str^r) (T1^S)

28 mn : (T+L+) (Gal+) (Lac+) (Str^r) (T1^S)

- Déterminez l'ordre des gènes (T+L+) (Gal+) (Lac+) (T1^S).

Solution : Dans notre expérience nous avons travaillé avec les souches ci-dessous :

Hfr : (T+ L+), (T1^S), (Lac+), (Gal+), et (Str^S) : **Donatrice**

F- : (T- L-), (T1^r), (Lac-), (Gal-), et (Str^r). : **Réceptrice**

Nous avons défini les recombinants comme étant des réceptrices ayant reçu du matériel génétique de la donatrice. Par conséquent, les génotypes des recombinants vont correspondre à celui de la réceptrice avec l'acquisition d'un ou de plusieurs caractères de la donatrice. -

Après 10 minutes de contact entre la donatrice et la réceptrice, la réceptrice a reçu les gènes (T+L+)

- Après 15 min : elle a reçu les gènes (T+L+) et le gène (T1^S)

- Après 20 min : elle a reçu les gènes (T+L+), le gène (T1^S) et le gène (Lac+)

- Après 28 min : elle a reçu les gènes (T+L+), le gène (T1^S), le gène (Lac+) et le gène (Gal+)

L'ordre des gènes donc est le suivant :

Gal+	Lac+	T1S	(T+L+)
-----/-----/-----/-----/----->			

Notez qu'on peut par ailleurs, estimer la distance entre les gènes par les temps nécessaires à leur passage dans la réceptrice.

Chapitre V :

Phénomène de restriction modification

Chapitre V : Phénomène de restriction modification

1. Définition :

Une enzyme de restriction est une enzyme, principalement d'origine bactérienne qui peut couper un fragment d'ADN au niveau d'une séquence de nucléotides caractéristique appelée *site de restriction*. Chaque enzyme de restriction reconnaît ainsi un site spécifique. Plusieurs centaines d'enzymes de restriction sont actuellement connues, on en retrouve naturellement dans un grand nombre d'espèces de bactéries.

2. Phénomène de restriction/modification:

Les enzymes de restriction sont produites par des bactéries et constituent un mécanisme de défense contre les infections par les bactériophages, des virus spécifiques des bactéries. Lorsque le virus injecte son ADN dans le micro-organisme, celui-ci est coupé par l'enzyme de restriction au niveau de ses sites spécifiques. La destruction du génome du virus bloque ainsi l'infection. Le nom d'enzyme de restriction provient de ce mécanisme, en effet la présence de ces enzymes dans les bactéries restreint l'infectiosité des bactériophages.

D'autre part, pour éviter que l'enzyme de restriction ne coupe l'ADN de son propre génome, la bactérie fabrique aussi une deuxième enzyme appelée méthylase qui reconnaît également le site de restriction. La méthylase ne coupe pas l'ADN, mais le modifie en lui rajoutant un groupement méthyle sur un ou plusieurs nucléotides du site. Cette méthylation empêche la coupure par l'enzyme de restriction. Ce mécanisme de défense, appelé système de restriction / modification, associe systématiquement ces deux enzymes, l'une de coupure et l'autre de protection.

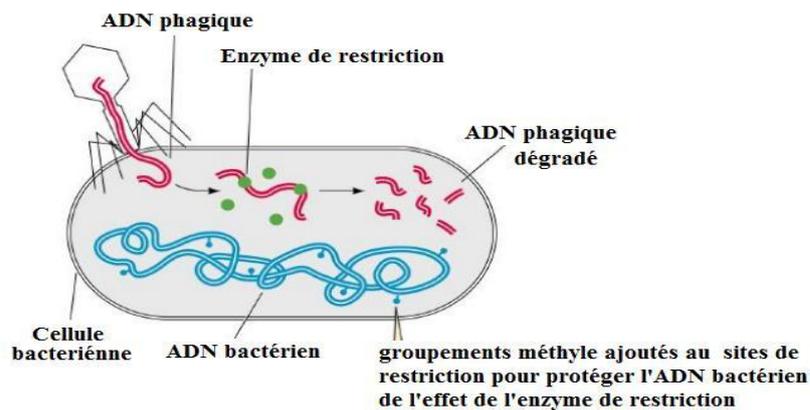


Figure 39: Destruction du génome viral par les enzymes de restriction bactériennes (Lionnet et Croquette. 2005).

3. Propriétés des enzymes de restrictions:

Les enzymes de restrictions appartiennent à la classe des endonucléases, c'est-à-dire des enzymes capables de cliver les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides à l'intérieur de

la chaîne d'un acide nucléique, et plus spécifiquement appartiennent à la classe des endodésoxyribonucléases puisque spécifique à l'ADN. Les endonucléases diffèrent des exonucléases, puisqu'elles peuvent cliver les brins d'acide nucléique de manière interne, alors que les exonucléases n'attaquent la molécule d'acide nucléique qu'au niveau de ses extrémités. Les enzymes de restriction sont capables de reconnaître spécifiquement et uniquement une courte séquence de l'ADN de 4 à 10 paires de bases, et de cliver les deux brins de l'ADN au site reconnu. Cette propriété a depuis longtemps été utilisée en biologie moléculaire, puisqu'elles permettent de fragmenter l'ADN en segments de taille réduite en coupant à des sites définis et devenues actuellement des outils important en génie génétique.

Lorsqu'une endonucléase de restriction coupe un ADN, le résultat peut être :

1. soit une coupure franche c'est-à-dire au même niveau sur les deux brins ; ce sont les bords ou les bouts francs : la coupure a lieu au milieu du site de restriction. Il ne peut pas y avoir de liaison spontanée entre les fragments qui ont résulté de cette coupure. Seule une T4 ligase peut rétablir la ligation des deux brins d'ADN résultant de la coupure.

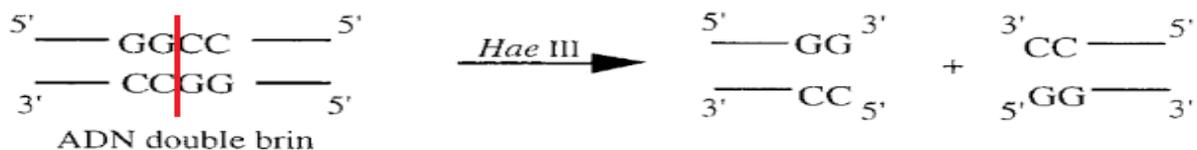


Figure 40: Exemple de coupure franche.

2. soit une coupure décalée sur les deux brins. On parlera alors d'extrémités cohésives. Les bouts des deux ADN obtenus ne sont plus francs ; ce sont des bouts collants ou bouts cohésifs. Les coupures sont décalées l'une par rapport à l'autre sur les deux brins. Les parties simples brins peuvent s'apparier, d'où la possibilité de lier des fragments d'ADN d'origine différentes : c'est le phénomène de la recombinaison génétique.

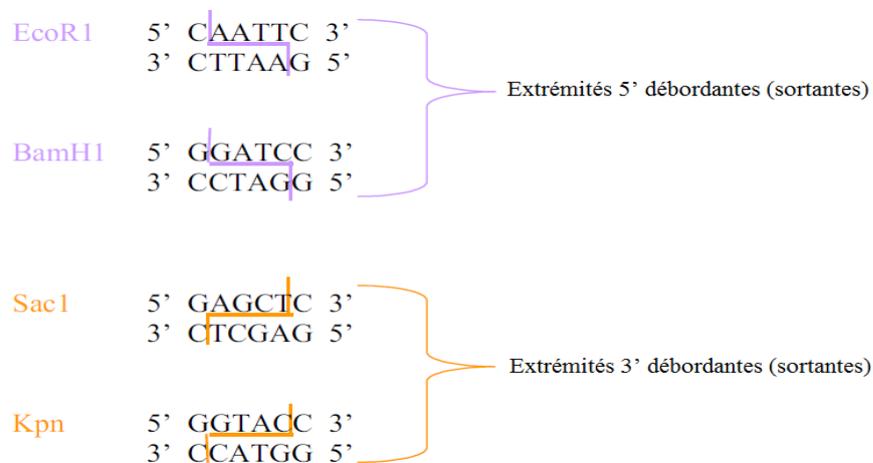


Figure 41: Exemple de coupure décalée.

- 5' débordante signifie que l'extrémité la plus longue après coupure est l'extrémité 5'

- 3' débordante signifie que l'extrémité la plus longue après coupure est l'extrémité 3'

4. Types d'enzymes de restriction :

Selon la relation spatiale entre la séquence reconnue et le lieu de coupure, il est possible de distinguer trois types d'enzymes de restriction.

Les enzymes de **type I** et de **type III** reconnaissent une séquence d'ADN spécifique et coupent en un endroit aléatoire, d'une distance d'environ 1 000 paires de bases (pb) pour le type I et de 25 pb pour le type III plus loin que le site de restriction. Ces 2 types ont également une activité méthylasique en plus de leur activité endonucléasique, ce qui les différencie du type II.

Les enzymes de **type II**, les plus utilisées, reconnaissent une séquence spécifique et coupent en un endroit spécifique de cette séquence.

5. Nomenclature :

La nomenclature des enzymes de restriction est précise. Leur nom comporte 3 ou 4 lettres correspondant entre autre à la bactérie à partir de laquelle on a extrait cette enzyme :

- La première lettre est en majuscule cela correspond à la première lettre du genre de la bactérie
- La seconde et troisième lettre sont en minuscule et correspondent aux deux premières lettres de l'espèce bactérienne
- La quatrième lettre correspond à la souche bactérienne, elle est écrite en majuscule mais n'est pas présente dans toutes les enzymes de restriction
- Enfin un chiffre romain donne le numéro d'ordre de caractérisation de l'enzyme

Tableau 05: Exemples d'enzymes de restriction.

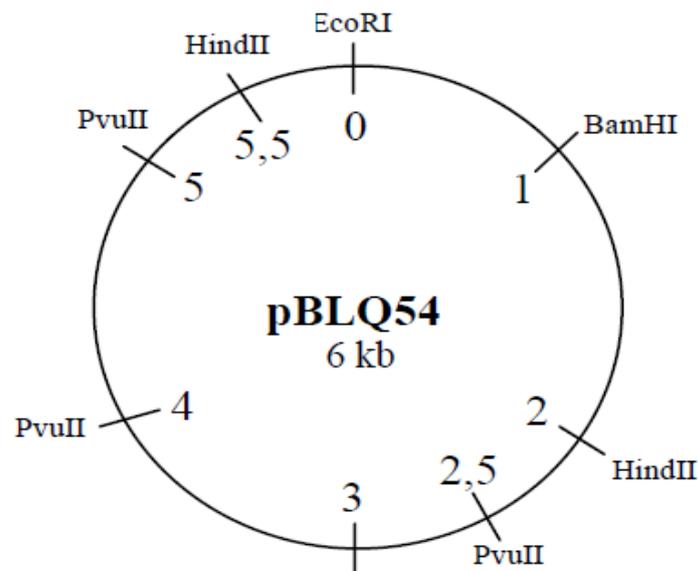
Enzyme	Source	Séquence reconnue	Coupure	Extrémités (après coupure)
Eco RI	<i>Escherichia coli</i>	5'GAATTC 3'CTTAAG	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'	Cohésives
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'GGATCC 3'CCTAGG	5'---G GATCC---3' 3'---CCTAG G---5'	Cohésives
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'AAGCTT 3'TTCGAA	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A---5'	Cohésives
MstII	<i>Microcoleus species</i>	5'CCTNAGG 3'GGAMTCC	5'---CC TNAGG---3' 3'---GGAMT CC---5'	Cohésives

TaqI	<i>Thermus aquaticus</i>	5'TCGA 3'AGCT	5'---T CGA---3' 3'---AGC T---5'	Cohésives
NotI	<i>Nocardia otitidis</i>	5'GCGGCCGC 3'CGCCGGCG	5'--GC GGCCGC--3' 3'--CGCCGG CG--5'	Cohésives
HinfI	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'GANTC 3'CTNAG		
AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'AGCT 3'TCGA	5'---AG CT---3' 3'---TC GA---5'	Franches

6. Établissement d'une carte de restriction :

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

Exemple de carte de restriction:



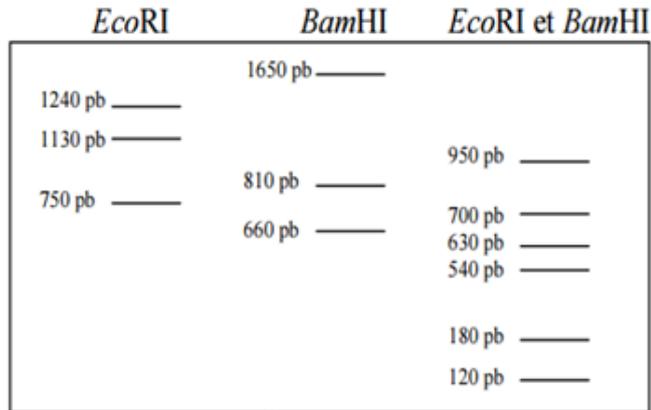
Exercices d'application :

Exercice 1 :

Afin de construire la carte de restriction d'un plasmide x, ce plasmide est digéré premièrement par l'enzyme EcoRI, puis par BamHI, ensuite par un mélange des deux. La figure ci-dessous donne les électrophorèses après les digestions simples et multiples.

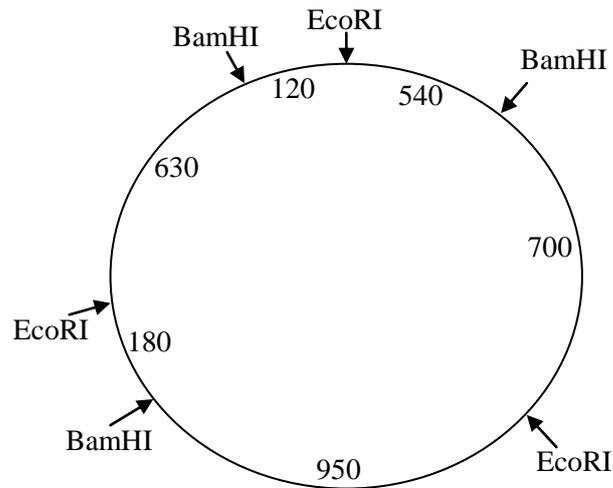
- Quelle est la taille du plasmide avant digestion ?

- Combien de sites chaque enzyme possède-t-elle ?
- Quelle est la carte de restriction du plasmide?



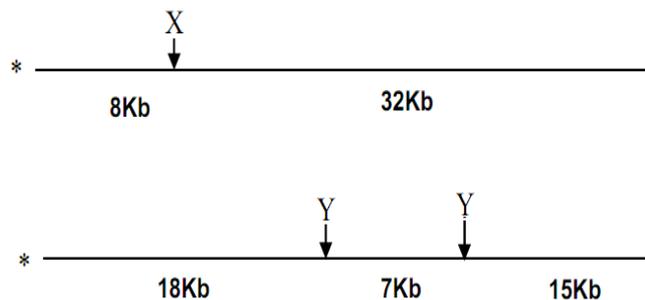
Solution :

- la taille du plasmide avant digestion = **3120 pb**.
- les sites de restriction pour chaque enzyme : **EcoRI = 3 / BamHI= 3**
- la carte de restriction du plasmide est la suivante :



Exercice 02:

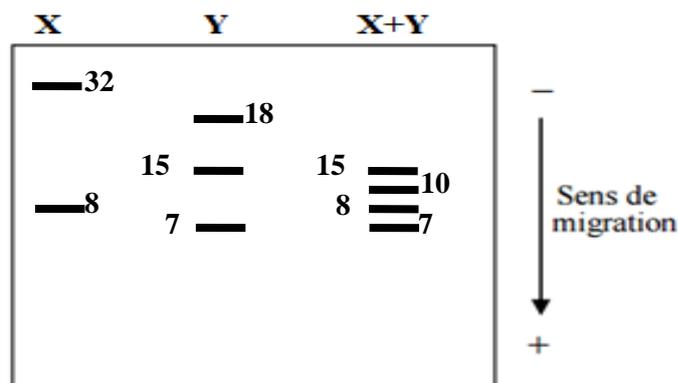
On dispose d'un fragment d'ADN linéaire de 40Kb et on connaît les emplacements de deux sites de restriction X et Y.



1. Placer sur un schéma représentant une plaque d'électrophorèse les fragments produits respectivement par les digestions simples et multiples. (L'extrémité 5' d'un des deux brins du fragment d'ADN a été marquée (*))
2. Comparer les fractions issues de l'action enzymatique X et X + Y, quels sont les fragments :
 - ✓ Produits par l'action de X qui ne sont pas recoupés par Y ?
 - ✓ Ceux qui sont produits par X et sont recoupés par Y ?
3. En comparant cette fois les fractions issues de l'action enzymatique Y et X + Y, quels sont les fragments :
 - ✓ Produits par Y qui ne sont pas recoupés par X ?
 - ✓ Ceux qui sont produits par Y et sont recoupés par X ?

Solution :

1. Schéma de la plaque d'électrophorèse des fragments produits respectivement par les digestions simples et multiples.



2. En comparant les fractions issues de l'action enzymatique X et X + Y, on trouve que :
 - ✓ les fragments produits par l'action de X et qui ne sont pas recoupés par Y, il y a uniquement le fragment de 8Kb.
 - ✓ Ceux qui sont produits par X et qui sont recoupés par Y, il y a uniquement le fragment de 32Kb.
3. En comparant cette fois les fractions issues de l'action enzymatique Y et X + Y, on trouve que :
 - ✓ les fragments produits par Y et qui ne sont pas recoupés par X sont les fragments de 7 et de 15Kb.
 - ✓ Ceux qui sont produits par Y et qui sont recoupés par X, c'est uniquement le fragment de 18Kb.

Chapitre VI :

Régulation de l'expression des gènes chez les procaryotes

Chapitre VI : Régulation de l'expression des gènes chez les procaryotes

1. Définition : La régulation de l'expression des gènes c'est l'ensemble des mécanismes de régulations mis en œuvre pour passer de l'information génétique incluse dans une séquence d'ADN à un produit de gène fonctionnel (ARNm ou protéine). Elle a pour effet de moduler, d'accroître ou de décroître la quantité des produits de l'expression des gènes (ARNm, protéines). La régulation des gènes se fait aux différentes étapes de l'expression, allant de la séquence d'ADN au produit final (que ce soit la transcription, la maturation des ARNm, la traduction des ARNm ou la stabilité des ARNm et protéines). Chez les bactéries, le contrôle s'exerce essentiellement au niveau de la transcription.

2. La régulation transcriptionnelle:

2.1. Expérience de JACOB ET MONOD: Culture de bactéries en milieu contenant le glucose + lactose à 37 °C pendant quelques heures.

Résultats :

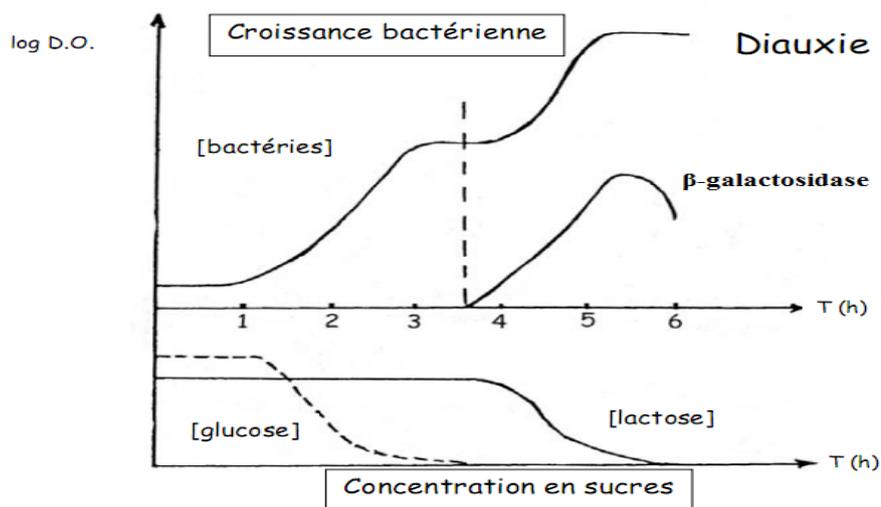


Figure 42: courbe de croissance bactérienne en présence du glucose + galactose.

Les bactéries n'ont commencé de consommer le lactose (disaccharide) qu'après disparition totale du glucose (sucre simple) dans le milieu ; la β -galactosidase (enzyme responsable à la dégradation du lactose en glucose + galactose) apparue juste avec la consommation du lactose.

Interprétation : La β -galactosidase n'est synthétisé qu'après disparition totale du glucose et la présence du lactose comme seule source du carbone. Le lactose active donc la synthèse de l'enzyme β - galactosidase. Il a été montré par ailleurs qu'il s'agit bien d'une synthèse accrue d'enzyme et pas d'une activation d'un précurseur préalablement présent. On dit que l'enzyme est inductible et le lactose est l'inducteur.

Conclusion : La synthèse du β -galactosidase est contrôlée, ou d'autre façon l'expression du gène responsable à la synthèse du β -galactosidase est régulée, c'est la régulation de l'expression des gènes.

2.2. Mécanisme de la régulation de l'expression des gènes (notion d'opéron): Le contrôle concerté de l'expression des gènes est essentiel pour le maintien équilibré de la croissance cellulaire. Ce contrôle permet à la cellule d'ajuster ses synthèses aux conditions environnementales. Chez les bactéries, les gènes impliqués dans un processus métabolique sont souvent groupés sur le chromosome et organisés en unité de transcription appelée opéron. Le contrôle coordonné de l'expression de ces gènes est possible grâce à des protéines régulatrices. Elles régulent le taux de transcription en se liant à l'ADN au niveau de séquences spécifiques.

Structure générale d'un opéron :

L'opéron comprend une région régulatrice, l'opérateur (la séquence d'ADN où se fixe un activateur ou un répresseur), un promoteur commun (où se fixe l'ARN polymérase), et un ou plusieurs gènes structuraux qui sont contrôlés de manière coordonnée grâce à l'opérateur. Ces gènes sont co-transcrits sous forme d'un ARN messager polycistronique. En effet, Deux modes de régulation de l'expression des gènes ont été déterminés:

2.2.1. Régulation génique négative : Les opérons répressibles et les opérons inductibles sont des exemples de répression génique négative. En effet, dans ces deux types d'opérons, la liaison d'un répresseur protéique à l'opérateur de l'opéron a pour effet de bloquer sa transcription en ARN.

2.2.1.1. Les opérons inductibles : Le répresseur est naturellement actif et inactive donc la transcription de l'opéron en se liant à l'opérateur de celui-ci. La liaison d'une molécule appelée inducteur avec le répresseur modifie sa forme. Le répresseur, lié à l'inducteur, se détache alors de l'opérateur et la transcription de l'opéron est activée, ses gènes sont exprimés.

Exemple:

Le cas typique est celui de l'opéron lactose qui contient trois gènes adjacents :

- ✓ **Lac Z** (codant la Bêta galactosidase qui hydrolyse le lactose en glucose + galactose) ;
- ✓ **Lac Y** (codant la lactose perméase : protéine membranaire permet l'entrée du lactose dans la cellule) ;
- ✓ **Lac A** (codant la thiogalactoside transacétylase débarrassant la cellule du thiogalactoside importé avec le lactose).

Ces trois gènes de structure sont précédés par une région responsable de la régulation de leur expression. Cette région régulatrice comprend le promoteur (P) et l'opérateur (O). On trouve

également en amont de l'opéron lactose, le gène régulateur (*lac i*) qui code une protéine régulatrice. Celle-ci agit en inhibant l'expression des gènes de l'opéron lactose par transactivation en se liant spécifiquement sur l'ADN au niveau de l'opérateur. L'expression de ce répresseur est constitutive, c'est à dire qu'il est exprimé quelque soient les conditions de croissance de la bactérie. Par contre, son affinité pour l'opérateur sera modifiée en présence de lactose.

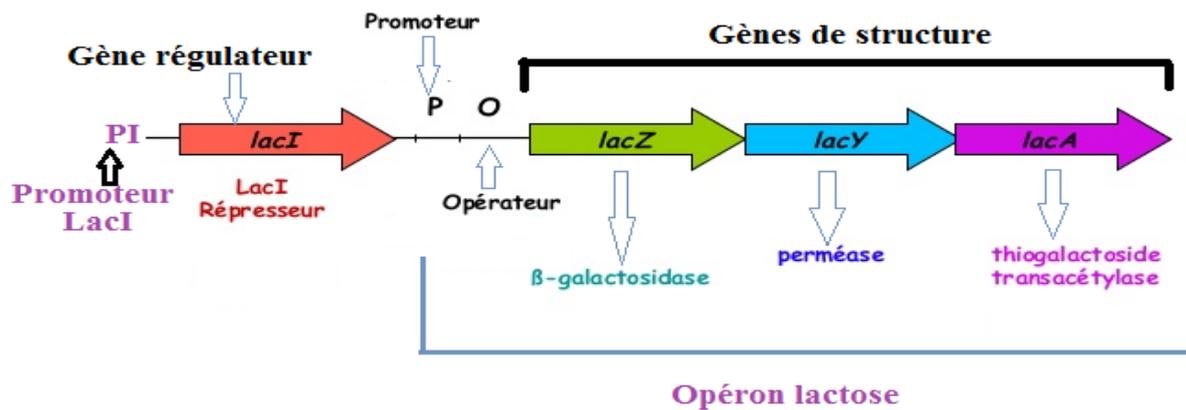


Figure 43: Structure de l'opéron lactose.

a) **En absence du lactose**, le répresseur est sous sa forme active. Il va se lier spécifiquement au niveau de l'opérateur de l'opéron lactose bloquant l'accès de l'ARN polymérase au site d'initiation de la transcription. Ainsi, il y a régulation négative de la transcription des gènes de l'opéron lactose. Les enzymes nécessaires au métabolisme du lactose ne sont pas synthétisées car inutiles en absence de lactose.

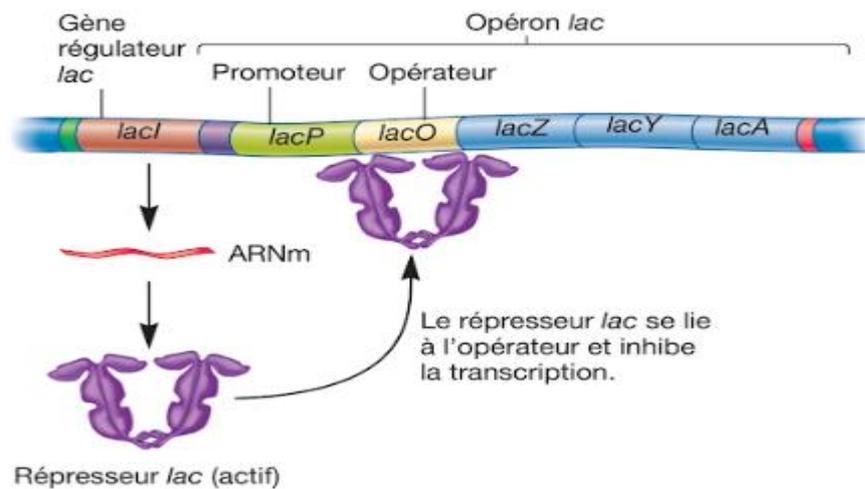


Figure 44: l'opéron lactose en absence du lactose (Willey et al., 2017).

b) **En présence du lactose seul**, c'est l'allolactose, un isomère du lactose, qui va jouer le rôle d'inducteur en se liant au répresseur pour l'inactiver. Cette liaison entraîne un changement conformationnel du répresseur qui perd alors son affinité pour l'opérateur. Le site opérateur étant libéré, l'ARN polymérase peut atteindre le site d'initiation de la transcription et

synthétiser l'ARN polycistronique. La production des enzymes nécessaires au métabolisme du lactose est donc dépendante de la présence du substrat. L'opéron lactose est donc un opéron inducible.

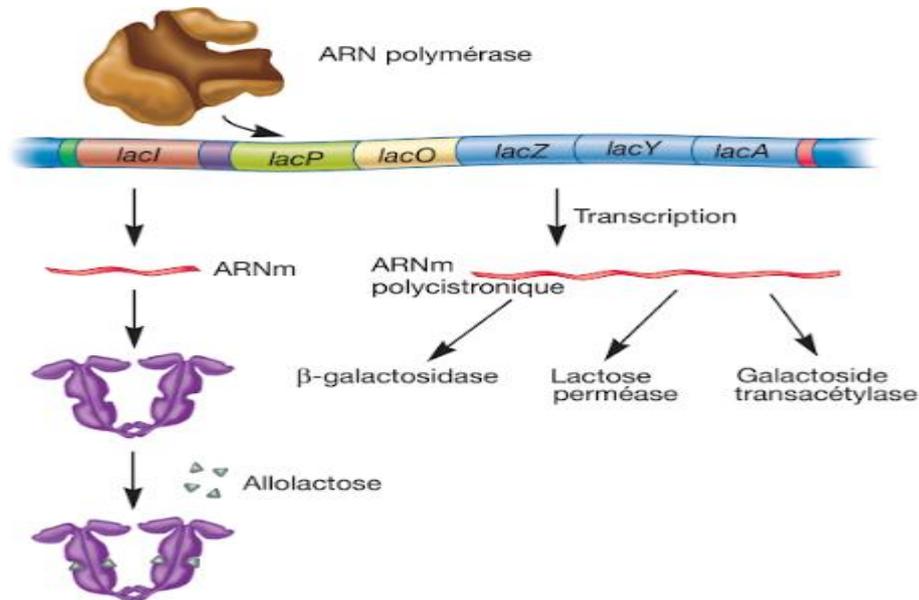


Figure 45: l'opéron lactose en présence du lactose (Willey et al., 2017).

2.2.1.2. Les opérons répressibles : Le répresseur n'est activé que lorsqu'il se lie avec une autre molécule, appelée corépresseur. En l'absence de corépresseur, le répresseur n'a donc pas la structure spatiale nécessaire pour se lier avec l'opérateur et l'opéron est alors transcrit normalement, les gènes sont exprimés.

Exemple:

Un exemple couramment cité est celui de l'opéron tryptophane, qui code pour 5 gènes impliqués dans la biosynthèse du tryptophane. En amont de cet opéron se trouve une séquence codant un répresseur.

En absence de tryptophane :

Le gène régulateur synthétise un répresseur. Ce répresseur se présente sous forme d'un tétramère dont les 4 sous-unités sont identiques. Il possède une particularité essentielle. En effet, il ne se fixe pas sur l'opérateur. On l'appelle apo-répresseur. Ce n'est qu'en présence d'un co-répresseur que le répresseur se fixera sur l'opérateur. En absence de répresseur au complet (apo-répresseur et co-répresseur) fixé sur l'opérateur, l'ARN polymérase peut se fixer sur le promoteur et commencer la transcription. Dans ces conditions, les gènes de structure seront transcrits et les enzymes de synthèse du tryptophane seront synthétisées. Le tryptophane sera produit.

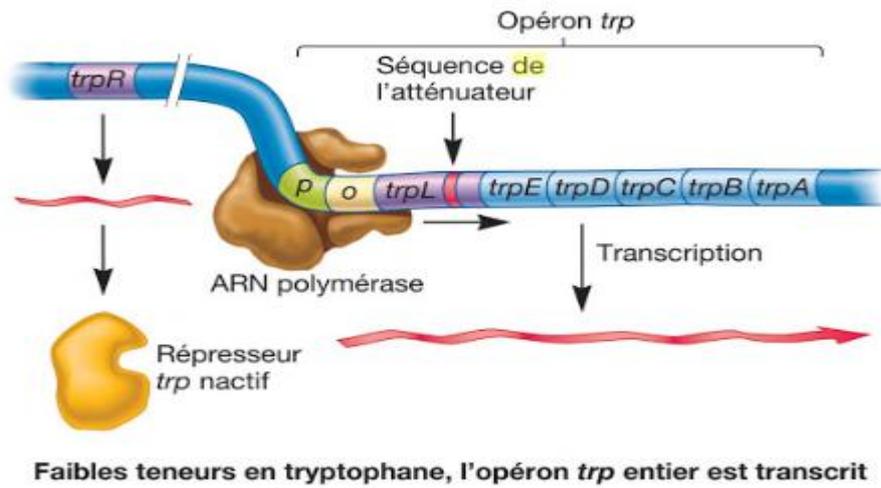


Figure 46: l'opéron tryptophane en absence du tryptophane (Willey et al., 2017).

En présence de tryptophane : La présence de tryptophane en excès dans le milieu de culture entraîne un arrêt de la synthèse de tryptophane. Cette synthèse est donc réprimée. Le tryptophane agissant comme un corépresseur se lie au répresseur inactif. Le complexe ainsi formé peut se fixer sur l'opérateur. Dans ces conditions, l'ARN polymérase ne peut pas commencer la transcription. Cette dernière est donc bloquée par le résultat final de l'action des gènes de structure.

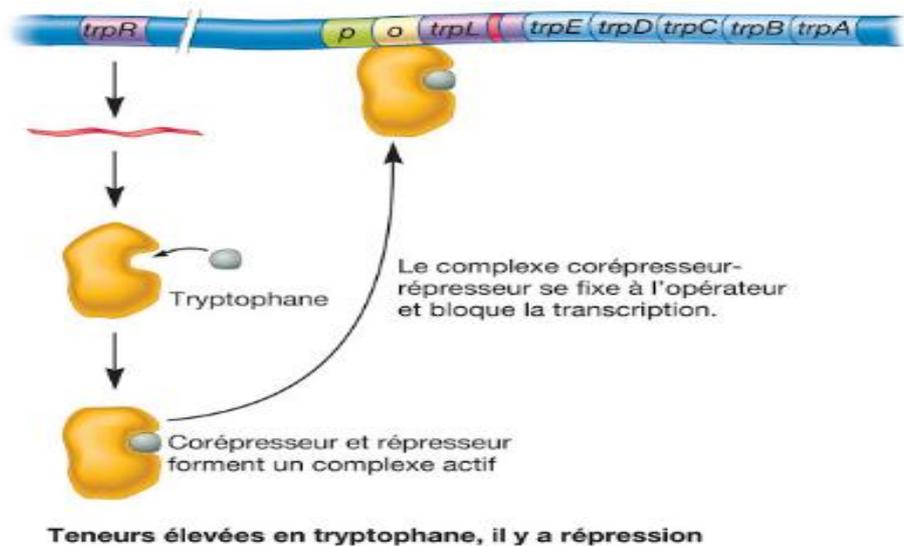


Figure 47: l'opéron tryptophane en présence du tryptophane (Willey et al., 2017).

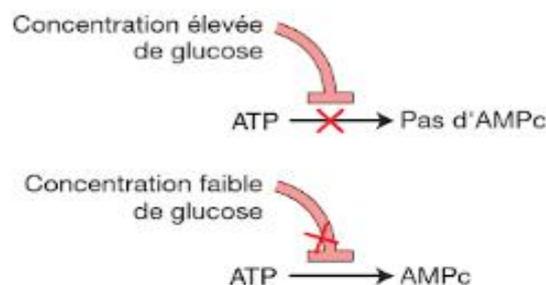
2.2.2. Régulation génique positive : Certains opérons peuvent également faire l'objet d'une régulation génique positive par l'intermédiaire d'une protéine activatrice stimulatrice. La protéine activatrice, lorsqu'elle est active, se lie à l'ARN polymérase et augmente son efficacité au promoteur, permettant ainsi une plus grande transcription en ARNm donc une expression génique plus importante. La protéine activatrice est généralement inactive à l'état naturel et s'active seulement avec la présence d'une autre molécule avec laquelle elle se lie.

Exemple : la régulation positive de l'opéron lactose :

Lorsque les bactéries, par chance, disposent en même temps de glucose et de lactose, la situation se complique ! La protéine inhibitrice (Le répresseur) de l'opéron lactose est

inactivée par l'allolactose, le site opérateur de l'opéron est donc libre et les gènes pourraient être transcrits. Or, tant que du glucose est présent, la bactérie va le métaboliser préférentiellement : elle n'a donc pas besoin des enzymes nécessaires au métabolisme du lactose. Ceci implique l'existence d'un autre mécanisme de régulation que l'on appelle la répression catabolique (régulation positive). Ce n'est que lorsque la concentration en glucose diminue que le métabolisme du lactose devient nécessaire. Un signal de carence alimentaire est alors déclenché sous forme d'une augmentation du taux d'AMPc (AMP cyclique). Cet AMPc forme un complexe avec la protéine CAP (protéine activatrice des catabolites). Ce complexe se lie à l'ADN en amont du site de fixation de l'ARN polymérase. L'interaction du complexe CAP-AMPc va agir comme un inducteur et augmenter l'affinité de l'ARN polymérase pour le promoteur de l'opéron. Cette régulation positive peut permettre d'augmenter la transcription de l'opéron lactose. On comprend alors qu'en présence de glucose, il n'y a pas de complexes CAP-AMPc disponibles : le niveau de transcription de l'opéron lactose est donc très faible.

(a) Les concentrations de glucose régulent les concentrations d'AMPc



(b) Le complexe AMPc-CAP active la transcription

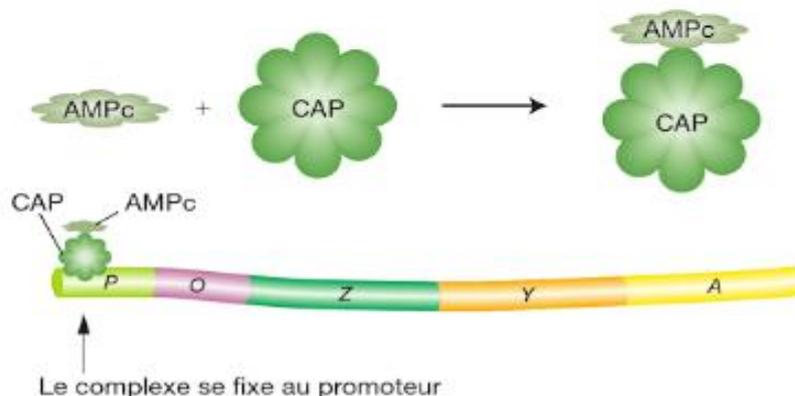


Figure 48: Régulation positive de l'opéron lactose (Griffith et al., 2013).

Exercice d'application:

La régulation de l'expression de l'opéron lactose a été étudiée à l'aide de souches bactériennes comportant deux exemplaires de la région lac (diploïdes partiels).

Mettre une croix (+) lorsque une synthèse des enzymes actives (betagalactosidase : produit du gène lac Z) et (betagalactoside perméase : produit du gène Y) est possible et une croix (-) dans le cas inverse.

i^+ : allèle fonctionnel du gène du répresseur

i^- : allèle muté, le répresseur ne reconnaît pas l'opérateur

i^s : allèle muté, le répresseur ne reconnaît pas l'inducteur

o^+ : allèle fonctionnel du site de l'opérateur

o^c : allèle muté, opérateur non reconnu par le répresseur

z^+ : allèle fonctionnel du gène de la β galactosidase

z^- : allèle muté, β galactosidase absente

Y^+ : allèle fonctionnel du gène de la betagalactoside perméase

Y^- : allèle muté, betagalactoside perméase absente

Génotype	β -galactosidase		β -galactosidase perméase	
	Absence d'inducteur	Présence d'inducteur	Absence d'inducteur	Présence d'inducteur
$i^+o^cz^+y^+ / i^+o^+z^+y^+$				
$i^+o^cz^+y^+ / i^+o^+z^+y^+$				
$i^+o^cz^+y^+ / i^+o^+z^-y^-$				
$i^+o^+z^+y^+ / i^+o^+z^+y^+$				
$i^so^+z^-y^+ / i^+o^+z^+y^-$				

Solution:

Dans le cas de la diploïdie partiel on trouve l'état de la dominance entre les allèles comme suit :

Pour le gène i (Dominance: 1. i^s ; 2. i^+ ; 3. i^-)

Pour le gène O (Dominance: 1. O^c ; 2. O^+)

Pour le gène Z (Dominance : 1. Z^+ ; 2. Z^-)

Pour le gène Y (Dominance : 1. Y^+ ; 2. Y^-)

Les résultats de la synthèse enzymatique sont résumés dans le tableau suivant :

Génotype	β -galactosidase		β -galactosidase perméase	
	Absence d'inducteur	Présence d'inducteur	Absence d'inducteur	Présence d'inducteur
$i^+o^c z^-y^+ / i^+o^+z^+y^+$	+	+	+	+
$i^+o^c z^+y^+ / i^+o^+z^+y^+$	+	+	+	+
$i^+o^c z^+y^+ / i^+o^+z^-y^-$	+	+	+	+
$i^+o^+z^+y^+ / i^-o^+z^-y^+$	-	+	-	+
$i^s o^+z^-y^+ / i^+o^+z^+y^-$	-	-	-	-

Chapitre VII :

Génétique des bactériophages

Chapitre VII : Génétique des bactériophages

1. Définition

« Les bactériophages (également dénommés phages) sont des virus qui infectent spécifiquement les bactéries. Ils ont été décrits pour la première fois par un chercheur anglais, Frederick Twort, en 1915. Les bactériophages sont présents dans l'ensemble de la biosphère. En effet, on estime entre 10^{30} et 10^{32} bactériophages dans notre environnement. Ils sont présents partout, mais en quantité plus importante dans les excréments, le sol et les eaux d'égout. Ils sont reconnus comme étant des parasites absolus. En effet, ils ne possèdent pas la machinerie nécessaire à leur réplication et ont donc besoin d'emprunter celle de leur hôte de manière à pouvoir proliférer librement. »

2. Classification et structure

Plus de 5000 bactériophages ont été analysés et ces derniers sont classés selon l'ICTV (« International Committee on Taxonomy of Viruses »). Le matériel génétique est habituellement utilisé pour faire la classification générale des bactériophages. Comme les virus qui infectent les eucaryotes, les phages sont constitués d'une enveloppe protéique externe (appelée capsid ayant une géométrie icosaédrique et possédant une queue de format variable) protégeant le matériel génétique (ADN ou ARN). Le génome d'ADN ou d'ARN peut être à brin simple ou double et circulaire ou linéaire. Pour plus de 90 % des phages connus, ce matériel est une molécule d'ADN double-brin d'une longueur de 5 à 650 kpb (kilobases) et leur dimension varie de 24 à 200 nm. On reconnaît un ordre (*Caudovirales*), 13 familles et 31 genres chez les bactériophages. Environ 40 critères sont utilisés pour la classification, mais aucun critère universel n'existe pour le genre et l'espèce.

La morphologie de la queue permet de subdiviser cette large famille en 3 groupes :

- 60 % des phages sont des *Siphoviridae* et possèdent une longue queue flexible.
- 25 % sont des *Myoviridae* avec une queue contractile.
- 15 % sont des *Podoviridae* et possèdent une courte queue.

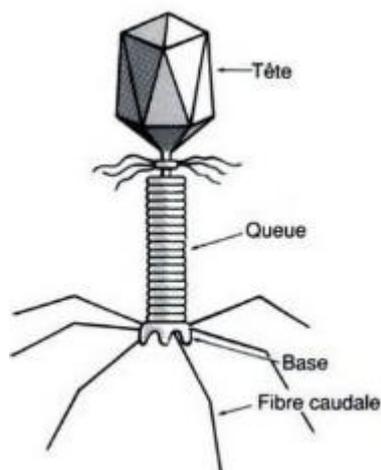


Figure 49: structure d'un Bactériophage T4
(Eisenstein et al., 1999)

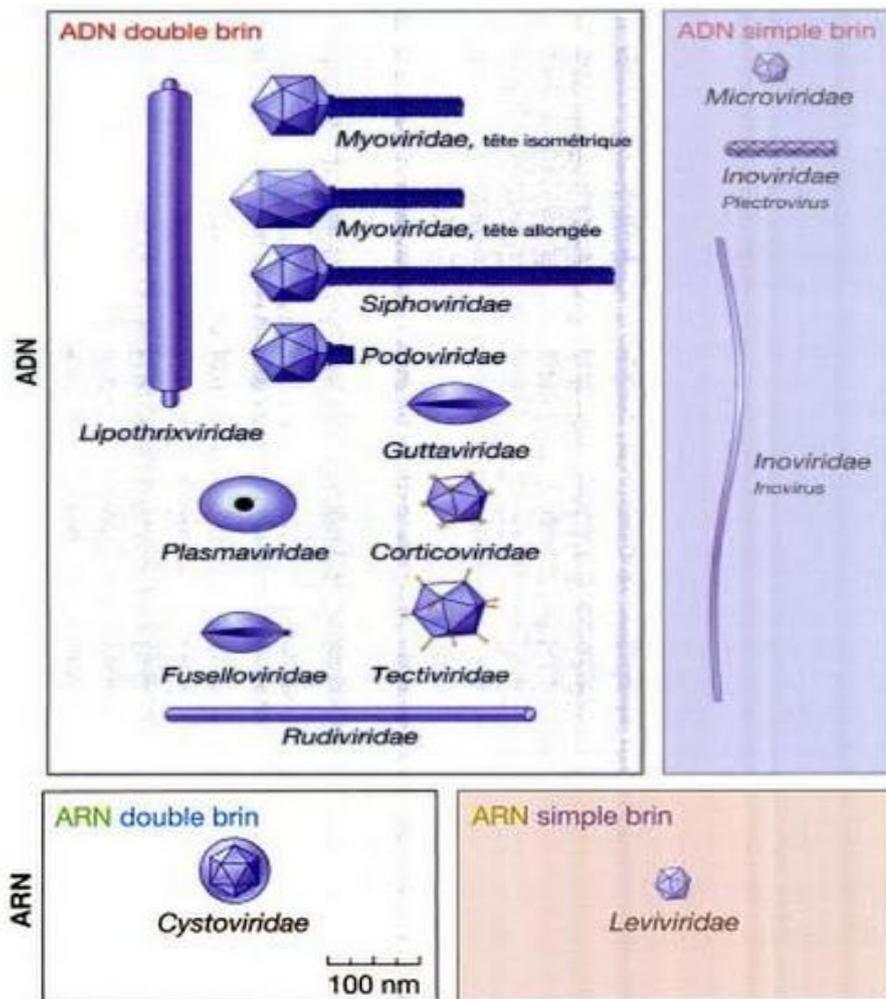


Figure 50: Les familles et genres de virus de procaryotes (Lansing et al., 2003).

3. Biologie des bactériophages :

La plupart des phages (comme le phage T4 qui infecte *E.coli*) n'ont qu'un cycle de vie lytique au cours duquel ils tuent leur cellule hôte en produisant leur descendance. De tels phages sont dits virulents. Quelques phages (comme le phage λ qui infecte *E.coli*) ont un cycle de vie lysogénique au cours duquel ils peuvent soit se camoufler temporairement et agir ainsi en phage tempéré (non virulent) soit entrer en cycle lytique.

3.1. Les cycles lytiques : exemple du phage T4 chez *E. coli*

La première étape dans le cycle de vie du phage T4 consiste en l'adsorption d'un virion sur un récepteur membranaire spécifique de la cellule hôte. Toute cellule dépourvue de ce récepteur serait protégée d'une infection par T4. Généralement, un type de phage ne peut infecter qu'une seule espèce de bactéries, et, dans certains cas, uniquement une ou plusieurs souches de cette espèce. Le nombre de types bactériens dans lesquels un phage peut réaliser son cycle lytique est appelé son spectre d'hôtes. Après adsorption, T4 injecte son ADN dans la cellule

hôte à travers sa queue. La capside phagique vide reste à l'extérieur de la bactérie, telle un fantôme. Une fois l'ADN phagique nu présent dans la cellule, les phages adoptent différentes stratégies pour produire les particules filles. Généralement, l'ADN phagique est transcrit par l'ARN polymérase de l'hôte en ARNm précoces. Plus tard, les ARNm seraient synthétisés par une ARN polymérase phagique traduite à partir d'un ARNm précoce; alternativement, l'ARN polymérase bactérienne serait modifiée afin de transcrire préférentiellement voire exclusivement les gènes du phage. Ces ARNm sont alors traduits en protéines enzymatiques, régulatrices et structurales. Les protéines régulatrices du phage contrôlent la cinétique d'expression de plusieurs gènes du phage. Les protéines structurales forment les têtes, queue et autres modules protéiques requis pour l'obtention de particules phagiques complètes. Les enzymes du phage assurent la production d'un grand nombre de génomes phagiques par réplication, certaines transcriptions, et même parfois la destruction de l'ADN de l'hôte.

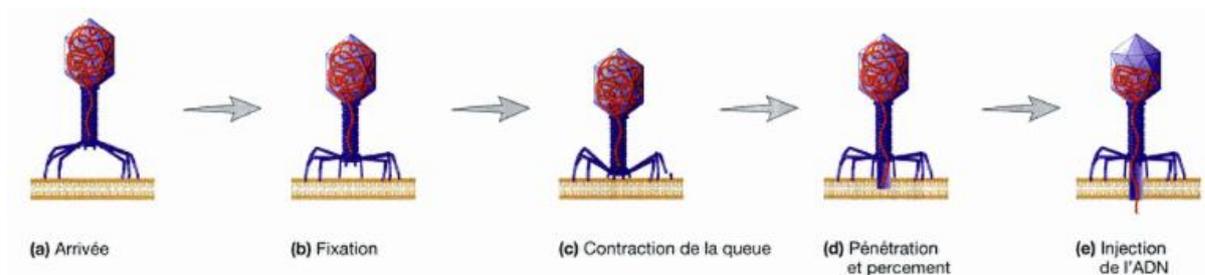


Figure 51: Adsorption et injection de l'ADN du bactériophage T4 (Lansing et al., 2003).

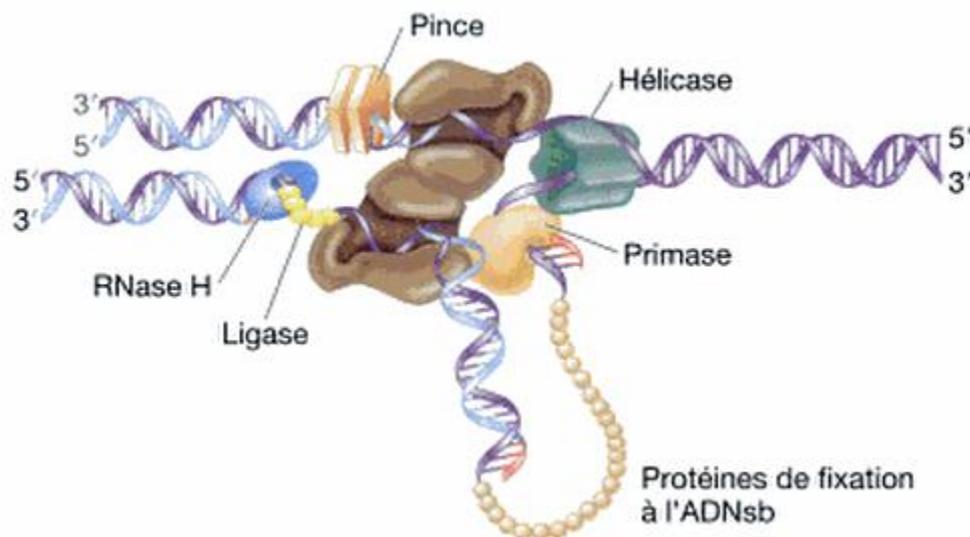


Figure 52: Un modèle de réplisome de T4 (Lansing et al., 2003).

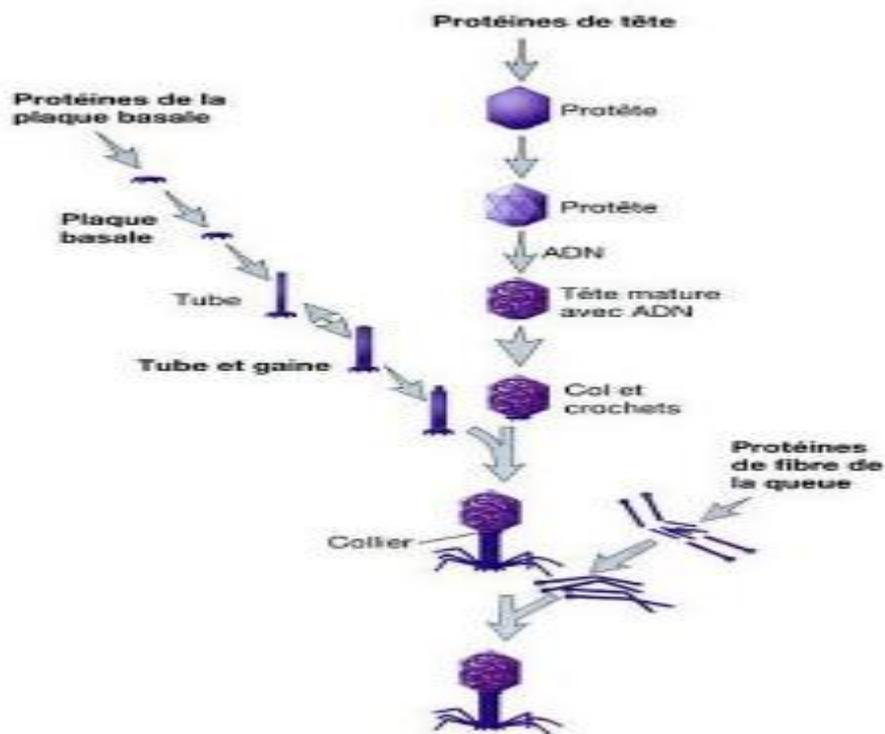


Figure 53: L'assemblage du bactériophageT4 (Lansing et al., 2003).

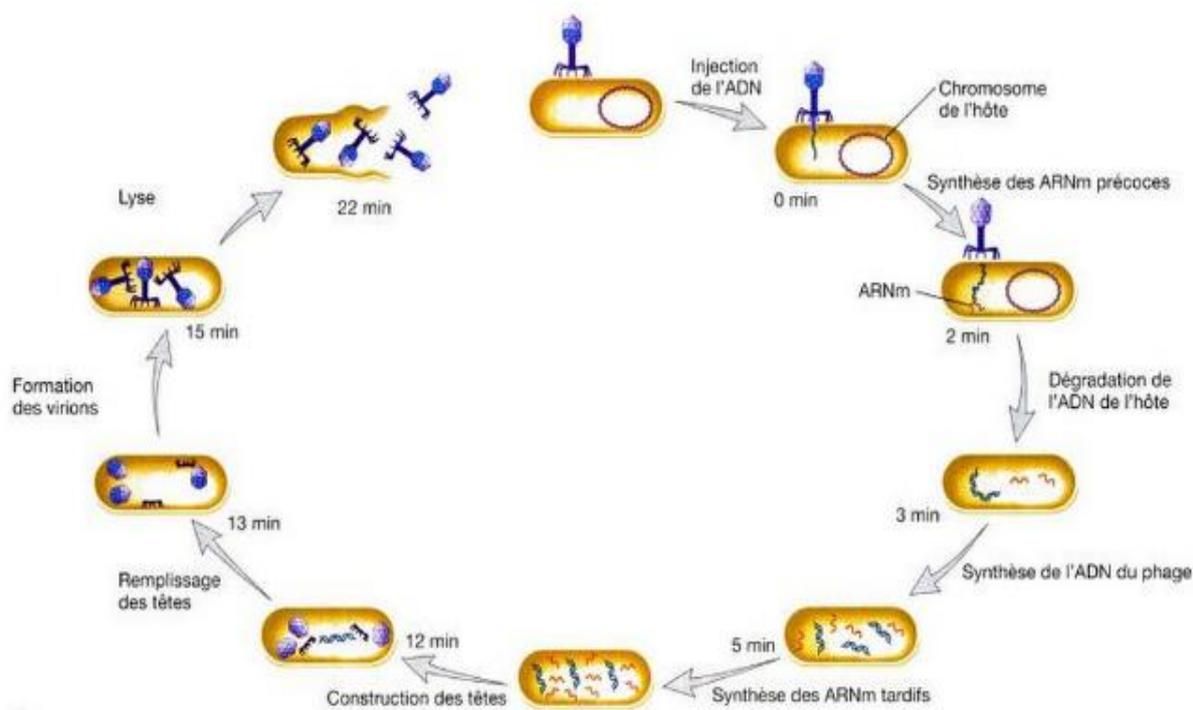


Figure 54: Cycle infectieux du bactériophageT4 (Lansing et al., 2003).

3.2. Les cycles lysogéniques (phage lambda λ d'*E.coli*)

Il existe deux types de cycles lysogéniques. Dans le cas le plus fréquent, dont l'exemple-type est le phage lambda (λ) d'*E.coli*, l'ADN phagique est intégré dans le chromosome de l'hôte. Dans l'autre cas, représenté par le phage P1 d'*E.coli*, l'ADN phagique ne s'insère pas dans le chromosome de l'hôte mais se réplique de manière synchrone avec lui, tel un plasmide. Lorsqu'il est intégré, l'ADN intégré porte le nom de prophage. La production d'un prophage λ intégré se réalise en 4 grandes étapes (exemple chez *E. coli* K12) :

- Injection de l'ADN phagique linéaire dans la bactérie-hôte puis circularisé par appariement des bases des extrémités redondantes ;
- Certains gènes phagiques précoces sont transcrits et traduits en quelques molécules d'un répresseur protéique et d'une intégrase (enzyme) le répresseur inactive alors la transcription de gènes phagiques;
- Intégration de l'ADN phagique au niveau d'un site spécifique du chromosome de l'hôte à l'aide de l'intégrase, donnant ainsi un prophage ;
- Survie et multiplication de la bactérie (pendant toute cette phase, le prophage est répliqué avec le chromosome de l'hôte).

Après infection par le phage λ , deux protéines sont synthétisées: le répresseur λ et la protéine *cro*. Le répresseur λ inhibe la transcription de la protéine *cro* et inhibe la transcription des autres protéines nécessaires à l'établissement du cycle lytique. La protéine *cro* bloque la transcription du gène codant le répresseur λ . L'évolution du système est donc tributaire du rapport de concentrations entre λ et *cro* : quand λ est fortement concentré, le cycle lysogène est maintenu; si la concentration de λ diminue et que celle de *cro* augmente, la bactérie entre en cycle lytique.

Le mécanisme par lequel une cellule infectée s'oriente vers un cycle lytique ou lysogénique n'est pas bien compris. De nombreux détails du cycle lysogénique du phage λ sont connus. Cependant deux conditions semblent favoriser l'établissement du cycle lysogénique d'un phage tempéré: l'élimination des substances nutritives du milieu et une forte multiplicité d'infection – c'est-à-dire, de nombreux phages adsorbés par une bactérie. Les phages ne peuvent réaliser un cycle lytique qu'au sein de bactéries ayant un métabolisme actif. Lorsque les substances nutritives sont éliminées, les bactéries dégradent leurs propres ARNm et protéines avant d'entrer en dormance. Lorsque les substances nutritives sont à nouveau disponibles, une bactérie dormante non infectée peut reprendre sa croissance. L'entrée en dormance d'une cellule infectée par un phage interrompt le cycle lytique ; celle-ci perd habituellement sa capacité à produire des phages et meurt. Mais, si la cellule peut être

lysogénisée, la bactérie et le phage peuvent survivre durant une période de dormance, et le potentiel de production de phages par induction persiste. Si une bactérie lysogénique subit des altérations au niveau de son ADN, il est avantageux pour le prophage de s'exciser du chromosome bactérien, entrer en cycle lytique, produire une descendance phagique puis quitter la cellule. Ce processus est nommé induction du prophage.

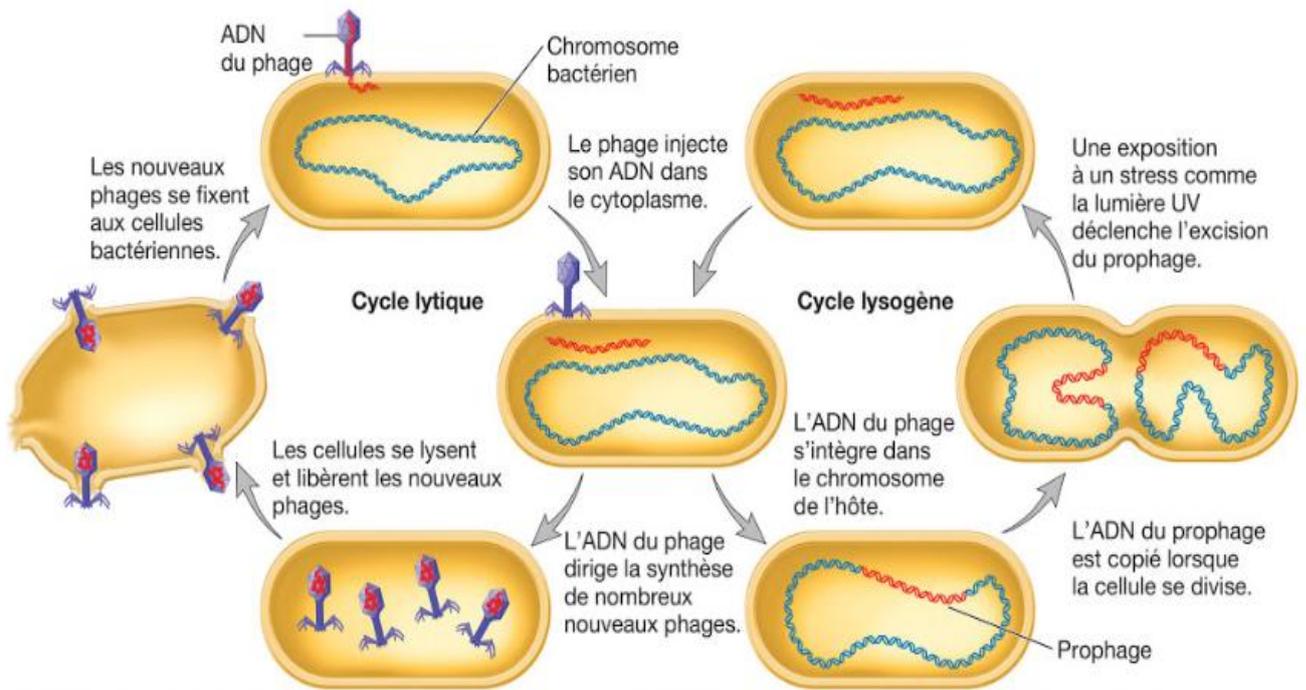


Figure 55: Cycle lytique et cycle lysogénique des bactériophages (Lansing et al., 2003).

3.3. Influence de la composition membranaire cellulaire des bactéries (à gram-positif et négatif) sur le type de bactériophage qui peut s'y attacher :

- ✓ La membrane externe des bactéries à gram-négatif augmente la perméabilité de la bactérie en raison de la présence des nombreux canaux de transport formés par des protéines. Aussi, on retrouve dans la membrane externe, des lipopolysaccharides (LPS), qui sont exclusifs aux bactéries à gram-négatif. Les protéines canaux de transport et les LPS sont les deux types de récepteurs qui sont reconnus par les phages spécifiques aux bactéries à gram-négatif. Certains phages vont interagir avec les LPS, d'autres avec les récepteurs protéiniques des canaux de transport et certains vont interagir avec les deux composantes.
- ✓ La structure de la paroi cellulaire des bactéries à gram-positif diffère de la structure retrouvée chez les bactéries à gram-négatif. 40 à 90% de la paroi cellulaire est

composée de peptidoglycane. Un type de molécule intégré au peptidoglycane est l'acide téichoïque. L'acide téichoïque traverse de manière perpendiculaire la membrane plasmique. Les phages spécifiques aux bactéries à gram-positif utilisent généralement une des composantes du peptidoglycane, comme l'acide téichoïque, comme récepteurs.

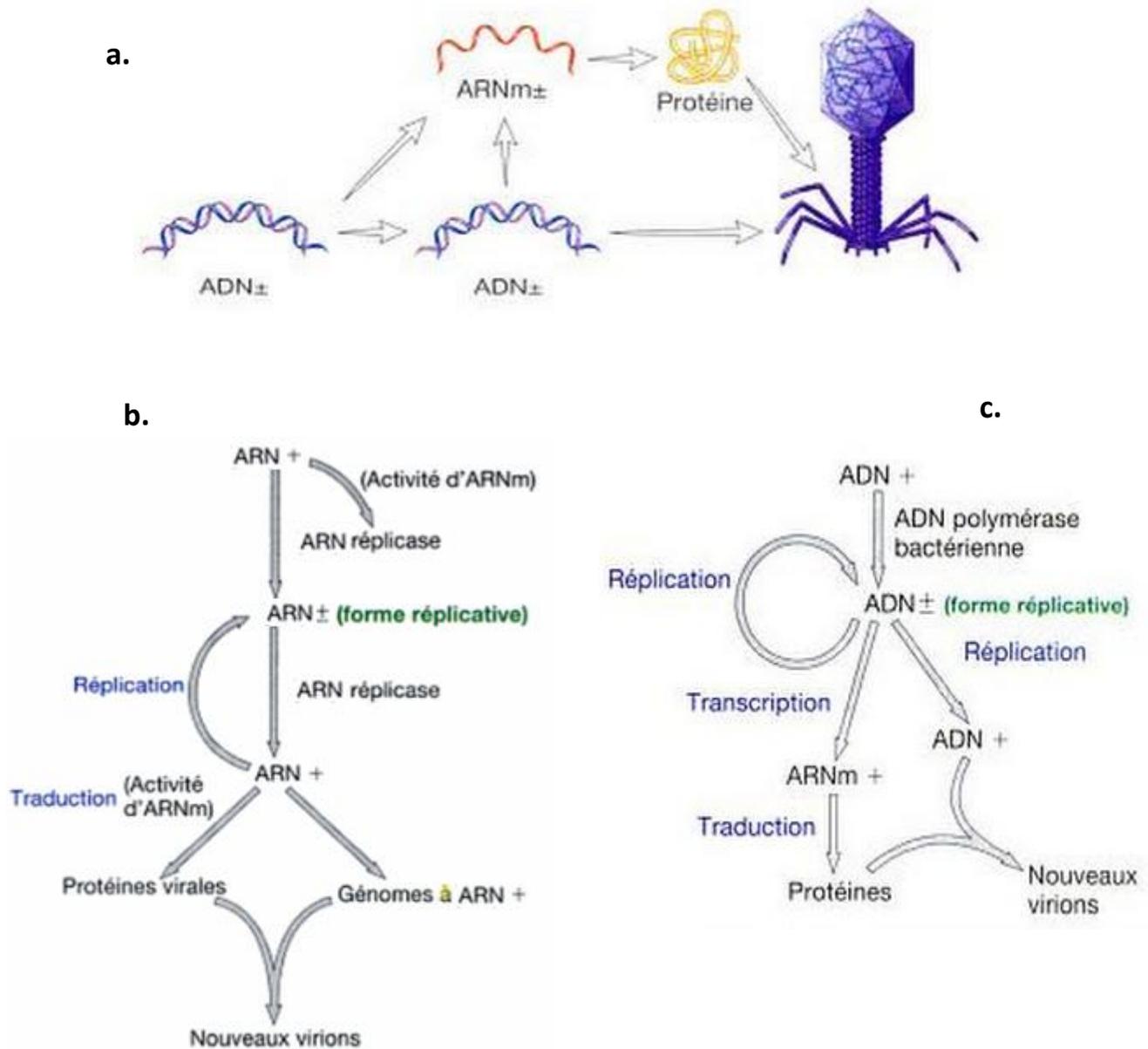


Figure 56: Multiplication des bactériophages (Lansing et al., 2003).

a. bactériophages à ADN_{\pm} ; b. bactériophages à $ARN+$; c. bactériophages à $ADN+$

Bibliographie

1. Amrani F. 2016. Génétique moléculaire.
2. Bakri Y. 2013. Cours de Virologie (Module de Biologie Humaine). Université Mohammed V-Agdal. Maroc.
3. Benjamin L. 1998. Gènes VI. Traduction de la 6^{ème} édition anglaise par Chrystelle Sanlaville. De Boeck. Paris.
4. Cain, Damman, Lue, Yoon. 2006. Découvrir la Biologie. Edition De Boek Université. Paris.
5. Clark D. 2005. Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution. Southern Illinois University. USA Elsevier Academic Press.
6. David C.G. 2016. Fascicule II de cours en Biologie Générale. 1ere année Bachelier en Sciences Biologiques et en Sciences Chimiques. Université de Mons.
7. Don G, Leesa B, Jean B, Anita C, Eric G, Donna M, Grace P, Adrienne M. 2002. BIOLOGIE 11
8. Eduardo D. P. De Robertis, E. M. F. De Robertis. 1983. Biologie cellulaire et moléculaire. Presses Université Laval. Paris
9. Eisenstein B, Medoff G, Schaechter M. 1999. Microbiologie et pathologie infectieuse. 1^e Ed. Edition De Boek Université. Paris.
10. Florian H., Gerdlinden M., Christian G., Isabelle M., Silke B., Nadine S., Birgit M. 2005. Biochimie humaine .édition Flammarion.
11. Gabrielle B. 2015. Évaluation de l'utilisation des bactériophages anti-staphylococcus aureus pour l'assainissement de surfaces. Mémoire de maîtrise ès sciences appliquées (génie biomédical). Université de montréal. Canada.
12. Gaillardin C et Tinsley C.R. 2007. Fascicule de cours en Génétique moléculaire. 1^{ère} année cursus ingénieur agronome. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement. Paris.
13. Garret R.H. et Grisham C.M.. 2000. Biochimie. Traduction de la 2^{ème} édition américaine par Bernard Lubochinsky. De Boeck. Paris.
14. Geoffrey M. Cooper. 1999. La cellule: Une approche moléculaire. De Boeck. Paris.
15. Griffiths. J. F., Susan R. Wessler, Sean B. Carroll, John Doebley. 2013. Introduction à l'analyse génétique. Edition De Boek Université. Paris.
16. Gwénaëlle C. 2009. Caractérisation des sites d'insertion du transposon marinier Mos1. Thèse doctorat. Université François - Rabelais De Tours.
17. Hames B, Hooper N et Houghton J. 2000. L'essentiel en biochimie. Ed. Berti – Paris.
18. Hartl D. L. et Jones E. W. 2003. Génétique, les grands principes, Dunod, Paris.

19. Housset C. et A. Raisonier. 2006. Biologie Moléculaire. Biochimie PCEM1 Université Paris VI.
20. Jacqueline E, Eric C, Sophie C et François M. 2001. Biochimie, génétique, biologie moléculaire. Ed. Masson – Paris.
21. Lansing M. Prescott, John P. Harley et Donald A. Klein. 2003. Microbiologie. De Boeck. Paris.
22. Lionnet T et Croquette V. 2005. Introduction à la Biologie Moléculaire
23. Lodish H, Darnell J et Baltimore D. 1989. La cellule: Biologie Moléculaire. Edition VIGOT. Bibliothèque national du Québec-Canada.
24. Mammeri H. 2016. Génome bactérien et mécanismes de variabilité génétique. (<http://1.21-bal.com/doc/5436/index.html>)
25. Madigan M et Martinko J. 2007. Biologie des microorganismes. 11e Ed. Pearson Education- Paris-France.
26. Melki R. 2015. Fascicule de cours de Génétique II (Génétique moléculaire) ; Filière SVI- semestre S5. Université Mohamed I. Faculté des Sciences. Département de Biologie Oujda.
27. Merlin C et Ariane T. 1999. Les éléments transposables bactériens. Société Française de Génétique. m/s n° 8-9, vol. 15
28. Ozoux B. 2013. *Xeroderma pigmentosum*, actualisation des connaissances sur la maladie et les traitements associés. Thèse du doctorat en pharmacie. UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
29. Prescott M. L, Harley J. P et Klein D. A. 2007. Microbiologie. 2^e Ed. Edition De Boek Université. Paris.
30. Raven De Peter H, Kenneth A Mason, Georges B Johnson, Jonathan B Losos, Susan R Singer. 2017. Biologie. 11^e. Edition De Boek Université. Paris.
31. Serre J.L. 2006. Génétique : Rappels de cours, exercices et problèmes corrigés, 3^e édition, Dunod. Paris.
32. Susan E, William S. 2003. Génétique. Ed. Ediscience (4^eme édition). Dunod – Paris.
33. Turner P, Melennan A, Bates A et White M. 2000. L'essentiel en biologie moléculaire. Ed. Berti – Paris.
34. Verron B. 2015. Cycle lytique et cycle lysogénique des bactériophages. [Illustration]. Tiré de <http://www.microbiologie-medicale.fr/virologie/untitled39.jpg>
35. Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M et Losick R. 2009. Biologie Moléculaire du gène. 6^e Ed. Pearson Education- Paris-France.
36. Willey Joanne M, Linda M Sherwood, Christopher J Woolverton. 2017. Microbiologie. Edition De Boek Université. Paris.
37. Winter P, Hickey G et Fletcher H. 2000. L'essentiel en génétique. Ed. Berti – Paris.