

## MODULE : GENETIQUE GENERALE ET MOLECULAIRE

### VI. GENETIQUE BACTERIENNE

#### Analyse génétique chez les bactéries

Le matériel génétique peut être transféré d'une bactérie à une autre par trois façons: la transformation, la conjugaison et la transduction. Dans tous les cas: (1) le transfert est unidirectionnel; (2) contrairement aux eucaryotes, aucun vrai zygote diploïde n'est formé; et (3) seuls les gènes inclus dans le chromosome circulaire sont hérités d'une manière stable. De ce fait, il est possible de cartographier les gènes bactériens par l'utilisation de l'une de ces méthodes.

Parmi les bactéries, *Escherichia coli* est largement utilisée en analyse génétique. Elle est retrouvée communément dans l'intestin de la plupart des animaux, y compris l'homme. Cette bactérie est très facile à étudier par des techniques microbiologiques du moment qu'elle peut être cultivée dans un milieu simple et défini. *E coli* peut être cultivée aussi bien en milieu liquide qu'en milieu solide sur support d'agar. Typiquement, l'analyse génétique des bactéries est réalisée par ensemencement des cellules sur milieu solide. Lorsqu'une bactérie se trouve en contact avec la surface de l'agar, elle va pousser et se diviser jusqu'à aboutir à la formation d'une entité visible constituée de cellules génétiquement identiques: la **colonie**.

La composition du milieu de culture utilisé dépend de l'expérience et des génotypes des souches bactériennes. Chaque souche bactérienne (ou microorganisme comme les levures) possède un **milieu minimum** (MM) caractéristique sur lequel elle pousse. Le milieu minimum contient les ingrédients de base permettant à la bactérie de synthétiser toutes les molécules (les acides aminés, les vitamines et les précurseurs de l'ADN et l'ARN) nécessaires pour la croissance et la reproduction. Un **milieu complet**, par contre, contient tous les éléments nécessaires pour la bactérie.

L'analyse génétique des bactéries repose sur l'étude de mutants ayant des déficiences dans leur capacité à synthétiser une ou plusieurs molécules essentielles à leur croissance. Les souches incapables de subvenir à leurs besoins en ingrédients vitaux sont appelées des **auxotrophes** (mutants auxotrophes, mutants nutritionnels ou mutants biochimiques). Une souche de type sauvage et qui est donc capable de synthétiser tout ce dont elle a besoin est dite **prototrophe**; celle-ci n'a besoin d'aucun supplément dans son milieu de culture.

Dans des expériences de génétique avec les microorganismes comme *E. coli*, les croisements sont réalisés entre des souches ayant des génotypes (et donc des phénotypes) différents et la progéniture est analysée pour la présence de phénotypes parentaux et recombinants. Dans le cas où des mutations auxotrophes sont prises en considération, la détermination des phénotypes des parents et de la progéniture est réalisée en testant les colonies pour leur exigence nutritionnelle. La procédure de choix qui peut être utilisée pour ces tests est la méthode des boîtes répliques. Cette technique consiste en l'ensemencement d'une culture bactérienne (par exemple après croisement de deux souches) sur un milieu complet. Après incubation, des colonies vont se former là où sont positionnées les cellules bactériennes. Les colonies ainsi formées sont ensuite transférées sur du velours afin de reproduire la même distribution que sur la boîte original. Des boîtes répliques sont alors créées en pressant le velours contre des boîtes de Pétri contenant des milieux sélectifs. Si une nouvelle boîte contient le milieu minimum uniquement, seules les bactéries prototrophes pourront survivre. Ainsi, en comparant les différentes boîtes répliques par rapport à la boîte mère, il est possible d'identifier des mutants auxotrophes et par conséquent leurs génotypes.

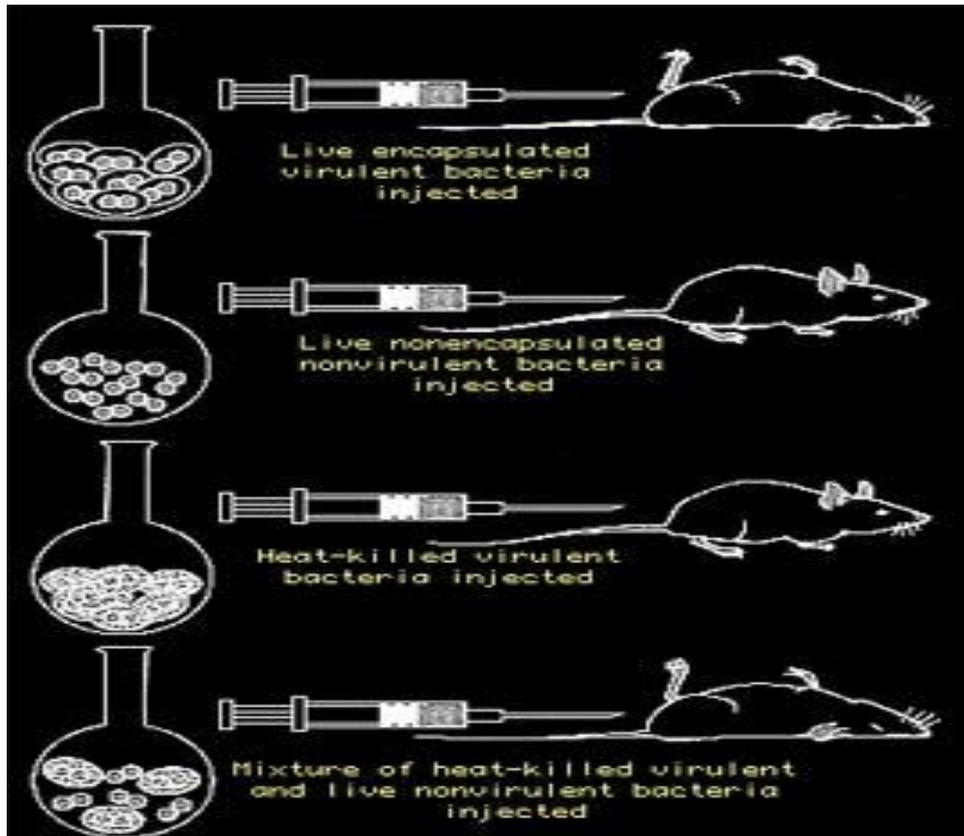
## **VI.1. La transformation**

La transformation est le transfert passif d'ADN d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice, dite en état de compétence. Le transfert, qui est partiel et limité à quelques espèces bactériennes, entraîne l'acquisition par la bactérie réceptrice de nouveaux caractères génétiques stables et transmissibles.

### **VI.1.1. Découverte de la transformation.**

En 1928, Frederick Griffith démontre que l'inoculation sous-cutanée à la souris d'un mélange de pneumocoques capsulés (virulents) tués par la chaleur et de pneumocoques non capsulés (non virulents) vivants, entraîne une septicémie mortelle à pneumocoques capsulés vivants (Figure 1). Il y a donc eu transformation ou «réversion» des pneumocoques non capsulés (R) en pneumocoques capsulés (S). La transformation est plus facile lorsque les pneumocoques non capsulés vivants et les pneumocoques capsulés tués sont du même sérotype.

En 1944, Avery MacLeod et McCarty démontrent que le «principe transformant» est l'ADN bactérien. Ils réussissent à reproduire *in vitro* la transformation en présence d'ADN fortement polymérisé. L'activité transformante est perdue en présence d'une désoxyribonucléase.



**Figure 1:** Représentation schématique de l'expérience de Griffith sur les souris.

### VI.1.2. Caractères de la transformation.

La transformation naturelle ou physiologique exige l'état de compétence qui n'apparaît qu'à certains stades de la division cellulaire et seulement chez une fraction de la population bactérienne. La transformation artificielle est précédée du traitement chimique ou enzymatique de la paroi bactérienne avant sa mise en contact avec l'ADN.

La transformation naturelle peut être observée chez un nombre très limité d'espèces bactériennes à Gram positif (*Streptococcus* et *Bacillus*) ou à Gram négatif (*Neisseria*, *Branhamella*, *Acinetobacter*, *Haemophilus*). Elle se produit selon les phases suivantes: apparition de l'état de compétence, fixation puis pénétration et intégration de l'ADN donneur dans le génome de la bactérie réceptrice. Chez les bactéries à Gram positif, les

différentes phases mettent en jeu un activateur spécifique d'espèce, excrété par la bactérie et qui se fixe à la surface de la bactérie. Il y a ensuite synthèse d'une protéine fixatrice de l'ADN, d'une autolysine et une endonucléase. L'ADN fixé est ensuite partiellement hydrolysé puis converti en un fragment monocaténaire.

Les bactéries transformables sont capables de fixer des ADN de multiples sources mais ne sont capables de former des recombinaisons génétiques que si la bactérie donatrice et la bactérie réceptrice sont génétiquement très proches. Cette relative spécificité est liée au fait que l'appariement qui se produit avant la recombinaison exige une étroite homologie des séquences nucléotidiques endogènes et exogènes.

Chez les bactéries à Gram négatif, l'état de compétence est aussi en relation avec la synthèse d'un activateur de paroi qui est excrété par la bactérie à la phase exponentielle de croissance (*H. influenzae*) ou à la phase stationnaire (*Acinetobacter*). L'ADN donneur se fixe sur la paroi au niveau de sites récepteurs, dans des conditions strictes de métabolisme cellulaire, de pH, de température et d'osmolarité.

Bien que la transformation ne permette que le transfert d'une petite fraction du génome bactérien (<1 %), soit d'efficacité relative (la fréquence de transfert est de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-6}$ ) et soit limitée à quelques espèces bactériennes, elle est d'un grand intérêt théorique et pratique. Elle a permis de comprendre le mécanisme de la synthèse de la capsule, le contrôle génétique de la résistance aux antibiotiques, l'établissement de cartes génétiques, etc... Elle joue un rôle important dans l'évolution vers la résistance du pneumocoque ( $\beta$ -lactamines). Grâce à la transfection, qui est la possibilité d'infecter des bactéries par des ADN ou des ARN viraux, on a pu démontrer l'universalité du code génétique en 1961.

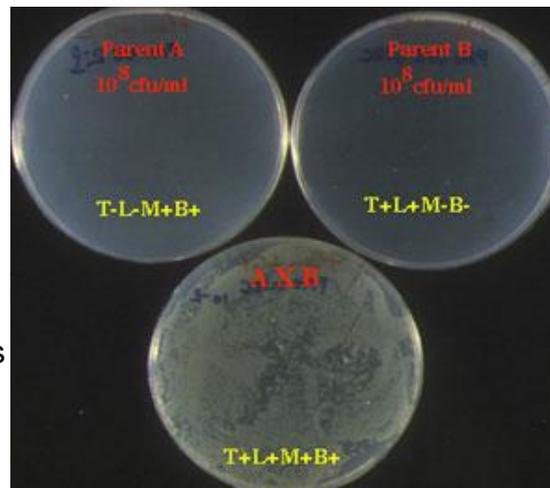
## **VI.2. La conjugaison**

La conjugaison est un transfert d'ADN entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice, qui nécessite le contact et l'appariement entre les bactéries, et repose sur la présence dans la bactérie donatrice ou mâle d'un facteur de sexualité ou de fertilité (facteur F). Celui-ci permet la synthèse de pili sexuels et donne la polarité au chromosome. Le transfert d'ADN chromosomique qui est à sens unique, orienté, progressif et quelquefois total, a beaucoup de similitudes avec le transfert d'ADN extra-chromosomique (plasmidique).

### VI.2.1. Mise en évidence de la conjugaison

La découverte de la transformation chez le pneumocoque et la possibilité d'obtenir des mutants auxotrophes (incapables de faire la synthèse d'un métabolite essentiel) ont suscité des recherches sur la recombinaison génétique chez les bactéries. L'expérience de Lederberg et Tatum (1946) (Figure 2) est à l'origine de la découverte de la conjugaison. Dans un milieu de culture liquide, ces auteurs ont mélangé deux types de mutants auxotrophes d'*E. coli*, d'une part des mutants exigeants seulement en thréonine (T<sup>-</sup>) et en leucine (L<sup>-</sup>) et, d'autre part, des mutants exigeants seulement en méthionine (M<sup>-</sup>) et biotine (B<sup>-</sup>). Après plusieurs heures de contact entre les mutants T<sup>-</sup> L<sup>-</sup> M<sup>+</sup> B<sup>+</sup> et les mutants T<sup>+</sup> L<sup>+</sup> M<sup>-</sup> B<sup>-</sup>, Lederberg et Tatum ont isolé des *E. coli* T<sup>+</sup> L<sup>+</sup> M<sup>+</sup> B<sup>+</sup> (environ 100 pour 10<sup>8</sup> *E. coli*). La recombinaison s'était produite avec une faible fréquence (10<sup>-6</sup>) et exigeait en plus le contact entre les deux types de mutants auxotrophes.

J. LEDERBERG et E. TATUM en 1946 mélangèrent dans un milieu liquide, 2 mutants polyauxotrophes d'*E. coli* K12: 10<sup>8</sup> T-L-M+B<sup>+</sup> et 10<sup>8</sup> T+L+M-B<sup>-</sup> (exigence en thréonine, T<sup>-</sup> ; leucine, L<sup>-</sup> ; méthionine, M<sup>-</sup> et biotine B<sup>-</sup>). Après plusieurs heures de contact, l'étalement de 10<sup>8</sup> bactéries sur un milieu synthétique 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<sup>+</sup> L<sup>+</sup> M<sup>+</sup> B<sup>+</sup>. Il ne pouvait s'agir de mutants doublement réverses (probabilité de l'ordre de 10<sup>-14</sup>) mais de recombinants.



**Figure 2** : Expérience de conjugaison mettant en œuvre le croisement entre deux bactéries auxotrophes

### VI.2.2. Caractères de la conjugaison

#### VI.2.2.1. Spécificité

Le transfert d'ADN chromosomique par conjugaison ne se produit qu'entre bactéries d'une même espèce (*spécificité*), et surtout chez les bactéries à Gram négatif telles que les entérobactéries (*E. coli*, *Salmonella*...et *Pseudomonas aeruginosa*). Le transfert d'ADN extra-chromosomique (plasmide) est en revanche plus répandu parmi les espèces bactériennes et est moins spécifique d'espèce.

#### **VI.2.2.2. Différentiation sexuelle**

Le transfert, qui est à sens unique (bactérie donatrice-bactérie réceptrice) repose sur la présence chez la bactérie donatrice du facteur sexuel ou facteur de fertilité (F) à laquelle il confère la polarité ou le caractère mâle (F<sup>+</sup>). Le facteur sexuel est le premier plasmide connu. L'information génétique qu'il porte code pour la biosynthèse de pili sexuels, pour son insertion possible dans le chromosome bactérien et pour la mobilisation (le transfert) de ce dernier vers des bactéries réceptrices (F<sup>-</sup>).

#### **VI.2.2.3. Contact ou appariement**

Le transfert chromosomique n'est possible qu'après appariement par couple des bactéries donatrice et réceptrice. Il fait d'abord intervenir les pili sexuels (2 à 3 par bactérie F<sup>+</sup>) qui reconnaissent par leurs extrémités les zones de contact à la surface des bactéries F<sup>-</sup> et s'y fixent puis se rétractent en rapprochant les deux types de bactéries. Ils permettent ainsi leur contact et la formation d'un pont cytoplasmique de 100 à 300 mμ par lequel va s'opérer le transfert chromosomique.

#### **VI.2.2.4. Transfert de l'ADN**

Le pont cytoplasmique formé, le transfert génétique peut commencer. Il ne porte d'abord que sur un brin d'ADN, ce qui permet de restaurer l'intégrité du génome de la bactérie donatrice par un processus de réplication asymétrique. Ce processus de réplication asymétrique a lieu tout près du pont cytoplasmique et met en jeu un site réplicateur spécifique. Le transfert du brin d'ADN est à sens unique, orienté, progressif, quelquefois total. Il dure alors une centaine de minutes à 37°C. Son interruption artificielle par agitation mécanique permet de déterminer la séquence des gènes transférés et d'établir la carte chromosomique.

#### **VI.2.2.5. Caractères chromosomiques transférés**

Tous les caractères codés par le chromosome (c'est-à-dire tous les gènes) peuvent être transférés. En effet, le facteur F peut être intégré dans le chromosome bactérien à certains sites. Dans cette position il permet le transfert de gènes chromosomiques proches de ces sites d'une bactérie à une autre mais ne transfère que rarement le facteur lui-même. Le facteur F peut rester autonome dans le cytoplasme. Dans cette position il ne transmet à la bactérie réceptrice que le facteur F mais pas de gène chromosomique. Lors du passage de l'état intégré à l'état autonome, le facteur F peut emporter avec lui des gènes bactériens. Le résultat en est un plasmide F' qui contient ces gènes et capable

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

#### VI.2.2.6. Découverte des souches bactériennes HFR

Les bactéries Hfr (haute fréquence de recombinaison) ont été découvertes pour la première fois par Cavali-Sforza. Après plusieurs repiquages, il reprend une colonie sensée être F<sup>+</sup> pour un croisement. Après étalage et à sa grande surprise, il obtient presque un tapis bactérien, c'est-à-dire de F<sup>-</sup> recombinantes. Le taux de transfert est de l'ordre de 10<sup>-4</sup>, donc multiplié par 100. Il appelle cette souche Hfr-C. Quand il refait le croisement précédent (Hfr x F<sup>-</sup> [str<sup>R</sup>]), il ne constate aucun transfert de F<sup>+</sup>, ce qui est contradictoire.

F<sup>+</sup> x F<sup>-</sup> gènes transférés # 10<sup>-7</sup>  
F infectieux

Hfr x F<sup>-</sup> gènes transférés # 10<sup>-4</sup>  
F = jamais

En fait, le facteur F est parfois transféré si la conjugaison dure 90 à 100 minutes.

Etude de la liaison génétique:

Soit le croisement Hfr (a<sup>+</sup>, b<sup>+</sup>, c<sup>+</sup>, d<sup>+</sup>, str<sup>S</sup>) x F<sup>-</sup> (a<sup>-</sup>, b<sup>-</sup>, c<sup>-</sup>, d<sup>-</sup>, str<sup>R</sup>)

On laisse le croisement se faire pendant 40 minutes, puis on étale sur milieu minimum + streptomycine et sélectif pour a. On récupère des colonies F<sup>-</sup> (a<sup>±</sup>, b<sup>±</sup>, c<sup>±</sup>, d<sup>±</sup>, str<sup>S</sup>), puis on fait des répliques appropriées afin de sélectionner successivement b, c et d.

On constate qu'on obtient toujours les mêmes pourcentages quel que soit le nombre de fois où on réalise l'expérience.

Exemple : On réalise le croisement suivant :

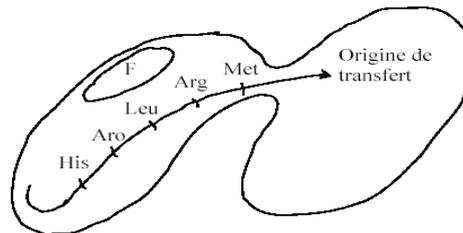
Hfr (met<sup>+</sup>, arg<sup>+</sup>, leu<sup>+</sup>, aro<sup>+</sup>, his<sup>+</sup>, str<sup>S</sup>) x F<sup>-</sup> (met<sup>-</sup>, arg<sup>-</sup>, leu<sup>-</sup>, aro<sup>-</sup>, his<sup>-</sup>, str<sup>R</sup>).

Après 70 minutes de conjugaison, on étale sur un milieu minimum additionné de streptomycine, leucine, acides aminés aromatiques, histidine et arginine. On sélectionne donc les colonies F<sup>-</sup> (met<sup>+</sup>, str<sup>R</sup>) et on fait des repiquages.

Les résultats sont les suivants :

Met 100%, arg 60%, leu 50%, aro 20%, his 4%.

Si on refait le même croisement en parallèle, on obtient quasiment les mêmes pourcentages ; ces pourcentages révèlent, en réalité, l'ordre de transfert des gènes. On conclut que les gènes sont localisés dans la même région et qu'ils sont transférés à partir d'une même origine (Figure 3).



**Figure 3** : Transfert de gènes à partir d'un point d'origine

Du moment qu'il faut 90 minutes pour transférer le facteur F, on conclut qu'il est transféré en dernier. Le problème est qu'entre Hfr-C et Hfr-H on obtient des résultats différents. Du fait que l'ordre de transfert est différent, on en déduit que l'origine de transfert est aussi différente. Quelque temps plus tard, Jacob et Wollman ont étudié la souche Hfr-H tout en présentant les résultats d'une façon complètement différente : Ils ont entrepris des études de cinétique de conjugaison interrompue en réalisant le croisement suivant :

$Hfr (azi^R, T_1^R, lac^+, gal^+, str^S) \times F^- (azi^S, T_1^S, lac^-, gal^-, str^S)$ .

Chaque minute, 1 ml de milieu de co-culture est prélevé et bien agité afin de casser les ponts cytoplasmiques des bactéries en train de conjuguer. Les différents prélèvements sont étalés sur des boîtes différentes:

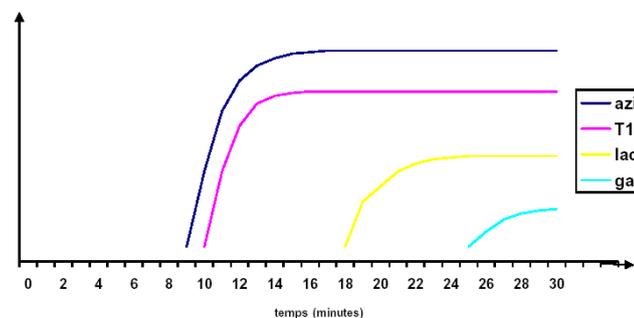
M + str + azi pour sélectionner les bactéries  $F^- (azi^R, str^R)$

M + str + T1 pour sélectionner les bactéries  $F^- (T_1^R, str^R)$

M (lactose) + str pour sélectionner les bactéries  $F^- (lac^+, str^R)$

M (galactose) + str pour sélectionner les bactéries  $F^- (gal^+, str^R)$

Résultats : (voir figure 4)



**Figure 4** : Ordre de transfert de gènes

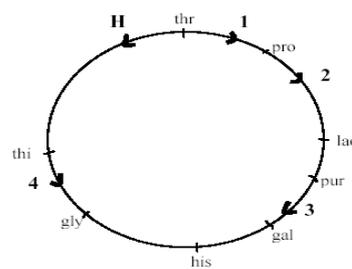
Donc la distance entre azi et l'origine de transfert est de 9 minutes de conjugaison. De cette façon, on peut évaluer les distances entre tous les gènes du chromosome bactérien. Cette méthode, tout en confirmant les résultats précédents, donne une cartographie très précise. En plus, le facteur F est transféré en dernier, après 90 à 100 minutes de conjugaison. C'est le temps nécessaire pour transférer tout le génome.

Chez *E. coli*, il y a  $4,2 \cdot 10^6$  paires de bases, ce qui correspond à une vitesse de transfert de 40000 pb/min. On notera qu'un gène d'*E. coli* mesure environ 1000 à 5000 pb, donc en une minute, il peut passer 8 à 40 gènes. Par conséquent, cette méthode est peu précise.

Considérons maintenant le croisement: Hfr x F<sup>-</sup> (thr<sup>-</sup>, pro<sup>-</sup>, lac<sup>-</sup>, pur<sup>-</sup>, gal<sup>-</sup>, his<sup>-</sup>, gly<sup>-</sup>, thi<sup>-</sup>) qui a donné les résultats suivants :

- Hfr-H      O thr pro lac pur gal his gly thi F
- Hfr-1      O thr thi gly his gal pur lac pro F
- Hfr-2      O pro thr thi gly his gal pur lac F
- Hfr-3 (C)   O pur lac pro thr thi gly his gal F
- Hfr-4      O thi thr pro lac pur gal his gly F

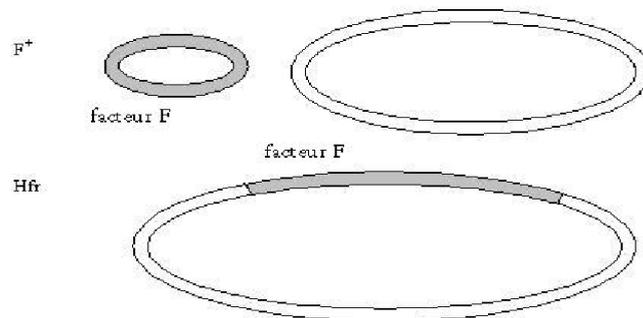
Ces résultats indiquent que le génome de *E. coli* est circulaire (Figure 5). Même si les origines de transfert sont différentes, les séquences sont identiques, mais coupées à des endroits différents. Ceci prouve que le facteur F, en s'insérant à des endroits spécifiques mais variables du chromosome circulaire bactérien, aide à créer des souches Hfr différentes à partir d'une même souche F<sup>+</sup>.



**Figure 5:** Transfert de gènes à partir de plusieurs points d'origine du chromosome circulaire

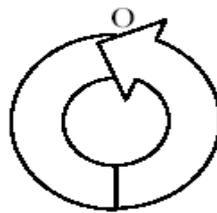
Cependant on ne sait toujours pas ce qu'est le facteur de fertilité. Même s'il adopte une position variable dans le génome, il se place toujours à côté de l'origine de transfert. Dans les souches F<sup>+</sup>, le transfert est très facile parce que le facteur F est hors du génome. Cette énigme a été résolue par Campbell qui a émis l'hypothèse suivante: Le

facteur F est une molécule d'ADN circulaire qui peut interagir avec le chromosome de *E. coli* pour donner naissance à une souche Hfr (Figure 6).

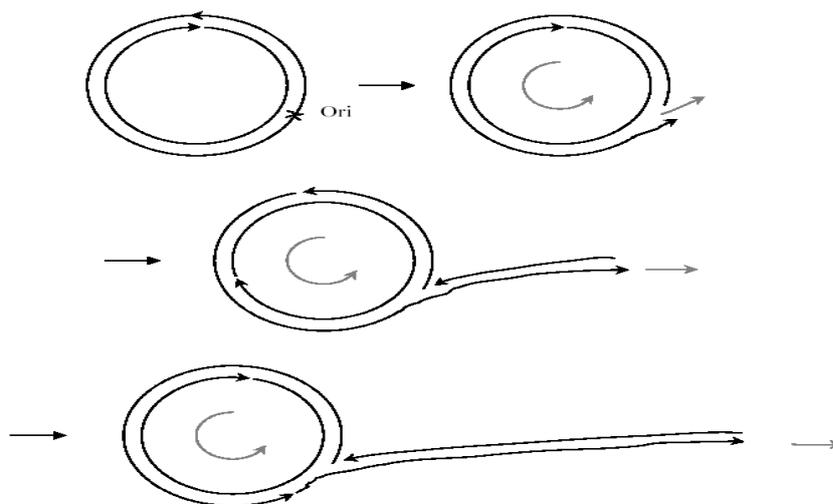


**Figure 6** : Apparition de souches HFR à partir de souches F<sup>+</sup>

En effet, le transfert ne concerne que le facteur F, mais dans une souche Hfr il entraîne tout le génome. Le facteur F contient des gènes ayant un rôle crucial dans la conjugaison. Mais pourquoi le facteur F est-il transféré en dernier ? Il possède l'origine de transfert.



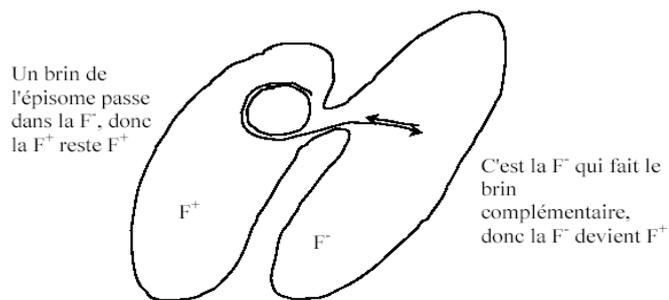
Donc le facteur F passe de F<sup>+</sup> à F<sup>-</sup>. Le mode de réplication est celui du « cercle tournant » (Figure 7).



**Figure 7** : Transfert de gène suivant le modèle de réplication par cercle tournant

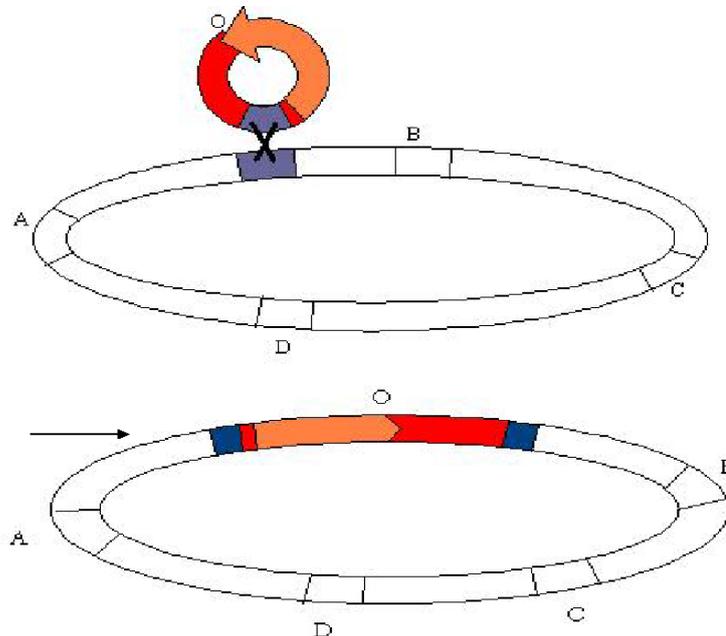
Ce modèle de réplication peut continuer durant un temps prolongé jusqu'à former des concatamères qui seront ensuite séparés par une endonucléase (Ce mode de réplication est aussi utilisé par les virus, notamment les bactériophages T<sub>4</sub> et Lambda (λ)).

Un seul brin du facteur F passe de la souche F<sup>+</sup> vers la souche F<sup>-</sup>. C'est la souche F<sup>-</sup> qui synthétise le brin complémentaire (Figure 8) et devient ainsi F<sup>+</sup> alors que la souche originale F<sup>+</sup> reste telle qu'elle était, c'est à dire F<sup>+</sup>.



**Figure 8** : Synthèse du brin complémentaire par la bactérie F<sup>-</sup>

L'intégration du facteur F dans le génome bactérien nécessite obligatoirement la présence de séquences homologues permettant une recombinaison homologue, comme illustré dans la figure 9 ci-dessous.



**Figure 9** : Intégration du facteur F par recombinaison homologue

Dans ce cas, l'ordre de transfert est : A, B, C, D.

Le facteur F est toujours transféré en dernier car il est coupé en deux, et pour qu'il passe en entier il faut que toute la molécule soit passée.

Sur le chromosome bactérien, il existe plusieurs séquences d'intégration pour le facteur F. On peut donc former autant de souches Hfr qu'il existe de sites d'intégration.

### VI.2.2.7. Utilisation de la conjugaison pour l'analyse génétique

On peut déterminer l'ordre des gènes du chromosome circulaire bactérien au cours d'une conjugaison à condition de sélectionner pour un marqueur donné qui est transféré avant tous les autres. Soit le croisement suivant entre une souche HFR prototrophe pour la méthionine, l'arginine, la leucine et l'histidine mais sensible à la streptomycine et une souche F<sup>-</sup> ayant les caractères opposés. Les recombinants seront sélectionnés dans un milieu ne contenant pas de méthionine. Le résultat typique sera :

Recombinants met<sup>+</sup> : 100% ; recombinants arg<sup>+</sup>, met<sup>+</sup> : 60% ; recombinants leu<sup>+</sup>, arg<sup>+</sup>, met<sup>+</sup> : 40% ; recombinants his<sup>+</sup>, leu<sup>+</sup>, arg<sup>+</sup>, met<sup>+</sup> : 20%.

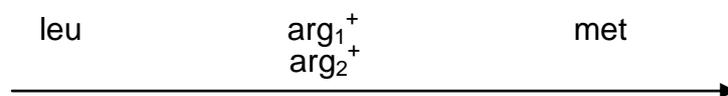
Les résultats des fréquences de recombinaison reflètent l'ordre des gènes sur le chromosome ; néanmoins, cette méthode ne peut pas s'appliquer pour des marqueurs génétiques situés avant le gène de sélection : la méthionine.

C'est ainsi qu'on utilise une autre méthode qui consiste à sélectionner pour le dernier marqueur ; de cette façon, une bactérie ayant reçu le dernier marqueur a eu plus de chance de recevoir tous les autres marqueurs situés avant.

### VI.2.2.8. Les croisements réciproques

La détermination de la cartographie des gènes en utilisant la conjugaison interrompue a démontré ses limites lorsque deux gènes sont localisés l'un à côté de l'autre. Considérons deux mutants arg<sup>-</sup>: F1 arg<sub>1</sub><sup>-</sup> et F2 arg<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Par cartographie interrompue, on obtient la carte génétique suivante :



On voit très bien que lorsque deux gènes sont très proches, il devient difficile d'établir leur ordre relatif. Dans le cas précédent, il existe deux ordres possibles: arg<sub>1</sub> avant arg<sub>2</sub> ou arg<sub>2</sub> avant arg<sub>1</sub>. C'est ainsi qu'on fait appel aux croisements réciproques:

Croisement A : Hfr (met<sup>+</sup>, arg<sub>1</sub><sup>-</sup>, leu<sup>+</sup>, str<sup>S</sup>) x F<sup>-</sup> (met<sup>-</sup>, arg<sub>2</sub><sup>-</sup>, leu<sup>-</sup>, str<sup>R</sup>)

Croisement B : Hfr (met<sup>+</sup>, arg<sub>2</sub><sup>-</sup>, leu<sup>+</sup>, str<sup>S</sup>) x F<sup>-</sup> (met<sup>-</sup>, arg<sub>1</sub><sup>-</sup>, leu<sup>-</sup>, str<sup>R</sup>)

On peut faire un tableau à 4 cases en introduisant les deux croisements ci-dessus et les deux ordres possibles (Tableau 1).

**Tableau 1:** Détermination de l'ordre des gènes par croisements réciproques

	ordre 1	ordre 2
croisement A		
croisement B		

En analysant le nombre de crossing over nécessaire pour la formation de recombinants prototrophe, il sera possible de déterminer la position de  $arg_1$  et  $arg_2$  par rapport aux deux autres gènes.

### VI.3. La transduction

La transduction est le transfert d'ADN bactérien par l'intermédiaire de bactériophages (ou phages). Ceux-ci sont des virus de bactéries, qui existent sous la forme virulente ou tempérée. Les phages virulents se multiplient dans la bactérie (ou mieux sont répliqués par la bactérie) et la lysent. Les phages tempérés s'intègrent dans le chromosome bactérien sans induire la réplication et sont répliqués en même temps que lui. Le bactériophage est alors appelé prophage et la bactérie qui en est porteuse, une bactérie lysogène. Dans une population de bactéries lysogènes, un prophage se libère de temps à autre du chromosome bactérien, devient virulent, se multiplie, provoque la lyse de la bactérie et peut infecter de nouvelles bactéries. Si, au cours de sa libération, le prophage emporte avec lui plusieurs gènes bactériens, il peut y avoir transfert par le bactériophage de gènes bactériens d'une bactérie (lysogène) à une autre (lysogène). C'est la transduction.

En 1952, N. Zinder et J. Lederberg tentent d'obtenir des recombinants après croisement de mutants auxotrophes de souches de *Salmonella typhimurium* (LA22, LA2) responsables de toxi-infections d'origine alimentaire. La fréquence des recombinants histidine+ tryptophane+, de l'ordre de  $10^{-6}$ , n'est pas modifiée lorsque les souches parentales, séparées par un filtre en verre fritté, ne sont plus en contact (cf expérience de

Davis). L'existence d'un agent filtrable, vecteur de l'information génétique est démontrée (bactériophage tempéré produit par la souche parentale lysogène, LA 22) (Figure 10).

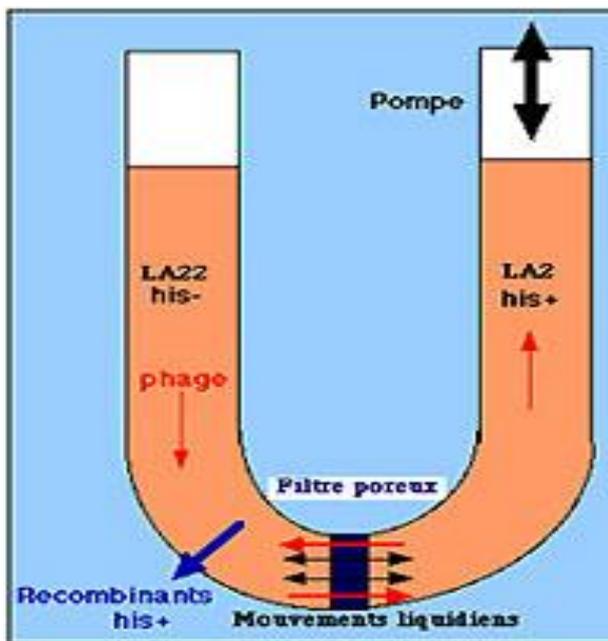


Figure 10 : Dispositif expérimental de la transduction

### VI.3.1. Caractères de la transduction

La transduction est liée à l'existence de souches bactériennes lysogènes, à Gram positif (staphylocoque, streptocoque) ou à Gram négatif (entérobactéries, *Pseudomonas*).

### VI.3.2. Types de transduction

1. Lorsque les gènes transférés (pas plus de 1 à 2 % du génome de la bactérie lysogène) s'intègrent dans le chromosome de la bactérie réceptrice et que celle-ci les transmet à sa descendance, on dit que la *transduction est complète ou généralisée* (figure 6).
2. Lorsque les gènes transférés ne sont pas intégrés dans le chromosome, ce qui est fréquent, on dit que la *transduction est abortive*. Dans ce cas, les gènes passent de la cellule mère à une seule cellule fille, etc... Il n'y a pas généralisation du caractère transféré à l'ensemble des descendants.

*La conversion lysogénique.* Dans certains cas, le génome du bactériophage apporte par lui-même un nouveau caractère très important pour la bactérie réceptrice, par exemple, la sécrétion de la toxine diphtérique, la sécrétion de la toxine érythrogène du streptocoque A (scarlatine) ou la présence de certains facteurs antigéniques. On dit alors qu'il y a eu

conversion lysogénique. La conversion et la transduction sont des phénomènes qui font tous deux intervenir un bactériophage. Mais, dans le premier cas, c'est le génome du bactériophage qui est responsable du nouveau caractère acquis par la bactérie ; dans le second cas, le bactériophage a seulement un rôle de vecteur et le génome transféré provient d'une autre bactérie.

## **Conclusions**

Le transfert d'ADN bactérien par transduction a été très utilisé par les généticiens en raison de sa faible fréquence ( $10^{-6}$ ), de son caractère partiel (1-2 % du génome bactérien) et de sa relative non-spécificité. On peut concevoir qu'elle a joué, plus que la transformation mais moins que la conjugaison, un rôle important dans l'évolution bactérienne.

## **VI.4. Les plasmides**

Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaire, circulaires et cytoplasmiques, de petite taille (5 à 4000 fois plus petit que le chromosome), se répliquant d'une manière autonome et non indispensables au métabolisme normal des cellules hôtes. Leur transmission d'une cellule bactérienne à une autre peut s'effectuer par conjugaison (Tra<sup>+</sup>) ou transduction.

### **VI.4.1. Mise en évidence**

Le terme 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.

### **VI.4.2. Propriétés biologiques portées par les plasmides**

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, phénicol, cyclines, macrolides) chez les bactéries à Gram positif ou négatif ; résistance aux antiseptiques mercuriels, aux métaux lourds (antimoine, argent, bismuth...) ; résistance aux bactériophages. 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 entéro-pathogènes (diarrhées des voyageurs), pouvoir pathogène des staphylocoques dans l'impétigo (exfoliatine).

Les plasmides peuvent également coder pour la synthèse de bactériocines qui inhibent la croissance d'autres bactéries (ex. : colicines létales pour les entérobactéries). Ils peuvent aussi porter les gènes qui codent pour le métabolisme du lactose ou de la lysine chez les *Proteus*, la production de H<sub>2</sub>S chez *E.coli*, la dégradation du toluène ou de l'octane chez les *Pseudomonas*...

Les plasmides possèdent des gènes qui assurent leur réplication autonome. Certains plasmides possèdent aussi des gènes qui assurent leur transfert par conjugaison (plasmides conjugatifs). Des classifications de plasmides par classes d'incompatibilité (Inc) ont été établies. Deux plasmides s'excluant mutuellement, c'est-à-dire ne pouvant coexister dans la même bactérie, appartiennent au même groupe d'incompatibilité.

Les plasmides confèrent aux bactéries qui les hébergent de nombreux caractères génétiques par un mécanisme d'addition et non par un mécanisme de substitution. Ils représentent un élément essentiel d'adaptation bactérienne. Ils sont responsables d'épidémies de gènes (notamment de résistance aux antibiotiques), qui ont fait découvrir les transposons, appelés encore gènes sauteurs ou mobiles.

## **VI.5. La transposition - Les transposons**

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.

### **VI.5.1. Mise en évidence de la transposition**

La constatation, en 1971, par N. Datta, du passage (saut) d'un gène de résistance aux bêta-lactamines d'un plasmide à un autre plasmide appartenant à des classes d'incompatibilité différentes au sein d'une même bactérie a fait découvrir l'existence de

gènes «sauteurs» ou mobiles. L'acquisition de ces gènes se traduit par une augmentation de taille du plasmide récepteur et l'acquisition de propriétés nouvelles.

### **VI.5.2. Propriétés des transposons**

Les déterminants génétiques transposables peuvent être la résistance à des antibiotiques très divers (bêta-lactamines, aminosides, phénicols, cyclines, érythromycine, sulfamides et triméthoprim). D'autres marqueurs peuvent être portés par des transposons: la résistance aux sels de métaux lourds, certains caractères métaboliques, etc...

La majorité des transposons identifiés proviennent des plasmides de bacilles à Gram négatif, mais certains proviennent de cocci à Gram positif comme le transposon de résistance à l'érythromycine chez *Staphylococcus aureus*.

### **VI.5.3. Structure des transposons**

Le transposon (figure 5) est constitué d'un fragment d'ADN limité de part et d'autre par des séquences répétitives inversées (IR) appartenant à des séquences d'insertion (IS). Les séquences d'insertion portent les gènes nécessaires à la transposition (transposase, éléments régulateurs de la transposition) et le fragment central porte les marqueurs spécifiques (exemple : gènes de résistance aux antibiotiques).

La transposition est un mécanisme d'adaptation génétique particulièrement efficace des bactéries à leur environnement.