

# **NOTIONS DE GENETIQUE MOLECULAIRE**

**Prof. Guimogo DOLO, M.Sc., PhD**

# RECOMBINAISON DES BACTÉRIES ET DES VIRUS

## 1- Introduction

La **recombinaison génétique** est « le phénomène conduisant à l'apparition, dans une cellule une **modification**. Chez les procaryotes (*bactéries*), elle se produit grâce à la **conjugaison bactérienne**, la **transformation bactérienne**, ou la **transduction bactérienne**. Chez les *virus*, la *recombinaison* peut avoir lieu au sein des cellules infectées ...

Etant donné que le matériel génétique est porté par les **chromosomes**, on comprend mieux le rôle **fondamental** de la reproduction **sexuée**, qui permet un double **brassage** des génotypes au moment de la méiose pendant la **gamétogénèse** d'une part, et au moment de la **fécondation** (caryogamie) d'autre part.

# 1- Introduction

Les bactéries et les virus ne présentant pas une alternance de phases diploïdes et haploïdes séparées par la **méiose** et la **caryogamie**, pendant longtemps on n'avait pensé que les concepts de la génétique classique ne s'appliquaient pas à eux. En fait la stabilité habituelle de la transmission des caractères (observée lors des phénomènes de parasexualité) et l'existence de mutations occasionnelles sont les bases qui ont permis par analogie de penser que ces micro-organismes possèdent une organisation génétique comparable à celle des organismes supérieurs.

# 1- Introduction (suite)

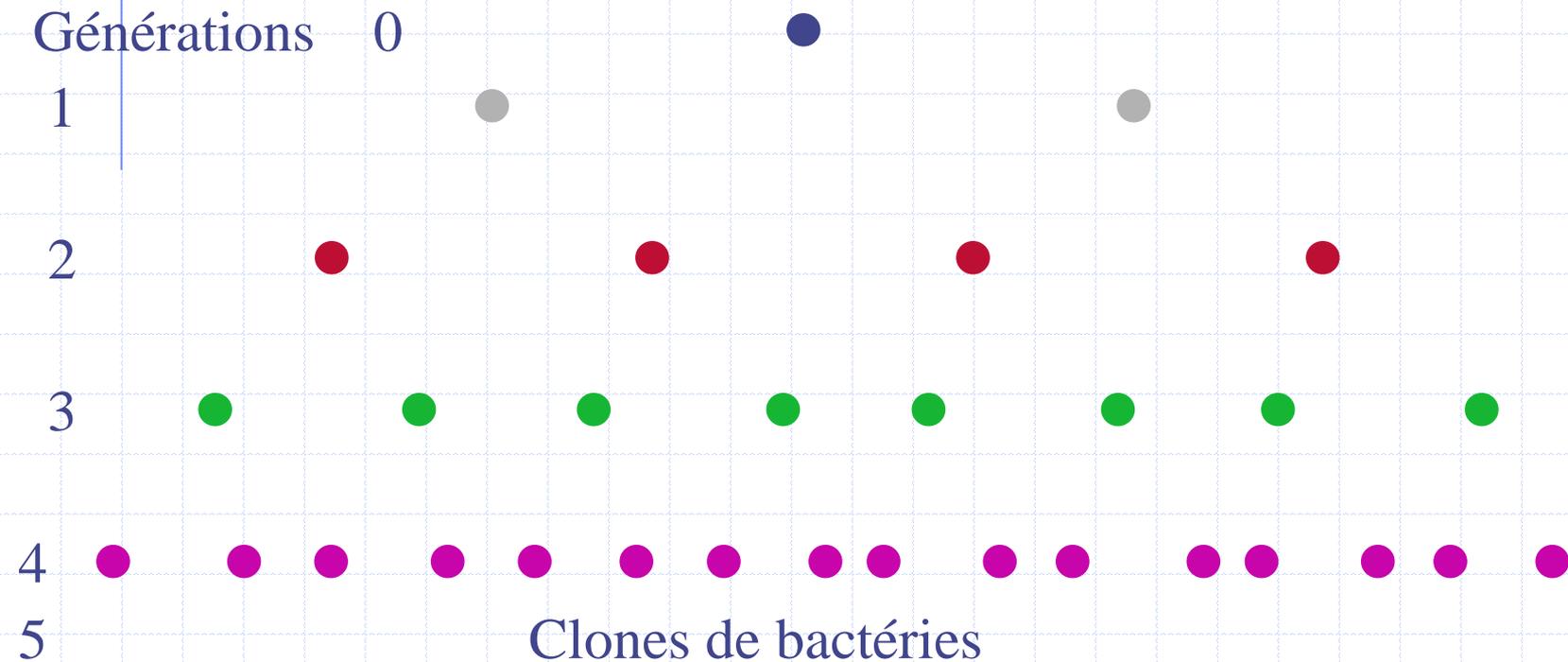
C'est pourquoi l'identification du matériel génétique chez les ~~micro~~-organismes, l'étude des phénomènes de la transformation, de la conjugaison bactérienne et de la transduction ont représenté une étape essentielle pour toute la génétique , pour mieux comprendre et définir avec plus de précision les notions de **gènes** et de **caractères** .

## 2 . Reproduction des bactéries

Les bactéries sont susceptibles d'être cultivées à l'aide d'un milieu de culture artificiel renfermant les éléments nutritifs adéquats .

Une bactérieensemencée, grossit , puis se divise en deux par la scissiparité.

Les bactéries-filles grossissent et se divisent à leur tour. On peut ainsi obtenir un clone à partir d'une bactérie-mère .



## 2 . Reproduction des bactéries (suite)

Une bactérie quelconque du clone est à l'origine d'un **sous-clone**.

Toutes les divisions (au moins au début) sont normalement synchrones; le nombre de descendants double à chaque génération. Au bout de  $x$  générations , une bactérie aura donné naissance à  **$2^x$  descendants** .

De façon générale , soit  **$N$**  le nombre de bactéries d'une culture à la génération  $x$  , soit  **$N_0$**  le nombre de bactéries à la génération 0, on a :  **$N = N_0 \cdot 2^x$** .

La croissance de la culture est exponentielle ; en fait , elle ralentit à partir d'une certaine densité de bactéries , puis finit par cesser complètement, le milieu étant en quelque sorte saturé.

## 2 . Reproduction des bactéries (suite)

On peut dénombrer les bactéries par la méthode de culture après dilution. Différentes souches de bactéries peuvent différer par des caractéristiques **morphologiques** ou **métaboliques** (aptitudes à utiliser certaines substances pour leur croissance ), par leur **vitesse de croissance**, par leur **virulence**, par leur **résistance** éventuelle à certains antibiotiques etc... Il peut s'agir de caractères héréditaires transmis sans changements de bactérie-mère à bactérie-fille ou de mutations (mutants résistants aux antibiotiques ou des mutants auxotrophes ayant perdu la capacité de synthétiser une substance (-) .

### 3. Reproduction des virus

Les virus sont des micro-organismes réduits à une enveloppe essentiellement protéique, **la capside**, renfermant un acide nucléique . Dépourvus de cytoplasme, ils sont incapables d'effectuer eux-mêmes la synthèse de leurs constituants et sont donc **parasites intracellulaires obligatoires** .

Les bactériophages ( ou plus simplement dits "phages" ), virus se reproduisant dans les bactéries, sont les plus utilisés; une bactérie infectée par un bactériophage assure la multiplication de celle-ci et, après une vingtaine de minutes normalement , éclate (lyse de la bactérie) et libère un grand nombre de **bactériophages** qui pourront à leur tour infecter d'autres bactéries .

### 3. Reproduction des virus

Si une culture de bactérie , suffisamment dense pour former un tapis d'apparence continue renferme au départ quelques bactéries infectées, chacune d'elles sera détruite (lysée) et libérera autour d'elle de nombreuses **particules virales** qui attaqueront les bactéries voisines et provoqueront leur lyse. Ainsi , on observe rapidement l'apparition de taches claires (**les plaques**) interrompant la surface d'un tapis bactérien . Chaque plaque correspond à une bactérie initialement infectée .

### 3. Reproduction des virus

#### Variation chez les virus :

Différentes souches d'un même virus peuvent différer par la spécificité de leur **virulence**, la nature des **troubles causés** à l'hôte, leur **sensibilité** à la température, etc. Un des caractères les plus utilisés est l'**apparence** des plaques causées par les bactériophages .

Normalement tous les **virions libérés** par une cellule-hôte après infestation par un phage possèdent les mêmes caractéristiques que celui-ci : il y a **hérédité des caractères** . Comme chez les autres organismes, on observe éventuellement des changements brusques héréditaires de ces caractéristiques: les phages présentent aussi des **mutations**.

## 4 . Identification du matériel génétique

### 4 . 1 . Matériel génétique des bactéries : la transformation bactérienne

Les expériences de transformations bactériennes de Griffith en 1928 furent à l'origine de l'identification de l'**ADN** comme matériel génétique des bactéries .

#### a ) Expérience de Griffith.

Les pneumocoques ( *Diplococcus pneumoniae* ) agents bactériens responsables de la pneumonie existent sous deux formes phénotypiquement différentes :

- les souches dites **smooth**: S ( lisses ) sont formées de bactéries possédant une enveloppe externe dite capsule : elles sont virulentes et provoquent la mort des souris inoculées , la capsule empêchant la destruction des bactéries infectantes par les cellules de l'hôte ;
- les souches dites **rough** : R ( rugueux ) sont dépourvues de capsules et ne sont pas virulentes chez les souris .

## 4 . 1 . Matériel génétique des bactéries : la transformation bactérienne

Des souris inoculées par des bactéries encapsulées (S) préalablement tuées par la chaleur restent indemnes . Des souris inoculées par des bactéries sans capsules (R) non virulentes restent indemnes .

Mais , des souris inoculées par un mélange : bactéries sans capsules R ( non virulentes ) + bactéries encapsulées S (virulentes) tuées par la chaleur développent une septicémie, et on peut en isoler des bactéries encapsulées S vivantes qui conservent par la suite ce caractère et le transmettent à leurs descendants .

Il y a eu transformation des bactéries de type sans capsules non virulentes en bactéries encapsulées virulentes .

# 4 . 1 . Matériel génétique des bactéries : la transformation bactérienne

## Généralisation

La transformation a pu être obtenue pour d'autres caractères et chez d'autres bactéries .

La transformation cause le changement d'un caractère héréditaire A en un caractère héréditaire alternatif A' , selon la figure suivante :

Bactérie vivante + Bactérie tuée -----> descendants  
caractère A            caractère A'                            caractère A'

La transformation réciproque est également possible :

Bactérie vivante + Bactérie tuée -----> descendants  
caractère A'            caractère A                            caractère A.

# 4 . 1 . Matériel génétique des bactéries : la transformation bactérienne

## b ) Isolement du facteur transformant.

Avery , McLeod et McCarthy ont montré en 1944 que le facteur transformant porteur de l'information était de l'**ADN** .

Si l'on extrait l'ADN de bactéries virulentes , la molécule initiale représentant le génome bactérien se trouve fragmentée en de nombreux petits segments (représentant en moyenne chacune 1/500 du génome total). L'un de ces fragments porte le **gène S** responsable de la virulence .

Il se comporte comme un **plasmide** et pénètre (en moins de 10s ) dans les bactéries réceptrices (R) avec lesquelles on le met en contact . Le court fragment d'ADN incorporé s'apparie ensuite avec le segment homologue du chromosome de la bactérie hôte (ce qui correspond à l'appariement chromosomique observé au stade zygotène de la méiose ) . Il se produit un **échange** de matériel génétique très semblable à un **crossing-over**, aboutissant à l'insertion du gène S dans le génome de la bactérie (R) réceptrice , qui se trouve ainsi transformée (le gène ne peut s'exprimer phénotypiquement que s'il est intégré au génome de l'hôte).

## **b ) Isolement du facteur transformant.**

NB. Chez les bactéries , on appelle plasmide de courts fragments circulaires d'ADN qui peuvent être séparés du chromosome et exister à l'état libre dans le cytoplasme.

Ces plasmides sont détenteurs d'une **information génétique**, se multiplient rapidement et de façon autonome dans la cellule et peuvent être transmis d'une bactérie à une autre, éventuellement d'une espèce différente . Dans certaines conditions, un plasmide peut "prélever" un court segment de l'ADN chromosomique de la bactérie à laquelle il appartient et le transférer dans une bactérie voisine . Bien que relativement peu répandu, ce transfert de gène, qui peut être comparé à un **crossing-over** , a certainement joué un grand rôle dans l'évolution bactérienne .

## 4.2 . Matériel génétique des virus : Expérience de HERSHEY

L'expérience consiste à produire deux séries de bactériophages marqués par des éléments radioactifs :

**a ) Première série** : On fait croître des phages sur des bactéries renfermant du **phosphore radioactif** : on obtient des phages radioactifs par leur ADN seulement (l'ADN seul contient du phosphore ).

**b ) Deuxième série** : on fait croître des phages dans les bactéries renfermant du **soufre radioactif** . On obtient des phages radioactifs par leurs constituants protéiques seulement ( **protéines** seules renferment du soufre). Ces deux catégories de phages radioactifs sont ensuite utilisées dans deux séries d'expériences parallèles pour infecter des bactéries **non radioactives** . Après que les phages aient eu le temps de se fixer sur les bactéries , on secoue violemment la culture : on constate alors que dans la série avec des phages marqués au **P** (ADN marqué) toute la radioactivité est passée dans les bactéries , tandis que dans la série des phages marqués au **S** (protéines marquées) , la radioactivité se trouve dans le milieu extérieur .

## 4.2 . Matériel génétique des virus : Expérience de HERSHEY

L'expérience montre que seul l'**ADN** du phage a pénétré dans la bactérie et que son enveloppe protéique vide a été détachée par la secousse . Or, les bactéries ainsi traitées permettent la reproduction normale des phages: le seul lien de continuité entre les deux générations successives de phages est donc l'**ADN** injecté.

Remarque : On a montré depuis que d'autres types de virus ont de l'**ARN** exclusivement pour matériel génétique (ex: virus de la mosaïque du tabac ,virus de la grippe, virus du sida ... ) .

## 5 . Organisation génétique des bactéries : conjugaison bactérienne .

### 5. 1 . Démonstration de la recombinaison chez les bactéries

( Lederberg et Tatum , 1946 )

On isole deux souches de mutants auxotrophes différentes chez la bactérie *Escherichia coli* : par exemple , une souche de mutants **B<sup>-</sup>** nécessitant de la **biotine** pour leur croissance et une souche de mutants **Thr<sup>-</sup>** nécessitant de la **thréonine** .

Aucune de ces deux souches ne peut se développer sur un milieu minimum ( dépourvu de biotine et de thréonine ) . Par contre , si on **mélange** ces deux souches , on observe le développement d'un certain nombre de colonies en culture sur milieu minimum : (elles proviennent d'individus **B<sup>+</sup>Thr<sup>+</sup>** obtenus par recombinaison ) .

## 5. 1 . Démonstration de la recombinaison chez les bactéries (Lederberg et Tatum , 1946)

NB. Des mutations reverses du type  $B^- \rightarrow B^+$  ou  $Thr^- \rightarrow Thr^+$  peuvent provoquer l'apparition d'un faible nombre de colonies qui se développent dans  $B^- Thr^+$  ou  $B^+ Thr^-$  . Aussi Lederberg et Tatum ont-ils utilisé des mutants auxotrophes doubles ou triples : souche (1)  $B^- Ph^-$  , souche (2)  $Thr^- L^-$  ; la probabilité que des colonies apparaissent par suite d'une double mutation :

$$\left\{ \begin{array}{l} B^- \rightarrow B^+ \\ Ph^- \rightarrow Ph^+ \end{array} \right. \quad \text{ou} \quad \left\{ \begin{array}{l} Thr^- \rightarrow Thr^+ \\ L^- \rightarrow L^+ \end{array} \right.$$

est alors absolument négligeable . Le développement de colonies est alors l'indice certain d'une recombinaison entre les deux souches .

## 5.2. Différenciation sexuelle des bactéries : sexduction

### a) Souches $F^+$ et $F^-$ .

Les bactéries manifestent une sorte de "différenciation sexuelle" (Hayes, 1953) connue sous le terme de **sexualité "asymétrique"**.

Les souches bactériennes  $F^-$  (fertilité négative) incapables de produire entre elles des recombinants sont qualifiées de **"femelles"** ou receveurs de matériel génétique. Les souches  $F^+$  capables de donner des recombinants avec les bactéries  $F^-$  sont considérées comme des **"mâles"** donneurs de matériel génétique.

Le "sexe" bactérien est conditionné par un **facteur génétique** particulier, **l'épisome** ou **facteur F**, qui peut être soit libre dans le cytoplasme, soit lié au chromosome bactérien. L'épisome est un facteur génétique capable d'effectuer sa réplication de façon autonome et plus rapidement que le chromosome bactérien lui-même. L'épisome correspond à la notion de **plasmide** : l'ensemble du phénomène, qui correspond à une **Transformation bactérienne** est appelé **sexduction**.

## b ) Les bactéries Hfr

On a observé que dans les souches  $F^+$  un petit nombre de bactéries sont capables d'entrer en conjugaison avec des bactéries  $F^-$ , et de se comporter comme des donneurs de matériel génétique autre que l'épisome . Ces bactéries  $F^+$  sont désignées par le sigle "**Hfr**" (bactéries à haute fréquence de recombinaison) . Chez ces bactéries l'épisome est lié au chromosome .

## 5.3. Transfert d'un fragment de chromosome et établissement d'une carte chromosomique

Wollman et Jacob ( 1956 ) ont montré que le chromosome bactérien, normalement circulaire et continu , peut se rompre en un point chez les bactéries Hfr toujours au même niveau pour un type donné de bactéries Hfr . Par contact entre une bactérie  $F^+$  Hfr avec une bactérie  $F^-$  une partie du génome de la bactérie Hfr (exogénote) est transmise à la bactérie  $F^-$  . Le phénomène peut être mis en évidence par autoradiographie après marquage de l'ADN du chromosome Hfr . Plus la durée de la conjugaison est longue et plus la portion du chromosome de la bactérie Hfr transmise à la bactérie  $F^-$  sera importante . On peut prévenir ( ou interrompre ) la conjugaison en soumettant la culture à une forte agitation (mixeur).

La bactérie  $F^-$  réceptrice qui a incorporé l'exogénote devient alors un mérozygote . Une partie du matériel génétique ( exogénote ) du donneur Hfr s'est intégrée à son propre génome à la suite d'un phénomène assez comparable à un crossing-over , il y a recombinaison .

## 6 . Organisation génétique des virus: transduction

### 6 . 1 . Les bactériophages :

Ce sont des virus parasites des bactéries ; ils ont été mis en évidence par Twort en 1915 . Ce sont des virus à ADN.

Comme tous les virus , ils ne possèdent ni membrane plasmique, ni cytoplasme , ni noyau et sont incapables de se multiplier librement.

Pour se reproduire ils doivent obligatoirement parasiter une bactérie hôte : ils se fixent sur elle par leur plaque basale épineuse, puis injectent leur ADN dans la bactérie.

## 6.2. Travaux de Lederberg

En 1952 Lederberg et Zinder, étudiant l'action d'un bactériophage (**phage P**) sur diverses variétés de colibacilles et de salmonelles montrent que des caractères génétiques peuvent être transmis d'une bactérie à l'autre par l'intermédiaire de bactériophages. Le phage P est un phage tempéré; si on l'introduit dans une culture de bactérie, deux éventualités peuvent se produire :

a ) La plupart du temps , le phage se multiplie aux dépens des bactéries qui se lysent .

- à  $t_0$  = Accrochage du phage à la bactérie

-  $t = 4'$  = Injection du matériel génétique du phage à la bactérie

-  $t = 13'$  = réplication de l'ADN phagique

-  $t = 28'$  = synthèse des protéines des capsides

-  $t = 32'$  = éclatement de la bactérie libération des nouveaux phages .

## 6.2. Travaux de Lederberg

b) Dans quelques cas, des bactéries peuvent survivre à l'injection de l'ADN phagique. Ces bactéries sont dites lysogènes, on pense qu'elles possèdent dans leur cytoplasme un facteur d'immunité agissant comme répresseur de la duplication de l'ADN phagique.

Les bactéries lysogènes conservent l'ADN phagique (formant un prophage) probablement attaché par une courte section au chromosome bactérien. Elles effectuent la réplication du prophage en même temps que la duplication de leur propre génome, celui-ci est donc transmis à des générations successives de bactéries lysogènes.

Cependant la lysogénie n'est pas permanente. Pour diverses raisons une bactérie peut perdre son immunité. Le prophage se multiplie alors à l'intérieur de la bactérie qui se lyse. Les phages libérés à la suite de la lyse bactérienne contiennent en plus de leur ADN propre, une petite portion de l'ADN bactérien qu'ils ont intégré à la suite d'un phénomène assimilable à une recombinaison.

## 6.2. Travaux de Lederberg

c) Si des phages qui ont intégré une partie du génome de bactéries d'un type donné A sont utilisés pour infecter des bactéries d'une souche différente B, on constate que certaines des nouvelles bactéries hôtes de type B, qui sont lysogènes, donnent une descendance exprimant à la fois des caractères de A et de B. Ceci démontre qu'effectivement un segment de chromosome des bactéries A (donneuses) peut être transmis à des bactéries B (receveuses) par l'intermédiaire du phage. Ce phénomène porte le nom de transduction.

La transduction peut être généralisée, dans ce cas n'importe quel segment du chromosome bactérien donneur peut être transmis à la bactérie réceptrice par l'intermédiaire du phage. Elle peut être spécialisée, dans ce cas le transfert est limité à des segments spécifiques du chromosome donneur.

## 6.2. Travaux de Lederberg

Un bon exemple de transduction spécialisée concerne le bactériophage Lambda, qui ne peut transférer que le locus "galactose" ( gal ) d'*E. coli* des cellules donneuses aux cellules réceptrices .

Mis au contact des bactéries gal<sup>+</sup> lysogènes, le bactériophage incorpore le groupe de gènes (opéron gal) qui chez la bactérie gouverne le métabolisme du galactose . Après sa libération consécutive à la lyse de la bactérie hôte, le bactériophage " lambda-gal" est mis en contact avec des souches bactériennes déficientes, chez lesquelles l'opéron gal n'est pas fonctionnel (gal<sup>-</sup>)

. Les bactéries lysogènes (gal<sup>-</sup> associées aux prophages porteurs de gal<sup>+</sup>) deviennent capables de métaboliser le galactose . Dans ce cas précis, le prophage Lambda-gal reste intact , associé au génome de la bactérie hôte et se répliquant avec lui . Ce type d'association constitue ce que l'on appelle un hétérogénote pour l'opéron gal .

# La différence entre la bactérie et le virus

Ce sont de petits organismes, mais les virus sont généralement bien plus petits que les bactéries. La bactérie est une cellule sans noyau avec une paroi et parfois même une sorte de petite queue, la flagelle, qui lui permet de mieux se déplacer. Pour se reproduire, comme toutes les cellules, les bactéries se divisent. Le virus ne peut pas se reproduire tout seul, il a besoin d'un autre organisme, une cellule dans laquelle il va entrer. Une fois dedans, il va se servir de ce qu'il trouve pour fabriquer de nouveaux petits virus, qui vont aller chercher d'autres cellules pour se reproduire

# La différence entre la bactérie et le virus

La plupart des virus provoque des maladies : la grippe, le sida, la méningite... Alors que la plupart des bactéries sont inoffensives et même utiles, comme celles qui nettoient la mer, qui transforment les déchets en terre, qui provoquent la fermentation du lait en yaourt ou même celles qui habitent dans notre corps et qui nous aident à digérer