

La génétique microbienne

1° L'ADN, support des caractères transmissibles :

1.1. Définitions :

La génétique étudie les caractères héréditaires et les variations accidentelles. L'approche de la génétique nécessite la connaissance de termes propres à cette discipline :

- **Un clone :**

Souche ou culture pure, c'est-à-dire une population de cellules génétiquement identique.

- **Le génome d'un organisme :**

Ensemble des gènes qu'il possède. C'est son patrimoine génétique.

- **Le phénotype d'un organisme :**

Ensemble des caractères que peut déceler l'expérimentateur. Il résulte de l'expression du génotype.

Tous les gènes ne sont pas exprimés en même temps et l'environnement influence profondément l'expression phénotypique.

Un phénotype peut correspondre à différents génotypes.

1.2. Expériences fondamentales :

1.2.1. Etude du transfert de la virulence de *Streptococcus pneumoniae* :

- L'injection de pneumocoques vivants de type S à une souris entraîne sa mort par pneumonie.
- L'injection de pneumocoques S tués par ébouillantage à une souris n'entraîne aucune infection.
- L'injection de pneumocoques vivants de type R à une souris n'entraîne aucune infection.
- L'injection d'un mélange de pneumocoques S ébouillantés et de pneumocoques R vivante entraîne la mort de la souris par pneumonie. On retrouve dans les souris mortes des bactéries vivantes de type S.
- Un facteur en provenance des bactéries S pathogènes est capable de transformer les bactéries R inoffensives en bactéries S pathogènes. Il y a eu transfert de phénotype.

1.2.2. Identification du principe transformant :

Dans un premier temps, des extraits de pneumocoques virulents ont été préparés, ils contiennent tous des molécules constitutives des pneumocoques. On en a détruit sélectivement l'ADN, l'ARN ou les protéines. Des pneumocoques non virulents ont été exposés aux extraits traités.

Ces travaux apportèrent pour la première fois la preuve que le principe transformant découvert Griffith était bien l'ADN et que c'était bien cette méthode qui portait l'information génétique.

1.3. La structure des gènes :

1.3.1. Définition :

Pour les généticiens, le gène est considéré comme l'entité responsable d'un caractère phénotypique, c'est-à-dire à un gène correspond un caractère.

Pour les biologistes moléculaires, le gène est une séquence d'ADN codant pour un ARN.

Ces deux définitions sont liées car un caractère d'un organisme est déterminé par une ou plusieurs protéines.

1.3.2. Structure et expression des gènes :

La synthèse des protéines s'effectue en deux étapes :

- La transcription de l'ADN en ARNm.
- Puis la traduction du message en protéine. Chez les eucaryotes, les protéines peuvent être maturées dans l'appareil de Golgi.

Un seul des deux brins de la double hélice du gène contient l'information codante. Ce brin est appelé brin codant.

Chaque séquence codante est précédée d'un site de régulation permettant la liaison de l'ARN polymérase, appelé promoteur. La région codante est encadrée par des régions transcrites mais non traduites, la séquence de tête permettant la liaison des ribosomes et la séquence de pause ou de queue. Ces régions sont indispensables à la traduction de l'ARNm par le ribosome.

1.4. Code génétique :

Ce code permet de traduire une séquence codante d'ARNm en une séquence d'acide aminé constituant la structure primaire du polypeptide.

Chaque séquence de trois bases sur le brin codant de l'ADN est appelé triplet. Chaque triplet code pour un codon complémentaire sur le messager. Chaque codon correspond à un acide aminé de la protéine.

Le nombre de combinaisons possible de codons est de 4^3 soit 64 codons, puisqu'il existe 4 bases différentes (A, C, G et U). A l'exception des codons non-sens (UAA, UAG et UGA), chaque codon correspond à un acide aminé. Les 20 acides aminés présents dans les polypeptides sont donc codés par $64 - 3 = 61$ codons différents.

Un acide aminé pouvant être codé par plusieurs codons, on dit que le code génétique est dégénéré.

1.5. La structure de l'ADN :

La molécule d'ADN est un très long filament, qui peut atteindre une longueur de 1 mm.

1.5.1. Composition chimique :

Comme chez les eucaryotes, l'ADN est un polymère d'unités appelées nucléotides.

Chaque nucléotide est constitué :

- D'un groupement phosphate.
- D'un pentose.
- D'une base azotée purique ou pyrimidique.

Ces nucléotides sont de quatre types, selon la nature de la base azotée qui les constitue. Ils s'unissent les uns aux autres par des liaisons phospho-diester, établies entre la fonction acide de l'acide phosphorique et la fonction alcool du pentose.

1.5.2. Structure de la molécule d'ADN :

Le modèle de la molécule d'ADN proposé par Watson et Crick est celui d'une double hélice enroulée :

- Les deux chaînes ont des polarités opposées.
- Dans tous les ADN, il existe autant de molécules de thymine que de molécules d'adénine, et autant de molécules de cytosine que de molécules de guanine.
- En revanche, le coefficient de Chargaff, c'est-à-dire le rapport $\frac{(A+T)}{(C+G)}$ varie considérablement selon les espèces, mais reste constant chez toutes les souches d'une même espèce. On l'exprime généralement en CG %.

1.5.3. Topologie de l'ADN :

La structure de l'ADN n'est cependant pas figée, il arrive parfois, en effet, que celle-ci subisse des modifications, en particulier au cours de la réplication. Ces modifications sont appelées mutation. Au laboratoire, il est également possible de provoquer artificiellement l'apparition de mutations.

2° Les mutations :

2.1. Définitions :

- **Mutation :**

Une mutation est une modification stable et héréditaire du matériel génétique.

- **Mutant ou souche mutante :**

Un organisme présentant une mutation est appelé mutant.

- **Souche sauvage :**

Une souche sauvage est une souche ne présentant pas de mutation.

2.2. Mise en évidence des mutants :

Seules les mutations qui modifient le produit d'un gène ou son expression sont facilement détectables.

2.2.1. Mutants morphologiques :

Le caractère modifié concerne la morphologie de la cellule bactérienne ou de la colonie. Le caractère est facilement détectable par un examen macroscopique de colonie isolée ou par examen microscopique des cellules.

2.2.2. Mutants nutritionnels :

Le caractère modifié concerne un besoin nutritionnel ou un caractère biochimique. Les mutants auxotrophes peuvent être isolés d'une population sauvage par la méthode des répliques, sur gélose.

2.2.3. Mutant résistants aux agents antimicrobiens :

Le caractère modifié concerne la sensibilité de la cellule aux agents antimicrobiens. Ces mutants sont mis en évidence par étalement et culture sur milieu contenant l'antibiotique. Seules les souches résistantes peuvent se multiplier.

2.3. Caractéristiques des mutations :

2.3.1. Les mutations sont des événements rares et spontanés :

L'apparition de mutants résistants à partir d'une population sauvage sensible est rare. La rareté de ces événements peut être mesurée par le taux de mutation. En général, le taux de mutation reste constant pendant la croissance d'une population bactérienne. Ce taux varie de 10^{-3} à 10^{-20} selon les espèces et le caractère concerné. Il est possible d'augmenter de façon significative le taux de mutation par l'utilisation des agents mutagènes.

2.3.2. Stabilité et transmission héréditaire :

La mutation est un caractère stable et héréditaire dans le temps car c'est l'ADN qui est modifié et transmis de génération en génération. La mutation est transmise de cellule mère à cellule fille, c'est une transmission verticale.

Cependant, dans une culture pure de mutants, il peut apparaître des cellules ne présentant plus le phénotype mutant.

2.3.3. Spécificité et indépendance :

Une mutation est spécifique d'un caractère déterminé. Elle n'affecte que ce caractère. Une bactérie mutante peut subir une seconde mutation indépendante de la première. Ceci confirme l'intérêt d'associer des antibiotiques pour le traitement des maladies infectieuses.

2.4. Mécanismes biochimiques des mutations :

2.4.1. Les agents mutagènes :

- **Facteurs intrinsèques ou mutation spontanée :**

Les bases nucléiques peuvent être altérées naturellement et il peut arriver que leur remplacement se fasse de manière erronée. De même, l'ADN polymérase peut faire des erreurs pendant la réplication. Ce type de mutation spontanée se produit rarement.

- **Facteurs extrinsèques ou mutation acquise :**

En plus des mutations spontanées, les microbes peuvent être soumis à l'action d'agents mutagènes de l'environnement.

2.4.1.1. Les rayonnements :

Les UV et les rayonnements ionisants altèrent les bases nucléiques.

2.4.1.1. Les agents mutagènes chimiques :

- Les analogues de bases qui sont incorporés dans les brins d'ADN.
- Les agents intercalant qui déforment la double hélice d'ADN en se logant entre les deux brins.

Dans les deux cas, ils favorisent les erreurs de réplication.

2.4.2. Les systèmes de réparation de l'ADN :

L'activité exonucléosique de l'ADN polymérase, lorsque l'ADN polymérase fait un appariement erroné de bases, est capable de s'arrêter et de réparer son erreur. Quand la cellule est en phase de multiplication intense, il se peut que cette erreur ne soit pas réparée.

En dehors de la phase de réplication, des systèmes enzymatiques repèrent les anomalies, excisent une région plus ou moins longue du brin portant l'erreur et une ADN polymérase spécialisée, synthétise la partie manquante.

Lors de la réplication, des lésions trop importantes de l'ADN peuvent bloquer le déroulement de l'ADN. Le blocage de la fourche de réplication déclenche un signal de détresse, qui force l'ADN polymérase à synthétiser le brin fils, même si elle rencontre des erreurs. Ceci conduit à l'incorporation erronée de bases au niveau du brin fils. Ainsi la mutation est le prix à payer pour la survie de la bactérie.

2.4.3. Les effets sur la séquence de l'ADN :

- **Les mutations ponctuelles ou de substitutions :**

Remplacement d'un seul nucléotide. Comme le code génétique est dégénéré, toutes les mutations ponctuelles d'une séquence codante ne conduiront pas à une modification de la protéine codée.

- **Les délétions :**

Correspondent à la perte d'une portion d'ADN. Cette perte est irréversible.

- **Les insertions :**

Correspondent à un gain d'une portion d'ADN.

3° Les transferts génétiques chez les micro-organismes :

Contrairement aux cellules eucaryotes, les bactéries sont incapables de brasser leurs gènes par le biais de la méiose. Cependant, une bactérie peut intégrer dans son génome de l'ADN étranger grâce à la recombinaison.

La recombinaison consiste à intégrer un fragment d'ADN exogène, provenant d'une cellule donneuse dans le chromosome d'une cellule endogène. Cette intégration se fait au niveau de site de recombinaison grâce à des homologies de séquence.

L'ADN exogène peut être transféré dans une cellule receveuse par trois mécanismes différents.

3.1. La transformation :

3.1.1. Définition :

La transformation est un processus qui correspond au transfert d'une molécule d'ADN « nu » et à son intégration dans le chromosome de la cellule receveuse. Pour qu'une cellule puisse être transformée par de l'ADN exogène, elle doit être compétente, c'est-à-dire capable de capter et d'intégrer l'ADN exogène.

3.1.2. Les étapes de la transformation :

Elle s'effectue en 4 étapes :

- La fixation de l'ADN exogène bicaténaire à la surface de la cellule compétente.
- La dégradation d'un brin de l'ADN par une nucléase et pénétration de l'autre dans la cellule.
- L'association du brin intact avec une protéine de compétence.
- L'intégration par recombinaison de l'ADN dans le chromosome de la cellule compétente au niveau d'une zone d'homologie.

3.2. La transduction :

3.2.1. Définition :

C'est le transfert de gènes bactériens par l'intermédiaire de virus.

3.2.2. Cycle lytique et cycle lysogène des bactériophages :

Les bactériophages sont les virus des bactéries, composés d'une capsule protéique renfermant une molécule d'ADN double brin.

Après infection, les bactériophages peuvent adopter deux types de comportements :

- **le cycle lytique :**

- Dégradation de l'ADN de l'hôte.
- Réplication de l'ADN phagique en de nombreuses copies.
- Encapsidation de l'ADN phagique.
- Libération des phages complets après lyse cellulaire.

- **Le cycle lysogène :**

- L'ADN phagique s'intègre dans le chromosome bactérien pour former un prophage.
- Le prophage est répliqué avec le chromosome bactérien.
- Le prophage reste silencieux jusqu'à ce qu'un phénomène inducteur provoque sa libération.
- Le phage libre peut déclencher un cycle lytique.

3.2.3. Les mécanismes de la transduction :

3.2.3.1. La transduction généralisée :

Au cours d'un cycle lytique, un fragment de l'ADN chromosomique peut être encapsidé, de même que l'ADN phagique. Cet ADN chromosomique peut être transféré à une autre bactérie après infection. Parfois cet ADN étranger est intégré dans le chromosome de la bactérie infectée.

3.2.3.2. La transduction spécialisée :

Au cours d'un cycle lysogène, il peut arriver que le prophage quitte le chromosome de l'hôte en emportant une partie contigüe de chromosome. La particule virale peut alors transférer ce fragment d'ADN chromosomique à une bactérie receveuse.

3.3. La conjugaison :

3.3.1. Mécanisme de la conjugaison :

3.3.1.1. Chez les bactéries Gram - :

Les bactéries donneuses possèdent un plasmide particulier appelé facteur F, ou épisome. Ce plasmide porte les gènes nécessaires à la synthèse des pili et au transfert de l'ADN. Ce plasmide peut s'intégrer au sein du chromosome de la bactérie réceptrice au niveau de séquences d'insertion par recombinaison homologue.

On appelle « mâle », les bactéries donneuses qui possèdent le facteur F.

On appelle bactéries « femelles », les bactéries receveuses qui ne possèdent pas le facteur F.

Selon que le facteur est intégré ou non dans le chromosome bactérien, on distingue deux modalités de transfert :

- **Croisement $F^+ \times F^-$:**

Le facteur F est sous forme plasmidique dans la cellule donneuse, F^+ . Il se réplique et migre dans la cellule receveuse qui devient F^+ .

- **Croisement $Hfr \times F^-$:**

Le facteur F est intégré dans le chromosome de la cellule donneuse. Après coupure de l'ADN, celui-ci migre dans la cellule receveuse qui devient F^+ .

3.3.1.2. Chez les bactéries Gram + :

La conjugaison s'effectue sans pili. Les bactéries receveuses sécrètent une substance qui stimule les bactéries donneuses. Ces dernières produisent alors des protéines nommées facteur d'agrégation qui permettent l'adhérence entre les cellules. Ensuite, il se forme des pores entre les cellules qui permettent le passage de l'ADN.