

Chapitre 04:
Transferts génétiques
chez les bactéries

Introduction

Les échanges de matériel génétique entre les bactéries se produisent en dehors des processus de division cellulaire.

Ils sont qualifiés de **transferts de gènes horizontaux**, par opposition aux transferts verticaux se produisant d'une cellule mère vers les cellules filles, lors de la multiplication cellulaire.

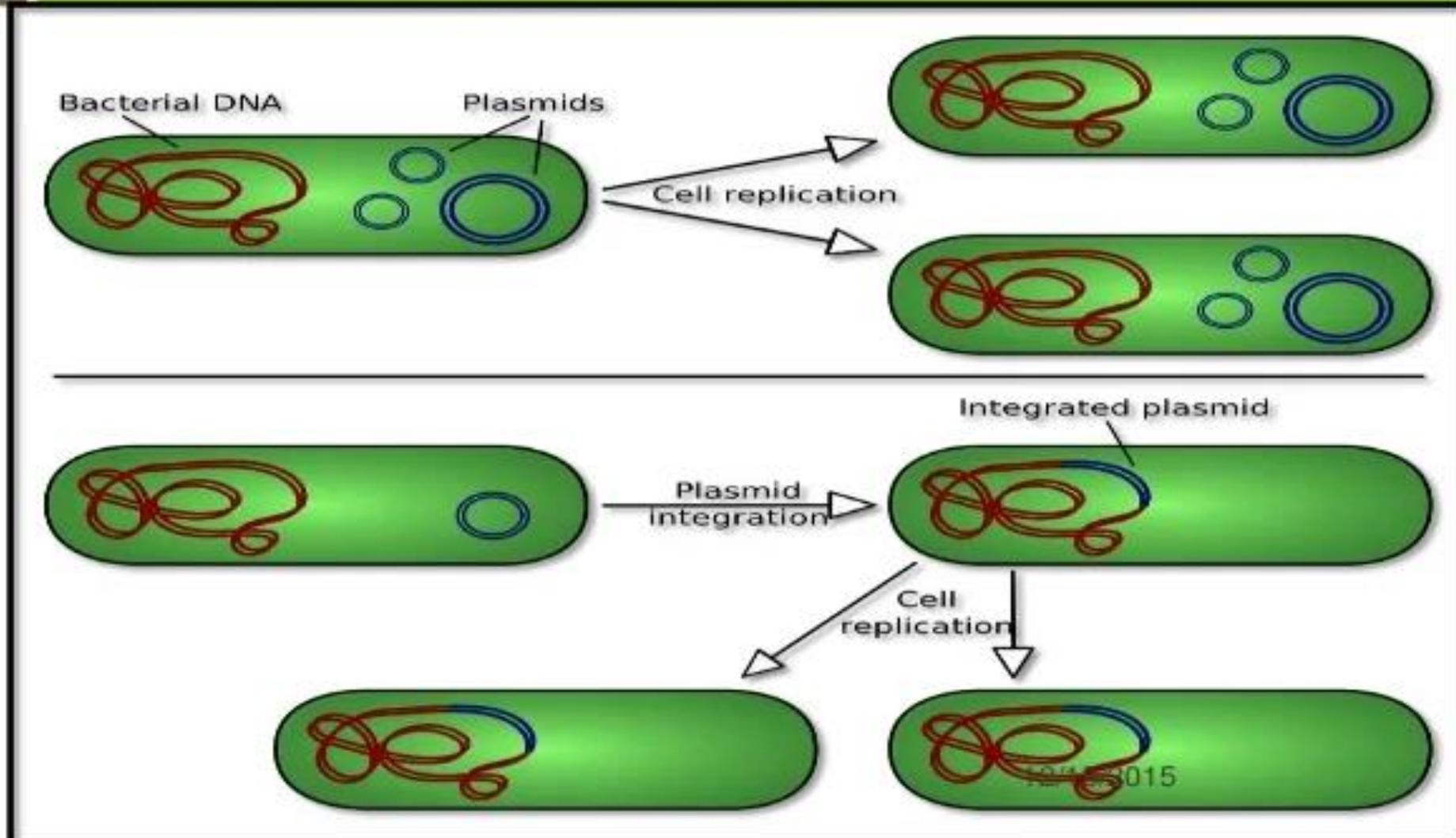
Ces échanges se réalisent selon trois modalités différentes :

- Transformation,
- Conjugaison
- et transduction

et sont à l'origine de la variabilité génétique.

L'ADN introduit, qualifié d'**exogénote**, peut:

- s'intégrer dans l'ADN de la cellule receveuse, **endogénote** et former un **épisode**,
- persister sous forme de **plasmide**,
- ou être détruit.



1- Transformation

- La transformation (naturelle) est le **transfert passif d'ADN d'une bactérie donatrice(généralement morte) à une bactérie réceptrice**, dite en état de **compétence**, caractérisé par sa perméabilité aux grosses molécules. Il s'agit d'un état transitoire qui apparaît en **fin de phase exponentielle de croissance**, lorsque la quantité de nutriments diminue.
- La transformation ne permet 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.

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 acapsulés (non virulents) vivants, entraîne une septicémie mortelle à pneumocoques capsulés vivants.

Il y a donc eu transformation ou « réversion » des pneumocoques acapsulés (R) en pneumocoques capsulés (S).

Le matériel utilisé par Griffith est le pneumocoque, bactérie qui est responsable de la pneumonie chez les Mammifères. Le pneumocoque existe sous deux formes :

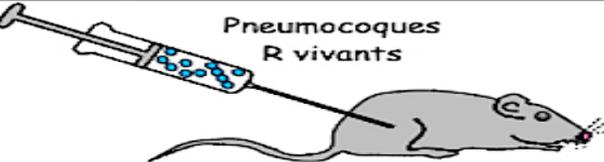
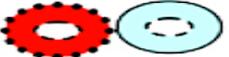
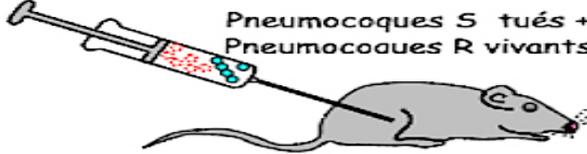
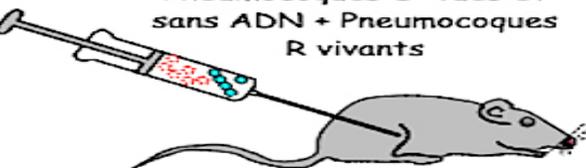
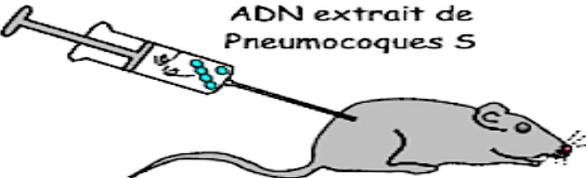
- Une forme virulente, ou pathogène, dite S, avec capsule, qui est résistante à l'élimination par les différentes cellules du système immunitaire ;
- Une forme dite R, non virulente parce que dépourvue de capsule, facilement éliminée par les cellules immunitaires.



Pneumocoques S : possédant une capsule épaisse et formant des colonies lisses (Smooth)



Pneumocoques R : dépourvus de capsule et formant des colonies ruqueuses (Rough)

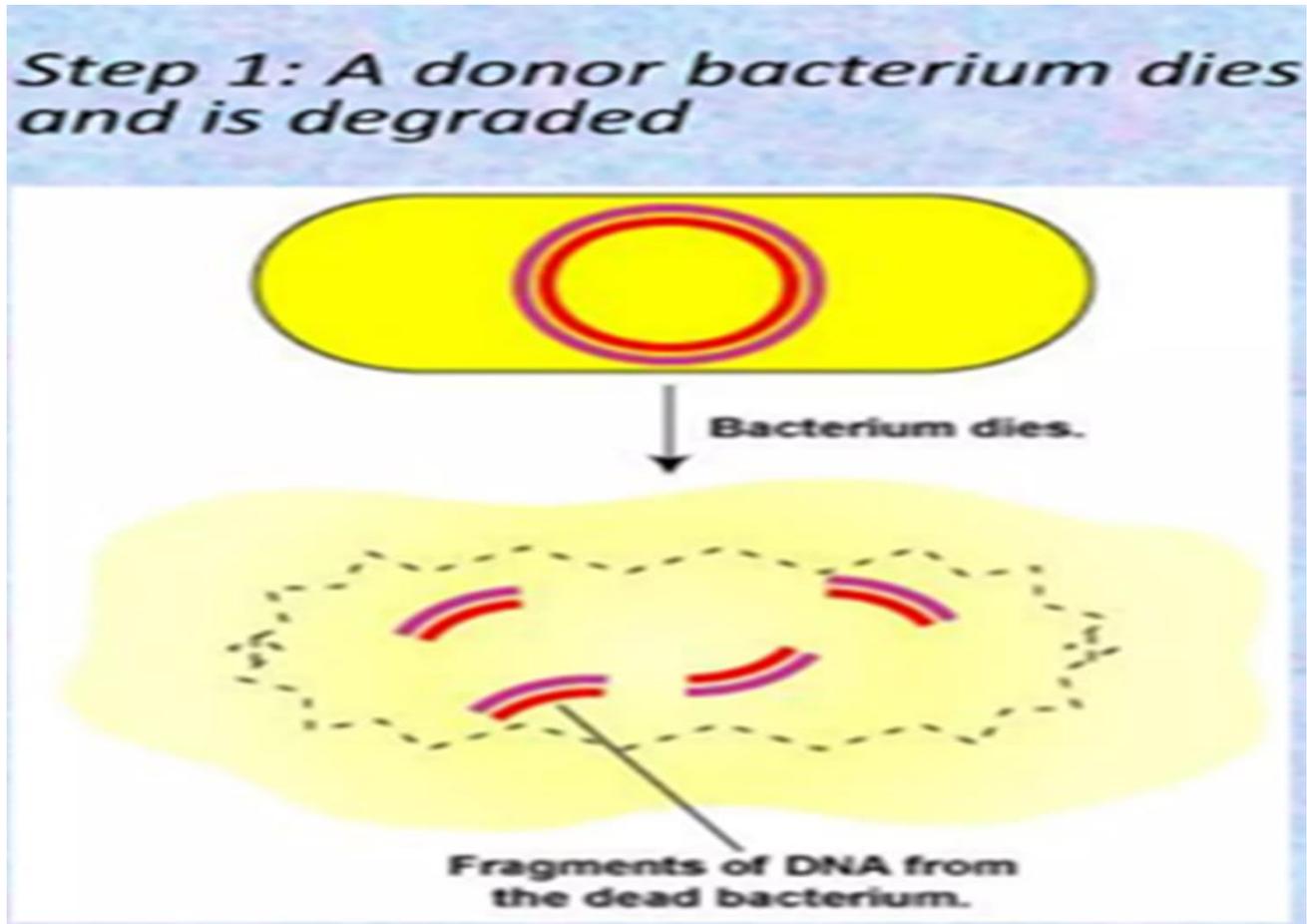
N°	Expériences	Etat de la souris	Analyse du sang de la souris
1	 Pneumocoques S vivants  pneumocoques S vivants	 Mort	Présence de très nombreux pneumocoques S vivants 
2	 Pneumocoques R vivants  Pneumocoques R vivants	 Survie	Absence de tout pneumocoque
3	capsule détruite  Pneumocoques S tués  Pneumocoques S tués	 Survie	Absence de tout pneumocoque
4	 Pneumocoques S tués + Pneumocoques R vivants  Pneumocoques S tués + Pneumocoques R vivants	 Mort	Présence de très nombreux pneumocoques S vivants 
5	 Pneumocoques S tués et sans ADN + Pneumocoques R vivants  Pneumocoques S tués et sans ADN + Pneumocoques R vivants	 Survie	Absence de tout pneumocoque
6	 Pneumocoques R vivants + ADN extrait de Pneumocoques S  Pneumocoques R vivants + ADN extrait de Pneumocoques S	 Mort	Présence de très nombreux pneumocoques S vivants 

Mécanisme de transformation

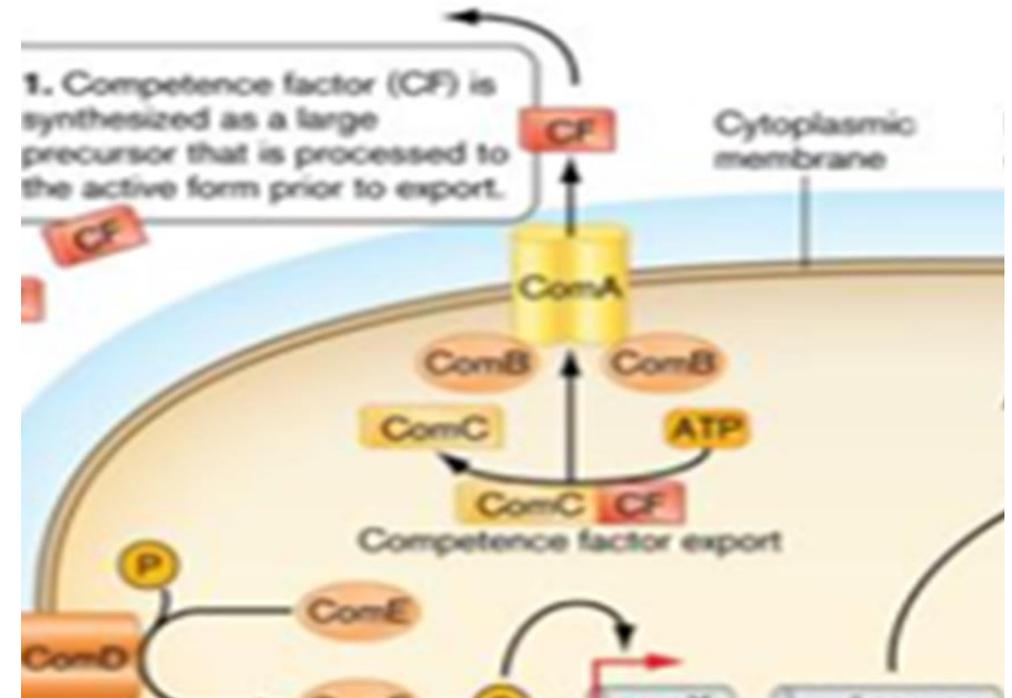
La transformation naturelle peut s'observer chez un nombre limité d'espèces bactériennes à **Gram positif** (*Streptococcus* et *Bacillus*) ou à **Gram négatif** (*Neisseria*, *Branhamella*, *Acinetobacter*, *Haemophilus*).

Elle se produit selon les étapes suivantes:

-**Apparition de l'état de compétence** = synthèse du facteur de compétence (CF).

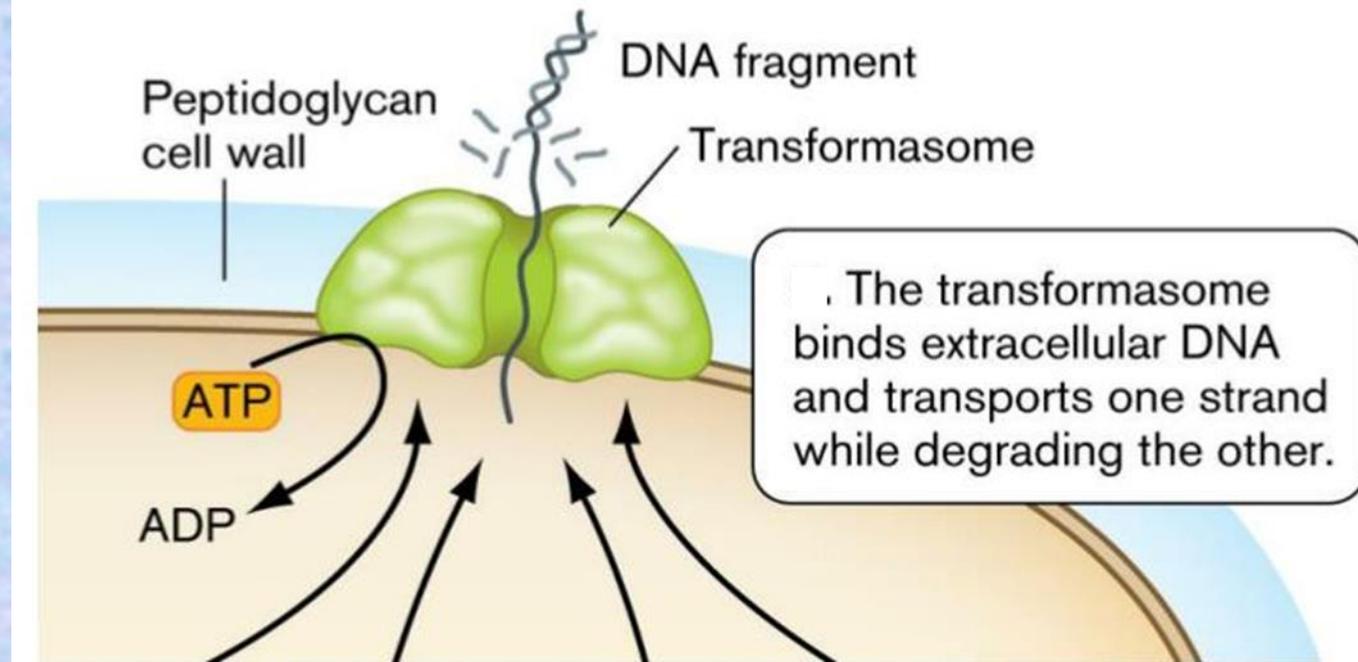
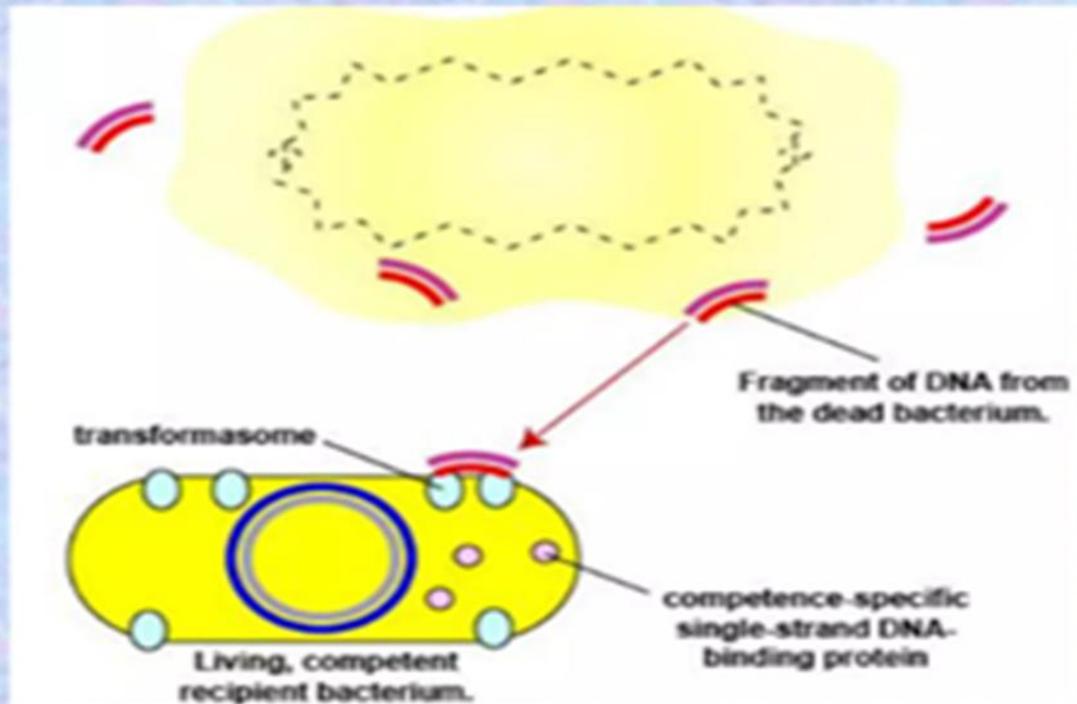


Synthèse et libération de CF (par la Cellule réceptrice)



Apparition, à la surface de la cellule, de complexes protéiques ou de vésicules, selon le type de bactérie nommés transformasomes.

Step 2: DNA fragments, from the dead donor bacterium bind to transformasomes on the cell wall of a competent, living recipient bacterium.

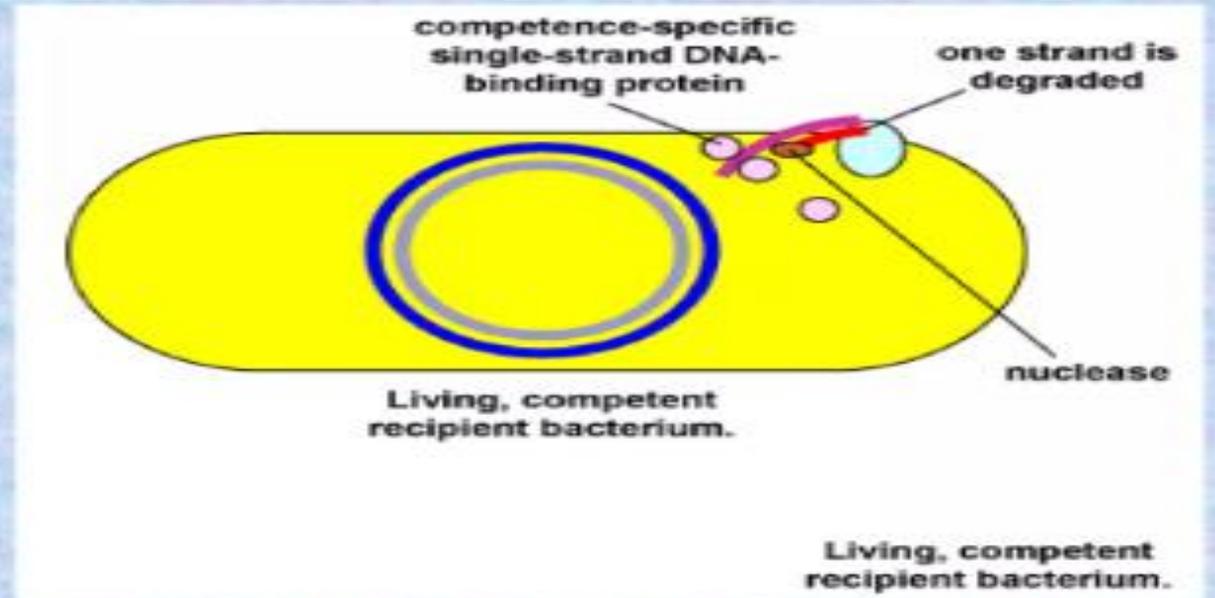


Transformasome

- Ces structures permettent de capturer l'ADN exogène et une nucléase permet la dégradation de l'un des deux brins pendant que l'autre pénètre dans le cytoplasme.

Step 3: Then, a nuclease degrades one strand of the donor fragment and the remaining DNA strand enters the recipient.

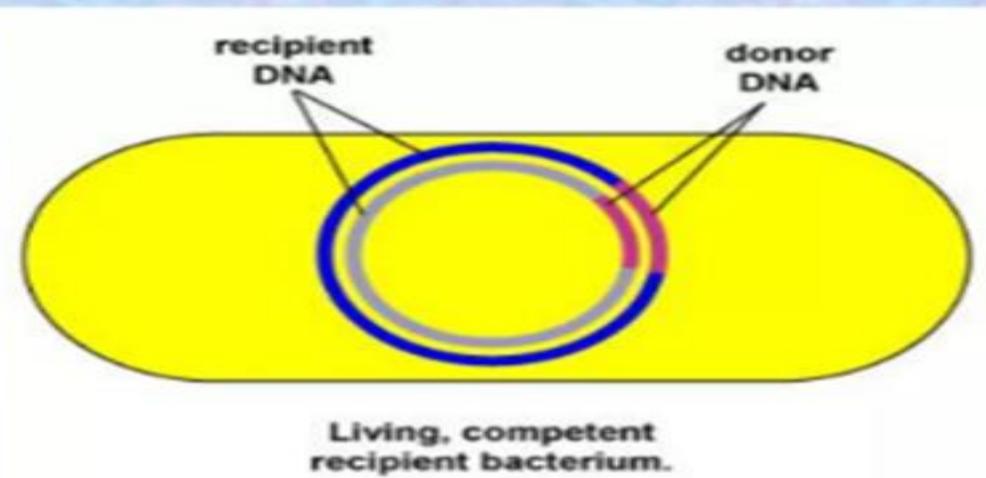
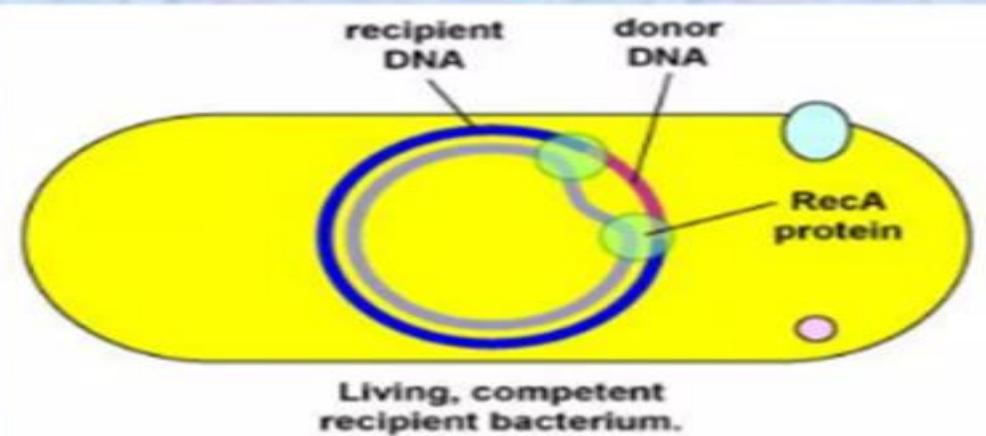
Competence-specific single-stranded DNA-binding proteins bind to the donor DNA strand to prevent it from being degraded in the cytoplasm.



- Par le biais de la protéine Rec A, l'ADN peut alors être recombiné avec le chromosome bactérien s'il existe des homologies de séquences.

S'il n'y a pas une homologie l'ADN peut alors être dégradé par les enzymes cellulaires.

Step 4: RecA proteins promotes genetic exchange between a fragment of the donor's DNA and the recipient's DNA This involves breakage and reunion of paired DNA segments.



Transformation artificielle

Toutes les bactéries ne sont pas naturellement compétentes mais peuvent le devenir suite à un **traitement enzymatique ou chimique** de la paroi bactérienne avant sa mise en contact avec l'ADN.

Exemple: utilisation de chlorure de calcium (CaCl_2) qui fragilise la membrane.

Culture d'*E. coli* jusqu'à que l' densité optique atteint 0,5 à 600 nm



La culture est refroidi dans la glace



Centrifugation à 6000 rpm/5min à 4°C



Les cellules sont mis en suspension par 20 ml de CaCl_2 glacial (50mM)



Les cellules en état de compétence peut être utilisées directement ou stockées à -80°C

2-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'une facteur de sexualité ou de fertilité (facteur F)**. Celui-ci permet la synthèse de **pili sexuels**.

Mise en évidence de la conjugaison

La conjugaison a été découverte par Lederberg et Tatum (1946). Ces deux chercheurs ont obtenu différentes souches mutantes (souches auxotrophes pour différents aminoacides et vitamines).

Expérience

Ils mélangent deux souches (Yco et Y24) auxotrophes pour des substances différentes, mais ces deux souches sont complémentaires et peuvent par recombinaison produire des souches recombinées prototrophes.

Le mélange des souches mutantes ce fait dans un milieu complet, ensuite et après un certain temps les bactéries sont lavées et placées dans un milieu minimum pour détecter d'éventuelles recombinants.

Résultats

Lederberg et Tatum ont obtenu quelques colonies qui poussent sur milieu minimum bien que leur fréquence est très faible. Ces prototrophes ne peuvent donc être dus qu'à la recombinaison entre les génomes des deux souches mutantes

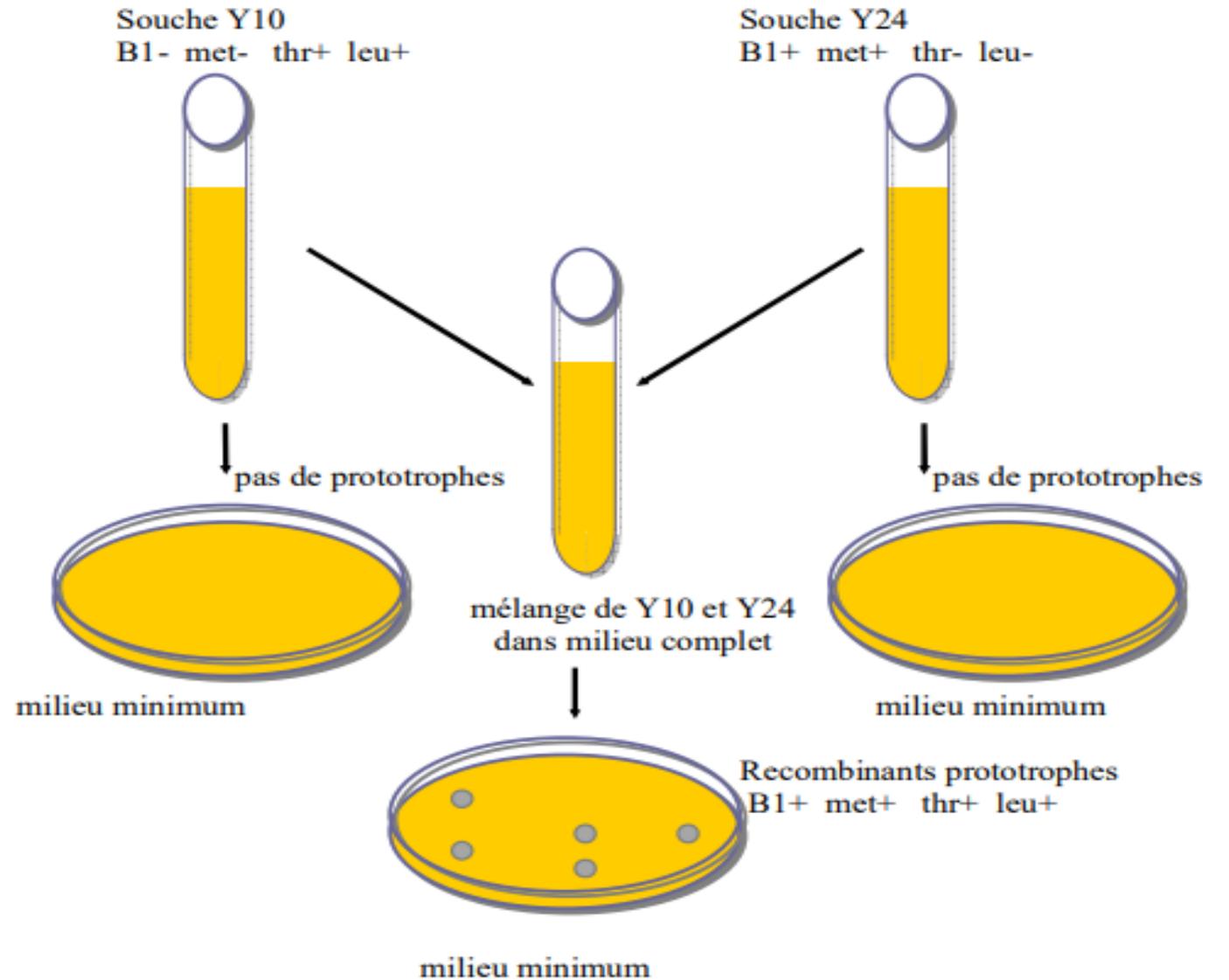


Figure 1. Expérience de Lederberg et Tatum, conçue pour étudier la recombinaison génétique par conjugaison chez *E.coli*.

Quelques caractères de la conjugaison

➤ Spécificité

-Le transfert d'ADN chromosomique ne se produit qu'entre bactéries d'une même espèce, et surtout chez les bactéries à **Gram négatif** telles que les entérobactéries (*E. coli*, *Salmonella* et *Pseudomonas aeruginosa*).

-Le transfert d'ADN extrachromosomique (plasmide) est en revanche plus répandu parmi les espèces bactériennes et est moins spécifique d'espèce.

➤ 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+). 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-).

➤ Contact ou appariement

Le transfert chromosomique n'est possible qu'après appariement entre bactéries donatrice et réceptrice.

Remarque

Il a été ensuite découvert que certaines souches bactériennes de type F⁺, croisées avec des F⁻ donnent une très grande fréquence de recombinants dans la descendance. Ces bactéries sont désignées par Hfr (haute fréquence de recombinaison).

Il a été par la suite démontré que les bactéries Hfr avaient le facteur de fertilité F qui est **intégré** au chromosome bactérien et forme **un épisome**, alors qu'il est **libre** chez les bactéries F⁺.

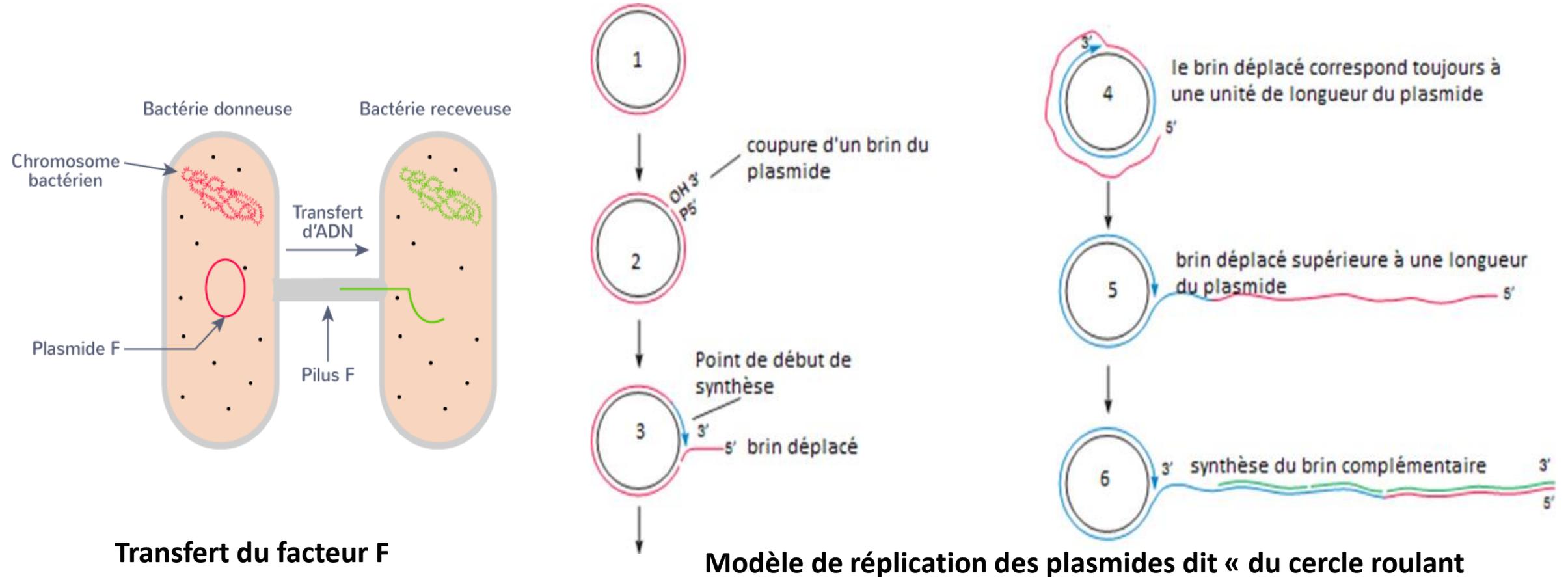
Donc la conjugaison chez les bactéries consiste en deux types de croisement : - un croisement **F⁺ x F⁻**
et un croisement **Hfr x F⁻**

Croisement $F^+ \times F^-$

La conjugaison commence par l'établissement du tube de conjugaison par la bactérie F^+ .

Puis le facteur F (plasmide F) est coupé à un certain endroit puis le brin externe qui porte l'extrémité 5' commence à migrer vers la bactéries F^- . Le brin intérieur qui reste au niveau de la bactérie F^+ synthétise un brin complémentaire, tandis que le brin qui migre vers la bactérie F^- synthétise aussi un brin complémentaire (model « rolling circle »).

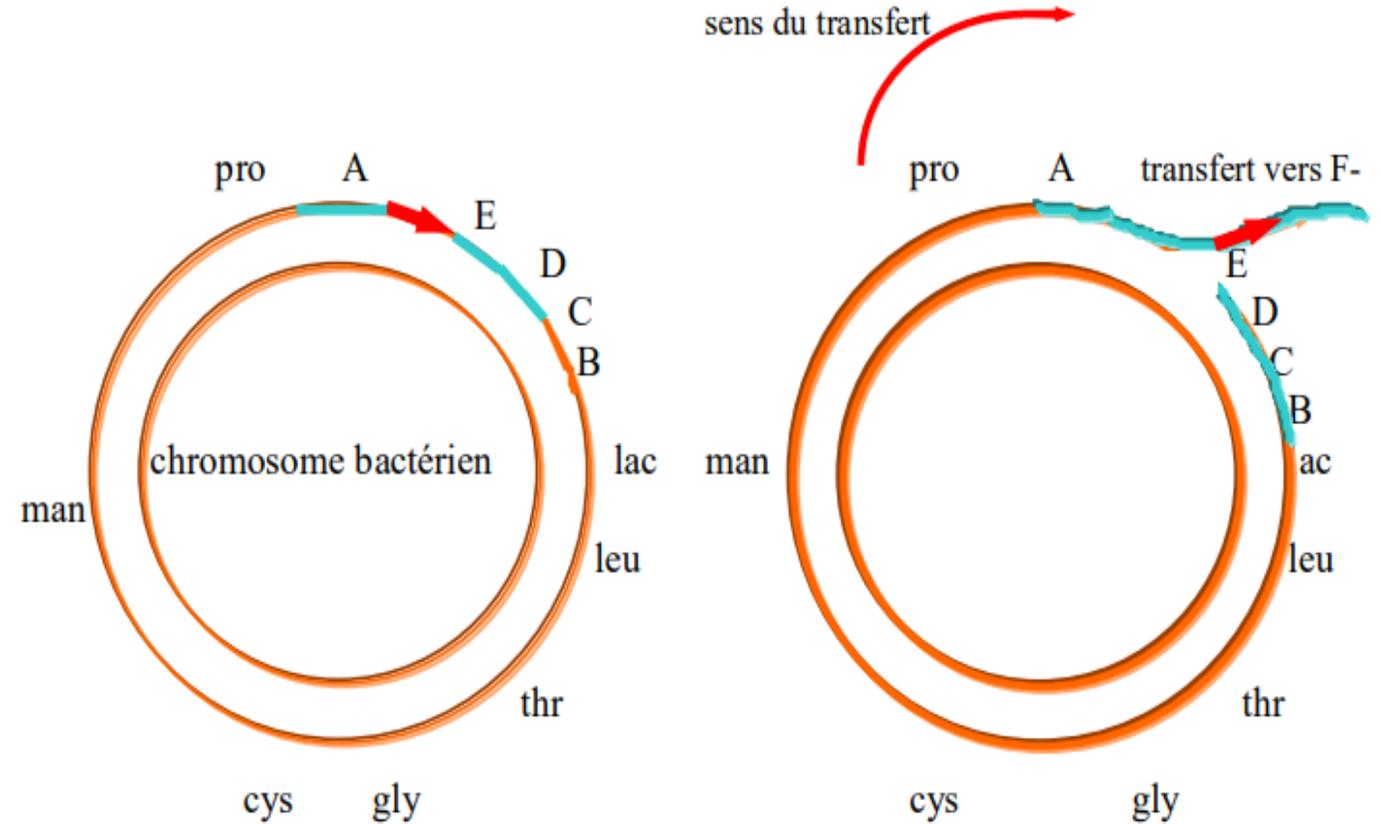
A la fin chacune des deux bactéries possède une copie du facteur F.



Croisement Hfr × F⁻

Chez les bactéries Hfr, le facteur de fertilité est intégré au chromosome bactérien. il peut alors le mobiliser.

Le mécanisme du transfert est alors le même que celui décrit pour le croisement F⁺ par F⁻. Mais la coupure qui se fait au niveau du facteur F va ouvrir le chromosome et le brin extérieur du chromosome va migrer vers la bactérie F⁻.



Site d'intégration du facteur F au niveau de chromosome bactérien. Point de cassure du chromosome et ordre dans lequel les gènes sont transférés.

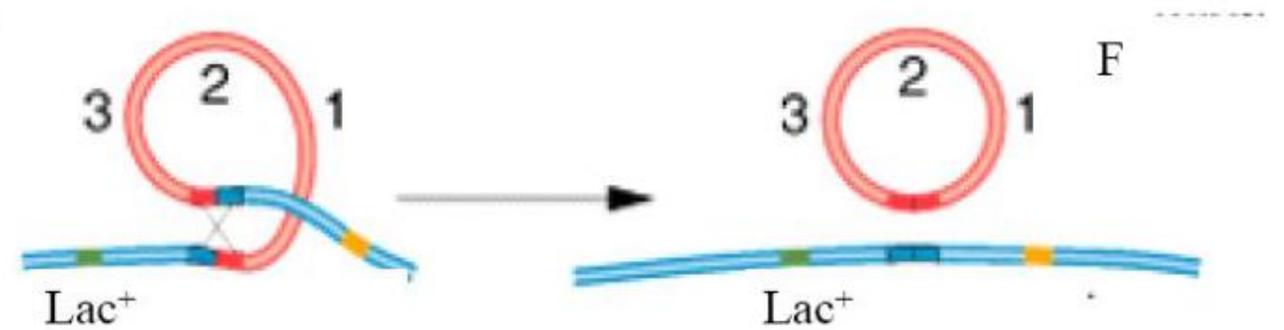
En bleu Facteur F intégré dans le chromosome (en rouge)

Sexduction ($F' \times F^-$)

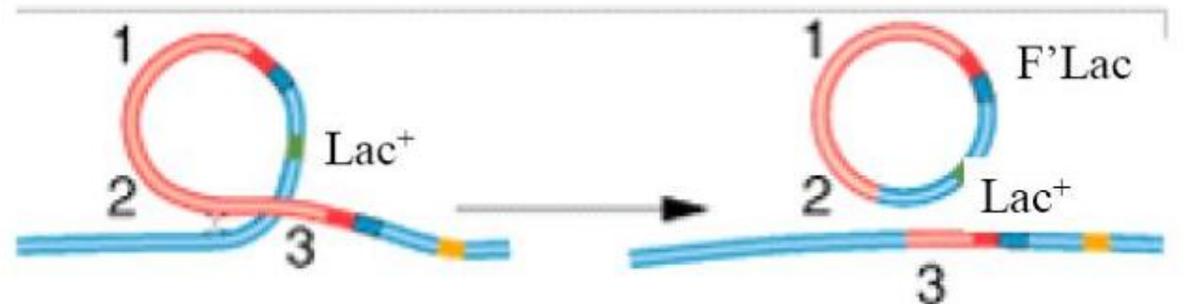
L'intégration de l'épisome dans le chromosome n'est pas stable et les épisomes reviennent à l'état libre. Les épisomes transportent parfois avec eux des fragments de gènes chromosomiques. Un tel facteur F qui intègre certains gènes chromosomiques est appelé facteur F prime (F').

Le croisement F' avec F^- , conduit au transfert du facteur F et les gènes de l'hôte qu'elle transporte avec elle.

Ce processus de transfert est nommé la **sexduction**.



Sortie normale du F du chromosome



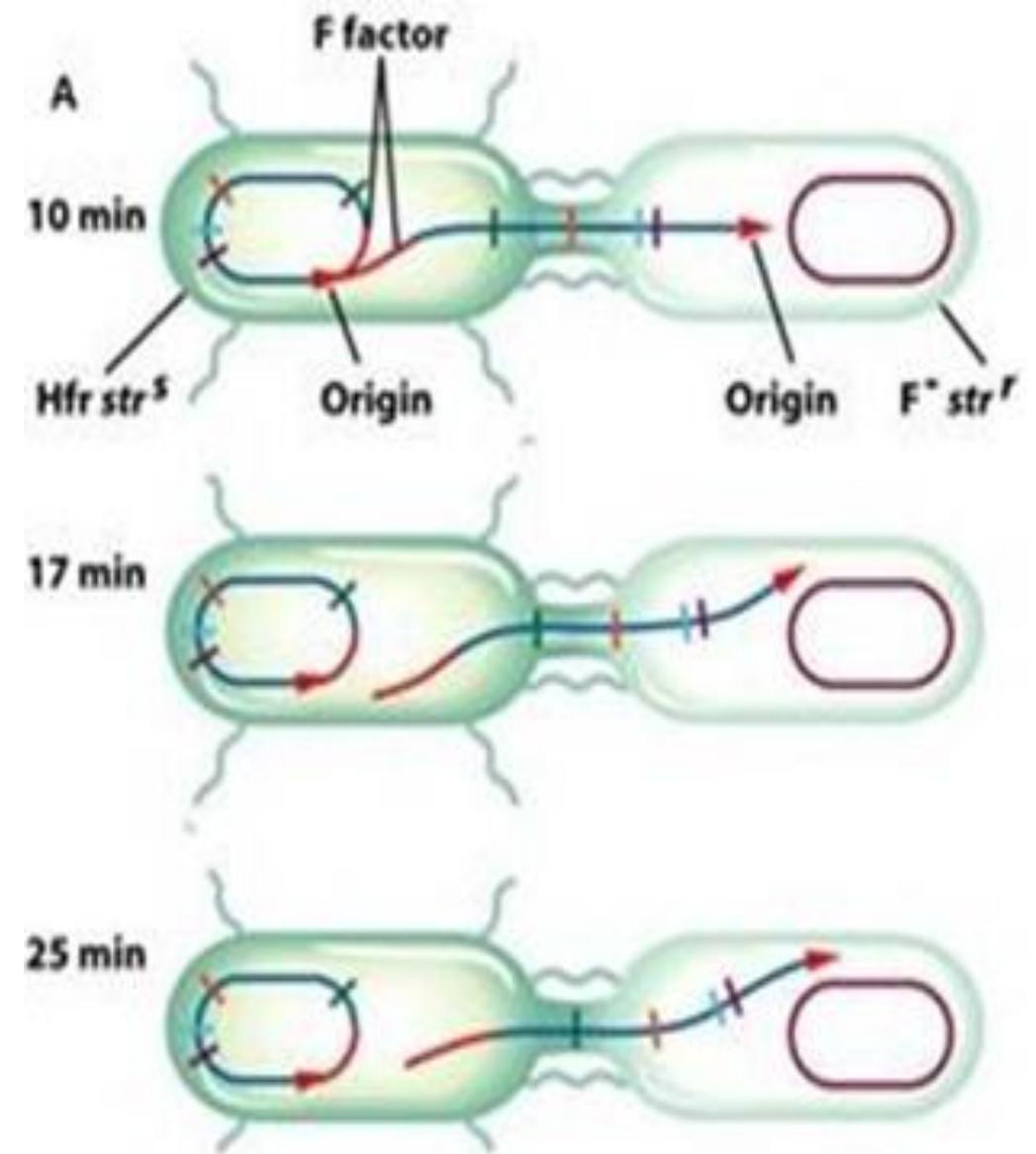
Mauvaise sortie du F du chromosome F'

Cartographie génétique

Le mécanisme par lequel il y a transfert de gènes chromosomiques de bactéries Hfr vers des bactéries F⁻, nous donne la possibilité de cartographier les gènes du chromosome bactérien.

Le passage des gènes de Hfr vers F⁻ se fait de façon progressive dans le temps et dans un ordre bien déterminé. Ceci fait que **plus un gène est proche de l'origine du transfert plus le temps qui lui faut pour passer vers F⁻ est court et plus la fréquence des recombinants pour ce gène est grande.**

Dans la pratique on utilise la méthode de la conjugaison interrompue pour achever la cartographie des gènes chromosomique. Cette technique consiste en l'interruption de la conjugaison entre Hfr et F⁻ à des intervalles de temps réguliers et chercher les recombinants obtenus à ces différents temps. Ainsi on peut mesurer le temps nécessaire pour le passage d'un gène donnée et on dresse une carte génétique dont la distance entre les gènes est exprimée en minutes.



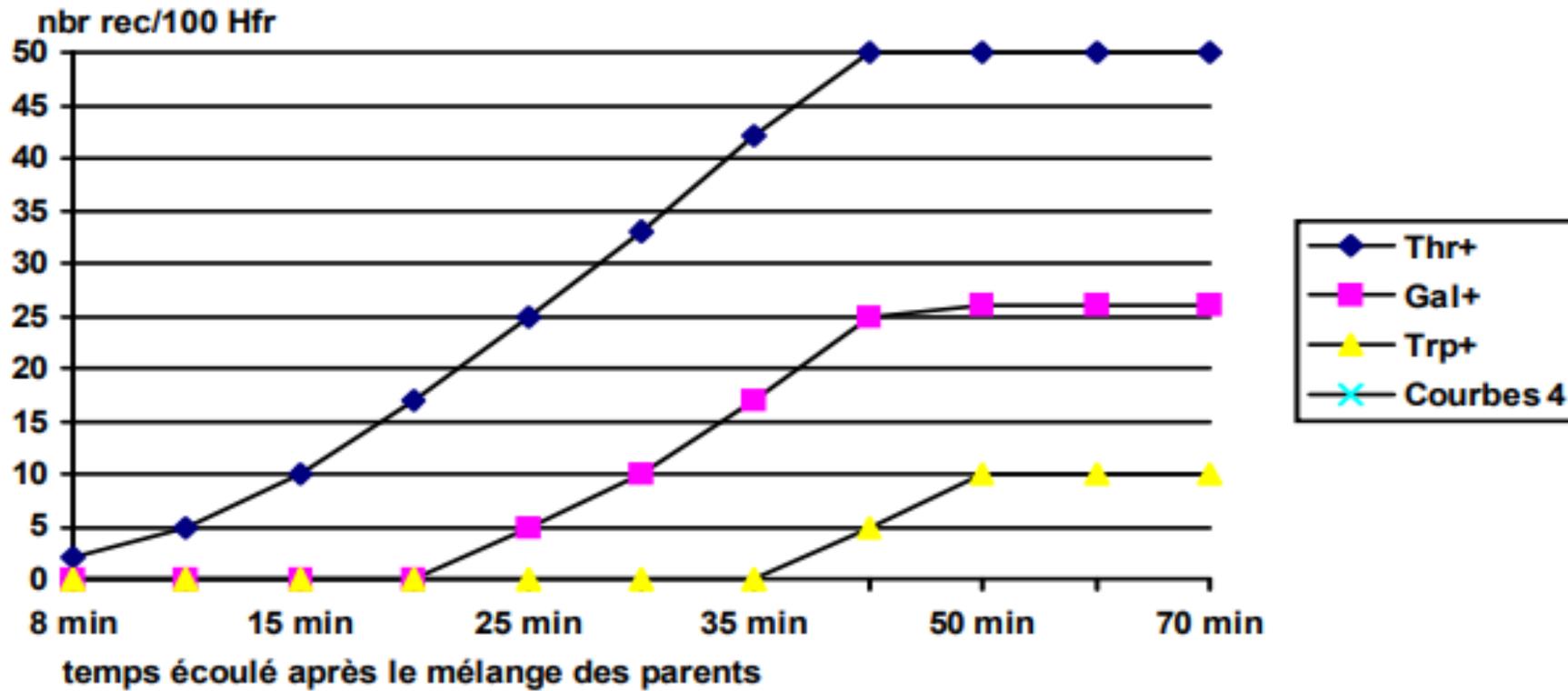
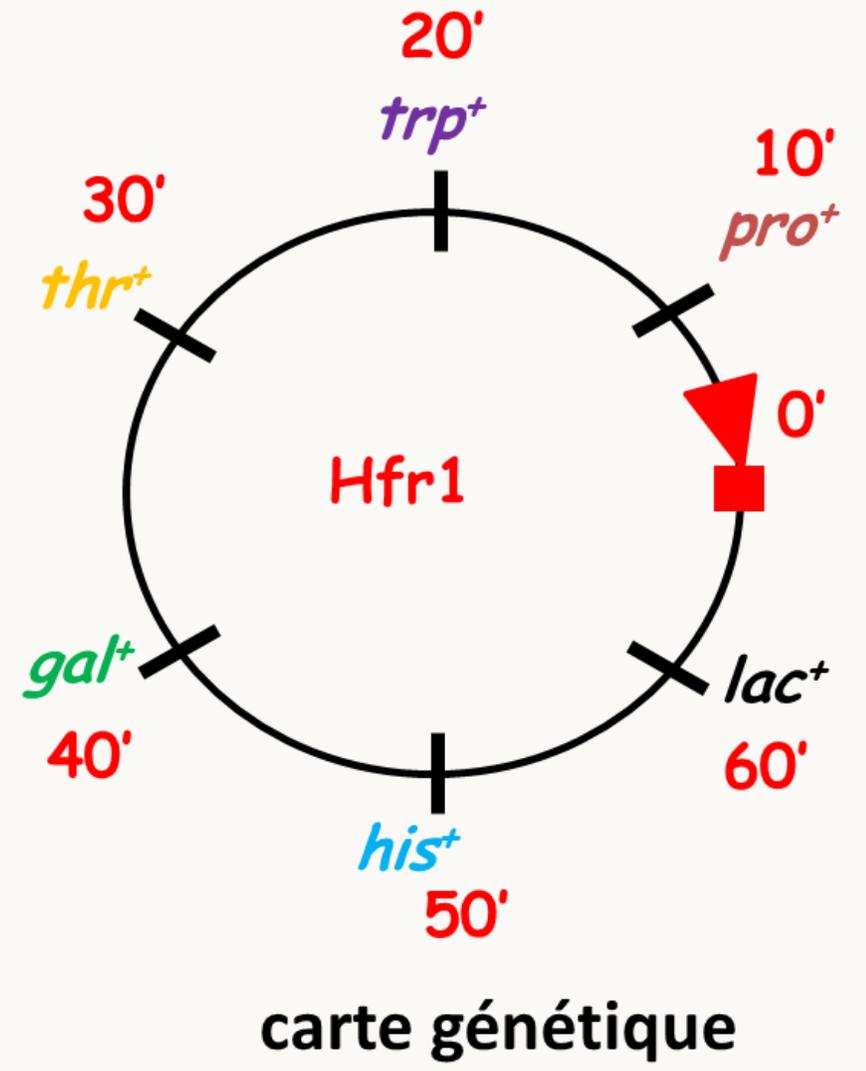
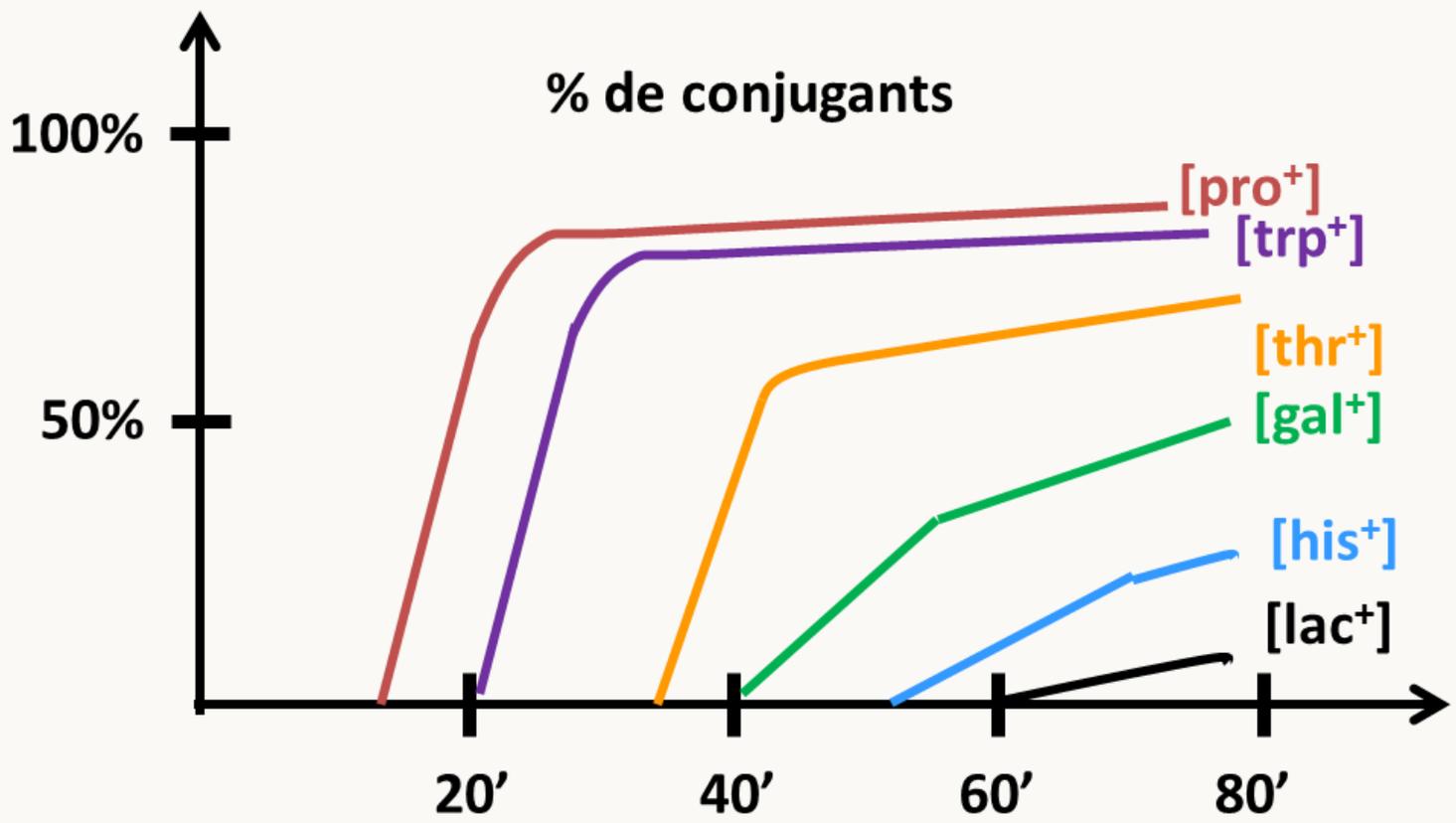
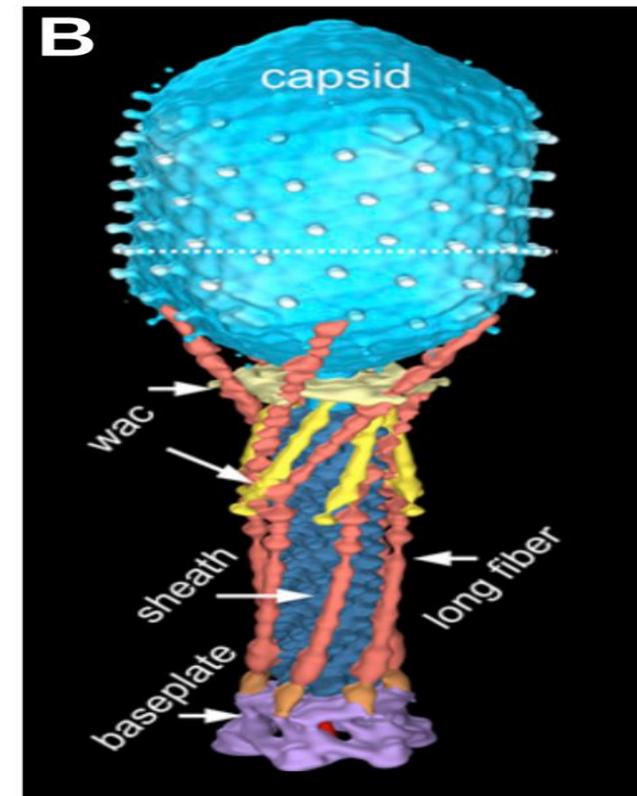
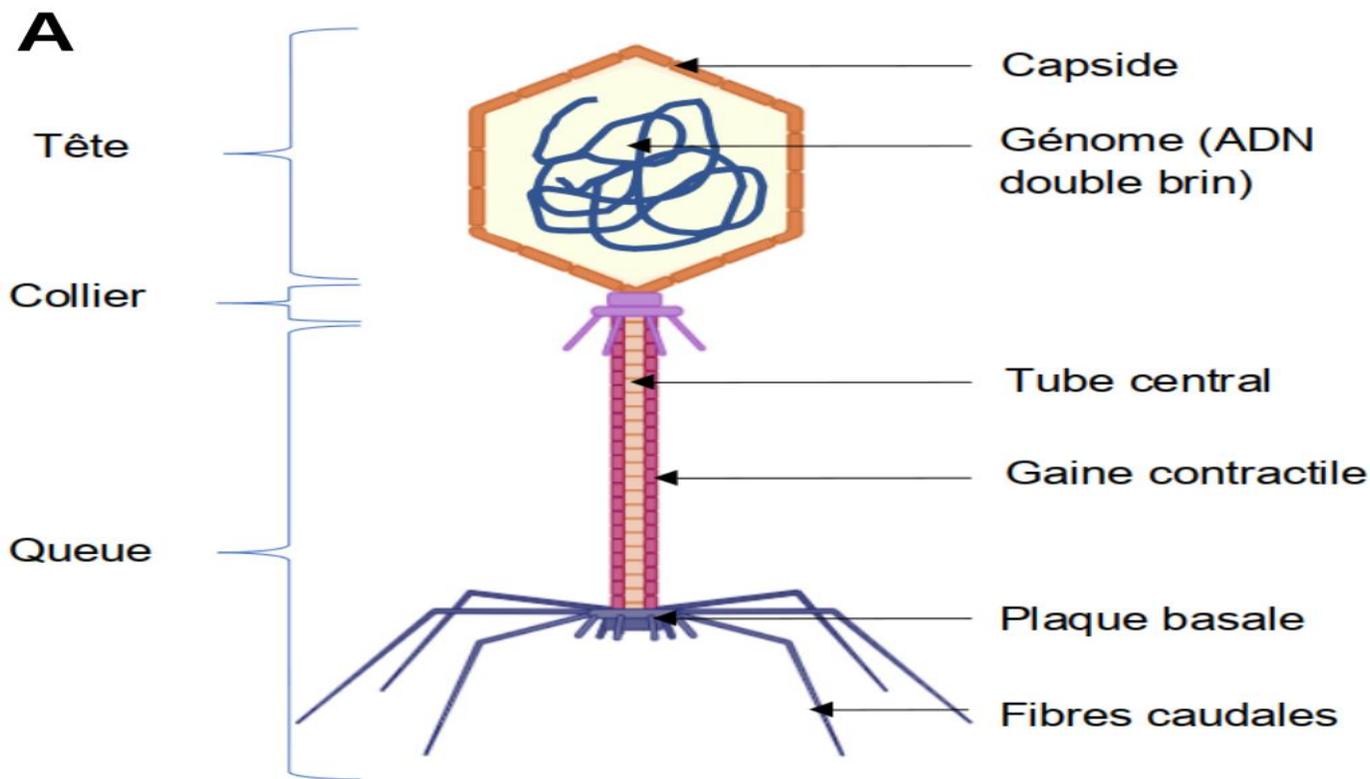


Illustration du principe de cartographie de gène chromosomique par la technique de la conjugaison interrompue.



3- Transduction

- La transduction est un transfert d'ADN chromosomique ou extra-chromosomique entre bactéries appartenant à une même espèce, via des bactériophages dits transducteurs.
- Un bactériophage est un virus qui se multiplie dans les bactéries.
- Il se compose d'un «chromosome» d'acide nucléique (ADN ou ARN), entouré d'une paroi de protéines: capsid. Le tout forme une nucléocapside.

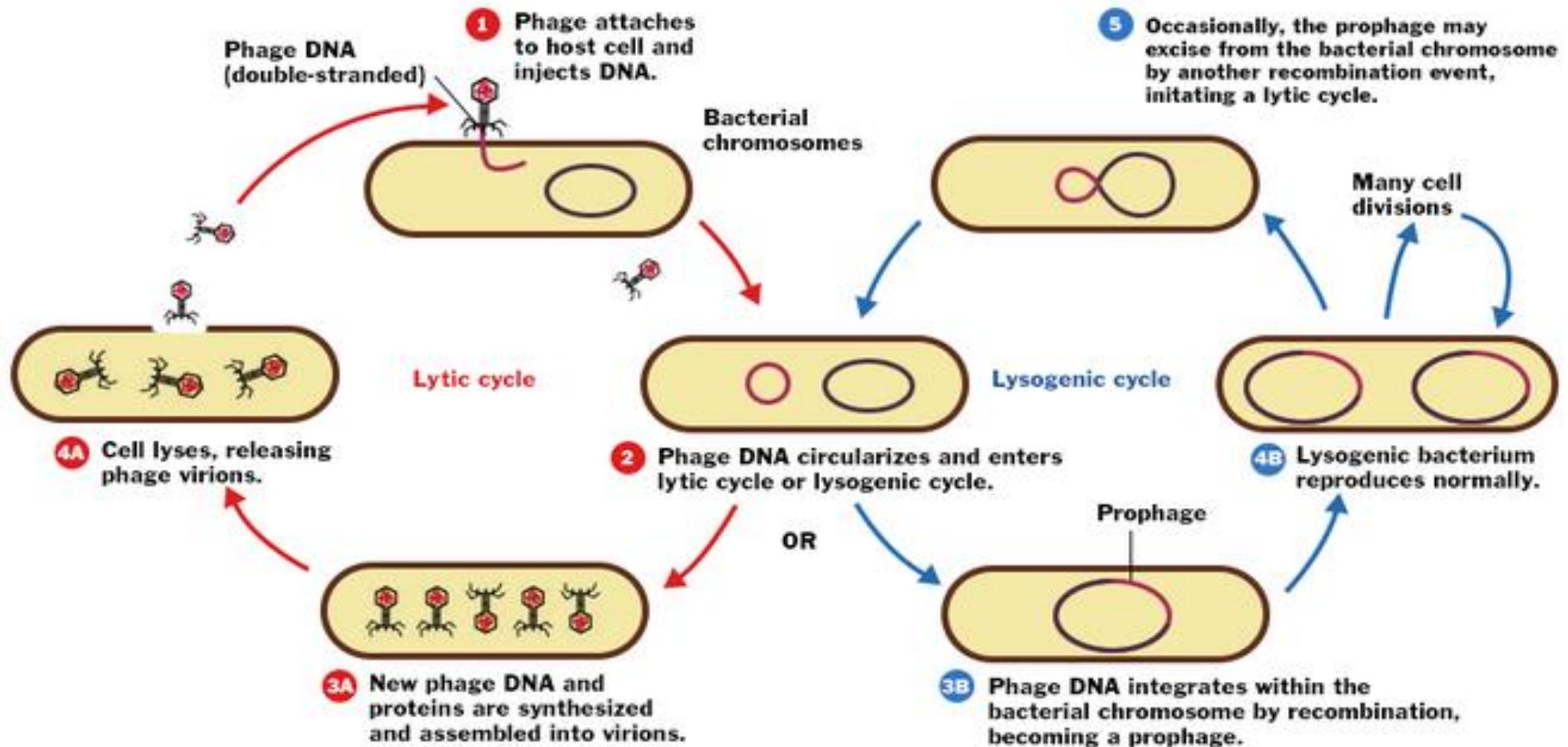


Cycle lytique et lysogénique

Quand un bactériophage infecte une bactérie, ce dernier détourne la machinerie de synthèse de sa cellule hôte pour assurer sa propre multiplication, on connaît deux types de cycles:

Cycle lytique

- Ce type de cycle est causé par un bactériophage dit **virulent**.
- Après infection, les synthèses protéiques bactériennes sont inhibées et le chromosome bactérien détruit.
- Le génome virale est répliqué en un très grand nombre et il y a synthèse d'un très grand nombre de capsides virales.
- Les capsides et les génomes virales sont assemblés pour former un très grand nombre de particules virales.
- La bactérie finit par être détruite (lysée) et il y a libération dans le milieu de toutes ces particules virales qui vont pouvoir aller infecter d'autres bactéries.



Cycle Lytique et Lysogénique

Cycle lysogénique

- Causé par des bactériophages dit «tempérés » qui n'entraîneraient pas systématiquement la lyse de la bactérie.
- Dans ce cas le génome virale qui est introduit dans une bactérie va s'intégrer au chromosome bactérien pour constituer ce qu'on appelle un **prophage**.
- Le prophage va se répliquer en même temps que le chromosome bactérien et va donc être transmis aux bactéries filles issues de la division de la bactérie initiale.
- Sous certaines conditions du milieu environnant le prophage peut s'exciser du chromosome et induit un cycle lytique.

Types de transduction

Transduction généralisée

Quand un bactériophage **virulent** infecte une bactérie, il y a dégradation du chromosome de la cellule hôte en segments de différentes longueurs. Il arrive que par fois il y a encapsidation accidentelle d'un segment du chromosome bactérien. De tel particule véhiculant un segment du chromosome bactérien va transduire l'information génétique vers une autre bactérie.

Dans ce type de transduction n'importe quel segment du chromosome de la cellule hôte peut être transduit et donc n'importe quel gène peut être transduit.

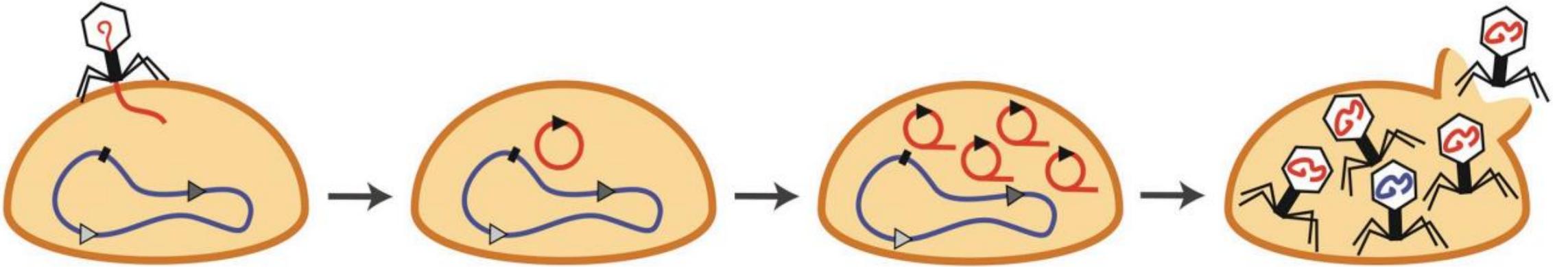
Transduction localisée ou spécialisée

La transduction spécialisée est assurée par des bactériophages **tempérées**. Elle est limitée au transfert d'ensembles spécifiques de gènes.

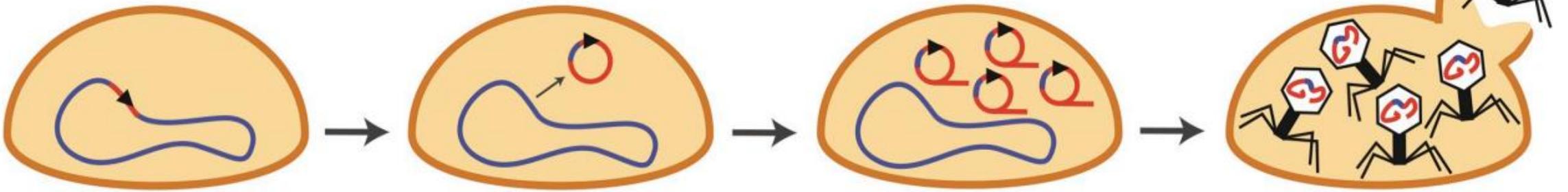
Dans certains cas, des particules transductrices spécialisées apparaissent lorsque l'ADN de l'hôte viral et bactérien est encapsidé sous forme de molécule hybride (le virus s'excise du chromosome de l'hôte en emportant avec lui un segment du chromosome bactérien).

De tels particules en allant infecter d'autres bactéries.

Generalized



Specialized



Transduction généralisée et spécialisée