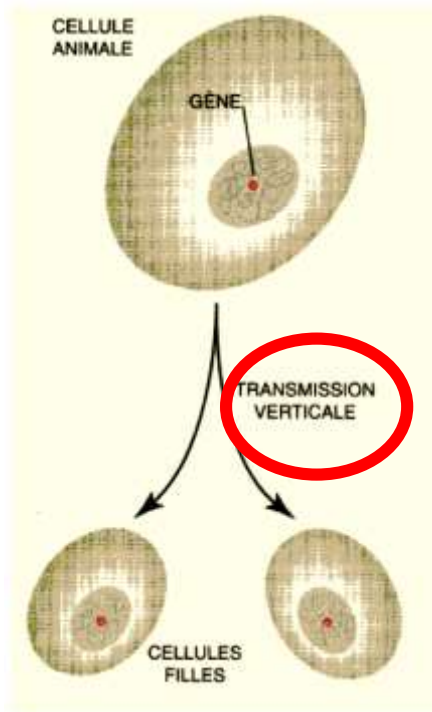


Chapitre 2 : Transferts génétiques horizontaux

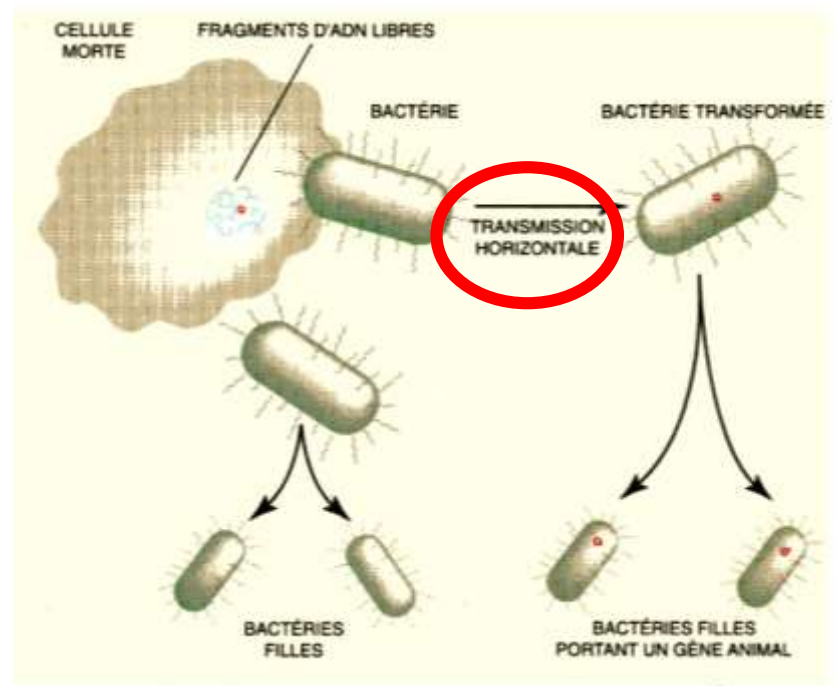
Introduction

La génétique bactérienne se fonde sur trois phénomènes ou mécanismes naturels permettant, chez les bactéries, l'entrée d'ADN exogène venant compléter ou remplacer localement l'information endogène.

Dans la nature, il existe deux moyens pour les microorganismes de transférer le patrimoine génétique



Transfert vertical de gènes



Transfert horizontal de gènes

- le transfert « vertical » de gènes qui se fait entre un « parent » et sa descendance.
- le transfert « horizontal » de gènes qui a lieu entre deux organismes distincts.

- les transferts de gènes :

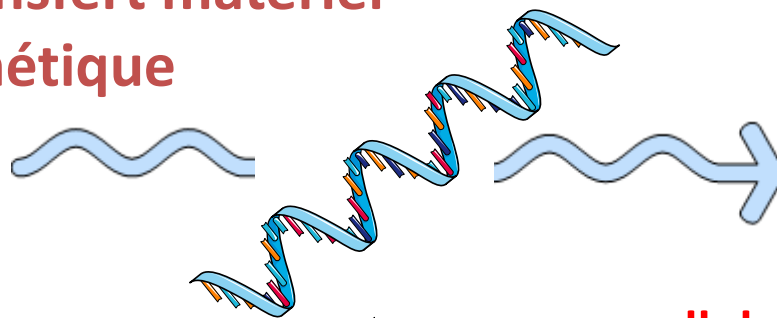
phénomènes rares chez les bactéries



cellule donatrice

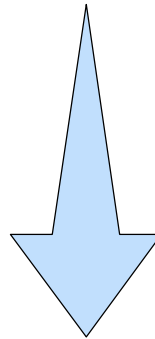
génom de la cellule
donatrice = **exogénote**

Transfert matériel
génétique



cellule réceptrice

génom de la cellule
réceptrice = **endogénote**



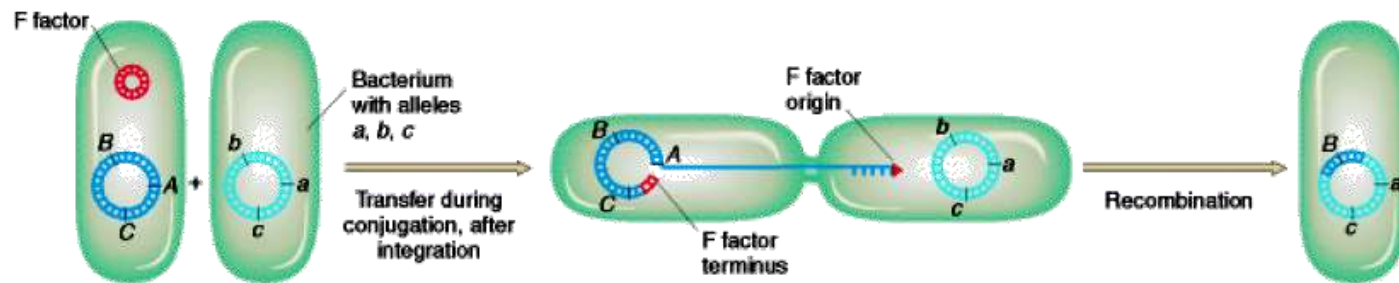
Il existe : **3 grands mécanismes**

d'échanges d'ADN entre bactéries donatrices et bactéries réceptrices

Les différents transfert horizontaux de gènes

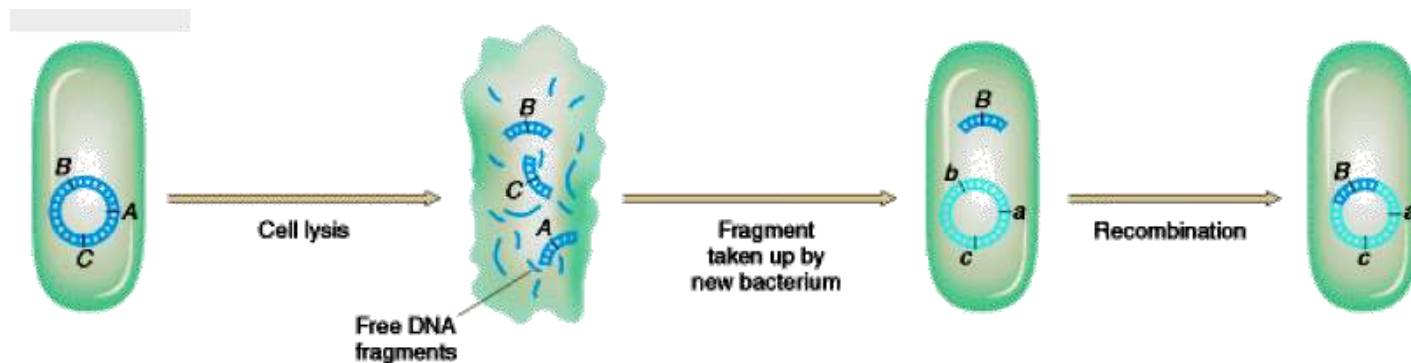
Conjugaison:

Bactérie + bactérie



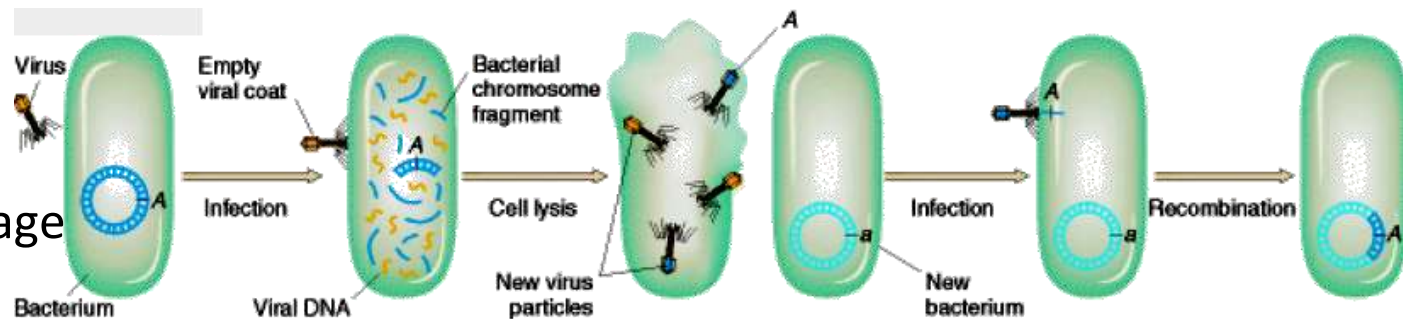
Transformation:

Bactérie + ADN libre

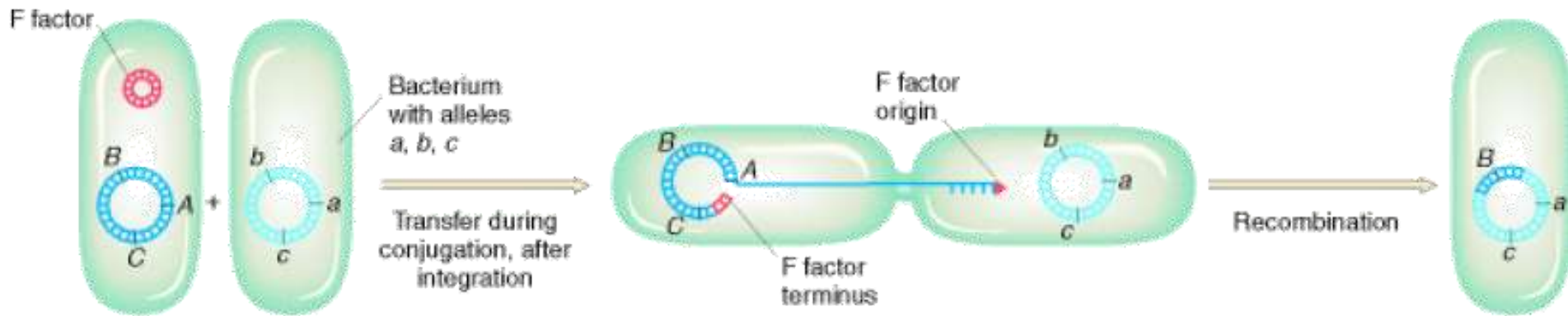


Transduction:

Bactérie + bactériophage



La conjugaison



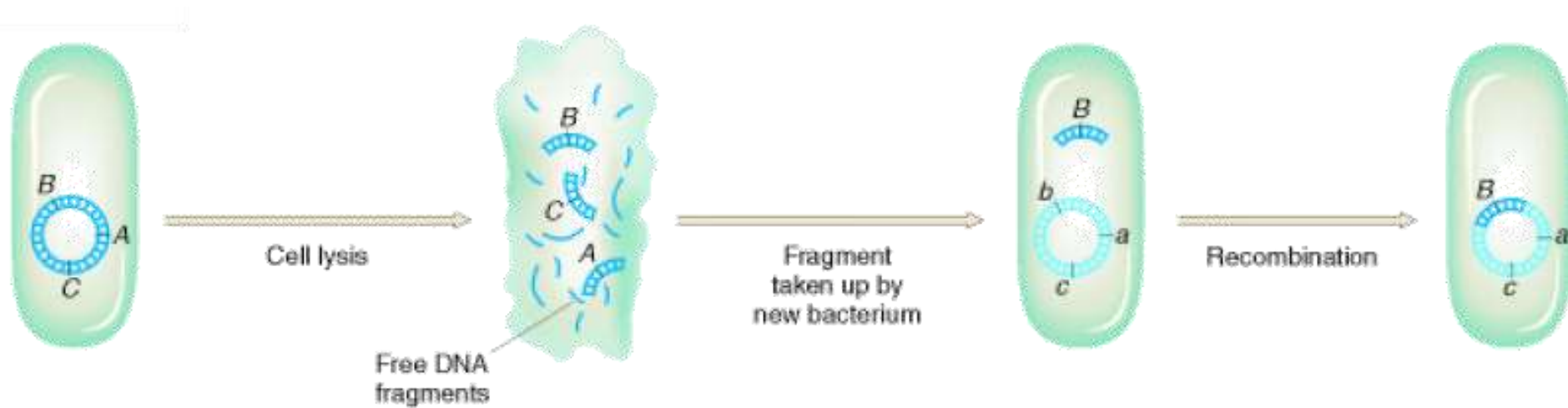
transfert génétique **unidirectionnel**

d'un **fragment d'ADN chromosomique ou plasmidique**

par **contact direct** entre deux bactéries « **sexuellement** »
différenciée :

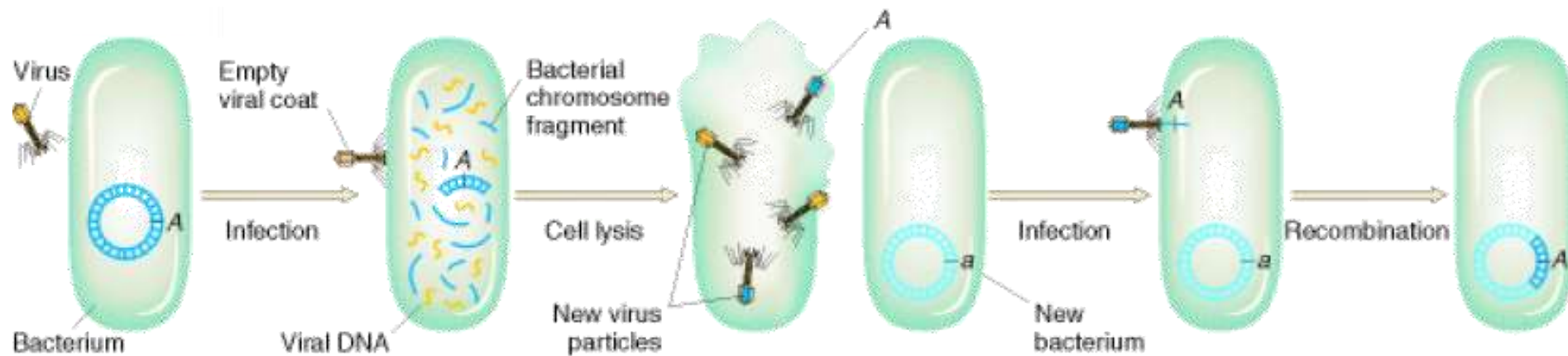
une donatrice = **mâle** et une réceptrice = **femelle**

La transformation



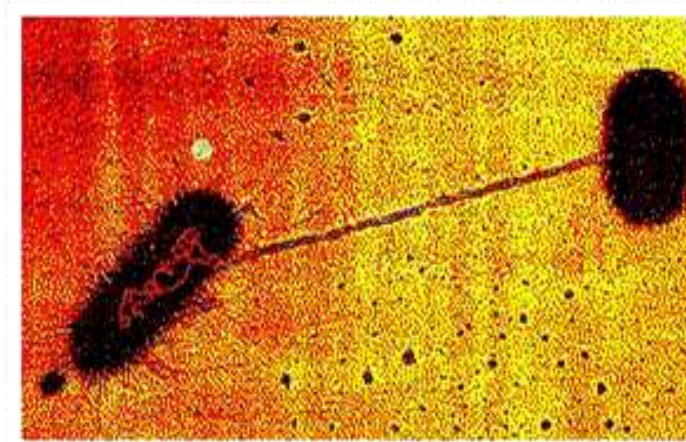
transfert génétique au cours duquel **un fragment d'ADN bicaténaire, libre, nu, en solution** est **capté** par une **bactérie réceptrice** avant d'être éventuellement **intégré au chromosome**

La transduction



transfert génétique d'un **fragment d'ADN chromosomique ou extrachromosomique d'une bactérie à une autre** effectué par des **bactériophages** dits **transducteurs**

1. LA CONJUGAISON

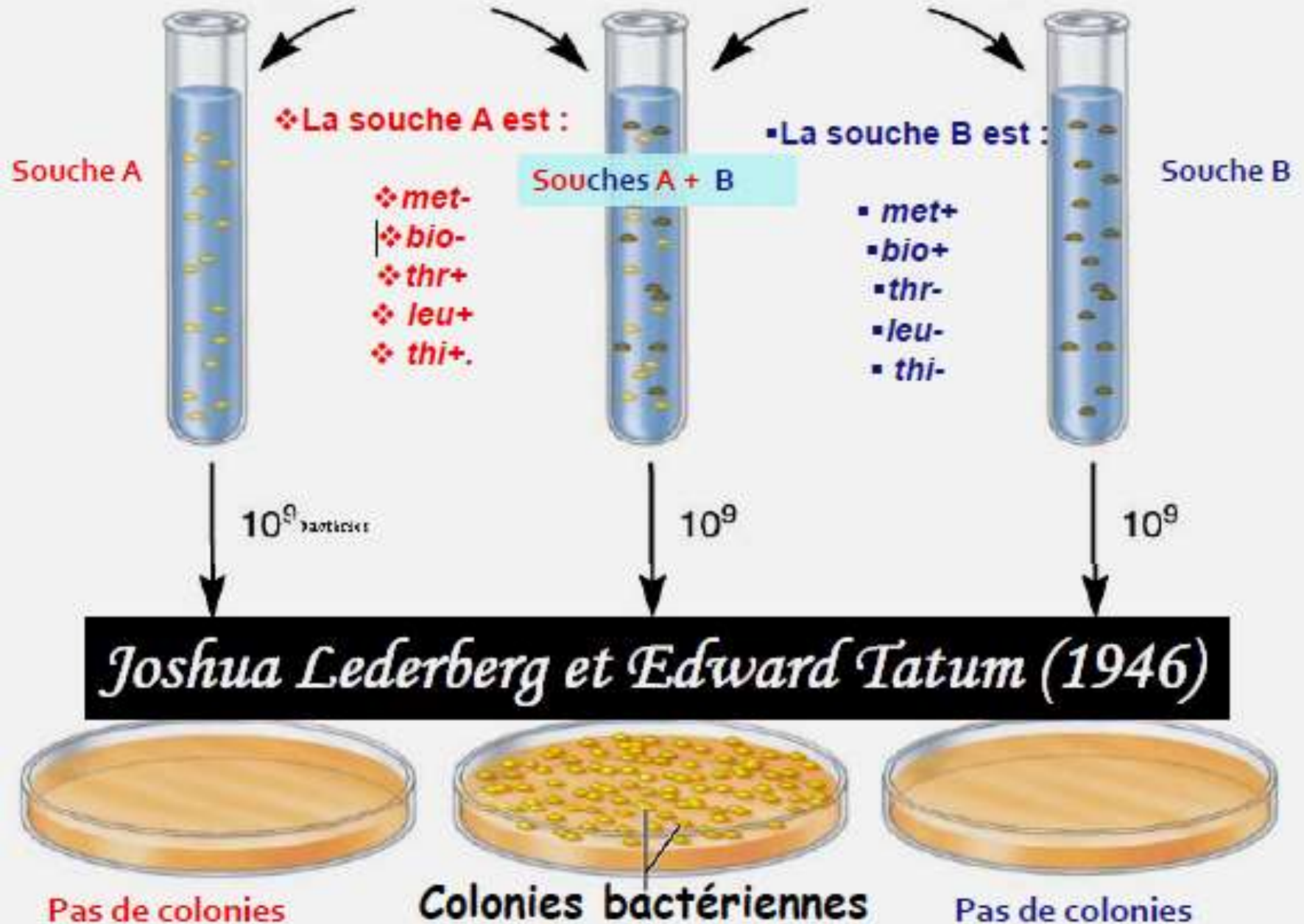


transfert génétique **unidirectionnel** d'un **fragment d'ADN chromosomique ou plasmidique** par **contact direct** entre **deux bactéries « sexuellement » différenciée** :

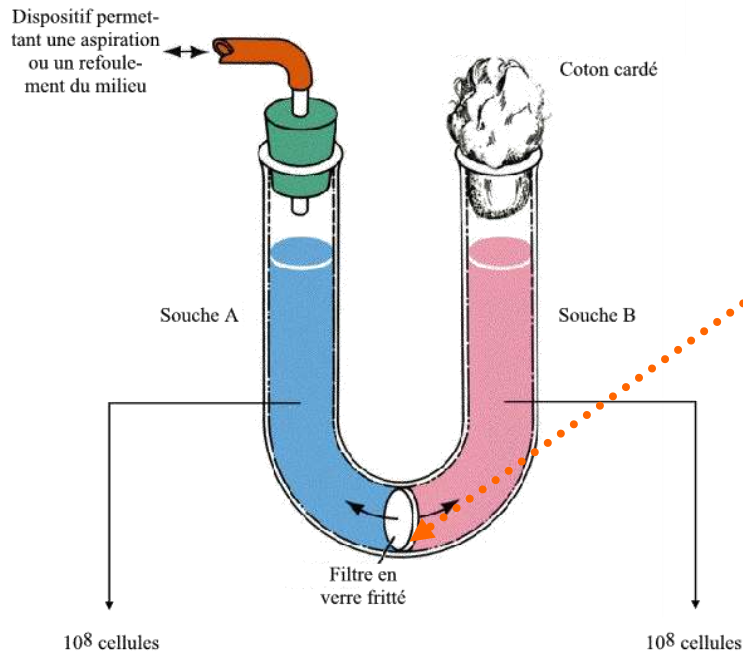
une donatrice = **mâle** et une réceptrice = **femelle**

1.1. Mise en évidence et caractéristiques de la conjugaison

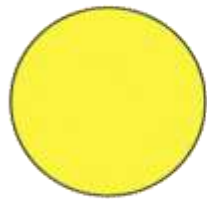
- **La conjugaison implique un transfert de gènes et un phénomène de recombinaison**
- **La conjugaison exige un contact physique direct entre les souches**
- **La conjugaison implique une différence sexuelle entre les souches**



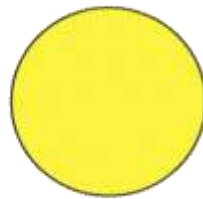
Bernard Davis ⇒ a utilisé : l'expérience du tube en U



Ensemencement sur milieu minimum sans Thr, leu, bio, Met et Thi



Absence de culture



Absence de culture

un tube en U séparé à la base par une **membrane en verre poreuse** (0.2μm)

empêche un contact direct entre les souches
laisse passer l'ADN libre, les phages ou les
substances solubles (ADN)

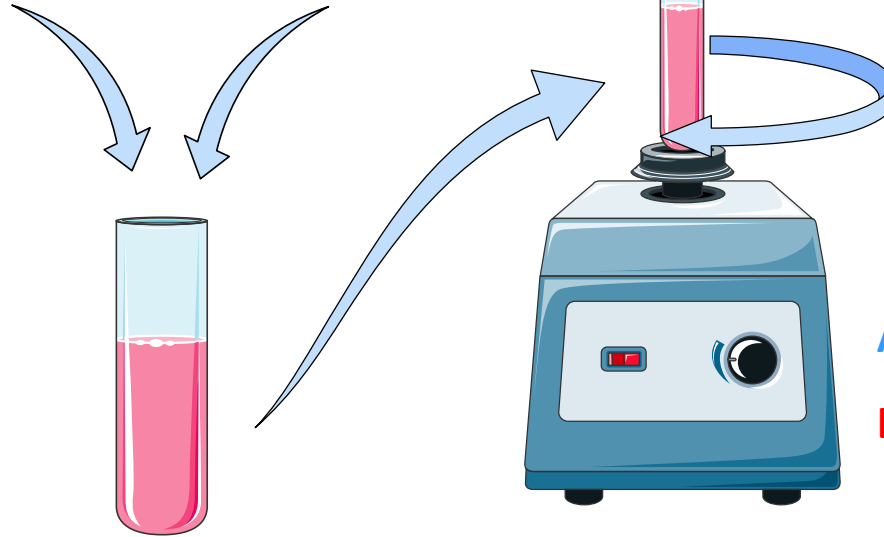
Les souches A et B sont placées chacune dans
une branche du tube, puis le milieu est aspiré
et refoulé plusieurs fois

**Il y a donc nécessité d'un contact direct entre
les souches A et B pour qu'il y est transfert du
matériel génétique**

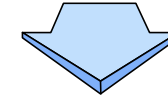
Aucune bactérie prototrophe

souche A

souche B

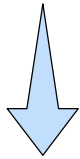


agitation vigoureuseusement

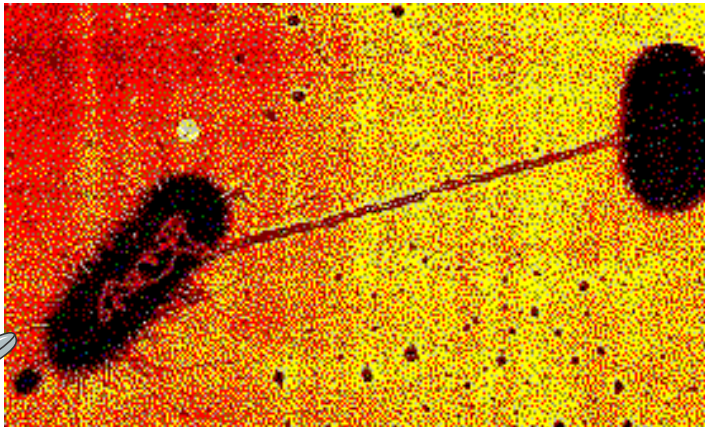
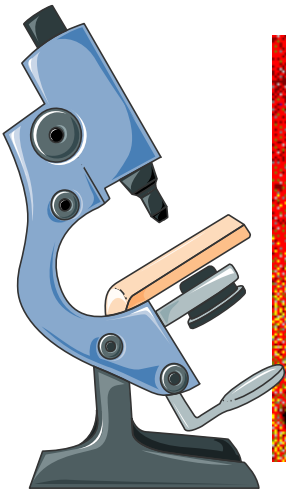


Aucune bactérie prototrophe

L'agitation rompt le contact



Au microscope électronique, on observe le phénomène :



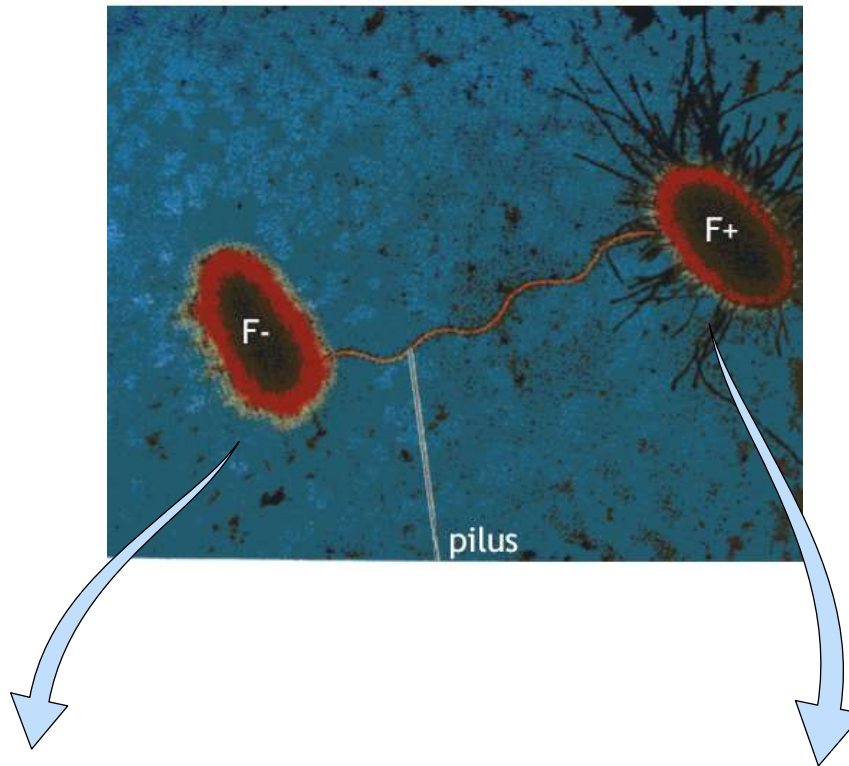
il y a contact direct entre les deux bactéries,

un **pont cytoplasmique**

est établi entre les bactéries conjugantes

grâce au **pili sexuel**

réceptrice de gènes
= bactéries **femelle**



donatrice de gènes
= bactéries **mâles**

bactéries réceptrices de gènes
= F-

car dépourvues de facteur F

bactéries donatrices de gènes
= F+

possèdent un **facteur de fertilité**
ou **facteur F**

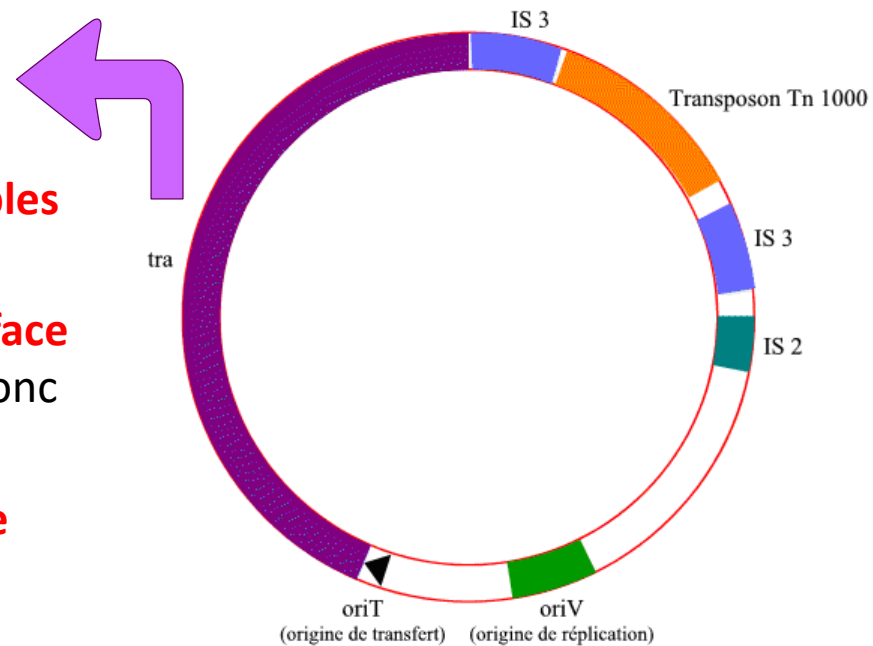
1.2. Le facteur F

Le facteur F = gros **plasmide conjugatif** (94 500 pb) qui contrôle :

- sa propre **réplication**,
- son **nombre de copies**,
- la **répartition des copies** dans les cellules filles
- son **transfert**

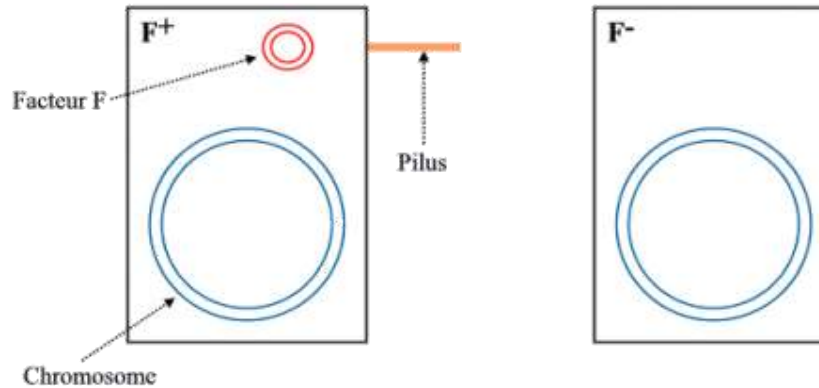
Les nombreux gènes gouvernant le transfert sont situés dans l'**opéron tra** :

- **13 gènes** codent la **synthèse de pili sexuels** = **câbles d'amarrage** (2-3 pilis par F+)
- **2 gènes** codent des **protéines d'exclusion de surface** qui empêchent l'attachement des pili sexuels et donc l'appariement de deux bactéries F+.
- **5 gènes** permettent **la synthèse** et **le transfert de l'ADN**.
- **3 gènes** sont des **gènes régulateurs**



1.3. La conjugaison entre bactéries F+ et F-

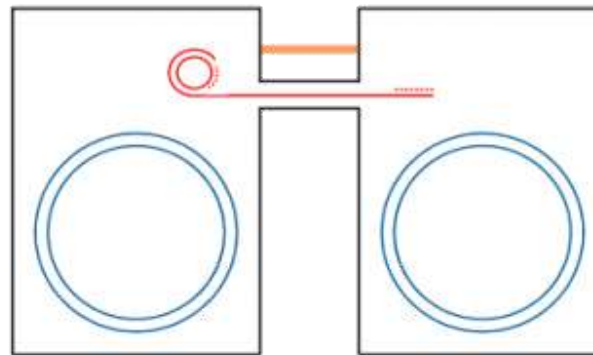
Union F+/F- grâce aux **pili sexuels**



**Facteur F libre
dans cellule
donatrice**

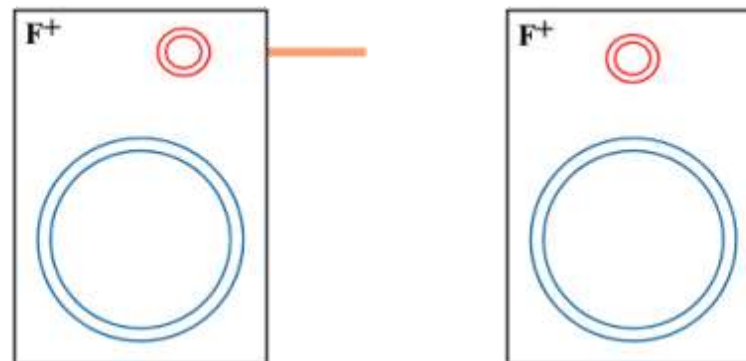
Création d'un **pont
cytoplasmique**

Permettant le **transfert
de l'ADN**



**Transfert de l'ADN à
partir de l'origine de
transfert (ori T) et
selon le modèle du
cercle roulant**

**Le facteur F
persiste dans la
bactérie donatrice
qui reste F+**



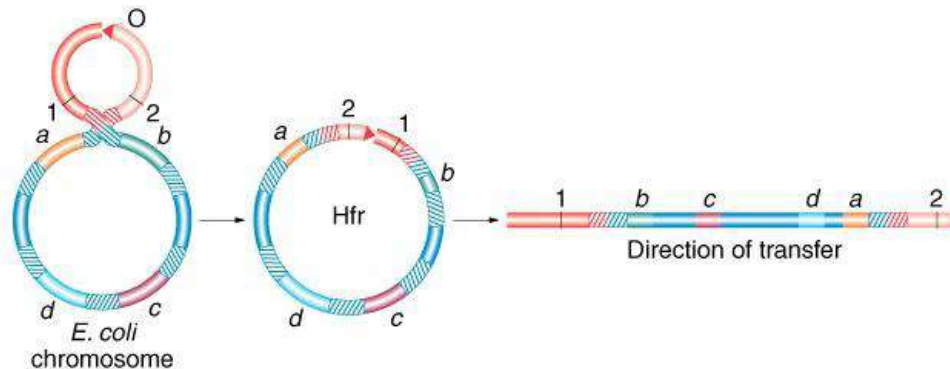
**La bactérie
réceptrice à acquis
une copie du
facteur F elle
devient F+**

On isole très peu de recombinants 10^{-6}

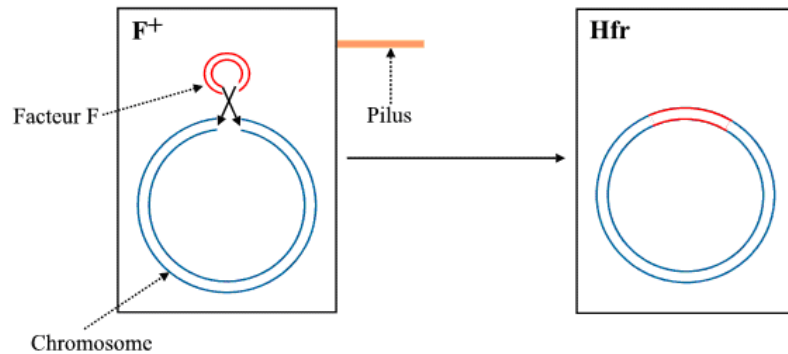
1.4. Les souches Hfr et la conjugaison entre bactéries Hfr et bactéries F-

1.4.1. Les souches Hfr et transfert d'ADN chromosomique

1.4.2. La chronologie du transfert des gènes chromosomiques : conjugaison interrompue



Formation d'une bactérie Hfr

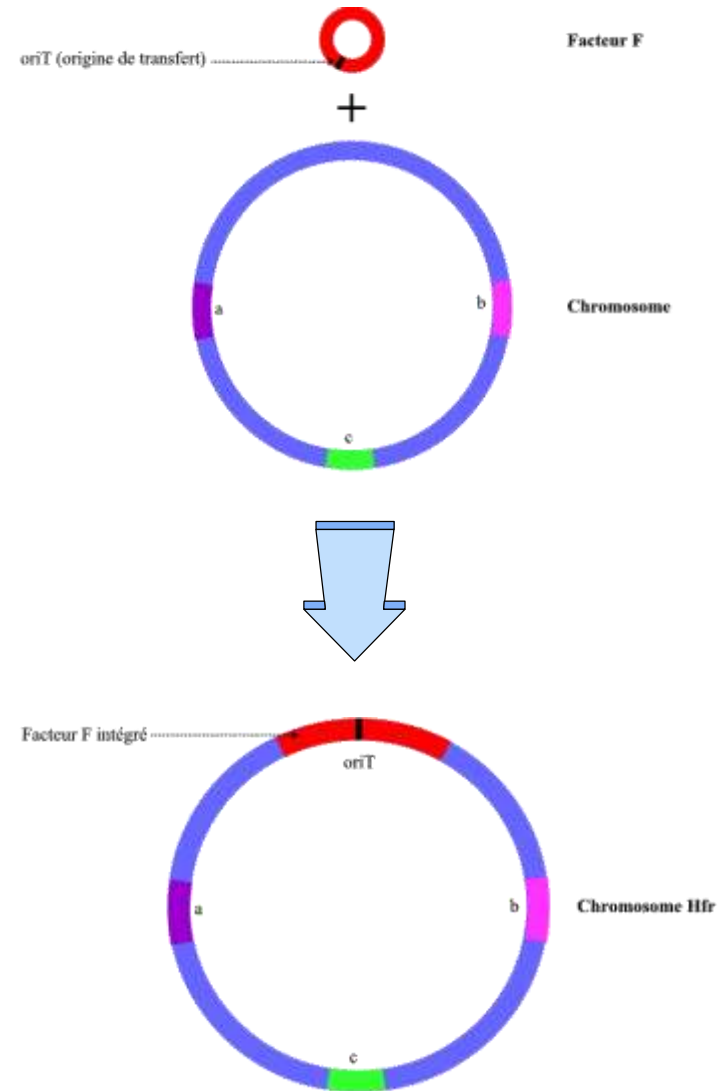


Les bactéries Hfr dérivent de bactéries F⁺, le **facteur F n'est plus autonome**, il est **intégré au chromosome bactérien**, on parle d'**épisode**.

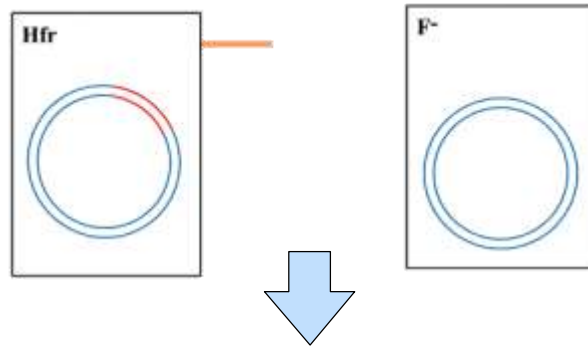
Hfr pour **H**aute **f**réquence de **r**ecombinaison car elles sont capables de **transférer des marqueurs chromosomiques avec une fréquence 1000 fois plus importante**.

Le facteur F et le chromosome de *Escherichia coli* contiennent des **transposons** et des **séquences d'insertion** capables de **recombinaison**.

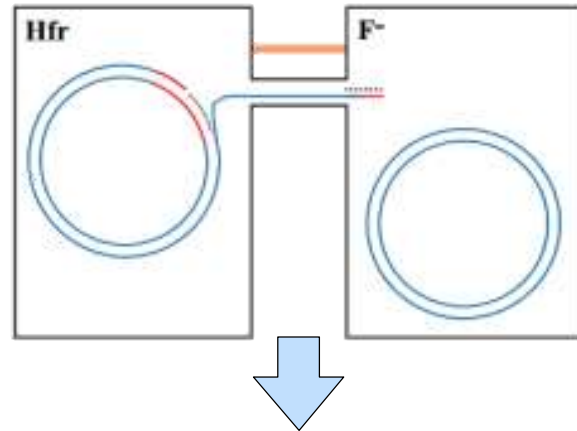
L'intégration du facteur F dans le chromosome peut se faire à **différents endroits** et **dans différentes orientations**.



La conjugaison entre bactérie Hfr et bactérie F-



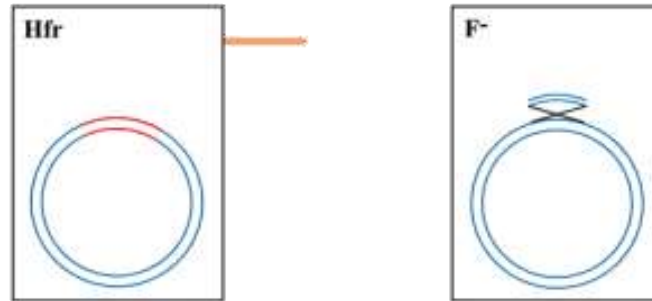
Transfert linéaire d'un des brins d'ADN en partant de l'origine de transfert



Réplication de l'ADN monocaténaire transféré selon le modèle du «cercle roulant»

sans interruption **durée transfert 120 minutes**

Très rare, interruptions fréquentes



Incorporation des gènes par « crossing over » (recombinaison homologue entre deux molécules d'ADN) **dans le chromosomes de la bactéries réceptrice**

On obtient 1000 fois plus de recombinants mais peu de bactérie F- deviennent mâle

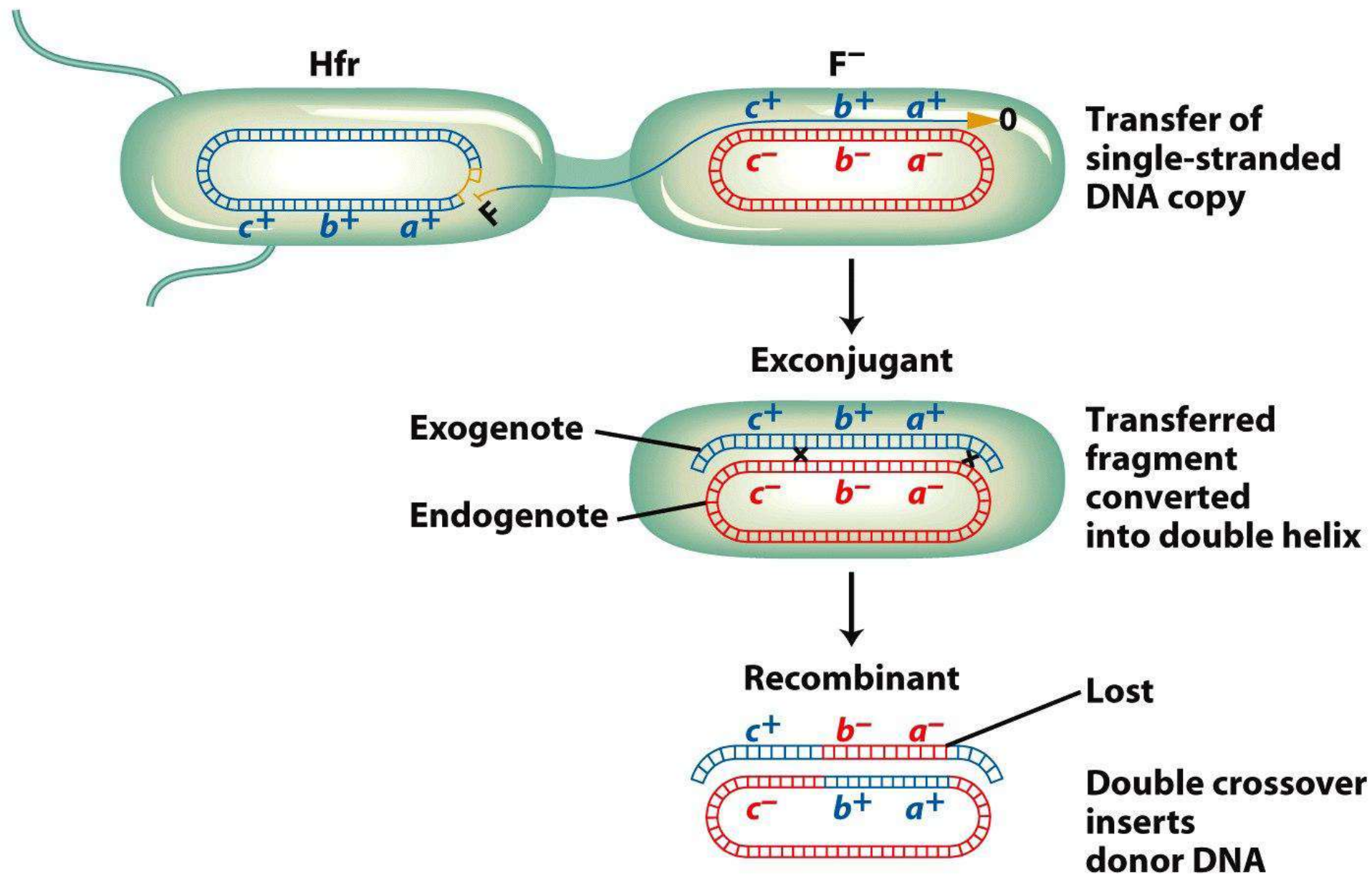
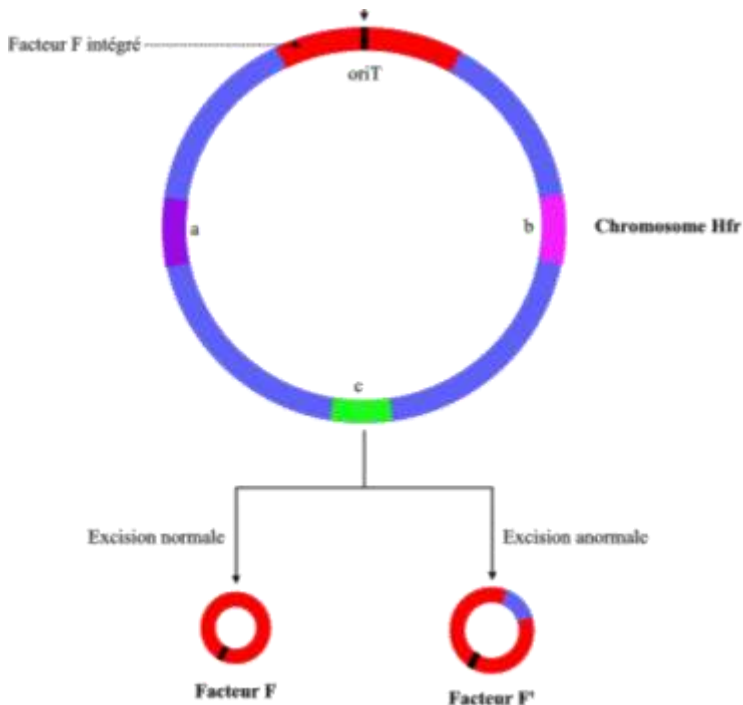


Figure 5-11
Introduction to Genetic Analysis, Ninth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

1.5. La sexduction et le facteur F'



Excision normale ou anormale
du facteur F

Intégration facteur F dans chromosome = **événement réversible**, le **facteur F peut retrouver son indépendance**.

2 possibilités lors de l'excision :

- excision correcte
- **excision incorrecte => le facteur F emporte avec lui une fraction du chromosome**

Le facteur F possède alors toute **l'information génétique nécessaire à la conjugaison** et en plus, il porte **un ou quelques marqueurs chromosomiques**.

Un facteur F ainsi modifié est appelé **facteur sexuel de substitution : F'**.

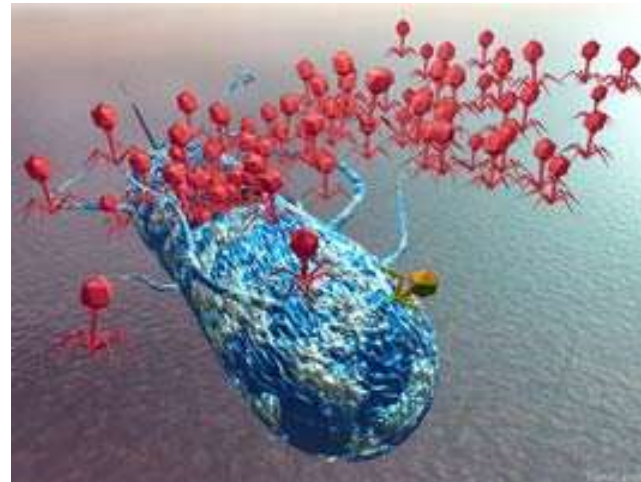
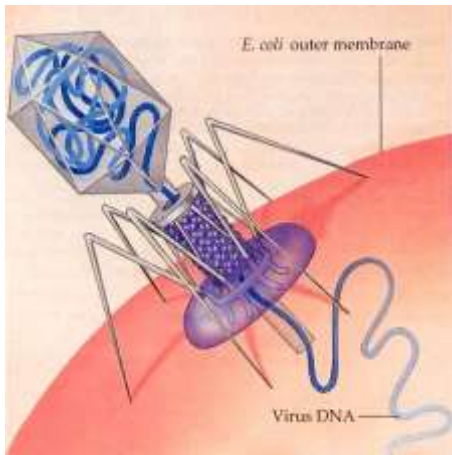
Lors d'une conjugaison F' x F- le facteur F' est **transmis à haute fréquence** à la bactérie réceptrice qui acquiert avec le plasmide un ou quelques gènes chromosomiques. On parle de **sexduction**.



2. LA TRANSDUCTION



transfert génétique d'un **fragment d'ADN chromosomique ou extra-chromosomique d'une bactérie à une autre** effectué par des **bactériophages** dits **transducteurs**

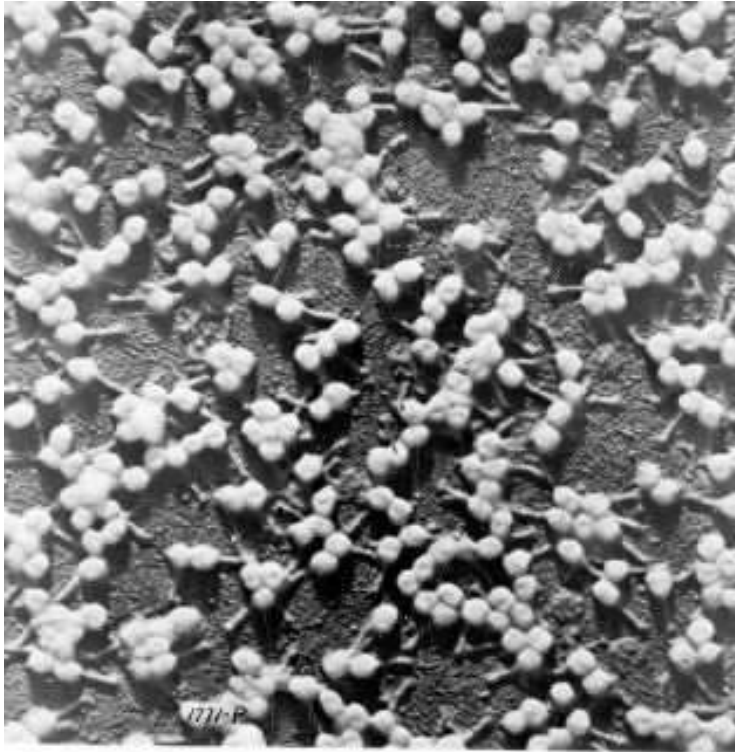


Les bactériophages sont des **virus de bactéries**, qui existent sous la forme **virulente** ou **tempérée**.

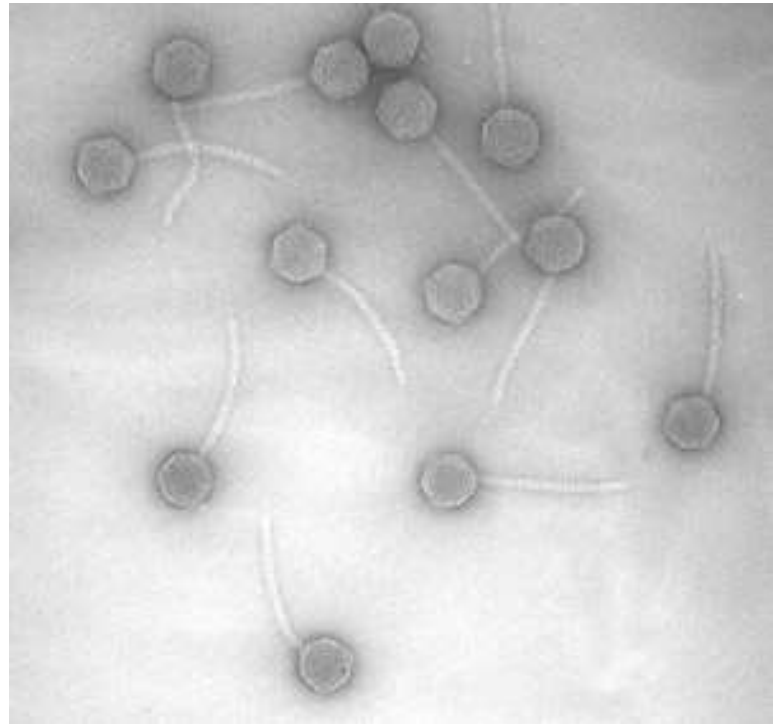
bactériophage virulent (lyse) ex: T_4 , T_2 , etc...

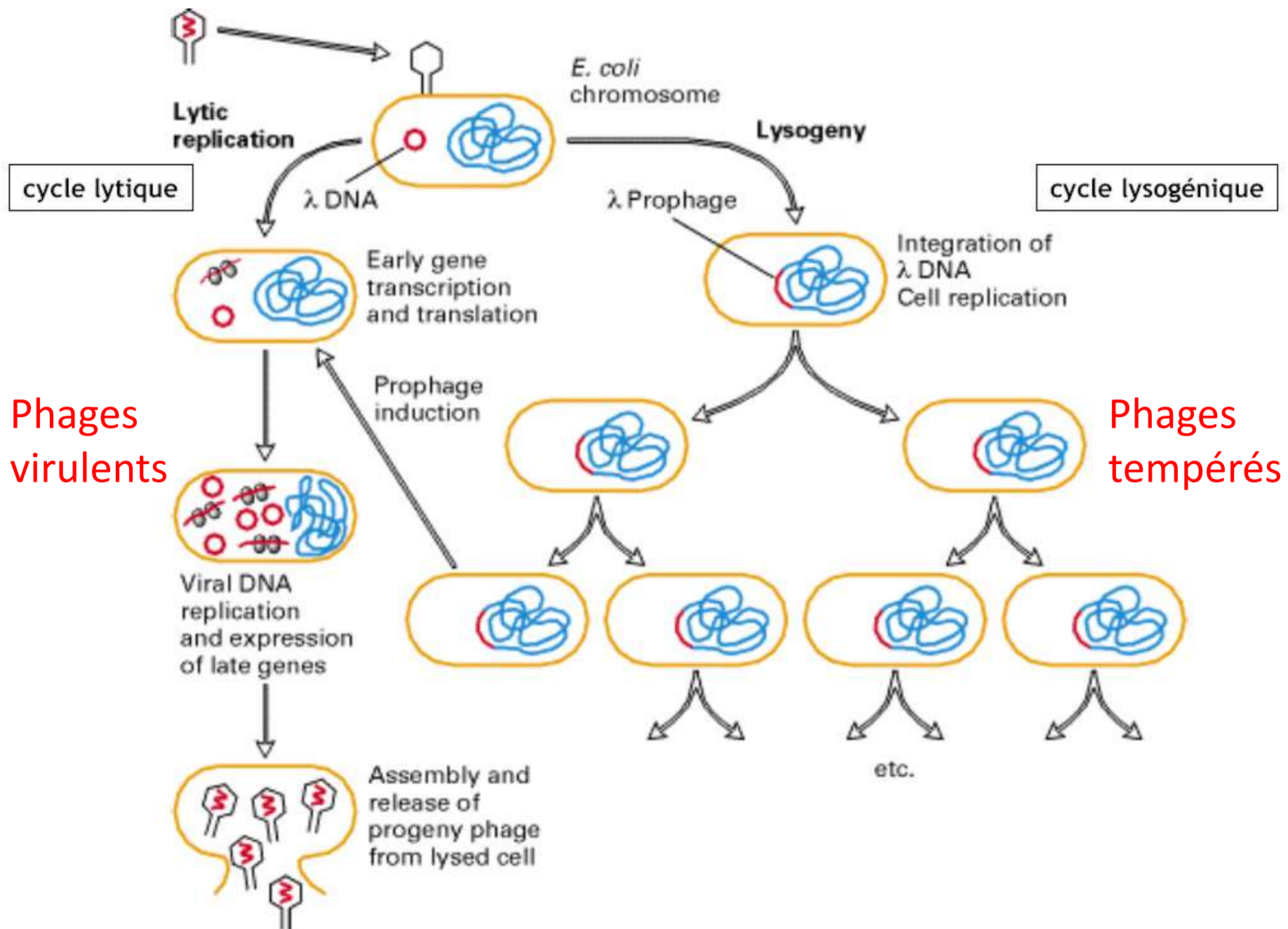
bactériophage tempéré (lysogénie) ex: λ , Mu, P_1 etc...

↓
Phage dont l'infection ne conduit pas forcément à une lyse



Group of sperm-like elementary particles of Colicin
Bacillus Bacteriophage, type T-4





2.1. Mise en évidence de la transduction

1951 : Lederberg et Zinder ⇒ a utilisé : l'expérience du tube en U

Avec des souches de Salmonella typhimurium

Dispositif permettant une aspiration ou un refoulement du milieu

souche A

his -

Coton cardé

souche B

Trp -

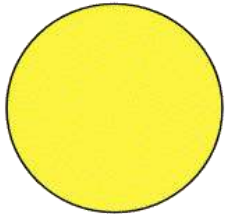
Souche A

Souche B

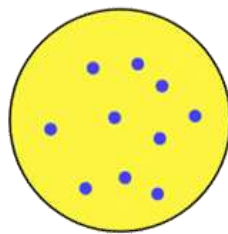
+ DNase

Filtre en verre fritté

Ensemencement sur milieu minimum sans Trp et His

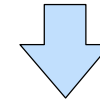


Absence de culture

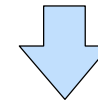


bactéries prototrophe + fréquence 10^{-5}

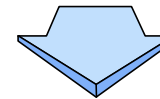
un tube en U séparé à la base par une **membrane en verre poreuse** (0.2µm)



empêche un contact direct entre les souches, laisse passer les phages et l'ADN libre qui est détruit par DNase



Les souches A et B sont placées chacune dans une branche du tube, puis le milieu est aspiré et refoulé plusieurs fois



Ce n'est pas une mutation, ni de la conjugaison, ni de la transformation car DNase n'empêche pas le phénomène ⇒ il s'agit d'un bactériophage ici le P22

2.2. Caractéristiques de la transduction

2.2.1. La transduction généralisée

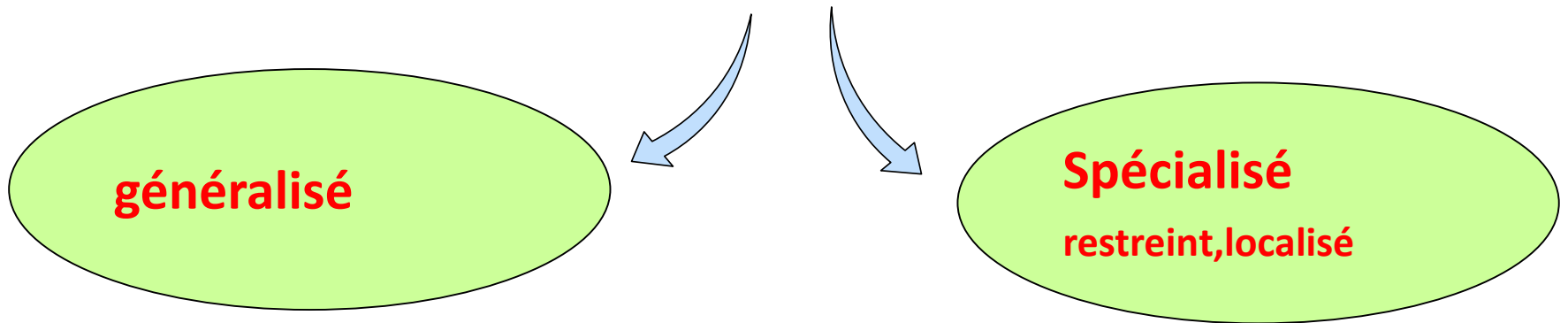
2.2.2. La transduction spécialisée ou restreinte

La transduction résulte d'une **erreur d'encapsulation** :

Lors de l'assemblage des virions **un fragment de génome bactérien est encapsidé à la place de l'ADN viral**.

Le phage devient **transducteur**, il est libéré lors de la lyse de la bactérie et pourra injecté de l'ADN bactérien dans une autre bactérie.

Selon les bactériophages, la transduction est un phénomène :

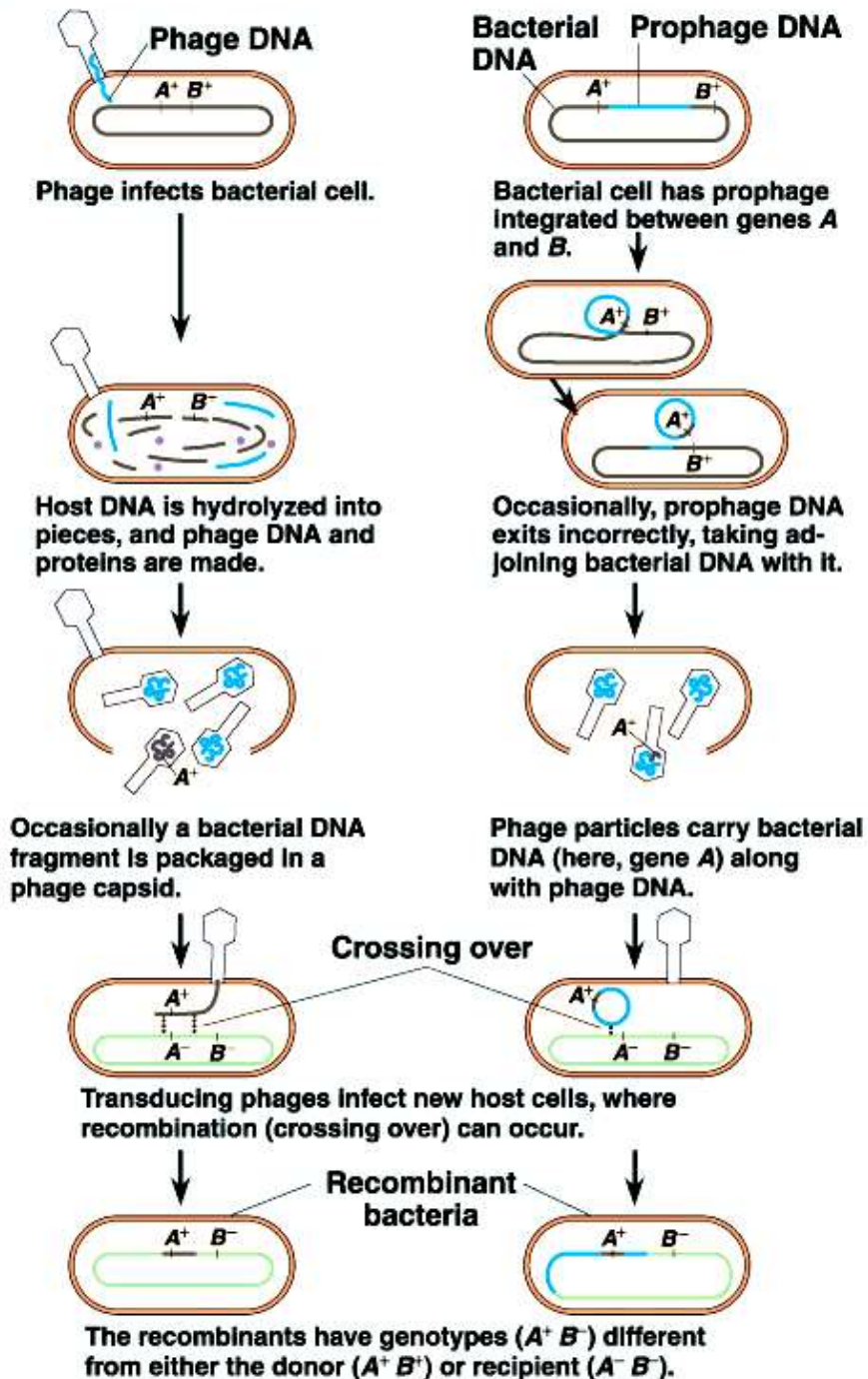


n'importe quel gène
bactérien est susceptible
d'être transféré à une
bactérie réceptrice

le transfert ne concerne que
quelques gènes bactériens dont
la nature est variable selon le
bactériophage

(a) Generalized transduction

(b) Specialized transduction



A l'aide du document ci-contre et de vos connaissances sur les phages répondre aux questions suivantes

-A quel type de phage correspond la transduction généralisée ? justifier ?

un **phage virulent**,
car il réplique son génome dans la bactérie et provoque la lyse en fin de cycle, libérant les nouveaux virions = **cycle lytique**

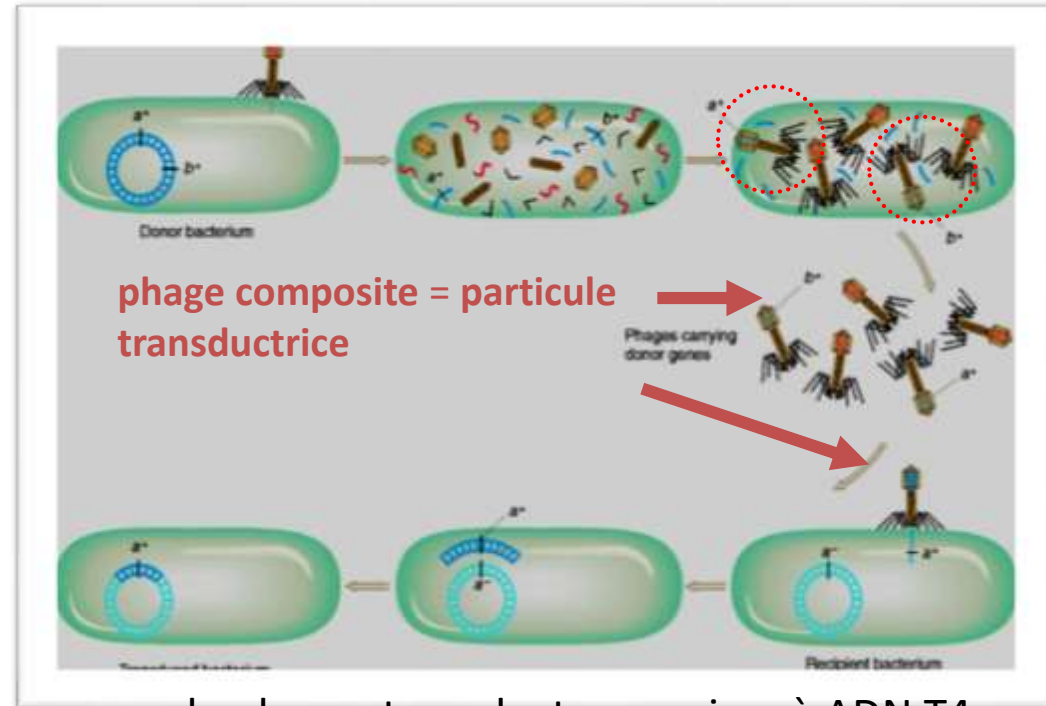
-A quel type de phage correspond la transduction spécialisée ? justifier ?

Un **phage tempéré**,
car il intègre son génome dans le génome de la bactérie sous forme de prophage cette dernière devient lysogène = **cycle lysogénique** l'ADN viral est répliqué en même temps que le chromosome bactérien.

2.2.1. La transduction généralisée

Elle est assurée par les **phages virulents**, qui au cours du cycle lytique **encapsident par erreur et de façon aléatoire des fragments d'ADN de la bactérie**.

taille fragment : 1 à 2% de l'ADN bactérien.



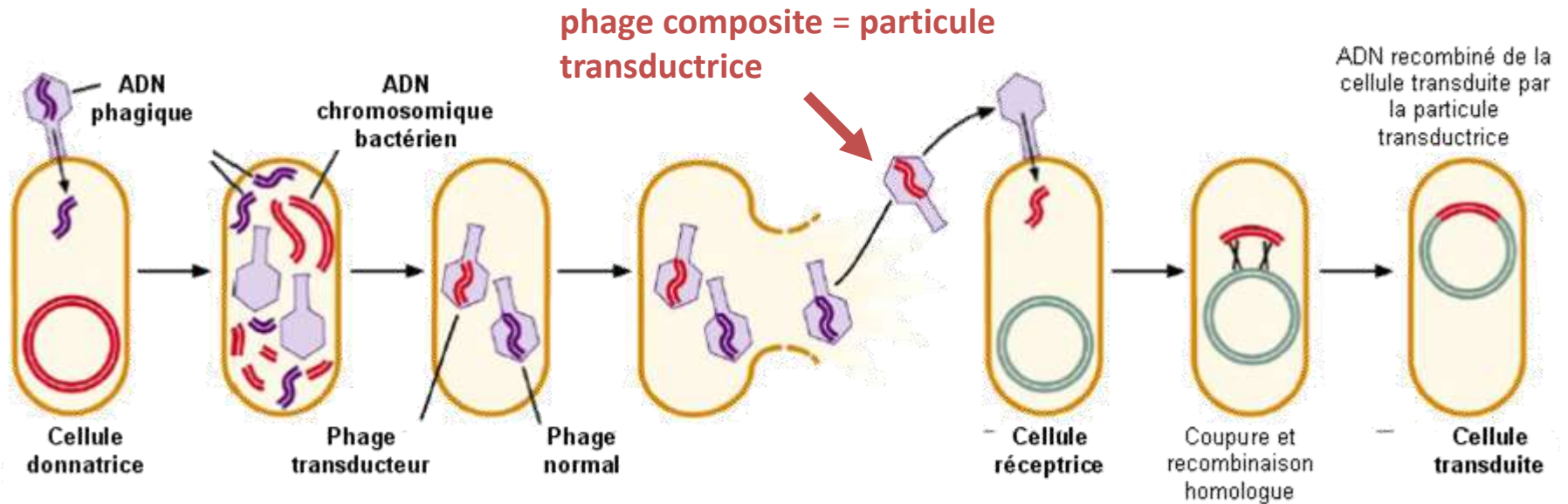
ex de phages transducteurs : virus à ADN T4 et P1 chez *E.coli* et virus à ADN P22 chez *Salmonella Typhimurium*

Il se forme alors un **phage composite** appelé **particule transductrice** qui peut infecter une nouvelle bactérie et lui transmettre un fragment de l'ADN de la bactérie précédemment lysée à une **fréquence faible (<1%)**

La transduction généralisée peut être **complète** ou **abortive** selon les cas.

2.2.1.1. La transduction généralisée complète

Elle implique une **expression stable des marqueurs transférés**.

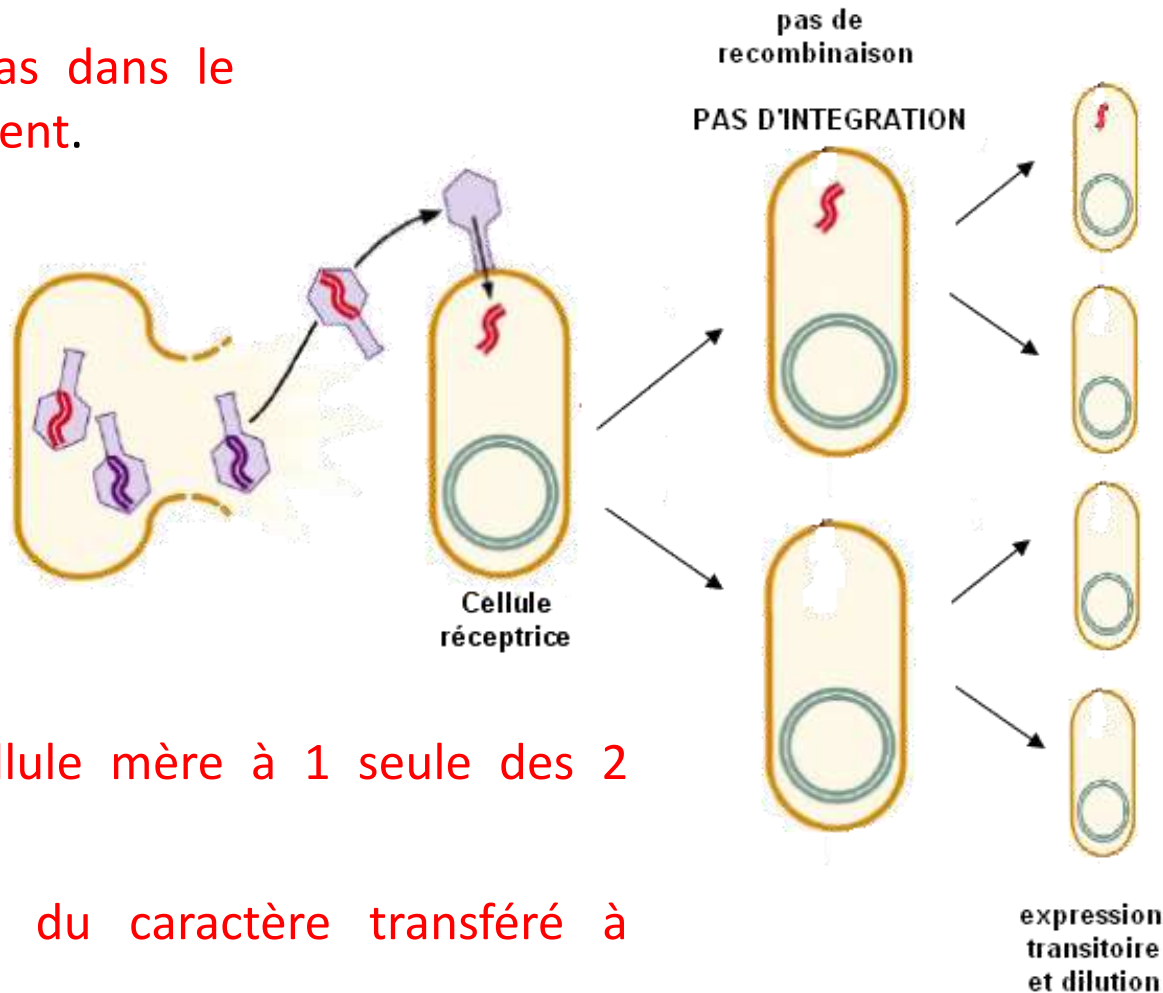


L'ADN introduit peut s'intégrer dans une région homologue du chromosome par **recombinaison homologue** et donner une **cellule transduite** au **génotype modifié et stable** transmet à toutes sa descendance.

2.2.1.1. La transduction généralisée abortive

l'ADN injecté ne s'intègre pas dans le chromosome, ce qui est fréquent.

Les marqueurs transférés s'expriment transitoirement jusqu'à ce que l'ADN soit dilué au cours des divisions bactériennes successives.



Les gènes passent de la cellule mère à 1 seule des 2 cellules filles.

Il n'y a pas généralisation du caractère transféré à l'ensemble des descendants.

La transduction abortive se traduit par l'apparition de colonies de taille minime et de formes irrégulières sur milieu minimum.

2.2.1.1. Caractéristiques et applications de la transduction généralisée

- Les deux bactéries **donatrice** et **réceptrice** doivent appartenir à la **même espèce** en raison de la spécificité d'infection du phage.
 - La quantité d'ADN bactérien encapsidé dépend principalement de la **taille de la capside** :
 - le phage P22 de *Salmonella* Typhimurium contient habituellement de l'ordre de 1 % du génome bactérien,
 - le phage P1 de *E.coli* contient de 2 à 2.5 % du génome bactérien.
 - Le plus souvent la transduction ne concerne qu'**un seul gène**
 - Dans une population de phages capables d'effectuer une transduction généralisée, il n'y a que très peu de particules transductrices.
- Ex : dans une population de phage P1 de *E.coli* seulement 0.1% des particules vont encapsider de l'ADN chromosomique, les autres particules sont virulents et vont déclencher le cycle lytique.

Ces points réunis font que la fréquence d'obtention de cellules transduites pour un caractère donné est très faible

La transduction généralisée reste toutefois très utilisée pour réaliser des **analyses génétiques**, puisque :

- **n'importe quel gène peut être transféré**
- la **fréquence** de **transfert est faible** : 10^{-6}
- elle a un **caractère partiel** : 1-2 % du génome bactérien

2.2.2. La transduction spécialisée ou restreinte

Elle est assurée par les phages **tempérés** qui s'insèrent **toujours au même endroit** sur le chromosome bactérien.

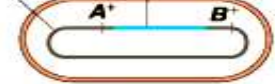
Et qui au cours du passage d'un cycle lysogénique à un cycle lytique, peuvent se détacher du chromosome bactérien :

- soit **sous la forme originale** et redonner un phage **complet**,
- soit sous une **forme incomplète** où une **partie de l'ADN** phagique reste attachée au chromosome bactérien et en contre partie quelques gènes bactériens sont encapsidés.

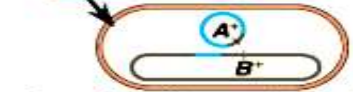
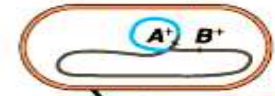
La transduction spécialisée se limite aux gènes qui délimitent l'ADN phagique inséré dans le chromosome bactérien et se sont toujours ces même gènes qui sont transmis à de nouvelles bactéries transduites.

(b) Specialized transduction

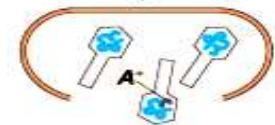
Bacterial DNA Prophage DNA



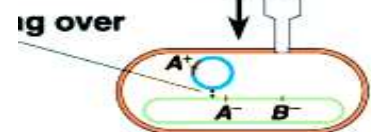
Bacterial cell has prophage integrated between genes A and B.



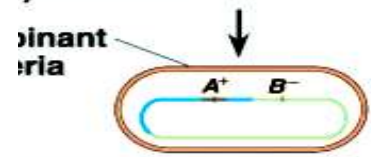
Occasionally, prophage DNA exits incorrectly, taking adjoining bacterial DNA with it.



Phage particles carry bacterial DNA (here, gene A) along with phage DNA.



ig over
ow host cells, where
) can occur.



types ($A^+ B^-$) different
or recipient ($A^- B^-$).

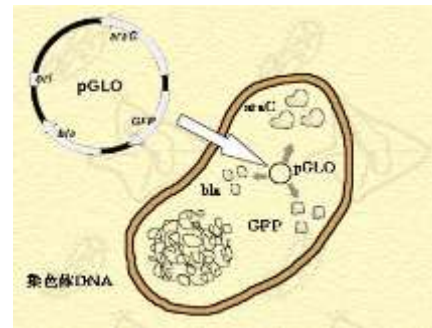
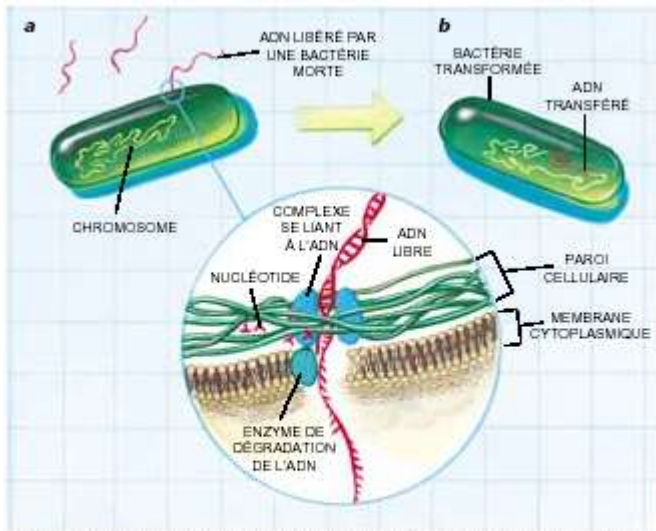
Le cas le plus connu de la transduction localisée est provoqué par le phage lambda de *E.coli*.

Il possède un site d'attachement correspondant à un site d'intégration situé entre les locus **gal** (nécessaire à l'utilisation du galactose) et le locus **bio** (assure la synthèse de la biotine).

3. LA TRANSFORMATION



transfert génétique au cours duquel **un fragment d'ADN bicaténaire, libre, nu** et en **solution** est **capté** par une **bactérie réceptrice compétente** avant d'être éventuellement **intégré** au **chromosome**



3. AU COURS D'UN MÉCANISME DE TRANSFORMATION (a), une bactérie récupère de l'ADN libre dans son environnement par une bactérie morte. Des complexes présents à la surface de la bactérie fixent l'ADN (cartouche inférieure), et des enzymes découpent un des deux brins en nucléotides ; simultanément, l'autre brin est intégré au chromosome de la bactérie et le brin complémentaire est synthétisé *in situ* (b). Bien que la transformation (illustrée ici pour une bactérie à Gram positif) se produise aussi dans les bactéries à Gram négatif, ce mécanisme reste rare.

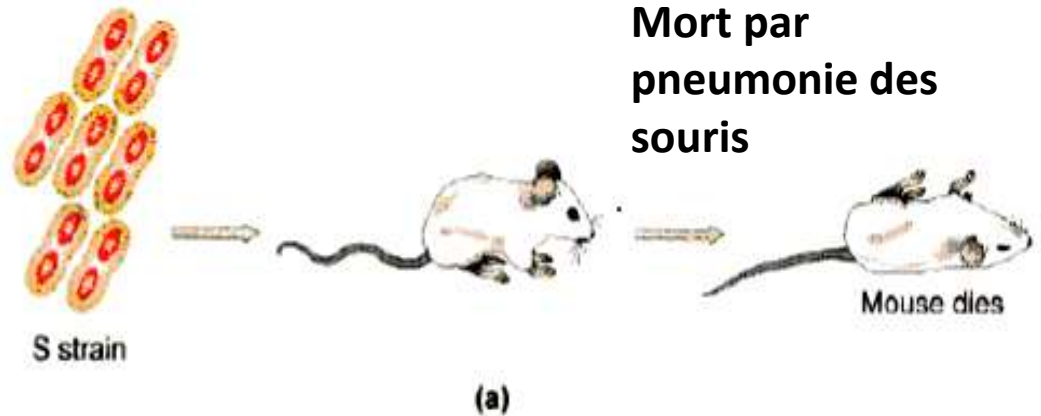
3.1. Mise en évidence de la transformation et « principe transformant »

3.1.1. Mise en évidence de la transformation

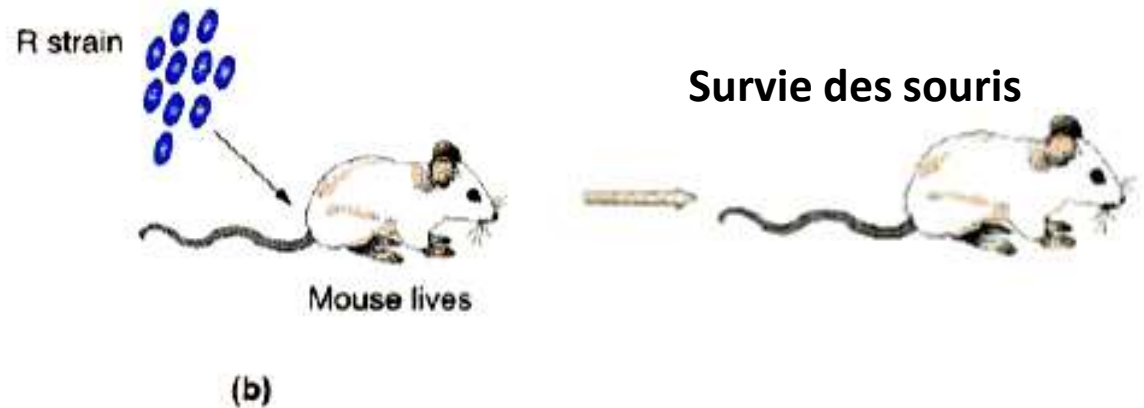
3.1.2. Nature du principe transformant

En 1928, Griffith ⇒ travaille sur le transfert de la virulence de la bactérie pathogène *Streptococcus pneumoniae*

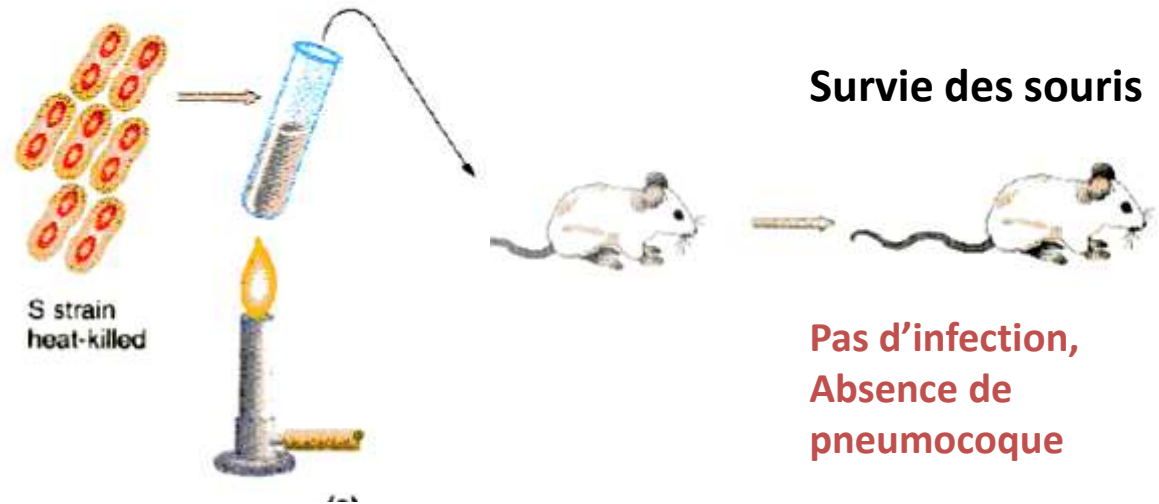
injection de pneumocoques de souche **S virulentes capsulée** et qui forment des colonies d'**aspect lisses** dites « **Smooth** »



injection de pneumocoques de souche **R non virulentes dépourvues de capsule** et qui forment des colonies d'**aspect rugueuses** dites « **Rough** »



Injection de
pneumocoques de souche
S tués par la chaleur



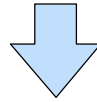
Injection de
pneumocoques de souche
S tués par la chaleur et de
souche **R vivantes non**
virulentes dépourvues de
capsule



Griffith donna le nom de transformation à ce changement de bactéries non virulentes en bactéries virulentes pathogènes.

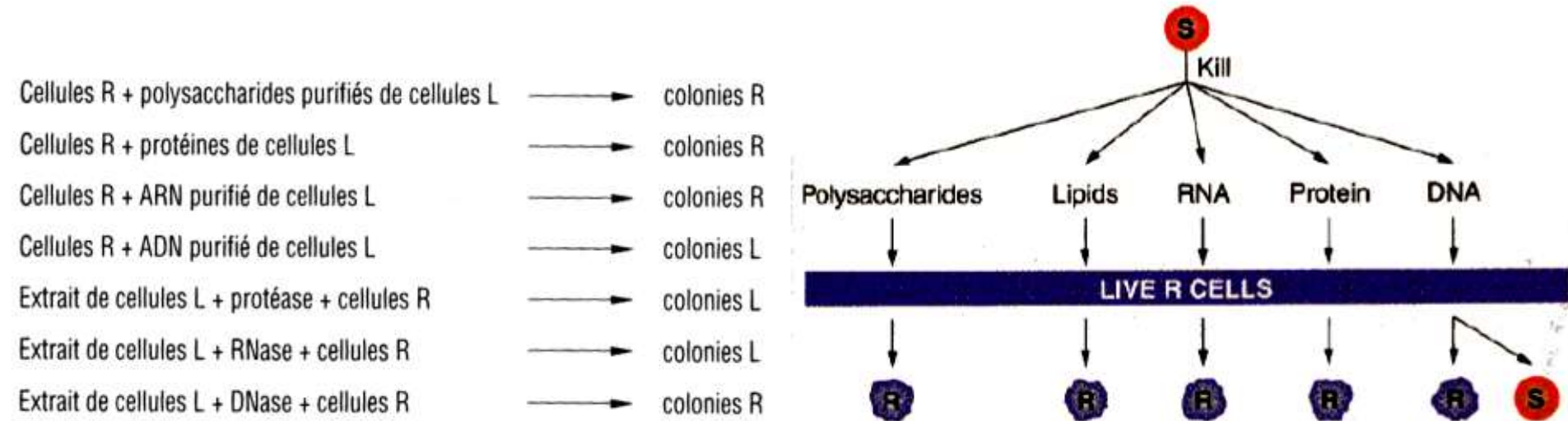
Par la suite, *Avery* ⇒ identifia le constituant responsable de la transformation et l'appela « principe transformant »

1. préparation d'extraits de pneumocoques virulents et destruction sélective de: l'ADN, l'ARN ou les protéines à l'aide d'enzymes appropriées.



2. mélange des pneumocoques R non virulents avec les extraits traités et observation

Par la suite, **Avery** ⇒ identifia le constituant responsable de la transformation et l'appela « principe transformant »



Seul l'ADN est capable de changer les cellules R en cellules S

Cet effet est perdu lorsque l'extrait est préalablement traité à la désoxyribonucléase.

L'ADN est donc le porteur de l'information génétique requise pour la transformation ou conversion du caractère R en S.

Le « principe transformant » est constitué d'ADN

3.2. Conditions nécessaires à la transformation

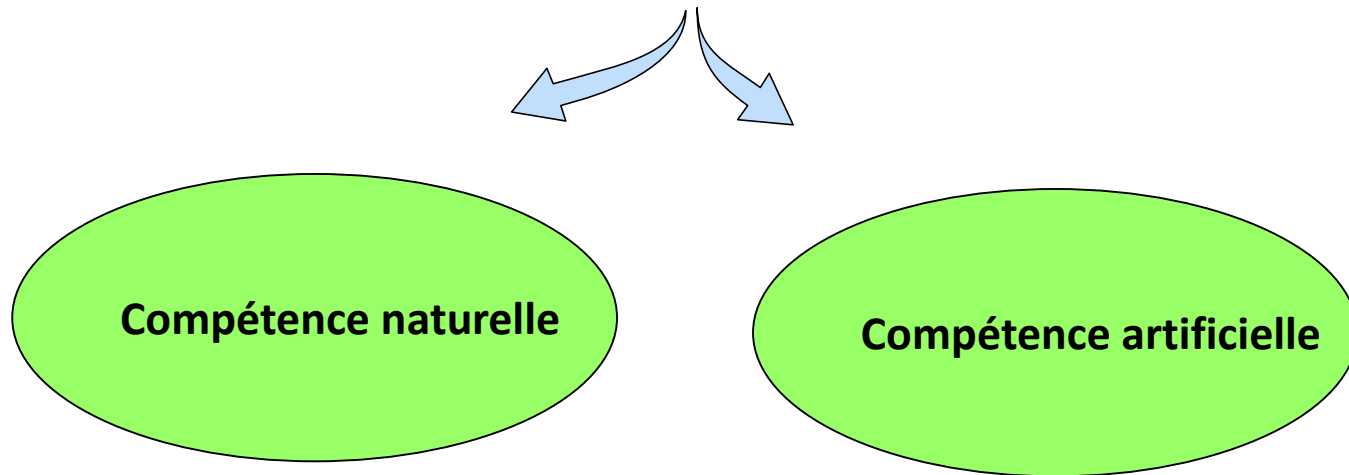
la transformation dépend :

- d'une part des bactéries et de leur aptitude à être réceptrices pour l'ADN : notion de compétence
- d'autre part de l'ADN transformant et de ses propriétés

3.2.1. développement de la compétence de la cellule réceptrice

L'ADN ne peut pénétrer que dans des cellules dites **compétentes**.

L'acquisition de la compétence se produit à une **fréquence faible** de l'ordre de **10^{-3}** soit **1 cellule sur 1000**.



3.2.1.1. La compétence naturelle

Bactéries naturellement compétentes

Bacillus subtilis,
streptococcus spp,
Haemophilus influenzae,
Neisseria spp

Elles ont la capacité de capturer l'ADN libre présent dans l'environnement

⇒ Les conditions générales de la compétence sont les suivantes :

- une forte densité de cellules
- un passage d'un milieu relativement riche en milieu plus pauvre
- absence d'inhibiteurs de la croissance et de produits qui bloquent l'apport de source d'énergie

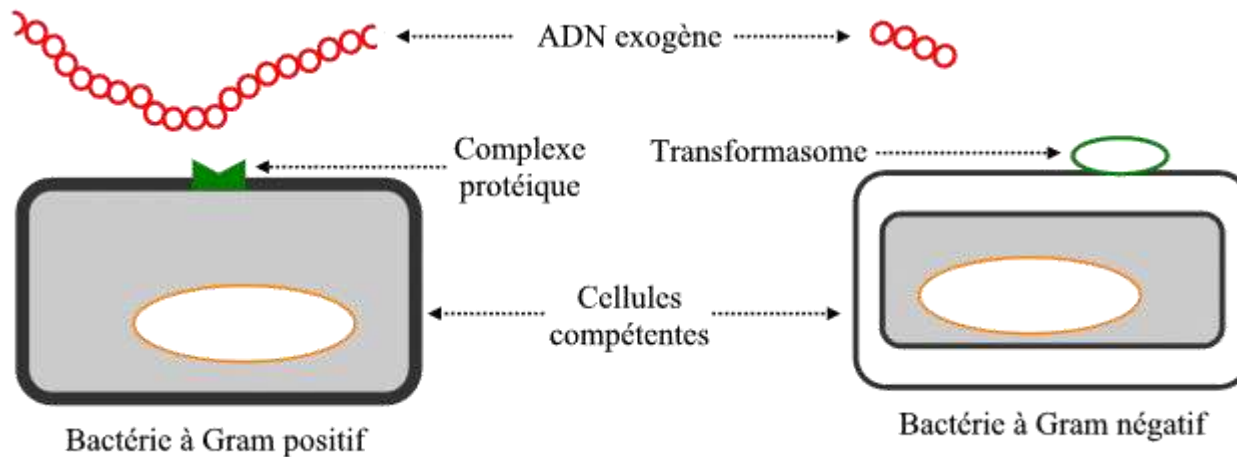
⇒ Chaque espèce se transforme selon des procédés particuliers :

ex: le pneumocoque exige de l'albumine et un pH de 7,6

⇒ La compétence phénomène transitoire et dépendant de facteurs de compétence ou de transformasomes :

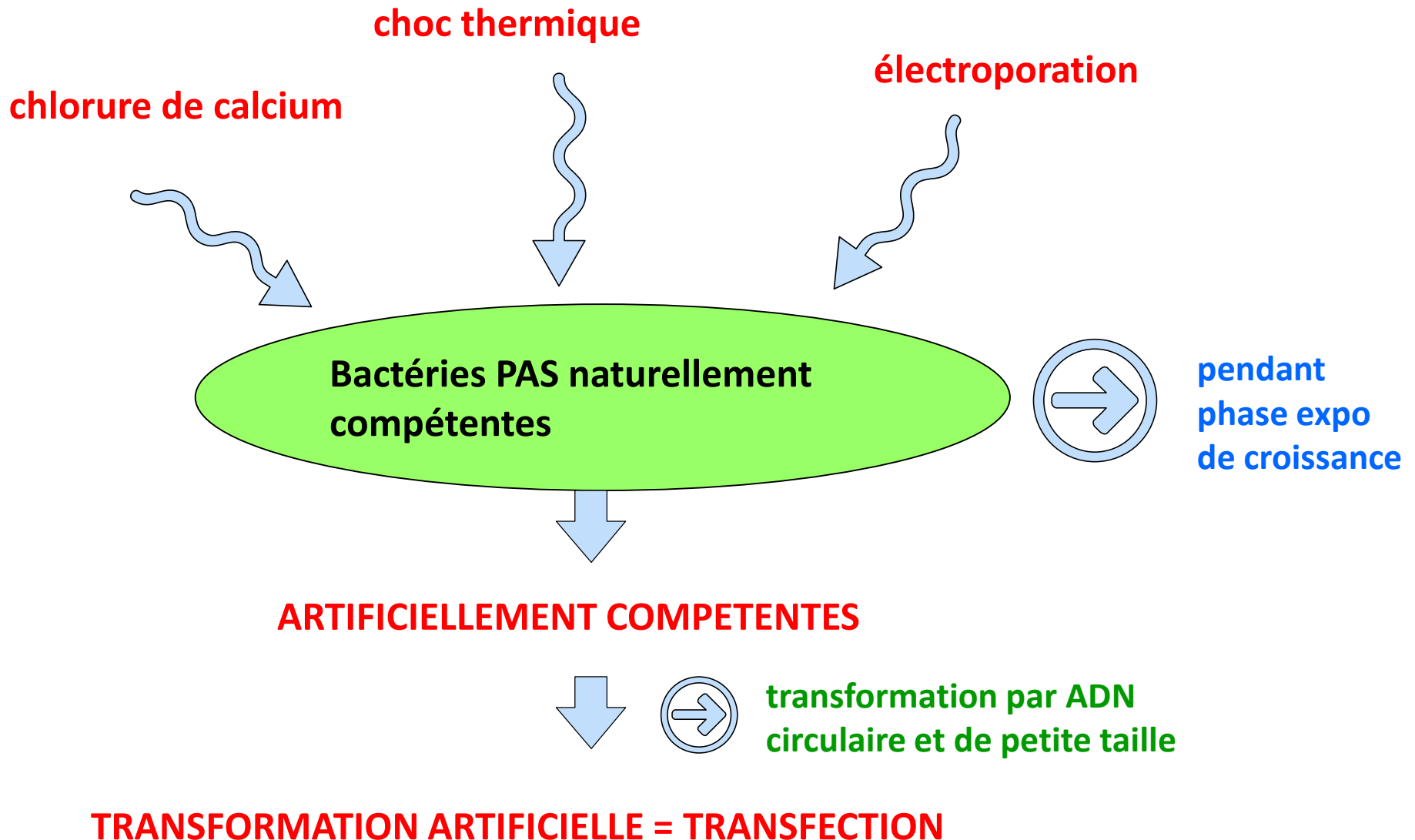
L'état de compétence :

- apparaît **transitoirement durant 15 à 30 minutes : pic de compétence**



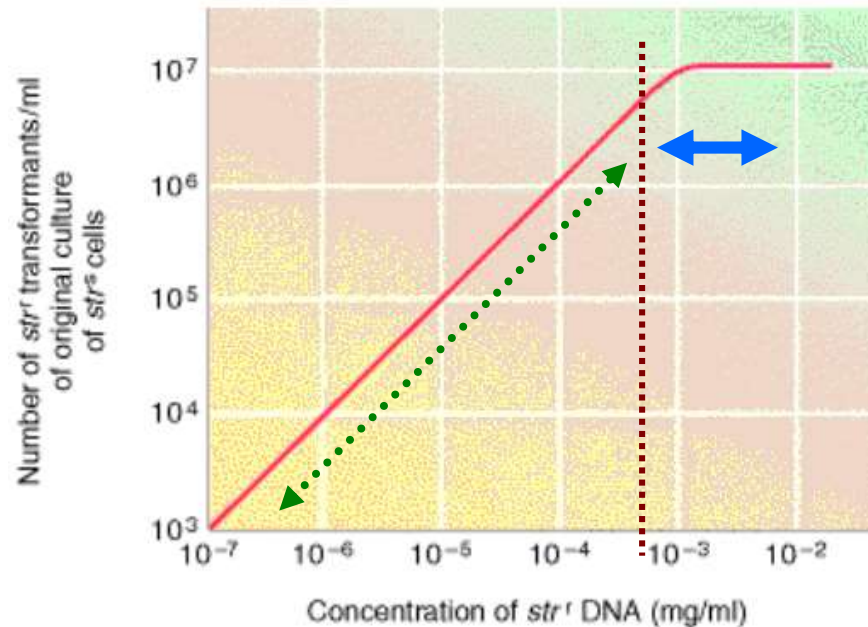
- chez les **Gram +**, dépend de la production d'une substance ou d'un **facteur de compétence** : polypeptide très instable qui stimule la production d'un **complexe protéique** nécessaire à la transformation à la surface de la cellule.
- chez les **Gram -**, est associés à la présence de petites **vésicules membranaires**, appelées **transformasomes**, qui font saillie à l'extérieur de la cellule.

3.2.1.2. La compétence artificielle



3.2.2. Les propriétés de l'ADN transformant

- Il doit être **bicaténaire** : double brin
- Sa **taille et sa concentration jouent un rôle important** (1/300ème du génome)

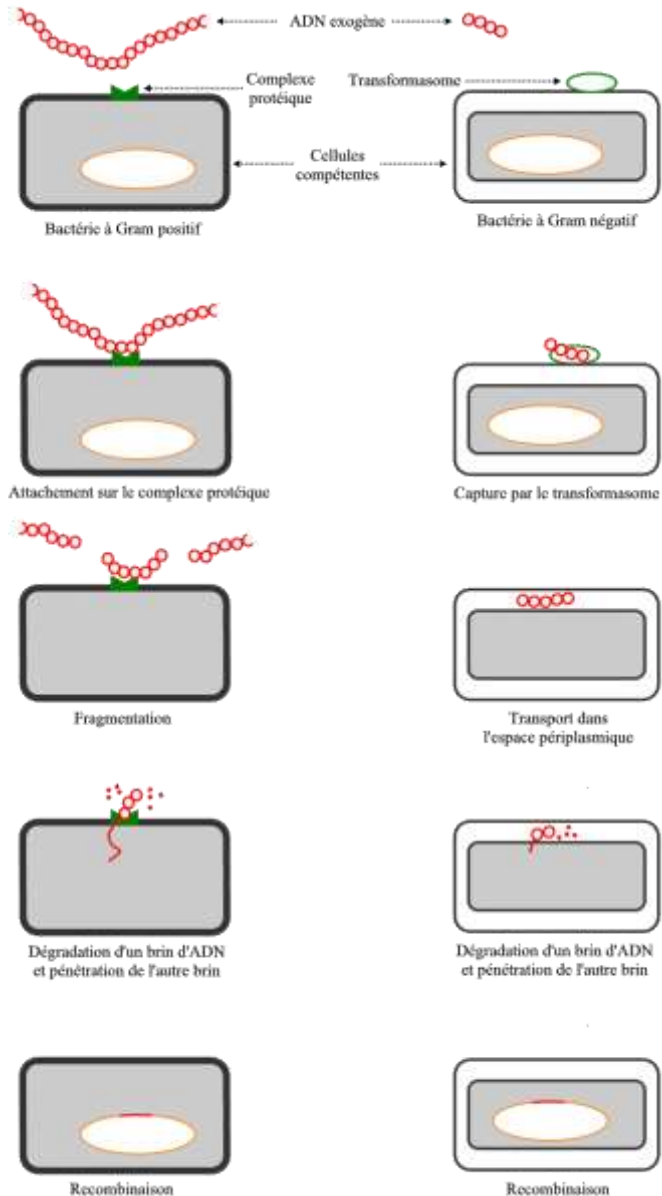


Le nombre de bactéries transformées augmente proportionnellement à la quantité d'ADN

jusqu'à une **concentration de 10^{-3} mg/mL**, puis, au delà, on passe un **seuil de saturation**.

Les cellules n'incorporent donc qu'un nombre limité de particules transformantes.

3.3. Les étapes de la transformation

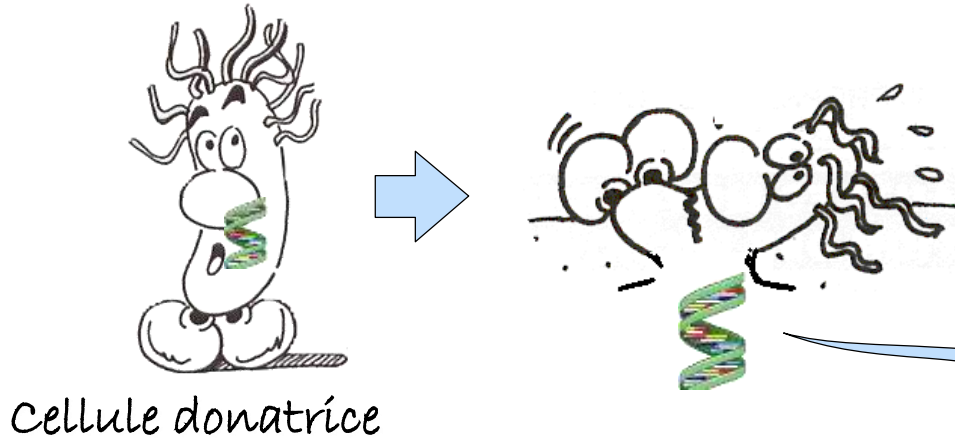


3.3.1. L'Interaction et la fixation de l'ADN à la surface de la bactérie

3.3.2. La pénétration de l'ADN dans la bactérie

3.3.3. La phase d'éclipse et l'intégration par recombinaison

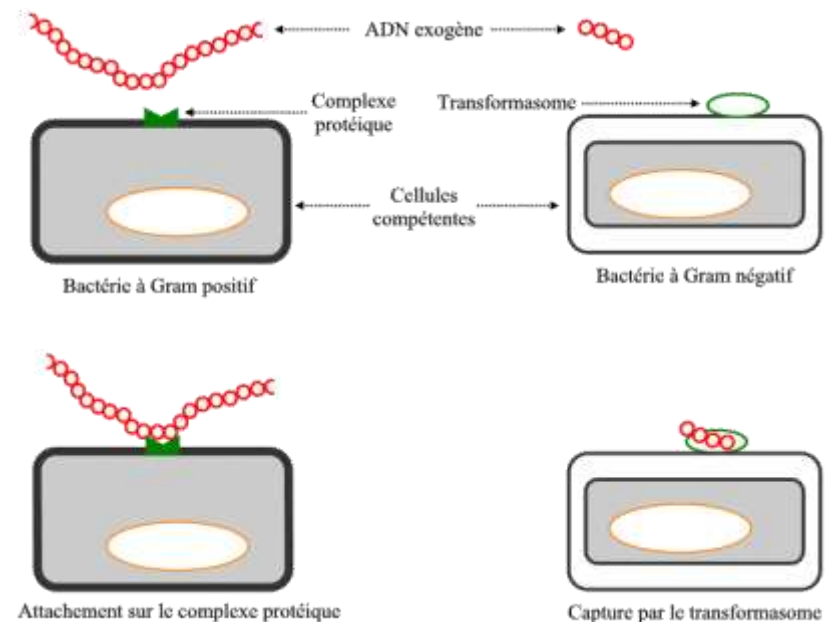
3.3.1. L'Interaction et la fixation de l'ADN à la surface de la bactérie



L'ADN double brin exogène est libéré dans le milieu après lyse de cellules bactériennes

Il se fixe généralement de façon aléatoire à la surface de la bactérie réceptrice.

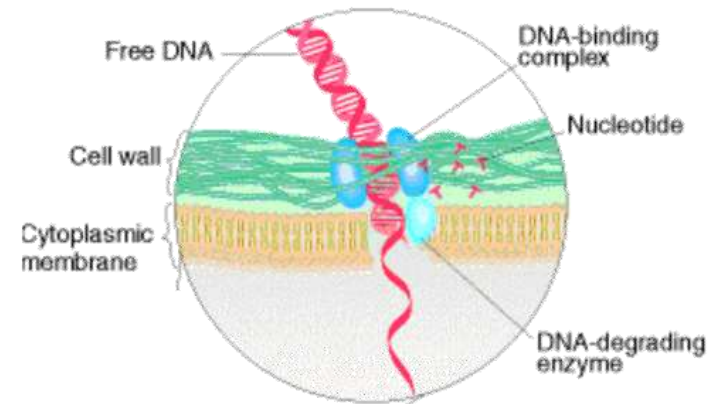
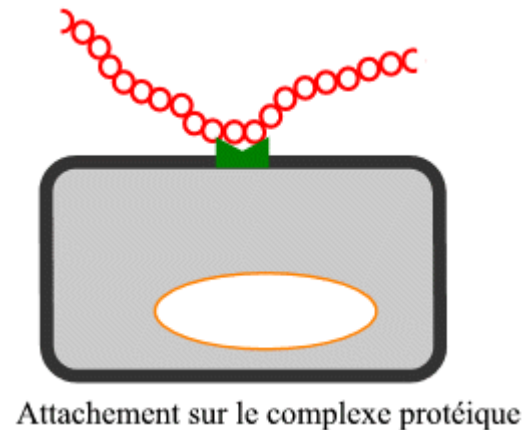
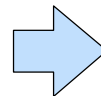
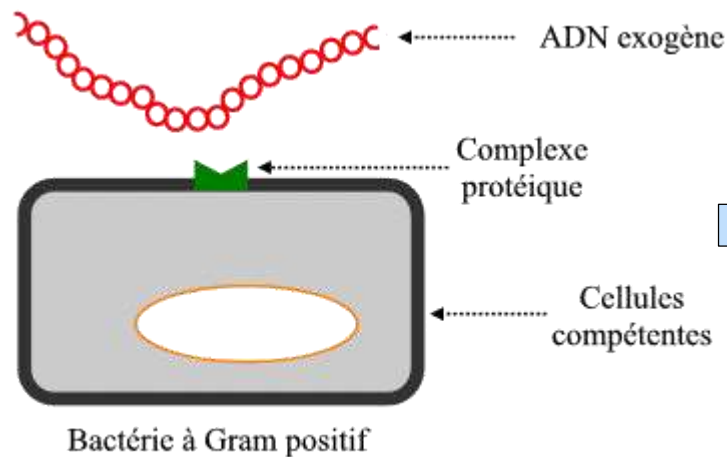
N'importe quelle fraction du génome peut être transféré



Chez les **bactéries à Gram positif**,

la capture de l'ADN exogène est assurée par des **polypeptides** capables de lier l'ADN

et qui font parti d'un **complexe protéique** présent à la surface de la cellule.

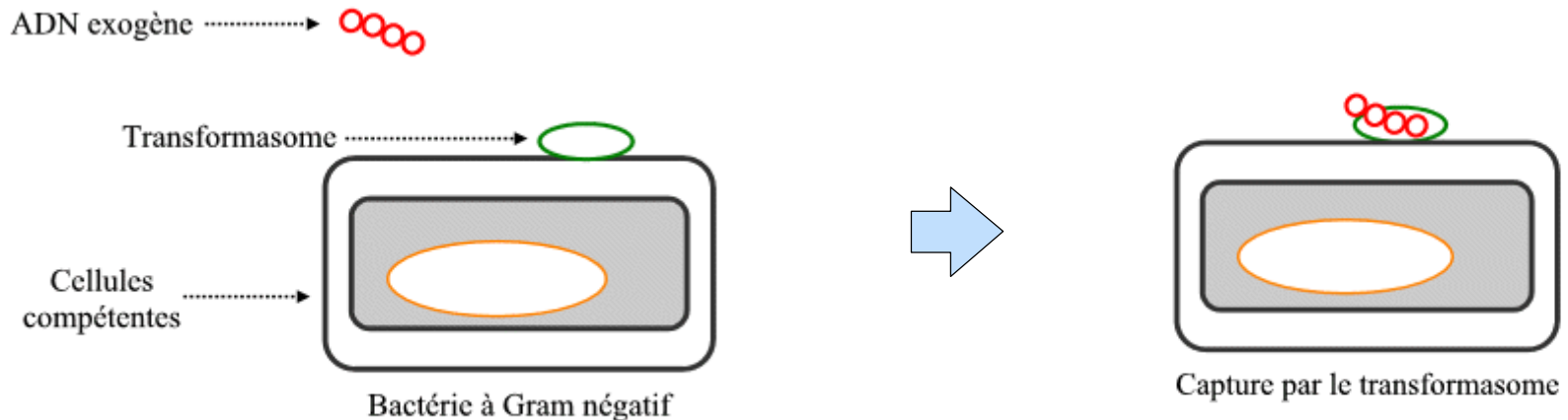


Chez les **bactéries à Gram négatif**

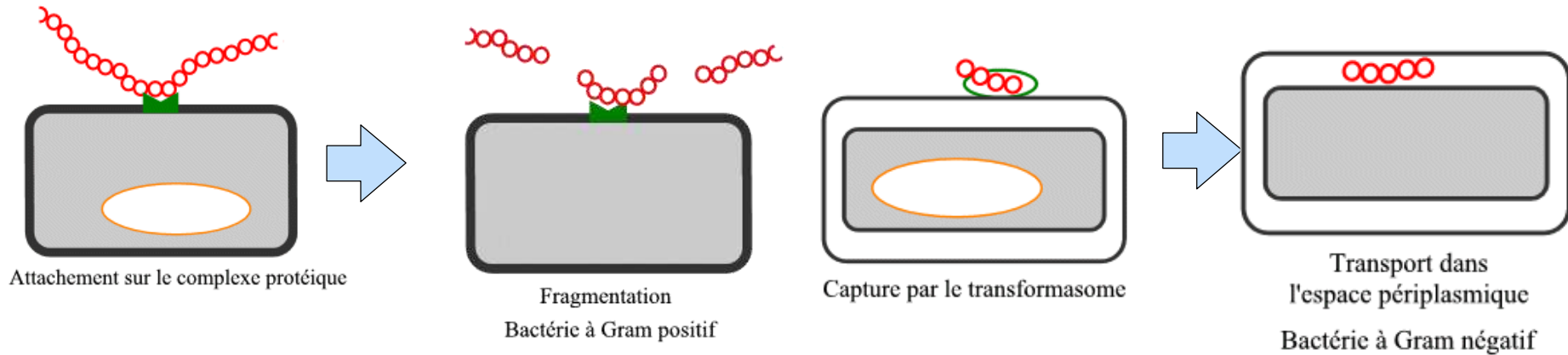
L'ADN transformant est capturé par les **vésicules membranaires** ou **transformasomes**, après **reconnaissance de séquences spécifiques de 10 à 11 pb.**

exemple: la séquence AAGTGCGGTCA pour *Haemophilus influenzae*.

Dans ce cas seul des ADN spécifiques peuvent être transformants

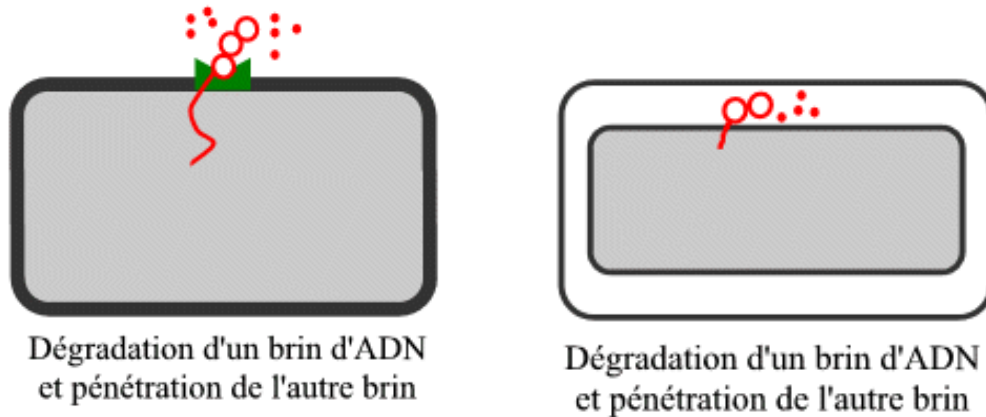


3.3.2. La pénétration de l'ADN dans la bactérie



Dès sa pénétration chez les Gram + ou juste après sont transport dans l'espace périplasmique chez les Gram -,

l'ADN bicaténaire est profondément modifié par une **endonucléase**.



il rentre au maximum 5% du génome dans une bactérie

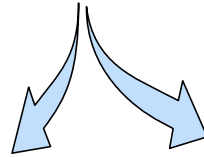
En général, un seul caractère est transféré

Un brin est dégradé par l'endonucléase, l'autre brin pénètre dans le cytoplasme **sous forme monocaténaire**. Après pénétration, le brin complémentaire sera fabriqué chez le receveur.

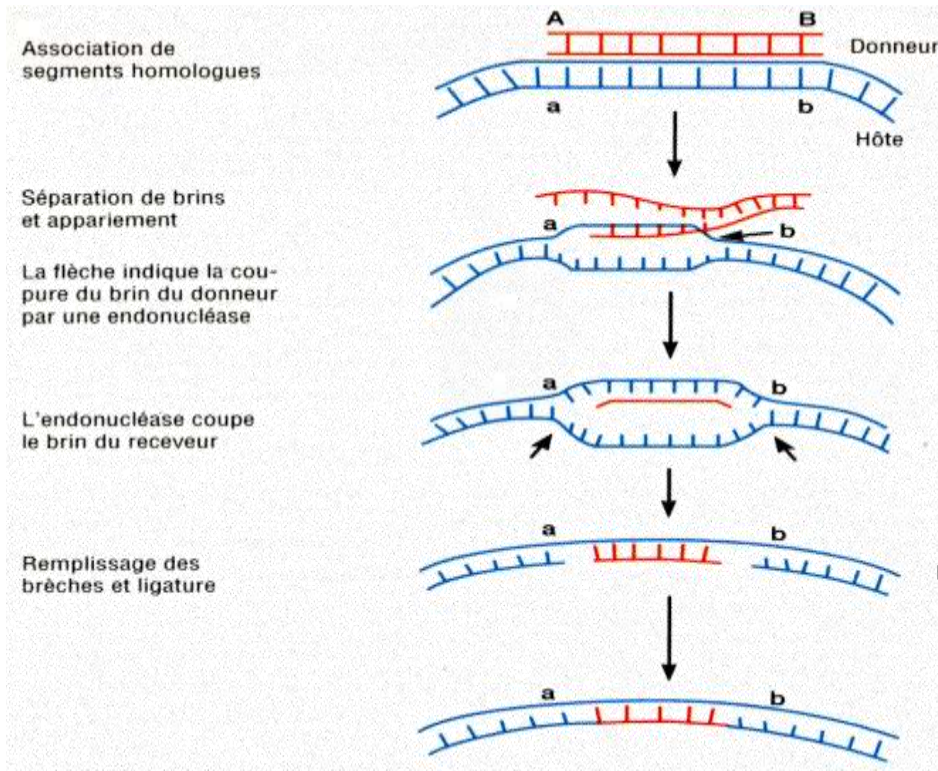
3.3.3. La phase d'éclipse et l'intégration par recombinaison

Phase d'éclipse = recherche d'une zone d'intégration au chromosome,

- Si il la trouve : l'ADN exogène est intégré par recombinaison à l'endogénote après création d'une zone en hétéroduplex.



- Si il ne la trouve pas : l'ADN est détruit ou bien dilué au cours des divisions cellulaires ultérieures : **transformation avortée**



⇒ La transformation peut alors se traduire par la **modification d'un caractère de la bactérie réceptrice.**

3.4. Les caractéristiques de la transformation

➤ **Phénomène spontanée dans la nature**

phénomène rare, fréquence 10^{-3} à 10^{-6}

⇒ 1 bactérie transformante pour 10^3 à 10^6 bactéries cultivées

➤ **Phénomène naturel restreint aux cellules naturellement transformables**

Peu de bactéries sont transformables de façon spontanée :

Haemophilus, les *Nesseria*, les streptocoques, les *Bacillus*.

➤ **Phénomène restreint aux cellules de même espèce ou d'espèce voisine**

L'ADN transformant et l'ADN de la bactérie réceptrice doivent être similaires et la transformation n'est possible qu'entre bactéries d'une même espèce ou d'espèces voisines.

➤ **Phénomène qui concerne différents caractères**

- forme capsulée devenant non capsulée et réciproquement
- résistance et sensibilité à un antibiotique
- exigence et « indépendance » vis à vis d'un métabolite
- caractères morphologiques, de mobilité etc