

Sous la direction de Luciano Paolozzi et Jean-Claude Liébart
Matthieu Arlat, Michel Dion, Harivony Rakotoarivonina

Introduction à la microbiologie

Microbiologie fondamentale et appliquée

DUNOD

Illustration de couverture : © newannyart – istockphoto.com

© Dunod, 2019
11, rue Paul Bert, 92240 Malakoff
www.dunod.com
ISBN 978-2-10-080016-2

Le Code de la propriété intellectuelle n'autorisant, aux termes de l'article L. 122-5, 2° et 3° a), d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite » (art. L. 122-4).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles L. 335-2 et suivants du Code de la propriété intellectuelle.

À la nouvelle génération : Emma, Jacopo et Elisabetta

À Sarah

Les auteurs

Ouvrage réalisé sous la direction de :

Luciano Paolozzi, professeur honoraire de génétique (université Tor Vergata, Rome), qui enseignait la génétique bactérienne et la microbiologie (Chapitres 1, 3, 4, 5, 6 et 8).

Jean-Claude Liebart, professeur honoraire (UPMC, Paris), qui enseignait la génétique bactérienne et la microbiologie (Chapitres 1, 3, 4, 5, 6 et 8).

Avec la contribution, par ordre alphabétique, de :

Matthieu Arlat, professeur (université Paul-Sabatier, Toulouse), qui enseigne la microbiologie à la faculté des Sciences et Ingénierie (Chapitre 7).

Michel Dion, professeur (université de Nantes), qui enseigne la microbiologie à la faculté des Sciences et Techniques (Chapitre 9).

Harivony Rakotoarivonina, maître de conférences (université de Reims Champagne Ardennes), qui enseigne la microbiologie à la faculté des Sciences Exactes et Naturelles (Chapitre 2).

Relecteurs

Pascal Le Bourgeois, professeur, université Paul-Sabatier, Toulouse

Pascal Combemorel, professeur, ENS, Paris

Anne Decoster, professeur, université catholique de Lille

Audrey Esclatine, professeur, université Paris-Sud

Gilles Etienne, maître de conférences, IPBS, université Paul-Sabatier, Toulouse

Michel Fons, professeur, université d'Aix-Marseille

Claire Geslin, maître de conférences, université de Bretagne occidentale, Brest

Patrizia Ghelardini, responsable de recherche, IBMM-CNR, Rome

Amel Guyonvarch, professeur, université Paris-Sud

Jean-Marie Lacroix, professeur, université Lille 1

Gaétan Le Floch, professeur, IUT, université de Bretagne occidentale, Brest

Philippe Rousseau, maître de conférences, université Paul-Sabatier, Toulouse

Philippe Silar, professeur, université Paris-Diderot

Philippe Urban, chargé de recherche, LISPB-CNRS, Toulouse

Table des matières

Les auteurs	IV
Avant-propos et guide d'emploi	X
Remerciements	XI
Et pour en savoir plus... Les + en ligne	XII
1 Micro-organismes	1
1. Un monde à découvrir	1
1.1 Les micro-organismes et la vie sur Terre	1
1.2 Formes, dimensions, unicellularité, physiologie	2
2. Taxinomie des micro-organismes	4
2.1 Spécificité de la classification des micro-organismes	5
2.2 Critères d'identification	5
2.3 Procédures d'identification	6
2.4 Classification	9
2.5 Les micro-organismes dans l'arbre universel du vivant	11
3. La cellule procaryote	14
3.1 L'enveloppe	14
3.2 Structure intracellulaire	20
3.3 Quelques éléments de réflexion	22
4. La cellule des micro-organismes eucaryotes	23
4.1 Principales structures intracellulaires	23
4.2 Le génome et son expression	25
5. Quelques protistes modèles	26
5.1 Des protozoaires	27
5.2 Des micro-algues	33
5.3 Les champignons	36
Entraînez-vous	40
2 Microbiologie environnementale	41
1. Les écosystèmes naturels	41
1.1 Périodes de carence, stress et survie	42
1.2 Stratégies trophiques : oligotrophie vs copiotrophie	43
1.3 Organisation des fonctions trophiques en réseaux	43

2. Fluctuations des communautés microbiennes	46
2.1 Les facteurs abiotiques	46
2.2 Les interactions biotiques	49
2.3 Résistance et résilience	51
2.4 Formation de biofilms	52
3. Comprendre la diversité microbienne	53
4. Quelques écosystèmes – Applications	56
4.1 Symbioses nutritionnelles dans les tubes digestifs	56
4.2 Écosystèmes du sol – Cycles biogéochimiques	58
4.3 Communautés microbiennes et dépollution	61
4.4 Antibiotiques et résistances	63
Entraînez-vous	67
3 Physiologie microbienne : métabolisme, croissance, division	68
1. Les systèmes d'échanges cellule/milieu	68
1.1 Les familles de transporteurs	69
1.2 Les systèmes de sécrétion	70
2. Métabolisme énergétique	71
2.1 La chimio-organotrophie	73
2.2 La chimio-lithotrophie	73
2.3 La phototrophie	74
3. Croissance d'une population microbienne – Le modèle <i>E. coli</i>	74
3.1 La croissance, reflet de l'état physiologique	76
3.2 Effets des facteurs externes	78
4. La reproduction, ou division, ou cytokinèse	79
4.1 Division binaire symétrique : <i>Escherichia coli</i>	80
4.2 Division asymétrique et différenciation	83
4.3 Division multiple	86
4.4 Les systèmes de division des Archées	87
4.5 Division sans FtsZ	87
Entraînez-vous	90
4 Génomes : structure et répllication chez les procaryotes	91
1. Le nucléoïde : structure physique et topologie	91
1.1 Propriétés mécaniques de l'ADN	92

1.2 Structure et malléabilité spatio-temporelle du chromosome	94
1.3 Les protéines SMC et NAP, des « architectes »	94
1.4 Organisation des génomes	95
2. L'ADN accessoire : son rôle adaptatif	98
2.1 Les plasmides	98
2.2 Les éléments génétiques mobiles (EGM)	100
2.3 Autres ADN accessoires	102
3. Réplication	103
3.1 Les étapes de la réplication	104
3.2 Modèles particuliers de réplication	109
Entraînez-vous	112

5 Variabilité génétique : potentialités et limites	113
1. Mutations et mutants	113
1.1 Les mutations spontanées	114
1.2 Les mutations induites	119
1.3 Apparition/détection des mutations	120
2. TGH chez les procaryotes	121
2.1 La transformation naturelle	121
2.2 La transduction	123
2.3 La conjugaison	123
2.4 Autres systèmes de transfert de gènes	125
3. Réparation de l'ADN	125
3.1 Les principaux systèmes de réparation	126
3.2 Blocage des fourches de réplication et recombinaison	128
4. Variabilité/anti-variabilité	129
4.1 Les systèmes anti-variabilité	129
4.2 Les stratégies anti-barrières	131
Entraînez-vous	133

6 Expression génique et adaptation	134
1. Expression génique chez les procaryotes	134
1.1 La transcription chez les Bactéries	134
1.2 La traduction chez les Bactéries	138
1.3 Transcription et traduction chez les Archées	140

2. Régulation de l'expression génique	141
2.1 Régulation du démarrage de la transcription	141
2.2 Autres niveaux de régulation	145
2.3 Le contrôle épigénétique	147
3. Régulation via des transmetteurs de signal	149
3.1 Détection et transmission du signal	149
3.2 Le chimiotactisme chez <i>E. coli</i> et <i>Salmonella typhimurium</i>	151
3.3 La sporulation chez <i>Bacillus subtilis</i>	151
4. Communications intercellulaires	153
4.1 Quorum sensing	153
4.2 Les biofilms : conditions de mise en place	157
Entraînez-vous	160
7 Interactions Bactéries/hôtes	161
1. Le mutualisme	161
1.1 Mutualisme et nutrition	161
1.2 Mutualismes non trophiques	167
2. Le commensalisme	169
2.1 Le microbiote humain	170
2.2 Le microbiote végétal	173
2.3 Algues rouges, makis et évolution du microbiote humain	174
3. Le parasitisme	175
3.1 Les épidémies – Conséquences sociétales et étiologie	175
3.2 Réservoirs, transmission et cycles infectieux	177
3.3 Adhérence/entrée dans les cellules hôtes	182
3.4 Contournement des défenses	183
3.5 Évolution du pouvoir pathogène	189
Entraînez-vous	192
8 Notions de virologie	193
1. Présentation et classification	193
2. Structure	195
2.1 Les capsides	195
2.2 Génomes	199

3. Phases du développement	201
3.1 Adsorption	201
3.2 Phase endocellulaire (dite d'éclipse)	202
4. Quelques virus typiques	204
4.1 Groupe I	204
4.2 Groupe II - Les phages Φ X174 et M13	210
4.3 Groupe III - Le phage Φ 6	211
4.4 Groupe IV - Les phages MS2 et Q β	212
4.5 Les phytovirus	213
Entraînez-vous	216

9 Biotechnologies microbiennes 217

1. Des procédés classiques à l'ingénierie	217
1.1 Ingénierie génétique : production d'acides aminés	218
1.2 Ingénierie métabolique : crise énergétique et biocarburants	221
2. Santé humaine et ingénierie métabolique	227
2.1 Vers de nouveaux antibiotiques : iChip et métagénomique	228
2.2 Oligosaccharides, un challenge d'ingénierie	230
2.3 Le mévalonate/DMAPP, un précurseur à large spectre	232
2.4 De l'hydrocortisone grâce à la levure	236
2.5 Production d'opiacés : collaboration <i>E. coli</i> - <i>S. cerevisiae</i>	238
3. Des approches innovantes	241
Entraînez-vous	246

Bibliographie (ouvrages didactiques et articles à caractère non spécialisé)	247
--	-----

Index	249
--------------	-----

Avant-propos et guide d'emploi

Cet ouvrage constitue une introduction à la microbiologie, l'étude des espèces généralement unicellulaires et microscopiques. L'univers microbien est un ensemble extrêmement hétérogène, encore plus diversifié que le monde qui nous est familier. Occupant toutes les niches écologiques de notre planète, les micro-organismes sont des agents indispensables de l'équilibre de l'ensemble des écosystèmes. Ils comprennent deux grandes catégories : les protistes, eucaryotes (structure cellulaire semblable à celle des organismes pluricellulaires), et les procaryotes (structure cellulaire plus simple). Leurs modes de vie sont très diversifiés, libres ou en association avec d'autres organismes, parfois néfastes s'il s'agit d'espèces pathogènes, et capables d'entretenir des « dialogues moléculaires » inter-organismes. Ce monde microbien est doublé du monde des virus, entités de tailles encore plus réduites et probablement au moins aussi nombreux, intermédiaires entre monde « vivant » et monde « chimique ». Parasites obligatoires d'organismes de toutes catégories, ils constituent un maillon important de la diversification et de l'évolution des organismes qu'ils infectent. C'est à l'étude des micro-organismes, qui n'a réellement commencé qu'il y a deux à trois siècles, que nous devons une grande partie des connaissances actuelles au niveau moléculaire en physiologie, génétique, etc. du monde vivant. Cela a permis, entre autres, la mise au point de méthodes de lutte contre des maladies infectieuses ou l'utilisation de micro-organismes dans des productions industrielles.

Nous vous conseillons, avant de vous plonger dans ce manuel, de commencer par la lecture de la fiche Introduction « Le monde inattendu des micro-organismes » (disponible sur le site web de l'ouvrage, voir plus loin), qui donne quelques clefs de l'histoire et du développement de la microbiologie.

En accord avec la nomenclature actuelle, les noms de genres sont écrits en italique avec une majuscule initiale, et les noms d'espèces en italique et tout en minuscules ; les noms des trois domaines actuellement reconnus, incluant chacun des micro-organismes, sont écrits avec une majuscule initiale : Bactéries, Archées et Eucaryotes. En revanche les termes « protiste » et « procaryote », qui désignent des regroupements pratiques mais non phylogénétiques, sont écrits tout en minuscules.

Le signe \$ en exposant indique une incitation à consulter l'Annexe méthodologique (sur le site web de l'ouvrage).

Bonne lecture !

Remerciements

Cet ouvrage de microbiologie fondamentale et appliquée est le fruit d'une harmonieuse collaboration avec plusieurs partenaires et collègues, à qui nous tenons à exprimer toute notre gratitude :

- M^{me} Laetitia Hérin (Dunod), pour la confiance qu'elle nous a accordée en nous proposant de réaliser ce nouvel ouvrage et pour ses nombreux conseils, qui ont permis d'assurer l'adéquation des textes aux exigences des étudiants auxquels il s'adresse ;
- nos collègues co-auteurs, bien sûr ;
- nos collègues relecteurs, qui ont contribué à la clarté et à la rigueur scientifiques des textes ;
- M^{me} Françoise Joset, professeur honoraire, université d'Aix-Marseille, à qui nous adressons un remerciement particulier pour avoir mis à notre disposition son expérience d'enseignante et de scientifique, qui s'est traduite en riches suggestions, analyses critiques et remaniements des textes, suivis de méticuleuses révisions.

Et pour en savoir plus...

Les + en ligne

Sur la page associée à l'ouvrage sur le site dunod.com, sont disponibles des fiches et vidéos formant des compléments à certains chapitres, essentiellement les chapitres à caractère général ; l'approfondissement des domaines plus spécifiques sera traité en master.

Fiches d'intérêt général

Fiche Introduction : Le monde inattendu des micro-organismes

Fiche A : Annexe méthodologique

Fiche B1 : Liste des organismes et virus cités dans les chapitres et les fiches

Fiche B2 : Principales Bactéries responsables de maladies infectieuses chez l'Homme et chez certaines plantes.

Fiches spécifiques

Chapitre 1

Fiche 1.1 : Distribution des procaryotes dans la nature

Fiche 1.2 : La classification des organismes vivants – Historique – Ses limites pour les procaryotes

Fiche 1.3 : La coloration de Gram

Fiche 1.4 : L'identification de Bactéries pathogènes humaines : à chacun sa méthode

Fiche 1.5 : Clé dichotomique d'identification – Cas d'une Bactérie coque à Gram⁺

Fiche 1.6 : Le manuel Bergey, référence de la systématique des procaryotes

Fiche 1.7 : Structures péri- et trans-enveloppes des procaryotes – Leurs fonctions

Fiche 1.8 : Organites de procaryotes

Fiche 1.9 : L'avantage d'être petit – Rapport dimension/structure d'une cellule

Fiche 1.10 : Chromatine et transcription chez les cellules eucaryotes

Chapitre 2

Fiche 2.1 : Les micro-organismes rares

Fiche 2.2 : Expressions mathématiques de la diversité microbienne

Fiche 2.3 : Fractionnement des parois végétales et bioraffinerie

Chapitre 3

Fiche 3.1 : Colonies microbiennes

Fiche 3.2 : La protéine FtsZ

Fiche 3.3 : Les Bactéries non cultivables

Fiche 3.4 : BALO, un monde à exploiter

Fiche 3.5 : Les Streptomycètes, une mine d'applications

Fiche 3.6 : À la recherche d'un mécanisme primitif de prolifération cellulaire

Chapitre 5

Fiche 5.1 : Transferts génétiques horizontaux en conditions naturelles

Fiche 5.2 : Découverte de la conjugaison

Fiche 5.3 : Fonctions et devenir du plasmide F d'*E. coli*

Fiche 5.4 : Identification des protéines Uvr chez *E. coli*

Fiche 5.5 : Hémiméthylation et correction par MMR

Fiche 5.6 : CRISPR, immunité bactérienne acquise ; instrument de génomique ; ses applications

Chapitre 6

Fiche 6.1 : Nucléotides non canoniques des ARNt – Leurs rôles

Fiche 6.2 : Variation de phase chez la souche pathogène *E. coli* UPEC

Fiche 6.3 : Variabilité des fréquences d'initiation de transcription

Fiche 6.4 : Fonctionnement du mouvement flagellaire

Chapitre 7

Fiche 7.1 : Les systèmes de sécrétion de types IV et VI

Fiche 7.2 : Les adhésines des *Yersinia* pathogènes pour l'Homme

Fiche 7.3 : Quelques épidémies et pandémies en Europe depuis le Moyen Âge

Fiche 7.4 : Les toxines bactériennes

Chapitre 8

Fiche 8.1 : Décision lyse/lysogénie chez le bactériophage λ

Fiche 8.2 : Encapsidation de l'ADN du bactériophage T4

Et pour en savoir plus... Les + en ligne

Fiche 8.3 : Injection et transcription séquentielles du génome chez le bactériophage T7

Fiche 8.4 : Le virus de l'hépatite B (VHB)

Fiche 8.5 : Les virus de la grippe

Vidéos

Chapitre 1

Vi 1.1 : L'antibiogramme

Chapitre 3

Vi 3.1 : Isolement de cultures pures

Vi 3.2 : Détermination de la concentration cellulaire

Vi 3.3 : La technique des répliques

Chapitre 8

V 8.1 : Le nombre d'unités virales formant plages de lyse

Introduction

La cellule, unité de base de tout organisme vivant, est constituée d'une structure (membrane et éventuellement enveloppe) contrôlant son interaction avec l'environnement et enserrant le cytoplasme, siège de l'ensemble des réactions nécessaires à la « vie ». Ce cytoplasme contient des milliers de constituants, dont des macromolécules (majoritairement protéines et acides ribonucléiques) organisées en structures fonctionnelles, et le génome, « tableau de commande » du fonctionnement et de la reproduction de la cellule. Cet archétype universel montre cependant des spécificités de contenus, structures et fonctions propres à la nature eucaryote ou procaryote et aux espèces des organismes.

Objectifs

Définir les notions de procaryotes, eucaryotes, unicellularité

Connaître la structure et l'organisation, les différences entre les cellules procaryotes et eucaryotes

Identifier les principaux constituants cellulaires et leurs fonctions chez les Bactéries et les Archées

Expliquer comment les micro-organismes ont développé leur capacité adaptative à une très large gamme d'environnements

Plan

- 1 Un monde à découvrir
- 2 Taxinomie des micro-organismes
- 3 La cellule procaryote
- 4 La cellule des micro-organismes eucaryotes
- 5 Quelques protistes modèles

1 Un monde à découvrir

1.1 Les micro-organismes et la vie sur Terre

Les cellules des millions d'espèces vivantes, tant multi- qu'unicellulaires, sont construites selon deux modèles : eucaryote et procaryote. À ces deux types correspondent les organismes que nous sommes habitués à côtoyer (plantes, animaux), mais aussi l'énorme et riche monde invisible des micro-organismes, un ensemble très hétérogène tant sur le plan morphologique que physiologique, dont l'unité est leur nature majoritairement unicellulaire. Il peut être défini en deux ensembles : les **protistes**, appartenant au domaine des **Eucaryotes** et subdivisés en plusieurs sous-ensembles (pour simplifier : les

protozoaires, les micro-algues et les champignons, voir § 5), et les procaryotes, incluant deux domaines : les **Bactéries** et les **Archées** (voir § 2). Le monde microbien colonise une énorme variété de niches écologiques (voir Chapitre 2). Cette présence ubiquitaire résulte d'une longue histoire évolutive qui lui a permis de s'adapter à une vaste gamme de conditions physiques (températures, pH, pression hydrostatique, jusque dans les profondeurs océaniques) et chimiques (nature des nutriments et des sources d'énergie) (voir Chapitre 3) et a contribué à sa diversification. Cette diversité est fondamentale pour la vie sur la planète, ces organismes assurant l'équilibre des cycles biogéochimiques, et ainsi le fonctionnement des écosystèmes. Ils constituent les premiers maillons de la chaîne alimentaire de l'écosystème marin. On estime qu'une molécule sur deux du dioxygène (O₂) que nous consommons par respiration est produite par des micro-algues marines. Les procaryotes et les champignons sont les principaux agents de recyclage de la matière organique morte.

Les modes de vie des micro-organismes sont soit sous forme libre, soit, assez fréquemment, en association – obligatoire ou non – avec d'autres organismes (inter-procaryotes ou avec des protistes, des plantes ou des animaux) (voir Chapitres 2, 6 et 7). L'association est très souvent bénéfique, sinon indispensable, pour l'hôte (tel le microbiote de l'Homme) ; elle peut inversement lui être néfaste, comme c'est le cas d'une centaine d'espèces pathogènes, qui ne représentent cependant qu'une minorité des Bactéries connues, aucune Archée, et quelques protistes dont une vingtaine infectant l'Homme (certaines Amibes, les Trypanosomes). La seule malaria, causée par le protozoaire *Plasmodium*, a été responsable en 2016 de 216 millions de cas, dont 429 000 décès (données de l'OMS).

Seul un très petit nombre d'espèces, voire de souches, a été étudié, tant protistes que procaryotes, en raison soit de caractéristiques plus favorables à leur étude en laboratoire (cultivabilité, vitesse de croissance, possibilités d'approche génétique), soit d'un intérêt médical et/ou appliqué (voir Chapitres 2, 7 et 9). Le nombre d'espèces répertoriées est une minorité par rapport à celles estimées : moins de 1 % pour les procaryotes et, parmi les protistes, moins de 10 % pour les seuls protozoaires (sans doute une surestimation pour l'ensemble des protistes).

1.2 Formes, dimensions, unicellularité, physiologie

La forme et la taille des cellules sont des caractéristiques génétiquement déterminées résultant d'un processus évolutif et adaptatif important. La forme dicte en effet les interactions entre la cellule et son environnement, les dimensions celles de sa structure interne. Tout comme chez les autres organismes, les caractéristiques morphologiques constituent des critères préliminaires pour l'identification des micro-organismes (§ 2). L'**unicellularité** est assez générale dans le monde microbien, mais de nombreuses espèces ont développé diverses formes allant de la simple association de cellules composant une colonie jusqu'à la pluricellularité.

Les **morphologies** des **protistes** peuvent être irrégulières (Amibe, voir Figure 1.7) ou présenter des formes géométriques simples – sphères, cubes, prismes, ovoïdes (*Saccharomyces*, voir Figure 1.4B) – ou complexes (Paramécie ou Trypanosome, voir Figures 1.8 et 1.9), avec parfois des appendices : cils (Paramécie), flagelles (Trypanosome, Euglène, voir Figures 1.9 et 1.11), etc. Les morphologies des procaryotes, **Bactéries** et **Archées**, sont généralement plus simples, quoique très variées (voir Figure 1.1A), les **Archées** ajoutant d'autres morphologies (cubes, lobes, tétraèdres, longs filaments non segmentés). Des structures de surface sont souvent présentes chez les membres des deux groupes (§ 3.1). Des changements de conditions physiques et/ou nutritionnelles, qui influent sur les capacités de croissance, sont souvent initiateurs de changements morphologiques. Ainsi la Bactérie *Escherichia coli* présente des cellules individuelles en bâtonnet en condition de croissance rapide, mais forme des filaments multicellulaires en conditions nutritionnelles limitatives ou inhibitrices de la division. Un dimorphisme lié au cycle de reproduction est observé chez quelques espèces (voir Chapitre 3). De nombreuses espèces se mettent en vie quiescente avec différenciation en spores, une forme de résistance, tant que persistent des conditions environnementales peu favorables à leur croissance (voir Chapitres 3 et 6). Chez certaines bactéries pathogènes intervient une cascade de variations morphologiques suivant les stades de l'infection, liée à leur capacité d'envahissement de l'hôte et/ou de résistance à sa contre-attaque (voir Chapitre 7). Les espèces cultivables en laboratoire, reproduites sur milieu nutritif solide (en boîte de Pétri[®]) forment des colonies consistant en amas de cellules (environ 10^8) d'un diamètre de l'ordre du millimètre (voir Figures 1.1B, C et D). Chaque colonie est une population clonale, issue d'une cellule unique, dont la forme, l'aspect, la pigmentation éventuelle sont aussi des caractères distinctifs (§ 2.3).

Les **dimensions** des micro-organismes se mesurent généralement en microns. Chez les protistes elles varient entre 10 et 100 μm (quelquefois plus) et sont très supérieures à celles des procaryotes (de 1 à 10 μm pour la plupart des Bactéries, et généralement inférieures au micron pour les Archées). Parmi les exceptions connues citons les Mégabactéries, ou Bactéries géantes, dont les dimensions varient entre 50 et 750 μm (telle *Eupulopiscium fishelsoni*, de 80 μm de diamètre et 700 μm de long, visible à l'œil nu) et, à l'opposé, les Ultramicrobactéries, avec des diamètres inférieurs à 0,2-0,3 μm . Dans leur ensemble, les volumes des cellules procaryotes couvrent ainsi huit ordres de grandeur ($< 0,01$ à $2,10^6 \mu\text{m}^3$) ; pour comparaison ces valeurs sont de 30-40 μm^3 pour le protiste *Saccharomyces cerevisiae*, et de 2 000-4 000 μm^3 pour une cellule de mammifère.

À la diversité morphologique des micro-organismes s'associe une diversité physiologique concernant les systèmes d'exploitation de l'énergie, la nature des nutriments (voir Chapitres 2 et 3), les modes de reproduction (voir Chapitre 3), tant sexuée que par multiplication végétative, ainsi que de nombreuses autres caractéristiques tels les modes de locomotion (voir Chapitre 6) et les relations intercellulaires (voir Chapitres 2, 6 et 7).

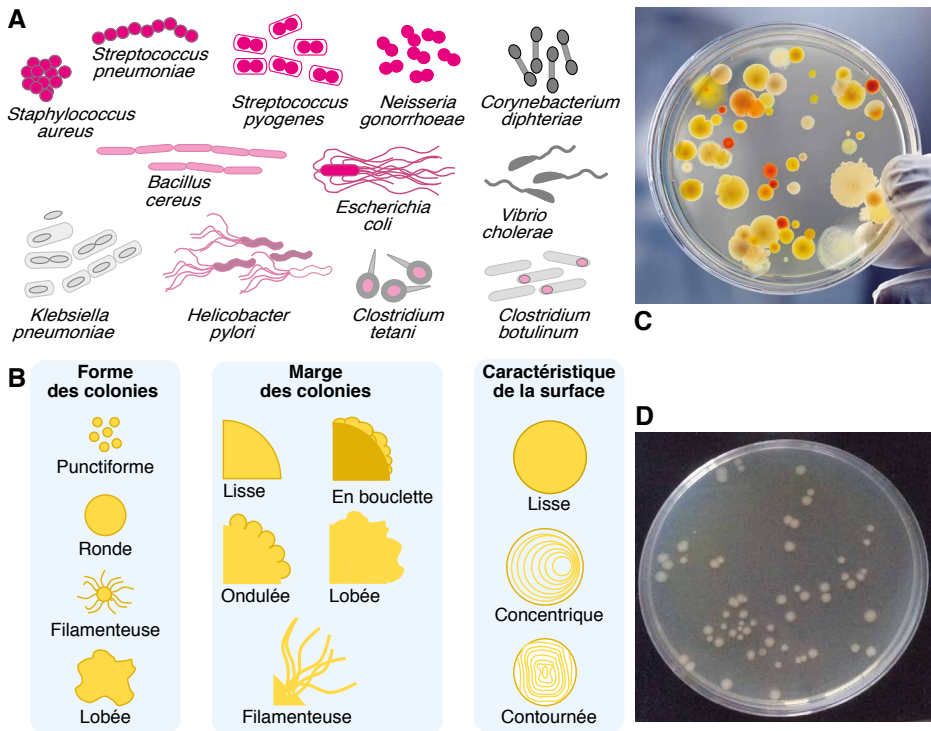


Figure 1.1 – Morphologies de cellules et de colonies de Bactéries

A. Schémas de cellules, agrandies environ 10^4 fois. Les noms peuvent renvoyer à la couleur (*aureus*, jaune or), ou à la forme des cellules : bacille (bâtonnet, régulier ou courbé), coque (sphère, plus ou moins régulière), strepto- (chapelet de sphères, *strepto* : surenroulée), *Sarcina* (en paquets), *Thermotdiscus* (en disque), *Helicobacter* (en hélice), spirales, cônes, rectangles, étoiles, etc. Certaines cellules sont pédunculées, en filaments (ramifiés ou simples, plus ou moins longs), associées par paires (diplocoque, deux sphères associées) ou en petit nombre, formant des cubes réguliers, des grappes (*staphylo*). **B.** Détails de contours de colonies. **C.** Colonies bactériennes sur milieux nutritifs solides (réduction de moitié environ). **D.** Colonies d'*E. coli* (réduction de moitié environ).

2 Taxinomie des micro-organismes

La taxinomie a pour but de décrire et nommer les organismes, et la systématique de les classer et d'en rechercher les relations phylogénétiques. La taxinomie actuelle définit hiérarchiquement domaine, règne, division, classe, ordre, famille, genre et espèce. Pour les organismes dont on dispose de fossiles, les critères d'identification se fondent sur les données de la paléontologie et de la cladistique (ou cladisme), qui permettent d'établir

une chronologie de l'histoire évolutive et des relations de parenté entre organismes à partir d'un ancêtre commun. Cela conduit à la construction d'arbres. Ces classifications sont continuellement remaniées au fur et à mesure de l'acquisition de données liées au développement des technologies ou à la découverte de nouveaux organismes. La nomenclature est classiquement binominale pour les protistes et les procaryotes : *Genre* (Majuscule italique) *espèce* (minuscule italique) souche (plus libre) : *Trypanosoma brucei gambiense* ; *Escherichia coli* B.

2.1 Spécificité de la classification des micro-organismes

La nécessité d'une définition rationnelle et donc d'une classification des micro-organismes, outre son intérêt scientifique, a été liée aux découvertes du rôle de certains d'entre eux dans les maladies infectieuses et la détérioration des denrées alimentaires, et à leur utilisation dans la production d'aliments et boissons par fermentation de produits naturels. Jusque vers le début du xx^e siècle le monde vivant a été divisé en animaux et végétaux, les micro-organismes étant assignés à l'un ou l'autre groupe (protozoaires, protophytes). La première modification a consisté en la séparation des champignons en un groupe distinct, fondé sur les différences chimiques majeures de leur enveloppe cellulaire (§ 4 et 5). Les « bactéries » ont été également identifiées comme un groupe à part sur la base de leur très petite taille, de la spécificité de leur paroi ainsi que de l'absence de membrane nucléaire (§ 3). La classification du monde vivant reconnaissait alors cinq domaines : Animaux, Plantes, Champignons, Protistes et Bactéries (R.H. Wittaker, 1959). Rappelons que les Archées n'ont été identifiées comme telles que plus tardivement (1967) (§ 2 et 3). Ultérieurement, les observations en microscopies optique et électronique ont conduit à la définition de deux groupes cellulaires, Eucaryotes et Procaryotes, amenant à une classification binaire (R.Y. Stanier & C.B. Van Niel, 1962), positionnant les Procaryotes à la base de l'arbre universel sur le critère que ce sont eux qui auraient donné naissance aux Eucaryotes.

2.2 Critères d'identification

Si les principes théoriques de la taxinomie sont les mêmes que pour les autres êtres vivants, plusieurs difficultés apparaissent dans leur application aux micro-organismes en général, et plus particulièrement aux procaryotes. Il en est ainsi de la difficulté à définir la notion d'espèce chez ces organismes. En effet cette notion, définie comme une population dont les individus peuvent naturellement se croiser et produire une descendance fertile, n'est pas applicable chez des organismes à reproduction asexuée (voir Chapitres 3 et 5). Leur structure unicellulaire limite l'utilisation des critères morphologiques. Enfin, les caractères physiologiques sont peu discriminatifs. Certains peuvent en effet être partagés par des espèces phylogénétiquement distantes (par un mécanisme de convergence) ou au contraire absents chez des espèces proches (mécanisme de régression) (§ 2.5). L'identification d'un procaryote et son classement dans un taxon ont largement progressé grâce à la disponibilité de méthodes moléculaires[§]. Le concept d'espèce selon ces méthodes a dorénavant été défini par le niveau d'identité

de séquence (la capacité d'hybridation ADN-ADN) de leur ADN total ou, par défaut, de leurs gènes ribosomaux. Une espèce sera le regroupement de souches présentant un degré de similarité d'au moins 70 % pour leur ADN, ou 97 % pour les gènes ribosomaux, associé à un ensemble de propriétés physiologiques communes qui les différencient des souches d'une autre espèce. Il existe toutefois des exceptions à cette règle.

Jusqu'à la fin des années 1960 les Archées étaient considérées comme des Bactéries particulières (d'où le nom d'Archéobactéries). Peu distinguables morphologiquement des Bactéries « vraies », ces organismes étaient groupés en considération de leur habitat ou d'une particularité métabolique : halophiles, thermophiles, méthanogènes. Ces déterminations, cependant, regroupaient aussi des procaryotes strictement définis comme des Bactéries. Ce ne sera que quelques années plus tard, grâce à l'approche moléculaire, qu'il deviendra possible, et nécessaire, de séparer ces organismes des Bactéries pour les classer dans un domaine propre (voir Figure 1.3).

2.3 Procédures d'identification

L'identification des micro-organismes procède selon les principes classiques de comparaison à d'autres organismes connus pour définir ressemblances et différences. Des clefs de classification définissent les caractères importants qu'il faut examiner dans ce but. Il existe essentiellement deux modalités d'identification, fondées pour la plus ancienne sur des critères phénotypiques et pour la plus récente sur des critères moléculaires. Cette dernière est actuellement prédominante, en particulier pour la détermination des pathogènes, et essentielle pour la majorité des organismes non cultivables ou extrêmement difficiles à cultiver dans les conditions de laboratoire. Le choix d'une méthode doit être considéré en fonction de l'utilisation prévue : pratique (bactériologie médicale, microbiologie industrielle) ou théorique (classification selon l'histoire évolutive).

a. La procédure d'identification phénotypique

La procédure d'**identification phénotypique** utilise un large éventail de caractères : aspect externe (morphologie, coloration de Gram ou autres, motilité, formation de spores, aspects des colonies), capacités culturales (aérobiose ou anaérobiose, températures et pH possibles et optimaux), capacités métaboliques (présence d'enzymes telles que catalase, oxydase, etc.), nature des antigènes de surface (sérogroupage), sensibilité à des bactériophages (lysotypie), profil moléculaire (composition en bases de l'ADN, profil protéique), etc.

Les procédures classiques d'identification phénotypique se déroulent en deux temps. L'échantillon à analyser provient généralement d'un prélèvement corporel (urine, sang, salive, fèces, etc.), du sol ou de produits destinés à la consommation, suivant qu'il s'agit de bactériologie médicale ou agroalimentaire. Il est généralement petit et complexe (impur). Il faut donc initialement réaliser une culture pure, c'est-à-dire dont les cellules sont issues d'une unique cellule mère de l'organisme à étudier^s (voir Chapitre 3), pour obtenir le matériau nécessaire pour la suite des opérations. Les capacités métaboliques

(utilisation de divers substrats) peuvent être déterminées soit *via* des cultures en milieu liquide (délais de réponses minimaux de 24 à 48 heures), soit par des réactions biochimiques sur des aliquotes cellulaires au moyen de tests de natures turbidimétrique ou colorimétrique (délais de réponses inférieurs à 24 heures)[§]. Chaque résultat est représenté par un code-barres, et des logiciels d'interprétation fournissent l'identification de la souche. Cette méthode donne de bons résultats mais elle est laborieuse, coûteuse et parfois peu pratique car assez longue à mettre en œuvre. L'identification d'un pathogène nécessite très souvent une réponse rapide pour compléter un diagnostic et initier une thérapie ciblée. Des kits d'analyse de capacités enzymatiques, disponibles sous forme de tubes multitests (voir Figure 1.2A), spécifiques soit d'une famille bactérienne (par exemple Entérobactéries), soit d'un genre (par exemple *Salmonella*), permettent d'identifier rapidement et à coût moindre de nombreuses espèces, en particulier des pathogènes responsables de maladies gastro-intestinales. Des versions plus récentes de ces tests ont été développées sous forme de galeries miniaturisées, qui analysent simultanément jusqu'à 50 caractères biochimiques en les associant à un antibiogramme, permettant l'identification d'une souche en 24 à 48 heures.

b. Les clefs dichotomiques d'identification

Des **clefs dichotomiques d'identification** (analogues à celles utilisées en botanique ou en zoologie) permettent l'identification d'une souche par une série d'étapes conduisant aux différents niveaux d'une table d'identification, au fur et à mesure de la réponse à chacun des caractères analysés (voir Figure 1.2B).

c. Les méthodes d'identification moléculaire

De nombreuses méthodes d'**identification moléculaire**, fondées sur l'analyse de l'ADN ou des protéines[§], ont été développées pour contourner certaines limites de l'identification phénotypique, dont la non-cultivabilité en laboratoire. Nous discuterons seulement la méthode de classification moléculaire fondée sur **l'analyse de l'ADN**, qui consiste à séquencer un gène ou une portion de génome, et à comparer cette séquence avec celles d'une banque de référence. Chaque base de l'ADN peut être considérée comme un caractère en soi, ce qui rend très informative une séquence même de 1 000 paires de bases (taille moyenne d'un gène procaryote). Le **gène de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomale** (codant l'ARNr 16S ou 18S chez les procaryotes et Eucaryotes, respectivement) (§ 3.2 ; 4.1), présent chez tous les organismes, a des caractéristiques qui en font un excellent marqueur d'identification des micro-organismes (§ 2.5). Il est admis que deux souches présentant des séquences de leur ARNr différant de plus de 3 % (c'est-à-dire que leur pourcentage d'identité est inférieur à 97 %) appartiennent très probablement à deux espèces différentes. La réciproque toutefois n'est pas vraie, puisque des souches d'espèces différentes peuvent avoir des séquences d'ARNr 16S ou 18S ayant un pourcentage d'identité supérieur à 97 %. Dans ce cas le comité chargé de la systématique des procaryotes recommande d'utiliser les pourcentages d'hybridation ADN-ADN, qui doivent être d'au

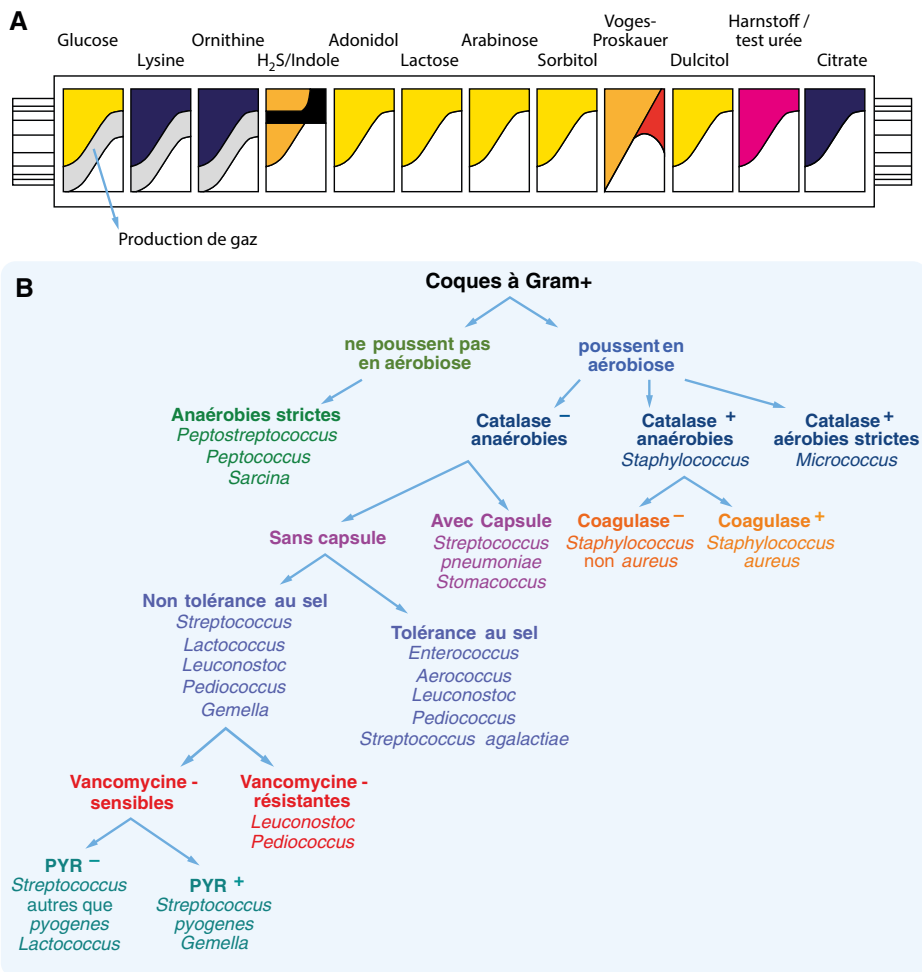


Figure 1.2 – Procédures d'identification

A. Un système miniaturisé de tests enzymatiques ; exemple d'un Entérotube « multitests ». Un tube en plastique est compartimenté en douze chambres contenant chacune un milieu de culture et un réactif spécifiques, destinés à tester les capacités de fermentation d'une série de substrats, celles-ci faisant virer la couleur du réactif. Un fil métallique traverse tout le tube et dépasse à chacune de ses extrémités. Utilisé pour l'ensemencement, il est chargé sur une colonie de la culture à tester, puis tiré à partir de l'extrémité opposée, permettant ainsi d'inoculer toutes les chambres du tube. Celui-ci est mis à incubation. Les résultats, exprimés sous forme d'un code-barres, sont interprétés par un ordinateur. **B.** Utilisation d'une clef dichotomique d'identification. Exemple d'application à un échantillon de Bactéries à Gram⁺. La réponse positive à la coloration de Gram et la forme de la cellule ont conduit à positionner l'organisme étudié parmi trois grands groupes, bacilles à Gram⁺, bacilles et coques à Gram⁻, coques à Gram⁺. Progressivement, la croissance de l'échantillon dans une série de conditions biochimiques et physiques, selon le schéma décrit, permet d'obtenir l'identification de l'espèce.

moins 70 %, ainsi que la stabilité thermique à 5 °C des hybrides ADN-ADN des gènes correspondants. Il est possible de déterminer le **profil de migration électrophorétique** de l'ADN, spécifique de chaque souche (technique AFLP), la **séquence de gènes** (5 à 7) codant des **fonctions conservées** (technique MLSA), ou la **séquence du génome complet** (technique ANI). La résolution des deux premières méthodes permet de discriminer des souches au sein d'une espèce, la troisième de discriminer deux génomes ne différant que de quelques nucléotides.

Des méthodes fondées sur les **profils protéiques**, en particulier les protéines ribosomales (**spectrométrie de masse MALDI-TOF**), analysés par comparaison avec des bases de données, sont actuellement très utilisées en diagnostic clinique.

2.4 Classification

a. Classification phénétique

La **classification phénétique** regroupe en principe les organismes sur la base de ressemblances anatomiques ; dans le cas des procaryotes ce sont des caractères phénotypiques tels que définis ci-dessus (§ 2.3). Malgré les points critiques qu'elle présente par rapport aux classifications phylogénétiques moléculaires actuelles, cette approche conserve un intérêt pratique en microbiologie médicale, agricole et industrielle. Des progrès énormes ont été accomplis dès qu'il a été possible de disposer d'outils (ordinateurs et programmes) permettant de confronter de nombreux caractères et de déterminer des degrés de similarité entre souches. Développé vers la fin des années 1950 par R. Sokal et P. Sneath, ce système s'inspire de la classification des plantes fondée sur un ensemble de caractères ayant chacun la même « valeur ». Les résultats sont présentés sous forme de matrices de similarité réalisées en calculant un indice par paires de souches (par exemple, l'indice de Jaccard). Ces matrices sont traduites en dendrogrammes construits grâce à un algorithme regroupant les souches en fonction de leurs caractères communs. Des phénons sont ainsi définis, des groupes homogènes dont les individus présentent environ 80 % de similitude ; dans le cas des procaryotes les phénons sont souvent équivalents aux espèces définies selon les autres modes de classification.

Cette classification est critiquable à plusieurs niveaux :

- Le choix des caractères analysés ainsi que leurs poids relatifs sont subjectifs.
- Il n'est pas tenu compte du nombre de gènes impliqués dans l'expression de chacun de ces caractères ; ainsi l'ensemble des gènes correspondant à la totalité des caractères examinés ne représente souvent qu'une petite fraction du génome. Les similarités phénotypiques prises en compte ne reflètent donc pas l'histoire évolutive des espèces.
- Non moins important est le fait que la méthode ne s'applique qu'à la minorité des organismes cultivables.

b. Classification phylogénétique

Cette classification, établie sur des bases moléculaires, regroupe les organismes en fonction de leur lien de parenté, et permet d'aborder leur histoire évolutive. Il s'agit donc d'une classification naturelle. Les premières phylogénies moléculaires ont eu pour support l'analyse de séquences protéiques. C'est sur cette base que L. Pauling et E. Zuckerkandl (1965) ont proposé l'hypothèse que les gènes répondent au concept d'horloge moléculaire : un gène évoluerait à vitesse fixe au cours du temps, c'est-à-dire qu'il accumulerait le même nombre de mutations (en majorité neutres vis-à-vis de la sélection naturelle) par unité de temps. La réalité de l'horloge moléculaire présente l'avantage de permettre de dater des divergences entre lignées, après calibration à l'aide d'organismes fossiles dont l'âge est interprétable. Les méthodes antérieures de phylogénie, éventuellement fondées sur des critères ne respectant pas l'horloge moléculaire, pouvaient conduire à une estimation faussée de l'histoire évolutive des organismes concernés. Cependant ce concept est rarement applicable pour les phylogénies anciennes du fait que les gènes évoluent souvent à des vitesses différentes selon les lignées évolutives. D'autres méthodes phylogénétiques sont disponibles, qui tiennent compte, au moins en partie, de ces variations.

La classification phylogénétique moléculaire exige de respecter **certaines contraintes**. Les séquences à analyser doivent répondre aux critères suivants : il doit s'agir de macromolécules universellement distribuées, couvrant des fonctions indispensables et maintenues telles au cours du temps (ADN ou ARN polymérases, ARN ribosomaux). Le gène ou la molécule qui en dérivent doivent évoluer à une vitesse compatible avec la résolution taxinomique voulue : la séquence protéique du cytochrome c, très constante chez les animaux, est utilisable uniquement pour classer des organismes très éloignés phylogénétiquement. Inversement les hémoglobines ont une vitesse d'évolution rapide qui permet la comparaison d'organismes évolutivement proches. Les gènes utilisés ne doivent pas être sujets à des transferts génétiques horizontaux (voir Chapitre 5) fréquents. Cette propriété est particulièrement importante dans le cas des procaryotes, chez lesquels le processus est loin d'être négligeable. Plusieurs gènes répondent plus ou moins bien à l'ensemble de ces contraintes, les meilleurs candidats étant sans aucun doute les ARNr 16S (procaryotes) et 18S (Eucaryotes) (§ 2.5a).

La nature du (des) organisme(s) d'étude conditionne la collecte des séquences à comparer. Il peut s'agir soit de séquences déjà disponibles dans des banques de gènes (Genbank, EMBL), soit d'un séquençage à effectuer. Les séquences obtenues sont alignées, c'est-à-dire positionnées parallèlement en favorisant les zones d'identité, à l'aide d'algorithmes (tel celui du logiciel Clustal W). Seules les séquences bien alignées seront retenues. La **construction de l'arbre phylogénétique** peut être réalisée selon plusieurs méthodes. Deux d'entre elles (méthode du maximum de vraisemblance et méthode bayésienne) sont probabilistes et considérées comme plus fiables, mais font appel à de nombreux paramètres, dont un modèle évolutif. En conséquence ce sont surtout deux autres méthodes qui sont utilisées couramment :

- La **méthode de parcimonie** consiste à rechercher parmi tous les arbres possibles celui ou ceux qui nécessitent le moins de changements évolutifs (*i.e.* de mutations).

Sa fiabilité repose sur le préalable que les séquences comparées aient évolué à la même vitesse, ce qui la rend très sensible à l'applicabilité du concept d'horloge moléculaire.

- **L'alignement des séquences** permet la construction d'une **matrice de distances** des organismes testés, qui peut être convertie en une matrice évolutive, puis en arbre phylogénétique grâce à des algorithmes tels que le *Neighbor joining*. Cette méthode est plus rapide que celle du maximum de vraisemblance et moins sensible au non-respect du concept d'horloge moléculaire. **L'enracinement de l'arbre** permet de l'orienter et de positionner l'ancêtre commun aux organismes étudiés. Un groupe d'organismes externes connus pour avoir divergé très tôt est ordinairement pris comme référence. La racine cherchée sera entre ce groupe et les séquences de l'arbre phylogénétique obtenu.

2.5 Les micro-organismes dans l'arbre universel du vivant

a. Carl Woese et la classification des procaryotes

Afin de positionner au sein d'un arbre phylogénétique des organismes jusque-là rangés dans le groupe « bactéries », C. Woese a choisi de comparer leurs séquences d'ARNr 16S, molécule qui répond aux contraintes à respecter pour en faire une séquence informative au niveau évolutif (§ 2.3) : elle est universelle, essentielle, et suffisamment stable pour être considérée comme une horloge moléculaire, et a une longueur (1 500 nucléotides) compatible avec la probabilité d'un nombre suffisant de mutations, variées et faciles à caractériser. Ce travail (1967) n'a pas pu bénéficier des méthodes de séquençage de l'ADN (datant de 1970). La procédure a consisté à analyser par des méthodes « classiques », chimiques et enzymatiques, des séquences issues de la digestion d'ARNr 16S longues d'au moins 6 nucléotides, en considérant que la probabilité d'avoir deux séquences de cette taille identiques par molécule d'ARNr est très faible. L'analyse des « bactéries » méthanogènes a été déterminante dans sa décision de proposer une modification de l'arbre universel. Les méthanogènes sont des procaryotes anaérobies stricts, seuls producteurs de méthane du monde vivant (voir Chapitres 2 et 3). L'analyse de leur ARNr 16S a montré qu'ils constituaient un groupe singulier, aussi éloigné des « bactéries classiques » que des Eucaryotes. C. Woese et G. Fox ont alors proposé de remplacer la division Eucaryotes-Procaryotes par une division ternaire, Eubactéries-Archéobactéries-Eucaryotes, prédisant, à juste titre, l'existence d'autres Archéobactéries. L'identification de cette nouvelle catégorie s'est faite sur le profil de résistance aux antibiotiques caractéristique des méthanogènes, retrouvé chez deux autres groupes de « bactéries » aérobies non méthanogènes, des halophiles et des thermo-acidophiles. Des études moléculaires ultérieures ont mis en évidence une proximité évolutive inattendue entre Eucaryotes et Archéobactéries, par exemple la très grande analogie des ARN polymérases ADN-dépendantes de ces deux groupes (voir Chapitre 6). Ces données ont conduit C. Woese à favoriser un modèle d'arbre universel enraciné entre les Eubactéries et une branche commune Eucaryotes-Archéobactéries (voir Figure 1.3). On parle maintenant de

domaines pour désigner ces trois groupes d'organismes, *Eucarya*, *Bacteria* (Bactéries) et *Archaea* (Archées), ces derniers termes remplaçant « Eubactéries » et « Archéobactéries ».

La séquence de l'ARNr 16S des chloroplastes s'est révélée très proche de celle de ces mêmes molécules chez les Cyanobactéries, résultat qui a conforté l'origine endosymbiotique de ces organites.

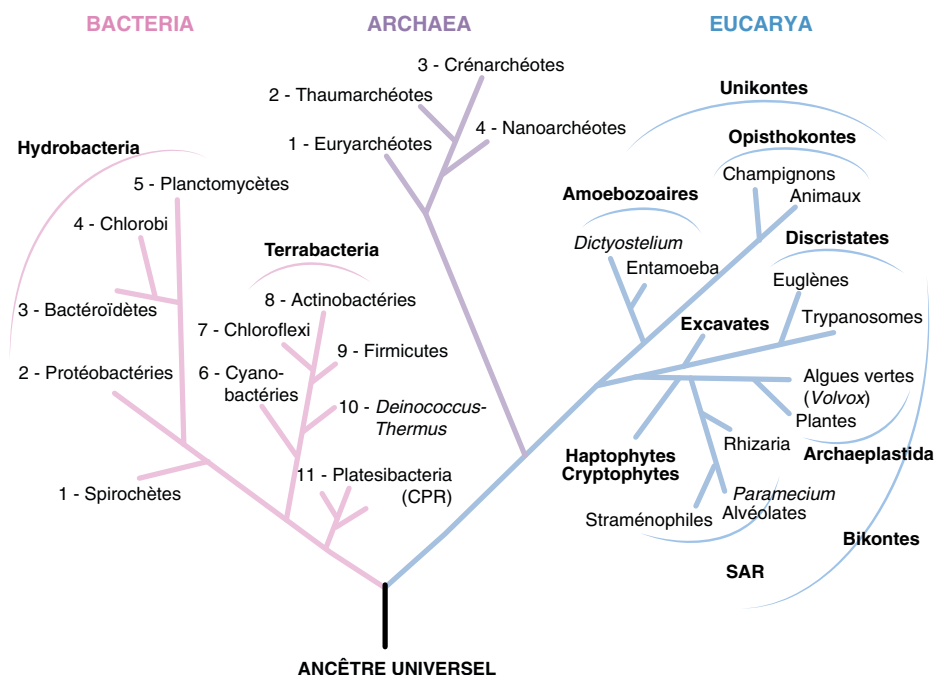


Figure 1.3 – Les trois domaines du vivant

Les règnes des trois domaines sont indiqués dans les encadrés. Quelques espèces pour plusieurs de ces règnes : **BACTERIA. Hydrobactéries** : 1. *Treponema pallidum* ; 2. Classe α : *Agrobacterium*, *Caulobacter*, *Rhizobium* ; classe β : *Neisseria gonorrhoeae* ; classe γ : *Buchnera*, *Erwinia*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Yersinia* ; classe ϵ : *Helicobacter pilori* ; 4. *Chlorobium* (phototrophe anoxygénique) ; 5. *Gemmata obscuriglobus*. **Terrabactéries** : 6. *Synechocystis* (phototrophe oxygénique), *Anabaena*, *Nostoc* (phototrophes oxygéniques, fixatrices d'azote) ; 7. *Chloroflexia* (phototrophe anoxygénique) ; 8. *Streptomyces*, *Mycobacterium tuberculosis* ; 9. *Bacillus subtilis*, *Clostridium*, *Epulopsiscium*, *Listeria*, *Staphylocoques*, *Streptococcus* (Gram⁺) ; 10. *Deinococcus*. **ARCHÆA**. 1. Hyperthermophiles anaérobies ; méthano-gènes ; halophiles anaérobies : *Archeoglobus*, *Halobacteria*, *Methonobacteria*, *Methanococcus*, *Methonosarcina*, *Thermococcus* ; 3. Microaérophiles, thermo-acidophiles, généralement aérobies : *Pyrodictium*, *Sulfolobus acidocaldarius* ; Hyperthermophiles : *Pyrodictium* (optimum de croissance 105 °C). Autre phylum possible : **Korarchæ** : ne comprenant jusqu'à présent qu'une seule espèce, *Korarchæum cryptophylum*. **EUCARYA** : voir le texte (§ 5) en ce qui concerne les protistes.

b. Grands phylums des trois domaines

L'analyse des séquences d'ARNr 16S et 18S a été complétée par une étude comparée de séquences nucléiques d'un grand nombre de gènes. Elle a conduit à l'établissement, à l'intérieur de chacun des trois domaines, de grands groupes monophylétiques, phylums ou divisions. Le **domaine des Eucarya** inclut la division des Opisthocontes qui réunit les champignons (dont les micro-champignons) et les animaux, la division des *Viridiplantae* comprenant les plantes et de nombreuses algues, et quatre divisions de protistes. Actuellement, il n'y a pas consensus sur les relations de parenté entre ces divisions. Le **domaine des Bacteria** est constitué d'une centaine de phylums, selon les auteurs, là aussi sans consensus quant aux relations de parenté entre ces phylums (voir Figure 1.3). Le **domaine des Archaea** est constitué de trois phylums principaux, les *Euryarchæa* (ou Euryarchéotes), aux phénotypes très variés (méthanogènes, halophiles, thermo-acidophiles et hyperthermophiles), les *Crenarchæa* (ou Crénarchéotes), hyperthermophiles, et les *Thaumarchæa* (psychrophiles, mésophiles ou thermophiles), de nombreuses espèces de ce groupe ayant pour caractère commun la capacité d'oxydation de l'ammoniac. D'autres phylums d'Archées ont été proposés mais leur validité fait encore débat. La présence d'hyperthermophiles à la base des trois principaux phylums des Archées incite à penser que ces organismes représentent le dernier ancêtre commun aux Archées.

L'ouvrage de référence pour la description des phylums des procaryotes est le *Bergey's Manual for Systematic Bacteriology*.

c. Les limites de l'arbre universel

L'arbre proposé par C. Woese sur la base des ARNr 16S (voir Figure 1.3) a été confirmé par des données de génomique comparée concernant des protéines universelles des trois domaines. D'une façon générale, la version Archée de ces protéines est toujours plus proche de la version Eucaryote que de celle des Bactéries. Le cas le plus spectaculaire correspond aux protéines impliquées dans la réplication, qui ne présentent aucune homologie entre Archées et Bactéries, mais s'avèrent très proches entre Eucaryotes et Archées (voir Chapitre 4). Il en va de même pour l'ARN polymérase ADN-dépendante des Archées (voir Chapitre 6). Ce faisceau de données a conduit à remettre plus ou moins en question le fait que LUCA (*Last Universal Common Ancestor*), à la base des trois domaines, aurait eu un génome à ADN.

Certaines sources actuelles remettent en cause la division en trois domaines pour revenir à deux domaines, les Archées et les Bactéries, les Eucaryotes émergeant des Archées à la suite d'une ou plusieurs endosymbiose(s) par celles-ci d'une Bactérie, qui serai(en)t à l'origine des mitochondries et des chloroplastes. La découverte récente des Asgard, des Archées qui présentent beaucoup de caractères moléculaires considérés jusqu'à aujourd'hui comme propres aux Eucaryotes, va dans cette direction. On aurait alors les *Eucarya* évoluant à partir des *Archæa* (sans expliquer l'apparition du noyau), puis l'absorption d'une α -Protéobactérie conduisant à l'endosymbiose mitochondriale. Le modèle des trois domaines prévoit que la cellule eucaryote serait issue de l'absorption

par une Bactérie d'une Archée, celle-ci devenant le noyau et la Bactérie la structure de base de l'organisme. L'Eucaryote ainsi obtenu aurait absorbé une α -Protéobactérie, établissant l'endosymbiose mitochondriale, puis l'absorption par l'un de ces Eucaryotes d'une Cyanobactérie serait à la base de la formation des chloroplastes.

Le séquençage massif de génomes de toutes origines a permis de souligner le rôle considérable des **transferts génétiques horizontaux** (TGH) au sein de l'ensemble des organismes, et en particulier des procaryotes (voir Chapitre 5). Certains auteurs considèrent que l'importance de ces transferts est telle que la notion d'arbre devrait être remise en question au profit de la notion de **réseaux**. Toutefois, du fait qu'elle est fondée sur la comparaison de protéines ou d'ARN peu ou pas affectés par les TGH, la notion d'arbre reste légitime telle qu'on l'a définie.

Enfin, l'arbre universel fondé sur les ARN ou les protéines ribosomales n'est évidemment pas applicable aux **virus**, y compris ceux des procaryotes (voir Chapitre 8), dépourvus de ribosomes. Il a été proposé de classer ces derniers en **lignées évolutives**. L'analyse des protéines majeures de leurs capsides et de leurs structures externes a révélé une origine très ancienne, contemporaine de LUCA. Cette origine est polyphylétique, indiquant que les virus ne peuvent être issus d'un même ancêtre commun, mais seraient apparus indépendamment au cours de l'évolution.

3 La cellule procaryote

Issues d'un ancêtre commun, Bactéries et Archées ont maintenu une organisation cellulaire similaire. Cette cellule procaryote se distingue d'une cellule eucaryote essentiellement par l'absence de membrane nucléaire, et en général de membranes spécialisées internes au cytoplasme, deux caractéristiques responsables de nombre de leurs particularités structurales et fonctionnelles (voir Figure 1.4A). Peuvent s'ajouter divers éléments externes ou intracellulaires, éventuellement différents entre Bactéries et Archées ou entre espèces de l'un ou l'autre domaine.

3.1 L'enveloppe

L'enveloppe des procaryotes est une structure multi-stratifiée complexe, siège de nombreuses réactions biochimiques qui pour certaines s'effectuent chez les Eucaryotes au niveau d'organites intracytoplasmiques (§ 4.1). C. Gram (1884) a mis au point une méthode de coloration histochimique des enveloppes aboutissant à classer les Bactéries en deux groupes, dits à Gram⁻ et à Gram⁺. Ces deux groupes sont corrélés *grosso modo* à deux types de structure, en une (monoderme) ou deux (diderme) strates principales, enveloppant une membrane, dite cytoplasmique ou interne (MI), équivalente à la membrane plasmique des cellules eucaryotes. La coloration de Gram dépend de la nature et de l'épaisseur de la couche interne, ou paroi, de l'enveloppe, un réseau macromoléculaire qui définit la morphologie cellulaire.

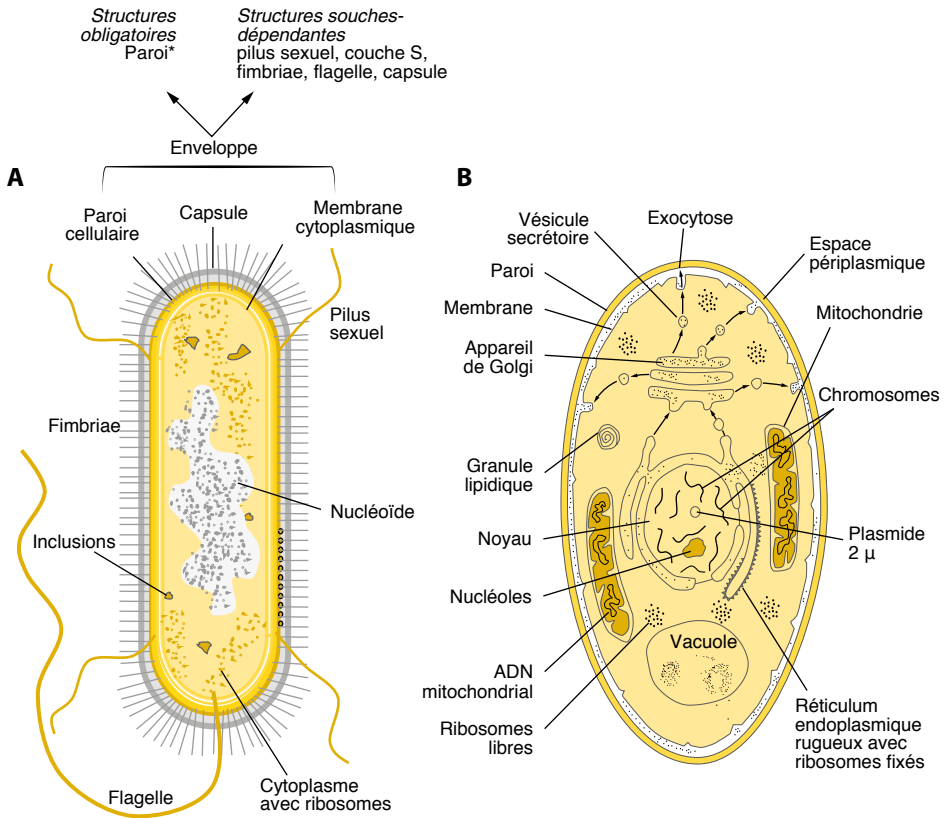


Figure 1.4 – Schéma simplifié de cellules procaryote (A) et eucaryote (B, type levure de boulangerie) (Figure modifiée d'après P. Ribéreau – Gayon et al., 1998, Dunod)

Agrandissement : environ 5.10^4 et 10^4 fois, respectivement.

La complexité structurale et l'importance fonctionnelle de l'enveloppe sont attestées par le nombre de protéines qui y sont associées (environ le tiers des différents types de protéines d'une cellule, dont un tiers constitué de protéines de transport, et la moitié de rôle encore inconnu). Cette structure joue un rôle fondamental dans la perméabilité cellulaire, le dialogue des cellules avec leur environnement. Chez les Bactéries didermes, dont l'espèce *Escherichia coli* (une *Proteobacteria* à Gram⁻) est l'archétype, l'enveloppe est formée de deux strates, une membrane externe (ME), et une paroi, enserrant la membrane MI. La paroi baigne donc dans l'espace formé entre ces deux membranes, dit espace périplasmique. Chacune de ces structures définit un compartiment cellulaire particulier, avec sa composition protéique propre. L'enveloppe des Bactéries monodermes est dépourvue de ME, leur paroi étant au contact direct du milieu extérieur.

a. La paroi (ou muréine)

Le constituant clef des parois est le peptidoglycane (PG), un hétéropolymère linéaire géant (voir Figure 1.5) qui constitue une sorte de sac recouvrant totalement la membrane interne (d'où les noms de saccule, muréine ou mucopeptide). La paroi joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité cellulaire en contenant la forte pression osmotique interne du cytoplasme (de l'ordre de 5-20 atmosphères). Son épaisseur est de 5 à 10 nm chez les didermes, et atteint 20 à 80 nm chez les monodermes, sous forme d'une trame de 50-100 feuillets constituant jusqu'à 40 % du poids sec des cellules. Cette forte épaisseur, nécessaire pour compenser la pression osmotique interne en l'absence de ME, pourrait être responsable de la réponse positive de ces Bactéries à la coloration de Gram, par rétention du colorant à ce niveau lors de l'étape de lavage. Un traitement par le lysozyme, une enzyme qui détruit l'intégrité du PG, conduit à la formation de cellules sphériques, appelées *protoplastes* s'il s'agit de Bactéries à Gram⁺, ou *sphéroplastes* s'il s'agit de Bactéries à Gram⁻ : maintenus en condition d'hypotonie (par exemple dans de l'eau distillée), ceux-ci se gonflent d'eau en raison de la différence de concentrations des solutés entre les milieux externe (faible) et endocellulaire (plus élevée), jusqu'à éclater. La paroi est donc bien l'exosquelette des procaryotes, exerçant une contrainte à l'expansion de la cellule malgré la forte pression du compartiment intracellulaire. Le PG, qui a les propriétés mécaniques d'un réseau étiré (en raison de la pression de turgescence interne), est cependant élastique et non rigide. Un étirement réversible est possible jusqu'à environ trois fois sa longueur. Cette structure porte des pores qui, dans leur forme relâchée, ont un diamètre moyen de 4 nm, permettant le passage de protéines globulaires d'un poids moléculaire maximal de 24 kDa. Cependant, dans la cellule vivante, l'expansion de la muréine pourrait permettre le passage de protéines allant jusqu'à 100 kDa.

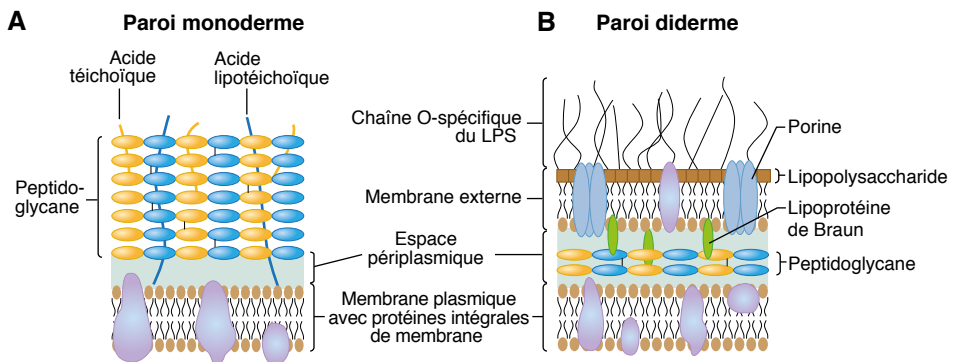


Figure 1.5 – Parois bactériennes monoderme (A) et diderme (B)

La synthèse du peptidoglycane nécessite l'activité d'une trentaine d'enzymes, selon trois étapes :

- La synthèse des précurseurs UDP-acétylmuramyl-pentapeptide et acétylglucosamine (étape cytoplasmique).

- La formation d'un intermédiaire lipidique de l'unité monomérique de base du PG (étape membranaire).
- L'allongement des chaînes de PG et leur réticulation (étape pariétale).

De nombreux antibiotiques ont pour cible des étapes de cette synthèse. La cyclo-sérine et la fosfomycine agissent au niveau de la première étape, les β -lactamines (pénicillines et céphalosporines) et les glycolipides (vancomycine et téicoplanine) sur la dernière.

Dans les couches de peptidoglycane des monodermes sont présents des glycopolymères anioniques, les acides téichoïques, lipotéichoïques et téichuroniques chez les *Firmicutes*, tels *Bacillus subtilis* ou *S. aureus*, archétypes des Bactéries à Gram⁺, ou des lipoglycane chez les *Actinobacteria*, autre phylum majeur de ce groupe. Ces acides, qui peuvent représenter une fraction importante du poids de la paroi cellulaire, interviennent dans sa porosité et sa tension. L'acide téichoïque peut être lié au squelette polysaccharidique du PG (par l'intermédiaire de l'acide N-acétylmuramique) ou être fixé à la membrane interne (par les acides lipotéichoïques, spécifiques des espèces). La surface externe des micro-organismes monodermes est en outre tapissée d'une variété de protéines dont certaines sont localisées dans l'espace périplasmique chez les organismes didermes. Elles peuvent soit traverser la MI, soit y être ancrées, soit encore former des liaisons covalentes avec le PG ou l'acide téichoïque de la paroi.

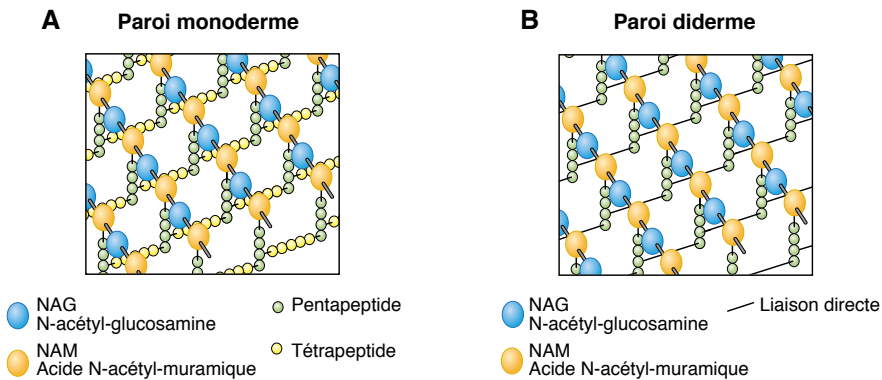


Figure 1.6 – Structure du peptidoglycane des organismes monoderme et diderme

b. La ME des didermes

Cette structure, asymétrique, a les caractéristiques fondamentales des membranes biologiques (double couche de phospholipides et glycolipides). Elle est constituée par un polymère, le **lipopolysaccharide** (LPS), spécifique des Gram⁻, dans son feuillet externe, et dans le feuillet interne de **phospholipides** et de la **lipoprotéine de Braun** (LPP), dont

les liaisons, covalentes ou non, avec le peptidoglycane de la paroi contribuent au maintien de l'intégrité de cette dernière. La composition de la ME est assez uniforme : 30-40 % de protéines, 35-45 % de LPS et 25 % de lipides. On constate cependant des variations importantes suivant les types de cellules, les phases de croissance, et les conditions de culture (milieu, température). Le LPS est un glycolipide complexe, représentant 10-15 % des molécules exposées à la surface (chez *E. coli* environ 3,5 millions, couvrant 75 % de la surface cellulaire). Responsable de la plupart des caractéristiques et fonctions de la ME, il intervient dans la perméabilité sélective de l'enveloppe, par exemple en s'opposant à la pénétration des antibiotiques. C'est un facteur important de virulence des bactéries pathogènes, leur permettant de contrecarrer les défenses immunitaires de l'hôte. Inversement, il est responsable de l'induction de la réponse inflammatoire lors d'infections bactériennes, justifiant le terme d'**endotoxine** qui lui est donné. La **LPP** contribue aussi à la réponse inflammatoire.

La ME intervient dans la stabilisation de la structure de la cellule et constitue une barrière de perméabilité, protégeant celle-ci de l'entrée de composés nocifs (antibiotiques, sels biliaires pour les bactéries commensales de l'intestin, etc.), et de la perte des constituants qui résident dans l'espace périplasmique. Elle contrôle le passage de petites molécules hydrophiles (600-700 daltons), soit la plupart des nutriments (acides aminés, monosaccharides, sels, etc.), passage qui se fait *via* des canaux aqueux ouverts vers l'espace périplasmique. Ces canaux sont formés par une famille de protéines intégrées dans cette membrane, les porines (OMPs, *integral Outer-Membrane Proteins*) qui constituent des systèmes de transport passif. Certaines porines sont spécifiques pour le passage de sucres, métaux ou autres protéines, d'autres laissent passer des molécules hydrophiles, dont quelques antibiotiques comme les β -lactames.

c. La membrane interne (MI)

Commune à tous les procaryotes, cette membrane est formée d'une double couche de phospholipides, d'une épaisseur d'environ 7,5 nm, et contient la majeure partie des protéines des structures exocellulaires. Celles-ci sont de deux types, les protéines dites intégrales, traversant la membrane par des domaines à hélice transmembranaires, et les lipoprotéines, ancrées dans le feuillet externe par le biais d'un groupement lipidique. Environ 60-70 % des phospholipides de la MI sont des acides gras liés à du glycérol-3-phosphate, les 30-40 % restant sont associés à différents produits dont des hopanoïdes. Ils servent de barrière de perméabilité sélective pour le passage (entrée et sortie) des ions et molécules diverses. La MI constitue une barrière de perméabilité plus contraignante que la ME. C'est une structure très dynamique, qui joue un rôle fondamental dans la réponse de la cellule au milieu extérieur : par sa capacité à percevoir, *via* des systèmes senseurs, une série de stimuli physiques (lumière, température) et chimiques (osmolarité, disponibilité en eau et autres molécules), elle transmet un signal à la cellule qui y répond *via* l'expression de gènes spécifiques (voir Chapitre 6). Elle est le siège d'un grand nombre de fonctions : énergétiques (phosphorylations oxydatives [respiration] pour les aérobies et fermentaires [ATPases] pour les anaérobies), biosynthèse des lipides,

sécrétion de protéines, transport actif des nutriments, formation des précurseurs de la paroi et de la ME chez les didermes. Beaucoup de ces fonctions sont assurées par des organites intracellulaires chez les Eucaryotes.

d. Enveloppes atypiques

Bien que classées à Gram⁺ et appartenant au phylum des *Actinobacteria*, l'ordre des **Corynebacterales** présente une enveloppe originale, difficile à identifier par la coloration de Gram, qui cependant une fois obtenue résiste à la décoloration. Deux autres méthodes de coloration (rouge à la fuschine de Ziehl-Neelsen et fluorescence à l'auramine de Dugommier) permettent de les identifier. Une mycomembrane externe, formée de trois composants, présente une organisation bicouche non classique, avec un feuillet interne d'acides mycoliques liés à de l'arabinogalactane, lui-même lié au PG. Cette couche externe contient des lipides libres variés, la plupart spécifiques de ces organismes, intercalés entre les acides mycoliques. Ces structures sont souvent entourées d'une capsule (voir Tableau 1.1) constituée principalement de polysaccharides. Trois espèces présentent un intérêt important en raison de leur pathogénicité, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium lepræ* et *Corynebacterium diphtheriæ*, responsables respectivement de la tuberculose, la lèpre et la diphtérie. Deux espèces non pathogènes à croissance rapide, *Mycobacterium smegmatis* et *Corynebacterium glutamicum*, sont utilisées, respectivement, comme modèle d'étude et en biotechnologie pour la production de divers composants dont des acides aminés (voir Chapitre 9).

Les **Mycoplasmes**, appartenant à la classe des *Mollicutes*, sont dépourvus de ME et de paroi, ce qui les rend équivalents à des protoplastes. Cette absence de paroi les rend insensibles aux antibiotiques de la famille des β -lactames. Ce sont des organismes commensaux obligatoires des animaux, dont certains pathogènes de l'Homme, tels *Mycoplasma pneumoniae*. Ils peuvent cependant vivre librement soit parce que leur MI contient des stérols qui leur confèrent une certaine rigidité, soit parce que leur habitat (par exemple, le corps humain) présente une pression osmotique élevée et contrôlée.

Chez les **Archées**, l'enveloppe proprement dite, variable suivant les espèces, se distingue de celles des Bactéries et des cellules eucaryotes. Elle est dépourvue de muréine ; seules certaines espèces méthanogènes contiennent une pseudo-muréine (des répétitions d'acides N-acétylmuramique et N-acétyltalosaminuramique). Chez le genre *Thermoplasma* la cellule est entourée d'une seule membrane, tri-stratifiée, incluant une couche S. Une seule Archée connue a une membrane externe. Ces compositions particulières rendent les Archées insensibles au lysozyme et aux antibiotiques de type β -lactames. La plupart des protéines extracellulaires des Archées sont glycosylées, une modification post-traductionnelle dont le rôle reste inconnu (chez les Bactéries pathogènes la glycosylation joue un rôle important dans l'interaction avec l'hôte). La MI des Archées présente une composition lipidique et une structure particulières, qui rendent ces cellules très imperméables aux protons, leur permettant une survie à des pH extracellulaires très acides (jusqu'à 4 unités en dessous de celui du cytoplasme) (voir Chapitre 2). Elle est organisée en bicouche typique. Les lipides, dans la majorité

des cas, contiennent de longues chaînes d'alcool isoprénique liées au glycérol par des liaisons éthers. Les espèces hyper-thermo-acidophiles contiennent des tétraéther-lipides à longue chaîne, dont certains traversent la membrane, dite alors monostatifiée, lui conférant ainsi une plus forte stabilité thermique (elle devient non dénaturable), éventuellement liée à la grande thermotolérance de ces organismes.

De nombreuses structures péri- et trans-enveloppes, et/ou des appendices, communs à tous les procaryotes ou spécifiques des Bactéries ou des Archées, ou de certaines espèces dans chaque domaine, couvrent une panoplie de fonctions (voir Tableau 1.1).

Tableau 1.1 Structures péri- et trans-enveloppes des procaryotes

Structure	Nature	Fonction	Présence
Couche S	Protéines et/ou glycoprotéines	Tamis moléculaire, adhésion, rigidité de la paroi, ancrage, défense	10 % des procaryotes
Capsule	Polysaccharides	Nombreuses fonctions dans la pathogénie (adhérence aux cellules hôtes, protection contre le système immunitaire, blocage de la phagocytose)	Bactéries
Flagelles	Protéines	Locomotion	Nombreux procaryotes
Pili (ou <i>fimbriæ</i>)	Protéines (pilines)	Adhésion, échange d'ADN, motilité, transfert de protéines, facteur de virulence, défense immunitaire	Bactéries et Archées
Vésicules membranaires	LPS, phospholipides de membrane	Adhésion, transfert d'ADN, libération d'enzymes et facteurs de virulence, contacts intercellulaires	ME des didermes
Appendices (<i>canules, épines, hameçons</i>)	Glycoprotéines	Contact, communication intercellulaires	Archées

3.2 Structure intracellulaire

Le **cytoplasme** représente 60-70 % du volume total (soit entre 0,2 et plusieurs μm^3 selon les espèces). Il est moins organisé que son cousin eucaryote et réunit une kyrielle de fonctions effectuées dans des compartiments individualisés chez celui-ci. Il est cependant structuré grâce à un réseau de plusieurs familles de protéines formant un **cytosquelette**. L'actine, la tubuline et les protéines du filament intermédiaire des Eucaryotes ont pour homologues respectifs les protéines FtsZ, MreB et les crescentines chez les Bactéries, et

la crénactine (homologue de l'actine) chez les Archées. Ces protéines ont des rôles vitaux multiples (voir Chapitres 3 et 4).

Un corps amorphe présentant des protubérances irrégulières, le **nucléoïde**, apparaît par microscopie. Il n'est pas enfermé dans une membrane, comme l'est le noyau des cellules eucaryotes, à l'exception d'un certain nombre de genres du phylum des Planctomycètes. Il occupe 10-20 % de la région centrale du cytoplasme. Un ou plusieurs exemplaires peuvent être présents selon les espèces et l'état physiologique des cellules. Chaque nucléoïde contient l'essentiel de l'**ADN**, dans la majorité des cas sous forme d'une seule molécule, le chromosome, maintenu sous une forme compacte par des protéines basiques chez les Bactéries et des histones chez les Archées (voir Chapitre 4). Le chromosome porte la majeure partie de l'information génétique. Le reste de l'**ADN** est réparti sur des familles d'éléments génétiques, les plasmides, à réplication autonome.

Les **ribosomes** des procaryotes présentent des caractéristiques spécifiques dans chacun des deux domaines concernés. Chez les Bactéries, ce sont des particules dont les deux sous-unités ont des coefficients de sédimentation de 50 et 30 unités Svedberg, donnant une particule de 70 unités (ribosomes 70S). Ils ne contiennent que trois molécules d'**ARN** (contre 4 chez les Eucaryotes). Les caractéristiques de ceux des Archées les rapprochent de ceux des Eucaryotes (voir Chapitre 6). Le nombre de ribosomes par cellule (au moins 7 000 chez *E. coli*) varie énormément avec le taux de croissance, et donc de synthèse protéique (voir Chapitres 3 et 6). La synthèse des protéines ayant lieu dans le cytoplasme, celles à destination non cytoplasmique doivent être transportées vers leur site d'activité, interne ou externe ; pour les facteurs multiprotéiques, les sites d'assemblage doivent pouvoir être reconnus pour aboutir à la formation de complexes fonctionnels. Les activités de transport transmembranaires sont donc nombreuses et primordiales (voir Chapitre 3).

Des **organites** forment des micro-espaces délimités par une barrière protéique permettant de compartimenter une activité métabolique spécifique. En concentrant un métabolite volatil ou toxique dans un petit volume, ces structures favorisent le couple enzyme-substrat, et donc l'efficacité de la réaction biochimique. Ils présentent des similarités de constituants et/ou de structure. Leur morphologie, des polyèdres de 80 à 200 nm analogues aux capsides virales (voir Chapitre 8), résulte de l'assemblage de milliers de protéines, incluant les sous-unités enzymatiques impliquées dans l'activité de l'organite. Contrairement aux organites eucaryotes, et à l'exception des magnétosomes et des anammoxosomes, ils n'ont pas de membrane lipidique. Leur enveloppe protéique est étanche, et se comporte comme une barrière à perméabilité sélective pour certains solutés. Les familles de protéines qui les constituent sont conservées chez environ 25 % des Bactéries étudiées, mais pas chez les Archées, et sont inconnues chez les Eucaryotes. Plusieurs voies métaboliques sont ainsi compartimentées : la fixation du CO_2 dans des carboxysomes (procaryotes chimolithotrophes) (voir Chapitre 3), le transport et le contrôle de la cristallisation du fer dans des magnétosomes (Bactéries magnétotactiques, phylogénétiquement diverses), la synthèse de butyrate (*Clostridium kluyveri*), d'éthanol à partir de pyruvate (*Vibrio furnissii*), d'éthanolamine (source de

carbone, d'azote et d'énergie de nombreuses bactéries), de 1,2-propanediol (produit par fermentation de certains sucres, abondant dans le gros intestin), l'oxydation anaérobie de l'ammonium pour produire de l'azote moléculaire (Planctomycètes) (voir Chapitres 2 et 3). Enfin des vésicules gazeuses contrôlent la densité des cellules, participant à leur déplacement.

Les **inclusions** sont des réserves de natures variées : carbone et énergie (glycogène, poly- β -hydroxybutyrate, poly- β -hydroxyalcanoate), phosphate (précurseur des acides nucléiques et des phospholipides), azote et/ou carbone (cyanophycine), ou encore esters de cire, triglycérides (lipides). Des réserves de soufre (et d'énergie) peuvent prendre la forme de granules associés à la membrane externe, ou enveloppés dans des invaginations de la membrane cytoplasmique, ou encore intracytoplasmiques. Dans la plupart des cas, chaque type bactérien ne possède qu'un type d'inclusion. L'accumulation de ces produits indique généralement un déséquilibre nutritif, tel un excès de carbone.

3.3 Quelques éléments de réflexion

Le **concept d'unicellularité**, longtemps indissociable de celui de procaryote, est-il encore justifié ? Une grande majorité de procaryotes (mais aussi des protistes) vivent effectivement la plupart du temps sous forme de cellules indépendantes. Procaryotes comme protistes ont cependant développé au cours de l'évolution différentes voies de multicellularité pour augmenter leur adaptabilité, en partie grâce à la possibilité de répartition de diverses fonctions biologiques dans différentes cellules de la communauté. Ces communautés peuvent être constituées, dans les cas les plus simples, des Bactéries comme des Archées, de cellules tendant à former des associations (agrégats sous forme de grappes, chaînes ou filaments), des biofilms, jusqu'à des organisations quasi-multicellulaires présentant des modalités de vie incluant la présence de cellules différenciées. Des cas de ce type s'observent au cours du développement de certaines Cyanobactéries, Myxobactéries, ou Streptomycètes (voir Chapitre 6), et de certains protistes (*Volvox*) (§ 5.2).

La **simplicité structurale apparente** des procaryotes est-elle un leurre ? Tous les types cellulaires ont dû, pour se perpétuer, optimiser leur fonctionnement physiologique et les interactions avec leur environnement. Chez les Eucaryotes cette optimisation a nécessité la localisation d'un certain nombre de fonctions dans des compartiments spécialisés très structurés (§ 4.1). L'apparente simplicité de structure des cellules procaryotes contraste avec l'unité de fonctionnement des mécanismes biochimiques de l'ensemble du monde vivant : molécules génomiques, fonctions à la base de la vie (réplication, expression et régulation géniques, activités enzymatiques, etc.). La remarquable efficacité fonctionnelle des constituants chez les procaryotes est donc à rechercher au niveau de structures spécifiques de la cellule (tels la membrane plasmique ou l'espace périplasmique) liées à leur petite taille, ou de complexes moléculaires peu ou pas encore connus.

Les procaryotes forment-ils un **regroupement taxinomique artificiel** ? La définition historique de la notion de procaryote fondée sur les caractéristiques structurales

de leurs cellules (§ 2) a conduit à regrouper Bactéries et Archées, des organismes forts différents et considérés actuellement comme appartenant à deux domaines phylogénétiques distants (§ 2.5). Ce regroupement, qui peut paraître artificiel sous l'angle taxinomique, conserve toutefois une certaine validité biologique en termes de structure cellulaire, et une validité pratique et/ou didactique. C'est dans cet esprit que nous parlerons de procaryotes.

4

La cellule des micro-organismes eucaryotes

Malgré leur grande diversité de morphologies, dimensions et physiologie, les protistes partagent le même plan de construction cellulaire, typique des Eucaryotes (voir Figure 1.4B), ce qui a conduit à les classer dans les mêmes ensembles que les organismes multicellulaires présentant ce type de structure. La phylogénie a confirmé les liens de filiation les unissant. L'absence ou la présence d'une membrane nucléaire, critère historique utilisé pour différencier les deux types de cellules, pro- et eucaryotes, même si elle est importante, n'est en fait qu'un de leurs caractères distinctifs.

4.1 Principales structures intracellulaires

Une membrane externe délimite la cellule, dont l'espace interne, le **cytoplasme**, est constitué d'un liquide gélatineux (le hyaloplasme) très organisé par le réseau du cytosquelette et des membranes internes, et riche en molécules minérales et organiques solubles et en structures spécialisées dans les diverses fonctions nécessaires à son développement. Le cytoplasme est le lieu où se produisent un grand nombre de processus vitaux. Sa composition chimique, ses propriétés physiques et son organisation spatiale et temporelle varient en fonction de l'état physiologique de la cellule, des fluctuations de l'environnement. Il héberge le noyau (§ 4.2), séparé par une membrane.

a. Complexes structuraux

La **membrane plasmique (Mi)**, ou cytoplasmique, ou interne, unique, délimite les contours de la cellule et constitue l'interface avec son environnement. Elle n'est pas doublée par une paroi chez les protozoaires, mais l'est chez les champignons (chitine, un polymère de résidus N-acétylglucosamine) et les micro-algues (principalement de la cellulose, le polymère prépondérant de la biosphère, comme chez la plupart des algues et plantes). Chez ces dernières elle agit comme un exosquelette, conférant aux cellules la rigidité nécessaire pour contrer la pression osmotique interne.

Le **cytosquelette**, une structure filamenteuse qui contrôle la forme de la cellule (et permet de la déformer pour assurer son déplacement), est composé de trois grands types de molécules. Les microtubules, conservés chez tous les Eucaryotes, sont constitués par polymérisation de dimères de tubuline. Ils participent à la répartition des chromosomes

durant mitose et méiose, et interviennent dans la construction des flagelles. Les microfilaments d'actine interviennent pour assurer la formation et le transport des vésicules, la séparation des deux cellules filles à la division, et la génération de pseudopodes pour le déplacement. L'actine, constituant de toute cellule eucaryote, est l'une des protéines les mieux conservées du monde vivant. Les filaments intermédiaires, qui assurent l'architecture de la cellule, sont constitués d'environ 70 protéines fibrillaires différentes, dont la nature varie chez les différents groupes d'Eucaryotes.

Les **réseaux membranaires internes** comprennent le système endomembranaire et le réseau mitochondrial, ainsi que les plastes chez les cellules effectuant la photosynthèse. Le système endomembranaire, issu de la membrane du noyau, reste connecté à celle-ci. Il comprend un ensemble de membranes spécialisées, formant des compartiments qui constituent l'interface entre cytoplasme, membrane plasmique et milieu extérieur. Le **réticulum endoplasmique** (RE) en est l'organite principal (de 20 à 60 % de la surface membranaire totale, environ 10 % du volume cellulaire). Il est constitué par le RE rugueux (aspect conféré par les ribosomes, attachés sur la face externe de sa membrane) et le RE lisse. Le premier intervient dans la synthèse et la maturation des protéines, le second dans la synthèse des lipides (acides gras et phospholipides). Pour être fonctionnelles, les protéines synthétisées subissent des modifications assurées par l'**appareil de Golgi**. Des **vésicules** assurent leur transport du réticulum vers l'appareil de Golgi, puis, après modifications, vers leurs destinations finales (membrane plasmique, organites divers, milieu extracellulaire), correspondant à leurs fonctions.

b. Organites spécialisés

Les **mitochondries**, dont le nombre varie selon le type et l'état physiologique des cellules (de centaines à milliers de copies), sont le siège de la production d'énergie par voie respiratoire, oxydative. Elles peuvent être sphériques ou en bâtonnets (1 à 2 μm de long, 0,1 à 0,5 μm de diamètre, pratiquement la taille d'une Bactérie). Elles sont composées de deux types de membranes en bicouches lipidiques ; l'une, externe, uniforme, contenant des protéines, est perméable aux ions et petites molécules ; l'autre, interne, riche en protéines, forme de nombreux repliements (crêtes mitochondriales, hébergeant les constituants de la chaîne respiratoire) qui se prolongent dans la matrice, partie centrale de l'organite. Cette matrice est multifonctionnelle grâce à la présence de mitoribosomes (de type 70S), d'ADN (circulaire), d'ARN (messagers et de transfert), et de nombreux systèmes enzymatiques (cycle de Krebs, oxydation du pyruvate et des acides gras). Les mitochondries ont une reproduction semi-autonome à l'intérieur de la cellule.

Les **plastides** des organismes photosynthétiques (plantes, algues et micro-algues) présentent une structure (double système membranaire, génome, etc.) et des propriétés analogues à celles des mitochondries. On distingue les leucoplastes, dépourvus de pigments (tels les amyloplast, qui accumulent l'amidon comme réserve) et les chromoplastes, contenant des pigments, comme la chlorophylle des chloroplastes. Le système membranaire interne de ces derniers (thylakoïdes) est le siège de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique, la chlorophylle permettant l'utilisation de l'énergie

lumineuse en vue de la synthèse de glucides à partir de CO_2 et d'eau. On estime à environ 150 milliards de tonnes le carbone fixé par an par voie photosynthétique au niveau planétaire, 40 % sur les continents et 60 % dans les océans et les mers, par des micro-organismes (phytoplancton principalement).

Le **vacuome**, ou appareil vacuolaire, est constitué de compartiments délimités par une membrane, remplis d'eau et contenant des molécules inorganiques et organiques, dépourvus d'ADN et de ribosomes (toutes leurs protéines sont donc acquises par importation sélective du cytoplasme). Sa fonction et son importance varient selon le type et l'état physiologique des cellules. Il assure le maintien de l'équilibre hydrique, l'isolement de composants toxiques, la digestion enzymatique de déchets. Chez certains végétaux, une unique grande vacuole occupe environ 80 % du volume cellulaire. Chez les protozoaires aquatiques, une vacuole contractile leur permet d'éliminer l'eau en excès. Un organe du vacuome est particulièrement important, les **lysosomes**. Ils ont pour rôle de dégrader les polymères biologiques intracellulaires (protéines, acides nucléiques, glucides et lipides) devenus obsolètes. Ils fonctionnent donc comme un système digestif. Leur taille varie ainsi en fonction des matériaux absorbés.

Les **ribosomes** sont des complexes ribonucléoprotéiques, sièges de la traduction des ARNm, donc de la synthèse des protéines (voir Chapitre 6). Ils sont associés au RE rugueux ou libre dans le cytoplasme. De type 80S, ils se distinguent de ceux des mitochondries et des chloroplastes, de type 70S comme ceux des procaryotes (§ 3.2). La composition en ARNr et en protéines, et la sensibilité à des inhibiteurs diffèrent entre ces deux types. L'assemblage des ribosomes 80S est complexe, la compartimentation cellulaire impliquant plusieurs migrations transmembranaires de leurs constituants.

4.2 Le génome et son expression

Le **noyau**, qui occupe un quart du volume cellulaire, est séparé du cytoplasme par une double membrane. Il contient le(s) chromosome(s) et un nucléole, et est le lieu de la transcription. Les **chromosomes**, des complexes ADN-histones, sont des structures linéaires compactes, dont le centromère, plus ou moins central, sert de point de fixation sur le fuseau mitotique au moment de la division, ce qui assure le contrôle de leur ségrégation. Les extrémités des chromosomes portent des **télomères**, indispensables pour leur réplique et leur stabilité. Plusieurs niveaux de condensation (nucléosomes, enroulement hélicoïdal, boucles) réduisent les dimensions linéaires des chromosomes. Le **nucléole** est une zone du noyau, dépourvue de membrane, ayant pour fonction la synthèse des ARN ribosomiaux (ARNr) et la synthèse ou le transit de petits ARN non codants participant à la maturation des ARN. Un transcrit pré-ARNr est clivé en quatre ARN fonctionnels – 28S, 18S, 5,8S et 5S – organisés en ribosomes par adjonction des protéines ribosomiques, synthétisées dans le cytoplasme et importées.

La **transcription**, le passage du code ADN au code ARN, se fait dans le noyau. Contrairement aux procaryotes qui n'en ont qu'une (voir Chapitre 6), les cellules eucaryotes disposent de trois **ARN polymérases** (ARN-Pol) : ARN-PolI synthétise l'ARN

préribosomal 35S, représentant 75 % des ARN cellulaires ; ARN-PolIII synthétise les ARN messagers et les petits ARN nucléaires, soit 85 % du génome ; ARN-PolIII synthétise l'ARN 5S, les ARNt et quelques petits ARN non codants. Il n'existe pas chez les Eucaryotes d'organisation en opérons, des groupements de gènes transcrits dans un unique ARNm, comme chez les procaryotes, mais des ensembles de gènes individuels pouvant être soumis à un même système régulateur (on parle de régulons) (voir Chapitre 6). Pour être fonctionnels, les ARNm subissent deux types de modifications post-transcriptionnelles, qui jouent un rôle de protection : l'adjonction d'une coiffe en 5' et une polyadénylation en 3'. L'interaction de la coiffe avec la queue polyA assure le démarrage de la traduction. La séquence polyA intervient dans le relargage de l'ARN-PolIII à l'issue de la transcription du messager. Outre ces deux modifications, l'ARN messager primaire doit aussi, pour être fonctionnel, être débarrassé de ses introns par excision et épissage.

Encart

La distinction procaryote/eucaryote est-elle encore appropriée ?

La distinction traditionnelle peut être remise en cause par nombre d'observations relativisant les critères définissant ces deux types cellulaires, évoquant l'idée que leurs différences pourraient être de nature quantitative plus que qualitative : certaines Bactéries sont pourvues d'une **membrane nucléaire** (§ 3.2) ; des structures typiques des Eucaryotes multicellulaires peuvent être absentes ou remplacées par des équivalents simplifiés : **peroxysome**, **mitochondries** et **appareil de Golgi** semblent remplacés par des mitosomes (organites dérivés des mitochondries entourés de deux membranes mais sans ADN) chez *Giardia intestinalis*, un protozoaire flagellé parasite de nombreux animaux, ou par une structure équivalente simplifiée associée à la présence de ribosomes de type procaryote chez le champignon parasite intracellulaire du ver à soie *Nosema bombycis* ; un **cytosquelette d'actine** permet d'assurer son déplacement et la phagocytose de ses proies chez l'Amibe pathogène *Entamoeba histolytica*, d'adhérer aux cellules hôtes chez le flagellé parasite *Trichomonas vaginalis*, de se déplacer et de pénétrer dans leurs cellules hôtes chez les sporozoaires parasites *Plasmodium* et *Toxoplasma*. Rappelons aussi que seule une très petite fraction des organismes unicellulaires, tant procaryotes qu'eucaryotes, est connue. De nouvelles espèces à découvrir pourraient révéler d'autres caractéristiques en conflit avec l'idée d'une séparation nette entre les trois domaines du vivant.

5

Quelques protistes modèles

La classification des protistes, qui les répartit dans différents embranchements, est très complexe et en continuelle révision. Certains sont plus proches de plantes ou d'animaux que d'autres protistes. Un regroupement « pratique », non phylogénétique, est utilisé ici,

en trois ensembles définis par leurs caractéristiques structurales et physiologiques (types trophiques, modes de nutrition). Leurs cycles de vie sont essentiellement sous forme unicellulaire, mais des organisations coloniales (multicellulaires) sont fréquentes. Leur reproduction est asexuée et/ou sexuée. Les **protozoaires** constituent un groupe polyphylétique, avec 200 000 espèces dont 10 000 sont symbiotes de métazoaires (*Plasmodium*, l'agent du paludisme ; *Toxoplasma*, infectant majoritairement les félidés). Leur nutrition se fait par diffusion d'aliments liquides ou ingestion d'aliments solides. Ils se caractérisent par leur motilité, par pseudopodes (Amibes), flagelles (flagellés), ou cils (ciliés). Les **micro-algues** forment aussi un groupe polyphylétique, avec 47 000 espèces répertoriées, probablement une infime partie de celles existant. Elles ont en commun un métabolisme énergétique photosynthétique, bien que certaines espèces soient mixotrophes (voir Chapitre 3). Avec les Bactéries photosynthétiques, elles forment le phytoplancton des océans et milieux aquatiques, assurant plus de 45 % de la production de matière organique mondiale. Les **champignons** constituent un règne indépendant, phylogénétique solidement établi (§ 2), de 100 000-150 000 espèces actuellement connues, sans doute moins du dixième de la totalité. Ils se nourrissent de matières organiques en décomposition. Les cellules reproductrices sexuées, ou spores, peuvent aussi se multiplier par division mitotique. Les caractéristiques des structures (hyphes) renfermant les spores (asques ou basides) permettent de distinguer les Ascomycètes (*Ascomycota*), les Basidiomycètes (*Basidiomycota*), les Chytridiomycètes (flagellés, pour la plupart parasites) et les Zygomycètes, formant des mycorhizes (associations symbiotiques avec des racines), des moisissures sur des matières organiques (aliments) en décomposition, ou encore parasitant des plantes et des animaux.

5.1 Des protozoaires

a. Les Amibes et l'invention de la phagocytose

Le terme « Amibe » regroupe de nombreuses espèces ayant en commun la capacité de former des pseudopodes. La plupart des espèces vivent à l'état libre dans les eaux et sols humides (voir Figure 1.7). Certains genres, dits à vie amphizoïque, peuvent vivre soit libres, soit dans l'organisme d'un hôte (mammifère). D'autres sont des organismes sociaux. Certaines Amibes parasitent le tube digestif de diverses espèces animales. Une seule est pathogène de l'Homme, *Entamoeba histolytica*, responsable d'une amibiase à localisation intestinale (côlon) ou extra-intestinale (foie et poumons). La maladie, transmise par contamination fécale, est contractée chaque année par 40 à 50 millions d'individus dans le monde, causant environ 100 000 décès.

Leur morphologie est généralement irrégulière et en perpétuel changement ; certaines (sous-phylum *Actinopoda*) ont une forme en étoile. Le cytoplasme est formé de deux régions : l'ectoplasme, fluide et dépourvu d'organites, entoure l'endoplasme, gel granuleux riche en organites et inclusions, dont des vacuoles. Le noyau est unique (mais en plusieurs copies chez certaines espèces). Le génome a un pouvoir codant de 13 500 à 15 000 protéines, selon les espèces. Les Amibes se déplacent par un mouvement amiboïde

assuré par des pseudopodes. Ce mouvement, dont le mécanisme est encore peu connu, résulte de modifications de structure du cytosquelette d'actine, de courants cytoplasmiques, et d'un changement réversible de viscosité du cytoplasme. Une cavité se forme dans l'ectoplasme en périphérie de la cellule, concentrant des organites et des inclusions. Cela augmente la viscosité locale, qui passe de l'état fluide à l'état granuleux de l'endoplasme. L'excroissance ainsi formée crée un nouveau contact sur le substrat extérieur, et cette poussée provoque un déplacement de la cellule par traction. Le pseudopode disparaît alors, la partie précédemment à l'état gel redevenant fluide.

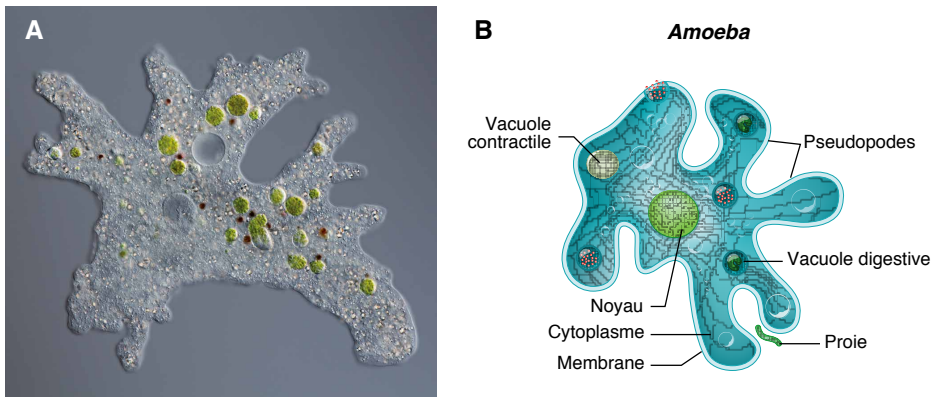


Figure 1.7 – Une Amibe

A. Image en microscopie (agrandissement : environ $\times 1\,000$). **B.** Schéma de la structure cellulaire. La dimension des cellules varie selon les espèces de 5 à 60 μm (mais jusqu'à 500-1 000 μm pour *Amoeba proteus*).

Ces organismes se nourrissent de corps organiques solides (ou proies) et de liquides, par phagocytose et pinocytose, respectivement, selon un mécanisme dit d'endocytose. La phagocytose en tant que mode nutritionnel est probablement apparue très tôt au cours de l'évolution chez des Eucaryotes unicellulaires tels que les Amibes. À côté des mécanismes universels d'échanges entre membrane et environnement comme la diffusion et le transport actif (voir Chapitre 3), les Eucaryotes ont ajouté l'endocytose, qui permet à une cellule d'incorporer des éléments extracellulaires (liquides ou solides), grâce à une invagination progressive de la membrane plasmique, ou pseudopode, qui entoure le corps extracellulaire à ingérer. Celui-ci finit par être englobé dans la cellule à la suite d'un étranglement de l'invagination, qui forme alors une vésicule dite d'endocytose, intracytoplasmique. On distingue généralement dans ce processus la pinocytose pour l'ingestion de liquides, la phagocytose pour des particules de grosses dimensions et l'exocytose, le mécanisme inverse, qui permet la sortie de macromolécules. Dans le cas de la phagocytose, l'endosome (ou phagosome) fusionne dans le cytoplasme avec un ou plusieurs lysosomes pour digérer les substances importées. Les vésicules assurent

aussi la pénétration dans la cellule de substances de petite taille (protéines, glucides) qui peuvent être stockées dans des vacuoles ou utilisées dans l'appareil de Golgi, et le transit des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi.

De nombreuses autres activités cellulaires ont recours à l'endocytose, telle la capture spécifique de ligands par des protéines de membrane, la communication intercellulaire, et l'ingestion et/ou la destruction d'agents potentiellement pathogènes. Si le mécanisme d'endocytose s'est maintenu chez tous les Eucaryotes, seuls les protozoaires continuent de l'utiliser pour se nourrir. Chez les métazoaires, cette fonction s'est maintenue comme moyen de défense. Elle permet par exemple aux cellules phagocytaires spécialisées du système immunitaire (les neutrophiles et les monocytes, ou macrophages) d'ingérer et de détruire des agents potentiellement pathogènes. C'est ainsi que l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum* est devenue un modèle d'étude du fonctionnement des macrophages.

b. *Dictyostelium discoideum* et les macrophages des mammifères

L'amibe *D. discoideum* vit sur les tapis de feuilles mortes sous forme solitaire tant que des nutriments sont présents. Elle se nourrit par phagocytose de bactéries et levures et se reproduit végétativement. En condition de carence, les cellules cessent de se diviser et s'engagent vers un processus de développement et différenciation complexe (cycle social) qui inclut une association sous forme d'une colonie multicellulaire, au sein de laquelle vont se différencier des corps fructifères contenant des spores reproductrices. La structure de la colonie suggère celle du tissu d'un organisme pluricellulaire. Le cycle de *D. discoideum* nécessite la mise en jeu de voies de signalisation (voir Chapitre 6) et un mécanisme de chimiotaxie qui peut être extrapolé au comportement de nombreux autres types de cellules (leucocytes, fibroblastes, cellules embryonnaires de l'Homme, certaines cellules cancéreuses). En condition d'axénie (en absence de proies), *D. discoideum* se nourrit par macropinocytose (endocytose d'un type particulier), processus propre à certains types cellulaires tels les macrophages, et certains états cellulaires (transformation de fibroblastes par des oncogènes). Cette caractéristique, associée à sa non-pathogénicité, sa facilité de manipulation en laboratoire et la disponibilité de mutants cultivables en milieu axénique, en a fait un modèle d'étude des macrophages du système immunitaire des mammifères. Le séquençage de son génome (six chromosomes) a révélé la présence de nombreux gènes codant des fonctions décrites chez les Eucaryotes pluricellulaires, dont une trentaine d'orthologues de gènes impliqués dans des maladies humaines.

c. Les Paramécies et l'hérédité cytoplasmique

Les Paramécies, des ciliés, vivent dans des milieux d'eau douce (voir Figure 1.8). Leur mode nutritionnel est de type phagocytose (§ 5.1a). Les déchets de la digestion sont acheminés par la vacuole digestive pour être éliminés au niveau d'un pore.

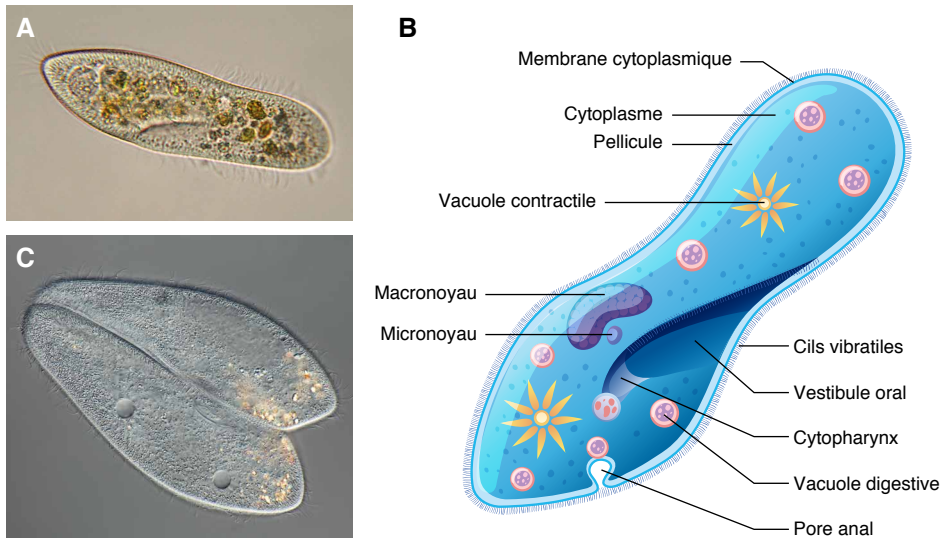


Figure 1.8 – Une Paramécie

A. Image en microscopie (Longueur : 50 à 300 μm selon les espèces). **B.** Couple de Paramécies en conjugaison. Dans chaque conjuguant, le micronoyau subit une méiose engendrant quatre noyaux haploïdes, dont trois dégénèrent, et le macronoyau est dégradé ; le micronoyau haploïde restant se divise pour former un pronoyau mobile et un pronoyau fixe ; les deux cellules s'échangent les pronoyaux mobiles, dont la fusion avec le pronoyau resté dans la cellule rétablit la diploïdie. Le macronoyau est issu du produit d'une mitose du micronoyau diploïde, suivie d'une polyploïdisation. **C.** Schéma de la structure cellulaire. Une large dépression de la surface, recouverte de cils distincts des cils somatiques, constitue le vestibule (ou cytosome) par lequel entrent les proies (Bactéries).

Les Paramécies contiennent deux types de noyaux : un micronoyau (deux chez certaines espèces), diploïde, siège de la méiose, et un macronoyau, polyploïde (jusqu'à 1 000 n), qui concentre les processus de transcription. On a estimé à 40 000 leur nombre de gènes, dont beaucoup sont dupliqués. Cette dichotomie structurale et physiologique a fait de cet organisme un modèle d'études en génétique. Les Paramécies possèdent deux formes de reproduction. La multiplication végétative par scission cellulaire assure la transmission aux deux cellules filles de deux micronoyaux et d'un macronoyau. Ce processus implique l'activité d'un système de ségrégation nucléaire complexe. Lorsque la cellule se trouve en état de carence, elle active une reproduction sexuée par conjugaison, au cours de laquelle deux cellules s'échangent uniquement un micronoyau. Trois aspects de cette reproduction doivent être soulignés :

- Ce processus de conjugaison ne conduit pas à une multiplication des individus mais uniquement à un remaniement du patrimoine génétique.
- Les deux types de noyaux dérivent du même noyau zygotique. Le macronoyau subit une **polyploïdisation** et l'élimination précise de nombreuses (environ

50 000) courtes séquences, des régions riches en transposons, séquences répétées et séquences intergéniques, tandis que le micronoyau subit une **mise en silence transcriptionnelle**.

- Cette reproduction n'impliquant pas la fusion des cytoplasmes des deux conjuguants, se maintient donc dans chaque cellule une **hérédité cytoplasmique** (non mendélienne) pour certains caractères.

d. Les Paramécies et le contrôle épigénétique

Les deux types sexuels, E et O, des Paramécies sont déterminés par la présence dans le seul type E d'une protéine transmembranaire, A, bien que le gène *mtA* codant cette protéine soit présent dans les deux types sexuels. Le contrôle de cette différenciation est de nature épigénétique. Le cytoplasme contient des petits ARN produits durant la méiose. Ces ARN sont inactifs dans le type E, tandis qu'ils se lient au promoteur de *mtA* dans les cellules de type O, bloquant sa transcription, avec pour conséquence l'absence de cette protéine dans ce type sexuel. Chacune des deux Paramécies issues de ce processus garde donc le type sexuel de la cellule qui lui a fourni son cytoplasme, cas typique d'une hérédité non mendélienne, ou épigénétique (voir Chapitre 6), c'est-à-dire de modifications transmissibles au cours des divisions mitotiques sans affectation de la séquence nucléotidique.

La surface de la cellule (comme celle des autres ciliés) est tapissée de milliers d'unités portant chacune un ou deux cils issus d'un corps basal, le complexe produisant les cils. Ces unités sont distribuées selon un motif répétitif organisé en files parallèles à l'axe antéro-postérieur de la cellule, suivant une symétrie droite-gauche et une polarité dorso-ventrale, l'ensemble formant le cortex. Cette organisation est conservée au cours des divisions cellulaires, mais il est possible d'obtenir des variants (non génétiques) par greffe d'un fragment de cortex suivant une polarité inversée. Les motifs greffés se dupliquent en conservant cette polarité inversée à travers des centaines de divisions, et sont transmis maternellement (donc épigénétiquement) au cours des croisements. Le mécanisme moléculaire de cette mémoire structurale réside dans le mode de duplication, semi-conservative, du corps basal.

e. Les Trypanosomes et leur capacité adaptative

Les Trypanosomes sont des protozoaires parasites (voir Figure 1.9). Beaucoup sont responsables de maladies plus ou moins graves, éventuellement létales, chez les animaux, dont la maladie du sommeil transmise par *T. brucei* à l'Homme *via* la Glossine.

Les Trypanosomes présentent un polymorphisme (deux à six morphologies suivant les espèces) responsable de modifications liées à leur stade de maturation et à l'organisme qui les héberge. Une forme longue (de 23 à 30 μm , mais pouvant dépasser 40 μm) porte un kinétoplaste subterminal. Le flagelle, fixé à l'extrémité postérieure de la cellule par une membrane (dite ondulante en raison du mouvement entraîné par le flagelle), se prolonge vers l'extrémité antérieure du parasite sur 6 à 7 μm , et est responsable du

déplacement en vrille de la cellule. Une forme courte (12 à 26 μm) sans flagelle libre (ou peu visible), avec un kinétoplaste plus antérieur que dans la forme longue et une membrane ondulante bien développée, existe chez certaines espèces. Une mitochondrie unique, polypléide, est ramifiée dans tout le cytoplasme. Dans la partie antérieure de la cellule est localisé un grand noyau (2,5 μm de diamètre) avec un seul grand nucléole. Le Trypanosome *T. brucei* apparaît comme une cellule fusiforme munie d'un kinétoplaste, mitochondrie unique et très développée.

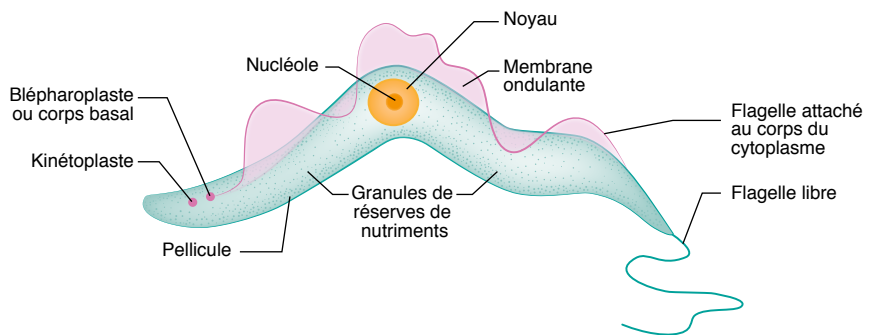


Figure 1.9 – Schéma d'une cellule de Trypanosome

Kinétoplaste, organe contenant l'ADN mitochondrial ; Blépharoplaste, organe de microtubules impliqué dans la biogenèse du flagelle.

L'ADN nucléaire est constitué d'une centaine de chromosomes (pour un total de 10 000 gènes), onze mégachromosomes (1 à 6 Mb), diploïdes, un à cinq chromosomes de tailles intermédiaires (200 à 900 kb) et une centaine de minichromosomes (50 à 150 kb), ces deux catégories étant de ploïdie inconnue. La plupart des mégachromosomes contiennent des gènes à expression constitutive, dont un millier code des protéines de surface reconnues par le système immunitaire de l'Homme. Ces gènes modifient continuellement leurs séquences par recombinaison génétique (voir Chapitre 5), permettant la production de protéines différentes connues sous le nom VSG (*Variant Surface Glycoproteins*). Ce processus constitue un moyen de défense du parasite.

Le cycle du Trypanosome, Diptère → Homme → Diptère, est complexe. La transmission du Trypanosome à l'Homme est initiée par piqûre d'une Glossine elle-même infectée. L'insecte possède des centaines de dents dont la morsure provoque une petite hémorragie sous-cutanée. Les Trypanosomes contenus dans les glandes salivaires de l'insecte passent dans le sang de l'hôte où ils se multiplient, et se propagent rapidement dans la lymphe et le liquide céphalo-rachidien. Inversement, le sang d'un hôte infecté qui passe dans la glossine au cours de son repas rend l'insecte vecteur de la transmission. Ce sang est mélangé à la salive de la mouche, qui contient un anticoagulant. Commence

un long parcours vers son intestin, *via* le gésier où est produite une membrane qui enveloppe le repas de sang, et le parasite. Lors du passage dans l'intestin moyen, l'action anticoagulante de la salive disparaît ; puis la nourriture passe dans l'hémolymph de l'insecte. Les parasites se multiplient et se transforment en une morphologie capable de traverser la paroi de l'intestin (par un mécanisme non encore élucidé), et rejoignent les glandes salivaires. À ce niveau, ils se multiplient et se retransforment en la forme infectante. Ce cycle nécessite environ trois semaines.

Le cycle de vie du Trypanosome dépend de deux conditions : l'insecte ne doit pas être tué par le parasite, et celui-ci doit survivre aux moyens de défense des deux hôtes (enzymes digestives de l'insecte, réponse immunitaire du mammifère). Pour cela, des changements de son métabolisme engendrent des variations de sa morphologie et de son revêtement de surface : il se couvre d'un manteau protéique particulier (la procycline) qui le protège contre les enzymes digestives de l'intestin de l'insecte. Dans l'hôte mammifère, il se couvre d'une protéine unique, de la famille des VSG, qu'il remplace périodiquement selon un mécanisme appelé variation antigénique, ou variation de phase (voir Chapitre 5), pour tenter de rester invisible au système immunitaire de l'hôte.

5.2 Des micro-algues

a. *Volvox* et la biologie du développement

Le genre *Volvox* regroupe des algues vertes appartenant aux Chlorobiontes (dont font partie la plupart des plantes terrestres). Les *Volvox* sont des organismes d'eau douce. *Volvox carteri* a des caractères analogues à ceux de la micro-algue à vie libre *Chlamydomonas* sp., mais aussi une forme de vie de type pluricellulaire. Elle est haploïde et pourvue au pôle cellulaire antérieur de deux flagelles aux extrémités divergentes, utilisés pour diriger la cellule vers la lumière nécessaire à la photosynthèse (phototaxie) (voir Figure 1.10A). La cellule contient dans sa zone antérieure une vacuole contractile, un chloroplaste et le noyau. Ces cellules vivent à l'intérieur d'une colonie. Celle-ci est une sphère transparente de 100 à 6 000 μm de diamètre, pouvant contenir jusqu'à 50 000 cellules, reliées par des ponts cytoplasmiques. Ces colonies, équivalentes à des organismes pluricellulaires, différencient deux types de cellules et ont une maturation qui ressemble à une gastrulation. Des cellules somatiques, de petite taille, incapables de reproduction, sont distribuées en monocouche de 2 000-4 000 sur la surface de la sphère (voir Figures 1.10B et C). Hautement spécialisées, elles assurent la motilité de la colonie vers une source lumineuse, par mouvement de leurs flagelles, positionnés vers l'extérieur de la colonie. Juste en dessous de ces cellules se trouvent seize grandes cellules reproductrices asexuées, ou gonidies. Leurs flagelles sont non fonctionnels car le pôle apical qui les porte est orienté vers l'intérieur de la colonie. Le restant du volume de la colonie est occupé par une matrice glycoprotéique.

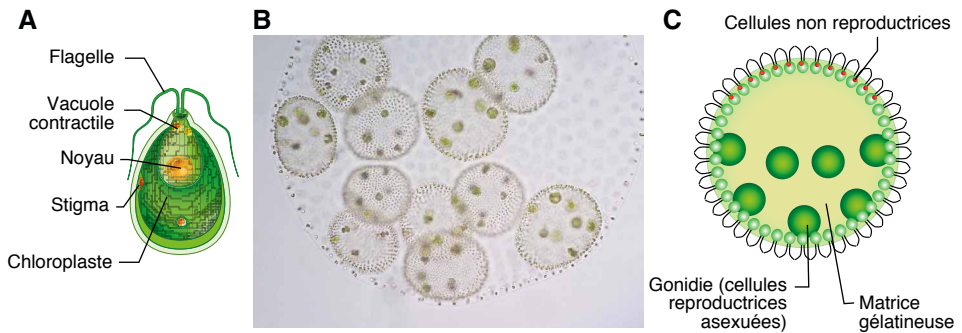


Figure 1.10 – Une colonie de *Volvox*

Schéma d'une cellule (A), de l'organisation coloniale (B). C. Image d'une colonie de *Volvox* en microscopie (diamètre : environ 300 μm). Stigma (ou tache oculaire), organe phototactique contrôlant les battements flagellaires.

V. carteri a deux modalités de reproduction :

- La reproduction asexuée assure la multiplication des colonies. Au cours de ce processus, les gonidies d'une colonie deviennent matures et entrent dans une phase de multiplication mitotique rapide (onze à douze cycles au total). Les cinq premières divisions conduisent à la formation de trente-deux cellules identiques par gonidie initiale. La sixième division, déséquilibrée, donne naissance à seize grosses cellules (les futures gonidies) qui ne se divisent plus, et quarante-huit petites cellules somatiques, qui continuent de se diviser pour donner naissance à une jeune colonie. À la fin du cycle, la couche cellulaire englobant chaque groupe de seize gonidies néoformées va se structurer en une sphère dans laquelle les cellules somatiques inversent leur orientation, tournant alors leurs flagelles vers l'extérieur. Les colonies filles ainsi formées sortent par éclatement de la colonie mère, dont les cellules somatiques entrent en dégénérescence.
- La reproduction sexuée implique la différenciation des gonidies en deux types de cellules, mâles et femelles. La différenciation sexuelle est due à l'action de facteurs externes (chocs thermiques) et internes (phéromones). Un contrôle génétique assure la formation de cellules de grande taille porteuses d'ovules et de cellules de petite taille biflagellées, les spermatozoïdes. La fécondation de la cellule femelle par la cellule spermatique engendre un zygospore qui, au moment de la germination, subit la méiose. Cette dernière produit une seule cellule viable, mâle ou femelle, qui à la suite de divisions se différencie et recrée une colonie. Le zygospore, adapté pour résister à la sécheresse et au froid, peut attendre des conditions favorables pour la germination, assurant la survie de l'espèce.

V. carteri est un exemple d'organisation cellulaire simple dont le cycle de vie inclut des caractéristiques retrouvées chez les organismes pluricellulaires :

- Cellules somatiques et lignée germinale, destinées respectivement à assurer la vie de l'individu (en colonie) et la survie de l'espèce, sont nettement différenciées.

- Les cellules somatiques sont programmées pour la vie végétative puis destinées à mourir, alors que la lignée germinale est immortelle.
- La division asymétrique des gonidies assure la formation des deux types de cellules, dont l'un va se différencier en gamètes.
- Le processus destiné à reformer la colonie fille par réorientation des cellules somatiques rappelle la gastrulation observée dans le développement des spongiaires.
- Enfin l'organisation spatio-temporelle de la colonie est parfaitement déterminée.

L'ensemble de ces caractéristiques ferait ainsi de cette micro-algue un modèle pour l'étude de la biologie du développement.

b. *Euglena gracilis*, productrice polyvalente

L'insécurité alimentaire et la malnutrition, liées entre autres à l'augmentation démographique, sont des thèmes de grande préoccupation qui devront être résolus à brève échéance. Non moins importants sont la production de biocarburants de troisième génération (ne dérivant pas d'une production agricole, donc ne nécessitant pas l'usage de terres arables) et le contrôle de la pollution. On attend beaucoup de l'exploitation de micro-algues, en particulier de l'Euglène, *E. gracilis*, organisme ubiquitaire et composant majeur des écosystèmes aquatiques (voir Figure 1.11). On dénombre chez *E. gracilis* une soixantaine de molécules présentes dans les légumes, viandes et poissons (dont vitamines, sels minéraux, acides aminés, acides gras insaturés, etc.) constituant l'alimentation humaine et les compléments de celle des animaux d'élevage. *E. gracilis* produit en outre du paramylon, un polymère de glucanes, produit de réserve de la cellule, qui a des propriétés antitumorales. Cet organisme est déjà exploité en alimentation (humaine et animale), et pour de nombreuses activités industrielles (production de biodiesel ou biokérosène, teinturerie), pharmaceutiques (antibiotiques, immunosuppresseurs, vasodilatateurs, narcotiques), ou cosmétiques (parfums).

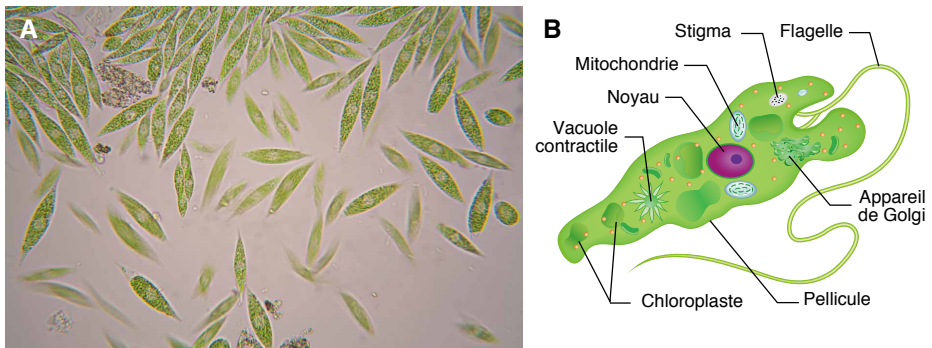


Figure 1.11 – Une Euglène

A. Image en microscopie (dimensions : 25 à 100 µm selon les espèces). **B.** Schéma de la structure cellulaire. Stigma (ou tache oculaire), organe phototactique contrôlant les battements flagellaires ; pellicule, zone réfringente déformable permettant un mouvement de reptation.

5.3 Les champignons

Les *Basidiomycota* et les *Ascomycota* (§ 2) englobent respectivement 30 % et 65 % des espèces de champignons répertoriées, dont la moitié sont parties prenantes de lichens. Les *Ascomycota* regroupent trois sous-embranchements. Les deux premiers, les **levures au sens large**, comprennent des espèces relativement simples, unicellulaires : les *Taphrinomycotina*, dont *Schizosaccharomyces pombe*, et les *Saccharomycotina*, dont *Saccharomyces cerevisiae* (voir Figure 1.4B) et *Candida albicans*. Le troisième sous-embranchement, les *Pezizomycotina* (Micromycètes), le groupe majoritaire, beaucoup plus hétérogène, réunit la majorité des **champignons filamenteux** tels *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Sordaria* (voir Figure 1.12), et des espèces communément appelées « **champignons supérieurs** », telles truffes ou morilles, et certaines espèces marines. Les *Basidiomycota* incluent des champignons comestibles (bolets, agarics, amanites, etc.) et des champignons microscopiques parasites tels que les charbons et les rouilles. Leur corps fructifère est généralement formé d'une tige et d'un chapeau, qui se développe lorsque le champignon se reproduit sexuellement. La partie inférieure de la calotte du chapeau présente une série de lamelles parallèles ou entrelacées sur lesquelles se trouvent les basides, où se forment les spores.

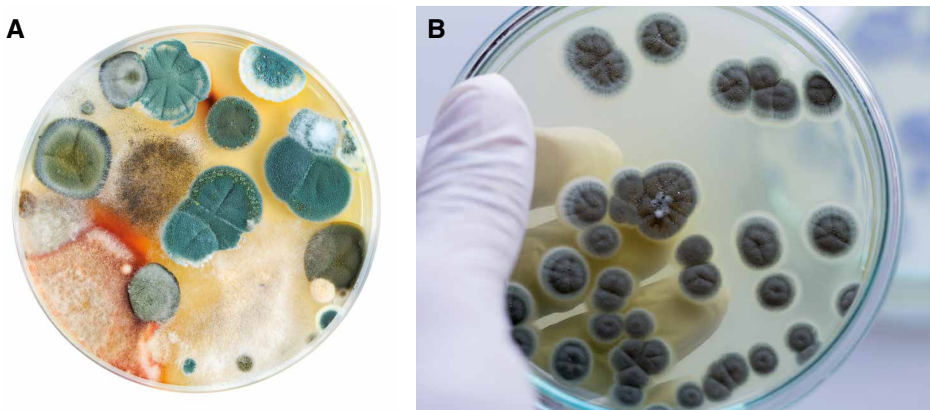


Figure 1.12 – Colonies de champignons microscopiques

A. Différentes espèces d'Ascomycètes. B. Un *Penicillium*.

a. Les Ascomycètes *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*

L'utilisation multimillénaire des levures de bière, pour la production de bière mais aussi de pain et de vin, découle de leur capacité à effectuer une respiration oxygénique soit comme unique voie énergétique (aérobie obligatoire), soit alliée à une voie fermentaire anaérobie (aérobie facultative), suivant les espèces. Plusieurs espèces **aérobies**

obligatoires ont été très étudiées en raison d'un intérêt industriel (*Yarrowia lipolytica*, productrice d'acide citrique) ou pathogène chez l'Homme (*C. albicans*). Contrairement à la majorité des organismes **aérobies facultatifs** qui utilisent la respiration préférentiellement à la voie fermentaire en condition de faible aérobie (l'effet Pasteur), un certain nombre de levures (*Kluyveromyces*, *Saccharomyces*) ont une préférence pour la voie fermentaire, même en présence d'oxygène. *Saccharomyces*, une fois le sucre fermentescible épuisé, utilise les produits issus de cette fermentation (glycérol, éthanol) pour la production de glucose, par voie respiratoire. Il s'agit donc d'une croissance en deux étapes, appelée diauxie.

S. cerevisiae et *Sch. pombe* se divisent respectivement par **bourgeonnement** et par **fission binaire**. Ces processus mitotiques classiques présentent cependant des durées relatives des phases différentes de celles de la majorité des Eucaryotes. Ce mode de reproduction s'applique autant aux formes haploïdes (spores) qu'aux formes diploïdes, faisant de ces organismes des haplo-diplobiontes. Au cours de la **reproduction sexuée** de *S. cerevisiae*, une méiose engendre quatre spores haploïdes, contenues dans un asque, se répartissant en deux cellules de deux types sexuels. La formation d'une cellule diploïde se fait par fusion d'une cellule haploïde de chacun des deux types sexuels. Ces processus ont fait de cet organisme, ainsi que de *Sch. pombe*, d'excellents outils d'analyse génétique classique.

Les **génomés nucléaires** de *Sch. pombe* (13,5 Mb, trois chromosomes) et *S. cerevisiae* (13 Mb, seize chromosomes) présentent de nombreux traits analogues à ceux des métazoaires (dont *Homo sapiens*), dont la présence d'introns, cependant en moindre quantité et de dimensions plus courtes. Le génome de *Sch. pombe* est un peu moins compact que celui de *S. cerevisiae*. Le processus d'épissage des introns, initialement décrypté chez cette levure, s'est avéré très semblable à celui d'*H. sapiens*. Leurs génomes présentent aussi des rétrotransposons, des séquences d'ADN se déplaçant *via* un passage par une forme ARN, selon un mécanisme comparable à celui des rétrovirus (voir Chapitre 8) d'autres Eucaryotes. *S. cerevisiae* possède en outre un ADN circulaire double brin, dit ADN 2 μ , ou microgénome, présent à raison de cinquante copies par noyau, et deux ARN double brin linéaires responsables de la production d'une toxine.

Le **génome mitochondrial** est un ADN circulaire double brin de 85,8 kb pour *S. cerevisiae* et 19,4 kb pour *Sch. pombe*. Chez *S. cerevisiae* ont été sélectionnés des mutants dits « petites colonies », dont le phénotype se révèle sur un milieu sélectif ayant deux sources de carbone, l'une fermentescible (ordinairement le glucose) en quantité limitante, l'autre uniquement respirable, en quantité saturante : les mutants ne réalisent qu'une croissance limitée par rapport aux cellules sauvages, indiquant leur incapacité à respirer. Certains présentent un comportement mendélien, indiquant l'origine nucléaire de leurs mutations. D'autres, signant une **hérédité non mendélienne**, sont associés à des mutations de l'ADN mitochondrial. L'étude transcriptionnelle de l'ADN mitochondrial de *S. cerevisiae* et d'autres ascomycètes a mis en évidence des particularités de cet organite, la présence de seulement vingt-quatre ARNt (contre quarante-deux dans l'ADN nucléaire) et quelques entorses à l'universalité du code génétique. Notamment, chez *S. cerevisiae* et

Sch. pombe les codons stop nucléaires UGA, AUA et CU codent respectivement dans la mitochondrie try, la méthionine d'initiation de traduction, et thr ou leu. Cela pourrait refléter une évolution des génomes mitochondriaux vers un code génétique fondé sur les seules deux premières bases des codons (ainsi UGA et UGG pour try, AUA et AUG pour met).

Des formes de **communication intercellulaire**, impliquant des voies dites de **transduction du signal** (voir Chapitre 6), sont à l'œuvre au cours de la reproduction sexuée. Les formes haploïdes de *S. cerevisiae* produisent en permanence une phéromone peptidique correspondant à leur haplotype. Ces peptides reconnaissent des récepteurs transmembranaires spécifiques. L'association phéromone-récepteur constitue un signal qui active la transcription d'une série de gènes permettant la reconnaissance des cellules du type sexuel opposé. La fécondation, qui implique la fusion d'une cellule de chacun des types sexuels, est réalisée par dégradation très localisée de la paroi, suivie d'une réorganisation des membranes cytoplasmiques. Un mécanisme comparable existe chez *Sch. pombe*, avec cependant une chaîne réactionnelle notablement différente. *H. sapiens* possède le même type de récepteurs pour certaines hormones (l'adrénaline, par exemple) et certains neurotransmetteurs (impliqués dans la vision, le goût et l'odorat). Les mécanismes de maturation et de sécrétion des hormones humaines et de la phéromone de levure présentent également de fortes similitudes.

b. Quelques Ascomycètes filamenteux

Le sous-groupe des Micromycètes inclut des genres importants au niveau industriel ou biotechnologique, tels que *Penicillium* (voir Figure 1.12B) ou *Aspergillus*. Il comprend nombre d'espèces dont le métabolisme secondaire est responsable de 20 % environ de la production naturelle totale d'antibiotiques, ainsi que de nombreuses mycotoxines (2 500 actuellement connues) dont une trentaine est dangereuse : la gliotoxine d'*Aspergillus*, à propriétés immunosuppressives, l'aflatoxine, un carcinogène, l'ergotamine et ses dérivés produits par *Claviceps*, des vasoconstricteurs, l'alternariol d'*Altenaria*, endommageant les mitochondries, la citrinine de *Penicillium*, un néphrotoxique. Actives à faible concentration, ces toxines représentent la seconde cause des dommages causés aux graines. *Penicillium notatum* est connu comme producteur historique de pénicillines, bien que celles-ci soient actuellement généralement synthétisées par voie chimique. Les *Penicillium* sont cependant toujours sources de β -lactames (telles la pénicilline G ou la céphalosporine). L'utilisation de ces champignons dans la production de fromages (*P. roqueforti* ou *P. camemberti*) est bien connue.

Les Micromycètes comprennent aussi les genres *Sordaria*, *Neurospora* et *Podospora*, modèles d'analyses génétiques et moléculaires. *Podospora* présente une limite de sa croissance associée au phénomène de sénescence, une mort par asphyxie des cellules issues des dernières divisions, liée à une déstabilisation de l'ADN mitochondrial au cours des divisions. Le mécanisme de cette déstabilisation reste inconnu.

Les points clefs du chapitre

- 1 Les micro-organismes, couvrant trois domaines (les procaryotes *Bacteria* et *Archæa* et, parmi les *Eucarya*, l'ensemble des protistes) forment un ensemble hétérogène, dont l'unité est la structure majoritairement unicellulaire.
- 2 Leurs morphologies, dimensions, physiologies et modes de vie (libres ou en associations variées, néfastes pour les pathogènes) présentent une vaste diversité.
- 3 Ubiquitaires, ils sont indispensables pour l'équilibre écologique et la vie sur la Terre.
- 4 Les *Bacteria* et *Archæa* sont définies par l'absence de noyau individualisé et une faible compartimentation intracellulaire, à l'inverse des protistes.
- 5 Les *Bacteria* possèdent une enveloppe à une (monoderme) ou deux (diderme) couches, dont une paroi de peptidoglycane. L'enveloppe des *Archæa* est de nature variée.
- 6 Leur classification, initiée par C. Woese (1967), fondée sur des critères de morphologie, physiologie et génomique, montre quelques spécificités par rapport aux règles classiques.
- 7 Des tests rapides d'identification sont utilisés en microbiologie médicale (Bactéries pathogènes) et industrielle.
- 8 Leur métabolisme permet de définir trois groupes de protistes (protozoaires, micro-algues et micro-champignons).
- 9 Certains aspects de la biologie des métazoaires peuvent être présents chez des protistes modèles.



Entraînez-vous

- 1.1 Outre la présence d'une membrane nucléaire, quelles caractéristiques morphologiques distinguent les cellules eucaryotes et procaryotes ?
- 1.2 Quelles sont les différences entre classification phénétique et classification phylogénétique ?
- 1.3 Définir la notion d'horloge moléculaire. Quel rôle joue-t-elle dans la classification ?
- 1.4 À quels critères doivent répondre les molécules utilisées pour une classification phylogénique moléculaire ?
- 1.5 Justifier le choix de C. Woese pour la construction d'un arbre universel du vivant.
- 1.6 À quoi attribue-t-on la dichotomie Gram⁻/Gram⁺ des Bactéries ? Les Archées peuvent-elles aussi être divisées en Gram⁻ et Gram⁺ ? Comment se positionne leur paroi vis-à-vis de cette dichotomie ?
- 1.7 Quelles données moléculaires justifient l'origine procaryote des organites eucaryotes ?
- 1.8 Définir la notion de couplage transcription-traduction chez les procaryotes. Pour quelle raison est-il difficilement concevable chez les Eucaryotes ?
- 1.9 Quels protistes sont à l'origine de l'étude de l'hérédité non mendélienne ?
- 1.10 En quoi la biologie de *S. cerevisiae* en fait-elle un organisme modèle pour l'étude de la transcription chez les Eucaryotes ?

Introduction

La plupart des micro-organismes de l'environnement vivent en groupes dynamiques de complexité variable. On y trouve des espèces persistantes, des espèces transitoires et des espèces rares ou dominantes. L'équilibre entre toutes dépend de différents facteurs, biotiques et abiotiques. Dans tous les cas, ce sont des réservoirs de diversité, qui peuvent répondre aux changements rapides de l'environnement. Les nombreuses techniques disponibles ne permettent pas de mesurer *in situ* et précisément la fonction d'un groupe de populations au sein d'un écosystème, mais permettent d'en réaliser une évaluation indirecte.

Objectifs

- Connaître** les notions de base de l'écologie microbienne
- Comprendre** la biodiversité des micro-organismes, leurs interactions et leur importance
- Identifier** les différents paramètres environnementaux impactant les communautés microbiennes ainsi que leurs stratégies d'adaptation et de survie

Plan

- 1 Les écosystèmes naturels
- 2 Fluctuations des communautés microbiennes
- 3 Comprendre la diversité microbienne
- 4 Quelques écosystèmes – Applications

1 Les écosystèmes naturels

Une espèce qui se divise et se reproduit, de façon sexuée ou non, dans un environnement donné forme une **population**, généralement définie comme un ensemble d'individus ayant un patrimoine génétique commun. Cependant, cette population, bien que clonale, contient très probablement des sous-clones (mutants) différant par plus ou moins de traits génétiques, et donc phénotypiques. Ces sous-clones, ou **sous-populations**, peuvent avoir des activités généralistes ou spécialisées, formant alors des groupes fonctionnels. Pour des populations proches réalisant une même activité métabolique et utilisant les mêmes ressources, on parle de **guildes microbiennes**. Des populations différentes se trouvant dans un même habitat à un instant donné forment des **communautés**. Plusieurs communautés peuvent être amenées à coexister ; elles interagissent alors entre elles et avec l'environnement, formant ainsi un réseau complexe appelé **écosystème**. Il est de plus en plus fréquent de trouver le terme **métacommauté**, qui représente un ensemble

de communautés au sein d'un « paysage » plus large dont les membres (communautés) sont liés les uns aux autres par différents processus, dont la dispersion des populations.

L'endroit physique dans lequel une communauté microbienne vit est appelé **habitat**. Ce dernier possède toutes les caractéristiques (ressources, en particulier nutriments, mais également conditions physico-chimiques, etc.) appropriées à la vie des organismes concernés. Un habitat donné peut présenter des **micro-environnements** dans lesquels certaines conditions peuvent être très différentes. Par exemple dans un environnement à température homogène peuvent exister des différences dans la distribution des nutriments, de l'oxygène, etc. Chaque type de micro-organismes occupe une **niche** spécifique en fonction de ses besoins. Plusieurs populations peuvent coexister dans un même habitat. Chaque population microbienne va avoir une condition de vie optimale dans une **niche principale**, qui répond à tous ses besoins nutritionnels et physico-chimiques.

1.1 Périodes de carence, stress et survie

Les conditions nutritionnelles dans la nature sont très variables, avec des micro-environnements très riches en nutriments et d'autres où les conditions de vie sont drastiques. Une caractéristique principale des habitats naturels est la périodicité de la disponibilité des nutriments. Se produisent régulièrement des carences temporelles (éventuellement très limitées dans le temps) et/ou spatiales (distribution intrinsèque d'un nutriment au sein d'un micro-environnement) qui entraînent des stress et des modifications de populations. Si plusieurs populations coexistent, elles sont souvent en concurrence pour les substrats disponibles, et doivent faire face à deux problématiques : la capacité à capter de façon efficace les nutriments disponibles, et la capacité à répondre à ces changements environnementaux rapides.

Les disponibilités en sources de carbone et d'énergie sont des facteurs importants affectant la croissance des organismes hétérotrophes dans la plupart des écosystèmes. Ainsi une abondance de nutriments peut être considérée comme favorable car riche en carbone assimilable, mais être cependant défavorable si elle présente une « activité de l'eau » (l'eau nécessaire pour réaliser les fonctions métaboliques) faible, et une forte osmolarité. Les environnements pauvres en nutriments sont communément appelés **oligotrophes** par opposition aux environnements riches. Dans ces environnements, le carbone organique (0,5 à 5 mg/L) est souvent sous forme de polymères complexes, non utilisables directement par la plupart des micro-organismes présents (voir Chapitre 3). Les quantités de carbone organique assimilable (10 à 100 µg/L) et de sources de carbone simple (µg/L) (sucres ou acides aminés) sont en général cinquante fois et cent fois plus faibles, respectivement, que le carbone organique total présent. De nombreux environnements oligotrophes peuvent cependant être riches en micro-organismes (jusqu'à 10^5 à 10^6 cellules/mL), dont la plupart sont en vie mais en état de dormance, prêts à se multiplier dès que les conditions redeviennent favorables.

Les conditions des environnements naturels diffèrent notablement de celles utilisées en laboratoire (substrats peu variés et en excès) qui permettent d'obtenir une grande quantité de micro-organismes avec une croissance optimale et rapide (voir Chapitre 3).

Dans l'environnement, les cellules sont souvent en phase de latence. Cela est vrai aussi pour l'utilisation et l'assimilation des nutriments, en particulier du carbone. Ainsi la présence d'un sucre simple peut déclencher un processus de **répression catabolique**, qui permet d'éviter une dépense énergétique inutile en utilisant un substrat complexe à coût plus élevé (voir Chapitre 6). Cette stratégie, applicable à de nombreuses espèces en conditions artificielles, correspond à une **spécialisation** permettant l'utilisation d'un substrat avec une **efficacité importante**. Les micro-organismes sont cependant généralement capables d'utiliser simultanément plusieurs sources de carbone (**dé-répression catabolique**) dans des conditions de nutriments limitants, avec une **vitesse de croissance souvent plus lente** qu'en présence d'une seule source de carbone, grâce à l'expression simultanée d'outils (gènes impliqués dans l'absorption, le transport et le métabolisme) nécessaires à l'utilisation de ces substrats. Cela constitue un avantage dans un environnement compétitif complexe, tout en permettant une **flexibilité physiologique** importante.

1.2 Stratégies trophiques : oligotrophie vs copiotrophie

Certains traits physiologiques peuvent influencer la fonction et la distribution des micro-organismes dans la nature, et modifier la structure de la communauté. Chez les micro-organismes hétérotrophes, deux stratégies trophiques coexistent, indépendamment de la présence ou de l'abondance des nutriments. Les espèces **oligotrophes**, en nombre constant (généralement faible) et ayant une vitesse de croissance très lente, sont en général résistantes et adaptées à des conditions de ressources limitées. Les espèces **copiotrophes** peuvent se trouver en faible nombre, mais, étant capables de répondre très rapidement à un changement environnemental, se multiplient rapidement quand les ressources sont abondantes, jusqu'à atteindre de grandes densités. Elles auront eu un avantage écologique à cet instant. Une différence principale entre ces deux types de populations est l'utilisation de l'énergie : les espèces oligotrophes utilisent davantage d'énergie pour se maintenir en vie que pour croître, tandis que c'est le contraire chez les espèces copiotrophes. Les deux populations peuvent coexister et fluctuer dans un environnement hétérogène, réalisant éventuellement chacune une ou plusieurs fonctions écologiques importantes.

1.3 Organisation des fonctions trophiques en réseaux

Il est rare qu'une seule espèce microbienne puisse réaliser l'ensemble des procédés liés à l'utilisation de tous les produits issus de la décomposition des substrats disponibles dans un environnement ou un écosystème donnés, et maintenir les différents cycles de nutriments en équilibre. L'ensemble de ces fonctions est partagé entre des populations différentes possédant des capacités complémentaires, interconnectées et interagissant suivant de nombreux modes (§ 2.2). Ces populations forment ainsi des chaînes alimentaires, interagissant par des **relations trophiques**, des échanges de nutriments et d'énergie. Chaque population est un maillon de la chaîne, où elle occupe une place particulière selon les activités qu'elle réalise. Les différentes populations étant interdépendantes, une modification au sein d'une population (taille ou autre) peut influencer

grandement l'ensemble de la communauté. Un écosystème peut contenir plusieurs chaînes trophiques, formant un **réseau trophique**, une population pouvant appartenir à différentes chaînes. Suivant les écosystèmes ceux-ci peuvent être organisés de différentes manières (voir Figure 2.1). À leur base se trouvent des producteurs primaires, des (micro-)organismes photoautotrophes (voir Chapitre 3).

Dans le sol l'essentiel de la matière organique provient des débris végétaux, animaux et microbiens. Dans les milieux aquatiques, elle est constituée des déchets d'organismes variés modifiés par des micro-organismes autotrophes, ou est apportée par des activités humaines (matières organiques allochtones). Ces matières organiques serviront de nutriments (sources de carbone et d'énergie) à des micro-organismes chimiohétérotrophes, qu'on pourrait qualifier de consommateurs. La régulation de ces réseaux trophiques se fait au sein des différentes populations, ou par des facteurs environnementaux ou même des virus (d'Eucaryotes ou de procaryotes).

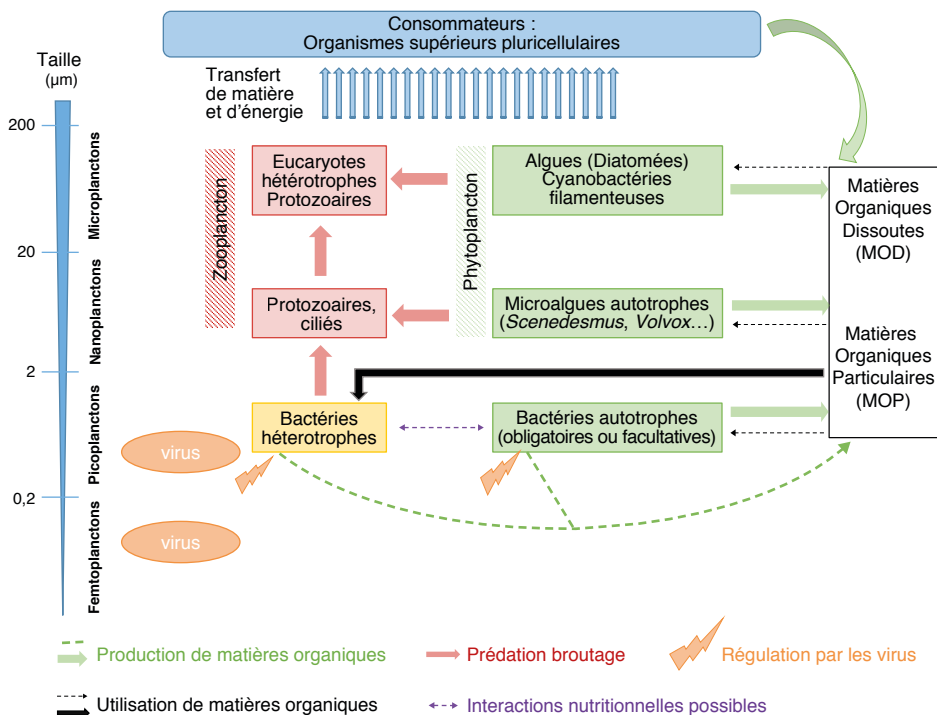


Figure 2.1 – Schéma simplifié de réseaux trophiques microbiens aquatiques

La **syntrophie** est une interaction nutritionnelle obligatoire, à bénéfices mutuels. De telles associations existent dans de nombreux habitats, généralement anoxiques, naturels (sédiments et sols anoxiques, tubes digestifs, etc.) ou non (digesteurs anaérobies, rizières, etc.). En permettant le recyclage du carbone, ce processus assure à la communauté un fonctionnement et une survie dans un milieu dont les conditions énergétiques

sont contraignantes (faible potentiel énergétique dû à l'absence d'O₂). La dépendance réciproque des partenaires ne peut pas être remplacée par l'ajout d'un co-substrat. Il est donc difficile, voire impossible, de maintenir chacun d'eux en culture pure.

Le premier partenaire, ou **syntrophe**, réalise la première partie du processus métabolique, la minéralisation partielle d'un substrat en CO₂ et H₂, associée à la libération d'autres molécules organiques. En conditions anoxiques, H₂ est un donneur puissant d'électrons (on parle alors de transfert interspécifique d'hydrogène), mais d'autres agents réducteurs (formate, acétate, mais aussi des composés organiques, sulfureux, azotés, des composés toxiques, etc.) peuvent intervenir pour la production d'énergie (voir Chapitre 3). Les substrats proviennent généralement de la fermentation primaire anaérobie de molécules complexes (polymères) par d'autres micro-organismes du réseau trophique.

Le deuxième partenaire, le **consommateur**, est chargé d'utiliser les produits du métabolisme du syntrophe, ce qui maintient leur concentration à un niveau faible, rendant la chaîne réactionnelle thermodynamiquement favorable (exergonique). De multiples interactions syntrophes existent dans la nature, faisant intervenir de nombreux micro-organismes hydrogénotrophes (Bactéries acétogènes ou sulfato-réductrices appartenant aux embranchements des *δ-Proteobacteria* [*Syntrophus*, ou des Firmicutes etc.], *Clostridia*, *Bacillus* [*Syntrophomonas*, etc.] et Archées méthanogènes).

Dans le tube digestif des ruminants (voir Figure 2.2), des polymères glucidiques disponibles sont hydrolysés par des micro-organismes fermentaires, libérant des sucres

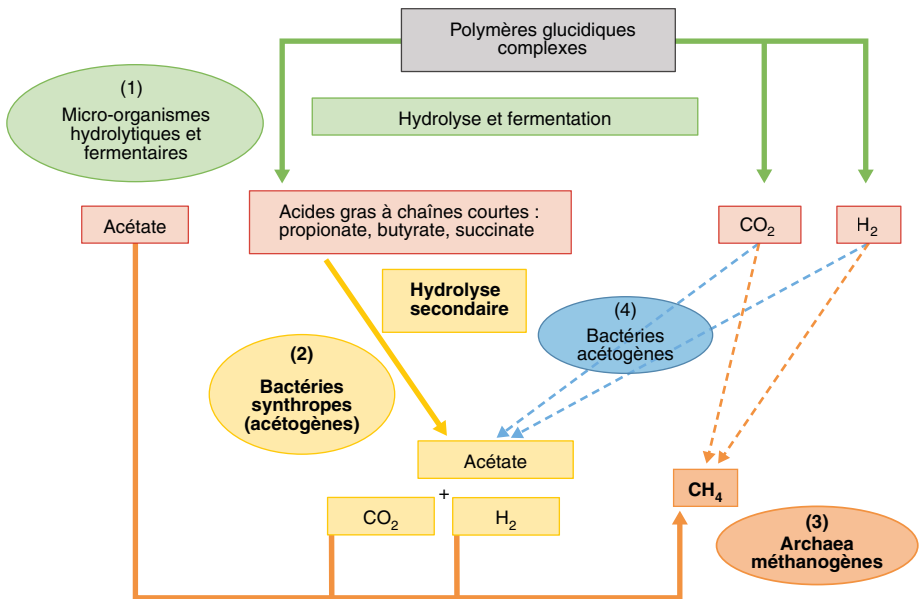


Figure 2.2 – Un réseau trophique dans un environnement anaérobie

Les partenaires 2 (syntrophe) et 3 (consommateur) ont une interaction de syntrophie. Les Bactéries (2) produisent de l'H₂, consommé par les Archées (3).

simples métabolisés en acides gras à chaînes courtes (propionate, butyrate, succinate, etc.) et acétate, CO_2 et H_2 . Une fermentation secondaire (acétogénèse) réalisée par des Bactéries acétogènes (les syntrophes) permet de minéraliser les acides gras à chaînes courtes en CO_2 et H_2 en formant de l'acétate. Cette réaction, énergétiquement défavorable si seules des Bactéries acétogènes sont présentes, et donc insuffisante pour soutenir leur croissance, le devient grâce à la présence de méthanogènes (Archées) qui consomment le H_2 produit, maintenant basse sa pression ; cela augmente la vitesse d'utilisation par les syntrophes de leur substrat et leur permet de se multiplier, stimulant à leur tour les méthanogènes.

2

Fluctuations des communautés microbiennes

Les conditions physico-chimiques (facteurs abiotiques) des environnements naturels entraînent la sélection de populations microbiennes spécifiques. Parallèlement la présence d'espèces diverses, microbiennes ou non (facteurs biotiques), entraîne la mise en place d'interactions entre ces populations.

2.1 Les facteurs abiotiques

Les principaux paramètres abiotiques qui conditionnent le développement des micro-organismes varient dans les différentes parties du globe terrestre.

a. La température

La **température** est très variable suivant les biotopes naturels (de moins de 0°C dans les zones polaires à 5°C dans les eaux profondes, autour de 20°C dans les zones terrestres tempérées, et jusqu'à 400°C près des sources hydrothermales). Chaque espèce microbienne présente un **optimum de température** de croissance, avec un éventail de tolérance au-delà duquel (**température maximale**) ces variations deviennent létales (dénaturation de composants cellulaires), et en deçà duquel (**température minimale**) les cellules sont métaboliquement inactives ou ont un métabolisme très ralenti (état de dormance). Au sein des micro-organismes **psychrophiles** (avec une plage de tolérance comprise entre 0 et 20°C , et un optimal à 10°C), les **psychrophiles stricts** ne peuvent se développer qu'à des températures inférieures à 0°C et sont détruits dès 15°C ; les **psychrotrophes** (**psychrotolérants**) se développent à basse température mais leur température optimale de croissance peut être plus élevée (proche de celle des mésophiles). Ces micro-organismes ont développé de nombreux mécanismes qui leur permettent de résister au froid (présence d'acides aminés polaires et structures secondaires riches en hélices alpha dans les protéines ; membranes cytoplasmiques contenant des acides gras insaturés qui évitent une rigidification membranaire au froid). Leurs biotopes sont les mers et océans polaires, les abysses, les sols gelés ou les glaciers. Les **mésophiles** (la plupart des

Bactéries et protistes des habitats terrestres) se développent entre 15 et 45 °C, avec un optimum autour de 30 °C. Les **thermophiles**, dont certains sont thermophiles obligatoires, ont une plage de température de croissance entre 40 et 70 °C avec un optimum à 50 °C, et les **hyperthermophiles** se multiplient à plus de 70 °C avec un optimum autour de 90 °C. Ces micro-organismes ont adapté leurs constituants et leurs mécanismes moléculaires à ces hautes températures (contenu en GC de l'ADN élevé, membranes cytoplasmiques riches en lipides saturés et protéines plus thermostables car riches en acides aminés hydrophobes). Leurs habitats sont les sources d'eau chaude de surface issues de fortes activités volcaniques (températures variant de 60 à 100 °C), les sources hydrothermales océaniques profondes (températures pouvant atteindre 400 °C), ou le sol (compost, fumier). Parmi les plus thermorésistants connus à ce jour, citons les genres bactériens *Aquifex* et *Thermotoga* (température de croissance pouvant atteindre 90 °C) et des Archées hyperthermophiles, avec l'embranchement des *Euryarchæota* (croissance jusqu'à 110 °C dans des sources hydrothermales terrestres ou aquatiques), dont certaines espèces produisent en même temps du méthane (*Methanoarchæa*), et celui des *Crenarchæota* (telles les *Sulfolobales*), présentes dans des sols volcaniques.

b. La salinité

La **salinité** est un facteur abiotique important. Les micro-organismes **halotolérants** sont résistants à une concentration en sel modérée. L'eau de mer, avec une concentration autour de 4 %, héberge des micro-organismes **faiblement** ou **modérément halophiles** (croissance entre 2-5 % et 5-20 % de NaCl, respectivement). Dans d'autres environnements, comme les marais salants, lacs salés ou la Mer Morte, dont les concentrations en sel atteignent entre 20 et 30 % (soit proches de la saturation, à 35 %), on trouve essentiellement des Archées **halophiles extrêmes**. Tous ces micro-organismes régulent très finement leur **pression osmotique interne** afin de maintenir leurs structures cellulaires intactes.

c. L'aérobiose

L'**aérobiose** peut aussi moduler la diversité des micro-organismes au sein d'un biotope. L'oxygène, qui est un accepteur final d'électrons pendant la respiration cellulaire (voir Chapitre 3), est également un agent oxydatif puissant qui peut générer de nombreux éléments réactifs très toxiques tels que les radicaux libres, capables de détruire les macromolécules biologiques (voir Chapitre 5). En présence de ces éléments, les micro-organismes déclenchent des réponses adaptatives telle la production d'enzymes capables de les détruire (peroxydases, catalases, superoxyde dismutases) ou de modifier (autres oxydo-réductases) le potentiel d'oxydo-réduction de l'environnement. Ces micro-organismes, dits **aérobies**, qui peuvent vivre en présence d'oxygène et l'utiliser, colonisent toutes les zones ouvertes du globe. Certains, **microaérophiles**, dont les systèmes de détoxification ont des performances variables, ne sont capables de croître que sous une pression en O₂ inférieure à celle de l'atmosphère. Les micro-organismes **anaérobies facultatifs** peuvent se développer en absence d'O₂ mais leur croissance est meilleure

en sa présence. À l'inverse, de nombreux micro-organismes incapables de réaliser la détoxification des espèces réactives issues de l'O₂, des **anaérobies stricts**, vivent dans les sols et environnements aquatiques riches en gaz (méthane), en soufre, etc.

d. Acidité-alcalinité

Chaque micro-organisme montre aussi une plage de **pH** optimale. La majorité est **neutrophile** (développement à pH entre 6,5 et 7,5). Les **acidotolérants** peuvent croître à pH acide, mais avec un pH optimal de croissance proche de la neutralité. Les **acidophiles**, ne se développant qu'à pH acide, incluent des acidophiles **stricts** et des acidophiles **extrêmes** (pH de croissance inférieurs à 5,5 et à 3, respectivement), avec certaines Archées **hyperacidophiles** se développant à des pH entre 1 et 3, dans des environnements riches en métaux (fer, cuivre, zinc, etc.) ou en composants soufrés ou chlorés issus d'activités volcaniques ou minières. L'**alcalotolérance** (pH optimal proche de la neutralité) est souvent accompagnée d'une capacité de croissance à des pH basiques. Les **alcalophiles modérés** et **extrêmes** ont des pH optimaux autour de 7 et 9, respectivement, avec encore un extrême pour des Archées **hyperalcalophiles**, se développant à des pH entre 11 et 12. Les micro-organismes alcalophiles se développent dans des environnements aquatiques riches en carbonate de sodium (sources thermales alcalines). Ce sont souvent des Bactéries photoautotrophes oxygéniques (Cyanobactéries) ou anoxygéniques (Bactéries pourpres), mais aussi des Bactéries chimiohétérotrophes et des Archées. Aucun organisme vivant n'a été trouvé jusqu'à présent à un pH supérieur à 12.

e. La pression

La **pression** atmosphérique terrestre (1 atmosphère, ou 1 000 kPascal) convient évidemment aux micro-organismes se développant en surface. De nombreux biotopes présentant de fortes pressions (fond des océans, lacs profonds, mais aussi la croûte terrestre, etc.) hébergent des micro-organismes **piézophiles**, ou **barophiles**, se développant jusqu'à environ 11 000 mètres de profondeur, sous une pression qui peut atteindre 100 MPa (Fosse des Mariannes), mais ne supportant pas la pression atmosphérique. Leur vie à ces pressions extrêmes est possible grâce à la production de protéines particulières (famille des porines) qui forment des canaux, leur permettant de maintenir une pression intracellulaire stable. La température dans les profondeurs variant de 2 °C à 400 °C, avec une moyenne de 4 °C, ces organismes sont souvent psychrophiles. Les micro-organismes **barotolérants** (**piézotolérants**) peuvent vivre sous une pression proche de la pression atmosphérique, et sont moins sensibles aux diminutions de pression que les micro-organismes piézophiles.

f. Autres facteurs

D'autres facteurs environnementaux sont aussi importants. Des micro-organismes **métallotolérants** se développent dans des environnements contenant de fortes concentrations en métaux lourds (eaux polluées). D'autres, tolérant de **fortes irradiations**

(rayons gamma ou UV), ont été isolés de l'eau de bassins de centrales nucléaires ou de sols radio-pollués. Des micro-organismes **xérophiles** peuvent tolérer des environnements contenant très peu d'eau et résister à la dessiccation en formant des spores ou des kystes. La **lumière** est indispensable à tous les organismes phototrophes (Bactéries et Eucaryotes uni- et pluricellulaires).

Remarque Dans un environnement naturel, les micro-organismes peuvent être confrontés simultanément à plusieurs de leurs limites de tolérance, et doivent alors développer diverses aptitudes pour s'y adapter au mieux : Bactéries anaérobies et thermophiles dans les composts, Bactéries alcalophiles et halophiles dans les lacs hypersalés roses (lac Hillier en Australie ou lac Retba au Sénégal), Bactéries acidophiles et métallobactéries dans les eaux rouges du Rio Tinto, Bactéries hyperthermophiles et hyperacidophiles, ou piézophiles et suivant les cas psychrophiles ou hyperthermophiles, dans les abysses.

2.2 Les interactions biotiques

Les cohabitations fréquentes de micro-organismes engendrent des interactions continues, entre eux ou avec des organismes pluricellulaires. Ces interactions sont régulées par l'émission de molécules excrétées dans leur environnement, qui jouent le rôle de facteurs de communication entre individus d'une même population ou de populations différentes, et déclenchent des réponses physiologiques et métaboliques. Le degré d'interaction entre populations influence la structure et les fonctions des communautés. Les interactions entre micro-organismes sont la plupart du temps fondées sur l'utilisation des ressources (pouvant être limitantes), et souvent régies par des relations trophiques (production d'acides aminés, vitamines, etc.) (§ 1.3). Des relations avec des organismes pluricellulaires mettent en jeu des interactions plus complexes, incluant d'autres niveaux (protection, résistance à des molécules toxiques, réponse immunitaire, habitat, transmission de virus, etc.).

Ces interactions peuvent être obligatoires ou non, durables ou pas. Une interaction **favorable** (tous les partenaires tirent bénéfice de l'association), qui se traduit par une croissance optimisée des partenaires (synergie), est désignée par les termes de **coopération** ou de **mutualisme**. Quand cette interaction favorable est **permanente** et **obligatoire** on utilise habituellement le terme généraliste de **symbiose** (en particulier dans les écosystèmes de types **tubes digestifs**). Quand elle implique des micro-organismes et des organismes supérieurs on parle de symbiote pour le premier et d'hôte pour le second. Le symbiote fournit de l'énergie ou des substrats, ou réalise des activités que l'hôte ne peut pas effectuer. L'hôte, à son tour, offre un environnement adéquat.

Les associations symbiotiques sont nombreuses dans la nature (pucerons hébergeant des Bactéries du genre *Buchnera* dans leur hémolymphe ; termites xylophages et leurs micro-organismes capables de dégrader le bois (voir Chapitre 7). Les herbivores hébergent une communauté microbienne complexe dans leur rumen (§ 4.1). Les micro-organismes symbiotiques peuvent former des **consortia** s'ils interagissent de façon dynamique au sein d'un habitat, se répartissant les différentes étapes d'une voie

métabolique (**co-métabolisme**). Le **commensalisme** ne profite qu'à un des partenaires, le deuxième n'étant pas affecté. Sont définies ainsi les associations de micro-organismes en différents habitats du corps humain (peau, etc.). Le premier offre une protection à l'Homme, en revanche il est difficile de mesurer s'il y a bénéfice au profit des micro-organismes (voir Chapitre 7). Ce type de relation est assez rarement mis en avant en raison de la difficulté à mesurer une absence d'effet sur l'un des partenaires. Lors du développement de la flore lactique dans la fabrication du yaourt, *Streptococcus thermophilus* se multiplie rapidement en produisant du lactate, ce qui entraîne une acidification qui permet la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*. L'interaction de ces deux Bactéries était considérée comme commensale, avec pour seul bénéficiaire *L. bulgaricus*. Or il a été montré depuis que ce dernier hydrolyse la caséine en acides aminés que peut utiliser *S. thermophilus*.

Les interactions sont qualifiées de **défavorables** quand un partenaire est impacté négativement par l'association (phénomène d'antagonisme). Une **compétition** a souvent lieu en cas de limitation de ressources ou d'espace dans un habitat occupé par plusieurs populations microbiennes aux métabolismes proches. La compétition peut s'effectuer entre individus de la même espèce (intra-population) ou d'espèces différentes. Elle peut être **directe** vis-à-vis de l'utilisation d'un substrat : une plus forte affinité pour ce substrat, donc une meilleure capacité à l'importer, peut avantager certains partenaires qui vont alors coloniser rapidement l'habitat et en devenir les populations dominantes.

Si des Bactéries acétogènes et des Archées méthanogènes, toutes deux hydrogénotrophes, se trouvent dans un même habitat, elles entrent en compétition pour l'hydrogène, leur substrat pour la synthèse d'acétate ou de méthane. L'affinité des Archées pour H_2 étant plus élevée, la conversion de H_2 et CO_2 en méthane est favorisée, et cette population avantagée. La compétition peut se manifester de manière **indirecte**, sous forme d'une lutte chimique par production de molécules toxiques (antibiotiques, bactériocines, etc.) inhibant la croissance, ou même tuant le micro-organisme le moins compétiteur, qu'il appartienne à la même espèce que le compétiteur ou à une autre. On parle d'**antibiose**, ou d'**amensalisme**. Les Bactéries marines *Vibrio* spp. comprennent une trentaine de sous-populations, dont plusieurs sont capables de produire des antibiotiques, spécifiques pour chaque espèce. Ces derniers peuvent agir sur d'autres Bactéries à Gram⁻ de l'habitat, mais aussi sur les sous-populations non productrices.

Le **parasitisme** est une interaction dont seul l'un des deux partenaires, le parasite, tire profit, pour se nourrir et se multiplier, son hôte étant impacté négativement (voir Chapitre 7). L'hôte, cependant, doit survivre sur une durée assez longue pour assurer au parasite le temps de se reproduire. Ce type d'interaction concerne de nombreux micro-organismes pathogènes capables d'infecter des cellules hôtes humaines, animales ou végétales. On parle de **prédation** quand des micro-organismes (prédateurs) sont capables de tuer d'autres micro-organismes (proies) pour s'en nourrir (de nombreux protozoaires, telles la Paramécie ou des Amibes se nourrissant de Bactéries, micro-algues ou autres protozoaires) (voir Chapitre 1). Des Bactéries prédatrices (*Bdellovibrio*, *Vampirococcus*, etc.) mettent en œuvre des techniques très élaborées et coordonnées

incluant mobilité, adhésion et pénétration pour tuer leurs proies. Bien que considérée comme négative au niveau d'un individu (la proie), cette interaction est nécessaire pour la régulation et la structuration de la communauté, en permettant de contrôler les concentrations des populations et le recyclage des nutriments.

2.3 Résistance et résilience

Les perturbations des facteurs environnementaux peuvent être temporelles ou spatiales, et avoir des intensités, des périodicités et/ou des durées variables. Elles risquent ainsi de toucher une partie ou la totalité de la communauté concernée. La communauté affectée peut mourir, ou persister mais avec une distribution (abondances relatives) de ses sous-populations modifiée. Deux paramètres permettent d'évaluer la stabilité d'une communauté microbienne après une modification de l'environnement :

- la **résistance** : l'insensibilité de la communauté à une ou plusieurs perturbations ;
- la **résilience** : le taux ou la rapidité de recouvrement de la population à son niveau initial après la survenue de la perturbation.

La **sensibilité** (inverse de la résistance) représente le degré de changements survenus au sein de la communauté suite à une ou plusieurs perturbations. La **stabilité** d'une communauté est souvent évaluée en termes de composition et de fonctions. Face à des perturbations, les réponses adaptatives d'une communauté peuvent se situer à différents niveaux. Une diversité importante (en espèces et en genres) permet une meilleure réaction. En effet, cette diversité représente une large gamme de capacités d'adaptation physiologiques et de réserves génétiques, qui peuvent converger pour permettre à la communauté de mettre en place rapidement des réponses variées (tolérance ou protection) contre des effets néfastes de perturbations chimiques (stress nutritionnels) ou physiques (chocs thermiques).

L'entrée dans un état de dormance, métaboliquement inactif, est une stratégie fréquente chez des organismes vivant dans des environnements très changeants (tubes digestifs, environnements aquatiques, sols, etc.). C'est une forme d'adaptation à long terme, qui permet d'éviter une disparition (voir Chapitre 6). L'état de dormance contribue également à la constitution d'un inoculum qui peut permettre un retour rapide à l'état initial (résilience), et le maintien de la diversité au sein de la communauté. La taille des populations, leur capacité à se déplacer (mobilité, voir Chapitre 6) ou leur dispersion contribuent à la reconstruction d'une communauté après une perturbation. En effet, la mort ou l'inactivation des occupants antérieurs libèrent de nouvelles ressources et crée des niches « vides », réoccupées aussitôt par les micro-organismes résistants (résilients) ou par de nouveaux arrivants. Un autre aspect important est le renouvellement des populations au sein d'une communauté. Ce paramètre est directement lié à la capacité de croissance et à la rapidité de retour à l'état initial des populations. Les divers réseaux et interactions (positives, neutres, négatives) existant au sein d'une communauté peuvent amplifier ou au contraire limiter les effets des perturbations, impactant la nature des réponses.

2.4 Formation de biofilms

Le biofilm est un mode de vie répandu chez les communautés microbiennes. Il consiste en un ensemble de cellules agrégées dans une **matrice extracellulaire** constituée de nombreux types de macromolécules hydrosolubles (polyosides, protéines et ADN) et insolubles (cellulose, fimbriaie, flagelles, etc.) et de plus de 97 % d'eau. Ce complexe se maintient grâce aux interactions entre ses constituants, bases de sa stabilité et de son architecture. Ils peuvent se développer **fixés** sur des **surfaces solides** abiotiques (matériaux submergés, cathéters, prothèses, éléments minéraux du sol) ou biotiques (muqueuse intestinale ou pulmonaire, vaisseaux sanguins, dents, racines de plantes terrestres, plantes aquatiques), ou se former en absence de support, et rester **mobiles** (les **flocs**), à l'interface air-liquide. Ce sont des structures **non rigides**, organisées en zones. La densité cellulaire y est très élevée (entre 10^8 et 10^{11} cellules/g de structure). Un biofilm peut contenir une seule ou plusieurs espèces, mais même un biofilm monospécifique contient une population hétérogène, car les cellules peuvent se différencier en fonction de leur position, hors ou dans le biofilm. Elles sont organisées en **microcolonies hétérogènes** et **ordonnées**, ce qui crée des pores et des canaux permettant la circulation de nutriments et de gaz. Par exemple, une structuration en fonction du gradient en O_2 verra les espèces aérobies en surface, puis, vers l'intérieur et suivant la diminution de tension en O_2 , successivement les espèces anaérobies facultatives, et les anaérobies strictes à un niveau où l' O_2 a été complètement éliminé par les autres espèces. Les nutriments disponibles sont d'origine exogène ou endogène (lyses cellulaires).

La formation d'un biofilm de surface est initiée par l'attachement de cellules colonisatrices (pionnières) à un support, abiotique ou biotique, en fonction des propriétés de celui-ci (charge électrique, hydrophobicité, présence de nutriments, etc.). Ces cellules, la plupart du temps mobiles, se différencient, lors de leur rencontre avec le support ou les unes avec les autres, en formes capables d'adhésion. Leur reproduction donne naissance à une microcolonie qui, à un certain stade, produit divers polymères contribuant à la trame du biofilm. À partir d'une certaine densité (phase de **maturation**) se forme un réseau de pores et de canaux au sein de la matrice, qui est en permanent remodelage, tant au niveau de son architecture que de l'organisation des populations. Certaines cellules, redevenues mobiles, peuvent aller coloniser de nouveaux habitats. Si la densité de la population devient critique, le biofilm peut être partiellement dégradé, facilitant la dispersion des organismes constitutifs.

Les biofilms, présents dans des écosystèmes très divers (aquatiques, végétaux ou animaux), y jouent des rôles variés. En permettant de **capturer** et de **concentrer** des nutriments, et de maintenir une forte teneur en eau grâce à l'hydrogel constituant la matrice, ils assurent des propriétés (**habitat**, **protection**, en particulier contre la **dessiccation**, et **nutriments**) essentielles pour la survie des cellules hébergées, même dans des environnements oligotrophes. Ils peuvent cependant également accumuler de grandes quantités de molécules toxiques (antibiotiques, polluants, etc.).

Un biofilm est un modèle d'adaptation intercellulaire, la forte densité cellulaire contribuant à créer de nombreux **réseaux d'interactions physiques et sociales**. Les cellules communiquent par échange de **signaux électriques** ou de **molécules signaux** (*quorum sensing*) (voir Chapitre 6). La division des tâches au sein des populations est très performante comparativement au cas des micro-organismes planctoniques. Il peut s'agir de **coopération** pour réaliser une action complexe (production ordonnée et en synergie d'enzymes extracellulaires permettant une **dégradation efficace** de substrats autrement **récalcitrants** pour des cellules planctoniques), ou au contraire de **compétition** directe (utilisation d'un nutriment) ou indirecte (production de substances anti-microbiennes). Parmi ces interactions figurent les **échanges génétiques** par transferts horizontaux (TGH ; voir Chapitre 5). Un rôle très étudié des biofilms est la capacité de leurs populations à survivre à l'exposition à des composés toxiques ou anti-microbiens (antibiotiques) (§ 4.4). Dans leur majorité, les cellules d'un biofilm sont **tolérantes** à de nombreuses molécules toxiques, par mise en place de modifications physiologiques pour survivre (croissance ralentie, dormance, sporulation, etc.) ou de **résistance** (par sélection de mutants suite à une exposition à des concentrations sublétales, ou par TGH interpopulations).

Des organismes eucaryotes (*Saccharomyces cerevisiae* ainsi que d'autres levures pathogènes, tel *Candida albicans*) peuvent aussi donner lieu à la formation de biofilms dans des conditions naturelles, ce qui revêt une certaine importance quand il s'agit d'organismes pathogènes. Formés *in vitro*, ces biofilms sont dimorphiques, avec des cellules ovoïdes en surface et des pseudohyphes en profondeur, au sein d'une matrice faite de glucides, protéines, hexosamine et acide uronique. Cette matrice confère à la levure un niveau élevé de résistance à différentes drogues antifongiques. Sur support en titane, dans des biofilms mixtes formés de deux micro-organismes présents dans la plaque dentaire, *C. albicans* et *Streptococcus gordonii*, ces derniers s'avèrent hautement résistants aux traitements antifongiques et antibactériens.

3 Comprendre la diversité microbienne

Déterminer la diversité au sein d'une communauté renseigne sur sa structure, et permet d'analyser de possibles fonctions associées aux différentes populations en tenant compte des relations entre les espèces présentes et de l'espace dans lequel elles se trouvent (*i.e.* la **biogéographie**). L'assemblage et la structure d'une communauté microbienne dépendent de plusieurs facteurs, qui peuvent se combiner : 1) la diversité des populations due à une sélection par les différentes niches ; 2) la taille de l'écosystème, qui peut conditionner l'arrivée de nouvelles espèces dans un habitat (dispersion à partir d'habitats environnants) ; 3) les changements d'abondances relatives des espèces au cours du temps (*turnover*) ; 4) la diversification (l'évolution) des populations, due à la fois à leur taille et aux différentes niches, générant ainsi de nouvelles variantes génétiques.

On peut définir une communauté par deux paramètres (voir Figure 2.3) : la richesse et la distribution de sa population. La **richesse spécifique**, **S**, correspond au nombre d'espèces différentes (taxa ou unités taxinomiques présentes au sein d'une communauté). Ce paramètre ne prend en compte ni la proportion ou la distribution des espèces, ni les populations rares (souvent largement sous-représentées), valeurs mesurées par l'**uniformité**, **E**, la **distribution relative de l'abondance** des différentes espèces. Pour deux communautés ayant le même nombre d'individus, une distribution similaire de toutes les espèces (cas rare) correspond à une valeur élevée de **E**, et inversement une distribution non uniforme (une ou quelques espèces numériquement dominantes, les autres étant rares ; cas le plus fréquent) correspond à une uniformité **E** faible. La diversité au sein d'un habitat (niveau local) doit aussi être estimée du point de vue de sa variabilité dans le temps, et pouvoir être comparée au sein de plusieurs communautés. Des approches mathématiques ont été développées en ce sens. L'**indice de Shannon**, **H'**, permet de réaliser un inventaire (richesse et diversité) des espèces présentes au sein d'un même habitat (la plus petite échelle). **H'** est généralement compris entre 1,5 et 3,5, et dépasse rarement 4, un indice **H'** élevé indiquant une forte biodiversité. L'**indice de Simpson**, **Ds**, indique la probabilité que deux individus pris au hasard dans deux habitats soient différents. Si la diversité est faible, il est probable que les deux individus appartiennent à la même espèce (**Ds** proche de 0), et inversement pour une forte diversité (**Ds** proche de 1) (voir Figure 2.3). Mesuré à un niveau plus large, faisant alors appel à la notion de dispersion des espèces, cet indice permet de comparer la diversité entre écosystèmes (indice de différenciation). Deux communautés appartenant à différents sites présentant des indices **Ds** différents seront distinctes dans leur structure (composition et abondance des espèces présentes) et auront peu d'espèces en commun.

La caractérisation des structures d'un écosystème, de son fonctionnement, des changements au cours du temps nécessite de recourir à plusieurs stratégies d'analyse[§]. L'association des approches devrait répondre à plusieurs questions :

- Quelles cellules (genres et espèces) sont présentes (taxinomie) ?
- Quelle est la taille des différentes populations ?
- Dans quels états physiologiques (métaboliquement actives, viables, dormantes, etc.) se trouvent-elles ?
- Quelles activités exercent-elles ?

Il est évidemment crucial que l'échantillonnage effectué soit parfaitement représentatif de l'écosystème. Les **approches culturelles** ne permettent d'identifier qu'une proportion de la population, passant à côté de micro-organismes viables mais non cultivables en laboratoire. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette impossibilité :

- Un micro-organisme ayant une croissance très faible ou très lente peut passer inaperçu si la majorité des espèces se développe rapidement.
- Un micro-organisme ayant des besoins nutritionnels (physiques ou chimiques) très spécifiques, non satisfaits par méconnaissance, ne pourra se développer.

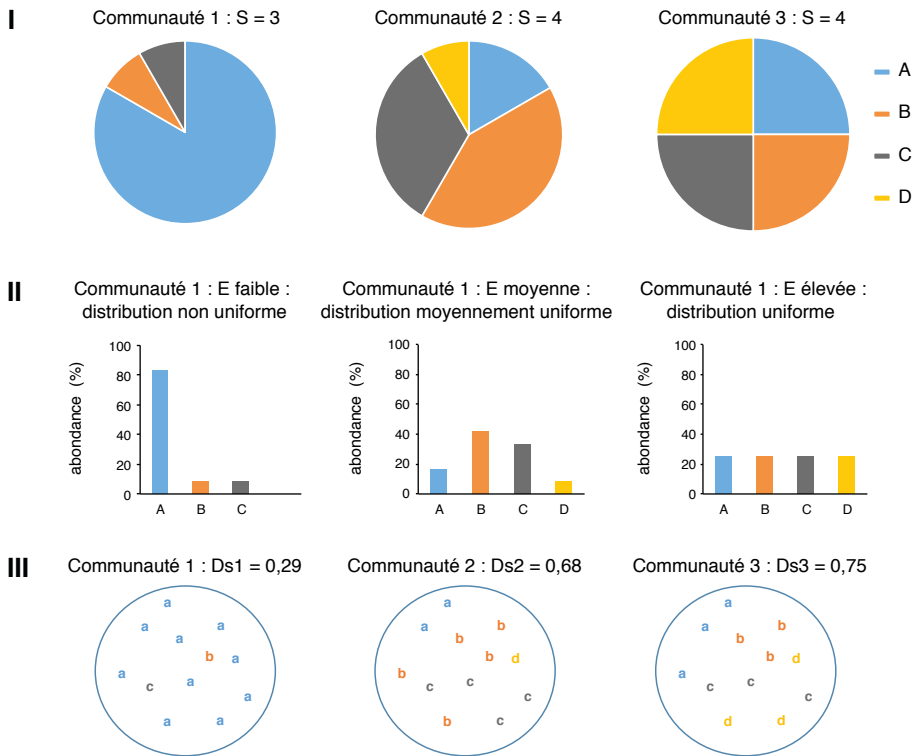


Figure 2.3 – Estimation de la diversité d'une ou plusieurs communautés microbiennes

Trois communautés contiennent chacune douze individus appartenant à quatre espèces différentes (A, B, C, D). (I) Richesse spécifique S des trois communautés ; (II) distribution de l'abondance relative E de chaque espèce ; (III) indice de diversité de Simpson Ds . Probabilité P d'appartenance à la même espèce de deux individus pris au hasard : Communauté 1 : $Ds = 0,29$, $P = 0,71$; Communauté 2 : $Ds = 0,68$, $P = 0,32$; Communauté 3 : $Ds = 0,75$, $P = 0,25$.

- La présence d'autres espèces (cas fréquent pour un échantillon issu de l'environnement) peut être défavorable en raison d'une compétition pour un nutriment ou de la production de substances inhibitrices par d'autres cellules.
- Inversement, la présence d'autres micro-organismes peut être nécessaire en raison de coopération métabolique (nutritions croisées) (§ 2.2).

Des **approches microscopiques** et de **cytométrie** peuvent pallier cet inconvénient et renseignent sur les structures des communautés. Les **analyses moléculaires**, diverses et très informatives, permettent l'identification des micro-organismes non cultivables et complètent l'analyse en abordant les modes de fonctionnement des communautés.

Malgré l'abondance des approches, la compréhension des relations entre la structure et les fonctions d'une communauté microbienne est encore modeste. L'observation de corrélations directes, comme prévisibles, ou à l'inverse d'absence apparente de lien entre les données de diversité (démontrant des potentiels) et les fonctions réellement exprimées dans l'environnement reflètent la complexité de ces systèmes et le chemin à parcourir pour les comprendre.

4

Quelques écosystèmes – Applications

4.1 Symbioses nutritionnelles dans les tubes digestifs

Au cours de l'évolution, de nombreux animaux hôtes (mammifères, insectes, etc.) ont établi dans leur tube digestif (TD) des interactions complexes avec des micro-organismes (voir Chapitre 7). Ces derniers (symbiotes) peuvent aller jusqu'à jouer le rôle d'un organe à part entière. En effet leur présence est indispensable à l'équilibre de l'hôte, et ils jouent un rôle dans sa protection vis-à-vis de pathogènes et ses réponses immunitaires. Ils participent au renouvellement des cellules épithéliales des TD en stimulant leur croissance, et sont impliqués dans les communications intra- ou interspécifiques. Un de leurs rôles majeurs est la nutrition. Ils participent à la digestion des aliments, fournissant des sources de carbone et d'énergie à l'hôte, sont capables de pallier des manques en aliments (acides aminés ou vitamines, apport d'azote par d'autres voies telle la fixation de diazote, etc.). L'hôte en retour leur offre un environnement protecteur, stable, ainsi que des nutriments. La répartition des micro-organismes dans le TD dépend des paramètres anatomiques (zone de transit, de stase alimentaire), et des conditions physico-chimiques de ses différents compartiments, modulées par les sécrétions digestives de l'hôte et les activités métaboliques des micro-organismes. Des applications biotechnologiques intéressantes mettant à contribution ces microflores peuvent être envisagées.

Les insectes sont les plus diversifiés et les plus abondants des animaux sur Terre (en termes d'espèces, d'habitats et de biomasse), un succès en partie lié aux liens étroits qu'ils développent avec les micro-organismes hébergés dans leur TD. Les termites hébergent dans leurs TD une communauté microbienne complexe parmi les plus élaborées et les plus étudiées (voir Chapitre 7), constituée de Bactéries et de protozoaires flagellés, dont la proportion varie en fonction de leurs régimes alimentaires. La digestion des parois végétales par les termites est le résultat d'une coopération entre les prétraitements mécaniques et enzymatiques par l'insecte et l'action des micro-organismes.

Les mammifères herbivores (dont les ruminants) ont également développé une relation avec des micro-organismes installés dans leur TD, ce qui leur permet d'utiliser au mieux les végétaux, qui constituent la majeure partie de leur alimentation. Cette relation

est dite symbiotique obligatoire (au sens restrictif d'une relation à effet positif). Le TD des ruminants comprend un estomac ou caillette (équivalent à l'estomac des autres mammifères), précédé de trois compartiments, le rumen ou panse, le plus volumineux, le réseau et le feuillet. Ces pré-estomacs, en particulier le rumen, hébergent la majorité de la microflore et sont responsables d'au moins 90 % de la capacité de fermentation du TD. L'hôte régurgite plusieurs fois les végétaux absorbés, afin de les broyer en particules fines et de tamponner leur pH par salivation. Cette rumination, qui peut durer jusqu'à huit heures par jour, facilite l'attaque enzymatique ultérieure par les micro-organismes. La digestion microbienne des végétaux est réalisée en plusieurs étapes selon une chaîne nutritionnelle complexe et par une flore et une faune abondantes et diversifiées d'organismes anaérobies stricts (voir Chapitre 7). Les espèces hydrolytiques (cellulolytiques et hémicellulolytiques) fractionnent les polymères glucidiques en oligosides ou sucres simples, qui seront utilisés par des micro-organismes fermentaires, libérant des acides gras à chaîne courte (acétate, butyrate, propionate, etc.), sources de carbone et d'énergie pour l'hôte. Du H_2 et CO_2 également libérés sont utilisés par des micro-organismes hydrogénotrophes, qui produisent d'autres molécules, en particulier du méthane, érucé par l'animal (voir Figure 2.2).

L'écosystème microbien du rumen contient au moins une cinquantaine d'espèces, à une concentration de 10^{10} à 10^{11} cellules/mL de contenu ruminal. On y trouve des Bactéries hydrolytiques, fermentaires et hydrogénotrophes (acétogènes et sulfato-réductrices) variées : embranchement des *Firmicutes* à bas G+C (*Ruminococcus*, *Butyrivibrio*...), des *Bacteroidetes* (*Fibrobacter*, *Prevotella*, etc.), des *Actinobacteria*, *Proteobacteria* (*Desulfovibrio*, *Enterococcus*, etc.) et des *Spirochaetes* (*Treponema*). Les Eucaryotes du rumen sont des protozoaires ciliés (10^5 - 10^7 cellules/mL de contenu ruminal) fermentaires ou capables d'hydrolyser les parois végétales (voir Chapitre 1), dont certaines de leurs enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques auraient été reçues par TGH à partir de Bactéries cellulolytiques du rumen. Les méthodes culturales ont permis de dénombrer jusqu'à 10^5 spores/mL de champignons, les seuls anaérobies connus de ce groupe. Ce chiffre est probablement une sous-estimation, la plupart de ces champignons formant des rhizoïdes qui pénètrent dans les substrats végétaux, facilitant ainsi les digestions enzymatiques. Les principaux genres en sont *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*. Des Archées (entre 10^8 et 10^{10} cellules/mL de contenu ruminal, avec les genres *Methanobrevibacter*, *Methanosarcina*, *Methanobacter*), les derniers maillons de cette chaîne trophique, transforment en méthane le H_2 et le CO_2 libérés par les autres micro-organismes.

Ces populations sont spatialement structurées dans le rumen : les cellules adhérentes aux particules alimentaires (toutes catégories) représentent environ les trois quarts de la population microbienne totale et participent à la dégradation de quelque 65 % de la cellulose végétale en quarante-huit heures. Les micro-organismes épimuraux, adhérant à la paroi interne du rumen, sont constitués d'une flore anaérobie facultative capable d'utiliser rapidement l' O_2 et l'urée qui arrivent dans le rumen par la circulation sanguine, et d'espèces protéolytiques qui se nourrissent des cellules épithéliales desquamées de

l'hôte. Les micro-organismes planctoniques, libres dans le liquide ruminal, sont constitués de protozoaires et Bactéries.

4.2 Écosystèmes du sol – Cycles biogéochimiques

Le sol est une matrice complexe, hétérogène, constituée de matières minérales et organiques à différents stades de décomposition, d'eau, de gaz (CO_2 , N_2 , O_2) et d'êtres vivants, dont de nombreux animaux des macro- et méso-faunes (lombrics, insectes, arthropodes, etc.) et de la microfaune. C'est un des habitats les plus riches en micro-organismes, avec une concentration pouvant atteindre 10^{12} cellules/g de sol, dont la composition varie en fonction des types de sol et des conditions environnementales. On y compte 10^3 à 10^6 espèces différentes, dont jusqu'à 60 % de procaryotes (des Bactéries à Gram⁺ [*Bacilli*, *Clostridia*, *Actinobacteria*, etc.] et à Gram⁻ [*Proteobacteria*, etc.]), et jusqu'à 200 m/g de sol d'hyphes fongiques.

Cette diversité peut entraîner des redondances fonctionnelles, qu'il est souvent difficile d'attribuer de façon précise à tels groupes, lesquels agissent fréquemment de concert. Certaines fonctions très spécifiques (nitrification, dénitrification, etc.) sont réalisées par des guildes microbiennes spécialisées. D'autres, génériques (décomposition du carbone organique, etc.) sont effectuées par un grand nombre de groupes microbiens. Les activités microbiennes ne sont pas homogènes dans l'ensemble des sols, mais ont surtout lieu dans des zones riches en matières organiques. Le rôle de la faune du sol, non abordée ici, est crucial pour la fragmentation physique et la distribution de la matière organique fraîche, pour la modification des propriétés physico-chimiques du sol (aération, pH, structures), et enfin pour la régulation des niveaux de populations des micro-organismes dans les réseaux trophiques du sol.

Les micro-organismes du sol sont impliqués dans de nombreuses fonctions écosystémiques, couvrant la transformation, le recyclage et le stockage de l'essentiel des éléments chimiques indispensables à la vie, et la modification physique et la structuration du sol. La plupart des éléments nutritifs contenus dans les matières organiques du sol sont décomposés et transitent par eux avant d'être de nouveau disponibles et assimilables par les végétaux, dont ils stimulent la croissance. Ces fonctions sont indispensables au maintien d'une bonne qualité et de la stabilité des sols, et de leur capacité d'adaptation rapide face à des changements environnementaux (réchauffement climatique, séquestration du carbone, limitation des gaz à effet de serre, etc.).

Tous les éléments indispensables à la vie sont ainsi redistribués *via* des cycles, souvent interconnectés. Le **cycle du carbone**, l'élément majoritaire des molécules organiques, est associé à la formation, l'utilisation et le stockage de ces matières dans et au-dessus du sol (voir Figure 2.4). Le carbone est présent sous différentes formes, organiques (C-H-O), ou minérales, sous différents états d'oxydation (du CO_2 au méthane, CH_4), et passe d'un état à un autre sous l'action de différents organismes vivants. Le CO_2 est utilisé par les (micro-)organismes photoautotrophes, dont il constitue la source de carbone, leur source d'énergie étant la lumière (voir Chapitre 3). La matière organique

(biomasse) ainsi synthétisée constitue les formes du carbone utilisables par les autres organismes, chimiohétérotrophes. La majorité de la matière organique des écosystèmes du sol est fournie par les végétaux, bien qu'y participent des micro-organismes photoautotrophes. Apportée par la litière et les racines, elle est constituée de molécules solubles et de parois végétales, riches en polymères glucidiques (cellulose et hémicelluloses) et en polymères aromatiques (les lignines). Le sol recèle aussi de nombreux autres types de matière organique provenant de débris animaux, dont la chitine (parois des insectes, des champignons, riche en carbone et azote). Le carbone contenu dans ces matières est pour partie minéralisé en CO_2 en présence d' O_2 lors de la respiration des micro-organismes, et pour partie décomposé par des micro-organismes en molécules simples (glucides, acides aminés, etc.) utilisées par les végétaux et les micro-organismes eux-mêmes. La biomasse microbienne constitue une réserve importante, libérée lors de la mort de ces communautés. La biomasse végétale est stockée, en partie sous forme de substances humiques très stables.

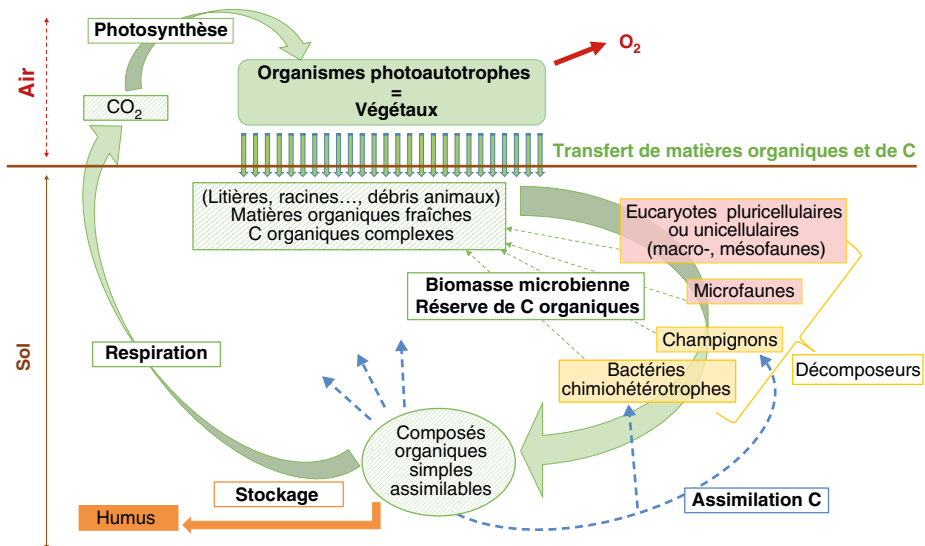


Figure 2.4 – Cycle du carbone en milieu aérobie et recyclage de la matière organique

Autre élément majeur des cellules vivantes, l'azote est impliqué dans la synthèse de la plupart des macromolécules biologiques (protéines, acides nucléiques, lipides, etc.). Il existe sous différentes formes, du gaz (N_2 , représentant les trois quarts de l'azote terrestre et 80 % de l'atmosphère), aux formes oxydée (nitrates, NO_3^-) et réduite (ammoniac, NH_3 ou ion ammonium NH_4^+ , selon les conditions). D'autres gaz non naturels comme le N_2O (gaz à effet de serre) peuvent être présents dans l'air. Le **cycle de l'azote** (voir Figure 2.5) comprend plusieurs étapes faisant intervenir de nombreuses communautés microbiennes,

lui permettant de passer par différents états d'oxydation. Le diazote est un gaz inerte que seuls quelques groupes de procaryotes sont capables d'assimiler directement.

La **fixation du N_2** est réalisée par des Bactéries fixatrices d'azote, libres ou en symbiose avec des plantes. Dans ce dernier cas, les bactéries procurent de l'azote transformé (fixé, NH_3 ou NH_4^+) aux plantes, qui en retour leur fournissent du carbone assimilable. Les matières organiques azotées accumulées dans le sol subissent plusieurs transformations, qui peuvent se faire en aérobiose ou en anaérobiose, pour aboutir à la formation d'**ammoniac (ammonification)**. Ce dernier peut être assimilé ou subir différents changements d'état d'oxydation jusqu'à la formation de nitrates. En anaérobiose, il peut être transformé directement en N_2 par la voie **Anammox** (*ANAerobic AMMonium OXidation*). Cette voie, mineure dans le sol, présente un fort intérêt en biotechnologie, en particulier pour le traitement des eaux usées (§ 4.3). La **nitrification** (en aérobiose) se fait en deux étapes. Des Bactéries nitrosantes transforment l'ammoniac en **nitrites** (NO_2^-) (étape de **nitritation**), une forme instable transformée en NO_3^- , forme facilement assimilable par les plantes et les micro-organismes dans leur ensemble (étape de **nitratation**). Les nitrates peuvent subir un processus inverse de **dénitrification** en anaérobiose, étape qui aboutit à la formation de N_2 . Une autre voie, la **réduction dissimilatrice des nitrates**, permet de minéraliser directement le NO_3^- en N_2 .

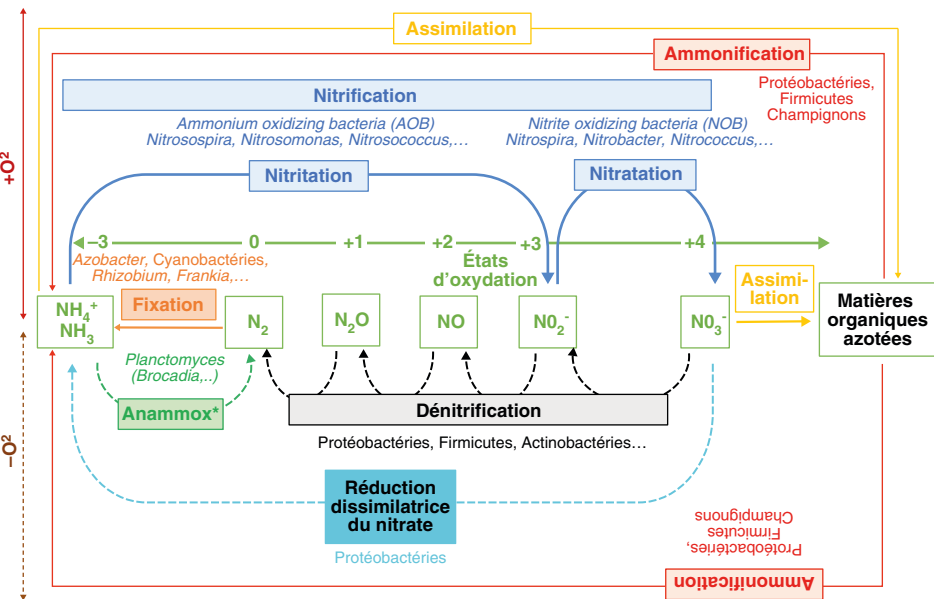


Figure 2.5 – Principales étapes du cycle de l'azote

* Le schéma du processus Anammox est simplifié ; en réalité la réaction se fait selon une voie intermédiaire produisant du NO_2^- .

La **teneur des sols en azote** est un point critique de leur équilibre écologique, une surabondance pouvant entraîner une **pollution aux nitrates**. L'azote étant en général

un nutriment limitant, sa disponibilité influence la croissance de nombreux organismes vivants, en particulier les végétaux. En agriculture, l'apport naturel biologique est remplacé par des apports externes (engrais azotés tels nitrate ou sulfate d'ammonium, urée, etc.). La conséquence est une augmentation de la qualité des litières tombant au sol, le carbone et l'azote n'étant alors plus limitants, effet qui devrait favoriser la croissance des micro-organismes. De nombreuses études montrent cependant qu'à long terme l'utilisation d'engrais chimiques azotés a des effets négatifs sur les communautés microbiennes du sol, et ce selon plusieurs mécanismes. Une diminution du pH, qui peut entraîner une lixiviation d'autres ions, résulte en une diminution de leur teneur (magnésium, calcium) dans le sol. La disponibilité en carbone peut aussi être impactée si l'azote en excès se fixe dans des polymères glucidiques formant des complexes réfractaires à la décomposition. Une diminution de la biomasse microbienne totale, impactant plus fortement certains groupes, peut atteindre jusqu'à 15 %, entraînant une limitation du renouvellement et de la quantité de carbone disponible.

Ainsi, les champignons mycorhiziens impliqués dans une symbiose avec des plantes n'étant plus indispensables pour le captage des nutriments, les plantes leur fournissent moins de carbone, ce qui en retour impacte négativement leur physiologie et leur population. On peut de même observer une diminution de l'abondance d'Actinobactéries ou de Bactéries à Gram⁻, et une augmentation de populations de Bactéries à Gram⁺. Des modifications de groupes fonctionnels peuvent être observées, telle une augmentation de populations de *Nitrospira* chez des Bactéries nitrifiantes. Les excès de nitrates fournis en agriculture intensive peuvent être lessivés et entraînés dans les eaux souterraines, pour se retrouver dans de nombreux écosystèmes aquatiques terrestres, où ils sont responsables de dysfonctionnements (eutrophisation, croissance anormale d'algues dans certaines régions).

4.3 Communautés microbiennes et dépollution

Les polluants chimiques et biologiques présentent un fort risque de perturbation du bon fonctionnement des environnements naturels et de la santé des organismes qui s'y trouvent, humains comme autres espèces. De nombreux écosystèmes sont impliqués dans l'élimination d'un certain nombre de ces polluants.

L'assainissement des eaux usées est un exemple de procédé utilisant une communauté microbienne artificielle pour réaliser une dépollution. À l'heure où la disponibilité en eau devient un problème sociétal majeur sur la planète, l'assainissement des eaux usées et leur recirculation (c'est-à-dire leur reconditionnement et leur recyclage) sont des enjeux très importants. Les eaux usées sont constituées des eaux de pluie et de ruissellement, et des eaux issues de nombreuses activités humaines (rejets domestiques, hospitaliers, industriels et agricoles). Leur composition est donc très variable, pouvant consister en matières organiques et minérales dissoutes ou en suspension (composés pharmaceutiques, pesticides, traces métalliques), les graisses étant souvent abondantes, et en nombreux micro-organismes (procaryotes, Eucaryotes et virus). L'assainissement,

réalisé dans des stations d'épuration selon des procédés sensiblement identiques quel que soit leur emplacement, permet de rejeter les eaux assainies dans l'environnement, selon des normes bien définies (concentrations maximales autorisées en azote et phosphore de 15 mg/L et 2 mg/L, respectivement).

Un traitement physico-chimique (dégrillage/désassemblage/dégraissage) permet d'éliminer les éléments solides, la graisse et les substances en suspension. Les eaux obtenues, clarifiées, contiennent encore des matières organiques dissoutes et de fines particules en suspension. Elles subissent un deuxième traitement, constitué principalement de procédés microbiologiques. L'eau sera ensuite séparée des micro-organismes (boues) par décantation, avant son rejet dans l'environnement. Le principe du traitement biologique, très simple, consiste à utiliser des micro-organismes capables de se multiplier grâce aux différents composants dissous (principalement C, N, P), et de piéger des éléments nocifs tels des métaux lourds. Il fait intervenir de nombreux micro-organismes (naturellement présents mais surtout inoculés, par réutilisation des boues par exemple), dont 90 % sont des Bactéries (chimiohétérotrophes ou chimioautotrophes, aérobies strictes, facultatives et anaérobies). Les embranchements présents sont très variés (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroides*, etc.). Ils forment des écosystèmes complexes, qui peuvent différer suivant les eaux à traiter et les conditions environnementales, et dont le fonctionnement est encore mal connu. La composition et la structuration de la communauté déterminent l'efficacité du traitement.

Deux types de procédés biologiques sont utilisés : les micro-organismes sont soit directement en suspension dans des bassins contenant les eaux à traiter (boues dites activées car contenant des micro-organismes vivants), soit immobilisés en cultures fixes (lits bactériens, en présence de graviers, billes de pouzzolane, disques ou filtres), sur lesquelles l'eau est percolée. Les conditions (aération, etc.) sont contrôlées en fonction de l'activité microbienne souhaitée, et la durée d'incubation modulée pour permettre l'activité microbienne optimale. Les procédés de traitements par **boues activées** comprennent plusieurs étapes, effectuées dans des bassins séparés reliés les uns aux autres.

- L'élimination du carbone organique se fait dans des bassins aérés (par injection d'air ou par agitation), et implique la plupart des micro-organismes hétérotrophes présents. Les molécules simples sont métabolisées directement par les micro-organismes. Les polymères complexes peuvent être fractionnés par des enzymes extracellulaires avant d'être assimilés. La diminution de la teneur en carbone des eaux est corrélée à une multiplication microbienne, et à un dégagement de CO₂ (respiration). Les micro-organismes produits sont séparés de l'eau par décantation, formant une phase solide (boues activées).
- L'élimination des matières organiques azotées se fait suivant les étapes du cycle de l'azote, par une succession de nitrifications et dénitrifications par modification des conditions d'incubation, particulièrement de l'aération. La majorité de l'azote, sous forme d'ions ammonium, va subir une nitrification en aérobiose par des Bactéries nitrifiantes chimioautotrophes (genres *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*,

etc.) et nitratantes (*Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, etc.). Les nitrates formés sont dénitrifiés en anaérobiose par la voie de la dénitrification complétée ou non par Anammox. Dans le premier cas des micro-organismes appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Bacillus* sont impliqués. Le procédé Anammox fait intervenir des *Planctomyces* pour oxyder l'ammonium directement en N_2 . L'azote, transformé en N_2 gazeux, est rejeté dans l'environnement. Le procédé de dénitrification permet d'éliminer jusqu'à 90 % de l'azote de l'eau, et les boues formées sont enrichies en azote.

- L'élimination du phosphore, plus complexe, fait intervenir des micro-organismes aérobies (dits déphosphatants) capables de survivre en condition anaérobie, majoritairement le genre *Acinetobacter*, mais aussi *Alcaligenes*, qui accumulent le phosphore sous forme de polyphosphates intracellulaires. Les bassins de traitement étant dans un premier temps placés dans des conditions de stress (anaérobiose), des micro-organismes fermentaires vont produire des acides gras à chaînes courtes volatils, utilisables par les bactéries déphosphatantes, qui dans ces conditions vont devoir utiliser leurs réserves en phosphates, et libérer du phosphore dans le milieu. Placées ensuite en conditions aérobies, elles utilisent le carbone organique de l'eau à traiter pour croître, et en même temps ré-accumulent du phosphate de réserve. La diminution de la concentration en phosphore de l'eau est de 50 à 60 %, la quantité libérée en phase anaérobie étant inférieure à celle accumulée ensuite. Les boues actives sont donc riches en phosphore.
- À la fin de chaque traitement biologique, les boues enrichies sont séparées de l'eau par décantation, en partie réintroduites dans le système (inoculum) et en partie éliminées (déchets solides). Au cours de certains dysfonctionnements (présence de Bactéries sulfureuses filamenteuses comme *Thiotrix*, de mauvaises conditions d'aération, de polluants réfractaires toxiques, etc.), les micro-organismes ne décantent pas correctement. Les stations d'épuration risquent alors d'être des voies d'introduction de polluants dans l'environnement (§ 4.4).

4.4 Antibiotiques et résistances

La découverte des antibiotiques dans les années 1940 a été une avancée majeure en médecine, humaine et vétérinaire, pour soigner des maladies infectieuses. Ces produits agissent en bloquant, chacun spécifiquement, une étape d'un processus cellulaire vital (division, réplication, synthèse protéique, etc. ; voir Chapitres 3, 4 et 6). Ces molécules peuvent être introduites dans de nombreux environnements (eaux, sols, etc.) par des activités humaines (industrie pharmaceutique, médicaments non utilisés, eaux usées domestiques ou issues des hôpitaux). Ces produits sont aussi utilisés massivement pour prévenir des infections (en cas de risque important de propagation) et pour améliorer la croissance et les rendements d'animaux d'élevage. Selon les réglementations émises par des directives de l'OMS, et depuis 2006 de l'UE, leur utilisation comme facteurs de croissance est cependant interdite sur ce continent. Une grande partie de la quantité

d'antibiotiques qui circule dans le monde n'est en fait ni absorbée ni métabolisée. Selon leurs compositions et leurs propriétés physico-chimiques, 30 à 90 % de ces molécules ou des produits issus de leur métabolisme sont excrétés dans les urines et les fèces quelques heures après leur ingestion. Ils sont alors considérés comme des polluants émergents, dont l'élimination est un problème de santé publique.

De nombreux micro-organismes non pathogènes (*Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Vibrio*, etc.) sont naturellement peu sensibles à divers antibiotiques en raison de la faible pénétration de ces molécules dans ces cellules. L'acquisition d'une résistance à un antibiotique (ou à une famille d'antibiotiques) par une souche naturelle sensible peut se faire par plusieurs voies. Il peut s'agir de mutations spontanées (en général chromosomiques) modifiant la cible de l'antibiotique, ou augmentant les capacités d'excrétion, de modification ou de destruction de l'antibiotique, les gènes responsables de ces types de résistance étant souvent portés par des éléments génétiques mobiles (voir Chapitre 4), ce qui facilite leur dissémination entre micro-organismes. Depuis plusieurs années, de nombreux micro-organismes pathogènes sont ainsi devenus (multi)-résistants : Entérocoques résistants à la vancomycine, MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*), Entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella*) résistantes aux β -lactamines, *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella oxytoca* résistants aux sulfonamides et tétracyclines, etc. L'utilisation massive d'antibiotiques a favorisé la sélection de tels variants.

Les stations d'épuration et d'assainissement sont donc un des points à risque pour la dispersion et le maintien de ces gènes de résistance, et des bactéries résistantes elles-mêmes. Les eaux issues des systèmes d'assainissement sont encore très riches en micro-organismes (dont 0,5 % à 40 % de bactéries résistantes), qui proviennent des inoculums ayant participé aux traitements des stations ou sont en transit (Entérobactéries des tubes digestifs d'animaux à sang chaud). Ces stations constituent ainsi un incubateur favorable à des phénomènes d'adaptation pouvant entraîner une évolution et une dispersion rapides des résistances dans l'environnement (voir Figure 2.6) :

- La présence d'antibiotiques dans les effluents, même en concentrations résiduelles faibles (variant du ng/L au $\mu\text{g/L}$), mais supérieures aux teneurs naturelles de l'environnement, installe une pression de sélection de micro-organismes naturellement résistants, souvent non pathogènes, qui peuvent jouer un rôle de réservoir et transférer ces caractères à d'autres espèces (pathogènes ou non). Des technologies de séparation membranaires sont disponibles pour éliminer les antibiotiques, mais elles restent coûteuses et ne sont pas toujours appliquées.
- Dans les cas où les eaux assainies sont reversées dans des zones d'activité humaine (baignades, aquaculture), les traitements biologiques conventionnels ne sont pas suffisants et il est nécessaire d'ajouter des traitements spécifiques (filtration sur membranes, irradiation aux rayons UV) pour diminuer la charge microbienne, dont les Bactéries pathogènes. Cependant le contenu génétique (dont les gènes de résistance) des organismes tués par irradiation peut être libéré et transmis à d'autres micro-organismes.

- L'effluent après traitement d'assainissement peut être reversé dans l'environnement ou utilisé pour l'irrigation des cultures, et le solide résiduel servir à l'amendement des sols. En absence de traitements adéquats, les antibiotiques, gènes de résistance et Bactéries résistantes présents dans ces matières peuvent être à l'origine de contamination de végétaux, donc de certains aliments.

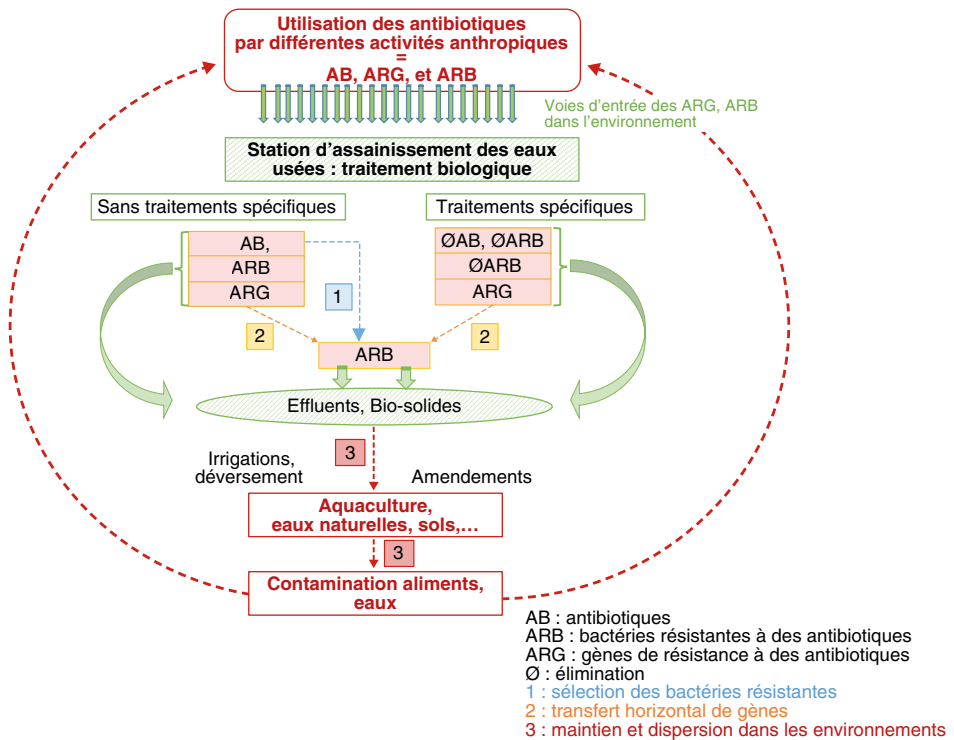


Figure 2.6 – Maintien et dispersion de gènes de résistance à des antibiotiques et de Bactéries résistantes par les systèmes d'assainissement d'eaux usées

Les points clefs du chapitre

- 1 Les micro-organismes vivent en communauté dans l'environnement et s'organisent en populations.
- 2 Les différentes populations exercent des types variés d'interactions qui régulent les communautés.
- 3 Les populations microbiennes s'organisent pour effectuer une ou des tâches complexes.
- 4 La diversité des micro-organismes est très importante, d'autant plus qu'un grand nombre d'entre eux sont incultivables.
- 5 Les conditions environnementales sont très variables et influencent les communautés.
- 6 L'environnement exerce de nombreuses pressions de sélection sur les micro-organismes, qui peuvent s'adapter et évoluer.
- 7 Les interactions entre micro-organismes et organismes « supérieurs » sont indispensables à la vie.
- 8 Les micro-organismes sont essentiels aux grands cycles biogéochimiques.
- 9 La plupart des éléments chimiques entrent dans les écosystèmes par les micro-organismes.

Entraînez-vous



- 2.1 Quels peuvent être les rôles des micro-organismes au sein d'une population ?
- 2.2 Définir la notion d'écosystème microbien.
- 2.3 Comment peuvent évoluer les conditions dans un écosystème ?
- 2.4 Quels types de relations régissent les différentes communautés microbiennes d'un écosystème ?
- 2.5 Définir les types de relations trophiques entre micro-organismes.
- 2.6 Quels types de facteurs régissent la structure d'une communauté microbienne dans un écosystème ?
- 2.7 Définir les termes symbiose, prédation, mutualisme.
- 2.8 Décrire l'importance de la diversité des micro-organismes lors de perturbations dans un environnement.
- 2.9 Définir la notion de biofilm et ses conditions d'établissement.
- 2.10 Pour quelles raisons de nombreux micro-organismes sont-ils non cultivables en laboratoire ?

Physiologie microbienne : métabolisme, croissance, division

Introduction

La croissance d'un micro-organisme est intimement associée à l'augmentation ordonnée et équilibrée de tous ses constituants, pour aboutir à la division de la cellule, donc à la reproduction de l'espèce. La grande diversité des nutriments et des sources d'énergie utilisés reflète l'extrême variété d'habitats de ces organismes, et leur réponse évolutive à cette variété. Les éléments nécessaires (molécules organiques et minérales, produits réducteurs et sources d'énergie) devant être puisés dans l'environnement, il s'ensuit une importante activité d'échanges avec le milieu extérieur.

Objectifs

Connaître les principes de la physiologie des procaryotes : les modalités d'échanges avec l'environnement ; la nature des nutriments et des sources d'énergie ; les modalités de la croissance d'une population et des facteurs pouvant l'influencer ; leur mode reproduction et variétés

Identifier les différents types trophiques

Définir la nature des transporteurs cellulaires, des phases de la croissance

Expliquer l'adaptation des procaryotes à l'environnement

Plan

- 1 Les systèmes d'échanges cellule/milieu
- 2 Métabolisme énergétique
- 3 Croissance d'une population microbienne – Le modèle *E. coli*
- 4 La reproduction, ou division, ou cytokinèse

1 Les systèmes d'échanges cellule/milieu

Le métabolisme est l'ensemble des processus responsables de la dégradation (catabolisme) et de la synthèse (anabolisme) des molécules biologiques, tous processus assurés par des réactions enzymatiques. Les voies de synthèse sont analogues chez les

micro-organismes et le reste du monde vivant. Dans les milieux naturels, les concentrations des petites molécules substrats sont en général tellement faibles que leur utilisation nécessite de les concentrer. Tout un arsenal de transporteurs à haute affinité pour chacune de ces molécules a été mis en évidence, initialement chez les « bactéries modèles » (*Escherichia coli* et autres), puis de façon ubiquiste. Cependant, certains substrats macromoléculaires abondants, telles la cellulose ou la lignine, insolubles et intransportables à travers les membranes cellulaires, doivent être préalablement dégradés en sous-produits solubles, transportables et assimilables (voir Chapitre 2). D'où le besoin d'excréter les enzymes responsables de ces processus. Ainsi *Bacillus subtilis*, une Bactérie du sol qui trouve dans ce milieu des produits de décomposition partielle de matériaux organiques (polysaccharides, polypeptides, peptides, acides aminés), exporte environ deux cents enzymes dégradatives (protéases, peptidases, lipases, DNases, RNases). Les systèmes d'échanges des organismes avec leur milieu sont donc essentiels, et extrêmement variés.

Une cellule doit aussi excréter les déchets de son catabolisme, les toxines, les métabolites secondaires (antibiotiques), ou les produits destinés à être injectés dans d'autres cellules pour les pathogènes. Des systèmes de transport membranaires sont impliqués dans cette importante activité.

1.1 Les familles de transporteurs

Il existe quatre types de transport. Le transport par diffusion facilitée *via* des canaux fonctionne dans le sens du gradient de concentration, alors que les trois autres peuvent réaliser un transport contre ce gradient, ce qui nécessite un apport d'énergie (voir Figure 3.1).

- **Le transport facilité** utilise des canaux transmembranaires, tels que les porines des Bactéries à Gram⁻, pour véhiculer des petites molécules hydrophiles, dans les deux sens (entrée et sortie). On trouve ce type de protéines chez les procaryotes, mais aussi dans les mitochondries et les chloroplastes.
- **Le transport actif secondaire** peut se faire selon trois modes : uniport (transport simple d'une molécule), symport (transport simultané d'une molécule et d'un cation), et antiport (échange entre une molécule expulsée de la cellule et un ion ou une autre molécule incorporée). Sont concernés de nombreux composés tels monosaccharides, oligosaccharides, acides aminés, vitamines, cations organiques ou inorganiques. Ce type de transport existe dans l'ensemble du monde vivant.
- **Le transport actif primaire**, qui utilise ordinairement l'ATP comme source d'énergie, est effectué par différents complexes moléculaires tels les ATPases et les transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*). Ces systèmes, présents dans l'ensemble du monde vivant, réalisent l'import et l'export de tous types de composés. Les transporteurs ABC sont composés de deux partenaires : un récepteur, protéine à affinité spécifique pour un substrat donné, et le transporteur lui-même.

- **Le transport PEP-dépendant, ou PTS** (*Phosphoenolpyruvate phosphoTransferase System*), est spécialisé dans le transport de nombreux sucres conjointement à leur phosphorylation. Le PEP sert de donneur primaire du groupement phosphate et de source d'énergie. La synthèse de tous ces transporteurs est généralement induite par les sucres qu'ils transportent (voir Chapitre 6). Hormis un système PTS de transport du fructose chez un certain nombre d'Haloarchées, ces systèmes sont présents uniquement chez les Bactéries, didermes comme monodermes (*E. coli* en possède vingt et un).

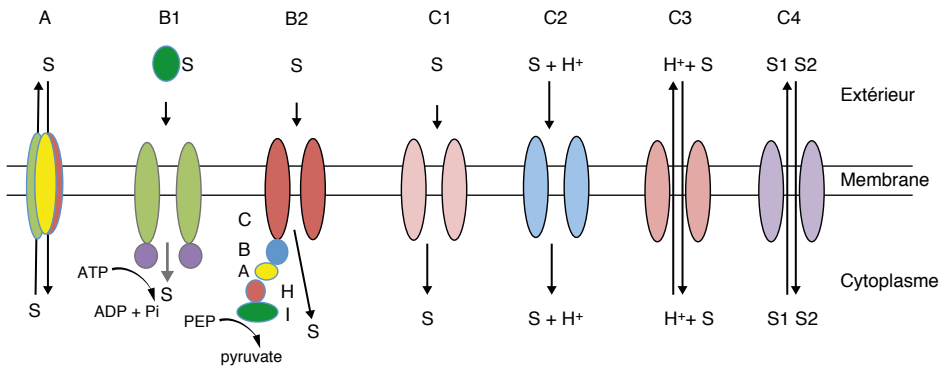


Figure 3.1 – Les principaux types de transport de petites molécules

A. Transport facilité, réversible, via un canal membranaire, sans consommation d'énergie. **B. Transport actif primaire**. **B1** : Transporteur ABC : le substrat, pris en charge par une protéine spécifique périplasmique (monodermes, ovale vert), ou liée aux lipides de la face externe de la membrane (didermes), est conduit au transporteur (une protéine transmembranaire). Ce transfert s'accompagne d'une consommation d'ATP. **B2** : Transporteur PTS (ou PEP) : le substrat (un sucre) est pris en charge par un ensemble de protéines cytoplasmiques, conjointement au phosphate du PEP, puis par une protéine transmembranaire, dont un changement de conformation permet le transport et la phosphorylation. Ces protéines sont soit communes à tous les PTS (I et H), soit spécifiques à chacun (A, B et C). **C. Transport actif secondaire**, assuré par des perméases, réalisé grâce à l'énergie créée par une différence de concentrations transmembranaire d'un ion (Na^+ , H^+ , etc.). **C1**, Uniport : la molécule traverse la membrane seule. **C2**, Symport : transport simultané du substrat et d'un cation (généralement H^+ ou Na^+). **C3**, Antiport : échange entre une molécule et un ion. **C4**, Antiport : échange entre un substrat exogène incorporé (S1) et une molécule expulsée (S2).

1.2 Les systèmes de sécrétion

Certaines protéines doivent être exportées hors du cytoplasme pour exercer leur activité, soit dans la (les) membrane(s), on parle alors de translocation, soit dans le milieu extérieur, on parle alors de sécrétion. L'export de ces protéines se réalise selon deux mécanismes :

- Le **transport SecA-dépendant** existe dans l'ensemble des procaryotes. Les protéines substrats de ce système possèdent une séquence de reconnaissance, la séquence signal, formée des quinze à trente premiers acides aminés de leur extrémité N-terminale. Après reconnaissance, la protéine est transloquée dans le périplasma, avec perte de sa séquence signal. Elle peut soit y demeurer, soit être transférée (sécrétée) à travers la membrane externe (Bactéries didermes), ou la paroi (Bactéries monodermes). Ce système permet la sécrétion d'enzymes dégradatives (protéases, cellulases, lipases), mais aussi de toxines (telle celle de *Vibrio cholerae*).
- Le **transport SecA-indépendant** est réalisé par des transporteurs ABC. Il ne met pas en jeu de séquence signal.

2 Métabolisme énergétique

L'anabolisme est consommateur d'énergie. Celle-ci est puisée dans l'environnement, en particulier grâce à la dégradation de molécules, organiques ou non, par des réactions de catabolisme. Chez les procaryotes, la grande diversité des habitats entraîne une non moins grande diversité non seulement des sources de carbone, mais aussi des sources d'énergie et des composés réducteurs. En outre, la variabilité potentielle de ces milieux peut entraîner une variabilité qualitative et quantitative des ressources, ce qui exige une adaptabilité des micro-organismes pour utiliser au mieux ces ressources (voir Chapitre 2). À titre d'exemple, *E. coli* est capable d'utiliser comme sources de carbone et d'énergie des sucres, des acides aminés ou des acides organiques tel l'acide succinique, et *Pseudomonas aeruginosa*, un pathogène opportuniste de l'Homme, une exceptionnelle variété de molécules carbonées allant des sucres aux carbures aromatiques. De même, *E. coli* peut se trouver dans des milieux dépourvus d'oxygène tels que l'intestin, son habitat usuel, ou au contraire en milieu oxygéné. Ces conditions changeantes ont pour corollaire une grande flexibilité métabolique, grâce à de nombreuses voies alternatives, dont l'expression ne s'observe, dans la grande majorité des cas, qu'en présence du ou des substrats concernés. Cette adaptabilité métabolique, ou régulation, existe chez la grande majorité des procaryotes (voir Chapitre 6).

Les **sources de carbone** sont très variées, des sucres aux acides aminés en passant par les lipides ou les bases constitutives des acides nucléiques, ainsi que les macromolécules (protéines, polymères de sucres, ADN). Les **sources d'énergie** sont la lumière dans le cas des phototrophes, et des composés chimiques réduits dans le cas des chimiotrophes. La source de **pouvoir réducteur** peut être minérale ou organique. Certaines molécules, tels le glucose et les autres sucres, cumulent ces trois fonctions. D'une façon générale, la captation d'énergie fait appel à des réactions d'oxydo-réduction (voir Figure 3.2).

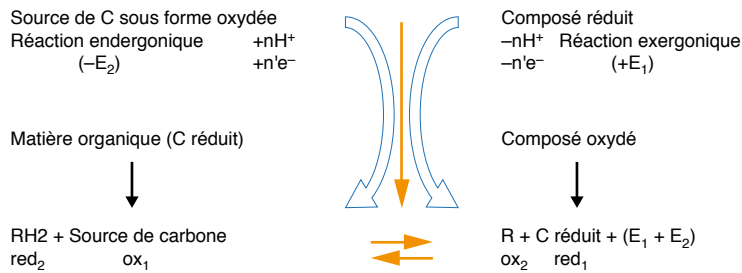


Figure 3.2 – Les réactions d’oxydo-réduction

E : potentiel redox ; nH^+ : nombre de protons mis en jeu ; $n'e^-$: nombre d’électrons mis en jeu ; RH : composé réduit.

Les organismes procaryotes, Archées comme Bactéries, caractérisés d’après la nature de leur source énergétique, se répartissent en types trophiques (voir Tableau 3.1). Dans tous les cas, l’énergie acquise résulte formellement de réactions d’oxydo-réduction. Selon le type trophique et l’organisme, l’utilisation de la source de carbone peut emprunter différentes voies biosynthétiques : cycle de Krebs utilisé par les organismes hétérotrophes, cycle de Calvin pour la fixation du CO_2 (procaryotes et Eucaryotes photosynthétiques), cycle de Krebs inversé (certaines Bactéries et Archées), voie réductrice de l’acétyl-CoA (Archées méthanogènes).

Tableau 3.1 Relation entre systèmes énergétiques et types trophiques

Types énergétiques	Chimio-organotrophie		Chimio-lithotrophie	Phototrophie
Source d’énergie	Composé organique		Composé minéral	Lumière
Donneur d’électrons	Organique (ex. glucose)		Minéral	Organique ou minéral
Voie énergétique	Fermentation généralement anaérobie	Respiration aérobie ou non		Photosynthèse
Types trophiques	Hétérotrophe	Autotrophe	Méthylotrophe	Mixotrophe
Source de carbone	Organique, au moins en C ₂	CO ₂ principalement	en C1, ≠ CO ₂	Toutes

Seules sont indiquées ici les sources de carbone. Les voies biosynthétiques des métabolites sont quasi-universelles (voir Traités de Biochimie).

Toutes les transformations des diverses sources de nutriments, carbonés comme énergétiques, sont indispensables pour maintenir la stabilité et le renouvellement des milieux naturels. De nombreux autres éléments (P, S, Fe, etc.) sont aussi concernés. Ces processus sont fortement interconnectés, aboutissant à ce qu'on décrit comme des cycles biogéochimiques (voir Chapitre 2). Chaque cycle comprend l'ensemble du devenir (transport, transformations, utilisateurs, etc.) d'un élément ou d'un composé chimique dans la biosphère, et implique la participation de nombreuses espèces, tant procaryotes qu'eucaryotes, dont des micro-organismes, variés et nombreux.

2.1 La chimio-organotrophie

La **chimio-organotrophie** représente plusieurs associations de voies énergétiques et trophiques. Les voies aérobies ont un rendement énergétique plus élevé que les voies fermentaires. En conditions anaérobies, les macromolécules peuvent être dégradées selon différentes voies, avec formation de pyruvate, substrat des fermentations. La dégradation ultérieure du pyruvate se fait par le biais de la respiration, aérobie ou non. Les trois voies dégradatives du glucose conduisent à la production de dérivés carbonés en C3 exploitables par les processus fermentaires (voir Tableau 3.2).

La voie de la glycolyse peut fonctionner en sens contraire, avec consommation d'énergie, dans le cas de la gluconéogenèse, réaction observée également chez les Eucaryotes. Le NADH comme le NADPH générés doivent être réoxydés pour pouvoir participer à de nouvelles réactions d'oxydation. Ces réoxydations se font soit par réduction du pyruvate en donnant du lactate, soit par décarboxylation du pyruvate puis réduction, donnant de l'acétaldéhyde puis de l'éthanol. Il existe nombre d'autres voies fermentaires, générant une variété d'autres produits. Ces voies sont sources de métabolites intermédiaires essentiels pour certaines biosynthèses. Le NADPH (voie Entner-Doudoroff) est impliqué dans la biosynthèse du glutathion et des acides gras. La voie des pentoses phosphates génère du ribose-5P, précurseur de la biosynthèse des acides nucléiques, du ribulose-5P, intermédiaire du cycle de Calvin, et de l'érythrose-4P, précurseur de la synthèse des acides aromatiques. En aérobiose, le pyruvate est substrat du cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs), avec l'oxygène comme accepteur final d'électrons. En son absence, les accepteurs terminaux peuvent être très variés : Fe^{3+} , Mn^{4+} , Cr^{6+} , U^{6+} , As^{5+} , fumarate, NO_3^- , NO_2^- . Cette grande variété rend compte de la non moins grande variété des habitats anoxiques que peuvent coloniser les organismes procaryotes et certains protistes.

Tableau 3.2 Les voies dégradatives du glucose des procaryotes

Voie	Réactions
Glycolyse (Embden-Meyerhof)	$\text{Glucose} + 2 \text{ ADP} + \text{P}_i \rightarrow 2 \text{ ATP} + 2 \text{ NADH} + 2 \text{ pyruvate}$
Pentoses Phosphates	$3 \text{ glucose-6P} + 6 \text{ NADP}^+ + 3 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{ fructose-6P} \rightarrow 3 \text{ P-glyceraldéhyde} + 3 \text{ CO}_2 + 6 \text{ NADPH}$
Entner-Doudoroff	$\text{glucose} \rightarrow 2 \text{ pyruvate} + 1 \text{ ATP} + 1 \text{ NADH} + 1 \text{ NADPH}$

2.2 La chimio-lithotrophie

Dans la **chimio-lithotrophie**, l'énergie provient de l'oxydation de composés minéraux tels que H_2 , sulfites, H_2S , S ou $S_2O_3^{2-}$. Le système générateur d'énergie est membranaire, par création d'un gradient de protons permettant la synthèse d'ATP et de NAD(P)H. L'accepteur final d'électrons est ordinairement l'oxygène, parfois le nitrate. Il s'agit généralement d'organismes autotrophes réduisant le CO_2 par l'intermédiaire du cycle de Calvin. Le rendement énergétique de ces réactions est très faible ; il nécessite donc une forte consommation de produits réducteurs, ce qui peut avoir un impact important dans les écosystèmes naturels.

2.3 La phototrophie

La **phototrophie** concerne les organismes autotrophes, qui utilisent la lumière comme source d'énergie et le CO_2 atmosphérique comme source de carbone *via* le cycle de Calvin. La source de H^+ et d'électrons est un composé minéral. Les Bactéries photosynthétiques vertes possèdent un photosystème proche du photosystème I des embryophytes ; leur photosynthèse s'effectue sans production d' O_2 , avec synthèse de NADPH, capable de réduire le CO_2 . La source de H^+ et d'électrons est soit H_2S , soit H_2 . Les Bactéries photosynthétiques pourpres pratiquent aussi une photosynthèse anoxygénique, avec production de NADH. Les Cyanobactéries possèdent deux photosystèmes, PSI et PSII, analogues à ceux des Bactéries photosynthétiques vertes et pourpres, respectivement. Ces deux systèmes fonctionnent en cascade, formant une chaîne de transfert dont l'eau est le donneur d'électrons. C'est l'ancêtre des systèmes des Eucaryotes photosynthétiques. L'ensemble de la chaîne est localisé dans des membranes internes, les thylakoïdes. Le bilan du fonctionnement de la chaîne est la production d'oxygène moléculaire, la synthèse d'ATP et la réduction du NADP. Les récepteurs de la lumière sont des bactériochlorophylles chez les Bactéries photosynthétiques, et chez les Cyanobactéries de la chlorophylle semblable à celle des plantes, assortie d'autres pigments permettant l'utilisation d'un large spectre lumineux. Les Archées halophiles possèdent un pigment membranaire, la bactériorhodopsine, une pompe à protons leur permettant de générer un potentiel membranaire assurant la synthèse d'ATP.

3

Croissance d'une population microbienne – Le modèle *E. coli*

Les analyses métagénomiques disponibles ont révélé une extraordinaire diversité du monde procaryote, dont seule une faible proportion (environ 0,1 à 5 %) est actuellement identifiée, et cultivable en laboratoire (voir Chapitre 1). Les raisons pour lesquelles un organisme n'est pas cultivable peuvent être multiples (voir Chapitre 2). Par exemple,

la Bactérie *Tropherima wipplei* a longtemps été cultivable uniquement en présence de fibroblastes, ce qui avait suggéré qu'il s'agissait d'un parasite intracellulaire. En fait, le séquençage de son génome a mis en évidence son incapacité de synthétiser certains métabolites, dont l'ajout a permis sa culture en milieu défini exempt de fibroblastes. Il est probable que le séquençage de génomes d'autres organismes résoudra un certain nombre de situations similaires. Tant que ces organismes ne sont pas cultivables, il faut recourir pour leur étude à d'autres stratégies d'analyse, telles celles fournies par les méta-analyses.

Malgré les conditions « artificielles » de sa réalisation (les effets de variations de facteurs de croissance ne peuvent être analysés qu'individuellement et non dans leur ensemble, comme c'est le cas dans les conditions naturelles), l'étude de la croissance d'un micro-organisme, c'est-à-dire de l'augmentation de la population microbienne au cours du temps dans des conditions données, se révèle un outil simple et riche en enseignements. Cette stratégie est restée un instrument indispensable et central dans toute étude (de base ou appliquée) de physiologie, de génétique ou de biochimie du monde microbien, en particulier des procaryotes. Le travail pionnier de J. Monod (1942) sur l'espèce modèle *E. coli*, fondé sur une observation précise des modifications du profil de croissance en réponse à des changements nutritionnels contrôlés, a depuis été élargi à de nombreux micro-organismes. L'étude méticuleuse menée par J. Monod a initié le développement de nos connaissances actuelles sur la régulation de l'expression génique. Elle a révélé l'extrême capacité de réactivité que cette régulation permet en vue de l'adaptation à ces changements, avec toute la cohorte des équilibres qualitatifs et quantitatifs des paramètres macromoléculaires (voir Chapitre 6). Chez les organismes pluricellulaires la régulation, ou maintien de l'équilibre du milieu intérieur (les liquides organiques circulant où baignent les tissus), est explicitée par la notion d'homéostasie. Telle quelle, cette notion ne s'applique pas aux organismes unicellulaires, chez lesquels on y a substitué la notion de régulation de leur milieu intracellulaire en réponse aux conditions, et aux variations, du milieu dans lequel ces organismes vivent. Certaines de ces conditions peuvent être « extrêmes » et sont alors définies comme des états de stress (oxydatif, osmotique, etc.) si elles sont temporaires, ou de vie en conditions extrêmes si elles sont permanentes (voir Chapitre 2).

Trois impératifs sont nécessaires à l'étude contrôlée de la croissance d'un micro-organisme : il faut disposer d'une culture pure de la souche à étudier, de milieux de culture appropriés, et d'une méthode de dénombrement des cellules (ou de leur masse biologique, ou de tout paramètre équivalent) au cours des observations[§]. Au cours de l'étude d'une « courbe de croissance » typique, telle qu'observée dans ces conditions, il est possible de suivre les effets de la composition du milieu nutritif, ou de paramètres physiques (pH, température ou autres) ou génétiques, sur la dynamique de croissance. La nature chimique du milieu et ses variations imposent des adaptations physiologiques, et éventuellement morphologiques, importantes.

3.1 La croissance, reflet de l'état physiologique

Suivre la croissance d'un micro-organisme – ici *E. coli* – en laboratoire consiste classiquement à suivre, par l'une des méthodes disponibles, l'évolution au cours du temps de la population dans les conditions choisies. Dans le cas présent, nous supposons que la croissance a été suivie par numération sur milieu nutritif solidifié (gélosé)[§]. Cette croissance (variation du nombre de cellules) sera représentée graphiquement en fonction du temps, ce qui peut se faire soit à l'aide de coordonnées linéaires, soit par des coordonnées semi-logarithmiques. Cette seconde représentation est habituellement préférée car l'analyse de la courbe est ainsi beaucoup plus aisée. Elle permet de distinguer facilement les différentes phases (voir Figure 3.3).

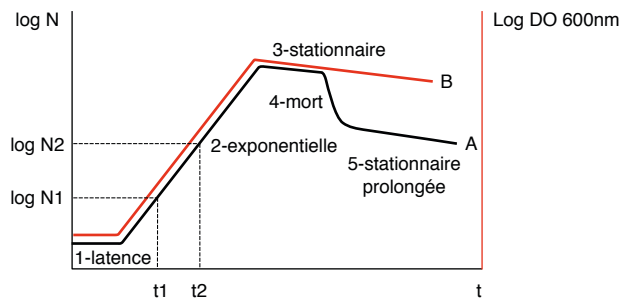


Figure 3.3 – Courbe de croissance de la Bactérie *Escherichia coli* en laboratoire

Évolution au cours du temps de la concentration de cellules viables (A) et de la turbidité (B). $\log N$, logarithme de la concentration de cellules viables ; $\log DO_{600\text{ nm}}$, logarithme de la masse bactérienne ; t , temps d'incubation ; T , temps de génération en phase exponentielle.

Mesure du temps de génération T en phase exponentielle : (1) $N = N_0 e^{\ln 2 \cdot t/T} = N_0 10^{\log 2 \cdot t/T}$; (2) $\log N_1 = \log N_0 + \log 2 \cdot t_1/T$; (3) $\log N_2 = \log N_0 + \log 2 \cdot t_2/T$; (4) $\log N_2 - \log N_1 = \log N_2/N_1 = (t_2 - t_1) \log 2 / T$; (5) $T = (t_2 - t_1) \log 2 / \log N_2/N_1$; si $N_2 = 2N_1$, $\log N_2/N_1 = \log 2$ et $T = t_2 - t_1$.

a. La phase de latence

La **phase de latence** (segment de courbe plus ou moins parallèle à l'axe des abscisses), équivalente à une **sortie de phase stationnaire**, peut correspondre formellement à la fin d'une carence alimentaire après transfert dans un milieu neuf ; elle prépare le retour de la croissance selon une chronologie précise de remise en marche de la synthèse des différentes macromolécules. D'autres facteurs, assez mal définis, peuvent influencer la durée de cette latence, telle l'élimination de produits toxiques issus de la phase stationnaire. Le pH interne évolue au cours du cycle ; chez *E. coli* se produit une acidification en milieu synthétique glucosé et une alcalinisation en milieu complexe, deux états ressentis comme des stress qu'il faut combattre en opérant un réajustement.

b. La phase exponentielle

La **phase exponentielle**, phase de croissance proprement dite, représente l'état durant lequel les cellules croissent et se divisent le plus rapidement possible, avec un rendement optimal du métabolisme. Représentée en coordonnées semi-logarithmiques, la droite correspondante a une pente caractéristique de l'espèce étudiée et des conditions (milieu, température, etc.) utilisées. La linéarité de cette portion de la courbe indique qu'au cours de cette phase l'accroissement de la population est proportionnel au temps, ce qui se traduit par la formule classique :

$$N = N_0 e^{\ln 2 \, t / T}$$

avec les définitions suivantes : N , concentration de cellules au moment t ; N_0 , concentration de cellules au temps 0, c'est-à-dire lors de l'ensemencement ; T , temps nécessaire au doublement de la population, appelé communément **temps de génération**. Celui-ci varie selon les conditions de croissance imposées. Mais pour chaque espèce ce paramètre, pour des conditions définies, est remarquablement constant et reproductible. Pour une souche d'*E. coli* cultivée à 37 °C, il varie de vingt minutes (en milieu complexe^s) à près de deux heures (en milieu synthétique avec du succinate pour seule source de carbone), en passant par quarante à cinquante minutes dans le même milieu synthétique additionné de glucose au lieu de succinate. La croissance peut également être estimée par le **taux de croissance**, μ , qui est le nombre de générations accomplies par unité de temps (ici, l'heure).

Pour une grande partie des études de physiologie, la phase exponentielle, remarquablement reproductible et fiable, a été et demeure la phase de référence. C'est lors de cette phase que la population cellulaire est la plus homogène, l'ensemble des cellules étant en division active, réparties uniformément de celles venant de se diviser à celles proches de la division. Lors de cette phase, les différents composants macromoléculaires sont eux-mêmes en phase exponentielle de synthèse avec le même rythme de production. Toutefois, comparées aux conditions de vie des micro-organismes dans leurs milieux naturels, celles générant une phase exponentielle sont assez artificielles. La nécessité d'effectuer des analyses reproductibles impose la mise en jeu d'une seule espèce (pour éliminer toute compétition avec d'autres espèces présentes dans un habitat naturel), et de conditions stables. En outre, l'alimentation fournie est ordinairement pléthorique, contrairement à beaucoup de conditions naturelles. Ainsi, le temps de génération d'*E. coli* est estimé de dix à vingt heures dans l'un de ses habitats naturels, le côlon.

c. La phase stationnaire

La **phase stationnaire** correspond à une quantité constante de cellules viables. Elle est le résultat de plusieurs facteurs pas toujours bien définis : épuisement d'un ou plusieurs éléments du milieu, accumulation de produits toxiques, etc. C'est un état dynamique, durant lequel des cellules meurent et d'autres croissent, partiellement aux dépens des produits issus de la lyse des cellules mortes. Les cellules sont notablement plus petites

qu'en phase exponentielle. La majorité de la population ne présente qu'un nucléoïde par cellule, fortement condensé, et ayant dans la plupart des cas achevé sa réplication. Chez *E. coli* et d'autres espèces, il a été montré que la phase stationnaire préside à la mise en place d'un programme de gestion de la carence nutritionnelle, grâce à un régulateur transcriptionnel, RpoS (voir Chapitre 6) qui contrôle, directement ou non, l'expression de 10 % du génome. Le rôle déterminant de RpoS est clairement démontré chez des mutants dépourvus de cette protéine : leur entrée en phase stationnaire se traduit par une mort massive et rapide. La concentration en sources de carbone d'un milieu naturel tel que l'océan, environ 10^4 fois plus faible qu'en laboratoire, implique que les cellules sont plus ou moins constamment en phase stationnaire (voir Chapitre 2).

d. La phase de mortalité

La phase de mortalité chez *E. coli* dure de trois à sept jours, avec une létalité pouvant atteindre 90 % de la population, qui ne s'accompagne pas de la lyse des cellules non viables. Cette phase correspond soit à une létalité aléatoire, comme l'est la décroissance de la radioactivité d'un radioélément, soit à une mort programmée, comme lors de processus de différenciation. Certaines Bactéries à Gram⁺, telles que *Myxococcus xanthus* ou *B. subtilis* (non pathogène), *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* (pathogènes), ou de rares espèces à Gram⁻, possèdent une aptitude à sporuler (voir Chapitre 6).

e. La phase stationnaire prolongée

La phase stationnaire prolongée correspond à une décroissance beaucoup plus lente de la population viable. Elle peut durer plusieurs mois, voire des années, ce qui met en évidence la remarquable robustesse de cet organisme. Comme la phase stationnaire, cette phase correspond à une gestion programmée avec mise en place de nouveaux facteurs permettant la survie d'une partie de la population. Ainsi chez *E. coli* il existe encore des cellules en division active après dix jours de phase stationnaire, révélant la persistance d'une activité métabolique.

3.2 Effets des facteurs externes

Tous les facteurs, tant **physiques** (température, pH) que **chimiques** (tension en oxygène, salinité, etc.) ou **biochimiques** (nature du milieu de culture, nature et concentrations des substrats énergétiques) agissant sur les réactions biochimiques, affectent de façon spécifique le taux de croissance. Le cas des **nutriments** est très particulier. Chez *E. coli*, les cellules tolèrent de fortes variations en aminoacides ou en glucides sans effet apparent. Ce phénomène est lié au fait qu'elles concentrent les nutriments à l'intérieur de la cellule, jusqu'à cent fois par rapport au milieu extérieur. Les effets des variations ne deviennent visibles que lorsque les réserves internes s'épuisent.

Afin de mettre en évidence les capacités adaptatives des cellules en réponse aux variations des conditions de croissance, O. Maaløe (1960) a déterminé les concentrations de différentes macromolécules de cellules de *Salmonella enterica* (espèce proche d'*E. coli*)

dans plusieurs situations nutritives : stables (phase exponentielle), et appauvrissement (*shift down*) ou enrichissement (*shift up*) du milieu, ces deux situations étant formellement analogues à l'arrivée en phase stationnaire et au redémarrage après transfert en milieu frais, respectivement. Les variations des vitesses de croissance sont déterminées par la valeur du taux de croissance, μ . Lors de la croissance exponentielle, dite équilibrée, les concentrations des différentes macromolécules sont strictement régulées et restent dans un rapport constant caractéristique du taux de croissance. En revanche ces concentrations évoluent lors de changements du taux de croissance. La quantité d'ADN en équivalent génome augmente légèrement avec le taux de croissance, et celle des ribosomes suit plus ou moins la valeur du taux de croissance. Les concentrations en ARNt et en protéines rapportées à la quantité d'ADN restent relativement constantes. L'observation majeure issue de ces expériences concerne la relation entre synthèse d'ADN et division. De manière prévisible, un *shift up* conduit à une augmentation du taux de synthèse d'ADN et un *shift down* à sa diminution. Dans les deux cas on observe une modification corrélative, mais décalée, de la division (§ 4.1).

4 La reproduction, ou division, ou cytokinèse

Par observation en microscopie d'un échantillon d'une suspension de bactéries *E. coli*, il est possible de suivre particulièrement le devenir d'une cellule. Celle-ci, en forme de bâtonnet, va à un certain moment se diviser transversalement pour former deux petites cellules, de tailles identiques, avec disparition de la cellule mère. L'utilisation d'une vidéo-caméra permet de poursuivre l'observation. Chacune des deux cellules sœurs néoformées augmente en dimensions (surtout en longueur), puis, lorsque sa taille a environ doublé, se scinde en deux à son tour. Ce cycle continue tant que les nutriments sont disponibles. Ce processus aux apparences simples recouvre en fait des mécanismes fort complexes, assurant la croissance ordonnée de tous les constituants cellulaires. Pour la majorité des procaryotes, la division est binaire (d'une cellule mère naissent deux cellules filles), symétrique ou non, mais d'autres schémas peuvent être observés.

La **division binaire symétrique** (§ 4.1) est une modalité commune à de nombreux procaryotes, Bactéries (à Gram⁻ et à Gram⁺) et Archées (Euryarchées), ainsi qu'aux chloroplastes et mitochondries des Eucaryotes. La **division binaire asymétrique** (§ 4.2) concerne certaines Bactéries en bâtonnets (*B. subtilis*) durant la sporulation (voir Chapitre 6), ou des Bactéries dimorphes (*Caulobacter crescentus*). La **division multiple** (§ 4.3), rencontrée chez de nombreux procaryotes, correspond à des mécanismes très différents d'une espèce à l'autre. En dernier ressort, et quels que soient les modes de division, la multiplication est liée à deux cycles finement coordonnés, la division proprement dite de la cellule (ou **cytokinèse**), précédée de la **réplication** de son génome. Ces deux fonctions exigent l'assemblage et le fonctionnement des deux grandes usines macromoléculaires : l'appareil de cytokinèse, le **divisome**, et la machinerie de réplication de l'ADN, le **réplisome** (voir Chapitre 4).

Les complexes moléculaires impliqués présentent de nombreuses similitudes chez la majorité des organismes étudiés, avec cependant quelques exceptions notoires et étonnantes.

4.1 Division binaire symétrique : *Escherichia coli*

Comment croît une cellule enveloppée dans son exosquelette (voir Figure 3.4) ? Le système de division binaire symétrique le mieux connu est celui d'*E. coli*. L'élasticité des filaments de PG, qui permet seulement de petites variations en longueur du saccule (voir Chapitre 1), est insuffisante pour supporter un doublement de taille de la cellule, qui doit donc continuellement remodeler la structure de sa paroi. Cela est réalisé en allongeant les chaînes de PG par intercalation d'un précurseur, l'UDP-Mur-NAc-pentapetide, synthétisé dans le cytoplasme puis transféré dans l'espace périplasmique. Cette insertion fait intervenir la protéine du cytosquelette MreB, impliquée dans la morphologie cellulaire (voir Chapitre 1), et présente sur une centaine de sites distribués sur toute la surface interne de la membrane plasmique. Seuls les deux hémisphères polaires en sont dépourvus et gardent leurs dimensions. Un complexe

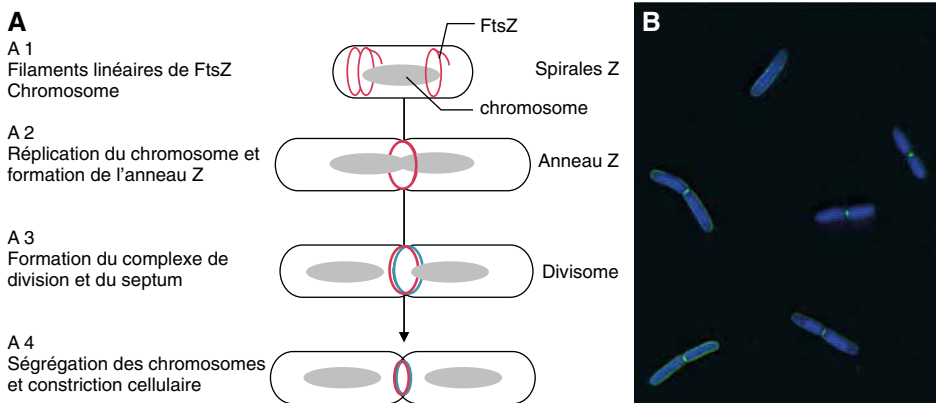


Figure 3.4 – Division binaire symétrique

A. Schéma d'une division binaire symétrique. **A1** : Début de cycle ; la cellule possède une copie du chromosome ; les unités de FtsZ sont organisées en proto-filaments sur la surface interne de la membrane cytoplasmique. **A2** : Au terme de l'allongement de la cellule et de la réplication du chromosome les polymères de FtsZ forment l'anneau Z au niveau du futur site de division, à équidistance entre les deux pôles. **A3** : Autour de l'anneau Z s'assemble une série de protéines de division ; la synthèse du peptidoglycane est réorientée en direction médiane de la cellule pour former le septum. **A4** : La constriction de l'anneau Z et la scission séparent deux cellules filles, chacune héritant une copie du chromosome. **B. Image en microscopie à fluorescence de la formation du divisome chez *E. coli*.** La sonde fluorescente (ou fluorochrome) marque une protéine de division, permettant de suivre la formation du divisome, dans la zone médiane de la cellule (futur septum).

multiprotéique, l'élongasome, est responsable de la croissance de la cellule (synthèse de la muréine, recyclage des matériaux du PG). Il est constitué de vingt-cinq enzymes distribuées entre cytoplasme, membrane interne et espace périplasmique. L'autre complexe, le divisome, assure la formation du septum (ou anneau Z) séparant les futures cellules sœurs.

Le divisome (appelé aussi septosome ou anneau septal) est une structure transitoire, responsable de la division proprement dite. Il est constitué d'un assemblage macromoléculaire d'une douzaine de types de protéines appartenant à différentes familles du cytosquelette, telle FtsZ (une protéine de la famille des tubulines) (voir Chapitre 1), et de la membrane interne. Les quantités de chaque type de protéines diffèrent (dizaines, centaines ou milliers de copies), mais leurs concentrations relatives sont finement régulées. Chaque type de protéine est assemblé au complexe selon une hiérarchie temporelle et topologique bien précise, et est impliqué dans une fonction spécifique : synthèse du PG septal à équidistance entre les deux pôles cellulaires, biogenèse des nouveaux pôles hémisphériques des deux cellules sœurs, ségrégation correcte des deux copies du génome entre les deux cellules sœurs, et cytokinèse.

a. L'assemblage

On distingue trois étapes d'assemblage. La première est la formation et la mise en place de l'**anneau Z**, un polymère constitué d'unités de la protéine FtsZ, dont les monomères sont dispersés dans le cytoplasme. Elle est initiée à un moment précis du cycle, sur la surface interne de la membrane cytoplasmique, au niveau du site où se produira la division. La polymérisation se développe bi-directionnellement, jusqu'à former un anneau contractile, fixé sur tout le périmètre interne de la membrane plasmique. Cet anneau constitue l'échafaudage pour le recrutement et l'assemblage des autres protéines du divisome. Il est d'autre part supposé être le moteur nécessaire à la « constriction » nécessaire pour invaginer la membrane externe le long du plan de division, ce qui, après des hydrolyses spécifiques, aboutira à la séparation des cellules sœurs. À cette phase participent des protéines membranaires d'ancrage et un certain nombre d'autres protéines qui renforcent la stabilisation de l'anneau Z. La deuxième étape, la consolidation de l'anneau Z, commence normalement (selon un mécanisme inconnu) après un délai de durée égale à un tiers du cycle cellulaire. La troisième étape, elle aussi séquentielle, commence avec la synthèse du peptidoglycane septal et des membranes. La structure tridimensionnelle du divisome est inconnue. Celui-ci se désagrège au terme de chaque cycle de division.

La chronologie et la localisation de l'assemblage du divisome sont précisément définies. Arrivée aux derniers stades de la division, la cellule mère possède deux copies de son génome (deux nucléoïdes), qui auront été préalablement séparées. Potentiellement le septum pourrait se former au niveau de l'espace central disponible entre les deux nucléoïdes, ou à l'une ou l'autre des extrémités de la cellule mère, dans la région comprise entre chaque pôle et chacun des nucléoïdes. La division en deux cellules sœurs de tailles identiques implique l'existence d'un mécanisme qui reconnaît pour base d'assemblage

du septum un site localisé à équidistance des deux pôles ; les déviations de tailles observées n'excèdent pas plus de 2 %. L'importance de ce processus est attestée par l'existence de mutants qui ont perdu cette capacité de reconnaissance, et forment des cellules sœurs non identiques, en raison de la localisation du septum à proximité d'un pôle. La réduction de taille de l'une des cellules sœurs peut aller jusqu'à l'impossibilité de contenir un nucléoïde. Ces structures, dites mini-cellules (*minicells*), sont évidemment létales.

b. Reconnaissance du site de septation

Comment la cellule reconnaît-elle le site de septation ? Chez les espèces de forme sphérique (coques) la division se produit selon un plan équatorial ; la détermination de l'emplacement de ce plan est inconnue. Chez les Bactéries en forme de bâtonnets (*E. coli* et *B. subtilis*) le site de division est défini grâce à deux systèmes de contrôle négatif dont l'action combinée oriente la localisation du site de division. **Le système Min**, constitué de trois protéines, en agissant sur les pôles de la cellule, empêche la septation à ce niveau. La liaison de MinD à un ATP et à un pôle de la membrane interne inhibe la formation d'un anneau Z à ces emplacements. Le recrutement de MinE par ce complexe après hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie nécessaire pour stimuler le détachement du complexe MinED du pôle. MinD, libre, récidive avec une périodicité d'environ une minute, mais au pôle opposé de la cellule. MinC, un autre inhibiteur de formation de l'anneau Z, suit le déplacement de MinD, avec pour conséquence une diminution notoire de sa concentration au centre de la cellule. Statistiquement les pôles ne sont donc jamais libres pour permettre la fixation de FtsZ, et la concentration de MinC au centre de la cellule est insuffisante pour inhiber la formation de l'anneau Z à ce niveau. Le second système, appelé **occlusion du nucléoïde**, dépend d'une protéine (SlmA chez *E. coli*, Noc chez *B. subtilis*) inhibitrice de la polymérisation de FtsZ sur les zones occupées par l'ADN. L'analyse des protéines impliquées dans ce mécanisme indique qu'il a été « inventé » plusieurs fois, indépendamment, chez les procaryotes. La protéine inhibitrice se lie à des séquences spécifiques (environ cinquante copies chez *E. coli*, soixante-dix chez *B. subtilis*) de son propre chromosome, distribuées près de l'origine de répllication et absentes de la région de terminaison (voir Chapitre 4). Chez *E. coli*, au début du cycle de répllication, les origines sont localisées dans la région médiane de la cellule, où les protéines SlmA inhibent l'assemblage de FtsZ ; puis chaque ADN migre, chargé des protéines SlmA, vers un pôle, contribuant à empêcher la division à ce niveau, et libérant la région médiane.

Le génome de la cellule doit être dupliqué et chaque copie transmise de la cellule mère à chacun de ses descendants. Chez les Bactéries le cycle de division à une température donnée a une durée dépendante de la nature et de la richesse du milieu de croissance (§ 3.2). En revanche, la durée d'un cycle de répllication du génome est constante à une température donnée (quarante minutes à 37 °C pour *E. coli*), et peu influencée par la nature du milieu. Pour reproduire correctement une cellule il est donc nécessaire que ces deux fonctions, division et répllication, interdépendantes et de durées différentes, soient coordonnées. Il en résulte généralement un décalage dans le temps entre les moments d'initiation de la répllication et d'assemblage du septum. Ainsi, au démarrage

de la formation du septum, chaque cellule sœur hérite de sa mère une copie de son chromosome non seulement complétée, mais qui a déjà initié le cycle suivant de réplication. Dans cette cellule la réplication en cours sera ainsi complétée avant la mise en division, et les chromosomes seront disponibles pour la génération suivante (voir Figure 3.5).

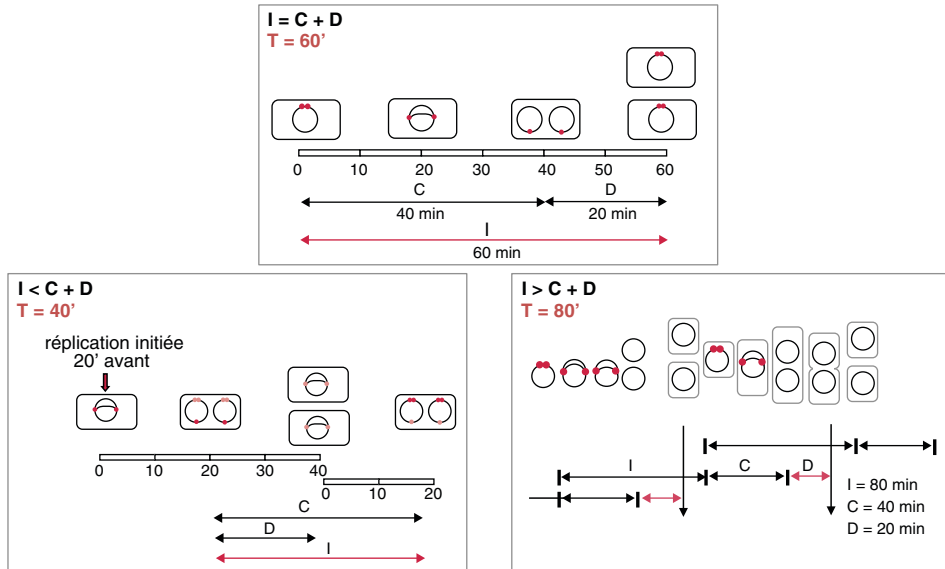


Figure 3.5 – Modèle de contrôle du cycle cellulaire de C.E. Helmstetter et S. Cooper (1968) chez *E. coli*

Introduction d'un **décalage**, D, entre **initiations de réplication**, C, et de **division**, I. L'initiation à *ori* se produit quand la cellule a atteint une masse critique, ouvrant la possibilité d'initiation d'un nouveau cycle de réplication soit avant la terminaison du cycle en cours, soit après un délai à la fin de sa terminaison. L'initiation dépend donc formellement de la durée de I. Si $I = C + D$ (cas le plus simple), les divisions se produisent avec un intervalle de temps (I, 60 min) identique à la somme du temps nécessaire pour effectuer un cycle de réplication complet (C, ici 40 min) et du temps nécessaire à la ségrégation des deux cellules filles (D, 20 min), donc la division. Au terme de la division, chaque cellule reçoit une copie complète du chromosome, et il y a un cycle de réplication par cycle de division, un rythme qui ressemble à celui des cellules eucaryotes. Quand $I < C$, une nouvelle initiation commence avant la fin du cycle de réplication en cours. Quand $I > C$, l'initiation suivante ne se produit que quand les cellules ont atteint leur maturité.

4.2 Division asymétrique et différenciation

Des conditions de stress et surtout l'appauvrissement en nutriments conduisent les cellules de *B. subtilis* à cesser leur division selon le modèle symétrique décrit ci-dessus, pour entrer dans un programme de développement qui conduit à une **division asymétrique**

et à la formation d'une **endospore**. Celle-ci est une forme de vie quiescente, particulièrement résistante à de nombreux facteurs, qui permet à la cellule de survivre jusqu'au retour de conditions favorables. Après blocage de la division symétrique, et à l'initiation de la réplication, les deux origines de réplication migrent vers les pôles opposés. Une modification de la conformation du nucléoïde aboutit à la formation d'un filament d'ADN dit axial, qui part d'un pôle et s'étend sur toute la longueur de la cellule. Un septum, subpolaire, va s'organiser à une extrémité de la cellule, accompagné par la compaction de la molécule d'ADN présente dans cette zone. Ce septum crée ainsi deux compartiments de dimensions différentes, le plus grand étant celui de la cellule mère, le plus petit se différenciant en pré-spore. Un circuit complexe de régulation coordonne le positionnement du septum à la zone subpolaire, la partition des chromosomes, et l'expression différentielle des gènes dans la cellule mère et la pré-spore (voir Chapitre 6). Celle-ci peut ensuite devenir mature (spore) et se détacher de l'autre cellule, devenue non viable.

Chez certains genres bactériens à Gram⁺ la formation de **spores** a subi une évolution qui conduit à ce que des cellules filles quiescentes (dites parfois incorrectement endospores) se forment à **l'intérieur de la cellule mère**. Citons les Bactéries du genre *Epulopiscium* (voir Chapitre 1) (voir Figure 3.6A), l'espèce *Metabacterium polyspora*, et le groupe des Bactéries dites « non cultivables ». Les *Epulopiscium* sont des symbiotes obligatoires de l'intestin de certaines espèces de poissons de la famille des Acanthurides. Leur progéniture est produite à l'intérieur d'une des extrémités de la cellule mère ; le processus de division continue jusqu'à son remplissage complet, soit entre deux et huit cellules filles selon les souches. Celles-ci sont libérées par lyse de la cellule mère. Les mécanismes moléculaires de cette reproduction sont inconnus à ce jour.

Caulobacter crescentus est une α -*Proteobacteria* aquatique caractérisée par un **dimorphisme cellulaire** très marqué des deux cellules sœurs issues de la division : une cellule nageuse (SW, *SWarmer*) incapable de division, et une cellule pédonculée (ST, *STalked*), immobile (voir Figure 3.6B). La cellule SW, qui possède un flagelle polaire à la base duquel se trouvent des pili et un appareil chimiotactique, est la forme de dispersion de l'organisme. Le pédoncule (ou prosthèque) de la cellule ST consiste en une extension pourvue à son extrémité de crampons capables de fixer la cellule sur un substrat. À sa naissance, une cellule SW voit sa réplication bloquée ; mais après une quinzaine de minutes, durant lesquelles elle continue à croître, elle perd son flagelle, ses pili et son appareil chimiotactique, et se différencie en une cellule ST. Un pédoncule est synthétisé au pôle où se trouvait auparavant le flagelle de la cellule SW, qui est alors capable de se diviser. Sa division passe par une étape prédivisionnelle (cellule PD) au cours de laquelle un appareil de chimiotaxie et un flagelle se forment au pôle opposé à celui occupé par le pédoncule, pôle qui, après la division, deviendra le pôle flagellé de la nouvelle cellule SW. La ségrégation des chromosomes, qui a lieu pendant une courte période du cycle, est suivie de la scission de la cellule, générant ainsi une descendante SW en maintenant l'autre sous forme ST, prête pour une autre division. La protéine FtsZ est sujette à une dégradation rapide, ce qui exige une nouvelle synthèse dès l'achèvement de la division, avant le cycle suivant. Cette synthèse a lieu durant la transition SW-ST. L'anneau se

forme dans la cellule ST, sans initiation préalable de la réplication, mais celle-ci est nécessaire à son insertion correcte au futur site de division, selon un mécanisme encore inconnu. Aucune protéine homologue à celles des systèmes Min n'a été identifiée. La division n'a jamais lieu dans la zone médiane, mais toujours à environ les deux tiers de la longueur à partir du pôle ST.

Chez les genres bactériens *Hyphomonas*, *Hyphomicrobium* et les *Planctomycètes* (voir Figure 3.6D), la reproduction est caractérisée par un processus de **bourgeonnement**, ou gemmation, suivant un mécanisme peu connu. La cellule, non répliquative ni reproductrice mais portant un flagelle qui assure sa nage, se **différencie** en éliminant ce flagelle et en synthétisant à sa place une prosthèque, ou pédoncule. Sous cette forme, la cellule peut alors répliquer son génome, et se divise en libérant des petites cellules filles par gemmation. Ces bourgeons deviennent des cellules nageuses.

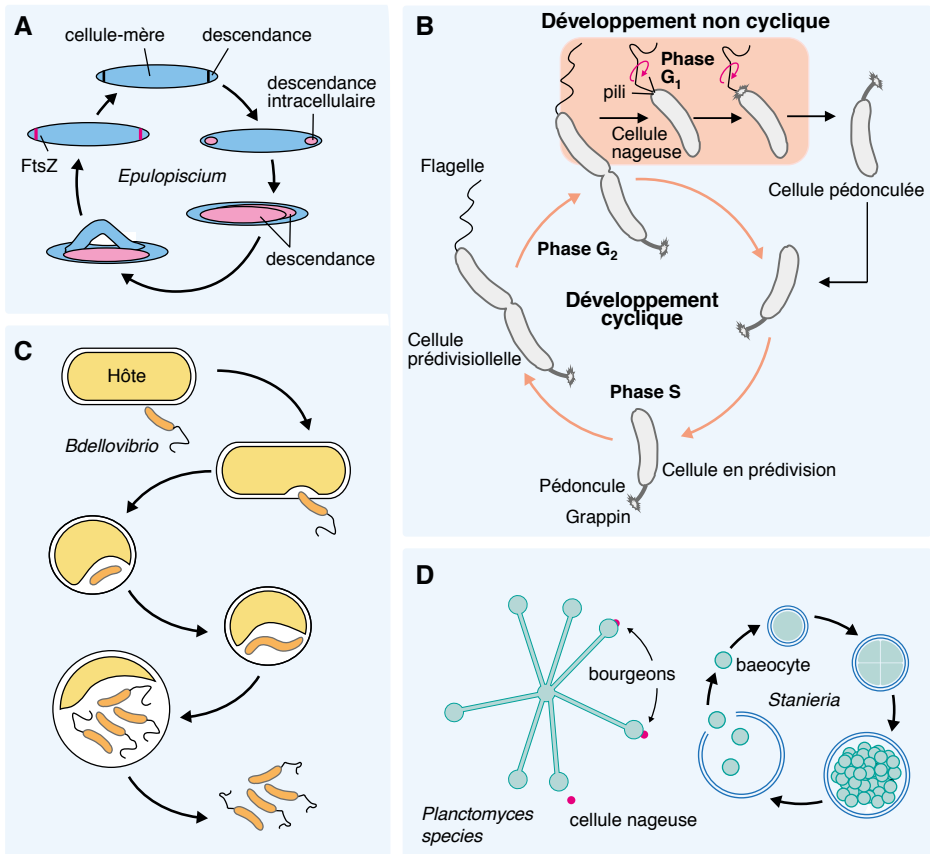


Figure 3.6 – Quelques modèles de division chez les Bactéries

A. Sporulation intracellulaire chez *Epulopiscium*. **B.** Division asymétrique chez *Caulobacter crescentus*. **C.** Division multiple : *Bdellovibrio*. **D.** Divisions par bourgeonnement chez un *Planctomyces* et chez la Cyanobactérie *Staniera*.

4.3 Division multiple

Le groupe polyphylétique *Bdellovibrio* (voir Figure 3.6C) et les organismes apparentés (dits **BALO**, *Bdellovibrio And Like Organisms*) présentent un mode de **division multiple**. Les BALO sont des Bactéries prédatrices obligatoires occupant de nombreux habitats (sol, rhizosphère, eaux douces, saumâtres et marines, eaux usées, environnements extrêmes, intestins de certains animaux), où ils jouent un rôle écologique très important. Leur cycle cellulaire dépend de la présence d'une proie (Bactéries à Gram⁻), selon deux stratégies possibles. Dans le premier cas (stratégie épibiotique) le prédateur se fixe sur la paroi de la proie, digère son contenu cellulaire et se multiplie par scission binaire, selon un mécanisme peu connu. Dans le deuxième cas (stratégie périplasmique) le prédateur, dans une phase dite d'attaque motile mais non répllicative, envahit le périplasme de la proie ; suivent une phase transitoire, puis une phase de croissance et de reproduction, durant laquelle il se reproduit sous forme de filament non segmenté contenant de multiples copies du nucléoïde. Des compartimentations, avec séparation des nucléoïdes, se produisent ensuite de façon synchrone tout le long du filament. Les différentes phases sont caractérisées par des expressions différentielles des gènes.

Les Streptomycètes, un groupe important des *Actinobacteria* (monodermes à Gram⁺) jouent un grand rôle dans la minéralisation des sols, dont ils représentent de 1 à 20 % de la microflore, en dégradant des substances réfractaires (pectine, lignine, chitine, kératine, latex, composés aromatiques), et produisent 70 à 80 % des substances bioactives naturelles employées en médecine (environ 70 % de tous les antibiotiques naturels, immunomodulateurs, molécules vaso-actives et neurologiques), en agrochimie (antifongiques, antitumorales, antivirales, insecticides, pesticides et herbicides) et en biotechnologie (protéases, lipases, cellulases, amylases, pectinases et xylanases). Le cycle des Streptomycètes, un des plus complexes chez les procaryotes, constitue un excellent modèle d'étude de développement comprenant une **phase pluricellulaire et une croissance sans division assortie d'une division multiple ultérieure**. C'est le seul organisme connu, avec l'Eucaryote *Physarium polycephalum*, chez qui la division n'est pas essentielle à la croissance de l'organisme. Sur un support solide, la germination d'une spore conduit à la formation d'un mycélium végétatif (dit primaire) constitué d'hyphes ramifiés dont certains pénètrent dans le substrat pour absorber les nutriments. Ces hyphes contiennent plusieurs copies du chromosome cloisonnées par petits groupes. Des signaux environnementaux ou une carence nutritionnelle conduisent à l'activation d'un second programme de développement avec formation d'hyphes aériens qui se propagent sur la surface du substrat et en hauteur, pendant que le mycélium primaire lyse, libérant des nutriments recyclés pour la croissance de ces hyphes. Ceux-ci peuvent contenir chacun de cinquante à cent chromosomes, non condensés. Après l'arrêt de la croissance s'initie une phase de sporulation durant laquelle un grand nombre d'anneaux Z se forment dans les hyphes, de façon synchrone, constituant des compartiments de pré-spores avec chacun un unique chromosome, condensé. Ces compartiments se transformeront en spores, individualisées mais formant une chaîne dans la structure

de l'hyphe. Une spore mûre peut éventuellement se détacher et, si les conditions sont propices, germer et se développer en un nouveau mycélium.

La machine de division se distingue de celle des Bactéries unicellulaires par quelques différences remarquables. L'activité du divisome différencie deux pôles pour FtsZ, différents pour la croissance et pour la sporulation. Le processus de division synchrone dans l'hyphe sporogène exige l'induction contrôlée de *ftsZ*. L'analyse du génome de *Streptomyces coelicolor* a révélé, outre le gène *ftsZ*, l'existence d'homologues d'une partie seulement des gènes des autres composants du divisome des Bactéries. Tous les génomes de Streptomycètes et de Mycobactéries pathogènes séquencés possèdent à la place du gène *minC* d'*E. coli*, son homologue de *B. subtilis*. Le contrôle de la division est de type positif et semblerait exiger la participation, directe ou indirecte, d'une seule protéine (SsgA). Ces données suggèrent que d'autres constituants, encore à découvrir, pourraient participer au contrôle de l'assemblage de l'anneau Z chez ces Bactéries.

4.4 Les systèmes de division des Archées

Les Archées se reproduisent, comme les Bactéries, de manière asexuée, par scission cellulaire. Les deux principaux phylums de ce domaine, les Euryarchées et les Crenarchées, se distinguent par leur machinerie de division – du type FtsZ bactérien pour le premier groupe et d'un type original qui utilise un système, Cdv, proche de celui des Eucaryotes, pour les Crenarchées. Parmi ces dernières, dans le groupe *Sulfolobus*, ce système est constitué de trois protéines, CdvA, B et C, dont les gènes forment un opéron largement conservé. La protéine CdvA, spécifique des Archées, ressemble à d'autres protéines cytosquelettiques eucaryotes distinctes de la tubuline. Les protéines CdvB et CdvC sont homologues aux protéines eucaryotes du complexe ESCRT-III (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). Chez les Eucaryotes ces protéines sont associées à la formation de vésicules endosomales, par un processus dit d'« anneaux concentriques », quelque peu analogue à la division cellulaire par bourgeonnement. Le rôle de ces protéines dans la division de *Sulfolobus* reste toutefois peu connu. Des analyses génomiques ont mis en évidence de multiples paralogues des gènes *cdvB*, dont le rôle est inconnu, chez plusieurs Crenarchées. Ceci est vrai aussi chez les Eucaryotes pour la majorité au moins des gènes de division. *Nitrosopumilus maritimus* et *Cenarchaeum symbiosium*, deux espèces de Crenarchées, possèdent les deux systèmes de division Cdv et FtsZ, sans que l'on sache si le système Cdv est impliqué dans la division ou seulement dans la formation de vésicules. Curieusement les organismes de l'ordre des Thermoprotéales (Crenarchées) ne possèdent aucun gène de division connu. En outre, leur division ne comporte aucune phase de constriction, suggérant un mécanisme de cytokinèse totalement original.

4.5 Division sans FtsZ

La protéine FtsZ est absente chez un certain nombre de Bactéries, dans le phylum des Planctomycètes, pour les formes symbiontes ou pathogènes ayant des génomes réduits

(*Carsonella ruddi*, *Chlamydia* spp., *Ureoplasma* sp.) ou chez certaines Cyanobactéries (voir Figure 3.6D). La division cellulaire de ces organismes est peu explorée en raison des difficultés expérimentales posées par leur manipulation. Par ailleurs, les études de génomique ont conduit à découvrir de nombreux paralogues de FtsZ, surtout chez les Archées (§ 4.4). Le rôle de certaines de ces protéines, qui ne semblent pas fonctionnelles, reste obscur. Ces faits suggèrent que d'autres familles de protéines ayant la même fonction que la superfamille FtsZ/tubuline pourraient être découvertes au fur et à mesure qu'augmente la disponibilité de séquences de nouveaux génomes. Enfin chez les formes L de nombreuses espèces de Bactéries, la multiplication des cellules est (ou peut devenir) indépendante de FtsZ.

Les points clefs du chapitre

- 1 Les échanges entre milieux exo- et endocellulaire, par internalisation (nutriments organiques et minéraux) et excrétion (enzymes, toxines, déchets), sont essentiels.
- 2 Les échanges de petites molécules utilisent quatre types de transporteurs, avec ou sans apport énergétique.
- 3 Les voies énergétiques incluent fermentation et respiration (aérobies ou non) et photosynthèse (oxygénique ou non).
- 4 Les sources de carbone utilisées sont en C1 (CO_2 , CH_4) (autotrophie, méthylo-trophie) ou/et C2 (ou plus) (hétérotrophie, mixotrophie).
- 5 Croissance et division dépendent des facteurs externes physiques et nutritionnels.
- 6 La croissance montre une phase exponentielle (croissance proprement dite, surtout observée en laboratoire) et des phases de latence, stationnaire, et éventuellement de mortalité, phases les plus fréquentes en milieux naturels.
- 7 La reproduction des procaryotes est asexuée. Les modes de division cellulaire sont variés : binaires (symétriques ou non), multiples, par bourgeonnement, avec différenciation.



Entraînez-vous

- 3.1 Citer les différents types de transport et leurs rôles dans la physiologie cellulaire.
- 3.2 Quels mécanismes permettent le transfert des protéines à l'extérieur de la cellule ?
- 3.3 Qu'est-ce qu'un chimio-organotrophe ? Quelle est la différence principale entre les voies aérobies et anaérobies chez ces organismes ?
- 3.4 Les Cyanobactéries comme les Bactéries photosynthétiques et certaines Archées utilisent la lumière comme source d'énergie. Quelle différence y a-t-il dans les mécanismes d'utilisation de la lumière chez ces trois types d'organismes ?
- 3.5 Quelles sont les conditions nécessaires à l'étude de la courbe de croissance d'un micro-organisme ? En quoi ces conditions sont-elles artificielles ?
- 3.6 Comment mesure-t-on le temps de génération d'un micro-organisme ?
- 3.7 Quels facteurs indiquent qu'en phase stationnaire les bactéries sont encore métaboliquement actives ?
- 3.8 Dans le processus de division, quels sont le rôle et la localisation de la protéine FtsZ ?
- 3.9 Chez *E. coli*, comme chez beaucoup de bactéries, la division est symétrique et conduit à deux cellules identiques. Dans quels cas rencontre-t-on une division asymétrique ?

Génomes : structure et réplication chez les procaryotes

Introduction

Dans tout organisme vivant, la vie est le résultat de l'exécution d'un programme génétique que les cellules héritent de leurs parents. Le génome, qui en est la structure dépositaire au sein de molécules d'ADN, est organisé principalement en chromosomes, des complexes nucléoprotéiques structurés en gènes codant pour la plupart pour des protéines, mais inclut aussi des molécules d'ADN annexes.

Objectifs

Connaître la structure physique, l'organisation génétique et la malléabilité spatio-temporelle du génome procaryote

Identifier les éléments structuraux du nucléoïde ; les séquences codantes

Définir ADN essentiel, ADN accessoire, plasmides, éléments génétiques mobiles, origine de réplication et terminaison, fourche de réplication

Expliquer les rapports entre la structure du génome et sa réplication

Plan

- 1 Le nucléoïde : structure physique et topologie
- 2 L'ADN accessoire : son rôle adaptatif
- 3 Réplication

1 Le nucléoïde : structure physique et topologie

Les chromosomes procaryotes, de Bactéries comme d'Archées, n'ont pas une morphologie bien définie, contrairement à ceux des Eucaryotes. Ils sont organisés en une structure de forme apparemment irrégulière, le nucléoïde (souvent improprement appelé chromosome), qui occupe une grande partie de la région centrale de la cellule (voir Figure 4.1). Rien n'est connu sur sa structure 3D, ni sur la position des gènes dans l'espace. Sa position dans la cellule est rigoureusement contrôlée (voir Chapitre 3). Extrait dans des conditions qui en préservent l'intégrité, il apparaît en microscopie électronique comme une structure lobée fermée sur elle-même, dont les boucles convergent vers son centre (structure dite « en rosette »).

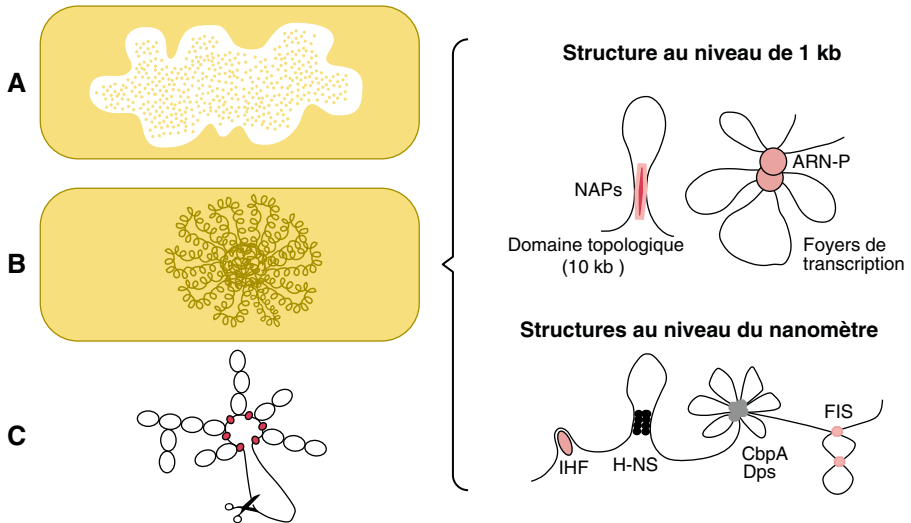


Figure 4.1 – Structure du nucléoïde

A. Structure cristalline dans la cellule. **B.** Organisation du chromosome en rosette, et différents niveaux de compaction de l'ADN dans la cellule. **C.** Schéma d'interdépendance des domaines topologiques. Une coupure au niveau d'un domaine n'affecte que celui-ci, laissant intacts les autres.

1.1 Propriétés mécaniques de l'ADN

Le double filament d'ADN est plutôt malléable. En suspension dans une solution aqueuse et non soumis à des contraintes physiques (forme dite relâchée, configuration la plus stable) ou à des interactions avec des macromolécules cytoplasmiques, il tend naturellement à se condenser sous l'effet de l'agitation thermique. Le volume que devrait occuper dans ces conditions le chromosome d'*E. coli* serait de l'ordre de $200 \mu\text{m}^3$, soit encore environ mille fois celui de la cellule, qui est d'environ $0,2 \mu\text{m}^3$. Sa longueur linéaire totale est de 1,57 mm, soit environ mille fois la longueur de la cellule. Rappelons qu'un filament bi-caténaire d'ADN forme une hélice qui s'enroule autour d'un axe longitudinal virtuel, et fait un tour complet sur elle-même tous les 3,4 nm, soit toutes les 10,5 pb (le pas de l'hélice). Pour une molécule d'ADN circulaire non contrainte le nombre de tours (nombre d'enlacements) est fixe et défini par sa longueur.

Dans une cellule l'ADN est soumis à des contraintes topologiques qui entraînent un surenroulement (superhélicité) et des repliements (plectonèmes). Selon le sens de rotation, cela peut introduire des super-tours positifs ou négatifs (le nombre d'enlacements augmente ou diminue), mais dans les deux cas cela induit un vrillage de la molécule, donc une compaction. Dans la cellule l'ADN est généralement présent sous forme de superhélice négative. La formation des surenroulements nécessite un apport d'énergie,

puisque la molécule passe d'un état sans tension à un état sous tension. Les changements d'états topologiques sont assurés par des ADN topoisomérases, présentes chez tous les organismes. Les procaryotes en possèdent quatre classes principales : la gyrase introduit un surenroulement négatif favorisant l'ouverture de la double hélice ; la topoisomérase I relâche l'ADN ; la topoisomérase IV participe à la résolution des intermédiaires de la réplication et de la recombinaison (voir Chapitre 5), et la gyrase inverse introduit un surenroulement positif. Ces enzymes effectuent une coupure simple brin (classe I) ou double brin (classe II) de la molécule d'ADN préalable au changement d'enroulement, qu'elles ressoudent ensuite. Une cassure simple brin dans une petite molécule d'ADN circulaire surenroulée (un plasmide par exemple) suffit pour lui faire retrouver son état relâché. Pour relâcher un chromosome bactérien, cependant, il faudrait appliquer plusieurs centaines de coupures (environ quatre cents pour celui d'*E. coli*), réparties sur l'ensemble de la molécule, en raison d'une organisation en domaines (voir Figure 4.2) (§ 1.2) ; une coupure dans un domaine est sans effet sur les domaines adjacents.

Les capacités de changement d'états topologiques confèrent à la molécule d'ADN d'importantes propriétés. Lors de leur formulation du modèle de la double hélice (1953), J. Watson et F. Crick ont souligné les implications de l'entrelacement des deux brins de l'ADN. Ainsi, une séparation localisée des deux filaments génère une perturbation locale du pas de l'hélice, avec en avant de ce site des surenroulements positifs qui doivent être compensés par des surenroulements négatifs en arrière. De telles modifications structurales locales sont produites régulièrement à tout site de la molécule d'ADN lors des processus de réplication, transcription, recombinaison, ou réparation. Elles doivent être prises en charge pour assurer la progression correcte de la machinerie en cours de fonctionnement.

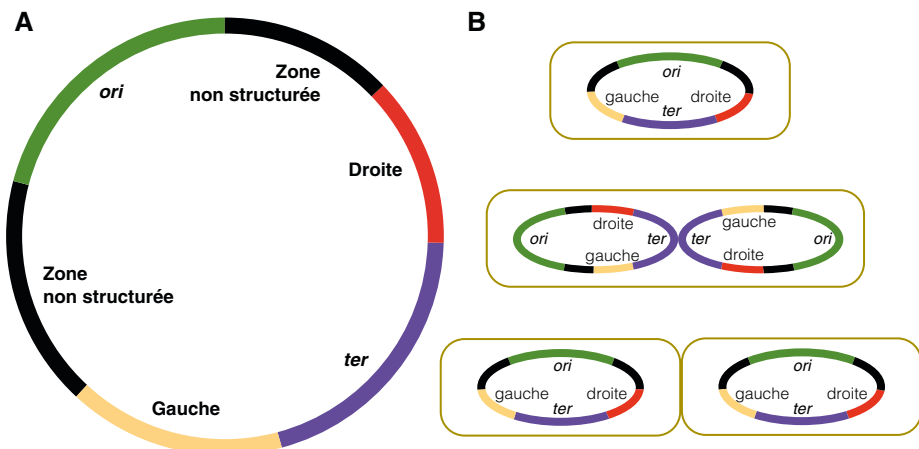


Figure 4.2 – Les macro-domaines topologiques du chromosome d'*E. coli*

A. Organisation sur le chromosome. **B.** Réorganisations cellulaires au cours du processus de division.

1.2 Structure et malléabilité spatio-temporelle du chromosome

L'organisation linéaire des gènes sur nombre de chromosomes procaryotes, dérivée de données historiquement génétiques puis issues de la génomique, est bien connue. Le chromosome est organisé de façon hiérarchisée en domaines topologiques de dimensions très différentes. Chez *E. coli*, un niveau de base comprend des domaines de l'ordre de 10 à 100 kb (un gène comprend environ mille bases), eux-mêmes organisés dans une structure supérieure en deux macrodomaines d'environ 1 Mb chacun, l'un comprenant l'origine (*ori*) et l'autre, à son opposé, la région de terminaison (*ter*) de la réplication (§ 3). Ces domaines, organisés grâce à la présence de protéines qui en assurent l'échafaudage, sont structuralement et fonctionnellement indépendants (§ 1.3). Les macrodomaines sont disposés de façon précise par rapport à certaines coordonnées liées à la dynamique de vie de la cellule. Chez *E. coli* tout de suite après la division le nucléoïde est localisé dans la région centrale de la cellule (voir Chapitre 3), les séquences *ori* et *ter* orientées en superposition l'une de l'autre dans la région médiane. Cette disposition change au cours du cycle jusqu'à placer l'origine de réplication vers un des pôles, tandis que la région *ter* conserve sa position dans la zone médiane. Une disposition ordonnée du nucléoïde a aussi été décrite chez deux autres Bactéries, *Bacillus subtilis* et *Caulobacter crescentus*. Un certain nombre d'expériences confirment que la disposition des domaines (donc des gènes qu'ils portent) par rapport aux coordonnées cellulaires est dynamique, par exemple pour répondre à des besoins d'accessibilité pour d'autres enzymes (ARN polymérases).

1.3 Les protéines SMC et NAP, des « architectes »

Les acteurs de l'organisation du nucléoïde sont deux classes de protéines. Les **protéines SMC** (*Structural Maintenance of the Chromosome*) permettent à la molécule d'ADN de conserver sa superhélicité négative et son organisation en domaines topologiques, tout en maintenant une certaine flexibilité. Elles interviennent aussi dans la ségrégation des chromosomes au moment de la division et dans la réparation des dommages de l'ADN. Ce sont des protéines ubiquitaires ; les Eucaryotes en ont de nombreux types tandis que celles des procaryotes, en nombre plus limité, ressortissent à deux familles : la plus fréquente chez les Bactéries montre un haut niveau d'homologie avec les condensines d'Archées et d'Eucaryotes, la seconde est constituée du **complexe MukBEF** présent chez des Enterobactéries et de nombreux autres ordres de Bactéries. Le complexe MukBEF d'*E. coli*, le plus étudié parmi les SMC procaryotes, intervient dans la condensation de l'ADN surenroulé négativement et dans la ségrégation des chromosomes.

Dans une cellule en croissance active environ quatre cents copies du complexe assurent au nucléoïde une sorte d'échafaudage maintenant sa structure. L'ensemble des protéines SMC/MukB ont des structures leur permettant d'assumer deux configurations, dites ouverte et fermée. La configuration ouverte permet un déplacement de MukB le long de l'ADN, tandis que le changement de conformation agit directement sur

la molécule d'ADN en la pliant. L'inactivation de MukBEF par mutation se traduit par une désorganisation du chromosome, une décondensation et des coupures de l'ADN ; les cellules se divisent en formant une descendance dépourvue de nucléoïde, et leur tolérance thermique est limitée à 25 °C (l'optimum pour *E. coli* est de 35-37 °C). Les **protéines NAP** (*Nucleoid Associated Proteins*), à tort définies comme de type histones, s'associent à l'ADN pour former des courbures et des repliements de cette molécule ainsi que des pontages entre segments d'ADN éloignés. Elles jouent en outre un rôle physiologique important en intervenant sur la régulation de l'expression d'environ 5 % des gènes, dont ceux des ARNr et ARNt, et ceux intervenant dans la réponse aux stress et la pathogénicité. La concentration des différentes NAP varie suivant la phase de croissance (exponentielle/stationnaire).

1.4 Organisation des génomes

La comparaison de données fournies par la génomique montre qu'il n'existe aucune corrélation simple entre dimensions des génomes et groupe taxinomique ou complexité des organismes (des espèces proches pouvant montrer de grandes différences de taille génomique), ni entre nombre de gènes et taille des génomes ; ainsi chez *Buchnera aphidicola*, un parasite intracellulaire obligatoire des Aphides (voir Chapitre 7), et *Homo sapiens*, ces nombres sont respectivement de 583 et 21 000 gènes, contre quatre ordres de grandeur entre leurs tailles de génome. Chez les organismes unicellulaires les dimensions des génomes varient de moins de 10^5 pb (pour certains Mycoplasmes) à autour de 10^7 - 10^8 pb chez la majorité des procaryotes, et de moins de 10^7 à plus de 10^{11} pb chez les protistes. Les tailles des chromosomes des Archées, définies essentiellement à partir de données génomiques limitées à un nombre restreint d'espèces, varient entre environ 0,5 Mb pour le parasite *Nanoarchæum equitans* et 5,5 Mb chez *Methanosarcina barkeri*, avec une moyenne de l'ordre de 2 Mb. Ces gènes sont en majorité constitués de cadres de lecture ininterrompus, avec une présence peu fréquente de micro-introns chez quelques espèces. La proportion d'ADN codant semble diminuer avec la « complexité » des organismes, avec au moins 75 % (environ 90 % chez *E. coli*) chez les procaryotes, 75-50 % pour les Eucaryotes « inférieurs » (70 % chez la levure), et environ 50 % pour la plupart des plantes et animaux (mais seulement 3 % chez l'Homme). La taille des génomes des procaryotes est donc toujours réduite, et plus directement liée au nombre de gènes, avec une fraction faible et assez constante d'ADN non codant. La densité de gènes des Archées (environ 1,2 par kb, contre 0,8 pour les Bactéries) fait de ces génomes les plus compacts. Parmi les Bactéries, des génomes plus grands sont rencontrés chez les espèces au style de vie complexe et occupant des environnements à forte variabilité. À l'opposé les Bactéries à petits génomes sont symbiotes et endosymbiotes obligatoires, en particulier d'Eucaryotes, leur environnement protégé et constant ayant favorisé la perte de gènes, illustrant l'efficacité de la sélection. L'origine des grands génomes pourrait résulter de l'invasion d'ADN non fonctionnel et non d'une nécessité physiologique. Cet ADN, désigné souvent par

le terme inapproprié de « poubelle » et peu exploré, pourrait en réalité cacher, comme on commence à le soupçonner, d'importantes propriétés.

Les procaryotes sont majoritairement monochromosomiques, avec la présence très fréquente de nombreux éléments génétiques annexes. L'ADN chromosomique procaryote est généralement une molécule circulaire. De nombreuses espèces, toutefois, ont des chromosomes linéaires, ou même des deux types. La composition en bases (pourcentage de GC) varie beaucoup, allant de 17 à 75 %, de 28 à 66 % et de 35 à 50 %, respectivement, chez Bactéries, Archées et Eucaryotes. En revanche, les variations à l'intérieur d'un genre sont inférieures à 10 %. La proportion de GC, déterminée par la température de fusion de l'ADN (température à laquelle les deux brins d'une molécule se séparent), associée à d'autres paramètres, peut permettre d'identifier des séquences issues de transferts géniques horizontaux (TGH) (voir Chapitre 5). Les procaryotes sont souvent haploïdes, mais avec un nombre de copies du génome variant selon l'état physiologique. Une polyploïdie est toutefois rencontrée chez certaines espèces. La présence de quatre à cinq copies chez *Deinococcus radiodurans* expliquerait en partie l'extrême résistance aux radiations de cette Bactérie. Une autre Bactérie, *Azotobacter vinelandii*, possède normalement quatre-vingts copies, et certaines Cyanobactéries en ont aussi un nombre élevé (deux cent dix-huit copies en phase exponentielle et quarante-deux en phase stationnaire chez *Synechocystis* PCC 6803). Chez *B. aphidicola*, le nombre de copies varie selon le stade de développement de l'hôte, pour des raisons inconnues. L'Archée *Halobacterium salinarum* passe de trente copies de son chromosome en phase exponentielle à dix en phase stationnaire.

L'information génétique de la cellule peut être classée en deux programmes : l'ADN indispensable, devant assurer le fonctionnement de base et la reproduction de la cellule, est porté par les chromosomes proprement dits ; l'ADN accessoire, non nécessaire, confère des caractères qui peuvent cependant s'avérer indispensables dans certaines conditions (voir Tableau 4.1 et Figure 4.3). Cette seconde classe d'information peut résider soit dans le(s) chromosome(s), soit sur des molécules d'ADN extrachromosomiques à réplication autonome (§ 2), soit sur les deux. La distribution des gènes sur le chromosome (organisation souvent en opérons [voir Chapitre 6], répartition sur l'un ou l'autre filament de l'ADN, orientation par rapport à la progression de la réplication [§ 3], distance par rapport à l'origine de réplication) n'est pas le fruit du hasard mais le résultat d'une sélection qui a opéré à travers les effets de ces facteurs sur la physiologie des cellules. Une fraction minoritaire des gènes (dits de ménage ou *housekeeping*) code les fonctions de base de la construction et du fonctionnement de la cellule. Ils sont exprimés de façon permanente, alors que la grande majorité des autres gènes ne l'est qu'en réponse à des signaux environnementaux (voir Chapitre 6). Cette capacité de programmation permet à l'organisme d'optimiser son interaction avec son environnement et de maintenir l'homéostasie cellulaire.

Tableau 4.1 Distribution des fonctions essentielles et accessoires sur les chromosomes et plasmides chez les procaryotes

Génomes procaryotes	Fonctions essentielles (indispensables dans toutes les conditions)	Fonctions accessoires (indispensables dans certaines conditions)
Chromosome	– Métabolisme central – Synthèse des précurseurs des constituants cellulaires – Assemblage des constituants macromoléculaires – Division – Régulation de l'ensemble des fonctions cellulaires	– Métabolisme secondaire – Dégradation de composés organiques – Enzymes de modification et/ ou de protection de l'ADN – Prophages et gènes viraux – Résistance aux antibiotiques – Pathogénèse – Autres fonctions pouvant conférer des avantages adaptatifs
Plasmide(s)	– Autonomie de réplication – Contrôle du nombre de copies et de leur ségrégation	

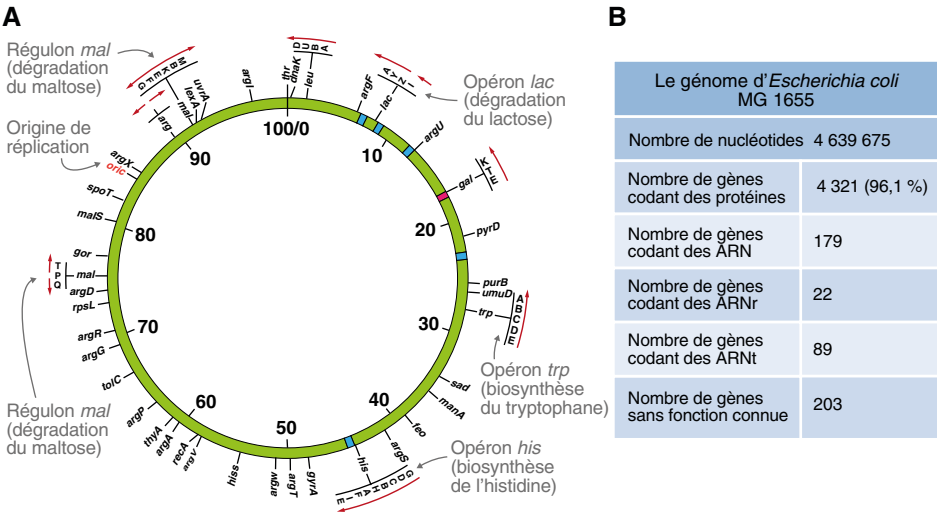


Figure 4.3 – Le chromosome d'*E. coli*.

A. Carte génétique historique. B. Nature des produits codés.

2 L'ADN accessoire : son rôle adaptatif

Jusqu'à 20 % du génome d'un procaryote peut être constitué d'ADN accessoire (ou éléments génétiques associés, EGA), dont la perte spontanée ou induite (en laboratoire) ne se traduit pas par un effet « visible ». Celui-ci peut conférer à la cellule porteuse des avantages adaptatifs pouvant aller jusqu'à assurer sa survie dans certaines conditions. Certains de ces éléments sont responsables de nombreux types de réarrangements chromosomiques, participant à la variabilité génétique des organismes concernés, et/ou encore s'auto-transfèrent par contact intercellulaire selon un mécanisme de parasexualité dit conjugatif (voir Chapitre 5). Les différentes familles d'EGA se distinguent par de nombreuses propriétés. Un aspect particulier d'une catégorie dit EGM (éléments génétiques mobiles) est cette « mobilité », qui met en jeu des mécanismes de recombinaison (dite non homologue ou site spécifique) impliquant des enzymes particulières, intégrases et excisionases, ou transposases.

2.1 Les plasmides

Ces molécules d'ADN peuvent être soit uniquement libres et à réplication autonome, soit présentes à l'état libre ou intégrées dans un chromosome (et dans ce cas répliquées passivement par le chromosome porteur), ces deux formes étant réversibles (plasmides dits intégratifs). On connaît plusieurs milliers de plasmides, dont mille sept cents sont entièrement séquencés. Ils sont présents chez tous les types de procaryotes ; une même cellule peut en porter plusieurs, appartenant à des familles différentes. Le nombre d'exemplaires (dit nombre de copies) d'un plasmide dans une cellule hôte est strictement contrôlé par chaque plasmide ; ce nombre peut aller de un à plusieurs dizaines par rapport au nombre de chromosomes, suivant les plasmides.

Le premier plasmide identifié, et le plus décrit, est le plasmide (dit aussi **épisode** ou **facteur**) **F** (pour fertilité), d'*E. coli* (voir Figure 4.4A). Il est représentatif d'une classe de plasmides complexes dont l'étude a été fondamentale en génétique, pas seulement bactérienne. L'épisode F est un double filament d'ADN circulaire de 99 kb, équivalent à environ 2 % du chromosome hôte, qui peut se maintenir soit à l'état libre dans le cytoplasme, soit intégré dans le chromosome. Le nombre de F libres par cellule est rigidement contrôlé, dans un rapport de 1:1 par rapport au nombre de copies chromosomiques. Le génome de F est organisé en différentes régions fonctionnelles : la région *oriV* contient une origine de réplication fonctionnelle quand F est libre dans le cytoplasme ; la région *tra* (environ un tiers de ce génome) code pour des protéines nécessaires au transfert de F vers une autre Bactérie, d'où la désignation de plasmide conjugatif (voir Chapitre 5) ; la région *oriT* porte une autre origine de réplication qui participe à ce transfert ; enfin une vaste région contient des gènes de fonctions peu connues, deux séquences d'insertion (IS2 et IS3) permettant l'insertion dans le chromosome, et un transposon (Tn1000) (§ 2.2).

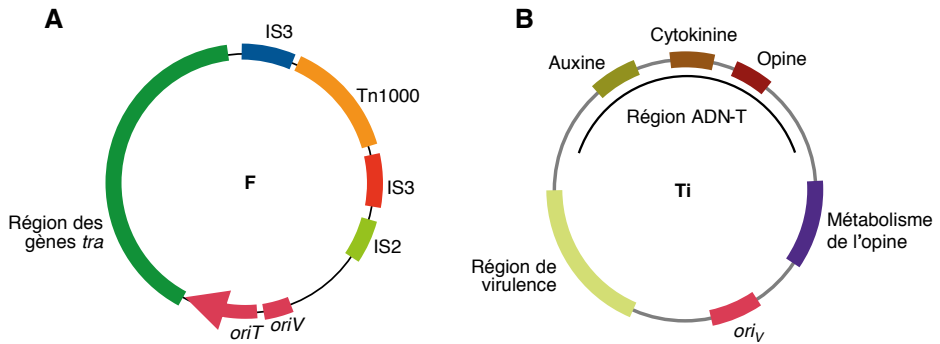


Figure 4.4 – Organisation génétique de deux plasmides

A. Le plasmide (ou facteur) F d'*E. coli*. **B.** Plasmide Ti d'*A. tumefaciens*. La région ADN-T du plasmide Ti d'*Agrobacterium* code la synthèse d'auxine et de cytokinine, protéines responsables de la prolifération et de la différenciation bactériennes chez la plante, et les enzymes de biosynthèse de composés azotés particuliers, des opines (nopaline ou octopine). Ces opines, exportées par les cellules végétales nodulées, servent de source de C, N et énergie aux bactéries. Région de virulence, gènes de fixation de la Bactérie aux cellules végétales et de transfert de l'ADN-T. Deux régions, *oriT* (non représentée) et *oriV*, interviennent dans la réplication végétative et de transfert du plasmide, respectivement.

La famille des **plasmides R**, largement répandus parmi les Bactéries, doit sa désignation au fait que ces ADN sont porteurs de gènes conférant la résistance à un ou plusieurs antibiotiques ou autres inhibiteurs. Ils ne sont généralement pas intégrés dans le chromosome, et nombre d'entre eux sont conjuguatifs. L'un d'eux, le plasmide R100, approximativement de même dimension que F, confère une résistance à cinq antibiotiques (sulfonamides, streptomycine, spectinomycine, chloramphénicol, tétracycline) et aux effets toxiques du mercure. Ces plasmides, et en particulier ceux pouvant être transférés par conjugaison, jouent un rôle important dans la diffusion de multirésistances aux antibiotiques, notamment chez les Bactéries pathogènes.

Les **plasmides de « virulence »** confèrent une capacité de pathogénicité aux hôtes porteurs (seules des Bactéries sont connues). Ils leur permettent d'échapper aux défenses de l'hôte ou de produire des toxines. Les plus étudiés sont le **plasmide conjuguatif Ti** d'*Agrobacterium tumefaciens* (voir Figure 4.4B), qui induit des tumeurs (galles) chez les Angiospermes (mais en même temps leur fournit de nouvelles sources de carbone), et les plasmides enterotoxigènes de souches d'*E. coli* responsables de pathologies intestinales graves avec perte de liquides et de sels. Les **plasmides Col** produisent des protéines (bactériocines) létales pour d'autres Bactéries. La bactériocine agit en augmentant la perméabilité de la membrane cytoplasmique, ou en dégradant le PG, l'ADN ou l'ARN. Ce sont des plasmides de petites dimensions présents dans l'hôte en grand nombre de copies. Les **plasmides métaboliques**, appelés aussi dégradatifs, confèrent la capacité de

dégrader des substances organiques très toxiques comme le toluène ou d'autres substances aromatiques, des pesticides, mais aussi des substances non toxiques (lactose).

2.2 Les éléments génétiques mobiles (EGM)

Ces éléments sont potentiellement présents dans tous les chromosomes, procaryotes ou eucaryotes, mais jamais libres dans le cytoplasme. Ils jouent un rôle fondamental dans la plasticité et l'évolution des génomes. Leur caractéristique principale est de pouvoir changer spontanément de localisation, de façon aléatoire par rapport au site et à la nature de l'ADN cible (chromosome, plasmides, virus bactériens), soit en *cis* dans un autre locus de l'ADN porteur, soit en *trans* sur un autre ADN, par un mécanisme particulier de recombinaison appelé transposition (voir Chapitre 5). Ces transpositions peuvent provoquer chez l'hôte des réarrangements génomiques ou l'induction de mutations suite à l'insertion de l'EGM dans une région codant une fonction essentielle de la cible. Les nombreuses classes connues de ces éléments chez les procaryotes peuvent être groupées en deux principales catégories, les séquences d'insertion et les transposons. Cette mise en catégories est cependant très réductrice. Plusieurs EGM appartenant à des catégories différentes pouvant coexister dans une même cellule, des interactions entre ces éléments sont possibles. Une recombinase particulière responsable de la mobilité réalise une recombinaison entre un site de l'élément et une séquence cible sur un autre ADN, provoquant la duplication de la cible sous forme d'une séquence répétée directe à chaque extrémité de l'élément mobile (voir Chapitre 5). La taille de cette duplication est variable d'un élément à l'autre, mais constante pour un élément donné. La réaction inverse, l'excision de l'élément, est réalisée sous l'action d'une excisionase.

Les **séquences d'insertion (IS)** sont des séquences longues de 770 à 2 700 pb, dont l'organisation est très uniforme (voir Figure 4.5A). Des séquences répétées inversement – palindromiques, IR, de 10 à 40 pb, positionnées à chaque extrémité – sont à leur tour flanquées, en position externe, d'une séquence directement répétée (DR), de 5 à 11 pb, générée à partir la séquence cible au cours du précédent événement de mobilité de l'IS. Comme potentiellement une séquence IS peut se fixer à n'importe quel site de sa cible, la nature de la séquence DR sera différente d'un événement de transposition au suivant. La partie codante des IS, comprise entre les deux séquences IR, ne code en général que pour les fonctions liées à leur transposition. Les IS (dont plus de 1 500 sont connues) ont été classées en vingt familles, en particulier sur la base de leur longueur et de la nature des IR. Un même chromosome peut en posséder plusieurs, appartenant ou non à diverses familles. Ainsi, des séquences de la famille IS1 sont présentes en cinq à dix copies chez différentes souches d'*E. coli* K12, et en quarante et aucune, respectivement, chez les espèces proches *Salmonella* et *Shigella*.

Les transposons (Tn), d'abord identifiés chez le maïs par B. McClintock (1950-60), ont ensuite été trouvés dans l'ensemble du monde vivant. Ce sont des séquences de type IS portant en outre des gènes codants pour des fonctions pouvant conférer des avantages adaptatifs aux cellules porteuses (résistance à un ou plusieurs antibiotiques ou aux

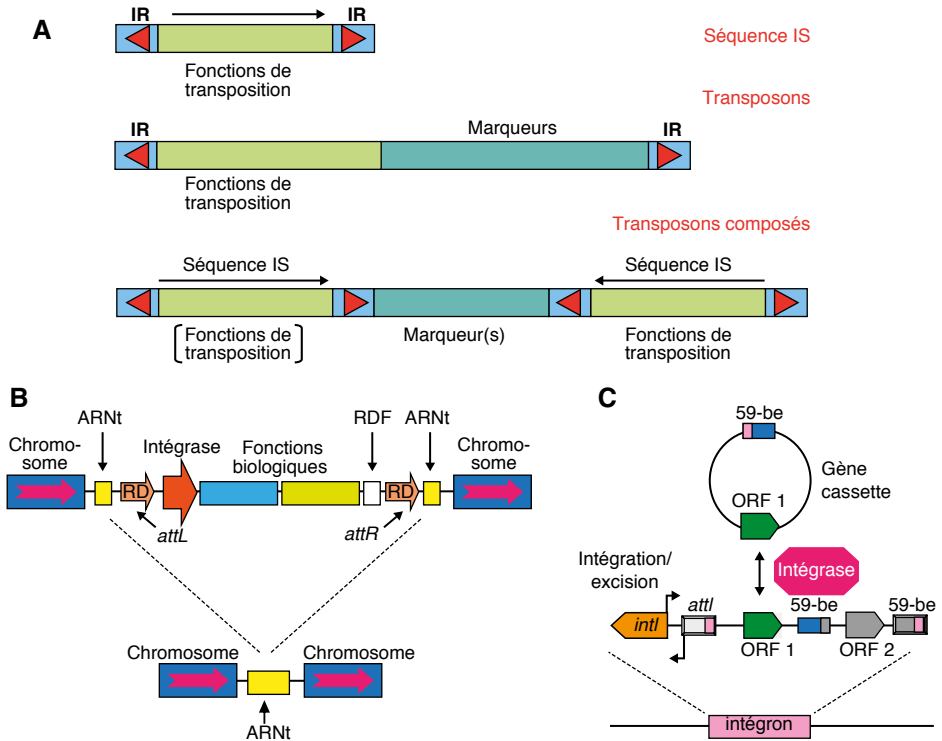


Figure 4.5 – Principaux éléments génétiques mobiles bactériens

A. Séquences IS et transposons. **B.** Structure d'un îlot génomique. **C.** Un intégron et son schéma de capture d'un gène.

effets toxiques de certains ions) (voir Figure 4.5A). Comme pour de nombreux gènes de résistance associés aux éléments mobiles, il s'agit d'une résistance par inactivation de l'antibiotique. On distingue deux classes :

- les transposons dits simples, ou non composites, ont une structure rappelant celle des IS (séquences IR flanquées de séquences DR). La région entre les deux IR contient, outre les fonctions liées à la transposition, le ou les gènes annexes. Le transposon simple Tn3, long d'environ 5 kb, est présent chez de nombreuses Bactéries à Gram⁻, dont plusieurs pathogènes ; il porte deux gènes de transposition (une transposase et une résolvase, ou régulateur de la transposition), et une β -lactamase, qui confère la résistance aux antibiotiques β -lactames ;
- les transposons composites, en général plus grands (de 5 à 20 kb), sont un assemblage de deux copies de la même IS (en orientations directes ou inversées) positionnées chacune à une extrémité de l'élément, flanquant une région interne portant le ou les gènes adaptatifs.

2.3 Autres ADN accessoires

a. Les îles génomiques (IG)

Les **îles génomiques (IG)** sont des régions continues du génome, de tailles allant de 4,5 à 60 kb (les plus courtes portent souvent le nom d'îlots génomiques), qui peuvent contenir des dizaines ou des centaines de gènes conférant à la cellule hôte de nombreux caractères adaptatifs (voir Figure 4.5B). Les IG sont acquises par un mécanisme de TGH, c'est-à-dire d'une cellule à une autre, n'appartenant pas nécessairement à la même espèce, ni même au même domaine (voir Chapitre 5). Leur distribution phylogénétique est souvent aléatoire, des IG pouvant être présentes chez certains organismes et absentes chez d'autres étroitement apparentés. La présence d'une catégorie d'IG, dite îlots de pathogénicité (PAI, *Pathogenic Islands*), chez des Bactéries par ailleurs non pathogènes de l'Homme, des animaux ou des plantes, entraîne l'acquisition de la virulence par ces Bactéries (voir Chapitre 7). D'autres îlots sont porteurs de gènes de résistance à des antibiotiques, de dégradation et/ou de capture de certains composés (îlots métaboliques). D'autres encore sont responsables de la capacité de symbiose (îlots de symbiose) de certaines Bactéries infectant des plantes. Très probablement, d'autres types sont encore à découvrir. Les IG se distinguent du génome propre de l'hôte par la présence dans leur séquence de gènes liés à leur mobilité, de répétitions directes (DR) à leurs extrémités, et d'un gène codant une intégrase, et par leur contenu en GC et leur usage de codons souvent différents de ceux de l'ADN hôte. Ces caractéristiques structurales et fonctionnelles rendent les IG assimilables à des EGM. Le mécanisme d'intégration nécessite la présence de séquences particulières sur l'ADN hôte, reconnues par leur intégrase.

b. L'hérédité infectieuse intracellulaire

L'**hérédité infectieuse intracellulaire** correspond à de l'ADN issu de virus bactériens, les bactériophages (voir Chapitre 8). Elle peut constituer chez certaines espèces la fraction prépondérante de l'ADN accessoire. Cela n'est pas surprenant si l'on considère que toute cellule peut être infectée au cours de sa vie par un ou plusieurs types de virus. Certains contractent avec leur hôte un rapport permanent par intégration de leur génome (dit alors prophage) dans celui de l'hôte (Bactéries et certaines Archées). Les prophages confèrent aux hôtes des traits phénotypiques désignés sous le terme de conversion lysogénique. La production de toxines par certains prophages est responsable de la pathogénicité de leur hôte, d'où l'intérêt médical associé à ces éléments. Citons, parmi les quinze cas connus, la toxine diphtérique codée par le phage β de *Corynebacterium diphtheriae*, agent de la diphtérie, le phage CTX Φ de *Vibrio cholerae* responsable du choléra, le phage C1 de *Clostridium botulinum* codant une neurotoxine agent du botulisme.

c. Les intégrons

Les **intégrons**, capteurs de gènes d'origine mystérieuse d'abord découverts chez *V. cholerae*, forment une classe d'éléments génétiques présents sur chromosomes, plasmides et transposons, particulièrement importante car elle est associée à la diffusion

de la résistance à des antibiotiques (voir Figure 4.5C). Il s'agit d'éléments capables de s'intégrer dans la molécule hôte, ou de se reproduire sous forme libre dans le cytoplasme. Le passage entre formes intégrée et libre (intégration/excision) résulte de l'activité d'une recombinase codée par l'intégron. Ces éléments ont la propriété de capturer des gènes dits cassettes, non réplicatifs, qui existent à l'état libre dans le cytoplasme. Au moins cent trente types de ces gènes cassettes ont été inventoriés, dont les plus fréquents fournissent une résistance à de nombreuses catégories d'antibiotiques (aminoglucosides, β -lactames, chloramphénicol, triméthoprime, phosphomycine, quinolones, érythromycine) ainsi qu'à des antiseptiques (ions ammonium quaternaires et désinfectants). Ils sont généralement dépourvus de promoteur, donc non transcrits. Leur expression est conditionnée à leur intégration, qui se fait dans un site spécifique de l'intégron (aboutissant à mettre en phase le gène cassette avec un promoteur de l'intégron). La réversibilité et/ou la répétition de ces événements a pour conséquence d'augmenter le nombre de cassettes associées à l'intégron. Chez certaines bactéries (*Vibrio*, *Treponema*, etc.), les intégrons constituent deux grandes familles, celle dite de « résistance » (RI), portant généralement moins de dix cassettes de résistance, et les « super-intégrons » qui peuvent posséder jusqu'à cent cassettes codant pour de nombreuses fonctions. Des intégrons et des gènes cassettes ont récemment été identifiés dans l'environnement (sol et sédiments marins). On pense qu'ils pourraient infecter certaines Bactéries, par un processus d'entrée directe (dit de transformation, voir Chapitre 5) dans les cellules. L'origine de ces gènes cassettes et leur maintien dans le cytoplasme bactérien sont un grand mystère, étant donné qu'ils ne peuvent ni se répliquer ni exprimer aucune fonction à l'état libre.

d. Les shufflons

Les **shufflons** constituent une classe importante d'éléments génétiques de certains protistes (*T. brucei*, la levure *Candida albicans*) et de nombreuses Bactéries, chez lesquels ils sont responsables d'un brassage génétique programmé. Chez ces dernières ils sont présents sur le chromosome ou sur le génome de certains bactériophages. Ces éléments portent un ou des gènes dont l'expression (ou la non-expression) dépend du sens d'insertion de l'élément sur l'ADN hôte. Le shufflon code pour la recombinase qui catalyse de façon spécifique cette inversion au site d'intégration. Ce processus est responsable des variations des antigènes impliqués dans la virulence chez de nombreuses Bactéries pathogènes, telles *Campylobacter jejuni*, *Citrobacter freundii* ou *Streptococcus pneumoniae*. En modifiant la nature des fimbria ou des pili chez *Neisseria meningitidis*, ils interviennent dans l'interaction avec la cellule hôte, et ainsi dans sa pathogénicité.

3 Réplication

La réplication est le processus cellulaire de synthèse d'un acide nucléique à fonction génomique grâce auquel un brin est complété, pour former une copie dite complémentaire (réplication semi-conservative). Dans le cas d'une molécule bicaténaire, les deux molécules

néoformées auront chacune un filament parental, ayant servi de modèle, et un filament néo-synthétisé. Une synthèse d'ADN utilisant plus ou moins les mêmes enzymes intervient aussi dans d'autres activités telles la réparation et la recombinaison (voir Chapitre 5).

3.1 Les étapes de la réplication

a. Synthèse de l'ADN et réplication d'un chromosome

Les caractéristiques principales de la réplication sont les mêmes chez tous les organismes. Toutefois des spécificités apparaissent au niveau des machineries de réplication dans chacun des trois domaines du vivant, même si nombre des protéines impliquées montrent des liens évolutifs. Les caractéristiques de la réplication et des complexes qui interviennent chez les Archées sont pour partie analogues à celles des Bactéries et pour partie proches de celles des Eucaryotes, dont c'est en quelque sorte une version plus simple.

La synthèse d'un acide nucléique *in vitro* est un processus simple. C'est la polymérisation de quatre nucléotides assemblés de façon complémentaire à ceux du brin modèle¹. En revanche, la réplication d'un chromosome est un processus complexe en raison de sa structure (circulaire ou linéaire), de son état de surenroulement (§ 1) et de la coordination nécessaire avec le cycle cellulaire (voir Chapitre 3). Toutes ces contraintes ont nécessité l'existence d'une machinerie extrêmement élaborée, et de nombres de contrôles (Fig. 4.6 ; 4.7). La réplication d'un ADN bicaténaire, le cas le plus fréquent, est initiée

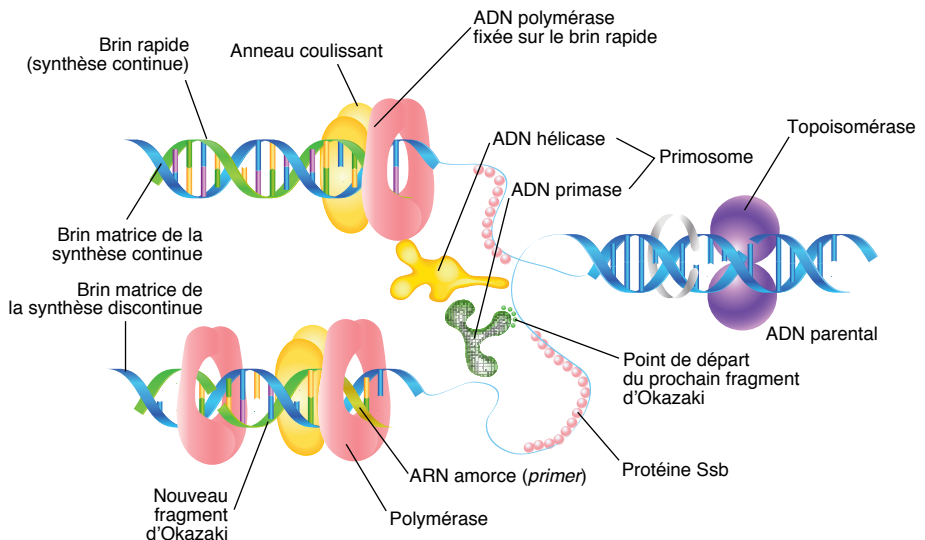


Figure 4.6 – Schéma d'ensemble des constituants et du fonctionnement d'une fourche de réplication

1. Voir cours de Biologie moléculaire

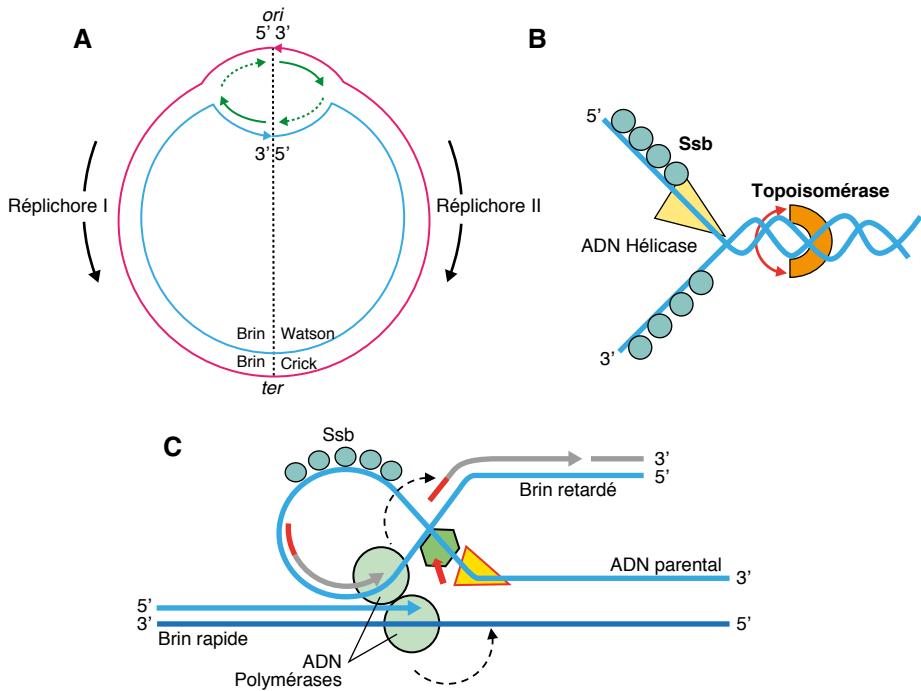


Figure 4.7 – Phases de la réplication du chromosome d'*E. coli*

A. Structure du chromosome et organisation en deux réplichores, montrant les caractéristiques de la réplication (semi-conservative, bidirectionnelle, et orientation de copie par l'ADN-PolIII), initiée au site *ori*, et terminée au site *ter*. **B.** Une fourche de réplication, constituée par de l'ADN parental simple brin protégé par les protéines Ssb. Structure formée après l'initiation de la réplication, par l'ADN hélicase, qui sépare les filaments de la structure double brin, et la topoisomérase, qui déroule l'ADN au fur et à mesure de l'avancement de la fourche. **C.** Modèle topologique de la réplication au niveau de chaque brin d'ADN d'une fourche de réplication d'un réplichore (voir aussi Figure 4.10).

au niveau d'un (ou de plusieurs) site(s) de la molécule, dit(s) origine(s) de réplication : origine unique dans le cas des Bactéries (*ori*) (voir Figure 4.7A) et de nombreuses Archées (telle *Pyrococcus abyssi*), ou origines multiples (ORBs, *Origin Recognition Boxes*) chez d'autres Archées (deux chez *Halobacterium*, trois chez *Sulfolobus solfataricus* et *Sulfolobus acidocaldarius*), comme chez les Eucaryotes, dont les chromosomes sont linéaires. La réplication est la plupart du temps bidirectionnelle, deux complexes de réplication (dits replisomes) se déplaçant en sens inverse l'un de l'autre (voir Figure 4.7A).

Les enzymes de synthèse d'ADN, les ADN-Pol, forment plusieurs familles, qui interviennent dans les différents processus impliquant le métabolisme de l'ADN. Les enzymes responsables de la synthèse réplivative (ADN-PolIII) sont aussi dites réplivatives, ou réplivases. Toutes ces enzymes ont deux particularités conditionnant le processus de

synthèse : l'obligation de synthèse dans la direction $5' \rightarrow 3'$, et le besoin d'un $3'OH$ libre où fixer les nucléotides, donc d'une amorce au démarrage du processus.

b. Le réplisome

Le réplisome est un complexe multi-protéique, dont les constituants sont analogues dans les trois domaines du vivant, avec toutefois de nombreuses variantes. Il contient deux molécules d'ADN-PolIII, une pour chaque brin d'ADN, responsables de l'élongation, la phase de progression de la synthèse le long du chromosome. Afin de coordonner les synthèses sur les deux brins, des deux polymérases sont liées par une protéine de pontage. L'initiation de la réplication passe par la reconnaissance de *ori* par une protéine spécifique, DnaA. L'origine (*oriC* chez *E. coli*, longue de 245 pb) contient plusieurs répétitions d'un motif de 9 pb auxquelles se lient les molécules de DnaA (dites *DNA-boxes*), et des séries de répétitions de 13 pb riches en AT (voir Figure 4.8). Du fait que seulement deux liaisons H sont contractées dans un couple AT (contre trois pour un couple GC), cette région est donc potentiellement malléable, ce qui favorise la séparation des deux brins. Le complexe ADN-DnaA étire l'ADN, provoquant la formation de deux fourches de réplication (voir Figure 4.7B). Cette structure est stabilisée par l'hélicase (DnaB chez *E. coli*), qui détruit les liaisons H au fur et à mesure de l'avance sur la molécule d'ADN (par un mécanisme inconnu), permettant la progression des fourches de réplication. La région *ori* contient également une proportion importante de motifs GATC, reconnus par une enzyme qui méthyle les adénines de ces séquences (voir Chapitre 5), créant un signal participant au contrôle de la fréquence d'initiation de cycles de réplication.

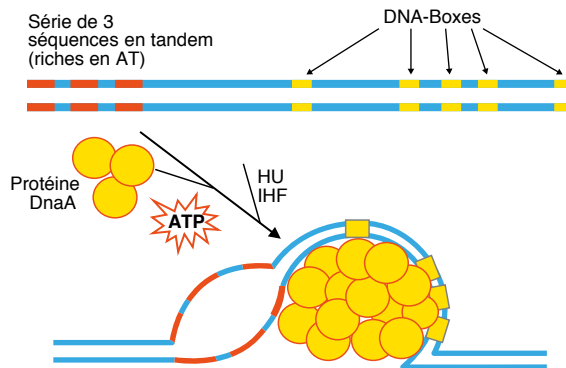


Figure 4.8 – L'origine *oriC*

Schéma simplifié et mécanisme de séparation des deux brins au moment de l'initiation de la réplication. La protéine HU intervient dans la régulation de la structure (stabilisation, surenroulement négatif) de l'ADN. IHF est la principale protéine de repliement de l'ADN.

c. L'ADN polymérase PolIII : propriétés et contraintes

L'ADN-PolIII est un hétérotrimère asymétrique dont chaque monomère est composé de dix-sept sous-unités de dix protéines différentes (voir Figure 4.9). Deux noyaux enzymatiques, fixés à chacun des brins de l'ADN par un anneau coulissant lui-même associé à un chargeur, incluent le site de polymérisation, une exonucléase $3' \rightarrow 5'$ (corrigeant les erreurs d'insertion), et les polymérases elles-mêmes, qui accrochent un désoxyribonucléotide à une extrémité $3'\text{OH}$ libre de l'amorce ou du dernier nucléotide, suivant la règle de complémentarité. L'amorce, constituée d'un fragment d'ARN de dix à trente bases, complémentaire d'une séquence du brin à compléter, est synthétisée par une ARN-Pol particulière, ou primase, qui n'exige pas de $3'\text{OH}$ libre pour fixer le premier nucléotide. L'anneau coulissant, entraînant le complexe, se déplace le long de l'ADN, permettant une activité de synthèse optimale. Plus de 5×10^5 nucléotides (équivalent à environ cent gènes) sont synthétisés sans détachement du complexe (propriété dite de processivité). Le brin d'ADN en cours de synthèse croît en direction $5' \rightarrow 3'$.

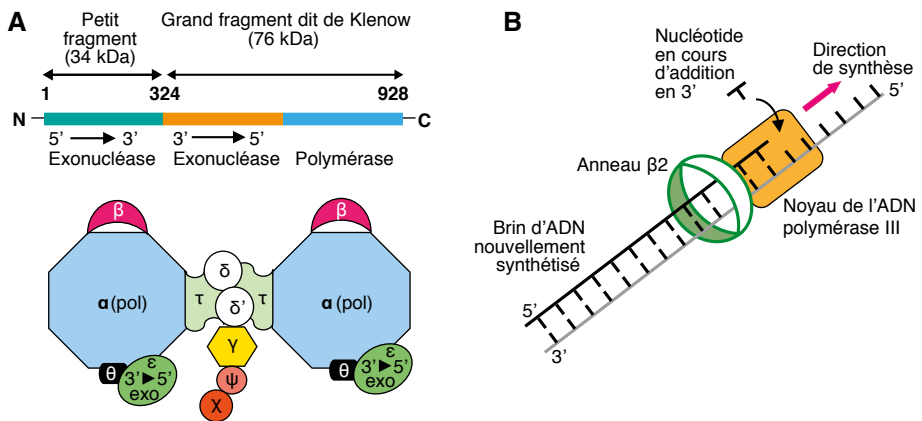


Figure 4.9 – L'ADN polymérase III

A. Structure et organisation des sous-unités de l'ADN-Pol III d'*E. coli*. **B.** Structure du noyau de l'enzyme et de l'anneau coulissant β.

En raison de l'obligation de synthèse dans la direction $5' \rightarrow 3'$ des polymérases, les processus de synthèse de chacun des deux brins au niveau d'une fourche diffèrent (voir Figure 4.7C). La matrice $3' \rightarrow 5'$, dite meneuse, rapide ou précoce (*leading strand*), est dupliquée par un brin synthétisé de façon continue, dans l'orientation $5' \rightarrow 3'$, celle de la progression de la fourche de réplication. En revanche, pour le brin $5' \rightarrow 3'$ de la matrice (brin lent ou retardé, *lagging strand*), le déroulement de la molécule d'ADN procède dans l'orientation opposée à celle que doit prendre le complexe de réplication. La synthèse procède de façon discontinue : au fur et à mesure de l'avancement de la fourche, de nouvelles amorces ARN sont formées, à partir desquelles la polymérase synthétise des

fragments (appelés fragments d'Okazaki), le tout dans le sens $5' \rightarrow 3'$. Ces fragments sont d'environ mille à deux mille nucléotides chez les Bactéries, et plus courts (150-250 pb) chez les Archées comme chez les Eucaryotes. Le brin néosynthétisé est donc une succession de fragments ARN-ADN, dont il faudra ensuite éliminer les parties ARN et combler les lacunes ainsi formées par de l'ADN, opérations réalisées par une polymérase particulière (la polymérase PolI chez *E. coli*). Cette enzyme possède en effet trois activités, de polymérase $5' \rightarrow 3'$, et d'exonucléase $5' \rightarrow 3'$ et $3' \rightarrow 5'$ (cette activité n'intervient que dans la correction d'erreurs de réplication ou de brèches consécutives à certains types de lésions). Enfin une ADN ligase crée les liaisons phosphodiester manquantes entre les nucléotides terminaux en $5'$ et en $3'\text{OH}$ des fragments d'Okazaki adjacents.

La progression des fourches pendant la réplication crée des contraintes topologiques sur l'ADN (supertours de l'hélicité en avant de la fourche) qui doivent être compensées à l'arrière. En outre, la structure du réplisome crée un problème pour l'avancement du processus de synthèse ; en effet non seulement les synthèses des deux brins procèdent en sens divergents, mais leurs vitesses sont différentes. Ce dilemme a été résolu grâce à un modèle qui propose la formation d'une anse qui orienterait localement le brin lent dans la même direction que le brin rapide au niveau de la fourche de réplication (voir Figure 7.4).

d. Terminaison de la réplication

La réplication d'un chromosome circulaire se termine lorsque les deux fourches de réplication se rencontrent. Chez les Bactéries, cela se produit généralement au niveau d'un site dit de terminaison (voir Figure 4.7A). Sur le chromosome circulaire d'*E. coli*, ce site, *ter*, est diamétralement opposé à *oriC*. C'est une région d'environ 300 kb, contenant des séquences particulières sur lesquelles se fixent des protéines spécifiques. Le complexe ainsi formé bloque transitoirement la progression des fourches. Chez les Archées la terminaison semble se produire de manière aléatoire dans les zones du chromosome où les fourches de réplication convergentes se rencontrent. En revanche, des sites spécifiques, formant des barrières à la progression de la fourche de réplication, ont été décrits chez les Eucaryotes. La réplication une fois terminée, la cellule possède deux copies de son chromosome, sous forme de deux cercles enchaînés. La résolution, ou décaténation, de cette structure est réalisée par une topoisomérase spécifique. Les deux chromosomes peuvent alors être répartis entre les deux cellules sœurs au moment de la division. L'arrêt des fourches dans ces régions entraîne une désagrégation du réplisome, mettant fin à la réplication. Chez *E. coli*, l'élongation se fait à raison de $350\text{-}500\text{ nt.s}^{-1}$ à 37°C , le chromosome étant répliqué en quarante minutes.

e. Le problème des chromosomes linéaires

La réplication des chromosomes linéaires pose un problème au niveau de l'extrémité de l'ADN. En effet, l'élimination de la première amorce à chaque cycle de réplication et l'impossibilité de la remplacer par de l'ADN en raison de son orientation devraient entraîner un raccourcissement progressif de la molécule à partir de cette extrémité.

Les Eucaryotes ont résolu ce problème grâce à la présence de séquences répétées (télomères) aux extrémités des chromosomes, auxquelles se lie une enzyme, la télomérase, qui permet d'allonger la synthèse de l'ADN à l'extrémité 5'. Chez les procaryotes, plasmides et bactériophages à chromosomes linéaires, deux solutions ont été adoptées : la présence de répétitions inversées reconnues par une protéine qui sert d'amorce, ou la formation d'une liaison covalente entre les extrémités des deux brins de l'ADN, formant une structure équivalente à un chromosome circulaire, une enzyme spécifique rompant la soudure covalente à la fin de la réplication.

3.2 Modèles particuliers de réplication

Beaucoup d'EGM et de virus, tant de procaryotes que d'Eucaryotes, utilisent des variantes du schéma général ci-dessus, dont seuls quelques systèmes représentatifs seront décrits.

Les plasmides, selon qu'ils sont intégrés dans le chromosome hôte ou libres dans le cytoplasme, sont répliqués, respectivement, de façon passive lors de la réplication du chromosome porteur, ou de façon autonome. La réplication autonome suit les modalités de celle des chromosomes, avec cependant de nombreuses spécificités :

- La séparation des deux brins d'ADN dépend, suivant les plasmides, de la transcription ou d'une protéine spécifique, Rep.
- L'amorce peut être un transcrit ou être générée par une primase codée par l'hôte ou par le plasmide.
- L'initiation exige dans la plupart des cas une protéine spécifique codée par l'élément, qui dans certains cas fonctionne conjointement avec la protéine DnaA de l'hôte. Cette protéine initiatrice reconnaît généralement une origine de réplication unique dont la structure rappelle celle du chromosome hôte. Certains plasmides ont deux origines séparées, une pour chaque brin.
- L'origine contient des séquences directement répétées, dénommées itérons, reconnues par la protéine Rep. Dans une origine donnée, les itérons ne sont généralement pas identiques, mais possèdent un motif consensus. Chez certains plasmides, des itérons, présents hors de la région origine, n'interviennent que dans le contrôle du nombre de copies du plasmide.

Trois schémas principaux sont utilisés dans le cas des génomes circulaires. La réplication de **type Thêta** est celle décrite pour un chromosome circulaire. La bulle de réplication formée au niveau de *ori* se déplace au cours du processus de réplication, ce qui confère à l'ADN une structure semblable à celle de la lettre grecque thêta (θ), d'où son nom. De nombreux plasmides et bactériophages ont recours à ce type de réplication. Dans le cas du facteur F sous forme libre végétative, l'appareil de réplication est essentiellement celui de l'hôte, avec plus de vingt protéines du système de l'hôte, contre une seule protéine codée par F, la protéine RepE. La synthèse est amorcée sur le brin continu à un site prédéterminé avec intervention de RepE, puis utilise le réplisome de l'hôte. D'autres plasmides, plusieurs bactériophages et certains virus d'Eucaryotes à génomes circulaires utilisent le système dit **sigma**, ou du **cercle roulant** (voir Figure 4.10).

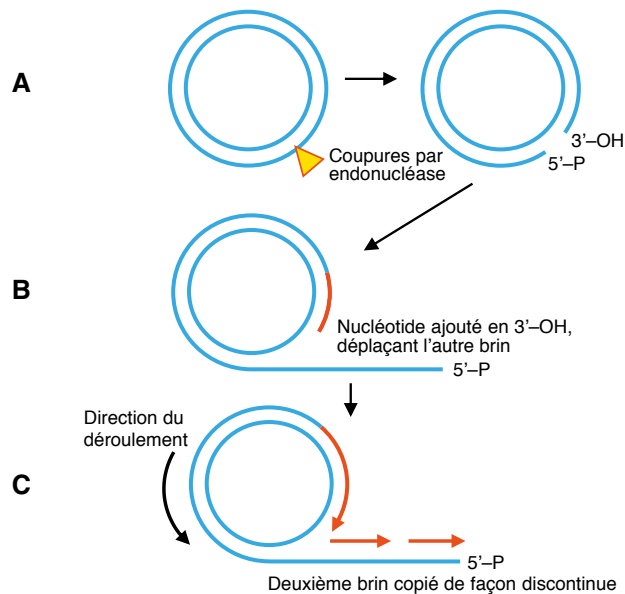


Figure 4.10 – Réplication d'un ADN bidirectionnel circulaire selon le modèle du cercle roulant

A. La réplication est initiée à l'origine par une coupure d'un seul brin libérant deux extrémités, $3'OH$ et $5'P$. **B.** L'extrémité $3'OH$ sert à PolIII pour commencer l'élongation, de façon unidirectionnelle, en utilisant le brin resté circulaire comme matrice, et en déplaçant au fur et à mesure le brin $5'P$. **C.** Arrivée en fin de cercle, PolIII poursuit sa progression, ce qui prolonge la molécule synthétisée, toujours liée de façon covalente à la molécule initiale. Au niveau de l'origine de ce brin linéarisé, qui vient d'être libérée, la primase synthétise alors une amorce $5' \rightarrow 3'$, qui permet à une molécule PolIII d'effectuer une réplication complémentaire, en direction $5' \rightarrow 3'$, c'est-à-dire en sens inverse du déroulement du cercle, et donc de la libération du brin $5'P$. Cette synthèse conduit à la formation d'une molécule double brin identique au chromosome initial. La progression de la fourche fonctionnant de façon circulaire peut se poursuivre de nombreuses fois, libérant à chaque cycle l'équivalent d'un génome simple brin, complété comme précédemment par la primase et une PolIII. Les nouveaux génomes double brin ainsi formés, sous forme d'une chaîne continue à partir de l'extrémité $5'P$ et d'équivalents génome complémentaires discontinus sur l'autre brin, peuvent être séparés par coupure de la liaison covalente.

Certains réplicons ont une **réplication mixte**. Le bactériophage λ , sous forme lytique, utilise le processus θ dépendant de protéines codées par le virus et par l'hôte pour conduire à la formation d'une dizaine de copies circulaires de son chromosome, et dans un second temps chacune de ces copies sert de matrice pour une réplication par cercle roulant, conduisant à la formation de multiples copies du génome (voir Chapitre 8). Les plasmides conjugatifs utilisent la réplication à cercle roulant lors du transfert de leur ADN vers un hôte bactérien (voir Chapitre 5).

Les points clefs du chapitre

- 1 Le génome procaryote est un ADN bicaténaire en général circulaire, condensé en domaines par des protéines (spécifiques *Bacteria/Archæa*) dans un nucléoïde directement dans le cytoplasme. Deux régions, *ori* et *ter*, définissent deux macrodomaines.
- 2 Les dimensions ($10^6 / 10^8$ pb) reflètent la nature des cycles de vie. Ce sont des molécules à haut pouvoir codant (environ 75 %), avec quelques microintrons (*Archæa*).
- 3 Les procaryotes sont généralement monochromosomiques, haploïdes, à ploïdie variable suivant l'état physiologique.
- 4 Des ADN annexes, souvent mobiles, plasmides (portant des gènes de virulence, autotransfert, métabolisme), transposons/séquences d'insertion (résistances à des antibiotiques), îlots génomiques (pathogénicité), virus, sont fréquents.
- 5 La réplication suit plusieurs modèles : elle peut être bidirectionnelle ; sur un seul brin, par cercle roulant ; avec pré-circularisation des ADN linéaires (protéines ou extrémités cohésives).
- 6 Deux réplisomes sont chargés de la reconnaissance de l'origine (*ori*), la séparation des chaînes (fourches), la polymérisation $5' \rightarrow 3'$ (ADN-PolIII) bidirectionnelle simultanée (continue/discontinue) jusqu'à la région *ter*.



Entraînez-vous

- 4.1 Quels facteurs interviennent dans la compaction et l'organisation structurale de l'ADN chez les procaryotes ?
- 4.2 Que définit-on comme ADN essentiel et ADN accessoire ?
- 4.3 Définir plasmide et épisome. Définir le mode de reproduction d'un plasmide autotransmissible.
- 4.4 Qu'est-ce qui distingue tous les gènes plasmidiques de certains gènes chromosomiques ?
- 4.5 Quelles différences et similitudes y a-t-il entre séquences IS et transposons ?
- 4.6 Quelles sont les différentes classes de transposons ? Qu'est-ce qui les différencie ?
- 4.7 En quoi la réplication d'un ADN double brin circulaire, tel que le chromosome d'*E. coli*, permet-elle de s'affranchir d'un problème : la réplication de l'extrémité 3'OH d'un ADN linéaire ?
- 4.8 Quel problème se pose lors de la terminaison de la réplication chez *E. coli* ?
- 4.9 Lors de la réplication du chromosome bactérien, comment se réalise la synthèse des deux brins néosynthétisés ? Quel problème pose cette réplication et comment a-t-il été résolu ?
- 4.10 Quelles différences y a-t-il entre intégron et superintégron ?

Introduction

Le maintien de l'intégrité d'une espèce ou d'un organisme est le reflet de son adéquation optimale à son environnement, ce qui requiert une pérennité de son information génétique. Toutefois ces conditions de vie peuvent être changeantes, ce qui *a contrario* nécessite une capacité d'adaptation. Celle-ci peut être transitoire, ou fixer dans les génomes des modifications introduites de diverses manières. Il se crée donc un équilibre entre ces forces antagonistes.

Objectifs

Connaître la nature des mutations, leurs causes endogènes et externes ; les moyens d'identification ; le rôle des systèmes de réparation dans l'équilibre variabilité-antivariabilité

Identifier les mécanismes moléculaires à la base des mutations

Définir mutation spontanée et induite, variabilité génétique

Expliquer comment l'équilibre variabilité et anti-variabilité assure permanence et évolution de l'espèce

Plan

- 1 Mutations et mutants
- 2 TGH chez les procaryotes
- 3 Réparation de l'ADN
- 4 Variabilité/anti-variabilité

1 Mutations et mutants

Tout changement héréditaire d'un caractère implique une modification de la séquence de l'acide nucléique génomique, ADN ou ARN, ce que désigne le terme de mutation. On distingue ordinairement mutation spontanée, dont l'apparition n'est pas attribuable à un événement identifié, et mutation induite, résultant d'agents dits mutagènes, augmentant la fréquence de ces changements. Cependant, certains changements de l'expression génique, donc du phénotype, peuvent être transmis au cours de plusieurs générations sans modification de la séquence d'ADN, phénomène désigné par le terme d'épigénétique (voir Chapitre 6).

1.1 Les mutations spontanées

Ces mutations peuvent être estimées par leur fréquence (proportion de mutants dans une population), et leur taux, rapporté au nombre de bases ou par génome d'une cellule. Les valeurs observées en conditions de laboratoire sont remarquablement constantes pour l'ensemble des organismes, tant procaryotes qu'Eucaryotes ($5,4 \times 10^{-10}$ par paire de bases répliquée chez *E. coli*, et $2,2 \times 10^{-10}$ chez *Saccharomyces cerevisiae*). Des facteurs internes et d'autres processus liés à la réplication sont potentiellement mutagènes : glissements de brins au niveau de séquences monobasiques, conduisant à des micro-insertions/délétions, recombinaison, déplacements d'éléments mobiles (voir Chapitre 4), processus de réparation (§ 3) ou de déblocage de la réplication (§ 3.2).

Parmi les **facteurs internes**, le taux de mutation « spontané » est imputable pour une bonne part à l'activité de copiage et réparation des **ADN polymérases processives** (voir Chapitre 4). Ces enzymes sont capables d'exciser les bases incorporées par erreur lors de la réplication, et interviennent dans nombre de processus de réparation (§ 3). Des mutants d'*E. coli* dépourvus de cette activité de correction présentent une augmentation de ce taux de mutation d'environ 10^4 fois. Des **produits naturels endocellulaires** sont capables d'endommager toute molécule biologique, et en particulier l'ADN ou ses précurseurs. Les principaux sont les formes réactives de l'oxygène (dites FRO, eau oxygénée, et surtout peroxydes et superoxydes, et le radical $\text{HO}^\bullet$, extrêmement réactif), générées par le métabolisme aérobie : ainsi la guanine, oxydée en 8-oxo-guanine, peut s'apparier soit à une cytosine, donc sans conséquence, soit à une adénine, ce qui donne une transversion $\text{GC} \rightarrow \text{TA}$.

La **recombinaison génétique** joue un rôle essentiel dans le brassage génétique chez tous les organismes, avec les risques d'erreurs inhérents. L'étude de la recombinaison, initiée avec les travaux de T.H. Morgan (dès 1910) sur la *Drosophile*, a permis l'établissement des premières cartes génétiques. Il s'agissait en fait de **recombinaison homologue**, avec échanges, au cours de la méiose, entre séquences quasiment identiques. Son implication a ensuite été reconnue dans d'autres processus impliquant des remaniements des molécules d'ADN. Elle intervient, et c'est peut-être sa fonction essentielle, dans le maintien de l'intégrité du matériel génétique, *via* divers systèmes de réparation d'ADN endommagé (§ 3), et dans la séparation des chromosomes à l'issue de leur réplication (voir Chapitre 4 ; § 3.2). Si la première approche, formelle, de la recombinaison a concerné des Eucaryotes, principalement des micro-champignons ascomycètes, l'analyse moléculaire en a été réalisée chez des procaryotes, dont essentiellement *E. coli*, et des bactériophages. La réalité d'un échange physique entre molécules d'ADN durant la recombinaison a été démontrée par une co-analyse physique et génétique du devenir des molécules d'ADN du bactériophage λ d'*E. coli* au cours de leur réplication. Les mécanismes moléculaires mis en évidence chez *E. coli* trouvent leurs équivalents dans l'ensemble du monde vivant. Chez tous les organismes, *E. coli* comme *Homo sapiens*, les levures et les Archées, une protéine, RecA (ou ses homologues), est indispensable dans ce processus. Elle est un partenaire obligé de toutes les voies impliquant des ADN hors structure double brin canonique. Grâce à son affinité pour l'ADN simple brin, elle

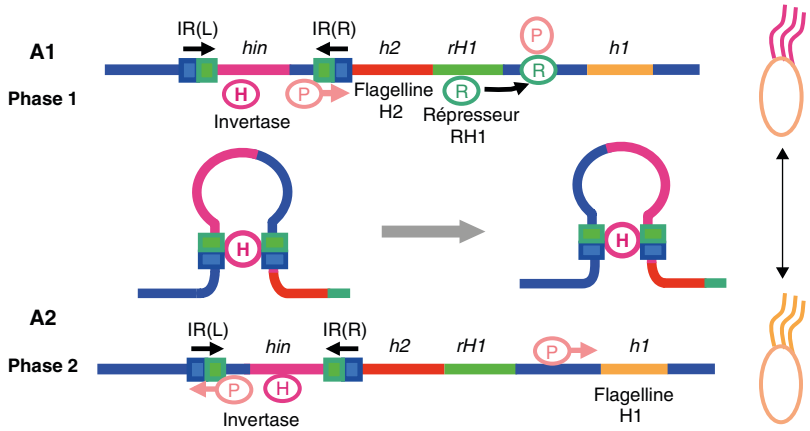
recouvre ces régions sur une longueur pouvant dépasser 1 000 pb ; le complexe ainsi formé s'associe avec un ADN double brin homologue, permettant l'échange de brins. En outre, le lien intime entre déficience pour la recombinaison homologue et sensibilité aux radiations, agents à effets mutagènes (§ 1.2), confirme le rôle déterminant de ce processus dans les voies de réparation de l'ADN.

La recombinaison homologue elle-même, à de rares cas près, ne modifie guère la structure des génomes, les réassortiments se faisant ordinairement par substitution d'un allèle d'un gène par un autre. Il n'en va pas de même d'autres types de recombinaison, dite **non homologue** ou **site spécifique**, liés à la présence d'**éléments mobiles**, qui peuvent conduire à des modifications d'organisation des génomes, contribuant à leur plasticité. Ces modifications se font par le biais de recombinaisons site-spécifique (Sérine- et Tyrosine-recombinases, d'après l'acide aminé de leur séquence intervenant dans le processus). Ce type de recombinaison est impliqué dans diverses propriétés telles que la variation de phase chez *Salmonella enterica* (l'expression alternative de deux antigènes de surface) (voir Figure 5.1A), ou l'aptitude de Mu (voir Figure 5.1B) et P1, deux phages d'*E. coli*, à exprimer deux protéines différentes intervenant dans leur spécificité d'hôte, ce qui leur permet de varier leur répertoire infectieux. La recombinaison non homologue intervient aussi dans l'intégration et l'excision de l'ADN du phage λ en un site spécifique du chromosome de son hôte (voir Chapitre 8) (voir Figure 5.2). De même, la mobilité des cassettes des intégrons (voir Chapitre 4) fait intervenir des recombinaisons particulières (intégrases, excisases) dont l'originalité réside dans le fait que leur substrat est un ADN simple brin généré à partir de la cassette à déplacer.

La **transposition** met en jeu un système de recombinaison non homologue, mutateur et éventuellement générateur de remaniements chromosomiques, faisant intervenir plusieurs types d'éléments génétiques mobiles (voir Chapitre 4). La question, largement débattue, de savoir si ces éléments confèrent un avantage sélectif à l'organisme qui les héberge, n'a abouti qu'à des réponses assez contradictoires. D'une façon générale, ils jouent probablement un rôle majeur dans la diffusion de caractères nouveaux, par une forme de transfert horizontal (non générationnel) (§ 2). Les séquences acquises peuvent être de toute nature. Les plus préoccupantes concernent les gènes de résistance à des antibiotiques, dont certains éléments peuvent en porter une panoplie (voir Chapitre 4), d'autant que ces éléments sont souvent intégrés dans des plasmides aptes à réaliser des transferts interspécifiques (§ 2.3). Compte tenu des effets sur la structure de l'ADN hôte et du potentiel mutagène de ces éléments, leur mobilité est cependant strictement régulée, par les éléments eux-mêmes.

Le **bactériophage-transposon Mu** est un phage tempéré, dont l'insertion de l'ADN se fait quasi aléatoirement dans le génome de son hôte. La découverte de ce phage résulte de l'observation que 1-2 % des cellules lysogènes pour Mu présentent une mutation pouvant affecter un large éventail de gènes, la mutation étant toujours génétiquement associée au site d'intégration du prophage. En effet le cycle infectieux du phage implique l'insertion de son génome dans l'ADN de l'hôte, la production des nouveaux génomes

A. Inversion de phase *S. enterica*



B. Inversion G-loop de Mu

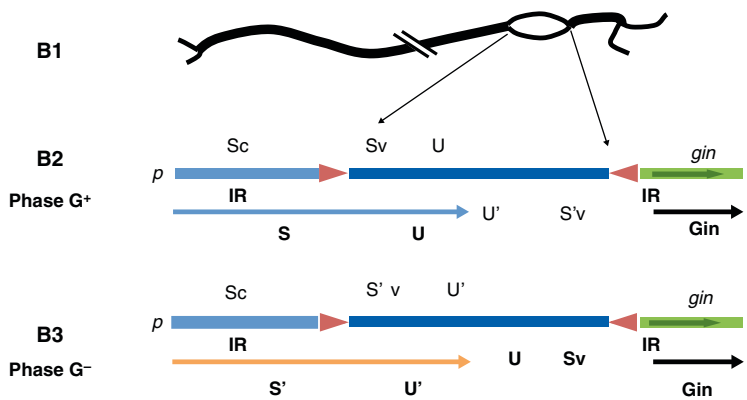


Figure 5.1 – Modifications génomiques dues à des Sérine-recombinases

A. Inversion de phase chez *Salomonella enterica* : Synthèse de flagellines. Phase 1 : Le promoteur P permet la transcription de *h2* (flagelline) et *rH1* (répresseur de *h1*). Il y a expression de la seule flagelline H2. Phase 2 : L'invertase H inverse l'ADN entre les séquences répétées inversées IRR et IRL. Le promoteur P n'est plus actif ; il n'y a plus expression de *h2* et *rH1*. La flagelline H1 est produite. **B. Inversion de la G-loop dans le génome du bactériophage Mu.** B1. Structure d'un hybride ADN-ADN d'un lysat de phages Mu montrant le segment (3 kb) non hybridé de la G-loop (les parties non hybridées aux deux extrémités sont de l'ADN bactérien). B2 et B3. La Sér-recombinase Gin provoque l'inversion réversible du segment d'ADN compris entre les séquences répétées inversées IR, codant les protéines Sv, U, S'v et U', responsables de la spécificité d'hôte de Mu. Phase G⁺ : synthèse des protéines Sv et U, à partir du promoteur p. Phase G⁻ : synthèse des protéines S'v et U', à partir du même promoteur p.

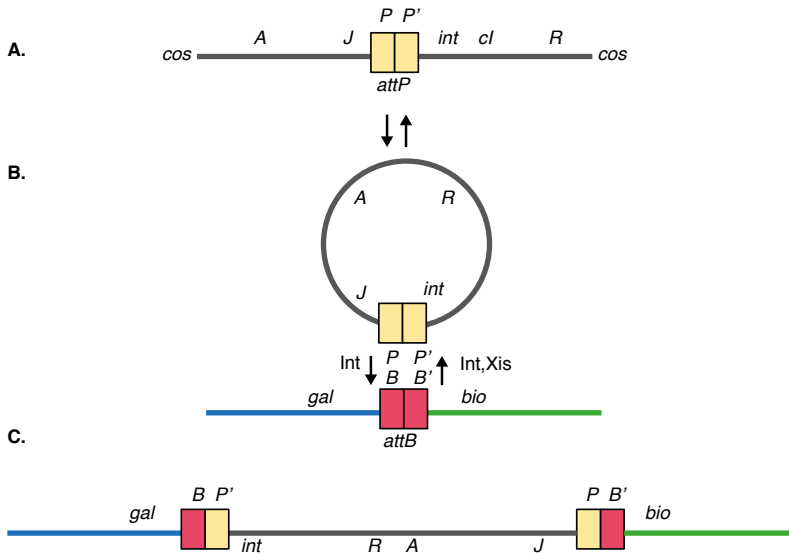


Figure 5.2 – Intégration du génome de λ grâce à une Tyrosine-recombinase

A. Carte simplifiée du génome du virion λ . *cos*, séquences simple brin de douze bases, complémentaires. **B.** L'ADN se circularise par action de la ligase de l'hôte au niveau des régions *cos*. **C.** La Tyr-recombinase site-spécifique *Int* (intégrase) réalise l'insertion de l'ADN de λ au niveau des sites *PP'* (*attP*) phagique et *BB'* (*attB*) bactérien, entre les gènes bactériens des opérons galactose et biotine. L'induction du prophage correspond au processus inverse, réalisé par l'intégrase *Int* et l'excisase *Xis* phagiques.

résultant de **transpositions réplcatives** répétées (voir Figure 5.3). Le génome phagique porte les caractéristiques des éléments mobiles : deux gènes codant une transposase (*MuA*) et un cofacteur de transposition (*MuB*) et des séquences répétées inversées, nécessaires au processus de transposition, aux extrémités de l'ADN. Le processus de transposition met en jeu, en outre, d'autres séquences reconnues par des protéines de l'hôte, dont la gyrase (voir Chapitre 4). Un complexe de transposition est mis en place associant un dimère *MuA*₂ à chacune des extrémités de l'ADN phagique. S'ensuit une coupure simultanée de l'ADN aux deux extrémités du prophage, celle de chaque extrémité se faisant par l'intermédiaire du dimère *MuA*₂ associé à l'autre extrémité. Cette contrainte a pour conséquence d'éviter toute coupure prématurée de l'ADN, préjudiciable au développement du cycle. Le contrôle de la transposition nécessite l'expression d'un seul répresseur, codé par *Mu*, assurant le choix entre lysogénisation (forme stable) et transposition. Il s'établit un équilibre entre ces deux événements. Les insertions se faisant au hasard par rapport aux gènes de l'hôte, cette forte fréquence de transposition explique la capacité mutagène de ce phage.

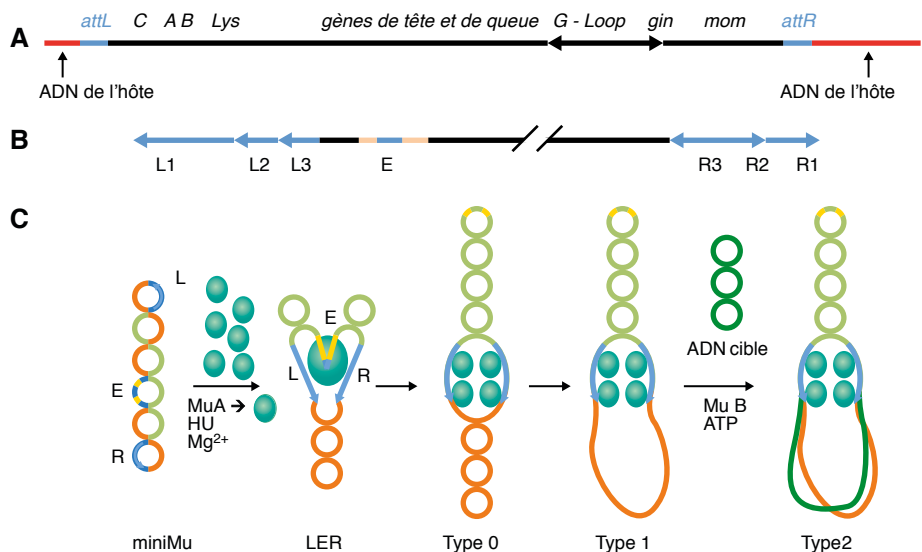


Figure 5.3 – Transposition rélicative de l'ADN de Mu

A. Carte génétique simplifiée de Mu. C, répresseur de l'expression des gènes de Mu à l'état lysogène ; A, B, protéines nécessaires à la transposition ; G-loop, voir Figure 5.1 ; en rouge, ADN d'origine bactérienne, variable d'un virion à l'autre. **B. Structures des extrémités de l'ADN de Mu.** Les séquences L1, L2, R1 et R2 sont nécessaires à la transposition dans leur position et leur orientation. E, séquence nécessaire à la transposition. **C. Les étapes de la transposition du vecteur dit « miniMu » étudiées *in vitro* :** partie Mu réduite aux extrémités attL et attR (bleu) encadrant la séquence E (jaune), à l'intérieur d'une séquence « neutre » de Mu (vert clair) et une séquence « non-E » (orange). **LER :** premier intermédiaire identifiable. HU est une protéine bactérienne de fixation à l'ADN. **Type 0 :** la protéine MuA sous forme tétramérique est associée à attL et attR. **Type 1 :** l'ADN cible, clivé aux bordures attL-attR, n'est plus surenroulé. La partie Mu associée à MuA le reste. **Type 2 :** l'ADN cible (vert foncé), recruté grâce à la protéine MuB, s'associe aux extrémités attL-attR. La réaction se termine par la réplication de la partie Mu du complexe avec formation de deux molécules portant chacune la partie Mu, l'une associée à la séquence « non-Mu », l'autre à l'ADN cible.

Tn5 est un transposon composite de 5,7 kb. Il porte deux séquences (IS50R et IS50L) semblables à des séquences d'insertion (voir Chapitre 4), ne se distinguant que par deux mutations ponctuelles inactivant le gène de la transposase dans IS50L. Le mécanisme de transposition est du type **non réplicatif**, coupé-collé (voir Figure 5.4). La région interne de Tn5 code la résistance à trois antibiotiques (streptomycine, bléomycine et kanamycine), caractères qui peuvent être avantageux pour l'hôte, suggérant qu'un équilibre pourrait s'établir entre efficacité de transposition et survie de l'hôte. En effet, des études *in vitro* ont montré que des variantes des séquences cibles ou de la transposase

permettraient une augmentation notable de l'efficacité du processus, et d'autre part l'expression du gène codant la transposase est modulée par le degré de méthylation de la séquence GATC présente dans son promoteur.

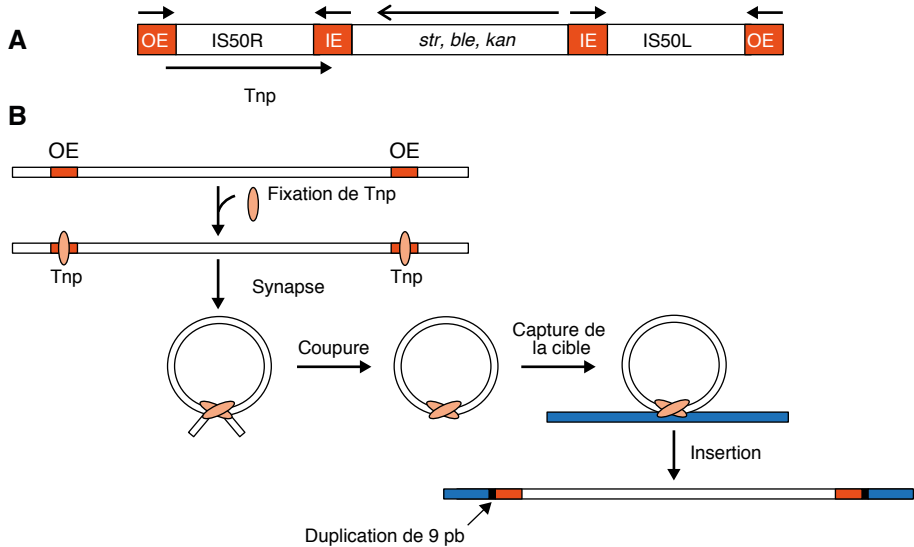


Figure 5.4 – Transposition de type coupé-collé de Tn5

A. Structure du transposon Tn5. OE et IE, extrémités répétées inversées. La transposase (Tnp) n'est codée que par IS50R. *str*, *ble*, *kan*, gènes codant la résistance à la streptomycine, la bléomycine et la kanamycine, respectivement. **B.** Une unité de la transposase se fixe sur chaque OE. Leur réunion sous forme dimérique conduit à une coupure double brin libérant le transposon associé à la transposase. Cette structure reconnaît la séquence cible et permet l'insertion de Tn5 avec duplication de 9 pb de la séquence cible.

1.2 Les mutations induites

Ces mutations, analogues dans leurs structures aux mutations spontanées, résultent de l'action d'agents mutagènes de nature variée. Le premier agent mutagène exogène connu a été les rayons X, utilisés par H.J. Mueller (1925) pour obtenir des mutants chez la *Drosophile*. Parmi les agents physiques, les radiations ionisantes (rayons X et γ) forment des radicaux libres tels que HO $\cdot$ endommageant l'ensemble des molécules biologiques, dont l'ADN (oxydation des bases ou ruptures double ou simple brin), et les ultraviolets (UV), produisant des pontages entre pyrimidines, surtout T-T, dont la réparation peut s'avérer mutagène.

Un nombre considérable de produits chimiques « artificiels » sont mutagènes. Il peut s'agir d'analogues de bases (5-bromouracile analogue de la thymine, 2-aminopurine

analogue de l'adénine) provoquant ordinairement des transitions, d'agents alkylants, désaminants (transformant respectivement l'adénine, la guanine et la cytosine en hypoxanthine, xanthine et uracile) ou intercalants (s'insérant entre les bases de l'ADN), toutes modifications risquant d'entraîner des modifications de l'ADN. Des tests précis ont été conçus pour déceler un effet potentiellement mutagène de l'arsenal de produits nouveaux générés par l'industrie chimique.

1.3 Apparition/détection des mutations

Toute étude de génétique implique l'obtention de mutants affectés dans le caractère analysé. Chez les micro-organismes manipulables en laboratoire, certains types sont faciles à sélectionner, tels ceux portant sur la coloration de colonies, ou présentant un avantage sélectif comme la résistance à un virus ou à un antibiotique. Même si leur fréquence spontanée est faible, le crible sélectif restera suffisamment puissant pour les sélectionner aisément. Il n'en va pas de même pour les mutants ne présentant pas d'avantage sélectif connu, par exemple une déficience de synthèse (auxotrophie) pour un acide aminé⁵. Les outils de biologie moléculaire ont actuellement considérablement élargi la panoplie des méthodes disponibles. Il est possible maintenant de fabriquer des mutants de toute séquence d'ADN par différentes stratégies de mutagenèse dirigée réalisée *in vitro* sur le gène (ou une séquence de ce gène), permettant d'obtenir des mutations de nature connue (ponctuelle, délétion, insertion, inversion), puis de réinsérer le gène muté, éventuellement associé à un caractère permettant une sélection directe, dans le génome de l'organisme étudié.

Le fait que l'on puisse déterminer un taux de mutation spontané implique que toute population doit contenir une collection de mutants différents, dont les mutations sont neutres vis-à-vis de la sélection opérant dans les conditions considérées. Par exemple, pour une population d'*E. coli* de 10^8 cellules (équivalente à une colonie), un calcul un peu simpliste (supposant un taux de mutation de $5 \cdot 10^{-10}$ par paire de bases, 10^3 bases par gène, et $5 \cdot 10^3$ gènes par cellule) conduit à la prédiction qu'une cinquantaine d'exemplaires de chaque gène porterait une mutation, en supposant (ce qui est peu probable) qu'elles soient toutes neutres, et donc viables dans les conditions utilisées. Ces notions sonnent un peu maintenant comme des truismes, mais cela n'a pas toujours été le cas. Il est intéressant de voir par quelles méthodes elles ont pu être établies. L'étude princeps, dite **test de fluctuation**, réalisée par S.E. Luria et M. Delbrück (1943), qui cherchaient à répondre à la question du rapport entre l'apparition d'une mutation et sa détection, avait pour base le dénombrement de mutants d'*E. coli* résistants à un virus lytique, le bactériophage T1. Une culture de bactéries soumises à ce virus devient rapidement limpide suite à une lyse massive. Mais, maintenue incubée pendant environ dix heures, elle redevient trouble : il y a eu croissance de bactéries non lysées initialement, qui s'avèrent dans leur immense majorité résistantes au bactériophage. Deux hypothèses peuvent *a priori* expliquer la présence de ces mutants. Une adaptation des bactéries après leur mise en présence du virus prévoit une probabilité, faible mais constante, d'apparition de mutations vers la résistance, transmissibles à leur descendance. Dans ce

cas, les mêmes conditions expérimentales (même nombre de virus et de cellules) appliquées à de nombreuses cultures indépendantes devraient conduire, statistiquement, à un nombre de cellules résistantes semblable (rapport moyenne/variance proche de 1). L'hypothèse de mutations de résistance au virus préexistantes à la mise en contact des cellules avec le virus prédit au contraire que, dans des cultures indépendantes comme ci-dessus, l'apparition de nouvelles mutations est aléatoire dans le temps. Une culture dans laquelle une mutation serait apparue précocement, et aurait donc pu être reproduite de nombreuses fois, donnerait une descendance notablement plus élevée qu'une autre culture dans laquelle la mutation serait apparue tardivement. Il devrait dans ce cas y avoir une grande variabilité de la quantité de cellules résistantes d'une culture à l'autre (rapport moyenne/variance très différent de 1). D'autres tests plus qualitatifs ont été développés ultérieurement par H.B. Newcombe puis par E. et J. Lederberg (portant sur l'analyse de la fréquence de mutants d'*E. coli* résistants au phage T1, et sur la résistance à la pénicilline, respectivement). Tous aboutissent à la même conclusion : les mutations préexistent au crible sélectif, qui ne fait que révéler leur présence. Le test de Lederberg, outre son intérêt scientifique, a fait appel à une technique dite des répliques, mise au point pour ce test, abondamment utilisée depuis en génétique microbienne[§].

2 TGH chez les procaryotes

Chez les Eucaryotes, la reproduction sexuée est un moyen puissant de brassage des gènes : deux gamètes avec chacun leur propre histoire génétique participent d'égale manière à former le zygote. Chez les procaryotes, malgré l'absence de reproduction sexuée, des mécanismes de parasexualité, dits de transferts génétiques horizontaux (TGH), assurent un flux génétique permettant aux cellules de recevoir et d'intégrer de l'ADN provenant d'autres cellules (voir Figure 5.5). Ces mécanismes constituent dans leur ensemble une force importante de diffusion de gènes (tels ceux liés à la virulence et à la résistance à des antibiotiques chez les pathogènes), et de diversification des espèces.

Un processus artificiel de pénétration d'ADN dans divers types de cellules, mimant le processus naturel de transformation, est utilisé au cours de manipulations d'ingénierie génétique. Les conditions, dites de façon inappropriée de « compétence », auxquelles sont soumises les cellules pour les rendre permissives à l'entrée de l'ADN sont sans rapport avec le processus physiologique.

2.1 La transformation naturelle

Il s'agit de la capture par une cellule d'ADN libéré dans l'environnement à la suite de la lyse d'autres cellules (voir Figure 5.5A). Les couches supérieures du sol contiennent entre 0,03 et 1 mg/g de terre d'ADN, d'origine procaryote, et les milieux aquatiques (eaux douces, marais, estuaires, côtes et haute mer) de 0,2 à 44 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, concentration diminuant avec la profondeur. Une grande partie de cet ADN est dégradée par des nucléases

excrétées par des procaryotes, qui en utilisent les produits comme nutriment. Certains facteurs (acides humiques du sol, argile associé à des matières organiques) préviennent cette dégradation. Cet ADN, dit transformant, peut être substrat pour la transformation, inséré dans le génome de cellules réceptrices par recombinaison génétique. Ce processus a été décrit dans plus de quatre-vingts espèces de Bactéries à Gram⁻ et à Gram⁺ (dont une dizaine au moins de Bactéries pathogènes) et d'Archées, appartenant à tous les types nutritionnels. Il pourrait intéresser 1 % de toutes les Bactéries connues.

Les cellules candidates réceptrices doivent être dans un état dit de compétence, peu mentionné dans les environnements naturels. En laboratoire les conditions conduisant au développement de cet état sont très variables selon les espèces, et souvent encore incomprises (fin de croissance rapide, suite à un stress nutritionnel, forte densité de la population, etc.). La proportion de cellules compétentes, propre à chaque espèce, s'étend d'une fraction à 100 % d'une population. Chez *Streptococcus pneumoniae* elle s'observe lorsque la population atteint une certaine densité, avec un pH intracellulaire de l'ordre de 8,3. Une stratégie originale, dite fratricide, chez le genre *Streptococcus*, consiste pour les cellules compétentes à tuer les non compétentes pour en libérer l'ADN. L'état de compétence consiste en la synthèse, en réponse aux signaux environnementaux, de vingt-cinq à cinquante protéines, homologues à celles qui interviennent dans certains types de pili et certains systèmes de sécrétion, selon les genres bactériens (voir Chapitre 7). Ces protéines, organisées en structures externes, favorisent l'adhésion d'un

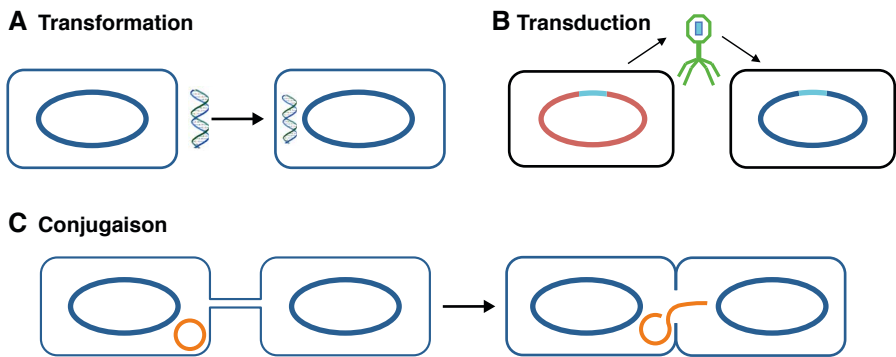


Figure 5.5 – Principaux systèmes de transfert génétique chez les procaryotes

A. Transformation. Des fragments d'ADN présents dans l'environnement sont transportés dans les cellules. S'il y a homologie, l'ADN est intégré par recombinaison génétique dans le génome de l'hôte. **B. Transduction.** Des accidents dans le processus de maturation d'une particule virale peuvent conduire à l'encapsidation (inséré dans le génome viral ou libre) de fragments d'ADN de l'hôte, qui seront transmis au cours d'une infection ultérieure à une autre cellule hôte. **C. Conjugaison.** Certains plasmides (cercle rouge) peuvent s'auto-transférer d'une cellule bactérienne à une autre cellule, bactérienne ou eucaryote. Dans certains cas le transfert peut entraîner celui de fragments du chromosome de la cellule hôte (donatrice) à la cellule réceptrice.

fragment d'ADN double brin sur la surface de la cellule. L'ADN est alors fragmenté par des nucléases, un seul filament transporté à travers l'enveloppe cellulaire, l'autre étant dégradé (dans les systèmes les plus connus). Une fois l'ADN internalisé, les activités de recombinaison, si elles reconnaissent une homologie entre cet ADN et l'ADN endogène, l'intègrent dans le génome. Chez deux espèces bactériennes étroitement apparentées, *Haemophilus influenzae* et *Haemophilus parainfluenzae*, la compétence correspond au développement en surface de vésicules membranaires dans lesquelles l'ADN transformant est internalisé, et ainsi protégé d'éventuelles DNases externes. L'ADN internalisé est soit progressivement dégradé (*H. influenzae*), soit peu dégradé (*H. parainfluenzae*) ; une de ses extrémités quitte la vésicule en s'appariant à la région homologue du chromosome receveur, entraînant le restant du fragment dans le cytoplasme, où il peut alors être intégré dans l'ADN receveur par recombinaison homologue.

2.2 La transduction

La transduction est le fait de phages tempérés à prophage intégré dans le chromosome de l'hôte (type λ) comme de phages tempérés non intégratifs (P1) (voir Chapitre 8) (voir Figure 5.5B). Les premiers réalisent une transduction restreinte (ou spécialisée), ne concernant que les gènes bactériens adjacents à l'une ou l'autre extrémité du prophage intégré, entraînés avec l'ADN phagique suite à une excision imprécise. Les phages tempérés non intégratifs peuvent encapsider par erreur, au cours du cycle lytique, tout fragment de génome bactérien de taille convenable (1 à 2 %) contenant une séquence reconnue par le processus d'encapsidation du phage (transduction généralisée). L'ADN ainsi libéré, mixte ou pas, empaqueté dans une capsid virale, constitue un vecteur, dit particule transductrice. Celle-ci peut, au cours d'une nouvelle infection, transférer cet ADN à une nouvelle cellule hôte. Certains phages de type intégratif comme P22 possèdent un double mécanisme de transduction spécialisé et généralisé.

La transduction a longtemps été sous-estimée dans les environnements naturels. Des analyses métagénomiques récentes de viromes (ensembles des génomes viraux présents dans un environnement donné) suggèrent que 50 à 60 % des bactériophages sont porteurs de gènes d'hôtes fonctionnels et que ces particules peuvent servir de réserves de gènes au sein d'environnements très diversifiés. Ces données revêtent une importance significative, par exemple pour les gènes de résistance à des antibiotiques, présents en abondance chez les bactériophages collectés dans la nature. La transduction joue certainement un rôle important dans la diffusion de ces gènes chez les Bactéries pathogènes.

2.3 La conjugaison

La découverte par J. Lederberg et E.L. Tatum (1946) du transfert d'ADN par **conjugaison** chez *E. coli* a constitué un moment décisif dans l'histoire de la microbiologie car les concepts qui en dérivèrent furent à la base de la naissance de la génétique des procaryotes. À partir de ce moment *E. coli* devint un modèle pour les études de génétique

classique, au même titre que l'étaient les organismes eucaryotes modèles de cette époque, le Maïs et la Drosophile. De nombreuses Bactéries à Gram⁻ comme à Gram⁺ peuvent transférer de l'ADN par conjugaison.

Un couple de cellules pouvant conjuguer est constitué de deux types « sexuels » (voir Figure 5.5C). La cellule donatrice est caractérisée par la présence d'une machinerie de conjugaison, dont les protéines sont codées par un élément génétique de type auto-transférable, tel le plasmide, ou facteur ou épisome, F chez *E. coli* (voir Chapitre 4) qui assure le transfert de l'ADN. La souche porteuse de F est dite F⁺, la souche réceptrice F⁻. L'appareil de conjugaison comprend deux complexes protéiques. Le premier est un **pilus sexuel**, le transférosome, positionné sur la surface de la cellule. Son rôle est l'identification d'une cellule réceptrice appropriée (non porteuse du même plasmide conjugalif), le rapprochement des deux cellules jusqu'à les amener côte à côte (probablement par un processus de rétraction par dépolymérisation du pilus), et enfin la transmission d'un signal nécessaire à la manipulation de l'ADN pour son transfert. La voie de passage de l'ADN entre les deux cellules est objet de discussion, l'idée dominante étant celle d'un canal interne du pilus F. Le deuxième complexe, le **relaxosome**, se lie à l'origine de réplication *oriT* du facteur F (voir Chapitre 4), coupe un des deux brins de l'ADN sur cette séquence, et forme un lien covalent avec l'extrémité 5' libérée, ce qui détermine le filament qui sera transféré (dit T), en direction 5' → 3'. La structure relaxosome-ADN est guidée vers le canal de jonction intercellulaire. En réponse à un signal dépendant du contact entre les deux cellules, il transfère le filament T à la cellule réceptrice *via* ce canal. Simultanément, une réplication asymétrique dans la cellule réceptrice reconstitue un filament double brin de l'ADN transféré, qui est alors re-circularisé. Une réplication similaire reconstitue la structure double brin du plasmide dans la cellule donatrice (voir Figure 5.6). Le facteur F peut s'intégrer dans le chromosome de l'hôte, qui est dite alors Hfr (Haute fréquence de recombinaison). Cette Bactérie peut transférer des gènes chromosomiques à une Bactérie F⁻. Ceux-ci peuvent être échangés avec ceux du chromosome de la cellule réceptrice par recombinaison homologue.

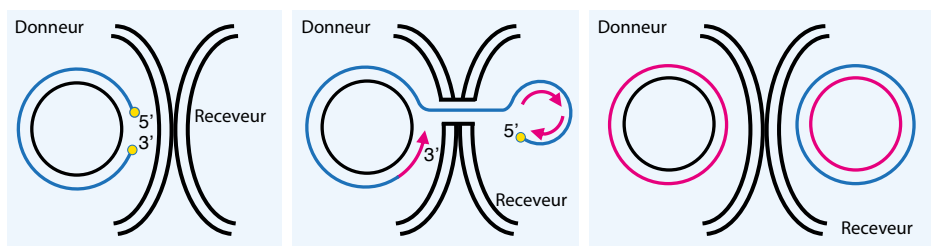


Figure 5.6 – Transfert du plasmide conjugalif au cours de la conjugaison

Un filament simple brin du plasmide est transmis entre cellules donatrice et réceptrice. Des réplications selon le modèle du cercle roulant dans la cellule donatrice et par réplication classique dans la réceptrice reconstituent une molécule d'ADN double brin dans chacune à l'issue du processus.

L'abondance de plasmides de type auto-transférable chez les procaryotes, la conservation des protéines de l'appareil de conjugaison et la non-spécificité du transférosome ont permis la mise en évidence en laboratoire de nombreuses possibilités de conjugaison inter-spécifiques, par exemple entre *E. coli* et *Salmonella typhimurium* ou de nombreuses autres Bactéries (Cyanobactéries, Spirochètes, nombreuses Bactéries à Gram⁺). La présence de nombreux plasmides conjugatifs chez les Archées et une capacité de conjugaison Bactéries → Archées mise en évidence en laboratoire pourraient indiquer que nos connaissances sur la conjugaison chez les Archées sont sous-estimées. Une capacité de conjugaison a été observée entre *E. coli* et des cellules eucaryotes (*Saccharomyces*, cellules Hela, et cellules ovariennes de Cochon d'Inde), et des transferts d'ADN plasmidique entre la Bactérie pathogène *Bartonella henselae* et des cellules endothéliales humaines en culture. Un cas important pour ses applications en biotechnologie verte est la conjugaison d'*Agrobacterium tumefaciens* (via son plasmide Ti) avec de nombreuses cellules végétales ou avec *S. cerevisiae*.

2.4 Autres systèmes de transfert de gènes

Moins connus, ces systèmes ont une prévalence et un impact encore inconnus, mais leur présence dans des écosystèmes divers suggère qu'ils y jouent un rôle significatif. Les **GTA** (*Gene Transfer Agent*) sont présents chez des Bactéries très distantes phylogénétiquement. Leur structure et leurs propriétés rappellent celles des phages et de la transduction, puisque ces particules sont capables de transférer un fragment d'ADN pris au hasard dans le génome de leur cellule productrice. Leur capsid ne peut cependant empaqueter qu'une quantité d'ADN inférieure à 14 kb (contre par exemple 20 pour le phage P22). Leurs propriétés les différencient cependant des phages transducteurs du fait qu'ils encapsident rarement leur propre génome, et sont donc défectifs pour leur propre propagation sous forme de particules virales libres. Ils codent cependant, au moins, les protéines formant leur capsid. Ils fonctionnent comme des systèmes de transfert d'ADN génomique entre cellules, sans les effets négatifs souvent associés aux virus. Les **nanotubes** (ou **nanopodes**) sont des extensions membranaires (voir Chapitre 1) qui réalisent des ponts mettant en communication des cellules peu éloignées fixées sur un support solide. Plusieurs études récentes suggèrent que divers constituants intracellulaires (métabolites, protéines, ARNm et ADN plasmidique) peuvent être transférés *via* ces nanotubes. Ce processus pourrait donc représenter un mécanisme potentiellement important dans la diffusion de gènes de résistance à des antibiotiques. Les **vésicules membranaires**, présentes dans les trois domaines du vivant, constituent une autre modalité de communication intercellulaire. En permettant des fusions cellulaires, elles fonctionnent comme des cargos pour véhiculer des molécules enveloppées et ainsi protégées des aléas extracellulaires.

3 Réparation de l'ADN

L'ADN pouvant subir de nombreuses lésions dues à des facteurs divers (§ 1), l'ensemble du monde vivant a développé une panoplie de systèmes de réparation permettant de

détecter et d'éliminer ces dommages, contribuant ainsi à une limitation du nombre de mutations. Certains ont des cibles similaires, donc des rôles redondants. Chez *E. coli*, la chaîne de conséquences déclenchée suite à une irradiation UV résume assez bien la complexité de la réponse, même en cas d'une lésion non létale :

- arrêt quasi immédiat de la réplication et de la division ;
- dégradation locale de l'ADN, dont l'importance est fonction de la dose d'UV reçue ;
- réparation de la région touchée ;
- reprise de la réplication puis de la division une fois dégradation et réparation achevées.

Tout dommage de l'ADN peut également avoir un effet mutateur, car il induit l'expression d'une quarantaine de gènes appartenant à un système de « survie », dit SOS, dont le but premier est la réparation de l'ADN endommagé par expression accrue de plusieurs fonctions de réparation et de recombinaison. L'induction est déclenchée par la synthèse de deux protéines à effets antagonistes : l'une, RecA, impliquée aussi dans le processus de recombinaison homologue (§ 1.1), dégrade, par une activité protéolytique spécifique, l'autre protéine, LexA, le répresseur de l'ensemble du système SOS.

3.1 Les principaux systèmes de réparation

Le système de **réparation par excision de bases**, BER (*Base Excision Repair*), très efficace, est présent dans l'ensemble du monde vivant. Il prend en charge tout mésappariement, quelle qu'en soit la cause. Il fait intervenir une batterie de N-glycosylases spécifiques chacune d'un type d'anomalie, dont certaines possèdent une activité lyase qui leur permet d'éliminer aussi le désoxyribose-5'P. La correction se fait en plusieurs étapes : la base à éliminer est excisée, générant un site abasique ; le désoxyribose-5'P concerné est éliminé, créant un hiatus dans l'ADN, qui est comblé par l'ADN polymérase PolI ; la ligase ADN-dépendante rétablit la continuité de la séquence. PolI, au lieu d'insérer un seul nucléotide, peut parfois répliquer une séquence d'une dizaine de nucléotides, conduisant à la formation d'un court segment simple brin, qui est alors clivé par l'activité exonucléase 5' → 3' de cette même polymérase, avant l'achèvement de la réparation par l'ADN ligase.

Le système de **réparation par excision de nucléotides**, NER (*Nucleotide Excision Repair*), prend en charge les lésions issues de l'action de facteurs externes (agents chimiques ou radiations) après dégradation partielle de la région lésée. Dans le cas d'*E. coli* il met en jeu quatre protéines, UvrA, B, C et D, et PolI (voir Figure 5.7). Chez *E. coli* il a été observé que l'efficacité d'une mutagenèse induite par irradiation est très fortement diminuée (90 à 95 %) par des traitements inhibant la transcription. *In vivo*, pour une lésion sur un brin d'ADN en cours de transcription reconnue par le complexe UvrA₂-UvrB, l'ARN polymérase va jouer le rôle d'une sous-unité du complexe de reconnaissance des lésions, avec pour conséquence une réparation beaucoup plus efficace que pour une lésion similaire sur un brin non en cours de transcription.

Les systèmes **NER**, ou leurs équivalents, y compris la capacité de couplage à la machinerie de transcription, semblent quasi universels. La présence d'enzymes homologues à UvrA, B et C chez seulement quelques Archées mésophiles donne à penser que les gènes codant auraient été acquis par transfert horizontal (§ 2). La majorité des autres Archées possède des enzymes homologues aux protéines eucaryotes impliquées dans ce processus. Leurs mécanismes de détection des dommages et de mise à contribution de la machinerie de transcription n'ont pas été identifiés. *Sulfolobus solfataricus* ne montre pas de réparation plus efficace sur le brin transcrit que sur le brin non transcrit.

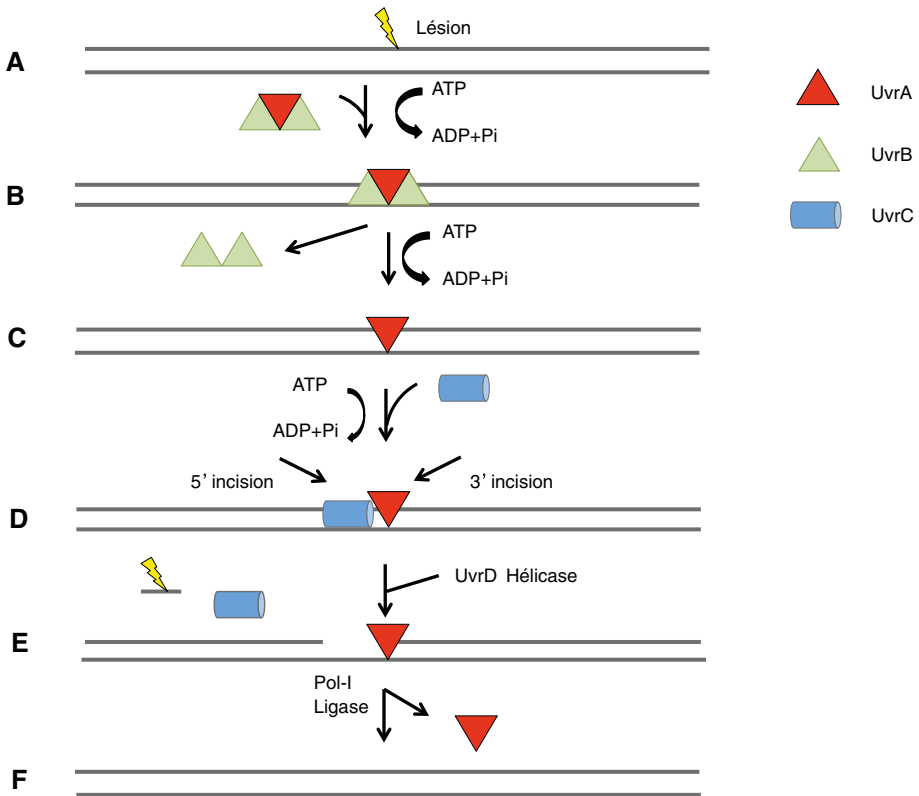


Figure 5.7 – Réparation par excision de nucléotides (NER)

La lésion (A) est reconnue par le trimère UvrA₂UvrB (B). UvrB seule reste associée à l'ADN lésé (C), interagit avec UvrC (D) et excise l'ADN de part et d'autre de la lésion, créant une région simple brin de 12-13 nucléotides. L'hélicase UvrD permet le relargage d'UvrB (E), et Pol-I et la ligase réparent la partie excisée (F).

La **réparation de mésappariements**, quelle que soit leur origine, peut être effectuée par un système spécialisé, **MMR** (*Methyl-directed Mismatch Repair*). Chez les

procaryotes, des mutations de ce système conduisent à un phénotype hypermutateur et hyper-recombinogène. Chez *E. coli* et quelques autres espèces bactériennes, une protéine, Dam (*Desoxy-Adénosine Methylation*), méthyle les adénines présentes dans les séquences GATC après leur réplication, le brin néosynthétisé étant donc transitoirement non méthylé (il est dit hémiméthylé), ce qui permet de l'identifier. C'est ce brin qui risque de porter des mésappariements résultant de la réplication. Chez *E. coli*, les mutants *dam* ont un phénotype mutateur et des doubles mutants *dam recA* sont non viables. Ces propriétés ont permis, à partir des mutants *dam*, d'identifier trois gènes, *mutH*, *mutL* et *mutS*, impliqués dans la réparation des mésappariements. Un complexe des trois protéines reconnaît une lésion sur le brin néosynthétisé, ce qui conduit à sa dégradation par MutH à partir de la séquence GATC non méthylée la plus proche. La région simple brin générée est protégée par des protéines spécifiques, puis réparée par PolI et l'ADN ligase.

Seuls quelques genres Bactériens possèdent une protéine MutH. Cependant, l'essentiel des étapes du système MMR décrites pour *E. coli* est actif chez la plupart des procaryotes et des Eucaryotes. La reconnaissance de brin se fait, sur le brin néosynthétisé, à synthèse discontinue, grâce aux coupures correspondant aux fragments d'Okazaki (voir Chapitre 4). Le système MMR, chez ces organismes, est associé à une structure du complexe de réplication, l'anneau coulissant (voir Chapitre 4), et le rôle de MutH dévolu à la protéine MutL, qui possède aussi une activité nucléasique. Chez la levure, la fréquence de mutations est dix fois plus élevée sur le brin à synthèse continue que sur l'autre.

3.2 Blocage des fourches de réplication et recombinaison

Les fourches de réplication rencontrent régulièrement divers obstacles (protéines telles que régulateurs ou complexes de transcription, lésions de l'ADN, erreurs de réplication). Les dimères chromosomiques ainsi générés, apparaissant avec une fréquence « naturelle » de 15 %, peuvent provoquer un arrêt provisoire ou définitif des fourches. La cellule doit résoudre ces structures en monomères, pour assurer une répartition équilibrée des chromosomes aux deux cellules filles. Le démantèlement des réplisomes, en cas de blocage irréversible, nécessite la mise en place d'un nouveau complexe de réplication. Dans la majorité des cas, il s'agit de blocages transitoires, résolus par l'action de trois protéines, PriA, B et C, non requises dans la réplication elle-même. La faible viabilité de mutants *priA*, comparativement à celle des mutants *recA*, a permis de définir l'implication de PriA dans le redémarrage de fourches bloquées. Ce processus fait intervenir, en outre, les complexes de réparation UvrA,B,C, et de recombinaison RecB,C,D. Ce dernier aurait pour rôle premier de maintenir fonctionnels les complexes de réplication, mais pourrait intervenir en cas de remaniements plus ou moins importants de l'ADN suite au redémarrage. Le brassage génétique consécutif n'en serait qu'un sous-produit. Le lien entre les deux processus de recombinaison et de réparation est courant chez les procaryotes. Il culmine dans le cas de *Deinococcus radiodurans*, une Bactérie hautement résistante aux radiations, lors du processus de réparation de son ADN après irradiation.

D'autres enzymes, des polymérases dites translésionnelles, mises en évidence chez *E. coli* (qui en possèdent deux) et présentes dans l'ensemble du monde vivant, jouent un rôle fondamental dans le déblocage des fourches de réplication. Étant dépourvues d'activité exonucléolytique, ces enzymes sont par nature mutatrices. Cependant ce dernier risque est moins préjudiciable aux cellules que la mort consécutive au blocage de la réplication.

4 Variabilité/anti-variabilité

Le compromis étroit que doit trouver toute espèce entre les forces tendant à préserver son identité génétique d'une part et la modifier de l'autre est particulièrement critique pour les procaryotes, leur état haploïde leur faisant subir directement les effets de flux génétiques résultant de mutations et des divers modes de TGH. Des systèmes de « protection » ont ainsi été développés.

L'observation que les Bactéries peuvent contrecarrer une infection virale a permis de découvrir deux systèmes qui reconnaissent un ADN exogène : la restriction-modification, qui détruit tout ADN (phagique, plasmidique ou autre) étranger, et le système CRISPR, une sorte de mémoire innée contre les infections virales.

4.1 Les systèmes anti-variabilité

Les systèmes de **restriction-modification (R-M)** de l'ADN permettent aux Bactéries et Archées de distinguer leur propre ADN (self) d'un ADN xénogénétique (non-self, celui de phages, plasmides ou autres) invasif, et de détruire ce dernier. Des complexes macromoléculaires s'en chargent, qui exercent deux activités opposées : l'une, dite de restriction, produit des coupures double brin dans la molécule d'ADN exogène (activité endonucléolytique), et l'autre, dite de modification, « marque » l'ADN self de manière à le différencier de tout ADN étranger, et simultanément à le protéger contre le processus de restriction en bloquant l'accessibilité à cette activité. Les deux activités fonctionnent donc obligatoirement de façon conjointe. Le marquage consiste en l'addition de résidus méthyl ($-CH_3$) sur certaines bases présentes au sein de courtes séquences définies de l'ADN : spécifiques de l'organisme et de chaque système R-M, elles constituent un signal d'identification.

Les systèmes R-M sont très répandus parmi les procaryotes. Les données de la génomique ont révélé leur présence dans plus de deux mille génomes. Plus de deux cents systèmes R-M, actuellement groupés en quatre classes principales, ont déjà été découverts – un nombre sûrement très sous-estimé, la génomique en prédisant environ 4 600 différents. Les enzymes fonctionnant dans de nombreux systèmes R-M, en particulier les endonucléases, ont été purifiées, leurs gènes isolés et clonés, permettant actuellement la production industrielle des enzymes correspondantes, dont la grande spécificité d'action en fait des outils indispensables dans les manipulations de génétique moléculaire.

Le système **CRISPR** (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) confère aux Bactéries et Archées une immunité héréditaire contre tout ADN exogène. Un fragment de l'ADN étranger stabilisé dans l'hôte lui sert de mémoire pour détruire toute nouvelle intrusion similaire. Un locus CRISPR est composé d'une série de séquences d'environ cinquante nucléotides chacune, directement répétées (DR), parfois plus de cent fois. Ces séquences, et leur nombre, sont spécifiques et conservées chez chaque espèce. Elles sont séparées par des séquences intercalantes différentes, d'origine virale, dites espaceurs (*spacers*). Lors de l'entrée d'un ADN exogène, un fragment de celui-ci est intégré au niveau d'une séquence CRISPR grâce à l'activité de protéines appelées Cas, codées par l'hôte. Ce fragment d'ADN servira de mémoire, à la manière de l'anticorps d'un système immunitaire, pour prévenir les conséquences d'une éventuelle invasion ultérieure par un ADN xénogénétique portant cette séquence. La région CRISPR, incluant les espaceurs, est transcrite en un ARN qui est ensuite clivé en petites séquences (crARN) contenant un espaceur et une partie des répétitions. Un ADN étranger qui porte cette même séquence mémoire entrant dans la cellule est reconnu par le crARN correspondant, avec lequel il forme un hybride ADN-crARN. L'ADN est clivé par une endonucléase (une protéine Cas), au niveau de son appariement avec le crRNA, empêchant ainsi son expression et/ou sa réplication.

Généralement, un unique locus CRISPR est présent par génome ; toutefois un nombre variant entre un et vingt, différant par leurs DR et leurs espaceurs, est assez commun. Certaines espèces en sont dépourvues. On a à ce jour répertorié douze familles de loci CRISPR, présentes dans environ 40 % des génomes des Bactéries séquencés et 90 % de ceux des Archées, chez lesquelles ils peuvent représenter plus de 1 % du chromosome.

Le système CRISPR-Cas, outre son importance biologique, a ouvert depuis une dizaine d'années un champ énorme d'applications en génomique moléculaire.

La **recombinaison** contribue à la variabilité des génomes, même si la nécessité d'une homologie entre les ADN impliqués en limite l'envergure. Elle fonctionne comme un système de reconnaissance d'ADN « self » et « non self ». L'échange entre molécules parfaitement homologues est évidemment sans effet sur la variabilité génétique. Le potentiel d'innovation d'un ADN xénogénétique est d'autant plus important que l'homologie est plus faible, cependant dans les limites de sa possibilité d'intégration dans le chromosome hôte. Le système de recombinaison homologue classique (§ 1.1) exige une homologie stricte sur au moins 30 à 50 b. Une divergence de 16 % réduit de 10^5 fois la fréquence de recombinaison, en raison notamment du fonctionnement des processus de réparation normalement associés, en particulier le système MMR (§ 3.1) qui tend à éliminer les régions non ou mal appariées. Cependant des processus de réparation défectueux peuvent favoriser la recombinaison malgré une homologie limitée. Des recombinaisons inter-espèces semblent effectivement possibles dans les conditions naturelles, les cellules isolées de ces habitats se révélant souvent mutées dans leur(s) système(s) de réparation.

4.2 Les stratégies anti-barrières

Certaines stratégies permettent de contrecarrer les barrières à l'intrusion d'ADN xéno-génétique. Ainsi le fonctionnement des systèmes de restriction peut être empêché à chacun des points critiques, par blocage transitoire des sites de restriction, par inhibition directe de l'enzyme de restriction, par modification de la séquence des sites de reconnaissance, ou encore par mystification de l'activité du système de R-M de l'hôte. Deux stratégies principales contournent les strictes conditions imposées par la recombinaison RecA-dépendante, permettant des recombinaisons non ou moins homologues. La première exploite la présence éventuelle aux extrémités du fragment d'ADN étranger de courtes séquences pouvant être reconnues spécifiquement par des intégrases ou des transposases d'EGA. La seconde correspond à un mécanisme particulier de recombinaison (dit de recombinaison facilitée par l'homologie) qui utilise une unique région d'homologie éventuellement présente à une des extrémités de l'ADN exogène. Enfin, certaines Bactéries ont pu développer des capacités de blocage de l'expression des gènes reçus par TGH, leur permettant ainsi d'annuler d'éventuels effets indésirables tout en maintenant ces séquences.

Les points clefs du chapitre

- 1 Les ADN présentent des mutations soit spontanées, à taux constant, résultant de processus naturels (erreurs des ADN-Pol, présence de FRO, recombinaison), soit résultant d'agents mutagènes externes.
- 2 Les mutations préexistent au moyen utilisé pour leur détection (Luria – Delbruck, 1943).
- 3 Des TGH (transferts génétiques horizontaux) fréquents participent à la variabilité génétique, selon trois processus principaux : un fragment d'ADN peut entrer nu (transformation), porté par un génome viral (transduction), ou introduit par un plasmide (conjugaison).
- 4 Les cellules ont élaboré des mécanismes de réparation contre cette variabilité, par excision de la base (BER) ou du nucléotide (NER), ou de la région (MMR) portant la lésion.
- 5 Des processus, souvent mutagènes, résolvent les dimères chromosomiques, non viables, apparaissant au cours de la réplication.
- 6 Une protection par reconnaissance et protection de l'ADN « self » (systèmes de restriction/modification) et par immunité contre des virus (CRISPR) contribue au maintien de l'identité génomique.
- 7 Un équilibre s'établit entre processus de variabilité et protection des génomes.



- 5.1 Quels sont les différents rôles de la recombinaison homologue ?
- 5.2 Quels rôles biologiques jouent les recombinaises site-spécifique ?
- 5.3 Pourquoi le bactériophage Mu a-t-il été déterminant dans l'étude du mécanisme de transposition ?
- 5.4 Quel problème pose le mécanisme de transposition de type « coupé-collé » de Tn5 ? En quoi, et comment, l'association de la transposition à la réplication permet-elle d'éliminer ce problème ?
- 5.5 Qu'entend-on par FRO et par quels processus métaboliques sont-ils générés ?
- 5.6 Les UV comme les rayons X sont des radiations endommageant l'ADN. Par quels mécanismes sont-ils mutagènes ?
- 5.7 Par quels mécanismes se réalisent les transferts génétiques chez les procaryotes ?
- 5.8 Par quel mécanisme le système NER permet-il la réparation de lésions provoquées entre autres par les UV ? Quel rôle joue l'ARN polymérase dans ce mécanisme ?
- 5.9 Par quel mécanisme peut-on régénérer une fourche de réplication qui conduirait à la mort cellulaire ?
- 5.10 Par quels mécanismes un procaryote peut-il préserver son génome de l'invasion par un ADN « étranger » ?

Introduction

Chaque cellule exprime son information génétique par le biais de protéines, dont la synthèse nécessite la transcription des gènes (passage de l'ADN à une forme en ARN), puis la traduction (passage du code ARN à la séquence en acides aminés équivalente). Les principes généraux en sont les mêmes dans les trois domaines du vivant, les constituants responsables de ces fonctions caractérisant chaque domaine et/ou organisme. À tout moment seule une fraction du patrimoine génétique est exprimée ; celle-ci change suivant les modifications des conditions de vie. Des signaux externes informent la cellule de ces variations, déclenchant son adaptation. Les processus impliqués chez les procaryotes, présentés ici, diffèrent de ceux de protistes, de type eucaryote classique.

Objectifs

- Connaître** les mécanismes de l'expression génique (transcription et traduction) et de sa régulation
- Identifier** les structures, effecteurs et enzymes permettant l'expression génique (opérateur, promoteur, région codante, opéron, ARN messager)
- Définir** les modes et les effecteurs de régulation de l'expression génique
- Expliquer** le fonctionnement de l'ARN polymérase, des mécanismes de transcription et traduction, et de régulation

Plan

- 1 Expression génique chez les procaryotes
- 2 Régulation de l'expression génique
- 3 Régulation via des transmetteurs de signal
- 4 Communications intercellulaires

1 Expression génique chez les procaryotes

1.1 La transcription chez les Bactéries

La transcription consiste à produire, pour chaque gène ou groupe de gènes, la réécriture de sa séquence ADN sous forme d'une autre molécule informative, un ARN simple brin, dit messenger (ARNm) (voir Figure 6.1). Le brin servant de matrice, ou brin transcrit, utilisé pour la synthèse de cet d'ARNm est dit non codant. L'ARNm, complémentaire de ce brin, porte la même information que le brin codant, avec substitution des T par des U

(et bien sûr du désoxyribose par le ribose). L'ARN polymérase (ARN-Pol), responsable de la synthèse des ARNm, fonctionne uniquement en direction $5' \rightarrow 3'$. L'enzyme des procaryotes est polyvalente : elle réalise la synthèse de toutes les classes d'ARN (ARNm, ARNt, ARNr), contrairement à celles des Eucaryotes, spécialisées pour la synthèse de chacun des types d'ARN. Le brin codant d'un gène peut se trouver sur l'un ou l'autre des deux filaments de l'ADN, si bien que l'orientation du brin transcrit, et donc celle de la progression de l'ARN-Pol, varie d'un gène à l'autre par rapport à celle de la répllication de l'ADN.

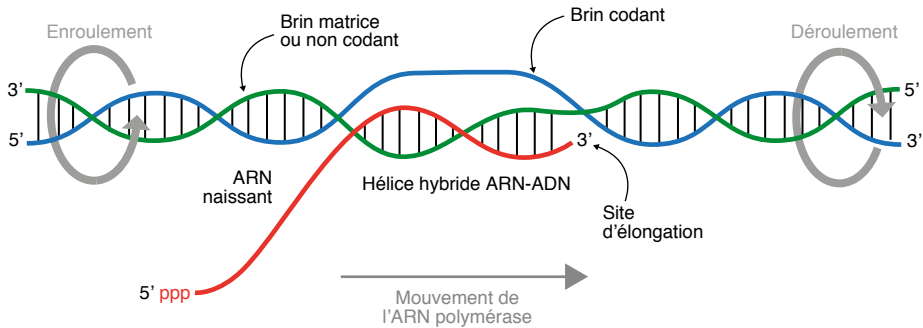


Figure 6.1 – Structure de l'ADN et de l'hybride ADN/ARN durant la transcription chez les Bactéries

Les ARNm sont en général très instables, caractéristique fondamentale pour les processus de régulation de l'expression génique. Chez les procaryotes l'organisation de nombreux gènes en **opérons** (voir Chapitre 4), structures ayant un promoteur unique, produit donc une seule molécule d'ARNm polygénique, dite polycistronique. Chez les Bactéries comme chez un certain nombre d'Archées, des gènes et/ou des opérons distants sur le chromosome, produisant chacun leur propre ARNm, peuvent être co-régulés ; ces structures, analogues à celles présentes dans les génomes d'Eucaryotes, sont désignées par le terme de **régulon**.

Deux éléments sont critiques pour la transcription, l'ARN-Pol et le promoteur.

a. La région promoteur

Ce dernier (voir Figure 6.2) est une région du gène non transcrite, en amont de la région transcrite, qui fournit à la sous-unité σ (dite aussi facteur sigma) de l'ARN-Pol l'indication d'où initier la transcription, et sur laquelle s'exerce l'activité de régulation de l'expression (§ 2). Chez la majorité des Bactéries le promoteur est constitué de deux séquences consensus, de chacune six nucléotides, localisées l'une en position -10 (dix nucléotides en amont du premier nucléotide transcrit, par convention $+1$; il n'y a pas de 0), et l'autre en position -35 . La première (dite « *TATA box* » ou boîte de Pribnow) a pour séquence consensus TATAAT, l'autre TTGACA.

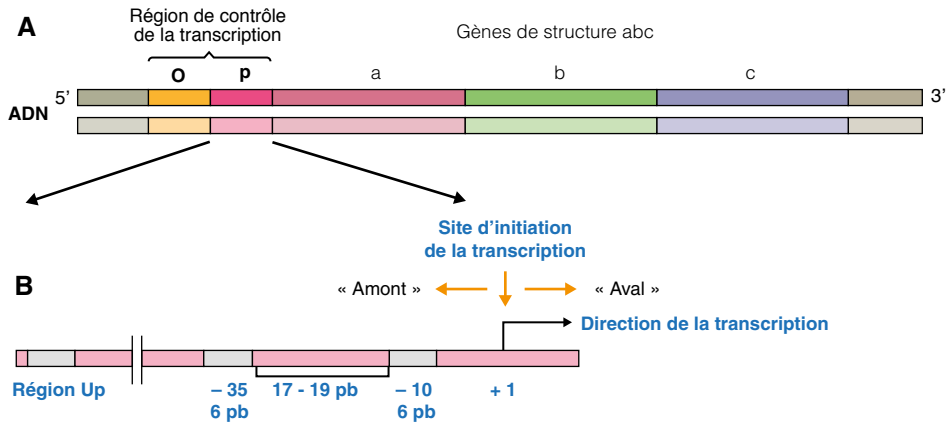


Figure 6.2 – Les régions de contrôle et d'initiation de la transcription

A. En amont des gènes de structure, les sites promoteur et opérateur. **B.** Le promoteur : sites de reconnaissance pour le facteur σ de l'ARN-Pol, et d'initiation de la transcription. La région Up (UPstream sequence element) renforce la liaison avec l'ARN-Pol.

En fait ces séquences varient d'une espèce à l'autre, et au sein d'un même organisme d'un promoteur à l'autre ; l'examen d'un grand nombre de promoteurs a défini la fréquence moyenne de chaque base à chaque position, soit $T_{80}A_{95}t_{45}A_{60}a_{50}T_{96}$ et $T_{82}T_{84}G_{78}A_{65}C_{94}a_{45}$, les chiffres en indices indiquant des pourcentages et les lettres minuscules des fréquences inférieures à 50 %. Chez la majorité des Bactéries, ces deux séquences sont nécessaires et suffisantes pour assurer une bonne reconnaissance par le facteur σ ; toutefois chez certains promoteurs, riches en A/T, une séquence, Up, en amont de -35, active la transcription soit en augmentant l'affinité de l'ARN-Pol pour l'ADN, soit en servant de site de reconnaissance à d'autres facteurs transcriptionnels. Ces variabilités de séquences conditionnent, outre la régulation de la transcription, la « force du promoteur ». En outre, pour chaque classe de promoteurs, des mutations ponctuelles de l'une des séquences, et/ou des changements du nombre de nucléotides les séparant, modifient (diminuent, bloquent, ou rarement augmentent) l'efficacité de la transcription. La diversité des familles de promoteurs a pour corollaire une diversité de familles de facteurs σ , chacune reconnaissant une famille de ces séquences. Ainsi *E. coli* dispose de sept facteurs σ différents. L'un d'eux, $\sigma 70$ (dit « de ménage »), permet la reconnaissance de la majorité des promoteurs de cette Bactérie. Un autre, RpoS (ou $\sigma 38$), présent uniquement en état de stress (telle la phase stationnaire), reconnaît des promoteurs qui lui sont propres, outre ceux reconnus par $\sigma 70$ (installant une compétition entre les deux facteurs). Les facteurs σH et σN , impliqués respectivement dans la réponse au stress thermique et dans le métabolisme de l'azote, ont leur classe de promoteurs spécifiques. Le nombre et le rôle de facteurs σ varient notablement d'une espèce à une

autre. Les Mycoplasmes, parasites intracellulaires d'Eucaryotes, n'en possèdent qu'un et les *Streptomyces* plus de soixante. Chez *Bacillus subtilis*, les facteurs σ sont les acteurs majeurs du processus de différenciation conduisant à la sporulation (§ 3.3). La fréquence de transcription d'un gène s'étend sur quatre ordres de grandeur (de rarement ou pas du tout à une fois par seconde au cours d'une génération). Conditionnée par la séquence de la région promotrice, elle est aussi modulée par de nombreux facteurs (§ 2), ainsi que par la localisation et l'orientation des gènes sur le chromosome par rapport au sens de réplication.

b. L'ARN-polymérase (ARN-Pol)

L'ARN-Pol intervient dans le contrôle de son positionnement sur le gène au démarrage de la transcription, l'allongement de la chaîne d'ARNm, et enfin la terminaison du processus. L'enzyme interagit aussi avec de multiples activateurs et répresseurs de la transcription (§ 2). L'holoenzyme (enzyme active) est constituée de six sous-unités (2α , 1β , $1\beta'$, 1σ , 1ω), dont chacune assure l'une de ces activités (voir Figure 6.3). La sous-unité ω est une protéine chaperon (protéine chargée d'assister la maturation ou le repliement correct d'une autre protéine) responsable de l'assemblage du noyau de l'enzyme. Le complexe 2α - β - β' de l'ARN-Pol, noyau de l'enzyme, a une faible affinité pour l'ADN double brin ; c'est son association avec la sous-unité σ – qui reconnaît le promoteur, formant alors l'holoenzyme – qui active l'**initiation** de la transcription. L'affinité de l'holoenzyme pour les séquences promoteurs est environ 10^7 fois supérieure à celle pour des séquences d'ADN sans promoteur. L'holoenzyme se lie à l'ADN autour du promoteur, formant un complexe dit fermé. L'enzyme déroule l'ADN de la région -10 à $+2$, formant un complexe dit ouvert, permettant la séparation des deux brins, et le démarrage de la synthèse de l'ARNm. L'ARN-Pol soude les sept ou huit premiers ribonucléotides ; le facteur σ , devenu inutile, se détache du complexe. La synthèse de l'ARN continue (**élongation**), en déroulant l'ADN en avant du point de synthèse, séparant les deux brins de l'hétéro-duplex, et le réenroulant après déplacement du complexe de synthèse. Ceci jusqu'à la phase de **terminaison**, qui se produit normalement lorsque l'ARN-Pol atteint, à la fin de la région codante, une région contenant un terminateur transcriptionnel. Les Bactéries possèdent deux types de terminateurs. Les terminateurs Rho-indépendants sont constitués d'une séquence nucléotidique riche en GC suivie en 3' d'une série de A (environ six). La séquence GC, palindromique, forme sur le transcrit une structure secondaire en « épingle à cheveux », qui bloque l'avancement du complexe de transcription, entraînant à la rupture des liaisons H entre la séquence polyA de l'ADN et le brin complémentaire polyU de l'ARN en cours de synthèse. La dissociation de ces deux molécules met fin à la transcription. La terminaison Rho-dépendante fait intervenir une hélicase, Rho, qui favorise la dissociation du complexe d'élongation. Aucun facteur de terminaison n'est connu chez les Archées, des études bioinformatiques récentes semblant cependant suggérer la présence de facteurs de type Rho.

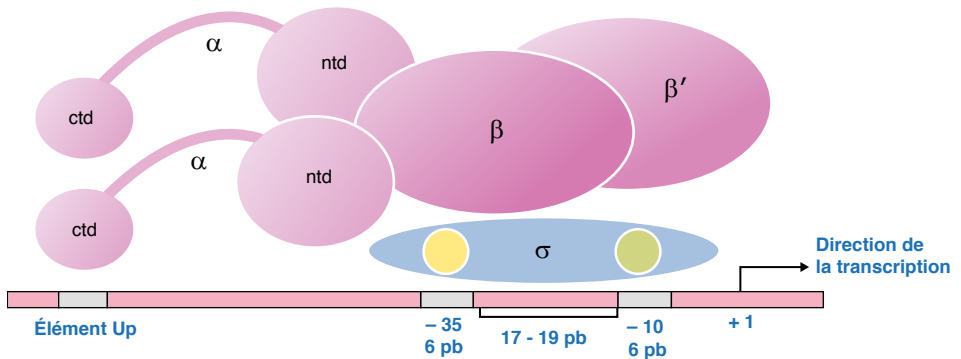


Figure 6.3 – Structure de l'ARN-polymérase bactérienne

L'enzyme noyau $\alpha_2\beta\beta'$ de l'ARN-Pol s'assemble avec la sous-unité σ pour former l'holoenzyme fonctionnelle. La sous-unité ω (non représentée) a pour rôle de structurer les sous-unités $\beta\beta'$. La sous-unité α se lie par ses extrémités C (ctd) et N (ntd) à l'ARNm et aux sous-unités $\beta\beta'$, respectivement. La sous-unité σ est responsable de la reconnaissance des séquences -35 et -10 du promoteur, via deux sites (en jaune et vert, respectivement). La région Up s'associe à l'ARN-Pol, soit par interaction directe avec l'extrémité C-terminale de la sous-unité α , soit par l'intermédiaire d'une protéine de liaison.

1.2 La traduction chez les Bactéries

La seconde étape du processus d'expression, la traduction, est le décodage de l'ARNm et la synthèse de la (des) protéine(s) correspondante(s). Chez *E. coli* ce sont environ 2×10^6 protéines (équivalant à 720×10^6 aminoacides) qui sont synthétisées à chaque génération (toutes les quarante minutes en conditions optimales). Pour réaliser cette extraordinaire performance, quantitative et qualitative, sont employés 20 000 ribosomes, dont chacun polymérise jusqu'à vingt aminoacides par seconde, ce qui requiert 40 % de l'énergie cellulaire totale. Contrairement aux Eucaryotes chez lesquels la transcription se fait dans le noyau et la traduction dans le cytoplasme, les procaryotes réalisent transcription et traduction de façon couplée dans le temps et dans l'espace.

Les ribosomes se fixent sur les molécules d'ARNm naissantes, non encore terminées, au niveau d'une séquence appelée RBS (*Ribosome Binding Site*, ou Shine-Dalgarno, SD), située trois à neuf nucléotides en amont du premier codon de la partie codante (voir Figure 6.4) ; celui-ci est un codon particulier, dit « initiateur », codant un acide aminé modifié, une N-formyl-méthionine (Fmet), qui participe au placement correct du ribosome. L'ARNm est aussi porteur, outre de la séquence de codage de la (des) protéine(s), de l'information définissant un site de terminaison de traduction. Ce site correspond à la présence sur l'ARNm, dans le même cadre de lecture, d'un autre codon particulier dit stop ou non-sens, ne correspondant à aucun acide aminé, et reconnu par une protéine de libération du ribosome. Trois codons sont utilisés dans ce rôle : UAA, UGA et UAG. La traduction requiert une série d'ARN, dits de transfert (ARNt), qui constituent les

composants essentiels du décodage de l'ARNm¹. Ce sont les « traducteurs » du code nucléotidique de l'ARN messager en acides aminés. Le décodage consiste en une reconnaissance par complémentarité entre un codon de l'ARNm et un anticodon (séquence de trois bases, ou triplet) de l'ARNt spécifique d'un acide aminé.

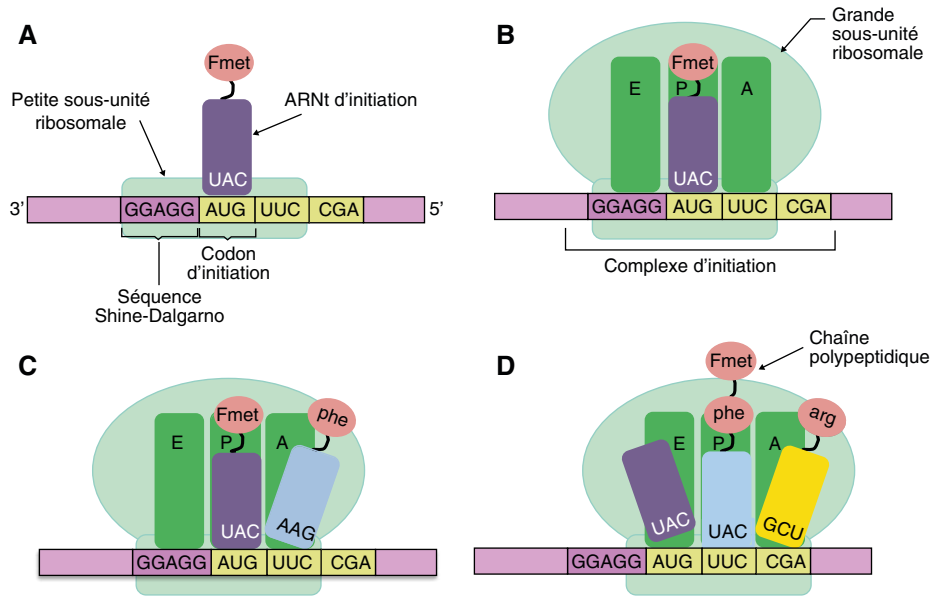


Figure 6.4 – Étapes de la traduction d'un ARNm

A. Fixation de la petite sous-unité du ribosome sur l'ARNm au niveau de la séquence Shine-Dalgarno, et d'un ARNt^{Fmet}-Fmet chargé au niveau du triplet d'initiation (AUG) ; toutes les protéines synthétisées commencent par une N-formyl-méthionine, puis déformylée ou excisée ensuite. **B.** Formation du complexe d'initiation par fixation de la grande sous-unité ribosomale, le site P au niveau de l'ARNt^{Fmet}-Fmet. **C.** L'ARNt chargé correspondant au triplet suivant (ici ARNt^{phe}-phe) est placé au site A. **D.** Une translocation de l'ARNm par rapport au ribosome conduit l'ARNt^{phe}-phe à entrer sur le site P. L'ARNt^{Fme} déchargé est déplacé vers le site E, d'où il sera libéré. Une peptidyl-transférase forme une liaison peptidique entre Fmet et phe. Le cycle continue pour les codons suivants, jusqu'à atteindre un codon non-sens du messager.

Les ARNt sont désignés par un exposant indiquant l'acide aminé reconnu (ARNt^{ala}, reconnaissant l'alanine), sigle suivi du nom de l'acide aminé quand cet ARN est chargé par cet acide aminé (ARNt^{ala}-ala). L'acide aminé Fmet possède son ARNt particulier (ARNt^{Fmet}). Le décalage entre les nombres d'ARNt, de codons disponibles et d'acides aminés (respectivement 47, 64 et 20 chez *E. coli*) s'explique par l'existence des codons stop et le fait que certains codons sont redondants (six pour leu, deux pour phe, etc.). Rappelons

1. Voir cours de Génétique ou de Biologie cellulaire

que le code est universel, à l'exception de certains organites d'Eucaryotes (voir Chapitre 1). Les ARNt, constitués de soixante-dix à quatre-vingt-dix nucléotides, présentent des structures secondaire et tertiaire très conservées au cours de l'évolution. La présence de trois principales boucles leur confère une forme en feuille de trèfle typique dont la tige (en double brin) porte le site accepteur sur lequel se fixe l'acide aminé. L'anticodon, qui reconnaît le codon sur l'ARNm, est situé sur la boucle centrale, opposée à la tige.

Dans les trois domaines du vivant les ribosomes sont constitués de deux sous-unités qui diffèrent en composition, structure et fonction (voir Chapitre 1). Chez les Bactéries, la sous-unité 30S est impliquée dans la lecture (ou décodage) de l'ARNm et la fidélité de la traduction. La sous-unité 50S porte la formation des liaisons peptidiques entre les acides aminés au fur et à mesure de leur incorporation (activité peptidyl-transférase), et est donc responsable de l'élongation de la chaîne peptidique. Les sous-unités équivalentes chez les protistes (40S et 60S) sont analogues à celles de tous les Eucaryotes. Le ribosome fonctionnel, résultant de l'assemblage des deux sous-unités, présente à l'interface de celles-ci trois sites de liaison, A pour l'ARNt chargé qui entre dans le ribosome, P pour le complexe peptide-ARNt (la chaîne polypeptidique en cours de synthèse encore associée au dernier ARNt en cours de transfert), et E pour l'ARNt désacylé (l'ARNt précédent, qui ne porte plus son acide aminé, celui-ci ayant été incorporé dans la chaîne peptidique) et prêt à être dissocié du complexe. L'initiation est une étape cruciale, puisque le complexe de traduction doit reconnaître la phase de lecture de l'ARNm, autrement dit identifier à partir de quelle base lire la séquence, et donc la succession des codons. La fin de la traduction se produit lorsque l'appareil de traduction rencontre un codon non-sens, reconnu grâce à des facteurs de terminaison qui forment des structures 3D proches de celle d'un ARNt. L'acide aminé de l'ARNt encore sur le site P se détache de son ARNt, ce qui libère le polypeptide. Les sous-unités ribosomales, dissociées de l'ARNm et l'une de l'autre, sont recrutées presque immédiatement pour une autre traduction. La Fmet initiale est soit clivée enzymatiquement, soit débarrassée du résidu formyl.

1.3 Transcription et traduction chez les Archées

Transcription et traduction chez les Archées montrent des caractéristiques proches de celles observées soit chez les Eucaryotes, soit chez les Bactéries. Les ribosomes des Archées sont de type 70S, mais apparaissent comme une version simplifiée de ceux des Eucaryotes, toutes leurs protéines étant communes au domaine Eucaryote (voir Chapitre 1). La plupart des gènes (50 à 70 %) sont organisés en opérons de deux ou trois unités. Contrairement à ceux des Eucaryotes, les ARNm des Archées sont généralement dépourvus d'introns. Les Archées possèdent une seule ARN-Pol, beaucoup plus complexe que celle des Bactéries, avec douze sous-unités, dont certaines sont structuralement et fonctionnellement semblables à celles de l'ARN-PolII des Eucaryotes. Comme chez les Eucaryotes l'ARN-Pol reconnaît une boîte TATA. Deux protéines recrutent la polymérase et forment un complexe de pré-initiation fermé. L'association d'un facteur d'initiation stimule la formation d'un complexe d'initiation ouvert, prêt à démarrer la polymérisation du transcrit. Les processus d'élongation et de terminaison

de la transcription sont peu caractérisés. Certains facteurs d'élongation homologues à ceux des Eucaryotes ont été identifiés. Le démarrage de la traduction présente des caractéristiques eucaryotes et bactériennes. Le couplage transcription/traduction (analogue à celui des Bactéries) n'a été mis en évidence que récemment. Comme chez les Eucaryotes l'ARNt initiateur porte une méthionine non formylée, et c'est une protéine analogue à celle des Eucaryotes qui le positionne sur le ribosome. Deux autres protéines fortement homologues aux protéines eucaryotes essentielles à la formation du complexe de démarrage, sont également présentes. En revanche d'autres facteurs présents chez les Eucaryotes participant à cette étape sont absents. L'élongation de la traduction utilise des facteurs d'élongation homologues des équivalents bactériens.

2

Régulation de l'expression génique

Le terme de régulation de l'expression génique regroupe une pléthore de mécanismes qui permettent à une cellule d'activer ou de réprimer l'expression d'un ou plusieurs gènes selon ses besoins. Ces systèmes permettent d'optimiser les synthèses cellulaires à moindre coût énergétique. Les méthodes d'analyse actuellement disponibles permettent d'avoir un tableau de l'ensemble des types de protéines ou d'ARNm présents dans une cellule à un moment donné, notions désignées sous les termes respectifs de transcriptome et protéome. *B. subtilis* cultivé sur différentes sources de nutriments, en état de stress ou pendant la sporulation, exprime une base de 3 % de ses séquences codantes. La majorité des autres gènes ne s'exprime que dans certaines conditions, définissant des transcriptomes spécifiques. Une cellule d'*E. coli* cultivée à 37 °C en milieu synthétique avec du glucose exprime environ deux mille types différents (son protéome), présents de quelques exemplaires à 10^5 copies et représentant approximativement la moitié des capacités codantes de son génome. Les premières descriptions de systèmes de régulation (utilisation de sucres ou biosynthèse d'acides aminés), réalisées chez des Bactéries, ont mis en évidence l'importance des mécanismes de contrôle transcriptionnel. Ces modes de régulation existent dans l'ensemble du monde vivant, avec des spécificités suivant les domaines et organismes. D'autres processus de régulation jouent sur la stabilité des ARN ou des protéines, l'existence de mécanismes épigénétiques, ces derniers encore peu documentés chez les procaryotes, ou des voies plus complexes de transmission de signaux (§ 3).

2.1 Régulation du démarrage de la transcription

a. Régulation négative : l'opéron lactose d'*E. coli*

L'exemple décrit ici, l'analyse d'un système de régulation au moyen de diploïdes pour les éléments régulateurs (promoteur, opérateur) et les protéine(s) impliqués, est devenu classique. L'utilisation du lactose, un β -galactoside, par *E. coli* met en jeu deux protéines principales, la galactoside perméase LacY, une protéine de la membrane interne qui assure le transport du lactose dans la cellule, et la β -galactosidase LacZ, qui hydrolyse le lactose

en ses deux sous-unités, le glucose et le galactose. Il s'agit d'un système **inductible** : ces enzymes ne sont synthétisées qu'en présence de molécules inductrices, le lactose bien sûr, mais aussi des dérivés de ce sucre. Parmi ces derniers, des inducteurs dits gratuits parce que non métabolisables (tels l'IPTG, isopropyl- β -thiogalactopyranoside) ont été un outil d'étude particulièrement précieux du fait que leur concentration, à l'inverse d'un inducteur métabolisable, reste constante et contrôlable, et qu'ils pénètrent dans la cellule sans le secours de la perméase. En présence de glycérol comme source de carbone, l'adjonction d'IPTG entraîne immédiatement la synthèse *de novo* de ces deux enzymes. Au taux maximal d'induction, la β -galactosidase peut représenter 7 % des protéines cellulaires. L'élimination de l'inducteur conduit à un arrêt quasi instantané de la synthèse des deux enzymes. Les deux gènes *lacZ* et *lacY* sont contigus et organisés en opéron (voir Figure 6.5) comprenant un troisième gène (*lacA*) non impliqué dans ce processus. Adjacent à cet opéron se trouve un gène, *lacI*, codant la protéine régulatrice du système.

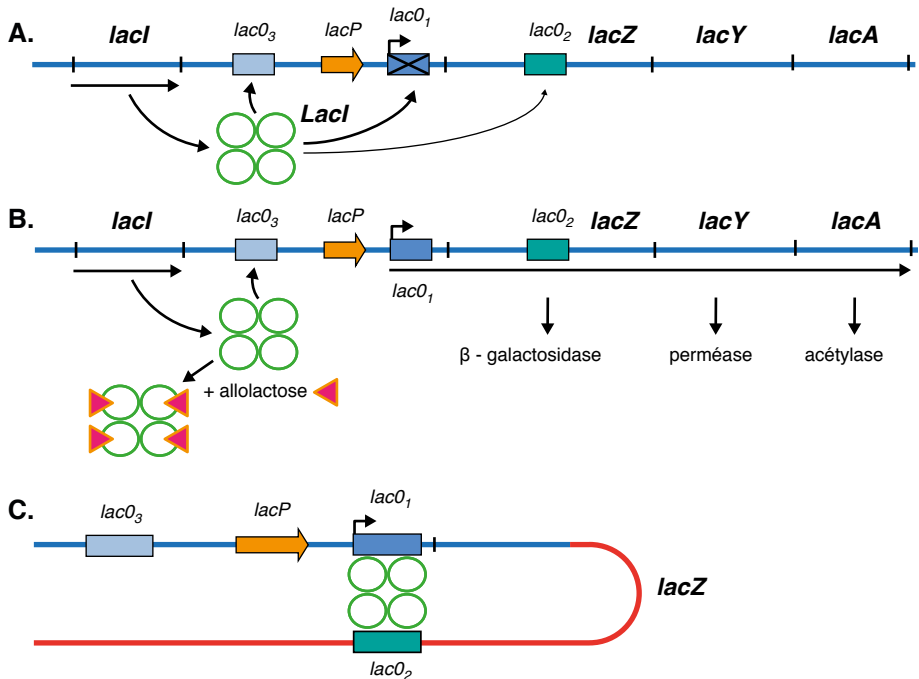


Figure 6.5 – Régulation de l'opéron *lac* chez *E. coli*

A. En absence de lactose, le répresseur LacI se fixe sur l'opérateur *lacO* sous forme tétramérique, et empêche la fixation de l'ARN-Pol sur le promoteur *lacP*. L'expression de l'opéron *lac* est réprimée. **B.** En présence d'inducteur (ici l'allolactose), la conformation du répresseur LacI est modifiée ; il ne se fixe plus à l'opérateur *lacO*. L'ARN-Pol peut se fixer au promoteur et y démarrer la transcription. L'expression de l'opéron *lac* est induite. **C.** En fait, trois sites de l'opérateur contribuent à la fixation du répresseur LacI. La fixation simultanée du tétramère sur les sites *lacO1* et *lacO2*, possible en raison de leur rapprochement grâce à une boucle de l'ADN, inhibe la transcription.

L'étude de la régulation de l'utilisation du lactose (F. Jacob et J. Monod, 1965) a été fondée sur l'obtention de mutants affectés dans ce processus, et sur la possibilité d'obtenir des diploïdes partiels construits à partir du plasmide F (voir Chapitre 5). Chez la Bactérie « haploïde », on peut sélectionner des mutants de régulation au phénotype prévisible : des mutants qui expriment les gènes de l'opéron même sans inducteur, appelés mutants constitutifs (^c), et d'autres qui n'expriment jamais ces gènes, bien que ceux-ci restent fonctionnels, appelés mutants sur-réprimés (^s). Des mutants des deux types affectent le gène *lacI*. On trouve également des mutants constitutifs en un site appelé opérateur, O, très proche du gène *lacZ*. L'analyse phénotypique de diploïdes partiels, portant des formes alléliques différentes de la région lactose sur le plasmide F libre dans le cytoplasme (F'*lac*) (voir Chapitre 5 et compléments web) a été déterminante pour comprendre le mécanisme de régulation sous-jacent, comme l'indiquent ces exemples :

Cas	Chromosome	F' <i>lac</i>	Phénotype	Conclusion
1	<i>lacI</i> ⁺ <i>lacZ</i> ⁺ Y ⁺	<i>lacI</i> ⁻ <i>lacZ</i> ⁺ Y ⁺	Lac ⁺	ensemble des gènes inductible ; <i>lacI</i> ⁺ dominant sur <i>lacI</i> ⁻
2	<i>lacI</i> ⁺ <i>lacZ</i> ⁺ Y ⁺	<i>lacI</i> ^s <i>lacZ</i> ⁺ Y ⁺	Lac ⁻	aucun gène exprimé ; l'allèle <i>lacI</i> ⁺ récessif sur <i>lacI</i> ^s
3	<i>lacI</i> ⁺ O ⁺ <i>lacZ</i> ⁺ Y ⁻	<i>lacI</i> ⁺ O ^c <i>lacZ</i> ⁻ Y ⁺	LacZ ⁻ Y ⁺	<i>lacZ</i> ⁺ est inductible ; <i>lacY</i> ⁺ exprimé constitutivement
4	<i>lacI</i> ^s O ⁺ <i>lacZ</i> ⁺ Y ⁻	<i>lacI</i> ⁺ O ^c <i>lacZ</i> ⁻ Y ⁺	LacZ ⁻ Y ⁺	<i>lacZ</i> ⁺ non exprimé ; <i>lacY</i> ⁺ exprimé constitutivement

L'interprétation est la suivante : en l'absence de lactose le gène *lacI* produit une protéine, diffusible, qui réprime l'expression de l'opéron par fixation au site opérateur. En présence de lactose, l'interaction de LacI avec le sucre inactive le répresseur, ce qui permet la transcription. Les mutants *lacI*⁻ produisent un répresseur inactif, ce qui permet à l'ARN-Pol de transcrire l'opéron en absence comme en présence de lactose : de tels mutants doivent être récessifs (cas 1). Les mutants *lacI*^s produisent un répresseur actif en l'absence comme en présence de lactose : de tels mutants doivent être dominants (cas 2). Les mutants O^c révèlent la présence d'un site de l'ADN permettant une interaction avec le répresseur qui conduit à l'inhibition de la transcription. Ces mutants ont perdu l'aptitude à fixer le répresseur : les gènes de l'opéron qui lui sont adjacents s'exprimeront de façon constitutive (effet cis dominant), alors que ceux présents sur l'autre structure génétique conserveront leur phénotype d'inductibilité (cas 3 et 4). En fait le répresseur, une forme tétramérique, reconnaît simultanément deux sites de l'opérateur, induisant la formation d'une boucle d'ADN qui empêche la reconnaissance du promoteur par l'ARN-Pol (voir Figure 6.5C). L'ajout d'inducteur entraîne une modification structurale (une transition allostérique) du répresseur, qui ne reconnaît plus l'opérateur, ce qui permet la transcription de l'opéron. En réalité, l'inducteur naturel de l'opéron lactose n'est pas le lactose mais un dérivé, l'allolactose, synthétisé par... la β -galactosidase ! Dans les cellules, il existe toujours un niveau basal d'expression de l'opéron qui assure

la mise en marche du système. L'utilisation d'inducteurs gratuits, tels l'IPTG, a permis d'éviter le problème posé par les mutants *lacZ⁻* qui, ne pouvant convertir le lactose en allolactose, se comportent donc comme des mutants de régulation. Le gène régulateur *lacI* est génétiquement très lié au système qu'il régule, mais cette situation n'est pas obligatoire dans la mesure où le répresseur est diffusible. D'autres systèmes, dont le système maltose (§ 2.1b) et l'opéron tryptophane (§ 2.1d), ne présentent pas cette caractéristique.

b. Régulation positive : le système maltose d'*E. coli*

Les gènes responsables du métabolisme de ce sucre et des maltodextrines (polymères de glucose) sont organisés en quatre opérons, dont trois codent les protéines nécessaires au transport et au métabolisme des substrats, le quatrième (en fait un seul gène, *malT*) codant le régulateur des quatre structures. L'inducteur est le maltotriose, un trimère de glucose. Des mutants de ce régulateur présentent les mêmes phénotypes, constitutifs ou sur-réprimés, que ceux isolés pour l'opéron lactose. En revanche, chez les diploïdes, les mutants constitutifs sont dominants alors que les sur-réprimés sont récessifs. En outre, parmi les sur-réprimés, on obtient des mutants de type non-sens, indiquant une perte de l'activité de la protéine régulatrice. Le régulateur, MalT, ne peut donc pas être un répresseur, mais doit être un activateur de la transcription. MalT, en présence de maltotriose, reconnaît un site opérateur spécifique présent en amont de chacun des quatre opérons, ce qui permet la mise en place efficace de l'ARN-Pol au niveau des promoteurs, et l'expression de l'ensemble des gènes. Puisque les quatre opérons répondent au même régulateur, ce système constitue un régulon.

c. Régulations multiples : la répression catabolique

Dans les deux systèmes précédents, en réalité, la présence d'inducteur ne suffit pas pour permettre l'expression des gènes concernés. Ainsi, en présence simultanée de lactose et de glucose, *E. coli* métabolise d'abord le glucose, et seulement après épuisement de celui-ci, le lactose : c'est le phénomène de diauxie. Un second système, un régulateur positif de transcription, se superpose aux systèmes spécifiques, les gènes *lacI* pour l'opéron lactose et *malT* pour le régulon maltose. Une protéine, Crp (*Cyclic-AMP Receptor Protein*) également appelée Cap (*Catabolite Activator Protein*), s'associe à l'AMP cyclique pour activer la transcription de ces systèmes, ainsi que d'une centaine d'autres, notamment la plupart des systèmes inductibles d'utilisation des sucres. Chez *E. coli* et d'autres Entérobactéries, la priorité donnée au glucose réside dans la faible concentration d'AMP cyclique en présence de ce sucre, concentration qui augmente en son absence. D'autres glucides peuvent exercer le même type d'effet, plutôt dénommé **répression catabolique par le carbone** actuellement. Des systèmes similaires ont été décrits chez *B. subtilis* et chez certaines Archées.

Parmi les nombreux systèmes de régulation multiple identifiés chez l'ensemble des procaryotes, le **système SOS** mis en jeu lors d'une lésion de l'ADN (voir Chapitre 5) active l'expression d'une trentaine de gènes, le **système Lrp** (*Leucine Responsive Regulatory Protein*) module en particulier des fonctions métaboliques liées au métabolisme

des aminoacides, et la **réponse stringente** conduit à une inhibition de la synthèse des ARN stables (ribosomaux et ARNt) lors d'une carence en aminoacides.

d. Atténuation : l'opéron tryptophane d'*E. coli*

Cet opéron de cinq gènes (*trpEDCBA*) impliqués dans la biosynthèse du tryptophane a *a priori* une structure tout à fait classique, avec un promoteur-opérateur en amont de *trpE*, et, non lié à l'opéron, le gène d'un répresseur, TrpR, actif sous forme tétramérique. L'inactivation du gène *trpR* conduit, comme prévisible, à une expression constitutive de l'opéron. La transcription reste cependant modulable par le tryptophane, avec une expression plus importante en l'absence qu'en présence de l'acide. En présence de tryptophane, un court ARN est transcrit, correspondant à la région amont de l'opéron et possédant une courte séquence codante, avec un codon d'initiation de traduction et un codon stop ; cet ARN permet la synthèse d'un peptide de quatorze aminoacides, appelé peptide leader, comprenant deux résidus tryptophane. La structure de cet ARN engendre un mécanisme dit d'atténuation, qui tire avantage du couplage entre transcription et traduction des procaryotes, les ribosomes se déplaçant à distance derrière l'ARN-Pol (§ 1.2). La partie aval de la région codante du peptide leader révèle la présence de trois blocs de séquences, 2 à 4, susceptibles de former des hybrides 2-3 ou 3-4, de structure tige-boucle (voir Figure 6.6), dont le dernier, suivi d'un groupe de U, est équivalent à un terminateur de transcription. Suivant la concentration de tryptophane disponible, les ARN^{trp} sont ou non chargés, permettant ou non une traduction rapide de la région codant le peptide leader dès le passage de l'ARN-Pol. Cela conditionne la progression des ribosomes, et ainsi les appariements possibles de la séquence 3 avec la séquence 2 ou avec la séquence 4.

Des mécanismes d'atténuation similaires sont documentés dans l'ensemble du monde procaryote. L'opéron histidine, chez *E. coli* comme de *Salmonella enterica*, ne présente que ce mécanisme régulateur, le peptide leader possédant sept histidines successives.

2.2 Autres niveaux de régulation

Certaines protéines peuvent participer à un contrôle de leur propre synthèse (**régulation post-transcriptionnelle**). Ainsi, entre autres, pour chacun de la vingtaine d'opérons codant les protéines ribosomales, l'une des protéines exerce un contrôle négatif sur la traduction du messager de son propre gène/opéron, par interaction avec le site RBS de l'ARNm. Ces protéines ont une plus forte affinité pour les ARNr que pour leur site RBS, et vont donc préférentiellement s'associer à ces ARN, contribuant à la formation des sous-unités ribosomales. Si aucun ARNr n'est « libre », une protéine en excès interagira alors avec son RBS, conduisant à une extinction de la traduction du messager correspondant. Ce système contribue donc à une expression équilibrée des différents constituants du ribosome.

Un système de régulation universel, qui présente beaucoup de similarité avec l'atténuation, fait intervenir des ARN régulateurs, dits **commutateurs ribonucléiques**

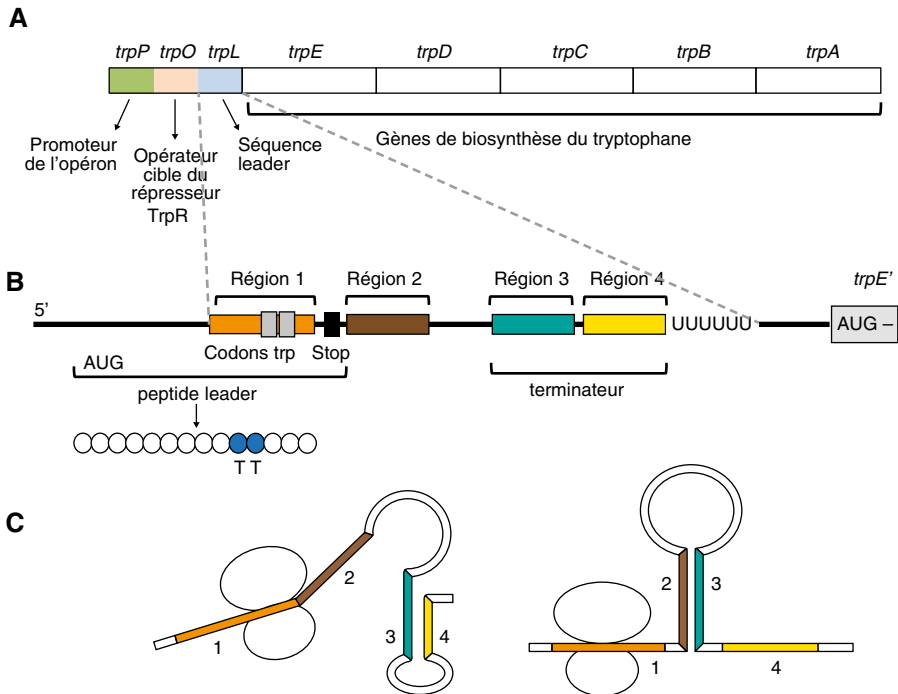


Figure 6.6 – Régulation par atténuation de la biosynthèse du tryptophane

A. Structure de l'opéron *trp*. *trpP*, promoteur ; *trpO*, opérateur ; *trpL*, séquence leader ; *trpEDCBA*, gènes de structure des enzymes de synthèse du trp. Le gène du répresseur TrpR, qui se lie à l'opérateur *trpO*, n'est pas génétiquement lié à l'opéron qu'il régule. **B. La séquence leader *trpL*** permet la synthèse d'un peptide de quatorze acides aminés dont deux trp contigus. **C. Le mécanisme d'atténuation.** À forte concentration en tryptophane, les ribosomes suivent de près (couplage transcription – traduction) l'ARN-Pol. La région 2 est alors masquée par le complexe de traduction, ce qui empêche l'appariement 2-3, et permet l'appariement 3-4, une structure tige-boucle suivie d'une séquence polyU, typique d'un terminateur de transcription. Il n'y a alors pas transcription de l'opéron. À faible concentration en tryptophane, la présence des deux codons trp dans la séquence leader retarde le complexe de traduction par rapport à la transcription. Il s'ensuit le démasquage de la région 2, qui peut alors s'apparier à la région 3, ce qui permet la poursuite de la transcription de l'ensemble de l'opéron.

(*riboswitch*). Il s'agit d'une séquence amont du site d'initiation de la traduction d'un messager, composée de deux éléments : une séquence fixatrice d'un ligand, dite aptamère, et un domaine régulateur. En l'absence de ligand, la structure de l'aptamère permet la traduction du messager ; son absence conduit à former soit une structure de type terminateur transcriptionnel, entraînant une terminaison de la transcription, soit une structure double brin piégeant le site RBS, aboutissant à une inhibition de la traduction.

Tous les organismes possèdent des **ARN régulateurs**, ou **sARN**, des petites molécules (cinquante à trois cents nucléotides) non codantes, pouvant former une structure secondaire en type tige-boucle (*E. coli* en dispose d'une centaine). À la différence de ceux des Eucaryotes, qui sont issus d'un ARN précurseur de grande taille, ceux des procaryotes sont codés par des gènes de structure classique, de taille analogue à l'ARN. Ces ARN ont pour cibles des ARNm, avec lesquels ils s'hybrident plus ou moins parfaitement, grâce à une protéine dite chaperon à ARN, Hfq, qui, d'une part protège le sARN des nucléases, et d'autre part aide à la recherche de sa ou ses cible(s) ARNm. L'interaction avec l'ARNm peut conduire à une inhibition de sa traduction par masquage du RBS, ou au contraire à une activation par modification de sa structure secondaire démasquant le RBS (par exemple le sARN qui interagit avec l'ARNm de RpoS [§ 1.1], activant son expression), ou encore à une déstabilisation de l'ARNm, qui est dégradé. C'est le cas d'un sARN, *ryhB*, intervenant dans l'homéostasie du fer chez *E. coli*. Bien qu'abondant, le fer est peu disponible dans les conditions naturelles en raison de sa très faible solubilité sous forme Fe^{3+} en atmosphère aérobie. D'autre part, la concentration en fer intracellulaire doit respecter des limites étroites, suffisante pour assurer sa fonction au niveau de nombreuses enzymes, mais assez basse pour éviter la génération de FRO, très nocifs (voir Chapitre 5). La régulation de l'utilisation du fer est sous le contrôle d'une protéine, Fur, qui, associée à Fe^{2+} , réprime de nombreux opérons, dont ceux impliqués dans le transport du fer, par action au niveau d'une séquence de ces promoteurs appelée boîte *fur*. Le sARN *ryhB*, synthétisé en absence de fer, inhibe l'expression de dix-huit opérons (plus de cinquante gènes), dont les gènes codant des protéines non essentielles ayant le fer comme cofacteur. Le gène *ryhB* possédant une boîte *fur*, son expression est inhibée par Fur- Fe^{2+} . De telles conditions permettent de réserver l'utilisation du fer aux protéines essentielles, telles que les cytochromes.

Une modulation de l'activité de certaines protéines peut être produite par des **modifications post-traductionnelles**, consistant ordinairement en méthylations ou phosphorylations. Ce mode de régulation, fréquent chez les Eucaryotes, existe également chez les procaryotes. C'est le cas de la cohorte de kinases et phosphatases modulant l'expression de protéines impliquées dans la sporulation chez *B. subtilis* (§ 3.3) ou du régulateur du cycle de reproduction de *Caulobacter crescentus* (voir Chapitre 3).

2.3 Le contrôle épigénétique

Ce terme était initialement utilisé pour désigner un ensemble des processus conduisant à une différenciation cellulaire, c'est-à-dire à des **changements héréditaires de l'expression génique** sans modification de la séquence d'ADN. Chez les Eucaryotes, relèvent de phénomènes épigénétiques les prions, l'*imprinting* (répression allélique de gènes maternels ou paternels), la modification des histones notamment par méthylation de lysines ou, chez la Paramécie, l'hérédité cytoplasmique maternelle (antigènes de surface) (voir Chapitre 1) et le caractère killer présent chez certaines souches, transmis de façon non mendélienne, résultant de la présence d'endosymbiontes bactériens dits particules Kappa.

Un fonctionnement à première vue « anormal » de l'opéron *lac* de *E. coli* relève d'un tel processus. On ajoute à une culture d'*E. coli* une forte dose d'inducteur de l'opéron *lac* (§ 2.1a), puis on sépare la culture en deux aliquotes, l'un fortement dilué immédiatement, et en conséquence non encore induit, l'autre fortement dilué après dix minutes. La première culture, comme prévu, ne présente pas d'activité des enzymes de l'opéron *lac* au cours des générations ultérieures. L'autre présente ces activités, et les maintient au taux maximal pendant de nombreuses générations. Cette culture diluée tardivement a eu le temps de synthétiser la perméase qui va maintenir un niveau intracellulaire élevé en inducteur, permettant ainsi l'expression de l'opéron *lac*. Ce système exprime de façon stable deux phénotypes à partir d'un même génotype.

La **méthylation de l'ADN** est le mécanisme épigénétique le mieux connu. Sa présence dans les trois domaines du vivant suggère une origine commune et un taux de conservation élevé. Chez *E. coli*, la méthylase Dam reconnaît les séquences GATC (voir Chapitre 5) qu'elle méthyle sur les résidus adénine des deux brins. Cependant, certaines séquences GATC incluses dans des sites reconnus par des protéines régulatrices, telles Fur (§ 2.2), Cap, et Lrp (§ 2.1c), peuvent rester non méthylées de façon stable, et transmises en l'état aux cellules descendantes. L'état de méthylation peut être altéré par des variations des conditions de croissance qui modifient la teneur en protéines régulatrices ou leurs propriétés de liaison à l'ADN. La variation de phase chez la souche uropathogène *E. coli* UPEC illustre ce fonctionnement, sans que son rôle dans la pathogénicité soit clairement établi. Un opéron, *pap*, impliqué dans la pathogénicité de cette souche, intervient dans la synthèse de piline, qui permet l'adhésion des bactéries aux cellules hôtes. La région régulatrice de cet opéron, qui possède deux séquences GATC, peut exister sous deux états stables, activé et non exprimé, correspondant à la méthylation de la séquence proche ou distale du promoteur, respectivement. Un régulateur de l'opéron, Lrp, masque l'une ou l'autre des deux séquences selon leur état de méthylation, modifiant la structure de l'ADN et ainsi l'action d'un autre régulateur, Cap, qui assure le positionnement de l'ARN-Pol.

Des analyses génomiques réalisées sur un ensemble de deux cent trente procaryotes, tant Bactéries qu'Archées, a révélé que 93 % d'entre eux montrent un ADN méthylé, avec huit cent trente quatre profils de méthylation reproductibles. Parmi eux, 48 % possèdent des méthylases dites orphelines, c'est-à-dire non associées à une enzyme de restriction (voir Chapitre 5), et reconnaissant des séquences palindromiques de quatre ou six paires de bases. Les motifs de méthylation sont compatibles avec des fonctions régulatrices.

Les **prions**, tel celui responsable de la maladie d'Alzheimer, sont des protéines qui acquièrent par mutation une **modification conformationnelle transmissible** à la forme non mutée, par agrégation avec cette protéine, donnant des corps amyloïdes. Ils sont présents dans l'ensemble du monde vivant, ayant été observés chez des protistes (la levure ou *Plasmodium*) et des procaryotes. Le prion de levure PSI^+ , connu de longue date, est une forme altérée d'un facteur de terminaison de traduction, altération qui résulte en son agrégation assortie de la diminution de son activité. Plus récemment a été identifié un domaine protéique de type prion dans un terminateur transcriptionnel

de la Bactérie *Clostridium botulinum*, fonctionnellement semblable à celui de la levure et pouvant donner des corps amyloïdes. Enfin, une analyse métagénomique portant sur des virus de procaryotes révèle l'importance de gènes de type prions, impliqués dans les interactions virus-procaryotes telles que l'attachement et la pénétration du virus, ce qui pourrait en faire des régulateurs de ces interactions.

3 Régulation *via* des transmetteurs de signal

3.1 Détection et transmission du signal

Des systèmes permettant la détection de signaux externes, leur transduction intracellulaire, et la mise en œuvre de réponse(s) appropriée(s) ayant en commun la phosphorylation transitoire de protéines, existent dans les trois domaines du vivant. Les procaryotes possèdent trois systèmes principaux de ce type, dont le mécanisme de phosphorylation, la distribution et les fonctions diffèrent.

Les **systèmes PTS** sont impliqués dans de nombreuses fonctions de régulation, tels le transport d'une vingtaine de sucres (voir Chapitre 3) et son contrôle, ou le chimiotactisme (§ 3.2). L'utilisation efficace des sucres par les procaryotes est liée à leur détection, puis à leur transport. Les systèmes PTS responsables de l'activation de leur transport possèdent des constituants communs, exposés sur la membrane cellulaire ou cytoplasmique, et un transporteur membranaire, spécifique d'un sucre. Cette enzyme est constituée de trois modules, dont deux sont en contact avec le cytoplasme et le troisième en partie exposé dans le périplasme, au contact direct du sucre à transporter. Le fonctionnement de ce système passe par une cascade de cinq transferts d'un groupement phosphoryl du phosphoénolpyruvate, du cytoplasme vers la membrane, simultanément à la translocation du sucre.

Les systèmes **kinases à sérine/thréonine (STPK)** ont été initialement découverts chez les Eucaryotes chez lesquels ils coordonnent des activités cellulaires très diverses (division cellulaire, prolifération, différenciation et apoptose). Leur activité passe par une cascade de phosphorylations résultant généralement en un changement, pour la protéine cible, de son activité enzymatique, sa localisation cellulaire ou encore son interaction avec d'autres protéines. La structure de ces protéines est caractérisée par la présence d'un domaine kinase cytoplasmique et d'un ou plusieurs domaines transmembranaires dont le fonctionnement reste peu compris, malgré de nombreuses observations soulignant leur importance. Des études génomiques récentes ont étendu l'existence de ces systèmes aux Archées et à de nombreuses Bactéries, chez lesquelles ils interviennent dans la régulation d'importantes activités cellulaires : métabolismes central (glucides, protéines, lipides) et spécialisé (synthèse d'antibiotiques ou d'autres molécules), division et différenciation (morphogénèse chez *Streptococcus pneumoniae*, germination de l'endospore chez *B. subtilis* [§ 3.3], développement des corps fructifères chez *Myxococcus xanthus*), ou encore virulence (chez des pathogènes tels *Yersinia pseudotuberculosis* ou *Mycobacterium tuberculosis*, avec ses onze types de STPK).

La régulation effectuée *via* les **systèmes de transduction du signal à deux composants (SDC)** met en jeu un couplage entre un signal spécifique reçu par une cellule et sa réponse (voir Figure 6.7). Le signal, un changement de l'environnement, peut être de nature chimique ou physique. La première molécule impliquée (senseur) est une histidine kinase (HK), généralement membranaire, constituée de deux domaines, récepteur et émetteur du signal. La réception du signal conduit à l'activation de l'HK, c'est-à-dire son autophosphorylation sur un résidu histidine conservé. L'HK activée assure ensuite le transfert du groupe phosphoryl à un résidu aspartate conservé du deuxième composant, le régulateur de réponse, RR, ce qui active cette protéine, lui permettant de se lier à l'ADN et d'activer la transcription d'un ensemble de gènes (régulon). Chez les Bactéries cette voie est le principal système de régulation des réponses à des changements externes. Le nombre de SDC différents est très variable, selon la complexité du cycle de reproduction des organismes (aucun chez *Mycoplasma genitalium* et *Candidatus Amoebophilus asiaticus*, des endosymbiontes à génome très réduit, quatre vingts chez *Synechocystis* sp., onze chez *Helicobacter pylori*, soixante chez *E. coli*, soixante-dix chez *B. subtilis*). Leur distribution phylétique est très inégale dans les trois domaines du vivant. Les données génomiques (2010) ont révélé leur présence dans 864 génomes de Bactéries sur 899 disponibles, seulement 50 % des génomes d'Archées, certains phylums en étant complètement dépourvus, et moins de 30 % des Eucaryotes, dont des champignons, en particulier des levures. Dans tous les cas la structure de base des deux composants HK et RR est très conservée ; toutefois leur structure modulaire a permis la construction de plusieurs dizaines de systèmes pouvant être adaptés à une variété de circuits de régulation et de signalisation cellulaire.

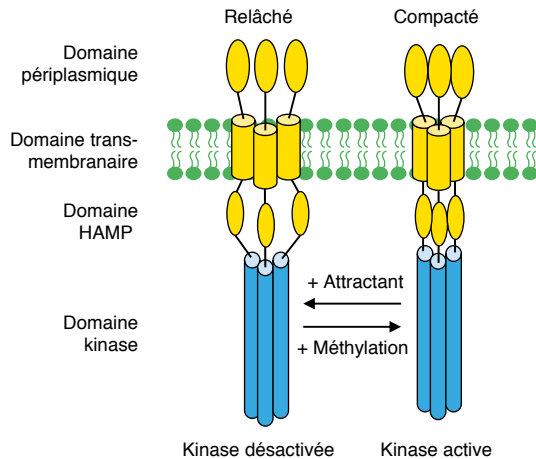


Figure 6.7 – Le senseur d'un système de régulation à deux composants

Ce système est constitué d'un domaine détecteur (senseur) d'un signal environnemental comportant un domaine périplasmique, un domaine transmembranaire de fixation et un domaine HAMP (*Histidine kinase, Adenyl cyclase, Methyl-accepting protein, Phosphatase*). La réception d'un signal induit un changement conformationnel du domaine HAMP, entraînant la phosphorylation du résidu spécifique histidine de la kinase (en bleu sur la figure).

3.2 Le chimiotactisme chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium*

La motilité dirigée, ou taxie, confère à de nombreux organismes procaryotes et eucaryotes la capacité de s'approcher ou de s'éloigner d'un stimulus physique ou chimique pour rejoindre un environnement favorable ou, au contraire, fuir un environnement hostile. Chez de nombreux pathogènes, cette capacité est essentielle dans certaines phases de leur cycle de développement ainsi que pour leur virulence. La mobilité est distincte du tropisme, qui concerne exclusivement les organismes fixés (le géotropisme, positif ou négatif, oriente la croissance des racines vers le sol et des tiges vers le haut, respectivement ; l'héliotropisme du tournesol, *Helianthus tuberosus*, oriente la fleur vers la lumière solaire). Les organismes détectent des gradients de nombreux types de paramètres chimiques (chimiotaxie) ou physiques (magnétotaxie, aérotaxie, respectivement le champ magnétique, l'atmosphère). Les signaux détectés sont transmis à des récepteurs intracellulaires par des voies de transduction, entraînant une réponse adaptative.

La chimiotaxie permet aux organismes de se diriger vers des sources d'attractants, ou de s'éloigner de produits potentiellement nocifs (acides gras, alcools, cations divalents). Le système le mieux caractérisé est celui d'*E. coli* et de *S. typhimurium*, qui utilisent le réseau flagellaire comme organe de déplacement (voir Chapitre 1). Un système de senseurs transmembranaires, organisé surtout au niveau d'un pôle cellulaire, détecte la nature et la concentration des agents externes, ou ligands, et le transmet au moteur du flagelle (voir Figure 6.8). L'élément central de la détection des signaux est un complexe protéique transmembranaire, MCP (le senseur) – CheW (un adaptateur) – CheA (une histidine kinase) et CheY (une protéine cytoplasmique accepteur d'un groupement phosphoryl, capable de se lier au moteur du flagelle). La présence/absence d'un signal, donc d'un ligand sur MCP, entraîne une chaîne de réactions résultant en une modification du type de mouvement du flagelle, en sens antihoraire (permettant une course, en vue d'un rapprochement vers un attractant ou d'une fuite devant un répulsif), ou en sens horaire (favorisant le mouvement de culbute, donc un déplacement aléatoire). Les variations du niveau de méthylation de MCP constituent la clef du système. En outre la courte durée de vie de CheY phosphorylée (dix secondes) entraîne une réaction rapide des cellules aux changements de concentration du ligand. En absence d'attractant ou de répulsif les cellules maintiennent un niveau intermédiaire de phosphorylation de CheA et CheY, ce qui produit un équilibre entre les phases de course et de culbute.

3.3 La sporulation chez *Bacillus subtilis*

Dans des conditions défavorables (voir Chapitres 2 et 3) certains organismes (uniquement des Bactéries, semble-t-il) sont capables de survivre sous une forme dormante, ou spore. Ce processus est différent de celui, aussi dit de sporulation, de certains protistes (tels les champignons ascomycètes), spécifiquement associé à la reproduction sexuée. *B. subtilis*, en condition de carence nutritive, peut enclencher, de façon exclusive, la voie de la compétence (§ 4.1) ou le processus de sporulation. Ce dernier est un processus long (environ dix heures dans les conditions optimales en laboratoire), coûteux en énergie

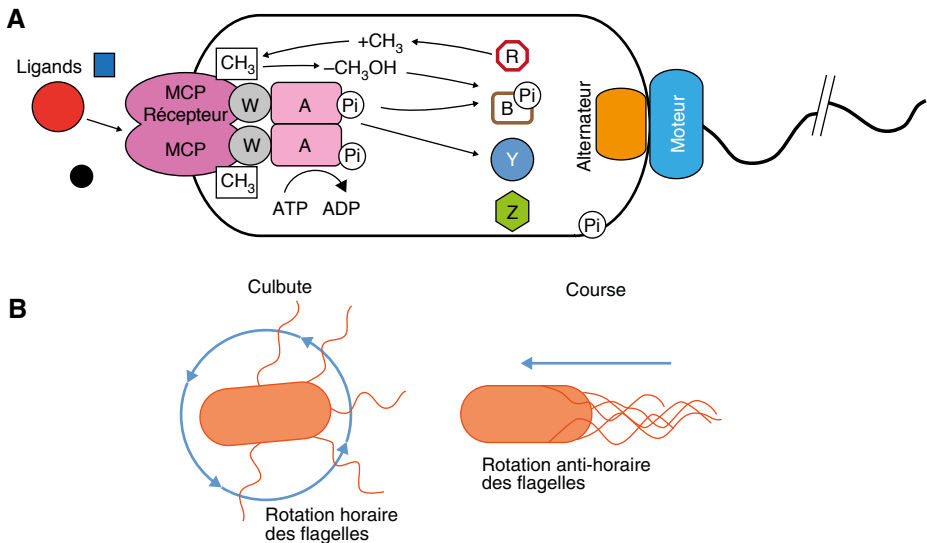


Figure 6.8 – Mouvement et réponse chimiotactique

A. Régulation du chimiotactisme. Le récepteur du signal est un complexe protéique transmembranaire, MCP₂-W₂-A₂. MCP (*Methyl-accepting Chemotaxis Protein*), le sensor, capable aussi d'accepter un groupement méthyl ; CheW, un adaptateur du complexe ; CheA, une histidine kinase ; CheY, accepteur d'un groupement phosphoryl. MCP répond aux variations de concentration du ligand via son niveau de méthylation, sous l'effet respectif des méthyltransférases CheR et CheB. Un signal lié à la forme méthylée de MCP et transmis via CheW active l'autokinase CheA. Cette protéine, alors phosphorylée, transfère le phosphate à CheY. CheY phosphorylée diffuse dans le cytoplasme et se lie à l'inverseur de rotation du moteur à la base du flagelle, induisant une rotation antihoraire, qui déclenche la course de la cellule. CheY est très rapidement déphosphorylée par la phosphatase CheZ ; l'induction de ce mouvement ne dure que tant que le signal est transmis par MCP. CheA peut aussi transférer le groupe phosphoryl à CheB, qui est activée et élimine alors les groupes méthyl de MCP (sous forme de méthanol), réinitialisant le transducteur dans le mode « détection ». La méthylation, réversible et de courte durée, de MCP, en réponse aux variations de concentration du ligand, est donc l'étape clef du système, contrôlant l'activation et la durée de chaque phase. Les majuscules W, A, Y, R, B, Z désignent les différentes protéines Che. **B. Les deux modes de déplacement.** Durant la rotation horaire les flagelles sont déployés autour de la cellule, leurs actions s'annulant ; la cellule culbute ou tourne sur elle-même, ce qui lui permet de se réorienter. Durant la rotation antihoraire, les flagelles s'assemblent en faisceau qui fonctionne comme un organe de propulsion, poussant la cellule vers l'avant.

et surtout irréversible. Il se manifeste par une division asymétrique avec pour résultat deux cellules restant associées, la cellule mère, de grande taille, et la pré-spore, plus petite (voir Chapitre 3). Il est déclenché par l'activation, par phosphorylation, d'un régulateur transcriptionnel, Spo0A, qui contrôle directement l'expression de cent vingt et un

gènes, dont l'ensemble de ceux impliqués dans la sporulation. Cette phosphorylation est très précisément régulée par le biais d'un phospho-relais faisant intervenir différentes kinases qui réagissent en réponse à des signaux métaboliques. Le groupe phosphoryl est transféré, *via* ces protéines, au récepteur final Spo0A. Les protéines du phospho-relais sont également contrôlées par des phosphatases qui elles aussi réagissent à des signaux métaboliques, ce qui fait du système un ensemble très finement régulé. Spo0A activé déclenche la programmation de la sporulation par la synthèse séquentielle de plusieurs facteurs sigma : σ^H , commun aux deux cellules, puis, chronologiquement : σ^F (pré-spore), σ^E (cellule mère), σ^G (pré-spore), σ^K (cellule mère), chacun contrôlant l'expression de gènes différents dans leur compartiment propre. La sporulation est donc le résultat d'un dialogue entre deux cellules, la cellule mère destinée à mourir par autolyse, et la future spore destinée à assurer la survie de la population soumise à carence. Si les processus sont similaires, cependant chaque espèce bactérienne sporulante possède ses spécificités propres vis-à-vis des facteurs déclenchant la germination. Chez *B. subtilis* la germination de la spore est déclenchée par certains métabolites tels que des aminoacides.

4

Communications intercellulaires

4.1 Quorum sensing

Jusqu'au début des années 1970, il était implicitement admis qu'une population de micro-organismes était homogène, chaque individu agissant pour son propre compte, sans intercommunication. Il a été depuis établi que, dans leur ensemble, non seulement ils s'adaptent à leur environnement physico-chimique, mais qu'ils ne sont pas sourds à la présence d'autres organismes avec lesquels ils cohabitent. Cette perception passe par des systèmes connus sous le nom de quorum sensing (QS), à l'œuvre dans nombre d'interactions pouvant impliquer des organismes des trois domaines du vivant, suivant des modes opératoires variés. La première mise en évidence de QS a concerné le phénomène de **bioluminescence**, une propriété propre à un organisme ou réalisée par une Bactérie hôte, comme chez certains poissons ou calamars, dans le but d'attirer des proies ou de se camoufler vis-à-vis de prédateurs (voir Chapitres 2 et 7).

Aliivibrio fischeri est ainsi hôte de l'organe lumineux du poisson *Photoblepharon palpebratus*. Cette Bactérie à Gram⁻, cultivée en culture pure, non associée à son hôte, montre une courbe de croissance classique (voir Chapitre 3). La bioluminescence apparaît de façon « explosive » à partir d'une certaine densité bactérienne. L'ensemble des gènes impliqués dans ce processus est organisé en un opéron, *lux*, (voir Figure 6.9), contrôlé par deux éléments régulateurs : une protéine, LuxR, codée indépendamment et une molécule dite auto-inducteur, une acyl-homosérine-lactone (AI-1), codée par le gène *luxI* de l'opéron *lux*. À faible concentration bactérienne, la production limitée d'AI-1 reflète la faible expression de l'opéron *lux*. À forte concentration bactérienne, la teneur

en AI-1 atteint un niveau suffisant pour s'associer à LuxR, qui active alors la transcription de l'opéron *lux*, conduisant à une expression massive de la luminescence. Chez tous les organismes présentant le même type de régulation, une homosérine-lactone particulière est impliquée, avec une forte spécificité pour « son » régulateur, ce qui est en faveur d'une action essentiellement intra-spécifique.

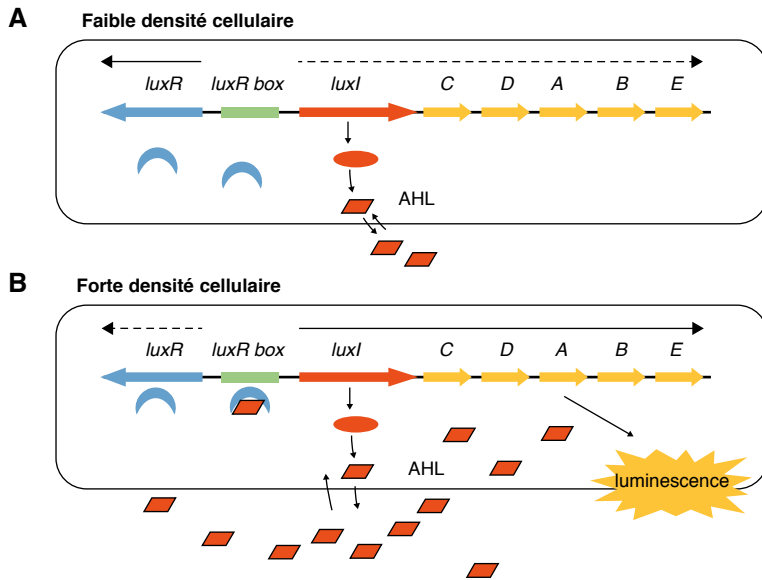


Figure 6.9 – L'opéron *lux* d'*Aliivibrio fischeri* et sa régulation

Expression constitutive à faible niveau de *luxI*, premier gène de l'opéron *lux*. Faible production de AHL (Acyl Homosérine Lactone). **B.** Accumulation de AHL qui, à partir d'un niveau seuil, associé au produit de *luxR* active l'opéron *lux*, entraînant une augmentation explosive de la luminescence.

a. Les systèmes QS des Bactéries à Gram⁻ pathogènes

La stratégie infectieuse de **Bactéries à Gram⁻ pathogènes** (du monde animal ou végétal) inclut un processus QS, les différences notables portant sur le nombre de couples auto-inducteur/régulateur et sur leur chronologie d'action. L'infectivité d'*Erwinia carotovora*, dont la pathogénèse nécessite la synthèse d'exo-enzymes (protéases, cellulases, pectinases), met en jeu un système QS avec **un seul couple auto-inducteur/régulateur**, très semblable à celui de *A. fischeri*. C'est donc une forte concentration d'AI-1 qui entraîne l'expression de la virulence, ce qui revient à n'exprimer le potentiel pathogène qu'à partir d'une concentration bactérienne suffisante pour conduire à une infection victorieuse. Certaines espèces d'*E. carotovora* produisent un antibiotique, le carbapénème (une β -lactamine), dont la synthèse est sous le contrôle du même inducteur, associé à un autre

régulateur. Cet antibiotique pourrait servir à éliminer d'autres espèces bactériennes susceptibles de profiter des exo-enzymes d'*Erwinia*. *Vibrio harveyi*, commensale et/ou pathogène opportuniste d'animaux marins divers, met en jeu **en parallèle trois systèmes QS**. Elle synthétise trois auto-inducteurs qui, associés chacun à l'une de trois protéines régulatrices distinctes, agissent sur le même régulateur positif de l'expression des gènes de virulence, LuxO. Une basse concentration en auto-inducteur aboutit à la phosphorylation de LuxO, ce qui permet la synthèse de cinq ARN régulateurs (§ 2.2). Ceux-ci se complexent à l'ARNm de LuxO, provoquant sa dégradation, et bloquant ainsi l'établissement de la virulence. À forte concentration en bactéries, et donc en auto-inducteur, LuxO reste non phosphorylé, avec pour conséquence l'expression des gènes de virulence. Ce système un peu compliqué pourrait avoir pour rôle de détecter et de prévenir l'effet de bruit de fond d'auto-inducteurs exogènes potentiels présents chez l'hôte infecté. *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste, notamment chez des malades atteints de mucoviscidose, chez lesquels elle forme des biofilms pulmonaires. À une certaine densité cellulaire, la synthèse d'un auto-inducteur et de sa protéine cible activent **en cascade un premier système QS**, lequel déclenche l'expression d'un deuxième couple auto-inducteur/régulateur, donc d'un **deuxième système QS**, conduisant à la formation de biofilms (§ 4.2 ; voir Chapitre 2).

b. Les systèmes QS des Bactéries à Gram⁺

Dans les systèmes QS des **Bactéries à Gram⁺**, l'auto-inducteur n'est pas une homosérine-lactone, mais un oligopeptide. *Staphylococcus aureus* présente une stratégie de **pathogénicité en deux étapes** : à basse concentration les bactéries adhèrent pour former des micro-colonies, structures denses en cellules qui déclenchent un processus de QS suite à la synthèse d'un octapeptide, couplé à un système à deux composants (§ 3.1). L'autophosphorylation du composant membranaire de ce système démarre une suite de réactions aboutissant à la répression des protéines d'adhésion aux tissus de l'hôte, et à la synthèse des protéines de virulence (toxines et protéases). Il existe quatre souches de *S. aureus*, dont les auto-inducteurs diffèrent. Lors d'une infection, la présence de l'auto-inducteur de la souche infectante inhibe compétitivement la mise en place des trois autres souches. *B. subtilis*, en cas de stress, est devant un choix **alternatif, sporulation versus compétence** (§ 3.3 ; voir Chapitre 3). Le choix vers l'une ou l'autre voie est déterminé par deux peptides, ComX et CSF, dont le jeu est régi par un système QS. ComX provoque l'autophosphorylation d'une protéine régulatrice, déclenchant ainsi une chaîne de réactions qui induit la synthèse de l'ensemble des gènes de compétence (régulon *com*). Le comportement de CSF, un peu plus complexe, passe par sa sécrétion dans le milieu, puis sa ré-internalisation. À basse concentration, CSF favorise indirectement, par un jeu de répresseurs, la compétence, alors qu'à haute concentration, par un autre jeu de régulateurs à effets négatifs, il inhibe la voie vers la compétence et favorise la sporulation. Seule des Bactéries à Gram⁺, *Streptomyces* utilise une γ -butyro-lactone comme inducteur, laquelle, liée à un régulateur, est responsable de la synthèse de métabolites dits spécialisés, dont les antibiotiques, produits par ces souches.

c. Des QS chez les Archées

Des phénomènes de type QS ont été caractérisés récemment chez quelques **Archées**. *Methanosaeta harundinacea*, une Euryarchée, produit un auto-inducteur (une homosérine-lactone) agissant à partir d'une certaine concentration sur un régulateur transcriptionnel. Aucun processus de type QS n'a été caractérisé chez les Crenarchées. Compte tenu de la faible fréquence de ces mécanismes chez les Bactéries, il se peut que l'échantillon d'Archées étudié soit trop faible, ou que les molécules auto-inductrices n'aient pas été reconnues car différentes de celles identifiées par ailleurs.

d. Processus de QS inter-espèces

Des processus de QS peuvent faire intervenir des communications inter-espèces *via* l'auto-inducteur. La production d'un inhibiteur d'homosérine-lactone d'autres espèces (dont *E. carotovora*) par *B. subtilis*, dont le système QS n'utilise pas ces molécules, pourrait être un mode de défense. Une autre acyl-homosérine-lactone, AI-2, produite dans les conditions naturelles par des organismes variés, pourrait constituer un senseur de l'environnement à large spectre. Ce produit, à l'inverse d'autres homosérine-lactones, n'est internalisé que grâce à un système de transport membranaire, pour lequel des récepteurs ont été identifiés chez plusieurs espèces, ouvrant la voie à des relations interspécifiques (on parle d'« eavesdropping », une forme d'écoute de voisinage). Des Bactéries telles que *P. aeruginosa*, *Rhodobacter capsulatus* et *Rhodobacter spheroides*, ne synthétisent pas ce produit mais possèdent un senseur de sa présence. De même, on pourrait envisager un rôle d'*E. coli* dans la pathogénèse de *V. harveyi*, deux hôtes de l'intestin. AI-2 produit par *E. coli* peut être perçu par *V. harveyi*, déclenchant sa pathogénicité. La production d'AI-2 par *V. harveyi* peut déclencher un système QS. Des cas d'interaction Eucaryote/procaryotes sont aussi documentés. L'algue marine *Delisea pulchra* produit des furanones, analogues de AI-1, capables d'inhiber des systèmes QS. De même la légumineuse *Medicago truncatula* (voir Chapitre 7), en réponse à certaines homosérine-lactones bactériennes de type AI-1, synthétise des facteurs stimulant cette synthèse et inhibant celles d'homosérine-lactones de type AI-2, favorisant ainsi les espèces bactériennes possédant un système QS AI-1-dépendant.

e. Le quorum quenching

Ces interactions interspécifiques suggèrent la possibilité de stratégies de lutte antimicrobienne grâce à la production d'AI, ce que désigne l'expression quorum quenching (extinction du quorum), avec l'avantage majeur que ce processus n'élimine pas la Bactérie sensible et devrait diminuer notablement l'apparition de mutants résistants. Quelques exemples d'applications potentielles : *B. subtilis* inhibant la pathogénicité d'*E. carotovora* quand ces deux espèces se développent sur du tabac ou de la pomme de terre ; l'administration efficace, dans un système modèle de souris, d'antagonistes de AI-1 de *S. aureus*, ou de furanones de *D. pulchra* (bien que leur haute toxicité ne permette pas leur utilisation thérapeutique) ; l'ajoène, une substance produite par l'ail, se révélant

antibactérien à toxicité réduite, par inhibition de la mise en place du QS chez *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

f. Mise en place et maintien d'un système QS

La mise en place et le maintien d'un système QS ont un coût énergétique, favorisant l'apparition d'organismes dits **tricheurs**, incapables de mettre en place le QS mais qui en profitent. Il en va ainsi chez *Agrobacterium tumefaciens* : au cours du processus infectieux le plasmide responsable de la virulence peut être perdu par une partie de la population, qui se développe en profitant des substances sécrétées par la population « intacte ». De même, *M. xanthus* produit des corps de fructification, sièges de la formation de spores dont une forte proportion est incapable de former ces corps de fructification. Dans ces deux cas, l'avenir de ces tricheurs est compromis dans la mesure où ils ne pourront pas assurer seuls la propagation de leur descendance. Le cas de *A. fischeri* est plus intrigant : une co-culture de la souche sauvage et d'un mutant affecté dans le QS de la bioluminescence chez le calamar conduit à l'élimination de la souche mutée. Quand *P. aeruginosa* se développe dans des biofilms, une forte proportion de la population est constituée de mutants affectés dans le processus QS-dépendant de la mise en place des biofilms ; toutefois, il a été montré *in vitro* qu'une trop forte concentration de ces bactéries mutantes s'avère en dernier ressort préjudiciable à l'établissement du biofilm, ce qui contribue au maintien de la population sauvage.

4.2 Les biofilms : conditions de mise en place

Si la majorité des connaissances sur les micro-organismes est issue d'études en cultures liquides homogènes, il est connu que la plupart d'entre eux ont tendance à adhérer à des surfaces, pouvant donner naissance à des structures appelées biofilms (voir Chapitre 2) où elles acquièrent de nouvelles propriétés. Dans le domaine de la santé, ces biofilms sont impliqués dans des complications thérapeutiques telles que infection de prothèses ou de cathéters, invasion des poumons par *P. aeruginosa*. La formation d'un biofilm commence par la fixation des cellules sur une surface, donnant naissance à une micro-colonie qui, à un certain stade (une certaine densité) produit diverses substances (exo-polysaccharides, acides nucléiques, protéines) constituant la trame du biofilm. Du biofilm mûr peuvent se détacher des cellules pouvant à leur tour coloniser d'autres surfaces.

Chez les **Bactéries**, l'étude génétique de certains systèmes a démontré l'intervention de plusieurs facteurs dans l'établissement et/ou le maintien des biofilms. Dans les deux cas les mieux étudiés, la mise en place du biofilm met en jeu des structures de la paroi bactérienne (flagelles et pili pour *P. aeruginosa*, curli et acide colanique pour *E. coli*). Un processus de QS est déterminant dans le maintien du biofilm. Intervient également le di-GMP cyclique, qui agit comme signal intracellulaire, chez ces deux espèces comme chez d'autres (*Yersinia pestis*, *S. enterica*, *Vibrio*). Bien que les études de biofilms chez les **Archées** soient peu développées, en raison de la difficulté technique de leur étude et du faible intérêt du fait qu'il n'y a pas de pathogènes connus, il a été montré que ces

organismes peuvent aussi donner naissance à des biofilms, dans lesquels jusqu'à présent aucune intervention d'un QS n'a été établie. Chez la Crenarchée *Sulfolobus acidocaldarius*, l'intervention de structures de type pili ou flagelles révèle un point commun avec les biofilms bactériens. Chez les **protistes** les mécanismes intervenant dans la mise en place de biofilms monospécifiques, partiellement compris, font appel notamment à une adhésine, mais ceux présidant à la mise en place de biofilms mixtes restent obscurs. La mise en place sur la plaque dentaire du biofilm mixte *Candida albicans* – *Streptococcus gordonii* ainsi que de biofilms faisant intervenir plusieurs espèces bactériennes, fait intervenir AI-2 produit par *Streptococcus*.

Les points clefs du chapitre

- 1 Les promoteurs de transcription procaryotes sont définis par deux séquences (-10 et -35), dont la variabilité définit la force.
- 2 La même ARN-Pol synthétise tous les ARN. Sa sous-unité σ reconnaît le promoteur, définissant le point de départ. Une structure en « épingle à cheveux » (parfois secondée par un facteur Rho) la termine à l'extrémité du gène.
- 3 La traduction, simultanée à la transcription, est initiée au site d'initiation (dit Shine-Dalgarno), à partir d'un codon spécifique, Fmet, et terminée par atteinte d'un codon stop.
- 4 Les ribosomes sont de type 70S chez les Bactéries et Archées, avec des protéines de type eucaryote chez ces dernières.
- 5 Les gènes procaryotes sont souvent organisés en opérons ou en régulons.
- 6 Des régulations directes (positives, négatives, atténuation, méthylation de l'ADN, épigénétique, ARN régulateurs) ou *via* des systèmes de détection de signaux externes (phosphorylation réversible de protéines kinases) affectent le niveau de transcription d'une ou plusieurs voies métaboliques.
- 7 Des régulations post-traductionnelles (modifications protéiques, prions) affectent les propriétés des protéines.
- 8 Des communications (quorum sensing) *via* un auto-inducteur et une protéine régulatrice permettent à des populations procaryotes de développer des propriétés nouvelles, éventuellement *via* des biofilms.



Entraînez-vous

- 6.1 Quels facteurs de l'ARN polymérase interviennent dans la mise en place de l'enzyme pleinement fonctionnelle ?
- 6.2 Chez les Bactéries, quels facteurs interviennent dans la mise en place de la traduction de l'ARNm en protéines ?
- 6.3 Quelles sont les différences entre les ARN polymérases des Bactéries et des Archées ?
- 6.4 Quel est le mode d'action de la protéine régulatrice d'un système de régulation négatif ?
- 6.5 Quel est le mode d'action de la protéine régulatrice d'un système de régulation positif ?
- 6.6 Expliquer pourquoi, en présence simultanée de glucose et lactose, l'opéron lactose n'est pas exprimé.
- 6.7 Quels sont la structure et le mode d'action des petits ARN régulateurs des procaryotes ?
- 6.8 Décrire un mécanisme épigénétique important observé chez les procaryotes.
- 6.9 Chez *Bacillus subtilis*, quels sont les facteurs déclenchant la sporulation ? Comment est régulée l'activité de la protéine Spo0A, régulateur de l'expression des gènes de sporulation ?
- 6.10 Comment le quorum sensing intervient-il dans la pathogénèse d'*Erwinia carotovora* ?

Introduction

Parmi l'éventail des environnements colonisés par les procaryotes figurent des plantes et des animaux, avec lesquels ils peuvent établir des interactions biotiques, ou symbioses, selon trois types principaux : le mutualisme (association à bénéfices réciproques), le commensalisme (un seul partenaire tire avantage de l'association sans nuire aux autres), et le parasitisme (symbiose dont l'un des partenaires bénéficie au détriment du second). Les micro-organismes partenaires d'une symbiose sont dits symbiotes (ectosymbiotes et endosymbiotes suivant qu'ils vivent à la surface ou à l'intérieur de l'hôte), et leurs partenaires eucaryotes hôtes. Bien que majoritairement à deux partenaires, certaines symbioses peuvent concerner plusieurs symbiotes, et même des symbiotes de symbiotes. L'entité formée par un hôte et ses symbiotes forme un holobionte.

Objectifs

Connaître les différents types d'interactions hôtes/bactéries

Identifier les différentes étapes du cycle infectieux

Définir les notions de symbiose, mutualisme, commensalisme et parasitisme, de microbiote, cycle infectieux, virulence et pouvoir pathogène

Expliquer les bases du dialogue moléculaire sous-tendant les interactions hôte/bactéries

Plan

- 1 Le mutualisme
- 2 Le commensalisme
- 3 Le parasitisme

1 Le mutualisme

Le mutualisme peut concerner la nutrition ou d'autres aspects de la relation entre partenaires. Cette relation, obligatoire ou non, peut affecter de manière différente chacun des partenaires.

1.1 Mutualisme et nutrition

Les symbioses mutualistes trophiques sont fréquentes. Elles peuvent être obligatoires ou facultatives, et dans le premier cas obligatoires pour les deux ou un seul des partenaires.

Au contraire, les partenaires d'une symbiose mutualiste facultative peuvent se développer de manière indépendante, sous forme libre.

a. Mutualisme obligatoire réciproque : le puceron et *Buchnera*

Les pucerons sont des insectes piqueurs-suceurs qui se nourrissent de la sève élaborée (phloème) des plantes sur lesquelles ils vivent. Ainsi, le puceron *Arcyosiphon pisum* se nourrit de sève de pois. Cependant cette sève ne contient pas certains acides aminés essentiels à son développement. Ces derniers lui sont fournis par la Bactérie *Buchnera aphidicola* qui vit dans des cellules spécialisées de l'insecte, les bactériocytes. Le développement de la Bactérie dépend elle aussi de son hôte, qui lui fournit d'autres acides aminés qu'elle ne synthétise pas. Cette symbiose mutualiste très étroite est donc obligatoire pour les deux partenaires. Les bactéries sont directement transmises à la descendance par les pucerons femelles, passant des bactériocytes aux embryons au cours de leur différenciation. Cette transmission maternelle est dite **verticale**. Des analyses génomiques et phylogénétiques ont montré une co-évolution très étroite entre partenaires, rendant leur interdépendance très spécifique.

b. Mutualisme obligatoire univoque chez *Riftia*, des vers tubicoles géants

Le caractère obligatoire des relations mutualistes peut ne concerner qu'un des partenaires de l'association. Les *Riftia* sont des vers tubicoles géants (d'un à deux mètres de long) qui vivent au fond des océans, à proximité des fumeurs des sources hydrothermales, à une température de 10 à 20 °C. Ce milieu est anoxygénique et très riche en sulfure d'hydrogène (H₂S). Dépourvus d'intestin, les *Riftia* dépendent de la Bactérie endosymbiotique chimolithotrophe *Candidatus Endoriftia persephone* (classe des γ -*Proteobacteria*) pour leur survie (voir Figure 7.1). À la mort du ver les endosymbiotes, relâchés dans l'eau de mer, peuvent se reproduire à l'état libre, et être acquis par de nouvelles larves de *Riftia*. Les bactéries sont donc **transmises horizontalement**. La taille de la population libre de la Bactérie rend élevée la probabilité d'événements de rencontres entre hôte et symbiotes.

c. Mutualisme facultatif : les rhizobiums et les légumineuses

Les partenaires d'une symbiose mutualiste facultative peuvent se développer de manière indépendante, et donc se trouver sous forme libre dans l'environnement. C'est le cas des symbioses mutualistes fixatrices d'azote entre les légumineuses et leurs Bactéries endosymbiotiques, les rhizobiums. Les légumineuses (haricot, pois, soja, luzerne, etc.) peuvent se développer sans rhizobium, mais ont besoin d'un apport d'engrais azotés pour optimiser leur développement. Les rhizobiums sont capables de vivre librement dans le sol. La symbiose ne s'établit que si le sol est pauvre en matières azotées. La reconnaissance entre l'hôte et son symbiote, fondée sur un dialogue moléculaire spécifique, déclenche le développement, au niveau des racines, d'un nodule, dans lequel les rhizobiums vont s'installer, et certains entrer dans des cellules végétales (voir Figure 7.2). Sous l'action de molécules de défense de la plante, ils se différencient en **bactéroïdes**,

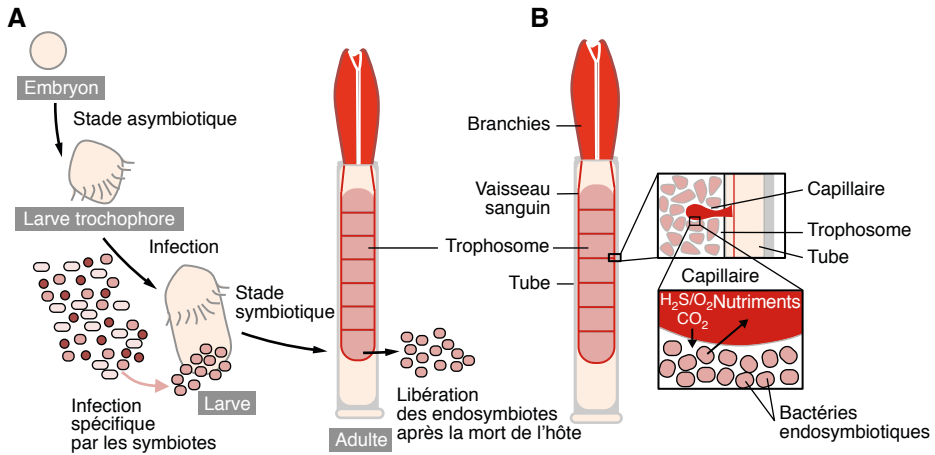


Figure 7.1 – Symbiose mutualiste entre le ver *Riftia* et son endosymbiote *Candidatus Endoriftia persephone* (d'après Li Y. et al., 2018)

A. Différents stades de développement de *Riftia* et transmission horizontale des symbiotes. Les embryons et les premiers stades larvaires sont asymbiotiques. Les symbiotes (rose) coexistent avec d'autres bactéries (rose clair et grenat) dans l'environnement. Les endosymbiotes s'attachent spécifiquement aux larves de *Riftia* et envahissent leur mésoderme, qui se différenciera en trophosome. Le ver adulte est fixé au sol. À sa mort les endosymbiotes sont libérés. **B.** Schéma simplifié d'un *Riftia* et échanges métaboliques entre l'hôte et l'endosymbiote au niveau du trophosome. Les branchies absorbent le sulfure d'hydrogène, l'oxygène et le dioxyde de carbone présents dans l'eau de mer. Ces éléments sont transportés par une hémoglobine spéciale présente dans les vaisseaux sanguins du ver, puis fournis aux bactéries endosymbiotiques du trophosome. Celles-ci, dont la concentration peut atteindre 10^{11} cellules par gramme de tissu de ver, oxydent le H_2S et se servent d'une partie de l'énergie produite pour réduire le CO_2 . Une partie des composés carbonés réduits est transférée au ver.

capables de **fixer l'azote** atmosphérique (voir Chapitre 3). L'ammoniac formé gagne le cytoplasme des cellules végétales, où il va permettre la synthèse de glutamine et d'asparagine, qui seront transportés dans le xylème et diffuseront dans toute la plante. Chaque nodule contient environ 10^9 cellules de rhizobium, dont environ 10^7 sont capables de survivre dans le sol une fois libérées à la mort du nodule, jusqu'à un prochain cycle de symbiose (**transmission horizontale**). Ce processus joue donc un rôle important dans la dynamique des populations de rhizobiums dans le sol. Les associations *Rhizobia*-légumineuses se font selon un **spectre d'hôte** strict, une composante très importante des relations symbiotiques. Ainsi, *Sinorhizobium meliloti* « nodule » la luzerne *Medicago truncatula* mais pas le haricot (*Phaseolus vulgaris*), et inversement pour *Rhizobium etli*. *S. meliloti* et *R. etli* ont des spectres d'hôtes très étroits ; d'autres en ont de beaucoup plus larges, tel *Sinorhizobium fredii* NGR234, qui nodule plus de cent douze genres de légumineuses. Ces spécificités sont déterminées au cours des nombreuses étapes qui conditionnent la mise en place des symbioses.

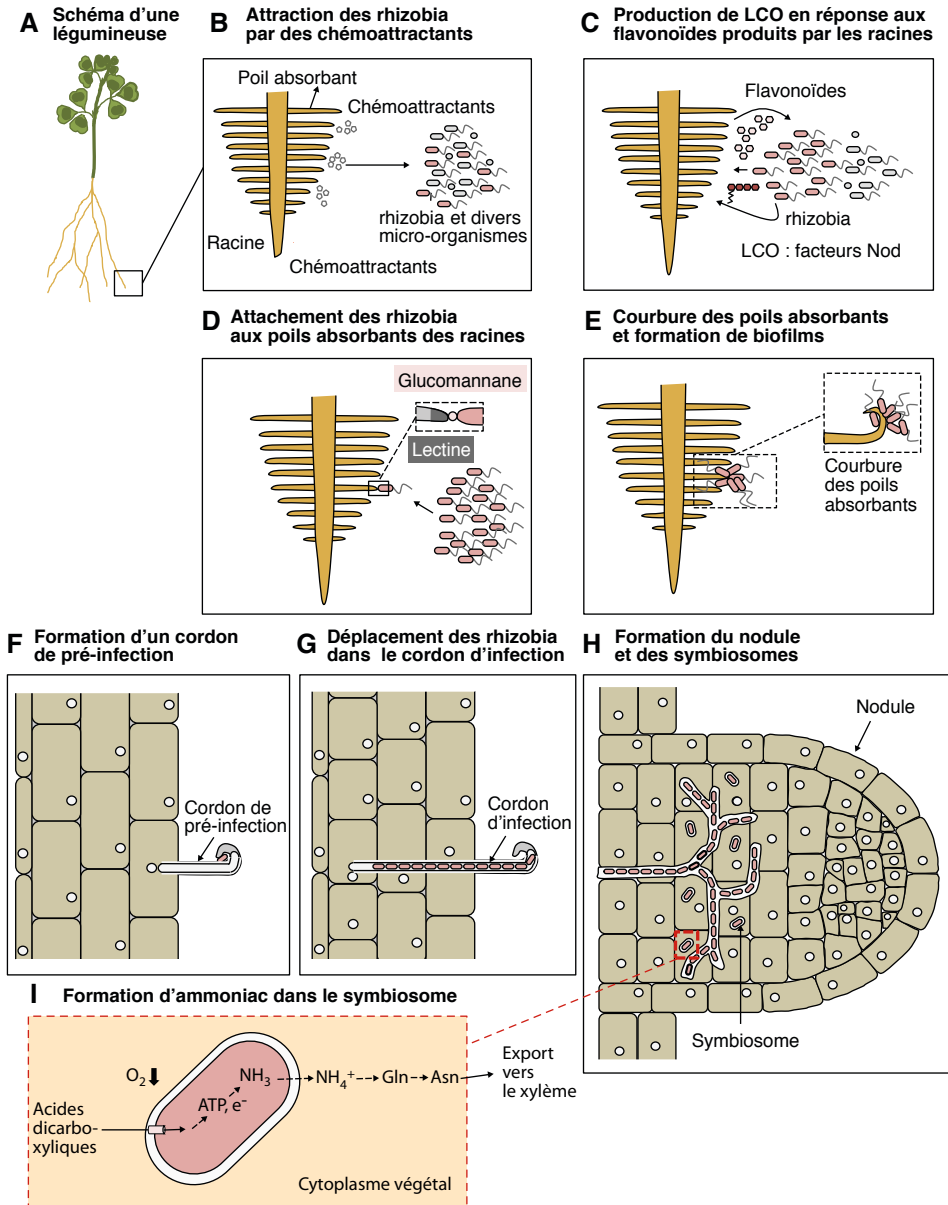


Figure 7.2 – Les symbioses rhizobium/légumineuses (d'après P. Gamas et al., 2017 ; G.E. Oldroyd, 2013 ; P. Poole et al. 2018)

A. La légumineuse *M. truncatula*. Le rectangle indique la zone de la racine infectée par les Bactéries. **B.** Grossissement de la zone d'infection. Les rhizobiums sont spécifiquement attirés vers les racines de leur hôte par des chémoattractants. **C.** Des flavonoïdes produits par les racines induisent chez les Bactéries arrivant à proximité la production de facteurs Nod spécifiques (des lipochito-oligosaccharides). Ceux-ci se fixent sur des récepteurs présents sur les poils absorbants de la racine, ce qui déclenche

le programme de développement cellulaire aboutissant à la formation des nodules dans lesquels les Bactéries vont se développer. **D.** Les Bactéries s'attachent à l'extrémité des poils absorbants par l'intermédiaire de glucomannane (cercle rose) disposé au pôle de la Bactérie, qui se lie à des lectines présentes sur le poil absorbant (maron). **E.** Les *Rhizobia* forment des biofilms au sommet des poils absorbants, entraînant leur déformation en crosse de berger, ce qui enferme une ou deux Bactéries. **F.** La mise en place du programme symbiotique se traduit par la formation d'un cordon de pré-infection qui progresse dans les tissus racinaires. **G.** Les Bactéries progressent dans ce cordon, tandis que la division des cellules du cortex de la racine amorce la formation d'un nodule à la base du cordon. **H.** Des cordons d'infection envahissent le nodule et se ramifient. Une partie des rhizobiums présents dans les cordons d'infection est libérée, par un processus proche de l'endocytose, dans les cellules végétales. Ils restent entourés d'une membrane végétale qui les isole du cytoplasme de la cellule hôte (symbiosome). **I.** Dans le symbiosome, les bactéries se différencient progressivement en bactéroïdes, où elles peuvent fixer l'azote atmosphérique.

d. Symbiose à plus de deux partenaires : les termites xylophages

Les termites sont des insectes sociaux qui jouent un rôle essentiel dans le cycle du carbone en dégradant environ 30 % de la production primaire nette terrestre, et émettent environ 4 % et 2 % des émissions totales de CH_4 et CO_2 . Il existe deux classes principales de termites : ceux dits « inférieurs » sont exclusivement xylophages, alors que ceux dits « supérieurs » ont une alimentation beaucoup plus variée. Leur point commun est de se nourrir de lignocelluloses, principaux composants des parois végétales, riches en cellulose, hémicellulose et lignines, pauvres en azote et très difficiles à digérer, qu'ils minéralisent grâce à une coopération étroite avec une micro-flore constituée de plus de trois cents espèces de procaryotes (Bactéries et Archées endosymbiotiques), protistes (dans le cas des termites inférieurs) et champignons (voir Chapitre 2).

Chez les termites inférieurs, la microflore est dominée par des protozoaires flagellés spécifiques (trois à dix-neuf espèces suivant les espèces de termites), représentant jusqu'à 10^7 individus par animal. La communauté bactérienne (10^7 - 10^{11} cellules/mL) est dominée par des Spirochètes (genre *Treponema*) et des *Fibrobacteres*, libres ou ectosymbiotes des flagellés. Cette microflore, hébergée dans l'intestin postérieur du termite, hypertrophié et pauvre en oxygène, complète la dégradation de la cellulose amorcée dans l'intestin moyen de l'insecte (voir Figure 7.3). Si de nombreuses Bactéries sont libres dans l'intestin postérieur, d'autres sont attachées aux protozoaires ou même hébergées dans leur cytoplasme. Il s'agit donc d'ectosymbiotes et d'endosymbiotes d'endosymbiotes ! Le protozoaire endosymbiotique *Trichonympha agilis* du termite inférieur *Reticulitermes speratus* héberge ainsi de façon permanente deux espèces de Bactéries, *Candidatus Endomicrobium trichonymphae* et *Candidatus Desulfovibrio trichonymphae*. L'analyse des génomes de ces deux Bactéries a montré qu'elles contribuent spécifiquement l'une à la fermentation des monosaccharides pour produire de l'acétate, du CO_2 et de l' H_2 , l'autre à la biosynthèse de plusieurs acides aminés et cofacteurs, et à l'oxydation de l'hydrogène. Cette consommation d'hydrogène permet de limiter la teneur en H_2 à un niveau non inhibiteur pour les autres fermentations.

Chez les termites supérieurs, dépourvus de protozoaires endosymbiotiques, il semble que ce soient les Bactéries qui assurent la dégradation de la lignocellulose. La composition de ces populations est très variable d'une espèce de termite à l'autre. Ces différences de composition pourraient refléter une adaptation fonctionnelle des communautés bactériennes endosymbiotiques à la diète de leur hôte.

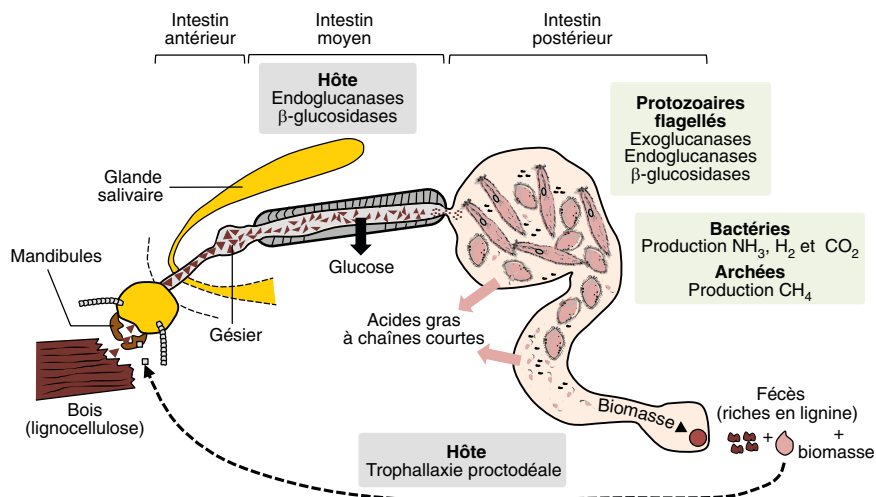


Figure 7.3 – La digestion du bois par les termites « inférieurs » (D'après A. Brune, 2014)

La dégradation du bois repose sur les activités cellulolytiques de l'hôte et de ses endosymbiotes localisés dans l'intestin postérieur. L'insecte découpe le bois grâce à ses mandibules pour produire des particules qu'il ingurgite. Ces particules sont dégradées dans l'intestin moyen par des enzymes produites par les glandes salivaires et broyées au niveau du gésier. Le glucose produit dans l'intestin moyen est absorbé au niveau de l'épithélium. Les particules partiellement digérées arrivent dans l'intestin postérieur où elles sont phagocytées par les protozoaires flagellés qui les hydrolysent grâce à leur cocktail très actif de cellulases et d'hémicellulases produit dans des vacuoles digestives. Les produits de fermentations ainsi obtenus, du CO_2 , de l' H_2 , des acides gras à chaînes courtes (acétate) sont absorbés par l'hôte. Les résidus, très riches en lignine, sont évacués sous forme de fèces. Une partie de la biomasse microbienne très importante produite dans l'intestin postérieur est transmise par trophallaxie aux autres termites présents dans le nid. Il s'agit d'un comportement social, les termites sollicitant leurs congénères pour qu'ils produisent des gouttelettes de fluide de l'intestin postérieur remplies d'endosymbiotes qu'ils « boivent ». La biomasse ainsi réabsorbée est digérée dans les intestins antérieurs et moyens, produisant des vitamines et des acides aminés récupérés par l'hôte. Au cours de cette dégradation de l'acide urique riche en azote est produit, et déversé dans l'intestin postérieur où des bactéries le transforment en ammoniac qui va être assimilé par la communauté microbienne. Parallèlement, d'autres bactéries présentes dans les protozoaires fixent l'azote atmosphérique ; l'ammoniac produit sera assimilé par le protozoaire, pour former des acides aminés, ce qui complète le cycle de l'azote chez l'holobionte. Les Archées présentes dans l'intestin combinent l'hydrogène et le CO_2 produits par les autres endosymbiotes pour synthétiser du méthane.

1.2 Mutualismes non trophiques

Le mutualisme ne repose pas uniquement sur des relations trophiques, mais peut assurer la protection de l'hôte contre la prédation, le rendre mobile, augmenter sa fécondité ou renforcer ses défenses.

a. Mutualiste, protection, luminescence : le calamar et *Aliivibrio fischeri*

Les calmars *Euprymna scolopes* originaires d'Hawaï produisent de la lumière (bioluminescence) grâce à un organe ventral complexe comprenant trois cryptes qui hébergent la Bactérie endosymbiotique *A. fischeri* (autrefois nommée *Vibrio fischeri*). Ce sont les symbiotes qui produisent cette lumière, qui servirait de camouflage contre les prédateurs, par contre-illumination. En effet, ces petits calmars vivent dans les eaux peu profondes. Par nuit claire, les animaux non lumineux projettent une ombre qui peut être un signal pour des prédateurs tapis plus bas sur le fond. La production de lumière permet aux calmars d'éviter la projection de cette ombre, ce qui les rend invisibles à leurs prédateurs. L'intensité et l'incidence de la lumière peuvent être modulées grâce à une lentille et des tissus réflecteurs présents dans l'organe qui abrite les Bactéries (voir Figure 7.4).

A. fischeri ne représente qu'une très faible fraction (quelques centaines ou milliers par millilitre d'eau parmi des millions d'autres Bactéries) de la population bactérienne libre dans l'eau de mer. Très rapidement après l'éclosion des œufs du calamar, les cellules d'*A. fischeri*, et spécifiquement elles, sont attirées dans les cryptes de l'organe lumineux des juvéniles suite à un dialogue moléculaire complexe avec l'hôte. La présence des Bactéries modifie morphologiquement et fonctionnellement le développement de l'organe (apparition de microvillosités), ce qui stabilise et pérennise la symbiose. Curieusement, la forme mature de cet organe présente une convergence de forme et de fonction avec un œil. Dans la crypte les Bactéries, trouvant les substrats et l'énergie nécessaires à leur croissance, atteignent des concentrations de l'ordre de 10^{12} cellules.mL⁻¹. La production de lumière par celles-ci est contrôlée par un mécanisme de quorum sensing (QS), déclenché lorsqu'un seuil de population du symbiote est atteint (voir Figure 7.4 ; voir Chapitre 6). Ce contrôle permet de synchroniser la production de lumière, qui doit être assez intense pour que la contre-illumination soit effective. Un seul opéron de *A. fischeri*, *lux*, code la luciférase, l'enzyme impliquée dans la production de lumière, les enzymes produisant les substrats de la luciférase, et l'auto-inducteur qui contrôle le QS, ce qui permet de coupler la production de lumière et le phénomène de QS (voir Chapitre 6).

Un contrôle circadien, actif sur le calamar et les bactéries, permet de ne déclencher la bioluminescence qu'en début de nuit, quand les calmars partent se nourrir. Juste avant l'aube, le calamar expulse plus de 90 % des bactéries des cryptes, ce qui bloque le processus de QS, et la luminescence par voie de conséquence. Parallèlement un remodelage du cytosquelette des cellules de la crypte leur fait perdre leurs microvillosités.

Les bactéries restantes reprennent leur croissance, dans un premier temps grâce à une respiration anaérobie fondée sur l'utilisation des constituants membranaires de l'hôte. Pendant ce temps, les cellules des cryptes retrouvent leurs microvillosités. Vers midi, les bactéries changent de métabolisme pour fermenter la chitine. Cette alternance permet de réguler la taille des populations du symbiote, donc le QS, et de synchroniser l'ensemble avec l'alternance jour-nuit.

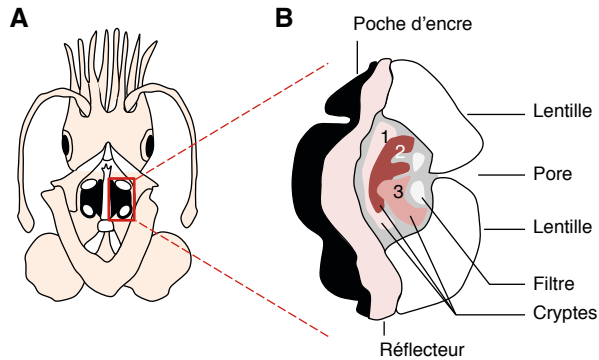


Figure 7.4 – Symbiose mutualiste « lumineuse » *Euprymna scolopes* - *Aliivibrio fischeri* (D'après M.J. McFall-Ngai, 2014)

A. Dissection ventrale de l'animal adulte. **B.** Section frontale d'un des lobes, avec les trois cryptes (1, 2, 3) qui hébergent l'endosymbiote.

b. Mutualisme et mobilité : le tréponème et le protiste *Mixotricha paradoxa*

Retournons maintenant dans l'intestin des termites pour étudier la mobilité du protiste flagellé *M. paradoxa*. Cet endosymbiote du termite australien *Mastotermes darwiniensis* vit en association avec plusieurs espèces de Spirochètes. Bien que le protozoaire possède des flagelles, il ne les utilise pas pour sa locomotion mais plutôt comme gouvernail. Ce sont les Spirochètes, du genre *Treponema*, qui assurent ses déplacements. Environ 250 000 de ces Bactéries, de forme hélicoïdale, sont attachées à la surface du protozoaire de manière polaire. Leur ondulation assure les déplacements de l'endosymbiote, ce qui lui permet de s'alimenter et de se maintenir dans l'intestin du termite. Ces Bactéries sont donc des ectosymbiotes mutualistes de l'endosymbiote flagellé.

c. Mutualisme, reproduction et résistance : *Wolbachia* et les arthropodes

Les Bactéries du genre *Wolbachia* (des α -*Proteobacteria* de la famille des *Anaplasmataceae*) sont des endosymbiotes intracellulaires très répandus chez les arthropodes (dans

plus de 40 % d'entre eux, et dans environ 60 % des espèces d'insectes). Ces Bactéries peuvent être transmises de manière verticale ou horizontale. Elles sont surtout connues pour leur rôle dans la manipulation de la reproduction chez les arthropodes, dont l'effet varie selon les espèces d'insectes et les souches de *Wolbachia*. Au moins quatre modes de manipulation sont connus. Les *Wolbachia* peuvent induire une parthénogenèse aboutissant à la féminisation de la population de l'hôte, entraîner la mort de la descendance mâle des hôtes femelles infectées, ou la féminisation des mâles en inhibant la production des hormones masculinisantes lors du développement. Enfin, certaines souches de *Wolbachia* peuvent provoquer une incompatibilité cytoplasmique : une femelle non infectée sera infertile si fécondée par un mâle infecté ; seules les femelles infectées pourront donc se reproduire avec des mâles infectés. Dans tous les cas le sex-ratio de la population penche en faveur des femelles, et particulièrement des femelles infectées. L'ensemble de ces altérations favorise la propagation de *Wolbachia* dans les populations d'arthropodes. L'infection par *Wolbachia* pourrait aussi augmenter la fécondité des insectes infectés.

L'association particulière entre les insectes et *Wolbachia* se reflète dans l'existence de nombreux échanges de gènes (TGH) entre les *Wolbachia* et leurs hôtes. Ce processus semble atteindre son paroxysme chez la mouche des fruits *Drosophila ananassæ*, dont le génome contient l'intégralité du génome de *Wolbachia pipientis*. S'agit-il de parasitisme ou de mutualisme ? La question fait aujourd'hui l'objet de nombreux débats. Toutefois, il a récemment été établi que les infections par *Wolbachia* pouvaient conférer à certains moustiques et certaines drosophiles une meilleure résistance à des virus à ARN, des bactéries pathogènes ou encore *Plasmodium*, l'agent du paludisme. Il est même proposé d'utiliser l'infection par *Wolbachia* pour lutter contre certaines maladies humaines transmises par des moustiques de la famille des *Aedes* et provoquées par des virus à ARN, telles que le Chikungunya ou la Dengue.

2 Le commensalisme

Les plantes et les animaux vivent en association avec une multitude de micro-organismes, tant Bactéries qu'Archées, Champignons et virus. La plupart des micro-organismes concernés n'ont pas d'effet néfaste sur leur hôte. Apparemment plutôt neutres, ils tirent parti de l'association en exploitant des nutriments ou des déchets produits par l'hôte. Ils sont donc considérés comme des **commensaux**. Un être humain de 70 kg en héberge environ 10^{13} (autant que le nombre de ses cellules somatiques), un simple calcul permettant d'estimer que l'humanité dans sa globalité en accueille plus de 7×10^{22} . Le côlon est son organe le plus riche en microbes, avec de 10^{11} à 10^{12} cellules par cm^3 . La situation est très similaire chez les plantes, avec en moyenne de 10^{11} à 10^{12} Bactéries par cm^2 de feuille. D'après des études de modélisation du couvert végétal attribuant à la surface foliaire (faces inférieures et supérieures) deux fois celle des terres émergées, ceci correspondrait

à au moins 10^{26} Bactéries hébergées par la phyllosphère (partie aérienne des plantes). L'ensemble des micro-organismes vivant en association stable avec un hôte constitue le **microbiote** (autrefois appelé flore microbienne), l'entité fonctionnelle de l'hôte et de son microbiote constituant l'**holobionte**.

Certains micro-organismes peuvent s'installer de manière stable sur ou dans leur hôte, constituant le **microbiote normal** (ou flore normale). Très souvent le microbiote, dans sa diversité ou dans sa globalité, joue un rôle bénéfique pour son hôte. Par conséquent, la limite entre commensalisme et mutualisme est très ténue et difficile à fixer. Certains micro-organismes commensaux peuvent cependant s'avérer nuisibles s'ils se retrouvent dans un site inhabituel de leur hôte : certaines souches d'*E. coli* vivant normalement dans notre gros intestin, où elles sont inoffensives, peuvent provoquer des infections (cystite, pneumonie) si elles gagnent d'autres organes (vessie ou poumons, respectivement). Ces micro-organismes sont appelés **pathogènes opportunistes**.

2.1 Le microbiote humain

La caractérisation des microbiotes a connu des avancées majeures ces dix dernières années grâce au développement de nouvelles techniques de séquençage et d'analyse génomiques[§]. La métagénomique (y compris fonctionnelle) a permis de définir l'ensemble des gènes d'un microbiote : le microbiome. Initialement surtout consacrées à l'étude du microbiote humain intestinal, des études portent actuellement sur d'autres sites du corps humain, sur le développement du microbiome au cours de la croissance, et sur la comparaison des microbiomes d'individus sains et malades.

L'état actuel de nos connaissances du microbiote humain repose sur l'analyse d'environ 2 000 individus provenant majoritairement des États-Unis, d'Europe et de Chine, dont la majorité était en bonne santé, et une minorité présentait des pathologies (diabète, maladies chroniques de l'intestin). Ces études ont principalement porté sur le tractus intestinal mais d'autres habitats (la peau, la bouche, le vagin) ont été analysés. Il ressort de ces travaux les points majeurs suivants (voir Figure 7.5) :

- Il existe une **très grande variabilité** entre individus. Ainsi, sur les mille à mille cent cinquante espèces bactériennes globalement trouvées dans l'intestin de l'ensemble des échantillons, chacun n'en portait qu'environ cent soixante. Bien qu'il soit donc difficile de définir un microbiote intestinal type, il semble que deux phyla dominent cette flore : les *Bacteroidetes* et les *Firmicutes*, dont au moins neuf familles principales ont pu être identifiées chez les individus en bonne santé. Le microbiote varie aussi au cours du temps chez un individu.
- Chez les adultes **la diète, l'origine géographique ou certains caractères génétiques** peuvent jouer un rôle dans la composition de ces communautés, mais sans impact majeur. Chez les très jeunes enfants, en revanche, les facteurs influençant sa dynamique de développement sont très importants pour la mise en place d'un microbiote « sain ».
- Malgré les limites des études portant sur d'autres habitats, il semble qu'il existe plus de **similitude des communautés bactériennes par type d'habitat** qu'entre habitats

différents chez un même individu. Le microbiote de la **bouche**, aussi complexe que celui de l'intestin, semble dominé par des espèces du genre *Streptococcus*. La **peau** héberge principalement trois groupes bactériens, avec des différences notables entre régions sèches, humides ou sébacées. La **flore vaginale** semble beaucoup plus structurée, avec cinq communautés types reflétant en partie l'origine ethnique, et influencée le cas échéant par la grossesse. Dans l'**intestin**, la présence de symbiotes tels que *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Faecalibacterium prauznitzii* favorise un **état de bonne santé**. En effet, ces Bactéries sont capables de dégrader des glucides non digestibles par l'Homme, produisant des acides gras à chaînes courtes, qui constituent une source d'énergie importante pour l'hôte. Ce sont des immuno-modulateurs (inhibant les pathogènes communs) qui pourraient posséder des propriétés anti-tumorales.

- Il semble possible d'identifier des **voies métaboliques spécifiques conservées** au niveau des différents sites chez les personnes en bonne santé. Il s'agit bien sûr de fonctions de ménage indispensables à la survie des micro-organismes (voir Chapitres 4 et 6), mais aussi de fonctions spécifiques de chacun des sites. Au niveau de l'intestin ces fonctions comprennent la dégradation des glycosaminoglycanes, la production de certains lipopolysaccharides, d'acides gras, de vitamines et d'acides aminés essentiels. Toute perturbation du microbiote altérant ces fonctions peut entraîner l'apparition de maladies intestinales (obésité, maladie de Crohn). Des essais de transplantation fécale de microbiotes provenant d'individus sains administrés à des patients atteints d'affections intestinales (comme la maladie de Crohn) permettent un recul très notable des symptômes. Le microbiote, particulièrement celui de l'intestin, joue donc un **rôle essentiel dans l'état de bonne santé**.
- Le microbiote joue probablement également un rôle important dans le **développement normal ou l'éducation du système immunitaire**. La surface de l'intestin, soit environ 200 m² (contre 2 m² pour la peau), représente la plus grande surface du corps humain en contact avec l'extérieur. Il n'est donc pas surprenant que le microbiote intestinal puisse avoir une influence sur notre immunité. Cela est vrai pour la maturation normale du système immunitaire des enfants dès l'âge de 6 mois, ce qui promeut la tolérance immunitaire, et par voie de conséquence l'atténuation ou même la suppression de certaines maladies auto-immunes. Le microbiote peut également limiter le développement de pathogènes par un phénomène d'exclusion de niche.
- Enfin, de manière plus surprenante, le microbiote pourrait avoir un rôle dans l'apparition de certaines dépressions ou dans certaines formes d'autisme. L'intestin est en effet en contact avec un très grand nombre de **cellules nerveuses** (on le qualifie ainsi parfois de deuxième cerveau). La production d'acides gras à chaînes courtes ou de neurotransmetteurs (le GABA, acide γ -aminobutyrique, ou la sérotonine) par certains éléments du microbiote pourrait influencer notre système nerveux central. Des déséquilibres du microbiote pourraient alors modifier ce dialogue et favoriser l'émergence de telles maladies.

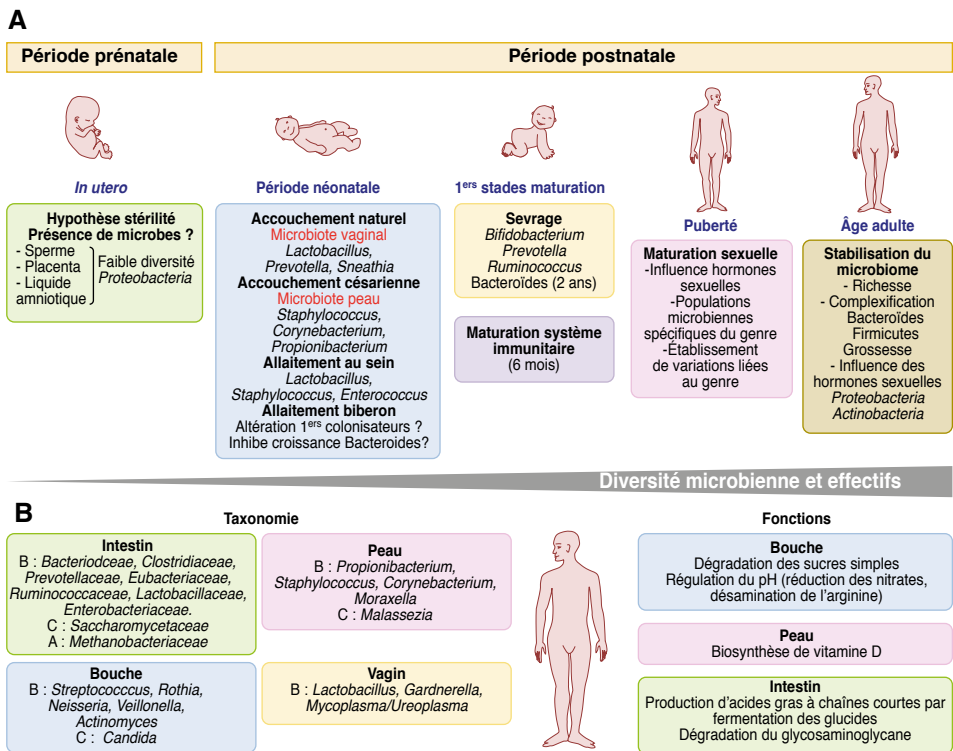


Figure 7.5 – Le microbiote/microbiome humain

A. Évolution du microbiote intestinal au cours du développement humain (d'après P. Kundu et al., 2017 et V.N. Vemuri et al., 2018). L'embryon est probablement stérile. Toutefois, des microbes ont été isolés dans le sperme, le placenta ou le liquide amniotique. Un accouchement par les voies naturelles permet l'installation et la structuration d'un microbiote sain, tandis qu'une naissance par césarienne favorise l'implantation de pathogènes opportunistes qui persistent au cours du temps, augmentant les taux d'infection. De même, l'allaitement maternel favorise certaines espèces (*Bifidobacterium* ou *Bacteroides*) capables d'utiliser les oligosaccharides du lait humain, ce qui permet une structuration du microbiote qui autrement se réalise au hasard. Le sevrage entraîne une complexification du microbiote, ce qui semble aussi s'accompagner d'une maturation du système immunitaire. Lors de la puberté, les hormones sexuelles introduisent des nouvelles propriétés liées au genre qui ont un impact sur la spécificité du microbiote. À l'âge adulte, le microbiote se complexifie et un microbiome « de base » se constitue. Celui-ci réduit notre vulnérabilité aux changements internes ou externes. **B.** Un microbiote sain : taxa trouvés au niveau de différents sites du corps d'individus en bonne santé (d'après J. Lloyd-Price et al., 2016). Chaque site montre un enrichissement notable de certains taxa (B : Bactéries ; C : Champignons ; A : Archées). Les études métagénomiques ont permis de dégager des fonctions typiques et spécifiques de différents habitats d'individus en bonne santé.

L'étude systématique à très grande échelle du microbiote humain n'en est vraiment qu'à ses débuts. Des avancées fascinantes devraient voir le jour très prochainement. L'utilisation d'animaux modèles (la souris ou le poisson zèbre) devrait également permettre de mieux comprendre les implications du (des) microbiote(s) dans la santé, en particulier humaine.

2.2 Le microbiote végétal

Une plante peut être schématiquement décomposée en deux parties externes, la phyllosphère (parties aériennes) et la rhizosphère (parties du sol fermement attachées aux racines). L'endosphère définit les parties intérieures des plantes. La microflore du sol est extrêmement riche. Il existe en général une convergence entre les taxons de micro-organismes présents dans la phyllosphère et la rhizosphère, mais certains taxons sont spécifiques de l'une ou l'autre zone. Chaque espèce végétale a-t-elle un microbiote particulier, ou celui-ci dépend-il de leurs conditions de croissance ? Le microbiote peut-il jouer un rôle dans la santé des plantes et dans leur résistance aux maladies ? Les questions concernant le microbiote végétal sont analogues à celles adressées à celui de l'Homme : existe-t-il des micro-organismes spécifiquement adaptés aux différents sites des plantes (feuilles, racines) ?

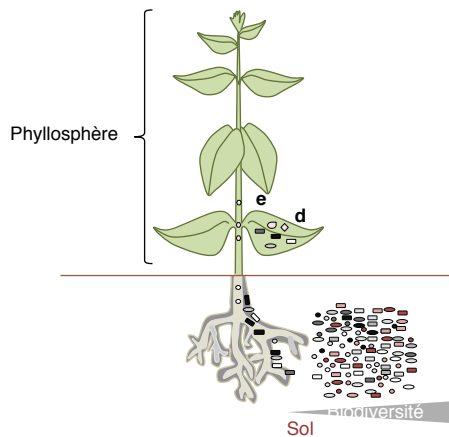


Figure 7.6 – Le microbiote végétal (d'après D.B. Müller et al., 2016)

Des micro-organismes du sol peuvent vivre à la surface des racines (b), des feuilles et des tiges (d, e) (organismes **épiphytes**). Certains, dits **endophytes** (c) sont capables de s'immiscer et de vivre à l'intérieur des tissus de la plante (rhizosphère ou phyllosphère).

L'émergence des méthodes de génomique a permis d'aborder ces questions chez plusieurs espèces végétales, dont la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, différentes espèces d'arbres ou de plantes d'intérêt agronomique (orge, maïs, vigne, laitue, pomme

de terre, tomate, canne à sucre, soja, riz). Les Bactéries sont très abondantes dans les communautés associées aux plantes, mais d'autres micro-organismes (algues, protozoaires), des nématodes et même des virus sont présents. Seules quelques règles générales peuvent être déduites de ces études, du fait qu'elles ont été réalisées dans des conditions très différentes et suivant des protocoles très variés.

Quelques phylums semblent dominer la flore bactérienne associée aux plantes : des *Proteobacteria*, *Actinobacteria* et *Bacteroidetes*, et dans une moindre mesure des *Firmicutes*. La composition des microbiotes de la rhizosphère et de l'endosphère, chez *Arabidopsis* et le riz, diffère de celle du sol environnant, avec une tendance à un appauvrissement du sol vers la rhizosphère puis l'endosphère, le site le plus pauvre en taxons. La plante influencerait donc la composition de son microbiote. Chez *Arabidopsis*, de manière intéressante, les microbiotes des feuilles et des racines montrent de fortes similitudes. Il semble que la nature du sol et les conditions climatiques puissent également influencer la composition des microbiotes végétaux. Le microbiote semble influencer sur son hôte en jouant un rôle dans sa **résistance** à différents **stress abiotiques**, tels que sécheresse, inondations, fortes teneurs en sel, ou contaminations par des métaux lourds, son **développement** en augmentant la part de nutriments accessibles dans le sol (phosphore, fer), ou en modifiant son architecture racinaire. Comme c'est le cas chez l'Homme, il peut **protéger** les plantes contre les attaques par des pathogènes, selon plusieurs mécanismes : une compétition pour la niche ou les nutriments, la production d'antibiotiques ou d'enzymes dégradatives, l'inhibition de la virulence. Certains microbiotes, ou des Bactéries contenues dans ceux-ci, peuvent activer des voies de défenses des plantes, cette activité étant elle-même indispensable au développement normal du microbiote. Le défi consiste maintenant à mieux comprendre ces relations plantes-microbiote(s), pour améliorer la croissance et la production des plantes d'intérêt agricole, ainsi que leur résistance aux maladies.

2.3 Algues rouges, makis et évolution du microbiote humain

Notre diète peut influencer le développement de notre microbiote, particulièrement durant les premiers mois de notre vie. Le microbiote du monde végétal, au sens large, peut-il influencer l'évolution du microbiote des animaux qui les ingèrent ? La Bactérie marine *Zobellia galactanivorans*, qui s'associe à une algue rouge du genre *Porphyra*, peut fournir une réponse à cette question. *Z. galactanivorans* possède une enzyme unique, appelée porphyranase, capable de dégrader de manière spécifique le porphyrane, un polymère de sucre présent dans la paroi des *Porphyra*. Ces algues rouges, aussi appelées algues nori, sont utilisées depuis plusieurs siècles au Japon pour entourer le riz des makizuschi (appelés maki en Europe). Elles revêtent une grande importance culturelle, pouvant servir de cadeau ou de valeur de paiement de taxes. Une étude métagénomique comparant les microbiotes intestinaux de treize Japonais et dix-huit Nord-Américains a montré que la porphyranase est présente dans le microbiote des premiers et absente dans celui des seconds. Une grande partie du locus génomique de *Z. galactanivorans*

permettant de dégrader et d'exploiter le porphyrane est conservée chez les souches de *Bacteroides plebeius* présentes dans l'intestin des Japonais. Est-ce que la longue exposition des Japonais aux algues nori et à leur microbiote aurait permis le transfert (par TGH) de ce locus à leur flore intestinale ?

3 Le parasitisme

Le parasitisme est une symbiose dont l'un des partenaires tire parti au détriment du second. Si des modifications physiologiques et/ou développementales de l'organisme atteint sont provoquées par un micro-organisme parasite ou ses produits (toxines) on parlera de **maladie infectieuse**. Notons que le terme infection s'applique non seulement aux maladies provoquées par des micro-organismes parasites, dits **pathogènes**, mais aussi à des associations avec des micro-organismes mutualistes tels que les rhizobiums ou *A. fischeri*.

3.1 Les épidémies – Conséquences sociétales et étiologie

Bien que rares, les maladies infectieuses ont la caractéristique de se propager rapidement à l'intérieur d'une population, provoquant une épidémie, et même une pandémie si l'épidémie se développe chez un grand nombre de personnes sur une zone géographique pouvant couvrir un ou plusieurs continents. Au cours des siècles des épidémies dévastatrices ont fortement impacté le développement de nos sociétés et notre imaginaire collectif. **L'épidémie de peste noire** qui a sévi en **Europe au Moyen Âge** (en fait une pandémie), la grande famine qu'a connue l'Irlande au XIX^e siècle suite à **l'infection des pommes de terre**, ou beaucoup plus proches (2011 en Europe), **l'épidémie du syndrome hémolytique et urémique** et le **syndrome du déclin rapide de l'olivier** en sont des exemples frappants.

La lutte contre les maladies infectieuses repose sur un large éventail de mesures, allant de la **prophylaxie** (processus destiné à prévenir l'apparition, la propagation ou l'aggravation d'une maladie) aux recherches visant à caractériser les bases moléculaires permettant aux pathogènes d'infecter leur hôte. L'**étiologie** permet d'identifier l'agent causal d'une maladie. Parallèlement il est important d'en analyser la **pathogénie**, les processus conduisant au développement de la maladie. Les maladies infectieuses sont naturellement heureusement assez exceptionnelles, reflétant d'une part un équilibre entre le **pouvoir pathogène** d'un organisme et les mécanismes de défenses de l'hôte (animaux et plantes) (**immunité**), et d'autre part le fait que seul un très petit nombre de Bactéries (quelques centaines d'espèces), aucune Archée, et seuls quelques protistes, sont pathogènes (voir Chapitre 1). Les personnes immunodéprimées sont plus sensibles aux agents pathogènes et pourront même être infectées par des agents pathogènes **opportunistes**, normalement incapables d'infecter des hôtes sains.

Parallèlement, les différentes souches d'un agent pathogène peuvent montrer des degrés variés de **virulence**. Ce sont L. Pasteur et R. Koch qui ont établi au XIX^e siècle les bases de la microbiologie médicale moderne (Fiche Introduction). L. Pasteur a démontré le rôle des « germes » dans les modifications de la matière organique. Les travaux de R. Koch sur l'anthrax, une maladie du bétail qui peut atteindre l'Homme, ont montré pour la première fois qu'une maladie infectieuse pouvait être provoquée par une Bactérie, dans ce cas *Bacillus anthracis*. R. Koch a aussi identifié *Mycobacterium tuberculosis* comme l'agent responsable de la tuberculose (1882). Cette maladie est aujourd'hui encore la première cause mondiale de décès due à un agent infectieux unique (10,4 millions de cas en 2016 avec plus d'un million de morts, dont respectivement 5 000 et environ 500 en France), devant le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Ces travaux ont amené R. Koch à développer un protocole expérimental, le **postulat de Koch**, qui fait encore référence en étiologie, utilisé pour déterminer la nature microbienne de l'agent causal d'une maladie :

- L'agent soupçonné doit être trouvé chez tous les individus atteints.
- Cet agent doit pouvoir être isolé et purifié à partir d'un organisme malade.
- Son injection à un organisme sain sensible (animal ou plante), doit déclencher la même maladie.
- Il faut pouvoir réidentifier le micro-organisme injecté chez l'organisme malade inoculé expérimentalement. Ce postulat n'est pas applicable tel quel dans tous les cas, par exemple si l'agent pathogène n'est pas cultivable *in vitro* (comme *Mycobacterium lepræ*, l'agent de la lèpre). La disponibilité de méthodes moléculaires a depuis permis de caractériser (et d'identifier) de tels pathogènes, et des virus.

Deux autres évolutions constituent des préoccupations majeures actuelles en santé humaine. L'apparition de souches bactériennes **multirésistantes** aux antibiotiques. C'est le cas de *M. tuberculosis* : bien que les traitements actuels permettent de soigner plus de 86 % des cas, l'OMS a déclaré en 2016 490 000 nouvelles infections dues à des souches multirésistantes, qui se sont traduites par le décès d'environ 200 000 personnes. L'autre problème concerne les **infections nosocomiales**, c'est-à-dire les infections contractées à l'hôpital. En France leur prévalence s'élève à environ 5 % des patients hospitalisés, entraînant environ 4 000 décès par an. Les plus fréquentes sont des infections urinaires, des pneumonies, des infections du site opératoire et des infections généralisées (septicémies, bactériémies). Les principaux agents responsables de ces infections sont des **pathogènes opportunistes** comme *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ou *Pseudomonas aeruginosa*. Ces infections peuvent s'expliquer par l'intégration de plusieurs facteurs :

- l'état d'affaiblissement des patients hospitalisés ;
- la réunion de personnes malades ;
- la présence et l'évolution de micro-organismes dans le milieu hospitalier ;
- la présence de chaînes de transmission en milieu hospitalier (personnels, matériels, etc.).

3.2 Réservoirs, transmission et cycles infectieux

La caractérisation du cycle infectieux d'un pathogène consiste à identifier les différentes étapes de sa reproduction, soit la ou les sources de sa provenance, et les moyens lui permettant d'infecter son hôte (voir Figure 7. 7).

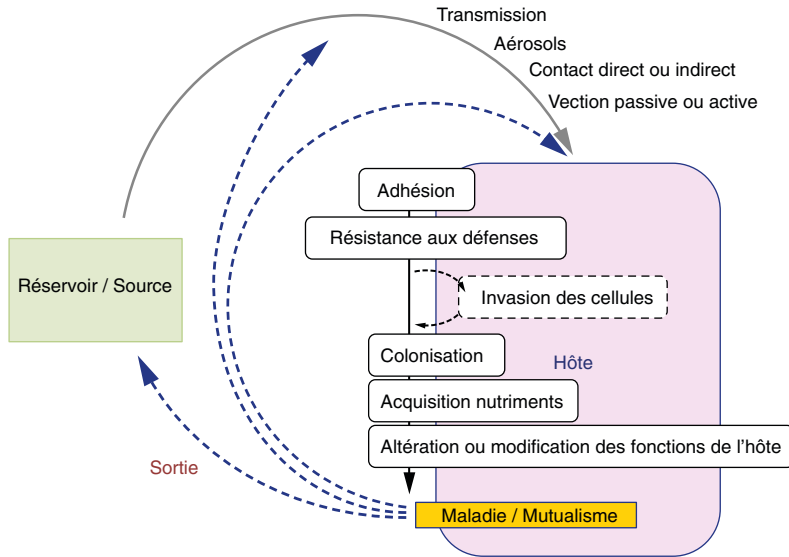


Figure 7.7 – Schéma du cycle infectieux de micro-organismes parasites ou mutualistes

L'étude du mécanisme pathogénique a connu un essor extraordinaire dès les années 1980 grâce aux développements en **biologie** et **microbiologie cellulaires** et **moléculaires**, couplées aux approches génétiques et biochimiques (construction de mutants, clonage de régions génomiques, etc.)[§]. Elles ont permis d'identifier chez les agents pathogènes des gènes contrôlant les interactions avec leur hôte. L'infection de cellules, animales ou humaines, en culture a permis d'étudier de manière très fine certaines étapes clefs de la pathogénie, comme l'entrée dans les cellules de l'hôte pour les pathogènes intracellulaires, ou l'induction de l'apoptose de certaines cellules de l'hôte. L'utilisation de cette « biologie cellulaire *ex vivo* » animale permet de mener des études à grande échelle sans sacrifice d'animaux de laboratoire. En **phytopathologie**, la biologie cellulaire a joué un rôle moins important à cette période. Les travaux ont souvent débuté par la construction de banques de mutants d'agents pathogènes destinées à isoler des variants incapables de provoquer la maladie chez les plantes hôtes, ces dernières étant cultivées en grand nombre en serre ou en chambres de culture. Les gènes mutés ont ainsi pu être identifiés, et la fonction de nombre d'entre eux déterminée (années 1990), permettant de dessiner une image très fine des interactions. Les progrès en microscopie,

notamment en microscopie confocale, ont été déterminants pour comprendre la fonction des composants du pouvoir pathogène. L'identification des cibles de ces composants chez l'hôte a ensuite permis de comprendre leur effet, et d'en construire une vision plus intégrée. Aujourd'hui, en menant ces approches à grande échelle, la **génomique comparative** permet d'étudier l'évolution du pouvoir pathogène, en comparant les génomes d'espèces pathogènes avec ceux d'espèces proches, pathogènes ou non, présentant des spécificités différentes.

Les sources de pathogènes, qui constituent leur **réservoir**, sont très diverses. Il peut s'agir d'organismes vivants (Homme, animaux domestiques ou sauvages, plantes, etc.), incluant les organismes malades mais aussi des **porteurs sains** qui hébergent l'agent pathogène sans développer la maladie (telles les graines germées de Fenugrec). Les maladies transmises à l'Homme par des animaux sont appelées **zoonoses**. Parmi les sources abiotiques, dans lesquelles le pathogène vit ou survit, figurent l'eau, le sol, divers objets ou les aliments.

La **transmission** du réservoir à l'hôte peut s'opérer directement d'hôte infecté à hôte sain, par **contact direct** (toucher, baiser, acte sexuel, etc.) ou **indirect** par l'intermédiaire d'un objet (mouchoir, verre, etc.), d'eau contaminée ou suite aux pratiques médicales (transfusions, cathéters...), ou par le biais de pratiques culturelles pour les plantes (taille, élagage, arrosage, etc.). La transmission peut également se faire à courte distance, par des **gouttelettes** de mucus (aérosols) émises par les individus infectés (toux, éternuements). Des **vecteurs** peuvent être impliqués. Il s'agit de **vection active** si le vecteur est un organisme vivant infecté par l'agent pathogène. Citons le cas de *Yersinia pestis* transmise à l'Homme par la puce du rat (*Xenopsylla cheopis*), ou de *Xylella fastidiosa* transmise d'oliviers malades à oliviers sains par *Philaenus spumarius*. La **vection** est **passive** si le vecteur ne fait que transporter l'agent pathogène : une mouche peut transporter un agent pathogène sur ses pattes ou son abdomen après un passage sur des fèces contaminées, et le déposer ensuite sur un aliment qui sera consommé.

Une fois sur ou dans l'hôte, plusieurs étapes vont se dérouler avant que n'apparaissent les symptômes de la maladie. Leur ordre chronologique est variable d'un agent pathogène à un autre, et certaines étapes peuvent même être facultatives. Dans la plupart des cas, le pathogène doit adhérer aux cellules de l'hôte. Il doit ensuite échapper ou contourner ses mécanismes de défense, envahir un tissu, y demeurer et éventuellement s'y multiplier (**colonisation**). Pour ce faire, il devra être capable d'acquérir chez l'hôte ses nutriments spécifiques. Certains agents pathogènes d'animaux, dits **agents pathogènes intracellulaires**, doivent pénétrer à l'intérieur des cellules de l'hôte. Enfin, les activités et/ou la reproduction du pathogène pourront entraîner une altération des fonctions de l'hôte, aboutissant à l'apparition de la maladie. Enfin, les pathogènes libérés doivent regagner leur réservoir, infecter de nouveaux vecteurs ou contaminer d'autres hôtes. Les symbiotes mutualistes passent par des étapes très similaires ; la notion de cycle infectieux ne concerne donc pas que les agents pathogènes mais aussi de nombreux micro-organismes mutualistes.

Trois cas, *Yersinia*, *Listeria monocytogenes* et *Pseudomonas syringae*, illustrent la variété des différents aspects de ces cycles.

a. *Yersinia*

Le genre *Yersinia*, une Bactérie à Gram⁻ pathogène pour l'Homme, compte dix-sept espèces, dont trois pathogènes. *Y. pestis*, l'agent de la **peste** pour l'Homme, a pour réservoir principal les rongeurs, en particulier le rat noir *Rattus rattus*. La Bactérie peut survivre dans les terriers de ces rongeurs et être transmise à l'Homme par la puce *Xenopsylla cheopis* (**vecteur**) du rat (voir Figure 7.8). Après morsure d'un rongeur contaminé par une puce, les bactéries récupérées par l'insecte forment un biofilm au niveau de la valve entre son œsophage et son intestin moyen. Ce biofilm bloque le flux de sang prélevé par celle-ci lors de son alimentation, ce qui l'affame et la rend plus agressive et capable de s'en prendre aux humains. Lorsqu'elle mord un humain, la puce infectée régurgite le sang et une grande quantité de bactéries au niveau du derme (inoculation sous-cutanée). Les Bactéries, qui ne sont pas tuées par les macrophages humains, vont

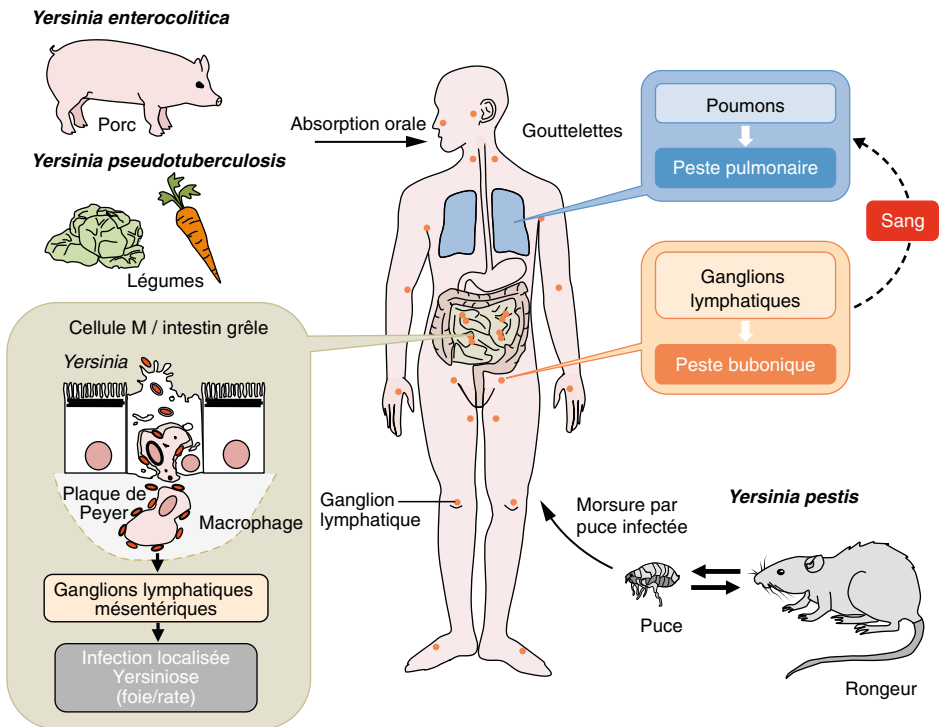


Figure 7.8 – Cycles infectieux et pathogénie des espèces de *Yersinia* pathogènes pour l'Homme (D'après A.K. Heroven et P. Dersch, 2014 ; P. Sansonetti, 2001)

être transportées jusqu'aux ganglions lymphatiques, où elles se multiplient et forment des bubons (**peste bubonique**). La létalité de cette pathogénie est de l'ordre de 50 % en absence de traitement. Dans certains cas, *Y. pestis* se dissémine dans le flux sanguin, entraînant des septicémies fatales, et dans de très rares cas gagne les poumons (**peste pulmonaire**). Les Bactéries peuvent aussi arriver dans les poumons directement par inhalation de poussière de terrier contaminé ou *via* des gouttelettes émises par des individus ayant déjà développé une peste pulmonaire. Cette forme est létale dans 90 % des cas, la mort intervenant de vingt-quatre à soixante-douze heures après l'inhalation. *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia pseudotuberculosis*, des entérobactéries provoquant des maladies intestinales (entérites, diarrhées, adénites mésentériques) communément appelées yersinioses, affectent principalement les animaux. Leurs réservoirs sont très variés (eaux souterraines, sol, plantes, insectes, animaux sauvages ou domestiques). Ces deux pathogènes sont transmis par voie oro-fécale, *Y. enterocolitica* principalement par de la viande de porc crue ou mal cuite, et *Y. pseudotuberculosis* par des légumes et des laitues (voir Figure 7.8). Ces deux Bactéries franchissent la barrière intestinale, envahissent ensuite les ganglions lymphatiques mésentériques et éventuellement le foie et la rate, provoquant des maladies différentes, beaucoup moins graves que la peste. Elles présentent néanmoins un tropisme marqué pour le tissu lymphoïde, comme *Y. pestis*, ce qui en fait des modèles d'étude pour analyser le développement de la peste.

b. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes, l'agent étiologique de la listériose, une Bactérie à Gram positif, se trouve communément dans le sol, l'eau et les détritiques, mais peut également être isolée de divers aliments (lait, fromages à pâte molle, sandwiches, plats cuisinés, fruits et légumes frais). Elle est capable de croître à la température du réfrigérateur sur les aliments en conservation. Elle infecte de nombreux animaux (oiseaux, ruminants, rongeurs). C'est un pathogène opportuniste de l'Homme, qui se développe principalement chez les personnes immunodéprimées, les personnes âgées, les femmes enceintes, leur fœtus et les nouveau-nés. Bien que le nombre d'infections annuelles soit relativement faible (~23 000), la mortalité est très élevée (20 à 30 %), ce qui en fait un des pathogènes très préoccupants pour l'industrie agroalimentaire. Après ingestion, la Bactérie gagne l'épithélium intestinal par phagocytose, traverse la barrière intestinale et gagne ses organes cibles (foie et rate) *via* la lymphe ou le flux sanguin. *L. monocytogenes* peut traverser la barrière hémato-encéphalique chez les personnes immunodéprimées, provoquant des méningites, et la barrière fœto-placentaire chez les femmes enceintes, provoquant des avortements, des accouchements prématurés et/ou des septicémies chez les nouveau-nés (voir Figure 7.9).

c. *Pseudomonas syringæ*

Pseudomonas syringæ, Bactérie phytopathogène à Gram⁻, provoque des maladies (nécroses, taches, chancres) sur les feuilles, les tiges, les gousses ou les fruits des végétaux.

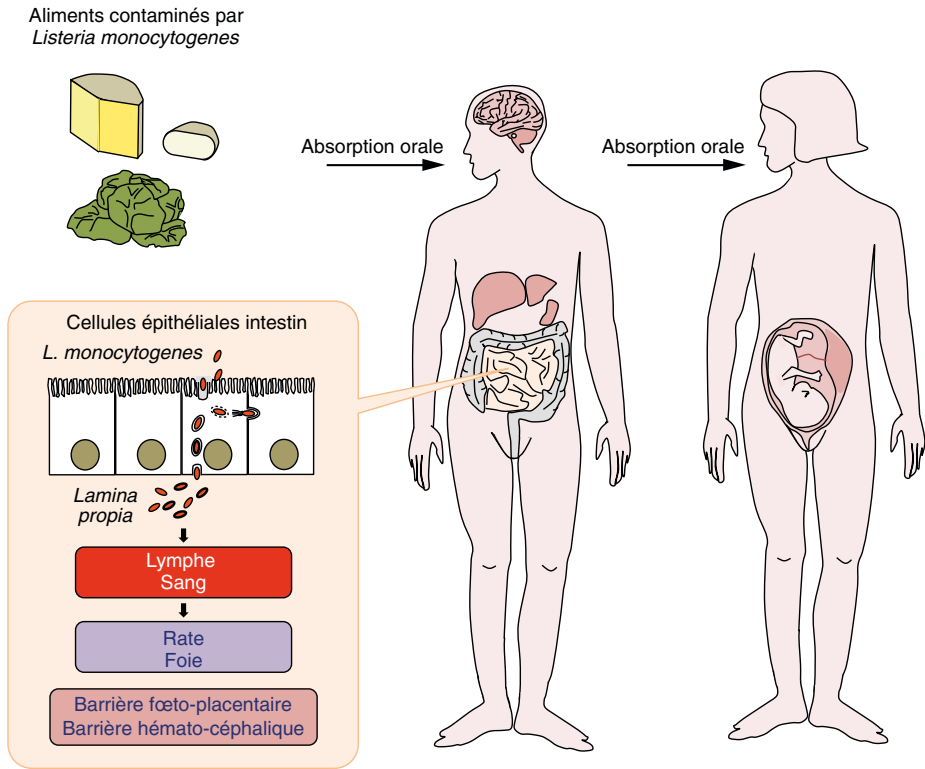


Figure 7.9 – Cycle infectieux de *Listeria monocytogenes* (D'après L. Radoshevich et P. Cossart, 2018)

Les souches sont classées en **pathovar** (pv.) sur la base des plantes hôtes sur lesquelles elles ont été isolées et pour lesquelles elles sont pathogènes (*P. syringæ* pv. *tomato* infecte la tomate, *P. syringæ* pv. *phaseolicola* le haricot commun, *Phaseolus vulgaris* L). Cette Bactérie épiphyte est fréquente à la surface des feuilles de plantes sauvages (de 10^2 à 10^4 bactéries par cm^2), mais également dans les rivières, les lacs et les eaux souterraines des zones tempérées (jusqu'à environ mille bactéries. L^{-1}), les nuages, les précipitations et les aérosols surmontant la canopée, dans le manteau neigeux des régions alpines et les litières végétales immédiatement inférieures. Il a été proposé que son cycle de vie soit intimement lié à celui de l'eau : grâce à une protéine présente à sa surface qui favorise la formation de cristaux, elle possède une activité de nucléation de la glace à des températures de l'ordre de -2 à -8 °C, auxquelles la glace ne se forme pas seule. Cette capacité pourrait intervenir dans le déclenchement de précipitations qui permettraient le retour des bactéries à la surface des feuilles hôtes, dans lesquelles elles doivent pénétrer pour accomplir leur cycle infectieux (Fig 7.10).

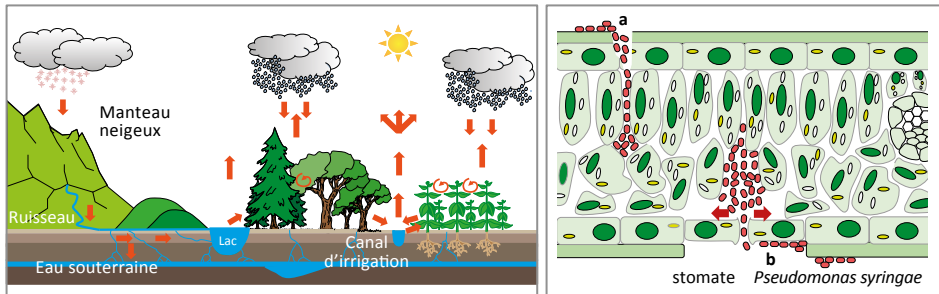


Figure 7.10 – Infection d'une plante par *Pseudomonas syringae* (D'après C.E. Morris et al., 2013)

A. Cycle de transmission et cycle de l'eau (les flèches indiquent les mouvements des bactéries). **B.** Feuille en coupe infectée par *P. syringae*. (a) Les Bactéries peuvent entrer dans les plantes à la faveur de blessures naturelles ou provoquées par leur activité de nucléation de la glace ; (b) Certains pathovars peuvent induire l'ouverture des stomates grâce à une toxine, la coronatine, qui, en mimant une hormone végétale (le jasmonate) entraîne l'ouverture des stomates, des pores présents à la surface des feuilles impliqués dans les échanges gazeux, par lesquels les bactéries vont entrer. À l'intérieur des feuilles, les bactéries présentes dans l'apoplaste (espace entre les cellules végétales) s'y multiplient, provoquant les symptômes de la maladie.

3.3 Adhérence/entrée dans les cellules hôtes

L'attachement de Bactéries pathogènes à leurs cellules hôtes est souvent une étape déterminante, et le premier échange moléculaire initiant les étapes suivantes du processus infectieux. Cette étape ancre de manière stable le pathogène à son hôte, et lui permet ainsi de résister à une élimination mécanique. De nombreuses protéines bactériennes, des **adhésines**, participent à cet attachement, sous forme monomérique ou polymérique, formant alors des structures, les **pili** ou **fimbriæ** (voir Chapitre 1). En général, les pathogènes produisent plusieurs adhésines, chacune ayant une spécificité leur permettant de se lier à des molécules particulières de l'hôte. Certaines adhésines peuvent même promouvoir l'entrée des bactéries à l'intérieur des cellules de l'hôte. Les *Yersinia* pathogènes de l'Homme produisent au moins sept adhésines, toutes n'étant pas présentes ou actives chez les trois souches pathogènes, et certaines pouvant avoir des fonctions supplémentaires. *L. monocytogenes* peut être internalisée dans les cellules de l'hôte par l'intermédiaire d'adhésines, permettant son entrée dans des entérocytes et des cellules en gobelet, des cellules hépatiques ou le placenta. L'absorption peut être opérée par des cellules non phagocytaires, l'une des caractéristiques de l'infection par cette Bactérie. Plusieurs molécules (exopolysaccharides, pili de type IV, hémagglutinines filamenteuses) favorisant l'attachement de *P. syringae* peuvent être impliquées à la fois dans leur adhérence aux cellules végétales et dans la formation de biofilms bactériens (voir Chapitre 6).

3.4 Contournement des défenses

L'**immunité** innée constitue l'une des premières lignes de défense chez les animaux et les plantes. Le déclenchement de cette réponse immunitaire est fondé sur la reconnaissance de molécules diverses (dites PAMP, *Pathogen-Associated Molecular Pattern*, ou MAMP, *Microbial-Associated Molecular Pattern*) spécifiques des micro-organismes, y compris les pathogènes, dont elles ne sont pas forcément spécifiques. Dans le monde bactérien il s'agit de molécules telles que les lipopolysaccharides, le peptidoglycane, l'acide teichoïque, l'ADN CpG, ou des fragments de la flagelline du flagelle (voir Chapitre 1). Les mêmes molécules déclenchent l'immunité innée chez les animaux et chez les plantes. Les PAMP sont reconnus par des récepteurs spécifiques, dits PRR (*Pattern Recognition Receptors*).

Chez les vertébrés, les PRR peuvent être associés aux membranes des macrophages (récepteurs TLR de type Toll), insérés dans la membrane plasmique ou dans celle des endosomes, ou solubles (récepteurs de type NOD (*Nucleotide Oligomerisation Domain Receptors*), localisés dans le cytoplasme). L'activation de ces récepteurs enclenche une réaction pro-inflammatoire qui se traduit notamment par la synthèse de cytokines (interleukines, facteurs de nécrose).

Les plantes n'ont pas de système d'immunité adaptative. Leur défense contre les micro-organismes repose en partie sur une immunité innée qui se joue à deux niveaux. Le premier, appelé PTI (*PAMP-Triggered Immunity*), fondé sur la reconnaissance des PAMP par des récepteurs PRR, se traduit par une réponse permettant de limiter la croissance des micro-organismes. Le deuxième niveau de défense, spécifiquement induit par les agents pathogènes, dépend de récepteurs appartenant principalement à la famille NOD, capables de détecter l'activité des pathogènes (voir Figure 7.2). Ce niveau de défense, ETI (*Effector-Triggered Immunity*), se traduit par une réponse très forte caractérisée en particulier par une apoptose rapide des cellules infectées, ou réponse hypersensible (HR), qui est associée à la résistance aux pathogènes. Les plantes résistantes peuvent être des non-hôtes (par exemple le tabac pour *P. syringæ* pv. *tomato*) ou un hôte devenu résistant (par exemple la souche DC3000 de *P. syringæ* pv. *tomato* provoque la maladie sur la variété de tomate 76S, un hôte sensible, mais pas sur la variété 76R, résistante). Il semble donc qu'il y ait une véritable course aux armements entre le pathogène et le déploiement des systèmes de garde mis en place par les plantes, reflétant une co-évolution continue entre les agents pathogènes et leurs hôtes.

Le **LPS**, PAMP des trois souches de *Yersinia* pathogènes pour l'Homme, est différent et moins immunogène quand il est produit à 37 °C (hôte mammifère) qu'à 26 °C. Cette capacité permet à la Bactérie d'être moins facilement détectée par l'immunité innée de l'hôte. Par ailleurs, ces trois souches ne déclenchent pas la production de cytokines lors d'infection de macrophages en culture, et inhibent la phagocytose. En outre, elles partagent plusieurs caractéristiques liées à la présence d'un plasmide, pYV, dont une incapacité de croissance à 37 °C en milieu pauvre en calcium et la production de longs filaments composés de huit protéines Yop (*Yersinia Out Proteins*) sécrétées dans le milieu.

L'appareil de sécrétion, formé par les protéines Ysc et Lcr, codées par pYV, dit de **type III (SST3)**, diffère des systèmes de types I et II caractérisés jusqu'alors (voir Chapitre 3) (voir Figure 7.11). L'analyse fonctionnelle de SST3 a permis d'établir la relation entre sécrétion des protéines Yop et inhibition de la production des cytokines et de l'activité anti-phagocytaire. La découverte du rôle de SST3 dans l'injection (translocation) de certaines protéines Yop à l'intérieur des cellules animales représente une avancée conceptuelle majeure en pathologie, puisqu'elle montre que des agents pathogènes non intracellulaires peuvent « agir » à l'intérieur des cellules hôtes grâce à ces systèmes d'injection. Le SST3 de *Yersinia* est devenu le paradigme de ces systèmes. Il comprend une aiguille creuse à l'intérieur de laquelle les effecteurs Yop transitent, dont la longueur est finement régulée pour être compatible avec l'espace existant entre les Bactéries et les cellules hôtes, espace déterminé par les systèmes d'attachement. L'aiguille se termine par une structure, dite translocon, qui crée un pore dans la membrane plasmique des cellules hôte (voir Figure 7.11). L'analyse des protéines Yop, encore en cours, a permis de montrer leur fonction d'**effecteurs** (voir Chapitre 6) actifs sur plusieurs fonctions de l'hôte : quatre protéines Yop altèrent l'activité du cytosquelette, inhibant ainsi

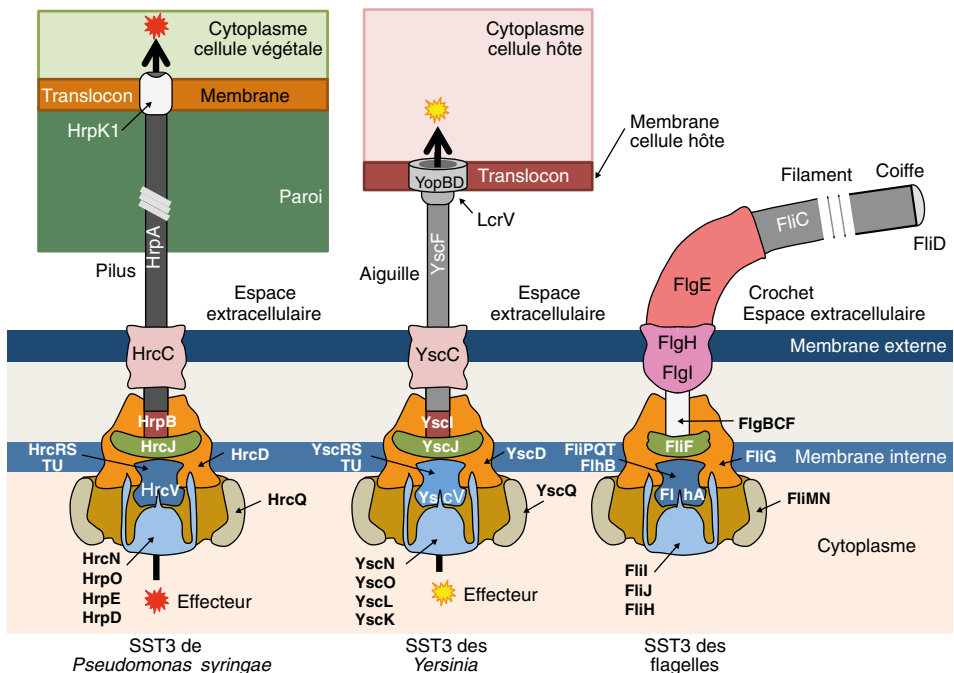


Figure 7.11 – Systèmes de sécrétion de type III (SST3) de *Yersinia* spp., de *P. syringae* et du flagelle des Bactéries à Gram⁻ (D'après W. Deng et al., 2017)

Les protéines et les structures conservées dans les trois types de nano-machines sont figurées par des couleurs identiques. La translocation (injection) d'effecteurs dans les cellules hôte est illustrée pour *Yersinia* et *P. syringae*.

la phagocytose par les macrophages, et deux autres l'immunité innée en modifiant certaines kinases, ce qui inhibe la production de cytokines (voir Figure 7.12). Les deux derniers effecteurs Yop participent à la formation du translocon.

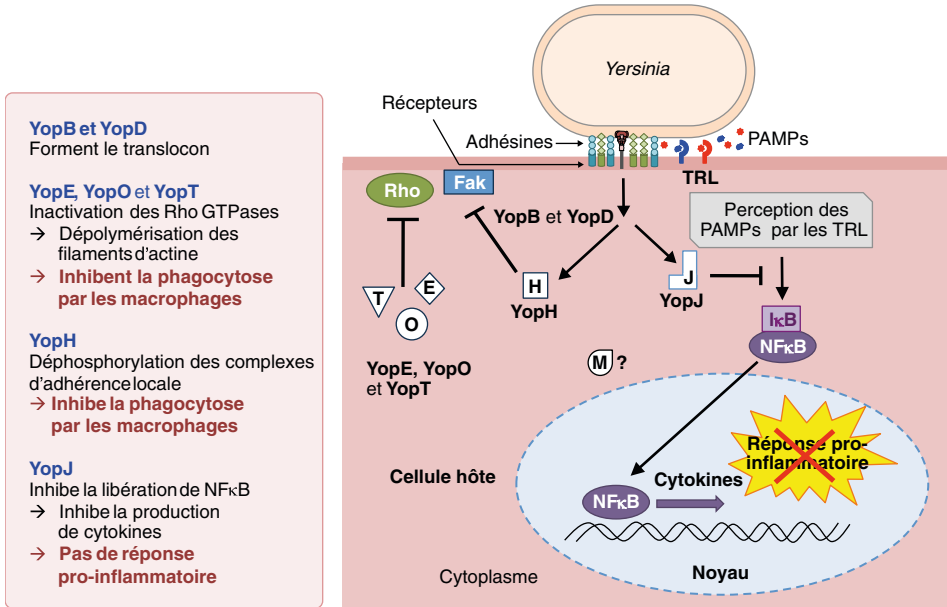


Figure 7.12 – Fonctions des effecteurs Yop des *Yersinia* pathogènes pour l'Homme

Le pouvoir pathogène de *P. syringae* prend avantage d'un système de sécrétion de SST3 (voir Figure 7.11). Une mutagenèse aléatoire effectuée sur cette Bactérie a permis d'identifier un groupe de gènes contrôlant la virulence sur plante hôte et l'induction de la HR sur plantes non-hôtes ou sur des variétés de plantes hôtes résistantes. Ces gènes, *hrc*, groupés dans le génome, contrôlent la formation d'un SST3 très semblable à celui de *Yersinia*. Les différences concernent la longueur de l'aiguille, supérieure chez *P. syringae*, certainement du fait qu'elle doit traverser l'épaisse paroi des cellules végétales (voir Figures 7.11 à 7.13), et le translocon. Le nombre d'effecteurs est beaucoup plus important que chez les *Yersinia* (vingt-huit chez la souche *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, tous injectés par le SST3), et diffère en répertoires, nombre et spécificité entre souches. Ces effecteurs ont souvent des fonctions redondantes, ce qui rend leur étude difficile. La souche *Psto*-DC3000 a servi de modèle car elle est pathogène sur tomate et sur la plante modèle *A. thaliana*, qui a servi de modèle pour la plupart des résultats décrits ci-dessous. Parallèlement à la coronatine qui intervient dans l'ouverture des stomates, quatre effecteurs de *P. syringae* (AvrB, HopBB1, HopXA et HopZ1a) participent à ce processus, ce qui démontre l'importance de cette étape pour l'entrée des Bactéries. D'autres effecteurs

manipulent directement l'immunité d'*Arabidopsis*. Les effecteurs AvrPto et AvrPtoB inhibent les voies de défenses induites par plusieurs PAMP (flagelline, facteur EFTU) lors de la PTI (*PAMP-Triggered Immunity*) en ciblant des PRR spécifiques (FLS2 et EFR). AvrPto inhibe l'activité kinase de FLS2 et d'EFR, tandis qu'AvrPtoB induit l'ubiquitination de FLS2, entraînant sa dégradation par le protéasome. Les effecteurs HopM1 et HopR1 agissent en aval, en ciblant la voie des MAP Kinases (MAPK) activée par les PRR. Les effecteurs HopM1 et HopR1 interfèrent avec la production des défenses antimicrobiennes située en aval des étapes de signalisation (voir Figure 7.13).

Par conséquent, comme pour *Yersinia*, des effecteurs de *P. syringae* sont capables d'inhiber les défenses de l'hôte. Toutefois, chez les plantes le deuxième niveau de défense, ETI, est beaucoup plus intense que la PTI. L'ETI est spécifiquement déclenchée par les effecteurs. Par exemple, la protéine RIN4 d'*Arabidopsis* qui intervient dans la PTI peut être clivée par l'effecteur AvrRpt2 qui agit comme une protéase. Cette protéolyse inhibe la voie de défense PTI basée sur la reconnaissance de la flagelline.

Toutefois, il existe chez *Arabidopsis* un système dit de garde, capable de détecter toute modification de RIN4. Il repose sur des gènes dits de **résistance** qui codent généralement

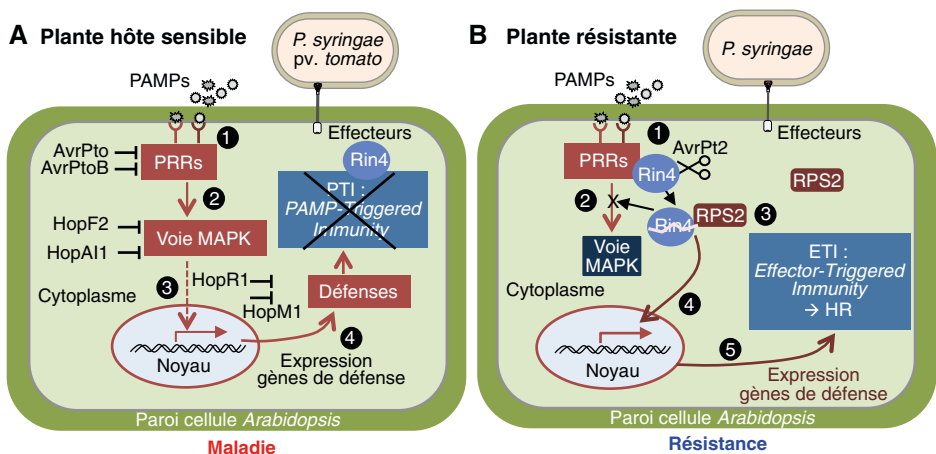


Figure 7.13 – Rôle de certains effecteurs de *Pseudomonas syringae* dans l'inhibition ou l'induction de l'immunité chez la plante *Arabidopsis thaliana* (D'après X.-F. Xin et S.H. He, 2013)

A. Inhibition de l'immunité innée induite par les PAMP (PTI) par les effecteurs AvrPto, AvrPtoB, HopF2, HopA1, HopR1 et HopM1. Cette inhibition permet l'apparition de la maladie. **B.** Induction de l'immunité induite par l'effecteur (ETI) AvrPt2 chez une plante résistante par l'intermédiaire la protéine de résistance RPS2. RPS2 « garde » la protéine RIN4. Lorsque celle-ci est clivée par AvrPt2, RPS2 induit un programme de défense spécifique ETI, qui se traduit par la mise en place de défenses qui limitent la croissance du pathogène. Dans certains cas, cela se traduit par une réaction hypersensible (HR). La plante « résiste » ainsi à la maladie.

pour des protéines cytoplasmiques de type NLR. Un système de garde donné n'est pas présent chez toutes les variétés d'une plante, mais s'il est présent, il permet la détection des modifications d'éléments clefs de la PTI, ce qui déclenche l'ETI. Les plantes résistent alors à la maladie. Ainsi, la protéine de résistance RPS2 qui garde RIN4 n'est pas présente dans toutes les lignées d'*Arabidopsis*, mais si elle est présente et qu'un agent pathogène, par son activité, modifie RIN4, alors il y aura déclenchement de l'ETI et résistance à la maladie. Dans notre exemple, c'est donc l'effecteur AvrRpt2 qui déclenche l'ETI. C'est pour cela que l'on parle d'immunité induite par les effecteurs. Toutefois, les choses peuvent encore se complexifier. En effet, un autre effecteur de *Psto*-DC3000, HopF2, interagit avec RIN4 et empêche sa dégradation par AvrRpt2. Dans les souches possédant à la fois AvrRpt2 et HopF2, l'ETI est inhibée, ce qui va permettre la progression de la maladie. Il y aurait une véritable course en avant chez le pathogène pour contrer le déploiement des systèmes de garde mis en place par les plantes, et une coévolution continue entre agents pathogènes et hôtes.

Le pouvoir pathogène de *L. monocytogenes*, qui ne possède pas de SST3, passe par son internalisation par les cellules phagocytaires ou non phagocytaires (voir Figure 7.14). Dès le contact Bactérie-hôte et durant le processus d'internalisation, ses PAMP déclenchent les voies de défenses contrôlées par les récepteurs de type Tol, qui conduisent à l'induction des gènes de la réponse pro-inflammatoire. Il semble que la plupart des bactéries soient tuées lors de la fusion des phagosomes et des lysosomes, ce qui génère la production d'antigènes et le déclenchement des réponses des cellules T CD4+. Toutefois, dans certaines conditions, une fois dans ces vacuoles, les bactéries produisent deux phospholipases (PlcA et PlcB), une listériolysine (LLO) et une lipoprotéine (PplA) qui provoquent la rupture des vacuoles par production de pores et dégradation des lipides membranaires (voir Figure 7.14Ba). Cela libère les bactéries dans le cytoplasme des cellules hôtes. Certaines bactéries sont lysées, ce qui déclenche l'inflammasome et d'autres voies de défense comme la voie STING (*Stimulator of INterferon Genes*) spécifiquement induite par la présence d'ADN dans le cytoplasme (voir Figure 7.14Bc). De manière paradoxale, l'induction de cette voie de défense a un effet négatif sur l'immunité contre *L. monocytogenes*. Les Bactéries qui survivent produisent des molécules qui vont également inhiber les voies de défense. Il s'agit par exemple de l'internaline InlC qui inhibe la voie NFkB (voir Figure 7.14Bd), ou encore d'un dinucléotide, le di-AMP cyclique qui interfère avec la voie STING et la protéine RECON (une enzyme du foie) (voir Figure 7.14B). Parallèlement, les Bactéries présentes dans le cytoplasme produisent à leur surface une protéine, ActA, qui, en interagissant avec le complexe Arp2/3, induit la polymérisation des filaments d'actine (voir Figure 7.14Bb). Ceux-ci forment une queue en comète à la base des cellules bactériennes, les propulsent à l'intérieur des cellules hôtes et permettent même leur passage d'une cellule à une autre. Par ailleurs, lors de l'infection des cellules en gobelet, les cellules de *L. monocytogenes* restent dans les vacuoles d'endocytose et ressortent par transcytose, ce qui permet le passage rapide de la barrière intestinale (voir Figure 7.14B).

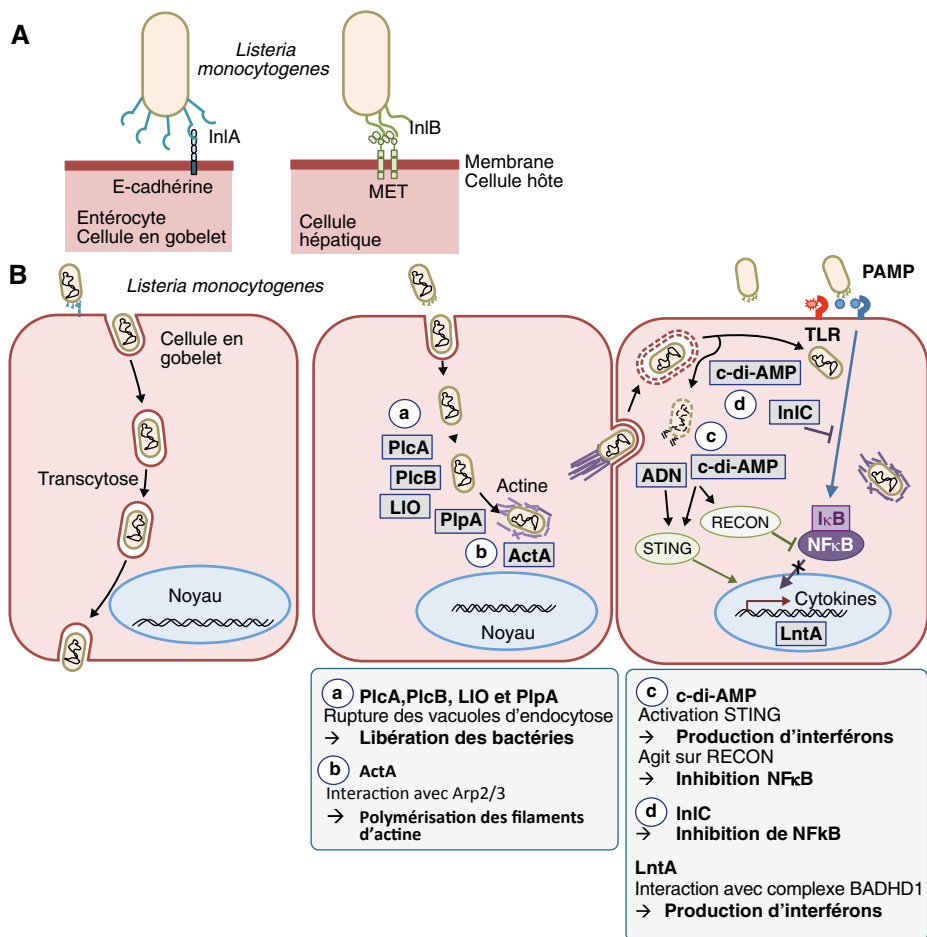


Figure 7.14 – Attachement et infection de cellules humaines par *Listeria monocytogenes* (D'après L. Radoshevich et P. Cossart, 2018)

A. Attachement des cellules de *L. monocytogenes* par l'intermédiaire de liaisons des internalines InlA et InlB aux récepteurs E-cadhérine et MET, respectivement. Cette reconnaissance induit l'endocytose des bactéries. **B.** Devenir des Bactéries dans les cellules hôtes et inhibition de l'immunité. Les bactéries peuvent passer la barrière intestinale par transcytose au niveau des cellules en gobelet, entraîner la rupture des vacuoles d'endocytose (a), ou migrer d'une cellule à une autre grâce à la polymérisation de filaments d'actine induite par ActA (b).

Comme nous l'avons vu ici, le contournement des défenses de l'hôte est une étape très importante, qui repose sur la production d'effecteurs ou de molécules qui vont être capables d'agir à l'intérieur des cellules de l'hôte, que ce soit par l'intermédiaire d'un système d'injection ou suite à l'entrée des Bactéries à l'intérieur des cellules de

l'hôte. Cette bataille se joue donc en grande partie dans le cytosol des cellules de l'hôte. Toutefois, certains effecteurs peuvent même gagner le noyau des cellules hôtes pour en modifier l'expression. C'est par exemple le cas de la **nucléomoduline** LntA de *L. monocytogenes*. Cette protéine interagit avec la protéine BAH1 de l'hôte, un répresseur de la chromatine. Son interaction avec LntA se traduit par la dérégulation de gènes d'interférons, ce qui paradoxalement bénéficie à la Bactérie. Chez *Yersinia*, la protéine YopM pourrait également agir dans le noyau des cellules hôtes. Toutefois, ses cibles et ses effets sont encore inconnus. Chez *P. syringae*, aucun effecteur ne semble agir dans le noyau. Cependant, chez d'autres Bactéries phytopathogènes comme *Xanthomonas* ou *Ralstonia solanacearum*, des effecteurs, les TAL (*Transcription Activator Like*), injectés par les SST3 de ces Bactéries, agissent directement dans le noyau des cellules hôtes où ils activent l'expression de gènes spécifiques.

3.5 Évolution du pouvoir pathogène

Le système SST3 est très conservé chez de nombreuses Bactéries à Gram⁻ pathogènes de vertébrés, d'insectes, de plantes ou de champignons, et chez des symbiotes mutualistes. Chez les pathogènes, les effecteurs injectés n'entraînent pas la mort des cellules hôtes comme le font généralement les toxines, mais agissent plutôt de manière synergique pour générer des réponses complexes non destructives. Certaines Bactéries comme *Salmonella typhimurium* possèdent plusieurs SST3 qui interviennent chacun dans une étape différente de l'interaction : l'entrée dans les cellules hôtes, le contrôle de la survie et la croissance dans les vacuoles à l'intérieur des cellules infectées. Le flagelle bactérien comprend dans sa partie basale un SST3 ayant de très fortes analogies avec les SST3 des agents pathogènes (voir Figure 7.11). Ce SST3 permet la sécrétion des constituants du flagelle, qui s'assemblent au fur et à mesure de leur sortie pour former le crochet et le filament (voir Chapitre 6). Les analyses phylogénétiques suggèrent que les SST3 des pathogènes auraient évolué à partir de celui du flagelle pour assurer la sécrétion de protéines. La capacité à injecter des effecteurs serait apparue par la suite au cours de l'évolution des pathogènes par l'acquisition de composants spécifiques. Les SST3 ne sont pas les seules machines (ou **nano-machines**) permettant l'injection d'effecteurs dans des cellules hôtes. Les **systèmes de sécrétion de type IV** et de **type VI** (voir Chapitre 3) en sont aussi capables. Ces systèmes contrôlent également la pathogénie des bactéries qui en possèdent. Enfin le système de sécrétion ESX-1 de type VII, spécifique de *M. tuberculosis*, bien que n'étant pas vraiment un système d'injection, agit à l'intérieur des cellules infectées en permettant la sécrétion d'effecteurs qui déclenchent la lyse des membranes des phagosomes et la suppression de l'immunité.

En règle générale, les gènes codant ces différentes nano-machines forment des clusters, ou **îlots de pathogénicité** (voir Chapitre 4), qui peuvent être portés par des plasmides (chez les *Yersinia* pathogènes pour l'Homme) ou localisés sur le chromosome (*P. syringae*). Les analyses phylogénétiques ont montré qu'ils pourraient résulter de transferts horizontaux. Les effecteurs de ces systèmes peuvent être codés par des gènes

appartenant à ces îlots, mais dans de nombreux cas sont éparpillés dans le génome. Si les constituants de ces « machines » sont conservés entre différentes Bactéries, le nombre et la nature des effecteurs sont variables et caractéristiques de chaque agent pathogène. Les contraintes évolutives ayant permis leur émergence reposent vraisemblablement sur la nécessité de pouvoir délivrer plusieurs effecteurs dans une seule et même cellule, caractéristique très difficile à atteindre par les mécanismes plus simples utilisés par les exotoxines. Ces systèmes complexes semblent dans la plupart des cas avoir dérivé de systèmes impliqués dans des interactions inter-bactéries ou avec l'environnement (SST3).

La découverte de ces systèmes de sécrétion et les études sur *L. monocytogenes* ont permis de comprendre des processus fondamentaux non seulement en microbiologie mais aussi en immunologie et en biologie cellulaire. Les connaissances acquises sur ces systèmes et leurs effecteurs permettent d'envisager des applications thérapeutiques complètement nouvelles, fondées sur leur inactivation par des inhibiteurs spécifiques ou par l'intermédiaire d'anticorps dirigés contre des composants clefs. Parallèlement, il est envisagé d'utiliser ces systèmes pour administrer des antigènes et développer de nouveaux vaccins, ou pour délivrer des enzymes dans des cellules déficientes, faire de l'édition de gènes ou encore cibler des cellules cancéreuses. Il est également proposé d'utiliser certains effecteurs pour soigner des maladies. Ce n'est donc que le début d'une nouvelle histoire initiée dans les années 1980.

Les points clefs du chapitre

- 1 Les symbioses, des associations facultatives ou obligatoires entre organismes d'espèces différentes, existent sous trois types : mutualisme (tous les partenaires en tirent bénéfice), commensalisme (un partenaire tire avantage sans nuire aux autres), parasitisme (un partenaire tire profit au détriment de l'autre).
- 2 Les Eucaryotes et Bactéries d'une interaction sont appelés hôtes et symbiotes.
- 3 De nombreuses symbioses impliquent des interactions spécifiques entre partenaires, définissant le spectre d'hôtes du symbiote.
- 4 Un microbiote est l'ensemble des micro-organismes vivant en association stable avec un hôte.
- 5 Le microbiote intestinal humain est dominé par deux grands types de phyla bactériens : les Bacteroïdètes et les Firmicutes, dont l'équilibre détermine un état de bonne santé. Sa composition varie au cours de la croissance et se stabilise à l'âge adulte.
- 6 Les plantes sélectionnent leur microbiote.
- 7 Les maladies infectieuses sont dues à des agents pathogènes, dont la virulence définit l'intensité du pouvoir pathogène.
- 8 Un cycle infectieux présente un ensemble d'étapes associées aux notions de réservoir, transmission, vecteur, adhésion, colonisation, contournement de l'immunité et de sortie de l'hôte.
- 9 L'immunité innée (animaux et plantes) est fondée sur la reconnaissance de molécules microbiennes spécifiques (MAMP ou PAMP).
- 10 Les bactéries pathogènes peuvent injecter dans les cellules hôtes des effecteurs qui agissent en synergie, provoquent des dysfonctionnements et contournent l'immunité.
- 11 Certaines Bactéries pathogènes produisent des toxines qui altèrent le fonctionnement normal de leurs cellules hôtes.



Entraînez-vous

- 7.1 Donner la définition des termes symbiose, mutualisme, commensalisme et parasitisme.
- 7.2 Décrire les grandes étapes du cycle d'une Bactérie infectieuse.
- 7.3 Comment définir le terme microbiote ?
- 7.4 Quels phyla bactériens dominent le microbiote intestinal humain ?
- 7.5 Quel(s) rôle(s) joue le microbiote intestinal chez l'Homme ?
- 7.6 Nommer et décrire les spécificités des molécules bactériennes qui déclenchent l'immunité innée.
- 7.7 Quelle est la fonction principale des systèmes de sécrétion de type 3 des Bactéries pathogènes ?
- 7.8 Décrire le postulat de Koch.
- 7.9 Expliciter les différences entre pouvoir pathogène et virulence.
- 7.10 Décrire les grandes classes de toxines produites par les Bactéries pathogènes d'animaux.

Introduction

Les virus sont des entités biologiques parasites caractérisées par la présence d'un seul type d'acide nucléique et l'absence de tout métabolisme propre. Leur reproduction se fait uniquement à l'intérieur et au détriment d'hôtes. Ils existent ainsi sous deux états, une forme extracellulaire libre, dite virion ou virus, métaboliquement inerte, et un état intracellulaire reproductif, qui à son terme produit les virions libres.

Objectifs

- Connaître** la structure des virus infectant pro- et Eucaryotes
- Identifier** le rôle des constituants des particules virales dans le cycle reproductif
- Définir** les caractéristiques de leur cycle de multiplication
- Expliquer** les relations entre nature et structure (ADN/ARN, double ou simple brin) du génome viral et les principales caractéristiques des cycles reproductifs

Plan

- 1 Présentation et classification
- 2 Structure
- 3 Phases du développement
- 4 Quelques virus typiques

1 Présentation et classification

Le terme virus est une dénomination générale, recouvrant plusieurs catégories définissables par les hôtes dans lesquels ils se reproduisent. Ces spectres d'hôte(s) sont stricts quant au domaine auquel appartiennent les hôtes, ce qui a conduit à définir une nomenclature usuelle : bactériovirus (ou, plus utilisée, bactériophage ou phage), archéovirus, et eucaryovirus (ou virus d'Eucaryote). Les virus sont de loin les entités biologiques les plus abondantes sur la planète (10^{31} particules), dont majoritairement des phages (avec une abondance dix fois supérieure à celle des procaryotes). Cependant ils ne représentent qu'environ 5 % de la biomasse terrestre totale, en raison de leurs faibles dimensions. Ils jouent un rôle important dans l'équilibre des populations des micro-organismes des environnements naturels ; ainsi des phages détruisent environ 20 % de la masse bactérienne des océans chaque jour. Tous les virus ont besoin pour leur reproduction d'un hôte en état de métabolisme actif, en raison de leur nature parasitaire. Ils sont

potentiellement létaux (virulents), ou au minimum nocifs ; cependant beaucoup sont dans un état chronique (ou porteur) n'entraînant pas directement la mort de l'hôte. Certains bactériovirus, dits tempérés, peuvent se maintenir transitoirement sous une forme silencieuse (dite de lysogénie ou de virus latents) dans la cellule hôte. Ils peuvent alors parfois apporter une information génétique utile à leur hôte, tels les gènes à fonction métabolique. Chez l'Homme et chez les animaux et plantes d'intérêt agronomique, les infections virales sont responsables de nombreuses pathologies, souvent létales. De nombreux eucaryovirus sont objets d'intenses recherches, pour l'aspect sanitaire ainsi que pour leur intérêt appliqué.

L'étendue du domaine de la virologie impose que ce chapitre n'en soit qu'une introduction générale, avec une grande place pour les bactériovirus, étant donné l'importance qu'ils ont jouée dans nombre de découvertes et de définitions de concepts de base de la biologie cellulaire actuelle.

Les premières classifications des virus se fondaient sur la nature des organismes parasités (bactériophages, mangeurs de bactéries), leur mode de transmission (virus entériques, arbovirus, transmis par la voie digestive ou les arthropodes) ou la pathologie provoquée (virus de la rage, de la grippe). Une classification proposée en 1962 par A. Lwoff (prix Nobel de médecine), R.W. Horne et P. Tournier, de structure linnéenne, hiérarchique et non phylogénétique utilisait quatre principaux critères : la nature de l'acide nucléique génomique, la morphologie et les dimensions de la particule virale, et la présence ou non d'une enveloppe. Adoptée en 1975 par le Comité international de taxonomie des virus (ICTV), elle a été complétée par l'ajout de nouveaux critères : maladies associées à l'infection, organismes et tissus affectés, données moléculaires, dont la séquence nucléique des génomes. La classification actuelle met en avant ces critères moléculaires (nature [ADN/ARN], structure [double/simple brin, circulaire/linéaire], polarité positive ou négative des génomes simple brin et processus de répllication), définissant ainsi sept groupes (D. Baltimore, prix Nobel de médecine, 1975) (voir Tableau 8.1). Les niveaux supérieurs (classe, phylum, domaine) n'existent pas, en raison de l'énorme difficulté à établir des liens phylogénétiques entre les virus. Cette classification utilise la nomenclature ...*virales* (ordre), ...*viridæ* (famille), ...*virinæ* (sous-famille), et virus pour le genre et l'espèce. Les sept groupes (ICTV 2017) répartissent les virus actuellement connus en neuf ordres, 134 familles, 455 genres et plus de 4 000 espèces. Les virus infectant les Bactéries (dont l'ordre des *Caudovirales* représente 96 % de ces virus) sont classés en douze familles, avec plus de 2 200 génomes entièrement séquencés (bases de données virales des sites NCBI et ViralZone). Ainsi, le bactériophage T4 (§ 4.1b) est classé : groupe I (virus à ADN double brin), ordre des *Caudovirales*, famille *Myoviridæ* (virus à queue contractile), sous-famille *Tevenvirinæ* (série T « paire »), genre T4, espèce *Escherichia virus* T4. Malgré leur nombre encore limité (une centaine de génomes), les archéovirus actuellement caractérisés se répartissent au sein de dix-sept familles, indiquant leur grande diversité morphologique et génétique.

2 Structure

2.1 Les capsides

Un virus est constitué d'un acide nucléique, ADN ou ARN, enfermé dans un revêtement protéique (ou coque), la capside, dont certaines sont entourées d'une enveloppe (ou péplos). La capside assure la protection du génome contre des dommages possibles et permet, grâce à des structures appropriées, la fixation du virion à la cellule hôte, prémisses de l'infection virale. Leurs morphologies varient beaucoup suivant les types de virus, sans corrélation (connue) avec les organismes qu'ils infectent (voir Tableau 8.1) (voir Figures 8.1 et 8.2). La majorité d'entre elles peut être définie par cinq prototypes, correspondant à deux structures de base, chacune enveloppée ou nue (virus dits enveloppés ou nus, respectivement), et à une structure complexe, avec une « tête » et une « queue » (virus dits caudés). Certaines ont des formes moins bien définies, variables (les Poxvirus) – telles que fuseau allongé, goutte, amphore (les virus géants Pandavirus) –, recouvertes de fibrilles (Mimivirus), dont la liste continue à s'enrichir avec la découverte, en particulier, de virus d'Archées, riches en morphotypes.

La capside icosaédrique, très fréquente chez les virus des trois domaines du vivant, est une structure à vingt faces en triangles équilatéraux identiques et douze sommets.

La capside hélicoïdale est constituée de protéines interagissant entre elles et avec l'acide nucléique pour former une structure enroulée en ruban. Cette structure exige peu de protéines différentes pour sa construction. Le virus de la mosaïque du tabac, le premier étudié ayant cette structure, et le *Filovirus* Ebola, en présentent une forme souple. C'est celle des bactériovirus filamenteux (famille des *Inoviridae*, dont le virus d'*E. coli* M13) et des archéovirus de la famille des *Lipothrixviridae*. La capside de M13 est un cylindre flexible construit autour de son génome, formé d'une protéine majoritaire, à raison de 2 700 à 3 000 copies par particule. La longueur du filament peut varier avec la dimension du génome, certaines formes délétées artificiellement (avec un ADN de 221 nucléotides) ne nécessitant des capsides que de 50 nm de long, contre 930 nm pour le virus sauvage. Cette caractéristique est à la base de nombreuses applications biotechnologiques.

Les capsides complexes sont constituées d'une « tête » icosaédrique (régulière ou irrégulière), qui contient le génome, et d'une partie tubulaire à symétrie hélicoïdale, la « queue », qui sert de canal d'injection du génome au moment de l'infection. Cette queue porte les déterminants moléculaires impliqués dans la reconnaissance spécifique de la cellule hôte. Les virus caudés de Bactéries et d'Archées (groupe I, ordre des *Caudovirales*), se distinguent par les caractéristiques de leur queue, contractile ou non, ou réduite et non contractile. Les **virus enveloppés** comportent, à l'extérieur de la capside, une membrane dérivée, selon les virus, des membranes cytoplasmique ou nucléaire, ou des phospholipides, de l'hôte dont ils sont issus. L'enveloppe est décorée de spicules jouant un rôle important dans l'interaction avec l'hôte. Cette structure est présente chez

Tableau 8.1 Caractères principaux définissant les sept groupes de classification des virus

Groupe/ Propriétés	I	II	III	IV	V	VI	VII
Génomes : type, morphologie et dimension	ADN db c/I, mp ^a 4.5–2473 kb	ADN sb c/I, mp/s (1 à 8) P (+)/(-) 4.5–12 kb	ARN db I, s (2 à 12) 3,7–18,2 kb	ARN sb I, s (1 à 5) P (+) 2,3–27,6 kb	ARN sb I, s (1 à 8) P (-) 11–17 kb	ARN sb c/I, mp P (+) 7–11 kb	ADN db I/c, mp 3,2–8,2 kb
Réplication et transcription Enzymes	Enzymes de l'hôte	Enzymes de l'hôte	Polymérase/ transcriptase virale	Polymérase virale	Polymérase/ transcriptase virale	RT virale	RT virale
Lieu	N (Euc) ; C (Proc)	N (réplication)	C	C	C/N (épissage)	C	C
Capsides Morphologies	Icosaédrique filamenteuse complexe diverses (bâtonnet, citron, bouteille, tige)	Icosaédrique, filamenteuse gémée ^b	Icosaédrique	Icosaédrique sphérique, filamenteuse	Sphérique Env filamenteuse Env flexible/rigide/ projectile Env bâtonnet NEnv	Sphérique Env pléomorphe NEnv	Bacille NEnv sphérique Env pléomorphe Env
Enveloppe	Nenv/Env	NEnv	Nenv ^c	NEnv/Env	Nucléocapsides NEnv		

Abréviations : db/sb, double/simple brin ; c/l, circulaire/linéaire ; mp/s, monopartite/segmenté (nombre de segments) ; P, polarité positive (+)/négative (-) ; N/C, noyau/cytoplasme ; Euc/Proc, Eucaryotes/procaryotes ; Env/NEEnv, enveloppés/non enveloppés ; RT, rétro-transcriptase.

Notes : ^aUne exception : les *Polydnaviridae*, qui ont un génome circulaire avec au moins dix segments. ^bDeux ou trois virions sont contenus dans une même enveloppe. ^cSeuls de ce groupe, les *Cystoviridae* sont Env.

Groupe I – Ce groupe extrêmement vaste renferme presque tous les types de capsides connus et la plus grande variété de capacités de pouvoir codant des génomes viraux. Faisant exception à la réplication nucléaire des eucaryovirus de ce groupe, les *Poxviridae* ont une réplication cytoplasmique et codent pour toutes leurs enzymes de réplication et de transcription. **Groupe II** – L'ADN simple brin est converti en ADN double brin, qui sera transcrit. Bien que de structures capsidaires distinctes, les cycles de développement des phages de ce groupe se déroulent suivant le même schéma. **Groupe III** – Le brin négatif est utilisé comme matrice pour la production des ARNm. La segmentation (trois segments) des génomes des *Cystoviridae* est un cas unique chez les bactériophages. **Groupe IV** – Chez les *Togaviridae* et *Coronaviridae* le génome viral permet la synthèse d'une protéine précoce, la polymérase, qui synthétise un brin complémentaire du génome, ARN (-), matrice pour la traduction des autres gènes. **Groupe V** – Une copie complémentaire du génome, ARN (+), sert pour la synthèse des ARNm et de nouveaux génomes. Chez certains virus à ARN dits ambisens (tels des arbovirus et arénavirus) le génome est transcrit dans l'une ou l'autre orientation suivant les gènes, la majorité des ARNm étant complémentaire de la séquence génomique. **Groupe VI** – Ces virus exigent la rétrotranscription de leur génome en ADN double brin, effectuée par la rétrotranscriptase virale. La copie ADN migre dans le noyau, où elle est intégrée dans le génome de l'hôte, puis transcrite par l'ARN PolII cellulaire. Les ARNm viraux ainsi transcrits, après un éventuel épissage, sont exportés dans le cytoplasme pour être traduits. **Groupe VII** – La nucléocapside de ces virus, qui inclut la famille des *Hepadnaviridae*, dont le virus de l'hépatite B, pénètre dans le noyau ; le génome, complété et circularisé par liaison covalente (ADNccc), sert de matrice à la PolII cellulaire pour la production d'ARNm viral et d'ARN subgénomique. Ces ARN sont transportés dans le cytoplasme, soit pour être traduits, soit pour servir de matrice de réplication (en fait une rétrotranscription) réalisée par la rétrotranscriptase virale (TR). Les génomes synthétisés seront encapsidés avec la rétrotranscriptase.

Les sites de l'ICTV (<http://ictvonline.org/virusTaxInfo.asp>) et de ViralZone (<https://viralzone.expasy.org/>) continuellement mis à jour, fournissent une description de la structure, du cycle et de la classification de tous les virus connus.

de nombreuses classes d'eucaryovirus, dont d'importants pathogènes humains (virus de la grippe, de la rage), et d'archéovirus, mais est restreinte à une unique famille de bactériovirus, les *Cystoviridae* (groupe III, le bactériophage $\Phi 6$).

Les **dimensions** des particules virales, très variables, sont en relation avec les dimensions du génome contenu, et avec la présence d'éventuels autres constituants intra-capsidaires. Pour tous les virus icosaédriques connus, elles se distribuent de 17 nm (Porcine circovirus) à 200 à 300 nm pour les plus grands (Herpesvirus), en passant par certains bactériophages (T4, 120 nm de long et 86 de large). Les virus hélicoïdaux, bactériens comme d'Eucaryotes, sont nettement plus grands (930 nm de long contre 6-7 nm de diamètre pour le phage M13, 970 nm de long contre 80 de diamètre pour le virus Ebola). Des virus de protistes, dits « géants », ont des dimensions de l'ordre de celles des Bactéries (tels les virus d'amibes Mimivirus, de 500 nm, Pandora, de 500 × 1000 nm, Pithovirus, de 500 × 1100 nm, ou Ehv86, infectant la micro-algue *Emiliana huxleyi*, de 100-220 nm).

L'organisation de la **structure interne, la nucléocapside**, est peu connue. Le génome viral est condensé et n'occupe pas tout le volume disponible, mais sa structure tridimensionnelle reste conjecturale. De nombreux virus intègrent dans la capside des

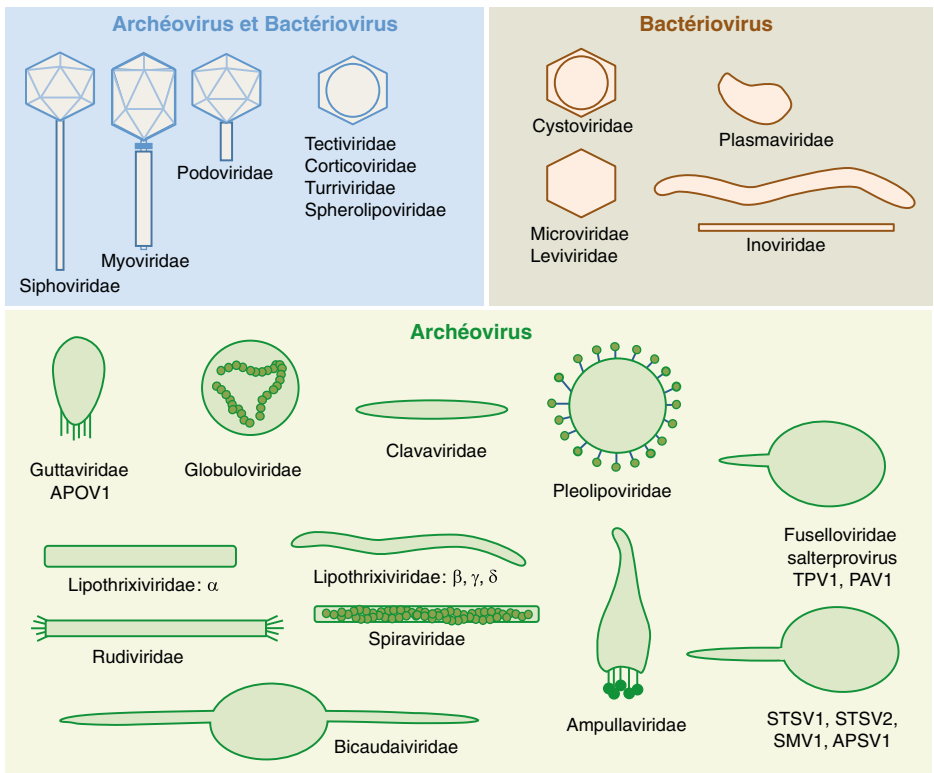


Figure 8.1 – Morphologies de capsides de virus de procaryotes

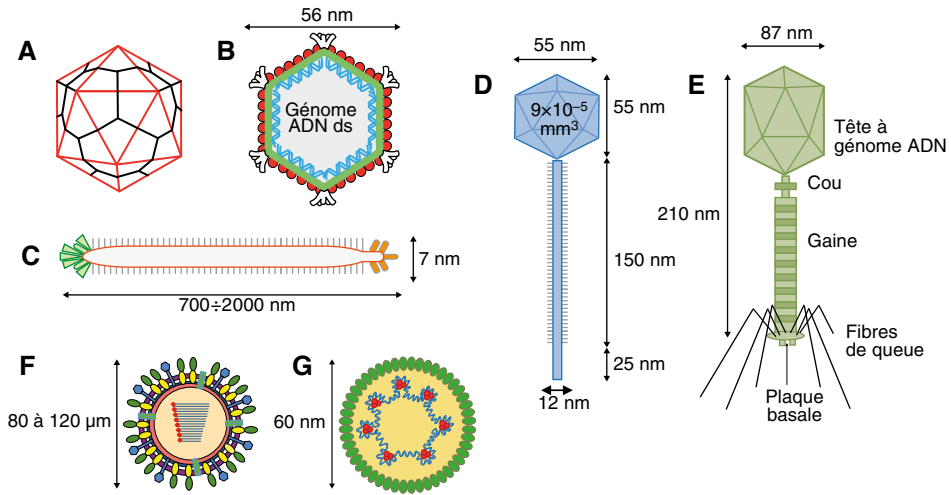


Figure 8.2 – Structure de quelques capsides virales

- A.** Capside isométrique simple (le virus MS2 d'*E. coli*). **B.** Capside à enveloppe (les virus PM2 et $\Phi 6$ de *Pseudomonas*). **C.** Capside hélicoïdale (phage M13 d'*E. coli*). **D.** Capside caudée complexe, formée d'une tête isométrique et d'une queue (phage λ d'*E. coli*). **E.** Capside caudée complexe irrégulière, avec tête allongée (phage T4 d'*E. coli*). **F.** Capside avec enveloppe (virus grippal). **G.** Capside non enveloppée (adénovirus).

protéines associées à l'ADN ou des enzymes (ARN-polymérase). La capside du VIH (groupe VI) héberge un groupe d'enzymes (protéase, intégrase, rétrotranscriptase). Chez certains virus du genre *Influenza* (grippe, groupe V) une neuraminidase intervient pour libérer la particule virale nouvellement synthétisée de la surface de la cellule. Les virus des protistes présentent une situation encore plus diversifiée.

2.2 Génomes

Les génomes viraux peuvent être à ADN ou à ARN, et dans chaque cas double (db) ou simple (sb) brin, linéaires ou circulaires, avec des dimensions et pouvoirs codants très divers (voir Tableau 8.1). De nombreuses classes de virus à ARN double brin (de procaryotes comme d'Eucaryotes) ou simple brin (d'Eucaryotes) sont segmentés, l'information génétique étant répartie sur plusieurs molécules. Les génomes à ADN sb ou à ARN sb sont tous de polarité positive (+) (l'ARN génomique est aussi l'ARNm) chez les virus de procaryotes, mais à polarité (+) ou (–) chez les eucaryovirus. Les génomes viraux sont haploïdes, à la seule exception connue des *Retroviridæ*, qui sont diploïdes.

a. Génomes des virus de procaryotes

Les **génomes des bactériovirus** sont le plus fréquemment à ADN db linéaires, mais tous les autres cas existent. Les extrémités des génomes à ADN db linéaires peuvent

être redondantes (répétitions bicaténares d'une séquence de nucléotides, T4), cohésives (à filament simple brin, complémentaire entre les deux extrémités, λ), soudées de façon covalente entre brins complémentaires (P22, SPP1), ou encore liées par un pont protéique (Mu). Certains génomes contiennent des nucléotides modifiés (5-hydroxyméthyl-cytosine chez T4 et des phages apparentés, le groupe hydroxyl étant souvent glycosylé), une protection contre une éventuelle restriction par des endonucléases de l'hôte (voir Chapitre 5). Les dimensions de ces génomes varient de 3,5-4 kb pour les plus petits à 500 kb pour le plus grand, le phage G de *Bacillus megaterium*, atteignant la dimension des génomes de Bactéries endosymbiontes ou parasites intracellulaires. Les plus petits génomes sont à ARN sb (*Leviviridae*) et à ADN sb (9-15 kb) (*Microviridae*). Les génomes de tailles supérieures à 16 kb (37 kb pour Mu, 48 kb pour λ , 169 kb pour T4) sont associés à des capsides de type complexe. Chez de nombreux phages les gènes sont organisés et transcrits par groupes fonctionnels.

Le nombre de **génomes d'archéovirus** actuellement séquencés étant d'environ une centaine (contre six mille pour les bactériovirus), toute comparaison entre ces deux groupes est à prendre avec précaution. Les génomes connus sont le plus fréquemment à ADN db, linéaires ou circulaires, plus rarement à ADN sb, et récemment des génomes à ARN sb (+) ont été identifiés. En général (et pour le moment) les dimensions de ces génomes sont plus réduites (entre 8 et 75 kb) pour les génomes à ADN sb. Les génomes linéaires ont souvent à leurs extrémités des régions inversées répétées de tailles variables (190 pb à 2 kb). La très grande majorité des gènes des archéovirus ne présente aucune ressemblance avec les données des bases génomiques virales ni avec des séquences d'éventuels provirus intégrés à des génomes hôtes. Au sein des archéovirus, certains partagent au mieux un nombre restreint de gènes.

b. Génomes des eucaryovirus

L'analyse des **génomes des eucaryovirus** élargit encore la grande diversité décrite jusqu'ici. Ces génomes sont aussi à ADN ou ARN, db ou sb, linéaires ou circulaires, y compris pour des génomes à ARN. Ces derniers sont très fréquents, et souvent segmentés. Les génomes des eucaryovirus couvrent un large éventail de tailles. Les génomes à ADN peuvent atteindre des tailles jusqu'à cent fois supérieures à celles des virus à ARN, ceux à ADN db étant en général plus grands que ceux à ADN sb. Les génomes à ADN db des virus infectant des vertébrés ont de 4,5-5 kb (*Polyomaviridae*) à 152 kb (Herpesvirus) et 375 kb (certains *Poxviridae*). D'autres eucaryovirus, en particulier d'algues et de protistes (§ 4.1d), ont des génomes remarquables par leur grande taille (jusqu'à un millier de gènes). En revanche les virus des plantes, phytovirus, sont de petites dimensions, avec un nombre de gènes relativement réduit (§ 4.5). Le plus petit des virus à ARN sb (1,7 kb) est celui de l'hépatite D, les plus grands (27,6 kb) ceux des *Coronaviridae*. Autre caractéristique singulière des eucaryovirus, la réplication de leur(s) génome(s) a lieu, suivant les types, dans le cytoplasme ou dans le noyau des cellules infectées (§ 3.2). Les rétrovirus empaquettent dans chaque capside un génome diploïde, les deux copies étant alignées et liées de façon non covalente par leur extrémité 5'. Les modalités d'exclusion de formes

monomères sont mal connues ; il est admis que la nucléocapside aurait une plus forte affinité pour la forme dimère. Une hypothèse pour expliquer cette diploïdie veut que la forme dimère confère le double avantage de distinguer l'ARN génomique de l'ARNm, et de pallier leur faible fidélité de réplication en éliminant facilement des recombinants délétères (ces virus ont une forte fréquence de recombinaison).

3 Phases du développement

Les mécanismes de multiplication des virus s'avèrent très variés et très complexes. La reproduction, toujours intracellulaire, comprend adsorption (ou attachement), pénétration, synthèse des constituants viraux (phase dite d'éclipse comprenant deux périodes, précoce [synthèse du génome] et tardive [synthèse des composants capsidaires]), assemblage et libération des particules. L'efficacité (nombre de virions produits par cellule infectée) de la reproduction est élevée (de la centaine au millier).

3.1 Adsorption

Première étape de l'infection, l'**adsorption** débute par la reconnaissance spécifique d'une cellule hôte par le virus. Cette spécificité est déterminée par l'identification par le virus de constituants particuliers, utilisés comme récepteurs, présents sur la surface de la cellule. L'ensemble des souches reconnues par un virus définit son spectre d'hôtes. Certains virus ont un large spectre d'hôtes, infectant de nombreuses espèces, voire souches dans le cas des Bactéries. D'autres, en revanche, ont un spectre d'hôte restreint à une espèce ou même une souche. La première interaction entre un **bactériovirus non enveloppé** et sa cellule hôte est une collision dont la fréquence dépend principalement de la concentration des deux partenaires, de la présence de certains ions dans le milieu, de la température. Se produit alors un attachement initial, réversible, entre composants de la capside virale et certaines structures de l'hôte, par formation de liaisons faibles. Si la structure cellulaire impliquée est sa surface, le virus « voyage » sur cette surface jusqu'à la rencontre éventuelle d'un récepteur approprié, sur lequel une interaction secondaire le stabilise. D'autres, fixés sur des pili (tel le pilus sexuel F) ou des flagelles, atteignent leur récepteur secondaire soit par glissement, soit suite à une rétraction (dépolymérisation des sous-unités protéiques) du pilus ou du flagelle. Les récepteurs sont une protéine de surface, un lipopolysaccharide ou une lipoprotéine de la Bactérie. Les **archéovirus** utilisent des flagelles, mais la nature du récepteur est inconnue.

L'interaction entre les deux structures, virale et cellulaire, a pour conséquence possible que des mutations affectant les récepteurs peuvent rendre ces hôtes spécifiquement résistants à l'infection, et que de même une souche hôte ainsi devenue résistante peut redevenir sensible par mutation compensatoire chez le virus.

Les **eucaryovirus** ayant pour hôtes des animaux ou des protistes n'infectent généralement qu'un nombre restreint d'espèces, et pour les premiers chaque virus peut

éventuellement ne reconnaître qu'un type cellulaire précis (tropismes tissulaire et cellulaire), en fonction de la présence de récepteurs appropriés. Le polyovirus n'infecte que l'Homme, les virus de la grippe principalement les cellules des voies respiratoires, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) principalement les lymphocytes T CD4⁺ dont la protéine CD4 leur sert de récepteur. Des récepteurs cellulaires d'adhésion fixent le virus de manière réversible, ce qui améliore l'infectiosité en concentrant les virus à proximité de leurs récepteurs secondaires. Ces derniers déclenchent l'entrée du virus par endocytose ou pinocytose, ou par fusion de l'enveloppe du virion (dans le cas des virus enveloppés) avec la membrane cellulaire (voir Figure 8.3). Les virus des végétaux ont en général des spectres d'hôtes larges, et présentent une stratégie d'attachement sans spécificité tissulaire (§ 4.5).

3.2 Phase endocellulaire (dite d'éclipse)

La première étape du développement intracellulaire d'un virus exige la **pénétration de son acide nucléique** à l'intérieur de la cellule hôte, selon des processus très variés, liés aussi au mode d'adsorption du virus. Les virus enveloppés entrés entiers doivent perdre leur capsid pour libérer le génome (processus fréquent chez les eucaryovirus). Les virus non enveloppés (à l'exception de $\Phi 6$ [§ 4.3] et des *Picornaviridae*), injectent leur seul génome à travers un pore, au niveau de leur récepteur secondaire. Les *Papillomaviridae* et les *Polyomaviridae* et *Orthomyxoviridae* (genre *Influenza*, grippe) (voir Figure 8.3) entrent entiers par endocytose. Les modalités de l'injection (forces impliquées, déterminants moléculaires) sont peu connues. La pression interne libérée par la décondensation de la molécule génomique ne permet pas son injection, comme supposé dans les premiers modèles proposés, mais elle est néanmoins suffisante pour déclencher l'éjection. Des facteurs de l'hôte, des protéines virales, la différence de pression osmotique entre cytoplasme de l'hôte et milieu environnant, un gradient électrochimique de protons à travers la membrane cytoplasmique, peuvent intervenir. Les aspects mécaniques de ce processus ont essentiellement été étudiés dans le cas des virus caudés. C'est lors de cette première étape que la majorité des procaryotes révèle deux mécanismes d'inactivation de l'ADN viral : le système de restriction-modification et le système CRISPR (voir Chapitre 5).

a. Synthèse des constituants

Les **synthèses des constituants** du virion commencent dès l'entrée du génome dans la cellule (cytoplasme ou noyau selon les cas). Les mécanismes de transcription et de traduction dépendent de la nature des génomes (ADN ou ARN, db ou sb, et polarité dans ce cas) et de l'hôte. Chez la majorité des **bactériophages**, la réplication est dépendante d'ARN- ou ADN-polymérases hôtes. La synthèse des ARNm procède souvent dans un ordre séquentiel, conformément à l'ordre dans lequel les différents produits sont nécessaires au développement du virus. Le bactériophage N4 (un *Podoviridae*, groupe I) constitue un cas spécial. Son génome, à ADN db linéaire, est transcrit séquentiellement

par trois ARN polymérases : la première, une enzyme virale, vARN-Pol1, empaquetée dans la capside et injectée en même temps que l'ADN, permet l'expression d'une deuxième enzyme, vARN-Pol2, elle-même responsable de la transcription des enzymes de réplication et de synthèse des protéines capsidaires, alors que les gènes impliqués dans l'assemblage de la capside et l'empaquetage de l'ADN et de la vARN-Pol1 sont transcrits par l'ARN-Pol de l'hôte. Les schémas de développement des **eucaryovirus** sont plus complexes, en particulier en raison de la compartimentation cellulaire. D'une façon générale transcription et réplication des virus à ADN db ont lieu dans le noyau grâce aux enzymes cellulaires, et celle des virus à ARN dans le cytoplasme. Les cellules hôtes ne produisant pas d'ARN polymérase ARN-dépendante capable de rétrotranscrire (convertir un génome à ARN en un ADN complémentaire, dit cDNA), les virus à ARN codent donc pour leur propre polymérase, qui fonctionne comme enzyme de réplication et de transcription. Les génomes à ARN sb (+) forment, à partir d'une copie à ARN (-), des ARNm sub-génomiques qui portent en général les signaux nécessaires pour leur traduction. Pour la réplication, la polymérase synthétise un ARN db, matrice pour la production de nouveaux génomes ARN sb (+).

b. Assemblage et encapsidation

Les étapes suivantes du développement viral sont l'**assemblage** de la capside et l'**encapsidation** du génome viral. Chez la plupart des virus à ADN, les protéines constituant la capside s'auto-assemblent, dans le cytoplasme ou dans le noyau, soit directement autour du génome viral soit préalablement à l'empaquetage. La capside des virus à ARN sb (-) (groupe V) s'assemble au fur et à mesure de la synthèse du génome. Les capsides de nombreux virus (Herpesvirus et virus à capsides complexes) exigent la participation de protéines d'échafaudage, qui forment une charpente sur laquelle se fixent les protéines capsidaires, réalisant une procapside. Les protéines d'échafaudage sont ensuite éliminées, et le génome intégré. Des mutants affectés dans diverses étapes de ce processus chez le phage T4 (§ 4.1b) ont permis d'en reconstruire la chronologie.

c. Libération des virions

La **libération des virus** de la cellule productrice est une phase importante du cycle car elle assure la diffusion des virus dans l'environnement et l'infection de nouveaux hôtes. De nombreux systèmes ont été développés pour assurer cette fonction. Le processus est bien connu pour les bactériovirus qui, à la seule exception des phages filamenteux, utilisent principalement deux groupes de protéines : une holine, qui forme des pores membranaires, expose alors le peptidoglycane à des endolysines (enzymes lytiques) qui dégradent cette paroi cellulaire, induisant la cytolysse. Les phages filamenteux sont libérés par un système d'extrusion sans lyse cellulaire. Les eucaryovirus disposent de plusieurs mécanismes : destruction de la membrane plasmique, insertion des virus dans des bourgeons membranaires qui éclatent, libérant les particules, ou dans des nanotubes formant des connections intercellulaires qui permettent le passage du virus d'une cellule à une autre.

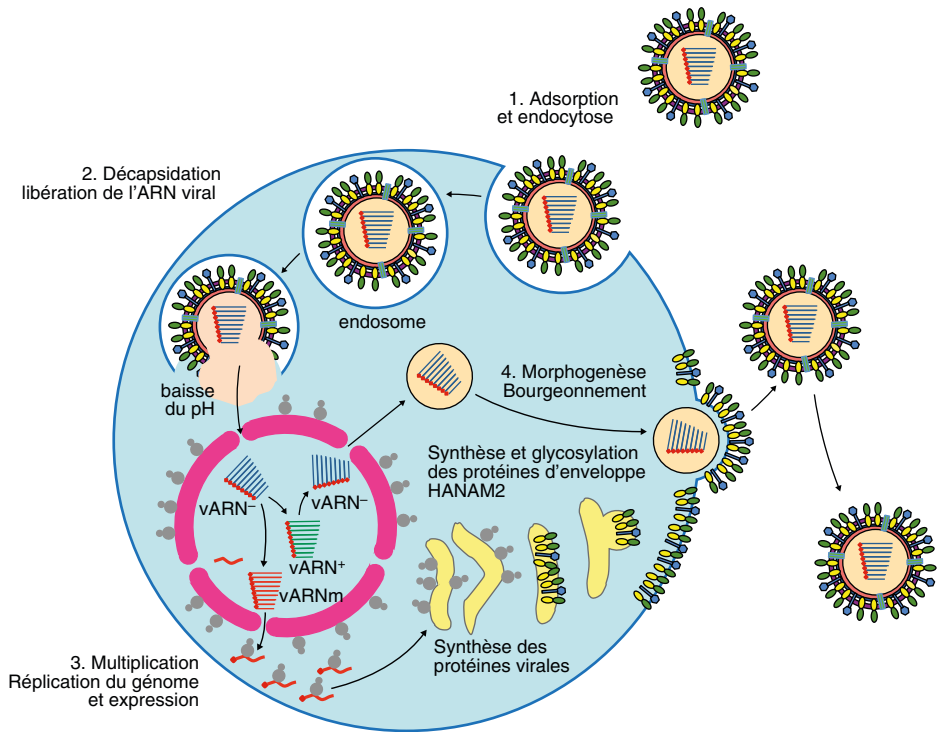


Figure 8.3 – Cycle d'un eucaryovirus, Influenza (grippe)

La particule virale, entourée d'une enveloppe lipidique hérissée de spicules, est fixée de manière réversible sur des récepteurs primaires, puis à ses récepteurs secondaires, qui permettent son entrée par endocytose, par fusion de l'enveloppe avec la membrane cellulaire. À l'intérieur de la cellule, le génome viral (sept ou huit molécules d'ARN), associé à de nombreuses protéines, dont trois polymérases, est transporté dans le noyau cellulaire, pour y être reproduit. Les nouveaux génomes sont réexportés dans le cytoplasme, encapsidés et éjectés.

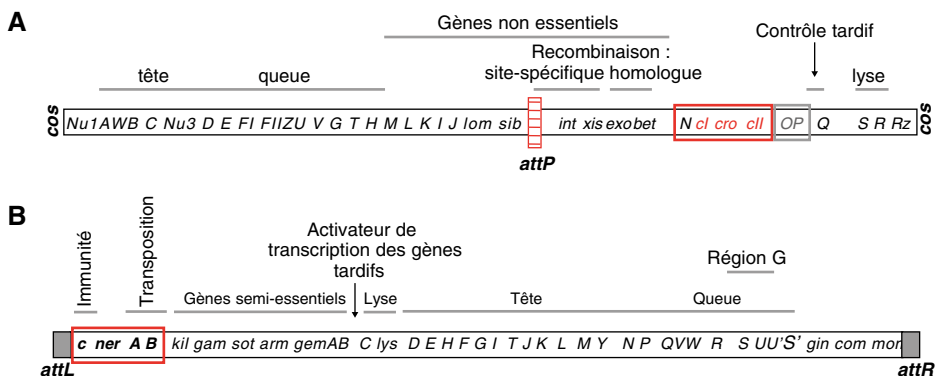
4 Quelques virus typiques

4.1 Groupe I

a. Les phages tempérés λ et Mu

La carte génétique du **bactériophage** λ (famille des *Siphoviridae*) (voir Figure 8.4A), linéaire, révèle la présence à chaque extrémité de l'ADN de séquences simple brin de douze bases, complémentaires, dites séquences *cos* (pour cohésives), permettant la circularisation de la molécule par liaisons covalentes, étape nécessaire à l'infectivité du virus.

Alternativement au cycle lytique, l'infection peut conduire à l'intégration de l'ADN phagique, dit alors prophage, en un site précis du génome bactérien. Ce processus, dit lysogénie, respecte la survie de l'hôte. La Bactérie, dite alors lysogène, perpétue le prophage, dormant, de façon très stable. La présence de l'ADN viral confère à l'hôte une immunité contre une surinfection par ce même phage, due à la présence d'une protéine, CI, codée par le seul gène phagique exprimé dans la cellule lysogène, un répresseur de l'expression de l'ensemble des autres gènes du phage. Une induction, spontanée (fréquence de 10^{-5} par cellule) ou provoquée (par perturbation de la synthèse de l'ADN, notamment par irradiation), induit le cycle lytique dont l'une des étapes précoces est l'excision du prophage de son site d'insertion. La décision lyse/lysogénie dépend de deux protéines régulatrices à effets antagonistes : la protéine CI et une protéine, Cro, inhibitrice de l'expression du gène *ci*, qui sont en compétition pour les mêmes séquences opératrices (voir Chapitre 6). Lors de l'infection, les deux protéines sont synthétisées, et c'est leur concentration relative qui va déterminer la voie suivie. L'acteur essentiel de la décision est une autre protéine phagique, CII, un régulateur transcriptionnel, qui permet un jeu de reconnaissance par l'ARN-Pol bactérienne entre séquences promotrices des gènes *ci* et *cro* (et de celui de l'intégrase), affectant leurs niveaux d'expression. Le choix entre voie lytique et voie lysogénique dépend aussi d'autres facteurs tels la présence d'une protéase bactérienne dégradant CII ou d'une protéine phagique la protégeant, l'état physiologique de l'hôte (une croissance rapide conduira plus fréquemment à la voie lytique), la multiplicité d'infection (nombre moyen de phages infectant une cellule) – une multiplicité supérieure à 3 conduisant toujours à la lysogénie.



205

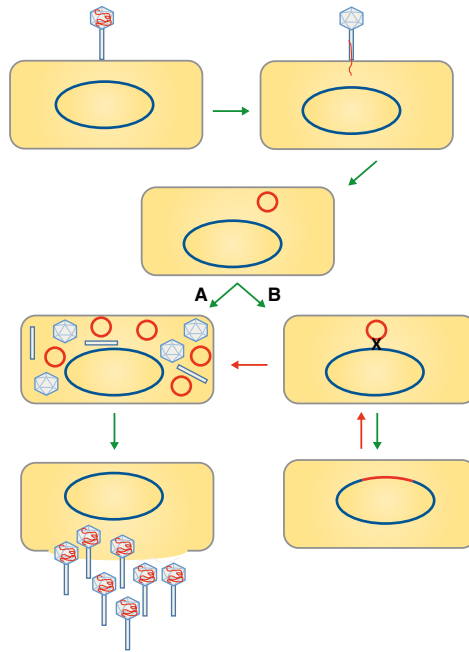


Figure 8.5 – Cycle du bactériophage tempéré λ d'*E. coli*

Dans la cellule infectée, l'ADN phagique, injecté sous forme linéaire, est circularisé par liaisons covalentes au niveau des extrémités *cos*. Un contrôle génétique et épigénétique conduit le génome viral à suivre l'un ou l'autre de deux programmes alternatifs de développement : cycle lytique, productif de particules virales (**A**) ou lysogéniques (**B**). Dans la voie lytique, la réplication se produit en deux étapes, une multiplication de formes circulaires suivie de leur réplication par cercle roulant, conduisant à la formation de concatémères génomiques (voir Chapitre 4). Parallèlement, la synthèse des protéines de la capsid permet la formation de têtes et de queues du phage. Chaque tête est emplies par une unité génomique issue d'une structure concatémérique, d'une séquence *cos* à la suivante. La queue y est alors adaptée, formant une particule virale complète. Dans la voie lysogénique le génome viral est intégré par une recombinaison entre deux sites, bactérien, *attB*, et phagique, *attP*, grâce à une intégrase phagique. Sous cette forme le génome viral (prophage) est reproduit par la machinerie de réplication du chromosome bactérien, et transmis de façon stable au cours des divisions cellulaires. L'induction conduit à l'excision du prophage, qui suit alors un cycle lytique.

Les cartes génétique et physique du **bactériophage Mu** (famille des *Myoviridae*) sont les mêmes dans le virus libre et dans sa forme prophage (voir Figure 8.4B). L'état lysogène se caractérise par la synthèse d'un répresseur de l'expression de l'ensemble des gènes impliqués dans le processus lytique. À la différence de λ , le choix lyse/lysogénie est gouverné par la dégradation ou le maintien du répresseur, sous le contrôle de deux protéases bactériennes. Une autre différence importante avec λ concerne l'intégration et

la réplication de l'ADN de Mu, réalisées selon un processus de transposition rélicative (voir Chapitre 5). L'insertion du prophage se fait par intégration sans spécificité de site, et la réplication correspond à une série de transpositions du prophage, dont les copies ne sont jamais libres dans le cytoplasme mais réintégrées au hasard sur le génome ou sur d'autres réplicons de la cellule. Durant le cycle lytique, la synthèse des protéines structurales de la capsidie conduit à la formation de têtes et de queues de phages. L'encapsidation consiste en un remplissage intégral de la tête phagique (mécanisme de la tête pleine) à partir d'une extrémité de l'ADN de Mu, puis de la coupure de « ce qui dépasse ». Après ajustage de la queue, la Bactérie est lysée et libère environ cent bactériophages.

Chez d'autres bactériophages tempérés (tel P1, qui infecte *E. coli*) le prophage n'est pas intégré dans le chromosome de l'hôte, mais reste dans le cytoplasme, sous une forme équivalente à un plasmide, transmis de façon stable au cours des divisions (voir Chapitre 5).

b. Le phage virulent T4

Historiquement, le bactériophage T4 et ses « frères » T2 et T6 (la série des phages T pairs), ont été au cœur d'études de problèmes fondamentaux de biologie : origine spontanée des mutations, nature du code génétique, mise en évidence de l'ARN messager. Le phage T4 a été la première entité biologique dans laquelle ont été identifiés des introns. Ces trois phages ont aussi été les premiers isolés de cette famille. Ils présentent une forte ressemblance morphologique et peuvent donner lieu à des échanges génétiques. Comme les autres membres de cette sous-famille, le virion a une structure complexe, avec tête icosaédrique et queue contractile (voir Figure 8.2E). Plus de 40 % de leur information génétique est consacrée à la synthèse et l'assemblage de ces structures. L'ADN, db linéaire, a une taille de 169 kb, avec des redondances terminales de 2,3 à 4,3 kb, différentes d'une particule à l'autre d'un même phage.

L'adsorption irréversible du phage sur son hôte, par le biais des fibres terminales de sa queue, entraîne la contraction de celle-ci, provoquant l'injection de l'ADN dans la Bactérie (voir Figure 8.6). Le cycle suit une chronologie stricte (voir Figure 8.7). L'ADN est protégé des réactions de défense de l'hôte par hydroxyméthylation des cytosines, lors de sa réplication. En outre, des protéines virales injectées lors de l'infection bloquent l'action des enzymes de restriction. La machinerie de transcription de l'hôte est totalement détournée au profit du phage par deux processus, une modification (par une protéine virale) d'une sous-unité de l'ARN polymérase, et la dégradation rapide de l'ADN de l'hôte, les produits de dégradation étant utilisés pour la synthèse de l'ADN du virus.

T4 code les enzymes nécessaires à sa réplication, ainsi que des protéines impliquées dans la réparation et la recombinaison de l'ADN. La réplication du génome, sous forme linéaire, génère des extrémités 3'OH simple brin que ne peuvent pas combler les ADN polymérases classiques. T4 résout ce problème grâce à des recombinaisons faisant intervenir soit les deux extrémités d'une même molécule, soit une autre molécule d'ADN possédant une séquence homologue à l'intérieur de sa propre séquence, permettant

ainsi la mise en place d'une fourche de réplication. Cela permet de générer de longs concatémères, substrats pour l'encapsidation de l'ADN. Le processus d'encapsidation, mécaniquement semblable à celui de λ , se rapproche toutefois de celui de la tête pleine du phage Mu. En effet, la dimension de la tête du phage lui permet de contenir un peu plus d'un génome, générant les répétitions terminales que l'on observe dans les particules matures. L'encapsidation de l'ADN est suivie de l'adjonction d'une queue à la tête pleine. La lyse de la Bactérie libère cent à deux cents virions.

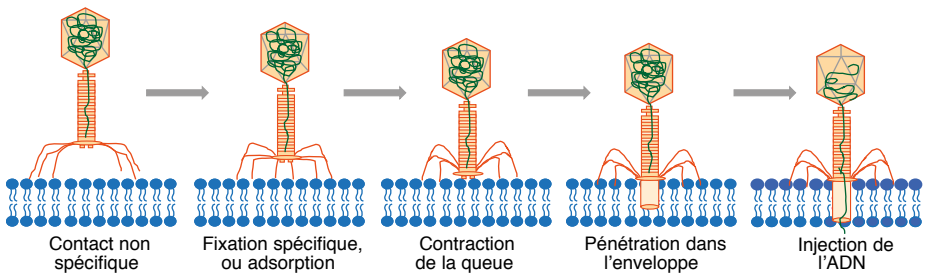


Figure 8.6 – Adsorption du bactériophage T4 d'*E. coli*

La durée du processus est de l'ordre d'une minute à 37 °C.

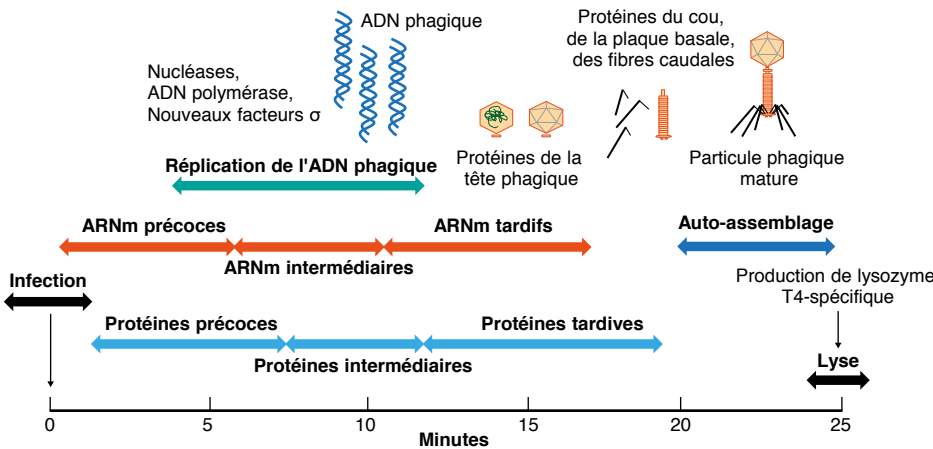


Figure 8.7 – Chronologie du cycle du bactériophage virulent T4 d'*E. coli*

Dans la cellule l'ADN viral est exprimé et traduit selon une séquence temporelle précise (indiquée par des flèches). La réplication commence quelques minutes après l'entrée de l'ADN viral dans la cellule et continue pendant environ la moitié du cycle pour former une centaine de copies. Les protéines structurales de la capsid sont synthétisées à peu près simultanément, assemblées pour former de nouvelles têtes, qui intègrent les génomes par le mécanisme de la tête pleine, et sont soudées aux queues, donnant de nouveaux virions. La lyse de la cellule libère les virions.

c. Deux archéovirus

L'étude des archéovirus s'avère difficile, tant dans la nature qu'en laboratoire, du fait des conditions extrêmes dans lesquelles vivent leurs hôtes. Des études approfondies ne peuvent être menées que pour des souches assez aisément cultivables, ce qui biaise la connaissance que l'on peut avoir de la diversité de ces virus. Cette diversité a cependant été mise en évidence grâce aux approches de métagénomique. Les archéovirus « modèles » sont donc peu nombreux. Deux d'entre eux, STIV1 (17,3 kb) et SIRV2 (35 kb), respectivement icosaédrique et filamenteux, ont pour hôte le genre *Sulfolobus*.

Le processus d'adsorption de STIV1 n'a guère été abordé. Les études transcriptomique et protéomique de l'infection montrent que l'expression des gènes est non séquentielle. En outre l'infection entraîne une modification du niveau d'expression d'un certain nombre de gènes de l'hôte, dont celui d'un constituant du complexe ESCRT (voir Chapitre 3), qui participe à la maturation de la capsid virale et à la sortie du virus. Le processus de sortie, très complexe et unique, implique la formation de structures pyramidales sur la paroi cellulaire, lesquelles s'ouvrent en fin de cycle, laissant s'échapper les virus. Ce mécanisme laisse intacte l'enveloppe de la cellule, bien que celle-ci ne soit plus viable.

L'adsorption de SIRV2 se fait par des filaments terminaux situés en queue du virus reconnaissant l'extrémité de pili de l'hôte, abondants sur sa surface. Le virus glisserait ensuite le long du pilus, se rapprochant de la surface membranaire. L'analyse transcriptomique indique aussi une expression non séquentielle des gènes au cours du processus infectieux. Une protéine de l'hôte serait impliquée dans la réplication de l'ADN viral. La libération des virions suit le même mécanisme que pour STIV1, une similitude remarquable étant donné les différences de morphologie de ces virus.

d. *Acantamoeba polyphaga mimivirus*

Les virus des protistes sont peu connus, leur étude ayant longtemps été limitée à un petit nombre de parasites de levures, micro-algues et diatomées. La découverte du premier virus « géant » infectant des amibes, en 2003, suivie d'un certain nombre d'autres, a révélé des propriétés insoupçonnées, ce qui a conduit à réexaminer un certain nombre de concepts de virologie que l'on croyait solidement établis. Actuellement, une seule famille est définie, les *Mimiviridae*, comprenant un seul genre, *Cafeteria Mimivirus*, avec deux espèces, *Acantamoeba polyphaga mimivirus* (APMV) et *Cafeteria roenbergensis virus*. D'autres virus du même groupe (*Pandora*, *Pithovirus*) n'ont pas encore été assignés à une famille. Ces virus ont un niveau de complexité proche de celui de procaryotes ou d'Eucaryotes parasites. Les dimensions de sa capsid (700 nm) et de son génome (1,14 Mb), et les propriétés de APMV l'avaient initialement fait considérer comme une Bactérie (d'où son acronyme *MImicking MICrobes VIRUS*). La particule virale est couverte de fibrilles de 120-140 nm de long qui permettent sa fixation sur des supports vivants. À l'intérieur de la capsid icosaédrique une bicouche lipidique (probablement acquise à partir du réticulum endoplasmique de la cellule hôte) enveloppe la nucléocapsid, compartiment fermé par une membrane lipidique contenant

l'ADN viral et des ARNm. La particule entre dans la cellule par phagocytose, où elle libère la nucléocapside à travers un unique sommet de la capsid. La transcription peut être initiée dès ce stade. Le génome est libéré et répliqué dans le cytoplasme. Il pourrait être enrobé dans une couche membranaire du réticulum endoplasmique, formant « un centre réplcatif », et plusieurs de ceux-ci pourraient fusionner pour constituer une « usine virale » contenant des zones impliquées, successivement, dans la réplication, la biogenèse membranaire, l'assemblage de la capsid, l'encapsidation de l'ADN puis l'acquisition des fibres. L'analyse protéomique de particules de Pithovirus a montré la présence de 159 protéines impliquées dans la structure de la particule, la transcription, la réparation de l'ADN, les modifications de l'ARN ou de protéines ou de lipides, ou de fonction inconnue. Le génome code 979 gènes, beaucoup plus que les autres virus connus, dont, fait particulier, des ARNt et des enzymes impliquées dans la synthèse des nucléotides et le métabolisme d'acides aminés et de polysaccharides. La découverte des *Mimiviridae* s'est accompagnée de celle d'un ensemble d'autres virus, les **virophages** (tel Sputnik), des virus à petit génome à ADN db (seize à trente-quatre gènes) ne se répliquant que dans des amibes infectées par un *Mimiviridae*, en exploitant la machine réplcative de ces derniers, dont ils peuvent aussi intégrer le génome.

4.2 Groupe II - Les phages ΦX174 et M13

ΦX174 (famille des *Microviridae*) n'infecte que les Entérobactéries, alors que les phages filamenteux connus, dont M13 (famille des *Inoviridae*), infectent une soixantaine de Bactéries à Gram⁻ incluant *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Thermus*, *Neisseria*, et au moins deux espèces à Gram⁺. ΦX174 comme M13 et les phages apparentés fd et f1, s'adsorbent sur les pili sexuels des hôtes à Gram⁻. Des pili (§ 3.1) ils rejoignent leur récepteur secondaire, les molécules de lipopolysaccharides (ΦX174) et des protéines membranaires (M13). L'ADN viral est injecté, sous forme circulaire, à travers la (les) membrane(s) (par un mécanisme peu connu) jusqu'au cytoplasme (voir Figure 8.8). Les génomes (onze et dix gènes, respectivement) codent pour le(s) gène(s) produisant une (des) protéine(s) impliquée(s) dans la réplication, et ceux (dix et huit, respectivement) codant les protéines de la capsid et de son assemblage. La réplication inclut la formation d'un ADN db par synthèse par la polymérase de l'hôte du filament (-). Cet intermédiaire circulaire sert de matrice pour la synthèse du concatémère du brin linéaire (+) par cercle roulant. Ce brin est scindé en unités génomiques, qui sont circularisées. Une fois les gènes tardifs exprimés, dans le cas de ΦX174, une procapsid est assemblée dans le cytoplasme, et une protéine virale associée au complexe de réplication induit l'empaquetage dans celle-ci de la forme génomique, l'ADN sb (+). Les virions mûrs sont libérés par lyse de la paroi cellulaire par des molécules de lysozyme, codé par le virus. La maturation des particules de M13 et leur export ont lieu au niveau d'un canal trans-enveloppes cellulaires, qui guide l'assemblage autour de l'ADN viral de protéines de structure de la capsid, laquelle s'allonge au fur et à mesure de la progression de l'ADN. Ce processus attente peu à l'intégrité de l'hôte, dont la croissance se poursuit, plus lentement cependant, et permet une réplication prolifique du génome phagique. Les rendements peuvent atteindre 10¹³ particules par millilitre de culture infectée.

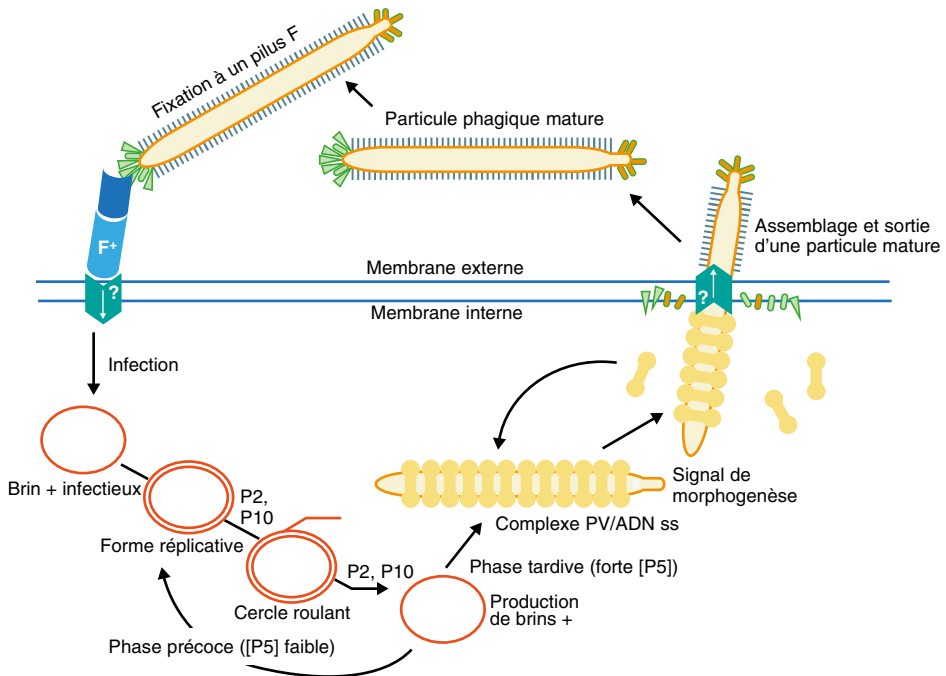


Figure 8.8 – Cycle du bactériophage M13 d'*E. coli*

4.3 Groupe III - Le phage $\Phi 6$

Le phage le plus connu de la famille des *Cystoviridae*, $\Phi 6$, infecte *Pseudomonas syringae*, une Bactérie diderme pathogène des plantes (voir Chapitre 7). $\Phi 6$ est un virus sphérique enveloppé par une structure en triple couche. La couche externe, une membrane lipidique originaire de l'hôte, est couverte de protéines virales dont l'une est responsable de la spécificité d'hôte *via* son interaction avec le récepteur du phage sur l'hôte. Cette membrane enveloppe une nucléocapside, caractéristique rare chez les virus de procaryotes, de forme icosaédrique, formée de deux coques concentriques de protéines virales, la plus interne étant une ARN-Pol ARN-dépendante (ou ARN réplicase), responsable à la fois de la transcription et de la réplication. Après adsorption du virion sur un pilus F et rétraction de ce dernier, la membrane externe du phage se fond dans la membrane externe de la Bactérie et une digestion locale du peptidoglycane entraîne la nucléocapside dans l'espace périplasmique, d'où elle rejoint le cytoplasme. L'ARN-Pol synthétise les ARNm correspondant aux trois segments génomiques, permettant la synthèse des protéines virales. L'auto-assemblage des protéines capsidaires forme des procapsides, dans lesquelles l'empaquetage contrôlé d'une copie (+) de chacun des trois ARNm peut alors avoir lieu, suivant un mécanisme peu connu. L'ARN-Pol reconstitue le génome ARN db en synthétisant les brins complémentaires. L'enveloppe du virion sera

constituée au moment de la libération des particules par assemblage avec des phospholipides de la membrane de l'hôte. Les virions sont alors libérés (quarante-cinq minutes après l'infection) suite à une lyse partielle du peptidoglycane par une protéine phagique.

4.4 Groupe IV - Les phages MS2 et Q β

Les cycles des deux phages modèles de ce groupe, Q β et MS2 (famille des *Leviviridae*), présentent de fortes similitudes (voir Figure 8.9). L'ARN-Pol ARN-dépendante, associée à des protéines de l'hôte, est la seule protéine phagique ayant une activité enzymatique. Synthétisée précocement, elle complémente l'ARN parental (+) pour produire un intermédiaire ARN db, qui sert de matrice pour synthétiser les copies ARN sb (+) génomiques. Deux autres protéines phagiques constituent la capside mature, et la quatrième, responsable de la reconnaissance du pilus F pour l'adsorption, inhibe la synthèse du

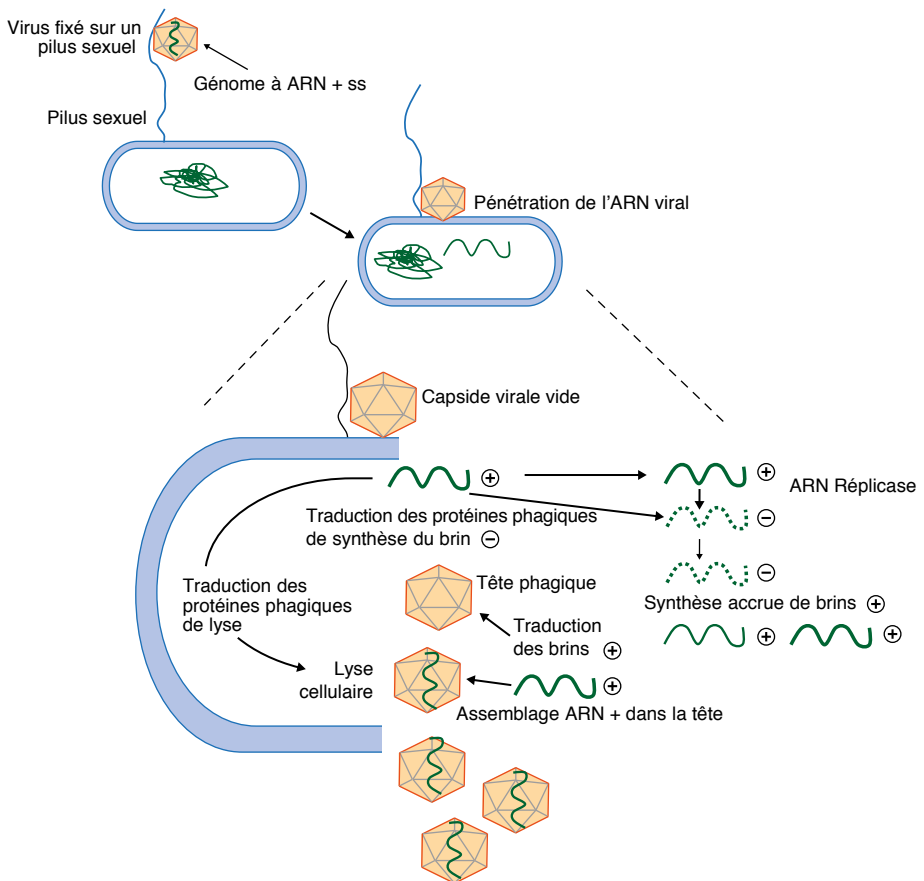


Figure 8.9 – Le cycle du bactériophage MS2.

P5, P10 et PV sont des protéines codées par MS2.

peptidoglycane, provoquant la lyse de la cellule et la fin du cycle. Tous deux, s'adsorbant sur un pilus sexuel, ont pour hôtes les genres bactériens dans lesquels le plasmide F peut être maintenu (*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*). Q β , le plus petit phage connu (24 nm de diamètre, quatre gènes), est donc présent en abondance dans les eaux usées, en particulier d'origines animale et humaine. Sa détection dans un échantillon de ces eaux est utilisée comme indicateur de la présence d'Entérobactéries, donc d'une contamination fécale pouvant éventuellement contenir d'autres pathogènes de l'Homme.

4.5 Les phytovirus

Les connaissances sur les virus des plantes, ou phytovirus, moins étendues que celles concernant les virus des animaux, se sont surtout focalisées sur les virus de plantes cultivées, soit moins de 0,1 % des végétaux connus. Cela peut sembler paradoxal, compte tenu de leur importance dans la naissance et le développement de la virologie, et de l'incidence économique des dommages qu'ils produisent sur les plantes alimentaires et ornementales (la perte de récoltes annuelle mondiale est estimée à 60 milliards de dollars US). En 2014, le nombre de phytovirus répertoriés (données de l'ICTV) était de 1 210 espèces, réparties en cent treize genres et vingt familles. Les phytovirus sont ubiquistes chez les végétaux. Leur nomenclature dérive généralement de l'hôte chez lequel le premier isolement a été obtenu, suivie parfois du type de manifestation provoquée dans la plante (virus de la mosaïque du tabac, VMT) ou encore de son origine géographique. Les spectres d'hôtes sont très variables. À une extrémité le virus Papaya Ring Spot n'infectant qu'un nombre limité d'espèces, surtout des cucurbitacées, à l'autre le virus de la mosaïque du concombre (VMC) capable d'infecter 1 200 espèces végétales, dont des plantes maraîchères, des plantes ornementales et des plantes adventices. Les symptômes de l'infection par ces virus sont une marbrure foliaire (décoloration du limbe foliaire formant une mosaïque de couleurs, d'où le nom des virus), un jaunissement du feuillage, des anneaux nécrosés, le rabougrissement et des déformations de l'ensemble de la plante.

Une infection par un phytovirus a deux caractéristiques principales : elle se produit par dissémination du virus au niveau d'abrasions provoquées par la pratique agricole ou par la piqûre d'un insecte porteur du virus (le VMC peut être transmis par plus de quatre-vingts espèces d'aphides) ; elle intéresse tous les organes de la plante, les virions passant d'une cellule à une autre, dans tous les tissus, provoquant une infection systémique.

Les principales morphologies des capsides sont des sphères ou des bâtonnets (plus ou moins rigides), généralement icosaédriques. Les génomes sont généralement petits (quatre à douze gènes), et présentent toutes les combinaisons possibles, ADN ou ARN, double ou simple brin, linéaires ou circulaires, les génomes à ARN sb, (+) ou (-), étant cependant très majoritaires (environ 90 %), et ceux à ARN db linéaires et ADN db circulaires représentant chacun environ 4 %. Les génomes à ARN sb (+) présentent une étonnante diversité. Ils sont souvent segmentés (deux à cinq parties), chaque fragment

enfermé dans une capside propre. L'infection, pour être efficace, nécessite donc la présence de toutes les particules permettant de reconstituer un génome entier. Les virus à ARN sb (–) ou ambisens sont en revanche morphologiquement et génétiquement peu différents des *Bunyaviridae* qui infectent les animaux. La réplication de la majorité des génomes de phytovirus (donc à ARN sb) passe par une phase à ARN db.

Le **virus de la mosaïque du tabac** forme un bâtonnet long de 300 nm avec un diamètre de 18 nm, constitué de 2 300 copies d'une même protéine, qui s'enroulent autour d'un génome à ARN sb linéaire (+) de 6,3-6,5 kb. Cet ARN porte à l'extrémité 3' une structure 3D de type ARNt et en 5' une coiffe constituée d'un nucléotide modifié analogue à la coiffe des ARNm eucaryotes. Cette coiffe assure la protection de l'ARNm pendant la traduction. Le génome du VMT code trois protéines : une ARN-Pol ARN-dépendante (ou réplacase) impliquée dans la transcription et la réplication, une protéine impliquée dans le déplacement du virus (MP) et la protéine de capside. La particule entre dans le cytoplasme, où commence la désagrégation de la capside. La traduction de l'ARN pourrait faciliter ce désassemblage par association d'un ribosome à l'extrémité 5' de l'ARN viral. Une fois le génome libre, la réplacase initie le cycle par la synthèse d'un ARN db. Puis elle transcrit cette forme bicaténaire en vue de la production des protéines virales, et réplique des molécules génomiques, ARN sb linéaires (+). La réplication a probablement lieu dans un complexe associé à la membrane, contenant l'ensemble des protéines de réplication, la protéine MP, l'ARN viral et des protéines de l'hôte. L'assemblage des virions est intra-cytoplasmique. Au terme du cycle le complexe virion-protéine MP passe vers d'autres cellules *via* les plasmodesmes (des pores de communication intercellulaires), provoquant une infection systémique.

Les points clefs du chapitre

- 1 Les virus sont des entités biologiques parasites dépourvues de métabolisme, ne pouvant se reproduire que dans une cellule hôte, qu'ils infectent, Bactérie, Archée ou Eucaryote.
- 2 Le virion est la forme extracellulaire inerte, formée d'une capsid, éventuellement enveloppée, qui enferme le génome, constitué d'une ou plusieurs molécules, d'ARN ou ADN, mono ou bicaténaire.
- 3 La capsule protège le génome et porte les structures spécifiques nécessaires à l'adsorption sur le(s) hôte(s) et le transfert du génome dans celui/ceux-ci.
- 4 Les cycles de développement varient suivant les virus et le type d'hôte.
- 5 Les virus peuvent soit injecter leur seul génome dans l'hôte (cas fréquent chez les virus des procaryotes), soit pénétrer sous forme de nucléocapside (virus d'Eucaryotes).
- 6 La réplication du génome viral est cytoplasmique (virus de procaryotes), et cytoplasmique ou nucléaire chez les virus d'Eucaryotes.
- 7 Réplication et transcription utilisent des enzymes virales et/ou de l'hôte.
- 8 Les virus jouent un rôle important dans l'évolution des organismes.



Entraînez-vous

- 8.1 Quels sont actuellement les critères retenus pour la classification des virus ? Pourquoi cette classification ne retient-elle pas les niveaux supérieurs (classe, phylum, domaine) utilisés pour l'arbre universel du vivant ?
- 8.2 Définir les étapes du développement d'un virus.
- 8.3 Quelles structures de l'hôte procaryote interviennent dans sa reconnaissance par un virus ?
- 8.4 Définir le terme de phage tempéré, et préciser la différence principale entre les phages Mu et lambda d'*E. coli*.
- 8.5 L'intégration du génome du phage lambda dans l'ADN bactérien conduit à une permutation circulaire alors que celle du phage Mu maintient la carte génétique (voir Chapitre 5). À quoi doit-on attribuer cette différence ?
- 8.6 En quoi l'infection par le phage T4 est-elle irréversible pour son hôte ?
- 8.7 En quoi la découverte des Mimivirus remet-elle en question certains concepts de virologie ?
- 8.8 Quels sont les processus utilisés par les bactériovirus pour sortir de la cellule infectée ?
- 8.9 Le phage Φ X174 donne des plages de lyse sur un tapis de son hôte, alors qu'il n'en va pas de même pour M13, qui ne donne que des « taches claires ». En quoi leur processus de sortie de la Bactérie explique-t-il cette différence ?

Introduction

Depuis les premières utilisations de micro-organismes pour la production d'aliments et de boissons, destinées à améliorer la conservation des produits disponibles, en passant par la rationalisation des procédés (L. Pasteur et R. Koch) au XIX^e siècle, la biotechnologie a largement évolué, grâce aux avancées des connaissances (génétique et physiologie) et des technologies, atteignant l'ère de l'ingénierie métabolique et de la biologie synthétique.

Objectifs

Connaître les principaux métabolites produits par des Bactéries grâce à l'ingénierie métabolique

Identifier les enzymes clés permettant la biosynthèse de ces métabolites ou exerçant une action défavorable

Définir les différentes stratégies utilisant alternativement la surexpression ou la répression de voies métaboliques pour optimiser le rendement

Expliquer comment un micro-organisme peut être modifié génétiquement afin de produire une nouvelle molécule

Plan

- 1 Des procédés classiques à l'ingénierie
- 2 Santé humaine et ingénierie métabolique
- 3 Des approches innovantes

1 Des procédés classiques à l'ingénierie

Les premières biotechnologies datent de plusieurs millénaires, quand nos ancêtres commencèrent à préparer des aliments et des boissons tels que pain, bière, vin, vinaigre, ou produits de la fermentation du lait, grâce à leurs observations empiriques. Ces préparations permettant de conserver les produits naturels disponibles, leur pratique s'est maintenue à travers les siècles. L'utilisation de végétaux décomposés naturellement comme fertilisants dans le sol doit dater d'à peu près la même période (le début de l'agriculture). La rationalisation des procédés, qui a découlé de la mise en évidence du rôle fondamental des micro-organismes dans ces transformations, n'a vraiment démarré qu'avec les débuts de la microbiologie scientifique, grâce à L. Pasteur et R. Koch, au

XIX^e siècle. L'exploitation de fermentations contrôlées pour la production de molécules à usage industriel ou de vaccins s'est alors développée. Ainsi, la seconde guerre mondiale a déclenché et accéléré la production de glycérol, d'acétone et de butanol (nécessaires pour préparer la nitroglycérine, la poudre explosive et le caoutchouc, respectivement), et des premiers antibiotiques. La diversification des domaines impliqués a incité chercheurs et industriels à améliorer les souches productrices et les procédés de culture, afin de parvenir à des rendements économiquement rentables. Ceci a débuté en soumettant les souches à des mutagénèses physico-chimiques « à l'aveugle » (voir Chapitres 5 et 6), destinés entre autres à lever ou modifier certaines régulations cellulaires interférentes. Ces procédés, qui nécessitaient de longues étapes de criblage, ont néanmoins permis d'améliorer sensiblement les niveaux de production de métabolites naturels primaires ou secondaires. La plupart des métabolites d'intérêt sont encore produits par des micro-organismes sélectionnés dans l'environnement et améliorés génétiquement. Des acides aminés et des antibiotiques (β -lactamines, tétracyclines, macrolides...) restent parmi les métabolites les plus produits malgré la crise que traverse actuellement l'antibiothérapie ; il en est de même des produits à usage alimentaire (vitamines, arômes, acides organiques, dextranes, etc.), des substituts de pétrole (1,2 propane-diol, butanol), et des biopolymères bactériens naturels, tel le poly- β -hydroxybutyrate produit par *Alcaligenes eutrophus*, utilisables pour la synthèse de plastiques biodégradables.

L'avènement du génie génétique, renforcé par les avancées spectaculaires des technologies de biologie moléculaire et l'accumulation de très nombreuses données génétiques et biochimiques, a donné lieu à une nouvelle discipline, l'ingénierie métabolique. Il devient possible de cibler les mutations souhaitées, d'exprimer des enzymes hétérologues dans une souche microbienne plus « manipulable », d'identifier plus facilement les enzymes pertinentes, et d'ouvrir la voie à une multiplicité de combinaisons génétiques.

1.1 Ingénierie génétique : production d'acides aminés

La demande en acides aminés concerne de nombreux secteurs. Méthionine, tryptophane, lysine et thréonine, peu ou pas présents dans les fourrages, servent de compléments alimentaires en zootechnie. D'autres sont des points de départ de procédés industriels variés (alimentation, pharmacie, plastiques biodégradables, solvants « verts », cosmétiques, textiles, détergents et agents tensio-actifs) ou des précurseurs de produits à usage médical, telle la dopamine. Ces métabolites primaires sont majoritairement produits par voie fermentaire[§] à partir de souches bactériennes améliorées. Les productions de glutamate et de lysine par *Corynebacterium glutamicum* figurent parmi les plus emblématiques.

Commercialisé essentiellement sous forme de sel de sodium, le **glutamate** (forme aqueuse normalement ionisée de l'acide glutamique) est un additif exhausteur de goût largement utilisé. Actuellement, environ trois millions de tonnes d'acide glutamique sont produites par an, grâce à une souche modifiée de *C. glutamicum*. C'est le plus fort tonnage au niveau de la production des acides aminés.

Ce métabolite est synthétisé par la glutamate déshydrogénase à partir de l' α -cétoglutarate (voir Figure 9.1). Durant la phase de croissance, la pyruvate carboxylase est l'enzyme anaplérotique majoritaire chez *C. glutamicum* ; c'est elle qui alimente le cycle de Krebs. Lorsque la phase stationnaire de croissance est atteinte, la majorité de l'isocitrate (82 %) est transformée en glutamate, notamment du fait que *C. glutamicum* possède un cycle de Krebs déficient en α -cétoglutarate déshydrogénase. Le glutamate devient alors le produit final majeur de la dégradation du glucose par cette Bactérie. Cependant cette surproduction n'est possible que par inhibition au moins partielle des régulations biochimiques affectant précisément le taux de produit final dans la cellule. La souche industrielle *C. glutamicum* 2262, portant des mutations de ces régulations, permet de s'affranchir de certaines rétro-inhibitions.

Par ailleurs, si rien n'est fait, le glutamate produit en abondance s'accumule à l'intérieur de la cellule, ce qui entraîne une inhibition de certaines enzymes (glutamate

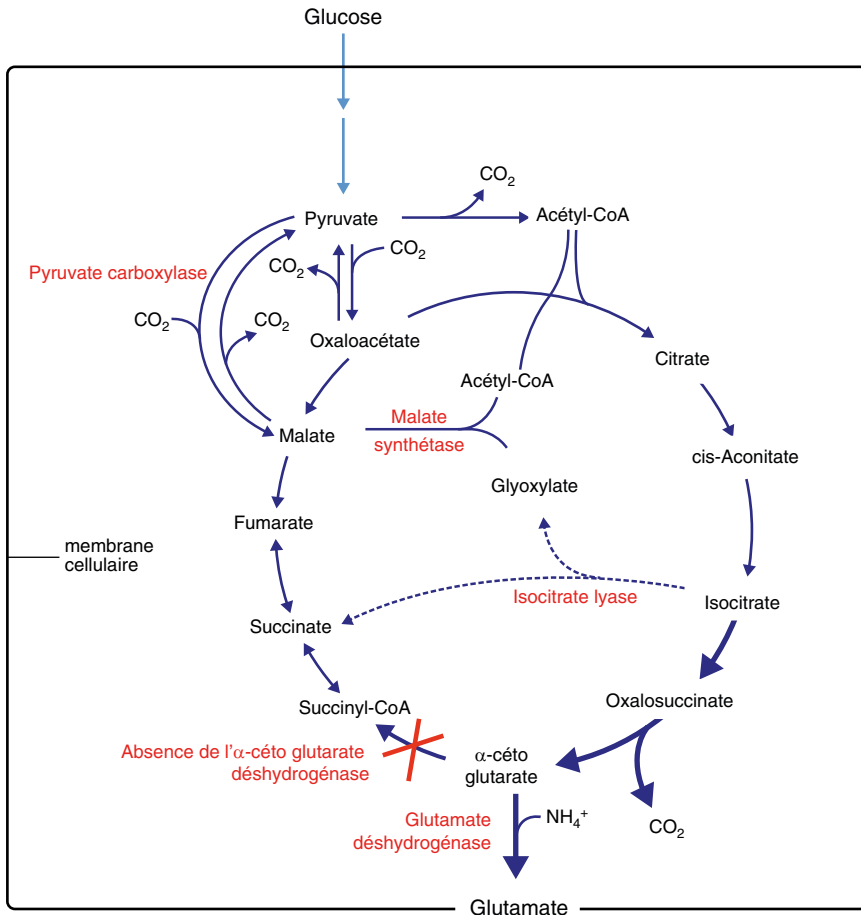


Figure 9.1 – Production de glutamate par *Corynebacterium glutamicum*

déshydrogénase) par rétro-inhibition négative. En effet, les Corynébactéries, qui sont capables d'excréter convenablement les acides aminés basiques et neutres, n'excrètent pas naturellement les acides aminés dicarboxyliques (aspartate et glutamate). Afin d'en diminuer la concentration intracellulaire, l'excrétion de l'acide glutamique est induite artificiellement, principalement par trois types de stress :

- Une limitation de la concentration en biotine (vitamine H), qui intervient dans la synthèse des acides gras. C'est pourquoi une souche ayant besoin de biotine pour sa croissance et cultivée dans un milieu pauvre en cette vitamine peut développer une membrane défectueuse (pauvre en phospholipides, avec un taux d'acides palmitiques plus élevé que le taux d'acides oléiques), ce qui facilitera l'excrétion de l'acide glutamique.
- L'ajout d'un tensioactif (Tween 40), qui fragilise la membrane et contribue à augmenter sensiblement le flux de glutamate vers le milieu de culture.
- Une élévation de la température du milieu de culture. Une fois que la biomasse obtenue à 33 °C est suffisante, la température est amenée à 39 °C. Ce traitement conduit à une augmentation très significative du niveau de glutamate extracellulaire. Il est ainsi possible d'atteindre un taux de 85 g/L dans le milieu de culture (avec stress thermique), alors qu'il est négligeable dans la même culture non soumise à ce traitement.

La **lysine** est un acide aminé essentiel pour les animaux domestiques et les humains, puisqu'ils ne le fabriquent pas naturellement. Il existe aussi quelques indications médicales de cet acide aminé. C'est la deuxième plus importante production après le glutamate (environ un million de tonnes en 2018). Aujourd'hui la lysine est essentiellement produite par des souches de *C. glutamicum* portant des mutations d'auxotrophie et de régulation (voir Figure 9.2). Dans la voie métabolique de synthèse de la lysine, l'aspartokinase K joue un rôle clef. Deux rétro-régulations négatives exercées par la thréonine et la lysine règlent précisément son activité. Afin de les éliminer, différentes mutations ont été incluses dans la souche d'origine :

- Le gène de l'homosérine déshydrogénase a été inactivé, ce qui empêche désormais la conversion de l'aspartate β -semialdéhyde en homosérine. Cela entraîne plusieurs conséquences. Tout d'abord la thréonine n'étant plus produite, l'aspartokinase n'est plus inhibée par cet acide aminé. Ensuite, le flux métabolique vers l'homosérine étant interrompu, le flux vers la lysine est renforcé. Enfin, cette souche étant devenue auxotrophe pour la méthionine, la thréonine et l'isoleucine, il faudra fournir ces trois acides aminés dans le milieu de culture.
- Le gène de l'aspartokinase K, *aspK*, a été muté pour surmonter la rétro-inhibition par le couple lysine + thréonine. Ces mutants ont été sélectionnés par leur capacité de croissance en présence de S-2-aminoéthylcystéine, un analogue de la lysine qui inhibe la croissance des bactéries sauvages en raison de la forte rétro-inhibition qu'il exerce sur l'aspartokinase K. Après une mutagenèse aléatoire (par des agents mutagènes physiques ou chimiques), des mutants du site de régulation de *aspK* ont

pu être sélectionnés par leur non-reconnaissance de la S-2-aminoéthylcystéine (et donc aussi de la lysine).

La présence conjointe de ces mutations (et l'élimination d'autres mutations néfastes) a donné naissance à une souche hyperproductrice de lysine. La souche native de *C. glutamicum* excrète naturellement la lysine au-delà d'une certaine concentration intracellulaire, grâce à un transporteur, LysE. Il n'est donc pas nécessaire de fragiliser la membrane pour l'excrétion de cet acide aminé, contrairement au cas du glutamate. Grâce à ce type de mutants, les rendements de conversion du glucose en lysine atteignent 30 % et les concentrations de lysine environ 40 g/L de culture. La souche sauvage n'en sécrète que des quantités négligeables du fait des rétro-inhibitions qui limitent le flux vers cet acide aminé.

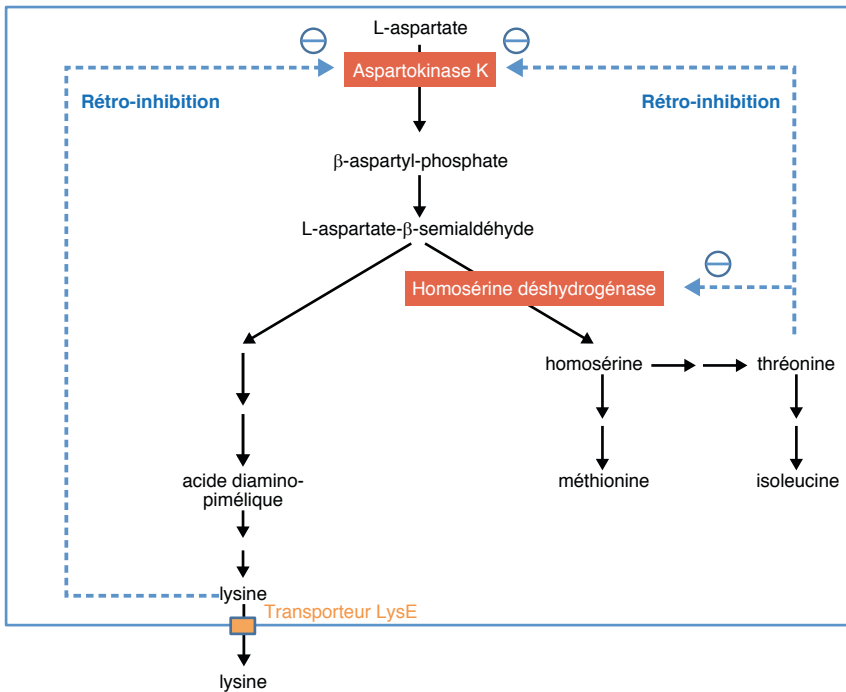


Figure 9.2 – Production de lysine par *Corynebacterium glutamicum*

1.2 Ingénierie métabolique : crise énergétique et biocarburants

a. Des biocarburants à base de déchets végétaux ?

La disparition annoncée des ressources de pétrole a stimulé la recherche de nouvelles sources d'énergie, en particulier des biocarburants. L'éthanol est une alternative

possible. Actuellement sa production industrielle est majoritairement assurée par la fermentation de saccharose (canne à sucre, betterave), mais aussi de glucose (provenant de l'hydrolyse d'amidon), qui constituent déjà des sources de carbone renouvelables. Des études approfondies sont actuellement menées pour optimiser ces processus de fermentation. En outre il serait préférable d'utiliser la cellulose et la lignocellulose à la place de sucres simples comme le saccharose. D'une part ces polysaccharides représentent une biomasse beaucoup plus importante (déchets de végétaux, paille...) et d'autre part leur utilisation ne viendrait pas en concurrence avec des productions alimentaires. Essentiellement deux micro-organismes sont actuellement envisagés pour relever ce défi, la levure *Saccharomyces cerevisiae* et la Bactérie à Gram⁻ *Zymomonas mobilis*. L'une et l'autre nécessitent cependant certaines modifications, réalisées par ingénierie métabolique. Le procédé fermentaire de production d'éthanol à partir d'hexoses est exploité depuis des siècles pour la préparation de vin ou de bière grâce à la transformation de sucres (hexoses) en alcool par *S. cerevisiae* maintenue en anaérobiose (voir Figure 9.3A). Deux enzymes clefs agissent successivement, la pyruvate décarboxylase (PDC) et l'alcool déshydrogénase (ADH). La production peut atteindre 150 g/L d'alcool. *Z. mobilis*, aussi capable de produire de l'alcool, est très performante. Contrairement à la levure, ce bacille dégrade les sucres en pyruvate par la voie d'Entner-Doudoroff. Possédant les deux enzymes PDC et ADH, il produit de l'éthanol avec un rendement d'environ 80 % (100 g/L d'éthanol pour 230 g/L de sucre).

S. cerevisiae comme *Z. mobilis* sont particulièrement intéressantes pour une utilisation industrielle : elles résistent à de nombreux stress (acidité, forte pression osmotique...) et présentent une haute résistance à l'alcool. *Z. mobilis* a une croissance 2,5 fois plus rapide que *S. cerevisiae*, permettant une meilleure productivité, et tolère d'assez hautes températures. Sa croissance est optimale à 32 °C, mais reste possible jusqu'à 42 °C. Ce point est important car le refroidissement des bioréacteurs représente un coût important, particulièrement pour les industries installées dans les pays tropicaux. Toutefois, *Z. mobilis* a un défaut, ses auxotrophies pour la lysine et la méthionine, ce qui requiert l'enrichissement de ses milieux de culture. Malgré toutes les qualités énoncées, ni *Z. mobilis*, ni *S. cerevisiae* ne sont capables de métaboliser la lignocellulose, un substrat bon marché constitué majoritairement de pentoses. L'arabinoxylane, qui en est le constituant principal, contient des xyloses et des arabinoses polymérisés. Ce polysaccharide peut être dégradé chimiquement (en milieu acide par exemple) ou enzymatiquement, mais les pentoses produits (essentiellement du xylose) ne sont pas assimilés par les souches sauvages de ces micro-organismes.

Une manœuvre d'**ingénierie métabolique** chez *S. cerevisiae* va lui permettre de cataboliser le xylose, *via* deux implants génétiques (voir Figure 9.3A) :

- le gène *xylA* du champignon *Pyromyces* codant pour une xylose isomérase (XI) a été modifié pour ajuster ses codons à la fréquence d'utilisation de *S. cerevisiae*, puis greffé et surexprimé ;
- le gène *tal1* codant pour une transcétolase de *Saccharomyces stipitis* a été ajouté pour renforcer une des réactions de la voie des pentoses phosphates.

La souche résultante s'est bien révélée capable de croître sur xylose comme seule source de carbone, mais très lentement. Les chercheurs ont pu identifier deux goulets d'étranglement, à savoir les deux premières réactions enzymatiques (isomérisation et phosphorylation) du métabolisme du xylose. Le gène *xks1* codant pour la xylulokinase (XK) endogène a donc été surexprimé pour renforcer le flux vers le xylulose-5P. En revanche, la xylose isomérase était déjà surexprimée ; pour augmenter son activité, les auteurs lui ont donc fait subir une évolution dirigée (§ 3) : le gène a été muté de façon aléatoire, les gènes mutants ont été introduits à la place de l'allèle sauvage dans la souche précédente, et les mutants possédant les meilleures activités ont été sélectionnés. Des tests de fermentation (production d'éthanol) ont été réalisés. La croissance est effectivement beaucoup plus rapide, et la production d'éthanol plus élevée : au bout d'une semaine de fermentation, le xylose a été presque entièrement consommé et le rendement en éthanol atteint 0,4 g/g de xylose (voir Figure 9.3.B). Cela pourrait être

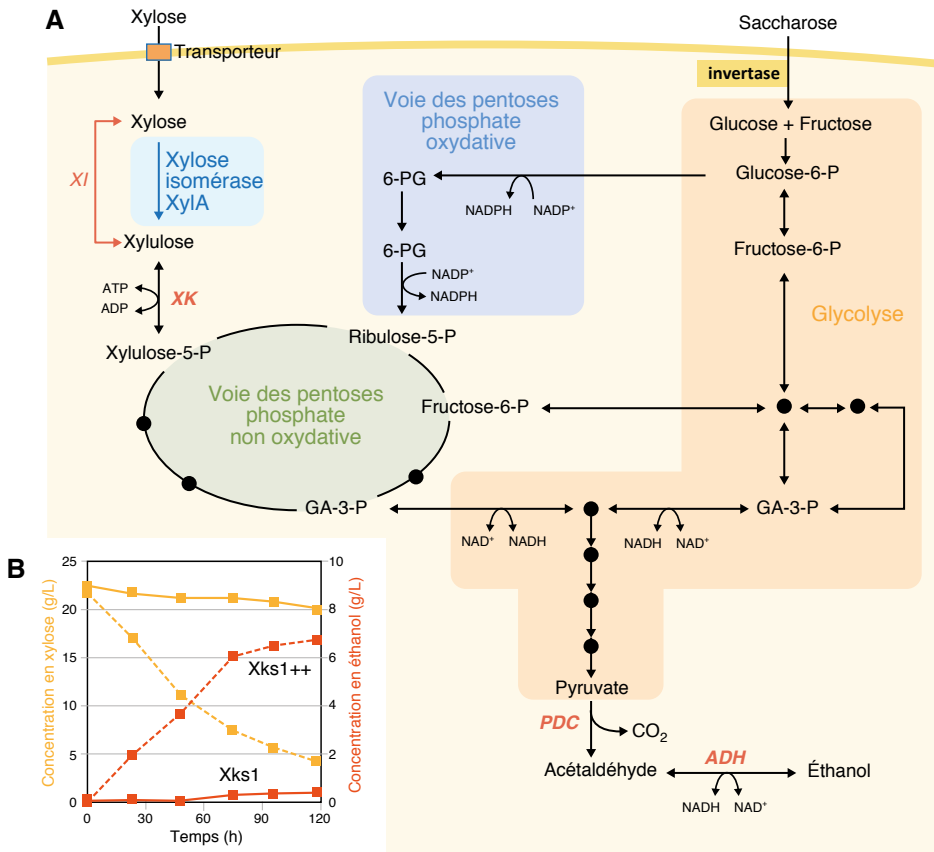


Figure 9.3 – Production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* (d'après S. Kwak et Y.S. Jin, 2017)

6-PG : 6-phosphogluconate, GA-3-P : glycéraldéhyde-3-P.

encore amélioré par l'introduction d'une perméase à xylose car ce sucre transite par les perméases à hexoses, peu efficaces pour ce pentose. D'autre part, la voie des pentoses phosphates, cruciale pour ce catabolisme, pourrait être encore stimulée. Néanmoins cet exemple montre ce que peut apporter l'ingénierie métabolique à un procédé de production microbien. Des améliorations du même type ont été apportées pour permettre le catabolisme de l'arabinose. Il est donc clair que des souches industrielles capables de transformer des hydrolysats de végétaux en alcool seront bientôt disponibles.

L'alternative *Zymomonas mobilis* a fait l'objet de nombreux travaux pour adapter cette Bactérie à l'utilisation d'hydrolysats de lignocellulose comme substrat. Plusieurs gènes ont été insérés dans le chromosome de la souche d'origine (nommée Z ici) :

- les cinq gènes de la voie des pentoses phosphates de *E. coli* : *yfdZ*, *metB*, *xylA*, *xylB*, *tktA*, *talB* ;
- les deux gènes d'*E. coli* complétant ses auxotrophies pour la lysine et la méthionine, *yfdZ* et *metB* ;
- le gène d'une protéine de choc thermique, Pfu-sHSP, provenant d'une Archée hyperthermophile (*Pyrococcus furiosus*), devant jouer le rôle de chaperonine pour éviter l'agrégation et la dénaturation de protéines soumises à un stress de chaleur.

La souche résultante (Z*) devient capable de croître sur xylose comme seule source de carbone dans un milieu sans méthionine ni lysine. Après trois jours de fermentation à 32 °C, l'éthanol est produit avec un rendement très analogue (0,4 g d'éthanol/g de xylose) à celui obtenu à partir de glucose (voir Figure 9.4). Dans un milieu contenant un mélange glucose-xylose (170 et 60 g/L, respectivement) qui mime l'hydrolysat végétal, le rendement est légèrement inférieur mais permet tout de même d'atteindre 90 g d'éthanol/L. Enfin, des tests réalisés à 42 °C pour vérifier le rôle de la chaperonine Pfu-sHSP ont montré que celle-ci protège clairement les enzymes impliquées dans le processus, puisque la souche qui n'en possède pas produit deux fois moins d'éthanol. La souche Z*, bien que moins performante à 42 °C qu'à 32 °C, parvient tout de même à une production de 60 g/L.

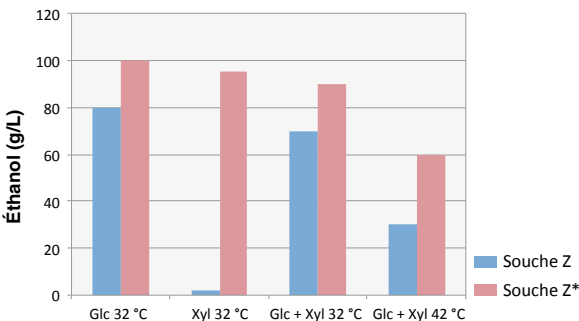


Figure 9.4 – Production d'éthanol par *Zymomonas mobilis*
(d'après M. Zhang et al., 2013)

Sources de carbone fournies : Glc : glucose (230 g/L) ; Xyl : xylose (230 g/L) ; Glc + Xyl : glucose (170 g/L) + xylose (60 g/L)

b. Bactéries modifiées et production de « pétrole vert » ?

On ne compte plus aujourd'hui le nombre de produits de consommation fabriqués à partir de dérivés du pétrole : plastiques en tout genre, textiles, polymères, etc. envahissent notre quotidien, mais comme pour les carburants, cette source n'est pas éternelle. Des recherches sont donc actuellement menées pour produire les molécules de base nécessaires à ces diverses synthèses par des procédés durables. Le **1,3-propanediol** (1,3-PDO) est à la base de la fabrication d'un polyester de spécialité, le polytéraphtate de triméthylène (PTT) qui, par ses propriétés exceptionnelles (toucher, élasticité, résilience, résistance à l'abrasion), peut être utilisé pour la production de fibres textiles, tapis et moquettes, ou encore pour de nombreux plastiques. La production mondiale est d'environ 150 000 tonnes par an, actuellement principalement par voie chimique. Cependant ce procédé est coûteux, dangereux et toxique pour l'environnement, ce qui a incité à le produire par voie biologique.

Clostridium butyricum semble actuellement l'espèce la plus performante parmi les Bactéries qui produisent naturellement le 1,3-PDO. De plus, elle est capable de réaliser cette biotransformation à partir de glycérol, ce qui est intéressant du point de vue environnemental, et économique puisque le glycérol est un sous-produit de transestérification d'huiles végétales. *C. butyricum* métabolise le glycérol selon deux voies (voir Figure 9.5) : la voie oxydative, qui mène au pyruvate grâce à la glycérol déshydrogénase puis aux enzymes de la glycolyse, et la voie réductive qui mène au 1,3-PDO grâce à la glycérol déshydratase (GDHT) et à la 1,3-PDO déshydrogénase.

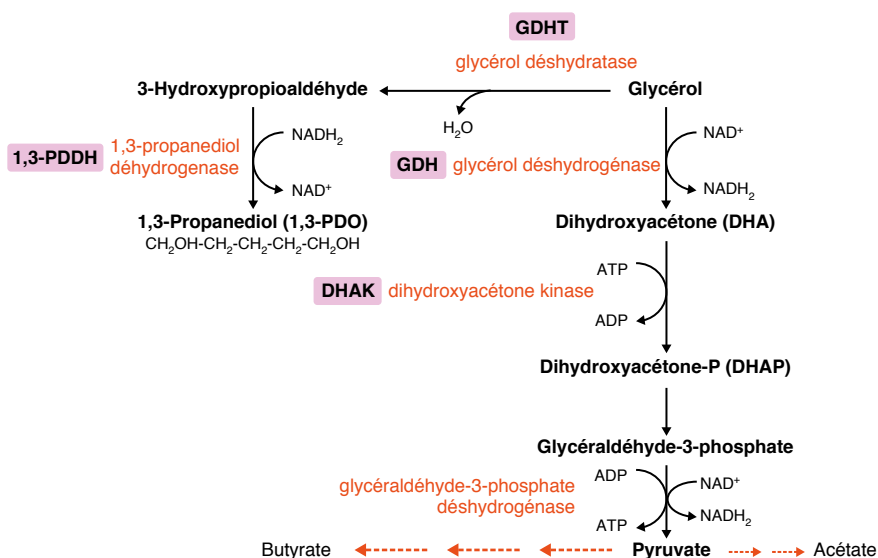


Figure 9.5 – Production de 1,3-propanediol par *Clostridium butyricum* (d'après Przystalowska, H., J. et al., 2015)

Le glycérol sert donc à la fois de source d'énergie pour la croissance et de substrat pour la synthèse du produit. Il est également fermenté en butyrate de façon minoritaire. Contrairement à d'autres GDHT, celle de *C. butyricum* n'a pas besoin de vitamine B12 comme co-facteur, d'où une économie substantielle pour le processus car cette vitamine est très chère. En revanche, *C. butyricum* étant anaérobie stricte, la culture doit être faite en anaérobiose, ce qui implique une croissance lente. De plus la production simultanée d'acétate et de butyrate tend à inhiber la croissance à partir d'une certaine concentration, en raison d'une neutralisation du potentiel transmembranaire (la culture en continu est un des moyens pour surmonter cette limitation). Néanmoins, après une semaine de fermentation en culture discontinue, le rendement avoisine tout de même 60 g/L, ce qui est compétitif. De plus, le butyrate co-produit peut être valorisé en nutrition animale. Le procédé est actuellement considéré comme suffisamment rentable au niveau industriel pour envisager sa mise en application, avec une production annuelle en France de 24 000 tonnes.

L'**isobutène** est un précurseur pour de nombreuses synthèses chimiques, en particulier celle de *tert*-butyl éther (ETBE), un additif de carburants, de polymères ou d'antioxydants. Sa production annuelle est de quinze millions de tonnes par an. Il est actuellement principalement obtenu par cracking de pétrole brut. De nombreux travaux sont donc menés pour le produire par fermentation à partir de sources de carbone renouvelables. Quelques micro-organismes sont capables de le synthétiser, mais à un niveau extrêmement faible. Il a donc semblé préférable de le **faire produire par *E. coli*** en lui implantant une nouvelle voie métabolique. Cette démarche est originale par l'association d'enzymes de différentes provenances, par le type d'extraction, mais surtout par l'utilisation d'une enzyme, la mévalonate diphosphate décarboxylase (MDD), dont l'activité naturelle n'a jamais concerné la synthèse d'isobutène. Elle consiste à produire tout d'abord de l'acétone, structuralement très proche de l'isobutène. Pour cela, trois enzymes de *Clostridium acetobutylicum* ont été exprimées chez *E. coli* (voir Figure 9.6A). Ensuite une enzyme de *Bacillus subtilis* (PksG) a été ajoutée pour condenser l'acétone en 3-hydroxy-isovalérate. Enfin, on connaissait depuis 1985 l'existence d'un cytochrome P450 de levure capable de réaliser la dernière étape enzymatique, la transformation de ce composé en isobutène, mais son activité était trop faible. Il fallait donc trouver une autre enzyme, également plus à même d'être exprimée chez *E. coli*. Une observation attentive a permis de montrer que le 3-hydroxyisovalérate constitue une partie de la molécule de mévalonate diphosphate (un précurseur de l'ergostérol) (voir Figure 9.6B), transformé en isopentényl diphosphate par la MDD. L'hypothèse que la MDD serait aussi capable de transformer le 3-hydroxyisovalérate s'est avérée exacte : cette enzyme (de levure) présente une promiscuité catalytique pour ce substrat, ce qui lui permet de synthétiser un peu d'isobutène. Son activité étant faible, une recherche systématique d'enzymes orthologues a été réalisée chez une douzaine d'organismes et micro-organismes, la MDD de l'Archée *Picrophilus torridus* s'étant montrée la plus active. Son potentiel fut encore augmenté par évolution dirigée (§ 3). L'isobutène étant faiblement soluble dans l'eau (267 mg/L) et toxique pour *E. coli*, il est récupéré sous forme de gaz au-dessus du bioréacteur, puis séparé des vapeurs d'eau et du CO₂. Ce procédé permet un rendement d'une

mole d'isobutène à partir de 1,5 mole de glucose, jugé suffisant dès 2018 pour envisager une valorisation industrielle à partir de saccharose de betterave ou de lignocellulose.

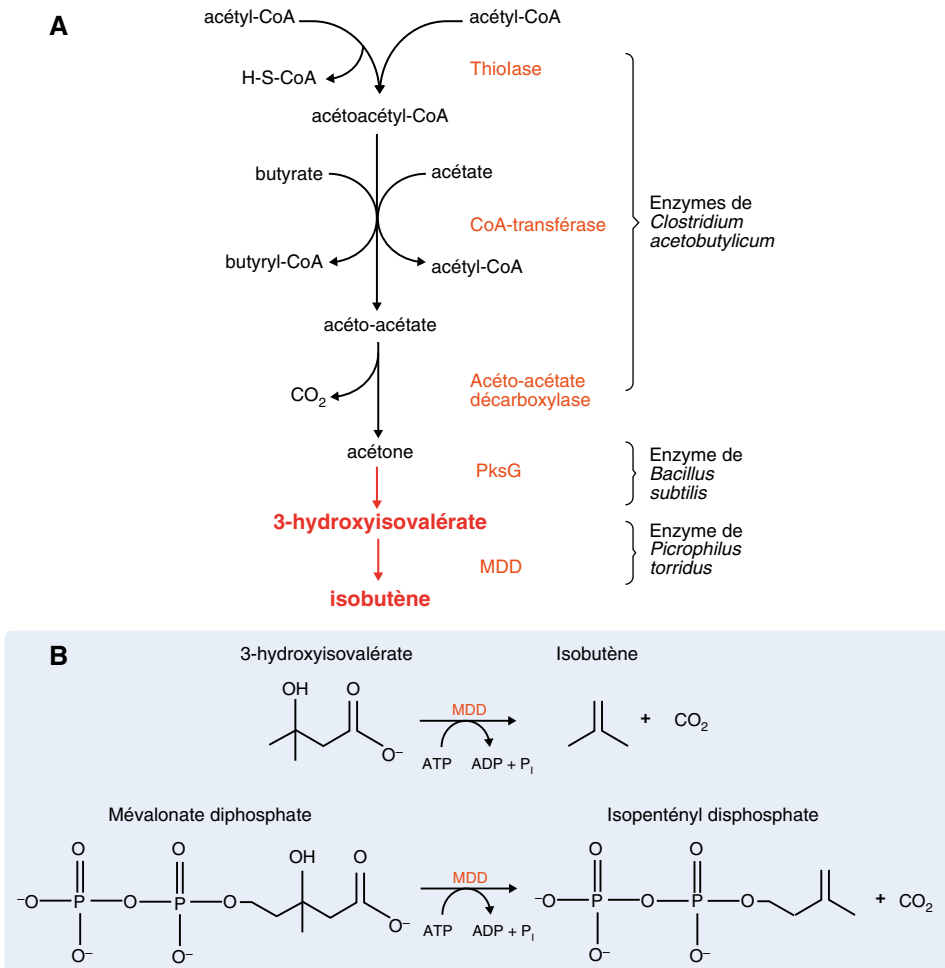


Figure 9.6 – Production d'isobutène par *E. coli* (d'après B.N.M. Van Leewen et al., 2012)

2 Santé humaine et ingénierie métabolique

L'ingénierie métabolique, bien qu'extrêmement prometteuse, requiert encore beaucoup d'études préalables et de tâtonnements. Il reste que des métabolites de haute valeur ajoutée, difficiles à obtenir ou inaccessibles par voie chimique, ont pu être synthétisés

avec des rendements suffisants. Dans le domaine de la santé, les avancées des technologies de biologie moléculaire et l'accumulation de données génétiques et biochimiques ont été particulièrement profitables. Certains travaux sont aboutis et se traduisent par une production industrielle, d'autres en sont encore au stade recherche/développement. Des applications inattendues, comme la conception de bactéries anti-tumorales, montrent que les chercheurs ne manquent pas d'imagination pour exploiter le monde très prometteur des micro-organismes.

2.1 Vers de nouveaux antibiotiques : iChip et métagénomique

La résistance des Bactéries pathogènes aux antibiotiques constitue actuellement un problème de santé publique, en particulier en milieu hospitalier. Les recherches menées depuis des décennies ont surtout consisté à modifier chimiquement les antibiotiques connus afin de contourner les résistances, ou à identifier des molécules de synthèse pouvant agir sur de nouvelles cibles cellulaires (protéines de la réplication, de la division, etc.). D'une part, bien sûr, les antibiotiques modifiés ont aussi donné lieu à l'apparition rapide de résistances, et d'autre part très peu de nouvelles molécules ont été découvertes.

La plupart des antibiotiques ont été découverts chez des micro-organismes du sol cultivables en laboratoire. Classiquement, des lixiviats de différents types de sols sont dilués et ensemencés dans un milieu de culture approprié⁸, et des échantillons des micro-organismes isolés sont déposés sur une série de milieux gélosés pré-ensemencés chacun d'un tapis d'une Bactérie pathogène différente. Si après incubation un halo d'inhibition de croissance de la Bactérie pathogène se développe autour du point de dépôt d'un micro-organisme, il est probable que celui-ci sécrète un produit bactériostatique ou bactéricide. Cette technique, équivalente à un test d'antibiogramme classique, est très simple à réaliser. Toutefois le produit impliqué est beaucoup plus difficile à identifier, et bien souvent il appartient à une famille d'antibiotiques déjà connue. La découverte de nouvelles molécules semble donc plus probable chez des micro-organismes peu ou pas explorés, en particulier chez ceux qu'on ne sait pas cultiver dans les conditions classiques de laboratoire, soit approximativement 99 % des micro-organismes du sol ! Des chercheurs ont récemment développé une stratégie permettant d'explorer cette flore, grâce à l'obtention de micro-croissances de ces organismes.

L'iChip est un assemblage de plaques qui contient des centaines de puits, chacun formant une très petite chambre de diffusion, recouverts de membranes en plastique semi-perméables (voir Figure 9.7). Chaque puits est ensemencé par un échantillon de sol dilué de telle sorte qu'il ne contienne, en moyenne, qu'une cellule. Les plaques sont ensuite enfouies dans le sol pendant un mois, ce qui permet une micro-croissance grâce à la diffusion des facteurs de croissance et nutriments présents dans le milieu naturel des micro-organismes. Elles sont ensuite déposées sur un milieu gélosé portant un tapis de Bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus* par exemple) pour tester un effet antimicrobien potentiel de chaque puits. Dix mille micro-organismes ont été criblés

de cette façon, ce qui a permis d'en isoler vingt-cinq potentiellement intéressants, dont une nouvelle espèce de β -Protéobactéries, *Eleftheria terræ*, qui produit un nouvel antibiotique, la teixobactine. Les auteurs ont montré que la teixobactine est capable de tuer des souches représentatives de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium difficile* (Bactéries à Gram⁺), ainsi que *Mycobacterium tuberculosis* (voir Chapitre 1). Une faible croissance de *E. terræ* a pu être obtenue *in vitro* après onze jours de culture, ce qui a permis de purifier la teixobactine et de déterminer sa structure :

Nmphe-ile-ser-gln-ile-ile-ser-thr-ala-end-ile,

qui inclut une liaison covalente entre thr et le résidu ile terminal. Il s'agit d'un peptide inhabituel contenant un acide aminé très rare, l'enduracidine (end), de la méthylphénylalanine (Nmphe) et quatre acides aminés de la série D. Sa voie de biosynthèse, identifiée par séquençage du génome, repose sur l'activité de deux peptide-synthétases non ribosomales. Sa synthèse chimique a pu être réalisée avec succès et de nouveaux variants sont déjà en cours d'expérimentation. En outre, l'enduracidine n'est pas indispensable pour l'activité de la molécule, ce qui permet de faciliter la synthèse d'une molécule active proche de l'antibiotique naturel. La teixobactine a un mode d'action différent de celui des antibiotiques actuellement utilisés pour traiter les infections bactériennes. Elle inhibe la biosynthèse du peptidoglycane en se liant à des motifs hautement conservés portés par le lipide II (un précurseur du peptidoglycane) et le lipide III (un précurseur de l'acide téichoïque (voir Chapitre 1). Jusqu'à présent, aucun *S. aureus* ou *M. tuberculosis* résistant à la teixobactine n'a pu être isolé, principalement en raison de ce double ciblage qui diminue drastiquement la probabilité de voir émerger de tels mutants. Une société pharmaceutique mène actuellement des tests cliniques sur cette molécule pour une prochaine mise sur le marché. L'analyse de micro-organismes non cultivables s'est donc avérée fructueuse et devrait permettre l'identification d'antibiotiques actifs contre des Bactéries en particulier à Gram⁻ (*E. coli* ou *Klebsiella*).

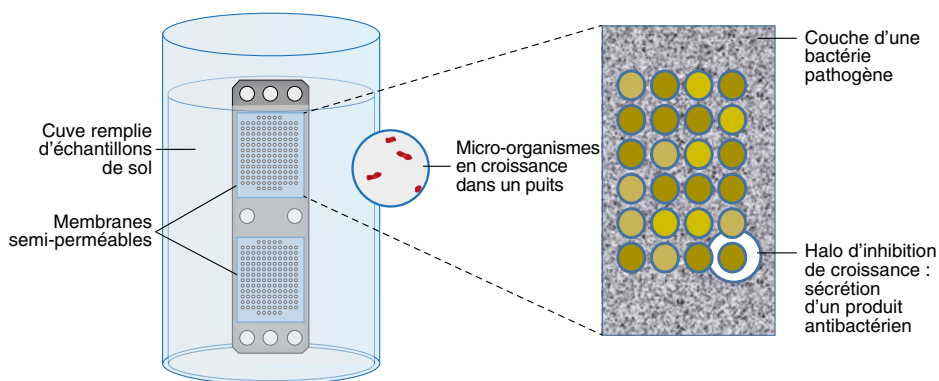


Figure 9.7 – Recherche et identification de nouveaux antibiotiques. Schéma de la technique des iChip. (d'après Ling, L.L., 2015)

L'approche métagénomique est une alternative pour accéder aux voies métaboliques de micro-organismes difficilement cultivables : de grands fragments d'ADN peuvent être extraits d'échantillons de sol, puis clonés dans un hôte microbien. Si les gènes de ces organismes peuvent être correctement exprimés dans l'hôte de clonage, et si les voies métaboliques concernées sont complètes, il sera possible de cribler ces clones recombinants pour leur production d'antibiotiques. Cette stratégie, assez aléatoire, peut néanmoins faciliter l'identification des clusters de gènes responsables, et l'obtention d'un micro-organisme hôte producteur directement cultivable.

2.2 Oligosaccharides, un challenge d'ingénierie

a. Intérêt des oligosaccharides

La glycobiochimie est en plein essor. Depuis quelques années, la communauté scientifique a pris conscience de l'importance des oligosaccharides (OS) portés par les protéines ou les lipides. Ils jouent des rôles fondamentaux dans la communication intercellulaire, la fécondation, l'immunité, les infections, ou encore le développement tumoral. Ainsi, les Bactéries pathogènes débute bien souvent la colonisation de tissus par l'adhésion sur des sucres présents à la surface des cellules épithéliales. Les toxines qu'elles sécrètent ciblent aussi la plupart du temps des OS des cellules hôtes. Pour des besoins de recherche et d'applications thérapeutiques, la demande en oligosaccharides croît donc fortement, en décalage avec les capacités de synthèse actuelles. Ces molécules sont d'une extrême diversité structurale, et leur synthèse chimique est rendue très complexe en raison des multiples fonctions hydroxyles qu'elles portent, qui peuvent générer de nombreux régio- ou stéréo-isomères. Ainsi de nouvelles voies de synthèse ont été envisagées, et la voie enzymatique *in vivo* semble l'une des plus prometteuses.

b. Synthèse *in vivo* avec des glycosyltransférases

Dans les cellules, les OS sont produits par des glycosyltransférases (GT) qui présentent de fortes spécificités de substrats (donneur et accepteur), de régiospécificités (branchement 1→2, 1→3, etc. entre deux sucres), et de stéréospécificités (branchement de l'hydroxyle du carbone anomérique en position α ou β). Il semblait donc pertinent d'utiliser ces enzymes pour produire différents types d'OS dans un hôte bactérien adapté. Pour rendre ce procédé viable, certaines conditions devaient être réunies : la disponibilité en nucléotides-sucres endogènes (tel l'UDP-glucose), l'absence de glycosidases capables de dégrader les OS synthétisés, l'expression de GT actives, la mise au point d'une méthode de purification à partir du lysat cellulaire. Une démarche de ce type s'est révélée extrêmement fructueuse, en particulier pour l'obtention de très nombreux antigènes de groupes sanguins (A, B, O, Lewis...) ou d'antigènes glycotumoraux. C'est le cas de la synthèse de l'antigène glycotumoral GloboH, présent à la surface de cellules tumorales variées (sein, ovaire, prostate, poumons) suite à des défauts de glycosylation chez ces cellules. D'une façon générale, l'hôte bactérien producteur retenu est *E. coli* en

raison de sa facilité de manipulation, de la très large connaissance de son métabolisme et de sa génomique. Cette Bactérie présente deux défauts : elle ne possède que peu de GTs adéquates, et ne fabrique naturellement que quelques nucléotides-sucres. Il faut donc introduire par clonage des GTs provenant d'organismes eucaryotes ou procaryotes, qui doivent être délétées de leur domaine transmembranaire pour permettre une bonne activité chez *E. coli* (voir Figure 9.8). Il faut aussi pallier le manque de diversité des nucléotides-sucres endogènes disponibles grâce à des modifications métaboliques. La purification du GloboH se fait en plusieurs étapes : perméabilisation des cellules par autoclavage, rétention des sucres du surnageant par mélange à du charbon actif, élution par l'éthanol, et séparation des différentes espèces d'OS par chromatographie.

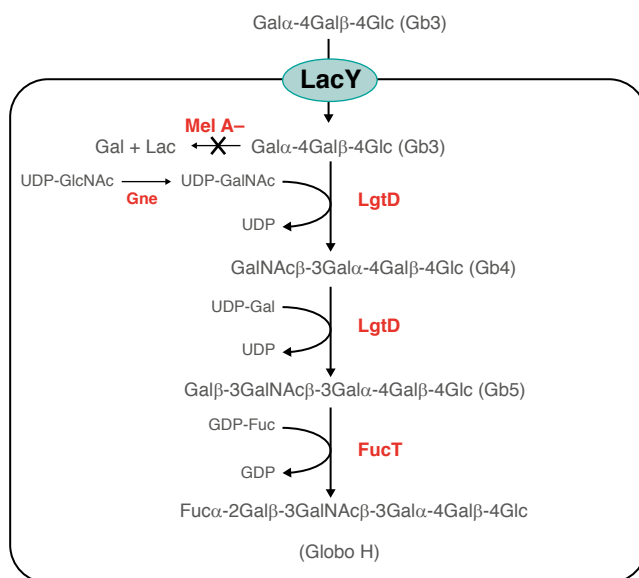


Figure 9.8 – Biosynthèse de l'antigène glycotumoral GloboH par *E. coli* à partir de globotriose Gb3 (d'après M. Randriantsoa et al., 2007)

Deux gènes de GT ayant chacun les spécificités requises et directement impliquées dans la synthèse de GloboH ont été clonés chez *E. coli* : *lgtD*, codant la GalNAc-transférase (qui possède aussi une activité galactosyl-transférase) de *Haemophilus influenzae*, et *fucT*, codant la fucosyl-transférase, de *Helicobacter pylori*. L'introduction d'un sucre « accepteur », ici le Gb3, permet d'amorcer la synthèse. Le Gb3 pénètre dans le cytoplasme grâce à la perméase LacY d'*E. coli*. Par contre, il ne doit pas être métabolisé, ce qui requiert l'inactivation de l' α -galactosidase endogène MelA. Le substrat de LgtD, l'UDP-GalNAc, n'étant pas produit par *E. coli*, le gène *gne* de *Campylobacter jejuni* codant pour une UDP-GlcNAc-4-épipimérase capable de transformer l'UDP-GlcNAc en UDP-GalNAc a été introduit. Les GTs agissent successivement pour ajouter les sucres, la GT LgtD branchant le GalNAc avant le GlcNAc car son affinité est plus forte pour le GalNAc.

La production en fermenteur a permis d'obtenir quelques g/L de GloboH. L'antigène, couplé à une protéine porteuse, est actuellement en cours de tests cliniques en tant que vaccin anti-cancéreux. Le couplage nécessite une modification de l'OS pour le rendre plus réactif. Différents groupes activateurs peuvent être associés. Leur importation par *E. coli* permettra à la Bactérie de modifier l'OS *in vivo*.

Un autre groupe d'oligosaccharides, les HMOs (*Human Milk Oligosaccharides*), présents dans le lait maternel sous forme libre ou fixés sur des protéines (mucines), assure très vraisemblablement une protection des nourrissons vis-à-vis de Bactéries pathogènes ou de virus. Ils constitueraient une sorte de leurre sur lesquels les pathogènes se fixeraient, évitant l'infection des cellules intestinales du nourrisson. Les HMOs n'étant pas présents dans le lait de vache, d'importantes industries agroalimentaires cherchent actuellement à « humaniser » ce lait, pour prévenir des gastro-entérites chez des enfants en bas âge non allaités naturellement. Le challenge est important car ces HMOs sont très nombreux et difficiles à caractériser !

2.3 Le mévalonate/DMAPP, un précurseur à large spectre

En pharmacopée, la plupart des molécules actives sont extraites de plantes. Celles-ci s'y trouvent parfois à de très faibles concentrations, ce qui exige de partir d'une masse importante de végétal pour les obtenir. De plus la culture des plantes peut subir un certain nombre d'aléas néfastes à l'approvisionnement. L'ingénierie métabolique semble être une opportunité pour faire produire ces principes actifs par des micro-organismes dont la culture est maîtrisée, et avec un rendement pouvant éventuellement dépasser celui des plantes. Ces dernières années, deux molécules présentant un intérêt en santé humaine ont fait l'objet d'études particulières, le lycopène et l'artémisinine, produites naturellement, respectivement, par la tomate et l'armoise annuelle (*Artemisia annua*). Leurs voies de biosynthèse ont un précurseur commun, le mévalonate, lui-même ensuite transformé en diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP), conduisant aux terpènes et aux stéroïdes (voir Figure 9.9A). De très nombreuses molécules dérivent de ces composés, avec des applications en agro-alimentaire, énergie, santé. Les terpènes (C_5H_8) sont formés à partir d'isopentényl-pyrophosphate (IPP), par réaction avec une molécule amorce, ici le DMAPP. C'est pourquoi il a semblé primordial de s'intéresser à la voie métabolique du mévalonate, en cherchant à l'optimiser chez *E. coli*, qui produit naturellement du mévalonate, mais à un niveau faible. Parmi les organismes possédant une voie de biosynthèse de mévalonate plus performante se trouve *S. cerevisiae*. En effet, le mévalonate est un précurseur de l'ergostérol, un composant constitutif de sa membrane lipidique, donc abondant. Les enzymes responsables de cette synthèse à partir de l'acétyl-coA ont été identifiées chez *S. cerevisiae* (voir Figure 9.9A). Les gènes correspondants de ce micro-organisme ont été placés sur un plasmide multicopie afin d'obtenir une surexpression chez *E. coli*. La concentration intracellulaire du mévalonate est en effet fortement augmentée par rapport au niveau de base. Quatre autres enzymes nécessaires pour produire le DMAPP à partir du mévalonate ont été obtenues à partir de *S. cerevisiae* et d'*E. coli* (voir Figure 9.9B).

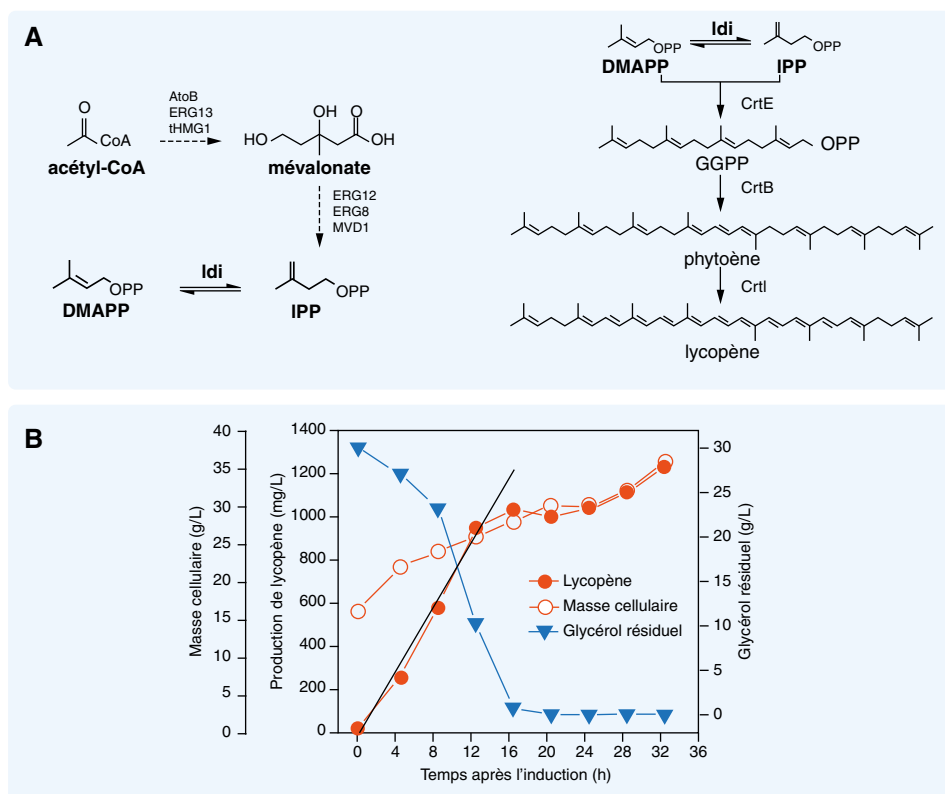


Figure 9.9 – Production de lycopène chez *Saccharomyces cerevisiae* (d'après Zhu et al., 2015)

A. Voies de production de DAMP, IPP et lycopène (enzymes d'*E. coli* avec les AtoB, Idi), *S. cerevisiae* (ERG13, tHMG1, ERG12, ERG8, MVD1), *Pantoea ananatis* (CrtE, CrtB, CrtI). **B.** Production de lycopène en fermenteur.

a. Production de lycopène, un anti-oxydant

Le lycopène est un pigment naturel synthétisé par des plantes et des micro-organismes. Sa fonction principale est d'absorber la lumière et de protéger les cellules de dommages photo-oxydatifs. En santé humaine, il peut donc agir comme anti-oxydant en piégeant et en désactivant les radicaux libres et les formes réactives de l'oxygène (voir Chapitre 5), ce qui lui confère un intérêt pour la prévention de certains cancers. Il peut être extrait de la tomate, synthétisé chimiquement, ou obtenu par fermentation par le champignon *Blakeslea trispora*. Ce dernier en produit naturellement mais sa croissance est lente, ce qui handicape par conséquent la productivité ; or la demande de lycopène est en nette augmentation.

Des tentatives de synthèse par ingénierie par différentes voies métaboliques ont été amorcées chez *E. coli*, et c'est finalement la voie « mévalonate » qui s'est révélée la plus efficace. Dans un premier temps, le mévalonate était fourni à la Bactérie ; puis, l'optimisation

de sa biosynthèse (voir ci-dessus) a permis de cultiver la souche en milieu minimum sur glycérol pour obtenir les deux molécules IPP et DMAPP. Les autres enzymes de la voie métabolique conduisant au lycopène proviennent de la Bactérie *Pantoea ananatis* (une Protéobactérie), autre producteur de lycopène. Grâce à une bonne surexpression des enzymes, une production supérieure à 1 g/L de lycopène a pu être obtenue en bioréacteur de 5 L avec cette souche. Le passage à un fermenteur de 100 L a montré que le rendement était conservé, ce qui n'est pas toujours le cas. De plus, des améliorations sont encore possibles : l'expression de certaines enzymes (CrtB, permettant la transformation du GGPP en phytoène) pourrait être stimulée ; la stabilité de la souche devra être renforcée ; en outre, les gènes plasmidiques pourront être intégrés en multicopies dans le chromosome. D'autres essais d'ingénierie ont également été réalisés chez la levure, qui présente le grand avantage d'avoir le statut « GRAS » (*Generally Recognised As Safe*), ce qui n'est pas le cas d'*E. coli*, qui produit naturellement des endotoxines. Les résultats récemment obtenus ont nécessité des investigations métaboliques assez poussées et sont encourageants.

Ainsi, les bases semblent désormais assez solides pour envisager la production de lycopène par fermentation selon un procédé compétitif vis-à-vis de la synthèse chimique ou de l'extraction à partir de la tomate. De plus, d'autres composés présentant un intérêt appliqué s'obtiennent à partir des mêmes précurseurs ; ces travaux constituent donc une avancée plus générale dans le domaine de la synthèse des terpénoïdes.

b. Production d'artémisinine, un antipaludique

Le paludisme, dû au parasite *Plasmodium falciparum* transmis par un moustique, est une maladie très répandue qui cause une mortalité importante dans les pays de l'hémisphère sud (voir Chapitre 1). Les médicaments antipaludiques trouvent actuellement leur limite, à l'instar des antibiotiques contre les bactéries pathogènes, en raison de l'émergence de résistances. C'est pourquoi des chercheurs se sont récemment intéressés à une thérapie vieille de deux millénaires, particulièrement en Chine, à savoir des décoctions d'armoise annuelle, *A. annua*. Le principe actif, l'artémisinine, une lactone sesquiterpénique (voir Figure 9.10A), est produit en faible quantité par la plante : une tonne de feuilles permettent l'extraction d'environ un kilogramme d'artémisinine pure ! De plus, les productions fluctuent en fonction des aléas climatiques. La synthèse chimique est particulièrement ardue, ce qui explique que des recherches aient été menées depuis une dizaine d'années sur la possibilité de la produire par ingénierie métabolique chez *E. coli* ou chez la levure. Deux étapes enzymatiques conduisent, à partir du couple DMAPP + IPP (voir Figure 9.9A), à l'amorphadiène, un précurseur de l'artémisinine. Une enzyme présente chez *E. coli*, la farnésyl pyrophosphate synthase (FPP, codée par le gène *ispA*) réalise la première étape, la fusion DMAPP – IPP, pour former le farnésyl-pyrophosphate. La deuxième étape est réalisée par l'amorphadiène synthase de l'armoise. Le gène de cette enzyme (*aps*) a été optimisé au niveau de ses codons pour permettre une bonne expression chez *E. coli*, et les deux gènes *ispA* et *aps* ont été surexprimés chez la souche d'*E. coli* surproductrice de mévalonate (voir Figure 9.9A). L'amorphadiène est effectivement produite, mais à un niveau insuffisant pour une exploitation industrielle (0,5 g/L), l'un des facteurs limitants

étant la trop faible concentration de mévalonate endogène. Des enzymes plus efficaces pour améliorer le flux vers ce métabolite ont été trouvées chez *Staphylococcus aureus*. Ainsi, les gènes de levure *erg13* et *tHMG1* ont été remplacés par leurs orthologues bactériens. De plus, les conditions de culture ont été optimisées : les concentrations d'azote ammoniacal ont été maintenues à un faible niveau, et la production a été réalisée dans un réacteur biphasique, ce qui permet d'éviter la perte d'amorphadiène par évaporation. Ce dernier ajustement consiste à ajouter à la culture 20 % de volume d'un solvant organique, le dodécane ; celui-ci, peu volatile et peu toxique pour *E. coli*, va retenir l'amorphadiène en raison de son hydrophobicité. Ainsi, la production a pu atteindre 28 g/L.

L'amorphadiène est purifiée puis traitée chimiquement pour donner de l'artémisinine. Il s'agit d'une suite de réductions et d'oxydations dont le rendement et la spécificité (régio- et stéréospécificité) sont loin d'être optimaux. Chez la plante, ces réactions sont effectuées par plusieurs cytochrome-oxydases, malheureusement inactives chez *E. coli*. On a donc cherché à mimer l'activité d'une de ces enzymes par un cytochrome P450 bactérien, donc mieux exprimé chez cet hôte, pour produire l'acide artémisinique-11S-époxyde, dont la modification chimique en amorphadiène ne pose pas de problème particulier (voir Figure 9.10B). Il s'agit du P450 de *Bacillus megaterium* (P450_{amo}), dont le gène a cependant dû subir une mutagenèse dirigée au niveau de son site actif afin de pallier l'encombrement

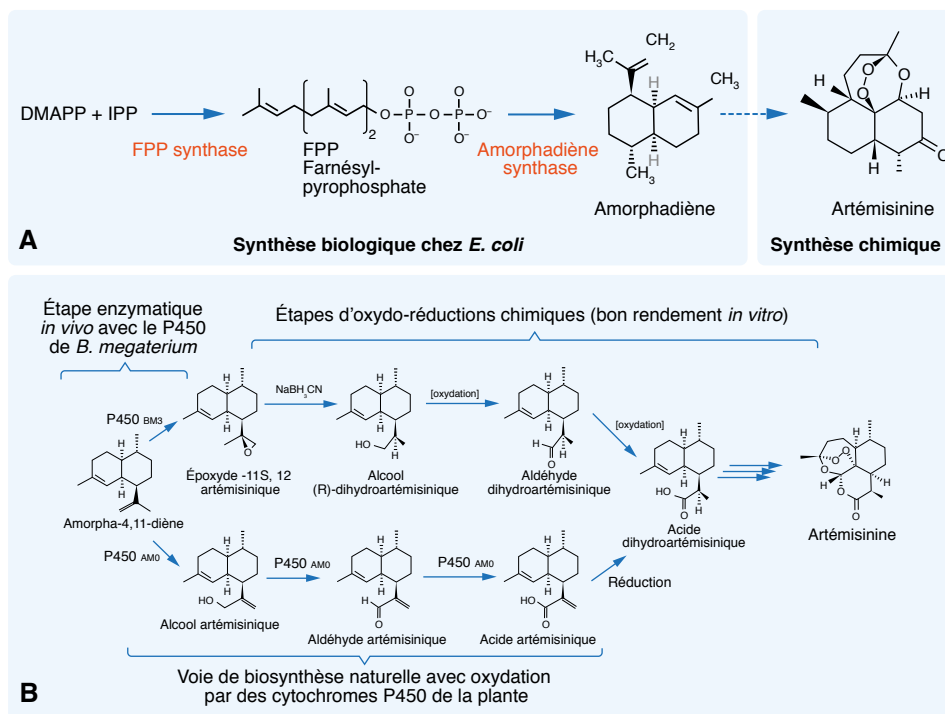


Figure 9.10 – Production d'artémisinine chez *E. coli* (d'après Dietrich J.A. et al., 2009)

A. Voie de synthèse. **B.** Production hémisynthétique.

stérique de l'amorphadiène. Ainsi, après surexpression de l'ensemble de ces enzymes, l'acide artémisinique-11S-époxyde a pu être obtenu. Le niveau est cependant assez faible (250 mg/L), principalement en raison de la toxicité du cytochrome P450.

Un travail similaire a été réalisé chez la levure, avec plus de succès. Différentes cytochrome oxydases d'*A. annua* ont pu être exprimés chez *S. cerevisiae*, ce qui a permis d'accéder à l'acide artémisinique. La production est analogue à celle de l'amorphadiène chez *E. coli* (25 g/L de culture) mais le traitement chimique final est facilité. Une usine en a produit environ cinquante tonnes en 2014, ce qui représente cent vingt-cinq millions de traitements antipaludiques.

Fait intéressant, on a pu montrer que l'artémisinine est aussi active contre d'autres parasites, et même contre certains cancers (sein et poumon) avec moins d'effets secondaires que la chimiothérapie classique. Cela ne fait donc que renforcer l'intérêt pour cette molécule, et pour l'optimisation de sa méthode de production. Le processus biosynthétique reste toutefois en concurrence avec la production naturelle, par extraction à partir de la plante.

2.4 De l'hydrocortisone grâce à la levure

L'hydrocortisone (ou cortisol) est une hormone de la famille des stéroïdes (voir Figure 9.11) qui a de nombreuses fonctions dans l'organisme. Cette famille de molécules est largement utilisée en santé humaine comme agents anti-inflammatoires, contraceptifs, anticancéreux et anti-vieillessement. Dans les années 1950, la production d'hydrocortisone était réalisée par un procédé chimique nécessitant 40 étapes, donc très laborieux et très coûteux. Il a pu être ramené à 9 étapes grâce à la mise au point d'une héli-synthèse utilisant des acides biliaires ou des phytostérols comme point de départ, mais associant tout de même une étape de bioconversion avec un micro-organisme naturel. Ce processus, faisant encore principalement appel à la chimie fine, restait relativement complexe, coûteux et générateur de sous-produits. On a donc cherché à produire cette hormone par voie totalement biologique. Cela a été réalisé en introduisant chez *S. cerevisiae* des gènes provenant de différents organismes, et en détournant ou reprogrammant certaines étapes métaboliques de ce micro-organisme. Les auteurs de ce travail sont partis du constat que l'ergostérol, présent naturellement dans la membrane de la levure, pouvait servir de précurseur à la synthèse de l'hydrocortisone. Ce sont en effet des molécules très proches qui se distinguent majoritairement par leur niveau d'oxydation. Chez les mammifères comme chez la levure, ces oxydations sont majoritairement catalysées par des cytochromes P450, enzymes très nombreuses et présentant chacune une spécificité de substrat et une régiospécificité. La difficulté fut donc d'identifier des enzymes présentant les bonnes spécificités et capables d'être exprimées chez la levure. De bonnes candidates furent trouvées chez des organismes aussi divers que l'Homme, le bœuf et une plante, *Arabidopsis thaliana*. De plus, comme les P450 ont besoin de protéines d'oxydoréduction associées qui leur fournissent des électrons, il fallut introduire des P450 réductases. Les gènes des différentes protéines sélectionnées ont été soit clonés sur des plasmides, soit intégrés au génome par recombinaison

homologue, et soumis à une régulation stricte par manipulation de leur promoteur. La souche recombinante produit en effet de l'hydrocortisone, mais aussi des molécules intermédiaires ou indésirables résultant d'une spécificité insuffisante des enzymes introduites ou de l'activité parasite d'enzymes endogènes. De fait, les premiers essais ont fourni un mélange de stéroïdes dans lequel l'hydrocortisone était sous-représentée. Des améliorations ont donc été apportées en inactivant certains gènes de *S. cerevisiae*. D'autres réglages affectant la régulation transcriptionnelle d'autres gènes ont permis d'orienter le flux métabolique dans la direction souhaitée. En définitive, la souche optimisée produit au moins 10 mg/L d'hydrocortisone, qui devient le stéroïde majoritaire (70 %).

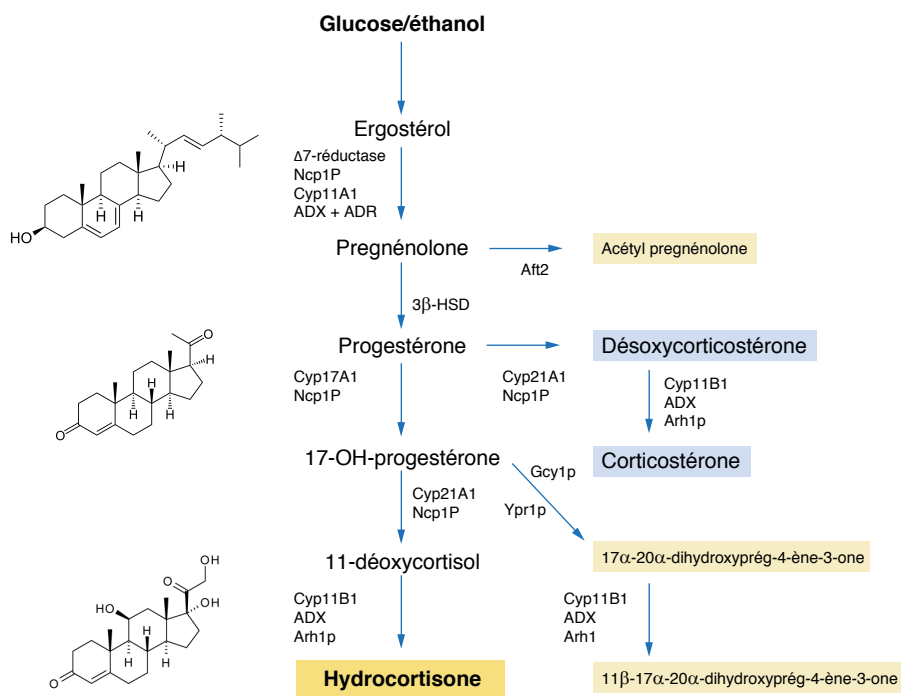


Figure 9.11 – Production d'hydrocortisone par *Saccharomyces cerevisiae* (d'après F.M. Szczebara et al., 2003)

La réalisation de la biosynthèse totale de stéroïdes et en particulier de l'hydrocortisone par un micro-organisme à partir de sources de carbone simples (alcool, sucre) et d'oxygène représente une avancée décisive tant en matière de compétitivité industrielle que de développement de nouveaux processus de synthèse respectueux de l'environnement. Ce saut technologique majeur a été rendu possible en particulier par l'accumulation d'informations sur la séquence du génome de nombreuses espèces, micro-organismes, plantes et mammifères. Il illustre d'autre part l'efficacité d'une collaboration entre organismes de recherche fondamentale, en l'occurrence le CNRS,

partenaires académiques et industriels. La conséquence fut la construction en 2016 d'une usine qui produit environ cent tonnes d'hydrocortisone par an.

2.5 Production d'opiacés : collaboration *E. coli* - *S. cerevisiæ*

Les substances analgésiques sont largement utilisées en médecine occidentale contre la douleur. La plupart d'entre elles sont extraites ou dérivées de l'opium, extrait du pavot *Papaver somniferum*, et agissent sur les récepteurs opiacés de l'organisme. On en distingue deux catégories : les dérivés naturels, les opiacés (morphine, codéine, thébaïne...) et les dérivés synthétiques, les opioïdes (héroïne, méthadone) qui induisent des effets similaires à ceux des opiacés. Les opiacés font partie de la famille des alcaloïdes benzylisoquinoléines (BIA), synthétisés à partir de la tyrosine. Pour former la morphine à partir de ce squelette BIA, les enzymes catalysent des couplages carbone-carbone, des réductions NADPH-dépendantes, des hydroxylations, des acétylations, des méthylations et des déméthylations.

La teneur en alcaloïdes du pavot est faible, et sa culture, en outre, est tributaire des conditions climatiques, de facteurs sociaux et politiques liés à son utilisation potentiellement illicite. Des études ont été réalisées pour permettre la production de ces substances par des micro-organismes faciles à manipuler tels qu'*E. coli* ou *S. cerevisiæ*, en combinant des enzymes microbiennes et végétales. Comme dans les exemples précédents, les points clefs sont l'obtention d'une quantité non limitante de précurseurs et d'enzymes actives chez l'hôte choisi, ainsi que l'élimination des réactions indésirables. De fait, aucune souche microbienne capable de satisfaire à une production industrielle d'opiacés n'a encore été obtenue. Cependant l'obtention de métabolites intermédiaires ou de produits finaux à partir de précurseurs par différentes souches représente un pas important.

a. Production de thébaïne chez *E. coli*

La **thébaïne**, chimiquement proche de la codéine et de la morphine, peut servir de précurseur de synthèse de la morphine. Sa biosynthèse complète a été obtenue par étapes réparties sur une batterie de souches d'*E. coli* (voir Figure 9.12). La production de tyrosine, le précurseur de base, a été optimisée, entre autres en inactivant le répresseur TyrR de la voie de biosynthèse de cet acide aminé. La tyrosine est convertie en dopamine (DOPA) grâce à deux réactions enzymatiques : une hydroxylation par la tyrosinase pour donner la L-DOPA, convertie en dopamine par la DOPA-décarboxylase. La dopamine est fournie à une autre souche d'*E. coli* synthétisant une monoamine oxydase (MAO), permettant la production de tétrahydropapavéroline (THP). Une troisième souche recombinante produit la R-réticuline, et une dernière, la thébaïne. Ce procédé est complexe mais il permet d'éviter des réactions indésirables. Ainsi, la tyrosinase dégrade le THP, et ne peut donc pas être exprimée dans la même souche que la MAO. D'autre part, pour une raison encore inconnue, la R-réticuline ne peut être produite dans la même souche que la thébaïne. Le rendement final est faible (2 mg/L) mais bien supérieur à ce qui avait été obtenu chez la levure.

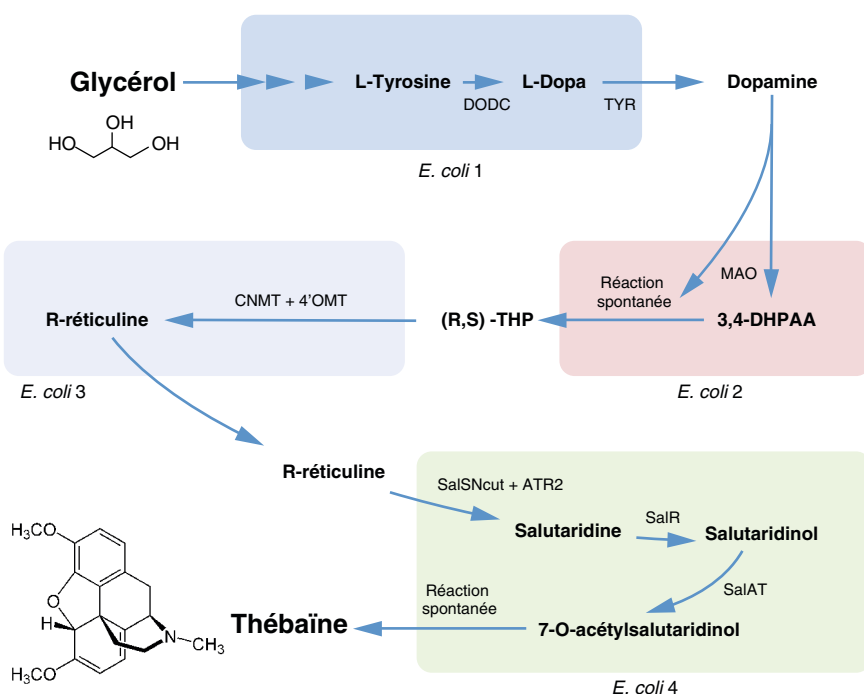


Figure 9.12 – Production d'opiacés chez *E. coli*.
(d'après Nakagawa A. et al., 2016)

ATR2, NADPH-cytochrome P450 réductase 2 ; CNMT, coclaurine N-méthyltransférase ; DODC, dopa-décarboxylase ; MAO, monoamine oxydase ; SalSNcut, salutaridine-N-tronquée synthase ; SalR, salutaridine réductase ; SalAT, salutaridinol acétyltransférase ; TYR, tyrosinase ; 3,4-DHPAA, 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde ; 4'OMT, 30-hydroxy-N-méthylcoclaurine,4'-O-méthyltransférase

b. Production de morphine chez la levure

La levure prend alors le relais pour la production d'opiacés. La biosynthèse de la **morphine** à partir de la thébaïne est catalysée par trois enzymes de *P. somniferum*, la thébaïne 6-O-déméthylase (T6ODM), la codéine O-déméthylase (CODM) et la codéinone réductase (COR) (voir Figure 9.13). Cette synthèse se fait selon deux voies distinctes dans le pavot (i et ii). Ces enzymes végétales sont capables de catalyser les transformations des opiacés chez la levure. Cependant, chez ce micro-organisme, une voie nouvellement identifiée (iii) produit deux isomères supplémentaires, la néopine et la néomorphine. Cette ramification dirige donc le flux en partie vers ces deux sous-produits indésirables. De plus, les niveaux d'opiacés détectés par spectrométrie de masse sont faibles (0,2 mg/L de morphine). Plusieurs optimisations ont donc été nécessaires pour augmenter la production de morphine. (a) Afin d'augmenter l'activité de la COR dans la levure, plusieurs isoformes de cette enzyme ont été testées. L'une d'entre elles

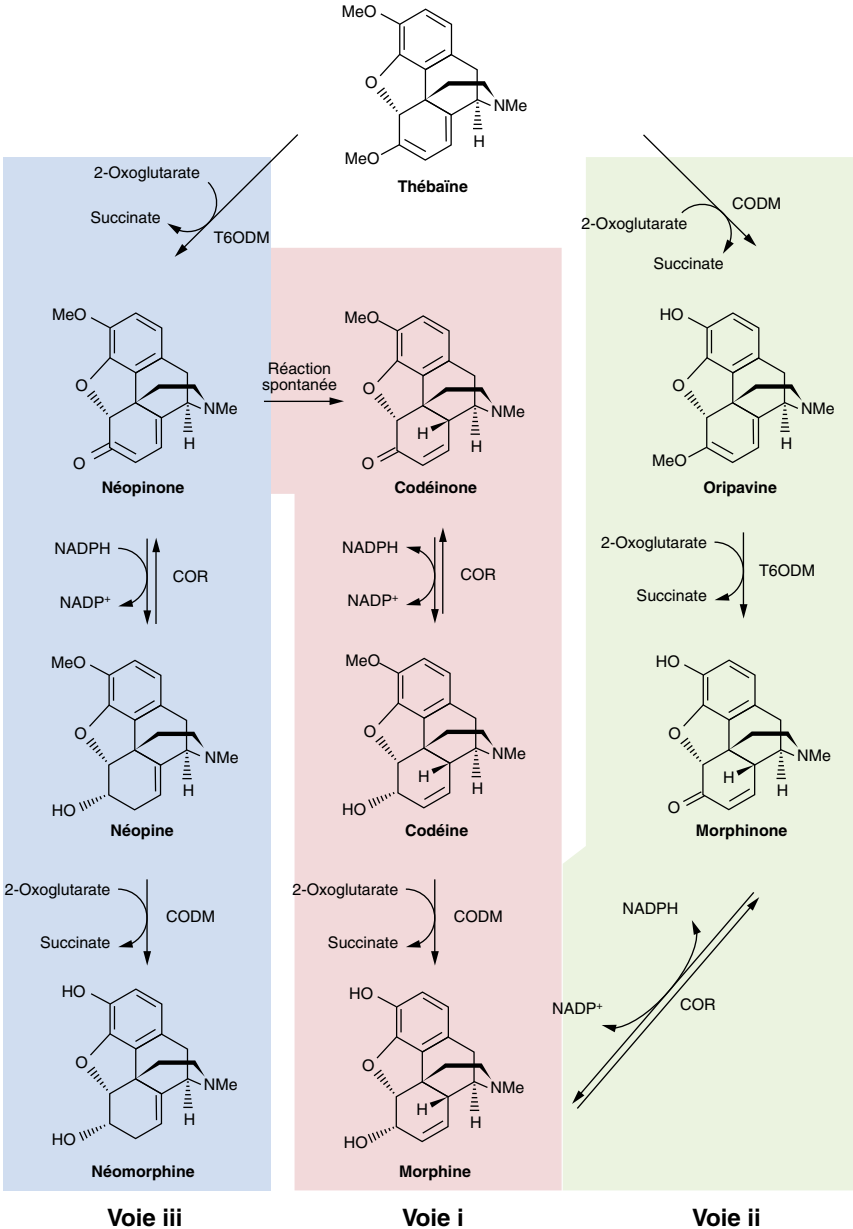


Figure 9.13 – Production d’opiacés chez *Saccharomyces cerevisiae*
(d’après K. Todey et al., 2014)

T6ODM, thébaine-6-O-déméthylase ; CODM, codéine-O-déméthylase ; COR, codé-
inone réductase (enzymes du pavot *P. somniferum*)

(COR1.3) a été sélectionnée sur la base d'une affinité plus élevée pour la codéinone. (b) Par ailleurs, le milieu de culture a été amélioré. Le 2-oxoglutarate, qui est un cosubstrat clef de la T6ODM et de la CODM dans les voies (i), (ii) et (iii), s'est avéré limitant dans la voie de la biosynthèse de la morphine. En effet, il a un rôle d'accepteur d'oxygène dans la déméthylation oxydative par ces enzymes de la thébaïne et de la codéine, respectivement. L'addition de 2-oxoglutarate a permis d'augmenter le taux de morphine d'un facteur 10 (soit 2,5 mg/L). (c) Certaines réactions catalysées par l'enzyme COR, dont la conversion de la codéine vers la codéinone, sont réversibles. Le flux vers la codéine, et par conséquent vers la morphine, pourrait être augmenté en optimisant les niveaux des enzymes impliquées. Le ratio des enzymes T6ODM, COR et CODM a été modifié pour obtenir une proportion 2/1/3, respectivement. La concentration de morphine produite a ainsi été portée à 5,2 mg/L. (d) Enfin, un aménagement parut nécessaire pour diminuer la voie vers la néomorphine. La cause principale de la ramification de la morphine vers la néomorphine est la trop faible vitesse de transformation spontanée de la néopinone (précurseur de la néomorphine) en codéinone (précurseur de la morphine). Une séparation spatiale de ces molécules a permis de laisser plus de temps à la néopinone pour se réarranger spontanément en codéinone : l'enzyme COR a été fusionnée à une étiquette de localisation vers le réticulum endoplasmique tandis que l'enzyme T6ODM est restée cytoplasmique. Cette compartimentation a permis d'augmenter la conversion de néopinone en codéinone, ce qui a entraîné un flux deux fois plus important vers la morphine.

c. Vers la synthèse d'opioïdes par une seule souche microbienne ?

Plusieurs souches d'*E. coli* sont donc requises pour obtenir la thébaïne, puis une souche de levure est ensuite nécessaire pour produire la morphine à partir de ce précurseur. Les processus industriels utilisant plusieurs souches sont difficiles à mettre en œuvre. C'est pourquoi des tentatives ont été menées pour obtenir une souche unique capable de synthétiser des dérivés d'opiacés à partir d'une source de carbone simple. Ceci a été réalisé chez la levure : pas moins de vingt-trois gènes provenant de la levure, de plantes (*Papaver somniferum*, *Papaver bracteatum*, *Coptis japonica*, *Eschscholzia californica*), du rat (*Rattus norvegicus*) et d'une Bactérie (*Pseudomonas putida*) ont été introduits chez *S. cerevisiae*. L'hydrocodone, un opioïde très utilisé en thérapie, a pu être obtenu mais à une concentration extrêmement faible (de l'ordre du µg/L), alors qu'un procédé rentable demande une concentration d'environ 5 g/L ! Cela traduit bien l'énorme travail d'investigation qui est nécessaire pour parvenir à la synthèse d'un composé complexe par un seul micro-organisme.

3 Des approches innovantes

a. Amélioration de la production de protéines recombinantes

Parmi les **protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique** l'insuline, l'interféron, l'hormone de croissance sont les premiers cas de production chez *E. coli* et la levure. De nombreuses souches et de nombreux vecteurs ont été construits, ce qui a rapidement permis

d'obtenir ces protéines avec un bon rendement. Cependant, leur synthèse n'a pas été sans poser quelques problèmes : mauvais repliements dans le cytoplasme du micro-organisme, pont disulfure absent ou illégitime, glycosylation absente ou différente. Plusieurs stratégies ont permis d'améliorer le repliement au cas par cas : expression contrôlée ou à température modérée, co-expression de chaperonines (pour assister le repliement) ou de disulfide isomérase (pour former des ponts disulfures corrects), utilisation de souches mutantes à cytoplasme oxydant, expression sous forme de protéine de fusion, etc. Grâce à ces ajustements, beaucoup de protéines recombinantes ont pu être produites dans des conditions satisfaisantes. À cet égard, les levures *S. cerevisiae* ou *Pichia pastoris* constituent des hôtes intéressants car en tant qu'Eucaryotes, ils sont plus adaptés à l'expression de protéines eucaryotes. De plus, leur système de sécrétion leur permet d'exporter les protéines recombinantes, ce qui constitue un sérieux avantage pour leur purification. À titre d'exemple, le vaccin recombinant contre l'hépatite B est produit chez la levure et est exploité commercialement. Cependant, même les micro-organismes eucaryotes trouvent leurs limites pour la synthèse de certaines protéines, comme les anticorps, et leur système de glycosylation (absent ou différent) peut se révéler néfaste soit pour l'activité de la protéine, soit pour son immunogénicité. Ainsi, la plupart des anticorps thérapeutiques conçus par génie génétique sont produits par des cellules eucaryotes de mammifères (souvent des cellules de Hamster CHO). Bien que leur expression soit assez faible et coûteuse, leur repliement est correct et leur glycosylation est davantage conforme à celle d'origine.

b. L'évolution dirigée des protéines

Les protéines ont évolué naturellement au cours des millions d'années antérieures, pour s'adapter à leurs environnements et devenir performantes au sein de leurs cellules hôtes. Ces propriétés naturelles peuvent cependant ne pas concorder avec les contraintes industrielles, en particulier en ce qui concerne leur surexpression, leur régulation, leur activité dans des conditions physico-chimiques particulières (température, pH, présence de solvant organique, etc.). Depuis quelques décennies, on a donc cherché à imposer de nouvelles pressions de sélection aux protéines afin de leur faire acquérir de nouvelles propriétés. Cela passe par une étape de mutagenèse aléatoire (réalisée bien souvent par une amplification PCR infidèle, c'est-à-dire faisant des erreurs d'insertion de nucléotides), par la construction et le criblage de banques de milliers de mutants dans des micro-organismes appropriés. Les clones sélectionnés peuvent subir plusieurs cycles, ce qui représente une sorte **d'évolution dirigée *in vitro* des protéines**, qui mènera progressivement à leur amélioration dans le sens souhaité. Le crible est une étape clef de l'évolution dirigée, spécifique pour chaque relation activité/protéine/hôte. Le crible le plus puissant est la sélection directe. Une alternative réside dans la conception de substrats chromogènes donnant lieu à un produit coloré. Enfin, plus laborieusement, on peut déceler la molécule recherchée par des méthodes classiques (chromatographies, RMN, spectrométrie de masse). Il est aussi possible de concevoir des cribles « intelligents » pour éviter des analyses fastidieuses, surtout pour des protéines n'ayant pas d'activité facilement testable. À titre d'exemple, voici un crible permettant d'améliorer la solubilité de

protéines recombinantes : leur gène peut être fusionné à celui d'une protéine « marqueur » (en l'occurrence la GFP^s ou ses dérivés, décelables grâce à leur fluorescence). Une protéine recombinante se repliant mal dans le cytoplasme du micro-organisme producteur, donc inutilisable, va influencer le repliement de GFP, provoquer son agrégation et par conséquent inhiber sa fluorescence. Les « bons » clones seront donc aisément identifiables. La modification de quelques acides aminés sur la protéine recombinante, grâce à une mutagenèse aléatoire sur le gène correspondant, peut suffire pour qu'elle ne se s'agrège pas.

L'évolution dirigée concerne aussi des protéines dépourvues d'activité enzymatique, majoritairement destinées à interagir avec d'autres protéines ou d'autres molécules. Les anticorps en sont les exemples les plus marquants, mais on peut également citer les lectines (fixant les sucres), les « *affibodies* » (protéines affines artificielles), etc. L'évolution dirigée de ces protéines visera principalement l'amélioration de leur spécificité et de leur affinité pour une cible. Plusieurs méthodes sont disponibles, celle de « *Phage display* »^s étant la plus répandue. Les propriétés de nombreux anticorps ont pu ainsi être améliorées. La mutagenèse intensive des boucles d'un anticorps peut aussi permettre d'obtenir un anticorps d'une certaine spécificité sans avoir besoin d'immuniser un animal avec l'antigène. Une autre solution, plus aléatoire et moins pratiquée, est l'exposition des protéines d'intérêt à la surface du micro-organisme producteur par fusion avec une de ses protéines membranaires (*Cell-display*).

c. Ingénierie des Bactéries anti-cancer

L'utilisation de **Bactéries** pour lutter **contre le cancer** découle des travaux de W. Coley au siècle dernier, qui a montré que certaines infections bactériennes ont un effet bénéfique sur la régression de cancers. Les cellules cancéreuses, bien que présentant des antigènes spécifiques, sont peu reconnues par le système immunitaire, qui a tendance à les tolérer. L'injection dans l'organisme malade de certaines Bactéries qui auront tendance à se localiser dans les tumeurs renforce la réaction inflammatoire et potentialise le rejet. Bien que cette approche soit tombée en désuétude pendant quelques décennies, elle reprend de la vigueur grâce aux nombreux travaux venus compléter et améliorer les premières tentatives. Un élément déterminant le choix des Bactéries réside dans leur capacité à se développer dans les conditions d'anoxie qui prévalent la plupart du temps dans les tumeurs solides. Les bactéries disposant d'un métabolisme anaérobie, obligatoire ou facultatif, prolifèrent davantage auprès des cellules tumorales que des cellules saines. Cette croissance site-spécifique est favorisée par la très faible réaction immunitaire et la forte disponibilité en métabolites dans cet environnement. Les Bactéries testées jusqu'ici, *Clostridium*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *E. coli*, *Mycobacterium*, etc., ont montré un tropisme insuffisant ; il est donc apparu nécessaire d'augmenter leur spécificité d'interaction, et donc leur développement majoritairement au sein des tumeurs. De plus, ces Bactéries étant conçues pour le ciblage d'un marqueur tumoral, leur titre initial peut être beaucoup moins élevé pour atteindre la même concentration au site voulu. Ceci est particulièrement important car même si ces Bactéries ont été atténuées du point de vue de leur virulence, l'infection entraîne une certaine toxicité qu'il faut juguler.

Il a récemment été possible d'exposer un anticorps ciblant un marqueur tumoral à la surface d'*E. coli* par fusion avec une protéine transmembranaire servant de support. Ces bactéries modifiées se sont avérées capables de reconnaître *in vivo* le déterminant antigénique correspondant exposé à la surface de cellules de mammifères. De même, on a construit une souche d'*E. coli* présentant à sa surface un peptide dont le récepteur (intégrine) est surexprimé dans de nombreux cancers. Son injection a permis une régression plus rapide de cancers « xénogreffés » chez la souris. Certaines souches bactériennes ont fait l'objet de modifications génétiques ciblées afin de les rendre plus efficaces : expression de cytotoxines (azurine), d'enzymes capables d'activer des prodrogues (cytosine désaminase), d'agents immuno-modulateurs (TNF).

Bien que la médecine actuelle soit très réticente pour utiliser des Bactéries atténuées comme traitement thérapeutique antitumoral, il n'est pas impossible que cette stratégie – au demeurant peu coûteuse ! – fasse son chemin dans les esprits.

d. Bientôt l'intelligence artificielle en biotechnologie ?

L'**intelligence artificielle** (IA) fait son apparition dans différents secteurs économiques et la biotechnologie n'y échappe pas, ouvrant la voie de la biologie synthétique. L'ingénierie métabolique est une thématique complexe qui dépend de nombreux paramètres, souvent difficiles à prédire, et nécessite donc de nombreux essais avant l'obtention du micro-organisme « champion » pour la production d'une molécule d'intérêt. Un cluster de start-up américaines s'intéresse actuellement à l'utilisation de l'IA pour **booster la biotechnologie**, accélérer les optimisations. Pour un micro-organisme de cinq mille gènes, les possibilités de mutations sont immenses et l'IA peut contribuer à les identifier plus facilement et rapidement. La première étape consiste à analyser les données bibliographiques sur le sujet d'intérêt, de façon automatisée, parmi toutes les revues scientifiques existantes, ce qui permet d'extraire de façon exhaustive les relations connues entre génotype et phénotype. Ensuite, toujours de façon automatisée, des robots très perfectionnés vont construire des variants de souches microbiennes à raison d'une mutation par cellule en fonction de l'analyse précédente, et ceux-ci seront testés pour l'amélioration de leur potentiel. L'ordinateur sera ensuite capable d'analyser lui-même les résultats et de concevoir de nouvelles expériences pour poursuivre de façon précise l'évolution de la souche. En outre, les expériences viseront à conserver la plupart des mutations bénéfiques ou neutres, au détriment de celles qui altèrent la croissance. L'IA devrait même permettre de faciliter la rédaction de l'article scientifique correspondant ! Cela n'en est qu'au stade expérimental et certaines étapes nécessitent bien sûr l'intervention humaine : en particulier, un goulet d'étranglement consiste à donner les bonnes directives au départ afin que l'auto-apprentissage puisse se dérouler correctement. Mais il est incontestable que l'exploration du génome microbien sera sur-multiplié grâce à cette assistance informatique et robotique. Reste que les chercheurs devront sans doute affronter une nouvelle frustration, celle de ne pas toujours comprendre l'impact des mutations, qui résulte d'un cheminement propre à l'IA...

Les points clefs du chapitre

- 1 Des mutants de régulation d'une souche de *Corynebacterium glutamicum* permettent une production massive de glutamate et de lysine.
- 2 L'ingénierie de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Zymomonas mobilis* conduit à la production d'alcool à partir de pentoses contenus dans une matière première non alimentaire, la lignocellulose.
- 3 De nouvelles voies métaboliques sont créées chez *E. coli* pour la production de substituts du pétrole.
- 4 Un nouvel antibiotique est découvert grâce à la mise au point d'une nouvelle méthode de culture.
- 5 Des oligosaccharides, enchaînement de sucres difficiles à produire chimiquement, sont synthétisés *in vivo* par une seule souche d'*E. coli* génétiquement modifiée.
- 6 Des molécules d'intérêt primordial pour la santé humaine, l'artémisinine (un antipaludique), l'hydrocortisone, la morphine, sont obtenues chez *E. coli* ou chez la levure par greffage de gènes provenant de différents organismes ou micro-organismes.
- 7 L'évolution dirigée pratiquée chez les micro-organismes peut modifier les propriétés d'enzymes ou de protéines de reconnaissance comme les anticorps.



Entraînez-vous

- 9.1 La souche de *Corynebacterium glutamicum* sécrète-elle naturellement le glutamate, la lysine ? Quelle solution a été appliquée pour améliorer cette sécrétion ?
- 9.2 Pourquoi est-il important de forcer les micro-organismes producteurs d'éthanol à utiliser également les pentoses comme source de carbone ?
- 9.3 En quoi l'utilisation de la glycérol déshydratase de *Clostridium butyricum* est-elle intéressante pour la production de 1,3-propane-diol ?
- 9.4 Pourquoi est-il plus prometteur de rechercher de nouveaux antibiotiques chez des souches non cultivables ?
- 9.5 Décrire la production d'oligosaccharides *in vivo* chez *E. coli* par des glycosyltransférases.
- 9.6 À quoi sert l'optimisation des codons d'un gène introduit chez un micro-organisme hétérologue ?
- 9.7 Décrire les étapes permettant de produire l'artémisinine, un antipaludique, par un seul micro-organisme.
- 9.8 Quelle molécule sert de base pour la biosynthèse de l'hydrocortisone chez la levure ?
- 9.9 Quelle méthodologie peut-on utiliser pour restaurer la solubilité d'une protéine surexprimée dans le cytoplasme bactérien ?
- 9.10 Comment peut-on améliorer le tropisme de Bactéries pour les tumeurs ?

Bibliographie (ouvrages didactiques et articles à caractère non spécialisé*)

Benkimoun P., « Une technique révolutionnaire permettrait de produire de la morphine à partir de sucre », *Le Monde*, 25/06/2015.

Bertrand J.C., Lebaron P., Normand P., Caumette P. et Matheron R., *Écologie microbienne : microbiologie des milieux naturels et anthropisés*, Presses universitaires de Pau et des Pays de l'Adour, 2011.

Bertrand J.C., Caumette P., Lebaron P., Matheron R., Normand P. et Sime-Ngando T., *Environmental microbiology: Fundamentals and applications: Microbial Ecology*, Springer 2016.

Claverie J.M. et Abergel C., « Les virus géants – État des connaissances, énigmes, controverses et perspectives », *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 1087-1096. (**)

Cézard F. *Biotechnologies*, Dunod, 2013.

Daubin V. et Abby S. « Les transferts horizontaux de gènes et l'arbre de la vie », *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 895-698. (**)

Duperron S., *Les symbioses microbiennes : associations au cœur du vivant*, Collection Écologie, ISTE, 2017.

Paolozzi L. et Liébart J.C., *Microbiologie : Biologie des Procaryotes et de leurs virus*, Dunod, 2015.

Silar Ph., *Protistes eucaryotes : Origine, évolution et biologie des microbes eucaryotes*, HAL Archives-ouvertes.fr. 2016. (**)

Pauthenier C. et Faulon J.C., « Techniques de l'ingénieur. Ingénierie métabolique et biologie de synthèse pour la chimie verte », *Techniques de l'ingénieur*, 10/02/2018.

Dessein R., Un nouvel antibiotique ? *Le Nouvel Observateur*, 11/01/2015.

Dauga C, Doré J. et Sghir A., « La diversité insoupçonnée du monde microbien », *Med Sci (Paris)*, 2005 ; 21 : 290-296. (**)

(*) Une bibliographie spécialisée est disponible sur la page associée à l'ouvrage sur le site dunod.com

(**) téléchargeable gratuitement

A

- acide lipotéichoïque 17
- acide N-acétylmuramique 17
- acide téichoïque 17
- acidité-alcalinité 48
- actine 20, 187
- activité de l'eau 42, 52
- acyl-homosérine-lactone 153
- adaptabilité 51, 53, 58, 64, 75, 78
- adhésine 182
- adhésion 52, 157, 178, 230
- ADN accessoire 96
- ADN codant 95
- ADN polymérase (ADN-Pol) 105
 - I 108, 126, 128
 - III 106, 107
 - processive 114
 - translèsionnelle 129
- ADN self/non-self (xénogénétique) 129-131
- ADN transformant (ADN - T) 122, 124
- ADN xénogénétique 130
- aérobic/anaérobic 47, 57, 62, 226, 243
- alcool déshydrogénase (ADH) 222
- algue nori 174
- allostérie 143
- amensalisme 50
- Amibe 27
- amorce 107
- anabolisme/catabolisme 68, 71
- analogue de base 119
- Anammox 60, 63
- ancêtre commun 11
- anneau coulissant 107
- anneau Z 81, 86
- antibiogramme 228
- antibiotique 17, 38, 52, 69, 86, 99, 102, 103, 115, 118, 121, 123, 154, 174, 176, 228
- anticodon 139
- antigène 103
- antigène glycotumoral 230
- antiport 69
- apoptose 183
- appareil de Golgi 24, 29
- appendice 20
- aptamère 146
- arbre phylogénétique/universel 5, 11
- Archæa* 12, 13
- Archée 6, 19, 125, 156
- archéovirus 193, 201
- ARN de transfert (ARNt)/chargé 138-140
- ARN messager (ARNm)/polycistronique 134, 135, 138
- ARN polymérase (ARN-Pol) 25, 135-137, 140, 145, 148, 203, 207, 211, 212
- ARN régulateur 147, 155
- ARN ribosomal (ARNr) 16S/18S 7, 10, 12
- artémisinine 234
- Ascomycète 36, 38
- Asgard 13
- aspartokinase K 220
- ATPase 69
- atténuation 145
- attractant 151
- auto-inducteur 153-156, 167
- autophosphorylation 155
- autotrophie 44, 62, 74
- auxotrophie 120, 220, 222, 224
- azote (métabolisme, source) 62

B

- Bacteria* 13
- bactérie anti-cancer 243
- bactérie atténuée 244
- bactérie modifiée 244
- bactériochlorophylle 74
- bactériophage 102, 193
 - tempéré 115, 123, 194, 204
 - T-pair 207

bactériophage-transposon Mu 115, 206
 bactériorhodopsine 74
 bactériovirus 201
 bactéroïde 162
 Baltimore (D.) 194
 Bergey's Manual 13
 bêta-lactame (β -lactame) 19, 38
 biocarburant 221
 bioconversion 236
 biodiesel 35
 biofilm 22, 155, 179, 182
 bioluminescence 153, 167
 biotine 220
 boîte de Pribnow 135
 boîte TATA 135, 140
 boues activées 62
 bourgeonnement 85
 brin lent, ou retardé/rapide 107
 brin transcrit/non codant 134
 γ -butyro-lactone 155

C

cancer 233, 236
 Cap (*Catabolite Activator Protein*) 144, 148
 capside 195
 capside icosaédrique/hélicoïdale/complexe 195, 207, 209
 capsule 20
 carbone 62
 carence 42, 78, 145
 cassette 103, 115
 catabolisme 71
 cathéter 157
 caudé 195
 Cdv 87
 cellules en gobelet 182
 cellulolyse 57
 cellulose 59, 69, 165, 222
 cercle roulant 109, 206, 210
 Champignon 13, 27, 57
 chaperon 137, 147, 224
 chargeur 107
 chimiotaxie 29, 84, 149, 151
 chitine 59
 chloroplaste 12, 13, 24

chromosome circulaire/linéaire 96, 108
 cible (séquence) 100
 cil 27, 31
 circadien 167
 cis dominant 143
 clé d'identification 6
 clonage 231
 clone 41
 codon 234
 codon initiateur 138
 codon stop, ou non-sens 138, 140
 colonie 29, 33
 colonisation 178
 coloration de Gram 14, 16
 commensalisme 50
 communauté 22, 41, 54, 170, 174
 communication intercellulaire /
 environnement 29, 38, 49,
 56, 230
 commutateur ribonucléique (*riboswitch*)
 145
 compaction 92
 compartimentation cellulaire 25, 203
 compétence 122, 151, 155
 compétition 50, 53, 174, 205
 complémentarité 139
 concatémère 206, 208, 210
 conjugaison inter-spécifique 125
 constitutif (mutant) 143, 144
 coopération 56
 corps fructifère 29
 couche S 20
 couplage transcription traduction 138, 141,
 145, 150
 courbe de croissance 75, 153
 Crick (F.) 93
 CRISPR 130, 202
 Crp (*Cyclic-AMP Receptor Protein*) 144
 cultivabilité/non cultivabilité 2, 74, 229
 culture en continu 226
 culture pure 6, 75, 153
 cycle
 biogéochimique 2, 73
 de l'azote 60
 de Calvin 73

de Krebs 73, 219
 de l'eau 181
 du carbone 58, 165
 cytochrome P450 235, 236
 cytochrome P450 réductase 236
 cytokine 183
 cytoplasme 20, 23, 138
 cytosquelette 20, 23, 26, 28

D

Dam (*Désoxy-Adénosine Méthylase*) 128, 148
 décantation 63
 décaténation 108
 décodage 140
 Delbrück (M.) 120
 dénitrification 63
 dialogue intercellules / environnement 15
 dialogue moléculaire 153, 162, 167
 diauxie 37, 144
 diderme 14
 différenciation 22, 29, 52, 78, 137, 149
 dimension géonomique 95
 dimorphisme cellulaire 84
 diploïde/diploïde partiel 37, 143
 distribution relative de l'abondance 54
 division 149
 asymétrique 35, 152
 synchrone 87
 divisome 81, 87
 DnaA 106, 109
 domaine phylogénétique 12
 domaine topologique 93
 dormance 51
 double brin (db) 199

E

eaux usées 61, 213
 écosystème 62
 ectosymbiote 165, 168
 effecteur 184
 élément génétique accessoire (EGA) 96
 élément génétique mobile (EGM) 64
 élongasome 81

élongation 137
 émetteur (du signal) 150
 encapsidation 203
 endocytose 28, 29, 202
 endonucléase 128, 129, 148
 endosphère 173
 endospore 149
 endosymbiose mitochondriale 13
 endosymbiote 162, 165
 énergie 3, 42, 69, 71
 enveloppe 195, 202
 enzyme dégradative 69, 71, 174
 enzyme de restriction 129
 épigénétique 31, 113
 épingle à cheveux 137
 épisome 98
 ergostérol 236
 ESCRT-III 87
 espace périplasmique 15
 espaceur 130
 espèce 5
 essentiel (métabolite) 162, 220
 éthanol 221
 étiologie 175
 étiquette (ciblage) 241
Eucarya 13
 eucaryovirus 193, 201
 évolution 10, 22, 53, 64, 100
 évolution dirigée 223, 226, 242
 excrétion 220, 221
 exonucléase 107
 exosquelette 16, 80
 extrémités
 cohésives 200
 liées par un pont protéique 200
 redondantes 199
 soudées 200

F

facteur F 98, 124, 143
 facteur sigma (σ) 135, 136, 153
 $\sigma 70$ (de ménage) 136
 féminisation 169
 fer 147, 174
 fermentation 45, 57, 165, 222

fermentation anaérobie 36
 feuille de trèfle 140
 fixation d'azote 60, 162
 flagelle 20, 27, 33, 84, 85, 151, 157,
 189, 201
 flore microbienne 170
 Fmet 138, 139, 140
 force du promoteur 136
 forme réactive de l'oxygène (FRO) 114, 147,
 233
 formyl-méthionine 138
 fourche de réplication 106
 fragment d'Okazaki 108, 128
 fréquence de mutation 114
 FRO 114, 147, 233
 FtsZ 20, 84, 87
 Fur 147, 148

G

galerie d'identification 7
 GATC 106, 119, 128, 148
 GC 96, 102
 gemmation 85
 gène de ménage 96
 génome mitochondrial 37
 génome viral
 circulaire 200
 linéaire 199, 200
 segmenté 199, 200, 213
 GFP 243
 GloboH 230
 glucose 144
 glutamate 218
 glycérol 225, 234
 glycolyse 73
 glycosylase 126
 glycosyltransférase (GT) 230, 231
 Gram⁻ 154
 Gram⁺ 155
 GRAS (*Generally Recognised
 As Safe*) 234
 GTA (*Gene Transfer Agent*) 125
 guild microbienne 41, 58
 gyrase 93, 117

H

habitat 42, 170
 halophile/halotolérant 47
 haploïde 37, 96, 129
 hélicase 106
 hélicité 108
 hémiméthylation 128
 hérédité cytoplasmique 29
 hérédité infectieuse intracellulaire 102
 hérédité non mendélienne 37, 147
 hétérotrophie 42, 59, 62
 Hfq 147
 Hfr (haute fréquence de recombinaison)
 124
 histidine kinase (HK) 150, 151
 HMOs (*Human Milk Oligosaccharides*) 232
 HO[•] 119
 holobionte 170
 holoenzyme 137
 homéostasie 75, 96
 homosérine-lactone 156
 horloge moléculaire 10
 hybridation ADN-ADN 6
 hyphe 86

I

île de pathogénicité 189
 île génomique 102
 îlot métabolique 102
 immunité 29, 33, 56, 130, 171, 205
 adaptative 183
 ETI 183
 héréditaire 130
 innée 183
 implant génétique 222
 inclusion 22
 incompatibilité 169
 indice de Shannon, H' 54
 indice de Simpson, Ds 54
 inducteur 142, 143, 144
 infection nosocomiale 176
 infection systémique 213
 ingénierie métabolique 234
 initiation 137, 140
 intégron 102, 115

intelligence artificielle 244
 interaction inter-cellulaire 44, 49, 52, 153
 interféron 189
 intron 37
 IPTG 142
 irradiation 48
 isobutène 226
 isoforme 239
 isomère 230

J

Jacob (F.) 143

K

kinase 147, 149, 185
 kinase à sérine/thréonine (STPK) 149
 Koch (postulat de) 176
 Koch (R.) 176, 217

L

Lederberg (E. et J.) 121, 123
 levure 36, 234, 236, 239, 242
 LexA 126
 liaison peptidique 140
 libération des virus 203, 209
 ligand 146, 151
 ligase 108, 126, 128
 lignine 59, 69, 165
 lignocellulose 222
 lipopolysaccharide (LPS) 17
 lipoprotéine de Braun (LPP) 17
 listériose 180
 lit bactérien 62
 lixiviation 61
 Lrp (*Leucine Responsive Regulatory Protein*)
 144, 148
 LUCA 13, 14
 Luria (S.E.) 120
 lutte antimicrobienne 156
 LuxR 153
 Lwoff (A.) 194
 lycopène 232, 233
 lyse 205, 207, 208, 210, 212, 213
 lysine 220
 lysogénie 194, 205

lysosome 25, 28
 lysozyme 16, 19, 210

M

macrophage 29, 183
 maladie de Crohn 171
 MalT, activateur de transcription 144
 membrane 202, 220
 externe (ME) 15
 interne (MI) 18
 nucléaire 5, 26
 plasmique 23
 ménage (fonctions de) 171
 ménage (gène) 96
 ménage ($\sigma 70$, de) 136
 mésappariement 126, 128
 métagénomique 230
 métallotolérant 48
 méthanogénèse/méthanogène 11, 46, 57
 méthode de parcimonie 10
 méthylase 148
 méthylation 128, 129, 147, 148, 151, 207
 mévalonate 232, 233, 235
 mévalonate diphosphate décarboxylase
 (MDD) 226
 micro-algue 27
 microbiome 170
 microbiote 57, 170
 micro-croissance 228
 microflore 173
 micro/macro noyau 30
 micro-organisme du sol 228
 milieu de culture 241
 mini-cellule 82
 mitochondrie 13, 24
 modification post-traductionnelle 147
 monochromosomie 96
 monoderme 14
 Monod (J.) 75, 143
 Morgan (T.H.) 114
 morphine 238, 239
 motilité 27, 33, 52, 151, 168
 MreB 20, 80
 multirésistance 176
 muréine 16

mutagène 117, 119
 mutagenèse aléatoire/dirigée 220, 235, 242
 mutateur 129
 mutation 129
 mutation spontanée 64, 100, 201
 MutH,L,S 128
 mutualisme 49, 175
 facultatif 162
 obligatoire réciproque/univoque 162
 mycélium 86

N

nanotube 125
 neurotransmetteur 171
 niche 42, 171, 174
 nitratisation 60
 nitrification 60, 62
 nodule 162
 nombre de copies 98
 nomenclature 5
 noyau 14, 25, 138
 nucléation de la glace 181
 nucléocapside 198, 209, 211
 nucléoïde 21, 86, 94
 nucléole 25
 nucléotide-sucre 230
 nutriment 3, 42, 43, 52, 56, 78

O

obésité 171
 occlusion du nucléoïde 82
 oligopeptide 155
 oligosaccharide 230
 opéron 96, 135, 140, 147
 opéron lactose 141, 148
 opéron *lux* 167
 opéron tryptophane 145
 organite 19, 21, 24
 origine (*ori*) 94, 105
oriT 98, 124
oriV 98
 orthologue 226, 235
 oxydo-réduction 71, 235

P

palindrome 100, 148
 paludisme 27, 169, 234
 pandémie 175
 Paramécie 29, 31
 paramylon 35
 parasite 193, 236
 parasitisme 50
 paroi 16, 157
 parthénogenèse 169
 particule transductrice 123
 Pasteur (L.) 176, 217
 pathogène 53, 87, 99, 123, 125, 148, 151, 154, 169, 174, 213, 230, 232
 pathogène opportuniste 170, 175
 pathogénèse 156
 pathogénicité 69, 95, 102, 103
 pathogénie 56, 175, 177
 pathologie 99, 194
 PCR infidèle 242
 pédoncule 84, 85
 pentose 222
 peptide leader 145
 peptide-synthétase 229
 peptidoglycane (PG) 16, 80, 229
 périplasme 71
 perméabilité 15, 18, 231
 perméase 224
 peste bubonique/pulmonaire 180
 petite sous-unité ribosomale 7
 phage 193
Phage display 243
 phagocytose 27, 180, 183, 210
 phagosome 28
 phase
 de latence 43, 76
 de lecture 140
 de mortalité 78
 exponentielle 77
 stationnaire 77, 136
 stationnaire prolongée 78
 phénomène 9
 phénotype 143, 148
 phosphatase 147, 153

phosphore 174
 phosphorylation 147, 149, 150, 152, 155
 photosynthèse 24
 photosystème 74
 phototrophie 49, 58
 phyllosphère 173
 piézophile 48
 pilus 20, 157, 182, 209
 pilus sexuel 124, 201, 210, 211, 212
 plasmide 207
 auto-transférable, ou conjugatif 98, 125
 conjugatif Ti 99, 125
 intégratif 98
 multicopie 232
 R 99
 métabolique 99
 plectonème 92
 pluricellularité 29, 33, 86
 polarité 199
 pôle cellulaire 81, 84, 151
 pollution 60, 63
 polymorphisme 31
 population 41
 pore 16, 184
 porine 18
 porteur sain 178
 pouvoir réducteur 71
 prédation 50, 86
 pression 48
 pression osmotique 47
 PriA,B,C 128
 primase 107
 prion 148
 procaryote 2, 22
 processivité 107
 profil protéique 9
 promiscuité catalytique 226
 promoteur 135, 148, 237
 propanediol (1,3-PDO) 225
 prophage 205
 prosthèque 84, 85
 protéase 155
 protéome 141
 prothèse 157
 protiste 1

protoplaste 16, 19
 protozoaire 27, 165
 pseudo-muréine 19
 pseudopode 27, 28
 psychrophile/psychrotrope 46
 pyruvate 73
 pyruvate décarboxylase (PDC) 222

Q

queue 195
 quorum quenching 156
 quorum sensing (QS) 53, 153, 157, 167
 inter-espèces 156

R

racine phylogénétique 11
 radiation ionisante 119
 radical libre 47, 119
 réacteur biphasique 235
 réarrangement chromosomique 98, 100, 115
 RecA 114, 126, 128, 131
 RecB,C,D 128
 récepteur 150, 201
 récessif 143, 144
 recombinaison homologue 114, 124, 128,
 130, 207, 236
 recombinaison non-homologue 115
 recombinaison site-spécifique 115
 recyclage 58
 redondantes (extrémités) 200
 régulateur de réponse, RR 150
 régulation 44, 75, 95, 135, 219, 220, 237, 242
 négative 141
 positive 144
 post-transcriptionnelle 145
 régulon 135, 144, 150, 155
 régulon maltose 144
 relation trophique 43
 relaxosome 124
 réparation 94
 de mésappariement, MMR 127
 par excision de bases, BER 126
 par excision de nucléotides, NER 126
 réplication semi-conservative 103
 réplication thêta 109

réplisome 106, 128
 réponse stringente 145
 répresseur 189, 238
 LacI 142, 143
 TrpR 145
 répression catabolique 43, 144
 réseau trophique 58
 réservoir 178, 179
 résistance 53, 64, 99, 115, 118, 121, 123, 201, 222, 228, 229
 respiration aérobie, oxygénique 24, 36
 restriction-modification (R-M) 129, 131, 202, 207
 réticulum endoplasmique (RE) 24
 rétro-inhibition 220
 rétrotranscriptase 203
 rétrotransposon 37
 rhizosphère 173
 Rho 137
 ribosome 21, 24, 25, 138, 140, 145
 RpoS ($\sigma 38$) régulateur transcriptionnel 78, 136, 147
 rumen 57
ryhB 147

S

salinité 47
 santé 61, 64, 157, 170, 173
 sARN 147
 sécrétion 70, 242
 de type III (SST3) 184
 de type IV et de type VI 189
 ESX-1 de type VII 189
 ségrégation 94
 sélection 64, 96, 120, 242
 sénescence 38
 senseur 18, 150, 151, 156
 sensibilité (d'une communauté microbienne) 51
 septation (site de) 82
 septum 81, 84
 séquence
 -10/-35 135
 cos 204
 de reconnaissance 129, 131
 d'insertion (IS) 98, 100, 118
 RBS (*Ribosome Binding Site*) 138
 Shine-Dalgarno 138
 signal 71
 Up 136
 séquences inversées/répétées 117, 130, 200
 shufflon 103
 sigma voir facteur sigma
 signal 149-151, 157
 simple brin (sb) 199
 SlmA 82
 SOS 126, 144
 source de carbone 37, 42, 43, 71, 226
 sous-unité 30S/50S 140
 spécificité (régio- ; stéréo) 230, 235
 spectre d'hôte 163, 201, 211, 213
 sphéropaste 16
 spore 84, 151
 sporulation 78, 84, 86, 137, 151, 155
 stabilité (d'une communauté microbienne) 51
 station d'épuration 62
 stress 95, 136, 155, 174, 220, 222
 stress thermique 220, 224
 structuration (du sol) 58, 62
 structure cellulaire 22
 structure péri-enveloppe 20
 structure pyramidale 209
 substance bioactive 86
 sucre 70, 144, 149
 superhélicité 92
 surenroulement 92
 surexpression 222, 223, 232, 234, 236, 242
 sur-réprimé (mutant) 143, 144
 survie 44, 52, 78, 98, 126, 153, 162, 171, 205, 210
 symbionte 87
 symbiose 49, 102
 symport 69
 syntrophie 44
 systématique 4
 système à deux composants 155
 système inductible 142, 143

T

Tatum (E.L.) 123
 taux de croissance 77
 taux de mutation 114, 120
 technique des répliques 121
 température 46
 temps de génération 77
 tensioactif 220
 terminaison (*ter*) 94, 108, 137, 138, 146
 termite 56, 165
 test de fluctuation 120
 tête 195
 tête pleine 207, 208
 thébaïne 238
 thermophile 47
 thylakoïde 74
 tige-boucle 140, 145, 147
 Tn5 118
 topoisomérase 93
 topologie 93
 toxine 38, 69, 71, 102, 155, 175, 230
tra 98
 transcription 109, 126, 152
 transcriptome 141
 transcytose 187
 transduction du signal à deux composants (SDC) 150
 transduction généralisée 123
 transduction restreinte (ou spécialisée) 123
 transféosome 125
 transferts génétiques horizontaux (TGH) 10, 14, 53, 102, 121
 transformation 103
 translocation 70
 transmission horizontale/verticale 129, 162, 163, 169
 transport 69
 ABC (*ATP Binding Cassette*) 69
 actif 19
 actif primaire/secondaire 69
 dépendant (PTS) 70, 149
 facilité 69
 passif 18
 SecA-dépendant/indépendant 71

transposase 100, 131
 transposition 100, 115
 non-réplivative, coupé-collé 118
 réplivative 117, 207
 transposon (Tn) 100
 transposon composite/simple 101
 tricheur 157
 triplet 139
 Trypanosome 31
 tube digestif (TD) 45, 56
 tube multitest 7
 tubuline 20, 23
 Tween 40 220
 type sexuel 31
 type trophique 72
 tyrosine 238

U

ultraviolets (UV) 119
 unicellularité 2, 22
 uniformité (E) 54
 uniport 69
 UvrA,B,C,D 126, 128

V

vaccin anti-cancéreux 232
 vacuole 25, 27, 29, 187
 variabilité 170
 variation de phase 32, 33, 103, 115, 148
 vection active/passive 178
 vésicule 24
 vésicule membranaire 20, 125
 virophage 210
 virulence 18, 99, 121, 149, 151, 154, 155, 174, 185
 virus 14, 129, 169, 232
 enveloppé 195
 « géant » 209
 latent 194
 vitesse de croissance 43
 voie des pentoses phosphates 73, 224
 voie Entner-Doudoroff 73

W

Watson (J.) 93

Woese (C.) 11

X

xérophile 49

xylose 222

Y

yersiniose 180

Yop 183

Z

zoonose 178