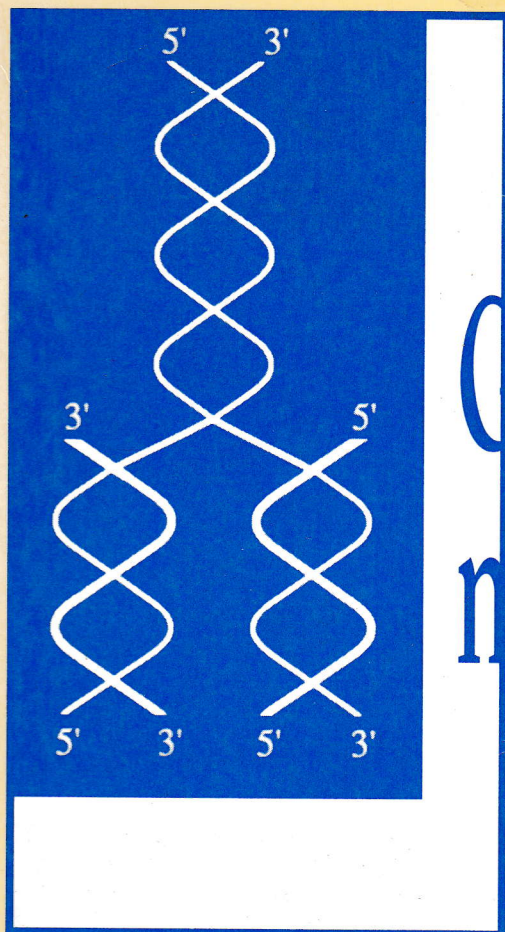


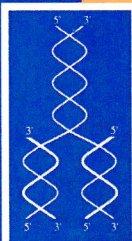


Génétique microbienne

Bases théoriques et introduction
aux applications pratiques

Joseph-Pierre GUIRAUD

la science
TEC
DOC



L'auteur : Joseph-Pierre GUIRAUD est Professeur à l'*Institut des Sciences de l'Ingénieur de Montpellier (ISIM)*.
Docteur ès Sciences, Agrégé et Chercheur au *Laboratoire de Microbiologie et Biochimie Industrielles*, il participe également à l'encadrement de projets industriels.

Le génie génétique fait largement appel aux données de la génétique microbienne dont l'importance, aussi bien théorique que pratique, est immense : l'amélioration génétique des souches microbiennes a en effet de nombreuses applications et offre de belles perspectives dans des industries diverses.

Le but de cet ouvrage est de regrouper sous une forme simple, l'essentiel des données théoriques et les bases des applications pratiques concernant la génétique des micro-organismes. Les souches utilisées en microbiologie industrielle appartiennent essentiellement à des espèces bactériennes ou fongiques (levures et moisissures). Toutefois, pour des espèces appartenant à d'autres groupes (algues en particulier), des applications concrètes ou potentielles existent. Pour cette raison, le monde microbien est traité au sens large dans cet ouvrage.

Ce livre a donc été conçu de manière à ce que les non-spécialistes puissent y trouver les bases théoriques solides nécessaires à l'approfondissement de cette discipline. En même temps, il aborde les développements les plus récents en insistant sur les retombées industrielles.

Il offrira un soutien indispensable aux étudiants et enseignants des deuxièmes et troisièmes cycles de toutes les filières de formation "bio", et sera également utile aux chercheurs et industriels •

2-85206-883-4



9 782852 06 883 4

TABLE DES MATIÈRES

RAPPEL SUR LES GRANDS GROUPES MICROBIENS

Chapitre I : LE MATÉRIEL GÉNÉTIQUE ET SA RÉPLICATION

1- Structure moléculaire du matériel génétique	1
1.1- Les acides nucléiques	1
1.2- Structure de l'ADN dans les cellules microbiennes	1
1.3- La notion de gène	5
2- Organisation du matériel génétique au niveau de la cellule ou de l'individu	6
2.1- Matériel génétique des organismes procaryotes : le génophore	6
2.2- Matériel génétique des organismes eucaryotes : les chromosomes	7
Le noyau • Structure des chromosomes • Organisation des chromosomes •	
Nombre de chromosomes et ploïdie	
2.3- Matériel génétique extrachromosomique	12
ADN des organelles • Plasmides • Facteur "killer" des levures • Facteur "killer" des paramécies •	
Autres éléments extrachromosomiques	
2.4- Matériel génétique des virus	18
Caractères généraux • Phages à ADN bicaténaire linéaire • Phages à ADN bicaténaire circulaire	
Phages à ADN monocaténaire circulaire • Phages à ARN monocaténaire • Phages à ARN bicaténaire	
3- Mécanisme de la réplication de l'ADN	20
3.1- Schéma général	20
3.2- ADN polymérases	21
Systèmes procaryotes • Systèmes eucaryotes	
3.3- Mécanisme de la réplication chez <i>Escherichia coli</i>	22
3.4- Autres systèmes de réplication	24
3.5- Problème de la réplication des ADN linéaires	25
4- Réplication et division cellulaire chez les organismes procaryotes	26
5- Réplication et division cellulaire chez les organismes eucaryotes : la mitose	27
5.1- Modalités de la réplication	27
5.2- Phases de la mitose	28
Interphase • Situation à la fin de l'interphase • Prophase • Métaphase • Anaphase • Télophase	
5.3- Différents types de mitose	30
Particularités de la mitose selon les groupes microbiens • La mitose chez les levures	
6- Réplication de l'ADN extrachromosomique	32
7- Réplication du génophore des virus	34
7.1- Réplication des ADN bicaténaires	34
7.2- Réplication des ADN monocaténaires	36
7.3- Réplication des ARN	36

Chapitre II : L'EXPRESSION DE L'INFORMATION GÉNÉTIQUE ET SON CONTRÔLE

1- Mécanisme de base	39
1.1- Le code génétique	39
1.2- Les acides ribonucléiques (ARN)	39
ARN messager (ARNm) • ARN de transfert (ARNt) • ARN ribosomique (ARNr) • Autres types d'ARN	
1.3- Synthèse des ARN : transcription	44
Transcription chez les organismes procaryotes • Transcription chez les organismes eucaryotes • Transcription chez les virus	
1.4- Traduction et synthèse des protéines	51
Initiation • Elongation • Terminaison et libération du polypeptide • Condensation et modifications des protéines	
1.5- Excrétion des protéines	54
2. Contrôle du fonctionnement et de l'expression des gènes :	
régulation de la synthèse des protéines	56
2.1- Contrôle de l'initiation de la transcription chez les bactéries	56
Généralités • Contrôle spécifique négatif • Contrôle spécifique positif • Contrôle non spécifique • Contrôles multiples ou coordonnés • Autres types de contrôle	
2.2- Autres contrôles de la transcription et de la traduction chez les organismes procaryotes	67
Régulation de la terminaison de la transcription : atténuation • Interactions transcription / traduction • Régulation de la traduction • Intervention des remaniements chromosomiques	
2.3- Mécanismes de contrôle chez les virus	70
Régulation de la transcription • Modifications post-transcriptionnelles • Régulation de la traduction • Contrôle d'un virus par un autre virus	
2.4- Mécanismes de contrôle chez les organismes eucaryotes	75
Contrôle de l'initiation de la transcription • Autres mécanismes de régulation	
3- Régulation du fonctionnement des enzymes	79
3.1- Rétroinhibition des voies de l'anabolisme	80
Rétroinhibition multivalente ou concertée • Rétroinhibition cumulative • Rétroinhibition coopérative • Rétroinhibition par isoenzymes • Systèmes séquentiels	
3.2- Phénomènes d'activation	81
3.3- Autres mécanismes	82
4- Autres exemples de régulation	82
4.1- Contrôle du fonctionnement d'un gène par un autre gène	82
4.2- Contrôle génique de l'excrétion des protéines	82
4.3- Régulation par action de protéases	82

Chapitre III : VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DE L'INDIVIDU ISOLÉ : MUTATIONS NATURELLES ET INDUITES

1- Généralités : Les mutations naturelles	83
1.1- Définition de la mutation	83
1.2- Propriétés générales des mutations naturelles	83
1.3- Agents responsables des mutations naturelles ou spontanées	83
Agents physiques • Agents chimiques • Agents enzymatiques	
2- Différents types de mutations	84
2.1- Classement selon la nature et la localisation	84
2.2- Classement selon les conséquences sur la duplication et la transcription	84
2.3- Mutations ponctuelles	85
Substitution • Délétion • Insertion • Modification	
2.4- Mutations par remaniement	87
Délétion • Inversion • Translocation • Duplication	
2.5- Modifications de ploïdie	88

3- Systèmes de protection du patrimoine génétique	88
3.1- Protection contre l'intrusion d'ADN étrangers	88
3.2- Protection contre les altérations affectant le matériel génétique	89
3.3- Réparation des altérations	90
Réparation par réversion directe de la lésion • Réparation par excision •	
Système SOS • Réparation par recombinaison	
4- Expression des mutations	95
4.1- Conséquences des mutations sur la synthèse peptidique	95
4.2- Expression et suppression chez les organismes haploïdes	97
Mutation réverse • Suppression intragénique • Suppression intergénique	
indirecte (ou physiologique) • Suppression intergénique directe • Mutations	
létales conditionnelles	
4.3- Expression des mutations chez les organismes diploïdes, polyploïdes,	
coenocytiques et pluricellulaires	98
5- Étude des mutations au niveau des populations	99
5.1- Taux de mutation	99
Définition • Détermination • Mutabilité spécifique • Souches "mutatrices"	
5.2- Evolution des mutants au sein d'une population : conséquences industrielles	101
6- Différents types d'agents mutagène : utilisation pour la mutagenèse	102
6.1- Agents physiques	102
Radiations ultraviolettes • Radiations ionisantes	
6.2- Agents chimiques	103
Analogues de bases • Agents de transformation des bases • Autres agents	
perturbant le fonctionnement du matériel génétique • Précautions à respecter	
lors de l'utilisation d'agents chimiques mutagènes	

Chapitre IV : SEXUALITÉ, PARASEXUALITÉ, HÉRÉDITÉ CYTOPLASMIQUE : MÉCANISME DE LA RECOMBINAISON GÉNÉTIQUE

1- Sexualité des eucaryotes	113
1.1- Notion de biocycle	114
1.2- Mécanisme de la fusion sexuelle	115
1.3- Mécanisme de la méiose	117
Phases de la première division • Phases de la deuxième division	
2- Parasexualité	120
2.1- Recombinaison chez les virus	120
2.2- Parasexualité bactérienne	121
Transformation • Transfection • Transduction • Conjugaison	
2.3- Fusion somatique des eucaryotes	130
3- Mécanisme de la recombinaison générale	132
3.1- Recombinaison interchromosomique	132
3.2- Recombinaison intrachromosomique	132
Généralités • Recombinaison par appariement de deux brins monocaténaux •	
Recombinaison par déplacement de brins monocaténaux • Autres mécanismes	
3.3- Recombinaison intragénique	138
4- Mécanisme des recombinaisons entre chromosomes ou fragments	
de chromosomes non homologues	139
4.1- Recombinaison de site à double spécificité : cas de l'intégration	
des bactériophages de transduction spécialisée	140
4.2- Recombinaison de site à simple spécificité : cas de l'intégration	
des bactériophages de transduction généralisée	142
4.3- Phénomènes de transposition	142
Transposons bactériens • Transposons eucaryotes	
4.4- Autres réarrangements de séquences d'ADN	148

Réarrangements chez les bactéries • Changement de signe sexuel de la levure • Variations de l'antigène de surface chez le trypanosome • Réarrangements d'ADN chez les protozoaires ciliés	
5- Brassage de l'information génétique cytoplasmique	151
5.1- Héritéité cytoplasmique	151
Mutation poky • Mutation "petite" • Facteur "killer" des paramécies	
5.2- Recombinaison d'ADN extrachromosomique	151

Chapitre V : CONSÉQUENCES DU BRASSAGE GÉNÉTIQUE : APPLICATION À L'ÉTUDE DU GÉNOTYPE

1- Conséquences de la confrontation de deux génomes	153
1.1- Test de dominance	153
1.2- Tests de complémentation fonctionnelle	154
Principe • Application dans le cas des microorganismes possédant une sexualité • Application dans le cas des organismes sans sexualité • Incidence des phénomènes de recombinaison	
2- Ségrégation des génotypes haploïdes	155
2.1- Cas des organismes haplobiontiques	155
Ségrégation d'un couple de gènes • Ségrégation de deux couples de gènes • Ségrégations non réciproques	
2.2- Cas des organismes diplobiontiques	159
Transmission d'un couple de gènes • Transmission de deux couples de gènes	
3- Etablissement des cartes génétiques à partir des fréquences de recombinaison	160
3.1- Fréquences de recombinaison	160
Définition • Recombinaison et distance génétique • Phénomènes d'interférence • Variabilité des fréquences	
3.2- Etablissement des cartes génétiques chez les microorganismes eucaryotes	162
Analyse chez les champignons ascomycètes à tétrades ordonnées • Analyse des tétrades non ordonnées • Analyse des spores en vrac • Analyse chez les microorganismes diplobiontiques	
3.3- Cartes génétiques chez les bactéries et les virus	171
Transformation • Transduction • Conjugaison • Recombinaison chez les bactériophages	
4- Introduction à la génétique des populations microbiennes	172

Chapitre VI : PRINCIPES DE LA SÉLECTION ET DE L'AMÉLIORATION DES SOUCHES MICROBIENNES

1- Stratégie générale	175
1.1- Critères de choix d'une souche	175
1.2- Possibilités de sélection	175
2- Recherche de souches existantes	176
2.1- Souches répertoriées	176
2.2- Souches naturelles	176
3- Création d'une souche nouvelle à partir d'une souche existante	177
3.1- Stratégie générale	177
3.2- Choix des conditions de mutagenèse	177
Choix de l'agent mutagène • Etablissement des courbes de survie	
3.3- Choix du crible et réalisation de la mutagenèse	178
3.4- Etude de la souche obtenue	178
3.5- Principaux mutants recherchés	179
4- Création d'une souche nouvelle à partir de plusieurs souches existantes	180
4.1- Principes généraux des techniques d'hybridation	180
Principales phases • Marquage génétique des souches à hybrider	
4.2- Utilisation des cycles biologiques naturels	181

Cas des microorganismes eucaryotes sexués • Cas des microorganismes eucaryotes imparfaits • Cas des microorganismes procaryotes	
4.3- Hybridation par fusion induite	186
Obtention des protoplastes • Réalisation de la fusion et sélection des recombinants • Cytoduction	
4.4- Transformation des cellules eucaryotes	190
4.5- Obtention d'une souche par génie génétique	190
5- Choix et mise au point des cribles de sélection	190
5.1- Méthodes générales	190
5.2- Techniques d'isolement	192
Isolement direct en boîte de Pétri • Isolement après obtention d'une réplique • Tests différentiels • Tests divers	
5.3- Techniques d'enrichissement	196
Enrichissement des souches auxotrophes • Autres cas	
5.4- Contrôle et conservation des souches	197

Chapitre VII : GÉNIE GÉNÉTIQUE

1- Les outils du génie génétique : principales enzymes utilisées	199
1.1- Enzymes de coupure	200
Endonucléases • Exonucléases • Phosphatases	
1.2- Enzymes de synthèse	202
ADN polymérase • Transférase terminale • ADN ligase • Autres enzymes	
2- Préparation de l'ADN à cloner	203
2.1- Origine de l'ADN	203
2.2- Préparation de fragments d'ADN génomique	204
Extraction et purification • Obtention et modification des fragments	
2.3- Synthèse d'ADN complémentaire à partir d'ARN messager	206
Isolement des ARN messagers • Obtention d'un ADN complémentaire	
2.4- Synthèse d'ADN à partir d'une séquence théorique	208
3- Transfert de l'ADN	208
3.1- Vecteurs de clonage	208
Plasmides • Bactériophages • Cosmides et phasmides • Utilisation des transposons	
3.2- Intégration de l'ADN à transférer au vecteur	217
3.3- Récepteurs microbiens	220
Propriétés requises • Récepteurs procaryotes • Récepteurs eucaryotes	
3.4- Transformation ou transfection	221
3.5- Stratégies de clonage	221
Gènes de virus d'organismes procaryotes (bactériophages) • Gènes bactériens • Gènes eucaryotes microbiens • Gènes eucaryotes non microbiens • Gènes de virus d'organismes eucaryotes	
3.6- Intégration dirigée	222
4- Analyse des clones obtenus	222
4.1- Sélection des souches transformées ou transfectées	222
Mise en évidence de la présence du vecteur • Mise en évidence de la présence d'ADN donneur	
4.2- Sélection des souches recombinées contenant une séquence spécifique	225
Méthodes biochimiques • Méthodes immunologiques • Méthodes utilisant l'hybridation des acides nucléiques • Etude de l'activité biologique dans un système modèle	
5- Expression des systèmes clonés	231
5.1- Conditions de l'expression	231
Incorporation • Stabilité • Réplication • Transcription • Traduction • Facteurs post-traductionnels	
5.2- Vecteurs d'expression	233
5.3- Expression par formation de protéines mixtes	235
5.4- Méthodes de contrôle de l'expression	236

Chapitre VIII : APPLICATIONS DES TECHNIQUES GÉNÉTIQUES

1- Etude du génome	237
1.1- Etablissement des cartes génétiques	237
Détermination de la taille du génome • Détermination du caryotype • Utilisation des croisements pour l'établissement des cartes génétiques	
1.2- Cartographie et étude de la structure des gènes par génie génétique	238
Cartographie de restriction • Application des techniques d'hybridation • Mutagenèse dirigée • Echange de gènes allèles sur un vecteur	
1.3- Séquençage	241
Méthode de Sanger • Méthode de Maxam et Gilbert	
1.4- Banques de gènes	243
2- Identification microbienne	245
2.1- Composition en nucléotides	245
2.2- Etude du polymorphisme de l'ADN	245
2.3- Identification par hybridation de l'ADN	245
Identification directe • Utilisation de la technique PCR • Applications à l'identification de bactéries pathogènes	
2.4- Marquage génétique des souches	248
3- Etude du métabolisme microbien et de sa régulation	249
4- Etude du pouvoir toxique de substances ou de procédés technologiques	249
5- Amélioration de procédés fermentaires traditionnels	250
5.1- Fermentation alcoolique	250
Levures "xénophobes" • Levures de brasserie dégradant les dextrines • Levures de brasserie réduisant le diacétyle • Levures "anaérobies" • Améliorations diverses des levures de fermentation • Levures effectuant la fermentation malo-lactique • Zymomonas • Valorisation de la biomasse par fermentation alcoolique	
5.2- Fromagerie	252
6- Production de métabolites microbiens et de produits divers	252
6.1- Acides aminés	252
6.2- Antibiotiques	253
Utilisation de la génétique classique • Utilisation du génie génétique	
6.3- Enzymes	255
Cellulases et pectinases • Enzymes amylolytiques • Chymosine • Glucose isomérase • Autres enzymes	
6.4- Autres produits	256
Dérivés d'acides nucléiques • Acides dérivés du cycle de Krebs • Vitamines • Galactose • Carotène • Lycopène • Acide ascorbique • Thaumatine II • Polysaccharides • Autres produits	
6.5- Production de biomasse microbienne	259
6.6- Production de protéines animales à intérêt médical	260
Insuline • Somatotrophine (STH) • Interféron • Somatostatine (SRIF) • Autres protéines	
6.7- Vaccins viraux	263
Hépatite B • FMDV • Autres antigènes viraux	
6.8- Transformations de cellules végétales	263
6.9- Fusions somatiques de cellules d'organismes eucaryotes supérieurs	263
7- Perspectives	264

BIBLIOGRAPHIE	265
----------------------	-----

INDEX	269
--------------	-----