

République algérienne démocratique et populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université des Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1  
كلية علوم الطبيعة الحياة



## Support de cours

### Régulation de l'expression des gènes : Régulation de l'expression des gènes chez les procaryotes

**Destiné aux étudiants de Master 1**

**Spécialité Génétique Moléculaire**

**Docteur GHARZOULI Razika Ep FERTOUL**

*Année universitaire  
2020 - 2021*

## Table des matières

<b>Préface</b> .....	1
<b>Chapitre 1 : Expression génique chez les Procaryotes</b>	
1. Transcription chez les procaryotes .....	2
2. Traduction chez les procaryotes .....	4
2.1. La machinerie traductionnelle .....	4
2.2. Les étapes de la traduction.....	5
<b>Chapitre 2: Régulation de la transcription chez les procaryotes</b>	
1. Régulation de la transcription .....	9
1.1. Stratégies de contrôle de l'initiation de la transcription .....	9
1.2. Protéines de régulation transcriptionnelle.....	10
1.3. Contrôle négatif-positif.....	10
<b>Chapitre 3: Modulation de l'expression</b>	
<b>3.1 et 3.2 Le système lactose : contrôle négatif et la répression catabolique (contrôle positif)</b>	
1. Notions de terminologie . .....	12
2. Contrôle négatif de l'opéron lactose... ..	12
2.1. Structure de l'opéron lactose .....	12
2.2. Fonctionnement de l'opéron lactose .....	13
3. Mécanisme d'action de la protéine CAP : la répression catabolique.....	16
4. Mise en évidence du déterminisme génétique du modèle de l'opéron.....	18
<b>Chapitre 3: Modulation de l'expression</b>	
<b>3.3 L'opéron arabinose</b>	
1. Structure et fonctionnement de l'opéron <i>ara</i> .....	23
2. Régulation de l'opéron arabinose.. ..	24
<b>Chapitre 3: Modulation de l'expression</b>	
<b>3.4 L'opéron tryptophane</b>	
1. La structure de l'opéron tryptophane.....	29
2. Fonctionnement de l'opéron tryptophane .....	30
3. Comparaison de l'induction et la répression .....	30
4. Atténuation : processus essentiel de la régulation de l'opéron tryptophane chez <i>E.coli</i> .....	31
4.1. La structure de l'atténuateur .....	31
4.2. Processus d'atténuation .....	31
4.3. Comment l'absence (ou la faible concentration) de tryptophane permet de surmonter l'atténuation? .....	32
<b>Chapitre 4: La biosynthèse d'antibiotiques par les <i>Streptomyces</i></b>	
1. Les antibiotiques et leur mode d'action .....	35
1.1. Définition d'un antibiotique .....	35
1.2. Mode d'action des antibiotiques .....	35
1.3. Origine de la résistance aux antibiotiques .....	36
1.3.1. Mutations génétiques .....	36
1.3.2. Les transferts horizontaux (notamment la conjugaison bactérienne) .....	37
1.3.3. Les transposons et les intégrons .....	37

1.3.4. L'utilisation non contrôlée des antibiotiques .....	37
2. Les streptomyces et La production d'antibiotiques.....	37
2.1.Définition des <i>Streptomyces</i> .....	37
2.2.Les antibiotiques produits par les <i>Streptomyces</i> .....	38
2.3. La régulation de la biosynthèse des antibiotiques .....	39
2.3.1. Les facteurs physico-chimiques .....	39
2.3.2. Les facteurs nutritionnels .....	39
<b>Chapitre 5: Communications et transmission des signaux chez les bactéries Gram+</b>	
1. Historique et définition de La détection du quorum ou Quorum Sensing .....	42
2. Mécanisme général commun du quorum sensing « QS » .....	44
3. Régulation du QS : Rôle des systèmes à deux composants .....	44
3.1.Les senseurs classiques .....	45
3.2.Les régulateurs de réponse (RR) .....	47
4. Schéma général du mécanisme commun du Quorum Sensing chez les bactéries à Gram –	47
5. Le QS chez les Gram + : exemple du système Agr de la bactérie <i>Staphylococcus aureus</i>	48
5.1.Organisation du locus Agr.....	48
5.2.ARN III effecteur de la réponse Agr .....	49
5.3.Auto-induction du système agr .....	50
6. Autres systèmes du QS chez la bactérie <i>S. aureus</i> .....	50
Liste des références bibliographiques .....	52
Quelques références Web.....	53

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Rôle des facteurs sigma dans la reconnaissance de la région promotrice.....	2
<b>Figure 2 :</b> Elongation de la transcription .....	3
<b>Figure 3 :</b> Terminaison de la transcription.....	3
<b>Figure 4 :</b> Structure de l'ARN de transfert.....	4
<b>Figure 5 :</b> Les molécules de protéines et d'ARNr constituent les deux sous-unités d'un ribosome.....	5
<b>Figure 6 :</b> L'amorçage de la traduction chez les procaryotes.....	6
<b>Figure 7 :</b> Les étapes de l'élongation de la traduction.....	7
<b>Figure 8 :</b> La terminaison de la traduction.....	7
<b>Figure 9 :</b> Les différents niveaux de régulation.....	8
<b>Figure 10 :</b> Promoteur bactérien.....	9
<b>Figure 11:</b> Le site opérateur.....	10
<b>Figure 12:</b> Le contrôle positif et négatif de l'initiation de la transcription.....	11
<b>Figure 13 :</b> Structure de l'opéron lactose et le gène régulateur <i>lacI</i> .....	13
<b>Figure 14 :</b> Répression de l'opéron lactose en absence de lactose.....	14
<b>Figure 15 :</b> Structure de lactose et l'allolactose.....	14
<b>Figure 16:</b> Induction de l'opéron lactose en présence de lactose et absence de glucose.....	15
<b>Figure 17 :</b> Modèle du fonctionnement de l'opéron lactose selon Jacob, Monod et Lwoff..	15
<b>Figure 18:</b> Régulation positive de l'opéron lactose par la protéine CAP et AMPc.....	16
<b>Figure 19 :</b> Le glucose réprime l'opéron lactose .....	17
<b>Figure 20:</b> La répression catabolique le l'opéron lactose .....	17
<b>Figure 21:</b> Activation totale de l'opéron lactose en présence de lactose et en absence de glucose.....	18
<b>Figure 22 :</b> Les diploïdes partiels.....	18
<b>Figure 23 :</b> Le génotype $I^- O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$ donne des bactéries de phénotype $lac^+$ .....	20
<b>Figure 24 :</b> Le génotype $I^s O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$ donne des bactéries de phénotype $lac^-$ .....	21
<b>Figure 25 :</b> Le génotype $I^+ O^c Z^+ / I^+ O^+ Z^+$ donne des bactéries de phénotype $lac^c$ .....	21
<b>Figure 26 :</b> Les enzymes nécessaires à l'utilisation de l'arabinose.....	23
<b>Figure 27:</b> La structure de l'opéron arabinose.....	24
<b>Figure 28 :</b> Localisation des gènes impliqués dans le métabolisme de l'arabinose.....	24
<b>Figure 30:</b> Régulation de l'opéron arabinose en présence et en absence de l'arabinose.....	26
<b>Figure 31 :</b> Répression de la transcription des trois gènes Ara BAD en absence de l'arabinose.....	26
<b>Figure 32 :</b> La fixation de la protéine AraC sur la région $O_2$ et $I_1$ provoque la formation d'une boucle d'ADN.....	27
<b>Figure 33 :</b> Activation de la transcription des trois gènes Ara BAD en présence de l'arabinose.....	27
<b>Figure 34:</b> L'association de l'arabinose avec la protéine AraC conduit à un changement de conformation ce qui favorise son attachement sur la région <i>araI</i> .....	28
<b>Figure 35:</b> Structure de l'opéron Tryptophane.....	29
<b>Figure 36:</b> Fonctionnement de l'opéron tryptophane, en présence et en absence du tryptophane.....	30

<b>Figure 37:</b> Structure de l'atténuateur .....	31
<b>Figure 38:</b> L'ARNm de la séquence LEADER de l'opéron Trp.....	32
<b>Figure 39:</b> Structure en épingle à cheveux de la séquence leader après transcription.....	33
<b>Figure 40 :</b> L'épingle antiterminateur (2/3) permet la poursuite de la transcription.....	33
<b>Figure 41 :</b> L'épingle terminateur (3/4) provoque un arrêt de la transcription .....	34
<b>Figure 42:</b> Exemple d'antibiogramme.....	35
<b>Figure 43 :</b> Les quatre principaux modes d'action des antibiotiques.....	36
<b>Figure 44 :</b> Les différents mécanismes de résistance à un antibiotique.....	36
<b>Figure 45 :</b> Structure de différentes molécules signal identifiées chez les bactéries.....	43
<b>Figure 46 :</b> Mécanisme général du quorum sensing .....	44
<b>Figure 47 :</b> Modèle de la régulation par un système à 2 composants.....	45
<b>Figure 48 :</b> Structure du Senseur.....	45
<b>Figure 49 :</b> Transmission du signal.....	46
<b>Figure 50 :</b> Structure du domaine transmetteur du senseur.....	46
<b>Figure 51 :</b> Structure des sous domaines du transmetteur.....	46
<b>Figure 52 :</b> Schéma général du mécanisme QS chez les bactéries à Gram -.....	48
<b>Figure 53:</b> Fonctionnement du système agr chez <i>S.aureus</i> .....	49
<b>Figure 54 :</b> Structure secondaire de l'ARN III.....	50

## Liste des abréviations

**AHL** : N-acylhomosérine lactone  
**AI** : Auto-inducteur  
**AIP** : Auto-inducteur Peptidique  
**AMPc** : Adénosine MonoPhosphate cyclique  
**Ara** : Arabinose  
**Arg** : Accessory gene regulator  
**ARNt-fMet** : ARNt-N formylméthionine  
**C** : constitutif  
**CAP** : Catabolite gene Activator Protein  
**CRP** : cAMP Receptor Protein  
**I** : Inducteur  
**IF** : Facteurs d'Initiation  
**IPTG** : IsoPropylThioGalactoside  
**IS** : Séquence d'Insertion  
**P** : Promoteur  
**O** : Opérateur  
**QS** : Quorum Sensing  
**R** : Répresseur  
**RR** : Régulateur de Réponse  
**S** : Sensible  
**TMG** : Thiométhylgalactoside  
**Tn** : Transposon  
**Trp** : Tryptophane

## Préface

La régulation de l'expression des gènes comporte l'ensemble des mécanismes de régulations mis en œuvre pour passer de l'information génétique incluse dans une séquence d'ADN à un produit de gène fonctionnel (ARN ou protéine). Cette régulation est indispensable pour que le métabolisme de la cellule soit en adéquation avec son environnement.

Chez les procaryotes comme chez les eucaryotes, les gènes sont régulés principalement à l'étape de l'initiation de la transcription, le plus souvent par des protéines capables d'activer ou d'inhiber le fonctionnement du gène. L'objectif de cette unité d'enseignement est de présenter les divers mécanismes de régulation chez les procaryotes et les eucaryotes. Dans cette partie nous allons présenter les différents mécanismes de régulation de l'expression des gènes chez les procaryotes (on prenant la bactérie *E. coli* comme modèle). Cette matière est désignée aux étudiants Master 1 génétique moléculaires.

Dans un premier temps nous avons commencé par un rappel sur l'expression génique chez les procaryotes, où nous expliquons les différentes étapes de la transcription et la traduction chez les procaryotes. Dans le deuxième chapitre nous avons expliqué les différents modes de régulation qui permettent à la bactérie de réprimer la synthèse des protéines inutiles ou de les activer au moment où ils deviennent nécessaires. Les diverses modalités de la régulation de l'expression génique chez les procaryotes sont étudiées sur quatre exemples différents. Tout d'abord nous commençant par le contrôle négatif de l'opéron lactose chez *E. coli* assuré par le répresseur *Lac I*. La protéine CAP est l'acteur principal qui assure un contrôle positif de cet opéron. L'opéron arabinose est enseigné à part puisque il est considéré comme un opéron inductible particulier. Finalement l'opéron tryptophane est étudié comme modèle de régulation en cas d'anabolisme chez les bactéries. Les antibiotiques sont des molécules du métabolisme secondaire produites dans des conditions spéciales de vie par les microorganismes. Plus du deux tiers des antibiotiques connus d'origine naturelle sont isolés et purifiés à partir des espèces du genre *Streptomyces*. La synthèse de ces métabolites secondaires est fortement affectée par les conditions environnementales et nutritionnelles dans lesquelles le microorganisme se développe. Enfin au niveau du cinquième chapitre nous avons abordé les différents mécanismes qui permettent aux bactéries de communiquer entre elles.

# **Chapitre 1**

## **Expression génique chez les Procaryotes**

L'étape principale de l'expression génique est l'interprétation de l'information contenue sur l'ADN et sa traduction en protéines. Deux grandes étapes sont nécessaires : la transcription qui permet d'obtenir une copie du gène présent sur le chromosome, sous forme d'ARN et la traduction est l'étape durant laquelle l'espèce d'ARN dit messenger est lu sur le ribosome, pour obtenir une protéine.

### 1. Transcription chez les procaryotes

La transcription est catalysée par des enzymes appelées ARN polymérase, chez les procaryotes il en existe une seule et trois chez les eucaryotes (ARN polymérase I, II et III). L'ARN polymérase se déplace le long de l'ADN en déroulant l'hélice et catalysant la formation des liaisons phosphodiester entre ribonucléotides. La synthèse s'effectue dans le sens 5' > 3'.

La transcription se déroule en trois étapes :

#### a) initiation

- Est une étape de reconnaissance et de fixation de l'ARN polymérase sur la région promotrice qui indique le point de départ de la synthèse d'ARN. Le promoteur inclut le site de la transcription (+1) et environ 50 nucléotides en amont (régions -35 et -10).
- D'autres facteurs interviennent dans ce processus, notamment les facteurs sigma et d'autres protéines régulatrices (activatrices et répressives). Les facteurs sigma ( $\sigma$ ) sont des sous-unités de l'ARN polymérase qui lui permettent de reconnaître et de se fixer sur les promoteurs des gènes. Il existe différents types de facteurs  $\sigma$  (Fig.1).

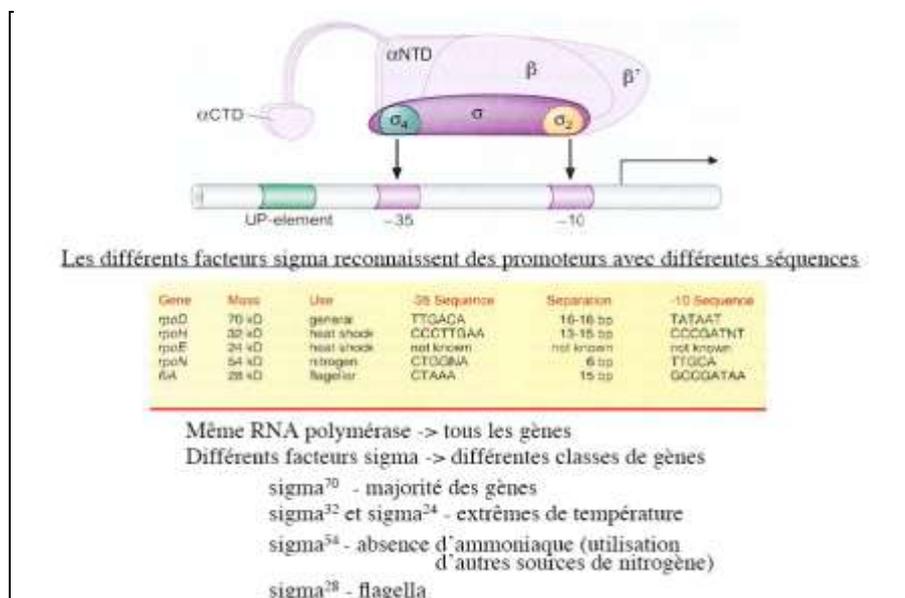


Figure 1 : Rôle des facteurs sigma dans la reconnaissance de la région promotrice.

### b) élongation

- l'ARN polymérase avance le long de l'ADN, en maintenant ouverte une « bulle » de transcription pour exposer le brin matrice et catalyser l'élongation en 3' du brin d'ARN en cours de synthèse. La synthèse s'effectue d'une façon complémentaire avec le brin matrice, appelé brin antisens (Fig. 2).

- De nombreuses copies d'ARN peuvent être fabriquées à partir d'un même gène, la synthèse d'une molécule d'ARNm démarrant avant que l'ARNm précédent ne soit terminé (il peut y avoir 15 molécules d'ARN polymérase se déplaçant sur le même gène à la suite l'une de l'autre).

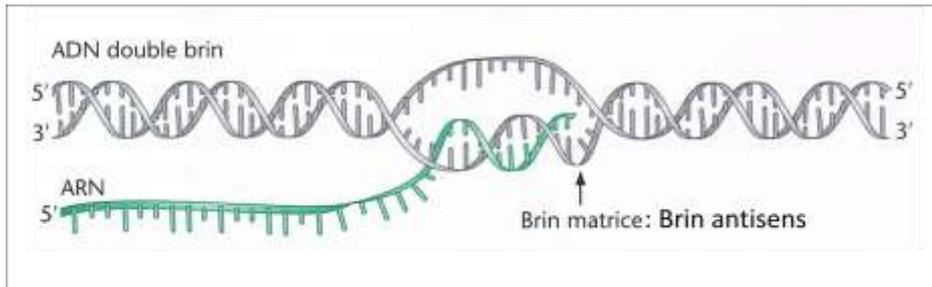


Figure 2 : Élongation de la transcription

### c) terminaison

La terminaison correspond à la dissociation de l'ARN polymérase aux séquences de terminaison. Il existe deux types de séquences : Rho indépendante et Rho dépendante (Fig. 3).

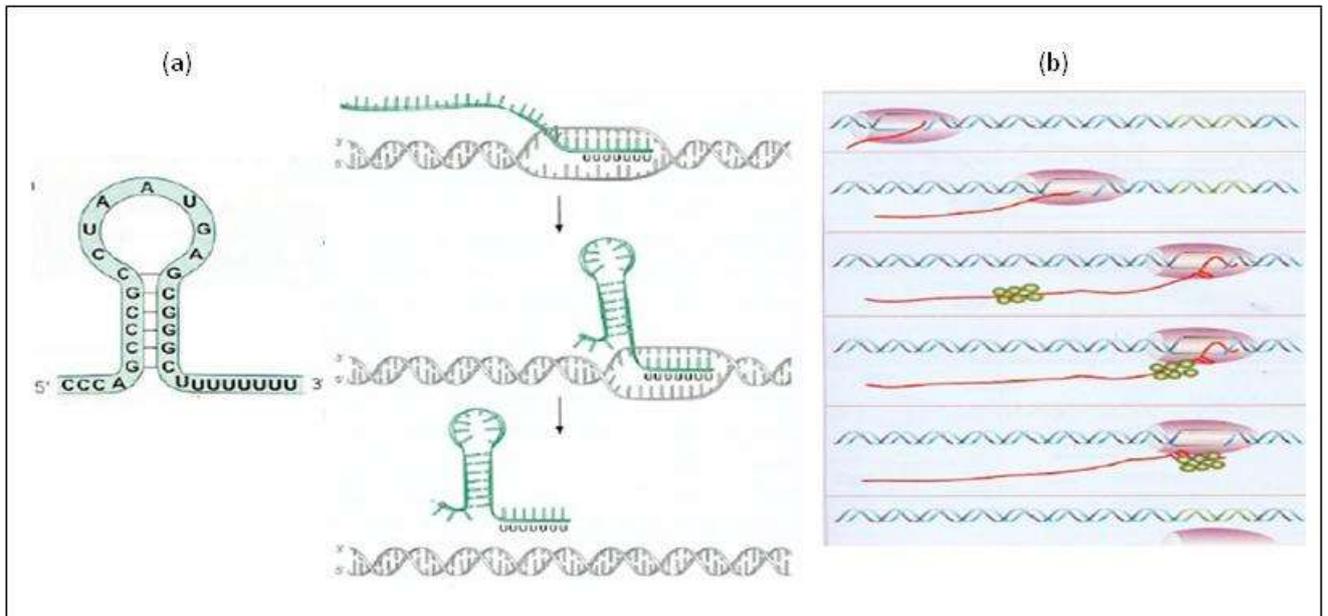


Figure 3 : Terminaison de la transcription. (a) de type Rho indépendante, (b) de type Rho dépendante

**Remarque :** Rho est une protéine de 6 unités qui fixe l'ARN simple brin sortant de la polymérase, elle contient une activité ATPase qui sépare l'ARN de la matrice.

## 2. Traduction chez les procaryotes

La traduction est l'étape durant laquelle l'ARNm est lu sur le ribosome ; et se traduira en une séquence d'acide aminé correspond à la protéine codée.

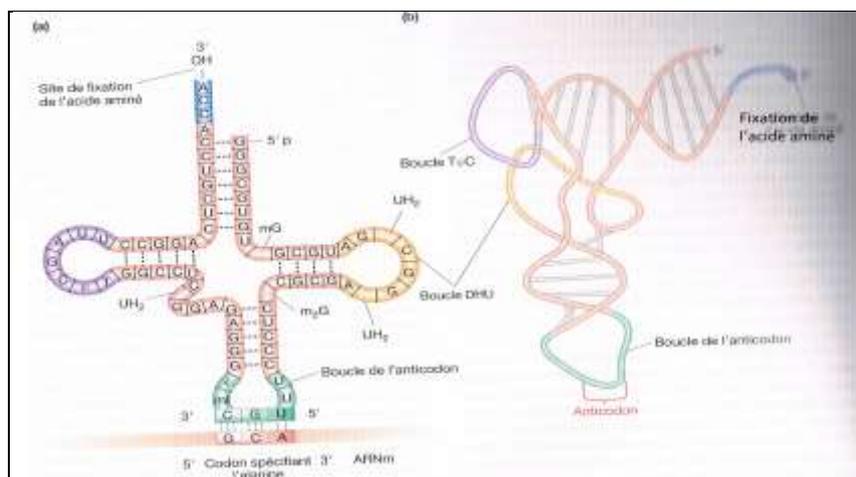
### 2.1. La machinerie traductionnelle

#### a) le code génétique

- La traduction de l'information génétique située sur la séquence de l'ARNm en séquence protéique s'effectue en suivant le code génétique.
- Il existe 64 codons, 61 codons représentent les 20 acides aminés composant les protéines et 3 codons représentent les signaux de terminaison de la traduction (codons stop : UAG, UAA, UGA).
- Chaque codon correspondant à un acide aminé spécifique lu par un ARNt spécifique (le code n'est pas ambiguë).
- Chaque acide aminé correspond à plusieurs codons : le code génétique est donc **dégénéré**, plusieurs codons peuvent spécifier le même acide aminé.

#### b) les ARNt

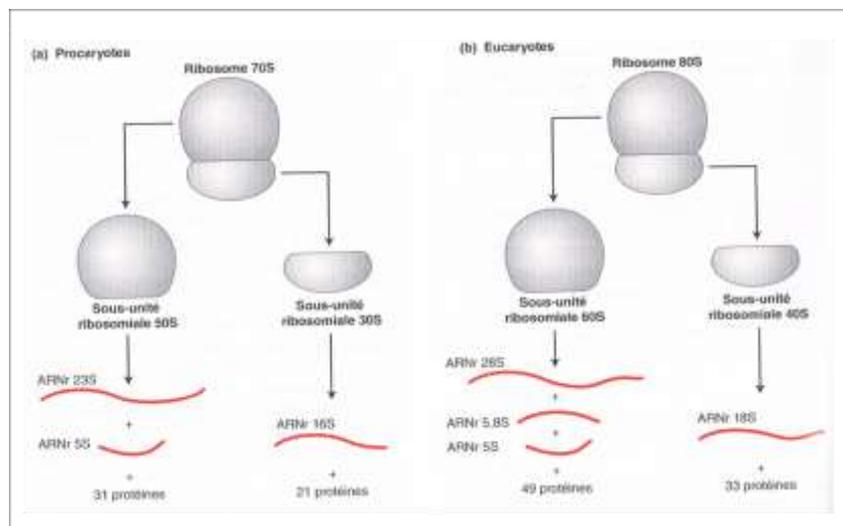
- Les ARNt sont des molécules adaptatrices qui permettent la correspondance codon-acide aminé grâce à leur structure : anticodon et site d'attachement de l'acide aminé (Fig.4).
- Reconnaissance et attachement de chaque acide aminé à un ARNt particulier par les aminoacyl ARNt synthétases. Il existe 20 acides aminés, 20 aminoacyl ARNt synthétases et un nombre d'ARNt qui diffèrent suivant les espèces (au moins 31).
- Code dégénéré : wobble : flottement dans l'appariement entre le nucléotide 3' du codon et le 5' de l'anticodon. Quelques ARNt s'apparient à plus d'un codon. Quelques acides aminés peuvent être chargés sur plusieurs ARNt différents.



**Figure 4 : Structure de l'ARN de transfert. (a) la structure de l'ARNt de l'alanine de levure, montrant l'anticodon de l'ARNt fixé à son anticodon complémentaire dans l'ARNm. (b) un schéma de la structure réelle de l'ARNt de la phénylalanine de la levure.**

### c) les ribosomes

- Les ribosomes bactériens et eucaryotes sont assez semblables. 100000 à des millions de ribosomes/cellule.
- Deux sous unités formées de l'association de nombreuses protéines (ribosomales) et de plusieurs molécules d'ARN (ARNr) (Fig.5).
- Ribosomes procaryotes (70S) : sous unité 30S (21 protéines + ARNr 16S), sous unité 50S (31 protéines + ARNr 23S + ARNr 5S).
- Ribosomes eucaryotes (80S) : sous unité 40S (30-35 protéines + ARNr 18S), sous unité 60S (40-50 protéines + ARNr 28S, 5S, 5,8S).
- La petite sous unité fait correspondre l'ARNt-codon de l'ARNm
- La grande sous unité catalyse la formation des liaisons peptidiques entre acide aminé et les 3 sites de liaison pour les ARNt : site A (ARNt chargé de son aa), site P (ARNt chargé de la chaîne peptidique en formation), site S (site de sortie).



**Figure 5 : Les molécules de protéines et d'ARNr constituent les deux sous-unités d'un ribosome. (a) chez les procaryotes, (b) chez les eucaryotes.**

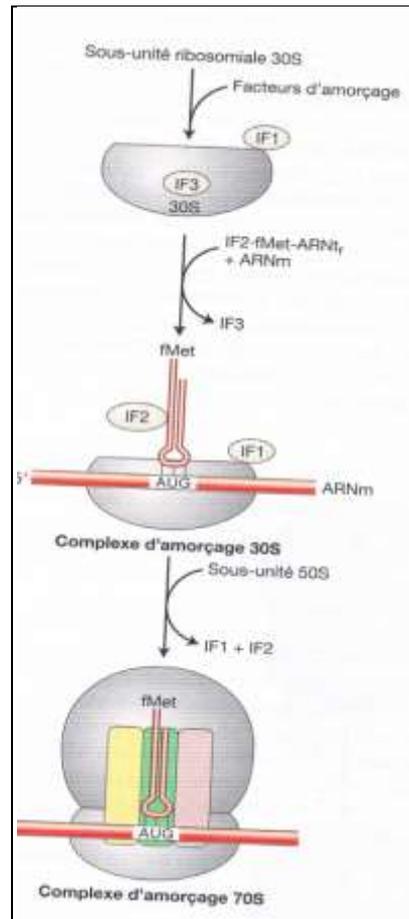
## 2.2. Etapes de la traduction

### a) initiation de la traduction

La traduction commence par le codon AUG, un ARNt initiateur est nécessaire pour débiter la traduction. L'ARNt initiateur chargé (ARNt-N formylméthionine chez les bactéries « ARNt-fMet », ARNt- méthionine I chez les eucaryotes) se fixe au site P de la petite sous unité ribosomale avec des facteurs protéiques d'initiation (IF). La petite sous unité chargée se fixe au 5' de l'ARNm puis fixation de la grande sous unité ribosomale (Fig. 6).

- Pour les ARNm procaryotes : présence d'une séquence Shine-Dalgarno en amont de l'AUG capable de s'apparier à l'ARN 16S de la sous unité 30S.

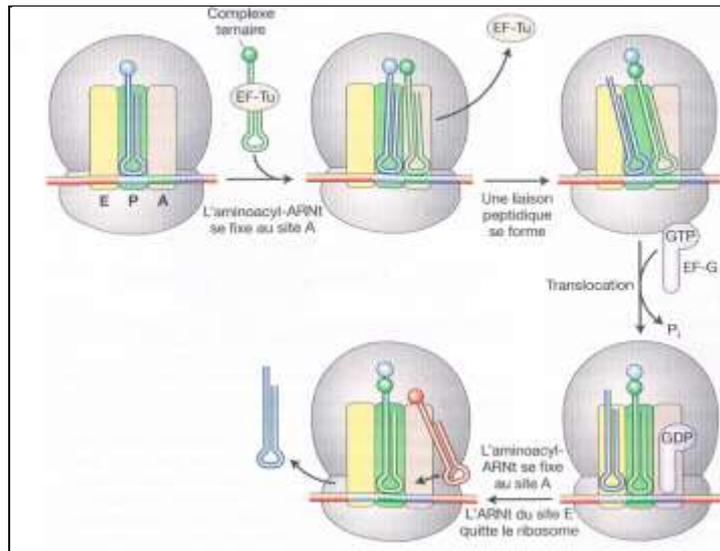
- Pour les eucaryotes : présence de la « coiffe » reconnue par le ribosome et déplacement jusqu'au premier AUG.



**Figure 6 : L'amorçage de la traduction chez les procaryotes.** (Les facteurs de traduction IF sont nécessaires à la fixation des ARNt-fMet au complexe 30S-ARNm. Ils sont libérés après la fixation de la sous unité 50S).

### b) élongation

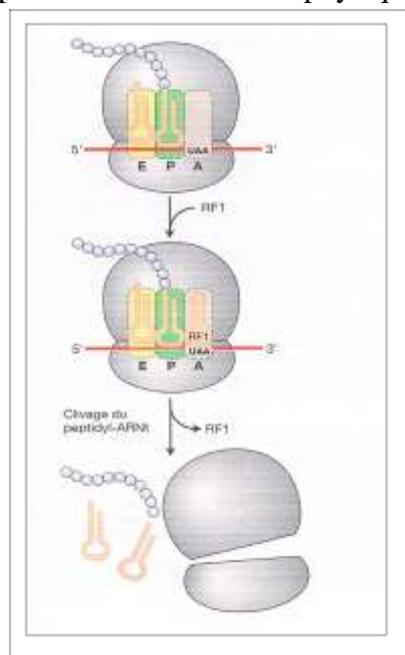
- L'ARNt chargé de l'acide aminé suivant (aa2) se fixe au site A.
- Rupture de la liaison ARNt-aa1 au niveau du site P et liaison peptidique entre l'aa1 libre et l'aa2 lié à son ARNt au niveau du site A. La réaction est catalysée par l'enzyme peptidyl transférase qui est une partie de la grande sous unité du ribosome (Fig.7).
- Mouvement du ribosome le long de l'ARNm de 5' en 3', translocation de 3 nucléotides qui libère le site A et le cycle est recommencé (de 2 à 20 aa sont ajoutés par seconde).



**Figure 7 : Les étapes de l'élongation de la traduction**

### c) terminaison

- Reconnaissance des codons stop par des facteurs protéiques de relargage (facteurs de terminaison « RF ») (Fig. 8).
- La chaîne peptidique et l'ARNm sont libérés, dissociation du ribosome (qui peut se réassembler pour une nouvelle synthèse protéique).
- Chez les bactéries : transcription et traduction sont simultanées.
- Chez les eucaryotes : transcription et traduction sont physiquement séparées.



**Figure 8 : La terminaison de la traduction**

**Remarque :** La traduction se fait sur des polysomes. Une même molécule d'ARNm est traduite par plusieurs ribosomes.

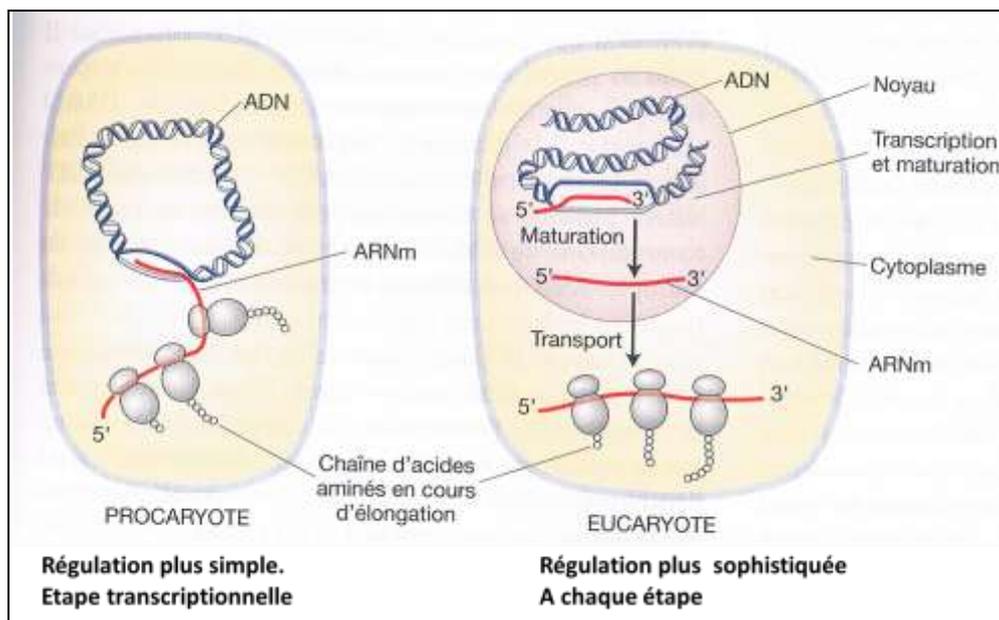
**Chapitre 2**  
**Régulation de la transcription chez les**  
**procaryotes**

Pourquoi y a-t-il la régulation de l'expression des gènes? La question posée dans ce chapitre est celle du choix des portions du génome devant être exprimées à un moment donné dans un environnement donné, donc il s'agit de répondre aux conditions changeantes de l'environnement immédiat.

Le contrôle de l'expression des gènes est gouverné principalement par des protéines de liaison à l'ADN qui reconnaissent des séquences spécifiques de contrôle dans le gène. Il existe deux modes de régulation de l'expression d'un gène cible par une molécule régulatrice :

- La régulation positive : l'interaction déclenche la transcription du gène
- La régulation négative : l'interaction empêche la transcription du gène

**Les différents niveaux de régulation** se mettent en place pour assurer le bon fonctionnement de la cellule. Cette dernière doit réguler les différentes étapes de la synthèse de ses protéines, il existe un contrôle au niveau transcriptionnel, au niveau traductionnel et post-traductionnel (Fig. 9).



**Figure 9 : Les différents niveaux de régulation**

Chez un organisme unicellulaire (les procaryotes), les demi-vies de la plupart des ARNm sont courtes, de l'ordre de quelques minutes. Ainsi, la transcription et la traduction sont couplées et se réalisent dans le même compartiment cellulaire. En plus, une bactérie possède un temps de génération très court et doit pouvoir répondre rapidement à des changements de son environnement, de ce fait, le point de contrôle majeur de la régulation chez les procaryotes est l'initiation de la transcription.

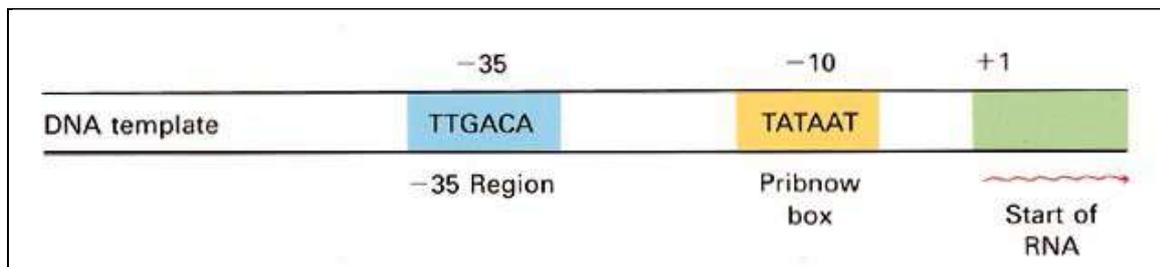
## 1. Régulation de la transcription chez les procarotes

### 1.1 Stratégies de contrôle de l'initiation de la transcription

Il existe deux modes distincts de contrôle de l'initiation de la transcription : un **contrôle constitutif** qui dépend de la structure du promoteur et un **contrôle de régulation** qui est sous la dépendance de protéines régulatrices.

#### a) Contrôle constitutif

La structure du promoteur est une séquence de nucléotides située en amont du point de départ de la transcription du gène. La région promotrice comporte des différences dans la composition des boîtes -35 et -10 ce qui permettent aux gènes d'être exprimés à différents niveaux (Fig. 10).



**Figure 10 : Promoteur bactérien**

En plus, les changements dans les sous-unités  $\sigma$  de l'ARN polymérase constituent un mécanisme de contrôle au niveau de l'initiation de la transcription. Ceci peut être accompli en synthétisant ou en activant une sous-unité  $\sigma$  différente de l'ARN polymérase qui reconnaît un ensemble distinct de séquences promotrices (Voir figure 1, chapitre 1).

L'expression constitutive est une expression en tout temps des protéines nécessaires à la survie et à la croissance bactérienne. Généralement, ces protéines sont impliquées dans :

- la synthèse de l'ADN et de l'ARN
- la synthèse des protéines
- le transport des électrons
- et constituent des enzymes métaboliques

Ce genre de régulation est important, mais il ne permet pas à la cellule d'ajuster l'expression de ses gènes d'une façon dynamique face aux changements environnementaux.

#### b) Contrôle de régulation

Les bactéries expriment seulement un sous ensemble de leurs gènes à un moment donné puisque l'expression de tous les gènes d'une façon constitutive serait énergétiquement inefficace.

Chez les bactéries ce ne sont pas tous les promoteurs qui sont constamment accessibles à l'ARN polymérase et les gènes qui sont exprimés sont essentiels pour traiter les conditions environnementales courantes, telles que le type de source disponible de nourriture. Les molécules spécifiques qui sont présentes dans le milieu (et dans la cellule) déterminent quels sont les gènes qui seront transcrits.

Dans une régulation contrôlée, l'expression des enzymes spécifiques exigées pour le métabolisme des molécules particulières peut être induite ou réprimée sur demande.

### 1.2 Protéines de régulation transcriptionnelle

Les protéines de régulation sont souvent appelées facteurs de transcription. Dans les bactéries, le site de liaison de ces facteurs est souvent proche du site d'initiation de la transcription. Ces séquences sont appelées séquences opérateurs (Fig. 11).

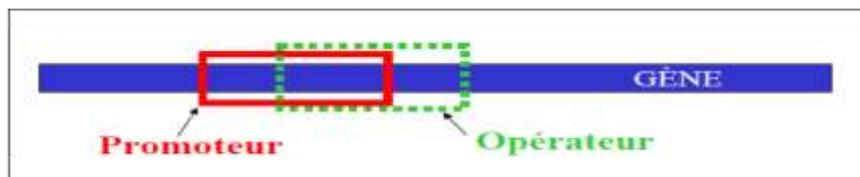


Figure 11: Le site opératoire.

Il existe deux classes principales :

- **Les activateurs** : ils stimulent l'initiation de la transcription (ex. la protéine CAP). Leur liaison augmente la fréquence de la liaison de l'ARN polymérase sur le promoteur ou aide l'initiation de la transcription.

- **Les répresseurs** : protéines qui inhibent la transcription et empêchent l'expression d'un gène. Leur liaison prévient l'association de l'ARN polymérase avec le promoteur. Les répresseurs se fixent sur le site **opérateur**.

Les répresseurs peuvent se combiner avec des **effecteurs** (petites molécules), ce qui affecte considérablement leur capacité de lier leur opérateur. 2 sortes d'effecteurs :

- \* *Inducteur*: Baisse l'affinité de liaison du répresseur sur l'opérateur (ex. liaison du lactose au répresseur lac I).

- \* *Co-Répresseur*: Augmente l'affinité de liaison du répresseur sur l'opérateur. Le répresseur n'est pas actif lorsque le co-répresseur est absent (ex. le tryptophane pour le répresseur trp).

Les modes de régulation se définissent selon leur action en contrôle négatif et contrôle positif.

### 1.3 Contrôle négatif –positif (Fig. 12)

- Les gènes sous **contrôle négatif** sont exprimés sauf si une protéine répresseur empêche leur expression. **Le répresseur** peut avoir besoin d'un corépresseur (cas de l'opéron tryptophane). Une protéine répresseur peut se fixer à l'ADN pour empêcher l'ARNpol d'initier la transcription ou bien se lier à l'ARNm pour empêcher le ribosome d'initier la traduction.

- L'expression des gènes sous **contrôle positif** n'est possible qu'en présence d'une protéine régulatrice activatrice. **L'activateur** peut avoir besoin d'un inducteur pour être actif (cas de Oxy R).

On distingue :

- **Les opérons inductibles** fonctionnent seulement en présence de **l'inducteur**

- **Les opérons répressibles** fonctionnent seulement en absence de **corépresseur**

- **Autorégulation** : ni inducteur, ni corépresseur, c'est la protéine elle-même qui agit (ex. protéine AraC de l'opéron arabinose).

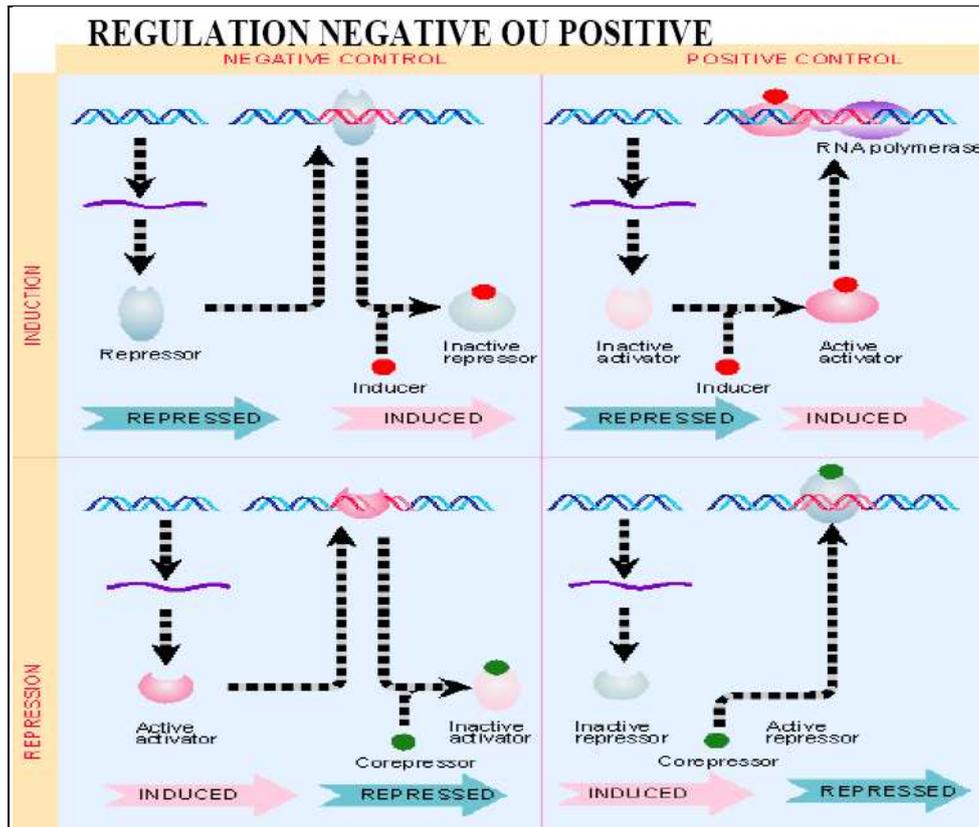


Figure 12: Le contrôle positif et négatif de l'initiation de la transcription.

**Remarque :**

La répression des catabolites fait intervenir une **régulation positive** au niveau du promoteur. Lorsque le glucose est disponible comme source d'énergie, il est préférentiellement utilisé (même en présence d'autres sucres). Ce choix est fait en empêchant l'expression de plusieurs opérons dont les opérons lactose, galactose et arabinose. Cet effet s'appelle la **répression catabolique** (ex : protéine CAP dans l'opéron lactose).

## **Chapitre 3**

### **Modulation de l'expression**

#### **3.1 et 3.2 Le système lactose : contrôle négatif et la répression catabolique (contrôle positif)**

## 1. Bref rappel des termes

- ✓ **Induction:** déclenchement de la synthèse d'une protéine.
- ✓ **Répression:** stopper la synthèse d'une protéine.
- ✓ **Opéron :** unité d'expression et de régulation des gènes bactériens, comprenant des gènes structuraux et des éléments de contrôle dans l'ADN, reconnue par des produits de gènes régulateurs. Dans ce cas, l'ARNm est **polycistronique**, c'est-à-dire qu'il contient l'information nécessaire à la synthèse des différentes protéines.
- ✓ **Cistron :** est une région du génome correspondante à l'unité de codage pour une chaîne polypeptidique.
- ✓ **Un ARN polycistronique :** est un ARN messager (ARNm) contenant plusieurs cistrons consécutifs, et donc codant plusieurs chaînes polypeptidiques.
- ✓ **Régulation cis/trans :** la séquence se trouve au voisinage du gène qui agit directement sur la transcription « régulation en cis ». La séquence est éloignée, le produit est une protéine agit en trans sur le gène cible « régulation en trans ».
- ✓ **Cis / Trans :** en 1961 Jacob et Monod établissent le modèle de l'expression dans lequel ils distinguaient 2 sortes de séquences d'ADN : agissant en **trans** protéines en général, agissant en **cis** (séquence d'ADN en général).

**TRANS:** tout produit d'un gène, libre de diffuser pour trouver sa cible.

**CIS :** séquence d'ADN qui n'est pas transformée en une autre molécule mais qui ne fonctionne exclusivement *in situ* sous forme d'une séquence d'ADN ne touchant que l'ADN auquel elle est physiquement liée, comme par exemple : Les marqueurs de début et de fin de l'unité de transcription sont le promoteur et le terminateur, exemples de sites agissant en **cis** (appelés aussi opérateurs) reconnus par l'ARN polymérase agissant en **trans**.

- ✓ **Gène structural :** gène codant pour une protéine ayant une fonction spécifique dans la cellule.
- ✓ **Gène régulateur :** impliqué dans le contrôle de la réplication, la transcription et la traduction.

On peut différencier les gènes structuraux des gènes régulateurs par les conséquences de leurs mutations. Une mutation dans un gène structural prive la cellule de l'enzyme codée par ce gène tandis qu'une mutation dans un gène régulateur influence l'expression de tous les gènes structuraux qu'il contrôle.

- ✓ **Opérateur :** une région de l'ADN sur laquelle se fixe un répresseur pour contrôler l'expression d'un gène ou d'un groupe de gènes.
- ✓ **Promoteur :** une région d'ADN en amont du site d'initiation de la transcription sur laquelle l'ARN polymérase peut se lier.

## 2. Contrôle négatif de l'opéron lactose

### 2.1. Structure de l'opéron lactose

La bactérie trouve sa source de carbone dans le catabolisme des sucres. Si le glucose est la source de carbone "préférée", le **lactose** (qui est un  $\beta$ -galactoside) peut également être consommé par la bactérie et métabolisé en galactose et glucose. Les enzymes nécessaires à

l'utilisation de lactose ne seront synthétisées qu'en présence de lactose et en absence de glucose, l'utilisation du lactose nécessite 3 enzymes:

- La  **$\beta$ -galactosidase** (gène *lacZ*): enzyme dont le rôle est de convertir le disaccharide lactose en deux monosaccharides, le glucose et galactose, par une hydrolyse de la liaison  $\beta$ 1-4 osidique.
- La **perméase** (gène *lacY*) : Enzyme membranaire qui permet l'entrée du lactose dans la cellule.
- La **thiogalactoside transacétylase** (gène *lacA*) : Elle acétyle les  $\beta$ -galactosides non métabolisables qui peuvent alors être éliminés hors de la cellule par diffusion à travers la membrane plasmique.

Ces trois enzymes ne sont synthétisées qu'en absence de glucose puisse être libéré à partir du lactose. Ont dit que ces trois enzymes sont **induits** par le lactose, le lactose est un **inducteur**.

Ces trois gènes de structure sont précédés par une région responsable de la régulation de leur expression. Cette région régulatrice comprend le **promoteur (P)** et l'**opérateur (O)** (**Fig.13**).

ADN	P	<i>lacI</i>	P O	<i>lacZ</i>	<i>lacY</i>	<i>lacA</i>	
ARNm		1040	82	3510	780	825	
Polypeptide		360		1021	260	275	Acides aminés
		38 000		116 000	30 000	30 000	Daltons
Protéine		Tétramère		Tétramère	Protéine membranaire	Dimère	Structure
		152 000		500 000	30 000	60 000	Daltons
Fonction		Répresseur		$\beta$ -galactosidase	Perméase	Transacétylase	

**Figure 13 : Structure de l'opéron lactose et le gène régulateur *lacI*.**

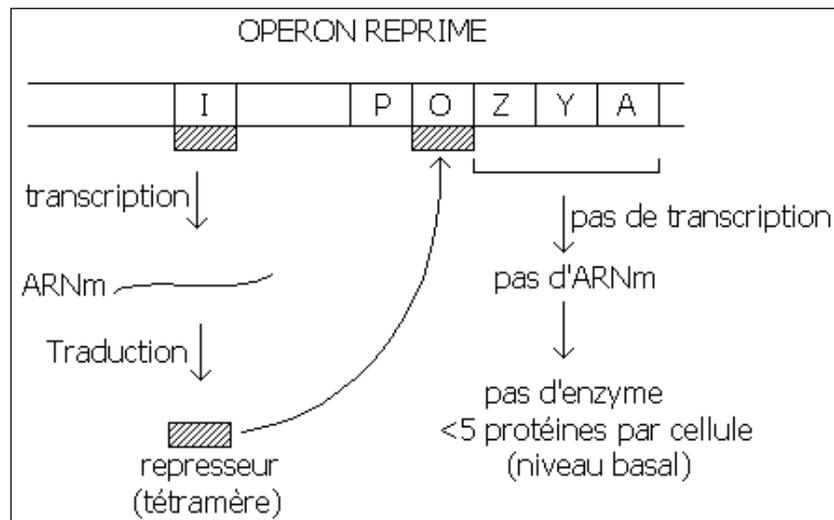
On trouve également en amont de l'opéron lactose, le gène régulateur (*lacI*) qui code une protéine régulatrice (structuralement ce gène ne fait pas parti de l'opéron lactose). Celle-ci agit en inhibant l'expression des gènes de l'opéron lactose par transactivation en se liant spécifiquement sur l'ADN au niveau de l'opérateur. L'expression de ce **répresseur** est constitutive, c'est à dire qu'il est exprimé quelque soient les conditions de croissance de la bactérie. Par contre, son affinité pour l'opérateur sera modifiée en présence de lactose.

## 2.2. Fonctionnement de l'opéron lactose

- **En présence de glucose et absence de lactose (régulation négative)**

En absence de lactose, le répresseur est sous sa forme **active**. Il va se lier spécifiquement au niveau de l'opérateur de l'opéron lactose bloquant l'accès de l'ARN polymérase au site d'initiation de la transcription (Fig. 14). C'est la régulation négative de la transcription des gènes de l'opéron lactose. Les enzymes nécessaires au métabolisme de lactose ne sont pas

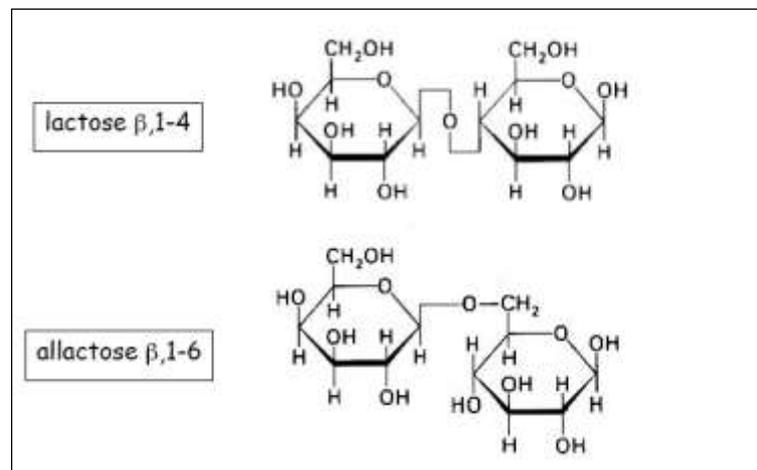
synthétisées car inutiles en absence de lactose. Il y a "**répression**", " l'opéron lactose est réprimé".



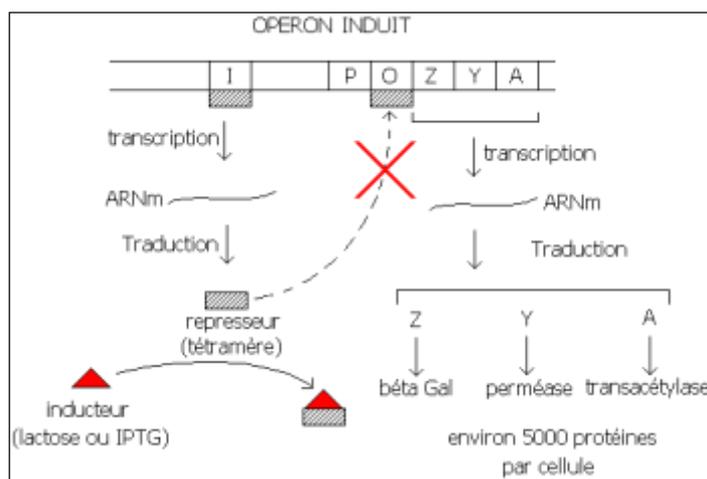
**Figure 14 : Répression de l'opéron lactose en absence de lactose.**

- **En présence de lactose et absence de glucose (l'induction)**

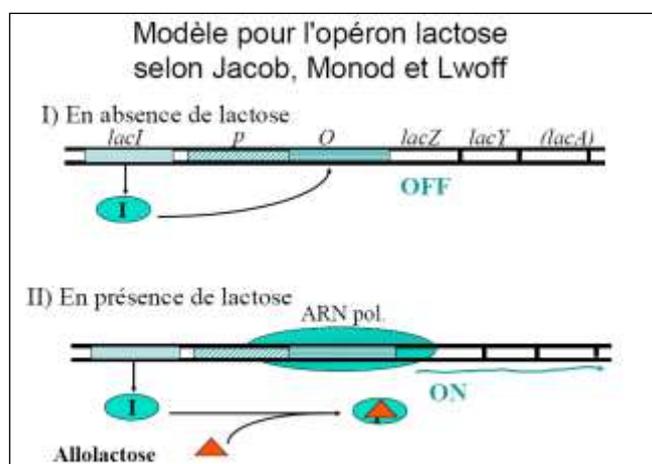
En présence de lactose, c'est l'**allolactose** (Fig. 15), un isomère du lactose, qui va jouer le rôle d'inducteur en se liant au répresseur pour l'inactiver. Cette liaison entraîne un changement conformationnel du répresseur qui perd alors son affinité pour l'opérateur. Le site opératoire étant libéré, l'ARN polymérase peut atteindre le site d'initiation de la transcription et synthétiser l'ARN polycistronique (Fig. 16). La production des enzymes nécessaires au métabolisme du lactose est donc dépendante de la présence du substrat (Fig. 17). On dit donc il y a "**dérépression**" ou "**induction par dérépression**".



**Figure 15 : Structure de lactose et l'allolactose.**



**Figure 16: Induction de l'opéron lactose en présence de lactose et absence de glucose (IPTG : IsoPropylThioGalactoside, induit l'opéron lactose mais n'est pas métabolisé)**



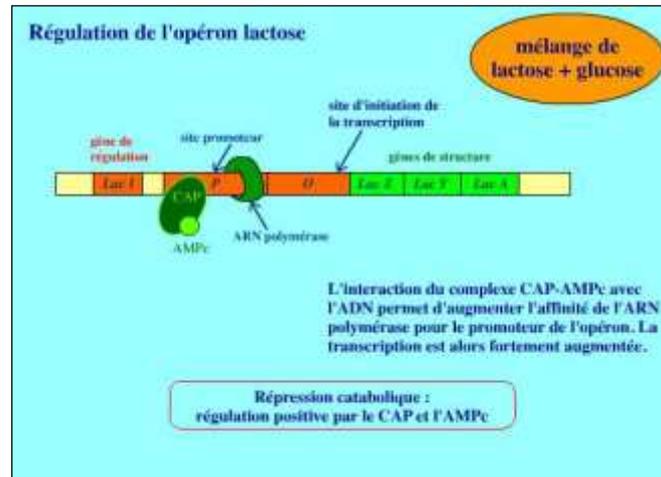
**Figure 17 : Modèle du fonctionnement de l'opéron lactose selon Jacob, Monod et Lwoff**

- **En présence d'un mélange de glucose et lactose**

Lorsque les bactéries disposent en même temps de glucose et de lactose, la situation devient complexe.

Le répresseur de l'opéron lactose est inactivé par l'allolactose, le site opérateur de l'opéron est donc libre et les gènes pourraient être transcrits. Or, tant que du glucose est présent, la bactérie va le métaboliser préférentiellement : elle n'a donc pas besoin des enzymes nécessaires au métabolisme du lactose. Ceci implique l'existence d'un autre mécanisme de régulation que l'on appelle **la répression catabolique** (Fig. 18). Ce n'est que lorsque la concentration en glucose diminue que le métabolisme du lactose devient nécessaire. Un signal de carence alimentaire est alors déclenché sous forme d'une augmentation du taux d'AMPc (l'adénosine monophosphate cyclique). Cet AMPc forme un complexe avec la protéine CAP (pour Catabolite gene Activator Protein, ou CRP pour cAMP Receptor Protein). Ce complexe se lie à l'ADN en amont du site de fixation de l'ARN polymérase. L'interaction du complexe **CAP-AMPc** va agir comme un **inducteur** et augmenter l'affinité de l'ARN polymérase pour le promoteur de l'opéron. **Cette régulation positive** peut permettre d'augmenter 50 fois la

transcription de l'opéron lactose. Ainsi en présence de glucose, il n'y a pas de complexes CAP-AMPc disponibles : le niveau de transcription de l'opéron lactose est donc très faible : l'induction de l'opéron lactose nécessite deux conditions, il faut que le lactose soit présent et que le glucose soit absent.



**Figure 18: Régulation positive de l'opéron lactose par la protéine CAP et AMPc.**

La transcription de l'opéron lactose est sous le contrôle de deux protéines régulatrices :

- le **répresseur lacI** qui se fixe au niveau de l'opérateur en absence de lactose et bloque l'ARN polymérase. C'est une régulation négative,
- la protéine **CAP** (ou **CRP**) qui, sous forme d'un complexe avec l'**AMPc**, se lie à l'ADN et permet d'augmenter l'affinité de l'ARN polymérase pour le promoteur. C'est une régulation positive.

### 3. Mécanisme d'action de la protéine CAP : la répression catabolique

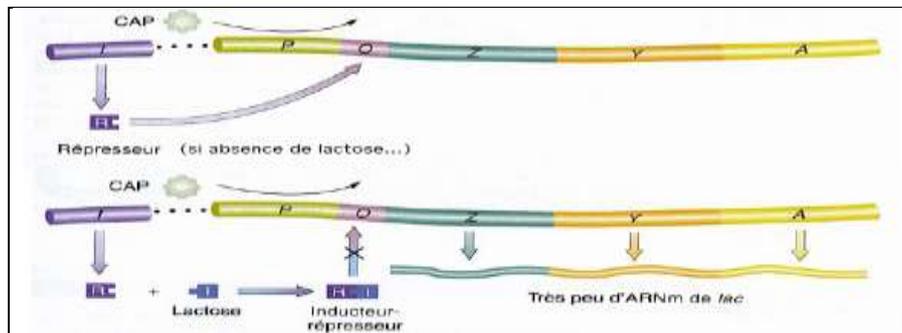
La protéine CAP (Catabolite- Activator Protein; protéine activatrice du catabolisme), agit pour réprimer de manière efficace l'expression de l'opéron *lac* en présence de glucose. Cette inhibition appelée **répression catabolique**, reflète la simplicité du catabolisme par rapport à celui du lactose. La cellule préfère le glucose, si celui-ci est disponible, l'opéron *lac* n'est pas activé, même en présence de lactose. Lorsque le répresseur I est lié à l'inducteur, l'opéron *lac* est activé et l'ARN polymérase transcrit les gènes de structure pour dégradation du lactose. La transcription est initiée par la liaison de l'ARN polymérase sur la séquence nucléotidique de la région promotrice, située en amont (5') de la séquence codante initiatrice. Au sein de l'opéron *lac* le promoteur est localisé entre le gène *I* et la région opératrice *O*. Des expériences minutieuses ont révélé que la liaison de la polymérase n'est efficace que si la CAP est présente. En l'absence de glucose et en conditions d'induction, la CAP exerce un **contrôle positif** se liant au site CAP, favorisant ainsi la liaison de l'ARN polymérase sur le promoteur et donc la transcription. Par conséquent, pour une transcription maximale le répresseur doit être lié au lactose et la CAP doit être lié à son site (Fig.19).

Cela mène à la question principale concernant la CAP, quel rôle le glucose joue-t-il dans l'inhibition de la liaison de la CAP? La réponse à cette question fait intervenir une autre

molécule, l'**adénosine monophosphate cyclique** (AMPc), dont dépend la liaison de la CAP au promoteur.

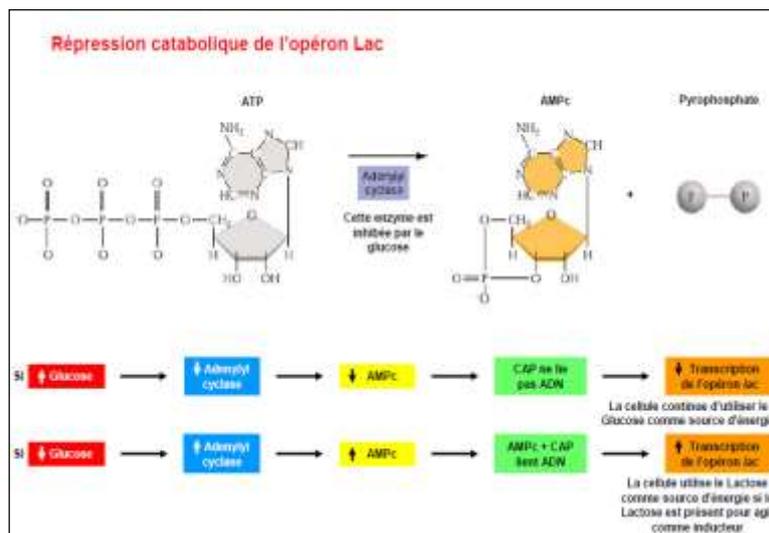
"En raison de son implication l'AMPc, la CAP est aussi appelé CRP (cyclic AMP receptor protein), le gène codant la protéine étant appelé *crp*".

Le taux d'AMPc est lui-même dépendant d'une enzyme, l'**adénylate cyclase**, qui catalyse la conversion de l'ATP en AMPc.



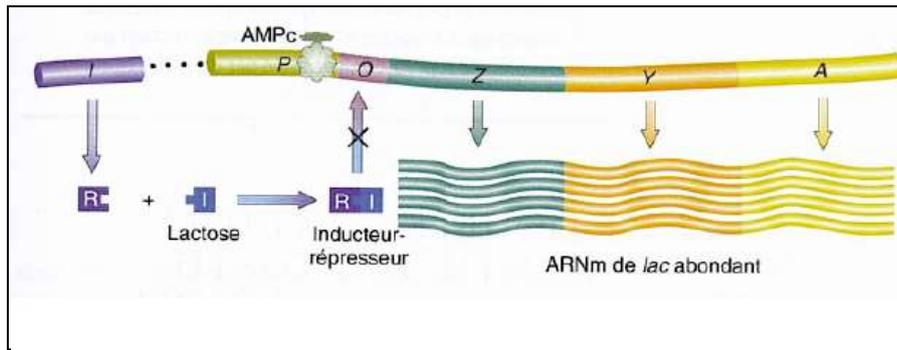
**Figure 19: Le glucose réprime l'opéron lactose**

Le rôle du glucose dans la répression catabolique est d'inhiber l'activité de l'adénylate cyclase, provoquant ainsi une diminution du niveau cellulaire d'AMPc. Dans ces conditions, la CAP ne peut former le complexe CAP-AMPc nécessaire au contrôle transcriptionnel positif de l'opéron *lac* (Fig.20).



**Figure 20 : La répression catabolique le l'opéron lactose.**

La CAP est un dimère qui s'insère dans des régions adjacentes appartenant à une séquence nucléotidique spécifique au niveau du promoteur. Lorsqu'il est lié à l'ADN, le complexe CAP-AMPc tord ce dernier, le forçant ainsi à adopter une nouvelle conformation. Seules, ni l'association CAP-AMPc, ni l'ARN polymérase ne possèdent une affinité suffisante pour se lier au promoteur *lac* et elles sont incapables de se lier l'une à l'autre. Néanmoins, lorsque les deux complexe se trouvent en présence du promoteur *lac*, un complexe de forte cohésion se forme: ce que l'on appelle **liaison coopérative** (Fig. 21). Dans le cas du complexe CAP-AMPc et de l'opéron *lac* ce phénomène illustre le fort degré de spécificité impliqué dans la régulation génétique d'un tout petit groupe de gènes.

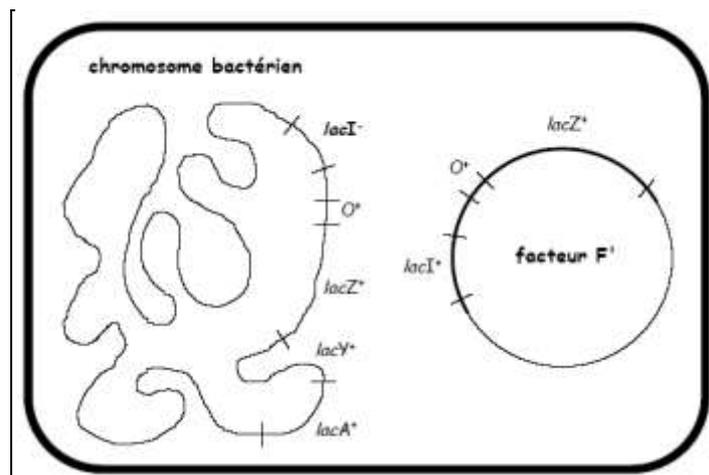


**Figure 21: Activation totale de l'opéron lactose en présence de lactose et en absence de glucose.**

#### 4. Mise en évidence du déterminisme génétique du modèle de l'opéron

Chez *E.coli*, deux protéines sont nécessaires pour métaboliser le lactose. La première enzyme appelé la  **$\beta$ -galactosidase**, clive le lactose en galactose et glucose. La deuxième est une protéine de transport, appelé la **perméase à lactose** qui permet l'entrée de lactose dans la cellule. L'explication du processus a été trouvée à partir de l'isolement de certain nombre de mutants incapables d'utiliser le lactose comme source de carbone (mutants *Lac<sup>-</sup>*).

Une partie des mutations était localisée dans le chromosome bactérien et l'autre partie dans le plasmide F' *Lac* qui porte les gènes d'utilisation de lactose. En réalisant des croisements F' X F', il a été possible de construire des **diploïdes partiels** ayant les phénotypes F' *lac<sup>-</sup>/lac<sup>+</sup>* ou F' *lac<sup>+</sup>/lac<sup>-</sup>* (le génotype du plasmide est à gauche de la diagonale et celui du chromosome est à droite) (Fig. 22). Ces **diploïdes partiels** étaient toujours de phénotype *Lac<sup>+</sup>* (qui fabrique la  **$\beta$ -galactosidase et la perméase**).



**Figure 22 : Les diploïdes partiels**

Par la suite d'autres diploïdes partiels possédant à la fois le plasmide F' *lac* et des gènes *lac* portés par le chromosome bactérien, ont été construits. D'après les phénotypes de ces diploïdes, il a été possible de classer tous les mutants en deux groupes: ***lacZ*** et ***lacY***.

- Les diploïdes partiels F' *lacY*<sup>-</sup> *lacZ*<sup>+</sup> / *lacY*<sup>+</sup> *lacZ*<sup>-</sup> et F' *lacY*<sup>+</sup> *lacZ*<sup>-</sup> / *lacY*<sup>-</sup> *lacZ*<sup>+</sup>: ont un phénotype ***lac*<sup>+</sup>** (inductible) et produisent la **β-galactosidase**.
- Les diploïdes partiels F' *lacY*<sup>-</sup> *lacZ*<sup>+</sup> / *lacY*<sup>-</sup> *lacZ*<sup>+</sup> et F' *lacY*<sup>+</sup> *lacZ*<sup>-</sup> / *lacY*<sup>+</sup> *lacZ*<sup>-</sup>: ont un phénotype ***lac*<sup>-</sup>** (non inductible) ne produisent pas la **β-galactosidase**.

L'existence de deux groupes de complémentation était une bonne indication que le système lactose était composé d'au moins deux gènes.

D'autres expériences ont permis d'établir la fonction précise de chaque gène. En utilisant du lactose marqué au <sup>14</sup>C (radioactif), il a été montré que le (<sup>14</sup>C) lactose ne pénétrait pas dans la bactérie *lacY*<sup>-</sup> alors qu'il pénétrait dans les bactéries *lacZ*<sup>-</sup>. Le traitement des cellules *lacY*<sup>-</sup> par le lysozyme, enzyme qui dégrade la paroi des cellules bactériennes et les rends plus perméables, permet au lactose radioactif d'entrer dans les cellules *lacY*<sup>-</sup>. Ceci indique que le produit du gène *lacY* est impliqué dans le transport du lactose à travers la membrane plasmique et correspond vraisemblablement au gène de structure de la perméase à lactose. D'autre part l'activité enzymatique β-galactosidase ne se retrouve pas chez les mutants *lacZ*<sup>-</sup>. Ces résultats ont permis de montrer que le gène *lacZ* était le gène de structure de la **β-galactosidase**. Des expériences de cartographie génétique ont montré que le gène *lacZ* et *lacY* étaient adjacents.

La nature **arrêt-marche** du système d'utilisation de lactose a été déduite des observations suivantes:

- Lorsque des cellules de *E.coli* en croissance sur un milieu sans lactose ou sans un autre β-galactoside, les concentrations intracellulaires de β-galactosidase et de perméase sont extrêmement faibles, à peu près une ou deux molécules par bactérie. Cependant, lorsque le lactose est présent dans le milieu de culture, le nombre de ces protéines augmente d'un facteur de 10<sup>5</sup> (100000 molécules).
- Le lactose est rarement utilisé dans les expériences d'induction car la β-galactosidase synthétisée clive le lactose, ce qui entraîne une diminution de la concentration en lactose et complique l'analyse de nombreuses expériences, dont les mesures cinétiques. A la place du lactose, deux analogues contenant un atome de soufre ont été utilisés: l'isopropylthiogalactoside (IPTG) ou le thiométhylgalactoside (TMG). Ces deux analogues sont des inducteurs mais ils ne sont pas clivés par la β-galactosidase.

Des mutants synthétisant des ARNm *lac* et donc la β-galactosidase et la perméase, aussi bien en présence qu'en absence d'inducteur, ont été isolés.

Ces mutants qui ne sont plus régulés ont permis de mieux de comprendre le mécanisme d'induction. Ils sont dits **constitutifs**. Les essais de complémentation ont été réalisés par la construction de diploïdes partiels portant deux mutations constitutives, l'une localisé sur le chromosome, l'autre sur un plasmide (le plasmide F peut porter des gènes chromosomiques et dans ce cas on le nomme F'). Ces expériences ont montré que ces mutants se répartissaient en deux groupes: *lacI* et *lacO*<sup>c</sup>.

- **Les mutations du répresseur :**

- ❖ **Les mutants  $lacI^-$  :** le répresseur muté ne peut plus se fixer sur l'**opérateur fonctionnel**. La bactérie est **constitutive [ $lac^c$ ]** : le gène *lacI* est un gène de régulation dont le produit est un inhibiteur qui maintient le système à arrêt. Un mutant *lacI* ne synthétise pas cet inhibiteur ce qui permet au système d'être **constitutivement en marche**.
- ❖ **Les mutants  $lacI^s$  :** Le répresseur muté ne peut plus interagir avec l'**inducteur** et changer sa conformation (super-répresseur). La bactérie est **non inductible [ $lac^-$ ]** : inhibition totale de l'opéron lactose en présence ou en absence d'inducteur (le répresseur est toujours fixé à l'opérateur).

- **Les mutations de l'opérateur:**

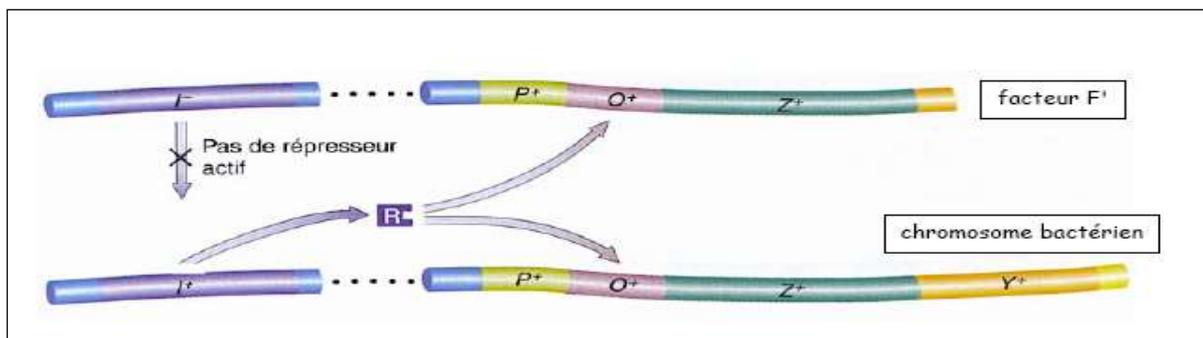
- ❖ **Les mutants  $O^c$  :** Le répresseur fonctionnel ne peut plus se **fixer sur l'opérateur muté**. La bactérie est **constitutive [ $lac^c$ ]**: puisque l'opérateur muté est toujours libre (pas de fixation du répresseur) ce qui permet une synthèse constitutive des deux enzymes la  $\beta$ -galactosidase et la perméase.

- **Les diploïdes partiels**

- ❖  $I^- O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$

Les mutants  **$lacI^-$  sont récessifs**. En absence d'un inducteur, une cellule  $lac^+$  ne synthétise pas l'ARNm *lac*, tandis que cet ARNm est synthétisé par les mutants *lacI*. Les allèles sauvages (fonctionnels) du gène *lacI* sont dominants car dans le cas d'un diploïde partiel  $lacI^+ / lacI^-$ , le système est régulé normalement (Fig. 23). La bactérie est de phénotype **inductible ( $lac^+$ )**.

Dans ce cas on dit que : L'allèle  **$I^+$  est dominant sur l'allèle  $I^-$**  et que les bactéries sont de phénotype [ **$lac^+$  inductible**].



**Figure 23 : Le génotype  $I^- O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$  donne des bactéries de phénotype  $lac^+$**

- ❖  $I^s O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$

Certaines mutations du gène *lacI* ont l'effet inverse de la mutation  $I^-$ . Dans ce cas au lieu d'une absence de liaison du répresseur à l'opérateur, il y aurait synthèse de molécules répressives mutantes incapables d'interagir avec l'inducteur (le lactose). Le répresseur serait alors lié de façon permanente à l'opérateur et les gènes structuraux continuellement réprimés.

En effet, cette mutation a été nommée  $I^s$ , pour laquelle l'opéron est "super-réprimé". Un allèle  $I^+$  supplémentaire ne lève pas la répression qui pèse sur l'activité des gènes structuraux (Fig. 24). Ces observations sont en accord avec l'hypothèse d'un répresseur contenant plusieurs sites allostériques distincts impliqués dans la régulation.

On dit donc que L'allèle  $I^s$  est dominant sur l'allèle  $I^+$  et que les bactéries sont de phénotype [ $lac^-$  non-inductible].

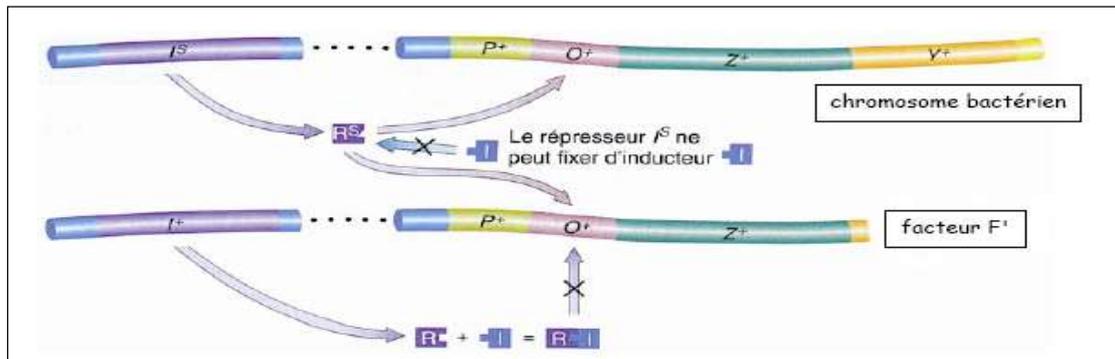


Figure 24 : Le génotype  $I^s O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$  donne des bactéries de phénotype  $lac^-$

❖  $I^+ O^c Z^+ / I^+ O^+ Z^+$

Le répresseur fonctionnel ne peut plus se **fixer sur l'opérateur muté**. L'opérateur  $O^c$  est toujours libre en présence ou en absence de l'inducteur (le lactose) la présence d'un autre opérateur normal (fonctionnel) ne réprime pas l'activation du premier. La bactérie donc est constitutive ( $Lac^c$ ) (Fig. 25).

On dit donc que L'allèle  $O^c$  est dominant sur l'allèle  $O^+$  et que les bactéries sont de phénotype [ $lac^c$  constitutif].

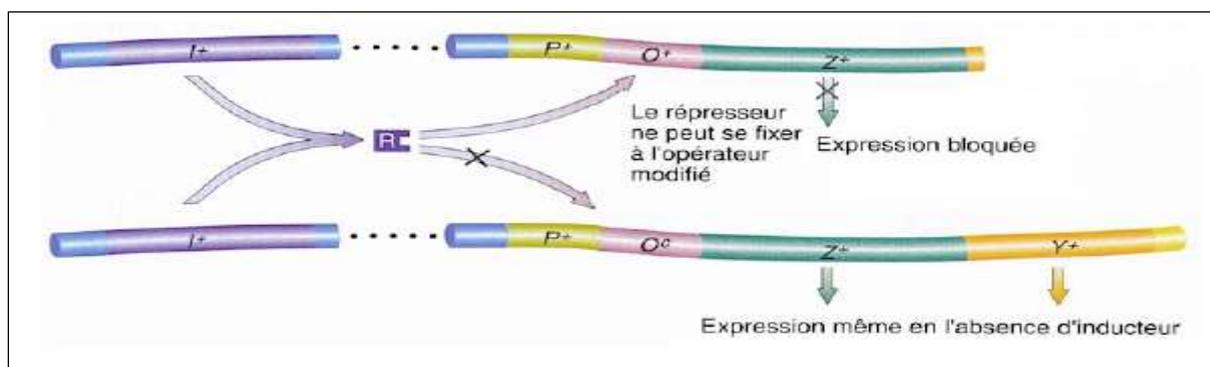


Figure 25 : Le génotype  $I^+ O^c Z^+ / I^+ O^+ Z^+$  donne des bactéries de phénotype  $lac^c$

**Remarque:**

La combinaison  $I^+ O^c \underline{Z^-} / I^+ O^+ Z^+$  donne des bactéries **inductibles** car: **en absence** de l'inducteur, l'opérateur  $O^+$  est occupé par le répresseur I, donc pas d'expression, alors que l'opérateur  $O^c$  même il est libre (muté; pas de fixation du répresseur) il y aurait pas de synthèse puisque le gène est  $Z^-$ . **En présence** de l'inducteur, l'opérateur  $O^+$  est libre (le répresseur est lié avec l'inducteur), donc il y aurait une synthèse de l'ARNm lac. Alors que le gène  $Z^-$  n'est pas exprimé (C'est le phénotype inductible).

La combinaison  $I^+ O^c \underline{Z^+} / I^+ O^+ \underline{Z^-}$  donne des bactéries **constitutive**: les gènes  $lacO^c$  et  $lacZ^+$  sont portés par la même molécule d'ADN. La mutation  $lacO^c$  est dite **cis-dominante**, puisque cette mutation n'agit que sur les gènes localisés en cis.

**Chapitre 3**  
**Modulation de l'expression**  
**3.3 L'opéron arabinose**

L'opéron arabinose est un opéron inductible unique car la même protéine régulatrice est capable d'exercer un contrôle positif ou négatif et donc induit ou réprime l'expression des gènes.

### 1. Structure et fonctionnement de l'opéron *ara*

Le métabolisme du sucre arabinose dépend des produits enzymatiques de trois gènes de structure, *araA*, *B*, et *D* (Fig. 26).

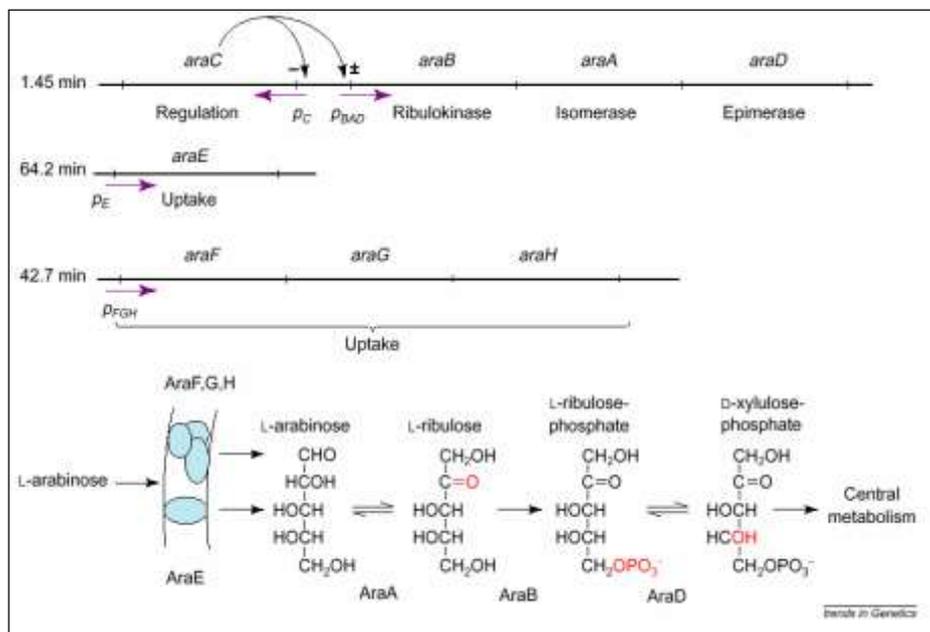
*araA*: isomérase convertissant le L-arabinose en L-ribulose

*araB*: kinase responsable du transfert d'un phosphate (P) sur le L-ribulose

*araD*: épimérase convertissant le L-ribulose-5-P en D-xylulose-5-P

**NB** : l'ordre structural des gènes est B, A, D

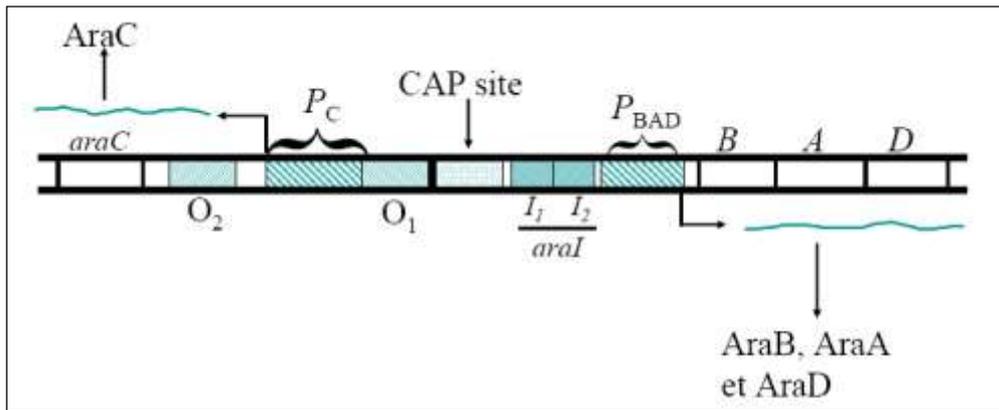
Ces trois protéines structurales sont toutes des enzymes requises pour convertir l'arabinose en D-xylulose-5-Phosphate. Le D-xylulose-5-Phosphate peut ensuite entrer dans la voie des Pentoses Phosphate et générer de l'énergie pour assurer les fonctions cellulaires.



**Figure 26 : Les enzymes nécessaires à l'utilisation de l'arabinose.**

La transcription des trois gènes de structure est contrôlée par la protéine régulatrice AraC, codé par le gène *araC*. La protéine AraC interagit avec deux régions régulatrices *araI* et *araO2*. Ces sites peuvent être liés à la protéine AraC, individuellement ou de manière coordonnée.

Une région opératrice supplémentaire ( $O_1$ ) est également présente, la protéine AraC se fixe sur  $O_1$  pour contrôler son taux intracellulaire (autorégulation) (Fig. 27).

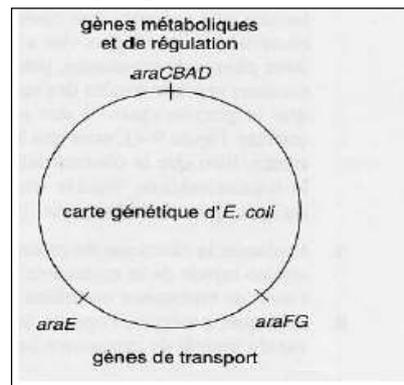


**Figure 27: La structure de l'opéron arabinose.**

Comme l'opéron *Lac*, l'opéron *Ara* code pour trois protéines structurales *AraBAD*, contrôlées également par le régulateur général CRP (CAP) et par une protéine régulatrice spécifique *AraC*.

**Remarque :**

Un groupe de gène : *araE*, *araFGH*, code pour un système de transport du L-arabinose, ailleurs dans le chromosome « ne fait pas partie de la structure de l'opéron » (Fig. 28).



**Figure 28 : Localisation des gènes impliqués dans le métabolisme de l'arabinose.**

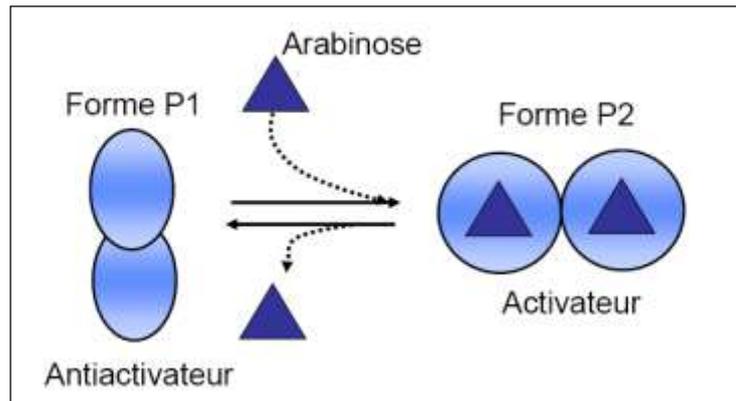
**Remarque :** le gène *araH*, n'est pas présenté sur la figure 28, mais il est adjacent aux gènes *araFG* (Voir figure 26)

**2. Régulation de l'opéron arabinose**

**a) le régulateur *araC* :** est un homodimère, avec un domaine de fixation à l'ADN (côté *C-ter*) et un site de fixation pour l'arabinose (activateur) (côté *N-ter*). Elle existe sous de forme différente activatrice ou antiactivatrice (Fig.29).

Elle agit comme :

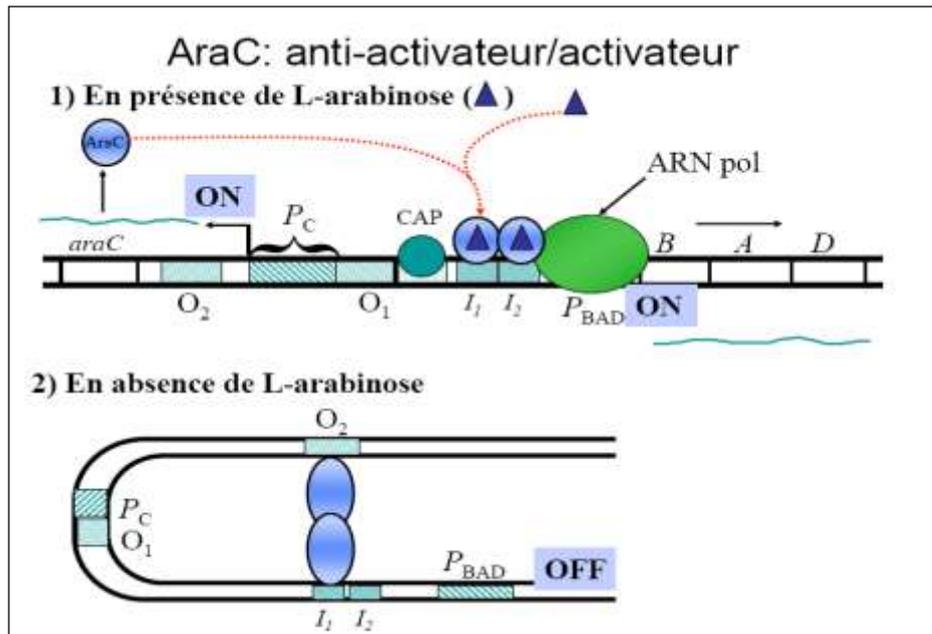
- **régulateur négatif:** se fixe à *araO2* et *araI1*: **En absence d'arabinose** et d'AMPc, la protéine *araC* se lie de façon coordonnée à la fois au site *I* et *O2* (ainsi nommé car il fut le second opérateur découvert dans cette opéron). Lorsque les sites *I* et *O2* sont tous deux liés à *AraC*, un changement conformationnel de l'ADN a lieu, une boucle étroite est formée et les gènes de structure sont réprimés (Fig. 30, 2).
- **régulateur positif:** se fixe à la fois aux *araI1* et *araI2* (*araI*)
- **régule sa propre synthèse** (autorégulation): se fixe à *araO1*
- **provoque la formation de boucles dans l'ADN.**



**Figure 29 : Changement de conformation de la protéine AraC en présence de l'arabinose**

- b) **La région I** porte ce nom car, lorsqu'elle est seule liée à l'AraC, le système est **induit**. Pour que ce phénomène ait lieu, il est nécessaire que l'arabinose et l'AMPc soient tous deux présents. Ainsi, comme pour l'induction de l'opéron *lac*, un site de liaison à la CAP est présent dans la région promotrice et module la répression catabolique en présence de glucose (Fig. 30, 1).
- c) **La région O<sub>2</sub>** est localisée approximativement 200 nucléotides en amont de la région *I*. C'est un dimère d'AraC qui se lie à l'une ou l'autre des régions régulatrices ; lorsque les deux régions sont liées à l'Ara C, les dimères interagissent, provoquant la formation de la boucle qui conduit à la répression. A priori cette boucle empêche l'accès de l'ARN polymérase à la région promotrice. La région d'ADN localisée entre *I* et *O<sub>2</sub>*, qui forme une boucle externe est essentielle à la formation du complexe de répression. Des altérations génétiques, par insertion ou délétion de seulement quelques nucléotides, suffisent à interférer avec la formation de la boucle et par conséquent, avec la répression.

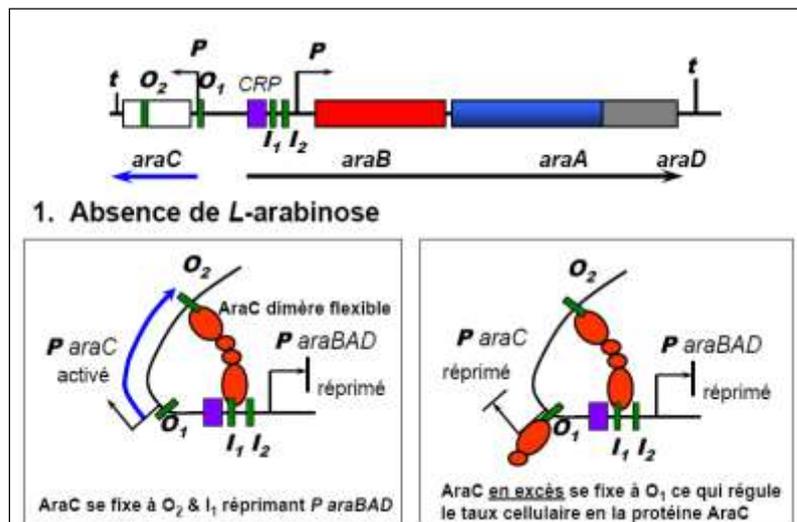
Ces découvertes sur l'opéron *ara* illustrent le degré de complexité atteint pour la régulation d'un groupe de gènes de fonctions liées. Le développement de mécanismes régulateurs a procuré aux systèmes bactériens des avantages sélectifs leur permettant de s'adapter à différents environnements naturels.



**Figure 30: Régulation de l'opéron arabinose en présence et en absence de l'arabinose.**

Il est important de retenir le processus d'action des différents points de contrôle de l'opéron arabinose :

1. L'arabinose est un régulateur positif de la transcription.
2. En l'absence d'arabinose, AraC se fixe aux sites régulateurs  $I_1$  et  $O_2$  ce qui réprime la transcription de l'opéron AraBAD (Fig. 31 et 32).



**Figure 31 : Répression de la transcription des trois gènes Ara BAD en absence de l'arabinose**

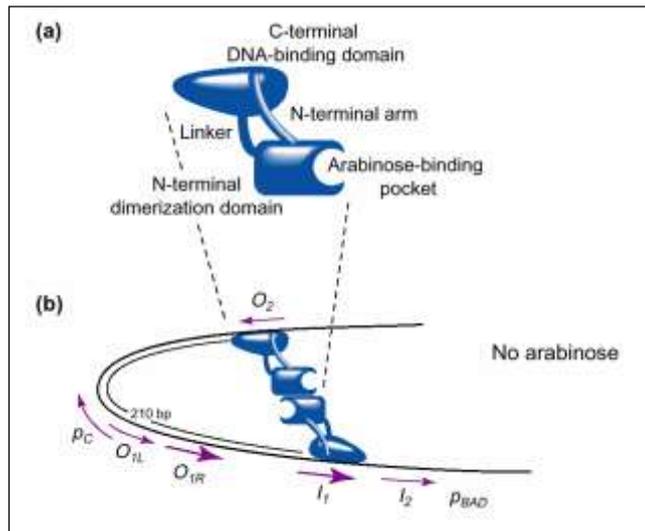


Figure 32 : La fixation de la protéine AraC sur la région O<sub>2</sub> et I<sub>1</sub> provoque la formation d'une boucle d'ADN.

3. Le taux d'AraC est autorégulé, lorsqu'un excès d'AraC se fixe en O<sub>1</sub>
4. Quand l'arabinose est abondant, il se fixe à AraC, AraC se fixe à I<sub>1</sub> et I<sub>2</sub> : la transcription est activée (Fig. 32 et 33).

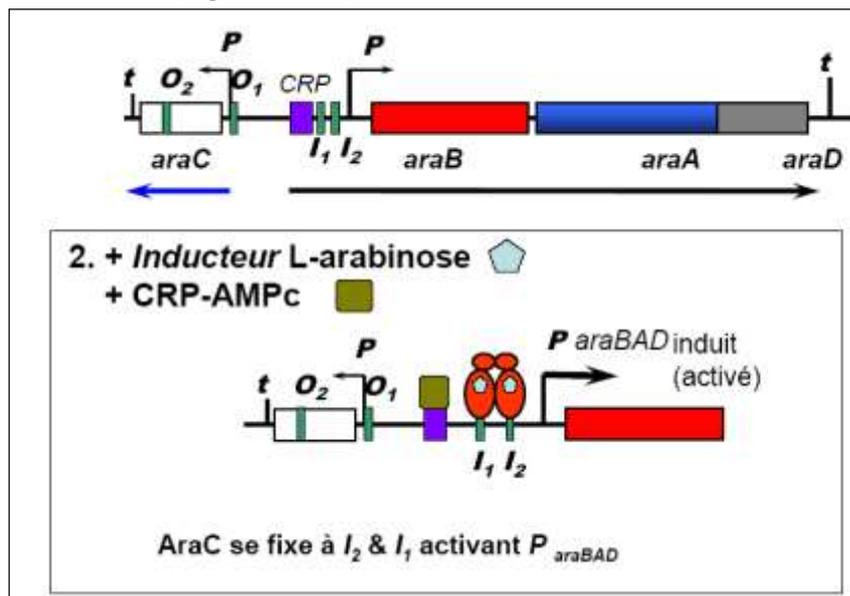
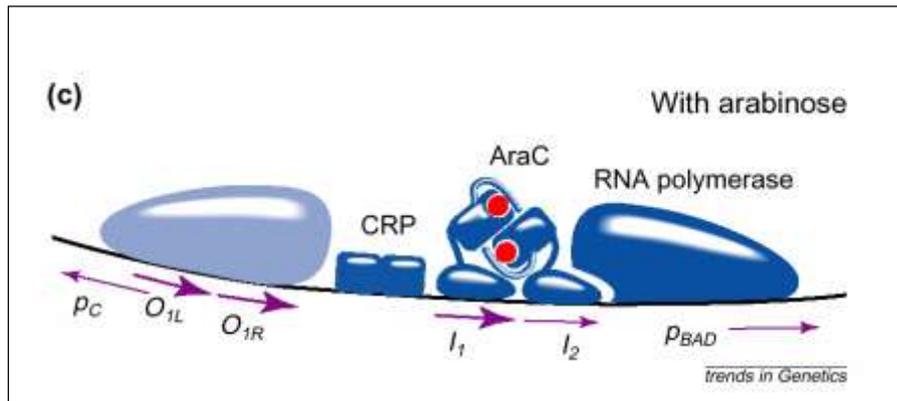


Figure 33 : Activation de la transcription des trois gènes Ara BAD en présence de l'arabinose



**Figure 34: L'association de l'arabinose avec la protéine AraC conduit à un changement de conformation ce qui favorise son attachement sur la région araI**

5. Quand le *Glucose est absent*, le taux d'AMPC s'élève et le complexe *cAMP-CRP* se fixe sur une séquence adjacente à I1. Il y a expression de l'opéron AraBAD.

Glucose	Arabinose	araBAD
fort	faible	réprimé
faible	fort	activé
fort	fort	réprimé
absent	absent	réprimé

**Chapitre 3**  
**Modulation de l'expression**  
**3.4 L'opéron tryptophane**

Les mécanismes d'induction ont été connus et sont les premiers à étudier. Ce n'est qu'en 1953 que Monod et ses collègues découvrirent l'opéron répressible, les souches d'*E.coli* de type sauvage sont capables de produire les enzymes nécessaires à la biosynthèse des acides aminés mais aussi d'autres molécules essentielles. En concentrant ses travaux sur l'acide aminé tryptophane et l'enzyme **tryptophane synthétase**, Monod découvrit que si le tryptophane est présent en quantité suffisante dans le milieu de culture, les enzymes nécessaires à sa synthèse ne sont pas produites. La répression des gènes impliqués dans la production de ces enzymes est énergétiquement très favorable pour les cellules.

La synthèse du tryptophane requiert une série de réactions qui aboutissent au tryptophane. Mais si ces enzymes ne sont pas synthétisés, il y a arrêt de la production de tryptophane.

**Remarque:**

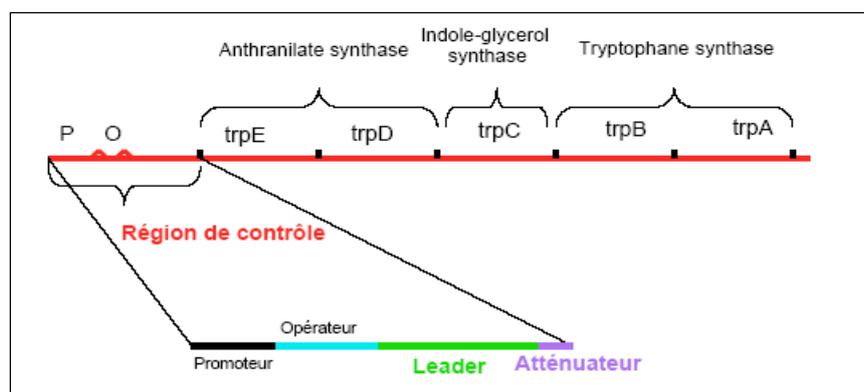
Le tryptophane est un acide aminé : Produit à partir de l'acide chorismique, nécessaire à la synthèse des protéines, peu fréquent dans les protéines « codé par un seul codon », sa synthèse a besoin d'une régulation fine

**1. La structure de l'opéron tryptophane**

L'opéron tryptophane complet est constitué de :

- Cinq gènes structuraux adjacents (*trp* E, D, C, B, A), sont transcrits en un message **polycistronique**, permettant la traduction des enzymes catalysant la biosynthèse du tryptophane.
- Une région promotrice (*trpP*) constitue le site de liaison de l'ARN polymérase et une région opératrice (*trpO*) lie le répresseur. En l'absence de liaison, la transcription est initiée dans la région recouvrant les séquences *trpP* et *trpO* et évolue le long d'une séquence **leader** (guide), 162 nucléotides en amont du premier gène de structure (*trpE*). Au sein de cette séquence leader, il a été identifié un autre site régulateur appelé **atténuateur** (Fig.35).

A une distance assez importante des gènes de structure, on distingue le gène *trpR* codant le répresseur.



**Figure 35: Structure de l'opéron Tryptophane.**

## 2. Fonctionnement de l'opéron tryptophane (Trp)

- **En absence du Tryptophane:** le gène régulateur (*trpR*) synthétise un répresseur qui est dit **inactif**, car il ne se fixe pas sur l'opérateur. On l'appelle "**apo-répresseur**". L'ARN polymérase peut se fixer sur le promoteur et démarrer la transcription. Les gènes de structure sont transcrits, l'ARNm est formé, et les enzymes sont synthétisés. le Trp est donc produit (Fig. 36).
- **En présence du Tryptophane:** l'addition du tryptophane au milieu de culture provoque un brusque arrêt de la synthèse des enzymes impliquées dans la production du trp. On dit que **la synthèse est réprimée** (Fig 36).

### Comment le tryptophane en excès bloque-t-il sa propre synthèse?

Le tryptophane que l'on appelle dans ce cas "**co-répresseur**" se combine au répresseur inactif qui devient alors capable de se fixer sur l'opérateur et le bloque. La RNA polymérase ne peut pas démarrer. La transcription est empêchée, on dit qu'il y a eu répression par le métabolite terminal (dans ce cas le Trp "**rétroinhibition**") qui a donc inhibé sa propre synthèse. Cette synthèse sera bloquée jusqu'à ce que tout le tryptophane soit utilisé par la bactérie. Quand il n'y a plus de Trp dans le milieu, la synthèse redémarre.

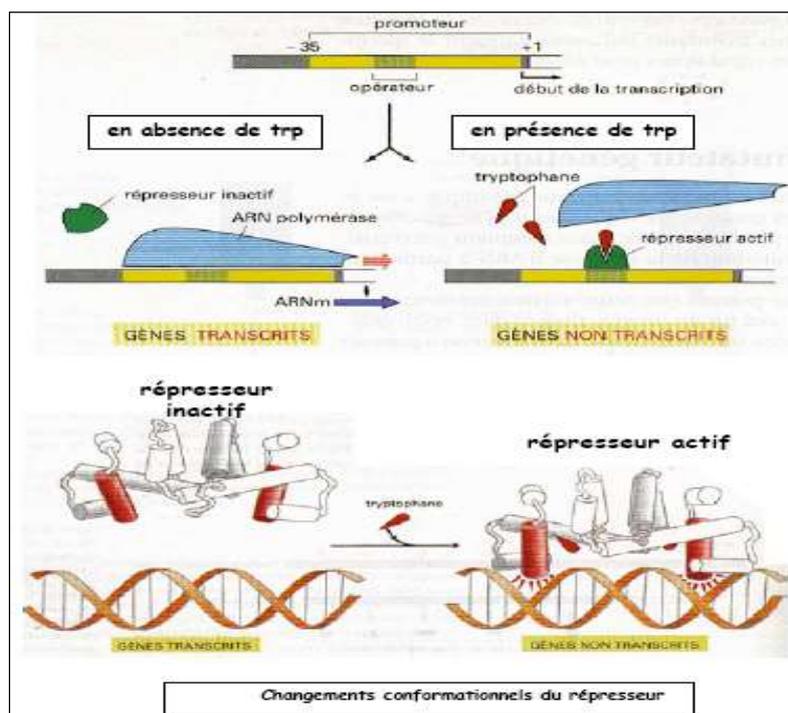


Figure 36: Fonctionnement de l'opéron tryptophane, en présence et en absence du tryptophane

## 3. Comparaison de l'induction et la répression

- **L'induction :** est la levée d'une répression permanente sur commande par un **inducteur**. Il s'agit d'une dérégulation par induction (Ex. les robinets d'eau, de gaz...sont habituellement fermés, et ouvert encas de besoin). Cet exemple de régulation s'observe pour les enzymes cataboliques (ex. la  $\beta$ -galactosidase).

- **La répression : lorsque la synthèse est permanente** mais elle sera interrompue sur commande par le métabolite terminal lui-même (Ex. l'eau coule en permanence dans un bassin est arrêtée lorsque l'eau arrive à un certain niveau). Cette régulation s'observe pour les enzymes anaboliques (comme le cas du tryptophane).
- **L'opéron Trp est très différent de l'opéron lactose:** car le tryptophane agit comme un répresseur et non comme un inducteur. De plus, l'opéron Trp code pour des enzymes appartenant à une **voie de biosynthèse** et non une **voie de dégradation**, ni le glucose, ni l'AMPc-CAP n'interviennent dans sa régulation.

#### 4. Atténuation : processus essentiel de la régulation de l'opéron tryptophane chez *E.coli*

"Atténuation: L'atténuation est une **terminaison prématurée** de la transcription".

##### 4.1. La structure de l'atténuateur

L'atténuateur de l'opéron tryptophane est une séquence ribonucléotidique de 162 bases, située à l'extrémité 5' de l'ARNm polycistronique. Cet ARN est donc synthétisé au niveau du promoteur de l'opéron try **avant** la séquence codante du gène *trpE* (voir figure 35).

L'ARN comprend une séquence codante, située entre les nucléotides **27 à 68** (codon d'initiation AUG à codon stop UGA) permettant la synthèse d'un peptide de 14 acides aminés de longueur : dont **deux codons tryptophane** (en positions 10 et 11, c'est-à-dire quasiment à la fin de la séquence codante) (Fig. 37).

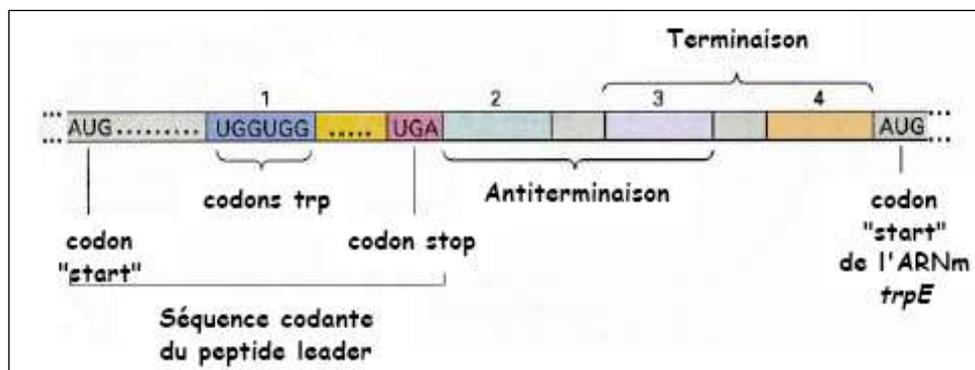


Figure 37: Structure de l'atténuateur

##### 4.2. Processus de l'atténuation:

**Charles Yanofsky, Kevin Bertrams** et leurs collègues observèrent que, même lorsque le tryptophane est présent et que l'opéron tryptophane est réprimé, l'initiation de la transcription peut avoir lieu donnant naissance à la portion initiale de l'ARNm (la séquence leader). Par conséquent, bien que le répresseur actif se lie à la région opératrice, il n'inhibe pas fortement **l'expression initiale** de l'opéron, ce qui suggère qu'il doit exister un mécanisme permettant ensuite au tryptophane d'inhiber la transcription et par conséquent la synthèse enzymatique. Yanofsky découvrit que, suite à l'initiation de la transcription, en présence de **concentrations élevées de tryptophane**, la synthèse de l'ARNm s'achève à environ 140 nucléotides du début du transcrit. Ce processus s'appelle l'atténuation, terme rendant compte d'une expression réduite des gènes de l'opéron.

Toutefois, lorsque le tryptophane est absent ou présent à de très faibles concentrations, la transcription est initiée et ne s'achève pas immédiatement, elle se poursuit au-delà de la séquence leader le long de l'ADN codant les gènes de structure, en commençant avec le gène *trpE*. Un ARNm polycistronique est donc produit et les enzymes nécessaires à la biosynthèse du tryptophane sont traduites.

La séquence d'ADN initialement transcrite donne naissance à une molécule d'ARNm qui peut se replier en deux structures mutuellement exclusives en forme de tige-boucle, que l'on appelle "épingle à cheveux".

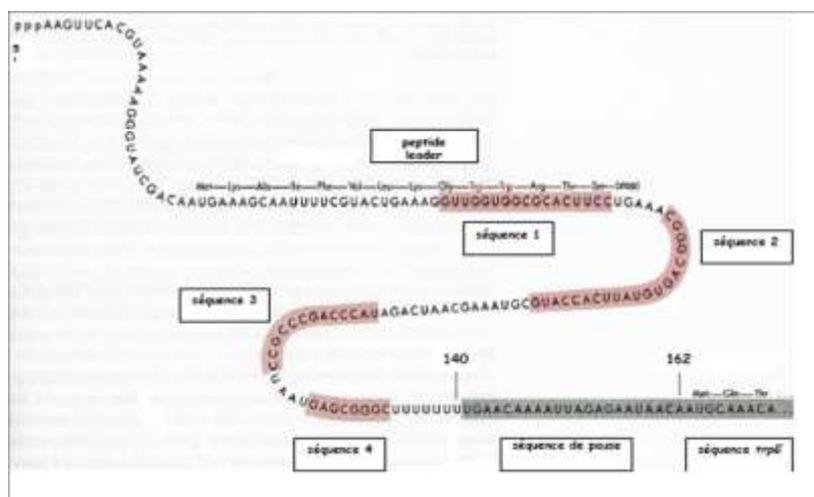
**En présence de tryptophane en excès**, l'épingle à cheveux se comporte comme une structure **terminatrice** et la transcription est presque toujours achevée prématurément.

En revanche, **si le tryptophane se fait rare**, une structure alternative se forme nommée épingle à cheveux **antiterminatrice**. La transcription peut alors dépasser cette structure d'ADN et un ARNm complet est synthétisé.

### 4.3. Comment l'absence (ou la faible concentration) de tryptophane permet de surmonter l'atténuation?

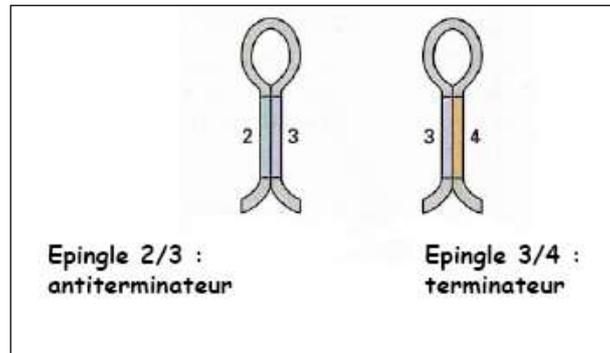
Un élément clé du modèle du Yanofsky est que le transcrit leader doit être traduit pour que l'épingle à cheveux antiterminatrice se forme. Il découvrit que le transcrit leader contient deux triplets (UGG) codant le tryptophane, en aval d'une séquence AUG qui permet l'initiation de la traduction par les ribosomes (Fig. 38). Quand la quantité adéquate de tryptophane est présente, des ARN<sup>t</sup><sub>trp</sub> chargés sont également présents. La traduction se poursuit donc au-delà de ces triplets et l'épingle à cheveux terminatrice se forme (Fig. 5).

Si les cellules sont privées de tryptophane, les ARN<sup>t</sup><sub>trp</sub> chargés ne sont pas disponibles. Par conséquent le ribosome "stagne" au niveau de la traduction de ces triplets, dans l'attente d'ARN<sup>t</sup><sub>trp</sub> chargés non disponible à cause du manque de tryptophane. Cet événement conduit la formation de l'épingle à cheveux **antiterminatrice** dans le transcrit (Fig. 39). L'atténuation est donc surmontée et la transcription se poursuit, permettant ainsi l'expression de l'ensemble des gènes de structure.



**Figure 38: L'ARNm de la séquence LEADER de l'opéron Trp**

4 séquences nucléotidiques (notées 1, 2, 3 et 4) sont des séquences palindromiques qui peuvent conduire à la formation de structures ARN "en épingle à cheveux"



**Figure 39: Structure en épingle à cheveux de la séquence leader après transcription.**

On conclut donc que:

L'atténuation repose sur le fait que la transcription et la traduction sont simultanées chez les bactéries, dans tous les cas, la transcription de l'ARNm tryptophane démarre, l'ARNm tryptophane en cours de synthèse est traduit.

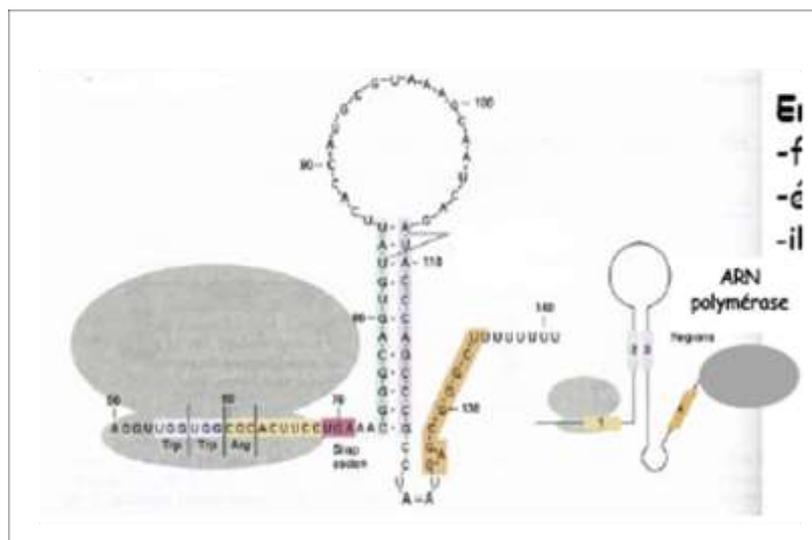
C'est la **position du ribosome** en cours de traduction qui va déterminer la suite des événements :

- atténuation et arrêt de la transcription
- ou poursuite de la transcription

Le **ribosome** pourra avoir **deux positions sur l'ARNm** et selon ces positions, il pourra y avoir formation de deux types de structures en épingle à cheveux différentes :

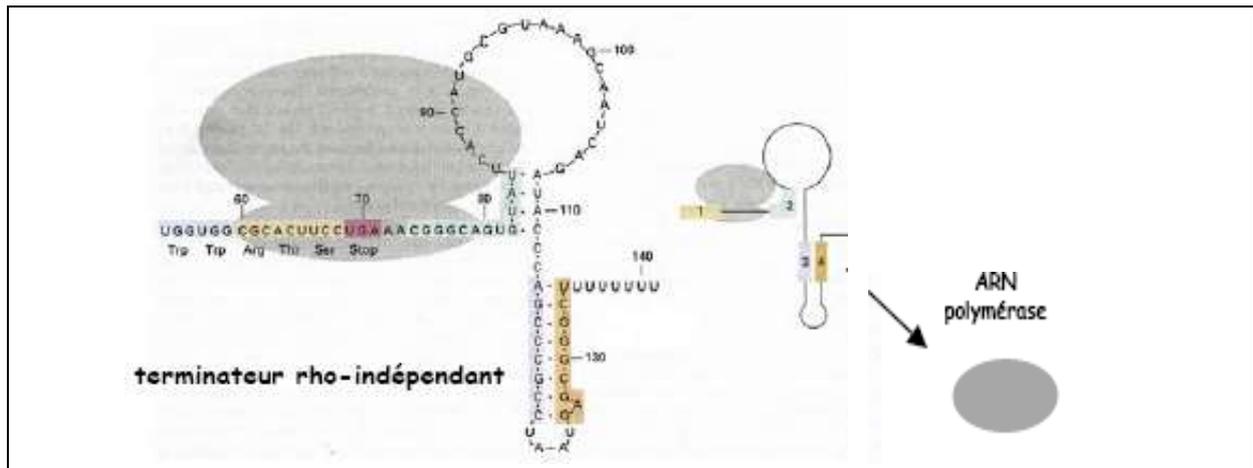
- **position A** : formation d'une boucle **2/3**: **boucle d'anti-terminaison (Fig. 40)**
- **position B** : formation d'une boucle **3/4**: **boucle de terminaison (Fig. 41)**

C'est la **vitesse de traduction du peptide leader** qui déterminera la position du ribosome sur l'ARNm tryptophane.



**Figure 40 : L'épingle antitermineur (2/3) permet la poursuite de la transcription**

**En absence de Trp:** freinage du ribosome par absence d'ARN<sub>t</sub><sup>Trp</sup> chargés, formation d'un épingle à cheveux 2/3. **Il y a synthèse de l'ARNm.**



**Figure 41 : L'épingle terminateur (3/4) provoque un arrêt de la transcription**  
**En présence de [trp] moyenne:** pas de freinage du ribosome (ARN<sub>t</sub><sup>trp</sup> chargés disponibles), formation d'une épingle à cheveux 3/4. **Terminaison de la transcription.**

**Chapitre 4**  
**La biosynthèse d'antibiotiques par les**  
*Streptomyces*

## 1. Les antibiotiques et leur mode d'action

Le premier antibiotique, la **pénicilline**, a été découvert en 1928 par **Alexander Fleming** chez le champignon *Penicillium notatum*. La **pénicilline** a été ensuite produite industriellement à partir de 1944 et a rapidement permis de vaincre de graves infections.

### 1.1. Définition d'un antibiotique

Les **antibiotiques** sont des molécules d'**origine naturelle ou de synthèse** à action spécifiquement **antibactérienne** ; bactéricide ou bactériostatique. Les antibiotiques bactériostatiques inhibent la croissance et la reproduction des bactéries, mais ne les tuent pas, alors que les antibiotiques bactéricides tuent les bactéries et qui agissent à faible dose. Ils sont sans effet sur les virus ou les champignons.

Les antibiotiques naturels sont fabriqués par des microorganismes (champignons ou bactéries) et leur permettent d'éliminer les bactéries concurrentes avec lesquelles ils sont en compétition dans leur milieu (auréole d'inhibition autour de la colonie de *Penicillium*).

Un même **antibiotique** n'agit pas sur toutes les bactéries. Pour déterminer l'antibiotique le plus efficace contre un germe donné on réalise un **antibiogramme** (Fig. 42). La bactérie est cultivée sur milieu gélosé dans une boîte de Pétri en présence de disques de buvard imprègnés d'**antibiotiques**. Chaque antibiotique diffuse à partir du disque et sa concentration est d'autant plus faible que l'on s'éloigne du disque. Plus l'**auréole d'inhibition** (zone d'inhibition) est grande plus l'antibiotique est efficace. Pour un antibiotique donné une souche donnée est soit sensible **S**, résistante **R** ou intermédiaire **I**.

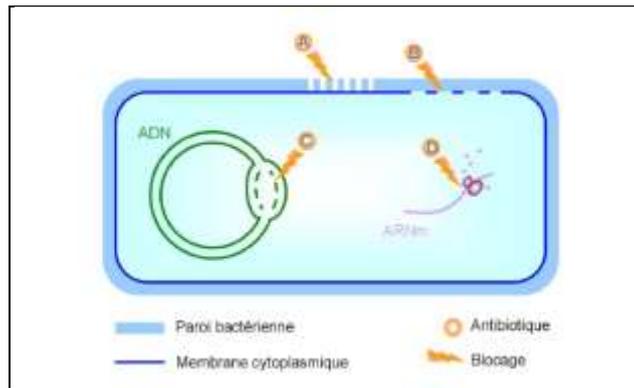


Figure 42: Exemple d'antibiogramme.

### 1.2. Mode d'action des antibiotiques

Chaque famille d'antibiotiques se fixe sur une cible spécifique et bloque une étape essentielle du développement de la bactérie (Fig. 43) :

- Une inhibition de la synthèse des constituants de la paroi (A : *pénicillines*, *céphalosporine*),
- Une altération du fonctionnement de la membrane cytoplasmique (B : polymixines),
- Un blocage de la synthèse des acides nucléiques (C : *quinolones*),
- Un blocage de la synthèse des protéines par les ribosomes (D : *streptomycine*, *chloramphénicol*, *tétracyclines*)



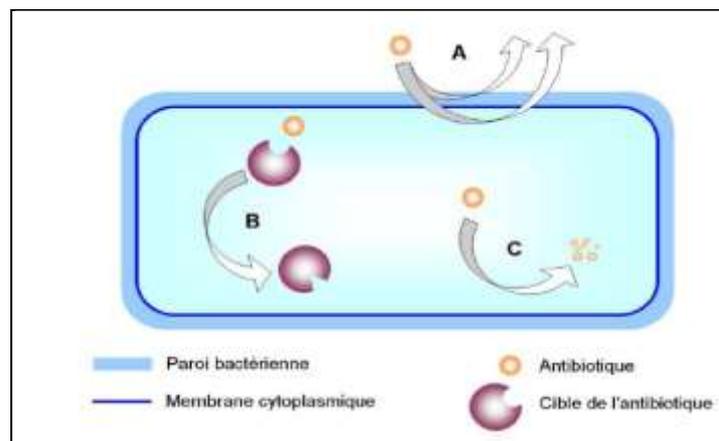
**Figure 43 : Les quatre principaux modes d'action des antibiotiques.**

### 1.3. Origine de la résistance aux antibiotiques

Pour être actif, un antibiotique doit parvenir au **contact** de la bactérie, y **pénétrer**, ne pas être **désactivé** et se fixer sur sa **cible**. Si l'une de ces conditions n'est pas remplie, l'antibiotique se révèle inefficace, c'est le phénomène de **résistance**.

Les bactéries deviennent résistantes (Fig. 44):

- A : en devenant imperméables à leur pénétration ou en les rejetant ;
- B : en modifiant leurs cibles ;
- C : en produisant des enzymes capables de les neutraliser



**Figure 44 : Les différents mécanismes de résistance à un antibiotique**

On distingue des **résistances naturelles** qui s'observent chez tous les individus d'une même espèce (par exemple, les bactéries productrices d'antibiotiques sont insensibles aux substances qu'elles produisent) et des **résistances acquises** qui ne s'observent que dans quelques souches d'une espèce normalement sensible. La **résistance acquise** est due généralement à l'un des phénomènes suivants :

#### 1.3.1. Mutations génétiques

Les mutations sont des phénomènes rares, qui apparaissent spontanément avec des fréquences de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$ . Les antibiotiques ne sont pas mutagènes mais sélectionnent les rares mutants résistants au sein d'une population car ils détruisent ou inhibent uniquement les bactéries sensibles. Cette résistance confère un avantage sélectif à la

souche mutante qui lui permet de se multiplier en présence de l'antibiotique. Cela d'autant plus qu'elle est débarrassée de la compétition avec la souche sauvage.

### 1.3.2. Les transferts horizontaux (notamment la conjugaison bactérienne)

Le transfert horizontal de gènes est l'un des mécanismes majeurs contribuant à la diversification des génomes bactériens. Le transfert génétique peut poser plusieurs risques pour l'humain, incluant : l'insertion d'ADN qui porte des gènes de résistance aux antibiotiques.

La **conjugaison** est le mécanisme de transfert de gène le plus fréquent. Une **bactérie donneuse** entre en contact avec une **bactérie receveuse**. Un seul des deux brins de l'ADN d'un **plasmide** est transféré puis, après séparation, chaque cellule synthétise le brin complémentaire. Un **gène de résistance** peut ainsi être transféré entre bactéries, même si elles appartiennent à des espèces différentes, c'est une **transmission horizontale**.

Au cours de chaque transfert l'information génétique responsable de la résistance est dupliquée ce qui multiplie la prolifération résultant des divisions cellulaires. Une bactérie peut héberger plusieurs plasmides et il n'est pas rare qu'un même plasmide véhicule plusieurs gènes de résistance (jusqu'à 7 gènes). L'acquisition d'un tel plasmide par une bactérie lui permet d'être **multirésistante** en une seule étape.

### 1.3.3. Les transposons et les intégrons

Les séquences d'insertion (IS) et les transposons (Tn) sont des éléments génétiques mobiles. Les éléments transposables, associés à des vecteurs tels que des plasmides sexuels ou des phages, constituent un élément essentiel dans l'évolution bactérienne. En particulier, ils contribuent de façon importante à la dissémination des gènes de **résistance aux antibiotiques**.

Les intégrons constituent un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. Ces dernières sont des éléments mobiles capables de s'intégrer ou de s'exciser par un mécanisme de recombinaison, spécifique de site, lié à l'intégrase. Une cassette peut porter plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques, son intégration sur un intégron permet l'expression de ces gènes, ce qui confère une résistance à la bactérie vis-à-vis ces antibiotiques.

### 1.3.4. L'utilisation non contrôlée des antibiotiques

Plus on utilise les antibiotiques plus la proportion de souches résistantes augmente. En effet, l'administration répétée d'antibiotiques crée une **pression de sélection** qui favorise le succès des mutations et des échanges plasmidiques responsables de l'acquisition de **résistances** aux antibiotiques. Elle tend ainsi à éliminer les bactéries sensibles pour laisser place aux seules bactéries résistantes, voire multirésistantes.

## 2. Les streptomyces et la production d'antibiotiques

### 2.1. Définition des *Streptomyces*

Le mot *Streptomyces* regroupe tous les membres du genre *Streptomyces*, c'est le genre d'actinomycètes le plus abondant et surtout le plus performant dans la production de métabolites secondaires importants (notamment les antibiotiques). Les *Streptomyces* sont

donc des organismes procaryotes qui possèdent une structure filamenteuse. Cela explique leur dénomination : Du Grec Strepto.myces : *Streptos* : tordu ou courbe et *myces* : champignons.

Les *Streptomyces* sont des organismes aérobies, à coloration de Gram positive, chimoorganotrophes, catalase positive qui appartiennent à l'ordre *Actinomycetales* de la classe *Actinobacteria*.

Le génome des Streptomycètes est composé d'une molécule linéaire d'ADN contenant huit millions de paires de bases ce qui en fait un des plus grands génomes bactériens et un taux G+C% compris entre 69 et 78%. Ils possèdent également des plasmides linéaires de très grandes tailles ainsi que, plus classiquement, des plasmides circulaires.

## 2.2. Les antibiotiques produits par les *Streptomyces*

Il est connu que le genre *Streptomyces* produit la majorité des antibiotiques et des métabolites secondaires biologiquement actifs. Près de 50% des espèces de *Streptomyces* isolées sont reconnues comme productrices d'antibiotiques. Les actinomycètes synthétisent les deux tiers des antibiotiques microbiens dont environ 80% sont isolés du genre *Streptomyces*. Même si on inclut les autres métabolites secondaires, les actinomycètes restent les plus grands fournisseurs avec environ 60% (les *Streptomyces* ont toujours la plus grande partie avec 80%). Plus de 60 substances à activité antibiotique produites par des espèces de *Streptomyces* sont utilisées non seulement dans le monde de la médecine vétérinaire et humaine, mais également dans celui de l'agriculture et de l'industrie.

Les *Streptomyces* synthétisent des antibiotiques appartenant à différentes classes chimiques, ils sont fournisseurs d'oligosides, de  $\beta$ -lactamines, de peptides, de tétracyclines, d'anthracyclines, d'ansamycines, de macrolides, de polyènes, de nucléosides et de la fosfomycine. Le tableau 1 détaille les principaux antibiotiques synthétisés par les *Streptomyces*, leurs classes chimiques et leurs cibles d'action.

**Tableau 1 : Principaux antibiotiques synthétisés par les *Streptomyces***

Classe chimique	Antibiotique	Producteur	Cible
Aminoglycosides	Streptomycine	<i>S. griseus</i>	La plupart des GRAM-
	Spectomycine	<i>S. spp</i>	<i>M. tuberculosis</i>
	Nèomycine	<i>S. fradiae</i>	large spectre
Tétracyclines	Tétracycline	<i>S. aureofaciens</i>	Large spectre GRAM+ et – <i>idem</i>
	Chlortétracycline	<i>S. aureofaciens</i>	
Macrolides	Spiramycine	<i>S. ambofaciens</i>	<i>Streptococcus, Neisseria</i> et <i>Mycoplasma</i>
	Erythromycine	<i>S. erythreus</i>	La plupart des GRAM+ Anaérobies strictes
	Clindamycine	<i>S. lincolnensis</i>	
Polyènes	Nystatine	<i>S. noursei</i>	champignons : <i>Candida</i>
	Amphocétine B	<i>S. nodosus</i>	champignons
Sans classe	Chloramphénicol	<i>S. venezuelae</i>	Large spectre et typhoïde

## 2.3. La régulation de la biosynthèse des antibiotiques

La biosynthèse des métabolites secondaires est fortement affectée par les conditions environnementales et nutritionnelles dans lesquelles le microorganisme se développe. Les conditions optimales pour la production d'un métabolite ne sont pas nécessairement les mêmes que pour la croissance maximale. De plus, un microorganisme est capable de produire différents métabolites secondaires à différents niveaux, en fonction des paramètres physico-chimiques et de la composition du milieu de culture (sources de carbone, d'azote et de phosphate).

Les métabolites secondaires sont produits à partir de précurseurs, par des voies métaboliques très spécifiques. Cette synthèse est soumise à un ensemble de mécanismes de régulation intervenant aux niveaux anabolique, catabolique et énergétique de la cellule. La régulation peut s'exercer directement et spécifiquement sur les gènes ou les enzymes de synthèse des métabolites secondaires et/ou indirectement sur les voies de biosynthèse des métabolites primaires.

Les différentes études concentrant cette régulation sont menées en laboratoire sous diverses conditions de culture et d'expression des antibiotiques.

### 2.3.1. Les facteurs physico-chimiques

L'influence des facteurs physico-chimiques (pH, température, agitation et aération) sur l'initiation de la biosynthèse des métabolites secondaires et l'amélioration des rendements n'est pas à négliger. Par exemple, une température élevée ou un pH très acide peut provoquer la fragmentation des filaments du mycélium, ce qui provoque l'arrêt de la biosynthèse de la spiramycine par *S.ambofaciens*.

### 2.3.2. Facteurs nutritionnels

La production des métabolites secondaires peut être réalisée sous trois conditions : **Premièrement**, il est nécessaire d'avoir des usines cellulaires pour synthétiser la molécule, c'est-à-dire de la biomasse; **deuxièmement**, les précurseurs doivent être présents; et **troisièmement**, les enzymes capables de transformer ces précurseurs, doivent être aussi présentes et actives.

La biosynthèse des antibiotiques est souvent contrôlée par des mécanismes dus au métabolisme des sources de carbone, d'azote et de phosphate: induction et répression de la biosynthèse, rétro inhibition et inactivation enzymatique (la plus part des gènes codant la synthèse des antibiotiques sont organisés sous forme d'un cluster de gène). Les sels minéraux ont également un rôle de régulation non négligeable (activation ou inhibition des enzymes de synthèse des idiolites), mais leur épuisement ne suffirait pas à initier le métabolisme secondaire.

#### ✓ La source de carbone

La disponibilité et le type de la source de carbone influencent fortement le métabolisme secondaire et par conséquent la production d'antibiotiques. De nombreuses productions d'antibiotiques sont ainsi soumises à la répression catabolique, par le glucose le plus

généralement, ou par le glycérol, voire même le citrate. Cette répression catabolique semble être due aux intermédiaires cataboliques du glucose. Dans le cas de nombreux microorganismes, le glucose provoque une répression de la formation de plusieurs antibiotiques amino-glycosidiques produits par les actinomycètes (streptomycine, kanamycine, istamycine et néomycine) par une répression des enzymes de biosynthèse.

Les sources de carbone lentement assimilées, tel que l'amidon, permettent de meilleurs rendements de production d'antibiotiques chez les champignons.

Les acyl-CoA produits à partir des acides gras sont d'excellents précurseurs de la synthèse des macrolides. La production de la spiramycine en milieu synthétique est facilitée par l'ajout de différents acides gras.

#### ✓ **La source d'azote**

Beaucoup d'antibiotiques possèdent un atome d'azote dans leur structure. La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures productrices d'antibiotiques influe et contrôle fortement les rendements de production. L'action de l'azote peut se situer au niveau du taux de croissance et au niveau plus direct de la formation ou du fonctionnement des enzymes responsables du métabolisme secondaire. Le régulateur principal de ce métabolisme est l'anunonium apporté sous forme de sel ou de composé organique au cours du catabolisme des protéines et des acides aminés ou à partir de nitrate.

Par exemple ; la production de la spiramycine par *Streptomyces ambofaciens* dépend de la nature et de la concentration des acides aminés présents dans le milieu de culture. L'utilisation de la lysine et de l'isoleucine (même à de fortes concentrations) assure une bonne production de la spiramycine. Cependant, la thréonine, l'alanine et la valine ne stimulent la biosynthèse de la spiramycine qu'à faible concentration, alors que l'arginine, le glutamate, la proline et la cystéine, à faible ou forte concentration, ne permettent qu'une faible production. Ces résultats ont montré que le niveau de production dépendait à la fois de l'apport des acyl-thioesters et de la concentration des ions ammonium obtenus lors du catabolisme des acides aminés.

#### ✓ **Source de phosphate**

La croissance microbienne, la consommation des substrats et la production des métabolites secondaires est soumise à une régulation par le phosphate inorganique chez plusieurs espèces de bactéries. Beaucoup de métabolites secondaires nécessitent pour leur formation des concentrations faibles en phosphate (inférieures à 10 mM). Il existe toutefois des exceptions notables: la thiopeptine et la nocardicine où la synthèse réclame une concentration élevée en phosphate inorganique (100 à 200 mM). Dans de nombreux cas, la production de l'antibiotique débute lorsque le milieu est carencé en phosphate (ex.: candidicine, tétracycline, tylosine). Il a été montré que la présence dans le milieu de culture du phosphate de magnésium permet d'améliorer de 2 à 10 fois la production de la leucomycine, de la tylosine ainsi que celle de la spiramycine.

### ✓ **Les sels minéraux et les oligoéléments**

La présence de  $MgSO_4$  est indispensable à la croissance des microorganismes. Son effet sur la production de métabolites est rarement mentionné, sauf dans le cas de la synthèse de certains thiopeptides et dans la production de l'antibiotique G-60 (une quinone). Certaines productions, telles que celles de la streptomycine ou de la tétracycline sont améliorées par l'addition respectivement de 0,5% et 1 % de NaCl. Des concentrations plus élevées en NaCl conduisent à l'inhibition de la production. Cependant, l'addition de NaCl dans le milieu de culture d'une souche mutante de *Streptomyces fradiae* restaure la production de l'antibiotique.

Plusieurs oligoéléments (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo), cofacteurs de la croissance des microorganismes, sont nécessaires à des concentrations très faibles (environ  $10^{-7}$  M). Certains jouent un rôle important, quantitativement et qualitativement, dans la biosynthèse des antibiotiques. Le manganèse, le fer et le zinc sont les ions métalliques les plus importants pour la production des antibiotiques. Il a été montré que le  $Fe_2(SO_4)_3$  et le MnCh stimulent la production de la monensine par *Streptomyces cinnamonensis*.

**En conclusion :** les différents mécanismes de la production des antibiotiques restent un domaine très vaste toujours alimenté par de nouvelles découvertes. Ils font l'objet de cours à part entière.

**Chapitre 5**  
**Communications et transmission des signaux**  
**chez les bactéries Gram+**

L'un des principes fondamentaux de l'organisation de la vie sur terre est que les cellules coopèrent. C'est évident dans le cas des organismes multicellulaires, du nématode à l'homme, mais cela semble s'appliquer largement aux organismes unicellulaires comme les bactéries, champignons, et amibes.

Les bactéries sont des organismes unicellulaires. Néanmoins, elles ont développé des systèmes génétiques, dits systèmes de « quorum sensing », qui leur permettent de communiquer entre elles et de conférer à la population bactérienne un comportement d'organisme multicellulaire. Ces systèmes de communication sont utilisés pour coordonner, au sein d'une population bactérienne, des fonctions essentielles pour l'adaptation aux conditions environnementales, comme la virulence, le transfert de gènes, la production d'antibiotiques ou la sporulation et la formation des biofilms bactériens.

Les cas les mieux étudiés de la communication entre les micro-organismes concerne la coopération intra-espèces. A haute densité cellulaire, les bactéries entrent dans un nouveau mode d'existence caractérisé par l'expression des gènes associés à des comportements collectifs.

### **1. Historique et définition de la détection du quorum ou Quorum Sensing (QS)**

La notion d'**autoinducteurs** « **AI** » petites molécules diffusibles induisant, en fonction de leur concentration qui reflète la concentration bactérienne l'expression de certains gènes a été introduite par Kaplan et Greenberg en 1985 dans le modèle de régulation de la luminescence chez *Vibrio fischeri*.

Ce modèle de régulation a maintenant été étendu à une centaine d'espèces bactériennes, même des *Archaea*.

**Quorum Sensing**: terme introduit par Fuqua et Winans en 1994 devant la découverte d'un système régulateur de type LuxR-LuxI contrôlant le transfert conjugatif du plasmide Ti chez le genre *Agrobacterium* en présence d'un métabolite produit par la tumeur de la plante cible. Il est très vite apparu qu'il existait deux grandes familles d'autoinducteurs: dérivés de **petits peptides** pour les bactéries à **Gram +** et dérivés d'**acides gras** pour les bactéries à **Gram -**.

**Bactéries à Gram - soumises au QS**: *Agrobacterium*, *Brucella*, *Bukholderia*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia*, *Vibrio*, *Yersinia*

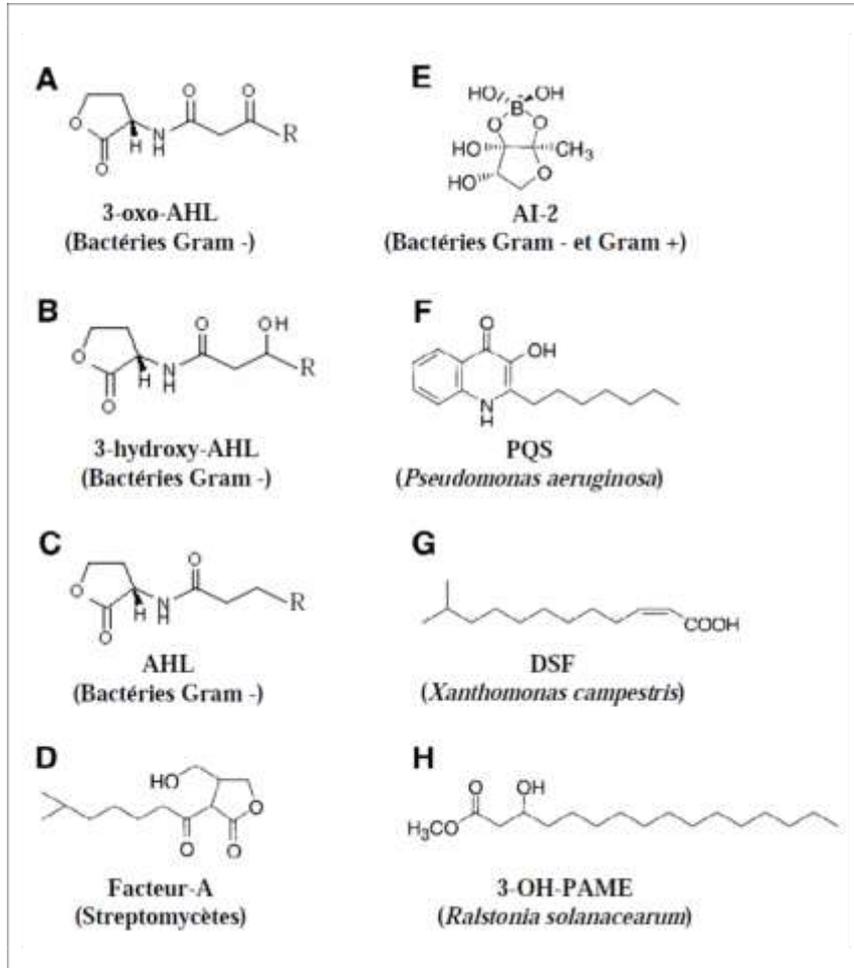
**Bactéries à Gram + soumises au QS**: *Bacillus*; *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*.

La **détection du quorum**, appelée *quorum sensing* en anglais, est un mécanisme de régulation contrôlant l'expression de certains gènes bactériens. *Quorum sensing* contribue à la synchronisation de l'expression (ou de la répression) de gènes particuliers au sein d'une population bactérienne en fonction de la densité de celle-ci (nombre de cellules par unité de volume). Elle repose sur la capacité de bactéries à communiquer avec leurs congénères en utilisant des **signaux moléculaires**.

**2<sup>ème</sup> définition** : Le **Quorum Sensing** (QS) est un mode de signalisation bactérien qui repose sur la production de petites molécules médiatrices appelées « **autoinducteurs** » qui sont produites en phase de croissance bactérienne (Fig.45).

Lorsqu'un seuil de concentration est atteint, ces autoinducteurs interagissent avec un régulateur transcriptionnel, permettant l'expression spécifique, en réponse à une forte concentration de cet autoinducteur, d'un groupe de gènes.

L'un des autoinducteurs intra-espèce le plus étudié est le N-acylhomosérine lactone (AHL).



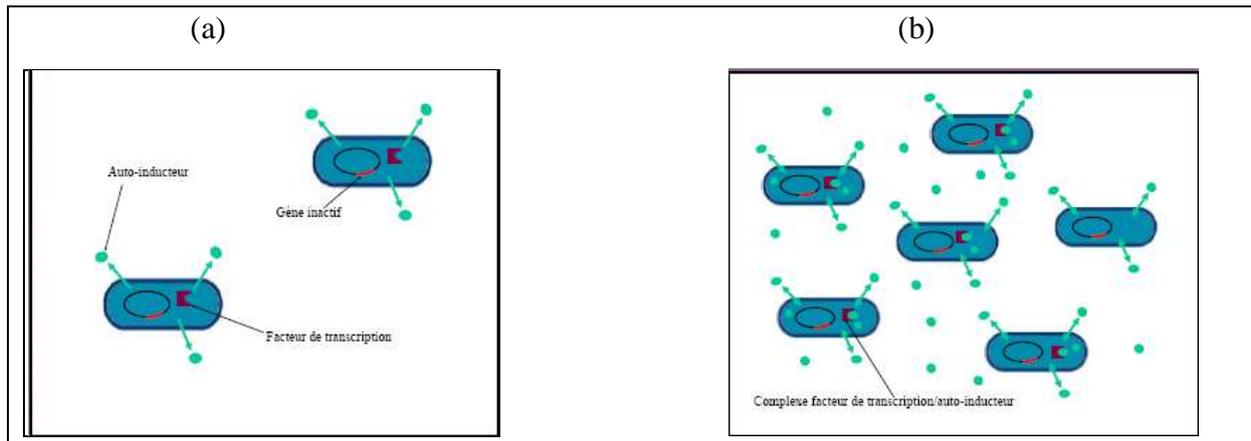
**Figure 45 : Structure de différentes molécules signal identifiées chez les bactéries.**

(A) 3-oxo-AHL, *N*-(3-oxoacyl) homoserine lactone; (B) 3-hydroxy-AHL, *N*-(3-hydroxyacyl) homoserine lactone et (C) AHL, *N*-acylhomoserine lactone avec R pouvant varier de C1 à C15. (D) Facteur A, 2-isocapryloyl-3-hydroxy-méthyl-gamma-butyrolactone; (E) AI-2, autoinducteur-2 ou furanosyl borate ester; (F) PQS, *Pseudomonas* Quinolone Signal ou 2-heptyl-3-hydroxy- 4(1H) quinolone; (G) DSF, 'diffusible factor' ou acide méthyl dodécénoïque ; (H) 3-OH-PAME, ester méthylique de l'acide 3-hydroxypalmitique.

Processus décrit chez un grand nombre d'espèces bactériennes, le quorum-sensing régule une assez grande diversité de phénotypes tels que la formation de biofilms, la production d'exopolysaccharides, la production de facteurs de virulence, la mobilité, autant de fonctions qui sont essentielles à l'établissement d'interactions symbiotiques ou pathogènes entre la bactérie et un hôte eucaryote.

## 2. Mécanisme général commun du QS

Les bactéries qui utilisent le QS produisent des signaux moléculaires appelés auto-inducteurs. À basse densité de population bactérienne, la diffusion réduit rapidement la concentration de l'auto-inducteur dans l'environnement. Au contraire, avec la multiplication cellulaire dans un espace confiné, la densité de la population augmente, et la concentration de l'auto-inducteur dépasse un seuil critique qui est alors perçu par les bactéries qui le produisent : le quorum est atteint (Fig. 46). Cette perception active très souvent la surproduction du signal auto-inducteur, conduisant ainsi à une boucle de rétroaction positive permettant de synchroniser sa perception au sein de la population microbienne.

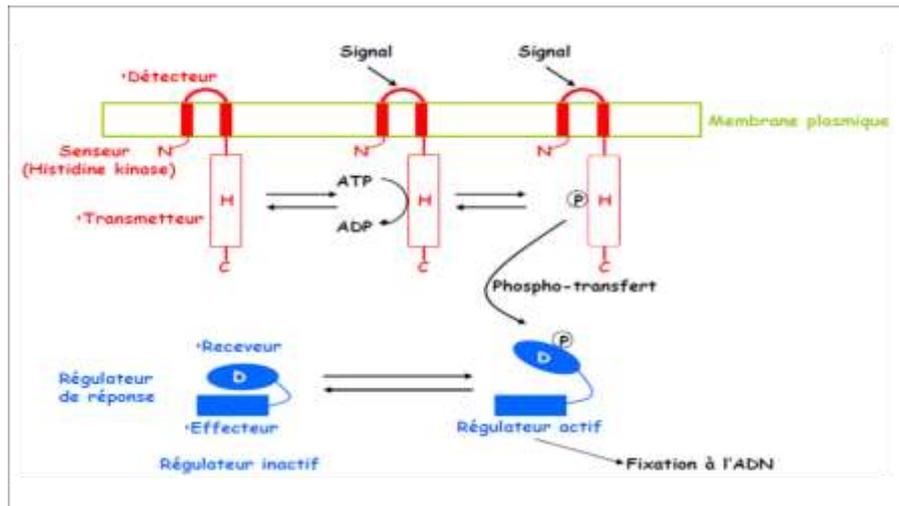


**Figure 46 : Mécanisme général du quorum sensing. (a) faible densité bactérienne, (b) forte densité bactérienne.**

La présence des auto-inducteurs est perçue par des récepteurs protéiques intracellulaires. Ces récepteurs fixent l'auto-inducteur dont la concentration intracellulaire reflète la concentration extracellulaire. Le récepteur ainsi activé reconnaît des séquences d'ADN spécifiques des gènes régulés par le QS et active ou réprime leur expression. Les auto-inducteurs sont perçus à des concentrations très faibles de l'ordre de 1 pmol à 1  $\mu$ mol.

## 3. Régulation du QS : Rôle des systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants sont très répandus chez les procaryotes. Ils sont sensibles à des signaux environnementaux pour déclencher une réponse adaptée par contrôle de la transcription de gènes cibles. Ces systèmes sont constitués de 2 protéines : une protéine **histidine kinase senseur** et une protéine **régulatrice**. Le senseur est une protéine transmembranaire capable de répondre à un stimulus environnemental. Le ligand extracellulaire se lie à la partie N-terminale de la protéine senseur ce qui engendre l'autophosphorylation du résidu histidine en C-terminale. Ce groupement phosphate est alors transféré au résidu aspartate de la région N-terminale de la protéine régulatrice. Cette cascade de phosphorylation induit un changement conformationnel du régulateur qui est alors activé et peut se fixer sur les gènes cibles (Fig. 47).



**Figure 47 : Modèle de la régulation par un système à 2 composants.**

Un stimulus ou un ligand externe provoque l'autophosphorylation de la protéine senseur, histidine kinase qui transfère le groupement phosphate à la protéine régulatrice. Cette cascade de phosphorylation induit un changement conformationnel du régulateur qui peut alors se fixer sur l'ADN de gènes cibles et réguler leur transcription.

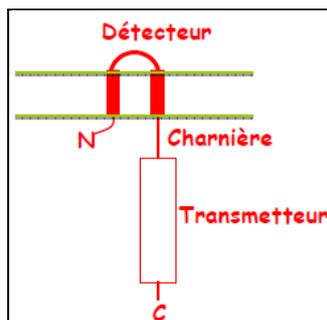
Le système à deux composants est présent dans de nombreux organismes : bactéries, Archaeobactéries, eucaryotes unicellulaires, champignons, plantes. Il joue un rôle important dans : l'adaptation (stress, carences), le métabolisme et la différenciation cellulaire.

### 3.1. Les senseurs classiques

Deux régions distinctes (Fig. 48):

- Détecteur N-terminal, détection du signal
- Transmetteur C-terminal, transfert du signal au régulateur de réponse.

Région charnière: transfert signal entre détecteur et transmetteur.



**Figure 48 : Structure du Senseur**

Les signaux qui peuvent être détectés : des ions ( $Mg_2^+$ ,  $Ca_2^+$ ), petites molécules (sucres, alcools,...) et les facteurs physiques (pression, lumière, ...)

#### ✓ Le domaine détecteur N-terminal du senseur

Majorité des senseurs :

- ancrés à la membrane plasmique par des segments transmembranaires (classiquement 2, jouant parfois un rôle dans la détection du signal)
- domaine détecteur extra-cytoplasmique (périplasma pour les Gram-)

Certains senseurs :

- libres dans le cytoplasme (pas de segment transmembranaire)

- domaine détecteur localisé dans le cytoplasme

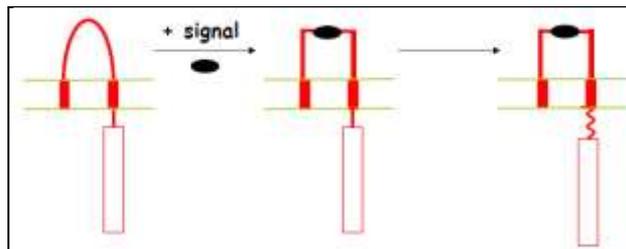
Détection du signal :

- le plus souvent directe
- parfois, intervention d'une protéine auxiliaire.

✓ **La transmission du signal** (Fig. 49)

Détection du signal: transmission du signal à travers la membrane vers le module transmetteur. Le mécanisme de transmission demande :

- Changement de conformation du domaine détecteur en présence du signal
- Transmission à travers la membrane par les segments transmembranaires
- Changement de conformation au niveau de la région charnière
- Activation du domaine transmetteur.



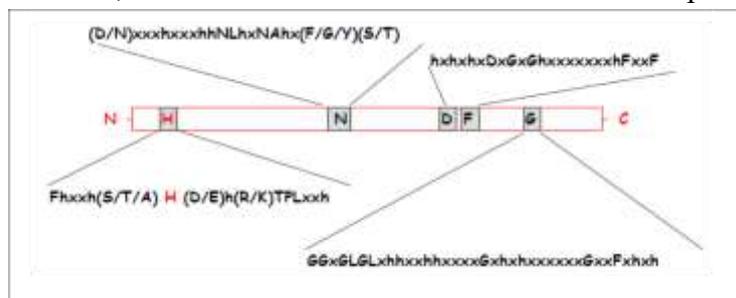
**Figure 49 : Transmission du signal**

✓ **Le domaine transmetteur** (Fig. 50)

Taille : environ 240 acides aminés

Présence de 4 motifs très conservés:

- Motif H : le plus conservé, contenant le résidu histidine cible de l'autophosphorylation



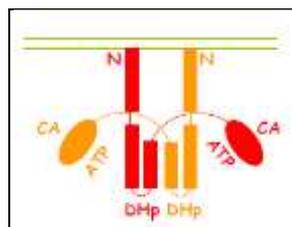
**Figure 50 : Structure du domaine transmetteur du senseur**

Protéines dimériques :

Phosphorylation de l'histidine conservée en trans

Deux sous domaines (fig.51):

- de dimérisation contenant le résidu histidine conservé (DHp)
- catalytique responsable de l'activité autokinase du senseur et capable de fixer le nucléotide nécessaire à cette activité (CA).



**Figure 51 : Structure des sous domaines du transmetteur.**

### 3.2. Les régulateurs de réponse (RR)

Deux modules:

- **le module receveur :**

- présent dans tous les régulateurs de réponse
- porte le site accepteur de phosphate qui est phosphorylé par le senseur
- Taille : environ 120 résidus. Il possède 3 résidus aspartate (2 résidus Asp à l'extrémité N-terminale et 1 résidu Asp = site phosphorylé par le senseur) et il possède aussi résidu lysine à l'extrémité C-terminale.

- **le module effecteur :**

Présent dans un grand nombre de RR, possède souvent un domaine de fixation à l'ADN.

Localisé le plus souvent à l'extrémité C-terminale. En distingue trois familles en fonction du mode d'action :

- Famille OmpR (~ 230 résidus) :

- activation et/ou répression de promoteurs transcrits par ARNP- $\sigma^{70}$
- un domaine de fixation à l'ADN de type « Winged Helix » (hélice ailée)

- Famille FixJ/NarL (~ 220 résidus) :

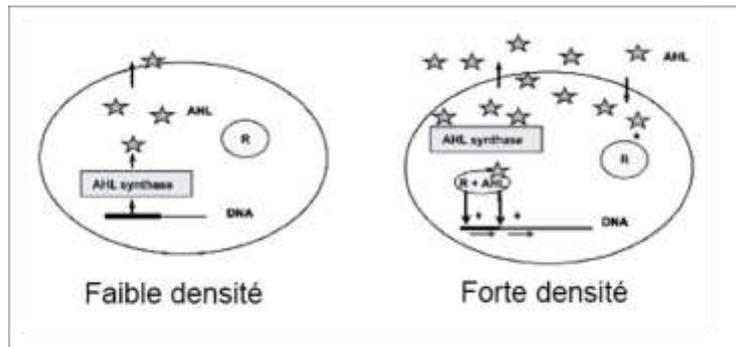
- activation de promoteurs transcrits par ARNP- $\sigma^{70}$
- un domaine de fixation à l'ADN classique HTH (hélice-tour-hélice)

- Famille NtrC (~ 460 résidus):

- activation des promoteurs transcrits par ARNP- $\sigma^{54}$
- un domaine de fixation à l'ADN classique HTH (hélice-tour-hélice)
- un domaine additionnel portant une activité ATPase.

### 4. Schéma général du mécanisme commun du Quorum Sensing chez les bactéries à Gram -

Les bactéries produisent un autoinducteur, le N-acylhomosérine lactone (AHL), via une AHL-synthase. A faible densité, les molécules d'AHL sont activement transportées du milieu extérieur vers le cytoplasme par un processus de transport dépendant de l'ATP. A forte concentration, le transport s'effectue par diffusion passive. Lorsque la concentration d'AHL atteint un seuil (Quorum State), les molécules autoinductrices d'AHL interagissent avec la protéine régulatrice (R), le plus souvent un régulateur transcriptionnel. Le complexe R-AHL se lie au promoteur des gènes cibles et initie leur transcription ainsi couplée à la densité bactérienne (Fig. 52).



**Figure 52 : Schéma général du mécanisme QS chez les bactéries à Gram -**

Le QS a été observé pour la première fois chez *Vibrio fischeri*, une bactérie bioluminescente qui vit de manière symbiotique dans l'organe lumineux de certains céphalopodes comme la sépiole. Lorsque les vibrions sont sous forme planctonique (à l'état libre), la concentration d'auto-inducteurs est faible, et les cellules ne sont pas lumineuses. Dans l'organe lumineux de la sépiole, les vibrions sont très nombreux (environ  $10^{11}$  cellules par mL) et l'auto-inducteur stimule la transcription du gène de la luciférase, une enzyme capable de produire de la lumière à partir d'ATP.

### 5. Le QS chez les Gram + : exemple du système Agr de la bactérie *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* possède plusieurs systèmes de Quorum-Sensing. L'accessory gene regulator ou agr joue un rôle important dans la physiopathologie des infections à staphylocoque. Ce système a été identifié en 1986 par l'étude d'une souche de *S. aureus* mutée sur le locus agr suite à l'insertion du transposon Tn551 qui confère une résistance à l'érythromycine. Le système Agr bien que classé dans la famille des systèmes à deux composants correspond à la combinaison d'un système à deux composants, d'un système de *quorum-sensing* et d'un ARN régulateur. Ce système a une double action sur les gènes de virulence. Il réprime la transcription des gènes codant des protéines associées à la paroi (protéine A, coagulase, protéine de liaison à la fibronectine) et active la transcription d'exoprotéines (toxine  $\alpha$ , hémolysine  $\beta$ , TSST-1, leucotoxines) en fonction de la croissance. Une étude transcriptomique a montré que le système Agr régulerait positivement plus de 100 gènes et négativement plus de 30 gènes.

#### 5.1.Organisation du locus Agr

Le locus agr est constitué de deux opérons dénommés P2 et P3. Le premier, P2, possède 4 cadres de lecture listés de A à D. Le second, P3, possède deux cadres de lecture dont l'un correspond au 26 acides aminés de l'hémolysine- $\delta$ . Les transcrits issus de ces opérons sont nommés RNAII et RNAIII. Un modèle de l'activation d'agr a été proposé (Fig.53):

- Le précurseur de l'AIP « autoinducteurs peptidique » est produit à partir du gène *agrD*,
- Ce propeptide de 7 à 9 résidus est hydrolysé par la protéine transmembranaire AgrB avec formation d'un cycle thiolactone au sein de la chaîne d'acides aminés,
- AgrB porte aussi un transporteur de type ABC qui va sécréter l'AIP formé à partir du précurseur,

- L'AIP dans le milieu extérieur va se fixer sur le récepteur spécifique AgrC soit sur la même bactérie soit sur une bactérie voisine,
- AgrC est un complexe transmembranaire avec activité histidine kinase qui phosphoryle la protéine AgrA suite à la fixation de l'AIP,
- AgrA se lie aux promoteurs des opérons P2 et P3 et induit la production de RNAII et RNAIII,
- RNAIII est à la fois régulateur et effecteur de ce système

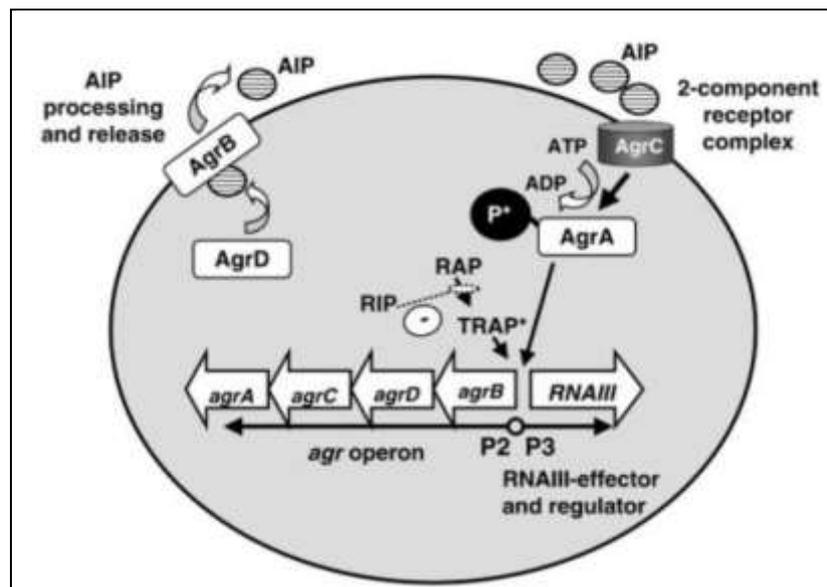
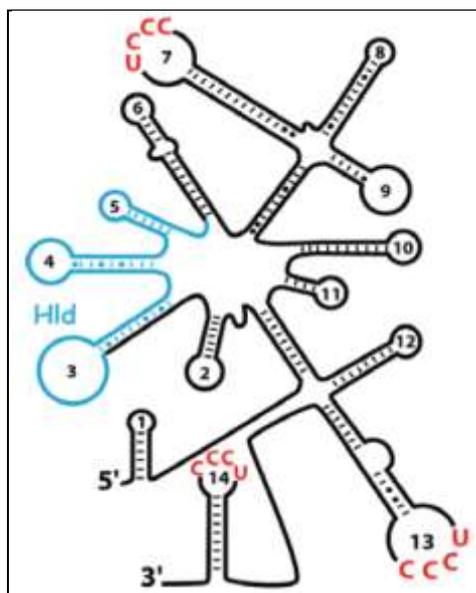


Figure 53: Fonctionnement du système agr chez *S.aureus*

## 5.2. ARN III effecteur de la réponse Agr

La phosphorylation de AgrA *via* le QS active l'expression de l'ARN III. Cet ARN de 514 nucléotides est l'effecteur du système Agr. Il possède un rôle pléiotropique en régulant un grand nombre de gènes dont plusieurs gènes de virulence. RNAIII fait partie de la famille des sRNA ou small regulatory RNA, il est organisé en 14 boucles (Fig. 54).

Il est capable de moduler la transcription des ARN messagers en s'appariant avec eux. Deux cibles directes ont été identifiées : l'ARNm codant l'hémolysine- $\alpha$  et celui codant la protéine A. L'effet de cet appariement est variable selon l'ARNm cible. Pour l'ARNm codant la protéine A, RNAIII est capable de se fixer par son extrémité 3' sur le site de liaison au ribosome de l'ARNm de la protéine A et donc d'empêcher sa traduction. En la formation d'ARN double brin rend celui-ci plus sensible à l'action de la RNaseIII ce qui diminue la durée de vie du messager. En revanche, l'hybridation de RNAIII avec l'ARNm de l'hémolysine- $\alpha$  empêche la formation d'une boucle intramoléculaire au sein de cet ARN ce qui dévoile le site d'initiation de la traduction. Dans ce cas, l'ARN « antisens » (RNAIII) joue le rôle d'activateur de la traduction. Le RNAIII peut agir sur l'expression des gènes de manière indirecte en interagissant avec d'autres systèmes de régulation. C'est le cas du facteur de transcription *rot*, RNAIII est capable d'inhiber la traduction de son ARNm par hybridation. Ces mécanismes servent d'exemples et ne sont cependant pas exhaustifs, l'action de RNAIII sur les autres facteurs de virulence reste inconnue.



**Figure 54 : Structure secondaire de l'ARN III.** L'ARN III est constitué de 514 nucléotides formant 14 motifs en tige-boucle (numérotés de 1 à 14) et 2 interactions longues distance. Le gène codant l'hémolysine  $\delta$  est identifié en bleu. La séquence UCCC identifiée en rouge représente la séquence consensus de reconnaissance des gènes cibles.

### 5.3. Auto-induction du système agr

Le gène *agrD* code un pro-peptide immature de 46 aa. La protéine transmembranaire AgrB est ancrée dans la membrane cytoplasmique. Elle exerce un double rôle, à la fois d'enzyme protéolytique et de transporteur transmembranaire. AgrB va ainsi permettre la maturation de AgrD en une molécule appelée « Peptide Auto-inducteur » ou AIP grâce à 2 digestions protéolytiques successives. AgrB assure ensuite le transport du peptide mature dans le milieu extracellulaire. Au cours de la croissance bactérienne et plus particulièrement durant la phase exponentielle de croissance, le peptide auto-inducteur s'accumule dans le milieu extracellulaire. A partir d'un certain seuil de concentration, l'accumulation d'AIP active le système à 2 composants AgrA/AgrC. C'est le *quorum-sensing* (QS). L'AIP se fixe sur les domaines extracellulaires de la protéine réceptrice transmembranaire AgrC et induit l'autophosphorylation du résidu histidine en C-terminal de celle-ci. Le résidu phosphate est ensuite transféré sur le résidu aspartate de la protéine cytoplasmique AgrA. AgrA sous sa forme phosphorylée régule plusieurs gènes du métabolisme et active l'expression des promoteurs P2 et P3. La protéine AgrA se fixe sur la région intergénique entre P2 et P3 par reconnaissance de 2 séquences inversées répétées, séparées par 12 nucléotides.

## 6. Autres systèmes du QS chez la bactérie *S. aureus*

Il existe au moins trois autres systèmes de régulation des facteurs de virulence chez *S. aureus*. Ils semblent interagir ensemble et former un réseau complexe de transduction des signaux environnementaux.

Le deuxième système de régulation identifié a été dénommé *sae*. Il est constitué de deux protéines SaeR et SaeS. L'étude de mutant *sae* négatif a mis en évidence un rôle important de ce dernier dans la production de nombreuses exoprotéines notamment les hémolysines  $\alpha$  et  $\beta$

ainsi que de la coagulase. Les deux loci ont une action intriquée de manière complexe comme l'a montré l'étude de double mutants *sae* et *agr*. La transduction du signal se ferait en fonction de la concentration saline, du pH, du taux de glucose et de la présence d'antibiotiques. Le troisième se dénomme ArIRS, il est aussi composé de deux protéines ArIR et ArIS. Son action semble s'opposer à celle d'*agr* et favoriser l'agglutination des bactéries ainsi que la formation de biofilm. Enfin le dernier système découvert est SrrAB qui s'oppose lui aussi à l'*agr* en inhibant le RNAIII, ce système régule l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique de la bactérie.

**En résumé :** il existe un grand nombre d'autoinducteurs effecteurs qui régulent la communication cellulaire interindividuelles. Ce domaine est sous un contrôle strict des relations entre bactéries.