

Echanges génétiques.

Chez les eucaryotes, les parents participent autant l'un que l'autre dans les échanges réciproques. Chez les procaryotes, les échanges sont inégaux et non-réciproques. On trouve comme mécanismes d'échanges :

- La conjugaison : une souche donneuse, une souche réceptrice.
- La transduction : une souche donneuse, une souche réceptrice, vecteur (phage).
- La transformation : souche réceptrice, ADN.

Pour transférer, un ADN doit s'insérer dans un réplicon pour une recombinaison homologue (dépend de la protéine *RecA*).

Réplicon : chromosome ou plasmide selon qu'il y ait homologie ou non. Lors de la recombinaison, le produit entrant sera répliqué, le produit sortant sera perdu car il sera seul dans le cytoplasme et donc détruit par la nucléase.

I\ La conjugaison.

La conjugaison est processus par lequel un ADN est transféré d'une bactérie donneuse à une bactérie réceptrice. Il faut qu'il y ait un contact physique.

La capacité d'une bactérie à donner son ADN dépend de la présence du plasmide F (facteur de fertilité).

Le plasmide F est composé de 100Kb, est présent en une seule copie par bactérie et est extrêmement stable, donc jamais perdu pour la population, car il a développé des systèmes :

- Système de Partition : il va se répartir pareillement dans les deux cellules filles.
- Système de Killing : si le système de partition ne fonctionne pas et qu'une cellule fille ne porte pas ce plasmide, elle sera tuée.

Le facteur F peut s'intégrer au chromosome bactérien (avec une fréquence de 10^{-4}). Comme F peut être intra ou extra chromosomique, on le nomme « épisome ». Ce facteur s'intègre par recombinaison homologue, car il possède des : -IS2 -IS3 -Transposons. Il possède aussi des gènes *tra*, nécessaires au mécanisme de transfert de la conjugaison (1/3 du génome de F), une origine de transfert -*OriT*- et bien sûr, une ou plusieurs origines de répllication.

tra code pour les pili sexuels qui ont pour rôle d'aller chercher un partenaire. Un individu avec pili est dit : mâle ou F+ ; un individu sans pili est dit femelle ou F-.

Pour que la conjugaison soit possible, il faut F+ et F-.

Les pili, en se dépolymérisant, vont rapprocher les partenaires → contact.

Une fois le contact réalisé, F de F+ passe progressivement vers F- à partir d'*OriT*. Ce qui entre en premier est le bout 5'.

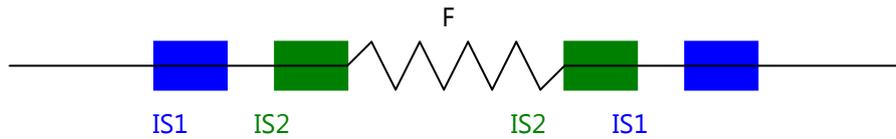
→ F- devient F+

→ F+ reste F+ car au fur et à mesure que F passe dans F-, il est répliqué.

La conjugaison est rapide : autour de deux minutes. Le facteur F est un réplicon donc, tout se fait extrachromosomiquement.

Quand F vient s'intégrer au chromosome bactérien, la bactérie devient HFr. La recombinaison de F est alors prise en charge par la répllication du chromosome (bactérien). F peut se ré-exciser à la fréquence de 10^{-4} .

Si F s'excise en utilisant la séquence IS1, il y a erreur, normalement, c'est avec IS2.



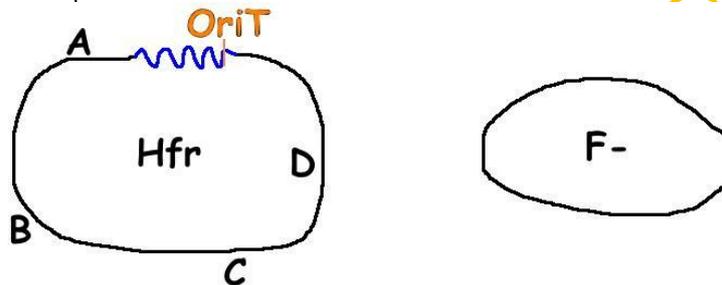
Alors, le produit de l'excision comportera un bout de chromosome bactérien → on parle alors du « facteur F' ».

F' peut conjuguer comme une bactérie F+.

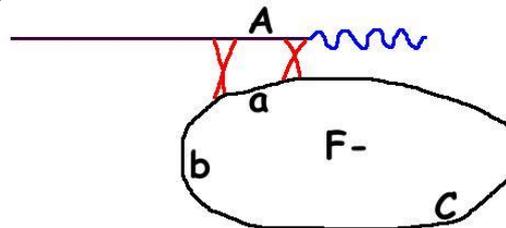
F' × F- :

→ F- devient F' et donc, on parle de diploïdie partielle pour le bout de chromosome bactérien contenu dans le plasmide et dans le chromosome de la nouvelle F'. Cela permet des expériences de complémentation. C'est intéressant d'un point de vue évolutif.

Remarque : A l'arrivée de toutes ces conjugaisons, on n'aura plus que des « mâles ». Pour lutter contre ce phénomène, on prend Hfr comme bactérie donneuse → Hfr × F-.

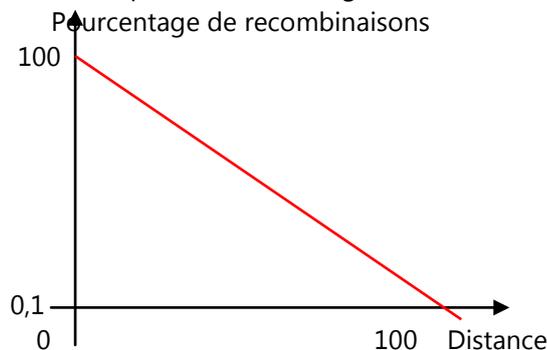


Lors de la conjugaison, avec le plasmide intégré, vont passer A, B, C... Donc, dans F-, il peut y avoir recombinaison homologue.



F- (a) deviendra F-(A) car tout le plasmide ne pénètre pas (il manque la fin).

La conjugaison s'arrête spontanément et au hasard, donc, la probabilité pour qu'un marqueur passe dans la souche réceptrice dépend de la position de celui-ci par rapport à OriT : plus le marqueur est proche d'OriT, plus il a de chances de passer → C'est le gradient de transfert.



C'est grâce à ses expériences de recombinaison que l'on a su que le chromosome de *E. coli* était circulaire avant même de savoir réellement que c'était un chromosome.

En conjugaison, on travaille sur de grandes parties de chromosomes.

Applications :

- Transformer une bactérie leu- en leu+ par une souche donneuse leu+ Hfr.
- Mutagenèse régionalisée toujours avec Hfr.

II\ Transduction.

Il faut un vecteur (e) donneur et un récepteur. Ce vecteur va être un phage. Il existe deux types de transduction :

- Spécialisée avec le phage λ . C'est toujours la même région d'ADN de cellule donneuse qui est transduite.
- Généralisée avec le phage P1. N'importe quel bout d'ADN peut être transduite.

Les phages injectent leur ADN dans les bactéries. Cet ADN se circularise puis peut avoir deux avenir possibles car λ et P1 sont des phages tempérés :

- Le cycle lytique : la réplication du génome phagique est très efficace et tous les gènes sont exprimés. Finalement, il y a lyse des bactéries et libération de 100 à 500 phages.
- Le cycle lysogénique : l'ADN injecté dans la bactérie ne se réplique pas. A partir de là, on distingue deux cas (un pour λ et un pour P1) :
 - Pour λ : l'ADN non-répliqué s'insère sur le chromosome bactérien au locus *attB* (entre les gènes bio et gal). On a alors un prophage qui n'exprime qu'un gène : celui de rester intégré. Sa réplication est prise en charge par le métabolisme bactérien.
 - Pour P1 : l'ADN non-intégré se circularise et reste extra-chromosomique, mais on parle aussi de prophage. Il va se comporter comme un plasmide. C'est un réplicon qui se suffit à lui-même et possède un système de partition et de killing.

Les prophages λ et P1 peuvent naturellement entrer en cycle lytique. P1 donne alors directement des phages alors que λ doit d'abord s'exciser.

Lors de l'encapsidation, au lieu d'encapsider du génome phagique, le phage P1 encapside de l'ADN chromosomique (dans 0,3% des cas). Ces particules phagiques qui contiennent de l'ADN chromosomique sont transductrices. Chaque région du chromosome a la même probabilité d'être encapsidée dans la particule phagique → C'est la transduction généralisée.

Lors de l'excision du phage λ , il peut y avoir des problèmes : l'excision contient un bout de bio ou de gal. Lors de l'encapsidation, bio ou gal va l'être aussi → c'est la transduction spécialisée.

Applications.

Un phage P1 virulent entre systématiquement en cycle lytique.

On va réaliser un étalement des bactéries sur une boîte. On y dépose ensuite un phage P1 virulent ; il entre dans une bactérie, s'y multiplie et produit 100 à 500 nouveaux phages. Ces derniers vont infecter d'autres bactéries.

Remarque : Une bactérie lysogène devient immune, c'est à dire, insensible à une surinfection.

→ Au final, on observera une plage de lyse claire : une plage de phage introduits.

Si l'on avait utilisé un phage P1 sauvage, celui-ci aurait pu entrer en cycle lytique ou en cycle lysogénique. Donc, dans la plage de lyse finale, il reste des bactéries lysogènes qui continuent à se multiplier : on a alors une plage de lyse trouble.

Avec P1 :

Dans 90% des cas, un fragment d'ADN transduit est détruit par les nucléases. Dans les 10% restant, s'il peut y avoir une recombinaison homologe, le fragment est inséré dans le chromosome de la bactérie réceptrice qui prendra ce nouveau caractère et perdra son ancien caractère car on est toujours en situation d'haploïdie

Applications :

- Mutagenèse régionalisée.
- Cartographie

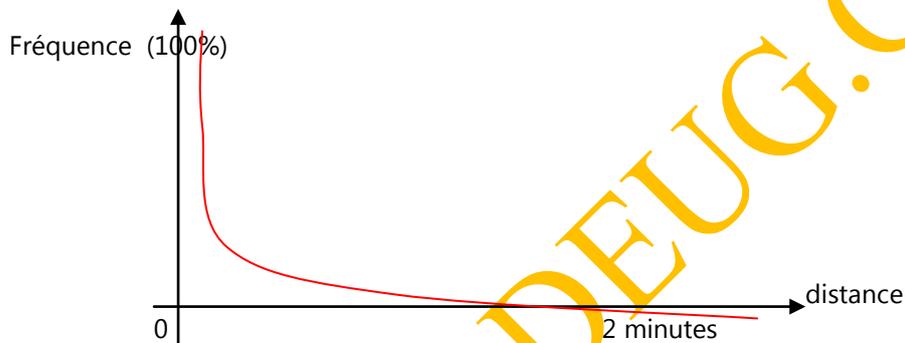
→ En transduction de ce type, on travaille sur de petites portions de chromosome : jusqu'à deux minutes, soit 90Kb.

On peut affiner une cartographie en localisant la mutation par rapport à un marqueur connu.

Si l'on réalise la transduction d'une bactérie m^+ , leu^- par une bactérie m^- , leu^+ et que l'on sélectionne les bactéries leu^+ , on pourra obtenir deux cas de figure :

- Ces bactéries sont leu^+ , m^- : on a cotransduit les marqueurs leu et m . → m est à moins de deux minutes du marqueur leu .
- Ces bactéries sont leu^+ , m^+ : on n'a pas cotransduit leu et m . → donc m est à plus de 2 minutes de leu .

Si l'on est à moins de deux minutes (leu et m), on peut calculer la fréquence de cotransduction qui est absolument corrélée à la distance (e) leu et m .



Cette corrélation suit la loi de Wu

$$F = (1 - d/L)^3$$

D est la distance (e) 2 marqueurs.

L : distance maximum (e)

2 : marqueurs c'est à dire, 2 minutes ou 90Kb.

III\ La transformation.

Capture d'ADN exogène par une bactérie dite compétente.

Certaines bactéries sont compétentes naturellement. Elles récupèrent l'ADN double brin. Elles dégradent un brin et intègrent l'autre grâce à l'énergie due à la dégradation du premier brin. Ensuite, il y a recombinaison homologe.

E. coli n'est pas compétente mais on peut la rendre compétente par un choc électrique. Ce qui entre est double brin :

- s'il est linéaire, il est détruit.
- Si c'est un plasmide, il est intégré.

L'intérêt du plasmide peut porter :

- sur le phénomène de résistance.

- Peut être un vecteur de clonage.
- Peut muter un gène.

Un plasmide porter souvent un gène de résistance, donc, pour sélectionner une bactérie transformée, on la fait pousser sur un milieu plus antibiotique spécifique : méthode peut efficace.

WWW.BIODEUG.COM