

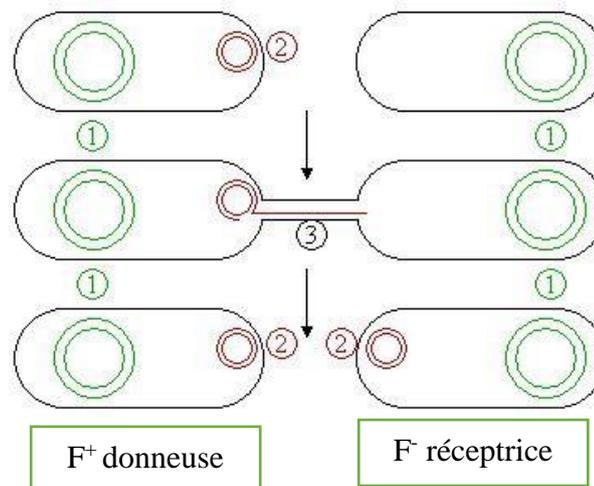
TP 03: Bacterial Gene Mapping Using Conjugation

Cartographie des gènes bactériens à l'aide de la conjugaison

1- Les bactéries F^- , F^+ , et Hfr (F= Fertility factor)

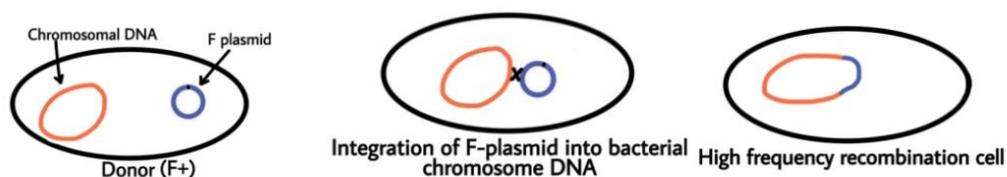
a- Conjugaison F^+/F^-

Les bactérie F^+ sont des bactéries qui possèdent un plasmide conjugatif F dans leur cytoplasme. Le plasmide F rend ces bactéries conjugatives car il code pour les caractères de conjugaison comme les pili sexuels, la réplication et le transfert du plasmide permettant d'assurer un contact physique entre 2 cellules bactérienne F^+ donneuse et F^- réceptrice qui est dépourvue (ne possède pas) le plasmide conjugatif.

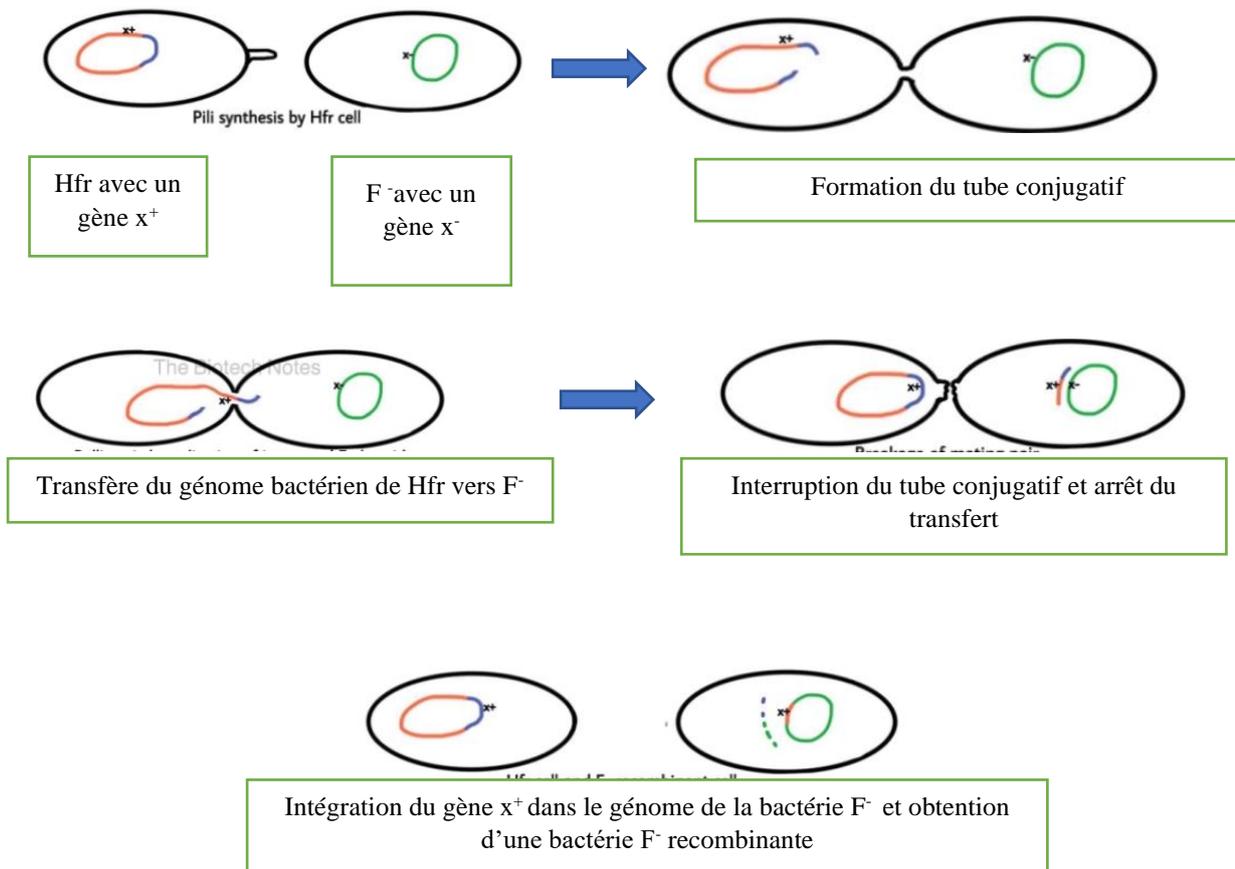


b- Conjugaison Hfr/ F^-

Les bactéries Hfr (High Frequency Recombination) sont formées lorsque le plasmide F est intégré dans le chromosome bactérien.



A l'état intégré (Hfr), les gènes du facteur F restent fonctionnels et peuvent entraîner la formation du pilus F, la réplication et le transfert du plasmide sous forme intégrée.



Le transfert de l'ensemble du facteur F intégré demande beaucoup et il est donc souvent interrompu en raison d'une cassure aléatoire du tube conjugatif (figure). Par conséquent, dans la plupart des cas, seule la partie initiale du facteur F ($oriT$ adjacent) et quelques gènes bactériens et non la totalité du génome sont transférés de la souche Hfr vers les cellules F⁻. Les gènes chromosomiques du donneur transférés sont incorporés dans le génome de la cellule F⁻, ce qui donne une cellule recombinante. **Par conséquent, le receveur, une cellule F⁻ n'est généralement pas converti en cellule F⁺ mais en cellules F⁻ recombinantes.**

2- Méthode de cartographie génomique par la conjugaison bactérienne

Exemple

Principe : Les expériences de conjugaison interrompue permettent d'établir la carte génétique de la bactérie.

On réalise un croisement (conjugaison) entre 2 souches bactériennes :

Hfr : $Str^S a^+ b^+ c^+ d^+$: Autotrophe pour les gènes a, b, c, et d et sensible à l'antibiotique Streptomycine

F⁻ : $Str^r a^- b^- c^- d^-$: Auxotrophe pour les gènes a, b, c, et d et résistante à l'antibiotique Streptomycine

On prélève des échantillons à des intervalles de temps déterminés (5 min, 10min, 15 min...),

après agitation violente du milieu permettant d'interrompre le transfert génétique entre les deux souches (donatrice et réceptrice).

Chaque échantillon est mis en culture dans un milieu spécifique appelé milieu de criblage.

Un milieu de criblage est un milieu qui permet la sélection des recombinants ou trans-conjugants (réceptrice ayant reçu du matériel génétique de la donatrice).

Dans ce cas c'est un milieu complet (MC) qui ne contient pas l'un des substrats qu'on veut cartographier son gène et qui contient l'antibiotique pour éliminer les bactéries Hfr et ne laisser que les bactéries F⁻ recombinantes.

Les échantillons sont placés sur 5 milieux différents, supplémentés chacun avec des mélanges de substances différentes:

- un milieu sans A, mais avec B, C et D (milieu complet moins le A : MC-A+Str) permet la croissance des cellules qui auront intégré le gène a⁺.
- un milieu sans B, mais avec A, C et D (milieu complet moins le B : MC-B+Str) permet la croissance des cellules ayant intégré le gène b⁺.
- un milieu sans C, mais avec A, B et D (milieu complet moins le C: MC-C+Str) permet la croissance des cellules ayant intégré le gène c⁺.

Le chromosome Hfr est transféré à la cellule F⁻ d'une manière linéaire, commençant en un point spécifique pour chaque souche, l'origine de transfert oriT. Plus un gène est éloigné de Ori T, plus il est tardivement transféré à F⁻.

Ceci permet l'établissement de cartes de liaison, utilisant comme mesure de la distance entre les gènes **le temps de pénétration**.

Résultats de l'expérience :

(+) croissance bactérienne, (-) aucune croissance

	MC-A+Str	MC-B+Str	MC-C+Str	MC-D+Str	MC-E+Str
Après 5 min	+	-	-	-	-
Après 10 min	+	+	-	-	-
Après 15 min	+	+	+	-	-
Après 20 min	+	+	+	+	-
Après 25 min	+	+	+	+	+

L'ordre des gènes sur le chromosome est donc le suivant :

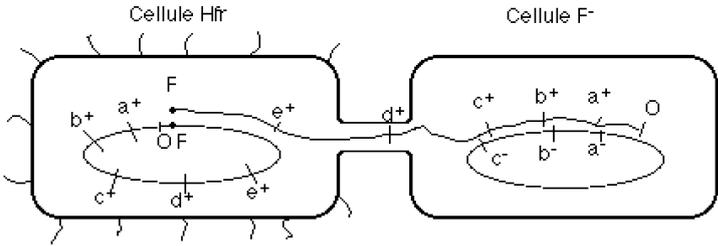


Schéma général de la conjugaison entre une bactérie Hfr et une bactérie F⁻