

TD : complément de génétique

**➔ Utilité de la conjugaison
chromosomique ➔ Utilité
de la transformation artificielle**

I /Utilité de la conjugaison chromosomique (fig.g1)

La conjugaison est un des principaux outils de la cartographie génétique des bactéries.

Principe

exploiter le gradient naturel de transmission des gènes



déterminer l'ordre des gènes sur le chromosome



construire une carte de liaison= **cartographie génétique**

Transfert du chromosome Hfr

Gradient naturel de transmission des gènes

Conjugaison chromosomique



Les gènes pénètrent dans l'ordre de leur inscription sur le chromosome

avec une vitesse proportionnelle à leur distance les uns des autres

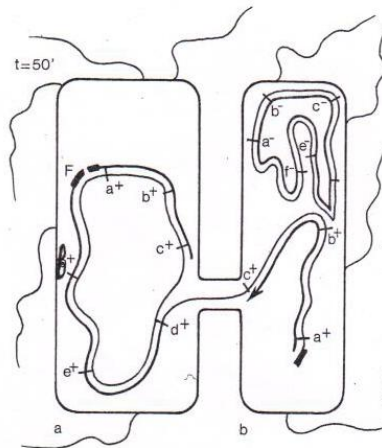
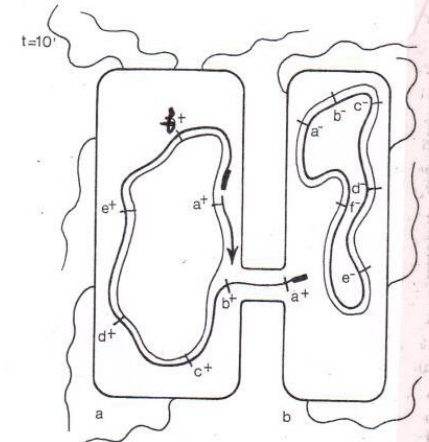
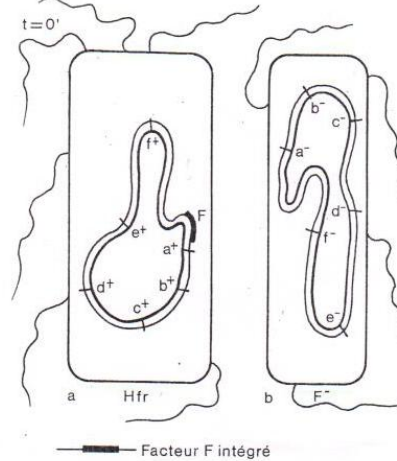


Fig. 14-14 Conjugaison bactérienne.

Soit la bactérie A, Hfr et la bactérie B, F⁻. Six gènes vont servir de marqueurs : a, b, c, d, e, f. Ces gènes sont fonctionnels chez la bactérie A, non fonctionnels chez la bactérie B. Le transfert commence environ 5 min après le contact au niveau du facteur F intégré. Un seul brin est transféré. Il est de suite remplacé par réplication dans la bactérie A (→). Le transfert est orienté (a = origine) et dure environ 60 à 90 min pour la totalité du chromosome. Le brin transféré est répliqué chez la bactérie B (→) et sera intégré par recombinaison (échange) au niveau de l'endogénote de la bactérie B.

Expérience de croisement interrompu :

Croisement entre une souche Hfr et une souche F-

Souche Hfr : $a^+ b^+ c^+ d^+ str^s$ → prototrophes

Souche F⁻ : $a^- b^- c^- d^- str^r$ → auxotrophes



suivre l'apparition des **recombinants prototrophes**
pour chacun des marqueurs en fonction du temps

= exconjugants F- auxotrophes
résistants qui ont acquis
les gènes de la souche donatrice

permet de déterminer le temps de pénétration de chaque gène
de la souche Hfr dans la bactérie F-

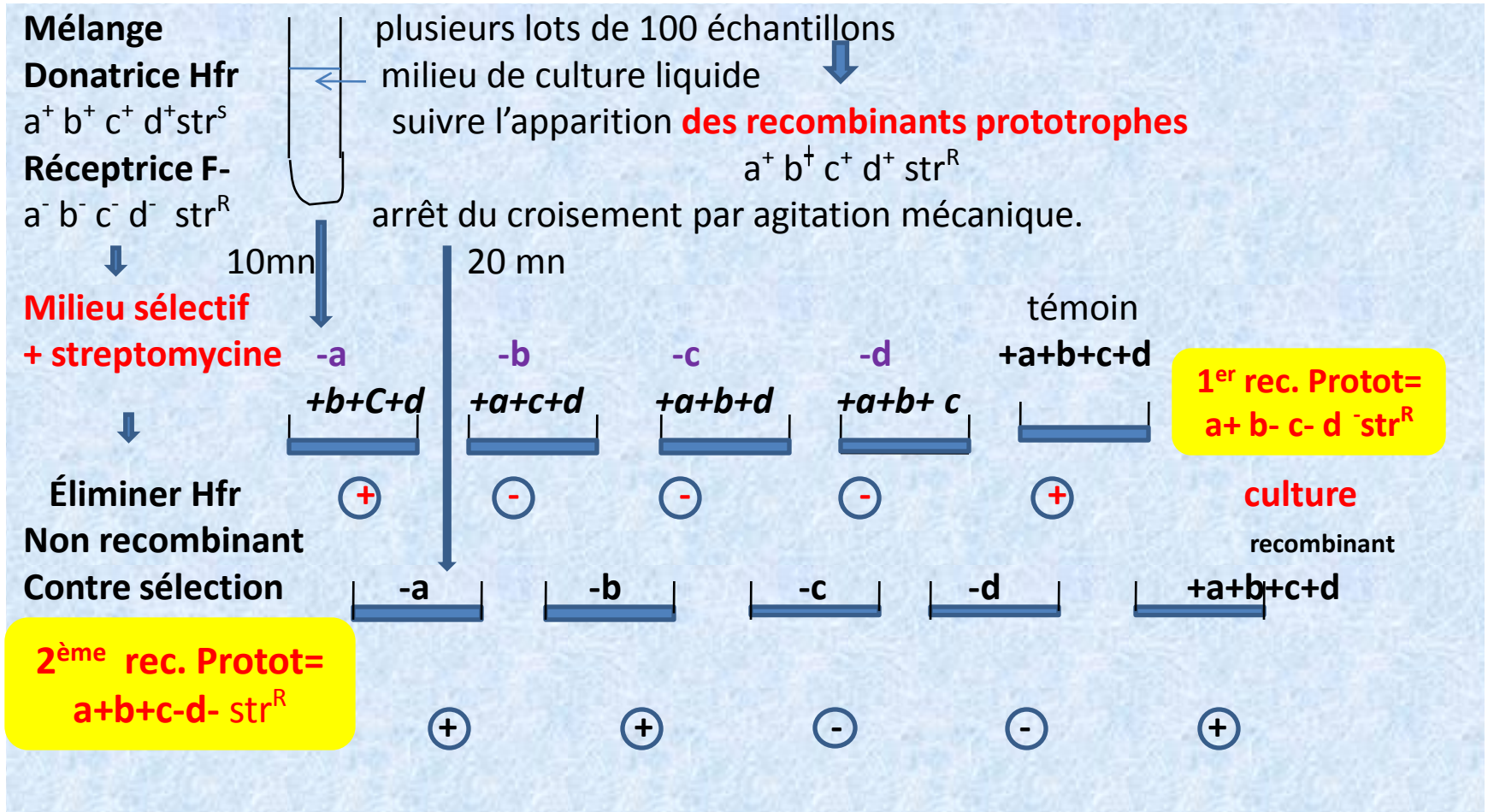


exploiter le gradient naturel de transmission des gènes

- ordre des gènes sur le chromosome
- la distance entre les gènes

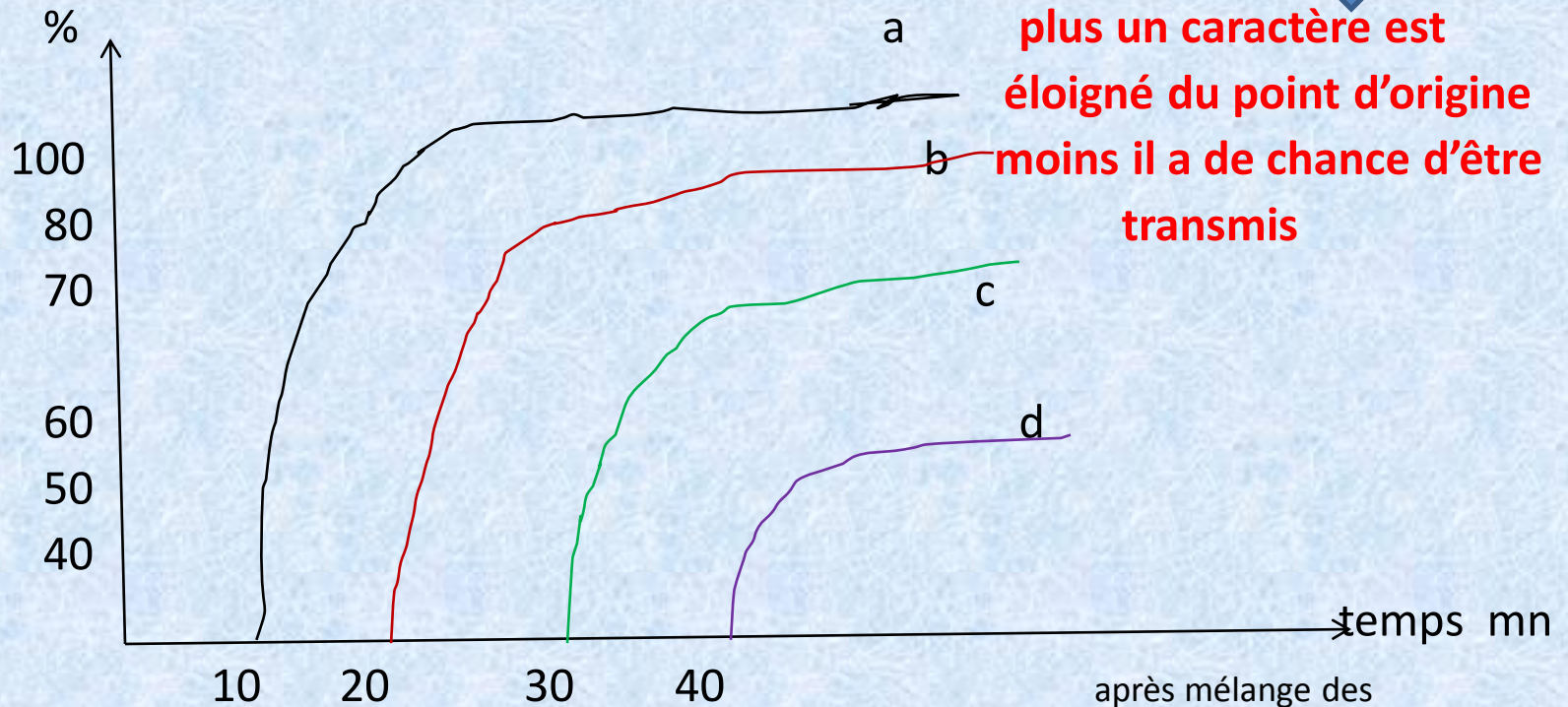
permet d'établir une carte génétique divisée en mn

Expérience de croisement interrompu :



Temps de pénétration des gènes de la souche Hfr dans la bactérie F⁻

Fréquence des caractères génétiques parmi les recombinants.



après mélange des cultures parentales
transfert de Ori T en 1^{er}, puis la suite des gènes progressivement: a 100%, b 80%, c 70%, d 50%

Conclusion : transfert chromosomique et carte génétique

Le transfert **unidirectionnelle** commence en un point donné du chromosome = **origine** s'effectue ensuite régulièrement.



Il est **orienté**, **progressif** et suit **le gradient de transmission des gènes**

Si la conjugaison n'est pas interrompue, **le chromosome entier sera transmis en 90 mn à 37°C.**

Cette éventualité est rare en raison des séparations spontanées des couples.



plus un caractère est éloigné du point d'origine, , moins il a de chance d'être transmis.

La carte génétique circulaire de référence d'E.coli K12

gradient naturel de transmission des gènes



- * ordre des gènes sur le chromosome +
- * la distance entre les gènes



permet d'établir une carte génétique divisée en mn

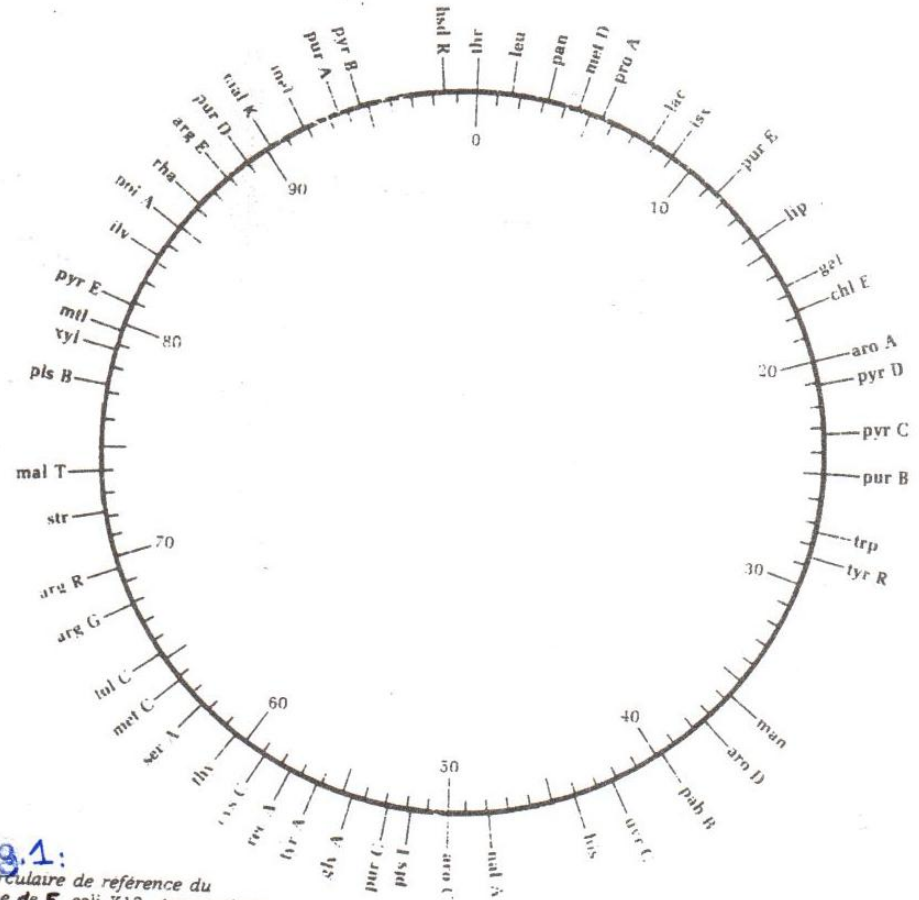


Figure 9.1:
La carte circulaire de référence du chromosome de E. coli K12. Autour de la périphérie externe sont indiqués les symboles de 52 gènes dont les localisations relatives sur le chromosome sont connues avec suffisamment de précision et peuvent servir de repères dans la cartographie des autres gènes. Le nombre à l'intérieur de la carte correspond au nombre de minutes nécessaires pour que le chromosome mâle entre dans la cellule femelle au cours de la conjugaison sexuelle de E. coli. Le point 0 est le gène thr.

II / Utilité de la transformation artificielle

La raison principale **du développement des techniques de transformation artificielle**



utilité en **génie génétique**

Introduction de molécules **d'ADN recombinant** dans des cellules bactériennes,



assurer leur multiplication donc leur amplification

étudier les mécanismes
qui gouvernent leur expression,

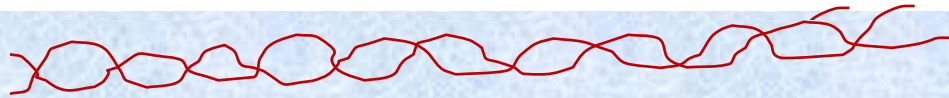
ou pour synthétiser des quantités
appréciables de produits trop peu
abondants dans leurs cellules d'origine

Exp :* synthèse de l'insuline (fig g3)

*synthèse de la somatostatine (fig g4)

Méthodes de préparation de l'ADN donneur

ADN



Extraction



purification

Endonucléases

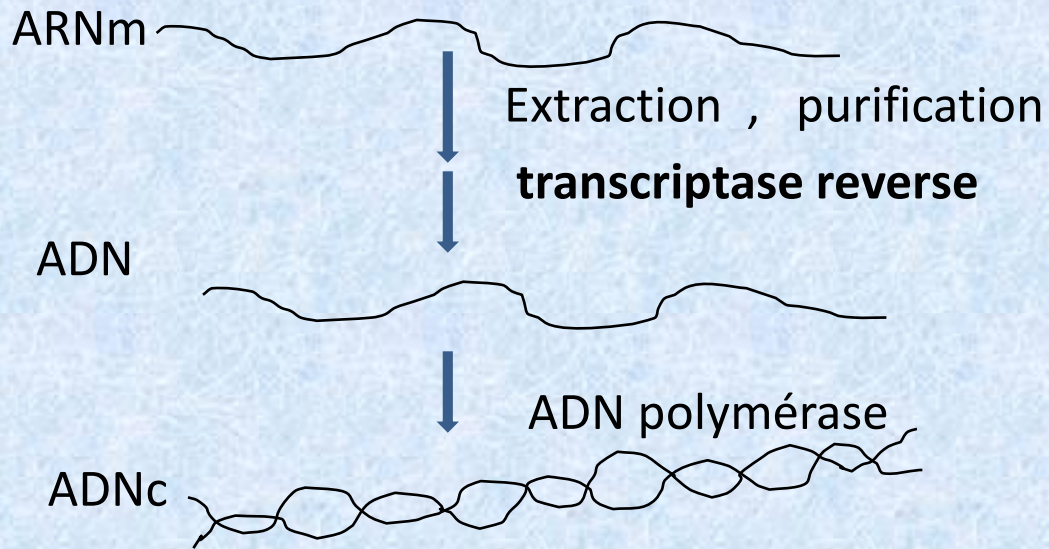


ADN génomique



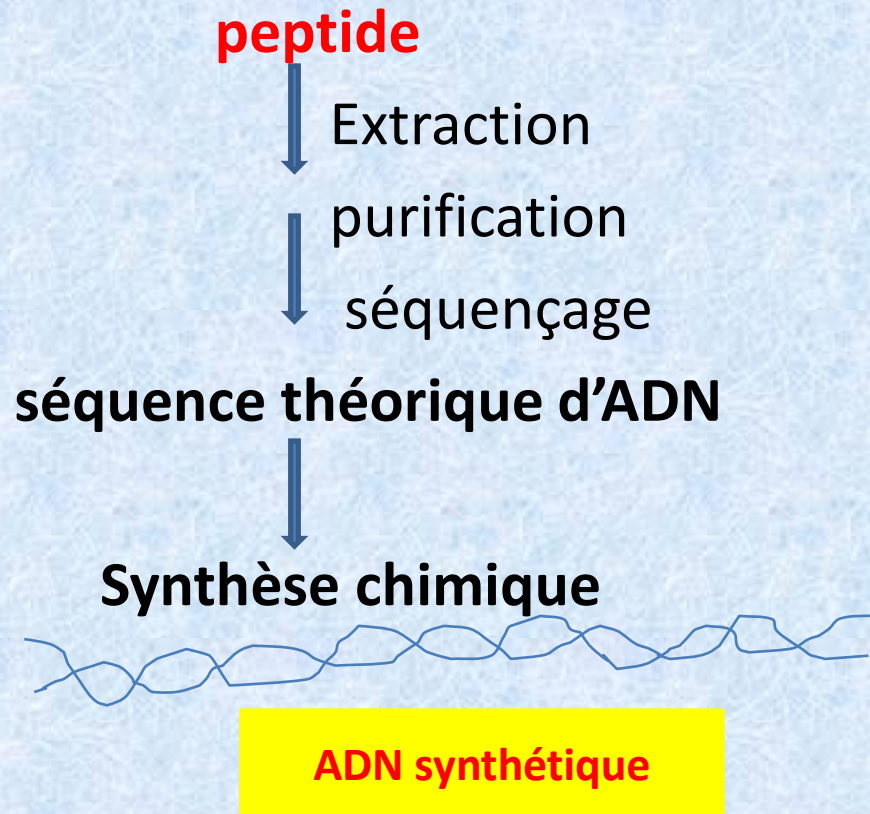
Extraction et traitement aux endonucléases

ADNc = ADN complémentaire



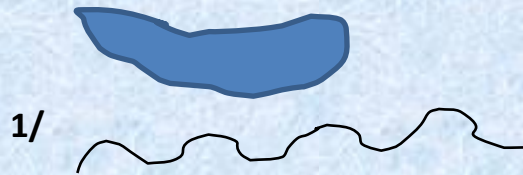
ADN complémentaire

Synthèse chimique



Synthèse de la proinsuline, un précurseur de l'insuline, par des clones d'E.coli transformés = clones recombinants

Pancréas humain



ARN m de l'insuline

2/+3/ **transcriptase réverse**

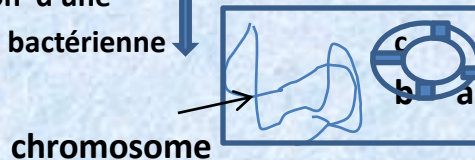


ADN c Complémentaire

4/



Infection d'une Culture bactérienne



Synthèse de l'insuline → hormone secrétée par le pancréas endocrine.

- 1/ Extraction de l'ARN_m de l'insuline à partir du pancréas.
- 2/ Effet de la **transcriptase réverse** qui transforme l'ARN_m en ADN.
- 3/ Effet d'une **polymérase** qui permet la formation de l'ADN complémentaire (ADN_c).
- 4/ **Raccordement au plasmide = vecteur de l'ADN étranger** → formation d'une **molécule d'ADN recombinante** contenant le gène de l'insuline et **la bactérie hôte est ainsi transformée.**

5/ **Le gène hybride est amplifié**

clonage de la bactérie

l'autoréplication du plasmide est avec une

grande vitesse/ à celle du chromosome

plusieurs exemplaires de l'ADN recombinant

la cellule réceptrice fabrique en abondance une protéine étrangère = proinsuline → : insuline.

Synthèse de la somatostatine

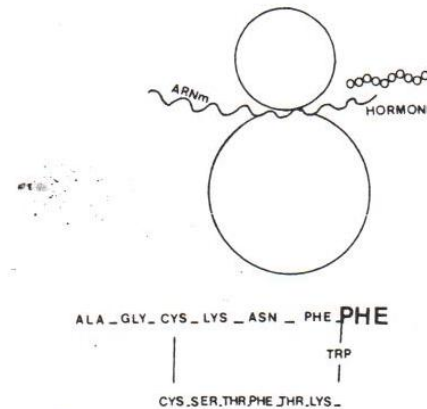
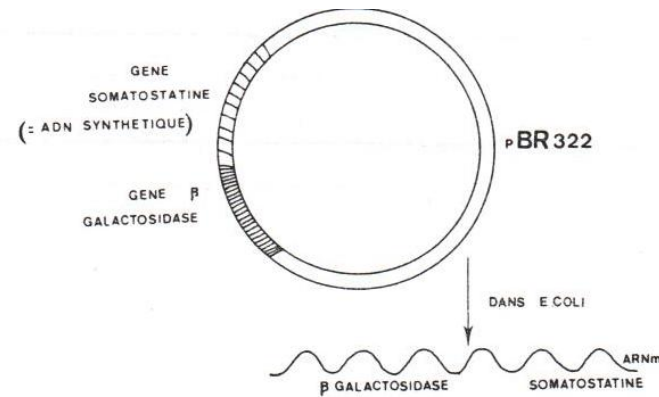
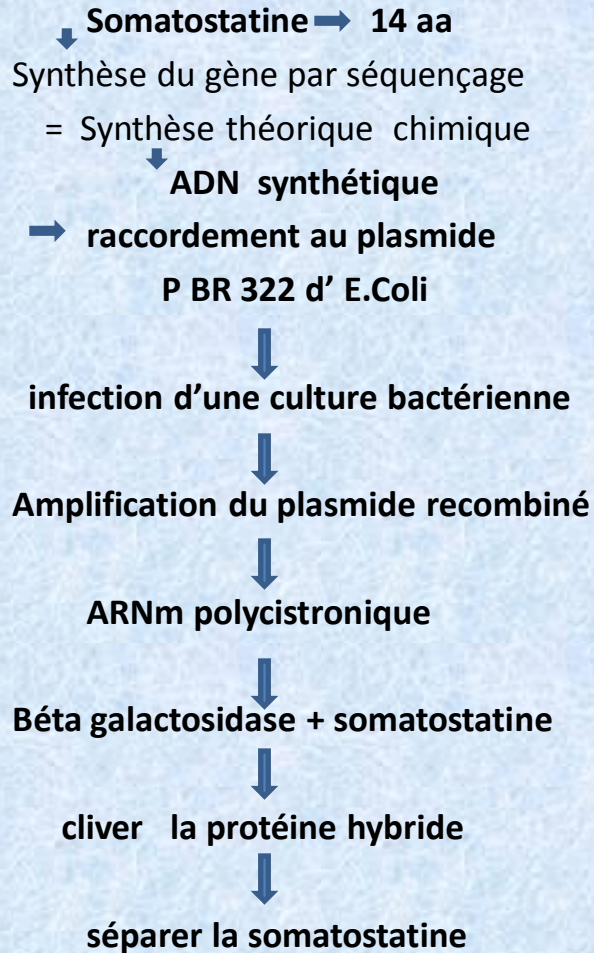


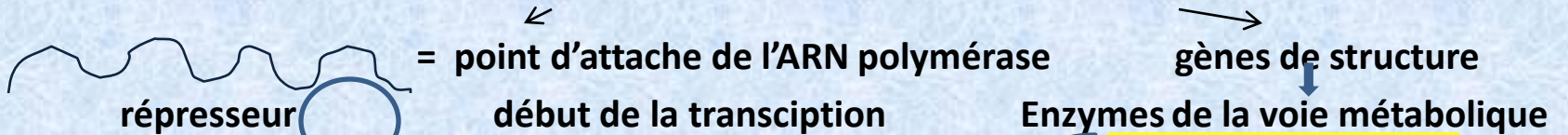
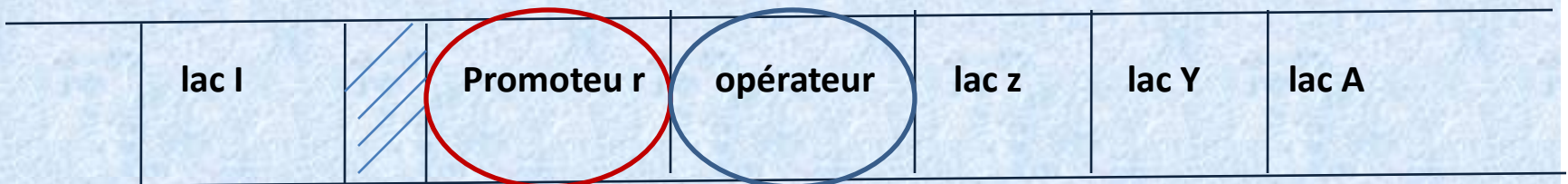
FIG. 84:

Le gène de la somatostatine, polypeptide de l'hypothalamus qui inhibe la libération de l'hormone de croissance par l'hypophyse, est formé de 14 acides aminés. Il a été entièrement synthétisé et intégré dans le plasmide pBR 322 avec une séquence de l'opéron lactose de la bactérie *Escherichia coli* (comportant le promoteur, le site de liaison CAT, l'opérateur, le site de liaison du ribosome et les 7 premiers codons du gène Z). Le plasmide recombiné se multiplie dans certaines bactéries (amplification). Les bactéries porteuses du plasmide sont sélectionnées par leur coloration bleue sur milieu contenant de l'ampicilline, de la tétracycline, du 5-bromo-4-chloro-3-indolyle-β-D-galactoside (Xgal). La coloration repose sur le fait que la galactosidase coupe le Xgal en libérant un dérivé (indolyde) de couleur bleue. Les gènes galactosidase et somatostatine sont transcrits en un ARNm polycistronique que traduisent les ribosomes de la bactérie. Il faut ensuite cliver la protéine hybride pour séparer la somatostatine.

Mécanisme d'action de l'Opéron lactose

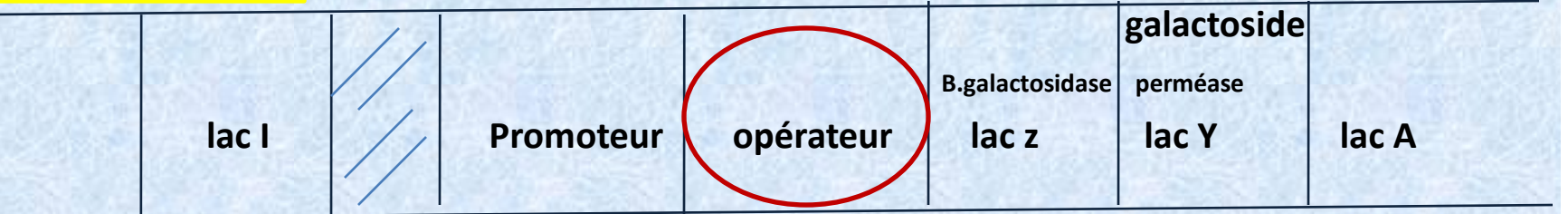
Régulation négative → En présence du glucose.

gène régulateur commande le fonctionnement des gènes de structure



Régulation positive → En présence du lactose

pas de synthèse



répresseur inducteur ARN m polycistronique
complexe répresseur inducteur : inactif

synthèse des enzymes