

1. découverte de la conjugaison

Dans la conjugaison, comme la transformation et la transduction, l'information génétique est transférée à partir d'une cellule bactérienne à l'autre. La conjugaison diffère de ces autres mécanismes de deux manières :

1. elle exige le contact entre les cellules donneuses et réceptrices,
2. elle transfère des quantités d'ADN beaucoup plus grandes (occasionnellement le chromosome entier).

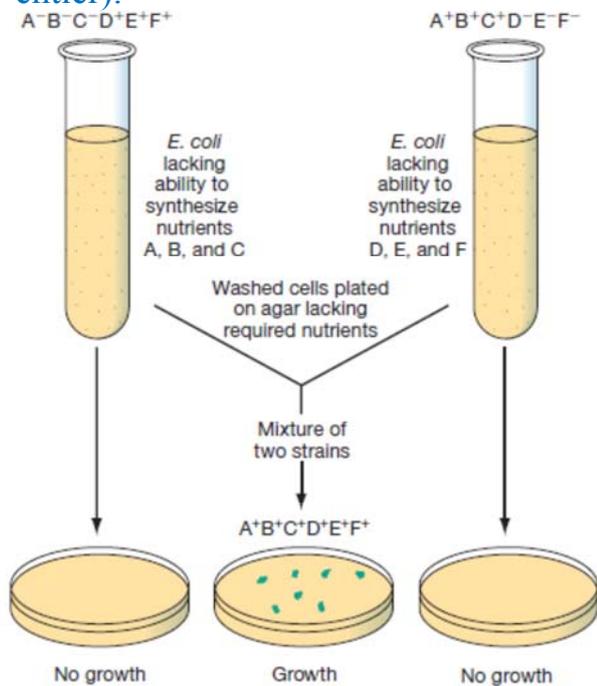


Figure 8.6 The discovery of conjugation: Lederberg's experiment.

La conjugaison a été découverte la première fois en 1946 par Joshua Lederberg, qui à ce moment-là était un étudiant en médecine.

Dans ses expériences, Lederberg a employé les souches mutées de *E. coli* K-12 qui ne pouvaient pas synthétiser certaines substances. Il a choisi deux souches, chacune déficiente dans une voie synthétique différente, et les a

introduit dans un milieu de culture enrichie

Il a enlevé des cellules de chaque culture et les a lavé pour enlever le résidu du milieu nutritif. Il a alors essayé des cultures de cellules de chaque souche sur des boîtes d'agar qui manquaient de nutriments spéciaux dont la souche a besoin.

Il a également mélangé les cellules des deux souches et les a ensemencé sur le même milieu. Considérant que les cellules des cultures originales ne se sont pas développées, certaines des cultures mélangées se sont développées. Ces dernières ont acquis l'agilité de synthétiser toutes les substances dont elles ont besoin.

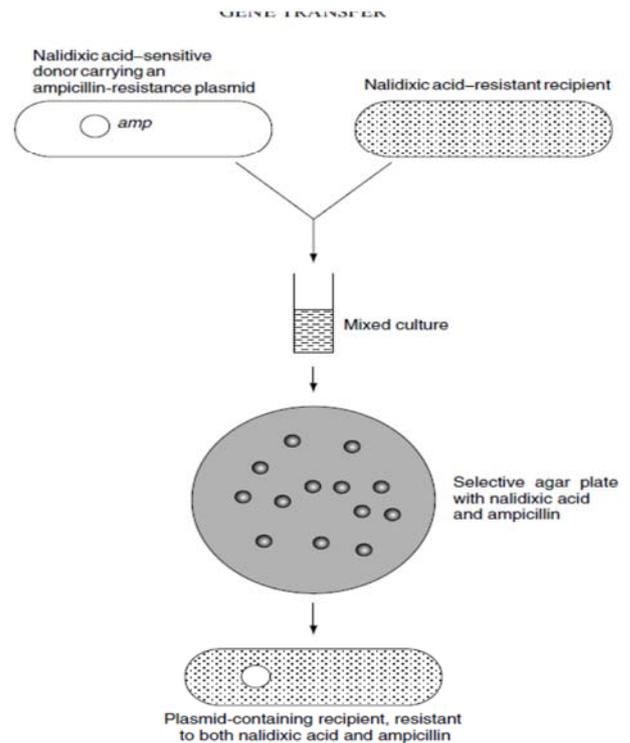


Figure 6.1 Conjugal transfer of a resistance plasmid. The donor strain is sensitive to nalidixic acid and carries a plasmid conferring ampicillin resistance (*amp*). The recipient is resistant to nalidixic acid, due to a chromosomal mutation, and sensitive to ampicillin. The growth of the mixed culture, plating on agar containing both ampicillin and nalidixic acid selects those recipients that have received the plasmid (transconjugants). The bacterial chromosome is omitted for clarity.

Lederberg et d'autres ont continué à étudier ce phénomène et ont

par la suite découvert plusieurs détails du mécanisme de la conjugaison. Lederberg était chanceux dans son choix des espèces, parce que des études semblables sur d'autres souches n'ont pas démontré une conjugaison

En plus des mutations qui donne des insuffisances synthétiques chez ces bactéries, il employé deux types cellules de *E. coli* qui étaient capables de conjuguer

Une série d'expériences a mené à la conclusion que **le contact direct entre les bactéries est exigé** afin que le matériel génétique soit transféré entre les cellules.

Ce transfert s'est avéré se produire dans une direction, des cellules donatrices aux cellules réceptives, par un mécanisme contenu dans les cellules de la cellule donneuse.

Des 1953, il a été déterminé que les cellules donneuses contiennent en effet un élément génétique séparé, le F (fertilité) **sexuel factor**, qui pourrait être transféré à la cellule réceptrice qui n'en contenait pas

L'analyse suivante du facteur sexuel F a confirmé que c'était un **plasmide** à réplication autonome qui code pour un filament extracellulaire, le pilus, essentiel pour la conjugaison.

autres éléments génétiques self-transmissible qui codent pour des gènes de résistance multiples aux antibiotiques ont été identifiés plus tard, suggérant que la conjugaison était importante pour la diffusion de caractères bactérien comme démontré par le transfert des facteurs R (résistance) entre les espèces de *Shigella* résistantes aux antibiotiques .

Depuis cette époque, le transfert des plasmides a été démontré, avec la

réplication de plasmide dans la nouvelle cellule hôte étant la barrière la plus importante à son établissement et maintenance.

Nous connaissons maintenant ce transfert conjugatif de l'ADN est une **fonction de sous famille de systèmes de sécrétions type IV (T4SS), avec like F- T4SS** représentant un groupe de systèmes apparemment impliqué du transport des acides nucléiques dans et hors cellules

La présence de like F- T4SS chez beaucoup de plasmides et génomes bactériens est une manière unique par laquelle F contribue au développement du génome bactérien. Il favorise également l'évolution des gènes et l'échange génétique par la mobilisation des gènes entre bactéries soit comme segments de chromosome soit le tout incorporé dans plasmide F lui-même.

2. le mécanisme de la conjugaison

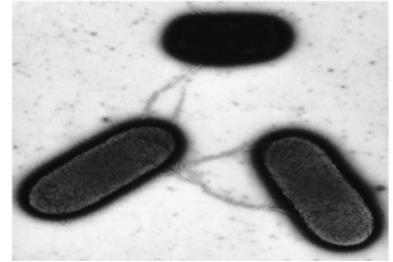
Les mécanismes impliqués dans la conjugaison ont été clarifiés par plusieurs expériences importantes, dont chacune est construite sur les résultats de précédentes.

De ces expériences, nous considérerons deux : transfert de plasmides F, et la **recombinaison de haute fréquence**. Les plasmides sont de petites molécules d'ADN extra chromosomique. Les Cellules bactériennes contiennent souvent plusieurs différents plasmides qui portent l'information génétique pour différentes fonctions non essentielles pour ces cellules.

3. Le Transfert des Plasmides F

Après l'expérience initiale de Lederberg, une découverte importante au sujet du mécanisme de la conjugaison a été réalisée. Deux types de cellules, appelés F1 et F2, existent dans n'importe quelle population d'*E. coli* capable de la conjugaison. Les cellules F1 contiennent l'ADN extra chromosomique appelé plasmide F (fertilité) ; les cellules F2 en sont dépourvues. (Lederberg a inventé le mot plasmide dans les années 1950s pour décrire ces fragments d'ADN.) Parmi l'information génétique contenue sur le plasmide de F celle pour la synthèse des protéines qui forment le pili de F. Les cellules F1 fabriquent un pili F (ou pili sexuel ou pili de conjugaison), un pont par lequel s'attache la cellule F2 quand les cellules F1 et F2 conjuguent. Une copie du plasmide F est alors transférée à partir de la cellule F1 à la cellule F2. F1 s'appellent les cellules donatrices ou masculines, et F2 s'appellent réceptrices ou cellules femelles. Bien que le processus exact de transfert demeure inconnu, l'ADN est transféré comme simple brin par l'intermédiaire d'un pont de conjugaison (canal joignant). Puisque le pili sexuel contient une ouverture cela permettrait le passage de l'ADN simple brin, il est possible, mais incertain, que cet ADN entre par ce canal. Cependant, il est également évident de suggérer que les cellules fondent temporairement, et pendant ce temps l'ADN est transféré.

Les pilis entrent en contact avec un site récepteur sur la surface



de la cellule F2 (réceptrice). Un pore est formé à ce site. À l'intérieur de la cellule de F, le pili est tiré dedans et démantelé. Ceci montre que les deux cellules sont étroitement ensemble. L'ADN de la cellule de F1 entre dans la cellule F2 à ce site. Chaque cellule synthétise alors le brin d'ADN complémentaire, tellement que toutes les deux ont un plasmide complet de F. Puisque toutes les cellules F dans une culture mixte de cellules F1 et F2 reçoivent le plasmide F, la population entière devient rapidement F1 ; mais dans une culture de cellules de F2, aucun transfert se produit, et les cellules demeurent des cellules F.

4. Recombinaisons De Haut-Fréquence (High-Frequency Recombinations Hfr)

Les mécanismes de la conjugaison ont été encore clarifiés quand le scientifique italien. Cavalli-Sforza a isolé un clone, d'une souche F1 qui pourrait induire plus que mille fois le nombre de recombinaisons génétiques vues dans les conjugaisons de F1 et F2.

La cellule donatrice est appelée souche à haute fréquence de recombinaison (Hfr). Les souches Hfr résultent de souches F1 quand le plasmide F est incorporé dans le chromosome bactérien sur un parmi plusieurs sites possibles. Quand une cellule Hfr sert de donatrice dans la

conjugaison, le plasmide F initie le transfert de l'ADN chromosomique.

Habituellement, seulement une partie du plasmide F, appelée le segment initiateur, est transférée, avec quelques gènes chromosomiques adjacents

En 1950, Wollman et Jacob étudiaient le processus Hfr dans une série d'expériences de conjugaison interrompues. Ils ont combiné des cellules d'une souche Hfr avec des cellules d'une souche F et prennent des échantillons des cellules à intervalles courts. Chaque échantillon de cellules a été soumis à l'agitation mécanique par la vibration pour perturber le processus de conjugaison. Les cellules de chaque échantillon étaientensemencées sur variété de milieux dont, chacun manque d'un nutriment particulier, pour déterminer leurs besoins nutritifs.

Les recherches ont montré que le transfert de l'ADN dans la conjugaison se produit selon un modèle linéaire et selon une chronologie précise. Quand la conjugaison a été perturbée après 8 minutes, la plupart des cellules réceptives avaient reçu un gène. Quand elle a été perturbée après 120 minutes, les cellules réceptives avaient reçu beaucoup plus d'ADN, parfois un chromosome entier.

Le facteur F est souvent associé à *E. coli* et semble agir comme agent d'échange génétique et d'évolution. F code pour système de sécrétion type IV (T4SS) cela permet le transfert de l'ADN à partir d'une cellule donatrice F+ à la cellule réceptrice F-.

La livraison des gènes de l'hôte ou d'ADN étranger a d'importantes conséquences pour la bactérie,

agrandir ou modifier son contenu génétique (plasticité) et s'adapter rapidement à sa niche écologique. Les fonctions conjugatives de F apparaissent contrôlées par un réseau de régulation complexe cela implique beaucoup de protéines hôtes résultantes d'une relation symbiotique entre F et son hôte.

5. La structure du plasmide f

Le plasmide de F de *E. coli* est approximativement 100 kb dans la taille (99,159 bp), plus d'un tiers est composé des opérons impliqués en facilitant le transfert de plasmide ;

La majorité des gènes connus se situent dans deux régions principales sur le plasmide, qui contiennent le transfert (*tra*) et régions centrales, qui contiennent des gènes impliqués dans la conjugaison et l'établissement du plasmide dans la cellule réceptrice, respectivement.

La deuxième région contient des gènes impliqués dans la réplication, division, et l'entretien du plasmide, incluant le réplicon RepFIA, un homologue de la protéine -liant ADN simple-brin codé près de *ssb* ou *ssf*, des gènes de division *sopABC*, le système toxine/antitoxine *ccdAB*, et les gènes *pif*, lié à l'inhibition du bactériophage, et l'origine de réplication *oriV*

un deuxième réplicon, RepFIB, aussi bien qu'une intégrase-like gène, *Int*. Une troisième région contient des gènes de fonction inconnue, mutations dans lesquelles, aucun effet mesurable de survie ou de diffusion de F.

La principale région, qui est la première partie du plasmide à transférer

dans la cellule réceptrice, contient les gènes qui sont conservés dans beaucoup de plasmides like F -.

De tels gènes conservés incluent *orf169*, un homologue de transglycosylases lytique probablement impliquée en construisant l'induction du transfert ; *psiAB*, un système pour empêcher des réponses SOS; et *ssb* ou *ssf*, qui est protéine d'interaction ADN simple brin - qui pourrait être impliquée en favorisant la réplication de l'ADN dans la cellule réceptrice

le plasmide F contient trois réplicons séparés : *RepFIA* , *RepFIB* , et non fonctionnel *RepFIC* , qui est interrompu par un élément *Tn1000*.

Bien que tous les deux *RepFIA* et *Rep-FIB* sont des réplicons complets et fonctionnels, *RepFIA* est le premier réplicon contrôlant la réplication du plasmide F, avec des origines bidirectionnelles de réplication, *oriV* and *oriS*, respectivement.

Le plasmide F contient quatre séquences d'insertion significatives. dans plus de *Tn1000* et *IS3* a inséré dans *RepFIC* et *finO*, respectivement, il y a également *IS2* et *IS3b* qui apparaissent être en dehors de tout codage de gènes. Ces séquences d'insertion sont censés avoir un impact significatif sur la cellule par la promotion de l'intégration et, plus tard une excision imprécise dans le chromosome hôte. L'insertion de *IS3* dans l'extrémité du gène distal *finO* de l'opéron *tra* aussi a un impact profond sur le transfert de F. Cette interruption mène directement à l'expression constitutive, ou la répression, des gènes *tra* et le transfert de F en inactivant la fonction de la protéine *FinO*

Le " côté noir " de F contient peu de gènes avec la fonction connue ou prévue

Deux gènes putatifs, *ycbB* et *ychA*, codent pour des protéines qui donnent homologie partielle de l'adhésine précurseur. AIDA-I de *E. coli*

Un autre gène, *ybaA*, code pour un homologue de la selenite dissimilatory reduction proteine, considérant que *Int*, une intégrase like phage, est adjacent du replicon *RepFIB*.

Un autre gène fonctionnel, *ompP*, initialement considéré être situé sur le chromosome, code pour une protéine qui est homologue approximativement a 70% avec *OmpT* code chromosomiquement, pour une protéase associée a la membrane externe.

Les autres nombreux gènes "yxx" de fonction inconnue pourraient refléter l'histoire évolutive de F en tant que intégrés et excisés dans un chromosome ou d'autres éléments.

Que ces gènes sont maintenus stables infère du fait qu'ils pourraient avoir une fonction qui a échappé à la détection. Plusieurs de ces derniers gènes putatifs partagent homologie aux deux niveaux (prédits) acide aminé et nucléotide avec autre plasmide like -F renforce cet argument. Le meilleur élément caractérisé de F est la région de transfert (*tra*). région composée de deux opérons monocistroniques, *traM* et *traJ*, et l'opéron *tra* multicistroniques 33.3 kb.

La plupart des gènes requis pour l'élaboration du pili et un Transfert

conjugatif d'ADN sont codés dans la région *tra*.

Il présente des moyens de l'échange génétique par l'intermédiaire de la recombinaison homologue par transport de l'ADN chromosomique l'un ou l'autre dans de petites sections sur épisomes F₋ ou les grands par l'intermédiaire du mode Hfr (high frequency of recombination).

le style de vie de *E. coli*, varie selon ses habitats dans l'eau ou le sol. la composition du milieu, subit de grandes variations dans la température et l'osmolarité, et les vie libres ou en communautés ou en biofilms. Le potentiel conjugatif du plasmide F est sensitif a ces variations et exprime les gènes de transfert seulement quand les conditions sont optimales.

Il transfère bien dans des milieux liquide ou solides et devient "phénotypiquement F⁻" (i.e., n'exprime pas les gènes de transfert) dans la phase stationnaire.

6. Le rôle de F comme facteur sexuel

Lors de la conjugaison les cellules acquièrent un "ensemble" de nouveaux gènes résidant sur le plasmide entrant ; l'exemple le plus notable étant les gènes codant pour la résistance antibiotique. F a été isolé dans sa forme réprimé, qui s'est avérée peu commune.

Beaucoup de chercheurs ont observé les coûts énergétiques de maintenir réprimé le système de transfert et les dangers d'une susceptibilité accrue aux bactériophages spécifiques F-pili.

On se demande pourquoi F est maintenu stable et pourquoi la région de transfert n'est pas inactivée. F

module l'expression génétique de son hôte pour minimiser ses dépenses d'énergie. La présence de F régule en amont une variété de transporteurs ABC impliqués dans la prise d'acide aminé et en aval quelques ARNt synthétases d'acide aminé. F semble changer le métabolisme d'acide aminé qui pourrait être lié aux niveaux élevés de pilin F⁻ dans la cellule (estimé être environ 100,000copies). Ainsi, le transfert de F est efficace dans les milieux d'excellents sources de carbone tels que le glucose, et à une gamme assez étroite des températures avec 37 °C to 42 °C étant préféré.

F semble avoir remplacé la répression par l'inhibition du système de fertilité (*FinOP*) d'autre F-like plasmides avec un programme complexe de régulation qui arrête l'expression de gène de transfert pendant que la cellule hôte entre dans la phase stationnaire. Considérant que la phase stationnaire, (appauvrissement), est probablement l'état normal pour *E. coli*, la cellule dépense peu en maintenant F. Si les conditions s'améliorent, l'appareil de transfert peut être rétabli pendant des minutes, suggérant que les composants de l'appareil soient démontés pendant la phase stationnaire mais ne sont pas nécessairement dégradés. Ceci peut être illustré par l'observation du fait que l'addition d'un peu de glucose à la phase stationnaire des cellules peut reconstituer complètement des capacités de conjugaison dans un délai de 30 minutes à 37°C

Le transfert de F lui-même peut se produire d'une cellule donatrice à une cellule réceptive pendant le début de la phase exponentielle. F peut

également transférer dans les cellules stationnaires F+ (F- phénocopies) en raison de la régulation des gènes d'exclusion.

L'engagement dans le transfert conjugatif d'ADN, fournit les conditions pour l'expression optimale du gène *tra*.

F a trois identités de base : comme F, comme **épisode F₋**, et comme souche Hfr par lequel F est incorporé dans le chromosome.

Comme F, il peut acquérir des gènes porté sur des **transposons, séquences insertion, bactériophages intégratifs, et intégrons** et les déplacer entre les bactéries.

Il est en mesure à rencontre un autre élément conjugatif et gènes d'échange ; le mosaïcisme dans les systèmes de transfert conjugatif est clairement évident, et beaucoup d'exemples de la perte et de l'acquisition de gènes ont été catalogués.

Le système **T4SS** donne l'exemple de la perte fréquente de sa-transmissibilité de gène, et interruption de opérons *tra* par le **modèle de cassettes pour la résistance aux antibiotiques**, entre d'autres. Comme épisodes de F (e.g., F_{-lac}, F_{-his}, F_{-pro}) cela peut maintenir stable d'importantes parties du chromosome, F agit comme " zone de travail " pour l'évolution.

Dans cet état, il y a deux copies de chaque gène sur l' épisode F₋ et le chromosome.

Un phénomène intéressant récent est le concept de **la mutation adaptative**, dans lequel un F₋ favorise des mutations ponctuelles qui **échappent à la réparation** pendant le choix des traits

qui combattent la privation ou la mort. F a également la propriété de l'intégration dans le chromosome dans beaucoup de sites différents à une fréquence d'environ 0.01%. Ces plasmides F intégrés sont maintenus stables et ont un taux d'excision bas, avec l'excision imprécise menant à formation de l'épisome F.

L'intégration se produit par des ordres comme Tn1000, IS2, ou éléments **IS3 via RecA**- dépendant de la **recombinaison homologue** ou via un événement de transposition. Les souches Hfr ont la capacité de transférer le chromosome entier, ce qui prend approximativement 90 minutes. Ce sert de base aux techniques employées pour tracer une carte du chromosome de *E. coli* ; en fait, des minutes sont encore employées comme unité mesure des distance chromosomique chez *E. coli*.

Rarement F, si jamais, les transferts du chromosome entier et les gènes distaux de F chez une souche Hfr avec une fréquence décroissante, un phénomène connu sous le nom de gradient de transmission. Cette propriété permet à des gènes d'être tracés en respect de leur distance du site d'insertion de F. Les raisons du gradient de la transmission sont spéculatives et inclure une coupure dans l'ADNss transféré, une coupure dans le pont de conjugaison, ou la présence de séquences dans l'ADN qui imitent les séquences dans F près d'*oriT* signe d'arrêt.

La région de transfert est la dernière séquence à transférer dans la conjugaison Hfr-, signifiant que la cellule réceptrice n'est jamais convertie au statut F+. Encore, ceci suggère que

F est un outil d'*E. coli* plutôt que d'agir en tant que "ADN égoïste," une propriété de beaucoup d'éléments mobiles. F est peu commun du fait que ses réplicons sont en repos quand il est dans l'état *Hfr*; ils sont capables d'exprimer l'incompatibilité, mais ils ne lancent pas la réplication à moins que l'origine chromosomique soit inactivée. Ainsi, *E. coli* a développé un rapport symbiotique avec son facteur sexuel lequel il commerce l'entretien de F pour les avantages de l'échange génétique.

L'expression de gène de transfert de F se produit seulement quand les conditions sont optimales pour son hôte. À la différence des plasmides comme ceux dans le groupe d'incompatibilité *IncP*, F et les plasmides relatifs ont développé beaucoup de circuits de contrôle qui impliquent les éléments de régulation de l'hôte, pour lui permettre de surveiller l'état métabolique de son hôte.

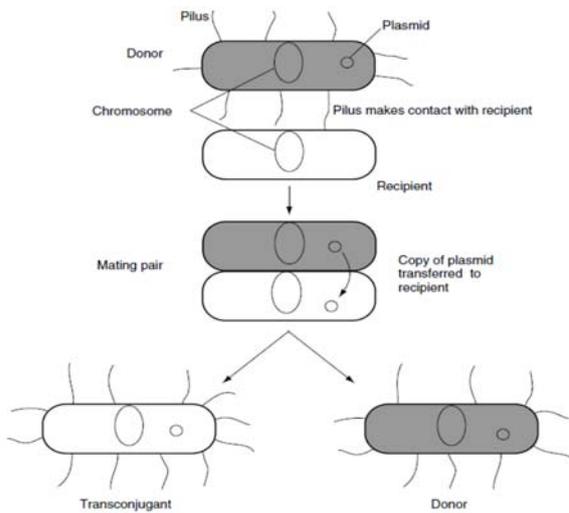


Figure 6.2 Transfer of DNA by conjugation

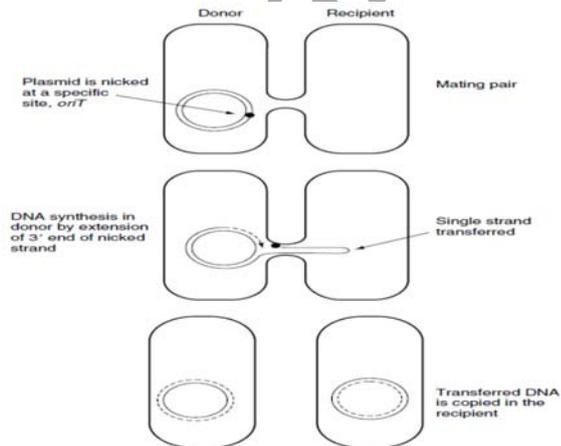
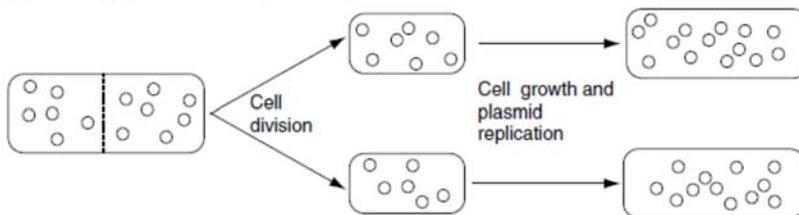


Figure 6.3 Mechanism of plasmid DNA transfer by conjugation. For clarity, only the plasmid is shown

(a) Multi-copy plasmid; random partitioning



(b) Low copy-number plasmid; directed partitioning

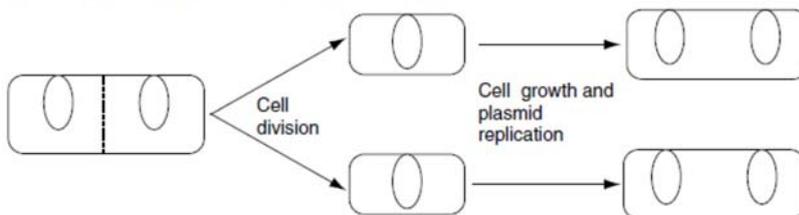


Figure 5.2 Partitioning of plasmids at cell division