TD 5 : GÉNÉTIQUE BACTÉRIENNE
Exercices et solutions

I - : TAUX DE MUTATION

Soit une culture d'*E.coli*, sensible à la streptomycine, dont la dilution 10^{-7} , étalée à raison de 0,1 ml sur un milieu gélosé en boîte de Pétri, donne après incubation, 10 colonies.

1) 0,1 ml de cette culture est étalé sur un milieu gélosé additionné d'un antibiotique, la streptomycine, à une dose supérieure à la CMI. Après incubation, la boîte de Pétri montre 4 colonies.

Quel est le taux de mutation des résistants à la streptomycine?

- ✓ L'opération effectuée consiste à étaler un volume de 0,1 ml de la dilution 10^{-7} d'une culture d'*E. coli* sur de la gélose nutritive. Après incubation, nous avons compté 10 colonies dans la boite ensemencée. Cette opération va nous permettre de déterminer le titre ou la concentration bactérienne de la culture d'*E. coli* (C).

C = 10 colonies x 10^7 (facteur de dilution) = **10^8 UFC/ 0,1 ml = 10^9 UFC/ml**

- ✓ Lorsqu'on a étalé 0,1 ml de la culture non diluée d'*E. coli* (10^8 UFC) sur de la gélose nutritive additionnée de la streptomycine à une concentration supérieure à la CMI (GN + Stp), nous avons obtenu, après incubation, 4 colonies.

Quel est le phénotype de ces quatre colonies ?

Les quatre colonies sont des *E. coli* résistant à la streptomycine. Cette résistance est apparue **spontanément** au sein de la population analysée (10^8 UFC).

Quel est le taux de mutation des résistants à la streptomycine?

Tm1 = Nombre de mutants / nombre total des individus composant la population analysée

Tm1 = 4 UFC / 10^8 UFC ; Tm1 = $4x10^{-8}$

NB : le taux de mutation est sans unité

2) La culture initiale est traitée par un agent mutagène, la nitroso-guanidine, puis étalée comme précédemment à raison de 0,1 ml sur le même milieu gélosé à la streptomycine (GN + Stp). Après incubation, la boîte de Pétri montre 40 colonies.

Calculez le taux de mutation (Tm2) des résistants. Comparez cette valeur à celle trouvée précédemment et conclure.

On appelle agent mutagène tout facteur qui peut entraîner une mutation. Il peut s'agir d'un facteur physique (radiations ionisantes, par ex) ou chimique (ex nitroso-guanidine).

Dans cette deuxième opération, nous avons traité la culture d'*E. coli* (Stp ^{S}) par un agent mutagène chimique (la nitroso-guanidine). Ensuite 0,1 ml de la culture traitée est étalé sur gélose nutritive + streptomycine (GN + Stp). Après incubation, nous avons dénombré 40 colonies.

Combien de germes bactériens traités à la nitroso-guanidine a t-on déposé sur la GN + Stp ?

Réponse : nous avons déposé 0,1ml de la culture non diluée d'*E. coli* c'est à dire un nombre équivalent à 10^8 UFC.

Quel est le taux de mutation (Tm2) après traitement à la nitroso-guanidine ?

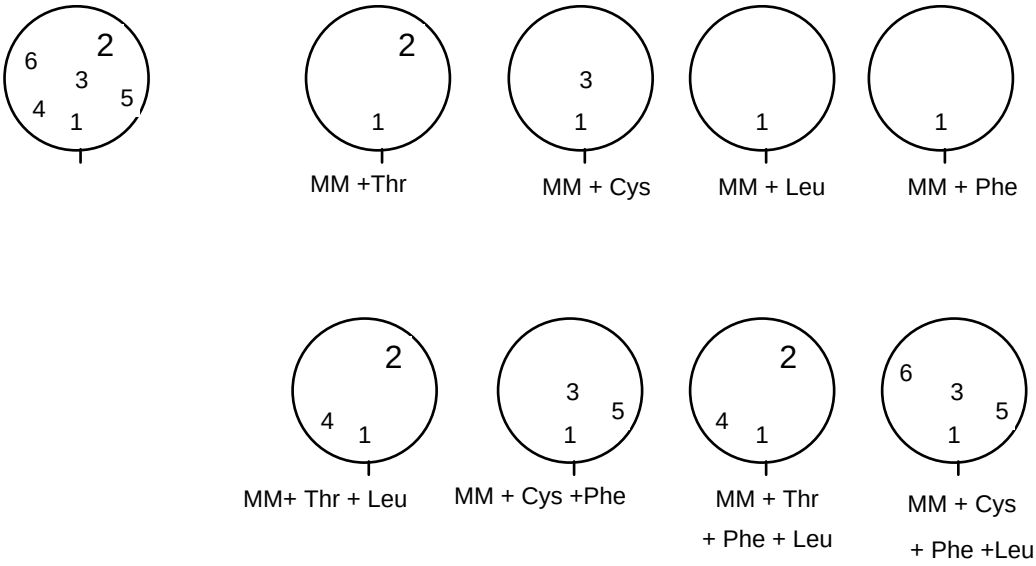
Tm2 = 40 / 10^8; **Tm2 = 4x10^{-7}**

On remarque que **Tm2 > Tm1**

Au niveau de la dernière expérience, nous avons en plus des mutants spontanés, d'autres mutants **« induits »** par l'agent mutagène. La nitroso-guanidine a augmenté la probabilité des modifications de l'ADN et par conséquent le nombre de bactéries devenues résistantes à la streptomycine.

II: MUTANTS DÉFICIENTS (AUXOTROPHES)

Six clones d'*E.coli* numérotés de 1 à 6, sont cultivés sur milieu minimum MM additionné de thréonine (Thr), leucine (Leu), Phénylalanine (Phe) et cystéine (Cys), puis repiqués par la technique du tampon de velours sur huit milieux minima MM diversement additionnés d'un ou de plusieurs de ces quatre acides aminés, comme indiqué sur la figure. Les clones qui poussent sur les boîtes de Pétri sont indiqués par leurs numéros.



Indiquer quels sont les phénotypes qui correspondent à ces 6 clones

Solutions :

La technique de velours consiste en : (velours = elmoubra en arabe)
Un morceau de velours stérile est tendu sur un cylindre de métal ou de bois dont le diamètre est légèrement plus petit que celui d'une boîte de Pétri. En appuyant légèrement le velours sur une gélose en boîte de Pétri contenant des colonies bactériennes, une fraction de chaque colonie est transférée sur le velours. En appliquant ensuite la surface du velours sur une autre gélose vierge, on obtient d'un seul coup un repiquage colonie par colonie de la première gélose, et en répétant les « répliques », on peut repiquer l'ensemble des colonies d'une boîte de Pétri sur de multiples boîtes.

Sur la boite contenant (MM + Thr+Cys+Leu+Phe), les six clones se développent. Ceci laisse supposer que ces clones ensemble ou chacun d'entre eux est peut être prototrophe ou auxotrophe (pour 1 acide aminé, deux, trois ou tous les quatre).
Nous allons essayer de traiter clone par clone pour déterminer leurs phénotypes correspondants : chaque clone est peut être prototrophe ou auxotrophe (pour 1 acide aminé, deux, trois ou tous les quatre).

Clone n°1

- Ce clone se développe sur le MM+Thr : Cela veut dire qu'il est capable de pousser en absence de la Cystéine, de la Leucine et de la Phénylalanine (Il n'est donc pas auxotrophe pour ces trois derniers acides aminés).
- Il faut voir s'il exige la Thréonine (Thr) pour sa croissance ou non. Or nous remarquons qu'il se développe sur les autres milieux (en absence de la Thr).
- Ce clone est donc prototrophe : Thr^+ Cys^+ Leu^+ Phe^+

Clone n°2 : -

- Ce clone se développe sur le MM+Thr : Cela veut dire qu'il est capable de pousser en absence de Cys, Leu et Phe (Il n'est pas donc auxotrophe pour ces trois derniers acides aminés).
- Il faut voir s'il exige la Thréonine (Thr) pour sa croissance ou non. Nous remarquons qu'il ne se développe pas sur les milieux ne contenant pas de Thr.
- Ce clone est donc auxotrophe pour la Thréonine : Thr^- Cys^+ Leu^+ Phe^+

Clone n°3 :

- Ce clone se développe sur le MM+Cys : Cela veut dire qu'il est capable de pousser en absence de Thr, Leu et Phe (donc, Il n'est pas auxotrophe pour ces trois derniers acides aminés).
- Il faut voir s'il exige la Cystéine (Cys) pour sa croissance ou non. On note qu'il ne se développe pas sur les autres milieux quand la cystéine est absente.
- Ce clone est donc auxotrophe pour la Cystéine : Thr^+ Cys^- Leu^+ Phe^+

Clone n°4 :

- Ce clone ne se développe pas sur le MM avec un seul acide aminé : Cela veut dire qu'il exige **au moins** deux acides aminés différents. Il se développe uniquement sur MM + Thr + Leu et sur MM + Thr + Phe + Leu. Rien qu'on nous basant sur ce résultat, nous pouvons déduire facilement

que ce clone n'est auxotrophe ni pour la Phénylalanine (Phe) ni pour la Cystéine (Cys).

Ce clone est donc auxotrophe pour la Thréonine et la Leucine :

Thr^{-} Cys^{+} Leu^{-} Phe^{+}

Clone n°5 : Il est peut être prototrophe ou auxotrophe (pour un, deux, trois ou tous les quatre).

- Ce clone ne se développe pas sur le MM avec un seul acide aminé : Cela veut dire qu'il exige **au moins** deux acides aminés différents. Il se développe uniquement sur MM + Cys + Phe et sur MM + Cys + Phe + Leu. On nous basant sur le fait que ce clone pousse sur MM + Cys + Phe, nous pouvons déduire que ce clone n'est pas auxotrophe pour la Thréonine (Thr) ni pour la Leucine (Leu) . L'absence de **l'un** des deux autres acides aminés (**Cys** ou **Phe**)

Ce clone est donc auxotrophe pour la Cystéine et la Phénylalanine :

Thr^{+} Cys^{-} Leu^{+} Phe^{-}

Clone n°6 :

- Ce clone ne se développe pas sur le MM avec un seul acide aminé : Cela veut dire qu'il exige deux ou trois acides aminés différents.

Autrement-dit, il pourrait être Cys^{-} Phe^{-} ; Phe^{-} Leu^{-} ; Cys^{-} Leu^{-} ou Cys^{-} Phe^{-} Leu^{-}.

Vérification : Sur MM+Cys+Phe, il ne se développe pas ; sur MM+Phe+Leu, il ne se développe pas non plus ; mais nous n'avons pas testé MM+Cys+Leu. Il pourrait donc être Cys^{-} Leu^{-} ou Cys^{-} Phe^{-} Leu^{-}.

- Pour trancher il faut repiquer le clone n°6 sur un milieu minimum additionné de Cystéine et de Leucine.

S'il se développe c'est qu'il est Thr^{+} Cys^{-} Leu^{-} Phe^{+} ; s'il ne se développe pas c'est qu'il est Thr^{+} Cys^{-} Leu^{-} Phe^{-}

III: CONJUGAISON INTERROMPUE

On mélange une souche d'*E.coli* K12 **Hfr** portant les marqueurs (T^+ L^+): pouvoir de synthétiser la thréonine et la leucine, (T_1^S): sensible au phage T_1, (Lac+): fermentant le lactose, (Gal $^+$): fermentant le galactose, (Str^S): streptomycine sensible et une souche **F^-** portant les marqueurs (T^- L^-), (T_1^r), (Lac^-), (Gal^-), et (Str^r). On interrompt la conjugaison aux temps indiqués ci-contre et on étale pour chaque temps des échantillons sur des milieux qui permettent de cribler les recombinants. Les résultats sont:

10 mn : (T^+L^+) (Gal^-) (Lac^-) (Str^r) (T_1^r)
15 mn : (T^+L^+) (Gal^-) (Lac^-) (Str^r) (T_1^S)
20 mn : (T^+L^+) (Gal^-) (Lac^+) (Str^r) (T_1^S)
28 mn : (T^+L^+) (Gal^+) (Lac^+) (Str^r) (T_1^S)

Déterminez l'ordre des gènes (T^+L^+) (Gal^+) (Lac^+) (T_1^S).

Cette expérience consiste en un transfert d'ADN par conjugaison (passage du matériel génétique d'une bactérie (donatrice) vers une bactérie (réceptrice) après contact étroit.

Il existe des souches qui transmettent leur ADN avec une fréquence de recombinaison élevée: ce sont des **souches Hfr** (haute fréquence de recombinaison). Les souches Hfr possèdent des pili sexuels. Les bactéries réceptrices sont en général F^-.

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

Principe: On réalise un croisement (conjugaison) entre une souche bactérienne :

Hfr : Str^S a^+ b^+ c^+ d^+...

et une souche F^- : Str^r a^- b^- c^- d^-

On prélève des échantillons à des intervalles de temps déterminés. L'agitation violente du milieu permet 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).

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 permet la croissance des cellules qui auront intégré le gène a^+ .

un milieu sans B, mais avec A, C et D permet la croissance des cellules ayant intégré le gène b^+ .

Le chromosome Hfr est transféré à la cellule F^- d'une manière linéaire, commençant en un point spécifique pour chaque souche, l'origine O. Plus un gène est éloigné de O 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.

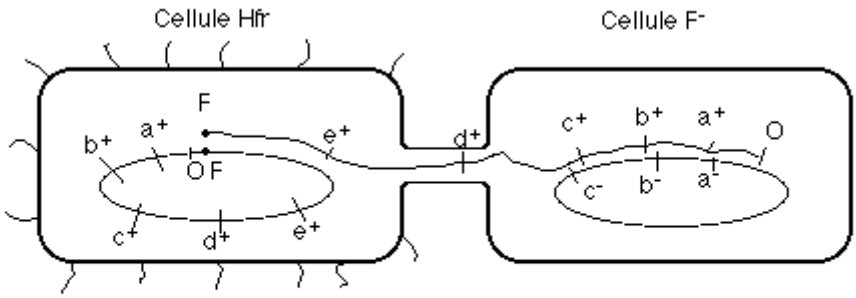


Schéma général de la conjugaison entre une bactérie Hfr et une bactérie F^-

Dans notre expérience nous avons travaillé avec les souches ci-dessous :

Hfr : (T^+ L^+), (T_1^S), (Lac^+), (Gal^+), et (Str^S) : Donatrice

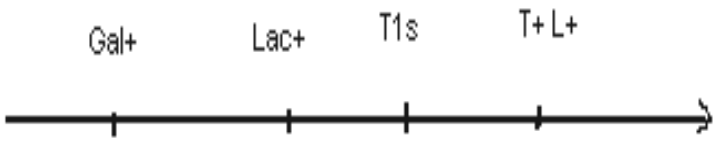
F^- : (T^- L^-), (T_1^r), (Lac^-), (Gal^-), et (Str^r). : Réceptrice

Nous avons défini les recombinants comme étant des réceptrices ayant reçu du matériel génétique de la donatrice. Par conséquent, les génotypes des recombinants vont correspondre à celui de la réceptrice avec l'acquisition d'un ou de plusieurs caractères de la donatrice.

- ✓ Après 10 minutes de contact entre la donatrice et la réceptrice, la réceptrice a reçu les gènes (T+L+)

- ✓ Après 15 min : elle a reçu les gènes (T+L+) et le gène ($T1^S$)
- ✓ Après 20 min : elle a reçu les gènes (T+L+), le gène ($T1^S$) et le gène (Lac+)
- ✓ Après 28 min : elle a reçu les gènes (T+L+), le gène ($T1^S$), le gène (Lac+) et le gène (Gal+)

L'ordre des gènes est le suivant :



Notez qu'on peut par ailleurs, estimer la distance entre les gènes par les temps nécessaires à leur passage dans la réceptrice.

Bon courage

LIENS UTILES ☝

Visiter :

1. https://biologie-maroc.com
   - Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. https://biologie-maroc.com/shop/
   - Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
   - Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
   - Trouver des bourses et des écoles privées

3. https://biologie-maroc.com/emploi/
   - Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
   - Trouver des offres d'emploi et de stage