

Série N° 3 d'éléments de génétique moléculaire des microorganismes

Exercice n°1 :

On dispose, chez *coli*, des souches A, B, C et D de génotype : A : (*cysB*–; *tyr1*–; *tyr2*+; *strR*);

B : (*cysB*–; *tyr1*+; *tyr2*–; *strR*); C : (*cysB*+; *tyr1*–; *tyr2*+; *strR*); D : (*cysB*+; *tyr1*+; *tyr2*–; *strR*).

où *cysB*, *tyr1* et *tyr2* sont des mutations ponctuelles respectivement responsables d'une auxotrophie pour la cystéine ou pour la tyrosine. *strR* étant une mutation de résistance à la streptomycine.

1. Des expériences de conjugaisons interrompues, avec 15 secondes de précision, entre une Hfr sauvage et des réceptrices *tyr1* ou *tyr2* donnent un temps de transfert égal pour *tyr1*+ et *tyr2*+, à 30 secondes après *cysB*+, plusieurs dizaines de minutes avant le site *str*.

a. Quelles ont été les réceptrices utilisées ?

b. Quels ont été les milieux de cocultures et d'étalement ?

c. Qu'en concluez-vous pour *tyr1* et *tyr2* sur le plan cartographique ? Sur le plan fonctionnel ?

Justifiez vos réponses de manière claire et concise. (Quelques lignes suffisent, à chaque fois, ne perdez pas de temps sur cette question.)

2. Par un test trois points on a montré que l'ordre était : *cysB*-*tyr2*-*tyr1*.

Vous reconstituerez le protocole de ce test trois points, réalisé par transduction, sachant qu'on disposait de phage transducteur P1 et des quatre souches de *E. coli*, A, B, C et D.

a. Quels sont les croisements effectués ? Avec quels lysats à partir de quelles donatrices ? Sur quelles réceptrices ? Quels sont les recombinants sélectionnés ? Sur quels milieux ?

b. Quels sont les résultats possibles ? Quel est le résultat obtenu ? Quelle est l'argumentation permettant de justifier la conclusion à partir du résultat obtenu ?

On demande des réponses claires, concises, argumentées, accompagnées des schémas utiles.

3. Les souches A et B sont transformées par un plasmide PK, porteur d'un gène de résistance à la kanamycine et d'un fragment de génome sauvage de *coli* contenant, entre autres, la séquence *cysB*+

Les colonies [kanR], issues de la transformation de A ou B par PK sont, [cys+, tyr+]. Concluez.

4. Un transposon est une séquence d'ADN capable, par elle-même, de se déplacer pour s'insérer (ou de se dupliquer pour insérer une copie) plus ou moins aléatoirement en un autre site du même réplique ou d'un autre réplique. L'insertion d'un transposon dans la séquence d'un gène a souvent un effet destructeur sur le message de ce gène qui ne peut plus être exprimé; elle entraîne donc une perte de fonction du gène.

La plupart des transposons bactériens sont porteurs d'un gène conférant la résistance à un antibiotique. De nombreux plasmides, porteurs d'un gène de résistance à un antibiotique, sont porteurs du transposon où ce gène est inclus.

On soumet le plasmide PK à l'action d'un transposon porteur d'un gène de résistance à l'ampicilline, puis on sélectionne un plasmide recombinant conférant la double résistance à la kanamycine et à l'ampicilline; ce plasmide est appelé PKA.

• Les colonies [kanR; ampR] issues de la souche A transformée par PKA sont [cys+, tyr+].

• Les colonies [kanR; ampR] issues de la souche B transformée par PKA sont [cys+, tyr-].

Qu'en concluez-vous pour le plasmide PKA et pour les mutations *tyr1* et *tyr2* ?