

TD N° 3 de génétique bactérienne (Les transferts génétiques)

Exercice N° 1

1. définir les termes suivants : conjugaison, transformation, Hfr,

2. Décrire le statut du facteur F chez des souches Hfr, F⁺ et F⁻

On dispose de 2 souches de bactéries dont les génotypes sont les suivants :

Souche A : F⁻, Leu⁺, Ade⁻, Arg⁻, Met⁻, Phe⁻, St^R

Souche B : Hfr, Leu⁻, Ade⁺, Arg⁺, Met⁺, Phe⁺, St^S

3. Les bactéries de la souche A sont mélangées aux bactéries de la souche B. Après deux heures, le mélange est étalé sur milieu minimum (Mm) + Leucine + streptomycine. De nombreuses colonies se développent.

- Pourquoi nous avons ajouté de la leucine au milieu minimum?
- Quel est le génotype des bactéries qui se sont développées sur ce milieu de culture ?

4. Les souches A et B sont mélangées pendant seulement 20 minutes. Le mélange est ensuite étalé sur Mm + Leu + streptomycine. Parmi les 100 colonies qui poussent on a compté:

100 colonies ade⁺

80 colonies Arg⁺

10 colonies Phe⁺

20 colonies Met⁺

Pourriez-vous déduire l'ordre des gènes.

Exercice N° 2

On incube ensemble en milieu liquide une souche *Hfr* d'*E. coli* prototrophe pour l'arginine, la thiamine et la phénylalanine [arg⁺, thi⁺, phe⁺] et une souche F⁻ d'*E. coli* auxotrophe pour ces mêmes nutriments [arg⁻, thi⁻, phe⁻]. La souche *Hfr* est sensible à la streptomycine et la souche F⁻ y est résistante.

Parmi les propositions suivantes, indiquez celle(s) qui est (sont) exacte(s) :

- A. l'étalement des bactéries sur milieu complet contenant de la streptomycine permet d'éliminer les bactéries F⁻ non recombinées.
- B. les bactéries recombinantes identifiées par cette expérience sont prototrophes pour au moins un des nutriments considérés.
- C. l'ordre des gènes du chromosome bactérien peut être différent entre la souche *Hfr* et la souche F⁻.
- D. si, dans cette expérience, le gène *arg* est transféré en dernier, on sélectionnera tous les recombinants [arg⁺] sur un milieu minimum contenant de la streptomycine.
- E. le clone recombiné [arg⁻, thi⁻, phe⁺] pousse sur un milieu contenant comme seul nutriment la phénylalanine.

Exercice N° 3

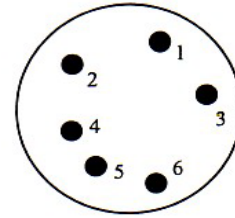
Deux souches bactériennes triples auxotrophes sont mises en conjugaison dans un milieu liquide dilué puis étalé sur un milieu complet gélosé (boîte mère).

$met^- thr^- pan^- pro^+ bio^+ his^+ \times met^+ thr^+ pan^+ pro^- bio^- his^-$

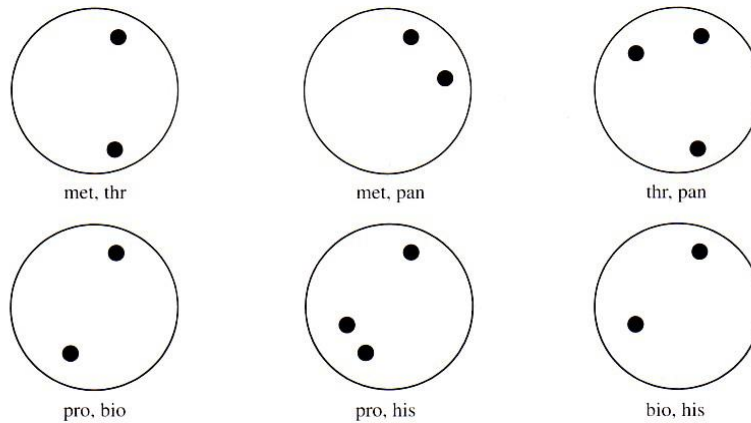
Symboles

met = méthionine
thr = thréonine
pan = acide pantothénique
pro = proline
bio = biotine
his = histidine

Boîte mère (matrice)



Des boîtes de répliques contenant des milieux supplémentés variés sont faites à partir de cette boîte mère. Déterminez le génotype de chaque clone en fonction de sa position et du milieu dans lequel il pousse.



Exercice N° 4

On mélange une souche d'*E.coli* K12 **Hfr** portant les marqueurs (T⁺ L⁺): pouvoir de synthétiser la thréonine et la leucine, (T1s): sensible au phage T1, (Lac⁺): fermentant le lactose, (Gal⁺): fermentant le galactose, (Str^s): streptomycine sensible et une souche **F⁻** portant les marqueurs (T⁻ L⁻), (T1r), (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) (T1r)

15 mn : (T⁺L⁺) (Gal⁻) (Lac⁻) (Str^r) (T1s)

20 mn : (T⁺L⁺) (Gal⁻) (Lac⁺) (Str^r) (T1s)

28 mn : (T⁺L⁺) (Gal⁺) (Lac⁺) (Str^r) (T1s)

Déterminez l'ordre des gènes (T⁺L⁺) (Gal⁺) (Lac⁺) (T1s).

Exercice N° 5

La technique de conjugaison interrompue a été utilisée dans le croisement impliquant les gènes *his*, *leu*, *mal* et *xyl*, afin la carte temporelle de ces gènes. Les cellules réceptrices sont auxotrophes pour les quatre gènes. Après 25 minutes le croisement est interrompu et les résultats suivants sont obtenus dans les cellules réceptrices : 90% [*xyl*⁺], 80% [*mal*⁺], 20% [*his*⁺] et aucune [*leu*⁺].

Quelles sont les positions relatives de ces gènes entre eux et par rapport à l'origine (O) du facteur F ?

Exercice N°06

2. On réalise un croisement par conjugaison H x A. Toutes les cinq minutes on prélève quelques ml de la coculture qu'on agite avant de les répartir par étalement sur plusieurs boîtes afin de tester, individuellement, le phénotype de la réceptrice pour chacun des marqueurs.

- Quel sera le milieu de culture permettant de tester les recombinants [pro⁺] ?
- Quel sera celui permettant de tester les recombinants [gal⁺] ?
- Interprétez les résultats dans le tableau, pour chacun des phénotypes étudiés (schéma souhaité).

Temps d'étalement	[leu ⁺]	[pro ⁺]	[thr ⁺]	[pur ⁺]	[cys ⁺]	[Tx R]	[gal ⁺]
0	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	-	-	-	-
10	+	-	+	-	-	-	-
15	+	-	+	-	-	-	-
20	+	+	+	-	-	-	-
25	+	+	+	+	-	-	-
30 min	+	+	+	+	-	-	-

Exercice N°07

Deux souches d'*E. coli* auxotrophes pour certains nutriments sont incubées ensemble dans du milieu liquide. La souche donneuse est Hfr et sensible à la streptomycine ; la souche receveuse, F⁻, est résistante à la streptomycine. L'ordre des gènes est : U, V, W, X, Y, Z.

L'analyse des clones résistants à la streptomycine à différents temps montre les résultats suivants :

- Temps 0 : U⁺ V⁻ W⁻ X⁺ Y⁻ Z⁻
 - à partir de 11 minutes : U⁺ V⁻ W⁺ X⁺ Y⁻ Z⁻
 - à partir de 30 minutes : U⁺ V⁻ W⁺ X⁺ Y⁺ Z⁻
 - à partir de 55 minutes : U⁺ V⁻ W⁺ X⁺ Y⁺ Z⁺
- quel est le phénomène décrit dans cette expérience ? expliquez.
 - Parmi les propositions suivantes, indiquez celle(s) qui est (sont) exacte(s) :
 - la souche donneuse est prototrophe pour X.
 - la souche receveuse est prototrophe pour X.
 - on peut déterminer que la distance entre Y et Z est de 25 minutes.
 - on peut déterminer que la distance entre V et W est de 11 minutes.
 - on peut déterminer que la distance entre W et X est de 19 minutes.

Exercice N° 1

1. Définitions :

- La conjugaison est un transfert génétique unidirectionnel, à déterminisme plasmidique, qui s'effectue entre des bactéries "sexuellement" différenciées et qui nécessite un contact étroit entre une bactérie donatrice (ou mâle) et une bactérie réceptrice (ou femelle)
- Hfr : désigne des bactéries donatrices à haute fréquence de recombinaison ou (high frequency of recombinaison).
- La transformation est un transfert génétique au cours duquel de l'ADN bicaténaire, libre, nu et en solution est introduit dans une bactérie réceptrice, puis intégré au chromosome

2. Le Facteur F ou facteur de fertilité est un plasmide sexuel présent chez les bactéries F⁺ à l'état libre dans le cytoplasme alors qu'il est intégré dans le chromosome bactérien chez les souches Hfr. Les bactéries F⁻ ne possèdent pas le facteur F (schéma souhaité)
3. La bactérie B est une souche donneuse et ne peut pas synthétiser la leucine. Lors de la conjugaison le gène Leu⁻ sera transféré aux bactéries réceptrices initialement Leu⁺. Les bactéries conjuguées seront incapables de synthétiser la leucine d'où la nécessité de mettre la leucine dans le milieu pour sélectionner les bactéries conjuguées

Les bactéries qui se sont développées dans ce milieu sont Leu⁻, Ade⁺, Arg⁺, Met⁺, Phe⁺ et S^R.

4. Le marqueur présent avec plus haute fréquence est transformé en premier. Plus le gène est loin du site de début de transfert moins il est fréquent.

L'ordre des gènes serait donc :

Ade, Arg, Met, Phe

Exercice N° 2

B et D

Exercice N° 3

Clone	Génotype des clones					
	met	thr	pan	pro	bio	his
1	+	+	+	+	+	+
2	+	-	-	+	+	+
3	-	+	-	+	+	+
4	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	-	+	+
6	+	-	+	+	+	+

Exercice N° 4

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

Hfr : (T⁺ L⁺), (T1s), (Lac⁺), (Gal⁺), et (Strs) : Donatrice

F⁻ : (T⁻ L⁻), (T1r), (Lac⁻), (Gal⁻), et (Strr) : 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.

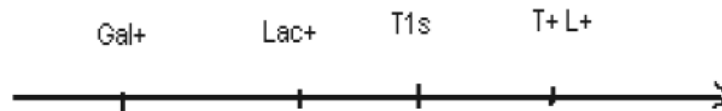
Après 10 minutes de contact entre la donatrice et la réceptrice, la réceptrice a reçu les gènes (T⁺L⁺)

Après 15 min : elle a reçu les gènes (T⁺L⁺) et le gène (T1s)

Après 20 min : elle a reçu les gènes (T⁺L⁺), le gène (T1s) et le gène (Lac⁺)

Après 28 min : elle a reçu les gènes (T⁺L⁺), le gène (T1s), 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.

Exercice N° 5

Puisque le gène *xyl* est transféré avec la plus grande fréquence, il est le plus proche de l'origine (*O*) (très proche). Le gène *mal* est proche et raisonnable lié à *xyl*, suivi par le gène *his*. Le gène *leu* est au-delà de ces trois gènes puisque aucun recombinant n'est obtenu. La carte ci-dessous résume les positions des gènes le long du chromosome



Exercice N° 6

On réalise un croisement par conjugaison H x A. Toutes les cinq minutes on prélève quelques ml de la coculture qu'on agite avant de les répartir par étalement sur plusieurs boîtes afin de tester, individuellement, le phénotype de la réceptrice pour chacun des marqueurs.

a. Quel sera le milieu de culture permettant de tester les recombinants [pro+] ?

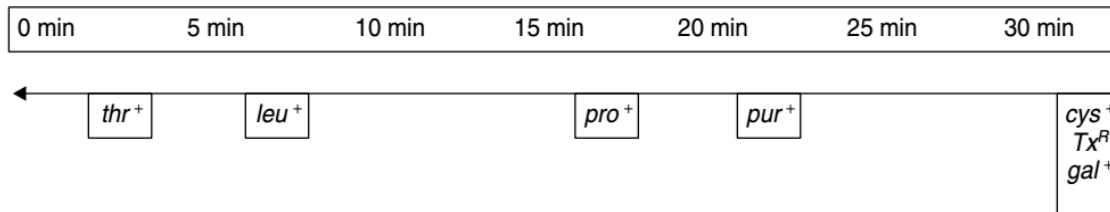
Milieu minimum complétement en leucine, thréonine, galactose, purines et cystéine + streptomycine

b. Quel sera celui permettant de tester les recombinants [gal+] ?

Milieu minimum complétement en leucine, proline, thréonine, purines et cystéine + streptomycine

c. Interprétez les résultats dans le tableau, pour chacun des phénotypes étudiés (schéma souhaité).

Temps d'étalement	[<i>leu</i> ⁺]	[<i>pro</i> ⁺]	[<i>thr</i> ⁺]	[<i>pur</i> ⁺]	[<i>cys</i> ⁺]	[Tx R]	[<i>gal</i> ⁺]
0	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	-	-	-	-
10	+	-	+	-	-	-	-
15	+	-	+	-	-	-	-
20	+	+	+	-	-	-	-
25	+	+	+	+	-	-	-
30 min	+	+	+	+	-	-	-



Exercice 7

Deux souches d'*E. coli* auxotrophes pour certains nutriments sont incubées ensemble dans du milieu liquide. La souche donneuse est Hfr et sensible à la streptomycine ; la souche receveuse, F⁻, est résistante à la streptomycine. L'ordre des gènes est : U, V, W, X, Y, Z.

L'analyse des clones résistants à la streptomycine à différents temps montre les résultats suivants :

- Temps 0 : U⁺ V⁻ W⁻ X⁺ Y⁻ Z⁻
- à partir de 11 minutes : U⁺ V⁻ W⁺ X⁺ Y⁻ Z⁻
- à partir de 30 minutes : U⁺ V⁻ W⁺ X⁺ Y⁺ Z⁻
- à partir de 55 minutes : U⁺ V⁻ W⁺ X⁺ Y⁺ Z⁺

3. quel est le phénomène décrit dans cette expérience ? expliquez.

Conjugaison interrompue

4. Parmi les propositions suivantes, indiquez celle(s) qui est (sont) exacte(s) :

F. la souche donneuse est prototrophe pour X. V

G. la souche receveuse est prototrophe pour X. V

H. on peut déterminer que la distance entre Y et Z est de 25 minutes. V

I. on peut déterminer que la distance entre V et W est de 11 minutes. F

J. on peut déterminer que la distance entre W et X est de 19 minutes. F