TD 1 : révisions Génétique procaryote

I - TRANSFORMATION

Transformations chez *Bacillus subtilis* (bactérie Gram$^+$).

L'ADN d'une souche sauvage prototrophe est extrait et purifié. Il est utilisé pour transformer des cellules réceptrices d'une souche (de la même espèce) auxotrophe pour l'histidine et le tryptophane (phénotype [His$^-$, Trp$^-$]).

TD 1 : révisions Génétique procaryote

I - TRANSFORMATION

Transformations chez *Bacillus subtilis* (bactérie Gram$^+$).

L'ADN d'une souche sauvage **prototrophe** est extrait et purifié. Il est utilisé pour **transformer** des cellules réceptrices d'une souche (de la même espèce) auxotrophe pour l'histidine et le tryptophane (phénotype [His$^-$, Trp$^-$]).

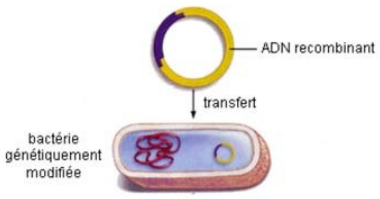
Rappels :

1- Qu'est-ce qu'une ~~Une~~ souche prototrophe ?

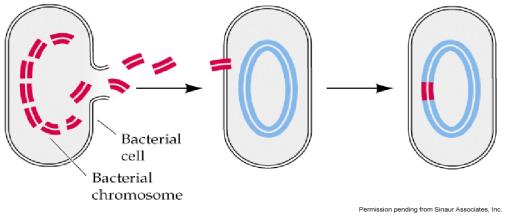
Qu'est-ce qu'une souche auxotrophe ?

2- La transformation est un mode de transfert d'information génétique *qui consiste en l'introduction d'ADN exogène dans une cellule sans intervention d'un autre partenaire (bactérie ou virus).*

Par de l'ADN plasmidique :



Par de l'ADN génomique :



Si l'ADN exogène présente suffisamment d'homologie avec l'ADN génomique de la bactérie receveuse, il peut s'intégrer dans le génome par recombinaison homologue.

*On distingue des bactéries **naturellement transformable** (cas de B. subtilis, gram+) **ou non** (cas de E. coli rendue transformable par traitement chimique ou par choc électrique)*

TD 1 : révisions Génétique procaryote

I - TRANSFORMATION

Transformations chez *Bacillus subtilis* (bactérie Gram$^+$).

L'ADN d'une souche sauvage prototrophe est extrait et purifié. Il est utilisé pour transformer des cellules réceptrices d'une souche (de la même espèce) auxotrophe pour l'histidine et le tryptophane (phénotype [His$^-$, Trp$^-$]).

Un ou plusieurs fragments peuvent pénétrer dans la bactérie réceptrice :

Si uniquement le marqueur *HIS*$^+$ **ou** le marqueur *TRP*$^+$ est intégré dans le génome, on parle alors de SIMPLE transformé [his+trp-] ou [his-trp+]

Si *HIS*$^+$ **et** *TRP*$^+$ sont intégrés dans le génome, on parle alors de DOUBLE transformé [his+ trp+]

TD 1 : révisions Génétique procaryote

I - TRANSFORMATION

Transformations chez *Bacillus subtilis* (bactérie Gram$^+$).

L'ADN d'une souche sauvage prototrophe est extrait et purifié. Il est utilisé pour transformer des cellules réceptrices d'une souche (de la même espèce) auxotrophe pour l'histidine et le tryptophane (phénotype [His$^-$, Trp$^-$]).

Après incubation des cellules réceptrices avec la solution d'ADN on prélève quatre fractions aliquotes de la suspension que l'on dilue et que l'on étale sur différents milieux. Le protocole utilisé et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau.

Fraction	Dilution	Quantité étalée	Milieu d'étalement	Nombre moyen de colonies par boîte
1	10-5	0,1 ml	mm + his + trp	100
2	10-2	0,1 ml	mm + his	100
3	10-2	0,1 ml	mm +trp	100
4	10-1	0,1 ml	mm	200

mm = milieu minimum

Q1 - Quel type de cellules est sélectionné sur chaque milieu ?

TD 1 : révisions Génétique procaryote

I - TRANSFORMATION

Q1 - Quel type de cellules est sélectionné sur chaque milieu ?

Sur certains milieux, plusieurs phénotypes sont possibles (2 ou 4)

Fraction	Dilution	Quantité étalée	Milieu d'étalement	Nombre moyen de colonies par boîte	Ecrivez le ou les phénotypes possibles des cellules
1	10-5	0,1 ml	mm + his + trp	100	
2	10-2	0,1 ml	mm + his	100	
3	10-2	0,1 ml	mm +trp	100	
4	10-1	0,1 ml	mm	200	

Complétez la dernière colonne du tableau avec vos réponses

Q2 - Les colonies poussant sur mm + his sont répliquées sur mm. Quelle fraction d'entre elles seront capables de pousser sur la boîte réplique ?

Q3 - Calculer les fréquences de simple et double transformés.

TD 1 : révisions Génétique procaryote

Fraction	Dilution	Quantité étalée	Milieu d'étalement	Nombre moyen de colonies par boîte	Ecrivez le ou les phénotypes possibles des cellules
1	10-5	0,1 ml	mm + his + trp	100	
2	10-2	0,1 ml	mm + his	100	
3	10-2	0,1 ml	mm +trp	100	
4	10-1	0,1 ml	mm	200	

Q2 - Les colonies poussant sur mm + his sont répliquées sur mm. Quelle fraction d'entre elles seront capables de pousser sur la boîte réplique ?

Les deux milieux concernés sont surlignés : regardez bien votre réponse concernant le phénotype des cellules poussant sur ces milieux. Y a-t-il des simple et des double transformés ?

Indice : « Quelle fraction d'entre elles seront capables de pousser sur la boîte réplique ? » : on comprend qu'il y a plusieurs catégories de cellules sur mm+his. Identifiez celle qui est capable de croître sur MM.

TD 1 : révisions Génétique procaryote

Fraction	Dilution	Quantité étalée	Milieu d'étalement	Nombre moyen de colonies par boîte	Ecrivez le ou les phénotypes possibles des cellules
1	10-5	0,1 ml	mm + his + trp	100	
2	10-2	0,1 ml	mm + his	100	
3	10-2	0,1 ml	mm +trp	100	
4	10-1	0,1 ml	mm	200	

Le facteur de dilution utilisé pour les différents milieux n'est pas le même. On ne peut donc pas comparer directement le nombre de colonies observées sur les différents milieux. Il faut passer par un calcul des titres cellulaire (Nbre de cellules /ml de suspension cellulaire).

-Faites ce calcul des titres cellulaire pour chacune des catégories phénotypiques simples et double transformé identifiées (Voir TP GBM de l'année dernière pour la formule de calcul d'un titre cellulaire).

-Vous devez identifier le milieu sur lequel ne pousse qu'une catégorie phénotypique, pour ensuite pouvoir calculer le titre des autres catégories phénotypique.

-Vous devez également identifier le milieu permettant à toutes les cellules de croître

TD 1 : révisions Génétique procaryote

Après incubation des cellules réceptrices avec la solution d'ADN on prélève quatre fractions aliquotes de la suspension que l'on dilue et que l'on étale sur différents milieux. Le protocole utilisé et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau.

Catégorie phénotypique	Titre cellulaire Indiquez le mode de calcul	Fréquence Indiquez le mode de calcul
[his+ trp+]		
[his+ trp-]		
[his-trp+]		

Q3 - Calculer les fréquences de simple et double transformés.

Rappeler la formule d'un calcul de fréquence (voir TP GBM année dernière)

- Pour chaque catégorie phénotypique, la formule contient le même dénominateur.
- A partir de quel milieu allez vous calculer ce dénominateur?
- Vous avez calculé différents numérateurs lors de la Q2, vous pouvez maintenant remplir le tableau ci-dessus

TD 1 : révisions Génétique procaryote

Q4 - En considérant que seuls deux gènes, *his1* et *trp2*, déterminent les exigences en histidine et tryptophane : pouvez-vous, en calculant la fréquence de co-transformation, déterminer si ces deux gènes sont liés génétiquement ou non ?

Dans l'hypothèse où les deux gènes sont très éloignés PHYSIQUEMENT (=INDEPENDANTS), ils ne seront pas présents sur un même fragment d'ADN génomique. L'acquisition conjointe des gènes *his1+* et *trp2+* nécessitera deux évènements INDEPENDANTS de recombinaison . Dans ce cas quelle sera la formule de la fréquence de la cotransformation ?

Faites le calcul et comparez la fréquence calculée avec la fréquence de double transformés que vous avez obtenue expérimentalement.

Sont-elles comparable ?

TD 1 : révisions Génétique procaryote

Q5 - Donner une interprétation biologique simple.

Vos enseignants sont là pour répondre à vos questions sur cet exercice.
N'hésitez pas à les solliciter