

## TD de microbiologie : génétique bactérienne(B245)

### Exercice 1 :

On part d'un inoculum de  $10^3$  bactéries dans un milieu de culture et au bout de 13h30min, on compte  $10^9$  bactéries. Calculer le temps de génération et le temps de croissance.

### Exercice 2 :

$3 \cdot 10^8$  cellules d'une souche mutante d'Escherichia coli sont étalées sur un milieu de culture complet et on obtient un tapis bactérien. Ce tapis est répliqué sur 3 milieux différents 1, 2 et 3 (figure : 1)

Déterminer le génotype de cette souche mutante.

Expliquer l'apparition d'une colonie sur la boîte 1 et 3.

### Exercice 3 : Mutants déficients (auxotrophes)

Six clones de colibacille numérotés de 1 à 6 sont cultivés sur 6 milieux minimums (MM) additionnés de diverses substances selon les cas ; les clones qui poussent sur les boîtes de pétri sont indiqués par leurs numéros (Figure: 2)

Si l'on désigne thréonine par T, leucine par L, thiamine par Ti, biotine par B, phénylalanine par P et cystéine par C ; indiquez quels sont les génotypes qui correspondent à ces 6 clones.

### Exercice 4 :

Un milieu de croissance liquide a été inoculé avec  $4 \cdot 10^4$  bactéries dont aucune ne renferme de mutants r. Lorsque le nombre de bactéries atteint  $1,6 \cdot 10^5$ , la fréquence des mutants Fr est de  $10^{-4}$  :

1. Quel est la valeur du taux de mutation ?
2. Quel sera la fréquence des mutants lorsque le nombre total de bactéries s'élève à  $6,4 \cdot 10^5$  ?
3. Quel sera la fréquence des mutants après la douzième division qui suit l'inoculation ? On négligera les mutants reversés.

### Exercice 5 :

Opéron lac : La  $\beta$ -galactosidase est un enzyme indispensable à l'utilisation du lactose par une bactérie (E. coli). Les bactéries qui ne possèdent pas cet enzyme sont incapables de croître sur un milieu lactosé ; elles poussent cependant parfaitement sur milieu glucosé car la  $\beta$ . galactosidase n'intervient pas dans l'assimilation du glucose.

Trois lignées différentes d'E. coli sont étudiées pour leur aptitude à métaboliser le lactose.

Dans ce but, 4 échantillons de chaque lignée sont cultivés sur un milieu glucosé et sur un milieu lactosé aux températures de 22°C et 37°C.

Sur un milieu glucosé, on recherche par dosage d'activité enzymatique la présence ou l'absence de  $\beta$ -galactosidase.

Sur un milieu lactosé, la croissance est conditionnée par l'existence de cette enzyme.

Les résultats suivants sont obtenus de manière reproductible.

\*Les lignées A, B et C ne possèdent pas de  $\beta$ -galactosidase sur un milieu glucosé aussi bien à 22°C qu'à 37°C.

- \*Sur milieu lactosé, la lignée A pousse aux deux températures.
- \*La lignée B pousse à 22°C mais non à 37°C.
- \*La lignée C ne pousse ni à 22°C ni à 37°C.

Dans les trois derniers cas, on vérifie que l'absence de croissance est due à l'absence de  $\beta$ -galactosidase.

- 1- Résumer l'expérience sous forme d'un tableau.
- 2- Citer les divers facteurs qui régissent la présence de la  $\beta$ -galactosidase
- 3- Quelles sont, parmi les lignées A à C, celles qui possèdent le même génotype ?
- 4- Deux souches cultivées sur un milieu glucosé ne renfermant pas de  $\beta$ -galactosidase, ont-elles le même phénotype ? peut on conclure qu'elles ont le même génotype ?
- 5- Quelle loi générale concernant le génotype et le phénotype pouvez-vous dégager des réponses aux questions précédentes ?

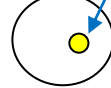
**Fig. 1 :** Boîte mère = boîte témoin

Milieu minéral  
+Glucose  
+Leucine  
+Méthionine  
+Sérine



tapis bactérien

1 colonie

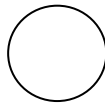


Milieu 1 :

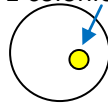
Milieu minéral  
+Glucose  
+Leucine  
+Méthionine

Milieu 2 :

Milieu minéral  
+Glucose  
+Leucine  
+Sérine



1 colonie



Milieu 3 :

Milieu minéral  
+Glucose  
+Méthionine  
+Sérine

**Fig. 2 :**



Clone 3

MM + L + Ti



Clones  
1, 3, 5

MM+T+Ti

Boîte témoin

6 clones :



1, 2, 3, 4, 5, 6



Clones ; 2,3,6

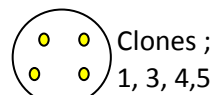
MM+P+C



Clones 3, 6

MM+B+C

MM+T+L+Ti+B+C+P



Clones ;  
1, 3, 4,5

MM+T+L



Clone 3

MM+B+P

**Corrigé du TD de microbiologie:  
génétique bactérienne (B 245)**

**Exercice 1 :**

$N_0 = 10^3$  bactéries = inoculum à  $t_0$

$N_n = 10^9$  bactéries à  $t = 13\text{h}30\text{min}$  = durée d'incubation

\* temps de génération =  $G = t/n$  = durée d'incubation / nombre de générations ou divisions

G en min = temps qui sépare deux divisions successives

\* taux de croissance =  $\mu = n/t$  = vitesse de croissance  $\mu$  en  $\text{h}^{-1}$

On cherche à trouver la génération « n » qui correspond au nombre de bactéries de  $10^9$

\* **Progression géométrique :**

Nombre de génération :	$t_0$						
	0	1	2	3	4.....n	.....n	
Nombre de bactéries :	$N_0$	$2^1 N_0$	$2^2 N_0$	$2^3 N_0$	$2^4 N_0$ .....	$2^n N_0$	

Donc  **$N_n = 2^n N_0$**

$N_n / N_0 = 2^n = 10^9 / 10^3 = 10^6$  ;  $\text{Log } 2^n = \text{Log } 10^6 = 6$  ;  $n = 6 / \text{Log } 2 = 6 / 0,301 = 20$

**$n=20$  donc le nombre de bactéries de  $10^9$  correspond à la 20<sup>ème</sup> génération**

\*  $G = t/n = 13\text{h}30 \text{ min} / 20 = 40 \text{ Min}$

⇒  **$G=40\text{min}$**

;

\*  $\mu = n/t = 20 / 13\text{h. } 30\text{min} = 1,5 \text{ h}^{-1}$

**$\mu=1,5 \text{ h}^{-1}$**

**Exercice 2 :**

La souche d'E. coli sauvage est **prototrophe** pour l'ensemble des métabolites essentiels.

\* **Une souche mutante d'E.coli** étalée sur un milieu de culture complet, on obtient un tapis bactérien. Ce tapis est répliqué, sur 3 milieux différents 1,2 et 3, avec le même type **d'ensemencement par inondation puis étalement**.

\* **La boîte mère** : contient les besoins élémentaires (les éléments minéraux ; source de carbone = glucose et la source d'azote = 3 acides aminés). Ces acides aminés constituent aussi des facteurs de croissance.

Nous sommes donc en présence de **3 marqueurs génétiques: leu, met, ser.**

Après incubation on obtient **un tapis bactérien**. Ceci va constituer **le témoin d'une culture positive**.

\* **Le milieu 1** : il manque la sérine ;

Après incubation, apparition d'une seule colonie (non significative par comparaison au témoin).

Il s'agit donc d'une **culture négative**.

Donc **la sérine** est indispensable au développement du tapis bactérien ⇒ donc cette souche est **auxotrophe pour la sérine**. (Ne peut pas synthétiser la sérine, il faut l'ajouter au milieu)

\* **Le milieu 3** : il manque la leucine

Après incubation, apparition d'une seule colonie, Il s'agit donc d'une **culture négative**.

Donc **la leucine** est indispensable au développement du tapis bactérien ⇒

donc cette souche est **auxotrophe pour la leucine**

\* **Le milieu 2** : il manque la méthionine

Absence de bactéries. Il s'agit donc d'une **culture négative**.

Donc **la méthionine** est indispensable au développement du tapis bactérien ⇒

Donc cette souche est **auxotrophe pour la méthionine**

⇒ **Donc le génotype de cette souche mutante est : leu<sup>-</sup> met<sup>-</sup> ser<sup>+</sup>**

Le génotype est représenté par 3 lettres minuscules

**Auxotrophe** pour un métabolite essentiel : -- souche mutante

**Prototrophe** pour un métabolite essentiel : + souche sauvage

### Conclusion 1 :

On peut déduire de ces résultats que **le milieu** peut parfois nous aider à détecter **le génotype** :  
**L'auxotrophie** est révélée par une culture négative en l'absence du facteur de croissance dans le milieu de culture

**La prototrophie** est révélée par une culture positive en l'absence du facteur de croissance dans le milieu de culture

### Explication d'apparition des clones 1 et 3.

\* L'apparition du clone 1 sur la boîte 1 : Ce clone a muté pour la sérine et il est devenu ser<sup>+</sup>.

\* L'apparition du clone 3 sur la boîte 3 : Ce clone a muté pour la leucine et il est devenu leu<sup>+</sup>.

Donc la souche mutante d'E. coli auxotrophe, a muté vers l'état sauvage prototrophe.

⇒ Il s'agit donc **d'une mutation réverse.**

### Conclusion 2 :

La mutation est réversible, donc le gène ne se perd pas après une mutation.

### Remarque 1:

\* **L'espèce** est identifiée par des caractères stables et donc significatifs pour l'identification.

\* **La souche** est une variété à l'intérieur de l'espèce. Cette variation est due à des caractères instables comme : \_ la résistance ou la sensibilité à un antibiotique

\_ L'auxotrophie et La prototrophie

Ces variations sont généralement dues à des mutations chromosomiques soit à une acquisition ou perte de plasmide

**Exemple :** L'espèce E. coli est caractérisée par une série de caractères stables parmi lesquels : indole<sup>+</sup> mais il existe des souches d'E. coli auxotrophes pour la sérine et d'autres prototrophes pour la sérine.

\* Les appellations clone en génétique ou colonie en bactériologie = ensemble de bactéries qui proviennent de la prolifération de la même cellule mère.

### Remarque 2:

Dans le cas de l'antibiothérapie, l'apparition de clones résistants (●) à l'intérieur de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne dans les boîtes d'antibiogramme indique que cette souche doit être considérée comme résistante malgré une sensibilité apparente expliquée par un diamètre assez large, sinon un échec thérapeutique est remarqué.



### Exercice 3 :

Mutants déficients (auxotrophes)

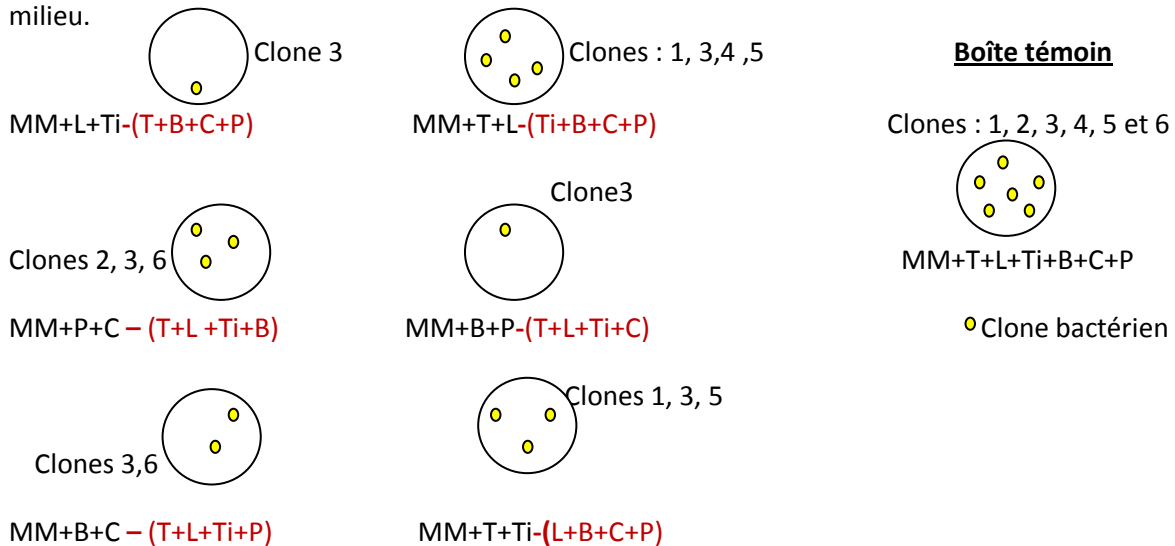
6 clones de colibacilles cultivés sur 6 milieux minimum (MM) additionnés de diverses substances. Un milieu de culture complet, utilisé comme témoin a été aussi ensemencé par touche en utilisant une micropipette.

Le témoin contient un milieu minimum = besoins élémentaires en plus de 6 facteurs de croissance

⇒ 6 marqueurs génétiques : T, L, Ti, B, C, P

D'abord il est intéressant de signaler les facteurs de croissance absents dans chaque milieu. Cela va permettre de connaître :

- Les souches prototrophes qui poussent malgré l'absence des métabolites essentiels dans le milieu
- Les souches auxotrophes qui ne poussent pas en l'absence des métabolites essentiels dans le milieu.



Le génotype de chaque clone est déterminé d'abord par la détermination de la **prototrophie** ⇒

Détecter la **présence du clone malgré l'absence de certaines substances** dans chacun des 6 milieux

⇒ **Ce clone est prototrophe** pour ces substances.

Ensuite vous allez déduire l'**auxotrophie** pour le reste des substances dont l'absence entraîne l'**absence du clone**.

### Les génotypes correspondants aux 6 clones

Clone 1 :	t <sup>-</sup>	l <sup>+</sup>	ti <sup>+</sup>	b <sup>+</sup>	p <sup>+</sup>	c <sup>+</sup>
Clone 2 :	t <sup>-</sup>	l <sup>+</sup>	ti <sup>+</sup>	b <sup>+</sup>	p <sup>-</sup>	c <sup>-</sup>
Clone 3 :	t <sup>+</sup>	l <sup>+</sup>	ti <sup>+</sup>	b <sup>+</sup>	p <sup>+</sup>	c <sup>+</sup>
Clone 4 :	t <sup>-</sup>	l <sup>-</sup>	ti <sup>+</sup>	b <sup>+</sup>	p <sup>+</sup>	c <sup>+</sup>
Clone 5 :	t <sup>-</sup>	l <sup>+</sup>	ti <sup>+</sup>	b <sup>+</sup>	p <sup>+</sup>	c <sup>+</sup>
Clone 6 :	t <sup>+</sup>	l <sup>+</sup>	ti <sup>+</sup>	b <sup>+</sup>	p <sup>+</sup>	c <sup>-</sup>

+ : **prototrophe** (état sauvage) ; E.coli est prototrophe pour l'ensemble des métabolites essentiels.

- : **auxotrophe** (mutant)

Rq : Normalement, D'après la nomenclature, Le génotype est représenté par 3 lettres minuscules.

Une seule lettre minuscule a été choisie, seulement, pour faciliter le travail.

**Exercice 4:**

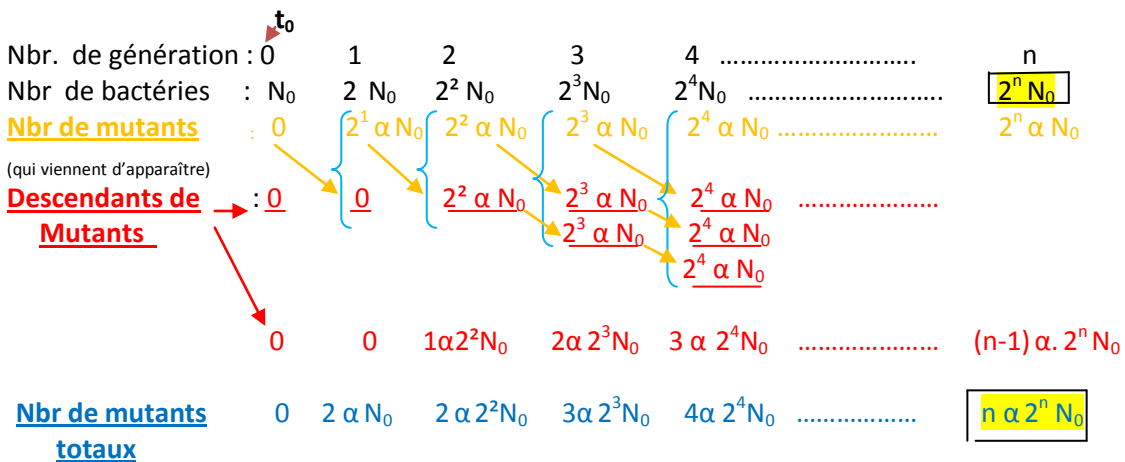
$N_0 = 4 \cdot 10^4$  bactéries (sans mutants)  
 $N_n = 1,6 \cdot 10^5$  bactéries  
 La fréquence des mutants  $f_r = 10^{-4}$

**1/Taux de mutation ou coefficient de mutation :  $\alpha$  = probabilité de mutation.**

Nombre de mutants pour une génération

\*  $f_r = \frac{\text{Nombre de mutants pour une génération}}{\text{Nombre total de bactéries pour cette génération}}$

**\*Suite géométrique :**



**Explications :**

- \* Une bactérie se divise par scissiparité, donc en deux pour donner 2 bactéries.  
 $N_0$  = le nombre de bactéries au temps initial =  $t_0$  se multiplie pour donner  $2 N_0$  après une division donc la 1<sup>ère</sup> génération, et ainsi de suite.  
 Donc à la n<sup>ième</sup> génération, nous avons  $2^n N_0$
- \* Au cours des divisions cellulaires, donc au cours de la duplication de l'ADN, il y a une certaine probabilité d'apparition de mutation ( $\alpha$ ) :  
 Mutation spontanée avec une faible probabilité ou provoquée avec une grande probabilité.
- \* Ces mutants qui viennent d'apparaître vont se multiplier par 2 et vont avoir une descendance :  
 $2 \alpha N_0 \Rightarrow 2^2 \alpha N_0$
- \* le nombre total des mutants = les mutants qui viennent d'apparaître + leur descendance

$\Rightarrow$  Cette suite géométrique a permis de connaître le nombre des bactéries à la n<sup>ième</sup> génération =  $2^n N_0$  et aussi le nombre total des mutants  $n \alpha 2^n N_0$

$$f_r = \frac{\text{Nombre total des mutants}}{\text{Nombre total des bactéries}} = \frac{n \alpha 2^n N_0}{2^n N_0} = n \alpha = f_r$$

$$\Rightarrow \boxed{f_r = n \alpha} \Rightarrow \alpha = \frac{f_r}{n}$$

On cherche n sans utiliser le logarithme décimale, mais en écrivant  $N_n$  en fonction de  $N_0$

$$\Rightarrow N_0 = 4 \cdot 10^4 \quad N_n = 2^n N_0$$

$$N_n = 1,6 \cdot 10^5 \quad N_n = 1,6 \cdot 10^5 = 16 \cdot 10^4 = 4 \cdot (4 \cdot 10^4) = 2^2 N_0$$

La fréquence des mutants  $f_r = 10^{-4}$

$\Rightarrow n=2$  , la 2<sup>ème</sup> génération

$$\Rightarrow \alpha = f_r / n = 10^{-4} / 2 = 5 \cdot 10^{-5} \Rightarrow \boxed{\alpha = 5 \cdot 10^{-5}}$$

2/  $f_r?$  ;  $N_n = 6,4 \cdot 10^5$

On cherche n de la même façon ;  $N_n = 6,4 \cdot 10^5 = 64 \cdot 10^4 = 16 \cdot (4 \cdot 10^4) = 2^4 N_0$

$\Rightarrow n=4$  ; la 4<sup>ème</sup> génération

$$f_r = n \alpha = 4 \times 5 \cdot 10^{-5} = 20 \cdot 10^{-5} = 2 \cdot 10^{-4}$$

$$\Rightarrow \boxed{f_r = 2 \cdot 10^{-4}}$$

3/ la 12<sup>ème</sup> génération  $\Rightarrow n=12$   $f_r?$

$$f_r = n \alpha = 12 \times 5 \cdot 10^{-5} = 6 \cdot 10^{-4} \quad \boxed{f_r = 6 \cdot 10^{-4}}$$

### Exercice 5 :

Opéron lactose

#### 1/Résumé de l'expérience sous forme de tableau :

Milieu +température Lignées E.coli	Glucose		Lactose	
	22°C	37°C	22°C	37°C
A	-	-	+	+
B	-	-	+	-
C	-	-	-	-

+ : présence de l'enzyme      \_ : absence de l'enzyme  $\beta$  – galactosidase

2/ Les facteurs qui régissent donc qui ont une influence sur la présence de l'enzyme sont :

- \*La température
- \*Le substrat
- \*La nature de la souche donc son génotype.

Remarque : Pour voir l'effet de chaque facteur, il faut le prendre seul comme variable/aux autres facteurs.

**3/** Aucune des souches ne présente le même génotype que l'autre, puisque les réponses phénotypiques sont différentes (les réactions des lignées sur le tableau ne sont pas les mêmes)

**4/** Deux souches cultivées sur milieu glucosé ne contenant pas d'enzyme → elles ont donc le même phénotype. Cependant, elles ne doivent pas avoir forcément le même génotype.

\*Généralement et sans se baser sur le tableau du résumé, **Un même phénotype sur milieu glucosé** des deux souches peut être le résultat de génotypes différents ou le même génotype, puisque les bactéries en présence du glucose, elles vont utiliser le glucose sans avoir à dégrader le lactose donc sans avoir à synthétiser la  $\beta$  – galactosidase. L'opéron lactose est non fonctionnel en présence du glucose même si le lactose existe aussi dans le milieu → **régulation négative**  
L'opéron lactose est fonctionnel en présence du lactose mais avec l'absence du glucose → synthèse de la  $\beta$  – galactosidase → **régulation positive (voir TD complément de génétique)**

#### **1<sup>er</sup> cas : les 2 souches ont le même génotype**

Souche 1 et souche 2 présentent l'opéron lactose mais avec régulation négative,  
Souche 1 et souche 2 ne présentent pas l'opéron lactose

#### **2<sup>ème</sup> cas : les 2 souches ont des génotypes différents**

Souche 1 possède l'opéron lactose mais avec régulation négative  
Souche 2 ne possède pas l'opéron lactose

\*D'après le tableau résumé :

Toutes les lignées A, B et C ne produisent pas de  $\beta$  – galactosidase en milieu glucosé, ce qui est logique et conforme au fonctionnement de l'opéron lactose. Cependant, en observant le comportement de ces lignées sur milieu lactosé, nous sommes sûrs qu'elles n'ont pas le même génotype : -la lignée C, probablement, ne possède pas l'opéron lactose.  
-Les lignées A et B possèdent l'opéron lactose.

#### **5/ Loi générale :**

\*Le génotype ne peut se déterminer de façon précise, mais on peut le détecter par un enchaînement de culture dans des conditions différentes de température, substrat et lignée.

\*Le même génotype peut très bien s'exprimer sur 2 voies phénotypiques différentes suivant les conditions du milieu → **il ya une interaction entre le génotype et le milieu pour déterminer le Phénotype**

**Exemple :** le génotype B synthétise la  $\beta$  – galactosidase sur milieu lactosé à 22°C mais pas à 37°C