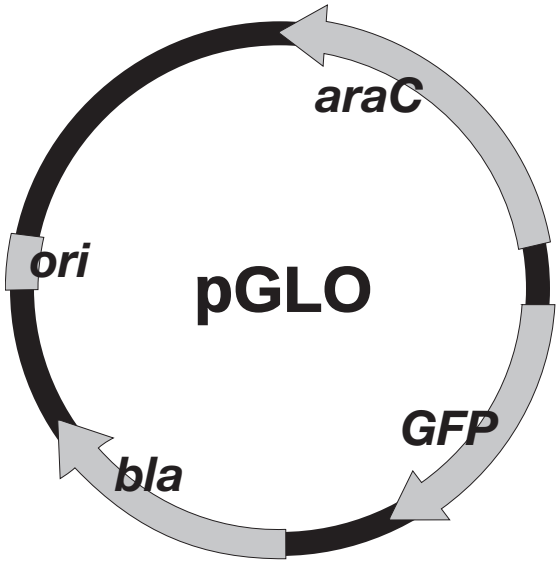



# Bio-Rad Explorer™

# pGLO™ Bacterial Transformation Kit

**N° de référence 1660003EDU**
**explorer.bio-rad.com**

## Se reporter à chaque composant pour les informations relatives à la température de conservation.

**La duplication de toute partie de ce document n'est autorisée que pour l'usage en classe.**
**Visiter explorer.bio-rad.com pour avoir accès à la traduction, dans différentes langues, des programmes pédagogiques des trousses Bio-Rad Explorer.**

BIO-RAD

**De quelle façon une méduse est-elle en capacité d'« éclairer » le thème de la transformation bactérienne?**

La caractéristique d'invisibilité de nombreux événements et processus constitue l'un des défis les plus importants pour les étudiants qui abordent pour la première fois l'étude de la biotechnologie ou de la biologie moléculaire. Le programme Bio-Rad Explorer offre une solution : un gène issu d'une méduse bioluminescente et sa protéine GFP (*green fluorescent protein*, protéine à fluorescence verte). La protéine GFP émet une fluorescence d'un vert brillant lorsqu'elle est exposée à une lampe ultraviolette de grande longueur d'onde (par exemple, une lampe torche à usage géologique).

À l'origine, le gène de la GFP a été isolé chez la méduse *Aequorea victoria*. Le gène de type sauvage (présent à l'état naturel) a été modifié par Maxygen Inc., une société de biotechnologie basée à Santa Clara en Californie. Des mutations spécifiques ont été introduites dans la séquence d'ADN pour augmenter considérablement la fluorescence de la protéine. Cette forme modifiée du gène de la GFP a été insérée dans le plasmide pGLO de Bio-Rad; elle est désormais exclusivement disponible auprès de Bio-Rad pour des applications éducatives.

La protéine GFP est particulièrement lumineuse. Avec pGLO, les étudiants transforment des bactéries et peuvent effectivement observer l'expression du gène en temps réel. À la suite de la transformation et grâce à la trousse de purification GFP Bio-Rad, les étudiants purifient la protéine GFP génétiquement modifiée, issue des bactéries transformées, par une procédure simple de chromatographie. L'ensemble du processus est également visible avec une lampe UV portable.

**Recherche dirigée**

L'objectif de ce programme est de guider les étudiants tout au long du raisonnement qui caractérise la procédure scientifique au sein d'un laboratoire. Ici, l'accent est mis non pas tant sur la réponse ou le résultat, mais plutôt sur les modalités d'obtention du résultat, ainsi que sur les modalités de justification de ce dernier par une observation et une analyse minutieuses des données. Ce modèle pédagogique est appelé « apprentissage par investigation en laboratoire ».

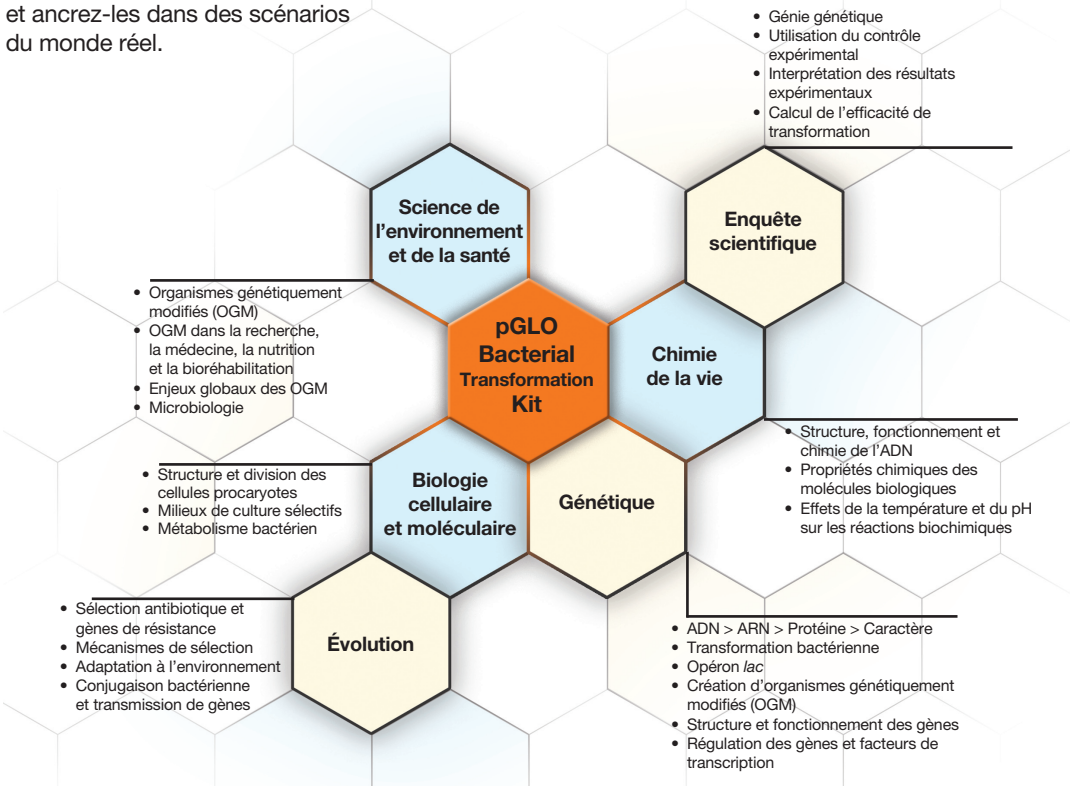
Chaque étape fait valoir la compréhension (par l'étudiant) du processus et de l'analyse des données. Plutôt que de fournir des explications ou des interprétations, le guide de l'étudiant pose une série de questions afin d'appuyer et de stimuler la réflexion sur tous les aspects de l'investigation. Les réponses sont fournies dans le guide de l'enseignant.

L'implication des étudiants dans ce cheminement aboutira à une compréhension accrue du processus scientifique et à un mode organisé et logique d'appréhension des tâches. En outre, nous souhaitons que les étudiants qui participent à ce type de processus commencent à développer un sentiment plus positif quant à leur capacité à comprendre la méthode scientifique.

Le programme GFP de Bio-Rad est unique et a généré un niveau d'enthousiasme sans précédent chez les enseignants en sciences. Votre retour d'information constitue une aide précieuse dans nos efforts permanents pour améliorer notre programme et nos produits. N'hésitez pas à nous faire parvenir vos anecdotes, commentaires et suggestions.

L'Équipe Bio-Rad Explorer
Bio-Rad Laboratories
6000 James Watson Drive
Hercules, CA 94547
bio-rad_explorer@bio-rad.com

**Créer un contexte. Renforcer l'apprentissage. Rester informé(e).**
Les nouvelles découvertes et technologies scientifiques créent davantage de contenus à enseigner sans pour autant étendre le temps d'enseignement. Les trousses Bio-Rad Explorer vous permettent d'enseigner de manière plus efficace grâce à l'intégration de plusieurs matières fondamentales au sein d'une seule activité. Associez des concepts aux techniques et ancrez-les dans des scénarios du monde réel.



# Sommaire

## Guide de l'enseignant


Page

Introduction à la transformation ..... 1
Le système pGLO ..... 1
Liste des composants de la trousse ..... 2
Plan de mise en œuvre ..... 5
Considérations de sécurité ..... 5
Points importants ..... 6
- Compétences générales de laboratoire ..... 6
- Points expérimentaux – Optimisation de l'expérience pGLO ..... 7
- Points conceptuels ..... 8

Vue d'ensemble de la préparation préliminaire de l'enseignant ..... 11
Liste de contrôle des postes de travail ..... 11
Guide de préparation préliminaire de l'enseignant ..... 13
Guide rapide (illustration du protocole de l'activité) ..... 18
Guide des réponses de l'enseignant ..... 20


## Guide de l'étudiant


Leçon 1 Introduction à la transformation ..... 32
Questions de base ..... 33
Leçon 2 Activité de transformation ..... 36
Questions récapitulatives ..... 42
Leçon 3 Collecte et analyse des données ..... 43
Analyse des résultats ..... 44
Questions récapitulatives ..... 45
Leçon 4 Activité supplémentaire : Calcul de l'efficacité de transformation ..... 47


## Annexes


Annexe A Biotechnologie – Repères historiques ..... 53
Annexe B Glossaire ..... 57
Annexe C Concepts fondamentaux de la biologie moléculaire et terminologie ..... 59
Annexe D Régulation des gènes ..... 64
Annexe E Documentation photographique des boîtes pGLO à l'aide du transilluminateur Vernier BlueView ..... 66
Annexe F Références ..... 67

# Introduction à la transformation

Au cours de cette expérience, vos étudiants exécuteront une procédure connue sous le nom de « transformation bactérienne ». La transformation génétique se produit lorsqu'une cellule intègre et exprime un nouveau fragment de matériel génétique (ADN). Cette nouvelle information génétique confère souvent à l'organisme un nouveau caractère identifiable. La transformation génétique signifie littéralement un changement engendré par des gènes; elle implique l'insertion d'un ou plusieurs gènes dans un organisme de façon à modifier ses caractères.

Elle est utilisée dans de nombreux domaines de la biotechnologie. En agriculture, les gènes qui codent pour les caractères tels que la résistance au gel, aux parasites ou à la sécheresse peuvent faire l'objet d'une transformation dans les végétaux. En bioréhabilitation, il est possible de transformer génétiquement des bactéries afin de leur permettre de digérer des déversements d'hydrocarbures. En médecine, des maladies causées par des gènes défectueux commencent à être traitées par thérapie génique; en d'autres termes, les cellules d'une personne malade sont transformées génétiquement avec une copie saine du gène impliqué.

Des gènes peuvent être isolés à partir de l'ADN humain, animal ou végétal et placés dans des bactéries. Par exemple, un gène humain sain codant pour une hormone, l'insuline, peut être intégré à des bactéries. Dans des conditions adaptées, ces bactéries peuvent produire de l'insuline humaine authentique. Cette insuline peut ensuite être utilisée pour traiter des patients diabétiques (pour lesquels il existe un dysfonctionnement du gène de l'insuline).

# Le système pGLO

Avec la trousse de transformation pGLO, les étudiants utilisent une procédure simple pour transformer des bactéries avec un gène qui code pour la GFP (protéine à fluorescence verte). La source de ce gène est la méduse bioluminescente *Aequorea victoria*. La protéine GFP rend la méduse fluorescente et la fait briller dans l'obscurité. À la suite de la procédure de transformation, les bactéries expriment le gène de méduse nouvellement acquis et produisent la protéine fluorescente qui les fait briller d'un vert lumineux sous la lumière UV.

Au cours de cette activité, les étudiants vont apprendre à transférer des gènes d'un organisme à un autre, à l'aide d'un plasmide. En plus d'un grand chromosome, les bactéries contiennent naturellement un ou plusieurs petits fragments circulaires d'ADN appelés « plasmides ». L'ADN plasmidique contient généralement des gènes codant pour un ou plusieurs caractères qui peuvent être bénéfiques pour la survie des bactéries. Dans la nature, les bactéries peuvent transférer et recevoir des plasmides, ce qui leur permet d'échanger ces gènes bénéfiques. Ce mécanisme naturel permet aux bactéries de s'adapter à de nouveaux environnements. La survenue récente de cas de résistance bactérienne aux antibiotiques est due à la transmission de plasmides.

Le plasmide pGLO unique de Bio-Rad contient le gène codant pour la protéine GFP et un gène conférant la résistance à un antibiotique, l'ampicilline. pGLO comprend également un système spécial de régulation des gènes, qui peut être utilisé pour contrôler l'expression de la protéine fluorescente dans les cellules transformées. Le gène codant pour la protéine GFP peut être activé dans les cellules transformées grâce à l'ajout du sucre arabinose au milieu nutritif des cellules. La sélection des cellules qui ont été transformées avec l'ADN pGLO est effectuée par culture sur des milieux contenant l'antibiotique. Les cellules transformées vont apparaître blanches (phénotype de type sauvage ou naturel) sur les milieux ne contenant pas d'arabinose, et vertes fluorescentes quand l'arabinose est inclus dans la gélose nutritive. La conception unique du système pGLO permet, pour la toute première fois, aux enseignants et aux étudiants d'explorer facilement les mécanismes de la régulation des gènes (annexe D) ainsi que ceux de la sélection génétique. De plus, la totalité du processus est observable avec une lampe UV de grande longueur d'onde, peu coûteuse, ou avec la lampe-stylo fournie.

Pour que les étudiants tirent profit au maximum de cette expérience, ils doivent connaître la définition d'un gène et comprendre la relation entre les gènes et les protéines. Pour obtenir une description détaillée ainsi que les concepts et termes fondamentaux en matière de biologie moléculaire, reportez-vous à l'annexe B.

Cette trousse de transformation pGLO permet également d'effectuer des activités pratiques supplémentaires : purification de la protéine fluorescente recombinante à partir des bactéries transformées, à l'aide du produit Green Fluorescent Protein Chromatography Kit (n° de référence 166-0005EDU) et séparation des protéines exprimées dans *E. coli*, telles que la protéine GFP, à l'aide du produit pGLO Kit SDS-PAGE Extension (n° de référence 166-0013EDU).

## Liste de contrôle (✔) des composants de la trousse

Cette section répertorie les composants fournis dans la trousse de transformation bactérienne. Elle détaille également les accessoires et équipements requis. Chaque trousse contient le matériel nécessaire pour équiper 8 postes de travail. Utilisez cette liste pour inventorier les fournitures avant de commencer les expériences. Tous les composants de la trousse peuvent être stockés à température ambiante jusqu'à utilisation.

| **Composants de la trousse** | **Nombre/trousse** | **(✔)** |
|---|---|---|
| *E. coli* HB101 K–12, lyophilisée | 1 flacon | ❑ |
| Plasmide (pGLO), lyophilisé, 20 µg | 1 flacon | ❑ |
| Ampicilline, lyophilisée, 30 mg | 1 flacon | ❑ |
| L (+) arabinose, lyophilisé, 600 mg | 1 flacon | ❑ |
| Solution de transformation (50 mM $CaCl_2$, pH 6,1), stérile, 15 ml | 1 bouteille | ❑ |
| Bouillon nutritif LB, stérile, 10 ml | 1 bouteille | ❑ |
| Gélose nutritive LB en poudre, stérile (pour faire 500 ml), 20 g | 1 sachet | ❑ |
| Pipettes, stériles, emballage individuel | 50 | ❑ |
| Anses d'inoculation, stériles, 10 µl, paquet de 10 | 8 paquets | ❑ |
| Boîtes de Petri, 60 mm, paquet stérile de 20 | 2 paquets | ❑ |
| Microtubes à centrifugation (multicolores), 2,0 ml | 60 | ❑ |
| Portoirs en mousse pour microtubes à essai | 8 | ❑ |
| Lampe-stylo UV | 1 | ❑ |
| Manuel d'instructions (disponible en ligne ou au format papier (sur demande)) | 1 | ❑ |

| **Accessoires et équipements requis – Non inclus dans cette trousse** | **Nombre/trousse** | **(✔)** |
|---|---|---|
| Horloge ou montre pour chronométrer 50 secondes | 1 | ❑ |
| Micro-ondes | 1 | ❑ |
| Bain-marie thermostatique, 1 – 6 litres (n° de référence 166-0504EDU)* | 1 | ❑ |
| Thermomètre qui indique 42 ºC | 1 | ❑ |
| Flacon 1 l | 1 | ❑ |
| Cylindre gradué de 500 ml | 1 | ❑ |
| Eau distillée, 500 ml | 1 | ❑ |
| Glace pilée (pas de glaçons) et récipients (les récipients en polystyrène sont adaptés) | 1 – 8 | ❑ |
| Eau de Javel (domestique) pour dilution à 10 % | 10 ml | ❑ |
| Marqueurs indélébiles | 4 – 8 | ❑ |

* En l'absence de bain-marie thermostatique, prendre un récipient (idéalement en polystyrène) pour eau chaude et utiliser une plaque chauffante ou de l'eau chaude du robinet pour obtenir une eau à 42 °C.

| **Accessoires et équipements optionnels** | **Nombre/trousse** | **(✔)** |
|---|---|---|
| Agitateur-mélangeur vortex | 1 | ❑ |
| Micropipettes, volume réglable, 2 – 20 µl (n° de référence 166-0506EDU ou 166-0551EDU) | 1 | ❑ |
| Film d'emballage de laboratoire Parafilm | 1 | ❑ |
| Embouts de pipette 2 – 20 µl | 1 | ❑ |
| Incubateur 37 °C (n° de référence 166-0501EDU)** | 1 | ❑ |
| Système Blue Digital BioImaging System – Vernier (BL-DBS) | 1 | ❑ |

** En l'absence d'incubateur, tenter d'utiliser une couverture chauffante ou fabriquer un incubateur artisanal avec une boîte en carton intégrant une ampoule basse tension. Sinon, incuber les boîtes gélosées pendant 48 à 72 heures à température ambiante (voir Compétences générales de laboratoire – Incubation).

| N° de référence | Description du produit |
|---|---|
| 166-0555EDU | **pGLO Bacterial Transformation Kit Refill Package** |
| 166-0405EDU | **pGLO Plasmid**, 20 µg, lyophilisé |
| 166-0406EDU | **Arabinose**, 600 mg, lyophilisé |
| 166-0407EDU | **Ampicillin**, 30 mg, lyophilisée |
| 166-0408EDU | ***E. coli* strain HB101 K-12**, lyophilisée |
| 166-0409EDU | **Transformation Solution**, 15 ml |
| 166-0421EDU | **LB broth**, 10 ml |
| 166-0600EDU | **LB Nutrient Agar Powder**, 20 g, constitution de quarante boîtes gélosées de 60 mm |
| 166-0472EDU | **LB Nutrient Agar Powder**, 500 g, pour mille boîtes gélosées de 60 mm |
| 166-0479EDU | **Jellyfish Foam Floating Racks**, 8 portoirs pour 12 microtubes à centrifugation |
| 166-0500EDU | **Long-Wave UV Lamp**, 1 |
| 166-0530EDU | **UV Pen Light**, 1 |
| 166-0470EDU | **Boîtes de Petri**, stériles 60 mm, 500 |
| 166-0471EDU | **Anses d'inoculation**, stériles, 80 |
| 166-0474EDU | **Pipettes de transfert jetables en plastique**, stériles, 500 |
| 166-0480EDU | **Pipettes de transfert jetables en plastique**, non stériles, 500 |
| 166-0473EDU | **Microtubes à essai de couleur de 1,5 ml**, 6 couleurs, 600 |
| 223-9480EDU | **Tubes à essai EZ Micro™**, 1,5 ml, coloris naturel, 500 |
| 223-9430EDU | **Tubes à essai EZ Micro**, 2,0 ml, coloris naturel, 500 |
| 166-0033EDU | **Manuel d'instruction** (disponible en ligne ou au format papier (sur demande)) |

## Normes nationales relatives aux sciences et transformation pGLO

# Enquête scientifique

- Concevoir et mener une enquête scientifique.

  Les étudiants comprendront la nécessité d'utiliser des contrôles pour l'expérience.
- Utiliser la technologie et les mathématiques pour améliorer les investigations et les communications.

  Les étudiants utilisent les mathématiques pour calculer l'efficacité de transformation. Ils sont à même d'évaluer les différences de technique, en fonction des efficacités.

# Normes relatives aux sciences de la vie

## La cellule

- Les cellules ont des structures particulières qui sous-tendent leurs fonctions

  Il convient que les étudiants comprennent le rôle et la fonction de la membrane cellulaire et les modalités de conception des procédures de l'activité pour que le plasmide traverse la membrane.
- La plupart des fonctions cellulaires impliquent des réactions chimiques.

  La solution de transformation contient du chlorure de calcium. Il convient que les étudiants comprennent comment ce sel se dissocie en solution pour entourer les molécules d'ADN chargées.
- Les cellules stockent et utilisent les informations pour guider leurs fonctions.

  Les étudiants fournissent de nouvelles informations à la cellule, qui lui permettent de fabriquer de nouvelles protéines.
- Les fonctions cellulaires sont régulées.

  La production de la protéine GFP est régulée par le sucre arabinose.
- Dans tous les organismes, les instructions permettant de spécifier leurs caractéristiques sont transportées dans l'ADN.

  Le plasmide introduit dans la cellule est un fragment circulaire d'ADN, à réplication autonome.
- Des modifications d'ADN (mutations) ont lieu spontanément, de façon modérée.

  Les bactéries ont la capacité de changer et de survivre en présence d'antibiotiques.

## Évolution biologique

- Les espèces évoluent avec le temps.

  Les bactéries ont évolué avec des plasmides pour fournir de nouveaux gènes et de nouvelles protéines, aux fins de survie.

## Interdépendance des organismes

- Les organismes vivants ont la capacité de produire des populations de taille infinie, mais les ressources ne sont pas illimitées.

  Dans la boîte de Petri, la croissance bactérienne est limitée tandis que la nourriture s'épuise et les déchets augmentent.

## Science et technologie

- Comprendre la science et la technologie

  La technologie de l'ADN recombinant permet d'introduire des gènes d'une espèce dans une autre, et de faire en sorte que celle-ci produise une nouvelle protéine.

**Plan de mise en œuvre**

Chacune des trois sessions de travaux pratiques en laboratoire est prévue pour être effectuée en périodes consécutives de 50 minutes. Le protocole détaillé de l'activité est disponible dans le guide de l'étudiant.

**Suggestion de programmation pour les étudiants**

| | | |
|---|---|---|
| Jour 1 | Préparation | Présentation et discussion<br>Considérations des étudiants 1 – 4 |
| Jour 2 | Activité de transformation | Transformation des cellules et étalement sur les boîtes<br>Questions de base des étudiants |
| Jour 3 | Collecte et analyse des données | Observation des transformants et des contrôles<br>Analyse et interprétation des résultats<br>Considérations des étudiants |
| Jour 4 | Activités supplémentaires | Calcul de l'efficacité de transformation<br>Green Fluorescent Protein Chromatography Kit (n° de référence 166-0005EDU)<br>pGLO Kit SDS-PAGE Extension (n° de référence 166-0013EDU) |

## Considérations de sécurité

Certains pays en dehors des États-Unis peuvent avoir besoin d'une autorisation spéciale pour pouvoir utiliser cette trousse. Consulter les autorités législatives nationales pour obtenir les lignes directrices en vigueur.

La souche *Escherichia coli* HB101 K-12 de cette trousse n'est pas un organisme pathogène comme la souche *E. coli* O157 H7, impliquée parfois dans les intoxications alimentaires. HB101 K-12 a fait l'objet d'une modification génétique pour empêcher sa croissance, sauf dans le cas d'une culture sur milieu enrichi. Cependant, la manipulation de la souche *E. coli* K-12 exige le respect des bonnes pratiques de laboratoire. Ces pratiques supposent notamment les précautions suivantes. Les surfaces de travail sont désinfectées une fois par jour et après tout déversement de matériel viable. Tous les déchets liquides ou solides contaminés sont désinfectés avant d'être éliminés. Le lavage des mains est indispensable : (i) après la manipulation de matériels contenant des bactéries et (ii) avant de quitter l'activité. Afin de réduire la formation d'aérosols, toutes les procédures doivent être exécutées avec précaution. Utiliser des dispositifs de pipettage mécanique; le pipettage à la bouche est interdit. Manger, boire, fumer et utiliser des produits cosmétiques est interdit dans la zone de travail. Il est fortement recommandé de porter des lunettes de protection et des gants.

En l'absence d'autoclave, l'ensemble des solutions et composants (anses et pipettes) qui ont été en contact avec les bactéries peuvent être placés dans une solution fraîche d'eau de Javel à 10 % pendant au moins 20 minutes, pour stérilisation. Il convient qu'une petite cuvette contenant cette solution soit placée sur chaque poste de travail. Quelle que soit l'option choisie, l'ensemble des anses et pipettes utilisées doivent être rassemblées pour stérilisation. Stériliser les boîtes de Petri en couvrant la gélose avec une solution d'eau de Javel à 10 %. Attendre au moins une heure, puis jeter le surplus de liquide. Une fois stérilisées, les boîtes gélosées peuvent être doublement emballées et traitées comme des déchets normaux. Au cours de l'utilisation de solutions d'eau de Javel, il est recommandé de porter des lunettes de protection.

L'ampicilline peut entraîner des réactions allergiques ou des irritations oculaires, respiratoires et cutanées. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un médecin. Porter des vêtements de protection adaptés. L'ampicilline est un antibiotique de la famille des pénicillines. Il convient que les personnes allergiques à la pénicilline, ou à tout autre membre de la famille des pénicillines, évitent tout contact avec l'ampicilline.

Pour obtenir les fiches de données de sécurité (FDS) Bio-Rad, appeler le numéro 800-424-6723 (États-Unis) ou visiter www.bio-rad.com pour obtenir plus d'informations sur les réactifs de cette trousse. En vue d'une élimination adéquate, consulter les réglementations locales en matière d'environnement, de santé et de sécurité.

#### Lampes à rayonnement ultraviolet (UV)

Le rayonnement ultraviolet peut causer des lésions oculaires et cutanées. La lumière UV à ondes courtes est davantage préjudiciable que la lumière UV à grande longueur d'onde. La lampe UV Bio-Rad recommandée pour ce module est de grande longueur d'onde. Si possible, utiliser des lunettes de protection.

## Points importants

Cette section décrit les points expérimentaux et conceptuels qui peuvent paraître difficiles pour les étudiants. Ces points sont extrêmement importants pour garantir la réussite globale de l'activité. Il convient que l'enseignant attire l'attention sur ces points, et dans la mesure du possible, procède aux démonstrations techniques préalablement aux tentatives des étudiants.

Pour les étudiants, l'élément le plus important consiste à mettre les bons composants dans les bons tubes et sur les bonnes boîtes. En vue du bon déroulement de l'expérience, il est donc essentiel de marquer clairement les tubes et d'être préparé et organisé. Le guide rapide est fourni pour organiser l'activité. Ce protocole imagé fournit des descriptions visuelles de toutes les étapes de la procédure de transformation.

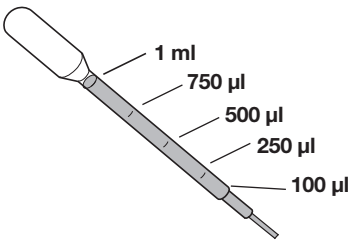
## Compétences générales de laboratoire

#### Technique stérile

Pour tout type de technique de microbiologie (par exemple, manipulation et culture de bactéries), il est important de ne pas introduire de bactéries contaminantes dans l'expérience. En effet, les bactéries contaminantes sont ubiquitaires : elles sont présentes sur le bout des doigts, les bancs de laboratoire, etc. Il est donc important d'éviter ces surfaces qui contaminent. Lorsque les étudiants travaillent avec les anses d'inoculation, les pipettes et les boîtes gélosées, l'enseignant doit insister sur le fait que l'anneau du bout de l'anse, la pointe de la pipette et la surface de la boîte gélosée ne doivent pas être touchés ni placés sur des surfaces contaminantes. Même si un certain degré de contamination n'entraînera probablement pas l'échec de l'expérience, les étudiants gagneront à recevoir des informations de base sur la technique stérile. L'utilisation de la technique stérile constitue également un enjeu d'hygiène et de sécurité pour l'être humain.

#### Utilisation de la pipette

Avant de commencer les sessions de l'activité, montrer aux étudiants les graduations sur la pipette. Les graduations 100 µl, 250 µl et 1 ml seront utilisées comme unités de mesure tout au long de l'activité.



### Décontamination et élimination

En l'absence d'autoclave, l'ensemble des solutions et composants (anses et pipettes) qui ont été en contact avec les bactéries peuvent être placés dans une solution fraîche d'eau de Javel à 10 % pendant au moins 20 minutes, pour stérilisation. Il convient qu'une petite cuvette contenant cette solution soit placée sur chaque poste de travail. Quelle que soit l'option choisie, l'ensemble des anses et pipettes utilisées doivent être rassemblées pour stérilisation. Stériliser les boîtes de Petri en couvrant la gélose avec une solution d'eau de Javel à 10 %. Attendre au moins une heure, puis jeter le surplus de liquide. Une fois stérilisées, les boîtes gélosées peuvent être doublement emballées et traitées comme des déchets normaux. Au cours de l'utilisation de solutions d'eau de Javel, il est recommandé de porter des lunettes de protection. En vue d'une élimination adéquate, consulter les réglementations locales en matière d'environnement, de santé et de sécurité.

### Incubation

Ce guide est rédigé en tenant compte de l'utilisation d'un incubateur à 37 °C. L'expérience de transformation peut être menée sans l'utilisation d'un incubateur. Toutefois, dans ce cas, le nombre de jours requis pour obtenir des colonies de taille optimale dépend de la température ambiante. Les meilleurs résultats sont obtenus si les colonies de la boîte d'amorce (starter) sont jeunes (24 – 36 heures de croissance) et mesurent environ 1 – 1,5 mm de diamètre. **La réfrigération des boîtes de culture diminuera significativement l'efficacité de transformation**. La température optimale pour la croissance d'*E. coli* est 37 °C (98,6 °F). Des températures plus basses diminueront le taux de croissance. À 28 °C (82 °F), deux jours d'incubation sont requis pour obtenir la taille optimale de colonie. À 21 °C (70 °F), trois jours d'incubation sont requis pour obtenir la taille optimale de colonie. Ajustez les délais de préparation préliminaire et la programmation de l'activité en fonction de la température d'incubation correspondant à votre contexte.

## Points expérimentaux – Optimisation de l'expérience pGLO

### Pratique des techniques

Certains enseignants jugent utile de procéder à une séance de répétition afin d'expliquer le travail en conditions stériles, de démontrer l'utilisation des pipettes et des anses, ainsi que la pratique de la striation et de l'étalement des bactéries sur la surface gélosée. Choisissez la meilleure option pour vos étudiants, en fonction de leur expérience et de leurs connaissances en matière de techniques de laboratoire. L'attention portée aux points expérimentaux suivants aboutira à la réussite de la transformation.

### Préparation des boîtes (gélosées) *E. coli* d'amorce (starter)

Pour la préparation de la gélose, de meilleurs résultats sont obtenus avec un flacon plutôt qu'avec un bécher. S'assurer que la gélose est complètement dissoute; en effet, un mélange non homogène peut entraver la solidification. Respecter scrupuleusement les consignes « Préparation préliminaire étape 1 » pour limiter l'introduction de contaminants.

Après striation avec *E. coli* et incubation à 37 °C, il convient d'utiliser les boîtes d'amorce dans les 24 à 36 heures. Un délai au-delà de 36 heures compromettra la transformation.

### Transfert des colonies bactériennes des boîtes gélosées aux microtubes

Le fait de prélever une colonie unique sur la boîte d'amorce peut conduire à la tentation de prendre plus de cellules que nécessaire. Une seule colonie qui mesure approximativement 1 mm de diamètre contient des millions de cellules bactériennes. Pour accroître l'efficacité de transformation, il convient que les étudiants sélectionnent 2 – 4 colonies volumineuses, d'un diamètre de 1 – 1,5 mm. La sélection de plus de 4 colonies peut réduire l'efficacité de transformation. Sélectionner des colonies individuelles plutôt qu'un prélèvement de bactéries à partir de la portion dense de la boîte; pour la réussite de la transformation, les bactéries doivent être en phase de croissance active.

### Transfert d'ADN

Le transfert de l'ADN plasmidique de son tube de stockage à la suspension de transformation est une étape primordiale. Les étudiants doivent observer attentivement l'anneau de l'anse pour voir s'il porte un film de solution plasmidique. Celui-ci est comparable au film savonneux qui se forme dans un anneau métallique permettant de créer des bulles de savon. [Facultatif] Les étudiants peuvent pipetter 10 µl du plasmide pGLO dans le tube étiqueté « +pGLO » et bien mélanger.

### Choc thermique

La procédure utilisée pour accroître l'incorporation de l'ADN étranger aux bactéries est appelé **choc thermique.** Il est important que les étudiants suivent les instructions relatives aux durées. Le changement rapide de température et la durée du choc thermique sont également importants. Pour des résultats optimaux, les tubes contenant les suspensions cellulaires doivent être directement pris de la glace, placés dans le bain-marie à 42 °C pendant 50 secondes et remis immédiatement dans la glace. L'absence de choc thermique entraînera un nombre de transformants diminué selon un facteur 10; avec un choc thermique de 90 secondes, le nombre sera diminué de moitié, par rapport à une durée de 50 secondes. Dans les deux cas, l'expérience donnera des résultats. Cependant, elle est optimisée avec un choc thermique de 50 secondes. En vue d'une efficacité de transformation maximale, veiller à utiliser de la glace pilée, plutôt que des glaçons. Utiliser deux thermomètres pour vérifier la température de l'incubateur et contrôler la précision.

### Étalement des transformants et des contrôles

Le dépôt d'un excès de culture transformée sur les boîtes avec la pipette de transfert jetable est contre-productif car les boîtes peuvent ne pas absorber le surplus de liquide et l'étalement sera alors inégal. Le transfert des suspensions bactériennes des microtubes aux boîtes de Petri exige quelques précautions. Les bactéries se déposent au fond; les étudiants peuvent donc prendre l'extrémité supérieure d'un tube fermé entre l'index et le pouce d'une main et tapoter le bas du tube avec l'index de l'autre main. Veiller à ce que les étudiants tapotent le tube avec le doigt ou remuent la suspension avec la pipette avant de l'extraire. Veiller également à ce qu'ils recouvrent les boîtes de Petri avec un couvercle immédiatement après avoir pipeté la culture de transformation et étalé les cellules. Étaler les suspensions uniformément sur la surface de la gélose en faisant des va-et-vient avec le côté plat d'une nouvelle anse stérile.

### Trousse de chromatographie GFP

Si vous envisagez de poursuivre l'expérience de transformation bactérienne pGLO avec le produit Green Fluorescent Protein Chromatography Kit (n° de référence 166-0005EDU), vous devez garder les bactéries pGLO transformées, cultivées sur les boîtes LB/amp/ara. La meilleure façon de conserver les boîtes est de les placer à l'envers dans un endroit froid, tel qu'un réfrigérateur. Cette action gardera les cellules en vie mais limitera leur croissance active jusqu'à ce que vous en ayez besoin pour commencer l'expérience suivante. La conservation des boîtes à l'envers permet d'éviter l'humidité de condensation sur les colonies.

Idéalement, il convient d'utiliser les boîtes dans les 2 à 4 semaines. Pour une conservation plus longue, s'assurer que les boîtes sont scellées avec du Parafilm pour prévenir la dessiccation.

## Points conceptuels

### Milieux

Les milieux nutritifs liquides et solides, c'est-à-dire le bouillon nutritif LB (du nom de Luria et Bertani) et la gélose nutritive LB, sont composés d'un extrait de levure et du résultat d'une digestion enzymatique de sous-produits carnés, lesquels fournissent un mélange de glucides, d'acides aminés, de nucléotides, de sels et de vitamines (nutriments pour la croissance bactérienne). La gélose est dérivée d'algues marines. Elle fond lorsqu'elle est chauffée, forme un gel solide lorsqu'elle est refroidie (comparable à la gélatine Jello-O) et fournit un support solide pour la culture des bactéries.

**Sélection antibiotique**

Le plasmide pGLO, qui contient le gène GFP, contient aussi le gène pour la bêta-lactamase, qui fournit la résistance à l'ampicilline (antibiotique membre de la famille des pénicillines). La protéine bêta-lactamase est produite et sécrétée par les bactéries qui contiennent le plasmide. La bêta-lactamase inactive l'ampicilline présente dans la gélose nutritive LB, pour permettre la croissance bactérienne. Seules les bactéries transformées qui contiennent le plasmide et expriment la bêta-lactamase peuvent croître sur les boîtes qui contiennent l'ampicilline. Seul un très faible pourcentage des cellules accepte l'ADN plasmidique et est donc transformé. Les cellules non transformées ne peuvent pas croître sur les boîtes de sélection à l'ampicilline.

**Solution de transformation**

Le postulat avancé ici est que le cation $Ca^{2+}$ de la solution de transformation (50 mM $CaCl_2$, pH 6,1) neutralise les charges négatives répulsives du squelette phosphate de l'ADN et des phospholipides de la membrane cellulaire, permettant ainsi à l'ADN d'entrer dans les cellules.

**Choc thermique**

Le choc thermique augmente la perméabilité de la membrane cellulaire à l'ADN. Bien que le mécanisme ne soit pas connu, la durée du choc thermique est critique et a été optimisée pour le type de bactéries utilisées et pour les conditions de transformation employées.

**Récupération**

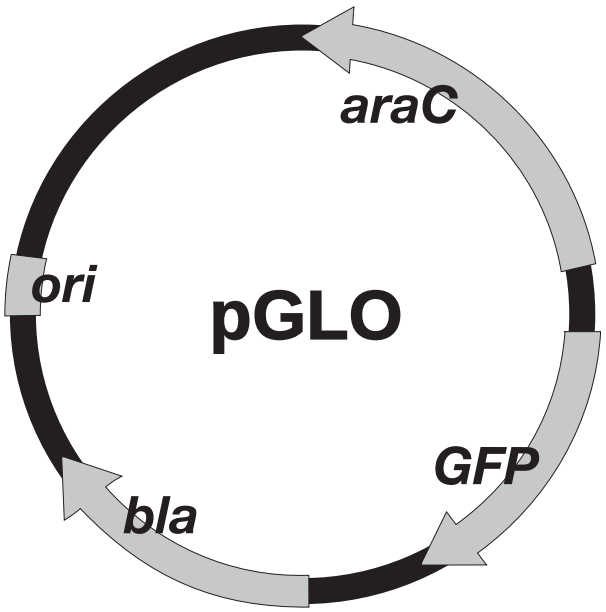
La période d'incubation de 10 minutes suivant l'ajout du bouillon nutritif LB permet aux cellules de récupérer et d'exprimer la protéine bêta-lactamase de résistance à l'ampicilline, de sorte que les cellules transformées survivent sur les boîtes de sélection à l'ampicilline.

La culture de récupération peut être incubée à température ambiante ou à 37 °C, pendant 1 heure ou toute la nuit. Cette action est susceptible d'augmenter l'efficacité de transformation de plus de 10 fois.

**Régulation du gène pGLO**

Dans tous les organismes, l'expression des gènes est soigneusement régulée pour permettre l'adaptation à différentes conditions et éviter une surproduction de protéines inutiles. Les gènes impliqués dans la dégradation de différentes sources nutritives sont de bons exemples de gènes hautement régulés. Par exemple, l'arabinose (sucre végétal simple) est à la fois source d'énergie et source de carbone pour les bactéries. Les gènes bactériens, qui impliquent que les enzymes digestives dégradent l'arabinose, ne sont pas exprimés quand l'arabinose n'est pas dans l'environnement. Mais lorsque l'arabinose est présent, ces gènes sont activés. Quand l'arabinose disparaît, les gènes sont de nouveau inactivés.

L'arabinose initie la transcription de ces gènes en favorisant la liaison de l'ARN polymérase. Dans l'ADN plasmidique pGLO génétiquement modifié, certains gènes impliqués dans la dégradation de l'arabinose ont été remplacés par le gène de la méduse qui code pour la protéine GFP. Lorsque les bactéries transformées avec l'ADN plasmidique pGLO sont cultivées en présence d'arabinose, le gène GFP est activé et les bactéries arborent un vert brillant quand elles sont exposées à la lumière UV.




**Plasmide pGLO.** La séquence et la cartographie sont disponibles à l'adresse http://explorer.bio-rad.com, sur la page dédiée aux ressources pédagogiques.

Il s'agit d'un excellent exemple de structure en matière de biologie moléculaire, c'est-à-dire ADN⇨ARN⇨PROTÉINE⇨CARACTÈRE. Lorsque l'arabinose est absent du milieu de culture, le gène GFP reste inactif et les colonies apparaissent blanches. L'annexe A fournit une description et une analyse détaillées de la régulation des gènes et de la fonction du promoteur de l'arabinose.

## Vue d'ensemble de la préparation préliminaire de l'enseignant

Cette section présente la programmation recommandée pour la préparation préliminaire de l'enseignant. Le guide détaillé de la préparation est fourni aux pages 13 – 17.

| Préparation de l'enseignant | | Quand | durée |
|---|---|---|---|
| Étape 1 | Lire le manuel de transformation<br>Faire une copie du guide de l'étudiant et du guide rapide pour chaque étudiant | Immédiatement | 1 heure |
| Étape 2 | Préparer les boîtes de gélose nutritive | 3 – 7 jours avant l'activité | 1 heure |
| Étape 3 | Préparer les boîtes d'amorce (starter), aliquoter les solutions | 36 – 48 heures avant l'activité | 30 minutes |
| Étape 4 | Organiser les postes de travail des étudiants | Juste avant l'activité | 10 minutes |

## Liste de contrôle (✔) des postes de travail

**Postes de travail des étudiants.** La liste indique le matériel et les fournitures qui doivent être présents sur chaque poste de travail des étudiants avant le début de l'activité. Les composants fournis dans cette trousse sont suffisants pour 8 postes de travail.

**Poste de travail commun.** La liste indique le matériel, les fournitures et l'équipement qui doivent être présents à un endroit commun, accessible à tous les étudiants. C'est à l'enseignant de décider si les étudiants peuvent accéder aux solutions tampons et équipements communs, ou si l'enseignant aliquote les solutions dans les microtubes fournis.

**Leçon 2 Activité de transformation**
**Postes de travail des étudiants**

| Matériel | Quantité |
|---|---|
| Boîte d'amorce (starter) *E. coli* (LB) | 1 |
| Boîtes de gélose coulée (1 LB, 2 LB/amp, 1 LB/amp/ara) | 4 |
| Solution de transformation | 1 |
| Bouillon nutritif LB | 1 |
| Anses d'inoculation | 7 (1 paquet de 10) |
| Pipettes | 5 |
| Portoir en mousse pour microtubes | 1 |
| Récipients (par exemple, récipients en polystyrène) remplis de glace pilée (pas de glaçons) | 1 |
| Marqueur | 1 |
| Microtubes à centrifugation | 2 |

**Poste de travail commun**

| Matériel | Quantité |
|---|---|
| ADN plasmidique pGLO réhydraté | 1 flacon |
| Bain-marie à 42 °C et thermomètre | 1 |
| Lampe UV | 1 |
| Incubateur 37 °C | 1 |
| (facultatif, voir Compétences générales de laboratoire – Incubation) | 1 |
| Micropipettes à volume réglable 2 – 20 µl | 1 |
| Embouts de micropipette 2 – 20 µl | 1 |

**Leçon 3 Collecte et analyse des données**

**Postes de travail des étudiants**

| Matériel | Quantité |
|---|---|
| Boîtes incubées de transformation et de contrôle : | Ensemble de 4 |
| LB/amp/ara | 1 |
| LB/amp | 2 |
| LB | 1 |

**Poste de travail commun**

| Matériel | Quantité |
|---|---|
| Lampe UV | 1 – 8 |

## Guide de préparation préliminaire de l'enseignant

| Objectifs | | Durée requise | Quand |
|---|---|---|---|
| Étape 1 | Préparer les boîtes gélosées | 1 heure | 3 – 7 jours avant l'activité |
| Étape 2 | Réhydrater *E. coli* | 2 minutes | 36 – 48 heures avant l'activité |
| | Strier les boîtes d'amorce (starter) | 15 minutes | 24 – 36 heures avant l'activité |
| | Réhydrater l'ADN plasmidique pGLO | 2 minutes | 0 – 36 heures avant l'activité |
| Étape 3 | Aliquoter les solutions | 10 minutes | Immédiatement avant l'activité |
| | Installer les postes de travail | 10 minutes | |

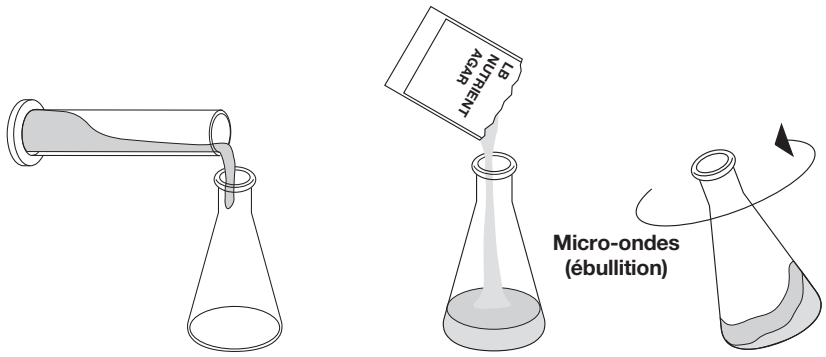
## Préparation préliminaire, étape 1 : 3 – 7 jours avant l'activité de transformation

**1. Préparer la gélose nutritive (sans autoclave)**

Il convient de préparer les boîtes gélosées au moins trois jours avant l'expérience. Elles doivent être laissées à température ambiante pendant deux jours et ensuite réfrigérées jusqu'à ce qu'elles soient utilisées. Les deux jours (banc de laboratoire) permettent à la gélose de sécher suffisamment pour recevoir aisément la solution liquide de transformation (leçon 2).

Pour préparer la gélose, verser 500 ml d'eau distillée dans un flacon Erlenmeyer d'au moins 1 l. De meilleurs résultats sont obtenus avec un flacon plutôt qu'avec un bécher. Ajouter le contenu entier du sachet de gélose nutritive LB. Agiter le flacon pour dissoudre la gélose, puis chauffer jusqu'à ébullition dans un micro-ondes. Répéter la procédure de chauffage et d'agitation environ trois fois jusqu'à ce que toute la gélose soit dissoute (**plus aucun grain visible**). Veiller à ce que le flacon refroidisse un peu avant l'agitation, de façon à éviter le débordement du milieu chaud sur la main. Un mélange non homogène de la gélose peut entraver la solidification.

Après dissolution complète, laisser la gélose nutritive LB refroidir de manière à pouvoir saisir le flacon à la main (50 °C). Pendant le refroidissement, marquer les boîtes et préparer l'arabinose et l'ampicilline comme indiqué ci-après (étape 3). Le refroidissement de la gélose doit être limité, afin d'éviter un début de solidification. Le maintien du flacon de gélose fondue dans un bain-marie à 50 °C peut empêcher un refroidissement trop rapide.



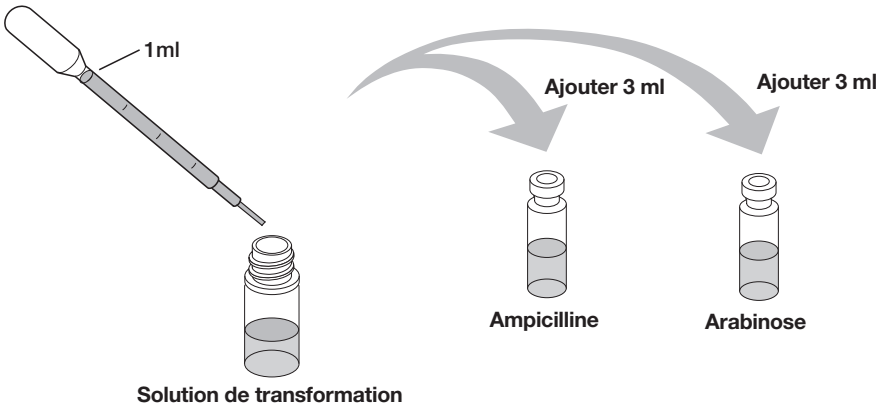

Un micro-ondes représente la meilleure solution pour dissoudre la gélose. En cas d'indisponibilité de cet appareil, il est possible d'utiliser une plaque chauffante. Veiller à ne pas faire bouillir jusqu'à l'assèchement et laisser frémir pendant 5 – 10 minutes après l'ébullition pour stériliser.

**2. Préparer l'arabinose et l'ampicilline**

**Remarque :** L'arabinose nécessite au moins 10 minutes pour se dissoudre — soyez patient.

L'arabinose est fourni sous forme sèche, dans un petit flacon. Avec une nouvelle pipette stérile, ajouter 3 ml de solution de transformation directement dans le flacon pour réhydrater le sucre. Agiter le flacon; il est possible d'utiliser un agitateur-mélangeur vortex. (La solution de transformation est utilisée ici parce qu'il s'agit d'une solution stérile à disposition. L'eau stérile fonctionnerait tout aussi bien.) Jeter la pipette après utilisation.

L'ampicilline est également fournie sous forme sèche, dans un petit flacon. Avec une nouvelle pipette stérile, ajouter 3 ml de solution de transformation directement dans le flacon pour réhydrater l'antibiotique. (La solution de transformation est utilisée ici parce qu'il s'agit d'une solution stérile à disposition. L'eau stérile fonctionnerait tout aussi bien).



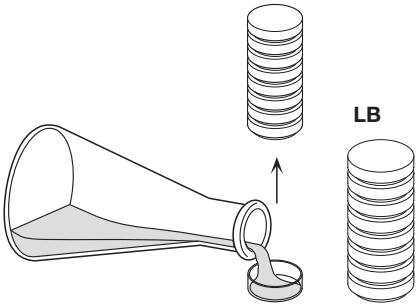

**Remarque :** Une température excessive (> 60 °C) détruira l'ampicilline et l'arabinose, mais parallèlement, la gélose nutritive se solidifie à 27 °C; il est donc nécessaire de surveiller attentivement le refroidissement de la gélose et ensuite de procéder au coulage dans les boîtes, de la première à la dernière sans interruption. Le maintien du flacon de gélose fondue dans un bain-marie à 50 °C peut empêcher un refroidissement trop rapide. Après le coulage, il est possible d'éliminer l'excès de bulles en chauffant brièvement la surface de chaque boîte avec la flamme d'un bec Bunsen. Par la suite, ne plus les manipuler jusqu'à solidification de la gélose. Jeter l'excès de gélose dans la poubelle, non pas dans l'évier. Essuyer les éventuelles gouttes de gélose sur le côté des boîtes.

**3. Marquer les boîtes**

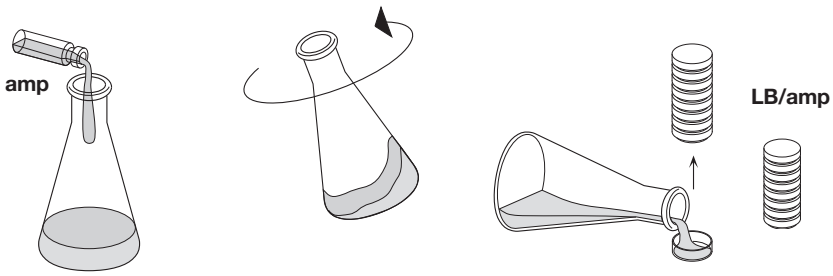
Les 40 boîtes gélosées fournies doivent être marquées, avec un marqueur indélébile, sur le dessous près du bord. Ne pas marquer les couvercles. Marquer 16 boîtes avec la mention **LB**, 16 boîtes avec la mention **LB/amp** et 8 boîtes avec la mention **LB/amp/ara**.

**4. Couler la gélose nutritive LB dans les boîtes (LB, LB/amp, LB/amp/ara)**

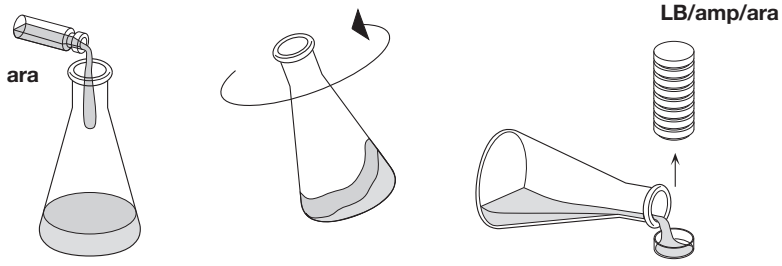
**Premièrement, couler la gélose nutritive LB dans les 16 boîtes marquées LB**. Faire des piles de 4 à 8 boîtes vides, enlever le couvercle d'une boîte avec une main (en partant de la boîte du bas) et couler la gélose nutritive LB avec l'autre. Remplir la boîte d'environ un tiers à un demi (~12 ml) avec la gélose, replacer le couvercle et continuer la pile vers le haut. Couler la gélose dans 16 boîtes de cette façon. Laisser les boîtes refroidir dans cette configuration d'empilement.




**Deuxièmement, ajouter l'ampicilline hydratée au reste de gélose nutritive LB**. Remuer brièvement pour mélanger. Couler la gélose dans les 16 boîtes marquées **LB/amp** à l'aide de la technique décrite ci-dessus.




**Troisièmement, ajouter l'arabinose hydraté au reste de gélose nutritive LB contenant l'ampicilline.** Remuer brièvement pour mélanger et couler la gélose dans les 8 boîtes marquées **LB/amp/ara** à l'aide de la technique décrite ci-dessus.




Les boîtes devraient prendre dans les 30 minutes.

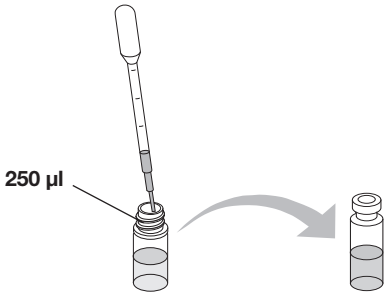
**5. Stockage des boîtes**

Après un séchage de deux jours à température ambiante, les boîtes peuvent être soit utilisées, soit empilées par vingt et enfilées dans un sachet plastique. L'utilisation du sachet plastique permet de conserver l'hydratation des boîtes. La pile est ensuite inversée, le sachet fermé, et les boîtes conservées à l'envers à 4 °C jusqu'à utilisation. L'inversion permet d'empêcher la condensation sur les couvercles, qui pourrait goutter sur la gélose.

## Préparation préliminaire, étape 2 : 24 – 36 heures avant l'activité de transformation

**1. Réhydrater les bactéries**

En utilisant une pipette stérile, réhydrater les *E. coli* HB101 lyophilisées en ajoutant 250 µl de bouillon nutritif LB directement dans le flacon. Refermer le flacon et agiter doucement pour garantir la réhydratation de toutes les bactéries. Incuber le flacon à 37 °C pendant 8 – 24 heures. En l'absence d'incubateur ou de bain-marie, il est possible de placer le flacon dans un grand volume d'eau chauffée à 37° C, puis de laisser à température ambiante pendant 16 – 24 heures. Conserver le bouillon LB restant à 4 °C jusqu'à utilisation.




**Bouillon nutritif LB** ***E. coli* lyophilisées**

**2. Strier les boîtes d'amorce (starter) pour produire des colonies bactériennes isolées sur les boîtes gélosées**

Chaque équipe aura besoin de sa propre boîte d'amorce comme source de cellules pour la transformation. Cette trousse contient le matériel nécessaire pour équiper huit postes de travail complets. Les boîtes LB doivent être striées pour fournir des colonies isolées, puis incubées à 37 °C pendant 24 – 36 heures avant que l'activité de transformation ne soit planifiée.

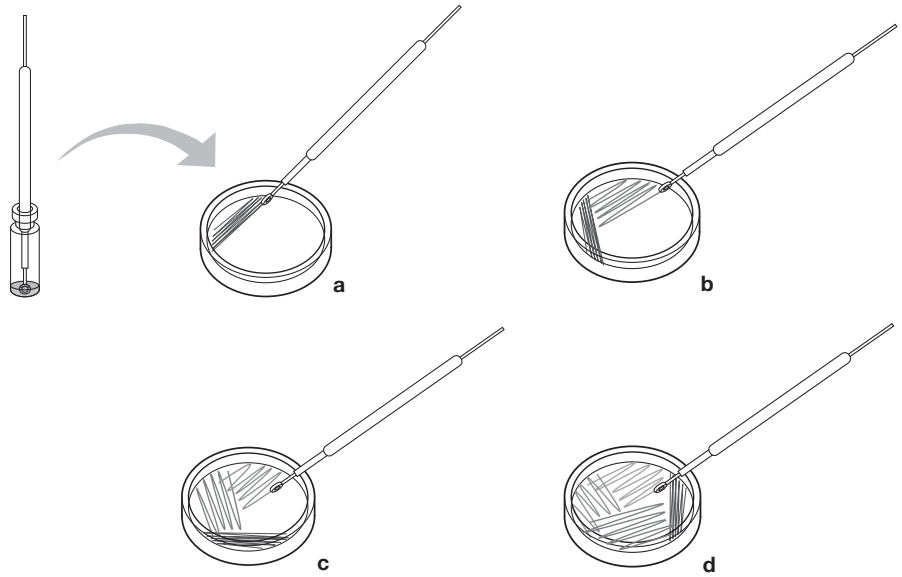
En utilisant les *E. coli* réhydratées, préparées lors de la dernière étape, et huit boîtes de gélose **LB** (préparées lors de l'étape 1), strier une boîte d'amorce pour chaque équipe d'étudiants. Le but de la striation est de générer des colonies isolées, à partir d'une suspension concentrée de bactéries. Une quantité infime de suspension bactérienne est très productive. Dans des conditions favorables, une cellule se multiplie pour produire des millions de cellules génétiquement identiques en seulement 24 heures.

a. Agiter doucement le flacon d'*E. coli* HB101 pour remettre en suspension les bactéries. Placer une anse d'inoculation stérile dans la culture de bactéries réhydratées. Plonger l'anse directement dans le flacon, sans inclinaison. Retirer l'anse et vérifier la présence d'une pellicule de bactéries. Strier les boîtes comme illustré ci-dessous. La striation se déroule successivement sur quatre quadrants. La première strie permet d'étaler un peu les cellules. Faire des va-et-vient avec l'anse à peu près une douzaine de fois dans la petite zone, comme indiqué sur le schéma. Dans les quadrants suivants, les cellules deviennent de plus en plus diluées, ce qui augmente la probabilité de produire des colonies isolées.

b. Pour les stries suivantes, l'objectif est d'utiliser au maximum la surface de la boîte. Faire pivoter la boîte d'environ 45 degrés (de manière à ce que le mouvement de striation soit confortable) et commencer la deuxième striation. Ne pas replonger dans les bactéries réhydratées une seconde fois. Passer dans la striation précédente à peu près deux fois, puis faire des va-et-vient comme indiqué sur le schéma, une dizaine de fois.

c. Faire pivoter la boîte de nouveau et répéter la striation.

d. Faire pivoter la boîte pour la dernière fois et procéder aux dernières stries. Répéter les étapes a à d avec les boîtes **LB** restantes, correspondant au nombre de postes de travail. Utiliser la même anse d'inoculation pour toutes les boîtes. Pour éviter la contamination, couvrir chaque boîte immédiatement après sa striation.

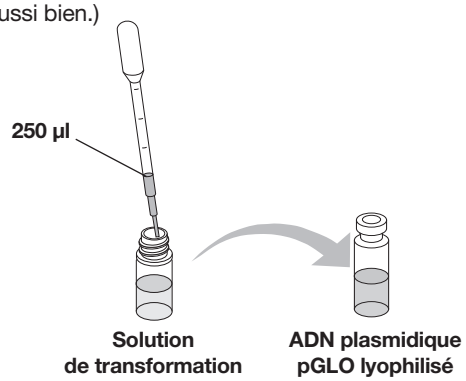



e. Placer les boîtes à l'envers dans l'incubateur, toute la nuit à 37 °C, ou à température ambiante pendant 2 – 3 jours en l'absence d'incubateur. Les utiliser pour la transformation dans les 24 – 36 heures; en effet, l'obtention d'une efficacité de transformation élevée implique que les bactéries soient en phase de croissance active. Un délai au-delà de 36 heures compromettra la transformation. **NE PAS RÉFRIGÉRER AVANT UTILISATION**.

f. Les *E. coli* forment des colonies blanc cassé, uniformément circulaires, avec des bords lisses. Éviter d'utiliser des boîtes avec des colonies contaminantes.

**3. Préparer le plasmide pGLO**

Avec une nouvelle pipette stérile, ajouter 250 µl de solution de transformation dans le flacon d'ADN plasmidique pGLO lyophilisé. Noter que la quantité d'ADN est si petite que le flacon peut sembler vide. Retourner le flacon pour bien mélanger la solution plasmidique et garantir que l'ADN est dissout et n'adhère pas au bouchon. Si possible, conserver l'ADN hydraté au réfrigérateur. (La solution de transformation est utilisée ici parce qu'il s'agit d'une solution stérile à disposition, sans nucléase. L'eau stérile fonctionnerait tout aussi bien.)




## Préparation préliminaire, étape 3 : Avant l'activité de transformation

**1. Aliquoter les solutions**

Pour chaque poste de travail des étudiants, aliquoter 1 ml de solution de transformation ($CaCl_2$) et 1 ml de bouillon nutritif LB dans des microtubes distincts de 2 ml à code couleur, fournis dans la trousse. Si le bouillon nutritif LB est aliquoté 1 jour avant l'activité, il convient de le réfrigérer. Marquer les tubes.

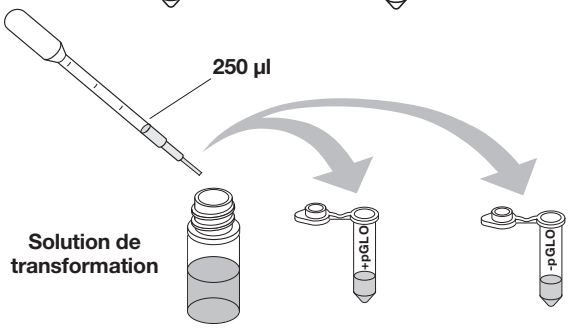
**2. Installer les postes de travail pour l'activité de transformation**

Voir page **11** pour le matériel de chaque poste de travail.

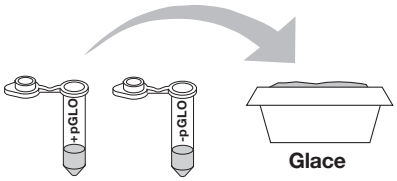
# Trousse de transformation — Guide rapide

1. Marquer un microtube à essai fermé avec la mention +pGLO et un autre avec la mention -pGLO. Marquer les deux tubes avec le nom du groupe. Les placer dans le portoir en mousse.

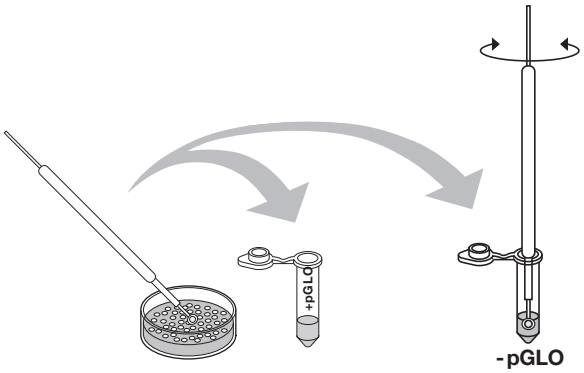
2. Ouvrir les tubes et, à l'aide d'une pipette de transfert stérile, transférer 250 µl de solution de transformation (CaCl2) dans chaque tube.



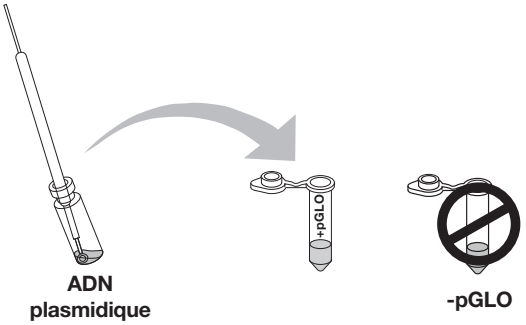

3. Placer les tubes dans la glace pilée. Ne pas utiliser de glaçons.



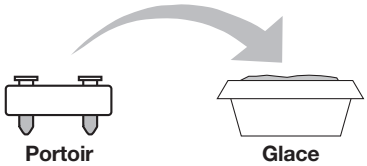

4. Utiliser une anse stérile pour prélever une colonie unique de bactéries à partir de la boîte d'amorce (starter). Prendre le tube +pGLO et plonger l'anse dans la solution de transformation au fond du tube. Faire tourner l'anse entre l'index et le pouce jusqu'à ce que la totalité de la colonie soit dispersée dans la solution de transformation (pas de fragments flottants). Replacer le tube dans le portoir, dans la glace. À l'aide d'une nouvelle anse stérile, répéter la procédure pour le tube -pGLO.




5. Examiner la solution d'ADN plasmidique pGLO avec la lampe UV. Noter les observations. Plonger une nouvelle anse stérile dans le tube de stockage d'ADN plasmidique. Retirer l'anse. L'anneau devrait présenter un film de solution plasmidique. Celui-ci est comparable au film savonneux qui se forme dans un anneau métallique permettant de créer des bulles de savon. Mélanger le contenu de l'anse dans la suspension cellulaire du tube +pGLO. De manière facultative, pipetter 10 µl de plasmide pGLO dans le tube +pGLO et mélanger. Fermer le tube -pGLO et le replacer dans le portoir, dans la glace. Ne pas ajouter d'ADN plasmidique au tube -pGLO. Pourquoi? Fermer le tube -pGLO et le replacer dans le portoir, dans la glace.

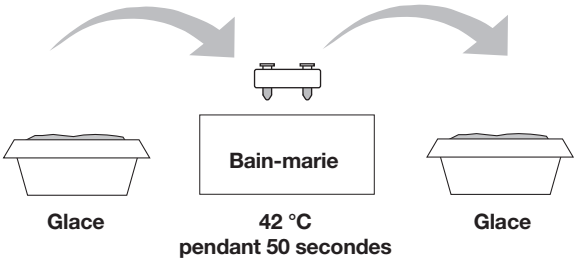



6. Incuber les tubes dans la glace pendant 10 minutes. Veiller à enfoncer les tubes dans le portoir de sorte que la partie inférieure ressorte et soit en contact avec la glace.

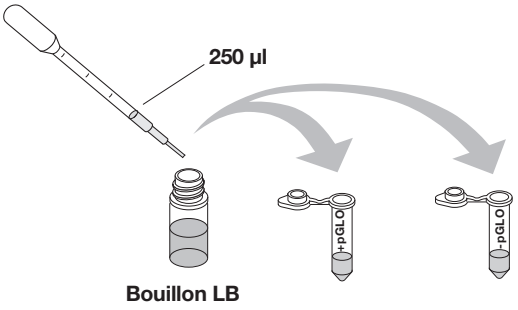


7. Tandis que les tubes reposent dans la glace, marquer les quatre boîtes de gélose sur la partie inférieure (non pas le couvercle), comme indiqué sur l'illustration.

8. Choc thermique. En utilisant le portoir en mousse comme support, transférer les tubes (+) pGLO et (-) pGLO dans le bain-marie, régler à 42 °C pendant **exactement** 50 secondes. Veiller à enfoncer les tubes dans le portoir de sorte que la partie inférieure ressorte et soit en contact avec l'eau chaude. Au bout de 50 secondes, replacer les deux tubes dans la glace. Pour obtenir des résultats optimaux en matière de transformation, le transfert glace (0 °C) – 42 °C – glace (0 °C) **doit être rapide**. Incuber les tubes dans la glace pendant 2 minutes.

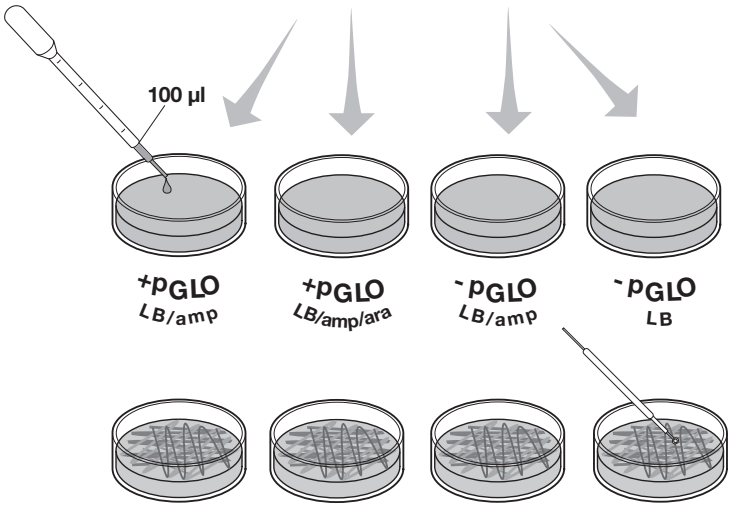



9. Retirer de la glace le portoir contenant les tubes et le placer sur le banc de laboratoire. Ouvrir un tube et à l'aide d'une nouvelle pipette stérile, ajouter 250 µl de bouillon nutritif LB et refermer le tube. Répéter la procédure pour l'autre tube à l'aide d'une **nouvelle pipette stérile**. Incuber les tubes pendant 10 minutes à température ambiante.

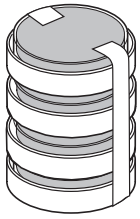



10. Tapoter doucement les tubes fermés pour mélanger. À l'aide d'une **nouvelle pipette stérile pour chaque tube**, pipetter 100 µl à partir de chaque tube vers les boîtes correspondantes, comme indiqué sur l'illustration.

11. Utiliser une **nouvelle anse stérile pour chaque boîte**. Étaler les suspensions uniformément sur la surface de la gélose en faisant des va-et-vient avec le côté plat d'une nouvelle anse stérile.




12. Empiler les boîtes et les solidariser avec du ruban adhésif. Indiquer le nom du groupe et la période de cours en bas de la pile; placer la pile de boîtes **à l'envers** dans l'incubateur à 37 °C jusqu'au jour suivant.



# Guide des réponses de l'enseignant

## Leçon 1 Questions de base

1. Pour transformer génétiquement un organisme entier, vous devez insérer le(s) nouveau(x) gène(s) dans chaque cellule de l'organisme. Quel organisme est le plus adapté à une transformation génétique totale : un organisme composé de nombreuses cellules ou un organisme composé d'une cellule unique?

   **Un organisme unicellulaire serait le meilleur choix pour une transformation génétique, car une seule cellule doit intégrer le nouveau gène.**

2. Souvent, les scientifiques souhaitent savoir si l'organisme génétiquement transformé peut transmettre ses nouveaux caractères à sa descendance et aux générations futures. Pour obtenir cette information, quel serait le meilleur candidat pour l'investigation : un organisme pour lequel chaque nouvelle génération se développe et se reproduit rapidement ou un organisme pour lequel chaque nouvelle génération se développe et se reproduit plus lentement?

   **Un organisme qui se reproduit rapidement. La production rapide d'une descendance permettra d'évaluer promptement si le nouveau caractère a été transmis.**

3. Lors de la sélection d'un organisme expérimental, la sécurité représente également une considération importante. Quels sont les traits ou caractères que doit (ou ne doit pas) posséder l'organisme pour garantir qu'il ne cause aucun préjudice (ni à l'être humain, ni à l'environnement)?

   **Il convient que l'organisme ne produise ni toxine ni composé susceptible de rendre malades les personnes. L'organisme devrait croître vigoureusement dans l'environnement de laboratoire mais ne devrait pas pouvoir survivre en dehors de celui-ci. L'organisme ne devrait pas contaminer les végétaux ni les animaux.**

4. En fonction des considérations précédentes, quel serait le meilleur choix pour une transformation génétique : une bactérie, un ver de terre, un poisson ou une souris? Décrivez votre raisonnement.

   **Une bactérie constituerait le meilleur organisme hôte. Les bactéries sont des organismes unicellulaires, de petite taille, qui se reproduisent rapidement et facilement.**

**Remarque : La souche bactérienne *Escherichia coli (E. coli)* HB101 K-12 correspond le mieux aux exigences précédentes . Elle est constituée d'une seule cellule, se reproduit toutes les 20 minutes, n'entraîne pas de maladie et ne peut survivre en dehors de l'environnement de laboratoire.**

## Leçon 1 Questions de base

Pour rappel, l'objectif de la transformation génétique est de modifier les caractères d'un organisme (phénotype). Avant de pouvoir détecter toute modification du phénotype d'un organisme, il est nécessaire de procéder à une analyse approfondie de son phénotype naturel (préalable à la transformation). Observez les colonies d'*E. coli* sur les boîtes d'amorce (starter). Répertoriez tous les traits ou caractères observables qu'il est possible de décrire.

**Couleur des colonies, nombre de colonies, répartition des colonies sur la boîte.**

Décrivez comment vous pouvez utiliser deux boîtes de gélose nutritive LB, des bactéries *E. coli* et de l'ampicilline pour déterminer de quelle façon les cellules des *E. coli* sont affectées par l'ampicilline.

**Des quantités égales de cellules pourraient être déposées sur deux boîtes différentes de gélose nutritive LB : une boîte contenant uniquement la gélose nutritive LB et une boîte contenant la gélose nutritive LB/ampicilline. La croissance des *E. coli* sur les deux boîtes pourrait être comparée. Si l'ampicilline a une incidence négative sur la croissance des *E. coli*, il devrait donc y avoir moins de colonies bactériennes sur la boîte correspondante. Si l'ampicilline n'a pas d'incidence, il devrait y avoir approximativement un nombre égal de colonies sur les deux boîtes.**

Résultats : Qu'attendez-vous que vos résultats expérimentaux indiquent quant à l'effet de l'ampicilline sur les cellules d'*E. coli*?

**De façon générale, les antibiotiques tuent les bactéries (ils sont bactéricides) ou inhibent leur croissance (ils sont bactériostatiques). Par conséquent, la boîte à ampicilline ne devrait présenter, le cas échéant, que peu de colonies bactériennes. La présence de colonies sur la boîte à ampicilline laisserait entendre que ces bactéries sont résistantes à l'antibiotique.**

## Leçon 2 Questions récapitulatives

1. Sur quelle boîte vous attendez-vous à trouver des bactéries quasiment identiques aux colonies d'*E. coli* originales et non transformées, observées initialement? Expliquez vos prédictions.

   **Les bactéries qui ressemblent aux colonies non transformées seront observables sur la boîte (-) pGLO LB. Ces bactéries ont été prélevées à partir de la boîte d'amorce (starter), n'intègrent pas de plasmide et ont été transférées sur une boîte LB. Elles sont donc pratiquement identiques aux colonies non transformées (amorce).**

2. S'il existe des cellules bactériennes génétiquement transformées, sur quelle(s) boîte(s) sont-elles le plus susceptible d'être situées? Expliquez vos prédictions.

   **Les cellules transformées sont présentes sur les boîtes LB/amp et LB/amp/ara. Les cellules génétiquement transformées ont intégré le plasmide pGLO, qui exprime le gène de résistance à l'ampicilline; ces cellules peuvent survivre sur les boîtes contenant de l'ampicilline.**

3. Quelles boîtes devrait-on comparer pour déterminer si une transformation génétique a eu lieu? Pourquoi?

   **Les boîtes (-) pGLO LB/amp et (+) pGLO LB/amp devraient faire l'objet d'une comparaison directe. Les cellules non traitées avec l'ADN (-pGLO) ne devraient pas exprimer le gène de résistance à l'ampicilline et ne se développeront pas sur les boîtes LB/amp. Les cellules traitées avec l'ADN (+pGLO) devraient contenir le plasmide pGLO et exprimer le gène de résistance à l'ampicilline; la boîte LB/amp correspondante contiendra des colonies bactériennes transformées.**

4. Qu'entend-on par « boîte de contrôle »? Quelle est la finalité d'un contrôle?

   **Une boîte de contrôle est une « référence » qui permet d'interpréter les résultats expérimentaux. Dans le cadre de cette expérience, les deux boîtes (-) pGLO sont des boîtes de contrôle. La boîte de contrôle LB/amp peut être comparée à la boîte LB/amp (+) pGLO. Cette comparaison montre que la transformation génétique produit des colonies bactériennes capables de croître sur un milieu doté d'ampicilline (en raison de l'intégration du plasmide pGLO et de l'expression du gène de résistance à l'ampicilline). La boîte de contrôle (-) pGLO LB peut être comparée à n'importe quelle boîte LB/amp pour démontrer que l'intégration du plasmide est nécessaire à une croissance en présence d'ampicilline. La boîte (-) pGLO LB/amp montre que la culture d'amorce (starter) ne croît pas sur la boîte LB/amp. Sans ce contrôle, il ne serait pas possible de savoir si les colonies de la boîte (+) pGLO LB/amp sont réellement des transformants.**

## Leçon 3 Collecte et analyse des données

1. Observez et dessinez ce que vous voyez sur chacune des quatre boîtes. Reportez vos dessins dans le tableau de données, colonne de droite. Le protocole peut aussi incorporer la documentation numérique des boîtes avec le système Vernier Blue Digital BioImaging System (annexe E). Consignez vos données pour pouvoir comparer les observations des cellules + pGLO et les observations des bactéries *E. coli* non transformées. Notez les observations pour chaque boîte.
2. Quelle est l'ampleur de la croissance bactérienne observée sur chaque boîte, relativement parlant?

   **Il devrait y avoir plusieurs colonies sur les boîtes LB/amp et LB/amp/ara ayant reçu le plasmide pGLO (environ 75 colonies). Aucune croissance ne devrait être observée sur la boîte (-) pGLO LB/amp. Il devrait y avoir un tapis de bactéries sur la boîte (-) pGLO LB.**
3. Quelle est la couleur des bactéries?

   **Les bactéries de la boîte (+) pGLO LB/amp et des boîtes (-) pGLO LB devraient être de couleur blanchâtre. Les bactéries de la boîte (+) pGLO LB/amp/ara devraient apparaître blanchâtres sous l'éclairage normal de la pièce et afficher une couleur vert fluorescent lors de l'exposition à la lumière UV de grande longueur d'onde.**
4. Dénombrez les colonies bactériennes sur chaque boîte (comptez les points).

   **Il devrait y avoir approximativement 75 colonies bactériennes sur les deux boîtes (+) pGLO. Le tapis de bactéries de la boîte LB est caractérisé par une répartition uniforme; il n'est pas possible de dénombrer des colonies individuelles.**

| Boîtes | Observations |
|---|---|
| **+pGLO, LB/amp** | **Nombreuses colonies bactériennes transformées (approximativement 75). Les colonies apparaissent de couleur blanche.** |
| **+pGLO, LB/amp/ara** | **Nombreuses colonies bactériennes transformées (approximativement 75). Les colonies apparaissent de couleur blanche sous l'éclairage normal de la pièce et affichent une couleur vert fluorescent lors de l'exposition à la lumière UV.** |
| **-pGLO, LB/amp** | **Aucune croissance bactérienne sur cette boîte.** |
| **-pGLO, LB** | **Cette boîte présente un tapis de bactéries. La couleur est blanc cassé.** |

## Leçon 3 Analyse des résultats

1. Quels caractères observés à l'origine pour *E. coli* ne semblent pas avoir été altérés? Dans l'espace ci-dessous, énumérez ces caractères non transformés et décrivez votre cheminement analytique pour chaque caractère.

| Caractère d'origine | Analyse des observations |
|---|---|
| **Couleur** | **Les bactéries présentent une couleur blanchâtre** |
| **Taille de colonie** | **La taille des colonies est similaire avant et après la transformation** |

2. Parmi les caractères d'*E. coli* observés à l'origine, lesquels semblent désormais significativement différents après la procédure de transformation? Énumérez ces caractères ci-dessous et décrivez les modifications observées.

| Nouveau caractère | Modification observée |
|---|---|
| **Couleur** | **Les colonies de la boîte LB/amp/ara présentent une couleur vert fluorescent lors de l'exposition à la lumière UV** |
| **Résistance à l'ampicilline** | **Les colonies transformées ont la capacité de croître sur un milieu doté d'ampicilline** |

3. Si les cellules génétiquement transformées ont acquis la capacité de vivre en présence d'ampicilline (antibiotique), que peut-on en déduire des autres gènes plasmidiques impliqués dans la procédure de transformation?

   **Le plasmide exprime un gène de résistance à l'ampicilline (le produit de protéine du gène *bla* code pour la bêta-lactamase, la protéine qui dégrade l'ampicilline).**

4. À partir des résultats obtenus, comment pourriez-vous prouver que les modifications qui ont eu lieu sont dues à la procédure que vous avez exécutée?

   **La meilleure preuve consiste à comparer les boîtes de contrôle et les boîtes expérimentales. Les cellules non traitées avec le plasmide (boîtes (-) pGLO LB/amp et (-) pGLO LB/amp/ara) n'ont pas pu croître sur le milieu à l'ampicilline, tandis que les cellules traitées avec le plasmide (boîtes (+) pGLO LB/amp et (+) pGLO LB/amp/ara) peuvent croître sur la boîte LB/amp. Il apparaît donc que le plasmide confère une résistance à l'ampicilline.**

## Leçon 3 Questions récapitulatives

**Qu'est-ce qui brille?**

1. Souvenez-vous de ce que vous avez observé au moment de projeter la lumière UV sur un échantillon d'ADN plasmidique pGLO original. Décrivez vos observations.

   **L'échantillon de plasmide n'émet pas de de fluorescence.**

2. Laquelle, parmi les deux sources possibles de fluorescence, peut désormais être éliminée?

   **L'ADN plasmidique pGLO et les bactéries d'origine peuvent être éliminés en tant que sources possibles de fluorescence.**

3. Qu'indique cette observation à propos de la source de fluorescence?

   **La fluorescence est probablement issue d'une protéine encodée par le plasmide.**

4. Décrivez l'élément qui prouve que votre expérience de transformation génétique a réussi ou non.

   **Une expérience réussie présente les caractéristiques suivantes : présence de colonies sur les boîtes (+) pGLO LB/amp et (+) pGLO LB/amp/ara et absence de colonies sur la boîte (-) pGLO LB/amp. En outre, les colonies de la boîte LB/amp/ara doivent émettre une fluorescence verte.**

   **Une expérience infructueuse présente les caractéristiques suivantes : absence de colonies sur les boîtes (+) pGLO LB/amp et (+) pGLO LB/amp/ara. Raison éventuelle : ne pas avoir ajouté l'équivalent d'une anse de plasmide ou une colonie de bactéries au tube (+) pGLO.**

## Leçon 3 Questions récapitulatives

**Interaction entre les gènes et l'environnement**

Observez de nouveau les quatre boîtes. Observez-vous une croissance d'*E. coli* sur les boîtes LB qui ne contiennent pas d'ampicilline/d'arabinose?

**Oui. Les bactéries n'ayant pas reçu le plasmide se développent sur une boîte LB pure.**

1. À partir de vos résultats, pouvez-vous dire si ces bactéries, observées sur la boîte LB, résistent à l'ampicilline? Expliquez votre réponse.

   **Non. Il n'est pas possible de dire que les bactéries sont résistantes à l'ampicilline simplement en les observant. Les deux types de bactéries (bactérie résistante à l'ampicilline/bactérie sensible à l'ampicilline) ont une apparence similaire en culture. Pensez aux colonies de la boîte d'amorce (starter) LB et aux colonies de la boîte (+) pGLO LB/amp.**

2. De quelle façon modifieriez-vous l'environnement des bactéries pour pouvoir affirmer qu'elles résistent à l'ampicilline?

   **Le meilleur test consisterait à prélever des bactéries en croissance sur la boîte LB et à les déposer par striation sur une boîte LB/amp. Si les bactéries sont viables sur la boîte LB/amp, elles sont alors résistantes à l'ampicilline. Le fait qu'aucune colonie ne survive indique que les bactéries n'étaient pas résistantes à l'ampicilline (mais sensibles à l'ampicilline).**

3. Très souvent, les caractères d'un organisme sont le résultat d'une combinaison de ses gènes et de son environnement. Pensez à la couleur verte que vous avez observée sur les bactéries génétiquement transformées :

   a. Quels sont les deux facteurs qui doivent être présents dans l'environnement des bactéries pour que vous puissiez observer la couleur verte? (Indice : un facteur se trouve dans la boîte et l'autre facteur se situe dans la façon dont vous observez les bactéries).

      **Le sucre arabinose de la boîte agarose est nécessaire pour activer l'expression du gène GFP. La lumière UV est nécessaire à la fluorescence de la protéine GFP au sein des bactéries.**

   b. Selon vous, quelle est l'action de chacun des deux facteurs environnementaux énumérés précédemment pour que les bactéries génétiquement transformées deviennent vertes?

      **Le sucre arabinose active l'expression du gène GFP via la liaison à une protéine régulatrice, *araC*, qui se fixe sur le promoteur $P_{BAD}$. Lorsque l'arabinose est présent, il se lie à la protéine *araC*, avec pour conséquence un changement conformationnel d'*araC* qui facilite la transcription du gène par l'ARN polymérase (voir la description détaillée à l'annexe D). Lors d'une exposition à la lumière UV, les électrons du chromophore de la GFP sont excités à un état plus élevé d'énergie. Lorsqu'ils tombent à un niveau plus bas d'énergie, ils émettent une plus grande longueur d'onde de lumière verte fluorescente visible, à 509 nm.**

   c. Quel serait l'avantage, pour un organisme, de pouvoir activer ou désactiver des gènes spécifiques en réponse à certaines conditions?

      **La régulation des gènes permet l'adaptation à différentes conditions et évite une surproduction de protéines inutiles. Les enzymes impliquées dans la dégradation de sources nutritives glucidiques sont de bons exemples de gènes hautement régulés. Si le sucre arabinose est présent dans le milieu nutritif, il est avantageux pour les bactéries de produire les enzymes nécessaires au catabolisme de la source de sucre. Inversement, si l'arabinose est absent du milieu, il serait énergétiquement inefficace de produire les enzymes de dégradation du sucre.**

## Leçon 4 Activité supplémentaire

1. **Détermination du nombre total de cellules vertes fluorescentes.**

   Placez la boîte LB/amp/ara à proximité d'une source de lumière UV. Il est possible d'admettre que chaque colonie de la boîte est issue d'une cellule unique. Au fur et à mesure de la reproduction des cellules individuelles, de plus en plus de cellules se forment et se développent en ce que l'on appelle une « colonie ». La manière la plus directe de déterminer le **nombre total de cellules vertes fluorescentes** consiste à dénombrer les colonies sur la boîte.

   Inscrivez ce nombre ici ➔

   Nombre total de cellules = **190**

2. **Détermination de la quantité d'ADN plasmidique pGLO dans les cellules bactériennes, diffusée sur la boîte LB/amp/ara.**

   Nous avons besoin de deux informations pour déterminer la quantité d'ADN (pGLO) dans les cellules bactériennes, diffusée sur la boîte LB/amp/ara au cours de cette expérience. (i) Quelle était la quantité totale d'ADN au début de l'expérience, et (ii) Quelle fraction d'ADN (dans les bactéries) a été effectivement diffusée sur les boîtes LB/amp/ara.

   Une fois que vous avez obtenu ces données, vous devez multiplier la **quantité totale d'ADN plasmidique pGLO utilisée** au cours de cette expérience par la fraction d'ADN que vous avez diffusée sur la boîte LB/amp/ara. Cette opération indiquera la quantité d'ADN plasmidique pGLO dans les cellules bactériennes, diffusée sur la boîte LB/amp/ara.

   **a. Détermination de la quantité totale d'ADN**

   La quantité totale d'ADN plasmidique pGLO au début de l'expérience est égale au produit de la concentration par le volume total utilisé, soit

   ADN (µg) = (concentration d'ADN en µg/µl) x (volume d'ADN en µl)

   Au cours de cette expérience, vous avez utilisé 10 µl de pGLO à une concentration de 0,08 µg/µl. Autrement dit, chaque microlitre de solution contenait 0,08 µg d'ADN pGLO. Calculez la **quantité totale d'ADN utilisée au cours de cette expérience**.

   Inscrivez ce nombre ici ➔

   Quantité totale d'ADN (µg) utilisée au cours de cette expérience = **0,8**

   Comment utiliserez-vous cette information?

   **Ce nombre sera multiplié par la fraction d'ADN utilisée, de façon à déterminer la quantité totale d'ADN diffusée sur la boîte gélosée.**

b. **Détermination de la fraction d'ADN plasmidique pGLO (dans les bactéries) effectivement diffusée sur la boîte LB/amp/ara.** Étant donné qu'une partie seulement de l'ADN plasmidique pGLO ajouté aux cellules bactériennes sera diffusée sur la boîte gélosée, vous devez déterminer quelle est la fraction d'ADN effectivement diffusée sur la boîte LB/amp/ara. Pour cela, divisez le volume d'ADN diffusé sur la boîte LB/amp/ara par le volume total de liquide du tube à essai contenant l'ADN. Formule de l'énoncé :

$$\text{Fraction d'ADN utilisée} = \frac{\text{Volume diffusé sur la boîte LB/amp/ara}}{\text{Volume total du tube à essai}}$$

Vous avez étalé 100 µl de cellules contenant de l'ADN pGLO à partir d'un tube à essai contenant un volume total de 510 µl de solution. Vous souvenez-vous pourquoi ce volume total de 510 µl de solution? Passez en revue la procédure de l'activité et localisez toutes les étapes au cours desquelles vous avez ajouté du liquide au tube de réaction. Additionnez les volumes.

Utilisez la formule précédente pour calculer la **fraction d'ADN** diffusée sur la boîte LB/amp/ara.

Inscrivez ce nombre ici ➔ Fraction d'ADN = **0,2**

- Comment utiliserez-vous cette information?

  **Ce nombre sera multiplié par la quantité d'ADN utilisée, de façon à déterminer la quantité d'ADN diffusée sur la boîte gélosée.**

Par conséquent, combien de microgrammes d'ADN avez-vous diffusés sur les boîtes LB/amp/ara?

Pour répondre à cette question, vous devez multiplier la **quantité totale d'ADN** utilisée au cours de cette expérience par la **fraction d'ADN** que vous avez diffusée sur la boîte LB/amp/ara.

ADN pGLO diffusé (µg) = Quantité totale d'ADN utilisée (µg) x fraction d'ADN

Inscrivez ce nombre ici ➔ ADN pGLO diffusé (µg) = **0,16**

- Que vous indique ce nombre?

  **Ce nombre indique la quantité d'ADN diffusée sur la boîte gélosée.**

Examinez tous les calculs précédents. Choisissez les nombres à entrer dans le tableau ci-dessous. Renseignez le tableau suivant :

| | |
|---|---|
| Nombre de colonies sur la boîte LB/amp/ara | 190 |
| Microgrammes d'ADN pGLO diffusés sur les boîtes | 0,16 µg |

Utilisez ensuite les données du tableau pour calculer l'efficacité de transformation pGLO.

$$\text{Efficacité de transformation} = \frac{\text{Nombre total de cellules en croissance sur la boîte gélosée}}{\text{Quantité d'ADN diffusée sur la boîte gélosée}}$$

Inscrivez ce nombre ici ➔

**1 187 transformants/µg**
Efficacité
de transformation

## Analyse

Les calculs relatifs à l'efficacité de transformation produisent de très grands nombres. Les scientifiques utilisent souvent un raccourci mathématique appelé « notation scientifique ». Par exemple, si l'efficacité de transformation calculée est égale à 1 000 bactéries/µg d'ADN, ils rapportent ce nombre sous la forme :

**$10^3$ transformants/µg ($10^3$ est une autre façon de représenter 10 x 10 x 10 ou 1 000)**

- Quelle est la notation scientifique de 10 000 transformants/µg?

  **$10^4$**

  Pour aller plus loin, supposons que les scientifiques ont calculé une efficacité de **5 000 bactéries/µg d'ADN.** La notation serait :

  5,0 x $10^3$ transformants/µg (5 x 1 000)

- Quelle serait la notation scientifique de 40 000 transformants/µg?

  **4,0 x $10^4$**

Un dernier exemple : Pour un calcul de 2 600 transformants/µg, la notation scientifique serait :

$2{,}6 \times 10^3$ transformants/µg (2,6 x 1 000)

De la même manière :

5 600 = $5{,}6 \times 10^3$ 271 000 = $2{,}71 \times 10^5$ 2 420 000 = $2{,}42 \times 10^6$

- Quelle serait la notation scientifique de 960 000 transformants/µg?
  **$9{,}6 \times 10^5$**

- Rapportez votre calcul de l'efficacité de transformation en notation scientifique.

  $1{,}2 \times 10^3$ transformants/µg

- En une ou deux phrases, expliquez ce que signifie votre calcul de l'efficacité de transformation :
  **L'efficacité de transformation est une valeur quantitative qui décrit l'efficacité d'incorporation d'un plasmide dans les bactéries. Il s'agit du nombre de colonies transformées, produites par microgramme d'ADN ajouté.**

  Les biotechnologistes s'accordent pour dire que le protocole de transformation que vous venez de terminer aboutit généralement à une efficacité de transformation comprise entre $8{,}0 \times 10^2$ et $7{,}0 \times 10^3$ transformants par microgramme d'ADN.
- Comment se positionne votre calcul d'efficacité de transformation par rapport à la donnée précédente?
  **L'efficacité calculée ($1{,}2 \times 10^3$) se situe dans les limites d'efficacité prévues pour ce protocole.**
- Dans le tableau ci-dessous, rapportez l'efficacité de transformation calculée par différentes équipes dans la classe.

| Équipe | Efficacité |
|---|---|
| **Réponses variables** | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

- Comment se positionne votre calcul d'efficacité de transformation par rapport à leur calcul?
  **Réponses variables**

- Calculez l'efficacité de transformation de l'expérience suivante grâce aux informations et résultats ci-dessous.

  **Concentration ADN plasmidique : 0,08 µg/µl**

  **Solution de transformation $CaCl_2$ : 250 µl**

  **Solution plasmide : 10 µl**

  **Bouillon nutritif LB : 250 µl**

  **Cellules étalées sur la gélose : 100 µl**

  **227 colonies de transformants (dénombrement)**

  Remplissez le tableau suivant et montrez vos calculs à l'enseignant.

| | |
|---|---|
| Nombre de colonies sur la boîte LB/amp/ara | 227 |
| Microgrammes d'ADN diffusés sur les boîtes | 0,16 |
| Efficacité de transformation | $1,4 \times 10^3$ |

- Défi bonus

  En admettant qu'une expérience spécifique présente une efficacité de transformation de $3 \times 10^3$ bactéries/µg d'ADN, combien de colonies de transformants sont supposées être en croissance sur la boîte LB/amp/ara? Vous pouvez supposer que la concentration d'ADN et la fraction de cellules étalées sur la gélose LB sont identiques à celles de l'activité pGLO.

**Efficacité de transformation = nbre de colonies/ADN diffusé sur la boîte (µg)**

**$3,0 \times 10^3 = X/0,16$**

**$(3,0 \times 10^3)(0,16) = X$**

**$480 = X$**

**480 colonies de transformants**

# Guide de l'étudiant

# Transformation pGLO

## Leçon 1 Introduction à la transformation

Au cours de cette expérience, vous exécuterez une procédure connue sous le nom de « transformation génétique ». Pour rappel, un gène est un fragment d'ADN qui fournit des instructions pour fabriquer une protéine (qui code pour une protéine). Cette protéine fournit à un organisme un caractère particulier. La transformation génétique signifie littéralement un changement engendré par des gènes; elle implique l'insertion d'un gène dans un organisme de façon à modifier le caractère de ce dernier. Elle est utilisée dans de nombreux domaines de la biotechnologie. En agriculture, les gènes qui codent pour les caractères tels que la résistance au gel, aux parasites ou à la détérioration peuvent faire l'objet d'une transformation dans les végétaux. En bioréhabilitation, il est possible de transformer génétiquement des bactéries afin de leur permettre de digérer des déversements d'hydrocarbures. En médecine, des maladies causées par des gènes défectueux commencent à être traitées par thérapie génique; en d'autres termes, les cellules d'une personne malade sont transformées génétiquement avec une copie saine du gène impliqué.

Vous utiliserez une procédure pour transformer des bactéries avec un gène qui code pour la GFP (protéine à fluorescence verte). La source de ce gène est la méduse bioluminescente *Aequorea victoria*. La protéine GFP rend la méduse fluorescente et la fait briller dans l'obscurité. À la suite de la procédure de transformation, les bactéries expriment le gène de méduse nouvellement acquis et produisent la protéine fluorescente qui les fait briller d'un vert lumineux sous la lumière UV.

Au cours de cette activité, vous apprendrez à transférer des gènes d'un organisme à un autre, à l'aide d'un plasmide. En plus d'un grand chromosome, les bactéries contiennent naturellement un ou plusieurs petits fragments circulaires d'ADN appelés « plasmides ». L'ADN plasmidique contient généralement des gènes codant pour un ou plusieurs caractères qui peuvent être bénéfiques pour la survie des bactéries. Dans la nature, les bactéries peuvent transférer et recevoir des plasmides, ce qui leur permet d'échanger ces gènes bénéfiques. Ce mécanisme naturel permet aux bactéries de s'adapter à de nouveaux environnements. La survenue récente de cas de résistance bactérienne aux antibiotiques est due à la transmission de plasmides.

Le plasmide pGLO unique de Bio-Rad contient le gène codant pour la protéine GFP et un gène conférant la résistance à un antibiotique, l'ampicilline. pGLO comprend également un système spécial de régulation du gène, qui peut être utilisé pour contrôler l'expression de la protéine fluorescente dans les cellules transformées. Le gène codant pour la protéine GFP peut être activé dans les cellules transformées grâce à l'ajout du sucre arabinose au milieu nutritif des cellules. La sélection des cellules qui ont été transformées avec l'ADN pGLO est effectuée par culture sur des milieux contenant l'ampicilline. Les cellules transformées vont apparaître blanches (phénotype de type sauvage ou naturel) sur les milieux ne contenant pas d'arabinose, et vertes fluorescentes sous lumière UV quand l'arabinose est inclus dans la gélose nutritive.

Vous recevrez des outils et un protocole permettant de réaliser une transformation génétique.

Votre tâche consistera à :

1. Réaliser la transformation génétique.
2. Déterminer le degré de réussite de votre expérience de transformation génétique.

## Leçon 1 Questions de base

Lors de la planification d'une investigation scientifique, de nombreux éléments sont à prendre en compte. Vous trouverez ci-dessous matière à réflexion, dans le cadre de l'expérience de transformation génétique.

Étant donné que les investigations scientifiques sont conçues pour obtenir des informations sur une question, la première étape pourrait être de formuler une question.

**Considération 1 : Puis-je transformer génétiquement un organisme? Quel organisme?**

1. Pour transformer génétiquement un organisme entier, vous devez insérer le nouveau gène dans chaque cellule de l'organisme. Quel organisme est le plus adapté à une transformation génétique totale : un organisme composé de nombreuses cellules ou un organisme composé d'une cellule unique?

2. Souvent, les scientifiques souhaitent savoir si l'organisme génétiquement transformé peut transmettre ses nouveaux caractères à sa descendance et aux générations futures. Pour obtenir cette information, quel serait le meilleur candidat pour l'investigation : un organisme pour lequel chaque nouvelle génération se développe et se reproduit rapidement ou un organisme pour lequel chaque nouvelle génération se développe et se reproduit plus lentement?

3. Lors de la sélection d'un organisme expérimental, la sécurité représente également une considération importante. Quels sont les traits ou caractères que doit (ou ne doit pas) posséder l'organisme pour garantir qu'il ne cause aucun préjudice (ni à l'être humain, ni à l'environnement)?

4. En fonction des considérations précédentes, quel serait le meilleur choix pour une transformation génétique : une bactérie, un ver de terre, un poisson ou une souris? Décrivez votre raisonnement.

**Considération 2 : Comment savoir si des cellules ont été génétiquement transformées?**

Pour rappel, l'objectif de la transformation génétique est de modifier les caractères d'un organisme, également connus sous le nom de « phénotype ». Avant de pouvoir détecter toute modification du phénotype d'un organisme, il est nécessaire de procéder à une analyse approfondie de son phénotype naturel (préalable à la transformation). Observez les colonies d'*E. coli* sur les boîtes d'amorce (starter). Répertoriez tous les traits ou caractères observables qu'il est possible de décrire :

Les observations suivantes, préalables à la transformation des *E. coli*, peuvent servir de données de référence lorsqu'il s'agit de déterminer si une transformation génétique a eu lieu.

a) Nombre de colonies

b) Taille de : 1) la plus grande colonie
2) la plus petite colonie
3) la majorité des colonies

c) Couleur des colonies

d) Répartition des colonies sur la boîte

e) Apparence visible avec une lumière ultraviolette (UV)

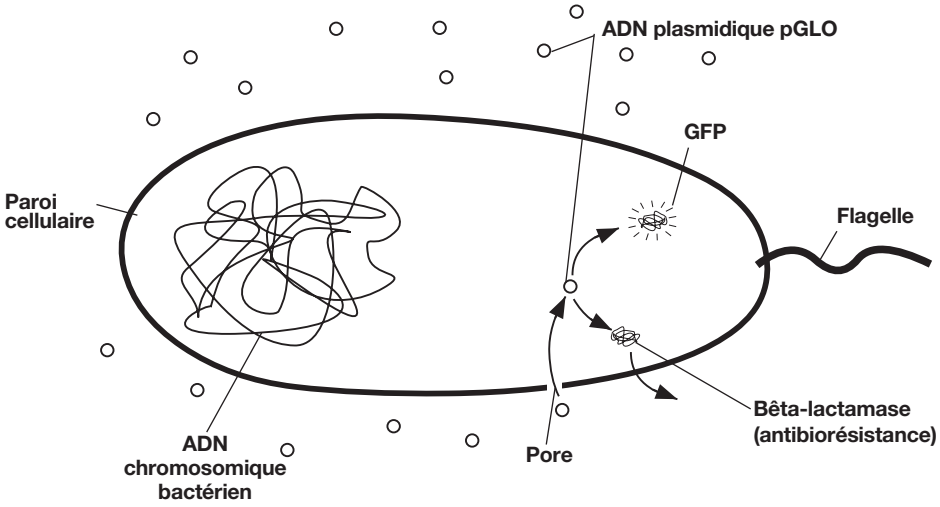
f) Capacité des cellules de vivre et de se reproduire en présence d'un antibiotique tel que l'ampicilline

1. Décrivez comment vous pouvez utiliser deux boîtes LB/gélose, des bactéries *E. coli* et de l'ampicilline pour déterminer de quelle façon les cellules des *E. coli* sont affectées par l'ampicilline.

2. Qu'attendez-vous que vos résultats expérimentaux indiquent quant à l'effet de l'ampicilline sur les cellules d'*E. coli*?

**Considération 3 : Les gènes**

La transformation génétique implique l'insertion d'un nouvel ADN dans les cellules d'*E. coli*. En plus d'un grand chromosome, les bactéries contiennent souvent un ou plusieurs petits fragments circulaires d'ADN appelés « plasmides ». L'ADN plasmidique contient généralement des gènes pour plusieurs caractères. Les scientifiques utilisent un processus appelé « génie génétique » pour insérer, dans un plasmide, des gènes codant pour de nouveaux caractères. Dans le cas présent, le plasmide pGLO a été génétiquement modifié pour porter le gène codant pour la protéine à fluorescence verte (GFP), ainsi qu'un gène (*bla*) codant pour une protéine qui confère aux bactéries une résistance à un antibiotique. Le plasmide génétiquement modifié peut alors être utilisé pour transformer génétiquement des bactéries afin de leur donner ce nouveau caractère.




**Considération 4 : La transformation**

Cette procédure de transformation implique trois étapes principales. Ces étapes consistent à introduire l'ADN plasmidique dans les cellules d'*E. coli* et à fournir à ces dernières un environnement pour exprimer leurs gènes nouvellement acquis.

**Pour que l'ADN plasmidique pGLO traverse la membrane cellulaire, vous :**

1. utiliserez une solution de transformation contenant du $CaCl_2$ (chlorure de calcium).
2. exécuterez une procédure appelée **choc thermique.**

**Pour permettre la croissance des cellules transformées en présence d'ampicilline, vous devez :**

3. leur apporter des substances nutritives et prévoir une petite période d'incubation pour qu'elles commencent à exprimer leurs gènes nouvellement acquis.

## Leçon 2 Activité de transformation

**Liste de contrôle (✔) des postes de travail**

**Votre poste de travail :** la liste indique le matériel et les fournitures qui doivent être présents sur votre poste de travail avant le début de l'activité.

**Postes de travail des étudiants**

| Matériel | Quantité | (✔) |
|---|---|---|
| Boîte d'amorce (starter) *E. coli* | 1 | ❑ |
| Boîtes de gélose coulée (1 LB, 2 LB/amp, 1 LB/amp/ara) | 4 | ❑ |
| Solution de transformation | 1 | ❑ |
| Bouillon nutritif LB | 1 | ❑ |
| Anses d'inoculation | 7 (1 paquet de 10) | ❑ |
| Pipettes | 5 | ❑ |
| Portoir en mousse pour microtubes | 1 | ❑ |
| Récipient (par exemple, récipient en polystyrène) rempli de glace pilée (pas de glaçons) | 1 | ❑ |
| Marqueur | 1 | ❑ |
| Exemplaire du guide rapide | 1 | ❑ |
| Microtubes à centrifugation | 2 | ❑ |

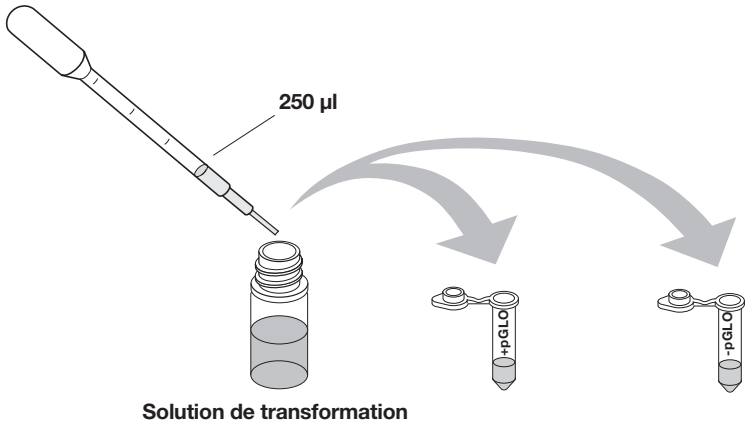
**Poste de travail commun.** La liste indique le matériel, les fournitures et l'équipement qui doivent être présents à un endroit commun, accessible à l'équipe.

| Matériel | Quantité | (✔) |
|---|---|---|
| Plasmide pGLO réhydraté | 1 flacon | ❑ |
| Bain-marie à 42 °C et thermomètre | 1 | ❑ |
| Lampe UV | 1 | ❑ |
| Incubateur 37 °C | 1 | ❑ |
| (facultatif, voir Compétences générales de laboratoire – Incubation) | | |
| Micropipettes à volume réglable 2 – 20 µl | 1 | ❑ |
| Pointes de micropipette 2 – 20 µl | 1 | ❑ |

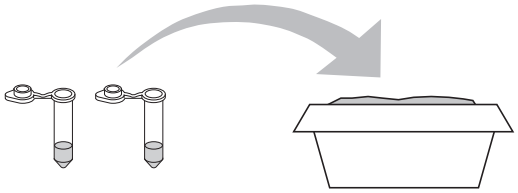
**Procédure de transformation**

1. Marquer un microtube à essai fermé avec la mention **+pGLO** et un autre avec la mention **-pGLO**. Marquer les deux tubes avec le nom du groupe. Les placer dans le portoir en mousse.

2. Ouvrir les tubes et, à l'aide d'une pipette de transfert stérile, transférer 250 µl de solution de transformation ($CaCl_2$) dans chaque tube.

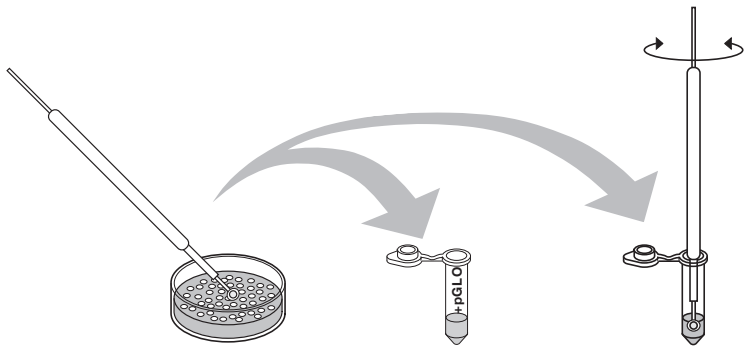


3. Placer les tubes dans la glace.



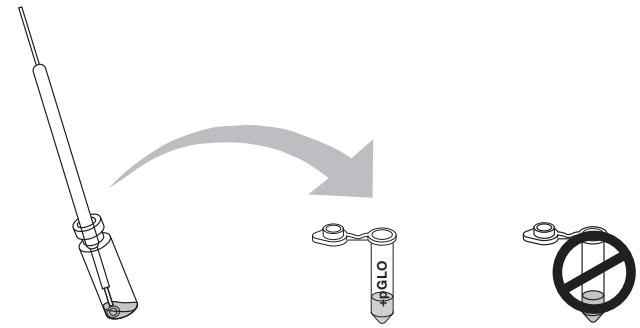
**Glace**

4. Utiliser une anse stérile pour prélever **2 – 4 grandes colonies de bactéries** à partir de la boîte d'amorce (starter). Sélectionner des colonies volumineuses (c'est-à-dire d'un diamètre de 1 – 2 mm). Il est important de sélectionner des colonies individuelles (plutôt qu'un prélèvement de bactéries à partir de la portion dense de la boîte); en effet, l'obtention d'une efficacité de transformation élevée implique que les bactéries soient en phase de croissance active. Choisir uniquement des colonies bactériennes uniformément circulaires, avec des bords lisses. Prendre le tube **+pGLO** et plonger l'anse dans la solution de transformation au fond du tube. Faire tourner l'anse entre l'index et le pouce jusqu'à ce que la totalité de la colonie soit dispersée dans la solution de transformation (pas de fragments flottants). Replacer le tube dans le portoir, dans la glace. À l'aide d'une nouvelle anse stérile, répéter la procédure pour le tube **-pGLO**.



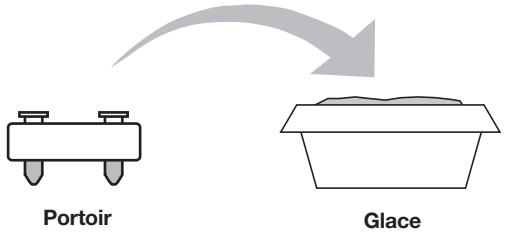

**(+pGLO)** **(-pGLO)**

5. Examiner la solution d'ADN pGLO à la lampe UV. Noter les observations. Plonger une **nouvelle anse stérile** dans le tube de stockage d'ADN plasmidique pGLO. Retirer l'anse. L'anneau devrait présenter un film de solution plasmidique. Celui-ci est comparable au film savonneux qui se forme dans un anneau métallique permettant de créer des bulles de savon. Mélanger l'anse dans la suspension cellulaire du tube **+pGLO**. De manière facultative, pipeter 10 µl de plasmide pGLO dans le tube +pGLO et mélanger. **Ne pas** ajouter d'ADN plasmidique au tube **-pGLO**. Fermer les deux tubes **+pGLO** et **-pGLO**, et les replacer dans le portoir, dans la glace.



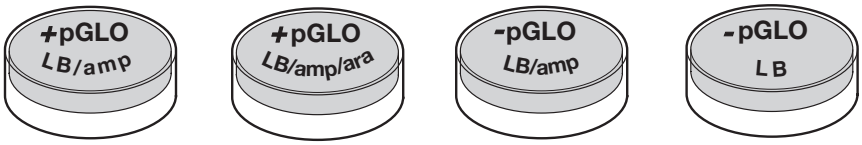

**ADN plasmidique pGLO** **(+pGLO)** **(-pGLO)**

6. Incuber les tubes dans la glace pendant 10 minutes. Veiller à enfoncer les tubes dans le portoir de sorte que la partie inférieure ressorte et soit en contact avec la glace.



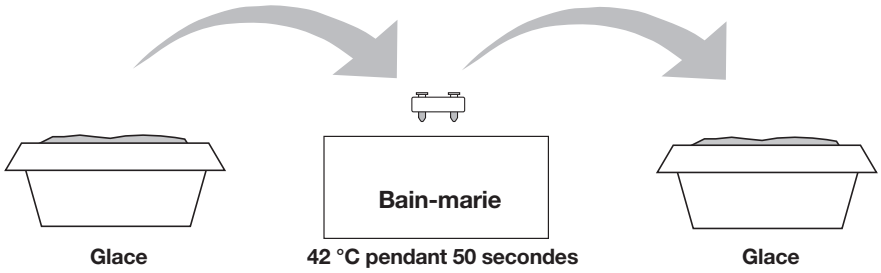

7. Tandis que les tubes reposent dans la glace, marquer les quatre boîtes de gélose nutritive LB sur le dessous (non pas le couvercle) de la manière suivante :

- Marquer une boîte **LB/amp** avec la mention : **+pGLO**
- Marquer la boîte **LB/amp/ara** avec la mention : **+pGLO**
- Marquer l'autre boîte **LB/amp** avec la mention : **-pGLO**
- Marquer la boîte **LB** avec la mention : **-pGLO**

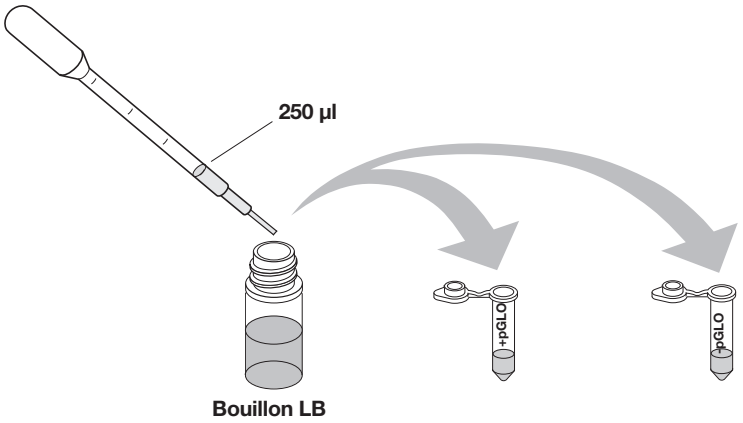



8. **Choc thermique**. En utilisant le portoir en mousse comme support, transférer les tubes (+) pGLO et (-) pGLO dans le bain-marie, régler à 42 °C **pendant exactement 50 secondes**. Veiller à enfoncer les tubes dans le portoir de sorte que la partie inférieure ressorte et soit en contact avec l'eau chaude. Utiliser deux thermomètres pour vérifier la température du bain-marie et contrôler la précision.

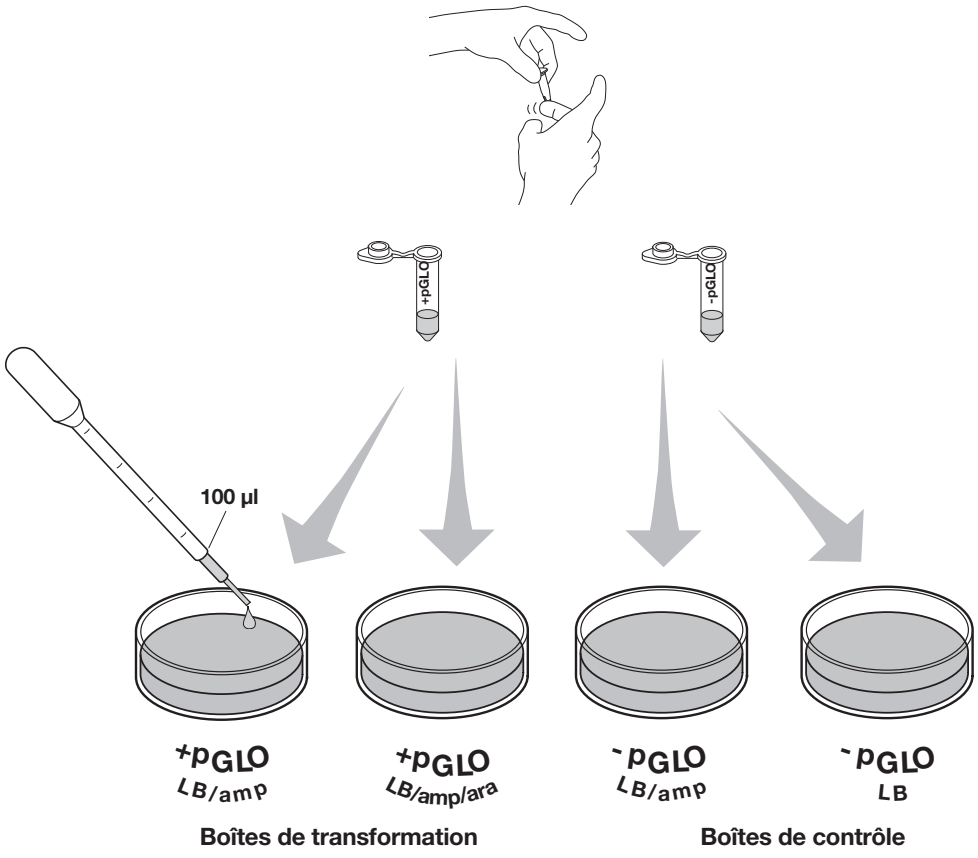
   Au bout de 50 secondes, replacer les deux tubes dans la glace. Pour obtenir des résultats optimaux en matière de transformation, le transfert glace (0 °C) – 42 °C – glace (0 °C) doit être rapide. Incuber les tubes dans la glace pendant 2 minutes.



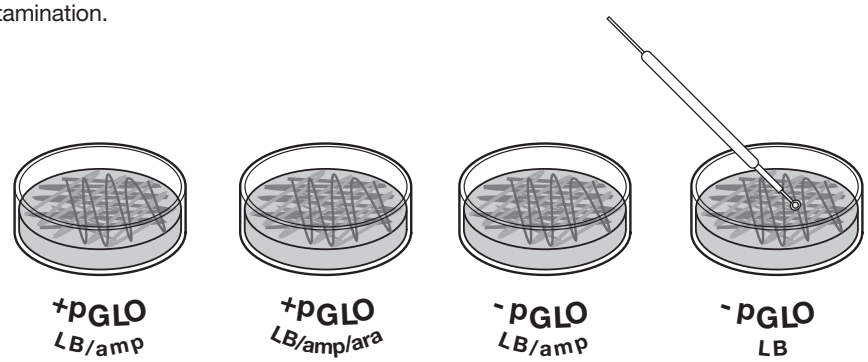
9. Retirer de la glace le portoir contenant les tubes et le placer sur le banc de laboratoire. Ouvrir un tube et à l'aide d'une nouvelle pipette stérile, ajouter 250 µl de bouillon nutritif LB et refermer le tube. Répéter la procédure pour l'autre tube à l'aide d'une nouvelle pipette stérile. Incuber les tubes pendant 10 minutes à température ambiante.



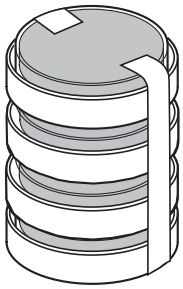

10. Tapoter doucement les tubes fermés pour mélanger et remettre les bactéries en suspension. À l'aide d'une nouvelle pipette stérile pour chaque tube, pipeter 100 µl de la suspension de transformation et de la suspension de contrôle sur les boîtes gélosées appropriées.



11. **Utiliser une nouvelle anse stérile pour chaque boîte.** Étaler les suspensions uniformément sur la surface de la gélose nutritive LB en faisant des va-et-vient avec le côté plat d'une nouvelle anse stérile. NE PAS APPUYER TROP PROFONDÉMENT SUR LA GÉLOSE. Ouvrir une boîte à la fois et recouvrir immédiatement après l'étalement de la suspension cellulaire. Cette action limitera la contamination.




12. Empiler les boîtes et les solidariser à l'aide de ruban adhésif. Indiquer le nom du groupe et la période de cours en bas de la pile; placer la pile de boîtes **à l'envers** dans l'incubateur à 37 °C jusqu'au jour suivant. L'inversion permet d'empêcher la condensation sur les couvercles, qui pourrait goutter sur la culture et fausser les résultats.



## Leçon 2 Questions récapitulatives Nom _____

Avant de collecter les données et d'analyser les résultats, répondez aux questions suivantes.

1. Sur quelle boîte vous attendez-vous à trouver des bactéries quasiment identiques aux colonies d'*E. coli* originales et non transformées, observées initialement? Expliquez vos prédictions.

2. S'il existe des cellules bactériennes génétiquement transformées, sur quelle(s) boîte(s) sont-elles le plus susceptible d'être situées? Expliquez vos prédictions.

3. Quelles boîtes devrait-on comparer pour déterminer si une transformation génétique a eu lieu? Pourquoi?

4. Qu'entend-on par « boîte de contrôle »? Quelle est la finalité d'un contrôle?

## Leçon 3 Collecte et analyse des données

### A. Collecte des données

Observez, sous l'éclairage normal de la pièce, les résultats obtenus à l'issue de l'activité de transformation. Éteignez ensuite les lumières et maintenez la lampe UV sur les boîtes. Le protocole peut aussi incorporer la documentation numérique des boîtes avec le système Vernier Blue Digital BioImaging System (annexe E).

1. Observez attentivement et dessinez ce que vous voyez sur chacune des quatre boîtes. Reportez vos dessins dans le tableau de données ci-dessous. Consignez vos données pour pouvoir comparer les observations des cellules **+pGLO** et les observations des bactéries *E. coli* non transformées. Notez les observations pour chaque boîte.

2. Quelle est l'ampleur de la croissance bactérienne observée sur chaque boîte, relativement parlant?

3. Quelle est la couleur des bactéries?

4. Quel est le nombre de colonies bactériennes sur chaque boîte (comptez les points que vous voyez)?

| | | Observations |
|---|---|---|
| Boîtes de transformation | +pGLO LB/amp | |
| | +pGLO LB/amp/ara | |
| | | **Observations** |
| Boîtes de contrôle | -pGLO LB/amp | |
| | -pGLO LB | |

**B. Analyse des résultats**

Dans le cadre de cette investigation, l'objectif de l'analyse des données est de déterminer si une transformation génétique a eu lieu.

1. Quels caractères observés à l'origine pour *E. coli* ne semblent pas avoir été altérés? Dans l'espace ci-dessous, énumérez ces caractères non transformés et décrivez votre cheminement analytique pour chaque caractère.

| **Caractère d'origine** | **Analyse des observations** |
|---|---|

2. Parmi les caractères d'*E. coli* observés à l'origine, lesquels semblent désormais significativement différents après la procédure de transformation? Énumérez ces caractères ci-dessous et décrivez les modifications observées.

| **Nouveau caractère** | **Modification observée** |
|---|---|

3. Si les cellules génétiquement transformées ont acquis la capacité de vivre en présence d'ampicilline (antibiotique), que peut-on en déduire des autres gènes plasmidiques impliqués dans la procédure de transformation?

4. À partir des résultats obtenus, comment pourriez-vous prouver que les modifications qui ont eu lieu sont dues à la procédure que vous avez exécutée?

## Leçon 3 Questions récapitulatives Nom _____

**Qu'est-ce qui brille?**

Si une couleur verte fluorescente est observée dans les colonies d'*E. coli*, une nouvelle question pourrait alors être soulevée : « Quelles sont les deux sources possibles de fluorescence, au sein des colonies, lors d'une exposition à la lumière UV? »

Expliquez :

1. Souvenez-vous de ce que vous avez observé au moment de projeter la lumière UV sur un échantillon d'ADN plasmidique pGLO original. Décrivez vos observations.

2. Laquelle, parmi les deux sources possibles de fluorescence, peut désormais être éliminée?

3. Qu'indique cette observation à propos de la source de fluorescence?

4. Décrivez l'élément qui prouve que votre expérience de transformation génétique a réussi ou non.

## Leçon 3 Questions récapitulatives Nom _____

**Interaction entre les gènes et l'environnement**

Observez de nouveau les quatre boîtes. Observez-vous une croissance d'*E. coli* sur la boîte LB qui ne contient pas d'ampicilline ni d'arabinose?

1. À partir de vos résultats, pouvez-vous dire si ces bactéries, observées sur la boîte LB, résistent à l'ampicilline? Expliquez votre réponse.

2. De quelle façon modifieriez-vous l'environnement des bactéries — la boîte sur laquelle elles se développent — pour pouvoir affirmer qu'elles résistent à l'ampicilline?

3. Très souvent, les caractères d'un organisme sont le résultat d'une combinaison de ses gènes et de son environnement. Pensez à la couleur verte que vous avez observée sur les bactéries génétiquement transformées :

   a. Quels sont les deux facteurs qui doivent être présents dans l'environnement des bactéries pour que vous puissiez observer la couleur verte? (Indice : un facteur se trouve dans la boîte et l'autre facteur se situe dans la façon dont vous observez les bactéries).

   b. Selon vous, quelle est l'action de chacun des deux facteurs environnementaux énumérés précédemment pour que les bactéries génétiquement transformées deviennent vertes?

   c. Quel serait l'avantage, pour un organisme, de pouvoir activer ou désactiver des gènes spécifiques en réponse à certaines conditions?

## Leçon 4 Activité supplémentaire : Calcul de l'efficacité de transformation

Au cours de cette investigation, la tâche suivante consiste à déterminer l'ampleur de la transformation génétique des cellules d'*E. coli*. Cette mesure quantitative est appelée « efficacité de transformation ».

Dans de nombreuses expériences, il est important de transformer génétiquement un nombre aussi grand que possible de cellules. Par exemple, dans le contexte de certaines thérapies géniques, les cellules sont prélevées chez le patient, transformées en laboratoire, puis réinjectées chez le patient. Plus le nombre de cellules transformées (en vue de la production de la protéine nécessaire) est élevé, plus la probabilité de réussite de la thérapie sera grande. Le calcul de l'efficacité de transformation permet aux scientifiques de déterminer le bon déroulement de la transformation.

**Tâche**

Vous allez calculer l'efficacité de transformation; elle vous donne une indication sur l'efficacité de l'incorporation des molécules d'ADN aux cellules bactériennes. L'efficacité de transformation est un nombre. Elle représente le nombre total de cellules bactériennes qui expriment la protéine à fluorescence verte, divisé par la quantité d'ADN utilisée au cours de l'expérience (elle indique le nombre total de cellules bactériennes transformées par un microgramme d'ADN). L'efficacité de transformation est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Efficacité de transformation} = \frac{\text{Nombre total de colonies en croissance sur la boîte gélosée}}{\text{Quantité d'ADN diffusée sur la boîte gélosée (µg)}}$$

Par conséquent, avant de pouvoir calculer l'efficacité de transformation, vous avez besoin de deux informations :

**(1) Le nombre total de colonies vertes fluorescentes en croissance sur la boîte LB/amp/ara.**

**(2) La quantité totale d'ADN plasmidique pGLO dans les cellules bactériennes, diffusée sur la boîte LB/amp/ara.**

**1. Détermination du nombre total de cellules vertes fluorescentes**

Placez la boîte LB/amp/ara à proximité d'une lampe UV. Il est possible d'admettre que chaque colonie de la boîte est issue d'une cellule unique. Au fur et à mesure de la reproduction des cellules individuelles, de plus en plus de cellules se forment et se développent en ce que l'on appelle une « colonie ». La manière la plus directe de déterminer le **nombre total de bactéries transformées avec le plasmide pGLO** consiste à dénombrer les colonies sur la boîte.

Inscrivez ce nombre ici ➔

Nombre total de colonies =
_____

**2. Détermination de la quantité d'ADN pGLO dans les cellules bactériennes, diffusée sur la boîte LB/amp/ara**

Nous avons besoin de deux informations pour déterminer la quantité d'ADN pGLO dans les cellules bactériennes, diffusée sur la boîte LB/amp/ara au cours de cette expérience. (a) Quelle était la quantité totale d'ADN au début de l'expérience, et (b) Quelle fraction d'ADN (dans les bactéries) a été effectivement diffusée sur les boîtes LB/amp/ara.

Une fois que vous avez obtenu ces données, vous allez multiplier la **quantité totale d'ADN pGLO** utilisée au cours de cette expérience par la **fraction d'ADN** que vous avez diffusée sur la boîte LB/amp/ara. Cette opération indiquera la quantité d'ADN pGLO dans les cellules bactériennes, diffusée sur la boîte LB/amp/ara.

**a. Détermination de la quantité totale d'ADN plasmidique pGLO**

La quantité totale d'ADN au début de l'expérience est égale au produit de la concentration par le volume total utilisé, soit

(ADN en µg) = (concentration d'ADN en µg/µl) x (volume d'ADN en µl)

Au cours de cette expérience, vous avez utilisé 10 µl de pGLO à une concentration de 0,08 µg/µl. Autrement dit, chaque microlitre de solution contenait 0,08 µg d'ADN pGLO. Calculez la **quantité totale d'ADN** utilisée au cours de cette expérience.

Inscrivez ce nombre ici ➔

**Quantité totale d'ADN pGLO (µg)**
utilisée au cours de cette expérience =
_____

Comment utiliserez-vous cette information?

**b. Détermination de la fraction d'ADN plasmidique pGLO (dans les bactéries) effectivement diffusée sur la boîte LB/amp/ara.** Étant donné qu'une partie seulement de l'ADN ajouté aux cellules bactériennes sera diffusée sur la boîte gélosée, vous devez déterminer quelle est la fraction d'ADN effectivement diffusée sur la boîte LB/amp/ara. Pour cela, divisez le volume d'ADN diffusé sur la boîte LB/amp/ara par le volume total de liquide du tube à essai contenant l'ADN. Formule de l'énoncé :

$$\text{Fraction d'ADN utilisée} = \frac{\text{Volume diffusé sur la boîte LB/amp/ara (µl)}}{\text{Volume total d'échantillon du tube à essai (µl)}}$$

Vous avez étalé 100 µl de cellules contenant de l'ADN à partir d'un tube à essai contenant un volume total de 510 µl de solution. Vous souvenez-vous pourquoi ce volume total de 510 µl de solution? Passez en revue la procédure de l'activité et localisez toutes les étapes au cours desquelles vous avez ajouté du liquide au tube de réaction. Additionnez les volumes.

Utilisez la formule précédente pour calculer la **fraction d'ADN plasmidique pGLO** diffusée sur la boîte LB/amp/ara.

Inscrivez ce nombre ici ➔ | Fraction d'ADN = _____

- Comment utiliserez-vous cette information?

**Par conséquent, combien de microgrammes d'ADN pGLO avez-vous diffusés sur les boîtes LB/amp/ara?**

Pour répondre à cette question, vous devez multiplier la **quantité totale d'ADN pGLO** utilisée au cours de cette expérience par la **fraction d'ADN pGLO** que vous avez diffusée sur la boîte LB/amp/ara.

ADN pGLO diffusé (µg) = Quantité totale d'ADN utilisée (µg) x fraction d'ADN utilisée

Inscrivez ce nombre ici ➔ | ADN pGLO diffusé (µg) = _____

- Que nous indique ce nombre?

Examinez tous les calculs précédents. Choisissez les nombres à entrer dans le tableau ci-dessous. Renseignez le tableau suivant.

| | |
|---|---|
| Nombre de colonies sur la boîte LB/amp/ara = | |
| Microgrammes d'ADN pGLO diffusés sur les boîtes | |

Utilisez ensuite les données du tableau pour calculer l'efficacité de transformation pGLO.

$$\text{Efficacité de transformation} = \frac{\text{Nombre total de colonies en croissance sur la boîte gélosée}}{\text{Quantité d'ADN diffusée sur la boîte gélosée (µg)}}$$

Inscrivez ce nombre ici ➔

Efficacité de transformation =
_____ transformants/µg

**Analyse**

Les calculs relatifs à l'efficacité de transformation produisent de très grands nombres. Les scientifiques utilisent souvent un raccourci mathématique appelé « notation scientifique ». Par exemple, si l'efficacité de transformation calculée est égale à 1 000 bactéries/µg d'ADN, ils rapportent ce nombre sous la forme :

**$10^3$ transformants/µg** ($10^3$ est une autre façon de représenter 10 x 10 x 10 ou 1 000)

- Quelle est la notation scientifique de 10 000 transformants/µg?

Pour aller plus loin, supposons que les scientifiques ont calculé une efficacité de 5 000 bactéries/µg d'ADN. La notation serait :

**5 x $10^3$ transformants/µg** (5 x 1 000)

- Quelle serait la notation scientifique de 40 000 transformants/µg?

Un dernier exemple : Pour un calcul de 2 600 transformants/µg, la notation scientifique serait :

**2,6 x $10^3$ transformants/µg** (2,6 x 1 000)

De la même manière :

5 600 = 5,6 x $10^3$ 271 000 = 2,71 x $10^5$ 2 420 000 = 2,42 x $10^6$

- Quelle serait la notation scientifique de 960 000 transformants/µg?

- Rapportez votre calcul de l'efficacité de transformation en notation scientifique.

- En une ou deux phrases, expliquez ce que signifie votre calcul de l'efficacité de transformation.

Les biotechnologistes s'accordent pour dire que le protocole de transformation que vous venez de terminer aboutit généralement à une efficacité de transformation comprise entre 8,0 x $10^2$ et 7,0 x $10^3$ transformants par microgramme d'ADN.

- Comment se positionne votre calcul d'efficacité de transformation par rapport à la donnée précédente?

- Dans le tableau ci-dessous, rapportez l'efficacité de transformation calculée par différentes équipes dans la classe.

| **Équipe** | **Efficacité** |
|---|---|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

- Comment se positionne votre calcul d'efficacité de transformation par rapport à leur calcul?

- Calculez l'efficacité de transformation de l'expérience suivante grâce aux informations et résultats ci-dessous.

**Concentration ADN plasmidique : 0,08 µg/µl**

**Solution de transformation $CaCl_2$ : 250 µl**

**Solution plasmide pGLO : 10 µl**

**Bouillon LB : 250 µl**

**Cellules étalées sur la gélose : 100 µl**

**227 colonies de transformants**

Remplissez le tableau suivant et montrez vos calculs à l'enseignant :

| |
|---|
| **Nombre de colonies sur la boîte LB/amp/ara =** |
| **Microgrammes d'ADN diffusés sur les boîtes =** |
| **Efficacité de transformation =** |

- Défi bonus :

En admettant qu'une expérience spécifique présente une efficacité de transformation de $3 \times 10^3$ bactéries/µg d'ADN, combien de colonies de transformants sont supposées être en croissance sur la boîte LB/amp/ara? Vous pouvez supposer que la concentration d'ADN et la fraction de cellules étalées sur la gélose LB sont identiques à celles de l'activité pGLO.

# Annexe A
# Biotechnologie – Repères historiques

La transformation biologique a une histoire passionnante. En 1928, Frederick Griffith, un médecin anglais travaillant dans un laboratoire de pathologie, a mené une expérience qu'il n'a jamais pu réellement interpréter de son vivant. Il a modifié (transformé) de manière permanente une souche bactérienne non pathogène et sûre de pneumocoques en une souche pathogène mortelle. Il a obtenu cette incroyable modification en traitant les bactéries sûres avec des bactéries mortelles, tuées par la chaleur. Ce mélange de deux souches bactériennes, qui ne comportait pas de bactéries virulentes vivantes, a tué les souris l'ayant reçu en injection. Il a répété l'expérience de nombreuses fois et a systématiquement obtenu les mêmes résultats. Le médecin et nombre de ses collègues étaient perplexes. Quel processus avait permis la transformation de bactéries sûres en tueuses? De nombreuses années plus tard, cette expérience sera reconnue comme le premier cas consigné de transformation biologique menée en laboratoire, que personne ne parvenait à expliquer. Griffith n'avait pas connaissance de l'ADN, mais savait que la transformation était transmissible. Comme tout moment susceptible de s'inscrire dans l'histoire, il est possible de considérer les expériences de Griffith, en matière de transformation, comme l'émergence de la manipulation génétique analytique ayant conduit à l'ADN recombinant et à la biotechnologie, ainsi qu'aux perspectives de manipulation génétique humaine.

En 1944, seize ans après l'expérience de Griffith, un groupe de recherche de l'Institut Rockefeller, dirigé par Oswald T. Avery, a publié un article directement dérivé des travaux de Griffith. « Quelle est la substance responsable? » était la question posée par Avery à ses collaborateurs. En travaillant avec les mêmes souches de bactéries responsables de la pneumonie, Avery et ses collaborateurs ont apporté une réponse rigoureuse à cette question. Ils ont prouvé que la substance en question était l'ADN, et que la transformation biologique a lieu lorsque les cellules intègrent et expriment un ADN étranger. Bien qu'il a fallu de nombreuses années pour accorder du crédit aux travaux d'Avery, il est aujourd'hui universellement reconnu pour ces avancées fondamentales en matière de connaissances biologiques. S'appuyant sur les travaux d'Avery et d'autres scientifiques, Douglas Hanahan a élaboré la technique de la transformation de colonie, utilisée dans cette investigation.[1, 2]

**Contexte historique**

*Transformation génétique*

1865 — Gregor Johann Mendel : Mendel présente ses découvertes : les principes selon lesquels les caractères génétiques se transmettent des parents à la descendance. De ses travaux est né le concept de gène, comme unité de base de l'hérédité.

1900 — Carl Correns, Hugo De Vries, Erich Tschermak : Les chercheurs en génétique végétale, qui mènent des études sur l'hérédité, révèlent que leurs travaux constituent essentiellement une redécouverte des travaux menés presque quarante ans plus tôt par un moine autrichien augustin et inconnu, Gregor Johann Mendel, qui étudiait des petits pois.

1928 — Frederick Griffith : Griffith transforme des *Diplococcus pneumonia* non pathogènes en bactéries pathogènes à l'aide de bactéries virulentes, tuées par la chaleur. Il suggère que le facteur de transformation a un lien avec la synthèse de la capsule polysaccharidique. Griffith n'avait pas connaissance de l'ADN, mais savait que la transformation était transmissible. Il est possible de considérer les expériences de Griffith, en matière de transformation, comme l'émergence de la manipulation génétique analytique ayant conduit à la technologie de l'ADN recombinant, ainsi qu'aux perspectives de manipulation génétique humaine.

1944 — Oswald Avery, Colin MacLeod : Avery et ses collaborateurs annoncent qu'ils ont isolé le facteur de transformation à haut degré de pureté : il s'agit de l'ADN. Depuis cette expérience classique en génétique moléculaire, la transformation, la conjugaison et la transduction (transfert d'ADN viral) sont utilisées pour le transfert de gènes entre des espèces de bactéries, de *Drosophila*, de souris, de végétaux et d'animaux, de cellules mammaliennes en culture et pour la thérapie génique humaine.

1952 — Alfred Hershey, Martha Chase : Hershey et Chase utilisent des isotopes radioactifs du phosphore et du soufre, ainsi que le phage T2, pour démontrer de façon concluante que l'ADN est la molécule informationnelle de l'hérédité. Parallèlement aux travaux d'Avery, de MacLeod et de McCarty, l'expérience Hershey/Chase a confirmé que l'ADN était le matériau de transformation et la molécule informationnelle de l'hérédité.

1972 — Paul Berg, Janet Mertz : Berg utilise l'enzyme endonucléase nouvellement découverte, *Eco*RI, pour couper l'ADN de SV40 et l'ADN du phage P22, puis utilise l'enzyme transférase terminale et l'ADN ligase pour former une liaison entre ces fragments distincts et aboutir à un seul morceau d'ADN. La création de la première molécule d'ADN recombinant marque le début de l'âge de la biotechnologie. En raison des préoccupations de la communauté scientifique quant aux transferts génétiques, la nouvelle molécule n'a pas été intégrée à une cellule mammalienne.

1973 — Herbert Boyer, Stanley Cohen, Annie Chang : Berg, Boyer et Cohen utilisent *Eco*RI pour isoler un gène intact de résistance à la kanamycine. Boyer, Cohen et Chang loge le gène de résistance à la kanamycine dans un plasmide *Eco*RI coupé contenant déjà une résistance à la tétracycline. Ils produisent ainsi une molécule de plasmide bactérien recombinant dotée d'une double antibiorésistance. Ils transforment ensuite *E. coli* avec ce plasmide modifié.

1977 — Genentech, Inc. : Le premier produit de génie génétique, le gène codant pour la somatostatine humaine (facteur d'inhibition du déclenchement de la sécrétion de l'hormone de croissance), est exprimé dans des bactéries et annoncé par Genentech.

1980 — J. W. Gordon, Frank Ruddle : Gordon et Ruddle procèdent avec succès à une micro-injection de gènes normaux dans des cellules germinales de souris.

1982 — Richard Palmiter, Ralph Brinster : Palmiter et Brinster procèdent à une micro-injection du gène de l'hormone de croissance du rat dans des embryons de souris. Il s'agit de la première « thérapie génique germinale » rapportée chez un mammifère. La souris receveuse était appelée « little » (« petite ») car elle souffrait d'une forme de nanisme congénital.

1988 — Steven Rosenberg : Rosenberg et ses collègues reçoivent l'autorisation de procéder à la première expérience de transfert de gènes chez des patients souffrant d'un mélanome métastatique. Cette expérience correspond à un pistage des gènes avec le gène marqueur $Neo^R$ et non à une thérapie génique.

1990 — W. French Anderson, Michael Blaese, Kenneth Culver : Le vendredi 14 septembre 1990 (12 h 52), au National Cancer Institute, une petite fille âgée de quatre ans, Ashanthi De Silva de Cleveland (Ohio), devient la première patiente traitée par thérapie génique. Elle reçoit ses propres globules blancs portant la version corrigée du gène ADA (adénosine déaminase). Les docteurs Anderson, Blaese et Culver ne s'attendaient pas à des résultats significatifs avant environ 1 an. Une seconde jeune fille, Cynthia Cutshall, reçoit une injection similaire en 1990. En juin 1993, un reportage montre les deux filles gaies et souriantes, jouant dans une cour d'école. Leur système immunitaire fonctionnait efficacement.

1994 — D'autres candidats à la thérapie génique incluent les patients souffrant des affections de drépanocytose, d'hémophilie, de diabète, du cancer et de cardiopathie. La thérapie génique germinale fait l'objet d'un débat au cours de la réunion du RAC (*Recombinant DNA Advisory Committee*, États-Unis). En 1996, un nombre croissant de propositions sont en attente d'examen par le sous-comité du RAC chargé de la thérapie génique humaine.

1995 — Dirigé par J. Craig Venter, un groupe du TIGR (*The Institute for Genomic Research*, Maryland) publie la séquence génétique complète de la bactérie *Hemophilus influenzae*. Il s'agit d'un événement marquant dans le domaine de la recherche microbiologique, en raison du décodage de l'empreinte génétique du premier organisme à vie autonome.

1996 — Une collaboration multinationale incluant plus de 100 laboratoires (Europe, États-Unis, Canada et Japon) décrypte pour la première fois la séquence génomique complète d'un eucaryote, la levure *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* est une levure importante sur le plan commercial; elle est couramment utilisée en boulangerie et pour la fermentation des boissons alcoolisées. Elle est largement employée en laboratoire en tant qu'organisme modèle pour comprendre les processus cellulaires et moléculaires des eucaryotes.

1997 — Une équipe de scientifiques du *Roslin Institute* (Écosse), dirigée par Ian Wilmut, rapporte le clonage réussi d'une brebis, appelée Dolly, à partir d'une cellule de glande mammaire d'une brebis adulte. Cette annonce a suscité un débat, à l'échelle internationale, sur les questions éthiques et morales relatives au clonage. Par la suite, des scientifiques du *Roslin Institute*, en collaboration avec la société PPL Therapeutics (Écosse), ont réussi le clonage de deux jeunes brebis, Polly et Molly, génétiquement modifiées avec un gène humain de sorte qu'une fois adulte, leur lait contienne une protéine appelée facteur IX, une protéine de coagulation sanguine qu'il est possible d'extraire et d'utiliser pour traiter l'hémophilie chez l'être humain.

1998 — Plus de 99 % de la séquence génomique du premier organisme multicellulaire, le petit vers *Caenorhabditis elegans*, sont rapportés. Bien que *C. elegans* soit un organisme primitif, il a en commun un grand nombre de ses caractéristiques génétiques et biologiques essentielles avec l'être humain et peut aider les scientifiques à identifier et caractériser les gènes impliqués dans la biologie et les maladies humaines.

Les scientifiques ont produit une carte physique détaillée et précise pour la plupart des 30 000 gènes humains connus, une étape majeure pour le projet du génome humain (*Human Genome Project*).

2000 — Une équipe, menée par Ingo Potrykus (École polytechnique fédérale de Zurich, Suisse) et Peter Beyer (Université de Fribourg, Allemagne), annonce la création d'un riz génétiquement modifié (le « riz doré ») qui peut produire de grandes quantités de bêta-carotène, une substance que l'être humain transforme en vitamine A. Le « riz doré » est susceptible de réduire la cécité causée par une carence en vitamine A chez des millions de personnes en situation de grande pauvreté dans le monde.

La séquence génomique de la mouche des fruits *Drosophila melanogaster* fait l'objet d'une publication issue d'une collaboration entre une société privée, Celera Genomics, et des chercheurs du monde entier qui étudient l'insecte. *Modèle largement utilisé en laboratoire, D. melanogaster*, est à ce jour l'espèce la plus imposante dont le code génétique est déchiffré.

Une ébauche du génome humain est réalisée par une équipe de 16 institutions internationales qui forment le consortium sur le séquençage du génome humain (*International Human Genome Sequencing Consortium*). Les chercheurs de Celera Genomics annoncent également avoir réalisé un « premier assemblage » du génome.

2001 — Le 12 février 2001, Celera Genomics et le consortium *International Human Genome Sequencing Consortium* annoncent conjointement la publication de la séquence quasi complète du génome humain (« l'empreinte » génétique de l'être humain). Pour l'équipe internationale, les travaux ont duré presque vingt ans et ont impliqué la collaboration de milliers de scientifiques dans le monde entier. Celera Genomics a déclaré de son côté avoir achevé les travaux approximativement en neuf mois. Les estimations des deux groupes diffèrent en ce qui concerne le nombre de gènes du génome humain, mais l'intervalle commun prévu, entre 25 000 et 40 000 gènes, est largement inférieur à l'estimation préalable de 100 000 gènes. Cette découverte inattendue laisse entendre qu'un organisme aussi complexe que l'être humain peut être composé de si peu de gènes, et de seulement le double de ceux du vers *C. elegans* ou de la mouche *D. melanogaster*. Le dévoilement de la séquence complète du génome humain permet aux chercheurs du monde entier de commencer à élaborer des traitements pour de nombreuses maladies.

Le président George W. Bush décide que seules les expériences impliquant les 64 lignées de cellules souches embryonnaires existantes seraient admissibles à un éventuel financement fédéral. Cette décision a entraîné une déception pour de nombreux scientifiques, qui espéraient utiliser les cellules souches embryonnaires pour mettre au point des traitements pour de nombreuses affections.

Advanced Cell Technology, une petite société basée au Massachusetts, annonce qu'elle est parvenue avec succès à cloner des embryons humains en vue d'extraire leurs cellules souches. À terme, cette méthode pourrait permettre de traiter des patients souffrant de différentes maladies, grâce à la production de cellules de remplacement telles que les cellules nerveuses et musculaires, en vue de les retransplanter chez la même personne sans risque de rejet par l'organisme.

PPL Therapeutics, la société qui a contribué au clonage de la brebis Dolly, annonce le clonage de cinq porcelets génétiquement modifiés, présentant un gène inactivé (neutralisé) qui permettrait un moindre rejet de leurs organes lors d'une transplantation chez un sujet humain. Le succès de PPL Therapeutics est porteur d'espoir pour les milliers de personnes qui attendent de bénéficier d'un don d'organes tels que le cœur, le poumon, le rein et le foie.

2002 — La brebis Dolly, le premier mammifère ayant fait l'objet d'un clonage à partir d'une cellule adulte, commence à souffrir d'arthrite à l'âge relativement précoce de cinq ans. On ne sait pas exactement si l'état de Dolly est le résultat d'un défaut génétique engendré par le clonage ou s'il s'agit d'une simple coïncidence. L'annonce ravive les débats sur la susceptibilité des animaux clonés au vieillissement prématuré et aux problèmes de santé; elle constitue également un revers pour les personnes en faveur du clonage comme moyen de produire des organes destinés aux patients des listes de transplantations.

2008 — La découverte et les avancées marquantes relatives à la protéine GFP (protéine à fluorescence verte) remportent le prix Nobel de chimie. Osamu Shimomura est le premier scientifique à isoler la protéine GFP et à découvrir qu'elle a des propriétés fluorescentes lors d'une exposition à la lumière UV. Martin Chalfie utilise la protéine GFP comme marqueur génétique lumineux. Roger Y. Tsien révèle le mécanisme de fluorescence de la GFP.

# Annexe B
# Glossaire

**Arabinose**
Glucide isolé à partir de végétaux, utilisé habituellement comme source alimentaire par les bactéries. Dans cette expérience, l'arabinose initie la transcription du gène GFP aboutissant aux cellules vertes fluorescentes sous la lumière UV.

**Bêta-lactamase**
Protéine qui fournit la résistance à l'ampicilline (antibiotique). La protéine bêta-lactamase est produite et sécrétée par des bactéries qui ont été transformées avec un plasmide contenant le gène pour la bêta-lactamase. La bêta-lactamase sécrétée inactive l'ampicilline présente dans la gélose nutritive LB, ce qui permet la croissance bactérienne et l'expression des gènes nouvellement acquis présents également dans le plasmide, par exemple la protéine GFP.

**Biotechnologie**
Application de la biologie au monde réel grâce à la manipulation spécifique d'organismes vivants, particulièrement au niveau génétique, en vue d'élaborer des produits potentiellement bénéfiques.

**Clonage**
Processus permettant de générer des copies quasi-illimitées, ou clones, d'un organisme ou d'un segment d'ADN. Le clonage produit une population qui présente une constitution génétique identique.

**Colonie**
Grappe de cellules bactériennes génétiquement identiques, en croissance sur un milieu gélosé. Étant donné que toutes les cellules d'une colonie unique sont génétiquement identiques, elles sont appelées « clones ».

**Criblage**
Processus d'identification des bactéries souhaitées, à partir d'une banque de bactéries.

**Gélose**
Substance gélatineuse issue d'algues marines. Fournit une matrice solide pour la croissance bactérienne. Contient un mélange nutritif composé de glucides, d'acides aminés, de nucléotides, de sels et de vitamines.

**Génie génétique**
Manipulation du matériel génétique (ADN) d'un organisme, par l'introduction ou l'élimination de gènes spécifiques.

**Milieux de culture**
Les milieux liquides et solides, appelés bouillon et gélose LB (du nom de Luria et Bertani), sont composés d'un extrait de levure et du résultat d'une digestion enzymatique de sous-produits carnés, lesquels fournissent un mélange de glucides, d'acides aminés, de nucléotides, de sels et de vitamines (nutriments pour la croissance bactérienne). La gélose, dérivée d'algues marines, se polymérise sous l'action de la chaleur et du refroidissement et forme un gel solide (comparable à la gélatine Jello-O). Elle fournit un support solide pour la culture des bactéries.

**pGLO**
Plasmide contenant la séquence du gène GFP et le gène de résistance à l'ampicilline, qui code pour la bêta-lactamase.

**Plasmide**
Molécule d'ADN circulaire, capable de réplication autonome, qui porte un ou plusieurs gènes pour les protéines de résistance aux antibiotiques et un gène étranger cloné, tel que GFP. Il s'agit d'une molécule d'ADN extrachromosomique, distincte de l'ADN chromosomique. Généralement, les plasmides sont présents naturellement chez les bactéries.

| | |
|---|---|
| **Protéine à fluorescence verte (*Green Fluorescent Protein*, GFP)** | La protéine à fluorescence verte a été isolée à l'origine à partir de la méduse bioluminescente *Aequorea victoria*. Le gène pour la GFP a récemment été cloné. La conformation tridimensionnelle unique de la protéine GFP entraîne sa résonance lorsqu'elle est exposée à la lumière ultraviolette, ainsi que l'émission d'énergie sous la forme d'une lumière verte visible. Lors d'une exposition à la lumière UV, les électrons du chromophore de la GFP sont excités à un état plus élevé d'énergie. Lorsqu'ils tombent à un niveau plus bas d'énergie, ils émettent une plus grande longueur d'onde de lumière verte fluorescente visible, à ~509 nm. |
| **Régulation des gènes** | Dans tous les organismes, l'expression des gènes est soigneusement régulée pour permettre l'adaptation à différentes conditions et éviter une surproduction de protéines inutiles. Les gènes impliqués dans le transport et la dégradation des sources nutritives sont de bons exemples de gènes hautement régulés. Par exemple, l'arabinose (sucre simple) est à la fois source d'énergie et source de carbone pour les bactéries. Les enzymes bactériennes nécessaires à la dégradation ou à la digestion de l'arabinose pour la nutrition ne sont pas exprimées en l'absence d'arabinose; elles sont exprimées lorsque l'arabinose est présent dans l'environnement. En d'autres termes, en présence d'arabinose, les gènes de ces enzymes digestives sont activés. Quand l'arabinose disparaît, les gènes sont inactivés. Voir l'annexe D pour plus de détails sur le rôle joué par l'arabinose dans la régulation et l'expression du gène de la protéine GFP. |
| **Sélection antibiotique** | Utilisation d'un antibiotique pour sélectionner les bactéries contenant l'ADN d'intérêt. L'ADN plasmidique pGLO contient le gène pour la bêta-lactamase, qui fournit la résistance à l'ampicilline (antibiotique). Une fois que les bactéries sont transformées avec le plasmide pGLO, elles commencent à produire et à sécréter la protéine bêta-lactamase. La bêta-lactamase sécrétée dégrade l'ampicilline, ce qui rend l'antibiotique inoffensif pour l'hôte bactérien. Seules les bactéries intégrant le plasmide pGLO peuvent croître et former des colonies sur le milieu nutritif qui contient l'ampicilline; les cellules non transformées, qui n'ont pas intégré le plasmide pGLO, ne peuvent pas croître sur les boîtes de sélection à l'ampicilline. |
| **Striation** | Processus consistant à strier, en quadrants, la surface d'un milieu gélosé avec une anse d'inoculation portant des bactéries, en vue de produire des colonies isolées. |
| **Technologie de l'ADN recombinant** | Processus qui consiste à couper et à recombiner des fragments d'ADN, de façon à isoler des gènes ou à modifier leur structure et leur fonction. |
| **Technique stérile** | Réduction de la possibilité d'une contamination bactérienne extérieure au cours d'une expérience, grâce au respect de l'hygiène et à l'utilisation de techniques de laboratoire rigoureuses. |
| **Vecteur** | Molécule d'ADN à réplication autonome, telle qu'un plasmide, dans laquelle des fragments d'ADN étranger sont insérés, puis propagés dans une cellule hôte. |

# Annexe C
# Concepts fondamentaux de la biologie moléculaire et terminologie

L'étude du monde vivant révèle que tous les organismes vivants s'organisent de façon unique. Une empreinte détaillée de cette organisation est transmise à la descendance.

Les cellules sont les plus petites unités fonctionnelles capables d'une reproduction indépendante. De nombreuses bactéries, par exemple, peuvent survivre sous la forme de cellules uniques. Au sein de chaque cellule, les molécules chimiques sont organisées pour agir de concert.



**Culture et prélèvement de cellules**

Une culture cellulaire est le processus selon lequel des cellules sont recueillies à partir de leur milieu naturel, puis cultivées dans des récipients de laboratoire, dans des conditions contrôlées. Pour favoriser la croissance des cellules, il est nécessaire de fournir des substances nutritives et un environnement appropriés. Il est très facile de faire croître des bactéries et des levures en culture. Même si cela reste possible, faire croître des cellules issues de plantes, d'insectes et d'animaux est un processus plus complexe.

Une fois la croissance terminée, il est possible de prélever et d'étudier les cellules en culture.

**Clonage**

Lorsqu'une population de cellules est obtenue par croissance, à partir d'une cellule unique, toutes les cellules seront génétiquement identiques. Cette population porte alors le qualificatif de « clonal ». Le processus de création d'une population clonale est appelé « clonage ». L'objectif de la striation de la gélose vise à produire des colonies isolées, chacune issue d'une cellule unique.

**À l'intérieur des cellules**

Au sein d'une cellule, les molécules exécutent chacune une fonction donnée. Par exemple, les molécules d'ADN stockent des informations (tout comme le disque dur d'un ordinateur). Les protéines sont les « outils à toute épreuve » de la cellule.

Pour étudier ces molécules, nous préparons une population clonale à partir d'un type de cellule d'intérêt, nous ouvrons les cellules et nous trions le contenu. Par exemple, il est relativement facile de séparer toutes les protéines de toutes les molécules d'ADN.

Il est également possible de procéder à la purification d'une espèce de protéines unique à partir du mélange de protéines découvert au sein d'un type de cellule. Chaque type de protéines présente des propriétés physiques et chimiques uniques. Ces propriétés permettent de différencier les espèces de protéines en fonction de leur taille, de leur charge ou de leur hydrophobie, par exemple.

**Molécules spéciales, fonctions spécialisées**

Regardons de plus près trois types de molécules très spéciales, au sein des cellules : ADN, ARN et protéines. Chacune de ces molécules exécute une fonction différente. Les molécules d'ADN s'apparentent à des meubles-classeurs qui stockent des informations. L'ARN contribue à extraire et à exécuter les instructions stockées dans l'ADN. Les protéines sont conçues pour effectuer des tâches chimiques à l'intérieur (et souvent à l'extérieur) de la cellule.

**ADN — Modèle universel des informations biologiques**

Le script principal de chaque organisme est encodé dans son acide désoxyribonucléique (ADN). Les informations au sein des molécules d'ADN de chaque cellule sont suffisantes pour activer les fonctions caractérisant cette cellule.

Les molécules d'ADN correspondent à de très longues chaînes composées de sous-unités répétées. Chaque sous-unité (nucléotide) contient l'une des quatre bases saillantes suivantes :

| | |
|---|---|
| adénine (**A**) | cytosine (**C**) |
| thymine (**T**) | guanine (**G**) |

Étant donné que les nucléotides sont reliés selon une configuration « tête-bêche », un long brin d'ADN se compose essentiellement d'une armature chimique avec des bases saillantes. Les informations portées par cette molécule sont encodées dans la séquence des bases **A, G, C** et **T**, sur sa longueur.

**Points supplémentaires sur la structure de l'ADN**

1. Étant donné que les sous-unités des chaînes d'ADN sont reliées selon une configuration « tête-bêche », la séquence est directionnelle. Par convention, on oriente l'écriture de la séquence d'ADN dans le sens de l'extrémité 5' libre (prononcé « cinq prime ») de l'armature vers l'extrémité 3' (prononcé « trois prime »).

   C'est-à-dire 5'...**AACTG**...3'

2. Les bases saillantes le long de la chaîne sont libres de former des liaisons hydrogènes spontanées avec des bases disponibles sur les autres brins d'ADN, selon les règles suivantes :

   (i) **A** est apparié avec **T**

   (ii) **C** est apparié avec **G**

   Du fait de ces règles, les bases **A** et **T** et les bases **G** et **C** sont considérées comme complémentaires.

   (iii) Pour que deux brins d'ADN s'apparient, ils doivent être complémentaires et dans des directions opposées.

   *Par exemple :* appariement de (5'...**AGGTC**...3') avec (5'...**GACCT**...3'). Ces deux brins présentent des séquences complémentaires. Le double brin s'écrit de la façon suivante :

   5'...**AGGTC**...3'
   3'...**TCCAG**...5'

   La molécule ci-dessus contient cinq paires de bases. En effet, de manière générale, l'ADN se présente presque toujours sous une forme à double brin, les deux brins portant des séquences complémentaires.

3. La longueur des molécules d'ADN implique typiquement des milliers voire des millions de paires de bases. Parfois, les deux extrémités d'une molécule d'ADN se rejoignent pour former un ADN circulaire.

4. L'ADN double brin ou bicaténaire, sous sa forme naturelle, apparaît comme un ressort enroulé ou une hélice. En raison du double brin, il est souvent fait référence à une double hélice.

L'architecture de l'ADN permet une stratégie très simple au cours de la réplication : les deux brins de chaque molécule d'ADN se dénouent; grâce à une enzyme appelée ADN polymérase, chaque brin engendre une copie complémentaire de lui-même. Apparaissent alors deux molécules filles, à double brin et identiques à la molécule mère.

**Les protéines et l'ARN sont les « outils à toute épreuve » de la cellule**

La biochimie de la vie requiert des centaines d'interactions chimiques, très spécifiques et efficaces, qui ont lieu simultanément. Au cours de ces interactions, les principaux acteurs sont les molécules de protéine et d'ARN à courte vie, qui peuvent agir ensemble ou de manière indépendante pour exécuter différentes fonctions. Tout comme l'ADN, l'ARN et les protéines représentent également de longues chaînes d'unités répétées.

**ARN**

L'ARN (acide ribonucléique), à l'instar de l'ADN, se compose de quatre types d'éléments constitutifs reliés sous forme de chaîne. Il diffère de l'ADN sur les poins suivants :

Les quatre bases de l'ARN sont **A, G, C** et **U** (uracile); les règles d'appariement sont les mêmes que pour l'ADN, excepté que **A** est associé à **U**. Bien qu'un appariement de l'ARN avec un ARN complémentaire ou un ADN soit possible, l'ARN est généralement à simple brin au sein de la cellule. Le sucre de l'armature ARN est le ribose, non pas le désoxyribose. Les molécules d'ARN sont généralement courtes, par rapport aux molécules d'ADN; la raison en est que chaque ARN est lui-même une copie d'un court segment issu d'une molécule d'ADN. Le processus de copie de segments d'ADN en ARN est appelé « transcription »; celle-ci est prise en charge par une protéine appelée « ARN polymérase ».

**Protéines**

Les protéines (plus précisément, les polypeptides) sont également des molécules longues, de type chaîne, mais sont plus structurellement diversifiées que l'ADN ou l'ARN. La raison en est que les sous-unités des protéines, les « acides aminés », sont de vingt types différents. La séquence exacte d'acides aminés le long d'une chaîne polypeptidique détermine de quelle façon cette chaîne se repliera dans sa structure tridimensionnelle. Les caractéristiques tridimensionnelles précises de cette structure déterminent à leur tour sa fonction.

**L'action** d'une protéine dépend de la **séquence** exacte de ses acides aminés.

Dans la plupart des cas, une protéine exécutera une fonction unique. Les protéines peuvent exécuter des fonctions très diverses. Certaines protéines, appelées « enzymes », agissent en tant que catalyseurs dans les réactions chimiques. D'autres transportent des signaux d'une partie de la cellule à une autre ou, dans le cas des « hormones », d'une cellule à une autre. Les protéines appelées « anticorps » luttent contre les intrus. De nombreuses protéines deviennent partie intégrante de diverses structures physiques au sein des cellules. D'autres encore (protéines régulatrices) contrôlent diverses activités au sein des cellules, de façon à les maintenir dans les limites « permises ».

**Code linéaire, conséquences tridimensionnelles**

L'ADN est le principal entrepôt d'informations chez les systèmes vivants. Comme indiqué précédemment, ces informations sont linéaires, c'est-à-dire encodées en séquence d'éléments de base **A, G, C, T** le long de la molécule d'ADN. Ce code linéaire est transmissible à la descendance — car l'ADN peut être reproduit en copies exactes.

À tout moment, de courts segments de chaque molécule d'ADN sont sélectionnés pour la transcription. Ces segments sont appelés « gènes ». L'ARN polymérase (enzyme) copie la totalité du segment, base par base, et procède à l'assemblage d'une molécule d'ARN qui contient une séquence **A, G, C** et **U** exactement complémentaire de la séquence d'ADN du gène transcrit.

Outre le fait de fournir un modèle maître pour la copie des ARN, l'ADN contient également des informations de séquence qui indiquent à l'ARN polymérase où commencer la transcription d'un gène (promoteur) et où arrêter, combien de copies sont à exécuter et quand. Il peut même incorporer certaines informations à la séquence d'ARN, afin de déterminer la longévité et la productivité de cet ARN.

Il existe trois principales classes d'ARN copiées à partir des matrices d'ADN : l'ARN messager, ou ARNm, qui relaie les informations de séquence requises pour l'assemblage des protéines; l'ARN de transfert, ou ARNt, qui travaille sur la chaîne d'assemblage pour les protéines; les ARN qui exécutent des fonctions structurelles. Par exemple, l'ARN ribosomique, ou ARNr, entre dans la constitution des ribosomes, la machinerie d'assemblage des protéines.

Les ARNm transportent les informations de séquence pour la constitution de protéines. Les ribosomes lisent cette séquence de nucléotides, selon un processus appelé « traduction », en vue d'aboutir à une séquence d'acides aminés. Quel est ce processus? Il n'existe que quatre types de nucléotides, mais vingt types d'acides aminés.

Au cours de la traduction, le ribosome lit 3 nucléotides à la fois et attribue un acide aminé à chaque triplet successif. **Remarque** : Les triplets sont souvent dénommés **codons**. Chaque acide aminé est ensuite lié à l'extrémité de la chaîne protéique en expansion. Il existe 64 triplets, ou codons, possibles. Par conséquent, les informations linéaires qui résident dans l'ADN permettent d'assembler une séquence linéaire d'acides aminés dans une protéine. Cette séquence, à son tour, **déterminera les modalités de repliement de la protéine en une forme précise**, avec des propriétés chimiques caractéristiques.

En résumé, le transfert principal d'informations au sein des cellules suit l'ordre :

ADN➔ARN➔PROTÉINE➔CARACTÈRE

Bien que les informations elles-mêmes soient linéaires, les implications sont tridimensionnelles. L'une des hypothèses fondamentales de la technologie de l'ADN recombinant est que des changements permanents et souhaitables dans le fonctionnement de cellules vivantes peuvent être obtenus en modifiant la séquence linéaire de leur ADN.

**Les gènes sont des fichiers discrets de données ADN**

Un gène est un segment, au sein d'une molécule d'ADN, singularisé pour la copie en ARN. Directement ou indirectement, cet ARN exécutera une fonction. Par conséquent, il est pratique d'envisager un gène sous la forme d'une unité fonctionnelle.

De nombreux caractères, tels que la résistance bactérienne à un antibiotique, sont gouvernés par des gènes uniques. La plupart des caractères tels que la couleur d'une rose ou la forme d'un nez, sont gouvernés par plusieurs gènes agissant de concert.

Les gènes sont de longueur variable : La longueur de certains gènes ne représente que quelques centaines de paires de bases; pour d'autres, la longueur peut correspondre à des dizaines de milliers de paires de bases. Une molécule d'ADN peut porter de quelques gènes à des milliers de gènes. Une cellule peut, elle, contenir une ou plusieurs molécules d'ADN (chromosomes). Par conséquent, le nombre de gènes d'une cellule peut grandement varier. La bactérie *E. coli* contient une molécule d'ADN portant environ 5 000 gènes. Une cellule humaine contient 46 molécules d'ADN portant un total d'environ 100 000 gènes.

Tous les gènes d'une cellule donnée ne **sont** pas copiés en ARN (c'est-à-dire « exprimés ») au même moment ou à la même fréquence. Aussi lorsqu'il est question de la fonction d'un gène, il est fait référence à son niveau d'expression. La fréquence peut être contrôlée par la cellule, selon des règles prédéterminées qui sont elles-mêmes inscrites dans l'ADN.

Exemple : Les cellules de notre corps (au nombre de 100 billions) contiennent chacune des molécules d'ADN identiques. Toutefois, les cellules hépatiques, par exemple, n'expriment que les gènes requis pour la fonction hépatique, tandis que les cellules cutanées expriment un sous-ensemble de gènes relativement différent.

**L'ADN peut être coupé par des enzymes de restriction**

Les enzymes de restriction sont des protéines, issues de bactéries, qui servent de défense contre l'ADN étranger (par exemple, l'ADN viral). Chaque enzyme de restriction reconnaît une séquence unique de 4 à 6 paires de bases généralement, et coupera tout ADN à chaque apparition de cette séquence.

Par exemple, l'enzyme de restriction *Bam*H I reconnaît la séquence (5'..**GGATCC**..3') et coupe le brin d'ADN entre les deux nucléotides **G** de cette séquence.

Les enzymes de restriction couperont l'ADN issu de toute source, à condition que la séquence de reconnaissance soit présente. Peu importe que l'ADN soit d'origine bactérienne, végétale ou humaine.

**Liaison des fragments d'ADN par l'ADN ligase**

L'ADN ligase est une enzyme qui relie les fragments d'ADN, à condition que les extrémités soient compatibles.

Par conséquent, un fragment d'ADN d'être humain, de grenouille ou de tomate, coupé avec l'enzyme *Bam*H I peut être facilement relié à un fragment d'ADN bactérien également coupé avec cette même enzyme. Ce processus permet la création d'ADN recombinants, ou hybrides, c'est-à-dire la liaison de fragments d'ADN issus de deux sources différentes.

Des gènes peuvent être isolés à partir de l'ADN humain ou végétal et placés dans des bactéries. Par exemple, le gène humain codant pour l'insuline (hormone) peut être intégré à des bactéries. Dans des conditions adaptées, ces bactéries peuvent produire de l'insuline humaine authentique.

**Les plasmides, petits fragments circulaires d'ADN**

Les plasmides sont de petits fragments circulaires d'ADN, présents dans certaines cellules bactériennes. Ils répliquent leur propre ADN en empruntant les polymérases des cellules. Par conséquent, ils peuvent demeurer indéfiniment dans les cellules sans grand effort.

En raison de la taille réduite, l'extraction et la purification d'ADN plasmidique, à partir de cellules bactériennes, sont aisées. Lorsqu'il est coupé avec une enzyme de restriction, l'ADN plasmidique peut être lié à un ADN étranger, issu de toute source, lui-même coupé avec cette enzyme.

Les ADN hybrides résultants peuvent alors être réintroduits dans les cellules bactériennes selon une procédure appelée « transformation ». Les plasmides hybrides peuvent désormais s'auto-perpétuer dans les bactéries, de manière classique, excepté que l'ADN étranger relié se perpétue également. L'ADN étranger obtient un « tour gratuit », pour ainsi dire.

Chaque plasmide hybride contient désormais une copie parfaite du fragment d'ADN étranger originellement relié. On dit que le fragment d'ADN étranger a été « cloné »; le plasmide qui a porté cet ADN est appelé « véhicule de clonage » ou « vecteur de clonage ».

Outre leur utilité pour le clonage de gènes étrangers, les plasmides portent parfois des gènes qui leur sont propres. Les bactéries meurent lorsqu'elles sont exposées aux antibiotiques. Cependant, les gènes d'antibiorésistance permettent aux bactéries de croître en présence d'un antibiotique tel que l'ampicilline. Ces gènes sont souvent présents sur les plasmides. Lorsqu'un ADN étranger est incorporé à ces plasmides et que l'ADN hybride est introduit dans les cellules bactériennes par transformation, il est facile de sélectionner les bactéries ayant reçu le plasmide—car elles ont acquis la capacité de croître en présence de l'antibiotique, tandis que toutes les autres cellules bactériennes sont tuées.

**Banques d'ADN**

Lorsqu'un ADN est extrait d'un type de cellule donné, il peut être découpé et les fragments peuvent être clonés en masse dans une population de plasmides. Ce processus engendre une population d'ADN hybrides (recombinants). Après réintroduction de ces ADN hybrides dans les cellules, chaque cellule transformée aura reçu et propagé un ADN hybride unique. Chaque ADN hybride contiendra le même ADN vecteur mais un insert d'ADN différent.

S'il existe 1 000 molécules d'ADN différentes dans le mélange d'origine, 1 000 ADN hybrides différents seront formés; 1 000 cellules transformantes différentes seront restituées, chacune portant l'un des 1 000 fragments originels d'information génétique. Cette collection est appelée « banque d'ADN ». Si l'extrait d'origine provient de cellules humaines, la banque est une banque humaine.

Il est possible d'isoler les différents ADN d'intérêt à partir d'une banque grâce à un criblage via une sonde appropriée.

# Annexe D
# Régulation des gènes

Notre corps contient des milliers de protéines différentes qui exécutent un grand nombre de tâches diverses. Les enzymes digestives sont des protéines. Certains signaux hormonaux traversant notre corps, ainsi que les anticorps qui nous protègent contre les maladies, sont des protéines. Les informations d'assemblage des protéines sont transportées dans l'ADN. La section d'ADN contenant le code de fabrication d'une protéine est appelée un « gène ». Il existe plus de 30 000 à 100 000 gènes dans le génome humain. Chaque gène code pour une protéine unique : un gène, une protéine. Le gène qui code pour une enzyme digestive dans la bouche est différent du gène qui code pour un anticorps ou pour le pigment qui colore les yeux.

Les organismes régulent l'expression de leurs gènes et, en définitive la quantité et le type de protéines présentes dans leurs cellules, pour une multitude de raisons, notamment les changements évolutifs, la spécialisation cellulaire et l'adaptation à l'environnement. La régulation des gènes permet non seulement l'adaptation à différentes conditions, mais elle évite également une surproduction de protéines inutiles, laquelle entraînerait un désavantage pour l'organisme. Les gènes impliqués dans le transport et la dégradation (catabolisme) des sources nutritives sont de bons exemples de gènes hautement régulés. Par exemple, l'arabinose (sucre) est à la fois source d'énergie et source de carbone. Les bactéries *E. coli* produisent trois enzymes (protéines) nécessaires à la digestion de l'arabinose comme source nutritive. En l'absence d'arabinose, les gènes qui codent pour ces enzymes ne sont pas exprimés; ils sont exprimés lorsque l'arabinose est présent dans leur environnement. Quelle en est l'explication?

La régulation de l'expression des protéines survient souvent au niveau de la transcription de l'ADN en ARN. Cette régulation a lieu sur un emplacement très spécifique de la matrice d'ADN, un « promoteur », où l'ARN polymérase se fixe et commence la transcription du gène. Chez les bactéries, des groupes de gènes associés sont souvent rassemblés et transcrits en ARN à partir d'un seul promoteur. Ces groupes de gènes contrôlés par un promoteur unique sont appelés « opérons ».



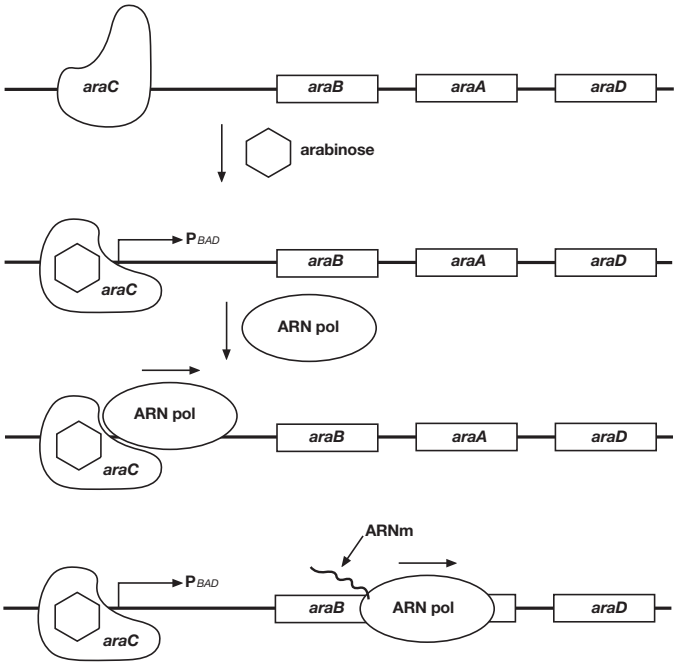
Les trois gènes (*araB, araA* et *araD*), qui codent pour trois enzymes digestives impliquées dans la dégradation de l'arabinose, sont groupés dans ce que l'on appelle « l'opéron arabinose ».[3] Ces trois protéines dépendent de l'initiation de la transcription à partir d'un promoteur unique, $P_{BAD}$. La transcription de ces trois gènes nécessite la présence simultanée de la matrice d'ADN (promoteur et opéron), l'ARN polymérase, une protéine de liaison ADN appelée *araC* et l'arabinose. *araC* se lie à l'ADN sur le site de liaison pour l'ARN polymérase (le début de l'opéron arabinose). Lorsque l'arabinose est présent dans l'environnement, les bactéries l'intègrent. Une fois intégré, l'arabinose interagit directement avec *araC*, liée à l'ADN. L'interaction entraîne le changement de forme de la protéine *araC*, laquelle favorise alors (contribue à) la liaison de l'ARN polymérase; les trois gènes *araB*, *A* et *D* sont transcrits. Trois enzymes sont produites, elles dégradent l'arabinose et en dernier lieu, l'arabinose disparaît. En l'absence d'arabinose, la protéine *araC* revient à sa forme d'origine et la transcription est arrêtée.

Le code de l'ADN du plasmide pGLO a été modifié de façon à incorporer des aspects de l'opéron arabinose. Le promoteur ($P_{BAD}$) et le gène *araC* sont tous deux présents. Cependant, les gènes qui codent pour le catabolisme de l'arabinose, *araB, A* et *D*, ont été remplacés par le gène unique qui code pour la protéine GFP. Par conséquent, en présence d'arabinose, la protéine *araC* favorise la liaison de l'ARN polymérase et la GFP est produite. Les cellules émettent un vert fluorescent au fur et à mesure qu'elles produisent de plus en plus de GFP. En l'absence d'arabinose, *araC* ne favorise plus la liaison de l'ARN polymérase et le gène GFP n'est pas transcrit. Lorsque la protéine GFP n'est pas produite, les colonies bactériennes présentent un phénotype— de type sauvage (naturel) et sont de couleur blanche sans fluorescence.

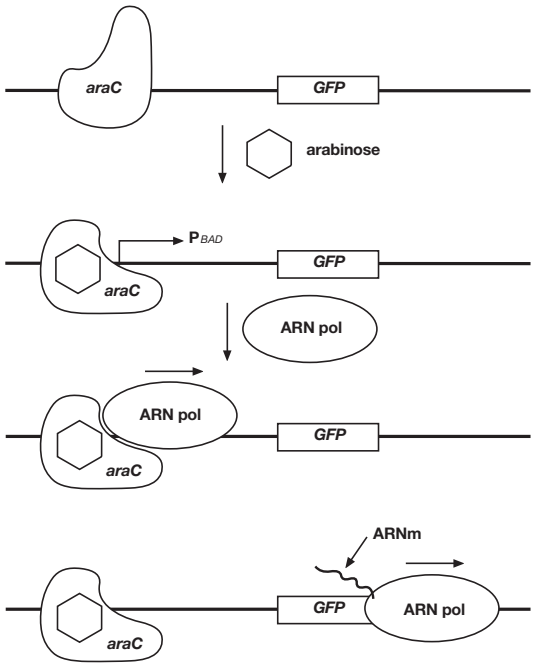
Il s'agit d'un excellent exemple de cadre central en matière de biologie moléculaire :

ADN➔ARN➔PROTÉINE➔CARACTÈRE.

## Opéron arabinose




## Expression de la protéine à fluorescence verte




ANNEXE D

# Annexe E
# Documentation photographique des boîtes pGLO à l'aide du transilluminateur Vernier BlueView Transilluminator

1. Démarrer Logger *Pro*® et choisir New [Nouveau] dans le menu File [Fichier].
2. Préparer BlueView Transilluminator.
   a. Transférer la boîte +pGLO LB/amp vers la partie centrale de la plateforme bleue de BlueView Transilluminator.
   b. Raccorder BlueView Transilluminator au système d'alimentation et mettre en marche.
3. Positionner ProScope HR™.
   a. Connecter la lentille 1–10X à ProScope.
   b. Connecter ProScope au port USB.
   c. Monter ProScope sur le support et positionner ce dernier à côté de BlueView Transilluminator.
   d. Placer ProScope de sorte que sa lentille soit parallèle à la surface de BlueView Transilluminator.
4. Préparer Logger *Pro* pour l'utilisation.
   a. Sélectionner Add Page [Ajouter une page] ► Blank Page [Page vierge] ► OK à partir du menu Page [Page].
   b. Sélectionner Text [Texte] dans le menu Insert [Insérer] et saisir un titre pour décrire le test, par exemple « +pGLO, colonies LB/amp/ara ».
   c. Sélectionner Video Capture [Capture vidéo] ► Take Photo [Prendre une photo] dans le menu Insert [Insérer].
   d. Orienter et procéder à la mise au point de ProScope HR de sorte que les colonies soient bien ciblées.

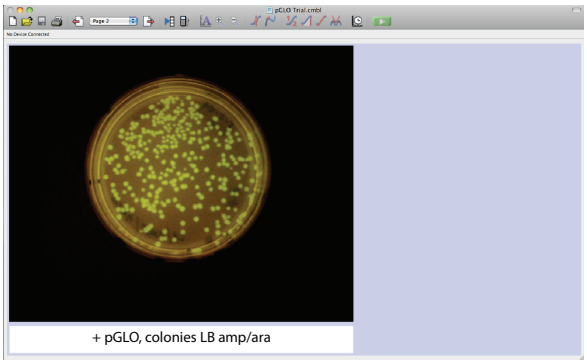



**Figure 1**

5. Placer la capote d'imagerie sur l'ensemble ProScope et BlueView Transilluminator. À travers la trappe, effectuer les derniers ajustements afin d'optimiser la position, la mise au point et la résolution.
6. Si l'image est satisfaisante, cliquer sur Take Photo [Prendre une photo] et sélectionner Auto Arrange [Disposition automatique] à partir du menu Page [Page].
7. L'écran devrait alors ressembler à la Fig. 1.
8. Ajouter une nouvelle page et un titre pour la boîte suivante et prendre la photo.
9. Répéter la procédure pour chaque boîte.
10. Il est possible d'ajouter au tableau de données de la page 1 les données de dénombrement des colonies et les informations relatives aux boîtes (facultatif).

# Annexe F
# Références


1. Hanahan, Douglas. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol*., **166**, 557 (1983).
2. Hanahan, Douglas. Techniques for transformation of *E. coli*. In DNA Cloning: A Practical Approach (Ed. D. M. Glover), vol. 1. IRL Press, Oxford (1987).
3. Schleif, Robert.Two positively regulated systems, *ara* and *mal*, In *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, Neidhardt. ASM Press, Washington, D.C. (1996).



Parafilm est une marque commerciale d'American National Can Co.

Jell-O est une marque commerciale de Kraft Foods, Inc.

Logger *Pro* est une marque commerciale de Vernier Software & Technology.

Pro Scope HR est une marque commerciale de Bodelin Technologies.

1660033EDU

(01) 03610520499177

BIO-RAD

**Bio-Rad Laboratories, Inc.**

*Life Science Group*

***Web site*** *bio-rad.com* ***USA*** *1 800 424 6723* ***Australia*** *61 2 9914 2800* ***Austria*** *43 1 877 89 01 177* ***Belgium*** *32 (0)3 710 53 00* ***Brazil*** *55 11 3065 7550*
***Canada*** *1 905 364 3435* ***China*** *86 21 6169 8500* ***Czech Republic*** *420 241 430 532* ***Denmark*** *45 44 52 10 00* ***Finland*** *358 09 804 22 00*
***France*** *33 01 47 95 69 65* ***Germany*** *49 89 31 884 0* ***Hong Kong*** *852 2789 3300* ***Hungary*** *36 1 459 6100* ***India*** *91 124 4029300*
***Israel*** *972 03 963 6050* ***Italy*** *39 02 216091* ***Japan*** *81 3 6361 7000* ***Korea*** *82 2 3473 4460* ***Mexico*** *52 555 488 7670* ***The Netherlands*** *31 (0)318 540 666*
***New Zealand*** *64 9 415 2280* ***Norway*** *47 23 38 41 30* ***Poland*** *48 22 331 99 99* ***Portugal*** *351 21 472 7700* ***Russia*** *7 495 721 14 04*
***Singapore*** *65 6415 3188* ***South Africa*** *27 (0) 861 246 723* ***Spain*** *34 91 590 5200* ***Sweden*** *46 08 555 12700* ***Switzerland*** *41 026 674 55 05*
***Taiwan*** *886 2 2578 7189* ***Thailand*** *66 662 651 8311* ***United Arab Emirates*** *971 4 8187300* ***United Kingdom*** *44 020 8328 2000*

*10000066633 Ver C (1660033EDU) FR* *16-0773 0716 Sig 1215*