

LE TEST DE FLUCTUATION : L'EXPÉRIENCE DE LURIA & DELBRÜCK

I. Observations et hypothèses

A. L'acquisition d'une résistance aux bactériophages

B. Deux hypothèses explicatives possibles

II. Approche expérimentale

III. Evaluation du taux de mutation

Mutation = processus d'**innovation génétique** au cœur du processus évolutif.

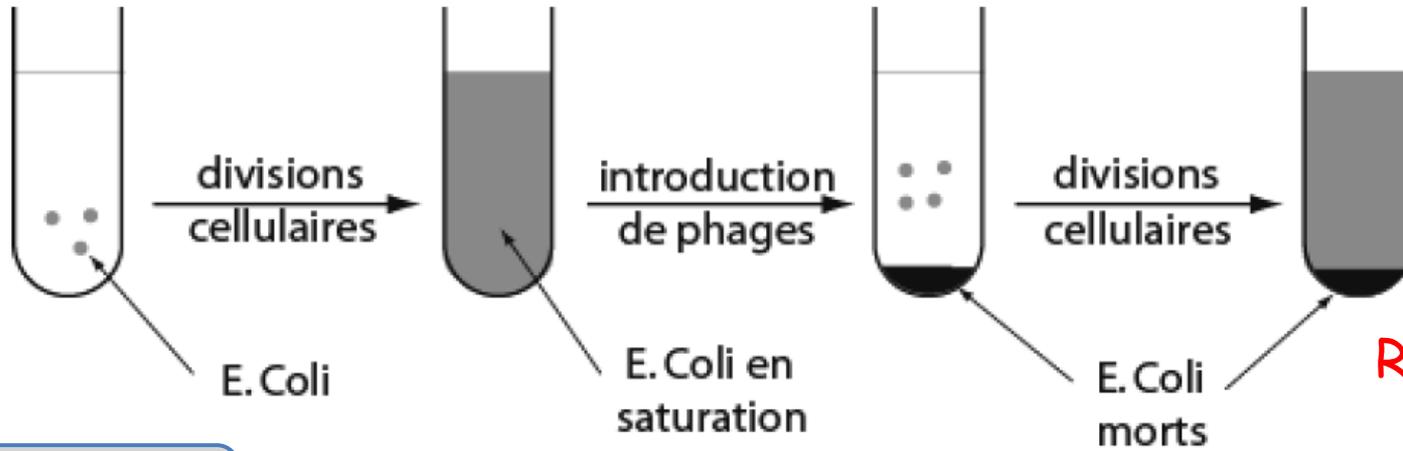
Expérience de Luria et Delbruck (1943) : les mutations ne sont pas causées par des changements environnementaux ou à des pressions du milieu.

Mutation = phénomène spontané et aléatoire durant la division cellulaire

L'environnement n'intervient que dans un second temps, favorisant telle ou telle mutation

Idée : « La génétique propose, la nature dispose »

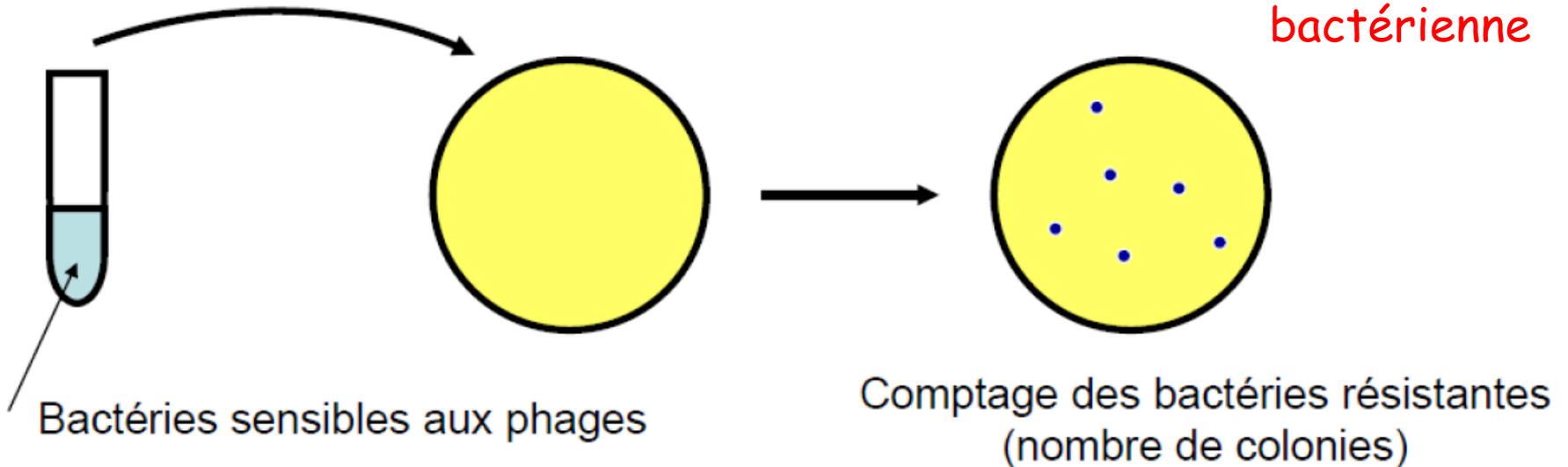
L'acquisition d'une résistance aux bactériophages



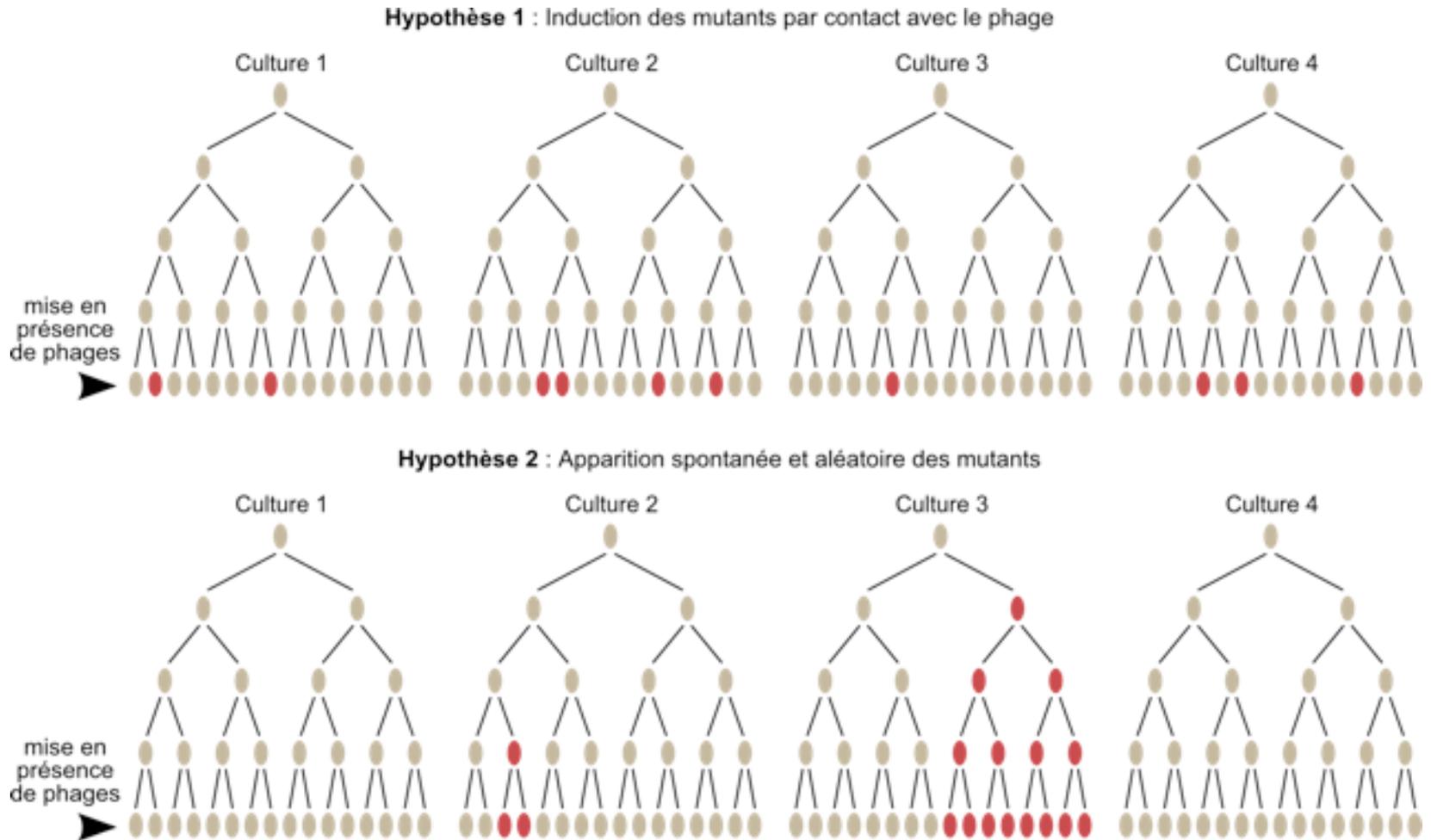
Résistance acquise par certaines bactéries et transmissible lors de la division bactérienne

Population clonale

Des cultures de bactéries sont étalées dans des boîtes contenant des phages.



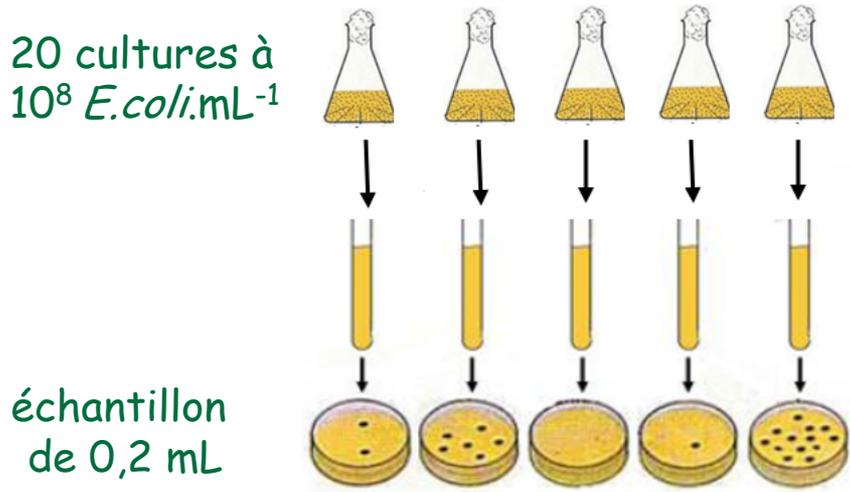
Mecavol 1: Les hypothèses testées par Luria et Delbrück (in Tou-En-Un Dunod 2014)



- (a) Dans le cas de l'hypothèse adaptative (hypothèse 1), les bactéries résistantes (en rouge) sous induites par les phages → **% de bactéries résistantes qui survivent peu variable.**
- (b) Dans le cas de l'hypothèse mutationnelle (hypothèse 2), elles apparaissent aléatoirement au cours des générations → **% de bactéries résistantes qui survivent doit varier selon les populations.**

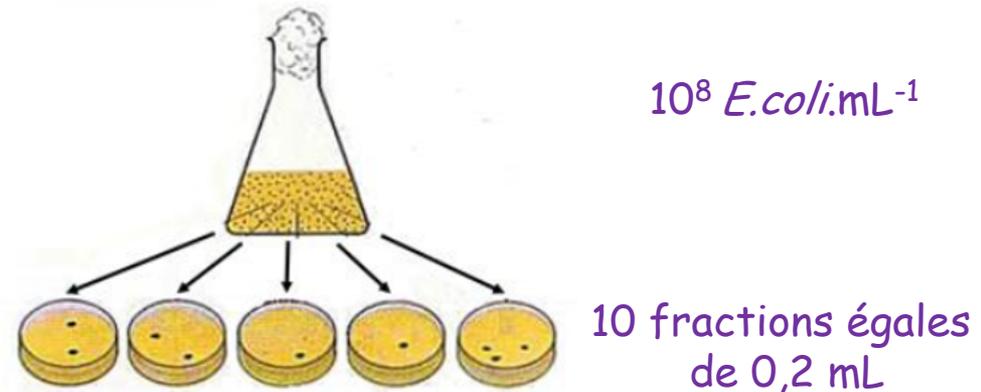
Préparat° indépendante de 20 petites cultures chacuneensemencée avec $10^3 E.coli.mL^{-1}$.

Lorsque, pour chaque culture, la population bactérienne atteint $10^8 E.coli.mL^{-1}$, ils prélèvent un échantillon de volume de 0,2 mL.



Préparat° de 10 mL de milieu de culture servant de témoin dans laquelle ils introduisent $10^3 E.coli.mL^{-1}$.

Lorsque la culture atteint $10^8 E.coli.mL^{-1}$, ils prélèvent 10 fractions égales de 0,2 mL chacune ou aliquotes.



Etalement séparé de chaque échantillon sur un milieu contenant des phages puis comptage du nombre de bactéries résistantes (= mutants viables).

Approche expérimentale de Luria et Delbrück

Deux cas de figures sont possibles.

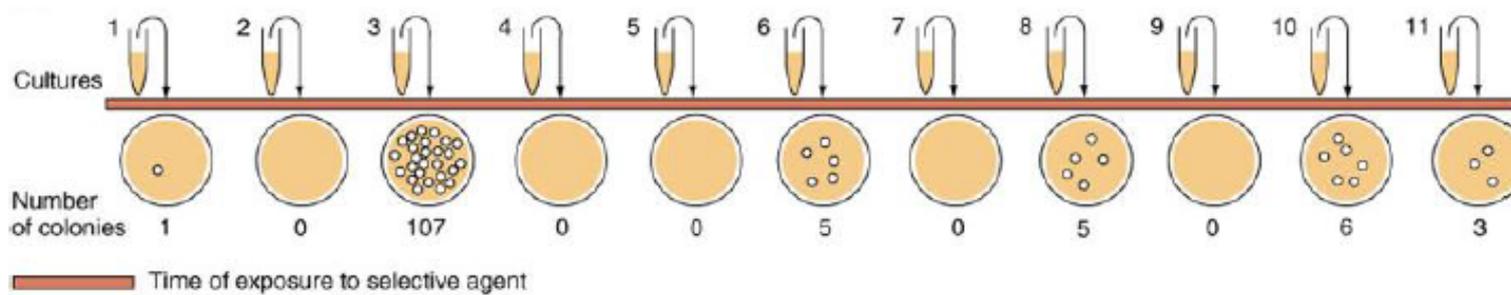
✓ Résistance due à une mutatio^o aléatoire → chaque petite culture isolée produira un nombre différent de cellules résistantes avec une fréquence faible. Distributio^o des bactéries résistantes avec une grande variance. On fait l'approximation que la loi binomiale s'apparente à une loi de Poisson.

✓ Résistance induite par une mutatio^o → la variance sera faible et sa valeur proche de la moyenne.

Mecavol 2: Résultats d'un test de fluctuation : exemple tiré des expériences de Luria et Delbrück (1943).

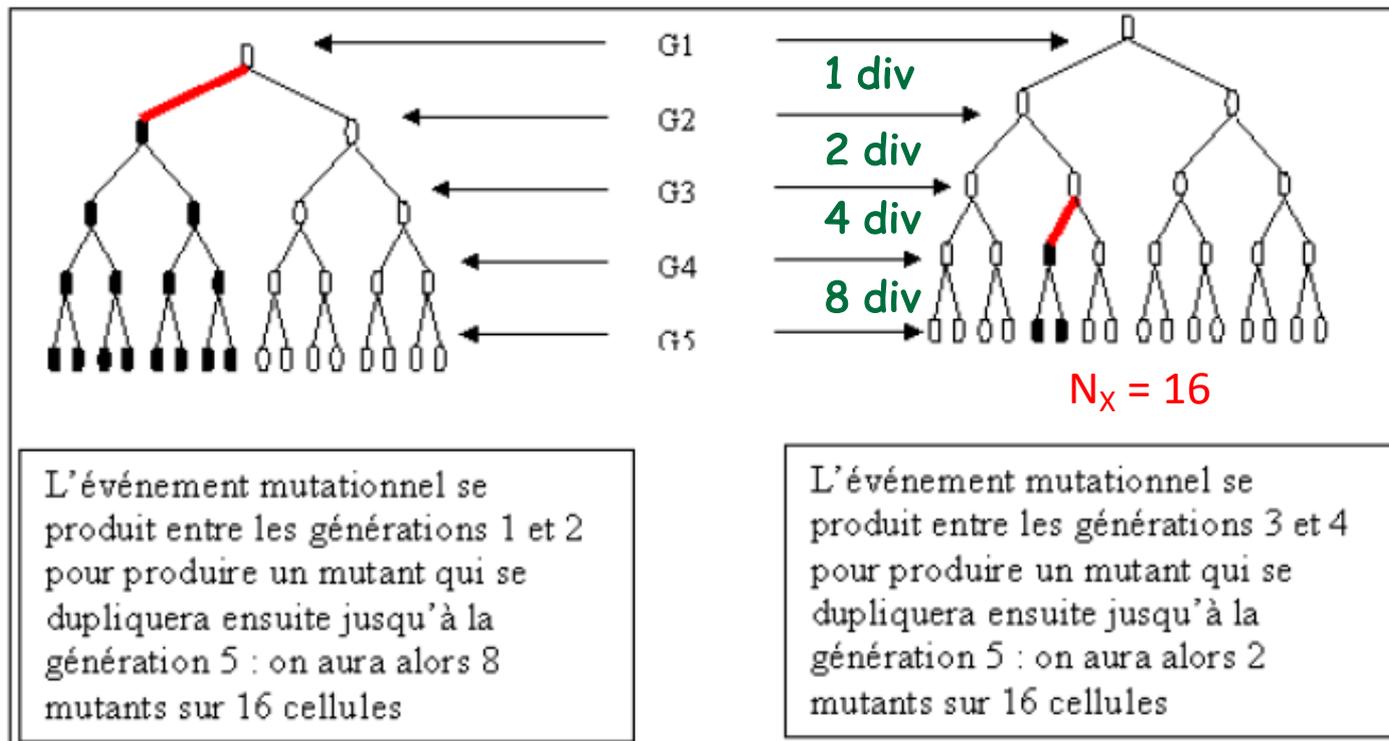
<u>Expérience 1</u> : culture unique de grand volume		<u>Expérience 2</u> : 20 cultures séparées de petit volume	
N° d'échantillon	Nombre de résistants dans les échantillons issus d'une même grosse culture	N° d'échantillon	Nombre de résistants dans les échantillons issus de cultures indépendantes
1	14	1	1
		2	0
2	15	3	3
		4	0
3	13	5	0
		6	5
4	21	7	0
		8	5
5	15	9	0
		10	6
6	14	11	107
		12	0
7	26	13	0
		14	0
8	16	15	1
		16	0
9	20	17	0
		18	64
10	13	19	0
		20	35
Moyenne	16.7	Moyenne	11.3
Variance	15	Variance	752.1

**11/20
non
résistantes**



Si le phage induisait la mutation, il n'y aurait aucune raison pour que la fluctuation soit plus élevée dans les cultures individuelles, car toutes étaient exposées aux phages de la même manière. La meilleure interprétation était que la mutation s'était produite aléatoirement dans le temps : les mutations précoces donnant des nombres plus élevés de cellules résistantes car elles avaient le temps de produire de nombreux descendants résistants, les dernières mutations produisant moins de cellules résistantes.

$N =$ densité



$\Delta =$ nb de divisions

$\Delta = N_x - N_0 =$

$\Delta 16 - 1 = 15$

Dans l'expérience
 $N_x = 10^8$ et $N_0 = 10^3$

$N_x \gg N_0 \rightarrow$

$\Delta = N_x$

L'événement mutationnel se produit entre les générations 1 et 2 pour produire un mutant qui se dupliquera ensuite jusqu'à la génération 5 : on aura alors 8 mutants sur 16 cellules

L'événement mutationnel se produit entre les générations 3 et 4 pour produire un mutant qui se dupliquera ensuite jusqu'à la génération 5 : on aura alors 2 mutants sur 16 cellules

Si la probabilité d'obtenir **X cultures résistantes** suit une loi de Poisson d'espérance $m = \mu\Delta$, avec $\mu = \text{taux de mutation}$ et $\Delta = \text{nombre de divisions}$, alors

$$P(X) = e^{-m} \cdot \frac{m^X}{X!}$$

L'**espérance mathématique** m modélise la moyenne expérimentale d'une variable aléatoire continue.

m est appelée aussi **paramètre de la loi de poisson**.

Dans cette loi, **moyenne et variance** sont toutes deux égales au paramètre m

La probabilité d'obtenir des cultures **sans colonie résistante, soit 11 colonies sur 20**, est

$$P(X = 0) = e^{-\mu \cdot \Delta}$$

Rappel: factorielle de $0 = 1$ et $m^0 = 1$

Soit : $\ln(P_0) = -\mu \cdot \Delta$, et ainsi :

$$\mu = -\left(\frac{\ln(P_0)}{\Delta}\right), \text{ soit } \mu = -\left(\frac{\ln\left(\frac{11}{20}\right)}{10^8}\right) = 0,6 \cdot 10^{-8} \text{ mutation / division}$$