

Génétique

La génétique est l'étude de la nature, du fonctionnement, de la transmission, de l'évolution, du matériel génétique (ADN) support de l'hérédité.

Comment l'ADN est-il organisé dans le génome ?

Comment l'ADN peut-il varier créant ainsi du polymorphisme ?

Comment l'ADN est-il transmis au cours des générations ?

Comment peut-on identifier les gènes impliqués dans un processus écologique donné ?

La génétique a débuté avec les expériences de Watson et Crick. On choisit pour travailler la levure *Saccharomyces Cerevisiae*, organisme eucaryote unicellulaire. Le principe de la génétique est le même pour tous les eucaryotes. La levure est un organisme haplodiplobiontique, c'est-à-dire qu'il existe une forme haploïde et une forme diploïde. On parle d'organisme diplobiontique lorsque la phase diploïde est majoritaire, la phase haploïde se limite aux gamètes et d'organisme haplobiontique lorsque la phase haploïde est majoritaire.

La levure a 2 types sexuels : α et a . Il existe des levures de type haploïde (n) α et d'autre de type haploïde (n) a . Une cellule $2n$ donne par méiose 4 cellules n (tétrapode), ce sont les asques. Une cellule a/α donne par méiose 2 cellules α et 2 cellules a .

I- Organisation des génomes et structure des gènes

1- Le génome

Il est contenu dans la cellule sous forme d'ADN. Il existe quelque génome sous forme d'ARN. Dans une espèce, le génome a globalement la même taille et la même structure. Les différences se trouvent au niveau des séquences : polymorphisme (variation de séquence au même endroit pour la même espèce)

2- Organisation des génomes : structure, différents types de cas

Dans une cellule, l'ADN est recouvert de protéines : les histones.

Régulation épigénétique : ensemble des mécanismes qui induisent une modification des expressions de l'ADN lié aux modifications protéiques fixées sur l'ADN.

Structure chromatinienne : des organismes peuvent avoir différents types d'ADN.

- Chromosome circulaire → procaryote (chromoïde)
- Plasmide : petite molécule d'ADN circulaire. Élément naturel de la bactérie qui se réplique de façon autonome et possédant des résistances à certains antibiotiques.
- Chromosome linéaire dans un noyau → eucaryote (haploïdie, diploïdie)

Dans le génome humain, il y a 23 paires de chromosomes dont 22 sont des autosomes (les 2 sont identiques) et la dernière paire correspond aux chromosomes sexuels XX ou XY, ce sont des hétérosomes. Chez la drosophile, il y a 4 paires de chromosomes. Chez la levure, il y a 16 paires de chromosomes sous forme haploïde. Il n'existe pas de chromosomes sexuels car le type sexuel est déterminé par un locus. Le caryotype est réalisé avec les chromosomes en métaphase.

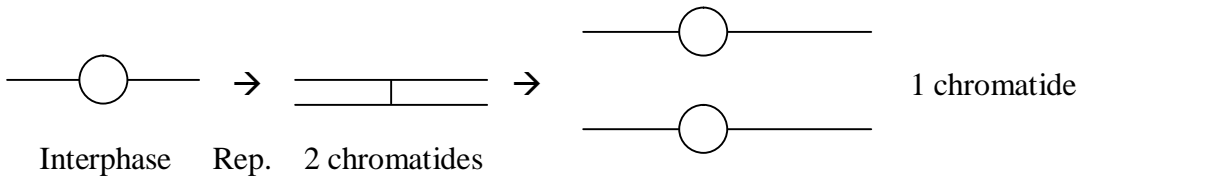
Centromère



Interphase : le chromosome ne possède qu'une chromatide = une molécule d'ADN constituée de 2 brins.

Réplication : il y a création de la 2^e chromatide

Métaphase : les chromosomes sont sous forme de 2 chromatides.



Les 2 chromatides sont issues de la réplication donc une molécule d'ADN et les 2 chromatides ont la même séquence. Une paire de chromosome homologue n'a pas la même séquence car ils ne viennent pas du même individu. Il existe des génomes mitochondriaux et chloroplastiques. Les mitochondries sont transcrites par le génome maternel.

Séquençage du génome :

1^{er} approche : « shotgun » (petit génome)

Extraction de l'ADN, coupure par des enzymes de restriction, clonage pour obtenir une infinité de fragment, et enfin séquençage.

2^e approche : Rétablissement de carte physique par assemblage des contigs. Réalisation de banque d'ADN génomique chevauchante (digestion de l'ADN par des enzymes X selon des conditions ménagées → digestion partielle). Assemblage de clone chevauchant (par cartographie de restriction). Réalisation de contigs.

Différence entre les 2 approches : dans la 2^e méthode on réalise des cartes physiques. Il n'y a pas de proportionnalité entre la taille du génome et le nombre de gènes.

Séquence répétée :

- Famille multi génique

- Autre séquence moyennement et hautement répétées :

- Dispersées dans le génome : élément transposable

abc abc abc



Les éléments transposables : séquences pouvant se dupliquer et se déplacer dans le génome. On les classe en famille suivant leur séquence et leur mode de transcription. La plupart de ces éléments sont aujourd'hui immobiles car ce sont les vestiges d'anciennes vagues d'invasion. C'est l'un des mécanismes permettant l'évolution des génomes.

- Transposons à ADN : duplication par l'intermédiaire d'une copie d'ADN
- Retrotransposons : duplication par l'intermédiaire d'1 copie ARN (SINE, LINE, LTR)

- Groupées dans le génome (séquence répétée en tandem)

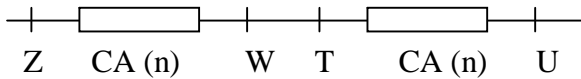
abc abc abc



Séquence répétée en tandem : séquences satellites de taille différente de motif répété.

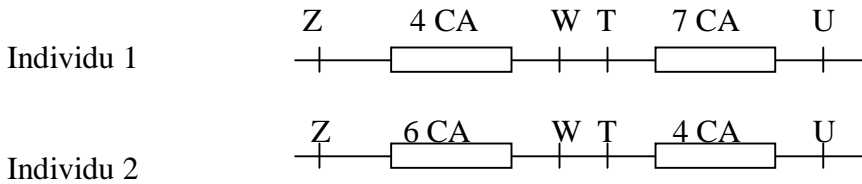
- Satellite : séquence contenant le motif répété > 100 pb
- Mini satellite : séquence contenant un motif répété entre 10 et 100 pb (il y a plus de 1000 mini satellites)
- Microsatellite : séquence contenant un motif répété compris entre 0 et 10 pb. Ils sont répartis uniformément dans le génome humain, ce sont d'excellents marqueurs génétiques car ils sont polymorphes (il y a un nombre de répétition différent selon les individus)

Séquence répétée = motif



Les satellites sont riches en CG et plus dense.

Endroit où on trouve ce motif : locus des microsatellites



Polymorphe : un même gène existe sous différente forme. Les polymérase ont des difficultés au niveau des séquences répétées car elles patinent. On peut donc avoir des changements. Il y a un nombre de motif selon les individus.

3- Notion de gènes : définition et structure

1^{er} définition : séquence nucléotidique permettant la synthèse de produits (ARN ou protéines) ayant une fonction dans la cellule. Il est constitué de la séquence transcrite ainsi que de séquences permettant la régulation de la transcription. C'est une unité d'information. C'est une séquence transcrite. Il existe plusieurs ARN donc on peut avoir un épissage alternatif.

Le gène Neuroxine a 2000 ARNm différents permettant de synthétiser plusieurs protéines avec des fonctions antagonistes. C

Structure d'un gène eucaryote :

Les gènes contiennent des introns et des exons, ce sont des gènes morcelés. Chez les procaryotes il n'y a pas de gènes morcelés.

Les différentes séquences :

- Non transcrites, non traduites en 5' et 3' du gène :

- Promoteurs basaux de la transcription
- Séquences consensus permettant la fixation de l'ARN polymérase : TATA et CAAT box (-35 et -80 par rapport au début de la transcription +1)
- Zones de régulations spécifiques : séquence permettant transcription du gène dans certaines cellules. Les séquences «enhancer» permettent d'augmenter le taux de transcription d'un gène alors que les séquences «silencer» le diminue. Elles se trouvent n'importe où par rapport au début de la transcription. Elles interagissent avec le promoteur par le repliement de l'ADN provoqué par les histones.
- Signaux de fin de transcription : terminateur de transcription en 3' du gène. Ce sont des séquences capables de s'apparier en palindrome pour former des épingles à cheveux (structure secondaire)

- Transcrites, non traduites

- Séquences 5' et 3'UTR. En 5'UTR se trouve la coiffe de l'ARN qui est le site d'entrée des ribosomes. En 3'UTR se trouve le site de la polyadénylation. La queue poly A et la coiffe ont une grande importance dans la stabilité de l'ARNm.
- Introns : ils sont transcrits puis supprimés de l'ARNm pour que seul les exons soient traduits. Les exons non codant sont la queue poly A et la coiffe

- **Transcrites, traduites**

- Le codon d'initiation de la traduction AUG
- Les codons stop : UAA, UAG et UGA

CDS : séquence nucléotidique bornée en 5' par un ATG et en 3' par un codon stop

ORF : cadre de lecture ouvert : cette séquence n'est pas interrompue par un codon stop.

La protéine peut ensuite subir des maturations post-transcriptionnelles : clivage ou glycolysation

4- Analyse informatique des génomes

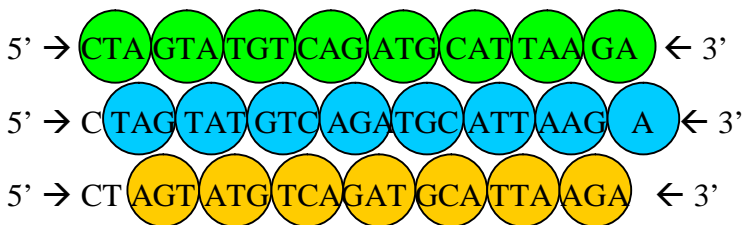
5' → A T T C A G C T A T C A ← 3' brin non transcrit

5' → A U U C

3' → T A A G T C G A T A G T ← 5' brin matrice (brin transcrit)

ARN polymérase

ADN polymérase polymérise de 5'→3' et se déplace sur le brin matrice dans le sens 3'→5'. L'ARNm a la même séquence et même orientation que le brin non transcrit. Tout le gène d'un génome n'est pas transcrit à partir du même brin.



La carte des ORF prédit les gènes codant pour des protéines. Limite de l'ORF :

- Critère de taille minimale
- Pas de mise en évidence de gènes codant pour ARN

Validation par approche expérimentale

Génétique classique : du phénotype au génotype. Isolement de mutant sur un critère phénotypique donné (ex : voie de biosynthèse d'un aa) → identification du gène impliqué chez le mutant.

Génétique inverse : du génotype au phénotype. Inactivation par mutagenèse dirigée d'un gène X mis en évidence par un séquençage du génome, dont la fonction est inconnue → analyse du phénotype du mutant → fonction du gène X

Par génétique classique, si le gène est essentiel, les mutants meurent. Pour 2 gènes codant 2 protéines ayant la même fonction, si on inactive un gène on ne voit pas le génotype.

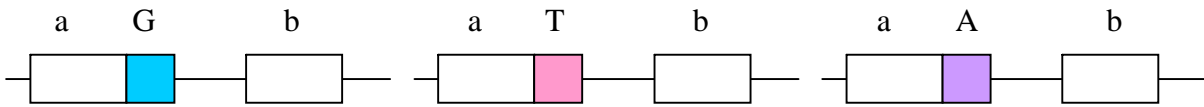
II- Variabilité des génomes : le polymorphisme

1- Source de la variation : la mutation, définition, notion de référence

Polymorphisme génétique : différence dans les séquences nucléotidiques de l'ADN génomique entre les 2 individus de la même espèce. Ce polymorphisme est dû à des mutations qui peuvent s'accumuler au cours des générations. Les mutations sont le moteur de l'évolution des génomes.

Locus : position particulière dans le génome. **Allèle** : une séquence possible d'un gène à un locus donné

Levure : haploïde



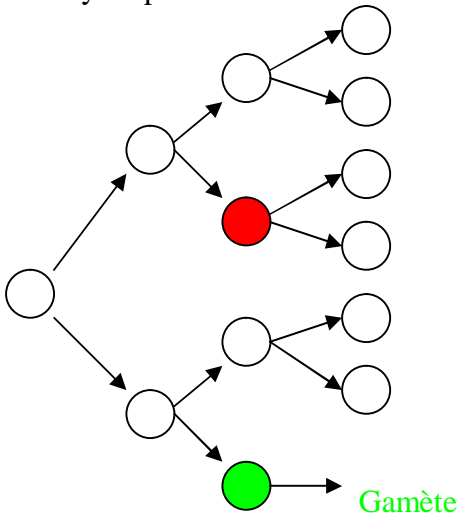
Le locus a 3 allèles : aA, aG et aT

Homozygote : les 2 allèles sont identiques à un locus donné.

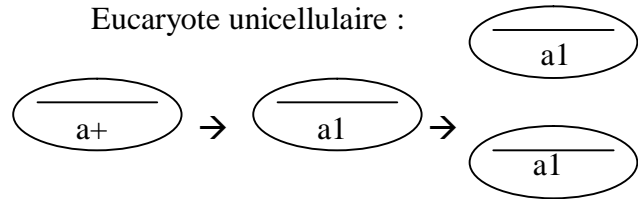
Hétérozygote : les 2 allèles sont différents à un locus donné.

La plupart des mutations sont silencieuses et ne peuvent être défectées qu'au niveau de la séquence d'ADN. D'autres mutations s'expriment et confèrent un phénotype particulier (phénotype mutant) différent du phénotype de référence. La démarche de génétique classique sur un organisme de laboratoire exploite ce polymorphisme génétique en étudiant des mutants pour un phénotype donné.

Eucaryote pluricellulaire :



Eucaryote unicellulaire :



Mutation somatique : il n'y a pas de transmission à la descendance.

Mutation germinale : mutation sur des cellules de lignée germinale donc transmission à la génération suivante.

Notion de souche de référence : lignée isogénique → tous les individus de cette lignée ont le même génotype. Ex : Drosophile naturelle → yeux rouges (c'est le caractère sauvage)


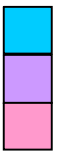
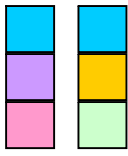
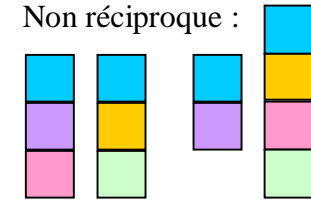
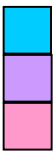
Lignée isogénique → yeux blancs

2- Les différents types de mutations

a- Mutations ponctuelles

On peut avoir des micro délétions de 2 ou 3 bases, des substitutions de bases. Comme substitution, il existe la transition : une purine est remplacée par une purine (idem pyrimidine), ou la transversion : une purine est remplacée par une pyrimidine (et inversement). Dans les microsatellites, on trouve des répétitions qui provoquent un glissement de la polymérase. Ces mutations sont dues aux erreurs de réplication mal ou non réparées.

b- Mutations chromosomiques

Délétion	Inversion	Translocation		Duplication
		Réciproque :  Non réciproque : 		

Elles proviennent de recombinaisons illégitimes (séquence répétée)

c- Mutations génomiques

Elles interviennent sur le nombre de chromosomes : aneuploïdie (nombre anormal de chromosomes). On peut avoir trop de chromosomes : trisomie 21, 13, 18, ou bien pas assez : syndrome de Turner (X/). Ceci provient d'un défaut de ségrégation lors de la méiose :

d- Insertion de séquence → éléments transposables.

3- Mutation dans les gènes

Effet des mutations :

Phénotype : ensemble des caractères observables d'un individu. 2 individus ayant le même génotype peuvent avoir des phénotypes différents en fonction de l'environnement (mutations thermosensibles) mais ils peuvent aussi avoir le même phénotype.

Substitution de base :

- **Mutation silencieuse :** pas de changement de l'aa : Sérine TTC → TTG (par mutation) Sérine
- **Mutation faux-sens :** changement aa en un autre : Leucine CTT → CCT proline
- **Mutation non-sens :** changement aa en codon stop : TCA → TGA, la protéine est tronquée donc non fonctionnelle.

Addition ou délétion :

GAG TTG GGA GCT AGT GTA G

1 GAG TTG GAG CTA GTG TAG codon stop

2 GAG TTG AGC TAG TGT AG codon stop

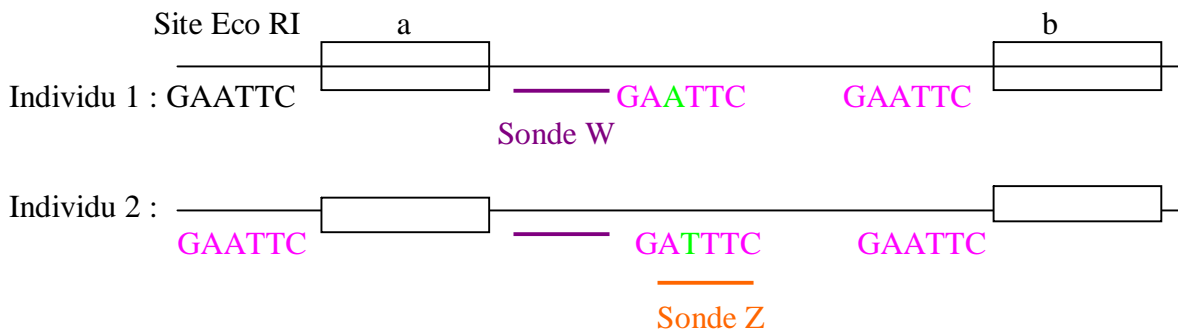
3 GAG TTA GCT AGT GTA G

Dans le cas 1 et 2, il s'agit d'un « frameshift » c'est-à-dire qu'il y a un décalage du cadre de lecture. La protéine est alors tronquée. Lorsque la délétion ou l'addition est un multiple de 3, il n'y a pas de décalage du cadre de lecture donc la protéine n'est pas tronquée.

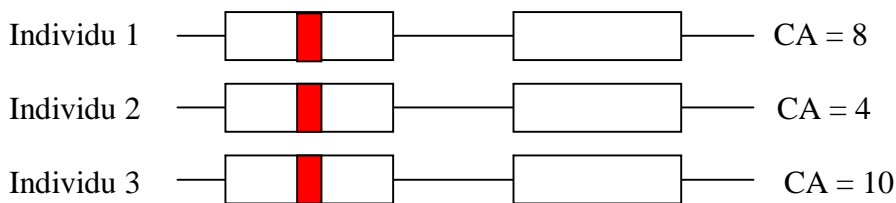
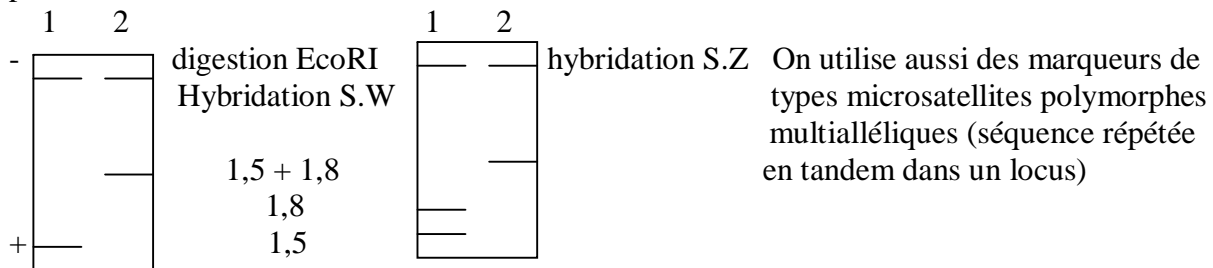
4- Phénotypages moléculaires

Le phénotypage moléculaire est la mise en évidence de polymorphisme au niveau de la séquence d'ADN.

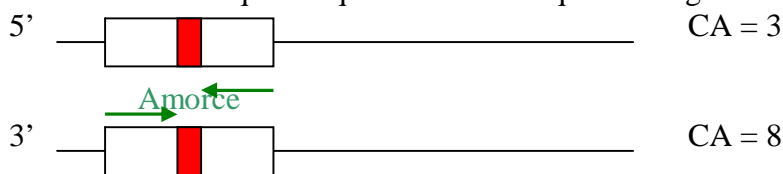
- **RFLP** : polymorphisme de longueur de fragment de restriction. 1 couple locus génomique – enzyme de restriction.



Pour mettre en évidence les RFLP, on réalise un southern blot. On utilise des marqueurs moléculaires bialléliques (on les utilise pour faire des cartographies génétiques qu'avec des séquences polymorphes). Cela nécessite des marqueurs polymorphes et les plus multialléliques possibles.

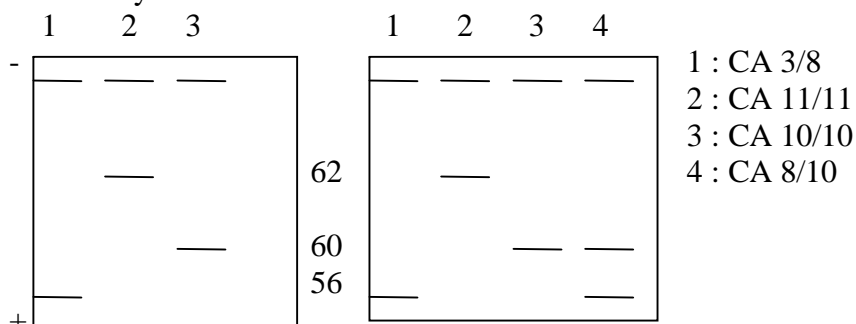


PCR : 2 amorces qui flanquent le motif et qui convergent vers la séquence



- Extraction d'ADN génomique (individu 1, 2 et 3)
- PCR avec amorce de 20 bases (individu 1 et 2)
- Migration sur gel

Electrophorèse des fragments de PCR sur gel d'acrylamide : visualisation directe par coloration au BET ou hybridation avec une sonde



- SNP : changement de nucléotide tous les 100 à 300 bases. Chez l'homme, chaque individu possède environ 10^6 SNP. Pour les mettre en évidence on peut utiliser la spectrométrie de masse ou la puce à ADN.

Conclusion :

Phénotype → au niveau d'un individu entier
 d'une protéine particulière
 de la séquence d'ADN (en particulier dans les région non codantes)

III- Créer et utiliser le polymorphisme pour étudier un processus biologique

1- Polymorphisme chez un organisme de laboratoire : la levure.

Condition physiologique de croissance

Température optimale de croissance 25°C jusqu'à 30°C. Ensemencement sur une boîte après 2 ou 3 jours, les colonies formées sont des clones de la cellule obtenue par mitose.

SSR

Souche sauvage de référence : elle est capable de pousser sur un milieu minimum (MM)

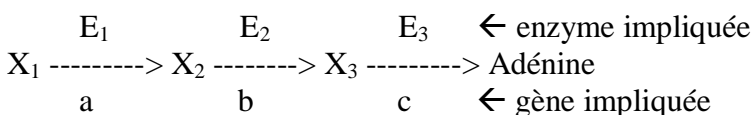
MM

Eau, sels minéraux, source de carbone (souvent du glucose) et source d'azote. (Synthèse de tous les acides aminés, toutes les bases, tous les produits nécessaires à leur croissance)

Quels sont les polymorphismes des levures ?

Convention d'écriture en génétique :

- phénotype : [Ade +] → levure capable de synthétiser l'adénine à partir du MM
- génotype :



Comment désigner un gène et ses allèles ?

Gène a → allèle sauvage = a+
 allèles mutants = a1, a2...

Levure (n) SSR : levure haploïde [Ade+], génotype a+, b+, c+

Levure (n) mutante : [Ade-], génotype a1, b+, c+
 ou a+, b2, c+
 ou a+, b+, c4

a) Phénotype d'auxotrophie – prototrophie :

Les levures incapables de synthétiser le produit P à partir du MM sont dites auxotrophes [P-] pour le produit P. A l'inverse, elles sont dites prototrophes [P+].

Comment les identifier ?

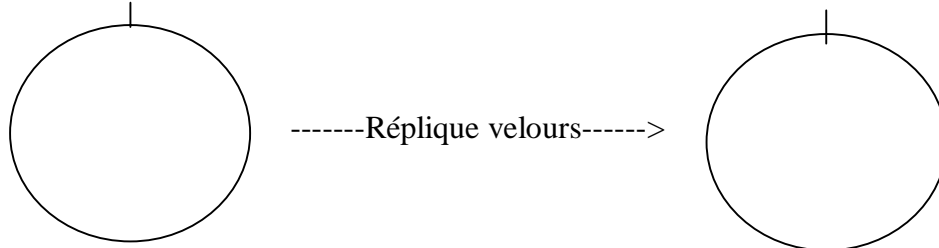
- Sélection
- Crible de sélection : protocole expérimental permettant de sélectionner un phénotype particulier.

Levures SSR : [Ade+]

Mutants : [Ade-]

Mutants : [his-]

Le milieu liquide est complet c'est-à-dire qu'il permet la croissance de tous les auxotrophes.



MC → tout le monde pousse
MM avec adénine

Milieu sélectif : MC sans adénine → seul [Ade+] poussent
On récupère [Ade-] sur 1^{er} boîte.

Sélection des mutants d'auxotrophie :

On sélectionne les cellules qui ne poussent pas sur le milieu de sélection → crible négatif.

2 mutants (M1 et M2) ne sont pas forcément de même génotype.

	E ₁	E ₂	E ₃	
X ₁	----->	X ₂	----->	X ₃
				-----> Adénine
	a	b	c	
SSR	a+	b+	c+	
M1	a1	b+	c+	→ pas enzyme E ₁
M2	a+	b+	c1	→ pas enzyme E ₃

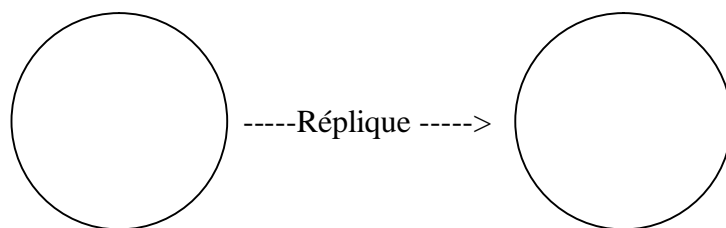
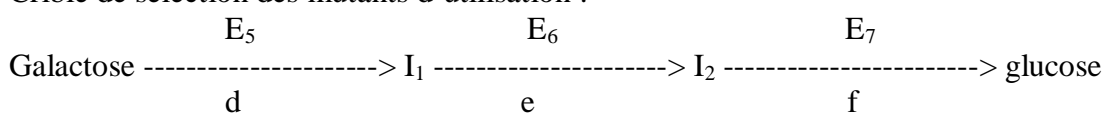
b) Mutants d'utilisation

Ils sont incapables d'utiliser un sucre comme source de carbone.

Ex : Mutant incapable de transformer le galactose en glucose.

Auxotrophe et prototrophe sont des voies de biosynthèse donc ils n'interviennent pas pour les mutants d'utilisation.

Crible de sélection des mutants d'utilisation :



Milieu + glucose

MM + glucose
[gal+] et [gal-] poussent

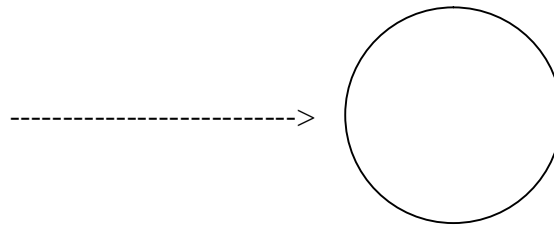
Milieu sélectif
MM + galactose
seul [gal+] poussent

c) Mutants de résistance

Résistance à des antibiotiques...

Ex : mutants résistants [cana^r] à la canavarrine et SSR sensibles [cana^s]

Crible de sélection :



Milieu sans canavarrine

milieu sélectif : MM avec canavarrine
Crible positif → on sélectionne ce qui pousse sur ce milieu.

d) Mutants affectés par le cycle cellulaire

Ils sont incapables de se diviser correctement par mitose : les mutations sont souvent létales. Sélection de mutation conditionnelle : le phénotype mutant ne s'exprime que dans certaines conditions de culture. SSR : [div+] alors que mutants : [div-]

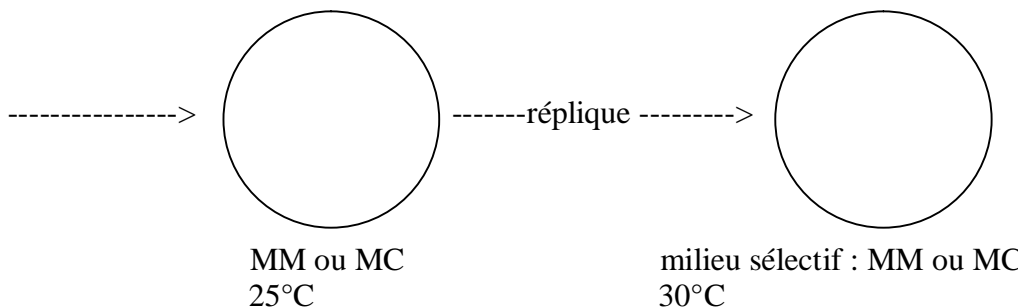
Mutation thermosensible :

SSR	Gène a	Allèle a+	Protéine cycline N fonctionnelle	[div+]
Mutant thermosensible	Gène a	Allèle a1	25°C → cycline fonctionnelle	[div+]
			30°C → cycline non fonctionnelle	[div-]

25°C → température permissive alors que 30°C est une température restrictive.

Mutation cryosensible (c'est la mutation inverse)

A 25°C on a [div+] alors qu'à 20°C on a [div-]



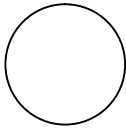
L'apparition de mutant spontané est de faible fréquence. La mutagenèse augmente cette fréquence grâce à un traitement. Il existe 2 classes, celle qui :

- induit substitution de base → modification → mésappariement → répllication mutante
- induit lésion de ADN : cassure à l'origine de délétion, translocation, inversion.

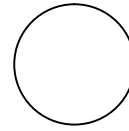
Quelques mutagènes peuvent induire des micro délétions. Les mutagènes biologiques sont des éléments transposables. Si le transposon se fixe dans un gène il l'inactive.

Expérience de mutagenèse : on utilise une culture bactérienne [sm^s] (sm = streptomycine)

Dilution
Étaler 0,1 ml par boîte



Milieu sans sm → [sm^s] et [sm^r] poussent



milieu avec sm → crible positif [sm^r] pousse

Les résultats sont page 26.

D'abord on cherche les caractères de la culture de départ :

[Cellule] dilution 10⁻⁶ → 100 colonies par 0,1 ml étalé → il y a 10⁹ cellules par ml.

Il faut ensuite estimer la fréquence des mutants spontanés :

D1, 4 colonies/0,1 ml → 40 cellules/ml → fréquence = [sm^r] / ([sm^s] + [sm^r]) = 40 · 10⁻⁹

Il faut estimer l'efficacité de la mutagenèse :

Le traitement a 2 effets : effet mutagène ou létale. Il faut trouver un juste milieu. L'effet létal est estimé par le taux de survie :

(Nombre de cellules vivantes après UV) / (Nombre de cellule de départ)

Il y a 100 fois moins de cellule avant que après donc le taux de survie est de 1%.

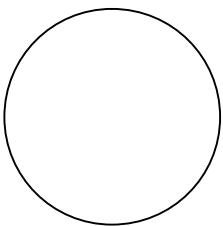
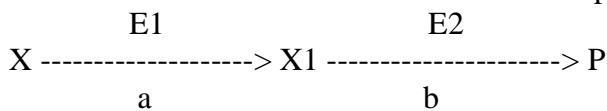
Effet mutagène : fréquence des mutants induit par les UV :

[sm^r] / ([sm^s] + [sm^r]) = 1000 / 10⁷ = 10⁻⁴

On passe de 4 · 10⁻⁸ à 10⁻⁴ → efficacité de la mutagenèse : 10⁻⁴ / 4 · 10⁻⁸ = 2500

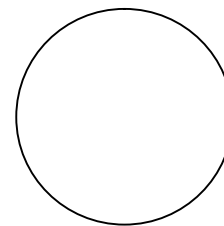
La fréquence des mutants est différente de celle des mutations car la fréquence des mutations est la probabilité pour avoir un événement mutationnel.

Mutant indépendant : on dit que 2 mutants sont indépendants q'ils sont issus d'événements mutationnels différents. Les mutants non indépendants sont issus du même événement mutationnel.



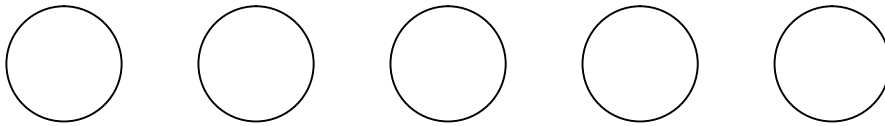
Milieu avec P

Sur 10 mutants dans une boîte on risque de n'en obtenir que 3 différents.



milieu sans P

Pour obtenir des mutants différents :



Etalement sur MM avec P, réplique sans P. On récupère un mutant par boîte, ils sont indépendants.

Mutagène : 5 mutants pour un phénotype donné X tous mutés dans le même gène.

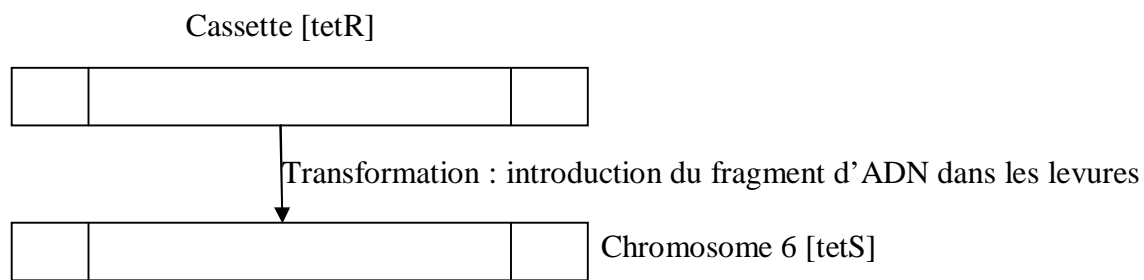
1 – 1 seul gène est impliqué dans le phénotype X.

2 – On a isolé 5 fois le même mutant

Mutagenèse aléatoire : elle apparaît n'importe où dans le gène

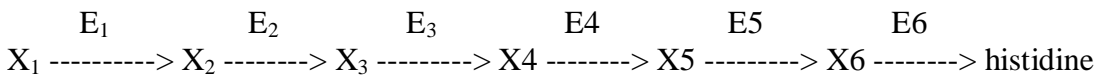
Mutagenèse dirigée : on cible un locus dans le génome.

Séquençage du génome → gène Z codant pour une protéine de fonction inconnue → Mutagenèse dirigée pour inactiver Z → phénotypes des mutants d'inactivation de Z.



On obtient un chromosome 6 [tetR]

Analyse fonctionnelle : voie de biosynthèse de l'histidine multi étape :



Document p27 : 12 mutants indépendants auxotrophes pour l'histidine.

Quel gène touché ? Combien de gène ?

Expérience de sauvetage du phénotype mutant par un intermédiaire réactionnel de la voie

- mutation en amont de X3 : sauvetage du phénotype par ajout de X3
- mutation en aval de X3 : pas de sauvetage

Il y a 10 mutants en amont pour l'histidinol donc on peut dire qu'il est plutôt en fin de chaîne. On dose les IR excrétés dans le milieu par les mutants. S'il n'y a pas de synthèse de X3, alors X2 et X1 s'accumulent car ils sont tous en équilibre.

M 1, 2, 5, 9,11 → pas de sécrétion de produit car blocage en amont des 4 IR → début de la chaîne.

M3 → bloqué en aval de IGP et c'est le 1^{er}.

D'où : X --->...----> IGP --->...----> IAP --->...----> HP --->...----> HOL --->...----> histidine

M 1, 2, 6, 9,11 3 4, 7,12 10 5,8

Il y a donc au moins 5 gènes impliqués dans la biosynthèse de l'histidine.

Les mutants 1, 2, 6, 9,11 sont-ils mutés dans le même gène ?

On réalise un test génétique :

1- test de dominance – récessivité : on croise MX avec SSR

2- test de complémentation fonctionnelle (TCF) : on croise MX et MY récessifs

On travaille sur des cultures haploïdes durant toute la mutagenèse. Avant le TCF il faut obligatoirement réaliser le test de dominance.

1 – On croise MX et SSR de type sexuel opposé :

MX (n) (a) [his+] * SSR (n) (b) [his-] → 2n [his+] → [his+] dominant par rapport à [his-]
[his-] → [his-] dominant par rapport à [his+]

Ce n'est pas toujours le phénotype de SSR qui est dominant.

MX est un simple mutant sur le gène a → allèle a1

SSR → allèle a+

On obtient le diploïde suivant : (a+//a1) → [his-]

La mutation a1 entraîne la perte de la fonction de l'enzyme E1 → codon stop prématuré. L'enzyme fixe X1 mais ne le transforme pas en X2

2 – Les mutants sont-ils mutés dans le même gène ? TCF Document p28

MX (n, a) [his-] * MY (n, α) [his-] → (2n) phénotype?

1^{er} cas : MY et MX mutants simples pour le même gène a

M1 [his-] a1 * M2 [his-] a2 → 2n (a1//a2) [his-]

→ M1 et M2 ne complètent pas

→ M1 et M2 ont un gène muté en commun

→ M1 et M2 appartiennent au même groupe de complémentation.

2^e cas : MX et MY simples mutants pour 2 gènes différents avec différents phénotypes récessifs.

M1 [his-] (a1, b+) * M3 [his-] (a+, b1) → 2n (a+//a1 ? b1//b+) [his+]

→ M1 et M3 complètent

→ M1 et M3 mutés sur 2 gènes différents

→ M1 et M3 appartiennent à 2 groupes de complémentation différents.

M4 : phénotype dominant par rapport à SSR :

M1 [his-] (a1, b+) * M4 [his-] (a+, b2) → 2n [his-]

→ Pas de complémentation d'un mutant dominant même si la mutation a lieu sur des gènes différents.

Cas de doubles mutants avec un phénotype récessif :

M5 (a3, b3) * M1 (a1, b+) → 2n (a3//a1 b3//b+)

→ M5 et M1 appartiennent au même groupe de complémentation

→ Ils ont un gène en commun.

M5 (a3, b3) * M7 (a+, b7) → 2n (a3//a+ b3//b7)

→ M5 et M7 appartiennent au même groupe

→ Ils ont un gène muté en commun

Interprétation des documents : 12 mutants mais on ne tient pas compte de M11 car il est dominant.

On regarde MX * SSR : tous les mutants sauf M11 sont récessifs par rapport à SSR

Groupe	Mutant	Gène
I	1, 2	A
II	3	B
III	4, 7, 12	C
IV	5, 8	D
V	6, 9	E
VI	10, 12	F

M1 ne complémente pas avec M2
M4 ne complémente pas avec M7 et M12...
M12 appartient à 2 groupes → double mutant
Il y a au moins 6 gènes impliqués dans la biosynthèse de l'histidine.

IV- Clonage d'un gène par complémentation fonctionnelle

Identification de gène impliqué dans la chaîne de biosynthèse de l'adénine chez l'homme. On l'utilise pour cloner des gènes chez d'autres organismes. On dispose de mutants [ade-] de levure (haploïde) : mutation du gène a, allèle a1. On dispose d'une banque d'ADN complémentaire humaine : c'est une collection de plasmide fabriquée chez des bactéries. Elle est construite dans un vecteur navette c'est-à-dire qu'il peut aller dans plusieurs hôtes. Ici il peut aller dans la bactérie et dans la levure. Cela nécessite 2 éléments : 2 origines de réplifications différentes et 2 marqueurs de transformations différents. On utilise un plasmide contenant l'allèle sauvage du gène a. On réalise une transformation de la levure. On sélectionne les transformants [ade+]. On parle de diploïde partiel (nérodiploïde) car seul un gène est diploïde, les autres sont toujours haploïdes. On réalise un sauvetage du phénotype mutant par rapport au gène homologue humain. On extrait le plasmide des levures, on séquence le gène sauvage humain. Le mutant doit être récessif pour réaliser cette expérience.

Combien de gènes sont mutés ?

Où sont-ils localisés ?

Pour cela on réalise une cartographie génétique. La localisation est basée sur la ségrégation des gènes au cours des méioses.

Mitose : (a1//a+) → S → (a1//a1, a+//a+) → M → (a+, a+) + (a1, a1)
2 chromosomes 2 chromosomes 2 cellules : 2 chromosomes
1 chromatide 2 chromatides 1 chromatide

Méiose : (a1//a+) → S → (a1//a1, a+//a+) → M1 → (a+, a+) + (a1, a1) → M2 → 2*(a+) + 2*(a1)

La méiose est source de diversité génétique → brassage inter chromosomique. C'est la façon dont les bivalents se disposent lors de la M1.

Les parents : P1 (a+ ; b+) * P2 (a1 ; b1) - 2 couples d'allèles (2 gènes sur 2 chromosomes différents)

On peut obtenir : 2 cellules (a+ ; b+) et 2 cellules (a1 ; b1) → génotypes parentaux

2 cellules (a+ ; b1) et 2 cellules (a1 ; b+) → génotype recombinant R.

Il y a 2ⁿ possibilité avec n = nombre de paire de chromosomes.

Brassage intra chromosomique → crossing over (a et b sur le même chromosome)

La probabilité des crossing over dépend de la distance entre les gènes considérés.

P1 (a+, b+) * P2 (a1, b1) → (a1, b1 ; a+, b+) → (a1, b1//a1, b+ ; a+, b1//a+, b+) → P1 (a+, b+)
P2 (a1, b1)
R1 (a1, b+)
R2 (a+, b1)

Le mutant est-il un simple mutant ?

M1 (a1) * SSR (a+) → (a1//a+) → ME → 2* (a1), 2* (a+)
 → On a que des génotypes parentaux en proportions égales (50%)
 → On a donc un mutant simple.
 → Ségrégation 1/2 1/2

Croisement de 2 souches qui diffèrent par plus d'un couple d'allèle

M [his-] * SSR [his+] → 2n → ME → pas de ségrégation

→ Le mutant diffère de SSR par au moins 2 gènes
 → On teste l'hypothèse du double mutant.

Gène a, allèles a1 et a+

Gène b, allèles b1 et b+

M (a1, b1) * SSR → (a1//a+) et (b1//b+) → (a1, b1) ; (a+, b+) ; (a1, b+) ; (a+, b1)

→ Résultat document page 31.

a et b sur 2 chromosomes différents : P=R

$$\% R = R / (P+R) * 100 = 50 \%$$

→ a et b sont génétiquement indépendants

→ a et b sont physiquement indépendants

Document page 32

a et b sont sur le même chromosome :

a et b relativement proche sur le chromosome : majorité des méioses sans CO → spores P
 P > R

% R << 50%

→ a et b sont génétiquement liés

a et b éloignés sur le chromosome : toutes les méioses impliquent au moins 1 CO

P = R.

% R = 50%

→ a et b sont génétiquement indépendants mais physiquement liés.

% R << 50% → génétiquement lié

**% R = 50 % → indépendant génétiquement : ils sont sur 2 chromosomes différents
 ils sont très éloignés sur le même**

Mutants [his-] : M1 M2 M3

M1 * SSR → diploïde [his+] → ME : 223 spores [his-] et 227 [his+]

→ Ségrégation 1/2 1/2 → simple mutant

M2 * SSR → diploïde → ME : 75% [his-] et 25% [his+]

→ pas de ségrégation : M2 et SSR diffèrent par au moins 2 gènes a et b.

M2 (a1, b1) * SSR → P1 : (a1, b1) P2 : (a+, b+) R1 : (a1, b+) R2 : (a+, b1)

[his-] : 25 [his+] : 25 [his-] : 25 [his-] : 25

→ M2 muté sur 2 gènes indépendants génétiquement.

M3 (c1, d1) * SSR → 60 [his-] et 40 [his+]

% R = 20 %

P1 : (c1, d1) P2 : (c+, d+) R1 : (c1, d+) R2 : (c+, d1)
 40 40 10 10

→ M3 muté sur 2 gènes liés génétiquement.

Distance génétique : centimorgan (cM)

1 cM = taille de l'intervalle pour lequel 1 produit sur 100 de la méiose est issu d'un évènement de crossing over.

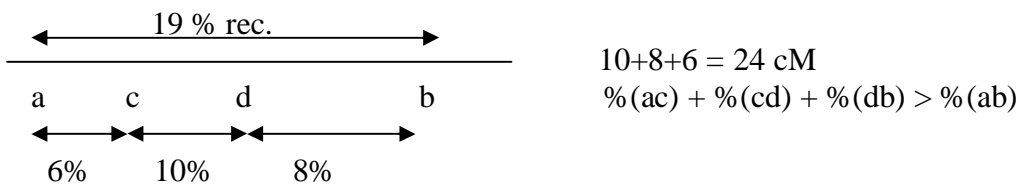
Relation entre % de recombinés et distance génétique :

- gène suffisamment proche : d (cM) = % recombinés (jusqu'à 10%)
- gène éloigné : CO multiples et génèrent des spores P issues d'évènements de recombinaisons. d (cM) > % recombinés
 $d \text{ (cM)} = -50 \ln(1 - 2FR)$ où FR = % recombinés

% recombinés > 10% → d (cM) >> % recombinés.

%rec. = sous estimation de la distance génétique.

Carte génétique de proche en proche :



Document page 28

S'agit-il d'une ségrégation 1/2 1/2 ?

[ade- leu- his- lys-] * [ade+ leu+ lys+ his+] → diploïde → analyse de spores en vrac

Apparition de nouveaux phénotypes donc il ne s'agit pas d'une ségrégation 1/2 1/2

→ Les 2 souches diffèrent par plus d'un gène.

Analyse des 4 phénotypes séparément :

On étudie l'auxotrophie pour l'adénine : [ade-] = 512 spores et [ade+] = 488 spores

→ Ségrégation 1/2 1/2

→ 1 gène impliqué.

Test du χ^2 :

	[ade-]	[ade+]	$\chi^2 = [(512 - 500) / 500]^2 + [(488 - 500) / 500]^2 = 0,576$ α : risque de rejeter H_0 alors que c'est vrai, $\alpha=5\%$ Ddl = n-1 = 1 χ^2 (table) = 3,841
Effectif observé	512	488	
Effectif théorique	500	500	

χ^2 (obs.) < χ^2 (table) donc H_0 est validée au risque α .

Pour les 3 autres phénotypes on obtient une ségrégation 1/2 1/2

→ Chaque phénotype est contrôlé par un gène

→ Il y a donc au plus 4 gènes impliqués.

Positionner les gènes les uns par rapport aux autres : analyse des phénotype 2 à 2

Gène a → allèles a1 et a+ → adénine

Gène b → allèles b1 et b+ → histidine
 Gène c → allèles c1 et c+ → lysine
 Gène d → allèles d1 et d+ → leucine

On étudie les gènes b et d :

[his- leu-] * [his+ leu+] → diploïde → (b1d1) (b+d+) (b1d+) (b+d1)
 b1 d1 b+ d+ [his- leu-] [his+ leu+] [his- leu+] [his+ leu-]

Phénotype	[his- leu-]	[his+ leu+]	[his- leu+]	[his+ leu-]
Effectif	390	386	112	112

% R = 22,4% << 50%
 → b et d génétiquement lié
 d > 22,4 cM.

%(ab) = 35,6 → lié d > 35,6

%(ac) = 37,7 → lié d > 37,7

%(ad) = 47,4 → indépendant

%(bc) = 5,1 → lié d > 5,1

%(bd) = 22,4 → lié d > 22,4

%(cd) = 18,7 → lié d > 18,7

d (ad) > 35,6 + 5,1 + 18,7

On peut également analyser des ségrégations pour faire des cartes génétiques pour des marqueurs polymorphiques de type RFLP et séquences microsatellites.

V- Cartographie des gènes

Polymorphisme RFLP : présence site de restriction → allèle a1 = présence ; allèle a2 = abs

Polymorphisme microsatellites : marqueurs génétique pour analyse de ségrégation cartographie génétique. Ils sont multialléliques.

Unité : pb → position précise d'1 locus sur 1 K.

Différents niveau de résolution : sur quel chromosome et sur quel bras ?

Technique Fluorescent In Site Hybridation : marquage avec fluochrome une sonde puis hybridation sur K en métaphase. Grand fragment d'ADN → découpage du génome en grands fragments (enzyme de restriction)

- 1- Migration sur gel d'agarose (électrophorèse en champs pulsé (alternance de 2 champs électriques dans des directions différentes)
- 2- Transfert du gel sur membrane
- 3- Hybridation avec la sonde
- 4- Carte de restriction

Clonage du gène : marque sur le chromosome

- 1- Etalement de la banque
- 2- Criblage de la banque :
 - Sonde x pour récupérer les clones contenant un fragment d'ADN avec la séquence x
 - Sonde y pour récupérer les clones contenant un fragment d'ADN avec la séquence y
- 3- Ordonner les clones
- 4- 2 étapes de marque sur le chromosome

Intérêt de la cartographie : Comparaison carte génétique et carte physique

- Au sein d'un même organisme (p.34)
 - Entre chromosome (taille en cM et en kb) : ≠ entre les K car la fréquence en CO n'est pas la même pour tous les chromosomes.

K 2 : distance entre a et b est de 0,5 cM et de 1kb } Fréquence en CO + élevée sur le K2. Variations
 K 4 : distance entre c et d est de 0,3 cM et de 1kb } dues aux états ≠ de la chromatine

- Sur ≠ régions d'1 même K : régions proches centromère subissent moins de CO.
- Comparaison entre la levure et l'homme : levure 2kb = 1 cM alors Homme 1kb = 1cM
- Comparaison entre organismes sexués : CO – fréquent chez males que chez femelles. Abs de CO chez la drosophile male.

VI- Etude de la souris

Phénotype étudié : couleur du pelage

SSR : pelage noir

Mutants A, B, C : pelage tacheté

Déterminisme génétique de ce phénotype dans les souches mutantes

Test de dominance – récessivité :

Male S [noir] * Femelle M [tache] → F1 : [tache] = 100% → dominance
 [noir] = 100 % → dominance
 [intermédiaire] = 100% → codominance

A simple mutant sur gène a autosomique : F1 (a1//a+) → hétérozygote

TCF : comparaison des souches A, B et C entre elle

Male A (a1//a1, b+//b+) * femelle B (a+//a+, b1//b1) → 2* (a1//a+, b1//b+) [noir]
 → Mutation sur 2 gènes différents

Male A (a1//a1) * femelle C (a2//a2) → 2* (a1//a2) [tache]
 → Mutation sur le même gène

1^{er} cas : A simple mutant

SSR * A (a1//a1) → F1 (a+//a1)

Backcross : A (a1//a1) * F1 (a+//a1) → F2

→ Ségrégation ½ ½

→ Mutation sur un gène

F1 (a+//a1) * F1 (a+//a1) → F2

[noir] = ¾

[tache] = ¼

	a1	%
a+	(a+//a1)	50
a1	(a1//a1)	50

	a1	a+
a+	(a+//a1)	(a+//a+)
a1	(a1//a1)	(a1//a1)

2e cas : A double mutant

SSR * A (a1//a1, b1//b1) → F1 (a+//a1, b1//b+)

Backcross : A (a1//a1, b1//b1) * F1 (a+//a1, b1//b+) → F2

	(a1, b1)
a+,b+	(a+//a1; b+//b1)
a1,b1	(a1//a1; b1//b1)
a1, b+	(a1//a1; b+//b1)
a+, b1	(a+//a1; b1//b1)

Cas de gènes sur le chromosome X : croisement réciproque

Femelle C (c1//c1) * male SSR (c+//Y) → Femelle F1 (c1//c+) [noir]

Male F1 (c1//Y) [tache]

→ Croisement informatif

Male C (c1//Y) * femelle SSR (c+//c+) → Femelle F1 (c1//c+) [noir]

Male F1 (c+//Y) [noir]

→ Non informatif