

Figure 1 : Quelques exemples d'allèles responsables de β -thalassémie et les populations concernées (d'après A syllabus of Thalassemia Mutations

[<http://globin.cse.psu.edu/html/huisman/thals/contents.html>]).

Type de mutation		Localisation géographique majoritaire
Mutation ponctuelle faux sens	Nucléotide 87 : C $\rightarrow$ G C $\rightarrow$ T	Méditerranée Allemagne, Italie
Mutations ponctuelle non sens	Codon 15 : UGG $\rightarrow$ UAG (stop) UGG $\rightarrow$ UGA (stop)	Inde, Turquie Portugal
Mutation décalant le cadre de lecture	Délétion d'un nucléotide Codon 1 : -G Codon 14 : +G	Méditerranée Chine
Mutations perturbant l'épissage des introns	Intron 1 : G $\rightarrow$ C	Europe, Amérique du Nord, Tunisie
Mutations modifiant les propriétés de l'ARNm	AATAAA $\rightarrow$ AAAAAA	France
Insertion d'un rétrotransposon	Insertion de 6kb dans l'intron II	République Tchèque

Figure 2 : Formation d'une mutation ponctuelle par désamination

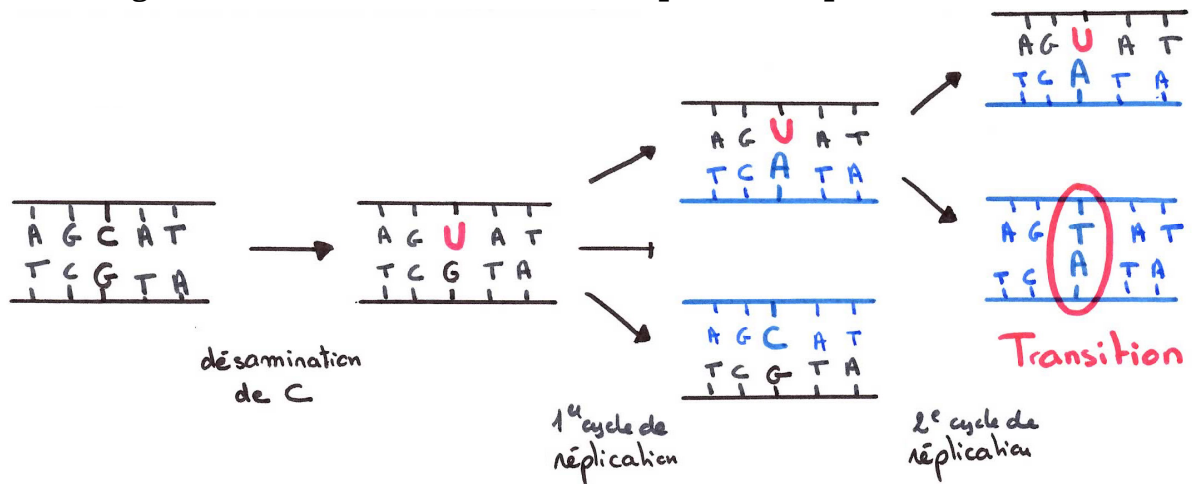
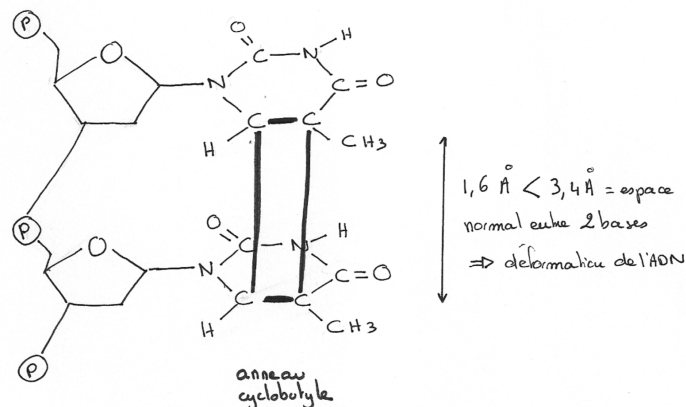
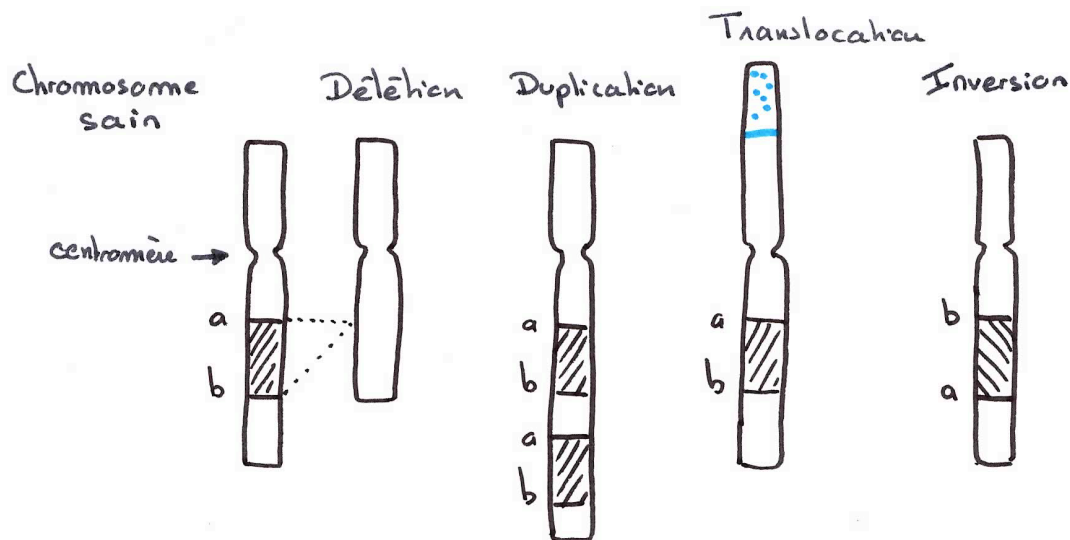


Figure 3 : dimère de thymine



Dimère de thymine formé par irradiation UV (les 2 thymines sont adjacentes)

Figure 4 : Différents types de mutations affectent la structure des chromosomes**Figure 5 : Les conséquences des mutations**

Type de mutation	Origine	Conséquence	Exemple
Décalage du cadre de lecture	Insertion ou délétion d'un nombre de nucléotides non multiple de 3	Séquence de la protéine totalement modifiée à partir de la mutation	β -thalassémie
Mutation silencieuse	Le codon muté code le même acide aminé (redondance du code génétique)	La séquence de la protéine est identique.	voir figure 6
Mutation neutre	Le codon muté code un autre acide aminé fonctionnellement équivalent	Les conséquences dépendent de la position et du type de mutation	
Mutation faux-sens	Le codon muté code un autre acide aminé non équivalent	Les conséquences dépendent de la position et du type de mutation.	β -thalassémie, drépanocytose Voir étude de document 1
Mutation non-sens	Le codon muté est un codon stop	La synthèse de la protéine s'arrête au niveau du codon muté.	β -thalassémie
Mutation à effet quantitatif	La mutation se situe dans une région régulatrice	Soit absence de synthèse = mutation perte de fonction, soit surexpression ou activation constitutive = mutation gain de fonction	Chorée de Huntington (gain de fonction)

Figure 6 : Des mutations silencieuses pas si silencieuses(Chamary, J.V. et Hurst, L. (2009), *Pour la Science* **384**).

Les mutations silencieuses sont généralement décrites comme des mutations qui ne modifient pas le phénotype.

Dans les années 1980, les généticiens ont montré que ces mutations pouvaient entraîner un défaut de production de protéines chez les bactéries et les levures. Ces observations semblent paradoxales dans la mesure où ces mutations modifient un codon en un codon qui code le même acide aminé. Que se passe-t-il ? Il faut rappeler que les ARNt qui reconnaissent les différents codons d'un même acide aminé (ARNt isoaccepteurs) ne sont pas présents en quantité égale dans une cellule. Ainsi, un ARNm possédant des codons reconnus par des ARNt abondants sera rapidement traduit. Au contraire la présence d'un codon reconnu par un ARNt peu abondant freinera la synthèse de la protéine.

Il a été montré chez différents organismes (drosophile, vers, certains végétaux...) que les codons des protéines les plus abondantes étaient ceux reconnus par les ARNt les plus abondants. Ceci permet donc d'augmenter l'efficacité de la traduction.

Et chez l'Homme, qu'en est-il ?

Depuis les années 2000, on a identifié différentes mutations silencieuses à l'origine de maladies génétiques. Les mécanismes sont différents de ceux des bactéries, levure, végétaux. Deux exemples sont présentés :

- certaines mutations silencieuses sont localisées dans des séquences nécessaires au bon épissage des introns. Ces mutations se situent au niveau des sites de reconnaissances des limites des exons. Elles entraînent des défauts d'épissage.
- certaines mutations silencieuses modifient les structures secondaires des ARNm. Or, les appariements (tige-boucle) d'une molécule d'ARNm déterminent sa stabilité et donc sa durée de traduction. Ces mutations modifient la durée de vie des ARNm.

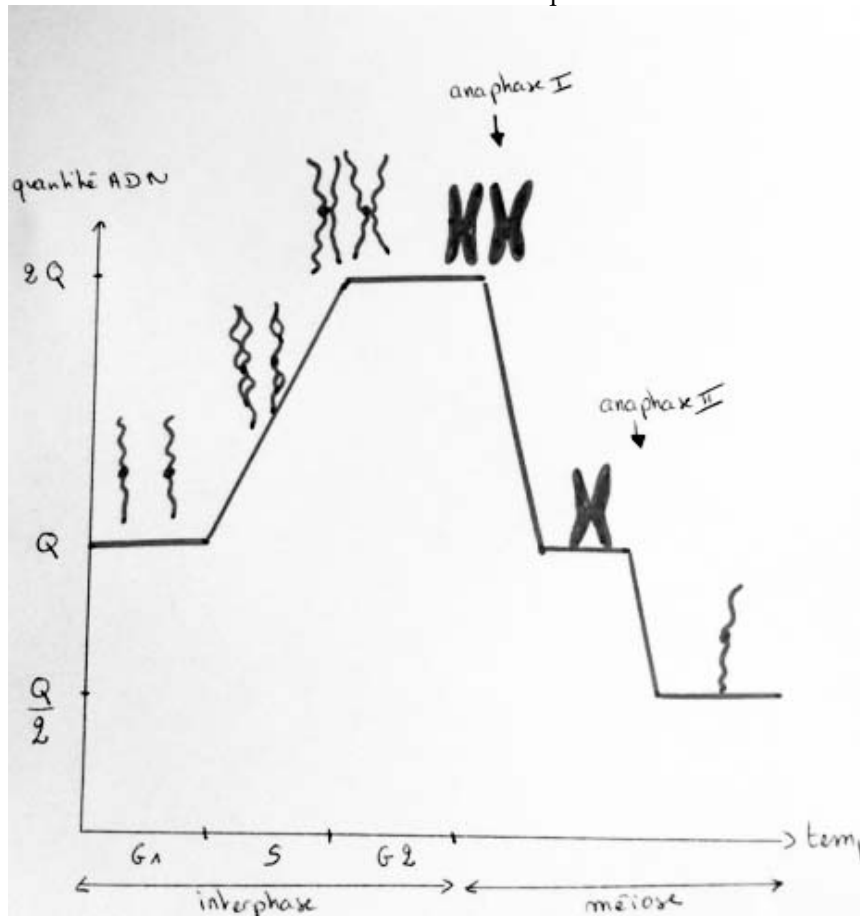
Au total, plus de cinquante maladies chez l'homme résulteraient de mutations silencieuses (maladie de Hirschprung, syndrome de Marfan, phénylcétonurie...)

Figure 7 : *Sordaria* et *Drosophila melanogaster*, deux organismes modèles

	<i>Sordaria macrospora</i> (haplonte)	<i>Drosophila melanogaster</i> (diplonte)
Cycle de vie court	Quelques semaines	10 jours à 25°C
Petite taille de l'organisme	Culture sur boîtes de gélose	Taille adulte : 3mm, élevage dans de petits tubes
Nombre d'individus	Un zygote forme plusieurs centaines de spores	Une femelle pond 40 œufs / jour
Caractéristiques du développement	périthèces (fructifications)	Développement externe, tissus transparents
Génome de petite taille	39,8.10 ⁶ pb séquencé en 2010	180.10 ⁶ pb séquencé en 2000
Autres caractéristiques	Spores ordonnées (la position rend compte de la migration des chromosomes)	Chromosomes polyténiques (glandes salivaires)

Figure 8 : Evolution de la quantité d'ADN au cours de la méiose.

L'état de condensation relatif des chromosomes est représenté au-dessus de la quantité d'ADN.



**Figure10 : les échanges de matériel génétique au cours de la prophase I
(à titre de doc, hors programme)**

La prophase comprend 5 stades:

- **leptotène (de leptos : fin et tene : ruben)**: les chromosomes homologues se rapprochent grâce à des interactions entre leurs télomères et des protéines de la lamina. On observe également une duplication et migration des centrioles.
- **zygotène** : les chromosomes homologues s'apparient pour former un **complexe synaptonémal** qui permet d'aligner les chromosomes. Des cassures double-brin initient les événements de recombinaison entre les chromatides de deux chromosomes homologues ou crossing-over. Ces échanges de séquences conduisent à la formation de deux chromatides sœurs qui ne portent plus la même information : ils sont à l'origine du **brassage intra-chromosmique**.
- **pachytène** : les chromosomes homologues commencent à se séparer.
- **diplotène** : les chromosomes se libèrent de leur complexe synaptonémal. Les chiasmas ou crossing-over sont matérialisés par les points de connexion entre les chromosomes.
- **diacinèse** : les chromosomes ont une condensation maximale et ils migrent vers la plaque équatoriale. La diacinèse se termine avec la rupture de l'enveloppe nucléaire.

Figure 9 : la méiose

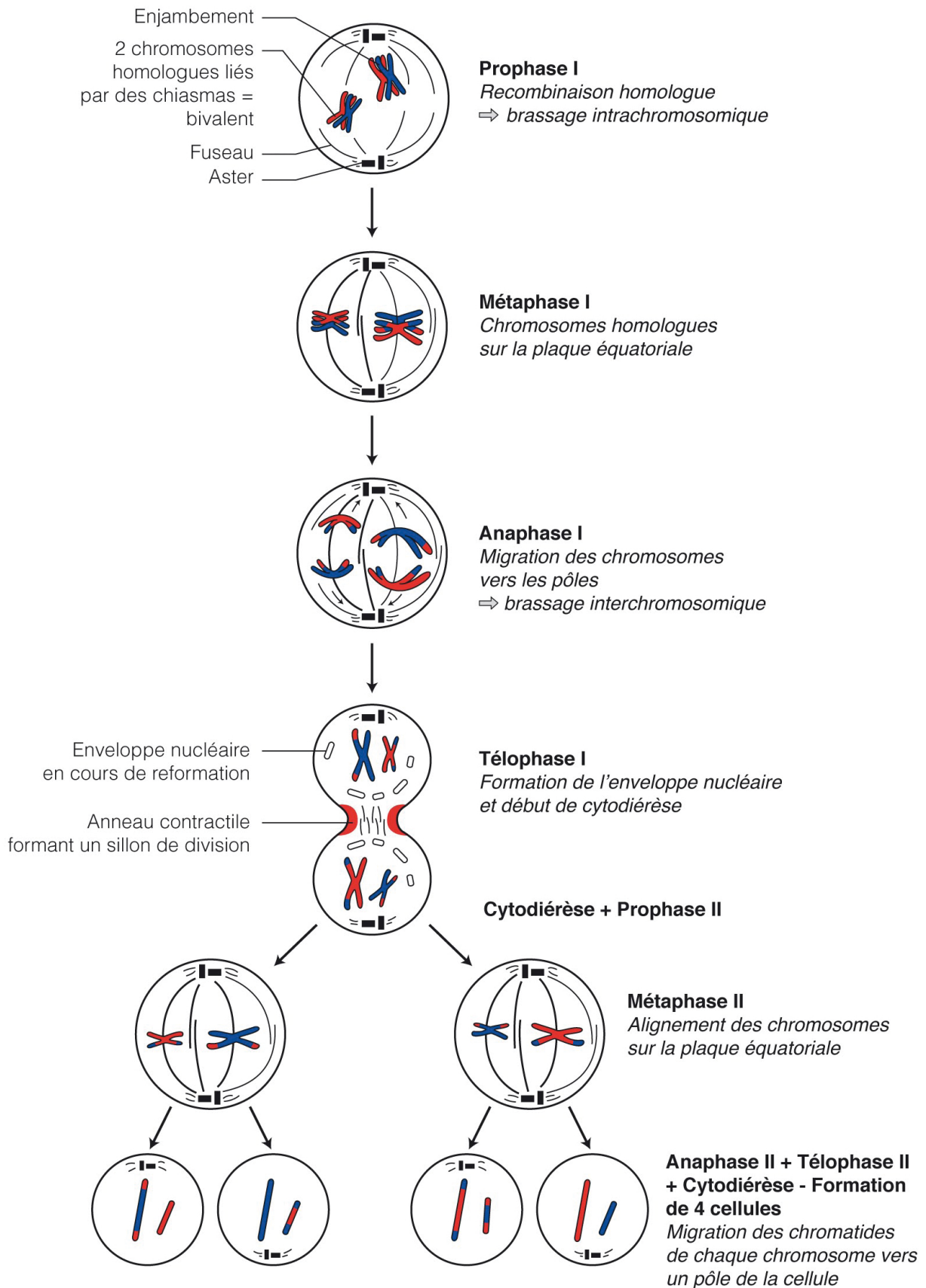


Figure 11 : comparaison mitose / méiose

	MITOSE	MEIOSE
Nombre de division	Une division donc deux cellules filles	Deux divisions : 4 cellules filles = les gamètes
Evolution de la quantité d'ADN	4q à 2q (2n chromosomes à 1 chromatide)	4q à q (n chromosomes à 1 chromatide)
Recombinaison	événements rares (recombinaison mitotique)	événements fréquents (prophase I)
Cytosquelette	Rôle dans la ségrégation correcte des chromatides et des chromosomes	

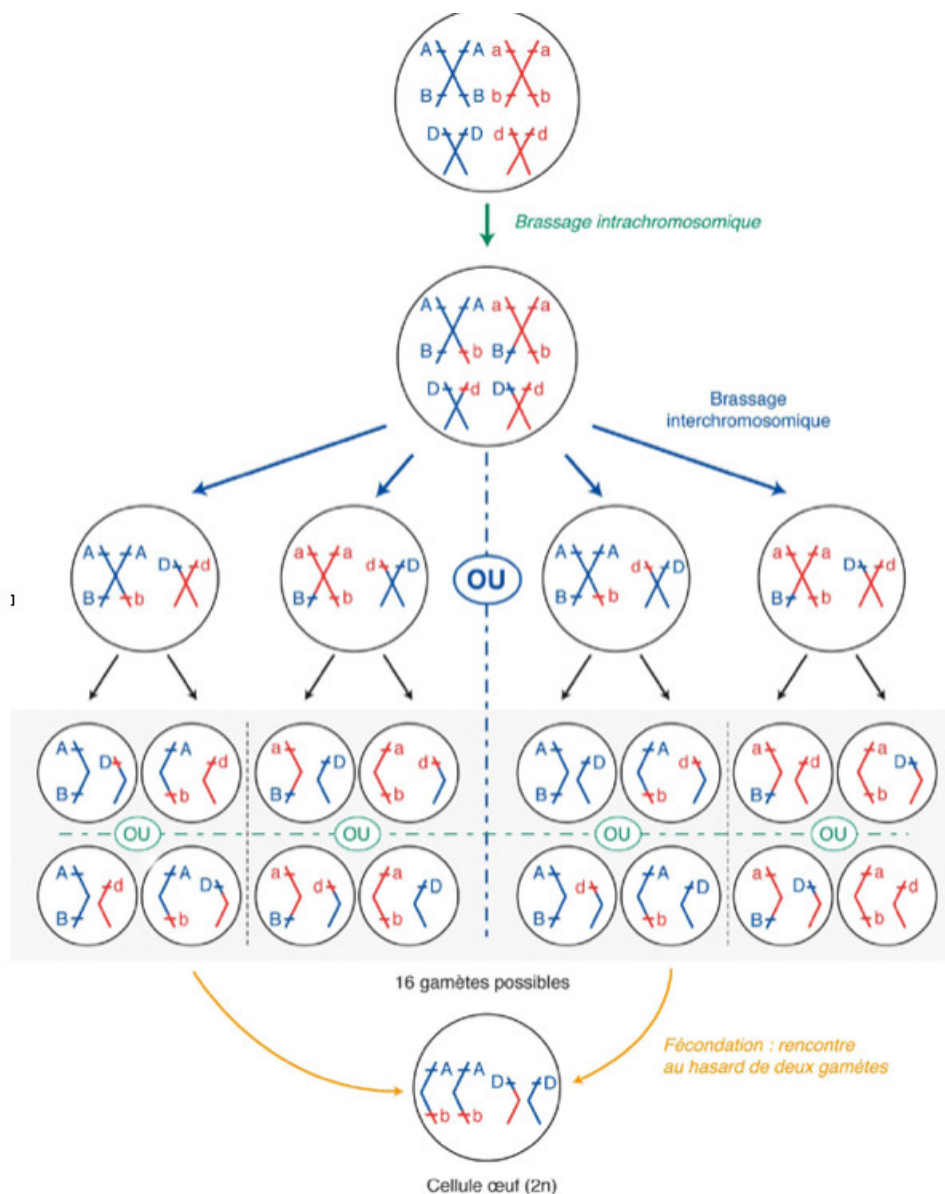
Figure 12 : les brassages mis en jeu au cours de la méiose et de la fécondation

Figure 13.a : Asques ordonnés obtenus par croisement entre une souche (AB) et une souche (ab).

AB AB ab ab	aB aB Ab Ab	AB aB Ab ab	aB AB Ab ab	AB aB ab Ab	aB AB ab Ab
Ab Ab aB aB	ab ab AB AB	Ab ab AB aB	ab Ab AB aB	Ab ab aB AB	ab Ab aB AB
AB Ab aB ab	aB ab AB Ab	AB ab AB ab	aB Ab AB ab	AB ab aB Ab	aB Ab aB Ab
Ab AB aB ab	ab aB AB Ab	Ab aB AB ab	ab AB AB ab	Ab aB aB Ab	ab AB aB Ab
AB Ab ab aB	aB ab Ab AB	AB ab Ab aB	aB Ab Ab aB	AB ab ab AB	aB Ab ab AB
Ab AB ab aB	ab aB Ab AB	Ab aB Ab aB	ab AB Ab aB	Ab aB ab AB	ab AB ab AB

Ces 36 asques correspondent à des DR (gris foncé), des DP (gris clair) et des T (blanc).

Figure 13.b : Formation des asques préréduits et postréduits dans le cas de deux gènes indépendants

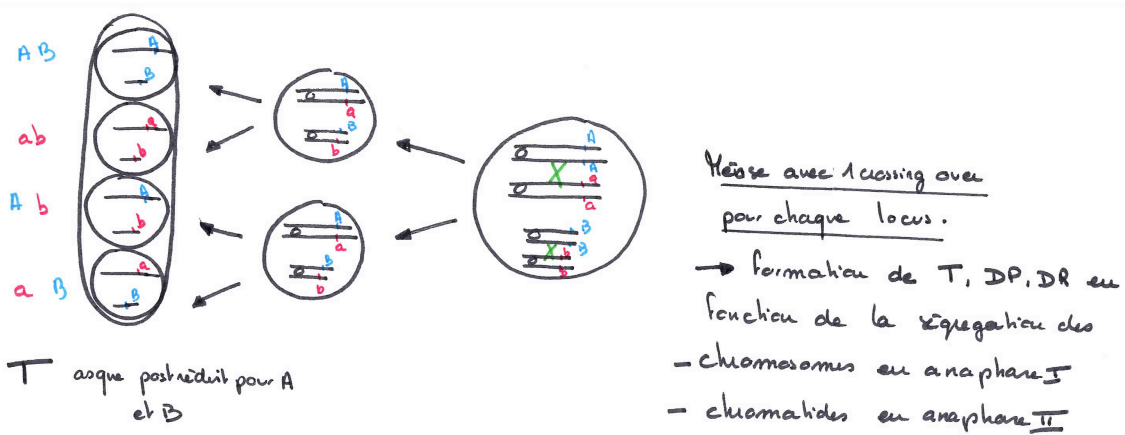
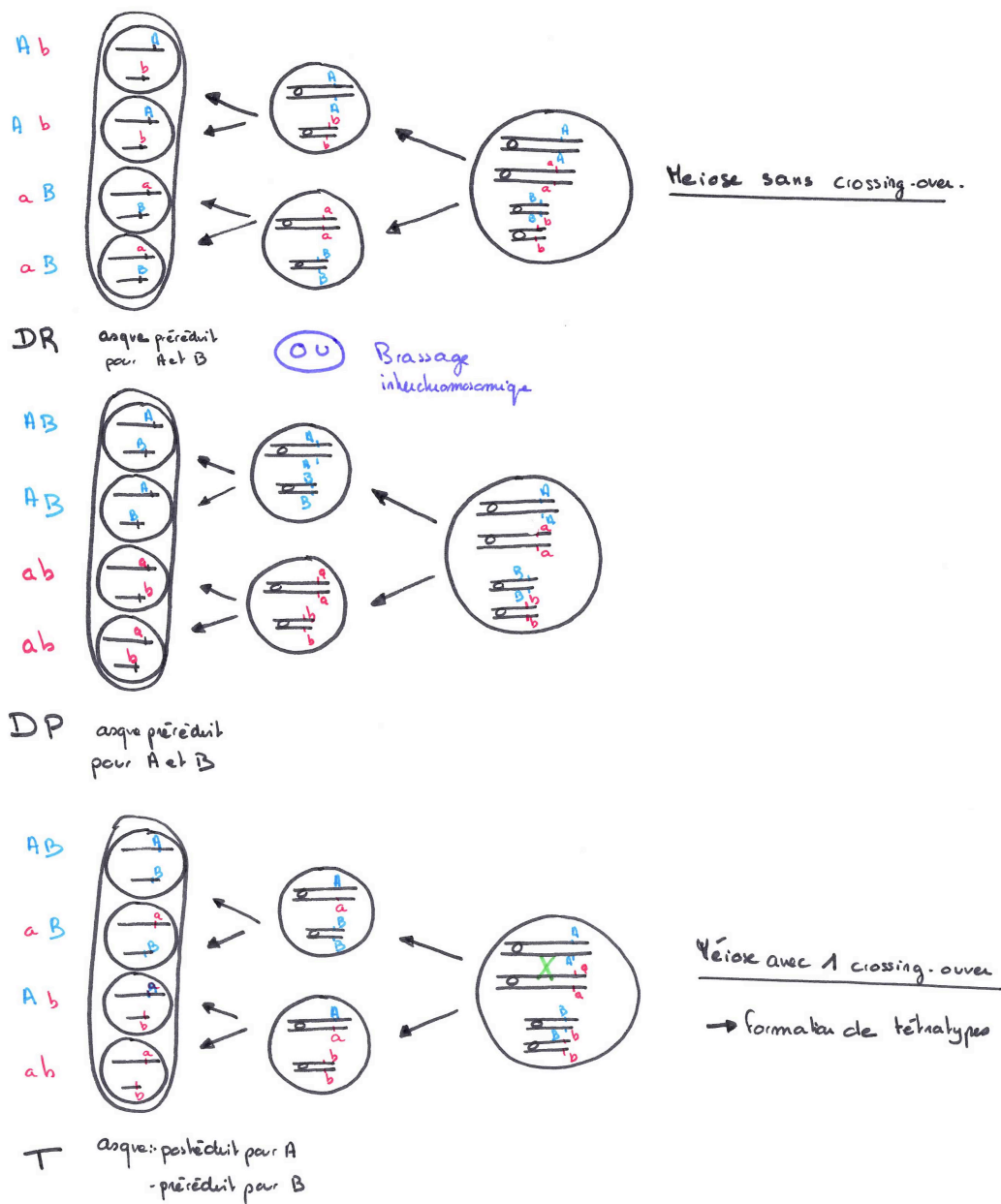
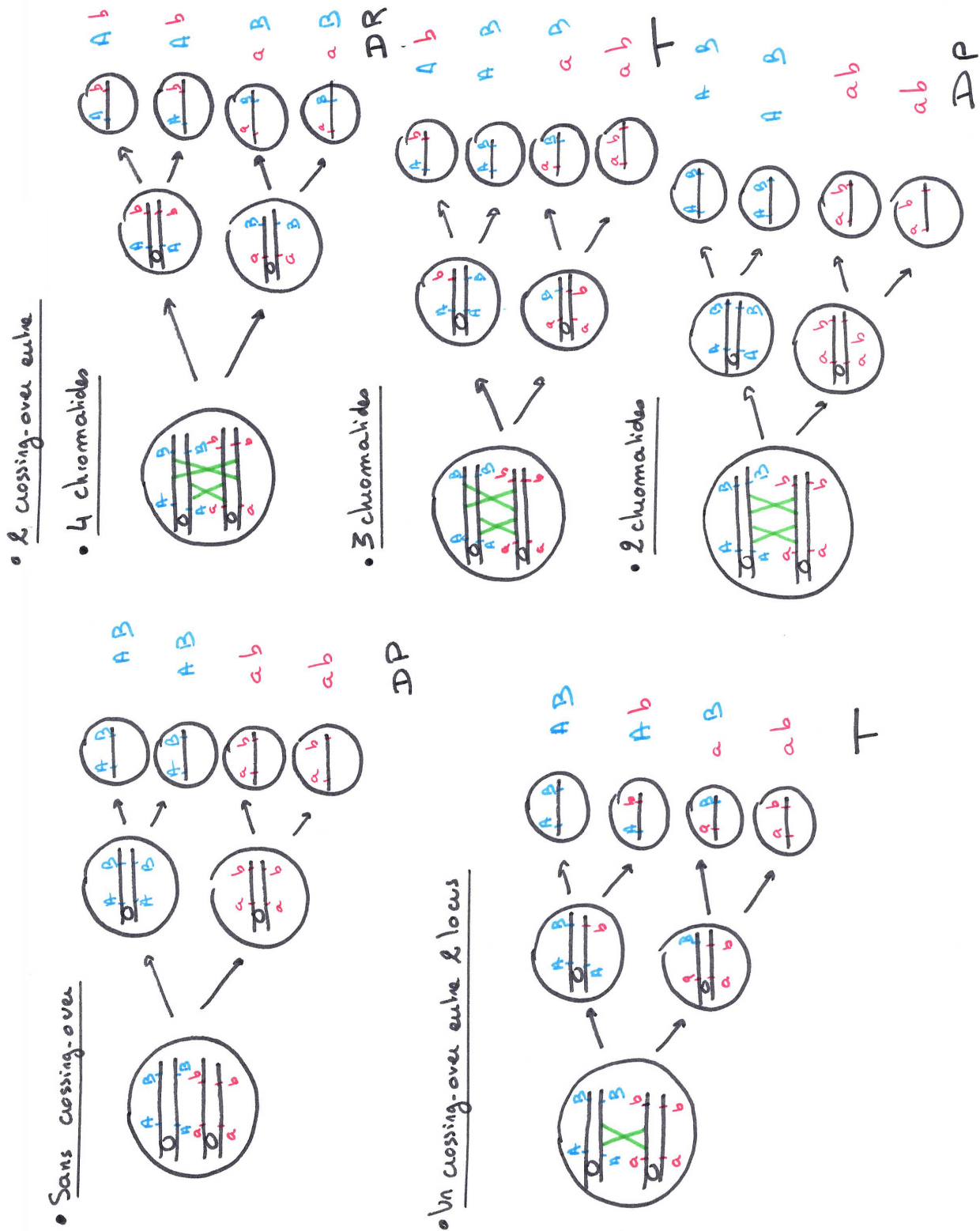


Figure 13.c : Formation des asques préréduits et postréduits dans le cas de deux gènes liés



Bilan du TP

Chez les organismes haploïdes : exemple de *Sordaria*

On s'intéresse à la transmission de deux gènes = dihybridisme.

Cas de deux gènes indépendants : pour chaque locus : → figure 13

- les asques dans lesquels l'allèle des 2 spores de chaque demi-asque est identique résultent d'une **méiose sans recombinaison**. Ces asques sont dits **pré-réduits pour ce locus**
- les asques dans lesquels l'allèle des 2 spores de chaque demi-asque est différent résultent de **crossing-over** au cours de la prophase I. Ces asques sont dits **post-réduits**.

La ségrégation aléatoire des chromosomes en anaphases I et II est responsable des différentes combinaisons entre allèles des deux locus et donc de la formation des DP, DR et T, comme le montre la figure 13.

Bilan

Les **tétratypes** résultent d'un **crossing-over** entre un seul des deux locus et son centromère ou avec un **crossing over affectant chaque locus**.

Les **DP et DR** sont le résultat d'une méiose **sans crossing-over** ou avec un **crossing over affectant chaque locus**.

Dans le cas de deux gènes indépendants, la reproduction sexuée permet donc la formation de nouvelles combinaisons alléliques et permet donc une diversification des génomes.

Remarque : dans le cas de gènes indépendants, les allèles n'ont aucune tendance particulière à rester ensemble. Le nombre de ditypes parentaux est égal au nombre de ditypes recombinés : **DP=DR**.

Cas de deux gènes liés :

Les proportions obtenues sont très différentes : le nombre de **ditypes parentaux est très supérieur** à celui des ditypes recombinés (**DP>>DR**). Les allèles présents chez les parents ont en effet tendance à rester unis au cours de la méiose.

Comment se forment les 3 types de tétrades dans ce cas ?

- les DP résultent de méioses sans crossing-over ou de méioses mettant en jeu 2 crossing-over entre deux chromatides uniquement.
- les T résultent de méioses mettant en jeu un seul crossing-over entre un locus et son centromère ou mettant en jeu deux crossing-over affectant 3 chromatides.
- les DR résultent de méioses mettant en jeu deux crossing-over affectant chacun un locus différent (donc 4 chromatides)

Bilan

Les **brassages intra et inter-chromosomiques réassocient des locus situés sur le même chromosome ou sur des chromosomes différents**.

Les résultats quantitatifs de croisement permettent de mesurer des distances génétiques entre les locus et leur centromère ou entre deux locus dans le cas où ils sont liés.

2. Chez les organismes diploïdes

Chez les diploïdes, chaque locus est présent en **deux exemplaires** : à partir du phénotype d'un individu, il n'est pas toujours possible de déterminer son génotype.

Prenons l'exemple d'un gène avec deux allèles A/a : on considère un individu hétérozygote [A/a]. Son phénotype peut être :

- (A) : dans ce cas l'allèle A est **dominant** sur l'allèle a, l'allèle a est **récessif**.
- (A,a) : dans ce cas on parle de **codominance**

Un même phénotype peut donc correspondre à plusieurs génotypes comme dans le cas des groupes sanguins chez l'homme, contrôlés par 3 allèles : A, B et O avec O récessif, A et B dominants sur O et A et B codominants. Dans cet exemple, le phénotype [A] peut correspondre aux génotypes (A,A) et (A,O).

Exemple de croisements : dihybridisme ou test cross.

Les croisements permettent également de calculer des distances entre locus ou entre un locus et son centromère.

Figure 14 : découverte de la conjugaison bactérienne**Doc1 : Expérience de Lederberg et Tatum (1946)**

Deux souches de bactéries mutantes incapables de se développer sur un milieu minimum (souches auxotrophes) sont isolées : on peut montrer que les mutations sont différentes d'une souche à l'autre :

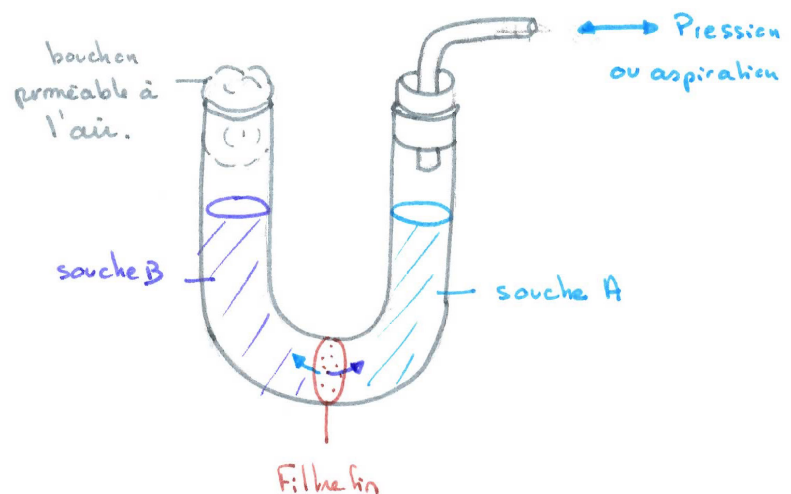
- la souche A ne pousse que sur un milieu minimum complété en méthionine et biotine : on la note de ce fait met- bio- thr+ leu+ thi+
- la souche B ne pousse que sur milieu minimum complété de leucine, thréonine et thiamine : elle est notée met+ bio+ thr- leu- thi-

Les bactéries sont cultivées ensemble dans un milieu complet (permettant aux deux souches de se développer) pendant une heure puis sont lavées et étalées sur milieu minimum.

Résultats : aucune souche de bactéries A et B ne se développe lorsqu'elle est cultivée seule. On observe en revanche quelques colonies lorsque les bactéries A et B sont cultivées ensemble.

Doc.2 : Etude de conditions nécessaires à la conjugaisonExpérience 1 (Davis 1950) :

La même expérience est réalisée mais les conditions de la co-culture sont modifiées. Les bactéries ne sont pas mises en contact directement dans un milieu de culture complet : chaque souche est placée dans un bras d'un tube en U, les deux bras communiquant au niveau d'un filtre (figure ci-contre).



Les bactéries sont lavées et étalées sur milieu minimum. Aucune colonie n'est observée.

Expérience 2 (Hayes, 1953)

L'expérience du document 1 est réalisée mais avant de mélanger les souches A et B, l'une d'entre elle est traitée à la streptomycine (antibiotique inhibant la division cellulaire).

Les résultats obtenus après étalement sur milieu minium sont donnés dans le tableau ci-dessous :

Protocole	Nombre de colonies obtenues sur milieu minimum pour 10^8 cellules étalées
Souche A traitée + souche B non traitée	8 à 10 colonies
Souche A non traitée + souche B traitée	Aucune colonie

Figure 15 : Conjugaison bactérienne chez des bactéries Hfr et F+

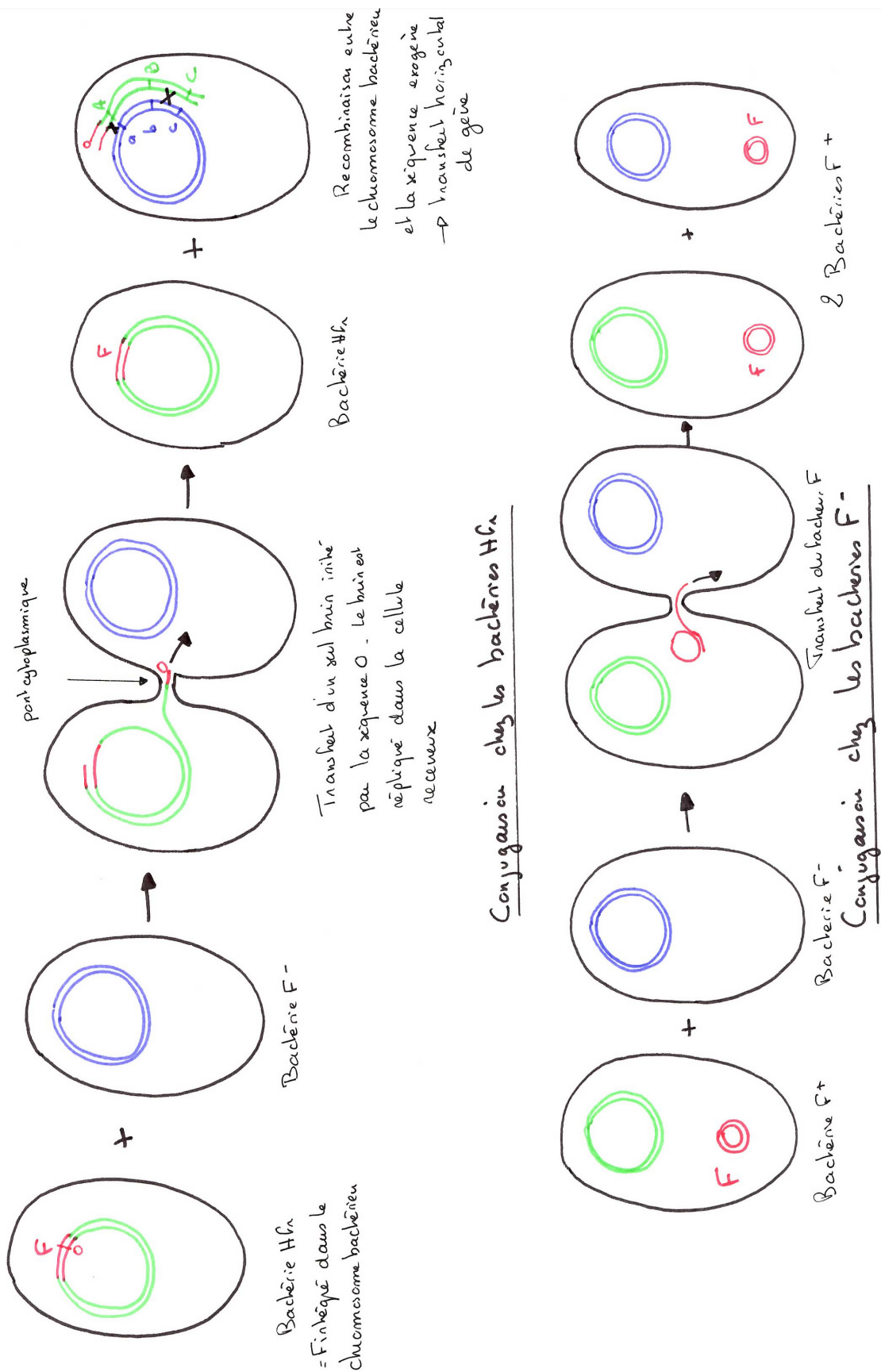




Figure 16 : cartographie du chromosome bactérien à partir d'expériences de conjugaison interrompue

En utilisant les données ci-dessous proposez une hypothèse pour expliquer les résultats de conjugaison interrompue.

On étudie la transmission de gènes d'une souche Hfr à une souche F⁻. Deux souches sont utilisées, présentant des mutations différentes :

- souche Hfr : *str^s azi⁺ ton⁺ lac⁻ gal⁺*, souche sensible à la streptomycine (un antibiotique) capable de pousser sur milieu minimum
- souche F⁻ : *str^R azi⁻ ton⁻ lac⁻ gal⁻*, souche résistante à la streptomycine incapable de se développer sur milieu minimum en raison de mutations l'empêchant de réaliser certaines étapes de son métabolisme.

Les 2 souches sont mélangées dans un milieu complet : à intervalles de temps réguliers, des bactéries sont prélevées, mixées de façon à stopper la conjugaison et déposées sur un milieu complet contenant de la streptomycine de façon à tuer les bactéries Hfr donneuses. On détermine alors les génotypes des bactéries F. Le document ci-dessous présente la fréquence des différents génotypes des souches *str^R* en fonction du temps de conjugaison.

Fréquence des différents génotypes des souches *str^R* en fonction du temps de conjugaison

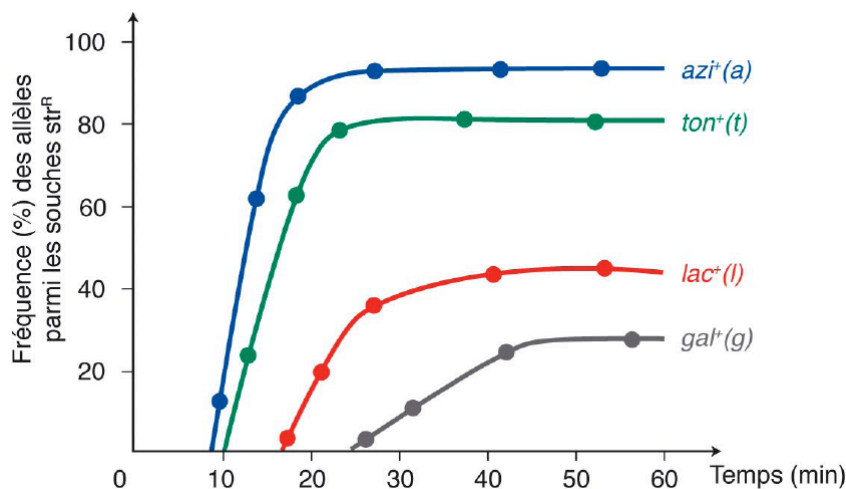


Figure 17 : transfert horizontal de gènes entre deux champignon

On étudie l'acquisition d'une virulence chez *Pyrenophora tritici-repentis* (*P. tritici-repentis*), un champignon pathogène du blé (Manning, V.A. *et al.*, (2013) *G3 Genes/Genomes/Genetics* **3**, 43-63).

Différentes souches de ce champignon existent dans le monde : certaines sont pathogènes et synthétisent une toxine spécifique du blé : la toxine ToxA, responsable de la formation de taches jaunes sur les feuilles de la plante hôte.



Le gène codant ToxA a été identifié et localisé dans le génome de *P. tritici-repentis*. Ce gène est absent dans les génomes des souches non pathogènes.

Un autre champignon, *Stagonospora nodorum* (*S. nodorum*) est également pathogène et provoque également la formation des taches jaunes sur les feuilles du blé.

L'analyse du génome de *S. nodorum* a montré la présence d'un gène présentant 99,7% de similitude avec le gène de *P. tritici-repentis*. La présence de deux gènes quasi identiques chez ces deux espèces suggère l'existence d'un gène ancestral commun.

Qu'en est-il ? L'analyse des séquences des deux gènes isolés à partir de champignons récoltés sur différents continents a montré que :

- la séquence du gène codant Tox A chez *P. tritici-repentis* ne présente aucune variation chez les différents champignons
- en revanche, le gène codant Tox A chez *S. nodorum* présente 11 allèles.

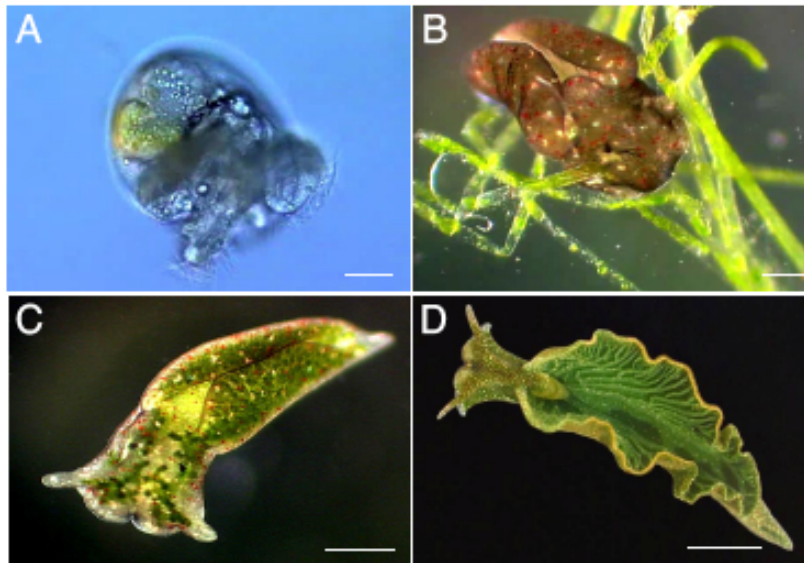
Interprétez ces résultats.

Figure 18 : transfert horizontal de gènes entre une algue et une limace, ou comment un limace devient photosynthétique



Elysia chlorotica est une petite limace de mer (2 à 3 cm) qui vit dans le long de la côte Est de l'Amérique du Nord. Cette limace a l'apparence d'une feuille et réalise la photosynthèse grâce à des chloroplastes symbiotiques stockés dans son épithélium digestif.

Cette capacité à réaliser la photosynthèse n'est pas innée : en effet les œufs et les larves ne possèdent pas de chloroplastes. Ceux ci sont acquis au cours des premières semaines de vie pendant laquelle elle se nourrit de l'algue *Vaucheria litorea* et conserve ses chloroplastes. Lorsque le nombre de chloroplastes est suffisant, elle devient autotrophe pour le carbone et a un métabolisme uniquement photosynthétique jusqu'à la fin de sa vie (10 mois environ).



Cycle de vie d'*Elysia chlorotica*.

A : Larve libre : la coloration verte est due à la présence d'algues dans le tube digestif : les chloroplastes ne sont pas encore stockés (barre d'échelle : 100µm). **B** : Limace juvénile se nourrissant d'algue *V. litorea* (barre d'échelle : 500µm). **C** : Jeune adulte, 5 jours après le début de la consommation de *V. litorea* : les chloroplastes de l'algue sont stockés dans des cellules appartenant à des diverticules du tube digestif (barre d'échelle : 500µm). **D** : limace adulte : les diverticules se sont propagés dans l'ensemble du corps qui peut ainsi réaliser la photosynthèse (barre d'échelle : 500µm).

Ces observations sont surprenantes dans la mesure où le métabolisme des chloroplastes repose sur des protéines issues à plus de 90% de gènes nucléaires de l'algue. Deux hypothèses permettent d'expliquer cette capacité à réaliser la photosynthèse en l'absence du génome nucléaire végétal :

- les plastes sont devenus capables de réaliser la photosynthèse en autonomie
- des gènes nucléaires végétaux sont présents dans le génome de la limace, ce qui suppose un transfert horizontal de gènes entre l'algue et la limace.

A partir de l'exploitation des documents ci-dessous, présentez des arguments en faveur de la deuxième hypothèse

Dans toutes les expériences, des contrôles internes ont vérifié l'absence de contamination des échantillons extraits des limaces (protéines, ARNm, ADNc, ADN génomique...) par du matériel qui aurait pu être issu des algues pendant les élevages au laboratoire.

Argument à l'échelle du protéome

Le gène *psbO*, qui code une protéine du photosystème II, est conservé chez toutes les espèces pratiquant la photosynthèse oxygénique. De manière surprenante, la protéine codée par le gène *psbO* a été identifiée chez la limace *Elysia chlorotica*. Le document ci-dessous présente la séquence en acides aminés de cette protéine

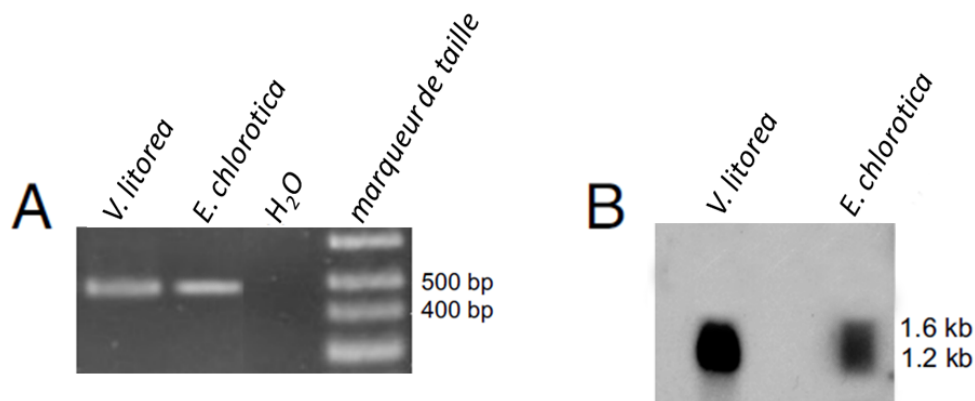
MKVPSALVALSAFSVKTSAPFRPAFAGLKTNAKSSSALTMVQDDI
KTLAVGALTILAGV**SIL**NAPVEAITKDQIESLSYLQVKGTGLANRCP
 EVFGTGSIDVNGKTKIVDMCIEPKTFQVLEETSSKRGEAKKEYVNT
 KLMTQRQTYTLYGIDGSFAPENGKITFREKDGIDYAATTIQLPGGERV
 PFLFTVKELVAQATTPGNSVTPGLQFGGPFSTPSYRTGLFLDPKGR
 GGSTGYDMAVALPGHQSGIEGDAELFGENNKTFDVTKGNIEFEVN
 RVDPSNGEIGGVFVSQKKGDTDMGSKVPKDLLIKGIFYGRLESE

Séquence en acides aminés de la protéine codée par le gène *psbO*

Chaque lettre représente conventionnellement un acide aminé (M = méthionine, K = lysine...). En rouge, bleu et vert : peptide signal tripartite typique de l'adressage aux thylacoïdes via le réticulum endoplasmique.

Argument à l'échelle du transcriptome

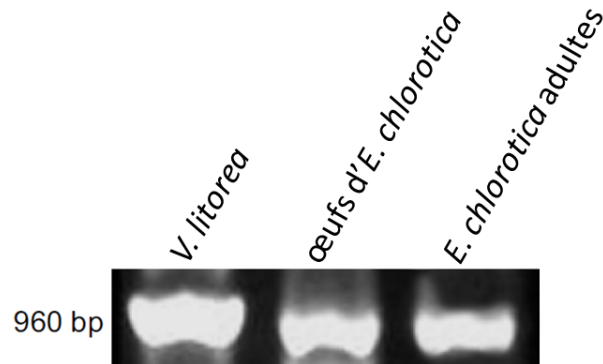
Les ARNm totaux sont extraits et purifiés à partir d'algues *Vaucheria litorea* ou de limaces *Elysia chlorotica*. Les ARNm obtenus sont ensuite retrotranscrits (RT) en ADNc. A l'aide d'amorces spécifiques du gène *psbO*, une PCR (réaction de polymérisation en chaîne) permet ensuite d'amplifier spécifiquement l'ADNc *psbO* parmi ces ADNc. A l'issue de cette RT-PCR, les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse en présence d'un marqueur de l'ADN. Par ailleurs, les mêmes ARNm sont également recherchés par northern-blot. Les résultats sont présentés sur le document ci-dessous.

**Résultats de la recherche du transcrit du gène *psbO***

(A) : L'électrophorégramme présente les résultats de la RT-PCR réalisée à partir des ARNm totaux purifiés chez l'algue *V. litorea*, des ARNm totaux purifiés chez la limace *E. chlorotica*, ou d'eau (H_2O) (B) : Northern blot (électrophorèse d'ARN) des ARNm totaux purifiés chez l'algue *V. litorea* ou des ARNm totaux purifiés chez la limace *E. chlorotica*, en utilisant une sonde spécifique de l'ARNm du gène *psbO*.

Argument à l'échelle du génome

L'ADN génomique est extrait et purifié à partir de limaces *E. chlorotica* adultes, de leurs œufs ou d'algues *V. litorea*. Une PCR est réalisée en utilisant des amorces spécifiques du gène *psbO*. Les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse en présence d'un marqueur de l'ADN. Les résultats sont présentés sur le document ci-dessous :

**Analyse à l'échelle du génome de la présence du gène *psbO***

