

Université Paris Saclay
2024-2025

LICENCE
L3

Biologie Santé

GÉNÉTIQUE

Travaux Dirigés

TD1 (2h)

Révisions : conjugaison et transduction

Exercice 1

On dispose d'une souche A de *Escherichia coli* auxotrophe pour la leucine, la proline, la thréonine, les purines, la cystéine, sensible au phage Tx, incapable de pousser sur galactose et résistante à la streptomycine. On dispose de la souche HfrH, résistante au phage Tx et sauvage pour le reste du génome. La mutation de résistance à la streptomycine est située à 72 minutes de l'origine de transfert.

1- On réalise un croisement par conjugaison entre la souche HfrH et la souche A. Toutes les 5 minutes pendant 30 minutes, on prélève quelques ml de la coculture qu'on étale sur plusieurs boîtes afin de tester individuellement le phénotype des conjuguants pour chacun des marqueurs.

Q1 - Ecrire les phénotypes des souches HfrH et A.

Q2 - Quel sera le milieu de culture permettant d'obtenir les recombinants [Pro+] ? Justifier la réponse.

Q3 - Quel sera celui permettant d'obtenir les recombinants [Gal+] ? Justifier la réponse.

Q4 - Interprétez les résultats obtenus (Tableau 1) pour chacun des phénotypes étudiés (conclusion sous forme d'un schéma).

Tableau 1 : + indique la présence de colonies et – l'absence

Temps d'étalement en minutes	[Leu+]	[Pro+]	[Thr+]	[Pur+]	[Cys+]	[Tx ^R]	[Gal+]
0	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	-	-	-	-
10	+	-	+	-	-	-	-
15	+	-	+	-	-	-	-
20	+	+	+	-	-	-	-
25	+	+	+	+	-	-	-
30	+	+	+	+	-	-	-

2- On laisse la conjugaison se poursuivre pendant 70 minutes et on sélectionne les recombinants [Pur+, Str^R]. Testés par répliques, 80% d'entre eux sont [Gal+], 30% sont [Cys+]. Testés par répliques 95% des [Gal+] sont [Tx^R], 50% des [Cys+] sont [Tx^R].

Q5 - Interprétez ces résultats.

3- On dispose d'une souche B d'*E. coli*, incapable de métaboliser le galactose et résistante à la streptomycine. Après croisement de la souche B avec la souche HfrH, on obtient des [Gal+, Str^R], après 14 min de conjugaison.

On prépare un lysat de phage transducteur P1 à partir de la souche Hfr et on transduit les souches A et B afin d'obtenir des recombinants [Gal+].

95% des recombinants [Gal+] issus de la transduction de A par P1, sont [Tx^R], 100% des recombinants [Gal+] issus de la transduction de B par P1 sont [Tx^S].

Q6 - Discutez de la cohérence de ces résultats et concluez sur une estimation des distances entre les marqueurs Gal et Tx.

Rappel : Taille de l'ADN du phage P1 : 2,1 min. Taille du génome d' *E. coli* : 4.10^6 pb

4- On dispose d'une souche C d'*E. coli* prototrophe et résistante au phage Tx à partir de laquelle on prépare un lysat de phage transducteur P1, pour transduire une souche réceptrice [Gal-, Pyr-] sensible au phage Tx. L'analyse par répliques de 210 recombinants [Gal+] donne les résultats suivants :

[Tx^S, Pyr-] : 55 [Tx^R, Pyr-] : 45 [Tx^S, Pyr+] : 5 [Tx^R, Pyr+] : 105

Q7 - Analysez les résultats de ce test 3 points sous forme de schémas, afin de déterminer l'ordre probable des 3 loci Tx, Gal et Pyr, en sachant que Pyr a été montré, par conjugaison, comme étant très proche des loci Tx et Gal (soit à moins de 2 min).

TD1 en autonomie (1h)

Révisions génétique procaryote : transformation

Transformations chez *Bacillus subtilis* (bactérie Gram+).

L'ADN d'une souche sauvage prototrophe est extrait et purifié. Il est utilisé pour transformer des cellules réceptrices d'une souche (de la même espèce) auxotrophe pour l'histidine et le tryptophane (phénotype [His-, Trp-]).

Après incubation des cellules réceptrices avec la solution d'ADN on prélève quatre fractions aliquotes de la suspension que l'on dilue et que l'on étale sur différents milieux. Le protocole utilisé et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau.

Fraction	Dilution	Quantité étalée	Milieu d'étalement	Nombre moyen de colonies par boîte
1	10^{-5}	0,1 ml	mm + his + trp	100
2	10^{-2}	0,1 ml	mm + his	100
3	10^{-2}	0,1 ml	mm + trp	100
4	10^{-1}	0,1 ml	mm	200

mm = milieu minimum

Q1 - Quel type de cellules est sélectionné sur chaque milieu ?

Q2 - Les colonies poussant sur mm + his sont répliquées sur mm. Quelle fraction d'entre elles seront capables de pousser sur la boîte réplique ?

Q3 - Calculer les fréquences de simple et double transformés.

Q4 - En considérant que seuls deux gènes, *his1* et *trp2*, déterminent les exigences en histidine et tryptophane : pouvez-vous, en calculant la fréquence de co-transformation, déterminer si ces deux gènes sont liés génétiquement ou non ?

Q5 - Donner une interprétation biologique simple.

TD2 (2h)

Révisions : Tests de ségrégation et tests fonctionnels chez les eucaryotes

Exercice 1

La souche sauvage de levure *Saccharomyces cerevisiae*, nommée S, peut pousser sur un milieu minimum sans thiamine, ni arginine et elle est sensible à la streptomycine. Son phénotype est noté [thia+, arg+, S^S]. On possède 5 souches présentant chacune un phénotype mutant : exigence en arginine - [arg-], ou en thiamine - [thia-], ou bien résistance à la streptomycine - [S^R]. Le phénotype de chaque souche est donné dans le Tableau 1.

Tableau 1 :

S	[arg+, thia+, S ^S]
A	[arg-, thia+, S ^S]
B	[arg+, thia+, S ^R]
C, D et E	[arg+, thia-, S ^S]

Certains croisements ont été réalisés entre ces souches, ils sont indiqués dans la première colonne du Tableau 2. Dans la 2^{ème} et 3^{ème} colonne sont donnés les phénotypes des descendants de ces croisements et leurs effectifs respectifs. Pour plus de clarté, seuls les phénotypes différents entre les deux souches croisées sont présentés chez les descendants.

Tableau 2 :

Croisements	Descendance	Effectifs
souche D x souche S	[thia+]	256
	[thia-]	244
souche E x souche S	[thia+]	251
	[thia-]	249
souche A x souche B	[arg+, S ^S]	121
	[arg+, S ^R]	132
	[arg-, S ^S]	128
	[arg-, S ^R]	119
souche A x souche C	[arg+, thia+]	48
	[arg+, thia-]	204
	[arg-, thia+]	196
	[arg-, thia-]	52
souche C x souche D	[thia+]	127
	[thia-]	373
souche C x souche E	[thia+]	2
	[thia-]	498
souche B x souche D	[thia+, S ^S]	23
	[thia+, S ^R]	228
	[thia-, S ^S]	222
	[thia-, S ^R]	27

Interprétez l'ensemble de ces résultats. Soyez très méthodique dans la démonstration génétique en répondant aux questions suivantes :

- Par combien d'événement(s) mutationnel(s) chacune des souches A, B, C, D et E diffère-t-elle de la souche sauvage ?

- Si dans certains croisements, plusieurs sites mutés sont en jeu, sont-ils indépendants ou liés génétiquement ?
- S'ils sont liés génétiquement, quelle est la distance génétique qui les sépare ?
- Etablir une carte génétique des différents sites mutants mis en évidence.

Exercice 2

On dispose d'une série de souches pures mutantes de drosophile (organisme diplobiontique), nommées de **A** à **H**, présentant des ailes de taille plus ou moins réduite. Ce phénotype sera noté [r] et le phénotype normal de la souche sauvage, sera noté [n].

Les femelles vierges de chacune de ces souches sont croisées avec des mâles de la souche sauvage notée S, et les descendants F₁ sont examinés. Le phénotype de chaque F₁ est noté dans la première ligne du tableau.

♀ \ ♂	A	B	C	D	E	F	G	H
S	[n]	[n]	[n]	[r]	[n]	♀ + ♂ [n] ♂ + ♀ [r]	[n]	[n]
A	[r]	[n]	[r]	[r]	[n]	♀ + ♂ [n] ♂ + ♀ [r]	[n]	[n]
B		[r]	[n]	[r]	[r]	♀ + ♂ [n] ♂ + ♀ [r]	[n]	[n]
C			[r]	[r]	[n]	♀ + ♂ [n] ♂ + ♀ [r]	[n]	[n]
D				[r]	[r]	♀ + ♂ [r] ♂ + ♀ [r]	[r]	[r]
E					[r]	♀ + ♂ [n] ♂ + ♀ [r]	[n]	[n]
F						[r]	[n]	[n]
G							[r]	[n]
H								[r]

[r] : tous les descendants F₁ ont les ailes de taille réduite excepté quand il est indiqué une différence entre les ♀ et les ♂
 [n] : tous les descendants F₁ ont les ailes de taille normale excepté quand il est indiqué une différence entre les ♀ et les ♂

Question 1 :

- Quel type de test est ainsi réalisé ?
- A quelles questions, vous permettent de répondre ce test ?
- Interprétez les résultats de ce test en expliquant votre raisonnement.
- A la suite de ce test, pouvez-vous déterminer et écrire le génotype de chacune des souches utilisées ?

Chacune de ces souches mutantes est croisée avec toutes les autres souches mutantes et les descendants F₁ sont examinés. Pour chaque croisement, le phénotype des F₁ est noté dans le reste du tableau.

Question 2 :

- A quel type de test correspondent ces croisements ?
- Donnez son principe et ses conditions d'application.
- Interprétez les résultats de ce test en justifiant vos conclusions.

(d) Reste-t-il des ambiguïtés ? Justifiez votre réponse.

Une étude plus approfondie de la souche **A**, aux ailes très réduites [r], a ensuite été entreprise.

Des femelles F_1 issues du croisement (femelle de la souche **A** avec mâle de la souche sauvage) sont croisées d'une part avec un mâle de la souche **A** (croisement 1) et d'autre part avec des mâles F_1 (croisement 2).

La descendance F_2 obtenue à partir du croisement 1 est composée de 60 individus avec des ailes normales [n], 65 individus aux ailes réduites [r] et 123 individus aux ailes de taille intermédiaire [i], quel que soit le sexe.

La descendance F_2 obtenue à partir du croisement 2 est composée de 169 individus [n], 18 individus [r] et 115 individus [i], quel que soit le sexe.

Question 3 :

- (a) Quelle est la spécificité du croisement 1 ? Quel est son intérêt ?
- (b) Analysez les deux croisements respectivement.
- (c) Comment expliquez-vous les différences observées entre les descendance 1 et 2 ?
- (d) Que pouvez-vous conclure sur la souche **A** ? Détaillez votre raisonnement et justifiez vos conclusions.
- (e) Votre conclusion est-elle en accord avec vos conclusions émises à la question 2 ? Justifiez.

Exercice 3 (optionnel)

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme unicellulaire eucaryote à cycle haplodiplophasique. La souche sauvage est prototrophe pour l'uracile. Par mutagenèse de la souche sauvage haploïde, on a obtenu 9 mutants indépendants auxotrophes pour l'uracile - [Ura-], notés m1 à m9.

Question 1 : Proposez une stratégie possible permettant de s'assurer d'obtenir des mutants indépendants à l'issue de la mutagenèse.

Chaque mutant est croisé avec la souche sauvage de signe sexuel complémentaire, et le phénotype des diploïdes résultants (sélectionnés grâce à d'autres marqueurs non indiqués ici) est testé.

parent mutant	phénotype des diploïdes issus du croisement: mutant x sauvage
m1	[Ura+]
m2	[Ura+]
m3	[Ura+]
m4	[Ura+]
m5	[Ura+]
m6	[Ura+]
m7	[Ura+]
m8	[Ura-]
m9	[Ura+]

Question 2 : Interprétez les résultats de ces croisements en justifiant votre réponse.

On croise entre eux les mutants haploïdes de signes sexuels complémentaires. Les phénotypes des diploïdes obtenus sont testés. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous : [+] pour [Ura+] et [-] pour [Ura-]

	m1	m2	m3	m4	m5	m6	m7	m8	m9
m1	[-]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[-]	[-]	[+]
m2		[-]	[-]	[+]	[+]	[-]	[+]	[-]	[+]
m3			[-]	[+]	[+]	[-]	[+]	[-]	[+]
m4				[-]	[-]	[+]	[+]	[-]	[+]
m5					[-]	[+]	[+]	[-]	[+]
m6						[-]	[+]	[-]	[+]
m7							[-]	[-]	[+]
m8								[-]	[-]
m9									[-]

Question 3 : Comment nomme-t-on le test génétique ainsi effectué ? Quel est le principe de ce test ?

Question 4 : En quoi les données relatives à la question Q3 sont-elles utiles pour réaliser ce test ?

Question 5 : Interprétez les résultats.

Il a été déterminé que chaque mutant est issu d'un seul événement mutationnel.

Question 6 : Comment les auteurs ont-ils pu déterminer que ces souches étaient simples mutantes ?

On a isolé biochimiquement des intermédiaires de la voie de biosynthèse de l'uracile, notés OP, AO, ADO et AU. La croissance de chaque souche mutante haploïde (sauf la souche m8) est testée sur milieu minimum (MM) additionné des différents intermédiaires (un "+" désigne la croissance, un "-" l'absence de croissance).

NB: la voie de biosynthèse de l'uracile est linéaire

	MM	MM + OP	MM + AO	MM + ADO	MM + AU	MM + uracile
m1	-	+	-	-	-	+
m2	-	-	-	-	-	+
m3	-	-	-	-	-	+
m4	-	+	+	-	-	+
m5	-	+	+	-	-	+
m6	-	-	-	-	-	+
m7	-	+	-	-	-	+
m9	-	+	+	+	-	+

Question 7 : A l'aide d'un schéma, indiquez l'ordre des intermédiaires dans la chaîne de biosynthèse de l'uracile et l'étape touchée pour chaque mutant.

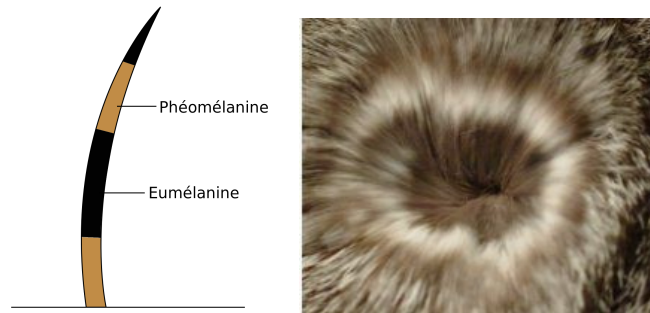
Question 8 : A l'aide de quel test génétique pouvez-vous déterminer si les sites mutés dans les mutants ci-dessus sont indépendants ou liés génétiquement ?

Formalisez votre réponse en indiquant les croisements nécessaires, ainsi que les génotypes et les phénotypes.





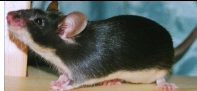


TD3 (2h)

Dominance / récessivité

Chez la souris le gène *agouti* affecte la couleur du pelage, qui est brun lustré chez la souche sauvage. La protéine codée par ce gène régule la quantité relative et la distribution des pigments jaune (phéomélanine) et noir (eumélanine) dans les poils :



On connaît de nombreux allèles mutants du gène *agouti* qui donnent des couleurs de pelage variées. Dans le tableau sont indiqués les phénotypes de quelques allèles mutants du gène *agouti*.

Génotypes	Viabilité	Couleur du pelage	
$+ / +, + / a$	+	brun lustré (sauvage)	
a / a	+	noir	
$a / A^y, + / A^y$	+	jaune	
A^y / A^y	léta1 embryonnaire	-	
$+ / a^x$	+	brun lustré (sauvage)	
a^x / a^x	léta1 embryonnaire	-	
a / a^x	+	dos noir ventre gris	
$+ / a^l$	+	brun lustré (sauvage)	
a / a^l	+	noir	
a^l / a^l	léta1 embryonnaire	-	

Q1 : Pourquoi dit-on que les mutations a^x , A^y , a^l ont des effets pléiotropes ?

Q2 : Quelles sont les relations entre les divers allèles du gène *agouti* ?

B- On fait le croisement ci-dessous et on compte les descendants viables selon leur couleur.

Croisements	Nombre et couleur des descendants
$A^y/a \times a^l/a$	102 jaunes, 194 noirs

Q3 : Prédire les génotypes, les phénotypes et les proportions de chaque classe dans la descendance de ce croisement.

Q4 : Comparer aux fréquences observées. Que pouvez-vous soupçonner ?

C- Parmi les descendants du croisement suivant, certains ont une couleur de pelage sauvage.

Croisement	Descendants à pelage sauvage	Effectif totale de la descendance
$A^y/a \times a/a$	2	3631

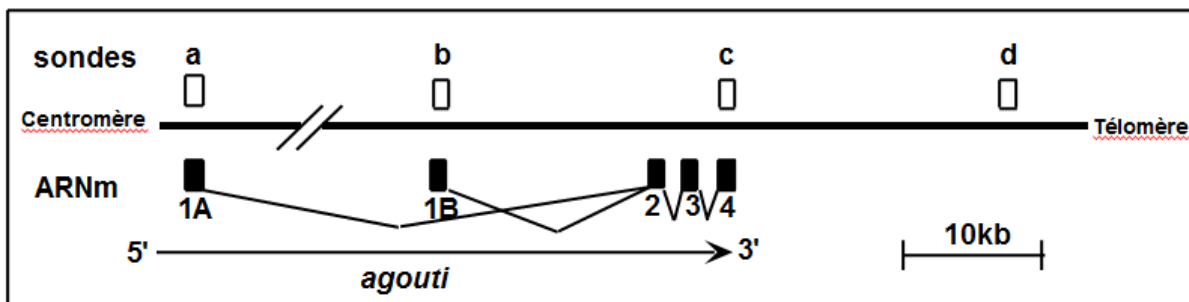
Q5 : Expliquer de quel type d'évènement peuvent provenir les individus à pelage sauvage.

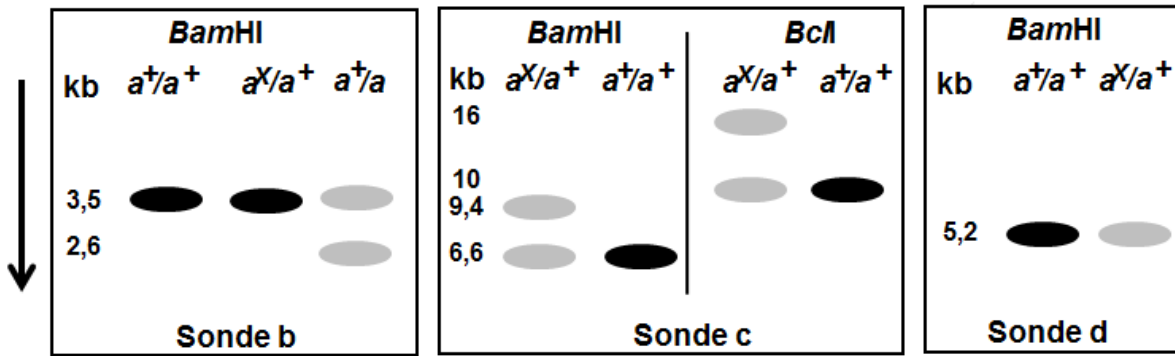
Q6 : Calculer la distance entre les marqueurs A^y et a .

D- L'allèle a^x a été sélectionné après une mutagenèse aux rayons X. On cherche à élucider la nature moléculaire de cette mutation.

Q7 : Quelle hypothèse peut-on faire pour expliquer ses caractéristiques phénotypiques ?

On prépare l'ADN génomique de souris de génotype a^+/a^+ , a^x/a^+ et a^x/a et on les digère par les enzymes de restriction *Bam*HI ou *Bcl*I. Après électrophorèse et transfert sur membrane de nylon les ADNs sont hybridés successivement avec les sondes b, c, et d (voir la carte). Les profils d'hybridation obtenus sont indiqués sur les figures ci-dessous.





Q8 : Expliquer pourquoi il est difficile, voire impossible, de réaliser ce Southern-blot sur des homozygotes a^x/a^x ?

Q9 : Quelles sont les difficultés d'interprétation des profils qui résultent de l'utilisation d'animaux hétérozygotes ?

Q10 : Interpréter les résultats.

Les ADNs génomiques de souris a^+/a^+ et a^x/a^+ digérés par *NotI* sont soumis à une électrophorèse "en champ pulsé" qui permet de séparer des fragments d'ADN de très grande taille. Le gel est ensuite traité comme précédemment (Southern-blot) et la membrane est hybridée avec les sondes a et c. Dans les deux cas on obtient le même résultat : une bande de 940 kb pour les souris sauvages et deux bandes de 940 et 720 kb pour les souris a^+/a^x .

Q11 : Que peut-on conclure sur la nature moléculaire de la mutation a^x .

Q12 : Quelle hypothèse peut-on faire pour expliquer qu'elle soit létale à l'état homozygote ?

TD4 (2h)

Complémentation fonctionnelle

Exercice 1 :

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l' α -tubuline est codée par les gènes *TUB1* et *TUB3* et la β -tubuline par le gène *TUB2*. Les mutants *tub1^{cs}* et *tub2^{cs}* sont des mutations récessives localisées respectivement dans *TUB1* et *TUB2* et qui entraînent la cryosensibilité des souches qui les portent. Le croisement suivant est réalisé :

mata *tub1^{cs}* X mata *tub2^{cs}*

Le diploïde résultant est cryosensible.

Donner au moins une hypothèse expliquant ce résultat.

Exercice 2 :

Le genre *Nephroselmis* regroupe des espèces d'algues vertes unicellulaires haploïdes. En sélectionnant des mutants incapables de réaliser la photosynthèse, 14 mutants ne présentant plus de pigmentation verte [v] sont isolés. Les 14 mutants sont croisés entre eux selon toutes les combinaisons possibles, formant ainsi des diploïdes dont le phénotype figure dans le tableau ci-dessous.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
2		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
3			-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
4				-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5					-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
6						-	-	+	+	-	-	+	-	-
7							-	+	+	-	-	+	-	-
8								-	-	+	+	+	+	-
9									-	+	+	+	+	-
10										-	-	+	-	-
11											-	+	-	-
12												-	+	-
13													-	-
14														-

+ indique une coloration verte typique de la présence de chlorophylle, - indique une absence de pigmentation.

Q1 : Le mutant 14 est manifestement différent des autres. Pourquoi ? Quelle expérience réaliseriez-vous pour vérifier votre hypothèse ?

Q2 : Le mutant 14 mis à part, que vous permet d'établir le tableau ci-dessus ?

Des diploïdes issus des croisements indiqués ci-dessous sont mis à sporuler :

	Descendants	
	[v ⁻]	[v ⁺]
mutant 1 X mutant 2	89	31
mutant 1 X mutant 14	97	0
mutant 2 X mutant 6	113	5
mutant 3 X mutant 4	121	0
mutant 4 X mutant 12	83	0
mutant 5 X mutant 9	80	26
mutant 8 X mutant 9	89	29

Par ailleurs, lorsque les mutants (1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14) sont individuellement croisés par la souche sauvage de référence de signe sexuel compatible et mises à sporuler, les descendance générées montrent toujours 50% de [v⁻] et 50% de [v⁺].

Q3 : Expliquez ces ségrégations. Combien de loci ont été identifiés à l'aide de ces 14 mutants ?

Q4 : Proposez des hypothèses qui expliqueraient les exceptions au test de complémentation que vous avez mises en évidence.

Q5 : Si 100 colonies sont comptées, donnez la descendance attendue pour les croisements suivants :

	100 descendants	
	[v ⁻]	[v ⁺]
mutant 4 X mutant 10		
mutant 1 X mutant 12		
mutant 9 X mutant 1		
mutant 14 X mutant 6		

TD5 (2h)

Cartographie chez les eucaryotes

Les chromosomes balanceurs - rappel

Lorsqu'une mutation récessive confère à la drosophile une létalité au cours de son développement ou une stérilité, il est nécessaire de pouvoir élever ces drosophiles à l'état hétérozygote. Les généticiens de la drosophile ont construit par des mutagenèses successives des chromosomes particuliers que l'on appelle chromosomes balanceurs. Les chromosomes balanceurs sont des chromosomes remaniés comprenant plusieurs inversions imbriquées. Lors de la méiose, les recombinaisons (crossing-over) entre le chromosome balanceur (remanié-inversé) et le chromosome normal vont conduire à l'obtention de gamètes (produits de recombinaison) non viables. Seuls les gamètes non remaniés seront viables.

Ces remaniements peuvent conduire à l'inactivation d'un gène essentiel, létal à l'état homozygote et conférant un phénotype dominant (morphologique) à l'état hétérozygote. Cette mutation dominante permet de marquer et de suivre le chromosome balanceur au cours des croisements à l'état hétérozygote. Seuls les hétérozygotes seront viables. L'utilisation de chromosomes balanceurs est un outil précieux pour la génétique de la drosophile. Par croisement avec un chromosome portant une mutation létale quelconque (différente de celle du balanceur) on obtient une structure hétérozygote stable et « balancée », que l'on peut maintenir au cours des générations.

Attention ! Nous rappelons l'absence de recombinaison lors de la gamétogenèse chez le mâle drosophile.

Mutagenèse par transposition de l'élément P chez la drosophile et caractérisation génétique de mutants

L'élément P de la drosophile est un transposon à ADN de 3 kpb environ (transposon naturel des populations de drosophile). Il est décrit en Figure 1 : il possède à ses extrémités des séquences parfaitement répétées en orientation inverse de 31 paires de bases (« les pieds 5' et 3' ») ; dans la partie centrale, se trouve une séquence codante spécifiant une enzyme appelée transposase qui permet d'exciser l'élément par coupure double brin de l'ADN de part et d'autre de l'élément.

Figure 1



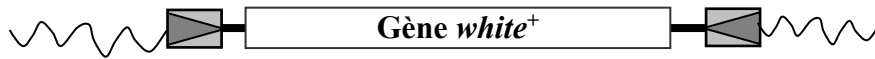
Ceci conduit à l'excision de l'élément d'un locus de départ puis à son éventuelle insertion vers un nouveau site. La transposase reconnaît les séquences terminales de l'élément, appelées "pieds". Le mode de transposition de l'élément P est illustré sur la figure 1.

En découplant, avec les méthodes de la biologie moléculaire, les séquences "pieds" et la séquence codant la transposase, l'élément P a été transformé en outil pour la transformation et la mutagenèse de la drosophile. Il est ainsi possible de placer des séquences choisies (ex. gène rapporteur) entre les séquences "pieds" d'une part et d'autre part d'isoler la séquence codant la transposase des séquences "pieds".

Dans le problème ci-dessous, on utilise 2 éléments P modifiés :

1) L'élément P{w⁺} : le gène codant la transposase a été délété et remplacé par l'allèle sauvage du gène *white* (abréviation *w*). Cet élément est inactif mais est repérable grâce au gène rapporteur *w⁺* dans un contexte

muté w (le gène w est naturellement porté par le chromosome X et sa mutation conduit à des mouches qui ont les yeux blancs alors que les mouches sauvages ont les yeux rouge brique).



2) L'élément P{Δ2-3} : cet élément a été délété au niveau d'une de ses extrémités, ce qui rend cet élément incapable de se transposer lui-même, mais il code une transposase active.



La stratégie de mutagenèse par transposition consiste à réunir par croisement ces deux transposons modifiés dans un même génome. Chez les descendants possédant les deux transposons, la transposition pourra se faire. Mais seul l'élément P{ w^+ } pourra être transposé grâce à la présence de la transposase (Voir tableau ci-dessous).

Pour qu'il puisse y avoir transposition, deux facteurs sont nécessaires et suffisants :

Le facteur « trans » : C'est la transposase qui est l'enzyme codée par l'élément. Elle peut être apportée en *trans* par un autre transposon.

Le facteur « cis » : Les séquences situées à chaque extrémité du transposon doivent être présentes pour que l'élément puisse s'exciser et se réinsérer.

Elément présent dans la mouche :	Facteur <i>cis</i> (séquences situées aux extrémités du transposon)	Facteur <i>trans</i> (transposase)	Transposition
Parent 1 : P{w^+}	+	-	non
Parent 2 : P{Δ2-3}	-	+	non
Descendant P{w^+} + P{Δ2-3}	+	+	Possibilité de transposition du P{w^+}

Il est important de noter que toutes les souches utilisées sont dépourvues d'éléments P autres que ceux modifiés qui sont présentés ci-dessus.

Question n°1 : Quel est l'intérêt de ce type de mutagenèse ?

Les travaux présentés dans ce sujet concernent l'identification de certaines fonctions essentielles chez la drosophile, portées par des gènes situés sur le chromosome X.
Les marqueurs, éléments P, balanceurs et réarrangement utilisés avec leurs caractéristiques sont récapitulés en annexe.

Une équipe de chercheurs décide d'utiliser cet outil pour caractériser des gènes localisés sur le chromosome X et dont la fonction est essentielle.

NB : La drosophile possède 4 paires de chromosomes. Le chromosome X correspond au chromosome I, et les autosomes sont les chromosomes II, III et IV. Le chromosome IV, très petit et portant très peu de gènes, n'est généralement pas mentionné dans les génotypes. Dans toute la suite de cet exercice, les génotypes seront donnés dans l'ordre : chromosome(s) I ; chromosomes II ; chromosomes III.

Première partie : mutagenèse insertionnelle

Croisements A : Des mâles de génotype $\frac{Xw}{Y}; \frac{CyO}{P\{w^+\}}; \frac{Sb P\{\Delta 2-3\}}{+}$ ont été obtenus. Ils ont été croisés individuellement avec des femelles vierges de génotype $\frac{XFM6-w B}{XFM6-w B}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$ (croisements de la génération F0).

NB : Les chromosomes balanciers CyO et XFM6-w B sont décrits en annexe ainsi que les deux transposons $P\{w^+\}$ et $P\{\Delta 2-3\}$. Les phénotypes correspondant au marqueur B seront notés [B] chez les homozygotes et $[\frac{1}{2}B]$ chez les hétérozygotes.

Questions n°2 :

- Chez les mâles F0 utilisés, sur quel chromosome l'élément $P\{w^+\}$ de départ est-il situé ? D'après le génotype de ces mâles, le transposon $P\{w^+\}$ peut-il changer de place ? Pour vous aider à répondre, vous pouvez regarder l'annexe 2.***
- Prévoir, à l'aide d'un tableau de gamètes, les descendance F1 (génotypes, phénotypes et leurs proportions) attendues à l'issue des croisements F0 en absence de tout événement de transposition. Le phénotype [yeux rouges] n'est jamais associé avec un autre phénotype, lequel et pourquoi ?***
- Quelle nouvelle association révélera une nouvelle insertion de $P\{w^+\}$ chez les individus F1 ? Pour répondre à cette question, considérez le fait que les descendants F1 d'intérêt seront porteurs d'une insertion située à un nouveau site dans le génome, mais ne devront pas contenir l'insertion $P\{w^+\}$ de départ.***
- Dans la lignée germinale, la transposition de l'élément P est pré-méiotique. Pensez-vous que plusieurs individus de la même descendance F1 porteurs de nouvelles insertions seront issus nécessairement d'événements de transposition différents ? ou seront au contraire tous porteurs nécessairement de la même nouvelle insertion ?***
- Discutez alors du choix fait de croiser individuellement les mâles dans les croisements F0.***

Croisements B : A l'issue des croisements F0, une femelle vierge F1 de phénotype $[\frac{1}{2}B]$, yeux rouges, ailes recourbées] est isolée dans chaque descendance et croisée par des mâles de génotype $\frac{XFM6-w B}{Y}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$

Questions n°3 :

- Donner le génotype des femelles F1 ainsi isolées. Vous indiquerez par un astérisque les chromosomes susceptibles de contenir une nouvelle insertion $P\{w^+\}$ en négligeant le chromosome IV.***
- Pourquoi avoir choisi le phénotype [femelle, $\frac{1}{2} B$, yeux rouges, ailes recourbées] dans la descendance F1 ?***
- Pourquoi n'avoir croisé qu'une seule femelle de ce type par descendance F1 ?***
- A quoi reconnaîtra-t-on qualitativement, dans les descendance F2, un événement de transposition sur le chromosome X ?***

- **Ecrivez les génotypes des individus croisés (avec une nouvelle insertion du $P\{w^+\}$ sur le chromosome X chez les femelles) et présentez un tableau de gamètes pour prédire les F2.**
- **Parmi les 3 phénotypes suivis (taille de l'oeil, couleur de l'oeil et forme des ailes), seule l'association de 2 phénotypes sont informatifs, lesquels ? Que remarque-t-on ?**

Deuxième partie : crible

Analyse des descendance F2 : Les chercheurs ont ainsi analysé les résultats de 39900 descendance de femelles F1 [$\frac{1}{2}$ B, yeux rouges, ailes recourbées]. Parmi ces 39900 descendance F2, 501 étaient caractérisées par la présence de $\frac{2}{3}$ de femelles et $\frac{1}{3}$ de mâles, ces derniers présentant tous des yeux blancs.

Questions n°4

- a) **Donnez une interprétation rendant compte de ces 501 descendance ?**
- b) **Avec quelle fréquence ces chercheurs ont-ils atteint l'objectif poursuivi ?**

Troisième partie : origine du phénotype observé chez les mutants obtenus

La question se pose maintenant de savoir si le phénotype observé dans ces 501 descendance est bien lié à une nouvelle insertion de l'élément $P\{w^+\}$. Pour répondre à cette question, les croisements suivants ont été réalisés :

Croisement C : Des femelles vierges [$\frac{1}{2}$ B, yeux rouges] prélevées dans l'une des 501 descendance F2 de croisements B décrites ci-dessus ont été croisées avec des mâles $\frac{XFM6-w B}{Y} ; \frac{CyO}{+} ; \frac{Sb P\{\Delta 2-3\}}{+}$.

Croisement D : Dans la descendance F1 du croisement C, on a isolé des femelles [$\frac{1}{2}$ B, yeux rouges, soies courtes] et on les a croisées avec des mâles de la souche utilisée dans le croisement A de génotype $\frac{XFM6-w B}{Y} ; \frac{+}{+} ; \frac{+}{+}$. On a alors recherché et isolé des femelles [$\frac{1}{2}$ B, yeux blancs] dans la F2 résultante.

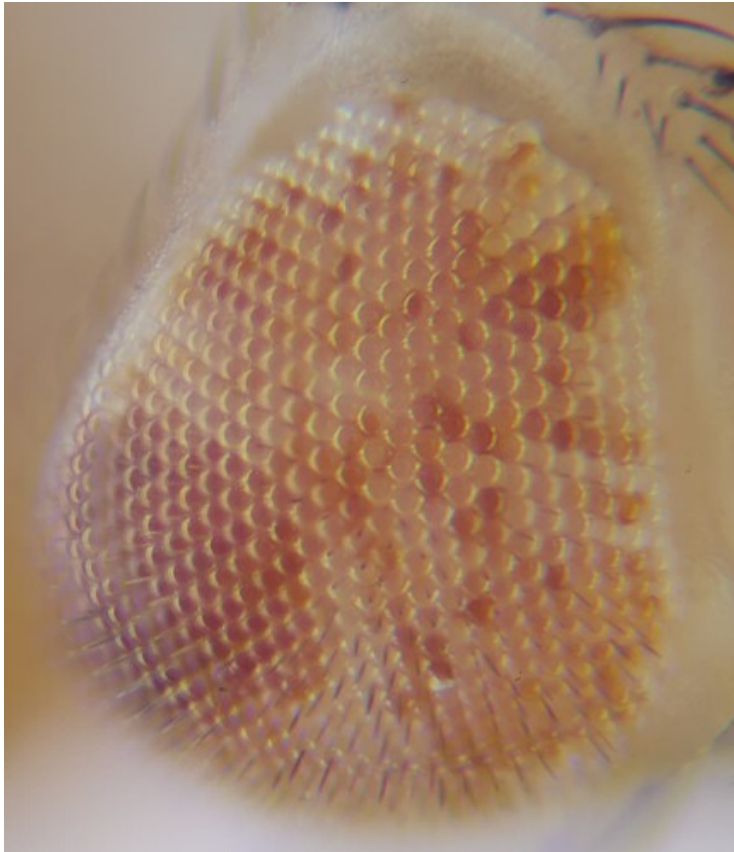
Croisement E : Celles-ci, croisées individuellement avec des mâles de la souche sauvage, donnent toutes une descendance composée de 50% de mâles et 50% de femelles.

Questions n°5 :

- a) **Ecrivez les génotypes des deux parents du croisement C. En déduire le génotype de la femelle F1 [$\frac{1}{2}$ B, yeux rouges, soies courtes] (sans tableau des gamètes). Dans quel intérêt ces femelles ont-elles été générées (reportez-vous à la question 2a) ?**
- b) **Ecrivez les génotypes des deux parents du croisement D. Quels seraient le phénotypes des femelles F2 si le transposon était resté sur le chromosome X d'origine ? Quel type d'événement peut expliquer l'apparition des 10 femelles F2 [$\frac{1}{2}$ B, yeux blancs] ?**
- b) **Que peut-on déduire des résultats de leur croisement avec la souche sauvage ?**

ANNEXE

	Abréviation	Nom	Phénotype	Remarque
Marqueurs	<i>w</i>	<i>white</i>	Yeux blancs	Situé sur l'X, récessif
	<i>Cy</i>	<i>Curly</i>	Ailes recourbées chez l'hétérozygote	Situé sur le II, létal homozygote
	<i>Sb</i>	<i>Stubble</i>	Soies courtes et épaisses chez l'hétérozygote	Situé sur le III, létal homozygote
	<i>B</i>	<i>Bar</i>	Œil de taille très réduite noté [B] chez l'homo- ou l'hémizygote, en forme de haricot noté [1/2B] chez l'hétérozygote	Situé sur l'X, semi-dominant
	<i>m</i>	<i>miniature</i>	Ailes courtes	Situé sur X, récessif
	<i>f</i>	<i>forked</i>	Soies fourchues	Situé sur X, récessif
	<i>Ubx</i>	<i>Ultrabithorax</i>	Haltères de grande taille chez l'hétérozygote	Situé sur le III, létal homozygote
Éléments P	<i>P{w⁺}</i>		Élément P modifié contenant tout le gène <i>white⁺</i> (y compris les séquences régulatrices) sans transposase	
	<i>P{Δ2-3}</i>		Élément P modifié, source de transposase, délété de l'un de ses « pieds »	
Balanceurs	<i>CyO</i>		Balanceur du chromosome II portant le marqueur dominant <i>Cy</i> , létal homozygote	
	<i>TM6-Ubx</i>		Balanceur du chromosome III portant le marqueur dominant <i>Ubx</i> , létal homozygote	
	<i>XFM6-w B</i>		Balanceur du chromosome X portant le marqueur semi-dominant <i>B</i> et le marqueur récessif <i>w</i>	



Annexe 2 : Œil d'un mâle F0

TD6 (3h)

Conjugaison bactérienne

Partie A : Analyse des souches d'*Escherichia coli* utilisées dans l'expérience.

Nous disposons de diverses souches d'*Escherichia coli* contenant chacune plusieurs plasmides. Les caractéristiques des plasmides sont données en annexe.

La souche d'*E. coli* **A** ne contient pas de plasmide, la souche d'*E. coli* **B** contient les plasmides **1, 2 et 3**, la souche d'*E. coli* **C** contient les plasmides **1, 2 et 4** et la souche d'*E. coli* **D** contient les plasmides **1, 2 et 5** (voir Annexes p°24).

Q1 : Qu'est-ce qu'un plasmide ?

Q2 : Pour chacun des 5 plasmides utilisés (P1 à P5), et en vous aidant du tableau fourni en annexe (et de sa légende), analysez les différentes séquences portées par ces plasmides et les phénotypes qu'elles confèrent (par exemple : la résistance à un antibiotique, la possibilité d'entrer en conjugaison, la capacité de mobiliser un plasmide lors d'une expérience de conjugaison, la présence d'un plasmide transférable...).

Q3 : En tenant compte des réponses précédentes, indiquez pour chacune des 4 souches A, B, C et D, leur phénotype (mêmes critères que précédemment).

Partie B : Expérience de conjugaison entre *E. coli* et *Rubrivivax gelatinosus*

La bactérie pourpre (*Rubrivivax gelatinosus*), notée Rg, est une bactérie photosynthétique. Elle est capable de pousser sur un milieu M en présence d'une source de carbone soit en aérobie (**respiration**), soit en anaérobie en présence de lumière (**photosynthèse**). À partir de cette souche, un mutant résistant à la streptomycine (noté Rg Sm^r) a été isolé.

Lors de l'expérience de conjugaison, quatre mélanges sont réalisés contenant par ml, 10⁸ bactéries Rg Sm^r et 10⁸ bactéries *E. coli*, soit de la souche **A (mélange A)**, soit de la souche **B (mélange B)**, soit de la souche **C (mélange C)**, soit de la souche **D (mélange D)**. Après 6 heures d'incubation à 30°C sans agitation, 0,1 ml de différentes dilutions (**dil**) de ces mélanges a été étalé sur différents milieux (noté **I à IV**) puis incubé en aérobie. Les résultats sont indiqués dans le tableau 1.

Tableau 1 : Résultat des expériences de conjugaison :

Milieu :	Milieu I M + Sm Nb. de colonies	Milieu II M + Sm + Kan Nb. de colonies	Milieu III M + Sm + Amp Nb. de colonies	Milieu IV M + Sm + Cm Nb. de colonies
A) Rg Sm^r + E. coli A	dil 10 ⁻⁵ = 91	0	0	0
B) Rg Sm^r + E. coli B	dil 10 ⁻⁵ = 90	dil 10 ⁻³ =350	0	0
C) Rg Sm^r + E. coli C	dil 10 ⁻⁵ = 85	0	0	0
D) Rg Sm^r + E. coli D	dil 10 ⁻⁵ = 80	dil 10 ⁻² =20	0	0

M : milieu de croissance de *R. gelatinosus*, Sm=streptomycine, Kan=kanamycine, Amp=ampicilline et Cm=chloramphénicol.

Q4 : a) Pour quelle raison, les milieux I à IV contiennent-ils tous au moins de la streptomycine ?
b) Donner les phénotypes des colonies sélectionnées pour chacun des 4 milieux.

Q5 : a) Quel est le rôle et l'intérêt du mélange de conjugaison A (Rg Sm^r + *E. coli* A) ?
b) Quelle est l'utilité du milieu I ?

Q6 : Est-il normal de ne pas obtenir de colonies sur les milieux III et IV ? (Vous pouvez vous aider de votre réponse à la Q3).

Des colonies ont été sélectionnées sur le milieu II uniquement pour les mélanges de conjugaison B et D, mais aucune pour le mélange C.

Q7 : a) Que vous apprend l'absence de colonies, sur le plasmide qui a été transféré par l' *E. coli* C ?
b) Quelle hypothèse pouvez-vous faire concernant le plasmide transféré par l' *E. coli* B ?
c) En comparant les plasmides transférés par les *E. coli* C et D, quelles hypothèses pouvez-vous faire concernant les propriétés du plasmide transféré par l'*E. coli* D ?

Q8 : a) Donnez le titre (par ml) des cellules formant colonies pour chaque situation.
b) Quelle est la fréquence de l'acquisition de la résistance à la kanamycine dans les mélanges B et D ?
c) L'acquisition de la résistance à la kanamycine relève-t-elle d'un même mécanisme dans les 2 cas ? Justifiez votre réponse.

Q9 : Résumez succinctement vos hypothèses et interprétations pour les mélanges B et D.

Partie C : Test des hypothèses concernant les plasmides transférés par les *E. coli* B et D

Deux expériences sont réalisées afin de tester les hypothèses émises précédemment.

Expérience 1 : 10 colonies Sm^r Kan^r issues du mélange B (numérotées de 1 à 10), et 10 colonies Sm^r Kan^r issues du mélange D (11 à 20) sont mises en culture en milieu sélectif M (Sm + Kan) liquide en aérobiose. Toutes les cultures liquides poussent avec le même temps de génération. Un protocole de préparation de plasmides est appliqué à chacune de ces cultures liquides, afin d'en extraire les éventuels plasmides. Ces 20 préparations d'ADNs plasmidiques sont mises en contact avec des bactéries compétentes d'*E. coli*. Après avoir suivi un protocole de transformation bactérienne, les bactéries sont étalées sur milieu LB (milieu de croissance d'*E. coli*) additionné de kanamycine. À partir des 10 premières préparations, des transformants sont obtenus, alors qu'aucune colonie ne pousse dans les 10 derniers cas.

Q10 : Pourquoi cherche-t-on à sélectionner des bactéries *E. coli* résistantes à la kanamycine ?

Q11 : Pourquoi les préparations issues des colonies 11 à 20 ne sont-elles pas transformantes? Ces résultats vont-ils dans le même sens que vos hypothèses posées en Q9 ?

Expérience 2 : Les 10 colonies Sm^r Kan^r issues du mélange B (1 à 10) et les 10 colonies Sm^r Kan^r issues du mélange D (11 à 20), précédemment étudiées, sont repiquées sur un milieu sélectif M (Sm + Kan) solide et incubées en aérobiose. Là encore, aucune différence de croissance entre les souches n'a été mise en évidence. Deux répliques de cette boîte sont réalisées, une est remise à pousser dans les mêmes conditions que précédemment, et l'autre est placée en anaérobiose en présence de lumière. Après 48 heures d'incubation, les résultats suivants sont observés (tableau 2) :

Tableau 2	Mélange B) Colonies 1 à 10	Mélange D) Colonies 11 à 20
Aérobiose	+	+
Anaérobiose-lumière	+	-

+ : indique la croissance des colonies. - : indique une absence de croissance.

Q12 : a) Schématisez l'intégration du plasmide P5 dans le chromosome de *R. gelatinosus* par recombinaison homologue (donc au niveau de l'ORF *pufL*).

b) Quelle conséquence un tel événement aura-t-il sur l'activité du gène *pufL* ?

Q13 : Interprétez les résultats du tableau 2. Quelles conclusions pouvez-vous établir ?

Partie D : Analyse de mutants de photosynthèse

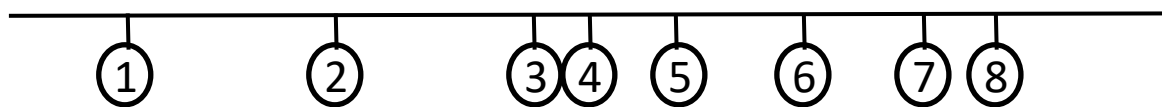
Chez les bactéries photosynthétiques, la plupart des gènes impliqués dans la fonction photosynthétique sont regroupés dans une même région chromosomique d'environ 50kb que l'on appelle le "cluster photosynthétique". Plusieurs mutants ont été obtenus par mutagenèse insertionnelle dans cette région. Pour chacun d'entre eux, un fragment d'ADN de 1,2 kb portant le gène de résistance à la Kanamycine (Kn) a été inséré à la position indiquée sur la figure 1. Les phénotypes de 8 mutants et de la souche sauvage sont donnés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Phénotypes des 8 mutants (A) construits et de la souche sauvage :

Souches	Phénotype			
	Résistance Kanamycine	Couleur	Croissance	
			PS	Res
Sauvage	-	rouge	+	+
A1 :: Kn	+	rouge	-	+
A2 :: Kn	+	rouge	-	+
A3 :: Kn	+	Vert-marron	+	+
A4 :: Kn	+	Vert-marron	+	+
A5 :: Kn	+	vert	+	+
A6 :: Kn	+	rouge	+	+
A7 :: Kn	+	bleu	+	+
A8 :: Kn	+	rouge	+	+

Q14 : Combien de gènes au minimum contient cette région ? Justifiez votre réponse. Représentez-les schématiquement sur la figure 1 par des rectangles d'environ 1,5 cm.

Figure 1 : Positions des insertions de la cassette Kn sur la région du chromosome



La pigmentation rouge de ces bactéries est due aux pigments caroténoïdes. Les gènes codant pour les enzymes intervenant dans leurs voies de biosynthèse sont appelés *crt*. Les gènes impliqués dans la photosynthèse sont appelés *puf*.

Q15 : Sur le nombre de gènes déterminés précédemment combien sont des gènes *crt*, des gènes *puf* ? Complétez la figure précédente en portant les gènes identifiés.

Des études biochimiques antérieures ont permis de proposer les voies de biosynthèse données figure 2. L'analyse du contenu en caroténoïdes des 8 mutants et de la souche sauvage est donnée dans le tableau 4.

Figure 2. Voies de biosynthèse des caroténoïdes.

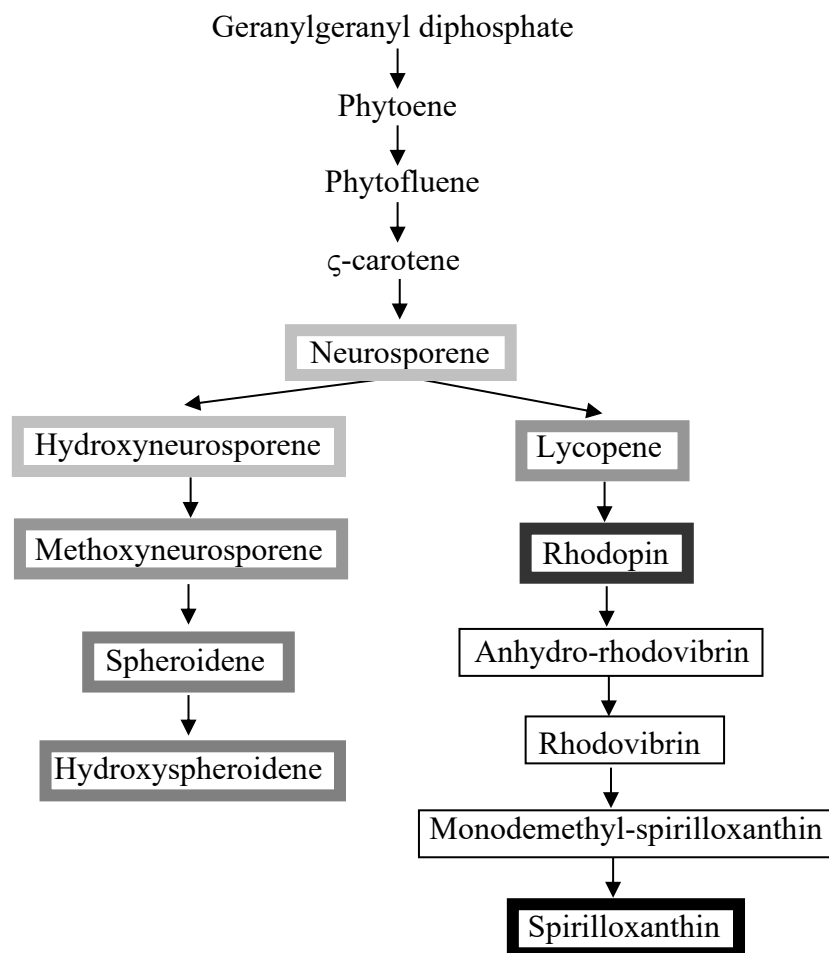


Tableau 4 : Caroténoïdes trouvés dans la souche sauvage (Wt) et dans les 8 mutants (A) construits :

	Wt	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Couleur	R	R	R	V-M	V-M	V	R	B	R
Hydroxyspheroidene	++	++	++				++		++
Spirilloxanthin	++	++	++				++		++
Spheroidene	+	+	+				+		+
Neurosporene				+	+	++			
Lycopene				+	+	++			
Methoxyneurosporene				++	++				
Hydroxyneurosporene				+	+				
Rhodopin				++	++				

Q16 : Indiquez quelles étapes sont sous le contrôle des gènes que vous avez identifiés ci-dessus en les indiquant sur la figure 2.

Une deuxième série (B) de 8 mutants a été construite en insérant aux mêmes endroits du chromosome un autre fragment d'ADN. Ce fragment contient cette fois-ci un gène conférant la résistance à la spectinomycine. Ce gène contient un terminateur fort de transcription. Les phénotypes des 8 mutants et de la souche sauvage sont donnés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Phénotypes des 8 mutants (B) construits et de la souche sauvage :

Souches	Phénotype			
	Résistance Spectinomycine	Couleur	Croissance	
			PS	Res
Sauvage	-	rouge	+	+
B1 :: Ω	+	vert	-	+
B2 :: Ω	+	vert	-	+
B3 :: Ω	+	vert	+	+
B4 :: Ω	+	vert	+	+
B5 :: Ω	+	vert	+	+
B6 :: Ω	+	rouge	+	+
B7 :: Ω	+	bleu	+	+
B8 :: Ω	+	bleu	+	+

Q17 : Combien d'opéron(s) au-moins se trouve(nt) dans cette région chromosomique ? Schématisez-le(s) sur la figure 1. Positionnez le(s) promoteur(s) en donnant le(s) sens de transcription.

(la question Q18 est à traiter seulement si il y a le temps).

Des conjugaisons sont réalisées entre les mutants de photosynthèse A1, A2 et la souche d'*E. coli* E qui contient les plasmides 1, 2 et 6. Après une incubation pendant 6 heures, les mélanges sont étalés sur milieu M + Sm + Kan et les boîtes sont incubées en anaérobiose-lumière. Après 48 heures, des colonies sont obtenues à partir du mélange avec le mutant A1, mais pas avec A2.

- Q18 :**
- a) Quel type de test est réalisé dans cette expérience ?
 - b) Que pouvez-vous conclure pour le mutant A1 ?
 - c) Quelles hypothèses peuvent expliquer les résultats avec le mutant A2 ?

ANNEXES

Plasmides	Séquences présentes	Remarques
P1	ori, Amp ^r , tra (s) ⁺	
P2	ori, Cm ^r , mob ⁺	
P3	oriV, oriT, Kan ^r	
P4	ori, oriT, Kan ^r	
P5	ori, oriT, Kan ^r , <i>pufL</i>	P5 = P4 + <i>pufL</i>
P6	oriV, oriT, Kan ^r , opéron <i>puf</i>	P6 = P3 + opéron <i>puf</i>

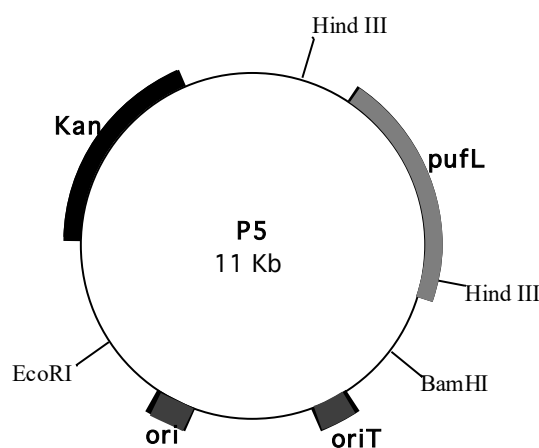
Légende :

- ori et oriV = origines de répllication. Attention : Ces deux origines de répllication sont fonctionnelles dans *E. coli*, mais on ignore leur fonctionnalité dans la bactérie *R. gelatinosus*.
- oriT = origine de transfert, qui rend un plasmide mobilisable, c'est-à-dire transférable en présence de l'équipement protéique adéquat.
- Sm=streptomycine, Kan=kanamycine, Amp=ampicilline et Cm=chloramphénicol.
- tra (s)⁺ = gènes impliqués dans la conjugaison (formation de pili, protéines de stabilisation du croisement, etc.)
- mob = code pour une enzyme " activant " oriT et donc permettant le transfert du plasmide porteur.
- *pufL* = fragment interne de la partie codante (90% de l'ORF = "Open Reading Frame" ou phase ouverte de lecture) du gène *pufL* de *R. gelatinosus*.
- Opéron *puf* = gènes *pufLM* de *R. gelatinosus*.

Souches d'*E. coli*

- Souche A *E. coli*
- Souche B *E. coli* contenant les plasmides P1, P2, P3
- Souche C *E. coli* contenant les plasmides P1, P2, P4
- Souche D *E. coli* contenant les plasmides P1, P2, P5
- Souche E *E. coli* contenant les plasmides P1, P2, P6

Figure 1 : Plasmide P5



Note : BamHI, EcoRI et HindIII indiquent la position des sites de restriction correspondants à ces trois endonucléases.

TD7 (3h)

Suppression & co-létalité

Une équipe de chercheurs travaillant sur la stabilité du génome de la levure *S. cerevisiae* s'intéresse au gène *SRS2*, une hélicase à ADN bloquant la recombinaison homologue. Ils souhaitent établir l'ensemble des interactions génétiques établies par ce gène.

I-Première partie

Dans un premier temps, ils décident d'explorer les interactions de type létalité synthétique avec une délétion du gène *SRS2*. Pour cela, ils disposent de la souche OP812 de génotype : *MAT α , srs2 Δ ::natR, ura3 Δ , leu2 Δ , his3 Δ , lys2 Δ* . *natR* est un gène conférant la résistance à l'antibiotique nourseothricin (Nc). Le phénotype résistant est dominant.

Q1) Quel est le phénotype de la souche OP812 ?

Par ailleurs, le génome complet de la levure *S. cerevisiae* a été séquencé en 1996. On estime que ce génome possède de l'ordre de 6250 gènes. Les chercheurs disposent d'une collection de souches haploïdes. Chaque souche de cette collection est délétée pour un des 6250 gènes (gènes X). Les délétions sont obtenues en remplaçant tout le gène par le gène *kanMX4* conférant la résistance à l'antibiotique G418. Le phénotype résistant au G418 est dominant. Ces souches SGA^X sont de génotype : *MAT a, X Δ ::kanMX4, his3 Δ , leu2 Δ , met15 Δ , ura3 Δ*

Q2) Pensez-vous que l'ensemble des souches délétées individuellement pour chacun des 6250 gènes a pu être obtenu ? Proposez une explication.

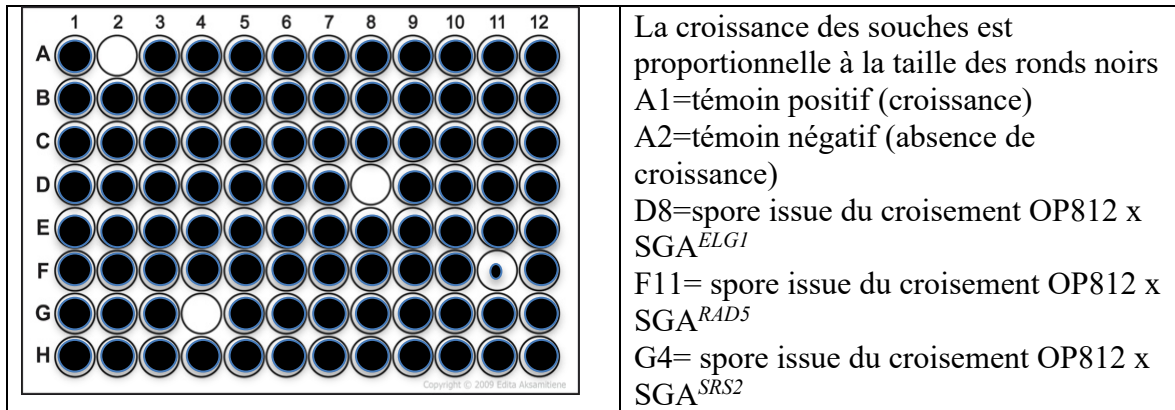
Les chercheurs vont ensuite croiser individuellement la souche OP812 avec chacune des souches SGA^X. Ce crible à haut débit se réalise dans des plaques 96 puits dans lesquelles chaque croisement est ordonné. Les repiquages de plaque en plaque pour étudier la croissance sur différents milieux se font à l'aide d'un robot.

Q3) Sur quel(s) milieu(x) peut-on sélectionner les diploïdes ?

La sporulation des diploïdes est induite.

Q4) Quel est le génotype des spores obtenues et quel est celui qui va intéresser les chercheurs pour leur étude (vous ne prenez en compte que les loci de *SRS2* et X)? Quels sont leur phénotype ?

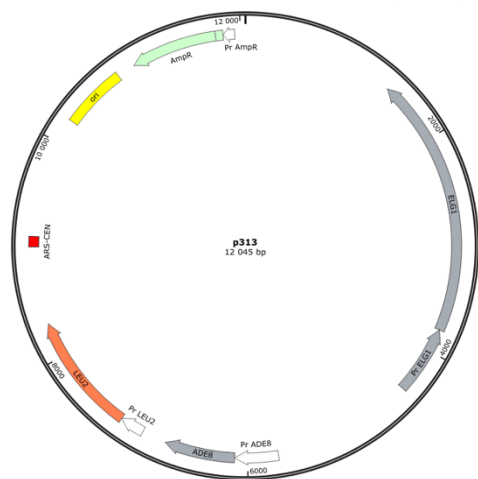
Les chercheurs ont pu isoler les spores d'intérêt et la croissance de ces spores haploïdes est examinée sur un milieu complet YPG. La figure suivante représente le résultat pour une des plaques 96 puits.



Q5) Interprétez les résultats obtenus pour cette plaque.

II- Deuxième partie

Une souche OP738 de génotype *MAT a, elg1Δ::kanMX4, srs2Δ::kanMX4, ade2Δ, ade8Δ, leu2, ura3, his3* et portant le plasmide p313 : ARS-CEN, *LEU2*⁺, *ELG1*⁺, *ADE8*⁺ a été construite (voir carte). La **mutation *ade2*** confère deux phénotypes (elle est dite **pléiotrope**) : une auxotrophie vis-à-vis de l'adénine [*Ade*⁻] et une **coloration rouge des colonies** [Rouge]. Cette coloration est due à l'accumulation d'un précurseur de l'adénine (AIR) qui a la propriété de s'oxyder à l'air pour donner un produit coloré en rouge. La **mutation *ade8*** confère un seul phénotype [*Ade*⁻], elle n'affecte pas la couleur des colonies [Blanc]. Le gène *ADE8* code une protéine (enzyme) catalysant une des étapes de la voie de biosynthèse de l'adénine. Cette étape est antérieure à l'étape catalysée par l'enzyme codée par le gène *ADE2*.

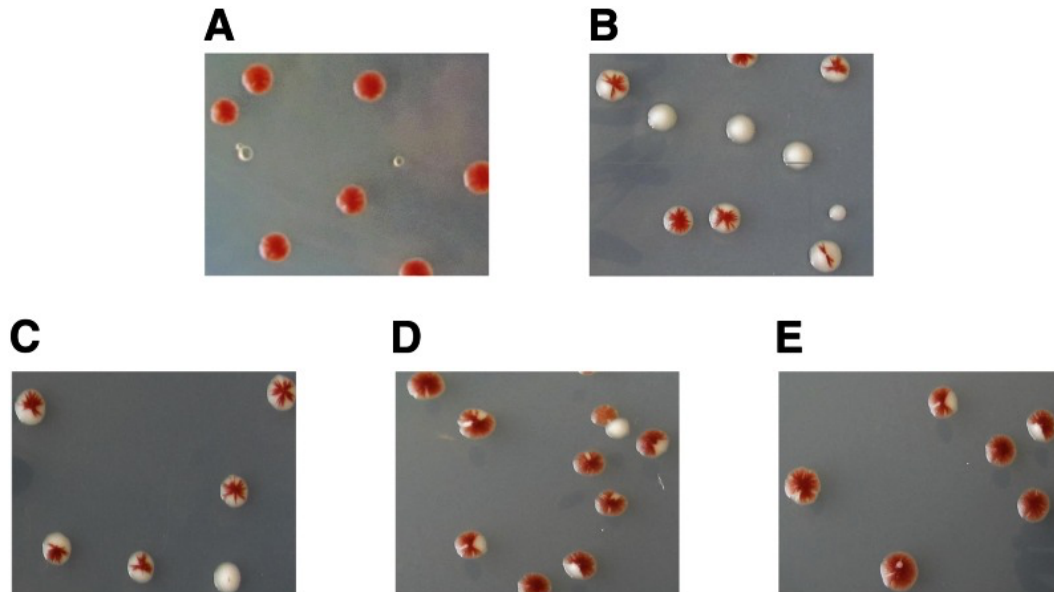


Carte du plasmide p313

- Q6) a- De quelle couleur sont les colonies de la souche OP738 ?
- b- Celles de la souche OP738 portant le plasmide p313 ?
- c- Comment s'appelle la relation entre les mutations *ade2* et *ade8* ?
- d- Décrivez les différents éléments du plasmide et leur utilité.

Cette souche a été transformée par une banque d'ADN génomique d'une souche sauvage cloné dans un vecteur multicopie possédant le marqueur *URA3*⁺. Après sélection sur un milieu contenant de la leucine, de l'adenine, de l'histidine mais sans uracile, les transformants sont striés sur milieu YPG8. Les photos A et

B correspondent aux témoins de l'expérience, les photos C à E à 3 exemples de résultat concernant des transformants d'intérêt obtenus avec la banque d'ADN génomique sauvage.



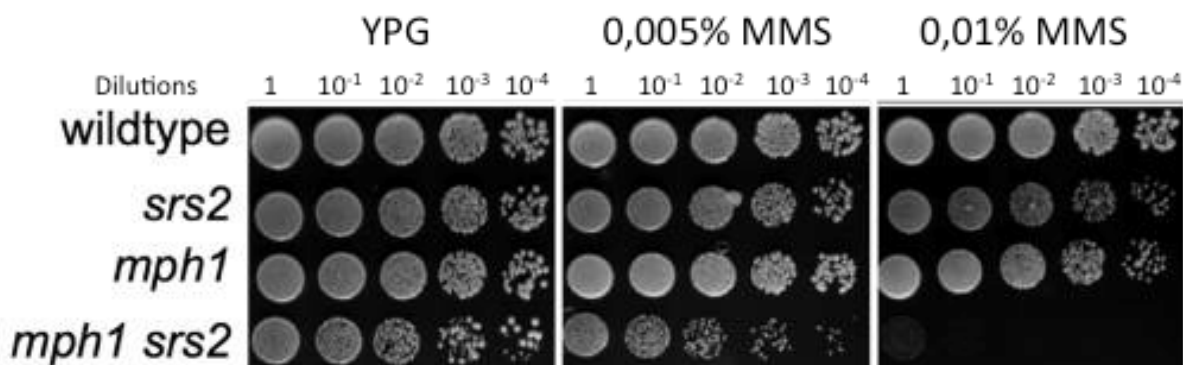
Q7) A quel témoin correspond la photo A, quel est le plasmide utilisé ? Mêmes questions pour le témoin B.

Q8) Que contient l'insert des plasmides correspondant aux transformants C à E ? Quelle relation génétique est-elle ici mise en évidence ? Quels sont les faux-positifs possibles ?

Q9) Les transformants C à E ont des comportements différents. Proposez une explication concernant la sectorisation observée.

Une préparation d'ADN plasmidique a été réalisée à partir des transformants C et D. La séquence de leur insert respectif a été déterminée ce qui a permis d'identifier le gène *MPH1* comme étant responsable de phénotype observé à la question précédente.

Afin d'affiner les relations entre le gène *SRS2* et ce nouveau gène, la croissance des souches simple et double mutantes a été testée à l'aide de dilutions en série (1 à 10^{-4}) sur YPG en présence ou non de MéthylMéthaneSulfonate (MMS) qui induit des lésions dans l'ADN.



Q10) a- Analysez ces résultats.

b- Quelle est la relation génétique mise en évidence ?

c- Ces résultats confirment-ils le rôle fonctionnel des protéines codées par ces deux gènes ? Justifiez.

III- Troisième partie

Au sein d'une culture de la souche OP812 (délétée pour le gène *SRS2*) apparaissent spontanément des révertants présentant une croissance nettement améliorée sur milieu YPG + 0,01% MMS par rapport aux cellules de la souche de départ (ce phénotype sera qualifié de [pseudo-sauvage]). Ces révertants apparaissent sous la forme de colonies de grande taille sur milieu solide parmi des colonies de petite taille correspondant au phénotype des mutants $\Delta srs2$.

Q11) Quel événement génétique peut être à l'origine de l'apparition de ces révertants? Justifiez et proposez le génotype le plus simple pour ces révertants

Un de ces révertants (nommé par la suite Rev1) a été croisé avec la souche sauvage de référence (*MATa*, *SRS2*⁺, *ura3* Δ , *leu2* Δ , *his3* Δ , *met15* Δ). Les diploïdes obtenus ont été mis à sporuler et une analyse de leur descendance méiotique a été effectuée. Les résultats de cette analyse vous sont présentés ci-dessous.

phénotype des spores	[sauvage]	[$\Delta srs2$]
nombre de spores observées	444	146

**Q12) a- Indiquez le génotype (à l'exclusion des marqueurs d'auxotrophie) des cellules diploïdes.
b- Donnez le génotype envisagé des quatre spores.
c- Que pouvez-vous conclure quant à l'événement à l'origine du révertant Rev1?**

Le révertant Rev1 a ensuite été croisé avec la souche OP813 (*MATa*, *srs2* Δ :*natR*, *ura3* Δ , *leu2* Δ , *his3* Δ , *met15* Δ). La souche diploïde obtenue présente les mêmes caractéristiques phénotypiques que la souche diploïde ($\Delta srs2/\Delta srs2$) sur YPG + 0,01% MMS.

Q13) Qu'en concluez-vous ?

Les 4 spores issues de la méiose des diploïdes formés lors du croisement de rev1 par la souche sauvage (Q12b) ont été soumis à une analyse phénotypique plus détaillée. Les résultats de l'analyse du phénotype de croissance sont présentés ci-dessous. Les résultats du phénotype d'instabilité génomique reflété par l'augmentation du taux de recombinaison au locus de l'ADN ribosomique sont présentés dans le tableau suivant. Les phénotypes correspondants des souches *SRS2*⁺ et $\Delta srs2$ de référence sont indiqués.

<p>dilutions croissantes →</p>	<p>Test de croissance en goutte des souches issues des 4 spores du croisement de rev1 par la souche sauvage.</p> <p>Chaque spore (a, b, c, et d) a été mise en culture liquide puis 4 dilutions croissantes de ces cultures ont été déposées en goutte sur une boîte de milieu YPG + 0,01% MMS puis incubées 48h à 30°C. Les souches sauvages et $\Delta srs2$ ont été traité de la même manière et sont utilisées comme référence.</p> <p>Les phénotypes ainsi déterminés sont indiqués à droite.</p>
--------------------------------	---

Fréquence de recombinaison au locus rDNA des souches analysées ci-dessus		
souches	fréquence de recombinaison (10^{-4})	facteur d'augmentation
spore a	80 +/- 11	7
spore b	13 +/- 4	1
spore c	860 +/- 80	75
spore d	11 +/- 4	1
sauvage	12 +/- 3	1
$\Delta srs2$	954 +/- 118	77

Q14) Quelles conclusions pouvez-vous émettre quant aux phénotypes de chacune des spores ?

TD8 (3h)

Préambule: Chez *E. coli*, la division cellulaire est un processus régulé de façon très précise (dans des conditions normales de croissance, la fréquence des cellules dépourvues de nucléoïde est inférieure à 10^{-3}) et strictement coordonné avec la réplication de l'ADN.

Quand la réplication de l'ADN est perturbée (par exemple après irradiation aux UV), les divisions s'arrêtent, conduisant à l'allongement des cellules qui deviennent filamenteuses. Lorsque la perturbation du métabolisme de l'ADN cesse, les divisions reprennent et les cellules retrouvent un aspect normal. Ceci suggère qu'il existe un couplage entre la réplication de l'ADN et la division. Dans un modèle proposé, la fin de la réplication devrait conduire à un signal de début de division, et il faudrait imaginer l'existence d'un inhibiteur de division dont la synthèse serait fortement induite quand la réplication de l'ADN est perturbée.

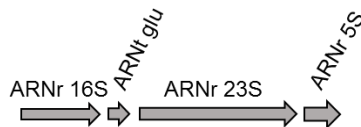
On a isolé un mutant appelé [*Lon*⁻], qui lors d'une irradiation aux UV même faible, donne de très longs filaments et s'avère incapable de restaurer une division normale. Par ailleurs, on a également observé que ce mutant est hypersensible à la nitrofurantoïne.

Cette mutation se trouve dans le gène *lon* qui est localisé à 10 min. sur la carte d'*E. coli*. De plus, le gène *lon* est cotransductible à 50 % avec le gène *tsx* (codant le récepteur au phage T6, *tsx*⁻=résistance au phage T6 ; *tsx*⁺=sensibilité au phage).

Pour aborder le problème de l'inhibition de division (en particulier, afin d'identifier les produits des gènes impliqués dans le couplage entre réplication et division), on a recherché des supprimeurs de la mutation *lon*.

Q1 – En utilisant des lysats de phages obtenus à partir des révertants phénotypiques, proposez une méthode génétique permettant de différencier des révertants correspondant à des supprimeurs extragéniques par rapport à des révertants correspondant à des supprimeurs intragéniques.

Parmi les supprimeurs identifiés, le premier est localisé dans la région chromosomique suivante :



L'utilisation d'un lysat de phage P1 réalisé sur ce suppresseur pour infecter une souche délétée du gène *lon* ne donne jamais de transductants [*Lon*⁺].

Q2 – Ce résultat est-il surprenant ?

Le séquençage du gène *lon* mutant fait apparaître le changement d'un codon glutamate GAA en codon TAA en plein milieu de la séquence codante.

Q3 – Comment appelle-t-on ce type de supprimeurs ?

Les deux autres supresseurs identifiés sont *sfiA* et *ftsZ*. Leur étude est poursuivie.

I - Localisation génétique de *sfiA* :

Le croisement suivant a été effectué : **Hfr** KL16 *lon⁻ sfiA⁺ str^s* x **F⁻** *lon⁻ sfiA⁻ pur⁻ trp⁻ gal⁻ pro⁻ str^r* (voir carte en annexe). Des étalements sont effectués après 100 min de conjugaison sur milieu minimum dépourvu de purine mais contenant du tryptophane, de la proline et de la streptomycine. Les recombinants testés par réplique sur milieux sélectifs appropriés se répartissent comme suit :

<i>pur⁺ str^r</i>	100
<i>pur⁺ trp⁺ str^r</i>	59
<i>pur⁺ sfiA⁺ str^r</i>	29
<i>pur⁺ gal⁺ str^r</i>	13
<i>pur⁺ pro⁺ str^r</i>	1,7

Q4 - Quels sont les milieux sélectifs appropriés pour établir ces génotypes ? Quelles indications fournit ce croisement sur la localisation de *sfiA*?

Pour préciser cette localisation, la transduction suivante est réalisée : un lysat de P1 est obtenu à partir de la souche *pyr⁺ fabA⁻ sfiA⁺* et utilisé pour infecter la souche *pyr⁻ fabA⁺ sfiA⁻*. Les transductants [*Pyr⁺*], testés par répliques, se répartissent comme suit:

<i>pyr⁺ fabA⁺ sfiA⁻</i>	174
<i>pyr⁺ fabA⁻ sfiA⁻</i>	32
<i>pyr⁺ fabA⁻ sfiA⁺</i>	91
<i>pyr⁺ fabA⁺ sfiA⁺</i>	3

Q5 - Quelle est la localisation génétique de *sfiA* ? (pour rappel : la taille d'ADN (**L**) pouvant être empaquetée dans une particule virale du phage P1 est environ 100 kb d'ADN/particule ou 2,1 min)

Finalement, il a été montré que la distance entre *sfiA* et *fabA* est de 0,12 min. Par le même type d'approche expérimentale que précédemment, le second supresseur *ftsZ* a été positionné entre *azi* et *leu*, plus précisément à 0,10 min de *azi*.

II - Etude de l'expression des gènes supresseurs de *lon*

1 - *sfiA* :

Les produits des gènes supresseurs ainsi identifiés ne pouvant pas être facilement dosés, il n'est pas possible d'aborder directement leur expression. Une fusion de protéines faisant appel à un dérivé du bactériophage Mu a été utilisée (voir annexe). Mu est un phage tempéré à ADN double brin capable de s'insérer en n'importe quel point du chromosome bactérien, provoquant l'inactivation du gène ainsi atteint. Lors de cette insertion, la carte génétique du virus n'est pas modifiée, l'insertion pouvant se réaliser dans les deux sens possibles.

Le dérivé de Mu appelé **Mu dII Ap lac** (décrit en annexe) a été utilisé pour réaliser la mutagenèse, les fusions de protéines, et sélectionner des supresseurs de *lon* à partir de la souche A [*Nitro^{hyperS} Amp^S*].

Q6 - Comment sélectionner les supresseurs ?

Une des fusions de protéines, touchant le gène *sfiA* (appelée *sfiA::lac*) ainsi obtenue a été étudiée plus précisément tant au niveau génétique qu'au niveau physiologique. Le tableau suivant résume le comportement de la fusion dans différentes conditions expérimentales et dans différents contextes génétiques (mutation *recA⁻* codant une protéine RecA non fonctionnelle ; ou mutation *lexA1*, codant une protéine fonctionnelle mais insensible à l'action de RecA). A titre de contrôle, une autre fusion de Mu dII Ap lac avec l'opéron galactose a été également testée. Le tableau suivant résume l'expression de la β-galactosidase dans les différentes souches testées :

Génotype de la souche	Traitement inducteur	Activité β-gal	
		0	+
<i>sfiA :: lacZ</i>	UV	30	440
<i>sfiA :: lacZ recA⁻</i>	UV	10	10
<i>sfiA :: lacZ lexA1</i>	UV	10	10
<i>sfiA :: lacZ lon⁻</i>	UV	20	400
<i>gal :: lacZ</i>	galactose	10	50
<i>gal :: lacZ</i>	UV	10	10

0 : pas de traitement inducteur

+ : traitement inducteur

Rappel: Le système SOS est un ensemble de gènes qui s'expriment lorsque *E. coli* est soumis à des traitements endommageant l'ADN (par exemple les UV...) et permettant aux cellules de bloquer momentanément les divisions cellulaires pour réparer l'ADN. Ce système est sous le contrôle de deux gènes régulateurs, le gène *lexA* qui code le répresseur de l'ensemble des gènes du système SOS et le gène *recA* qui code une protéase spécifique du répresseur LexA et de certains répresseurs tels que celui du prophage lambda.

Q7 - Cet ensemble d'informations permet-il de comprendre la régulation du gène *sfiA* ? Comment relier le système SOS et le gène *sfiA* ?

2 - *ftsZ* :

Aucune fusion n'a été obtenue pour *ftsZ*. Mais il existe des mutants létaux conditionnels affectant *ftsZ* qui conduisent à la formation de longs filaments dans des conditions non permissives, sans mise en jeu du système SOS.

Q8 - Quelle hypothèse sur le rôle du produit FtsZ peut-on déduire de ces résultats ?

III - En route vers un modèle :

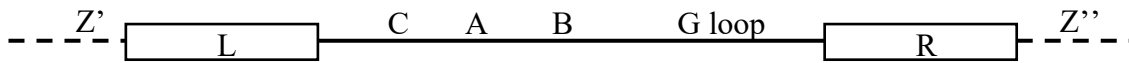
Q9 - Sachant que *lon* code de manière constitutive une protéase et que le produit du gène *sfiA* est instable, quel lien peut-on imaginer entre *lon* et *sfiA* ?

Q10 - D'après les réponses en Q6, Q7 et Q8, proposez une relation entre les deux suppresseurs ?

Q11 - Comment expliquer l'effet suppresseur d'une mutation dans *ftsZ* ?

ANNEXES

Carte de Mu :



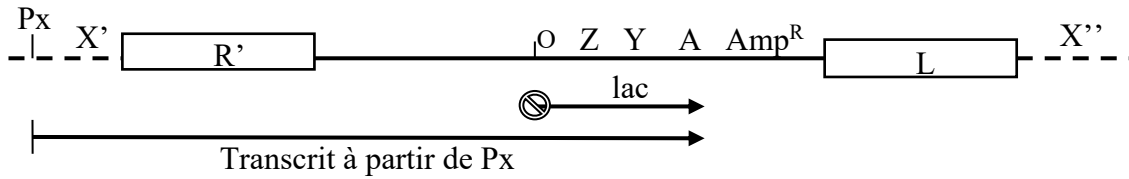
C code le répresseur de Mu.

A, B, G loop : quelques gènes de Mu.

L et R : extrémités de Mu qui jouent un rôle dans son insertion dans le chromosome d'*E. coli*.

Z'Z'' : ADN bactérien.

Carte de Mu dII Ap Lac :



Mu dII Ap Lac est un phage Mu déficient : l'extrémité désignée par **R'** ne possède pas de codon stop. La transcription peut être initiée à partir d'un promoteur bactérien (noté ici **Px**) et permettre l'expression du gène *lac* ; l'opéron lactose dans cette construction est dépourvu de son propre promoteur et ne peut donc s'exprimer qu'à partir d'un promoteur bactérien. L'insertion de Mu dans un gène bactérien X donné peut se faire dans 2 sens, mais un seul peut conduire à l'expression de l'opéron lactose.

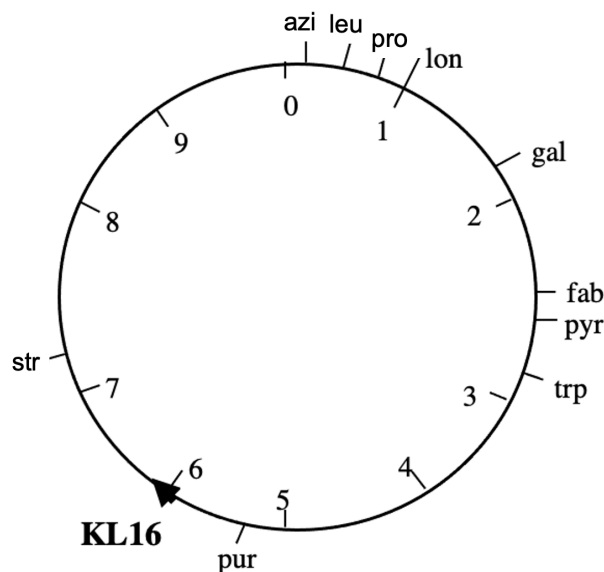
Px : promoteur du gène X d'*E. coli*.

X'X'' : les deux fragments du gène X inactivé par l'insertion de Mu dII Ap Lac.

Amp^R : confère la résistance à l'ampicilline quel que soit le sens d'insertion car le gène *amp^R* possède son propre promoteur.

Carte du chromosome d'*E. coli* :

La flèche indique le sens de l'origine de transfert de Hfr KL16.



TD9 (3h)

Epistasie

Exercice 1 :

Chez la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae*, on obtient des diploïdes a/α par conjugaison entre deux cellules haploïdes de signe sexuel a (le gène $MATa$ s'exprime) et α (le gène $MAT\alpha$ s'exprime). Ce processus est initié par un échange de phéromones, facteurs a (Fa) et α ($F\alpha$), qui se lient respectivement aux récepteurs membranaires de type α et de type a . Ce stimulus extracellulaire induit l'activation d'une voie de transduction du signal qui coordonne tous les changements métaboliques nécessaires à la conjugaison : arrêt du cycle cellulaire en phase G1, activation transcriptionnelle des gènes nécessaires à la fusion des cellules haploïdes puis à la fusion des noyaux (caryogamie). En absence de phéromone, la voie de signalisation qui permet la conjugaison est inactive.

Pour identifier les gènes nécessaires à la conjugaison, des mutants incapables de réaliser la conjugaison en présence de phéromones ont été isolés. On dispose ainsi de cinq mutants « STE » : $\Delta Ste4$, $\Delta Ste5$, $\Delta Ste7$, $\Delta Ste11$ et $\Delta Ste12$ (voir tableau 1). Par ailleurs, on dispose d'un allèle mutant du gène $STE11$, appelé $STE11^{DP}$, qui provoque, en absence de phéromone, l'activation de la voie de signalisation de la conjugaison. Les mutants haploïdes $\Delta Ste4$, $\Delta Ste5$, $\Delta Ste7$, $\Delta Ste11$ et $\Delta Ste12$ ont été individuellement transformés par un plasmide répliatif à faible nombre de copies (1 à 2 par cellules) portant l'allèle $STE11^{DP}$. Les résultats de cette expérience sont décrits dans le tableau 1 :

Génotype	Plasmide répliatif	Conjugaison
SSR	néant	+++
SSR	11^{DP}	+++
$\Delta Ste2$	néant	-
$\Delta Ste2$	11^{DP}	++
$\Delta Ste4$	néant	-
$\Delta Ste4$	11^{DP}	++
$\Delta Ste5$	néant	-
$\Delta Ste5$	11^{DP}	++
$\Delta Ste7$	néant	-
$\Delta Ste7$	11^{DP}	-
$\Delta Ste11$	néant	-
$\Delta Ste11$	11^{DP}	+++
$\Delta Ste12$	néant	-
$\Delta Ste12$	11^{DP}	-

Tableau 1 : SSR : souche sauvage de référence

Q1 : Comment s'appelle ce type d'analyse ? Quel est son but ?

Q2 : En justifiant votre démarche, donnez l'ordre chronologique dans lequel les différents produits des gènes STE agissent.

Les gènes *STE* ont été clonés et la fonction de chacun d'entre eux est indiquée dans le tableau 2 :

Nom	Fonction
STE2	Récepteur membranaire
STE4	Sous unité β de protéine G
STE5	Protéine de type « scaffold »
STE7	Protéine kinase
STE11	Protéine kinase
STE12	Facteur de transcription

Tableau 2 : fonction des protéines codées par les gènes *STE*

Q3 : A l'aide des informations contenues dans le tableau 2, pouvez-vous préciser votre réponse à la question 2 ?

Exercice 2 :

A partir d'une souche sauvage de *Saccharomyces cerevisiae*, des chercheurs souhaitent obtenir par mutagenèse des mutants auxotrophes pour le tryptophane.

Q1 : Décrivez les conditions expérimentales permettant de sélectionner des mutants [Trp-] indépendants.

Parmi ces mutants [Trp-], certains ont également un phénotype [Tyr-, Phe-].

Q2 : Donner un crible permettant d'identifier ce type de mutants. Comment expliquer ces phénotypes supplémentaires ?

Les mutants [Trp-, Tyr-, Phe-] sont croisés avec la souche sauvage. L'analyse de la descendance donne 50% [Trp+, Tyr+, Phe+] et 50% [Trp-, Tyr-, Phe-].

Q3 : Pouvez-vous préciser la réponse faite à la question 2 ?

Ces chercheurs ont montré que les mutants obtenus se répartissent en 8 groupes de complémentation (A à H). Les auteurs souhaitent ordonner les gènes dans la voie de biosynthèse de ces acides aminés aromatiques. Pour cela, on teste si les mutants peuvent pousser dans des milieux additionnés de différents intermédiaires présumés de la voie de biosynthèse de ces acides aminés.

	MM	MM + trp	MM + phe + tyr	MM + trp + phe + tyr	MM + Cho	MM + I3GP	MM + shi	MM + N5PRA	MM + Ant	MM + Ant + tyr + phe
A	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
B	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
C	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
D	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
E	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
G	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
H	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
SSR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

MM: Milieu minimum; I3GP: Indole 3-glycérol phosphate; N5PRA: N-(5'-phosphoribosyl)-anthranilate, Cho : chorismate, Shi : shikimate, Ant : anthranilate

Q4 : Déduisez la voie de biosynthèse mise en jeu.

Des double-mutants ont été construits comme indiqué ci-dessous :

- F, C
- C, D
- D, E
- A, G
- C, G

Q5 : Pour chacune de ces combinaisons pouvez-vous indiquer le phénotype du double mutant ?

Les gènes mutants ont été identifiés et les allèles correspondants séquencés. Les résultats de ces expériences montrent que les mutants F et H sont affectés dans le même gène.

Q6 : Comment peut-on expliquer que le test de complémentation fonctionnelle place ces mutants dans deux groupes de complémentation différents ?

TD10 (3h)

Génétique inverse

Partie I : Création de modèles murins pour étudier le gène *MLL*

Introduction :

Environ 50% des leucémies (tumeurs hématopoïétiques) sont porteuses de translocations chromosomiques. Parmi les différents points de cassure répertoriés, la région 11q23 est souvent sujette à de tels remaniements. Au niveau de ce point de cassure est localisé le gène *MLL* (« Mixed-Lineage Leukemia ») codant un régulateur transcriptionnel.

Les réarrangements chromosomiques observés dans les leucémies impliquant le gène *MLL* résultent la plupart du temps de translocations réciproques. Celles-ci conduisent à la fusion de 2 gènes dont l'expression, qui se fait toujours sous le contrôle du promoteur du gène *MLL*, produit une protéine de fusion dans laquelle la région C-terminale de la protéine *MLL* est perdue au profit de la région C-terminale de son partenaire (**Figure 1**). A ce jour, plus de 60 types de translocations réciproques impliquant le gène *MLL* ont été répertoriés. Les translocations les plus courantes sont les translocations réciproques t(4;11), t(9;11) et t(11;19) conduisant à la fusion du gène *MLL* avec le gène *AF4* (4q21), le gène *AF9* (9p21-22) ou le gène *ENL* (19p13), respectivement.

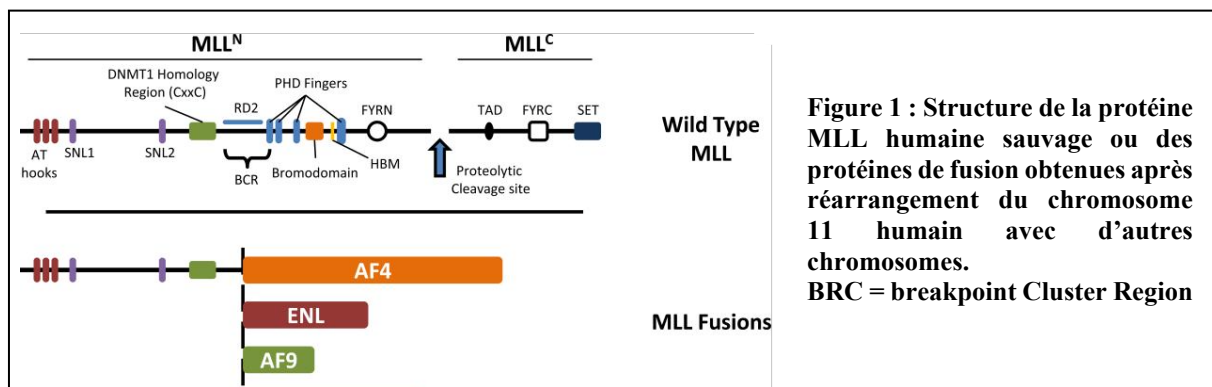
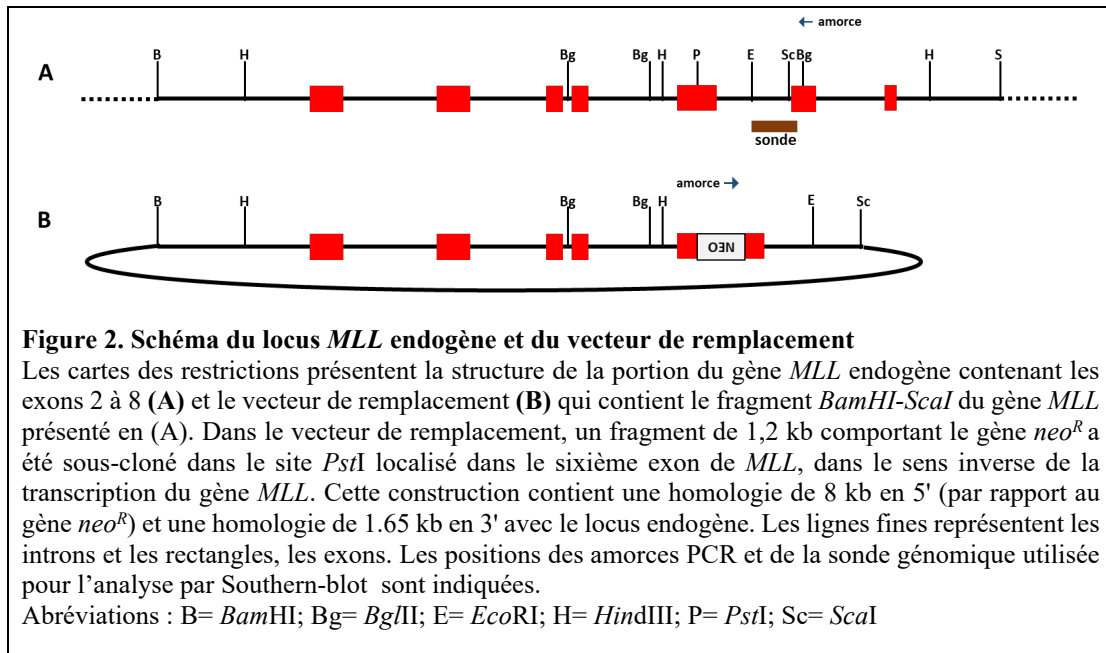


Figure 1 : Structure de la protéine MLL humaine sauvage ou des protéines de fusion obtenues après réarrangement du chromosome 11 humain avec d'autres chromosomes.
BRC = breakpoint Cluster Region

Les expériences décrites ci-dessous ont été réalisées afin de construire différents modèles animaux dans le but de mieux comprendre la fonction biologique normale du gène *MLL*.

I. Construction de « Knock-out » :

La **Figure 2A** représente une partie du gène *MLL* de souris contenant les exons 2 à 8 (rectangles). La **Figure 2B** montre un vecteur construit en vue du remplacement du gène *MLL* par une copie dans laquelle le gène *néo* est inséré dans l'exon 6, dans l'orientation opposée (pour la transcription) par rapport à *MLL*. Le gène *néo* confère la résistance au G418. Sur cette figure, la parenthèse indique la perte d'un site de restriction.



Question n°1 :

- **Schématiser le mécanisme qui doit aboutir au remplacement du gène *MLL* résidant par un gène modifié.**
- **Représenter la structure prédite pour ce dernier.**
- **Justifier l'orientation de la cassette Néo.**

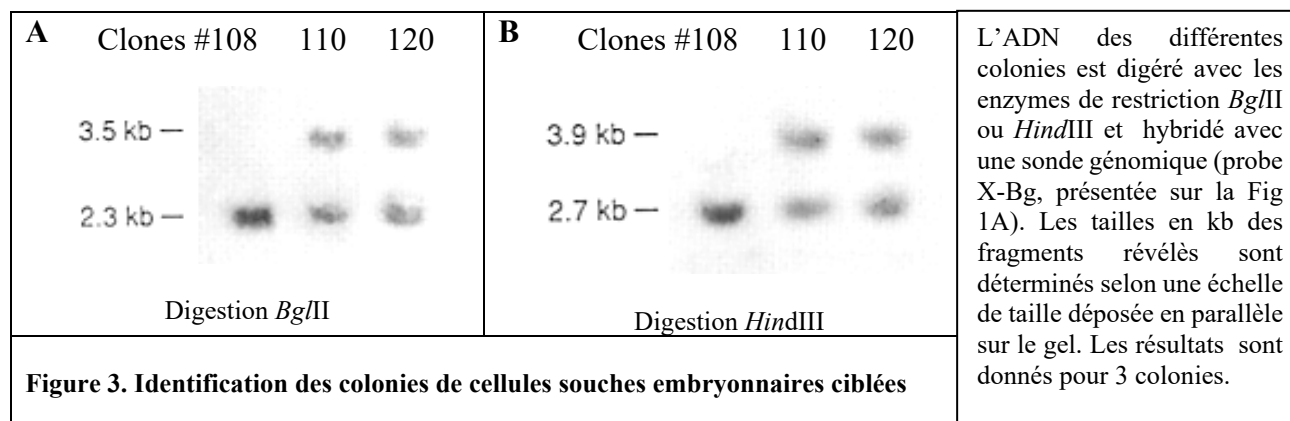
Le protocole expérimental utilisé est le suivant :

- a) Le vecteur, préalablement linéarisé, est introduit par électroporation dans des cellules souches embryonnaires (ES) provenant d'une lignée de souris R à pelage gris.
- b) Les cellules transfectées sont inoculées sur une couche nourricière de fibroblastes préalablement traités par la mitomycine (agent antimétabolique) issus d'embryons de souris résistants à la drogue G418. Les cellules sont ensuite recouvertes d'un milieu de culture et incubées dans des conditions appropriées.
- c) Après 24 heures, le milieu de culture est remplacé par du milieu contenant la drogue G418, ce milieu est ensuite renouvelé à intervalles de 1 ou 2 jours pendant 10 jours.
- d) Les colonies isolées sont alors traitées comme suit :
 - une portion de chaque colonie est mise en réserve dans un puits d'une plaque à 24 puits.
 - le reste de chaque colonie est ensuite rassemblé par groupes de 6 colonies pour une analyse par amplification de séquence par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les amorces utilisées pour cette analyse sont indiquées sur la **Figure 2** (A et B). Les produits de la PCR sont ensuite séparés par électrophorèse en gel d'agarose et transférés sur membrane pour une analyse par Southern-blot avec la sonde indiquée sur la **Figure 2A**. L'analyse par Southern-blot permet d'augmenter la sensibilité de la détection des clones positifs.
 - Les colonies des groupes positifs sont ensuite analysées individuellement par PCR dans les mêmes conditions et multipliées par cultures continues pour un usage ultérieur.

Question n°2 :

- **Expliquer chacune des étapes du protocole expérimental décrit ci-dessus.**
- **Indiquer plus particulièrement quelle séquence sera amplifiée au cours de l'expérience de PCR.**
- **Justifier le choix de la sonde utilisée pour le Southern-blot.**

Les ADN génomiques de 3 clones, 2 détectés positifs et 1 négatif par l'approche précédente, ont ensuite été analysés par Southern-blot. La **Figure 3** représente les profils d'hybridation obtenus avec ces 3 clones (n°108, 110 et 120) dont l'ADN génomique a été digéré par les enzymes de restriction *Bgl*III (**Fig. 3A**) et *Hind*III (**Fig. 3B**).



Question n°3 : Caractériser chacun des clones, justifier votre réponse.

Les membranes ont été déshybridées et réhybridées avec le gène *neo* comme sonde radioactive.

Question n°4 : Schématiser les profils attendus. Ne manque-t-il pas un (ou des) témoins ?

Les cellules souches embryonnaires de la lignée issue du clone #120 ont été injectées dans des blastocystes (embryons à un stade de développement donné) de souris d'une lignée L à pelage noir. Les blastocystes survivants ont ensuite été implantés dans l'utérus de souris femelles pseudogestantes d'une autre lignée à pelage noir.

Sur 14 souriceaux G0, 10 ont survécu, parmi lesquels 4 présentaient de 10 % à 100 % de pelage gris. Ces 4 souriceaux G0, tous mâles, ont été croisés avec des femelles de la lignée L. Dans trois cas, des descendants G1 à pelage gris sont apparus dont environ 50 % portaient l'allèle *MLL* altéré.

Question n°5 :

- **Pourquoi s'intéresser aux souriceaux présentant une partie de pelage gris ?**
- **Que signifie l'observation que des souriceaux à pelage gris ne sont apparus que dans 3 descendance G1 sur 4 ?**
- **Pourquoi et comment rechercher l'allèle *MLL* altéré chez les souriceaux G1 à pelage gris ?**
- **Expliquer la proportion observée.**

Les souris G1 apparaissent normales, qu'elles portent l'allèle *MLL* altéré ou non. Les individus G1 hétérozygotes pour *MLL* ont été croisés entre eux. L'analyse génotypique des descendants G2 âgés de 3 semaines montre qu'aucun d'entre eux n'est homozygote pour *MLL* altéré.

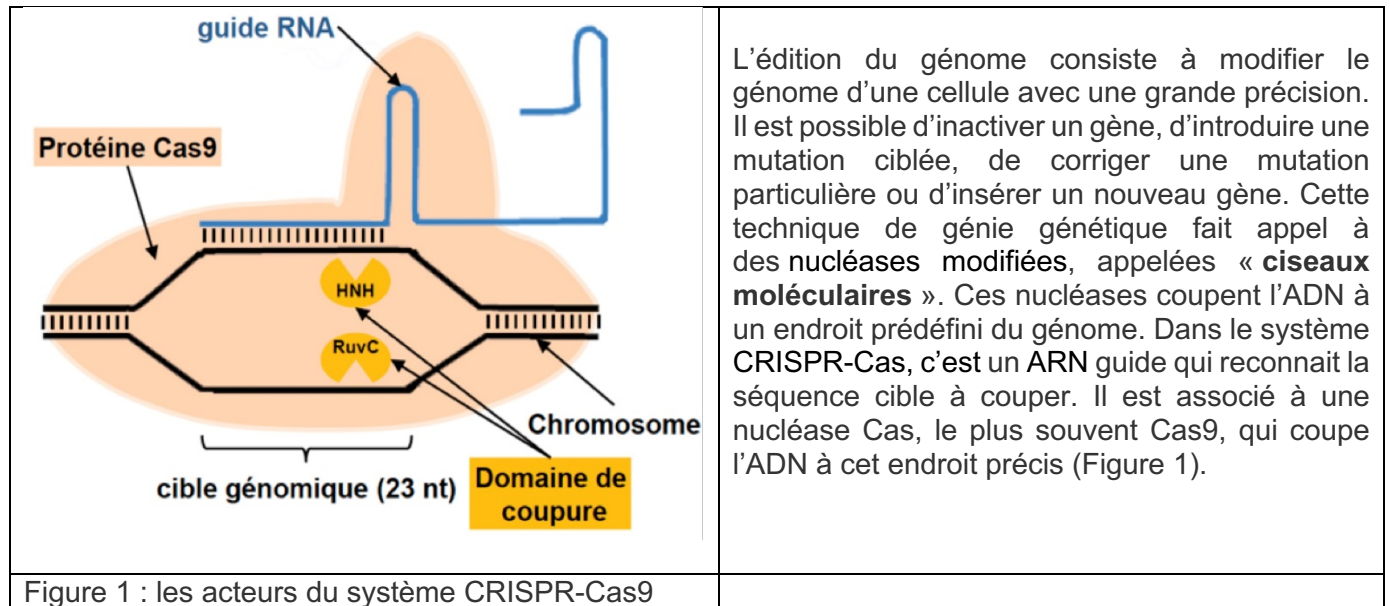
Question n°6 : Comment expliquer ce résultat ?

Partie II : Création de modèles murins pour étudier le gène *DMD*

Introduction :

L'édition génomique (de l'anglais *genome editing*) permet d'effectuer des modifications génétiques ciblées dans tous types de cellules, grâce à des ciseaux moléculaires spécifiques. Disponibles depuis les années 80, ces outils ont gagné en efficacité et en spécificité au cours du temps. En 2012, l'avènement du système CRISPR-Cas9 (CRISPR pour *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*),

caractérisé par sa très grande simplicité et son coût modeste, a révolutionné cette approche : l'édition génomique a désormais gagné tous les domaines de la science et de la médecine.



L'édition du génome consiste à modifier le génome d'une cellule avec une grande précision. Il est possible d'inactiver un gène, d'introduire une mutation ciblée, de corriger une mutation particulière ou d'insérer un nouveau gène. Cette technique de génie génétique fait appel à des nucléases modifiées, appelées « **ciseaux moléculaires** ». Ces nucléases coupent l'ADN à un endroit prédéfini du génome. Dans le système CRISPR-Cas, c'est un ARN guide qui reconnaît la séquence cible à couper. Il est associé à une nucléase Cas, le plus souvent Cas9, qui coupe l'ADN à cet endroit précis (Figure 1).

Figure 1 : les acteurs du système CRISPR-Cas9

En absence d'ADN présentant une homologie de séquence, un système de réparation naturel de l'ADN (NHEJ pour *Non-Homologous End-Joining*) se met alors en marche, pour « recoller » ensemble les deux extrémités libres générées par la coupure. Mais ce système de réparation introduit des erreurs, conduisant à des mutations de type délétion/insertion du gène ciblé. Il est également possible de modifier à façon la séquence visée. Il faut alors fournir à la cellule, en plus de la nucléase et de l'ARN guide, un brin d'ADN présentant la séquence désirée, flanquée d'extrémités homologues à celles du site de coupure. Un autre système cellulaire de réparation va alors intervenir (la recombinaison homologue) et remplacer la séquence génomique par la séquence d'ADN donneur au moment de la réparation, conduisant à son insertion définitive dans le génome.

Les avantages du système CRISPR, sont les suivants : (1) une seule protéine (Cas9) est nécessaire et, puisqu'elle est universelle, aucune ingénierie de protéines n'est nécessaire (2) le ciblage dépend de l'appariement des bases, de sorte que la conception des ARN guides nécessite uniquement une connaissance des règles de Watson et Crick (3) de nouveaux ARN guides sont très faciles à produire (4) il est possible de cibler différentes séquences simultanément en utilisant un mélange de plusieurs ARN guides (5) le système CRISPR permet de cliver un ADN méthylé.

La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie génétique provoquant une dégénérescence progressive de l'ensemble des muscles squelettiques de l'organisme. Des mutations du gène *DMD* sont responsables de cette maladie. Ce gène, comportant 79 exons, code la dystrophine, une protéine sous-membranaire essentielle pour l'intégrité structurale de la fibre musculaire dont l'absence rend les fibres plus vulnérables au stress mécanique.

Question 1 : En vous basant sur l'arbre généalogique de la famille D, déterminez le mode de transmission la plus probable de cette maladie (Figure 2).

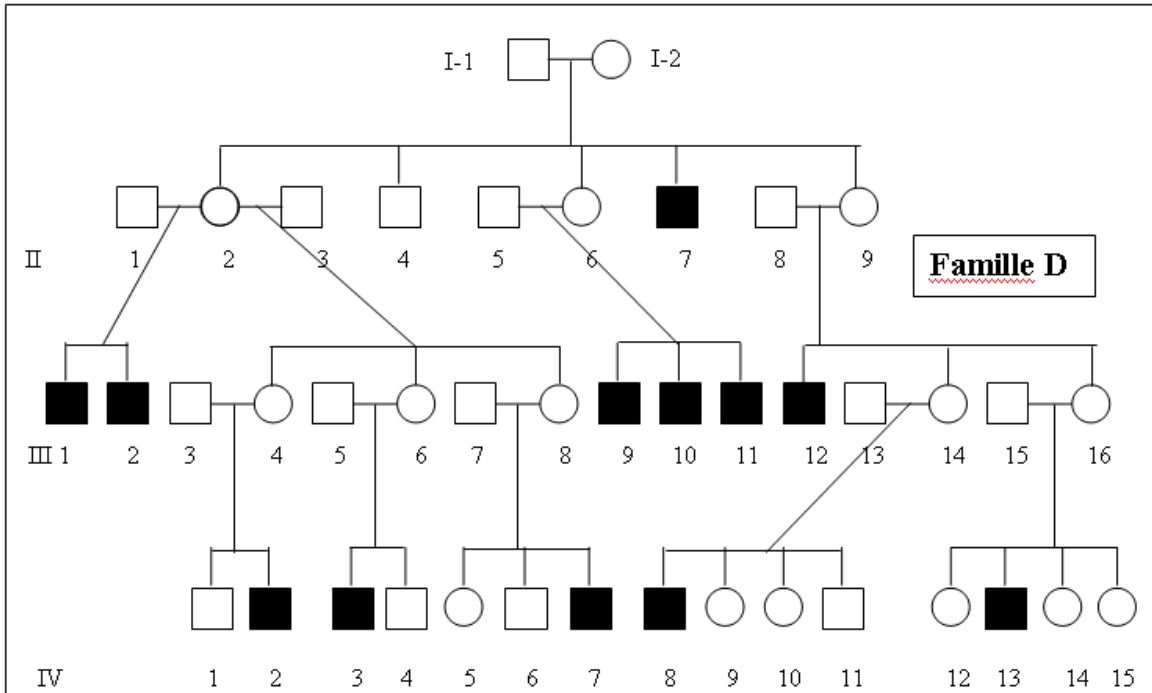


Figure 2 : Arbre généalogique de la famille D

Les chercheurs disposent d'une lignée de souris modèle C57BL-*Dmd*^{mdx/mdx} dont le gène *Dmd* contient une mutation non-sens dans l'exon 23 (Figure 3).

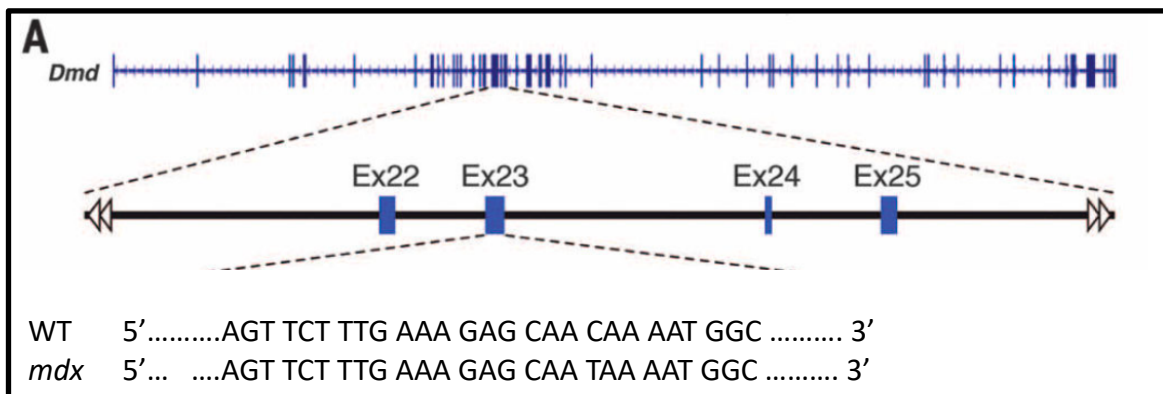


Figure 3 : Séquence partielle sauvage et mutante de l'exon 23 du gène *Dmd*.

Question 2 : Quelles seront les conséquences de cette mutation sur la dystrophine ?

Ils désirent ensuite éditer le gène *Dmd* de cette lignée murine par la technique CRISPR-cas9 afin de supprimer le codon stop.

Question 3 : Quelles sont les caractéristiques de la région à éditer ? Souligner les régions concernées en différentes couleurs. Où se trouve le site de coupure ? Quelles sont les caractéristiques de l'ARN guide (sgRNA) ?

Un oligonucléotide ssODN, dont la séquence vous est donnée Figure 4, a été utilisé dans cette expérience.

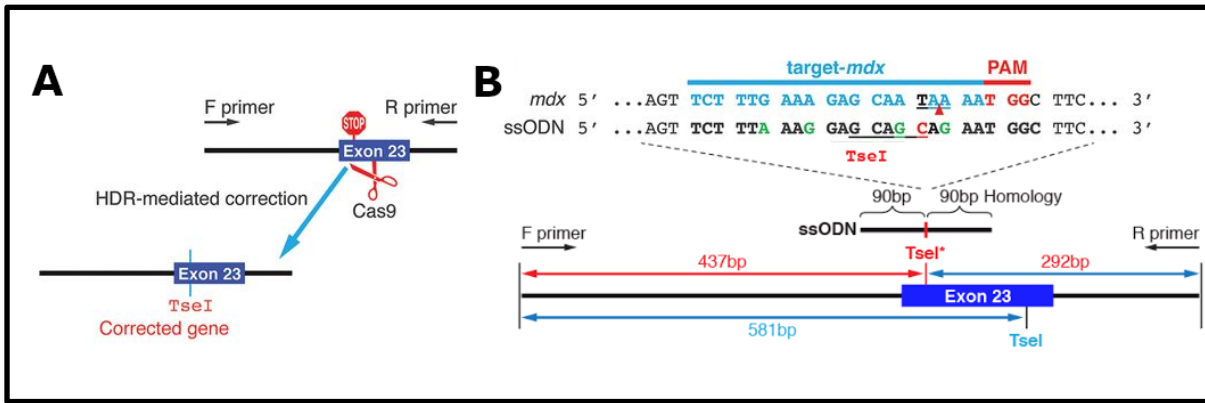


Figure 4 : **(A)** Stratégie de génotypage par PCR. **(B)** L'oligonucléotide ssODN présente 90 pb complémentaires à droite et gauche du site de coupure. Les oligonucléotides F et R permettent de produire un amplicon de 729 pb. L'hydrolyse par l'enzyme *TseI* génère un fragment de 437 pb si la séquence a bien été modifiée.

Question 4 : Quel est le rôle de cet oligonucléotide ? En vous reportant au code génétique donné en annexe, déduisez quel sera l'impact des modifications de bases par rapport à la séquence sauvage ?

Des zygotes ayant reçu par injection la protéine Cas9, l'ARN guide et l'oligonucléotide ssODN ont été implantés dans des femelles pseudogestantes (Figure 5).

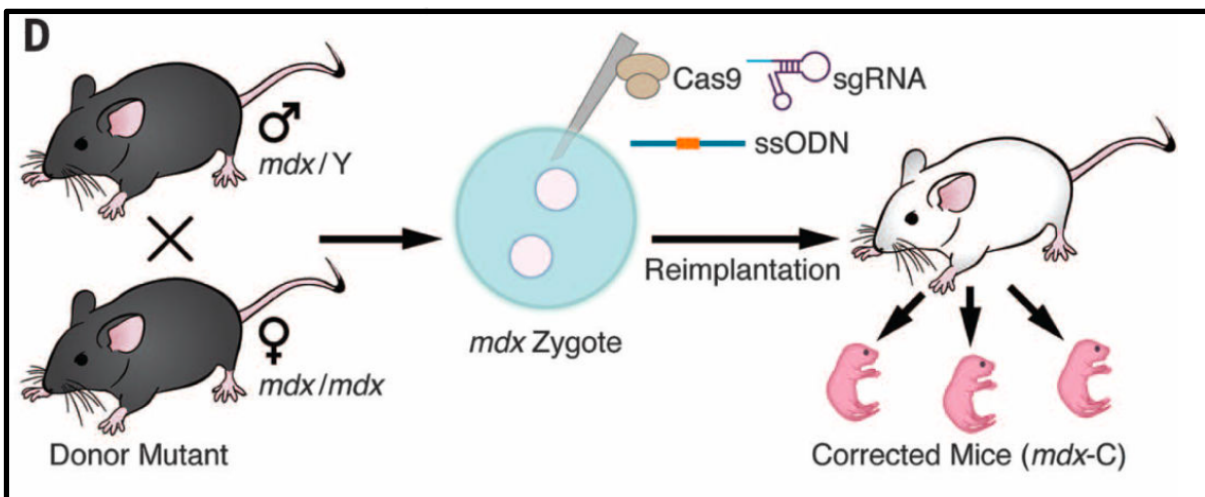


Figure 5 : Stratégie de correction génique des souris *Dmd^{mdx}*

La descendance mâle "corrigée" *mdx-C* a été analysée par RFLP (Figure 4 et 6)) sur de l'ADN extrait de la queue des souris F0.

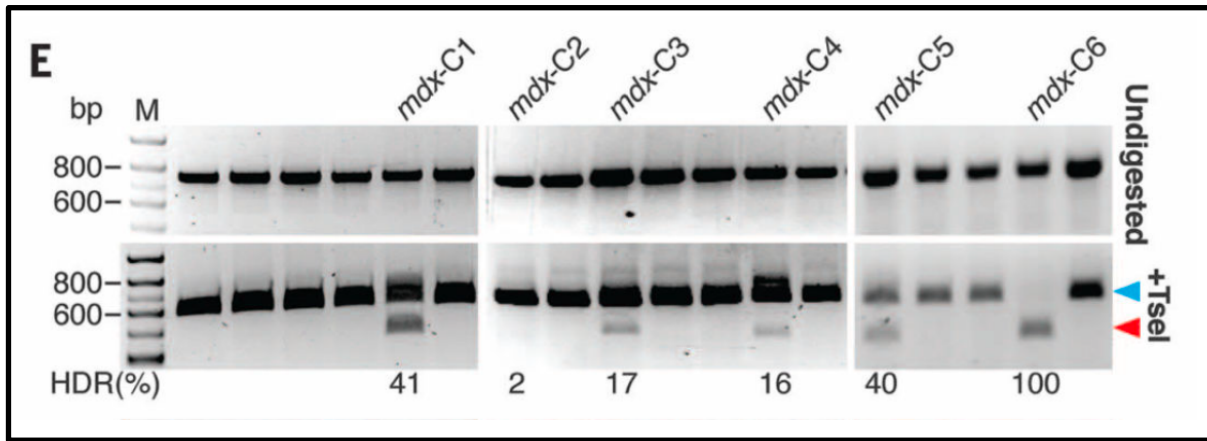


Figure 6 : Analyse par RFLP de l'ADN extrait de la queue de 17 souriceaux d'une même portée. En haut, produit PCR non digéré. En bas, produit PCR digéré par *Tsel*. La flèche supérieure indique la taille de l'allèle *mdx* non corrigée et celle du bas celle de l'allèle corrigé par HDR. Le pourcentage de HDR est indiqué sous chaque puit.

Question 5 : Interprétez la Figure 6. Pourquoi a-t-on coexistence de plusieurs bandes dans les puits *mdx-C1* à 6 ? Que signifie l'intensité relative de ces 2 bandes ? Cette mesure est-elle fiable ?

Le séquençage des produits de PCR a confirmé que, chez les 6 souris *mdx-C*, l'allèle *Dmd*^{*mdx*} a été corrigé conformément à la séquence présente sur l'oligonucléotide ssODN avec des fréquences équivalentes à celles des événements par recombinaison homologue (HDR%) indiquées Figure 6. Le séquençage de l'ADN de 4 autres souriceaux de la portée a donné le résultat de la figure 7.

<i>mdx-N1</i>	AGTTCTTTGAAAGAGCAA T AAAATGGCTTCAAC	<i>mdx</i>	×2
	AGTTCTTTGAA-----TGGCTTCAAC	IF-Del. (-12)	×10 (83%)
<i>mdx-N2</i>	AGTTCTTTGAAAGAGCAA T AAAATGGCTTCAAC	<i>mdx</i>	×7
	AGTTCTTTG-----CA---AAATGGCTTCAAC	IF-Del. (-9)	×4 (36%)
<i>mdx-N3</i>	AGTTCTTTGAAAGAGCAA T AAAATGGCTTCAAC	<i>mdx</i>	×8
	AGTTCTTTGAAAGA-A-----//-----CCT	IF-Del. (-48)	×2 (20%)
<i>mdx-N4</i>	AGTTCTTTGAAAGAGCAA T AAAATGGCTTCAAC	<i>mdx</i>	×3
	AGTTCTTTGAAAGAGCAA---AATGGCTTCAAC	IF-Del. (-3)	×3 (43%)
	AGTTCTTTGAAAGAG T AATAAAATGGCTTCAAC	Point	×1

Figure 7 : Séquence des allèles du gène *Dmd* présents chez 4 autres souriceaux *mdx-C* de la F0.

Question 6 : Que s'est-il passé pour ces souriceaux ? Quelles pourraient être les conséquences pour la protéine dystrophine

Question 7 : Quel est l'autre biais de la technique CRISPR ?

A l'aide de l'outil "CRISPR design tool", les chercheurs ont identifié dans le génome de la souris, 10 sites potentiels d'appariement de l'ARN guide (OT01 à 10) autres que le site initial dans l'exon 23 du gène *Dmd*. Ils ont séquencé les produits PCR correspondant soit à l'amplification de l'exon 23 soit à l'amplification de chacun des 10 sites "off-target" et ceci dans 4 types de souris (souris *mdx*, *mdx* éditées par CRISPR-cas9, sauvages et sauvages éditées par CRISPR-cas9) à la recherche de variations alléliques pour chacun de ces 11 loci. Le résultat est donné Figure 8.

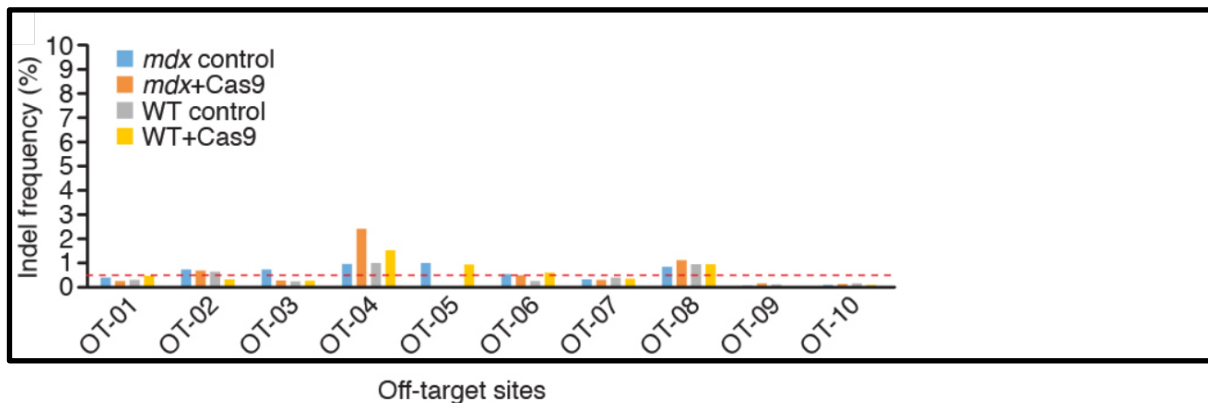


Figure 8 : Variation allélique des sites OT01 à 10 :Fréquence de réparation par NHEJ aux 10 sites OT.

Question 8 : Interprétez les résultats de la Figure8. Que se passe-t-il pour les 10 locus OT ?

Les chercheurs ont ensuite effectué des analyses physiologiques pour évaluer le niveau d'altération de différents muscles ainsi que le taux d'expression de la dystrophine par immunohistochimie. Les résultats concernant différents muscles vous sont présentés en Figure 9 mais sont généralisables à de nombreux autres muscles.

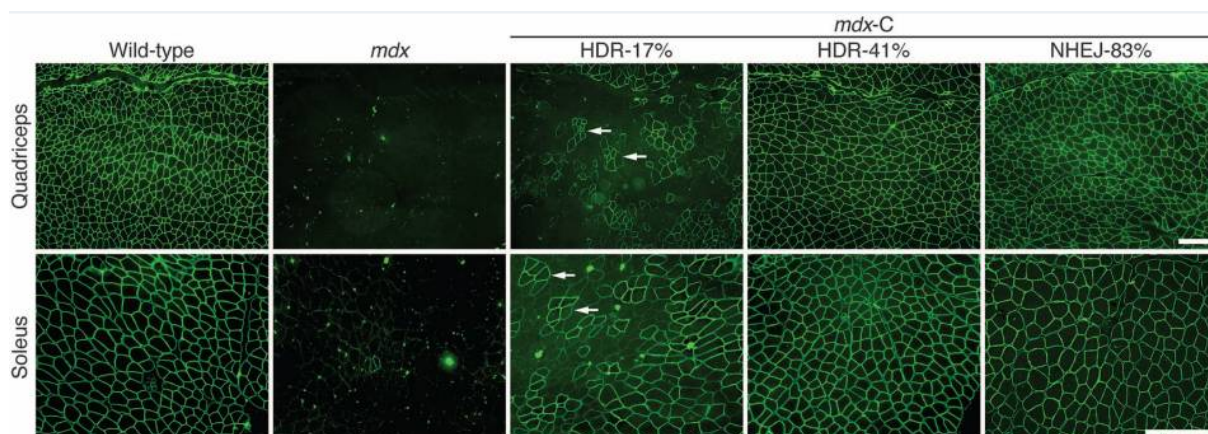


Figure 9 : Immunodétection de la dystrophine (en vert) dans différents muscles (quadriceps et muscle soleaire) de souris âgées de 7 à 9 semaines dans différents contextes génétiques : sauvage, *mdx*, *mdx-C*. La nature et le pourcentage de modification de l'allèle corrigé est reporté (conformément aux Figures 6 et 7).

Question 9 : Commentez les résultats obtenus. Cette approche vous parait-elle prometteuse ?

Les auteurs concluent leur article par "**Genomic editing within the germ line is not currently feasible in humans. However, genomic editing could, in principle, be envisioned within postnatal cells in vivo if certain technical challenges could be overcome**". En 2018, He Jiankui, généticien à l'université des sciences de Shenzhen, en Chine, prétend avoir contribué à la naissance des premiers bébés au monde (2 jumelles) dont le génome a été modifié. Il aurait fécondé une femme avec des embryons génétiquement modifiés de façon à ce que la voie moléculaire utilisée par le virus du sida pour infecter les cellules soit désactivée. Ces affirmations n'ont cependant pas été vérifiées par des séquençages indépendants, ni publiées dans une revue à comité de lecture.

Question 10 : A la lumière de ces récents évènements, commentez cette phrase.

Référence :

« Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA » Chengzu Long, John R. McAnally, John M. Shelton, Alex A. Mireault, Rhonda Bassel-Duby and Eric N. Olson. *Science*.2014; 5; 3456 : 1184-1188.

TD11 (2h)

Génétique Humaine

Exercice 1 : Réalisation d'une étude de liaison génétique

On entreprend une étude de liaison génétique dans le but d'identifier des gènes dont les mutations pourraient être responsables d'un syndrome de maladie héréditaire.

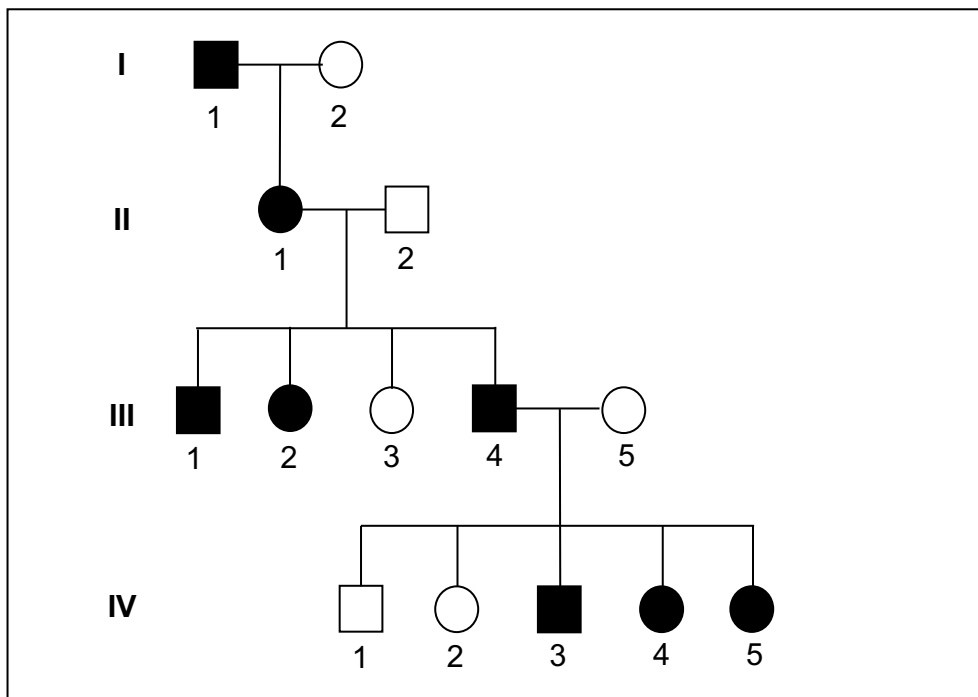
Question n°1 : *Quel est le principe d'une étude de liaison ? De quelles informations et de quel matériel biologique doit-on disposer pour entreprendre une telle étude ?*

Question n°2 : Pour cette recherche on dispose de marqueurs polymorphes de type microsatellite. **Définir les caractéristiques de ce type de marqueur.**

Question n°3 : Les caractéristiques de l'un de ces marqueurs (M1) doivent être établies. Pour cela on génotype 100 individus non apparentés appartenant à un groupe ethnique homogène.

Quels sont les objectifs de cette opération ? Comment procède-t-on expérimentalement ?

L'arbre généalogique de l'une des familles, dans laquelle le caractère héréditaire de la maladie est suspecté, est présenté sur la Figure ci-dessous.



Question n°4 : *Quel est le mode de transmission le plus probable de cette maladie ?*

Chaque individu de cette famille a été génotypé pour trois marqueurs polymorphes : le marqueur M1 (possédant 5 allèles) ; le marqueur M2 (7 allèles) et le marqueur M3 (6 allèles). L'ordre respectif de ces trois marqueurs est le suivant : centromère....M1-M2-M3....télomère. Les génotypes observés sont présentés ci-dessous :

individus ⇒ marqueurs ↓	I-1	I-2	II-1	III-1	III-2	III-3	III-4	III-5	IV-1	IV-2	IV-3	IV-4	IV-5
M1	[1,2]	[4,5]	[1,4]	[1,3]	[1,5]	[4,5]	[1,5]	[2,5]	[5,5]	[2,5]	[5,5]	[1,2]	[1,2]
M2	[3,4]	[3,5]	[3,5]	[1,3]	[3,6]	[5,6]	[3,6]	[2,7]	[6,7]	[2,6]	[3,7]	[2,3]	[2,3]
M3	[1,2]	[3,4]	[1,3]	[1,5]	[1,3]	[3,3]	[1,3]	[2,6]	[3,6]	[2,3]	[1,6]	[2,3]	[1,2]

Question n°5 : Etablir sur l'arbre ci-joint les haplotypes de tous les individus pour ces trois marqueurs.

Question n°6 : Quelle conclusion en tirez-vous quant à la localisation du gène morbide par rapport aux marqueurs utilisés ?

Exercice 2 : Détermination du sexe, Kératose Palmoplantaire et cancers cutanés

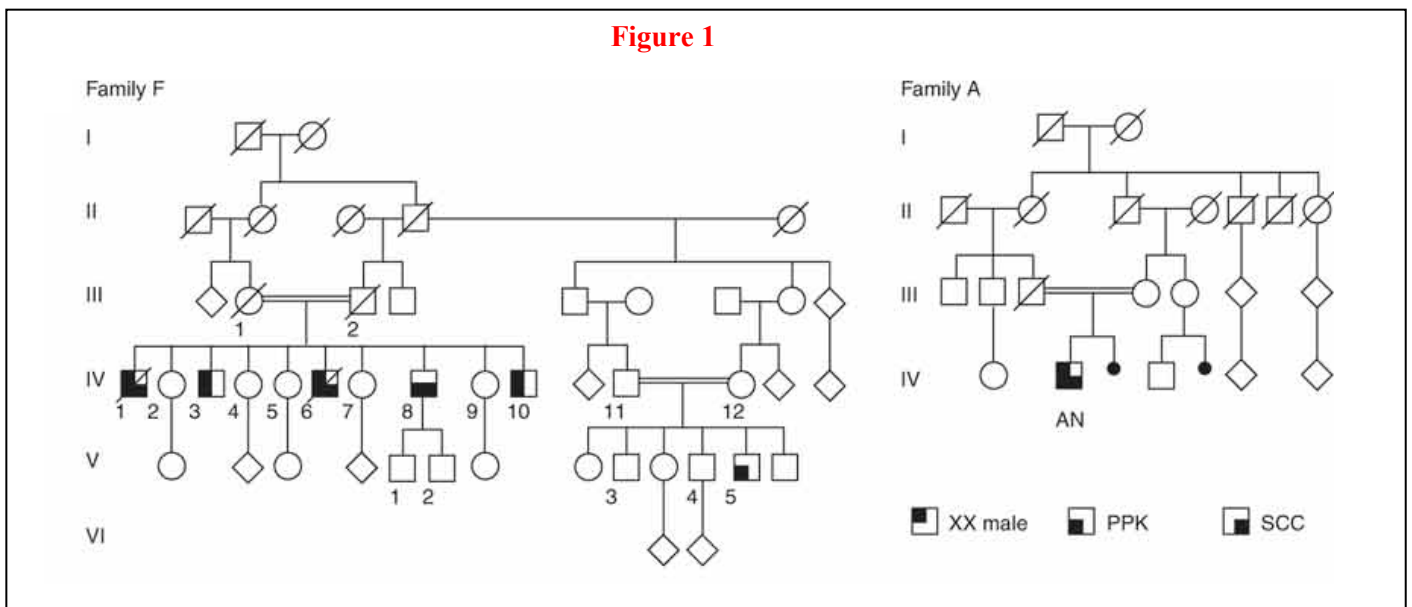
Chez l'homme, le sexe phénotypique de l'embryon dépend de la détermination du sexe des gonades. Cependant, si les testicules ne se développent pas correctement (dysgénésie testiculaire) et les hormones testiculaires n'atteignent pas un niveau seuil, le phénotype femelle de différenciation se met en place par défaut. L'inversion de sexe XY (mâle-femelle) relativement fréquente chez l'homme est génétiquement hétérogène, tandis que l'inversion de sexe XX-mâle est rare et habituellement causée par des translocations de SRY sur le chromosome X ou un autosome. L'inversion de sexe XX-mâle SRY-indépendante est extrêmement rare et ses bases génétiques essentiellement inconnues.

Question n°1 : Que veut-on dire lorsqu'on qualifie une maladie de « génétiquement hétérogène » ?

Une équipe italienne a décrit une grande famille d'origine sicilienne (famille F, **Figure 1**) incluant plusieurs cas de sujets mâles phénotypiques présentant l'inversion de sexe XX-mâle, SRY-négatifs. Dans la même famille, on observe également une agrégation d'affections cutanées de type hyperkératose palmoplantaire (PPK) et carcinome de la peau (SCC).

Question n°2 :

- Commentez l'arbre généalogique de la famille F
- Quel est le mode de transmission le plus probable des phénotypes observés dans ces familles ?
- Pensez-vous que les phénotypes observés puissent être la conséquence d'un ou plusieurs événements mutationnels ?

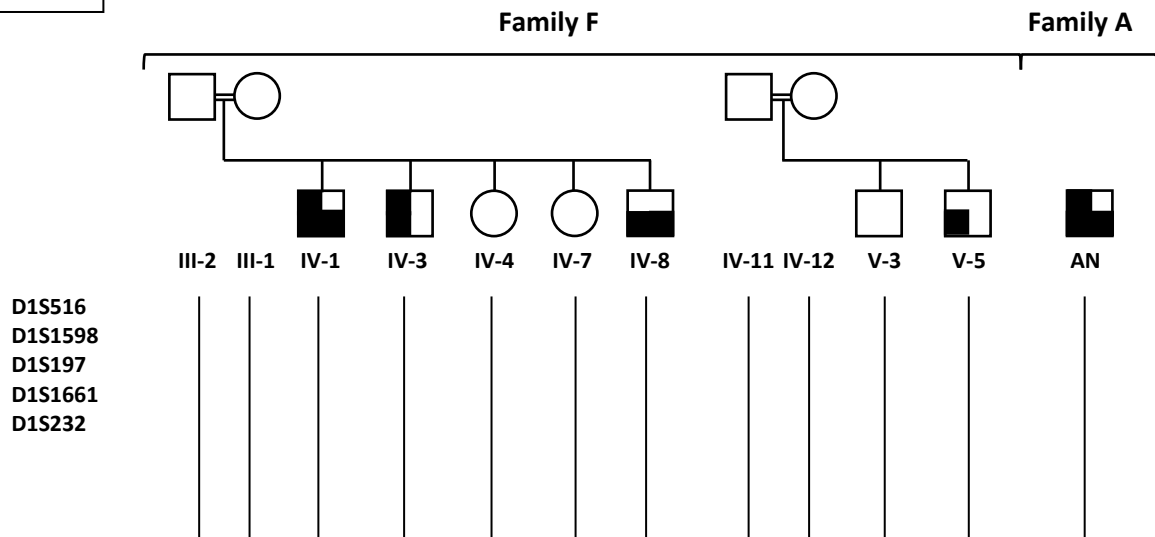


Le modèle de l'existence d'une mutation rendant compte des deux traits pathologiques (inversion de sexe XX-male et pathologies cutanées) a reçu un début de confirmation par la mise en évidence d'une liaison des traits pathologiques observés dans la famille F avec des marqueurs microsatellites, situés dans la région 1p34-p35. Le **tableau 1** donne les résultats du génotypage de plusieurs sujets de la famille F et du sujet AN de la famille A pour 5 de ces marqueurs de la région candidate.

Tableau 1

Sujets Marqueurs	Famille F											Fam. A
	III-2	III-1	IV-1	IV-3	IV-4	IV-7	IV-8	IV-11	IV-12	V-3	V-5	AN
D1S516	1,1	1,3	1,1	1,1	1,3	1,3	1,1	1,1	2,4	1,2	1,4	2,2
D1S1598	1,2	1,2	1,1	1,1	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	2,2
D1S197	2,3	1,2	2,2	2,2	2,3	1,3	2,2	2,4	2,5	4,5	2,2	3,3
D1S1661	1,2	1,3	1,1	1,1	1,2	2,3	1,1	1,2	1,2	2,2	1,1	2,2
D1S232	1,2	1,2	1,1	1,1	1,2	2,2	1,1	1,2	1,3	1,2	1,3	2,2

Figure 2

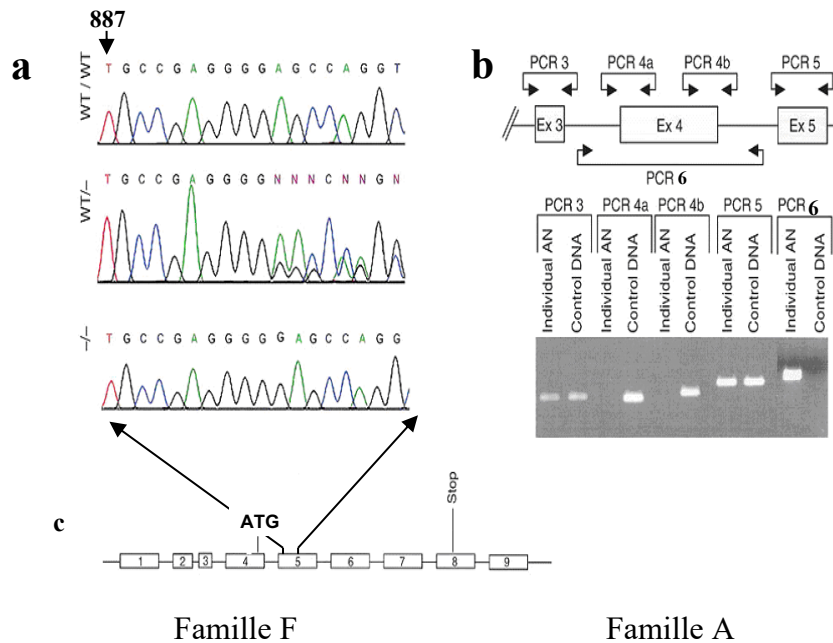


Question n°3 :

- **Construisez les haplotypes pour chaque sujet sur les arbres simplifiés de la Figure 2.**
- **Que notez-vous pour les sujets atteints ?**
- **Où est localisé le locus morbide par rapport aux marqueurs ?**
- **Quelle cohérence avec votre analyse de l'arbre généalogique de la famille F ?**
- **Les familles F et A vous semblent-elles apparentées ?**

La région critique identifiée par les marqueurs bordants couvre 15 Mb et approximativement 190 gènes. Le séquençage systématique de ces séquences géniques a été réalisé. Sur la **Figure 3a** ont été représentés les résultats obtenus respectivement sur trois ADN de sujets de la famille F, génotypiquement WT/WT, WT/mutant ou mutant/mutant, concernant la région indiquée, en 5' de l'exon 5 du gène *RSPO1* codant la R-spondin1. L'organisation génique de *RSPO1* est présentée sur la **Figure 3c** (les rectangles représentant les exons).

Figure 3



Question n°4 : *Quel est le type de la mutation observée dans la famille F ?
Quelles en seront les conséquences probables ?*

Le sujet AN de la famille A (**Figure 1**) présente les mêmes traits pathologiques que certains sujets atteints de la famille F. Il ne porte pas la mutation du gène *RSP01* détectée dans la famille F. On a cependant cherché à démontrer l'existence d'une altération de ce gène. Les analyses du gène par PCR comparant l'ADN du sujet AN à un ADN de sujet contrôle sont présentées sur la **Figure 3b**.

Question n°5 : *Quelle est la nature de la mutation affectant le sujet AN ? Ce résultat est-il cohérent avec votre réponse à la dernière interrogation de la question 3 ?*

Question n°6 : *Quelle hypothèse peut-on faire quant à la fonction du gène *RSP01* vis-à-vis de la détermination du sexe ?*

ANNEXES

CODE GENETIQUE

2eme lettre du codon

		U		C		A		G		
1ere lettre du codon	U	UUU	phénylalanine	UCU	sérine	UAU	tyrosine	UGU	cystéine	U
		UUC		UCC		UAC		UGC		C
		UUA	leucine	UCA		UAA	stop	UGA	stop	A
		UUG		UCG		UAG		UGG	tryptophane	G
	C	CUU	leucine	CCU	proline	CAU	histidine	CGU	arginine	U
		CUC		CCC		CAC		CGC		C
		CUA		CCA		CAA	CGA	A		
		CUG		CCG		CAG	CGG	G		
	A	AUU	isoleucine	ACU	thréonine	AAU	asparagine	AGU	sérine	U
		AUC		ACC		AAC		AGC		C
		AUA	méthionine/start	ACA		AAA	lysine	AGA	arginine	A
		AUG		ACG		AAG		AGG		G
	G	GUU	valine	GCU	alanine	GAU	acide aspartique	GGU	glycine	U
		GUC		GCC		GAC		GGC		C
		GUA		GCA		GAA	GGA	A		
		GUG		GCG		GAG	GGG	G		

3eme lettre du codon

TABLE DE chi2

Si C est une variable qui suit une loi du χ^2 ayant d degré de liberté alors
 $\Pr(C \leq M(d,y)) = y$

M	0,005	0,01	0,025	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75	0,9	0,95	0,975	0,99	0,995
1	0	0	0	0	0	0,102	0,455	1,323	2,706	3,841	5,024	6,635	7,879
2	0,01	0,02	0,051	0,103	0,211	0,575	1,386	2,773	4,605	5,991	7,378	9,21	10,597
3	0,072	0,115	0,216	0,352	0,584	1,213	2,366	4,108	6,251	7,815	9,348	11,345	12,838
4	0,207	0,297	0,484	0,711	1,064	1,923	3,357	5,385	7,779	9,488	11,143	13,277	14,86
5	0,412	0,554	0,831	1,145	1,61	2,675	4,351	6,626	9,236	11,07	12,833	15,086	16,75
6	0,676	0,872	1,237	1,635	2,204	3,455	5,348	7,841	10,645	12,592	14,449	16,812	18,548
7	0,989	1,239	1,69	2,167	2,833	4,255	6,346	9,037	12,017	14,067	16,013	18,475	20,278
8	1,344	1,646	2,18	2,733	3,49	5,071	7,344	10,219	13,362	15,507	17,535	20,09	21,955
9	1,735	2,088	2,7	3,325	4,168	5,899	8,343	11,389	14,684	16,919	19,023	21,666	23,589
10	2,156	2,558	3,247	3,94	4,865	6,737	9,342	12,549	15,987	18,307	20,483	23,209	25,188
11	2,603	3,053	3,816	4,575	5,578	7,584	10,341	13,701	17,275	19,675	21,92	24,725	26,757
12	3,074	3,571	4,404	5,226	6,304	8,438	11,34	14,845	18,549	21,026	23,337	26,217	28,3
13	3,565	4,107	5,009	5,892	7,042	9,299	12,34	15,984	19,812	22,362	24,736	27,688	29,819
14	4,075	4,66	5,629	6,571	7,79	10,165	13,339	17,117	21,064	23,685	26,119	29,141	31,319
15	4,601	5,229	6,262	7,261	8,547	11,037	14,339	18,245	22,307	24,996	27,488	30,578	32,801
16	5,142	5,812	6,908	7,962	9,312	11,912	15,338	19,369	23,542	26,296	28,845	32	34,267
17	5,697	6,408	7,564	8,672	10,085	12,792	16,338	20,489	24,769	27,587	30,191	33,409	35,718
18	6,265	7,015	8,231	9,39	10,865	13,675	17,338	21,605	25,989	28,869	31,526	34,805	37,156
19	6,844	7,633	8,907	10,117	11,651	14,562	18,338	22,718	27,204	30,144	32,852	36,191	38,582
20	7,434	8,26	9,591	10,851	12,443	15,452	19,337	23,828	28,412	31,41	34,17	37,566	39,997
21	8,034	8,897	10,283	11,591	13,24	16,344	20,337	24,935	29,615	32,671	35,479	38,932	41,401
22	8,643	9,542	10,982	12,338	14,041	17,24	21,337	26,039	30,813	33,924	36,781	40,289	42,796
23	9,26	10,196	11,689	13,091	14,848	18,137	22,337	27,141	32,007	35,172	38,076	41,638	44,181
24	9,886	10,856	12,401	13,848	15,659	19,037	23,337	28,241	33,196	36,415	39,364	42,98	45,559
25	10,52	11,524	13,12	14,611	16,473	19,939	24,337	29,339	34,382	37,652	40,646	44,314	46,928
26	11,16	12,198	13,844	15,379	17,292	20,843	25,336	30,435	35,563	38,885	41,923	45,642	48,29
27	11,808	12,879	14,573	16,151	18,114	21,749	26,336	31,528	36,741	40,113	43,195	46,963	49,645
28	12,461	13,565	15,308	16,928	18,939	22,657	27,336	32,62	37,916	41,337	44,461	48,278	50,993
29	13,121	14,256	16,047	17,708	19,768	23,567	28,336	33,711	39,087	42,557	45,722	49,588	52,336
30	13,787	14,953	16,791	18,493	20,599	24,478	29,336	34,8	40,256	43,773	46,979	50,892	53,672

	AB	Ab	aB	ab	total
Effectifs observés	110	50	10	30	200
Effectifs attendus	96	64	24	16	200

$$d = \frac{(110-96)^2}{96} + \frac{(50-64)^2}{64} + \frac{(10-24)^2}{24} + \frac{(30-16)^2}{16} = 25.52$$

$$d > \chi_{0,05,3ddl}^2 > 7.815 \Rightarrow \text{rejet de } H_0$$

□ Conclusion : il existe un déséquilibre de liaison significatif au seuil de 5% entre les 2 gènes

PETIT GLOSSAIRE DE GENETIQUE

"Qu'on s'épargnerait de questions et de peines si on déterminait enfin la signification des mots d'une manière nette et précise."

d'Alembert, Discours préliminaire de l'Encyclopédie, 1751.

Arbre généalogique ou pedigree : représentation à l'aide de symboles conventionnels de la transmission de caractères phénotypiques spécifiques dans une famille.

Allèle : une des formes alternatives (différant par leurs séquences nucléotidiques) d'un gène ou d'une séquence d'ADN pouvant exister au niveau d'un site chromosomique spécifique (locus).

Allèle dominant : allèle exprimant son effet phénotypique même lorsqu'il se trouve dans un génome hétérozygote en présence d'un allèle récessif. Si l'allèle A est dominant sur l'allèle a, les individus AA et Aa ont le même phénotype.

Allèle récessif : allèle dont l'effet phénotypique n'est pas exprimé chez un hétérozygote. L'individu Aa a le phénotype de AA.

Caractère quantitatif : se dit d'un caractère, comme la taille, ayant une distribution continue dans une population et déterminé par les effets combinés de plusieurs gènes.

Carte génétique : représentation pour chaque chromosome, de l'arrangement linéaire des gènes ou des loci séparés par des distances exprimées en centiMorgan (cM), données obtenues par des analyses de recombinaisons méiotiques. Définition non valable pour les procaryotes, bien sûr.

Carte physique : représentation de l'ensemble des fragments d'ADN génomique clonés, chevauchants, caractérisés et ordonnés couvrant chaque chromosome, données obtenues par l'utilisation des techniques de la biologie moléculaire et du génie génétique.

Caryotype : ensemble complet des chromosomes d'une cellule, chaque chromosome étant classé et décrit selon sa morphologie en métaphase de mitose.

CentiMorgan (cM) : unité de distance génétique séparant deux marqueurs entre lesquels la fréquence de recombinaison est de 1% de recombinaison au cours de la méiose. On peut établir une correspondance entre le cM et la distance physique séparant les deux marqueurs; il s'agit d'une valeur moyenne approximative car la fréquence de recombinaison n'est pas identique chez différentes espèces, en différents endroits du chromosome ni dans les deux sexes d'une même espèce. Elle est par exemple de 1 Mb dans le génome de l'homme, de 0,7 Mb dans le génome de la femme, de 500 kb chez la drosophile femelle (pas de recombinaison chez le mâle) et de 1 kb chez la levure.

Chromatide/chromosome : depuis l'anaphase de la mitose en G1 jusqu'au début de la phase S du cycle cellulaire, chaque chromosome prend la forme d'une molécule d'ADN double brin linéaire unique, complexée à des protéines chromosomiques. Après la duplication de l'ADN au cours de la phase S du cycle cellulaire, un chromosome est constitué de deux chromatides sœurs jointes au niveau du centromère. À l'anaphase de la mitose, le centromère se clive et les chromatides sœurs migrent à chacun des pôles de la cellule.

Chromatides sœurs : terme désignant les deux chromatides, jointes par le centromère, constituant un chromosome métaphasique.

Chromatides non-sœurs : chromatides appartenant à deux chromosomes homologues. Les chromatides non-sœurs sont impliquées dans les crossing-over au cours de la méiose.

Chromosomes homologues : deux copies d'un même chromosome trouvées dans une cellule diploïde, l'une venant du père, l'autre de la mère.

Codominance : situation dans laquelle un individu hétérozygote présente conjointement les effets phénotypiques des deux allèles. Le phénotype de l'individu Aa est intermédiaire entre ceux des individus AA et aa.

Crossing-over : échange, au cours de la méiose, de segments d'ADN appartenant à des chromatides non-sœurs de chromosomes homologues.

Cytogénétique : approche cytologique de la génétique, reposant principalement sur l'étude des chromosomes par microscopie.

Diploïde : cellule ayant deux copies de chaque chromosome ou organisme composé de telles cellules (gamètes exceptés).

Expressivité : degré d'intensité des manifestations phénotypiques en rapport avec un trait héréditaire, d'un individu à un autre, en liaison avec les conditions environnementales.

Fréquence de recombinaison : rapport du nombre de gamètes recombinants au nombre total de gamètes issus d'une méiose.

Gène : Unité d'information transmise par un individu à sa descendance, par reproduction sexuée ou asexuée. Cette unité est portée par une séquence d'ADN qui détermine en principe un polypeptide fonctionnel ou un produit ARN.

Génome : terme désignant la totalité du matériel génétique d'une cellule; dans le cas d'une cellule diploïde le génome est l'ensemble formé par une copie de chaque chromosome.

Génotype : a/constitution génétique d'un individu; b/types des allèles trouvés au niveau d'un locus chez un individu.

Haploïde : cellule ne possédant qu'une copie de chaque chromosome (c'est à dire 23 chromosomes chez l'homme par exemple); terme désignant également un organisme constitué de telles cellules.

Hémizygote: un individu (diploïde par ailleurs) est hémizygote pour un locus lorsqu'il présente un seul allèle pour ce locus. Cela se produit par exemple pour la presque totalité des gènes portés par le chromosome X chez les mâles de certaines espèces (humain, drosophile).

Hétérozygote : un individu hétérozygote pour un locus présente deux allèles différents au niveau de ce locus sur chacun des chromosomes homologues.

Homozygote : un individu est homozygote au niveau d'un locus donné, s'il présente deux allèles identiques au niveau de ce locus sur chacun des chromosomes homologues.

Liaison génétique : tendance des gènes ou des séquences d'ADN au niveau de loci spécifiques à être hérités ensemble du fait de leur proximité physique sur un même chromosome.

Marqueur génétique : caractère mendélien (génotypique tel que RFLP ou phénotypique tel que variant enzymatique) aisément reconnaissable permettant de repérer un chromosome ou une cellule et pouvant être utilisé pour la cartographie génétique. En cartographie génétique humaine, un marqueur est d'autant plus utile que le locus correspondant est suffisamment polymorphe pour qu'il existe une probabilité raisonnable qu'un individu pris au hasard soit hétérozygote pour ce marqueur.

Méiose : division cellulaire réductrice qui donne 4 cellules à n chromosomes à partir de 1 cellule à 2n chromosomes.

Mitose : division cellulaire des cellules somatiques conservant le nombre des chromosomes.

Phénotype : caractéristiques physiques d'une cellule ou d'un organisme, déterminées par sa constitution génétique et l'environnement.

Polymorphisme : existence pour un locus donné de deux ou plusieurs allèles ayant une fréquence significative dans la population (égale ou supérieure à 1% pour l'allèle le moins représenté).

Pléiotrope (mutation) : mutation conférant plusieurs phénotypes différents.

Pléiotropie : capacité d'un gène unique à produire un phénotype complexe consistant en deux ou plusieurs caractéristiques.

Recombinant : chromosome n'étant pas de type parental du fait d'un crossing-over.

Ségrégation mendélienne : processus par lequel les individus héritent de leurs parents et transmettent à leurs descendants l'un des deux allèles présents sur les chromosomes homologues.

Type sauvage : désigne le gène, la cellule ou l'organisme présentant le phénotype et/ou le génotype typique de l'espèce et, en conséquence, choisi comme standard