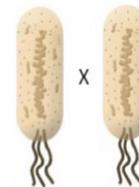


Rappels de génétique bactérienne et test de fluctuation

1

Voies d'échanges génétiques chez les bactéries

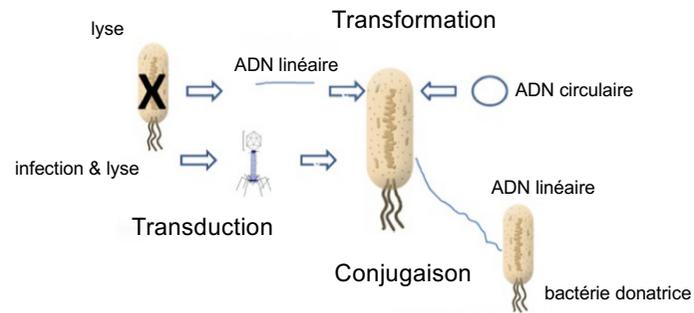
- ✓ **absence de cycle haploïde/diploïde**
le génome bactérien est constamment haploïde
- ✓ **absence de mitose & de méiose**
pas de recombinaison méiotique
- ✓ **pas de production de gamètes**
descendance génétiquement identique ?
- ✓ **les cellules bactériennes ne fusionnent pas**
pas de brassage de l'information génétique?



- **Même si il y a plusieurs copies du chromosome bactérien dans la cellule, il n'y a pas d'homologues, toutes les copies portent la même information, aux mutations près.**

2

Voies d'échanges génétiques chez les bactéries



- Une bactérie réceptrice reçoit seulement une partie du matériel génétique de la bactérie donatrice

3

Transduction

- Transfert d'ADN bactérien d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire d'un bactériophage

Bactériophages = les virus des bactéries

- **bactériophage virulent** -> lyse:

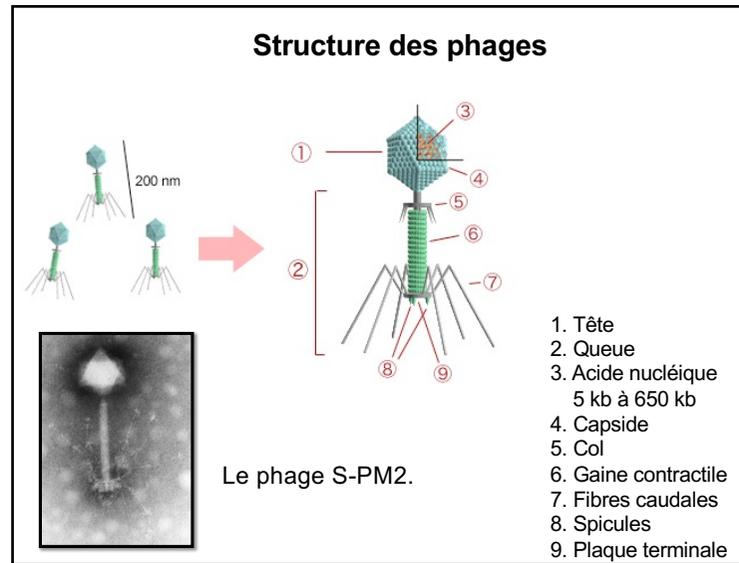
T₄, T₂, etc...



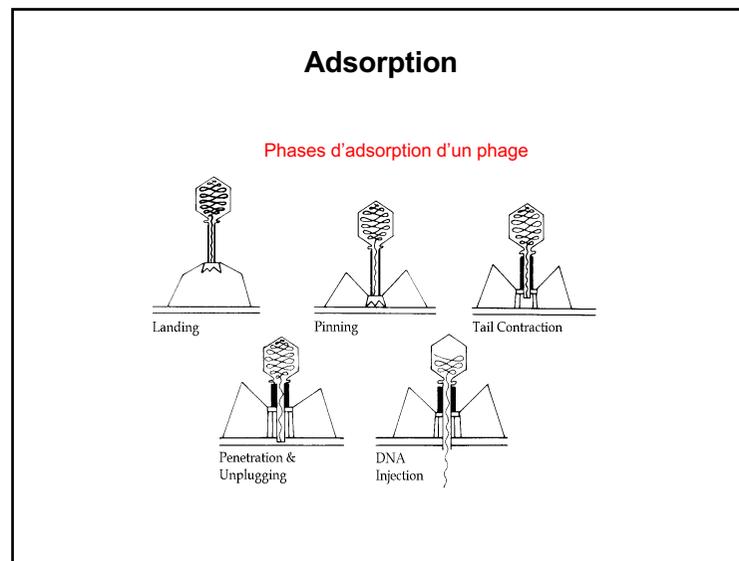
- **bactériophage tempéré** -> lysogénie (prophage) puis éventuellement lyse:

λ, Mu, P₁ etc...

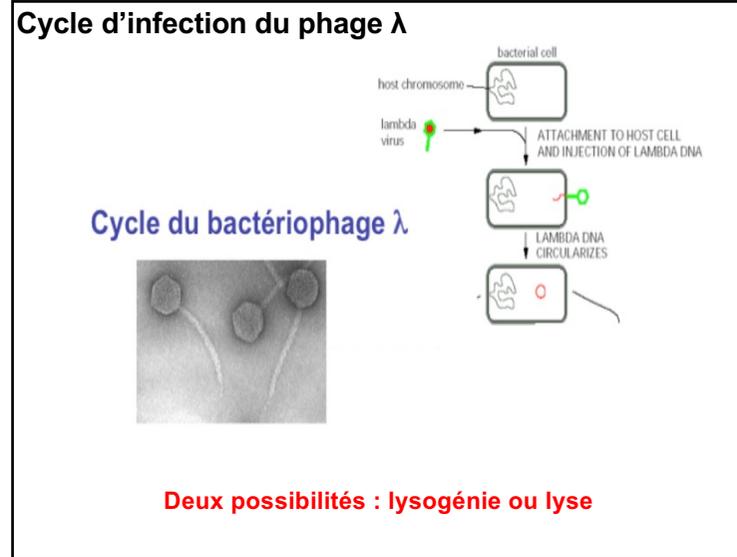
4



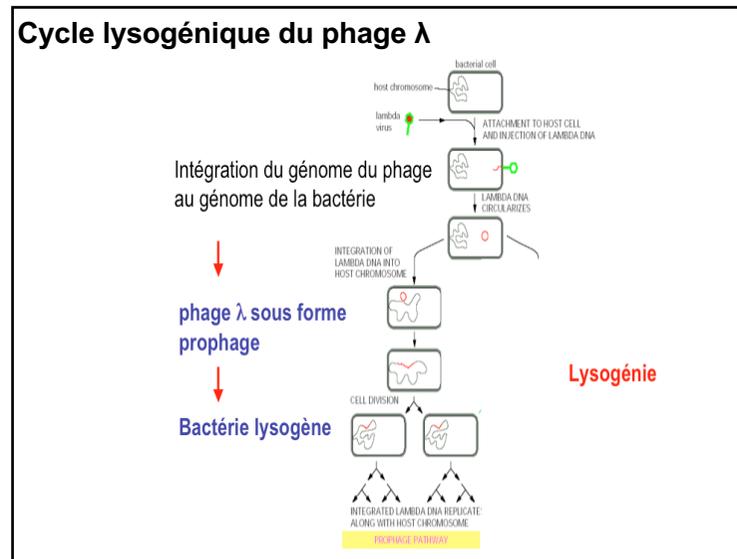
5



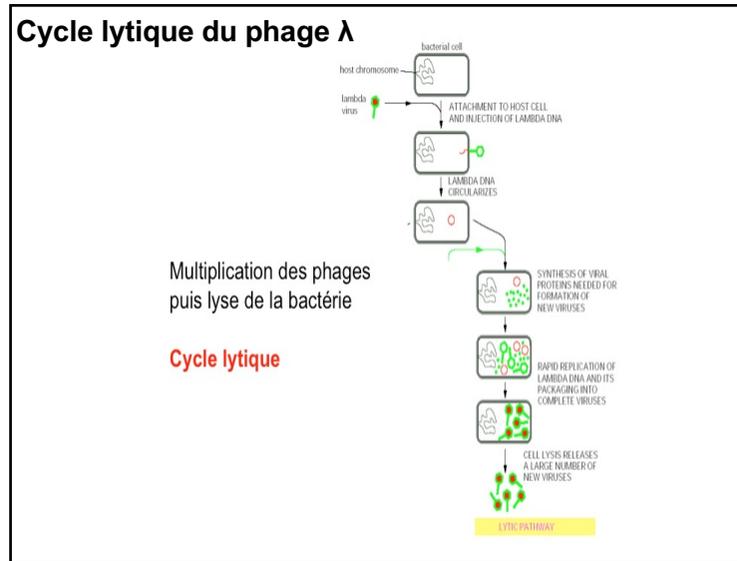
6



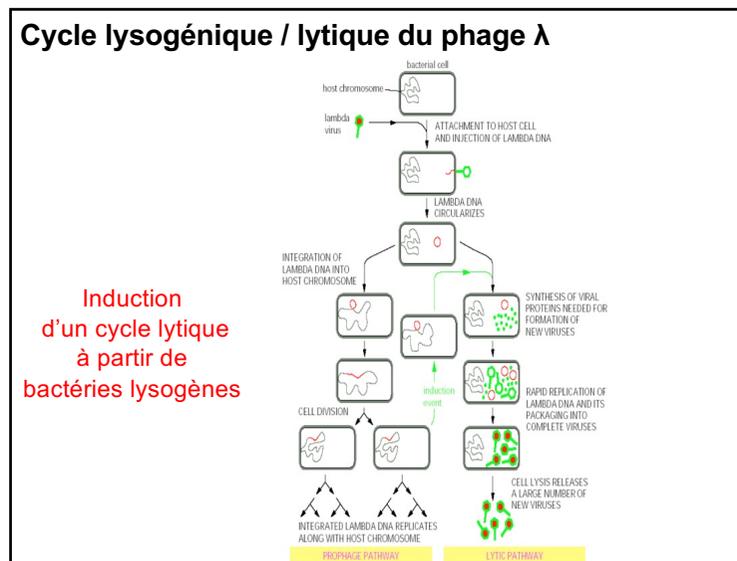
7



8



9



10

Parasexualité : transmission d'ADN par transduction

- ✓ Certains phages (pas tous) peuvent emporter des fragments d'ADN de la bactérie qu'ils ont infectée
- ✓ Fragments d'ADN ainsi prélevés sont susceptibles d'être injectés dans une bactérie hôte lors d'une nouvelle infection

=> **Transduction**

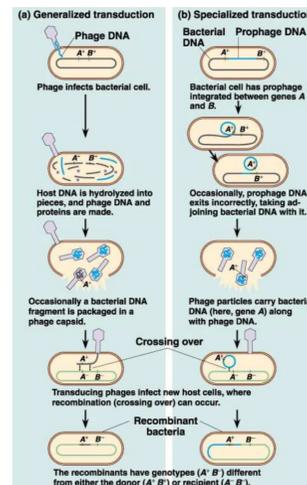
Deux types de transduction :

- Généralisée (P1)
- Spécialisée (λ)

11

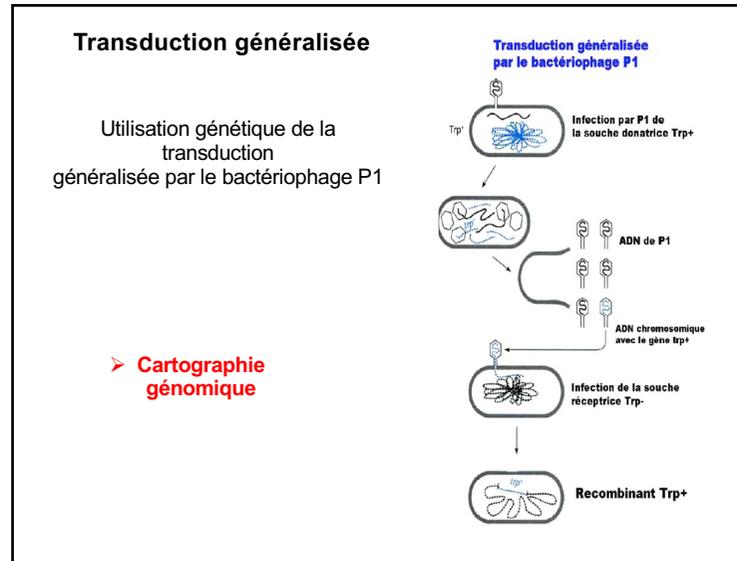
Transduction généralisée ou spécialisée

Transduction généralisée
Toutes les régions chromosomiques sont susceptibles d'être transduites

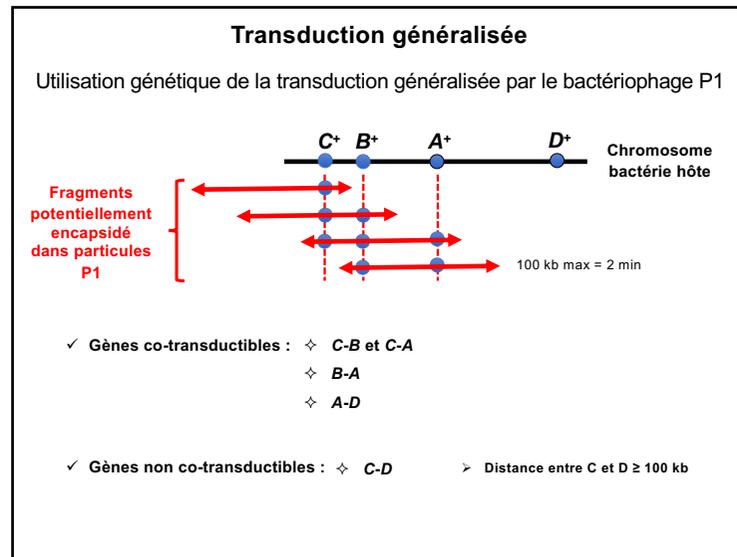


Transduction spécialisée
Une seule région chromosomique est susceptible d'être transduite

12



13



14

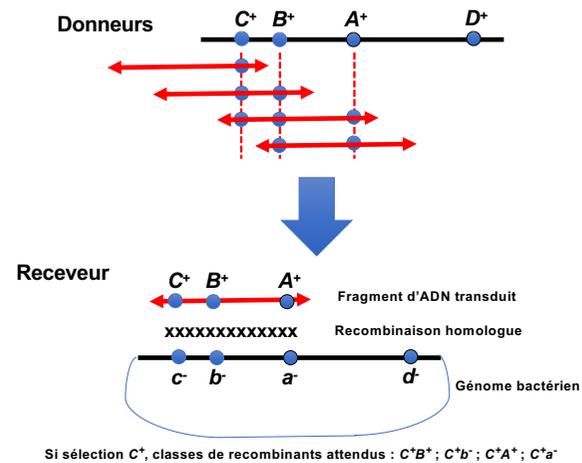
Transduction généralisée, quelques chiffres

Transduction généralisée via le phage P1 dans *E. coli*
pour remplacer un allèle résident *b*- par un allèle *B*+ par
transduction

- ◇ 1 particule sur 30 est transductrice
- ◇ 50 particules transductrices (50 X 100 kb) sont nécessaires pour couvrir tout le génome (4.10^6 pb)
 - 1 particule sur 1500 porte l'allèle *B*+
- ◇ Efficacité de recombinaison 2% pour remplacer l'allèle *b*- par un allèle *B*+
- Efficacité de transduction pour un allèle donné $1/(1500 \times 50)$ soit $\approx 1.10^{-5}$

15

Transduction généralisée & cartographie



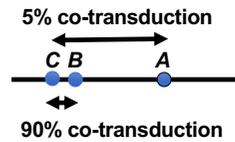
16

Transduction généralisée & distance génétique

➤ Fréquence de co-transduction :

$$F = \frac{C^+ B^+}{C^+ B^+ + C^+ b^-}$$

➤ Cette fréquence varie de proche de 100% si les gènes sont très liés jusqu'à 0% pour des gènes éloignés et donc jamais co-transduits



17

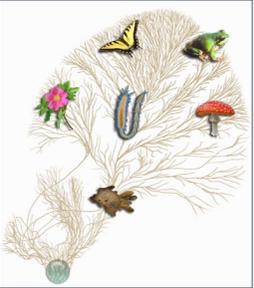
Test de fluctuation

Expérience de Salvador Luria et Max Delbrück
(1943)

18

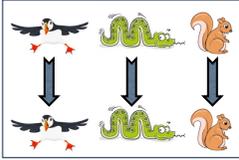
Un siècle plus tôt...

Évolution des espèces



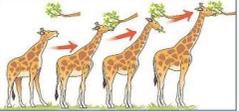
Mutations aléatoires
Sélection naturelle

Fixisme



Pas de mutations

Transformisme d'usage



Mutations dirigées

Difficile de faire des expériences reproduisant la sélection naturelle avec des animaux sur un grand nombre d'individus et de générations...

<http://tdweb.org/tree/>

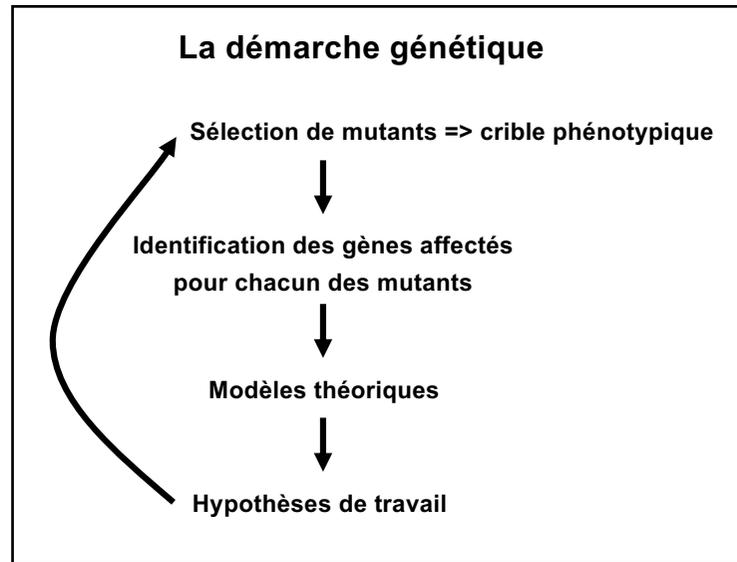
19

Choix d'un organisme modèle adapté pour un protocole d'évolution expérimentale...

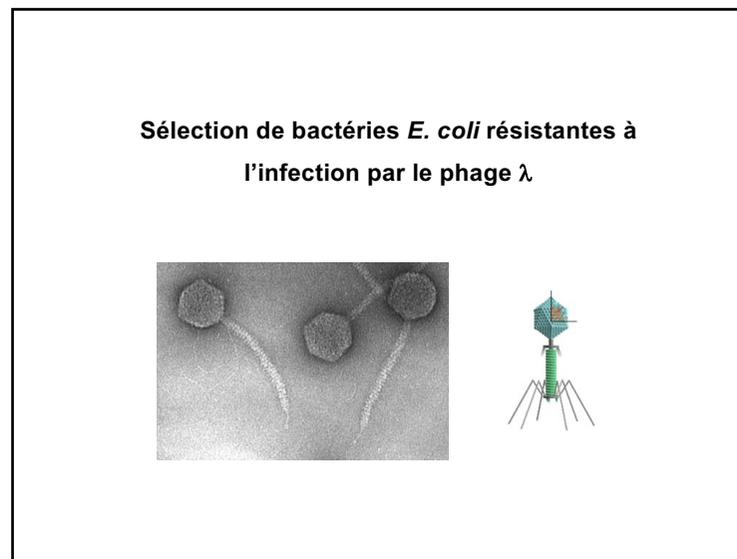
<p>Salvador Luria Microbiologiste</p>	<p>Max Delbrück Biophysicien</p>
<p>Bactéries & Phages</p>	<p>Génétique & Statistiques</p>

Question : comment apparaissent les mutations ?

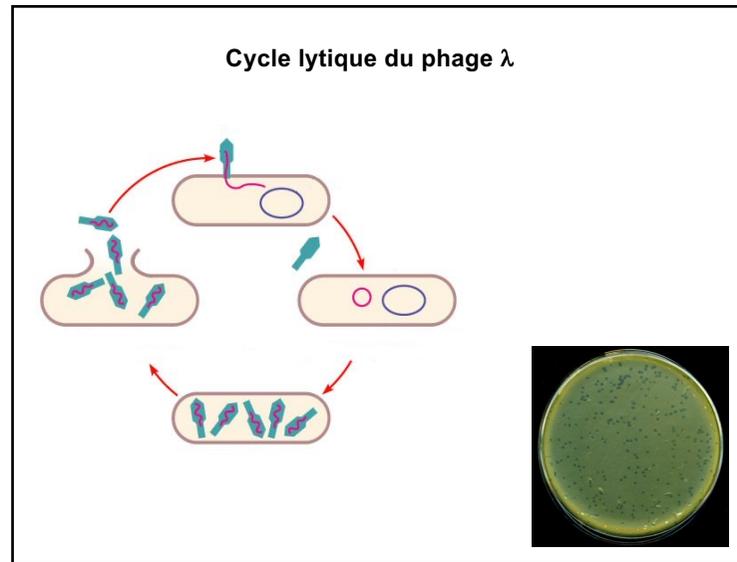
20



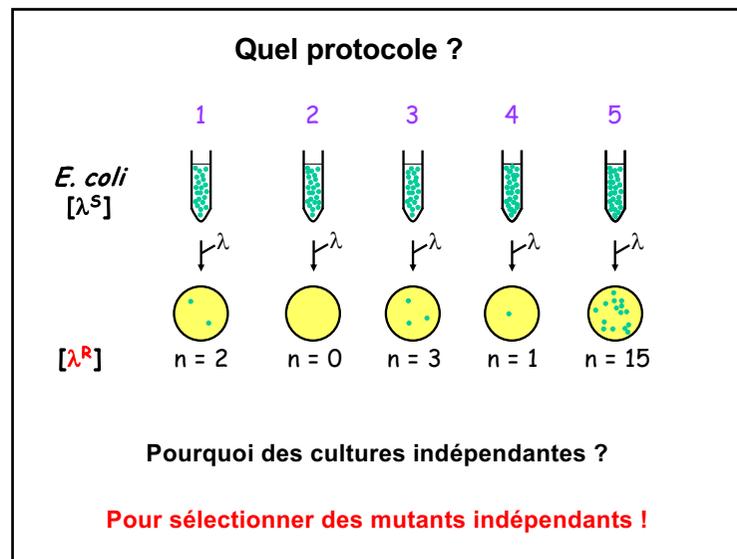
21



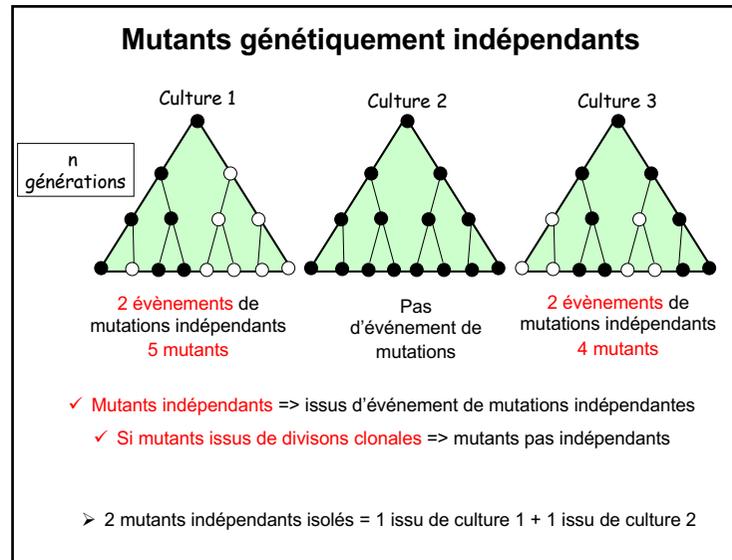
22



23



24



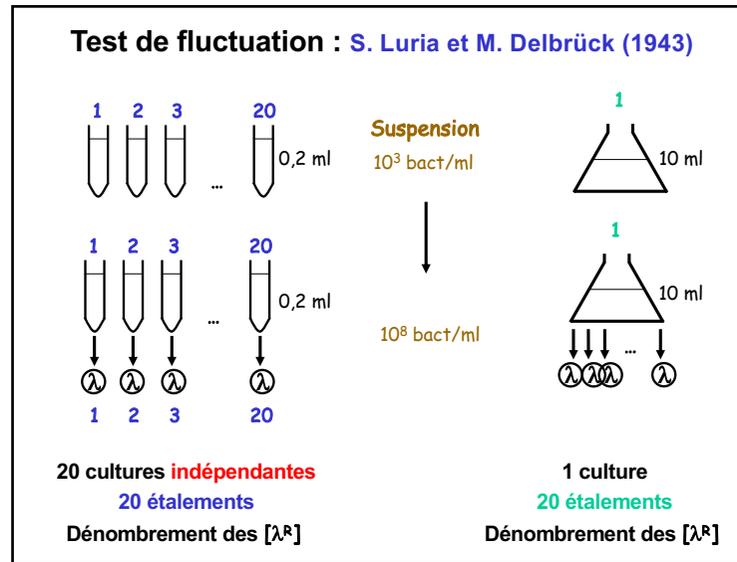
25

Comment les mutations apparaissent-elles ?

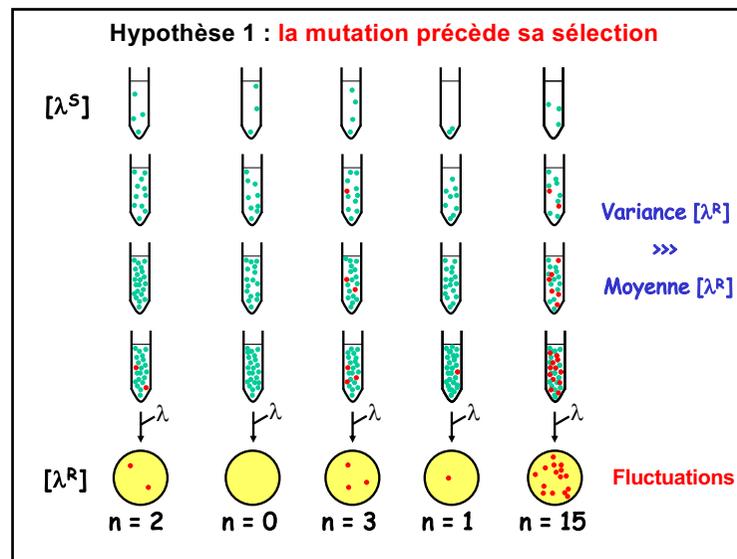
Hypothèse 1 : les mutations de résistance apparaissent dans la bactérie **SPONTANEMENT** avec une **probabilité fixe** **AVANT** leur exposition au phage

Hypothèse 2 : les mutations sont **INDUITES** avec une **certaine probabilité** dans la bactérie par le contact avec le phage. En d'autre terme, il existe une probabilité faible qu'une bactérie résiste à l'attaque d'un phage et si elle résiste, elle et ses descendants acquièrent alors une immunité contre le phage.

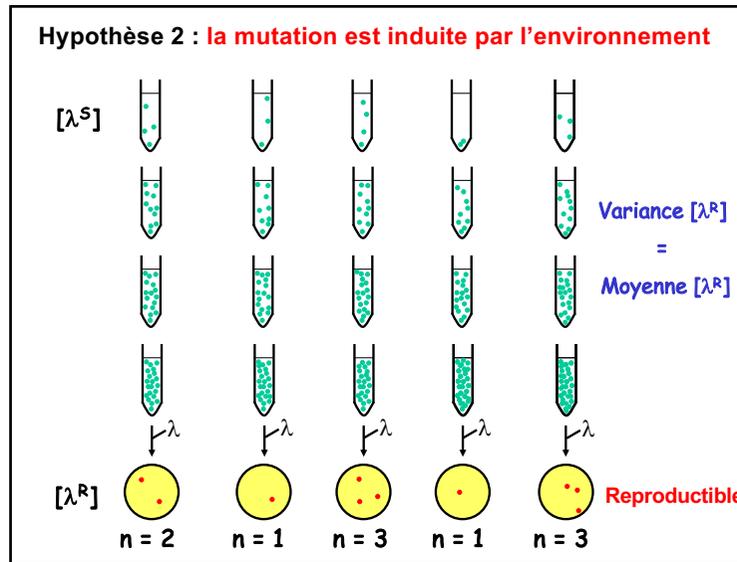
26



27



28



29

Cultures individuelles $[\lambda^R]$

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0	3	0	0	5	0	5	0	6	107	0	0	0	1	0	0	64	0	35

$M = 11,35$
 $V = 694$

Expérience test : Variance >>> Moyenne

Culture unique $[\lambda^R]$

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
14	15	13	21	15	14	26	16	20	13	12	18	17	22	19	14	16	21	15	16

$M = 16,85$
 $V = 12,52$

Expérience témoin : Variance ~ Moyenne

30

Expérience test : **Variance >>> Moyenne**

<=>

Hypothèse 1 vérifiée

donc

**l'apparition d'une mutation se fait AU HASARD
et PRECEDE son éventuelle sélection**

Corollaire : pas de mutation « adaptative »

31

Taux de mutation constant => pour un caractère donné
=> conditions expérimentales identiques

Taux de mutants variable => nombre de mutations apparues
=> nombre divisions bactéries mutantes
(moment apparition mutation)

Taux de mutation \neq **Taux de mutants**

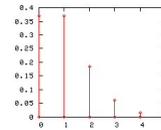
32

Taux de mutation

=

probabilité d'apparition stochastique d'une mutation par divisions cellulaires

-> suit une distribution de Poisson
Loi de probabilité discrète des évènements rares



33

Loi de Poisson

Pour une période T, un événement apparaît en moyenne λ fois

-> λ = espérance, réel positif

K variable aléatoire, déterminant le nombre de fois où l'événement se produit pendant la période T

K = entier naturel 0; 1; 2; 3 ...

K suit la loi de probabilité suivante

$$p(k) = e^{-\lambda} \times \lambda^k / k!$$

34

Calcul taux de mutation

Cultures individuelles [λ^R]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0	3	0	0	5	0	5	0	6	107	0	0	0	1	0	0	64	0	35

❖ Quelles sont les classes où l'indépendance des mutants [I^R] apparus est certaine ?

* Classe 0 [λ^R] → 2; 4; 5; 7; 9; 12; 13; 14; 16; 17; 19

* Classe 1 [λ^R] → 1; 15

p = probabilité d'apparition d'une mutation par divisions cellulaires

n = nombres de divisions cellulaires

Dans chaque tube : n X p évènements de mutation

35

Calcul taux de mutation

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0	3	0	0	5	0	5	0	6	107	0	0	0	1	0	0	64	0	35

Classe 0 [λ^R] → 2; 4; 5; 7; 9; 12; 13; 14; 16; 17; 19

$$\text{Si } K=0 \quad f(0) = e^{-np} \times np^0/0!$$

$$\Rightarrow f(0) = e^{-np}$$

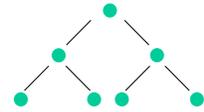
p = probabilité d'apparition d'une mutation par divisions cellulaires

n = nombres de divisions cellulaires

36

Calcul taux de mutation

❖ Combien de divisions cellulaires ?



2 descendants -> 1 division cellulaire

4 descendants -> 3 divisions cellulaires

n descendants -> n-1 divisions cellulaires

Ensemencement : quelques bactéries dans 0,2 ml -> 10^8 bact/ml

$n_{div} = n_{bactf} - n_{bact0}$ comme $n_{bactf} \gg n_{bact0}$ alors $n_{div} = n_{bactf}$

$n_{div} = 0,2 \times 10^8 = 2 \cdot 10^7$ divisions cellulaires

37

Calcul taux de mutation

Cultures individuelles [λ^R]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0	3	0	0	5	0	5	0	6	107	0	0	0	1	0	0	64	0	35

Fréquence de cultures sans mutant $f(0)$ -> $f(0) = 11/20 = 0,55$

Nombre de divisions cellulaires -> $n = 2 \cdot 10^7$

$$f(0) = e^{-pn}$$

$$0,55 = e^{-p \times 2 \cdot 10^7}$$

$p = 3 \cdot 10^{-8}$ mutations -> [λ^R] / divisions cellulaires

p = probabilité d'apparition d'une mutation par division cellulaire

38

Calcul du taux de mutants

Cultures individuelles [λ^R]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0	3	0	0	5	0	5	0	6	107	0	0	0	1	0	0	64	0	35

$$T = \sum [\lambda^R] / n_{\text{total bactéries}}$$

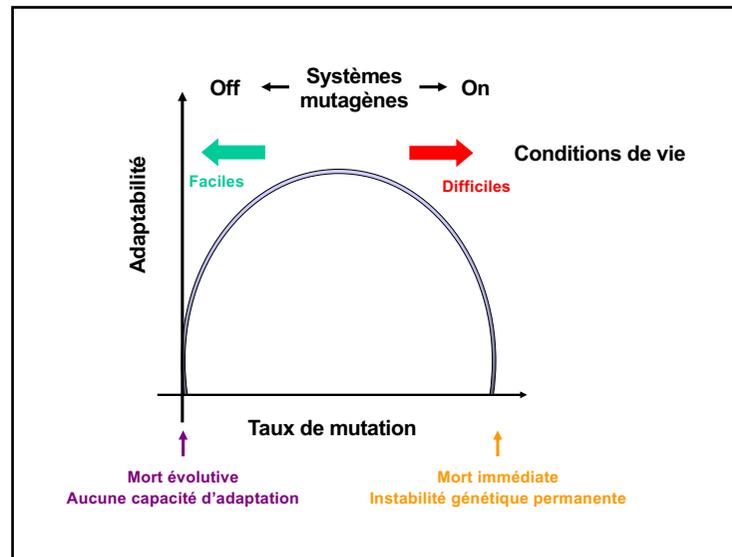
$$227 / (20 \times 0,2 \times 10^8) = 5,7 \cdot 10^{-7}$$

Fréquence d'apparition de mutants [λ^R] est de $5,7 \cdot 10^{-7}$

-> 1 mutant [λ^R] toutes les $5,7 \cdot 10^7$ bactéries

Attention : pas forcément indépendance des mutants !

39



40



TRAITEMENT MUTAGENE
=

exposition à des agents mutagènes

augmentation du **taux de mutation**

41

Test de fluctuation : à quoi cela sert il de nos jours ?

- Tester & quantifier le pouvoir mutagène:
 - de substances chimiques (médicaments, additifs alimentaires, polluants de l'environnement, etc.)
 - de mutations (détectées dans des tumeurs)
- Suivi de la dynamique des épidémies

Article

Resurgence of Ebola virus in 2021 in Guinea suggests a new paradigm for outbreaks

https://doi.org/10.1038/s41586-021-03901-9

Received: 4 April 2021

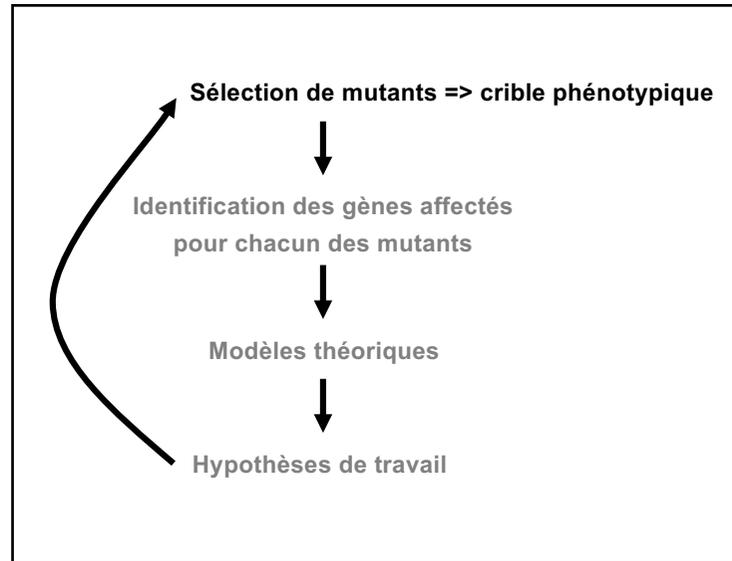
Accepted: 19 August 2021

Published online: 15 September 2021

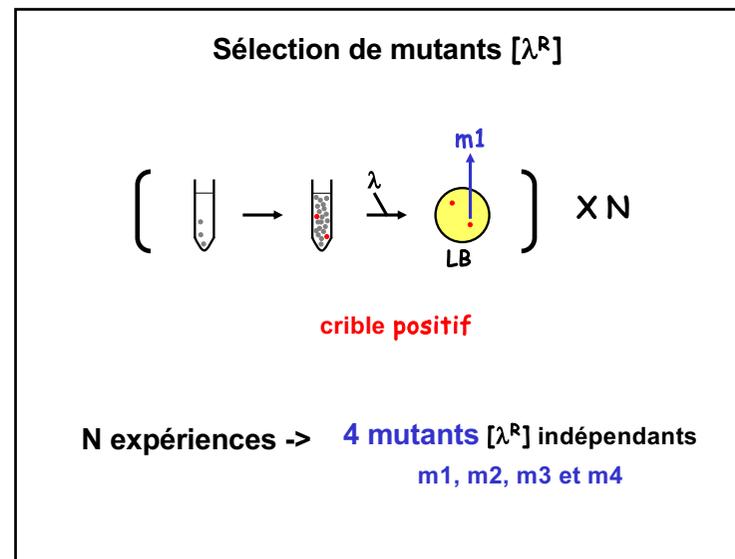
Check for updates

Alpha Kabalet Kabze^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500,501,502,503,504,505,506,507,508,509,510,511,512,513,514,515,516,517,518,519,520,521,522,523,524,525,526,527,528,529,530,531,532,533,534,535,536,537,538,539,540,541,542,543,544,545,546,547,548,549,550,551,552,553,554,555,556,557,558,559,560,561,562,563,564,565,566,567,568,569,570,571,572,573,574,575,576,577,578,579,580,581,582,583,584,585,586,587,588,589,590,591,592,593,594,595,596,597,598,599,600,601,602,603,604,605,606,607,608,609,610,611,612,613,614,615,616,617,618,619,620,621,622,623,624,625,626,627,628,629,630,631,632,633,634,635,636,637,638,639,640,641,642,643,644,645,646,647,648,649,650,651,652,653,654,655,656,657,658,659,660,661,662,663,664,665,666,667,668,669,670,671,672,673,674,675,676,677,678,679,680,681,682,683,684,685,686,687,688,689,690,691,692,693,694,695,696,697,698,699,700,701,702,703,704,705,706,707,708,709,710,711,712,713,714,715,716,717,718,719,720,721,722,723,724,725,726,727,728,729,730,731,732,733,734,735,736,737,738,739,740,741,742,743,744,745,746,747,748,749,750,751,752,753,754,755,756,757,758,759,760,761,762,763,764,765,766,767,768,769,770,771,772,773,774,775,776,777,778,779,780,781,782,783,784,785,786,787,788,789,790,791,792,793,794,795,796,797,798,799,800,801,802,803,804,805,806,807,808,809,810,811,812,813,814,815,816,817,818,819,820,821,822,823,824,825,826,827,828,829,830,831,832,833,834,835,836,837,838,839,840,841,842,843,844,845,846,847,848,849,850,851,852,853,854,855,856,857,858,859,860,861,862,863,864,865,866,867,868,869,870,871,872,873,874,875,876,877,878,879,880,881,882,883,884,885,886,887,888,889,890,891,892,893,894,895,896,897,898,899,900,901,902,903,904,905,906,907,908,909,910,911,912,913,914,915,916,917,918,919,920,921,922,923,924,925,926,927,928,929,930,931,932,933,934,935,936,937,938,939,940,941,942,943,944,945,946,947,948,949,950,951,952,953,954,955,956,957,958,959,960,961,962,963,964,965,966,967,968,969,970,971,972,973,974,975,976,977,978,979,980,981,982,983,984,985,986,987,988,989,990,991,992,993,994,995,996,997,998,999,1000}

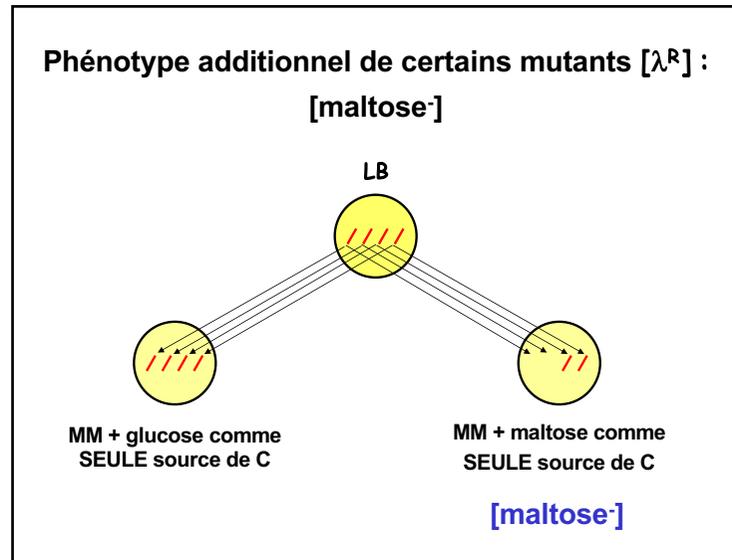
42



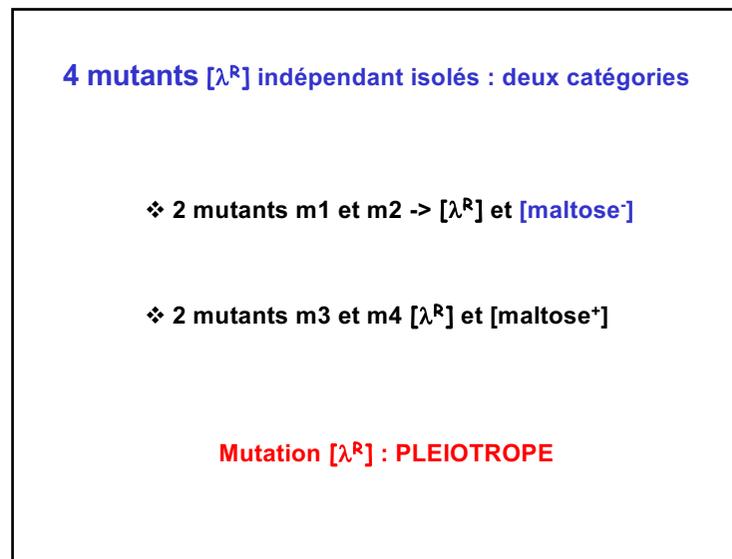
43



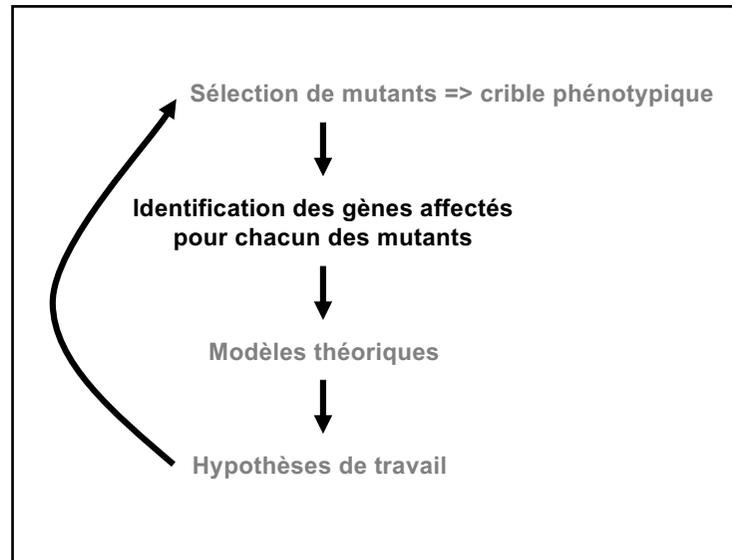
44



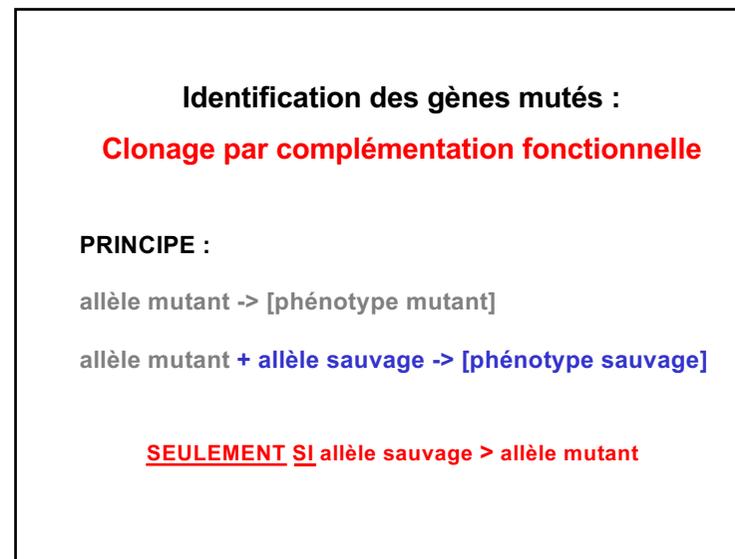
45



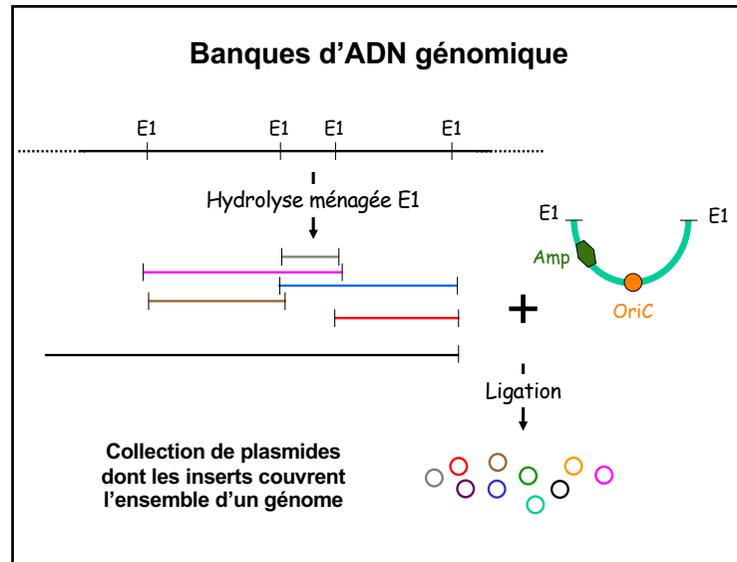
46



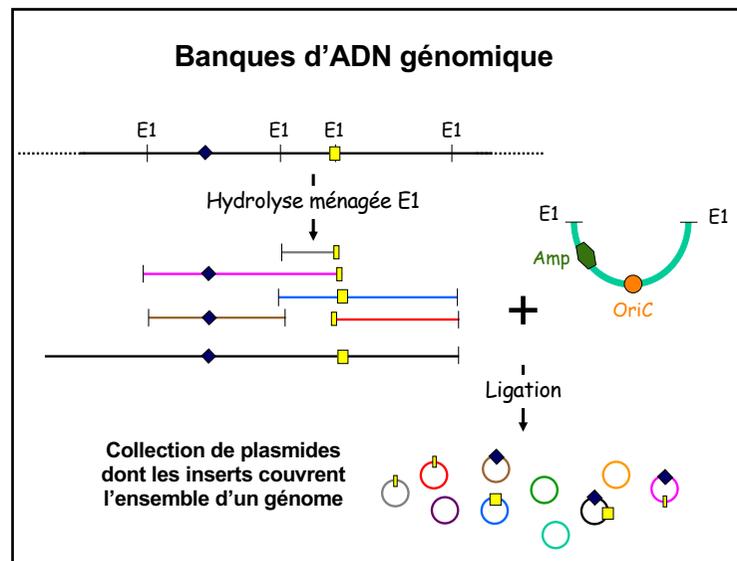
47



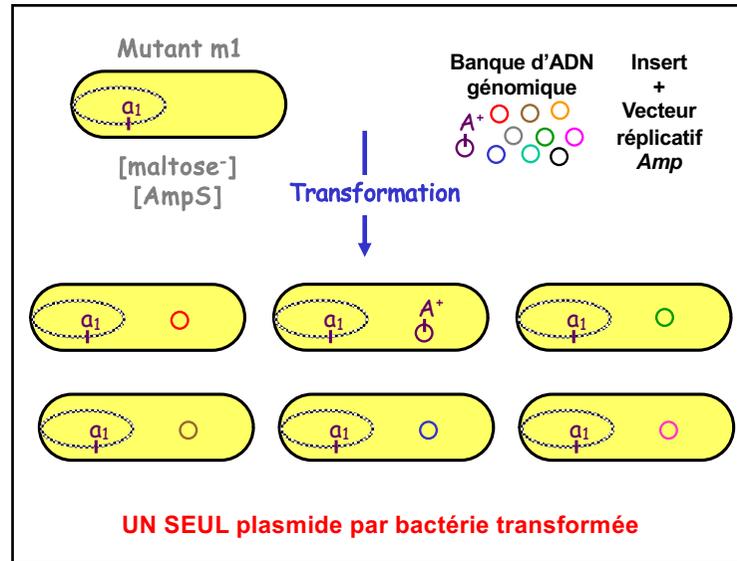
48



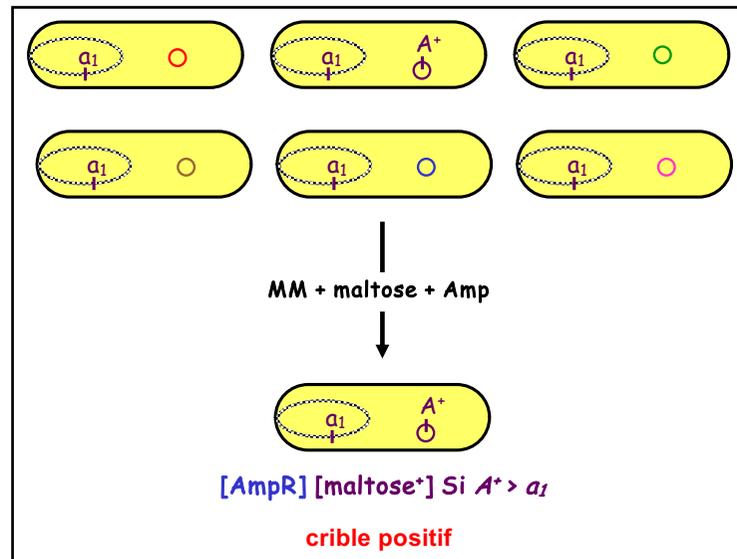
49



50



51



52

Dans ce crible, mutants [maltose⁻] sont également [λ^R]

mutation pléiotrope

Transformants [Amp^R] [maltose⁺] -> [λ^R] ou [λ^S] ?

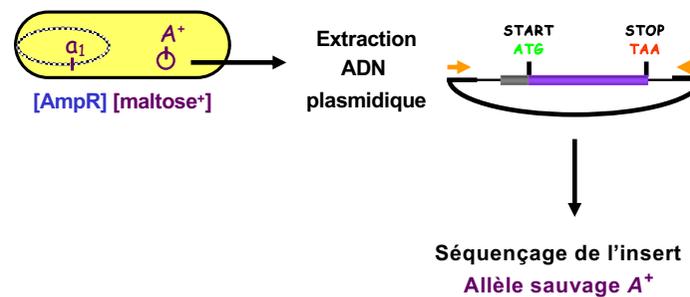
-> Si mutation dans un seul gène alors allèle sauvage correspondant complète TOUS les phénotypes associés à l'allèle mutant

Si allèle mutant < allèle sauvage
=> transformants [Amp^R] [maltose⁺] [λ^S] ✓

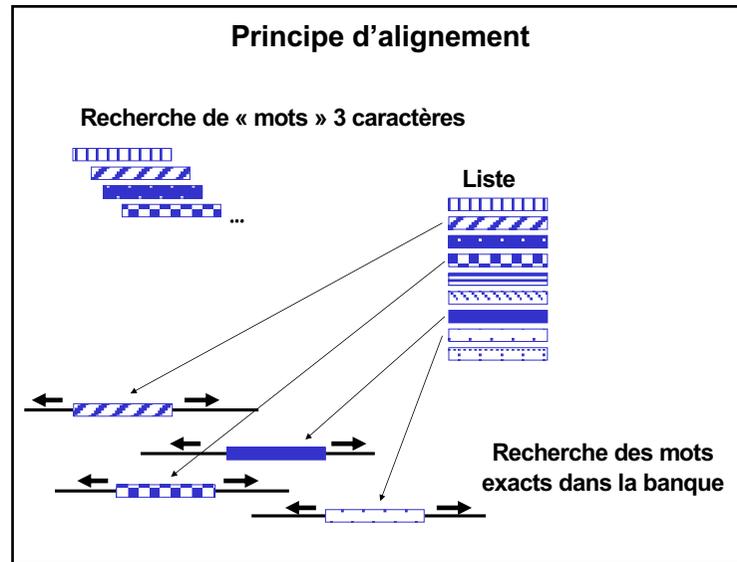
Si allèle mutant > allèle sauvage
=> transformants [Amp^R] [maltose⁺] [λ^R] ✗

53

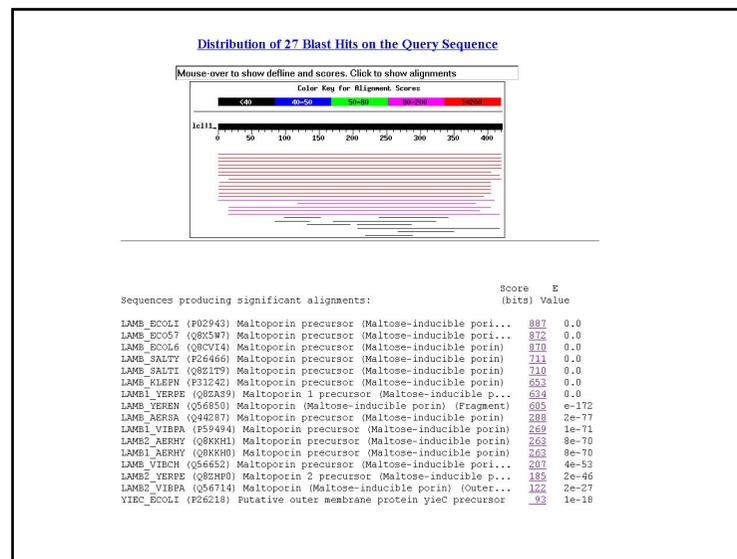
Identification des gènes mutés :
séquençage de l'allèle sauvage



54



59



60

E-value = probabilité d'observer au hasard une similitude de ce score à travers la banque de séquences considérée

- * Plus la valeur est faible, plus l'alignement est fiable
- * Dépend du nombre total de résidus contenus dans la banque
- * Ces valeurs ne sont pas comparables entre deux banques

61

```
>LAMB_ECOLI (F02943) Maltoporin precursor (Maltose-inducible porin)
(Lambda receptor protein)
Length = 446

Score = 887 bits (2291), Expect = 0.0
Identities = 421/421 (100%), Positives = 421/421 (100%)

Query: 1  VAVAAGVMSAQMVAVDHFGYARSIGWFTSGGEGCCFQTGAQSKYRLGNECETYAELKL 60
          VAVAAGVMSAQMVAVDHFGYARSIGWFTSGGEGCCFQTGAQSKYRLGNECETYAELKL
Sbjct: 12 VAVAAGVMSAQMVAVDHFGYARSIGWFTSGGEGCCFQTGAQSKYRLGNECETYAELKL 71

Query: 61  GQEVWKEGDKSEFYDITNVAYSVAQQNDWEATDPAFREANVQGNLLEWLFGSTIWAQKRF 120
          GQEVWKEGDKSEFYDITNVAYSVAQQNDWEATDPAFREANVQGNLLEWLFGSTIWAQKRF
Sbjct: 72  GQEVWKEGDKSEFYDITNVAYSVAQQNDWEATDPAFREANVQGNLLEWLFGSTIWAQKRF 131

Query: 121 YQRHVVHIDFYNDISGGAGLENIIDVGFGLSLAATRSSEAGSSSFASNNIYDYNE 180
          YQRHVVHIDFYNDISGGAGLENIIDVGFGLSLAATRSSEAGSSSFASNNIYDYNE
Sbjct: 132 YQRHVVHIDFYNDISGGAGLENIIDVGFGLSLAATRSSEAGSSSFASNNIYDYNE 191

Query: 181 TANDVFDVRLAQMEINFGGTLLELGVYGRANLNDNYRLVDGASKDGLFTAHTQSVLKG 240
          TANDVFDVRLAQMEINFGGTLLELGVYGRANLNDNYRLVDGASKDGLFTAHTQSVLKG
Sbjct: 192 TANDVFDVRLAQMEINFGGTLLELGVYGRANLNDNYRLVDGASKDGLFTAHTQSVLKG 251

Query: 241 ENKEVQYATDSMTSQKGLSQSGVAFDNEKFAYNINNGHMLRLLDHGASIMGDNNDM 300
          ENKEVQYATDSMTSQKGLSQSGVAFDNEKFAYNINNGHMLRLLDHGASIMGDNNDM
Sbjct: 252 ENKEVQYATDSMTSQKGLSQSGVAFDNEKFAYNINNGHMLRLLDHGASIMGDNNDM 311

Query: 301 MYVGMVQDINWDDNNGTKWTVGIREMYKWTFLMSTVMEIGYDNVESQRTGDKNNQYKIT 360
          MYVGMVQDINWDDNNGTKWTVGIREMYKWTFLMSTVMEIGYDNVESQRTGDKNNQYKIT
Sbjct: 312 MYVGMVQDINWDDNNGTKWTVGIREMYKWTFLMSTVMEIGYDNVESQRTGDKNNQYKIT 371

Query: 361 LAQQWQAGDSIWSRFAIRVFATYAKWDEKGGYDYGADNNAFNGKAVPADFNSSSFGRG 420
          LAQQWQAGDSIWSRFAIRVFATYAKWDEKGGYDYGADNNAFNGKAVPADFNSSSFGRG
Sbjct: 372 LAQQWQAGDSIWSRFAIRVFATYAKWDEKGGYDYGADNNAFNGKAVPADFNSSSFGRG 431

Query: 421 D 421
          D
Sbjct: 432 D 432
```

-> identité parfaite

62

```

>LAMB1_YERPE (Q82A89) Maltoporin precursor (Maltose-inducible
porin 1)
Length = 423

Score = 634 bits (1634), Expect = 0.0
Identities = 301/418 (72%), Positives = 348/418 (83%), Gaps = 12/418 (2%)

Query: 1  VAVAAGVMSAQAMAVDFHGYARSIGWTSGGEGQCFQTTGAQSKYRLGNBCEITYAELKL 60
+AVAAGV+3  QAMAVDFHGYARSIGWTF SGEGQCFQTTGAQSKYRLGNBCEITYAELKL
Sbjct: 11  LAVAAGVLTQAMAVDFHGYARSIGWTFASGGEGQCFQTTGAQSKYRLGNBCEITYAELKL 70

Query: 61  GQEVWKEGDKSFYFDTNVAYSVAQQNDWEATDFAFREANVQGNLIEWLPGSTIWAGKRF 120
GQE+WKEGDKSFY  DTNVAYSV+Q++DWE+TDFAFREANVQGNLIE  LPGSTIWAGKRF
Sbjct: 71  GQELWKEGDKSFYLLDTNVAYSVQRDDWESDFAFREANVQGNLIESLPGSTIWAGKRF 130

Query: 121  YQRHDVHMIDFYWDISGPGAGLENDVGFQKLSLAATRSSEAGSSSFASNNIYDVTNE 180
YQRHDVHMIDFYWDISGPGAGLE  ID+GFGKLS+AATR+SE+GGSS++  N  +
Sbjct: 131  YQRHDVHMIDFYWDISGPGAGLETIDLFGKLSVAATRNSSEAGSSSAMINDQ-RENAKY 189

Query: 181  TANDVFDVRLAQMEINPGGTLELGVYGRANLRDNYRLVDGASKDGLFTAEHTQSVLKG 240
T N+V+DVRLA +E NFGG+LELGVYGR+ ++ Y L  ASKDG + TAEHTQ8++ G
Sbjct: 190  TINNVYDVRLAGLETNPGGSLLELGVYGRADTQEGSYLAFNAKDGVMLEHTQSLMGG 249

Query: 241  FNKFVVQYATDSMTSQGKLSQSGVAFDNEKFAYINNNHMLRILDHGAIISMGDNDWM 300
FNKFVVQYATDSMTS  G  SQG+  +NNNH+LR++DHGAI++ + NDM
Sbjct: 250  FNKFVVQYATDSMTSYNTGHSQGT-----SVNNHGLLRVIDHGAINLAERKNDM 298

Query: 301  MYVGMVQDINWDDNGTKWWTGIRPMYKWTPI MSTVMEIGYDNVESQRTGDKNNQYKIT 360
MYV +YQDI+ DN+HG  W++VG+REMYKWTPI MST+HE  GYDNV+SQ  TG++N  QYK+T
Sbjct: 299  MYVALYQDIDLEDDNNGTWISVGVRFMYKWTPI MSTLEAGYDNVKSQHTGERNSQYKIT 358

Query: 361  LAQQWQAGDSIWSRPAIRVFATYAKWDEKGYDYTNADNANFGKAVFADFGSGSFG 418
LAQQWQAGDSIWSRPAIRVFATYA  WDEKGY  T  +  G  N  +FG
Sbjct: 359  LAQQWQAGDSIWSRPAIRVFATYANWDEKGYSDTTVAQDGTIGTNSRGNNEVTFG 416

```

63

```

>LAMB_ABRSA (Q44287) Maltoporin precursor (Maltose-inducible porin)
Length = 445

Score = 288 bits (738), Expect = 2e-77
Identities = 175/441 (39%), Positives = 236/441 (53%), Gaps = 54/441 (12%)

Query: 3  VAAQVMSAQAMAVDFHGYARSIGWTSGGEGQCFQTTGAQSKYRLGNBCEITYAELKLG 62
V A + s  A AYDFHGY  RSG+G + G  Q  Q  RLGNB +TY  E++LQ
Sbjct: 14  VTAALASQAFAVDFHGYFRSGVSVTDGMSQTLSDNARQKVRRLGNBCEITYEIQLS 73

Query: 63  EVWKEGDKSFYFDTNVAYSVAQQNDWEATDFAF-----REAN 99
EV+ +  K+EY  D+VA +  NEM+*+  F  R+ N
Sbjct: 74  EVENKDGKTYVDSMVMTSNGSNDWES+ESKFCQTSANSTALDGCENKEDATFALRQFN 133

Query: 100  VQGNLIEWLPGSTIWAGKRFYQRHDVHMIDFYWDISGPGAGLENDVGFQKLSLAATR 159
VQ K L+ + P +TWAGSRV+YQRHDVH+ DFYWHISG  GAG+E  I  G  GR+5  A  F
Sbjct: 134  VQAKLLGFAPAEALWAGKRFYQRHDVHISDFYWNISGRGAGIBGIQAGPKVYGFANVR 193

Query: 160  SSEAGSSSFASNNIYDVTNETANDVFDVRLAQMEINPGGTLELGVYGRANLRDNYRLV 219
+ +G  +N  Y +E  + D+R  A + +  G+LE+GVDY  AN  D  +
Sbjct: 194  NDRSG-----TWDFYVDEMNVWTLDERVAGIFLWQSSLEVGVDYALANPSDAQKDS 247

Query: 220  DGA---SKDGLFTAEHTQSVLKGKFNKVVQYATDSMTSQGKLSQSGVAFDNEKFAY 275
A  *KDG + TAE  TQ +L  GENK  V+QY  T+  G  S+  D  +
Sbjct: 248  ANAQYRNRKDGMLTAEHTQGLLGFENKVTLYGTB-----GYSKTFAGWDRSWSYGA 300

Query: 276  NINNHMLRILDHGAIISMGDNDWMYGMVQDINWDDNGTKWWTGIRPMYKWTPI 333
+  RI++HG  I  NG++M+M + +y  N  D  KW  T+ +  REMYK
Sbjct: 301  EAKDAGDFKRIINHGVI PMGNSWEMHQLVYGVGDNDWDTNDWETSVMVAFPMYKWD 360

Query: 334  MSTVMEIGY--DNVESQRTGDKNNQYKITLAQQWQAGDSIWSRPAIRVFATYAKWDEK 390
T+ E  GY  N  +  T  +++  YK+TLAQ  W  AG  S  W+RE  IRVFA+Y  D+K
Sbjct: 361  NKTIFEGGYFKDKNNKSTMGTSBEDAGYKLLTAQANSAGSSFWARPEIRVFA+YLAQKK- 419

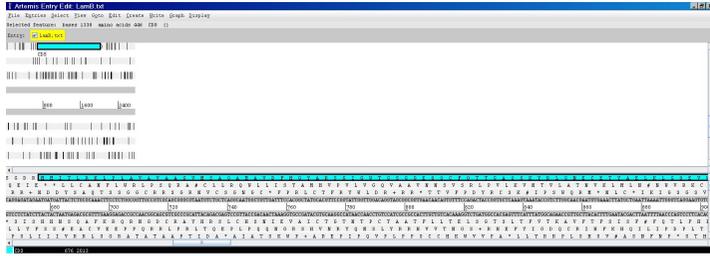
Query: 391  GYDYTNADNNA-----NEF 405
+  GNA  NN  NEF
Sbjct: 420  --EMKGNFNNGTADDTWTFG 438

```

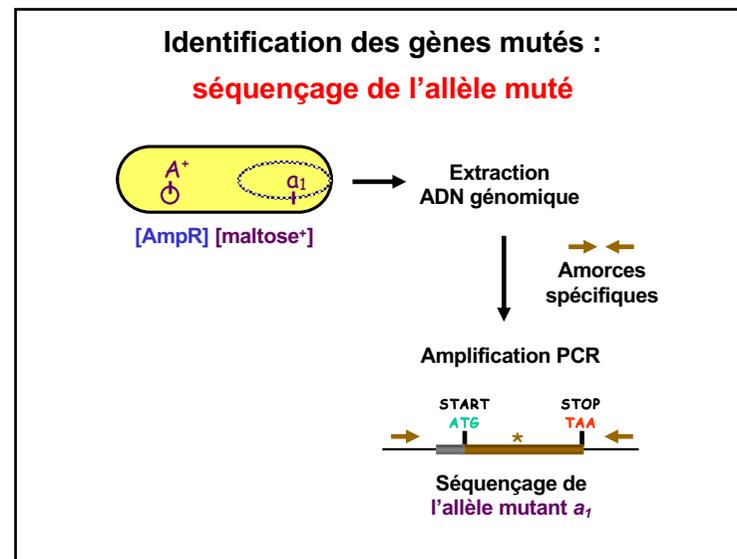
Aeromonas salmonicida

64

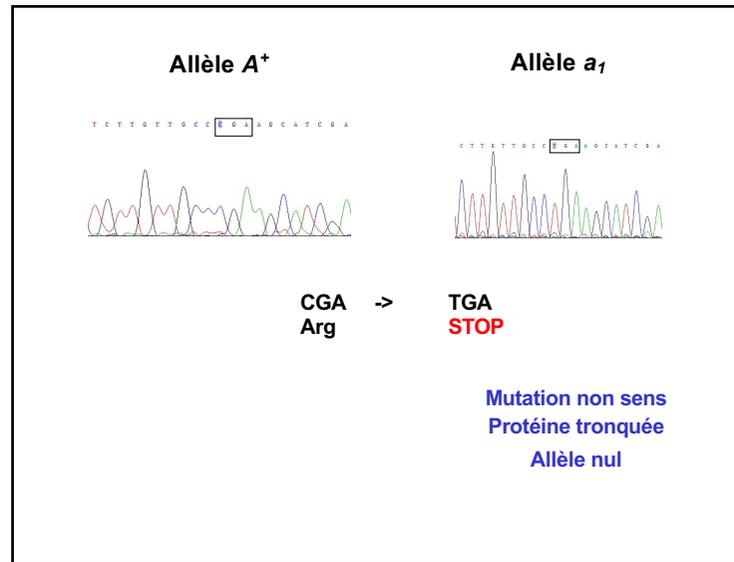
Allèle A⁺ : LamB
-> Transporteur maltose = protéine membranaire



65



66

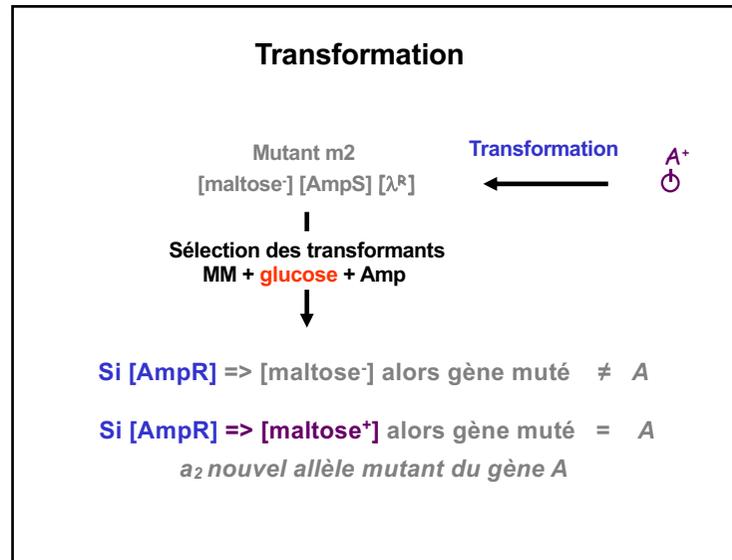


67

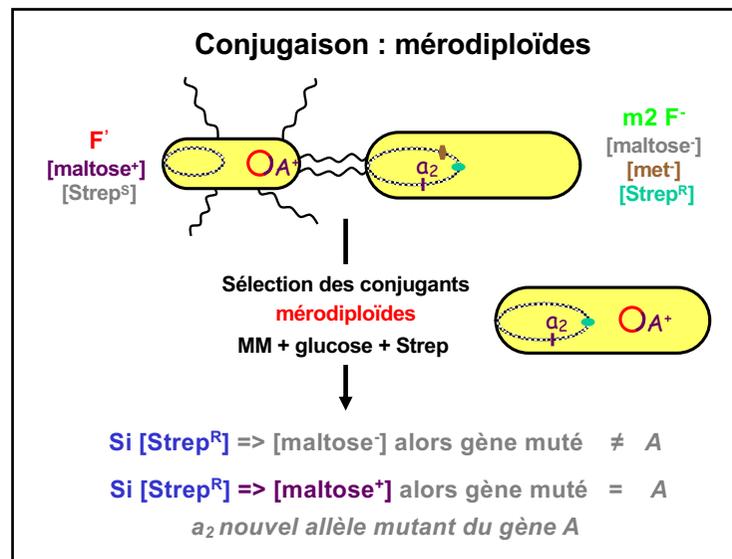
❖ 2 mutants m1 et m2 -> [λ^R] et [maltose]

mutant m2 : mutation localisée dans le même gène A ?

68



69



70

❖ 2 mutants m1 et m2 -> [λ^R] et [maltose⁻]

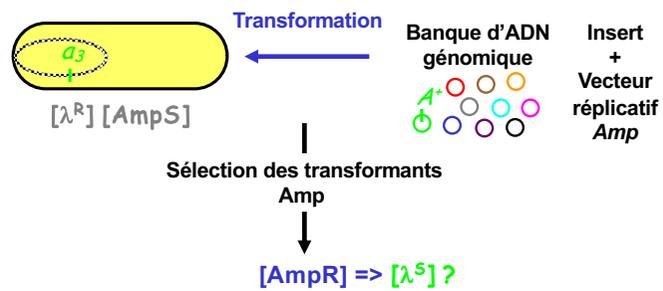
-> 2 allèles du gène A qui code LamB

❖ 2 mutants m3 et m4 [λ^R] et [maltose⁺]

-> gène(s) impliqué(s) ?

71

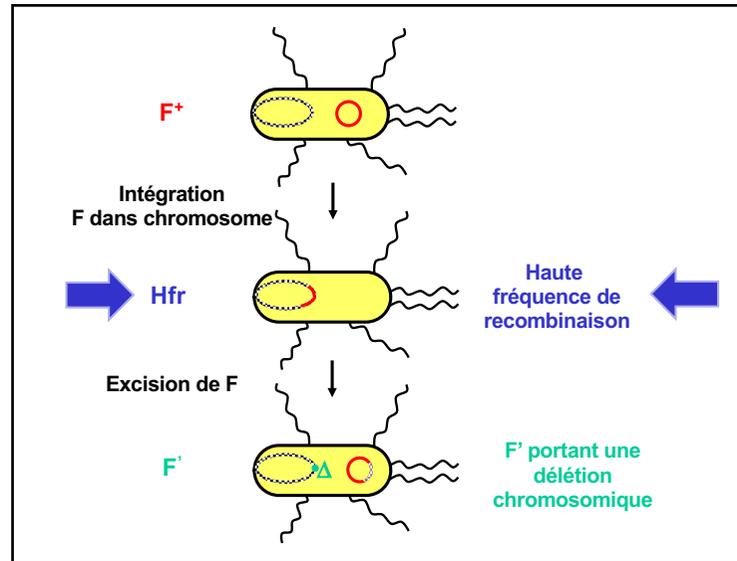
Clonage par complémentation



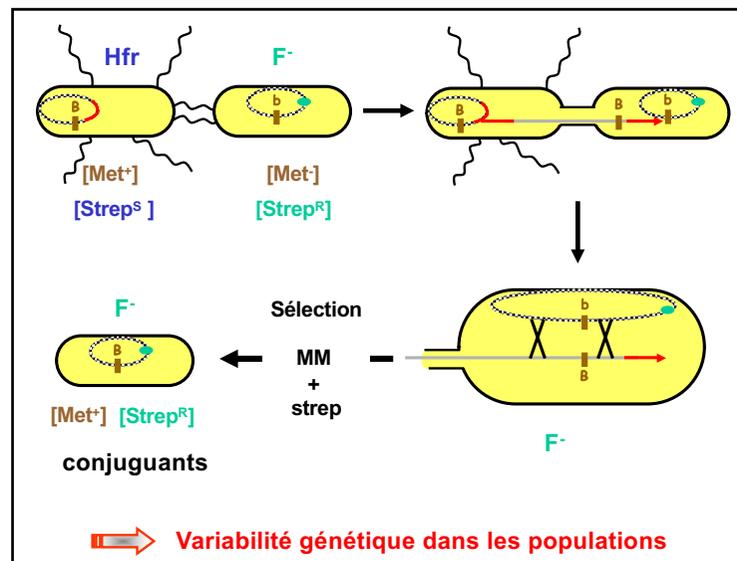
Si λ^R DOMINANT sur λ^S impossible !

Stratégie expérimentale ?

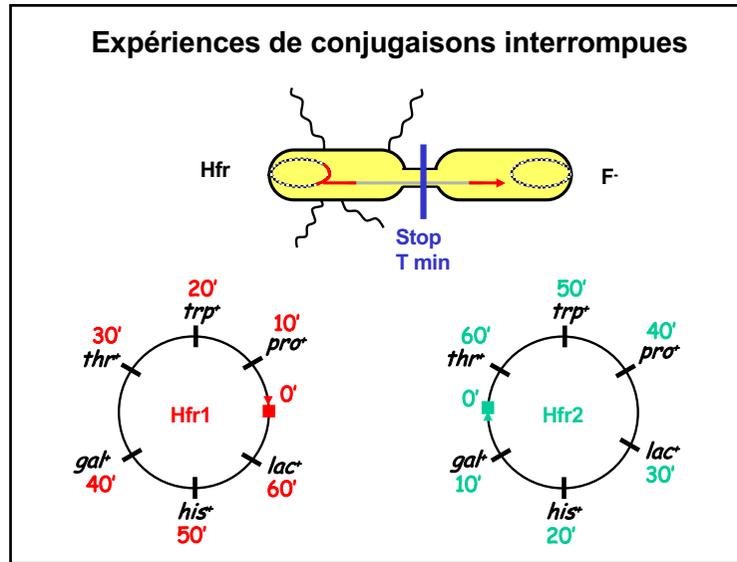
72



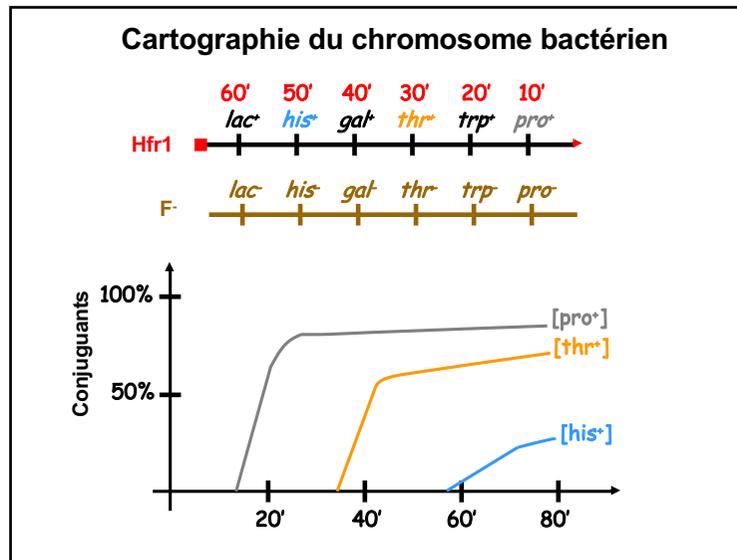
73



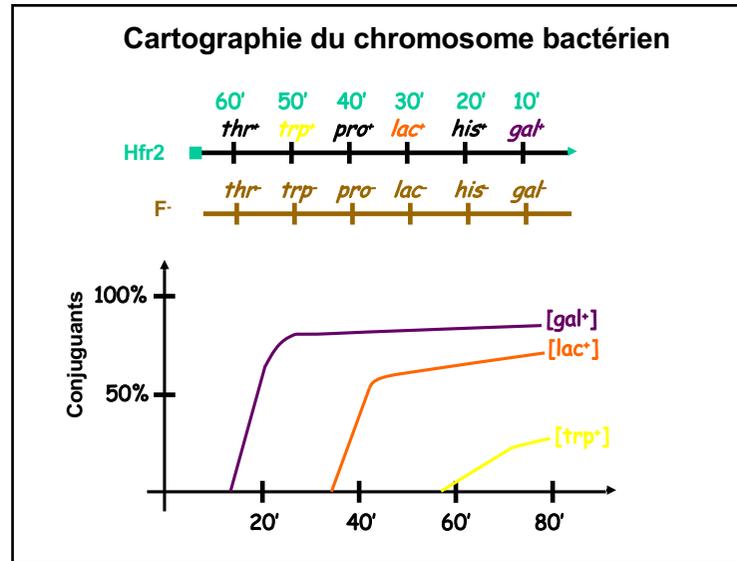
74



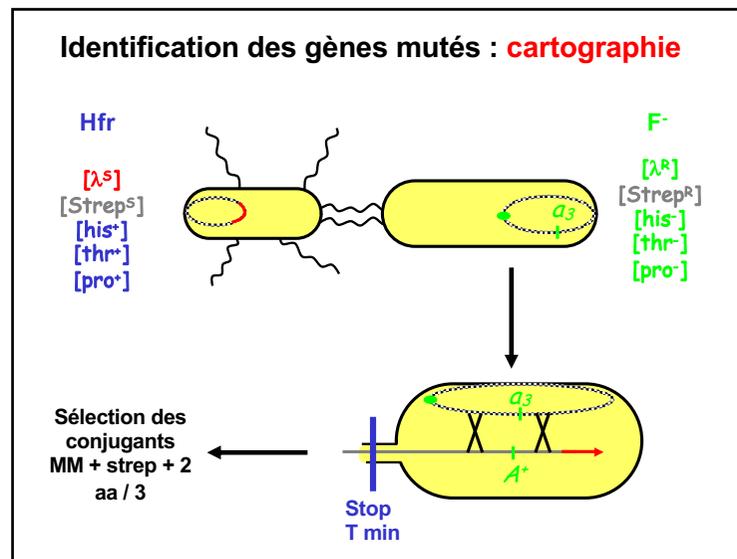
75



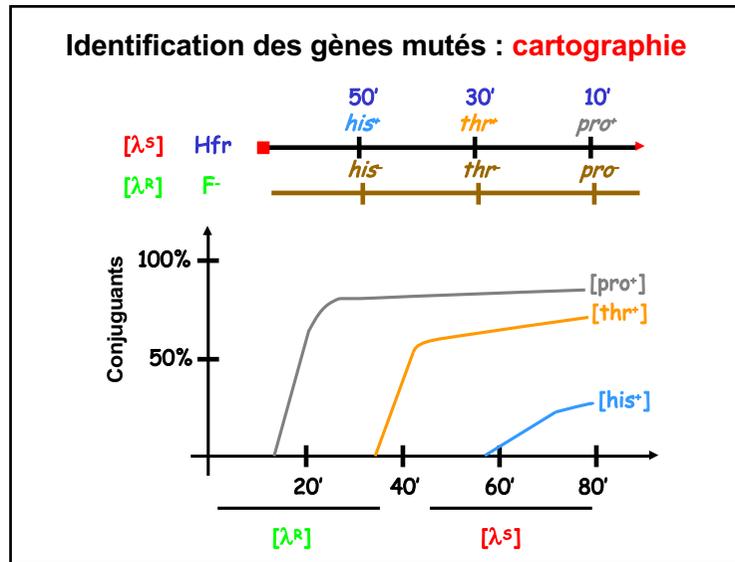
76



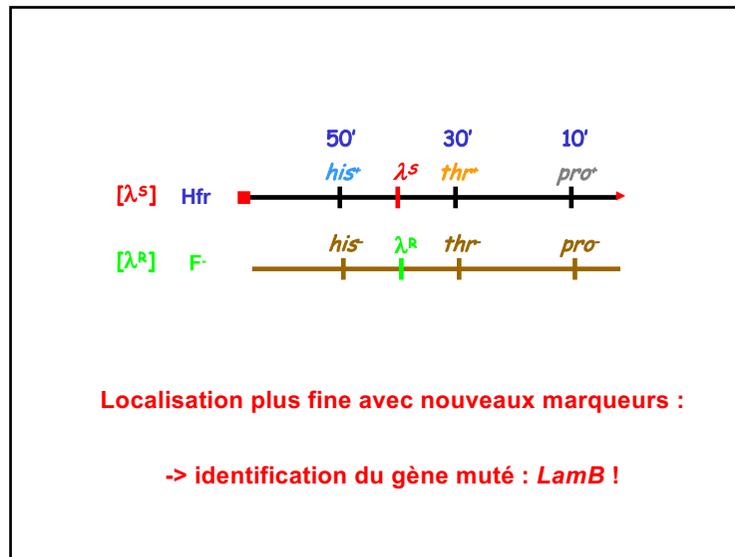
77



78



79



80

En résumé :

4 mutants [λ^R] indépendant affectant le gène *LamB* :
regroupés en deux catégories

❖ 2 mutants m1 et m2 -> [λ^R] et [maltose⁻]

Mutation m1 **non-sens** position 57 = protéine tronquée

Mutation m2 **faux-sens** position 18

❖ 2 mutants m3 et m4 [λ^R] et [maltose⁺]

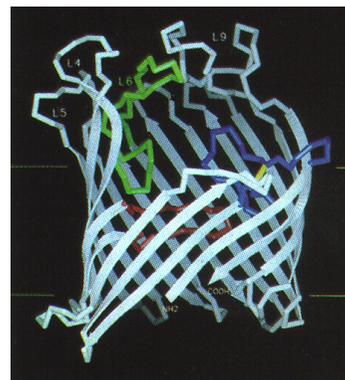
Mutation **faux -sens** :

substitutions position 155 (m3) et 401 (m4)

1 seul gène, *LamB*, 4 allèles différents

81

Structure cristallographique de LamB



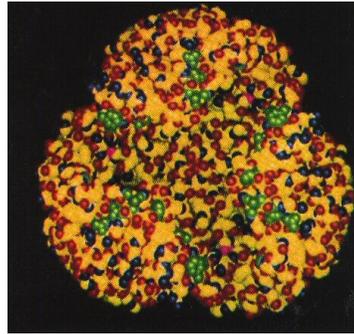
Extérieur

Membrane externe

Espace
périplasmique

82

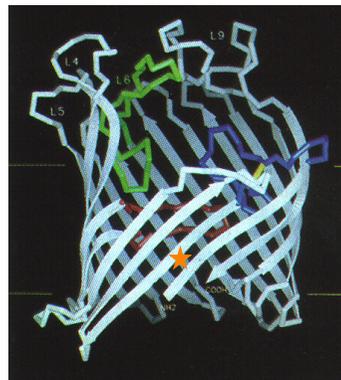
Maltoporine : un pore homotrimérique



En vert -> [λ^R] et [maltose⁺]

-> m3 et m4

83



Etoile orange m2 -> [λ^R] et [maltose⁻]

84

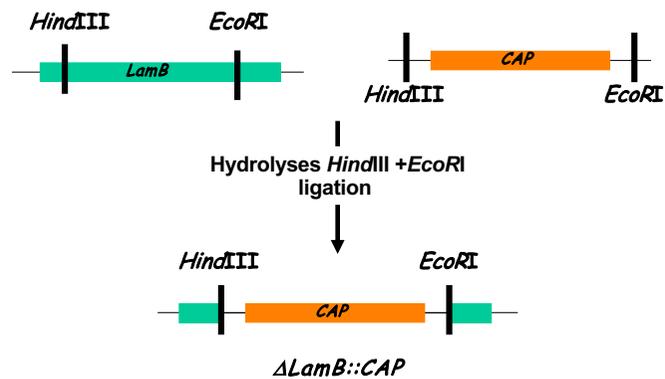
Invalidation par remplacement de gène : disruption

Principe : substitution d'un allèle nul au locus d'un allèle sauvage

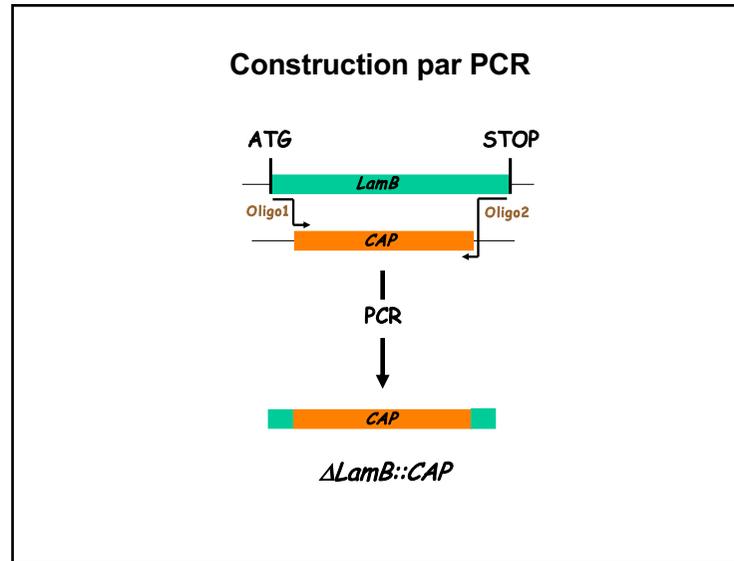
- 1- Construction de l'allèle muté
- 2- Transformation
- 3- Recombinaison homologue au locus du gène ciblé

85

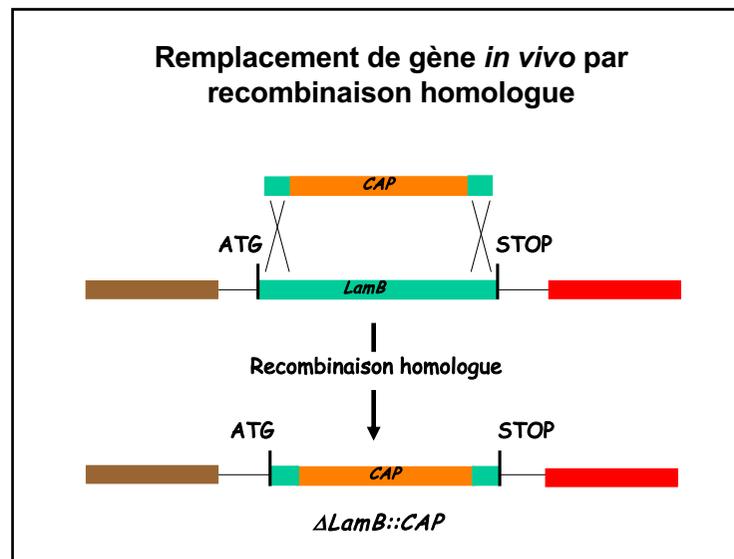
Construction par restriction



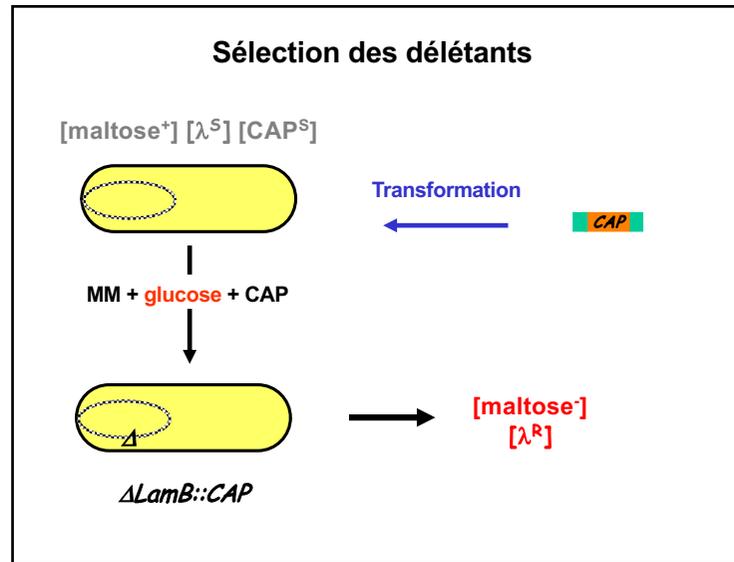
86



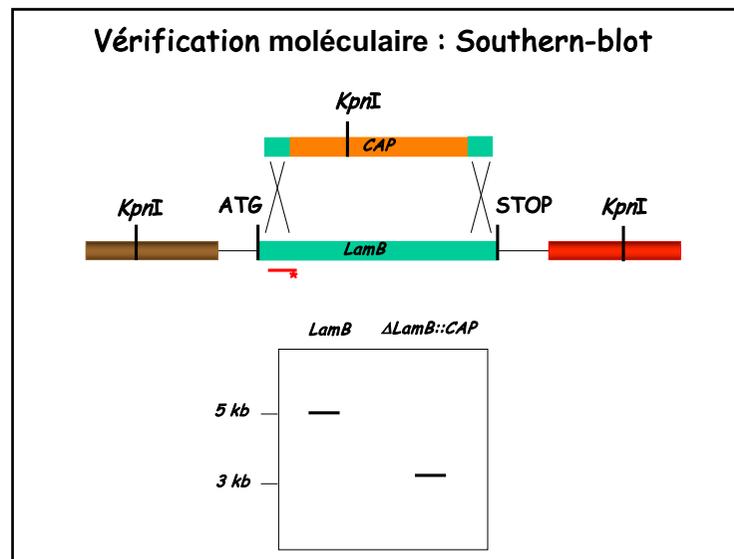
87



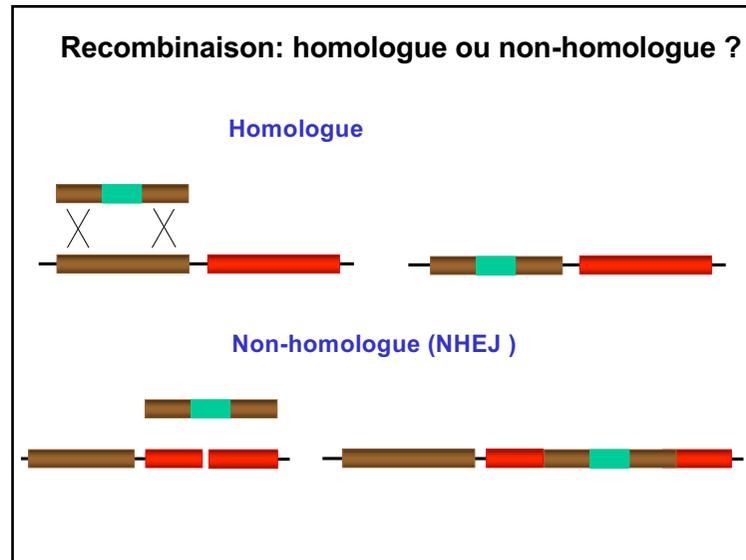
88



89



90



91

Recombinaison homologue TRES efficace

eubactéries
levures

Dans tous les autres organismes modèles :
f(recombinaison non homologue) >>> f(recombinaison homologue)

**Si fréquence de recombinaison homologue
trop faible pour remplacement de gènes ?**

-> RNAi cf *C. elegans*
-> *CrispR Cas9*

92

Rappels de génétique mendélienne

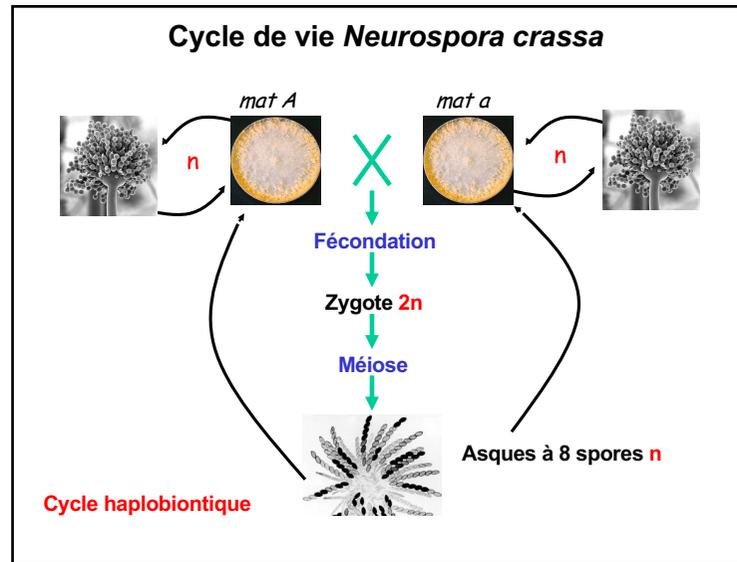
1

Etablissement du paradigme :

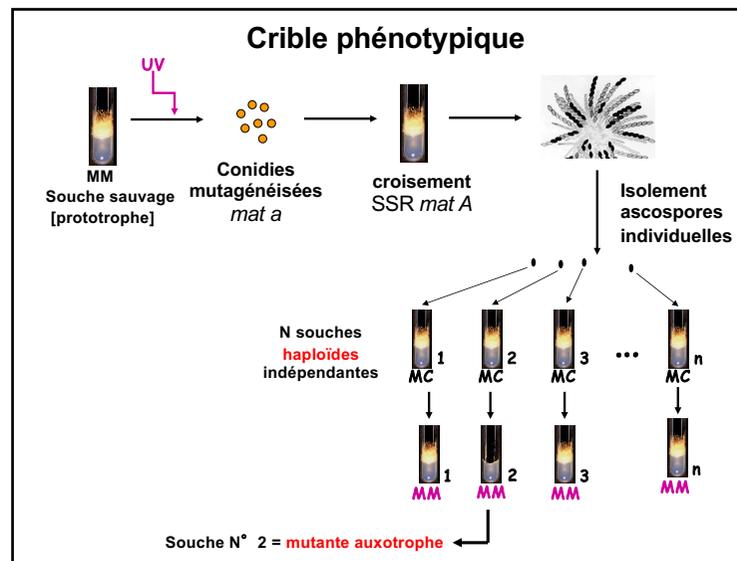
un gène - une enzyme

G. W. Beadle et E. L. Tatum (1941)

2



3



4

Prototrophie: capacité d'un organisme à croître sur un milieu minium (carbone, azote, sels minéraux dont P et vitamines)

Auxotrophie: incapacité d'un organisme à croître sur un milieu minium

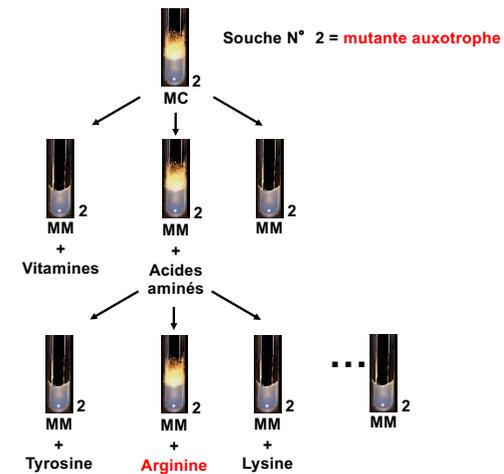
Autotrophie: capacité d'un organisme à utiliser des éléments inorganiques pour synthétiser leurs propres constituants organiques

- > photoautotrophie, utilisation énergie lumineuse
- > chimioautotrophie, utilisation énergie chimique

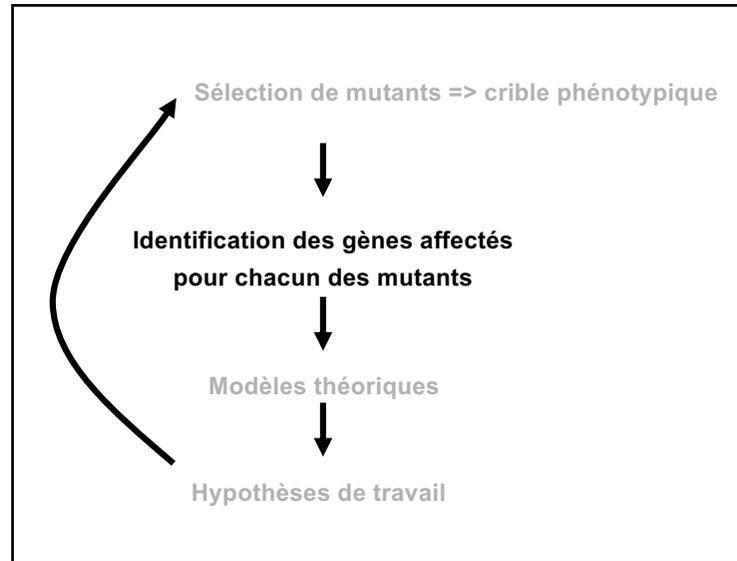
Hétérotrophie: incapacité d'un organisme à effectuer la synthèse de leurs constituants à partir d'élément minéraux. Se nourrit de matière organique

5

Crible phénotypique (suite)



6



7

Analyse génétique : combien de gènes sont mutés chez l'auxotrophe [Arg⁻] N° 2 ?

Souche N° 2 [Arg⁻] **X** SSR [Arg⁺] 50 % [Arg⁻]
 50 % [Arg⁺]

Hypothèse : 1 seul gène muté, 2 allèles -> allèle sauvage a⁺ [arg⁺]
 -> allèle mutant a⁻ [arg⁻]

Souche N° 2 a⁻ **X** a⁺ SSR
 Fécondation ↓
 a⁻ / a⁺ zygote -> ségrégation 2:2 donc hypothèse vérifiée
 Méiose ↓
 a⁺ a⁺ a⁻ a⁻
 2 [Arg⁺] 2 [Arg⁻]

1 seul gène muté pour souche N° 2

8

➡ Résultats du crible:

* 3 mutants indépendants [arg⁻]

arg-1

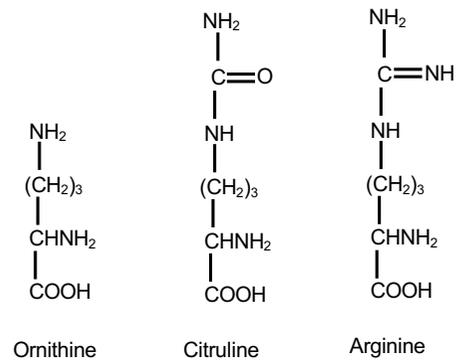
arg-2

arg-3

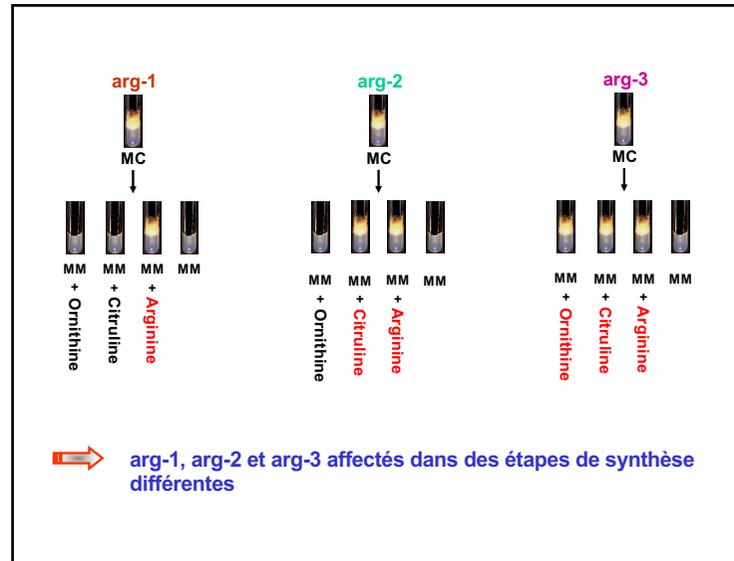
* Pour chacun des mutants 1 seul gène touché

Un seul gène codant l'enzyme de biosynthèse de l'arginine ?

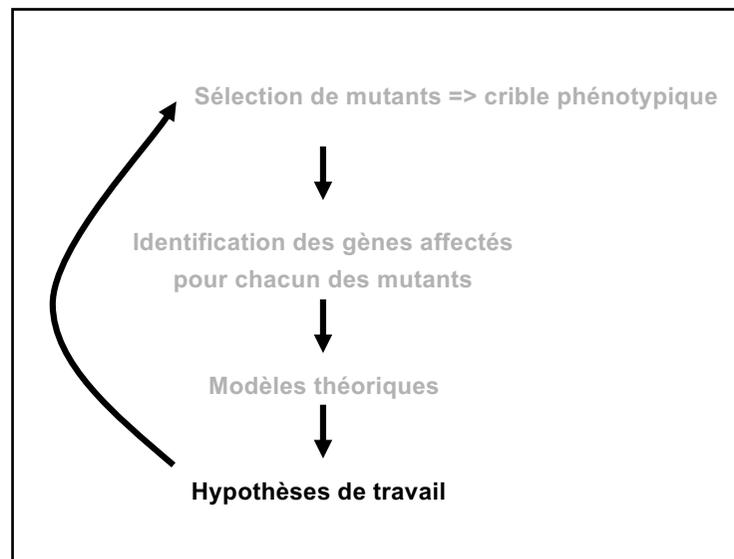
9



10



11



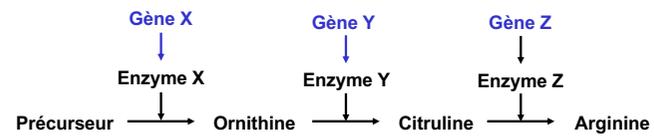
12

Un seul gène codant l'enzyme de biosynthèse de l'arginine ?

NON !

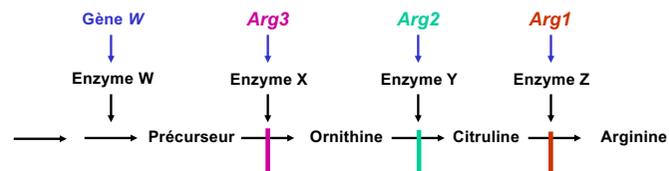
3 étapes enzymatiques -> au moins 3 gènes

1 gène <-> 1 enzyme

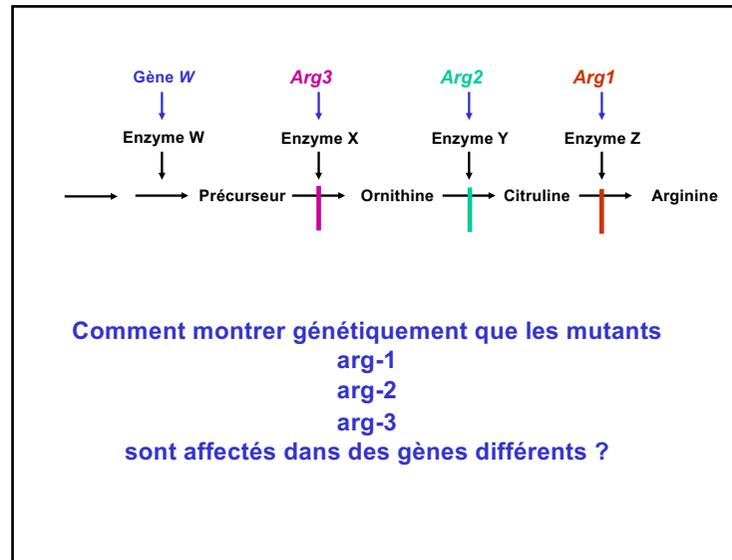


13

	Ornithine	Citruline	Arginine
arg-1	—	—	+
arg-2	—	+	+
arg-3	+	+	+



14

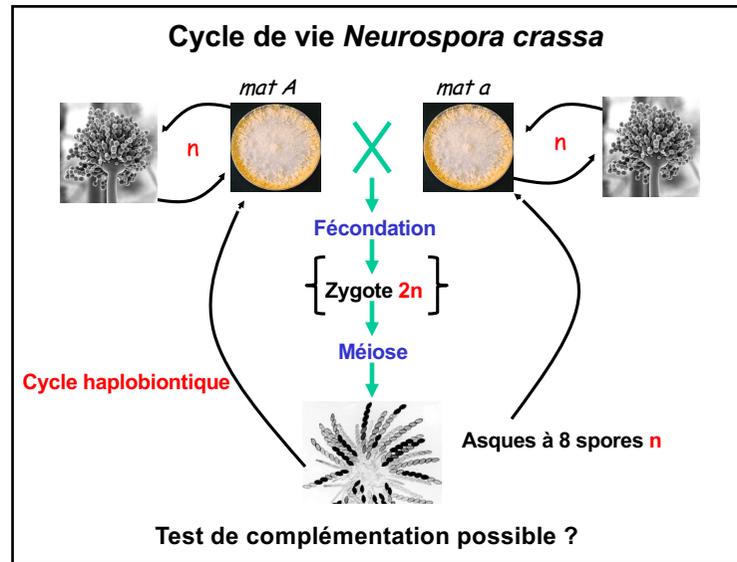


15

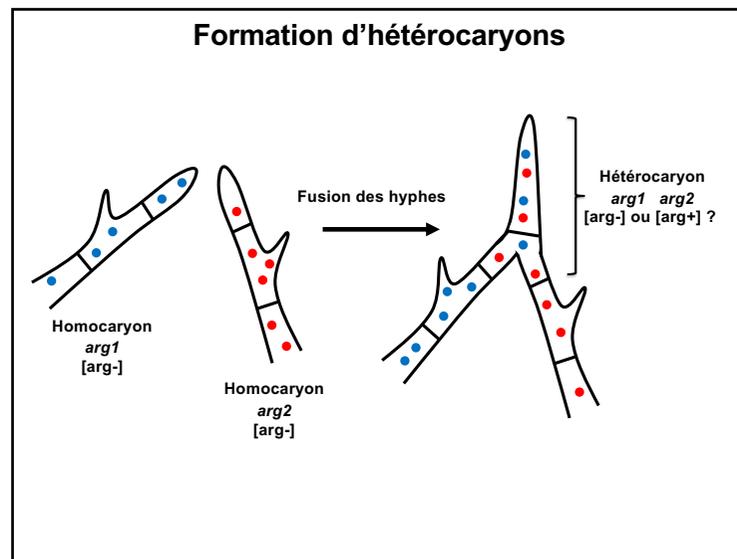
Sites mutationnels

- 2 sites mutationnels dans un même gène
- 2 sites mutationnels dans deux gènes différents
- 1 même site mutationnel (délétion) dans deux ou trois gènes différents

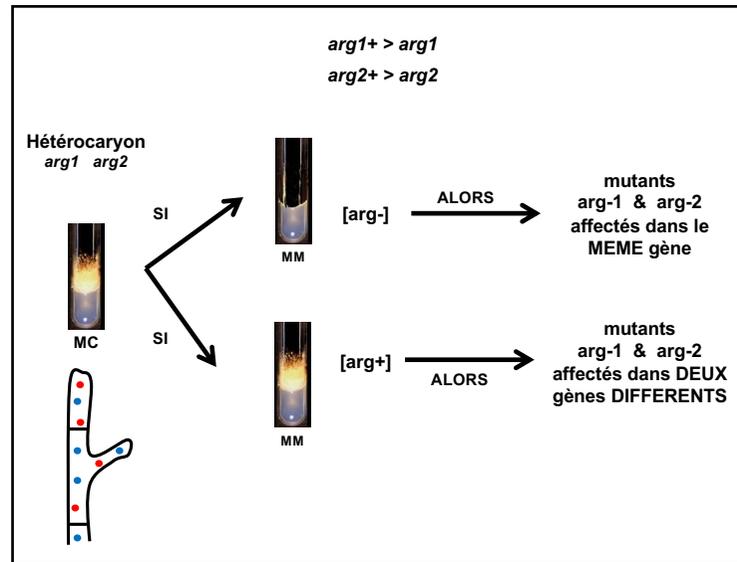
16



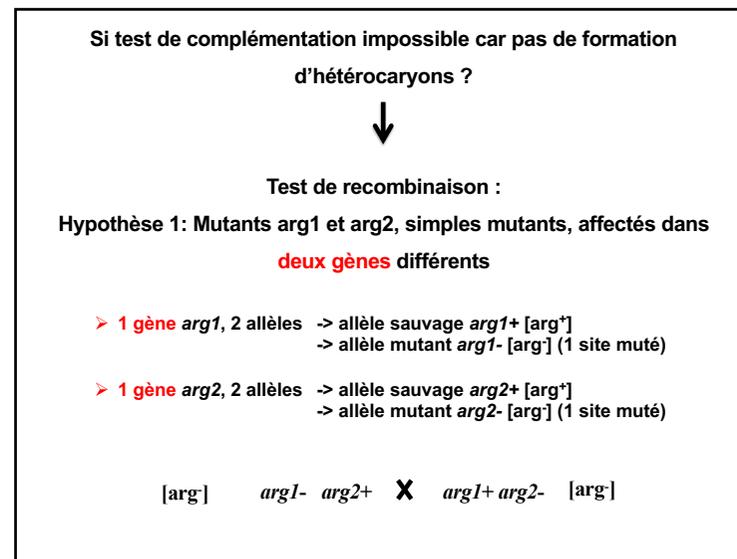
17



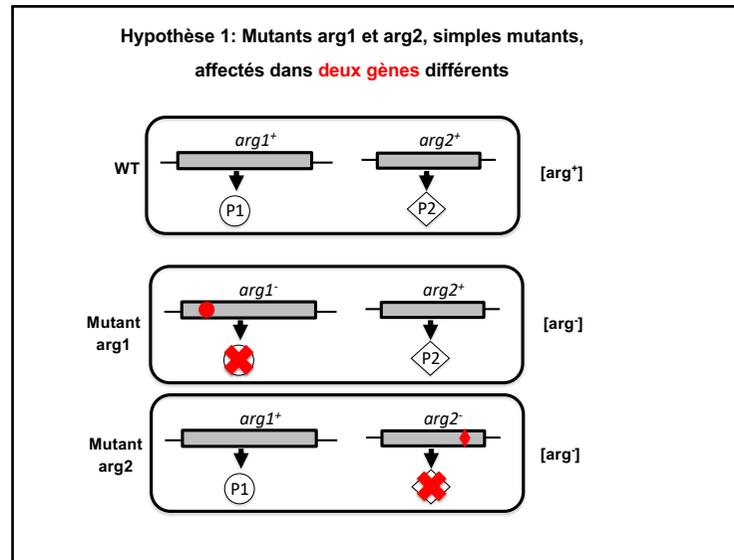
18



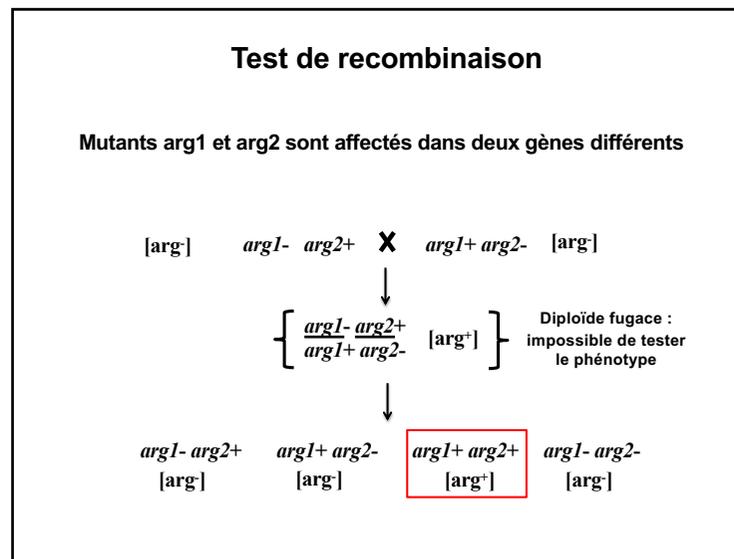
19



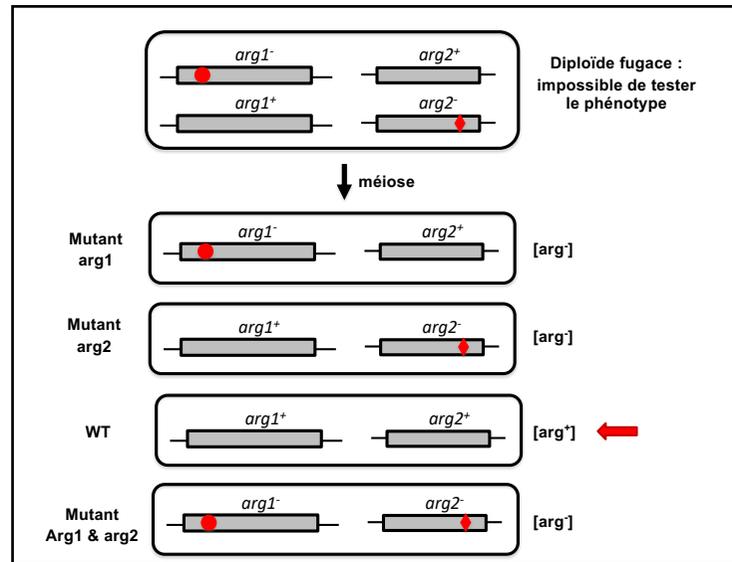
20



21



22



23

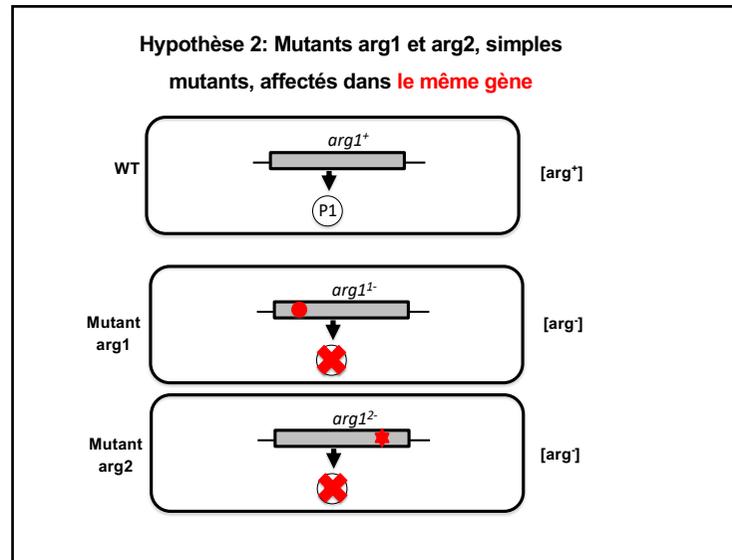
Test de recombinaison

Hypothèse 2: Mutants *arg1* et *arg2*, simples mutants, affectés dans le même gène

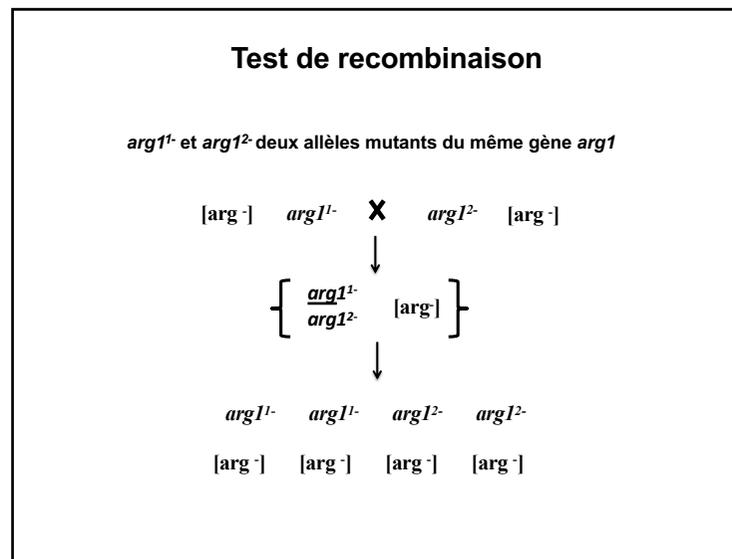
- > 1 gène *arg1*, 3 allèles -> allèle sauvage *arg1+* [arg⁺]
 -> allèle mutant *arg1¹⁻* [arg⁻] (1 site muté)
 -> allèle mutant *arg1²⁻* [arg⁻] (1 site muté)

[arg⁻] *arg1¹⁻* X *arg1²⁻* [arg⁻]

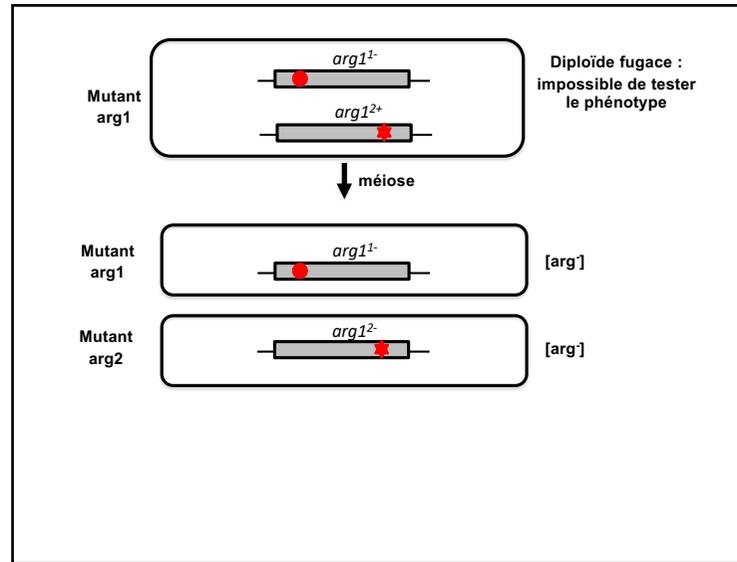
24



25



26



27