

Les interactions géniques

51

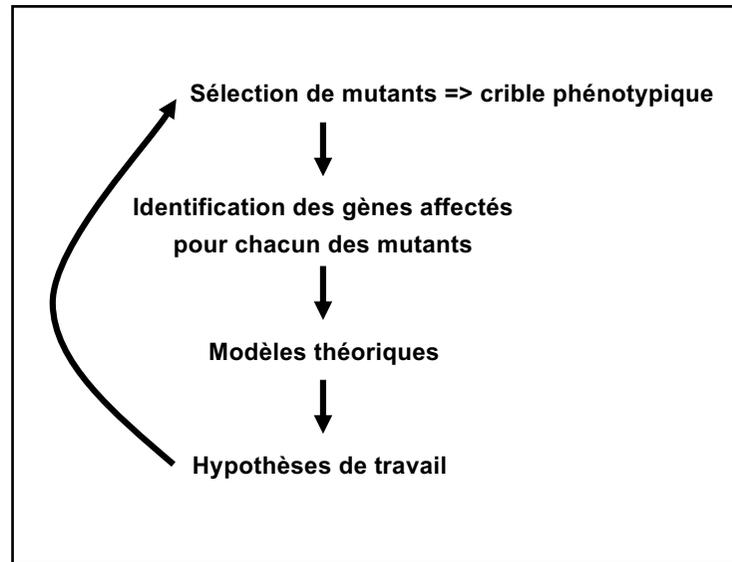
51

Test de complémentation

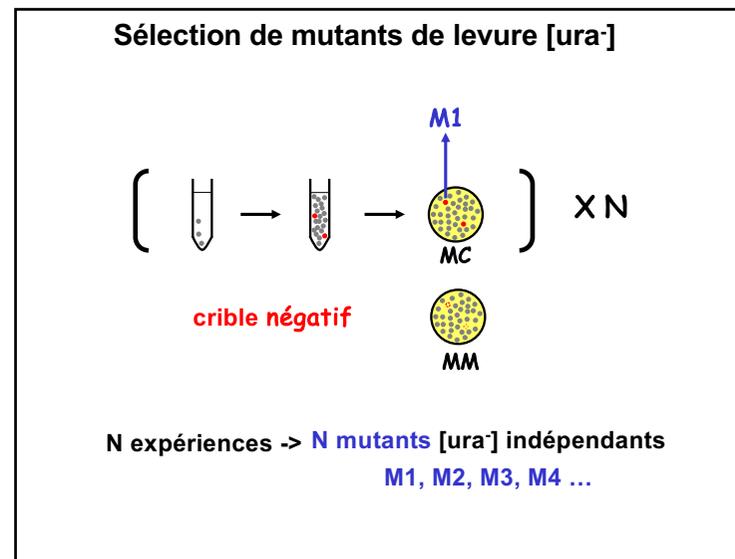
&

exceptions

52



53



54

Test de complémentation

[ura⁻] M1 X M2 [ura⁻]

Hypothèse 1 : M1 et M2 sont mutés dans le **MEME gène** (2 sites mutationnels)

> 3 allèles du gène *Ura1* -> allèle sauvage *ura1+* [ura⁺]
 -> allèle mutant *ura1₁-* [ura⁻] (récessif, 1 site muté)
 -> allèle mutant *ura1₂-* [ura⁻] (récessif, 1 site muté)

[ura⁻] M1 *ura1₁-* X *ura1₂-* M2 [ura⁻]
 Fécondation ↓
 $\frac{ura1_1^-}{ura1_2^-}$ Diploïde -> [ura⁻]

55

Test de complémentation

[ura⁻] M1 X M3 [ura⁻]

Hypothèse 2 : M1 et M3 sont mutés dans **DEUX gènes DIFFERENTS**

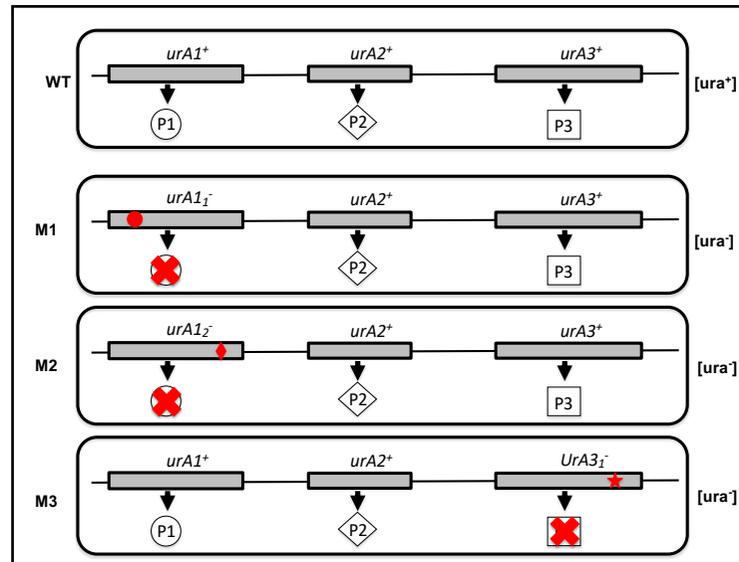
> 1 gène *Ura1*, 2 allèles -> allèle sauvage *ura1+* [ura⁺]
 -> allèle mutant *ura1-* [ura⁻] (récessif, 1 site muté)

> 1 gène *Ura3*, 2 allèles -> allèle sauvage *ura3+* [ura⁺]
 -> allèle mutant *ura3-* [ura⁻] (récessif, 1 site muté)

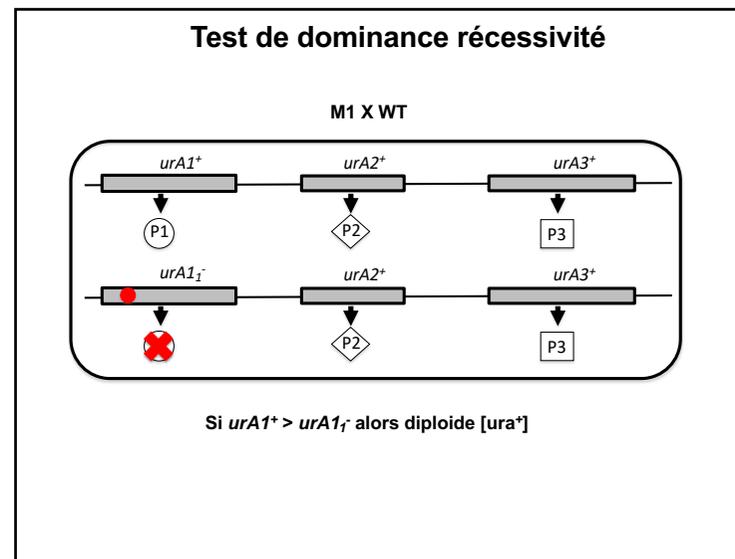
[ura⁻] M1 *ura1- ura3+* X *ura1+ ura3-* M3 [ura⁻]
 Fécondation ↓
 $\frac{ura1- ura3+}{ura1+ ura3-}$

Alors diploïde -> [ura⁺] = **COMPLEMENTATION FONCTIONNELLE**

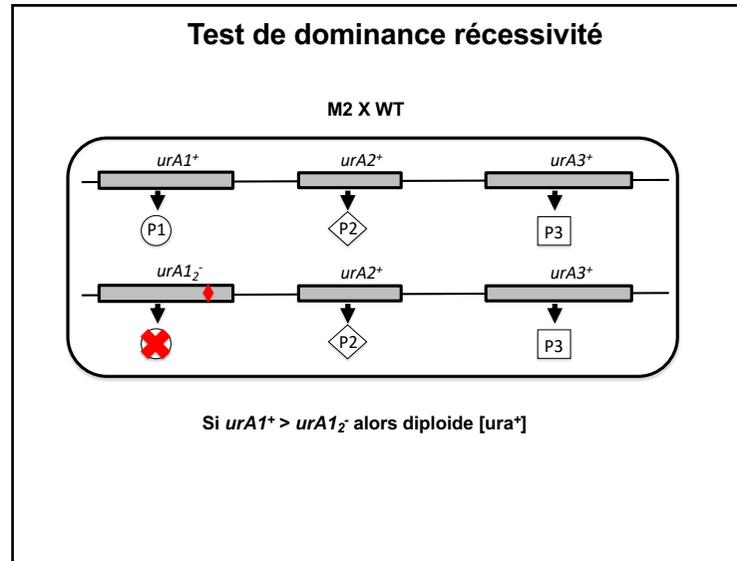
56



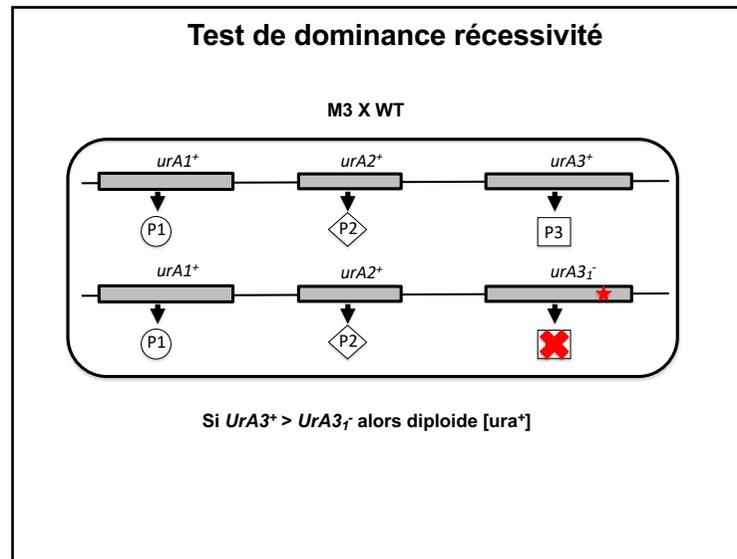
57



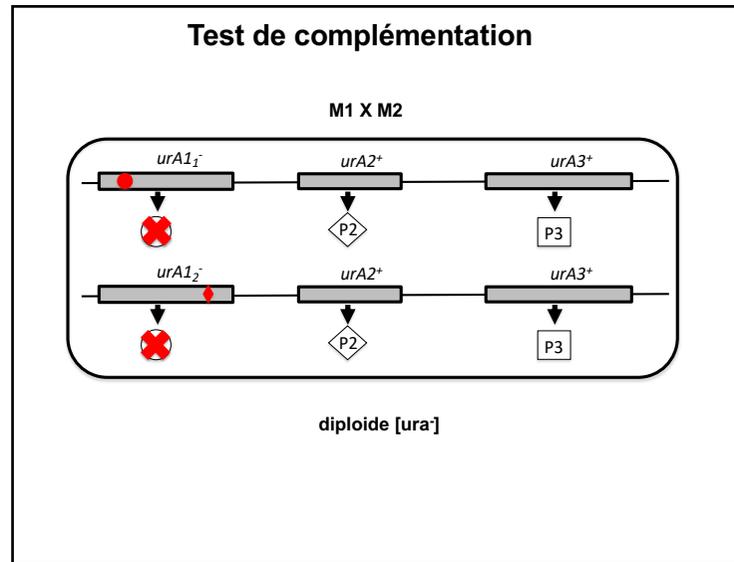
58



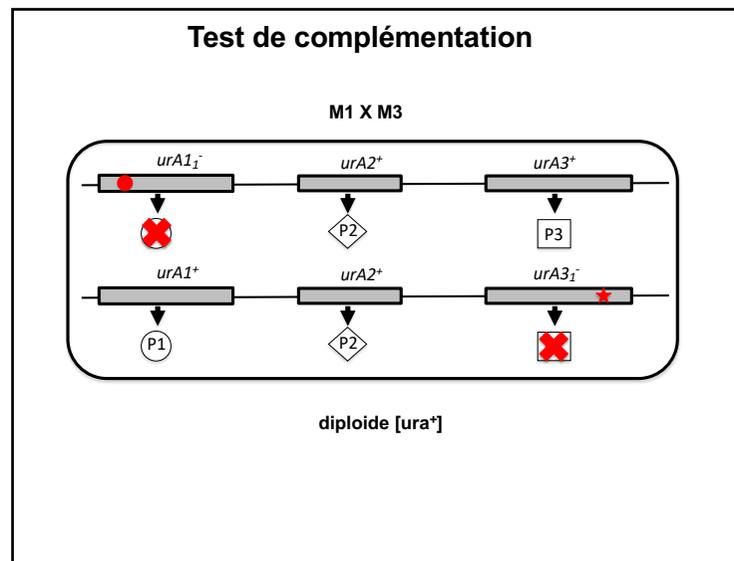
59



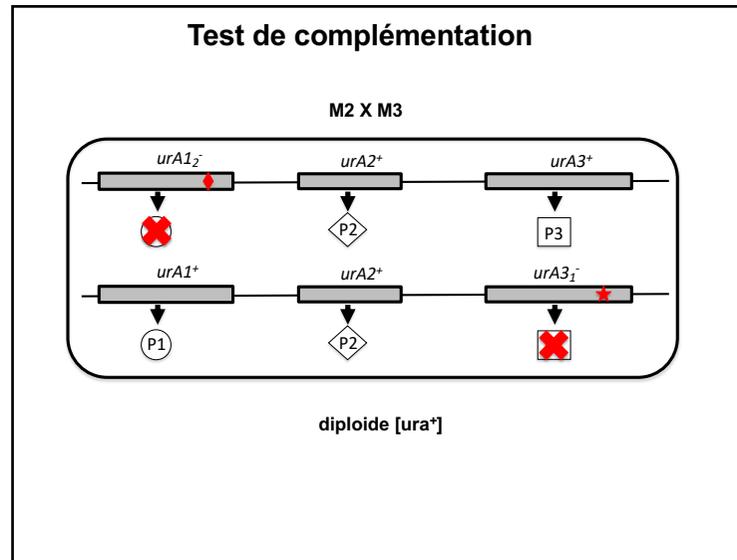
60



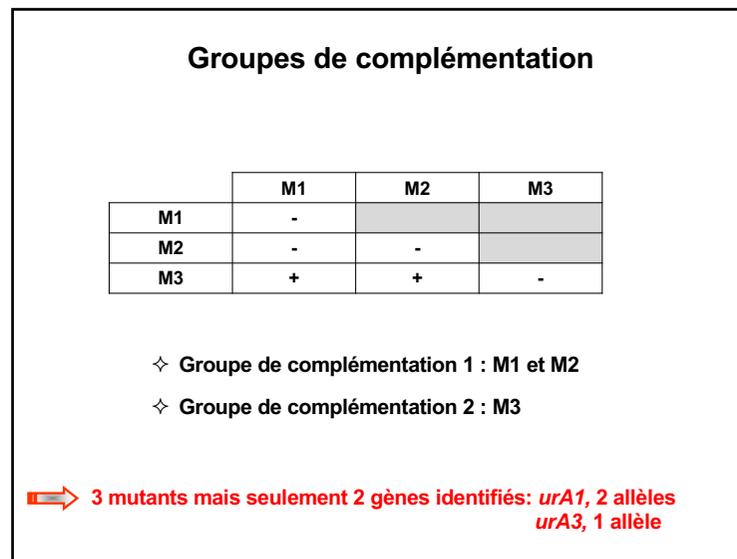
61



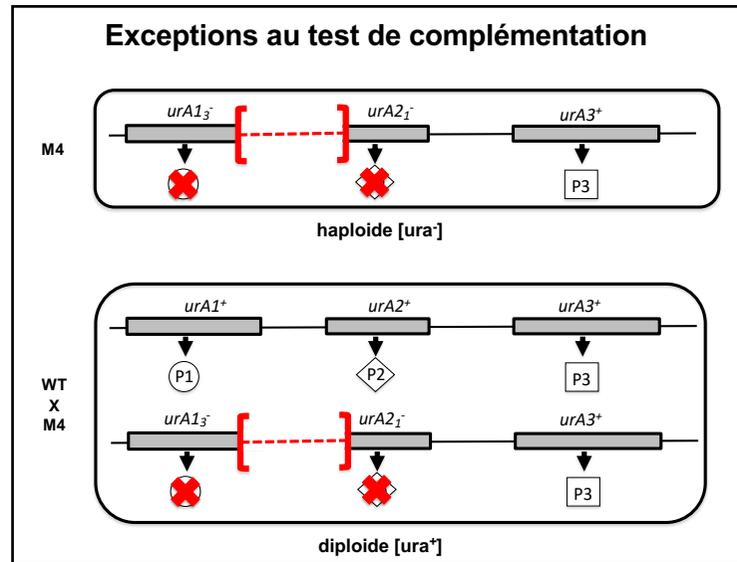
62



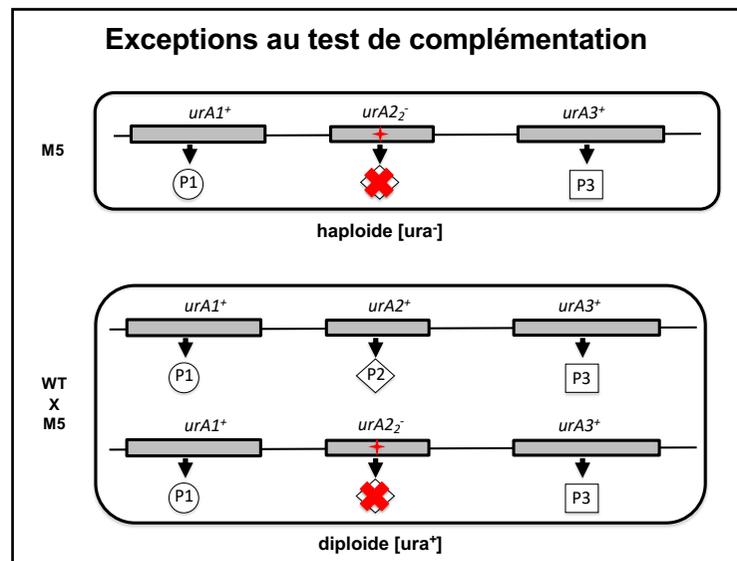
63



64

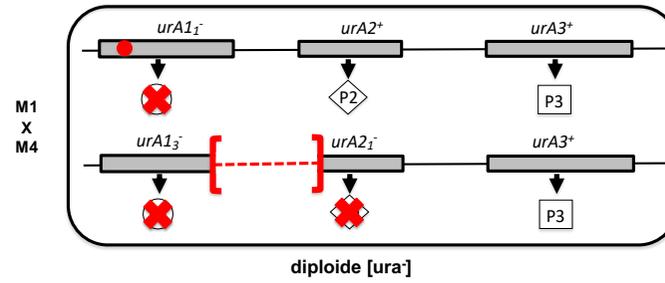


65



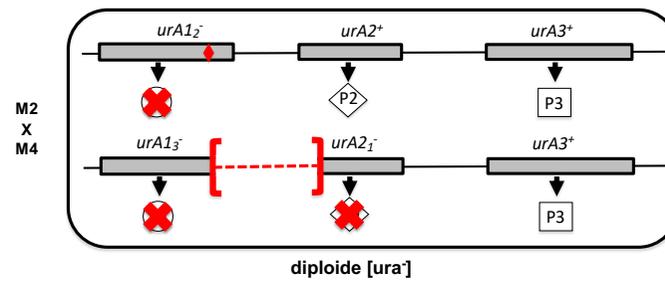
66

Exceptions au test de complémentation



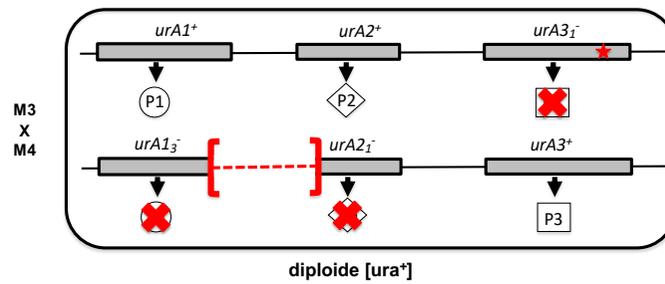
67

Exceptions au test de complémentation



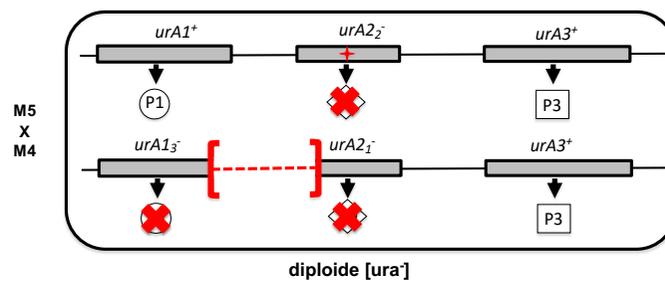
68

Exceptions au test de complémentation



69

Exceptions au test de complémentation



70

Exceptions au test de complémentation

	M1	M2	M3	M4	M5
M1	-				
M2	-	-			
M3	+	+	-		
M4	-	-	+	-	
M5	+	+	+	⊖	-

- ◇ Groupe de complémentation 1 : M1, M2, M4
 - ◇ Groupe de complémentation 2 : M3
 - ◇ Groupe de complémentation 3 : M5 M4
- } M4
1 site muté
&
2 gènes touchés
urA1 et urA2

⇒ 5 mutants mais seulement 3 gènes identifiés: urA1, 3 allèles
urA2, 2 allèle
urA3, 1 allèle

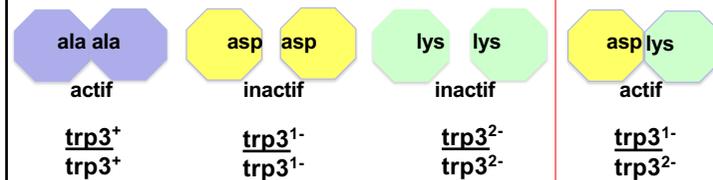
71

Exceptions au test de complémentation

Complémentation intra-génique (ex. *Neurospora crassa*) :

3 allèles du gène *Trp3* → allèle sauvage *trp3⁺* [*trp⁺*]
→ allèle mutant1 *trp3¹⁻* [*trp⁻*]
→ allèle mutant2 *trp3²⁻* [*trp⁻*]

trp3⁺ > *trp3¹⁻*
trp3⁺ > *trp3²⁻*



protéines homo-multimériques : mutations altérant la charge

72

Exceptions au test de complémentation

Complémentation intra-génique (ex. *Saccharomyces cerevisiae*):

3 allèles du gène *His4* → allèle sauvage *his4⁺* [*his⁺*]
 → allèle mutant1 *his4¹⁻* [*his⁻*]
 → allèle mutant2 *his4²⁻* [*his⁻*]

his4⁺ > *his4¹⁻*

his4⁺ > *his4²⁻*

Protéines présentant au moins deux fonctions enzymatiques distinctes, portées par deux domaines distincts

73

Exceptions au test de complémentation

Absence de complémentation (haplo-insuffisance) :

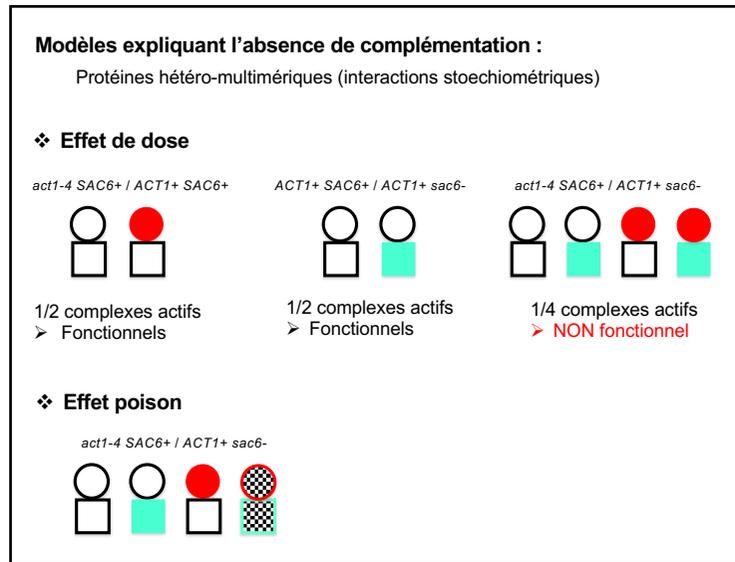
Protéine actine (*S. cerevisiae*) codée par *ACT1*

Mutations *act1-1* & *act1-4* (allèles récessifs) → thermosensibilité

Protéines TPM1 et SAC6 interagissent avec le cytosquelette d'actine

<i>act1-1 TPM1⁺ / ACT1⁺ tpm1⁻</i>	thermorésistant
<i>act1-4 TPM1⁺ / ACT1⁺ tpm1⁻</i>	thermorésistant
<i>act1-1 SAC6⁺ / ACT1⁺ sac6⁻</i>	thermorésistant
<i>act1-4 SAC6⁺ / ACT1⁺ sac6⁻</i>	thermosensible

74



75

Les interactions géniques

La suppression

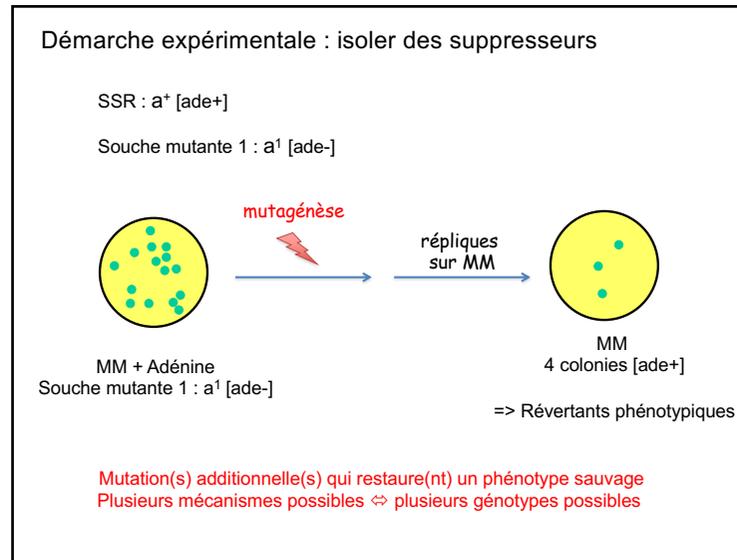
1

Démarche génétique

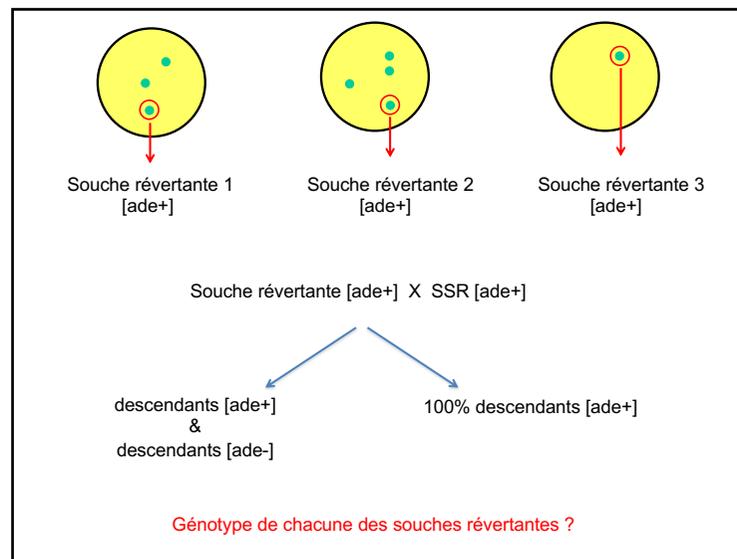
=> possibilité d'aborder des questions biologiques complexes

- ❖ recherche de mutants
- ❖ recherche de supresseurs
 - ✓ Etudes structure/fonction(s) d'une protéine donnée
 - ✓ Mise en évidence d'interactions entre macromolécules : réseaux d'interactions

2



3

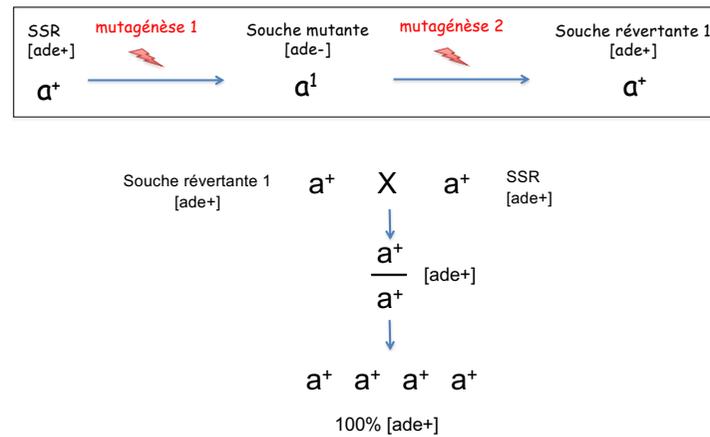


4

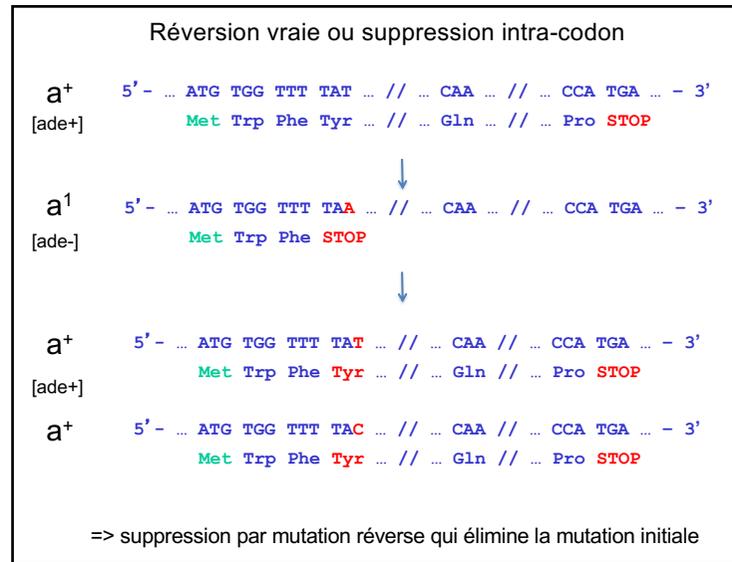
Suppression intragénique

5

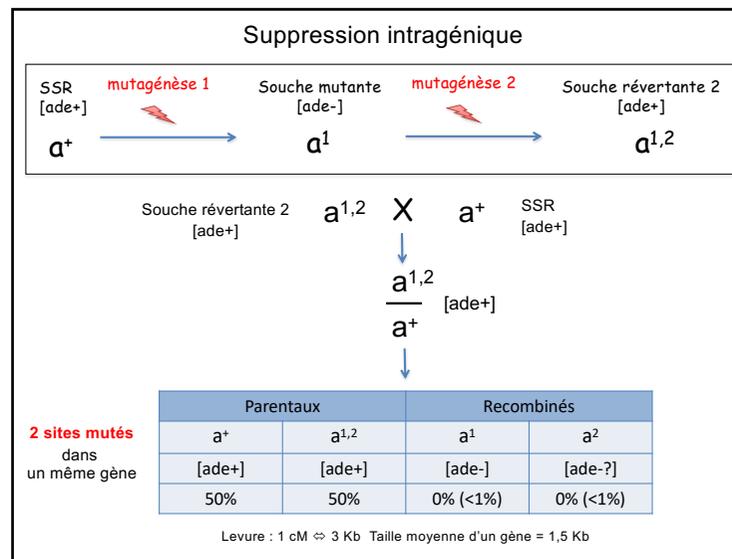
Réversion vraie ou suppression intra-codon



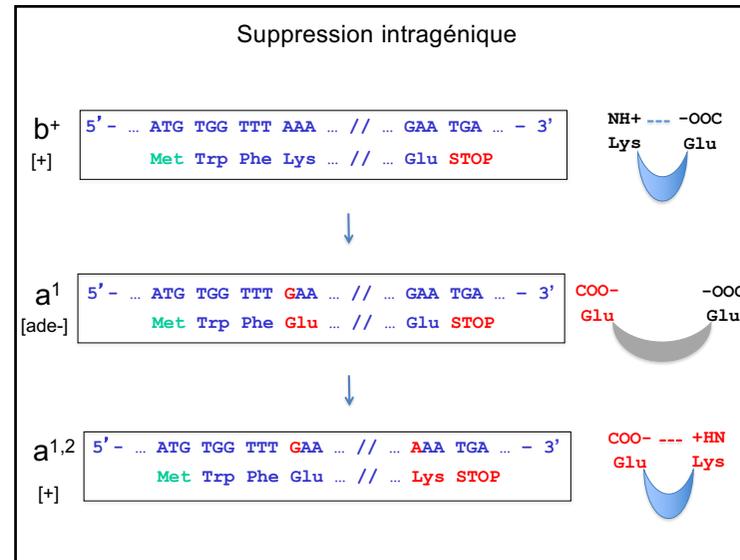
6



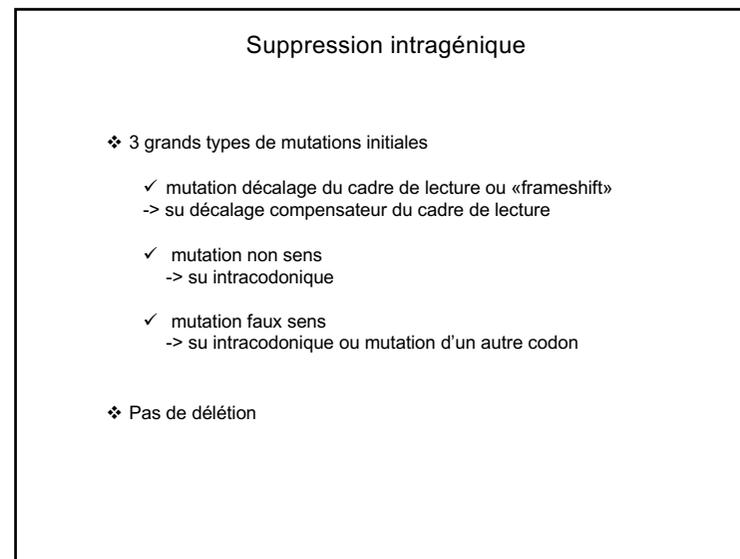
7



8



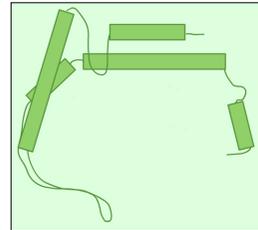
9



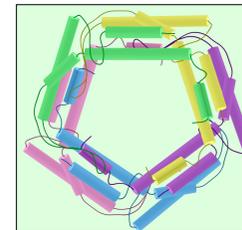
10

Exemples de suppression intragénique: le pore MscL

❖ *E. coli* : import de protéines de grande taille (>30 Å)



MscL



homopentamère de MscL

Allèles mutants [défaut de croissance] : Val23Ala & Gly26Ser

11

mutants [défaut de croissance] : Val23Ala ou Gly26Ser

mutagenèse



révertants [croissance normale]

	I3V	V16A	V23I	A27G	A28V	A28T	K31T	D39G	D39Y	Q26Y	F57S	Q65P	Q65Y	Y75C	V82A	A89V	A91D	I92V	A95E	L98P	K101E	K105E
V23A	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	?	?	?	?	+	+	+	+
G26S	+	+	+	-	+	-	-	?	-	?	?	-	+	+	+	?	+	+	+	+	+	+

TM1

TM2

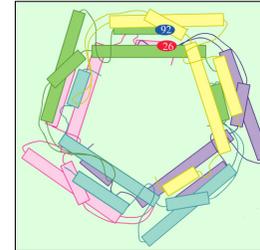
Suppression intragénique n'est pas un phénomène de tout ou rien

-> seule démarche expérimentale permet de conclure

12

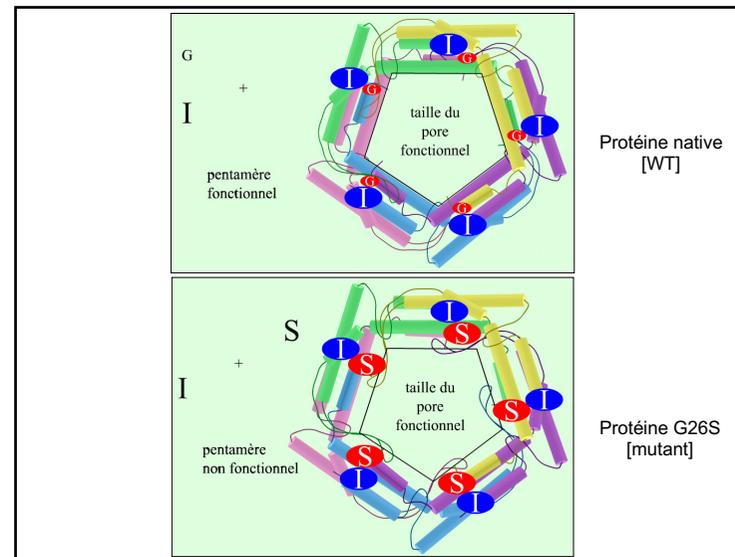
=> mutation G26S est supprimée par I92V

	1 ^{ère} mutation		2 ^{ème} mutation	
	G 26 S		I 92 V	
Masse	57	87	113	99
Volume	60	89	166	140

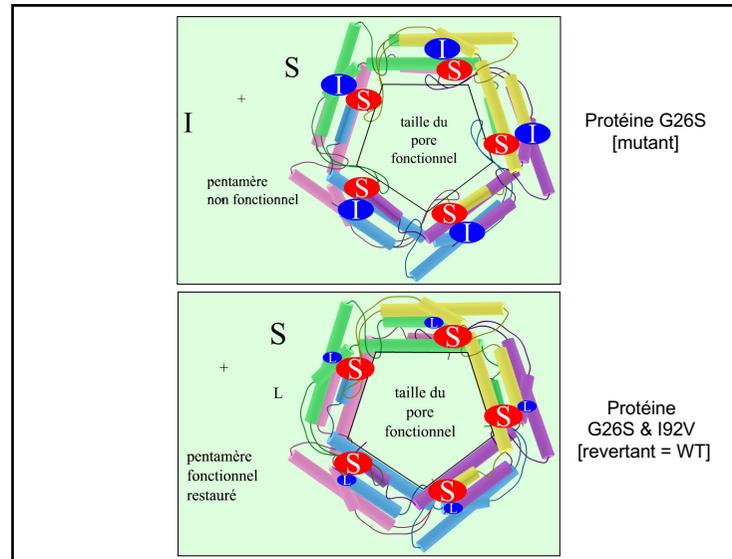


les deux substitutions se compensent en ce qui concerne l'encombrement stérique

13



14



15

Exemples de suppression intragénique: la fascine

❖ *D. melanogaster* : fascine codée par le gène *singed* (*sn*)

Allèle mutant sn^{289} -> fascine S289N mutation pléiotrope

Allèle	Modifications protéine sn	Expression de la protéine	Phénotype		
			Soies	Taille des oeufs	Fertilité femelle
sn^+	aucune	normale	lisses	100%	fertiles
sn^{289}	S289N	très réduite	noueuses	50%	stériles
sn^{Sup289}	S289N + S251F	modérément réduite	légèrement courbées	80%	fertiles

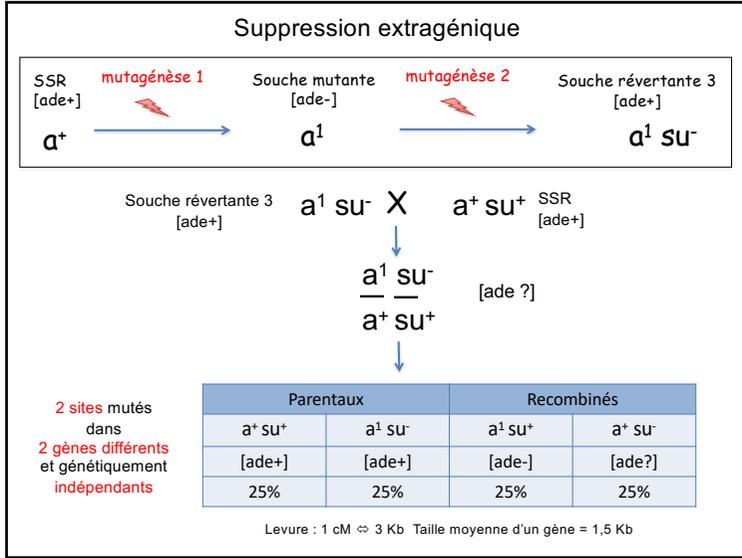
=> suppression partielle en fonction du phénotype considéré

il suffit parfois de quelques pourcents d'activité pour rétablir un phénotype proche de celui de la souche sauvage de référence

16

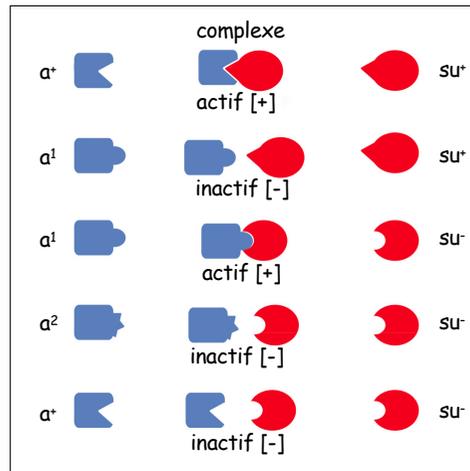
Suppression extragénique fonctionnelle

17



18

Suppresseurs extragéniques conformationnels



19

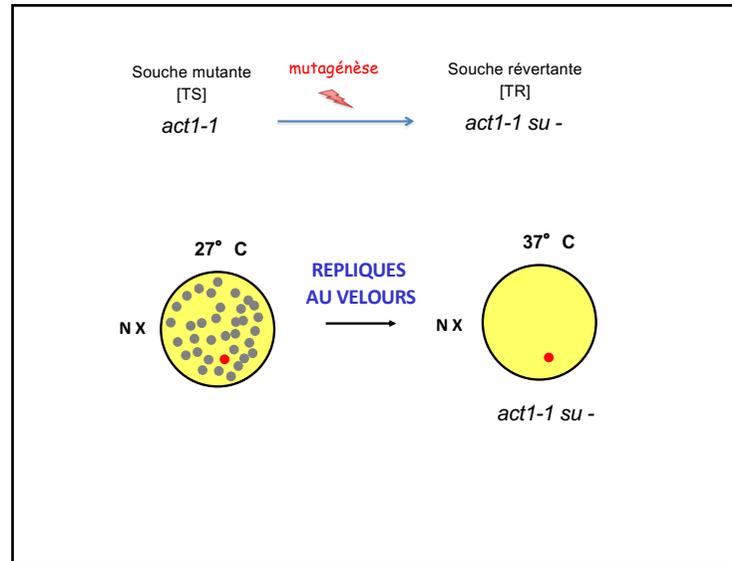
Exemples de suppression extragénique: l'actine

❖ *S. cerevisiae* : *ACT1* code l'actine, une protéine essentielle, qui forme des microfilaments, un des composants du cytosquelette

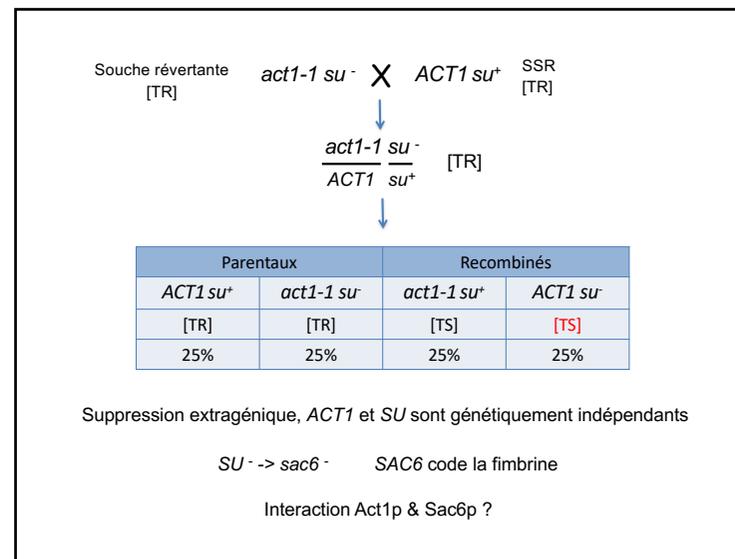
Mutations	Allèles	Phénotype
délétion non-sens décalage cadre de lecture	nuls	léthalité
surexpression	gain de fonction	léthalité
mutation faux sens	pertes de fonction	thermosensibilité

	Temp. permissive 27° C	Temp. non permissive 37° C
<i>ACT1</i>	croissance	croissance
<i>act1-1</i>	croissance	pas de croissance

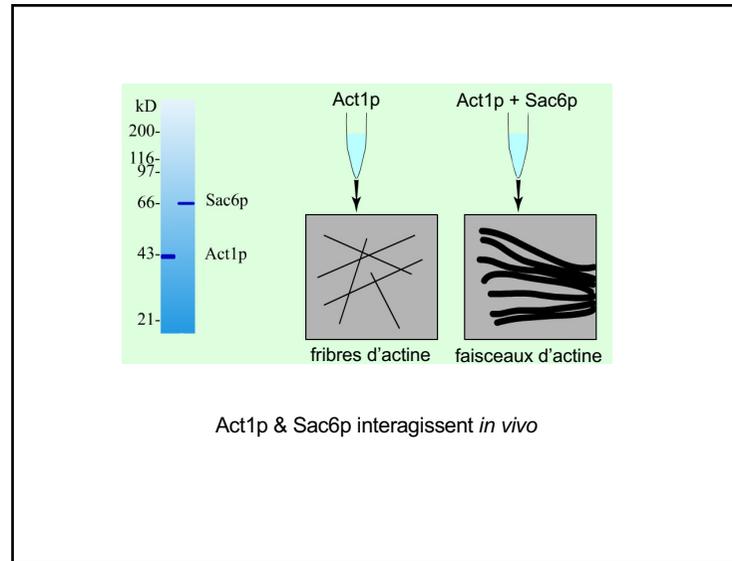
20



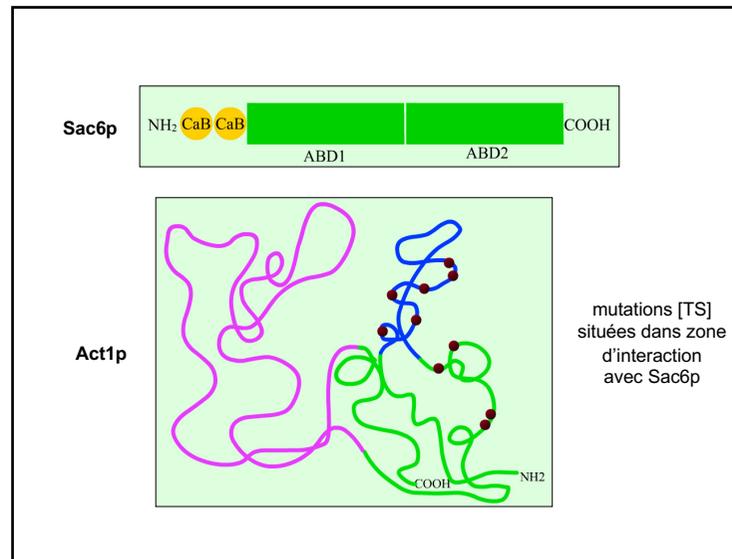
21



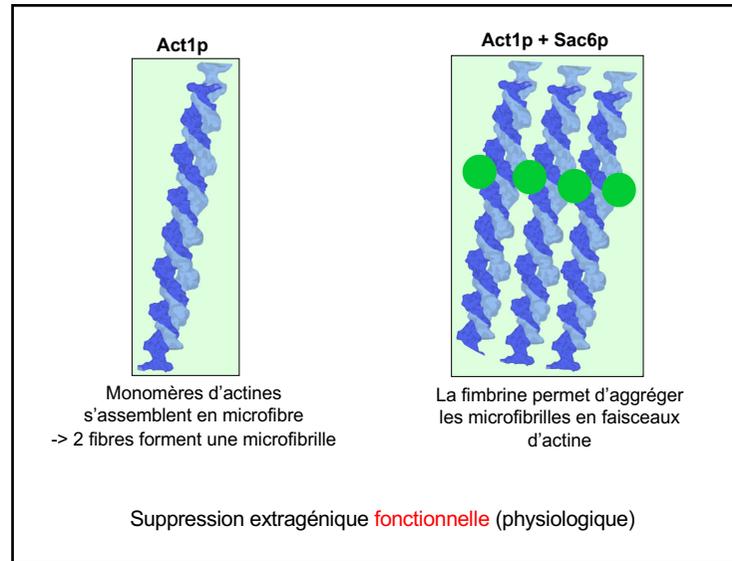
22



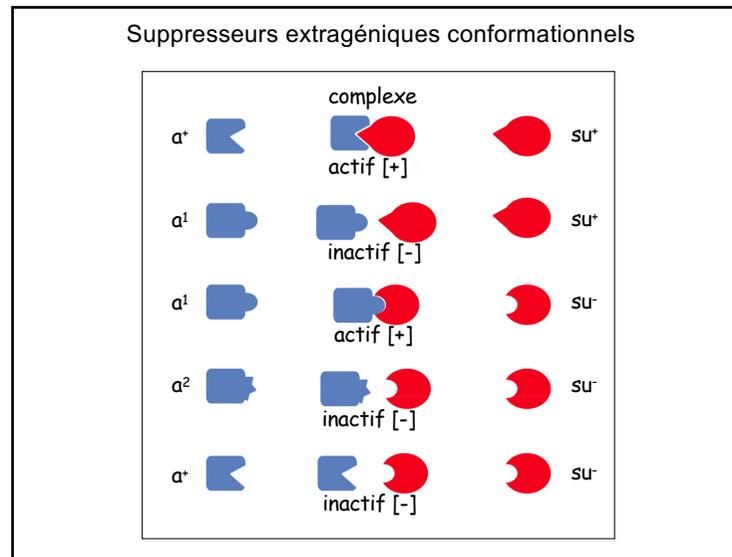
23



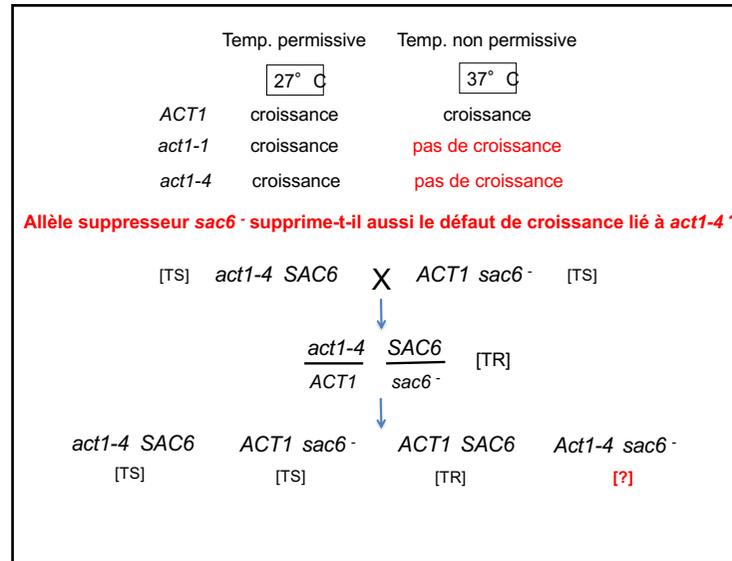
24



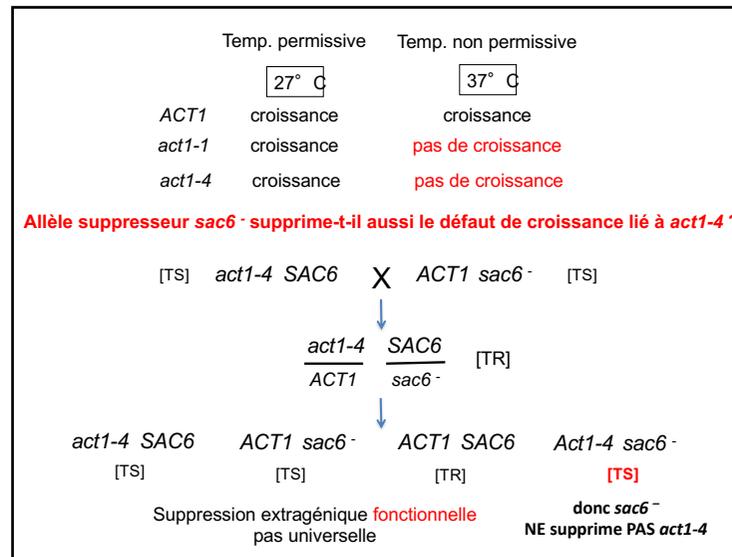
25



26



27



28

[TS] *act1-4* SAC6 X *ACT1* *sac6*⁻ [TS]

↓

$\frac{act1-4}{ACT1} \quad \frac{SAC6}{sac6^-}$ [TR]

↓

<i>ACT1</i>	SAC6	<i>sac6</i> ⁻	SAC6	<i>sac6</i> ⁻	SAC6	<i>sac6</i> ⁻
<i>ACT1</i>	SAC6	<i>sac6</i> ⁻	<i>sac6</i> ⁻	SAC6	<i>sac6</i> ⁻	SAC6
<i>act1-4</i>	<i>sac6</i> ⁻	SAC6	<i>sac6</i> ⁻	SAC6	SAC6	<i>sac6</i> ⁻
<i>act1-4</i>	<i>sac6</i> ⁻	SAC6	SAC6	<i>sac6</i> ⁻	<i>sac6</i> ⁻	SAC6

si *sac6*⁻ DR 4 [TS]
 supprime -> 0 [TS] 0 [TR]
act1-4 4 [TR] DP

Pas de 4 [TR] : 0 [TS] mais 2 [TR] : 2 [TS] donc *sac6*⁻ NE supprime PAS *act1-4*

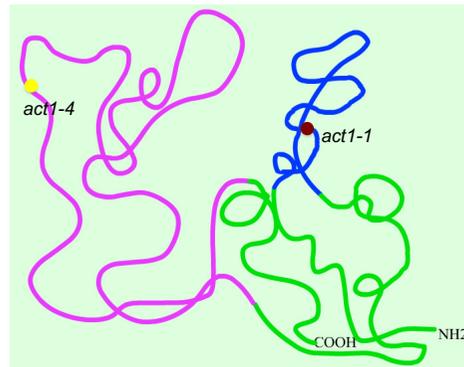
Suppression extragénique fonctionnelle pas universelle

29

Suppresseurs extragéniques conformationnels

α*		complexe actif [+]		su*
α ¹		inactif [-]		su*
α ¹		actif [+]		su-
α ²		inactif [-]		su-
α*		inactif [-]		su-

30



Suppression extragénique fonctionnelle : mécanisme d'interactions compensatoires

31

Suppresseurs extragéniques fonctionnels : cytochrome C

Génotype	Quantité relative de cytochrome C en %		Phénotype
	Isoforme 1	Isoforme 2	
<i>CYC1⁺ CYC7⁺ HAP1⁺</i>	95	5	[lactate+]
<i>cyc1-1 CYC7⁺ HAP1⁺</i>	0	5	[lactate-]
<i>cyc1-1 cyc7-2 HAP1⁺</i>	0	35	[lactate+]
<i>cyc1-1 CYC7⁺ hap1-18</i>	0	40	[lactate+]

Lactate : substrat respirable mais pas fermentescible
cyc1-1 : allèle récessif perte de fonction

✓ supresseurs => 2 gènes indépendants ***cyc7-2*** & ***hap1-18***

❖ ***cyc7-2*** : allèle dominant gain de fonction
 -> mutation localisée dans le promoteur de *CYC7* qui augmente son taux de transcription

❖ ***hap1-18*** : allèle dominant gain de fonction
 -> protéine Hap1p activateur transcriptionnel de *CYC7*, mutation augmente son activité

32

Génotype	Quantité relative de cytochrome C en %		Phénotype
	Isoforme 1	Isoforme 2	
<i>CYC1</i> ⁺ <i>CYC7</i> ⁺ <i>HAP1</i> ⁺	95	5	[lactate+]
<i>cyc1-1</i> <i>CYC7</i> ⁺ <i>HAP1</i> ⁺	0	5	[lactate-]
<i>cyc1-1</i> <i>cyc7-2</i> <i>HAP1</i> ⁺	0	35	[lactate+]
<i>cyc1-1</i> <i>CYC7</i> ⁺ <i>hap1-18</i>	0	40	[lactate+]
<i>cyc1-8</i> <i>CYC7</i> ⁺ <i>HAP1</i> ⁺	0	5	[lactate-]
<i>cyc1-8</i> <i>cyc7-2</i> <i>HAP1</i> ⁺	0	35	[lactate+]
<i>cyc1-8</i> <i>CYC7</i> ⁺ <i>hap1-18</i>	0	40	[lactate+]

Lactate : substrat respirable mais pas fermentescible
cyc1-8 : allèle récessif perte de fonction

=> 2 gènes indépendants ***cyc7-2*** & ***hap1-18*** qui suppriment les deux allèles *cyc1-1* & *cyc1-8*

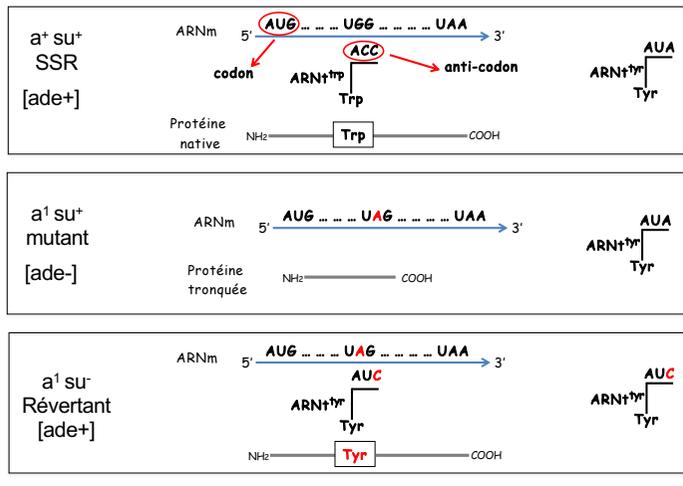
Suppression extragénique fonctionnelle : mécanisme régulateur

33

Suppression extragénique
informationnelle

34

Suppression extragénique informationnelle (allèle spécifique)



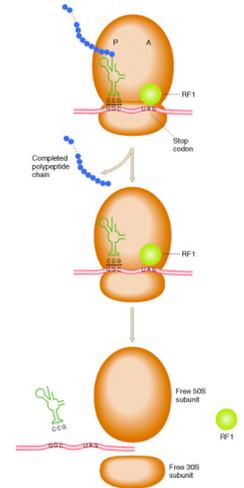
35

Rappel : terminaison de la traduction

Pas d'ARNt cognate pour les trois codons non-sens

-> fixation du facteur de fin de la traduction RF1 au site A

-> le ribosome se dissocie = fin de l'élongation du peptide



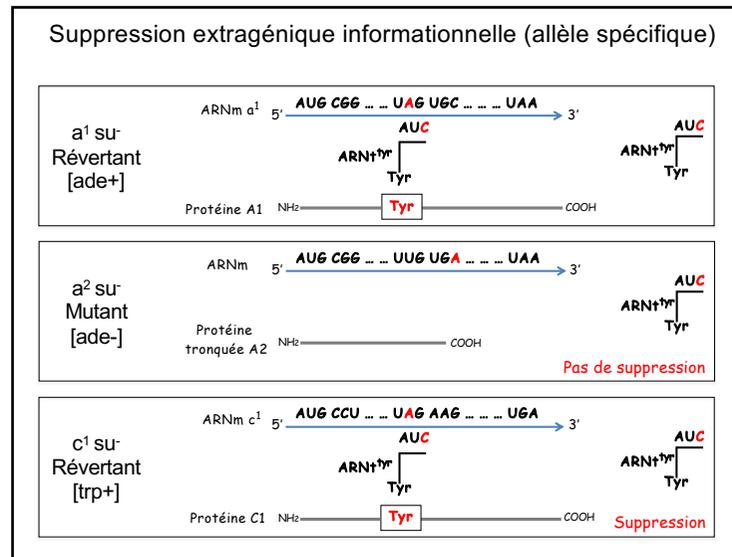
36

2eme lettre du codon

		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	UAG stop	UGA stop	A	
	UUG	UCG	UAG stop	UAG stop	UGG tryptophane	G	
C	CUU leucine	CCU	CAU histidine	CGU		U	
	CUC	CCC	CAC	CGC		C	
	CUA leucine	CCA	CAA glutamine	CGA	arginine	A	
	CUG	CCG	CAG	CGG		G	
A	AUU isoleucine	ACU	AAU asparagine	AGU	sérine	U	
	AUC	ACC	AAC	AGC		C	
	AUA isoleucine	ACA	AAA lysine	AGA	arginine	A	
	AUG méthionine/start	ACG	AAG	AGG		G	
G	GUU valine	GCU	GAU acide aspartique	GGU		U	
	GUC	GCC	GAC	GGC	glycine	C	
	GUA valine	GCA	GAA acide glutamique	GGA		A	
	GUG	GCG	GAG	GGG		G	

3 codons non-sens => suppression dite allèle spécifique

37

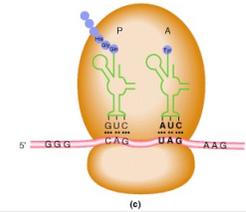
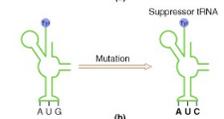
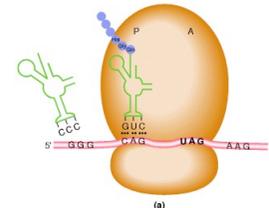


38

Suppresseurs informationnels

❖ ARNt supresseur de mutation non-sens (su⁻)

- ✓ Gain de fonction
- ✓ Allèles dominants
- ✓ Protéines fonctionnelles mais pas natives

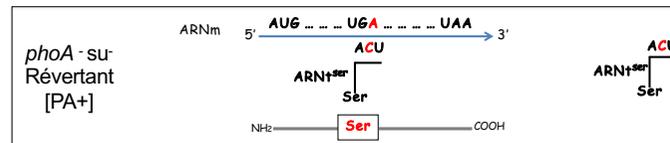
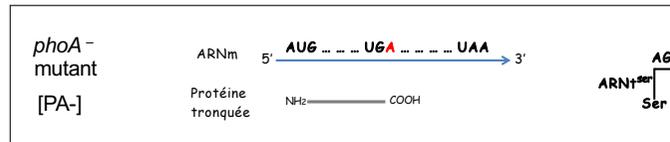
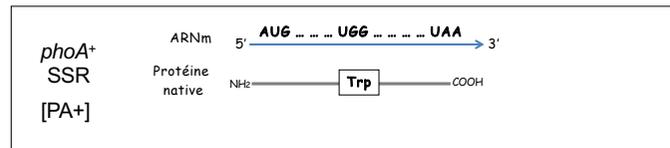


❖ Protéine ribosomique supresseur de mutation non-sens (su⁻)

- ✓ Diminue la fidélité de la traduction
- ✓ Allèles dominants
- ✓ Non allèle spécifique, non gène spécifique
- ✓ Effets délétères

39

Mutant de phosphatase alcaline chez *E. coli*



40

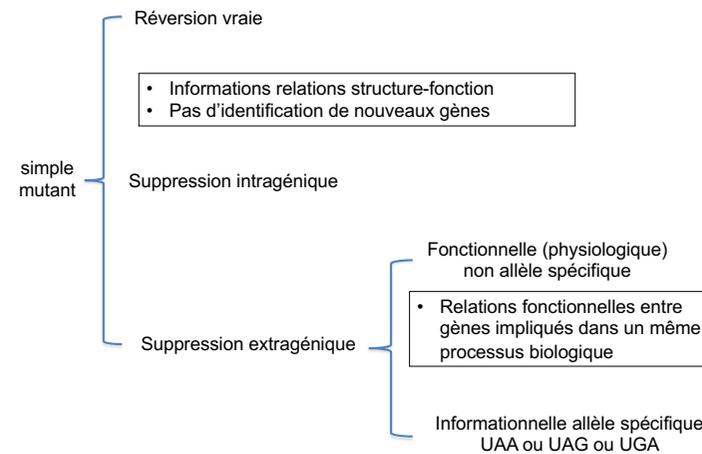
Mutant de phosphatase alcaline chez *E. coli*

Bactériophage R17	<i>E. coli</i>	Plage de lyses
R17 +	<i>phoA</i> +	+++
R17 +	<i>phoA</i> -	+++
R17 -	<i>phoA</i> +	-
R17 -	<i>phoA</i> -	-
R17 -	<i>phoA-su-</i>	++

Suppression extragénique informationnelle (allèle spécifique)
 -> même mutation d'origine pour les allèles *phoA*- et *R17*- soit
 mutation non-sens UGA

41

Récapitulatif suppression



42

Interaction génique : l'accentuation

Accentuation => inverse de la suppression

Une deuxième mutation aggrave le phénotype mutant causé par une première mutation

=> mutations d'accentuation

43

myoD & *myf5* codent des protéines impliquées dans la différenciation musculaire

Génotype	Phénotype	Expression	
		<i>myoD</i>	<i>myf5</i>
<u><i>myoD</i></u> <u><i>myf5</i></u> <i>myoD</i> <i>myf5</i>	[WT]	+	+
<u>Δ<i>myoD</i></u> <u><i>myf5</i></u> Δ <i>myoD</i> <i>myf5</i>	[WT]	-	+++
<u><i>myoD</i></u> <u>Δ<i>myf5</i></u> <i>myoD</i> Δ <i>myf5</i>	[WT]	+++	-
<u>Δ<i>myoD</i></u> <u>Δ<i>myf5</i></u> Δ <i>myoD</i> Δ <i>myf5</i>	[létal]	-	-

myoD & *myf5* => redondance fonctionnelle partielle

Mutation Δ *myoD* et Δ *myf5* = effet synergique (co-létalité)

44

L'accentuation : haplo-insuffisance

CDC28 : protéine sérine/thréonine kinase impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire

CLB1 : cycline

Géotype	température permissive 27° C	température non permissive 37° C
CDC28+	croissance	croissance
CDC28 ^{ts1N}	croissance	pas de croissance
CLB1+	croissance	croissance
CLB1-	croissance	croissance
CDC28 ^{ts1N} CLB1-	pas de croissance	pas de croissance (*)

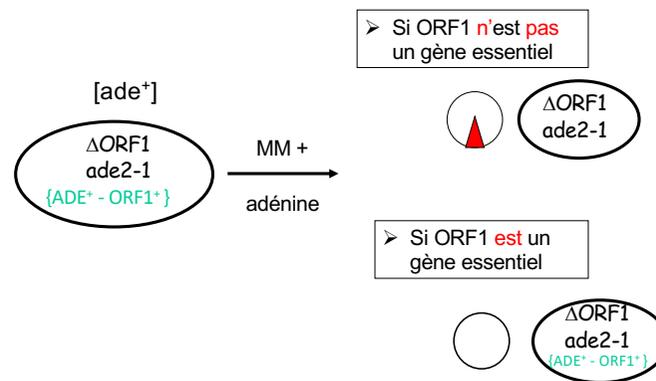
CDC28 et CLB1 interagissent en complexe pour déclencher la mitose

(*) -> exception au test de complémentation (voir chapitre précédent)

45

L'accentuation: les synthétiques létaux

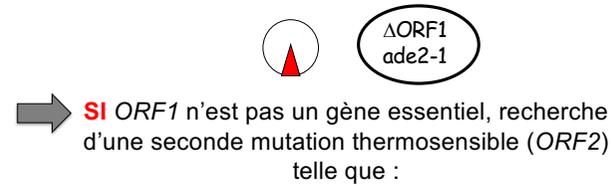
Etape 1 : Construction de banque de mutants de délétion : comment identifier un gène essentiel ?



46

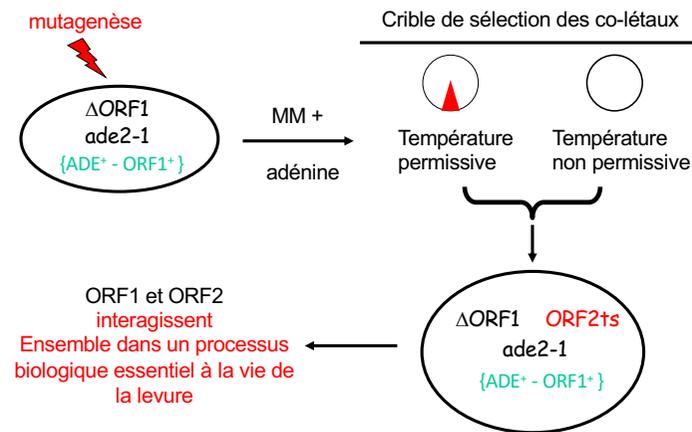
L'accentuation: les synthétiques létaux

Etape 2 : Sélection de mutants synthétiques létaux

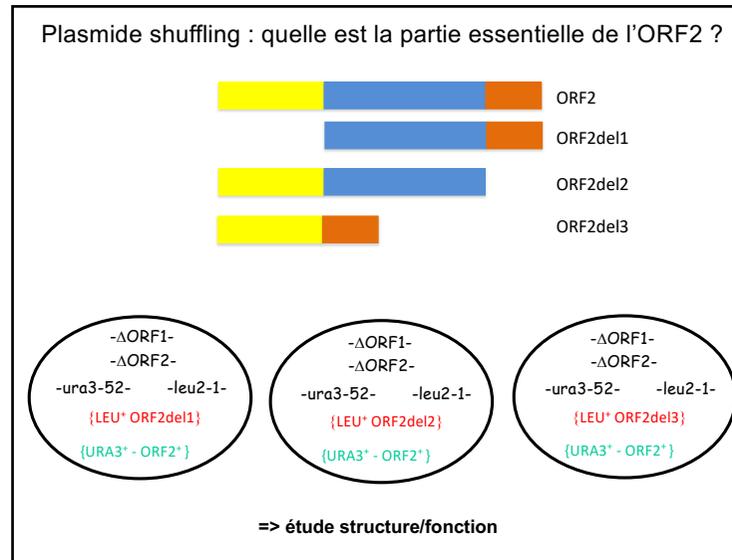


47

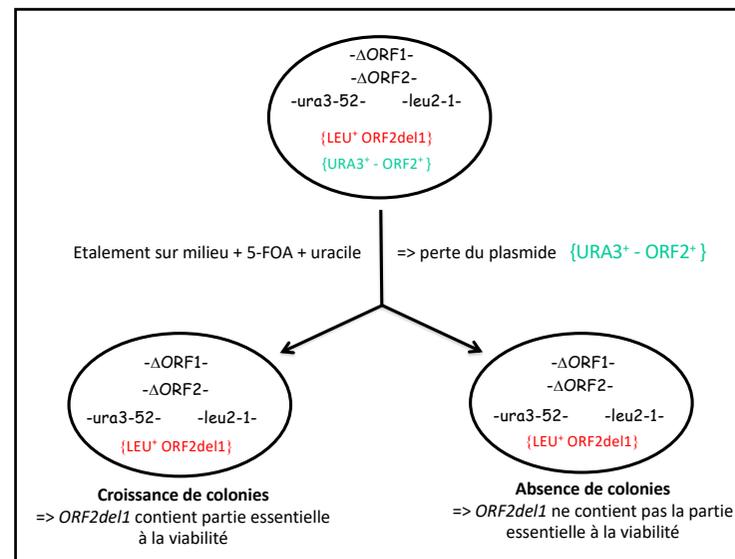
Etape 2 : Sélection de mutants synthétiques létaux



48



49



50

Crible de co-létaux à l'échelle d'un génome
 -> créer un réseau d'interaction génique
 nécessaire à la survie

Interactor	Type	Assay	Annotation	Action	Modification	Phenotype	Reference
ARG82	Genetic	Synthetic Growth Defect	manually curated	Bait		vegetative growth decreased Mutant Type: unspecified	Chan TF, et al. (2000) MICROBES
ASK10	Genetic	Negative Genetic	high-throughput	Bait			Costanzo M, et al. (2010) MICROBES
ASK10	Genetic	Negative Genetic	high-throughput	Bait			Shartppoor S, et al. (2012) MICROBES
ATG11	Genetic	Phenotypic Suppression	manually curated	Hit			Shin CS and Huh WK (2011) MICROBES
ATG13	Physical	Biochemical Activity	manually curated	Bait	Phosphorylation		Kamada Y, et al. (2010) MICROBES
ATP17	Genetic	Positive Genetic	high-throughput	Bait			Szappanos B, et al. (2011) MICROBES
ATP5	Genetic	Positive Genetic	high-throughput	Bait			Szappanos B, et al. (2011) MICROBES
BEM1	Genetic	Synthetic Growth Defect	manually curated	Bait		vegetative growth decreased Mutant Type: unspecified	Chan TF, et al. (2000) MICROBES
BEM2	Genetic	Synthetic Lethality	high-throughput	Bait		inviable Mutant Type: unspecified	Aronova S, et al. (2007) MICROBES
BEM2	Physical	Co-fractionation	high-throughput	Bait	No Modification		Aronova S, et al. (2007) MICROBES

51