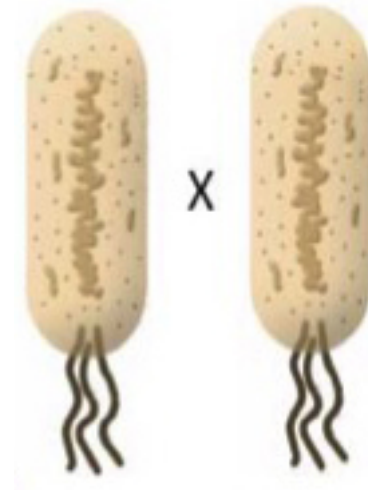


Rappels de génétique bactérienne et test de fluctuation

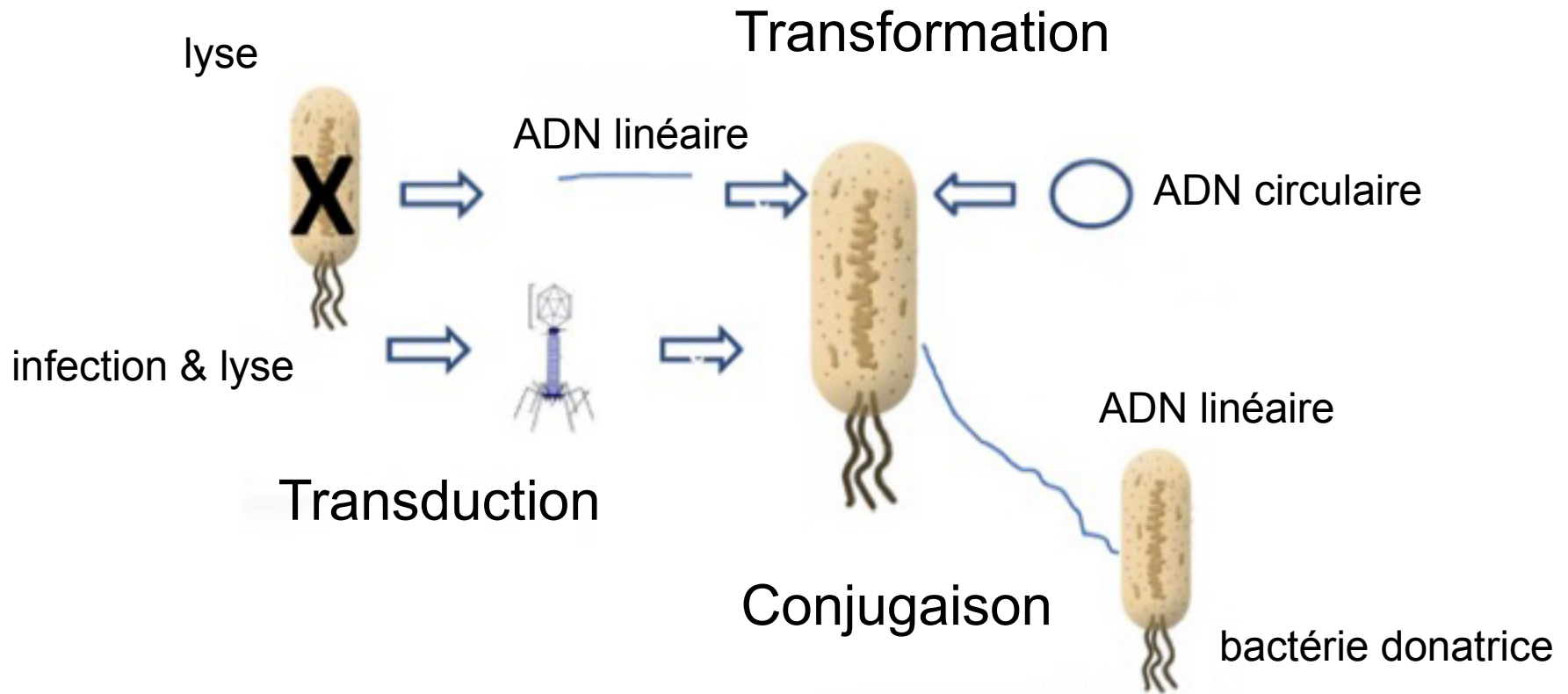
Voies d'échanges génétiques chez les bactéries

- ✓ **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.**

Voies d'échanges génétiques chez les bactéries



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

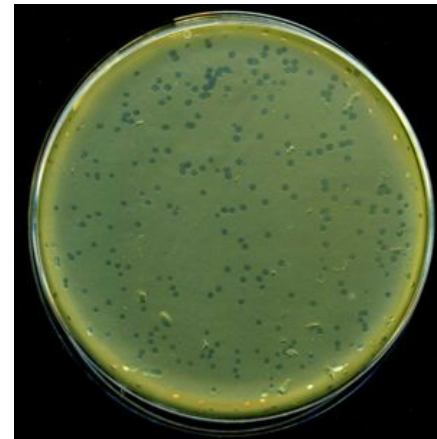
Transduction

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

Bactériophages = les virus des bactéries

- **bactériophage virulent** -> lyse:

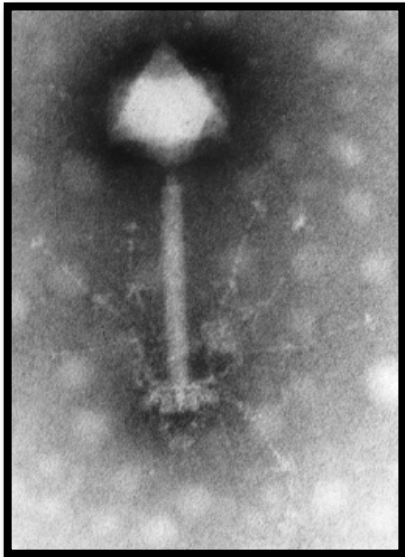
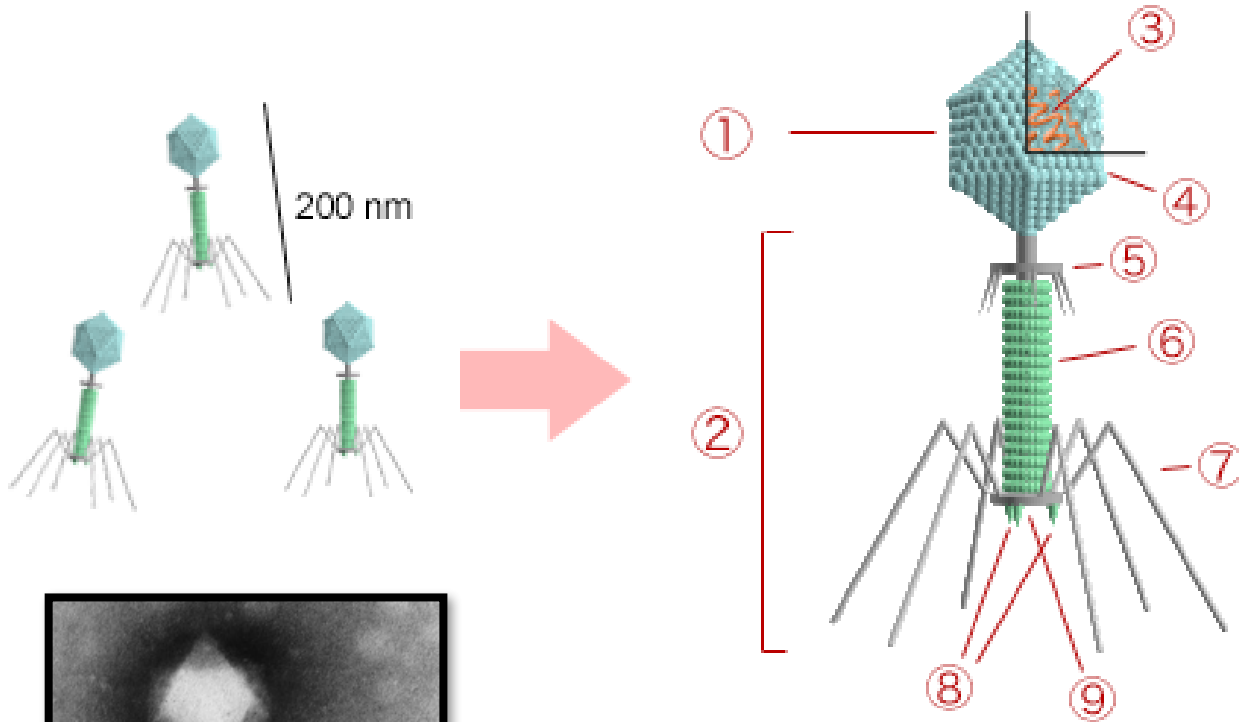
T_4 , T_2 , etc...



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

λ , Mu , P_1 etc...

Structure des phages

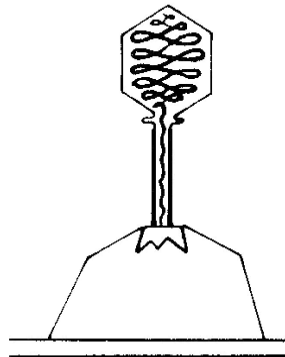


Le phage S-PM2.

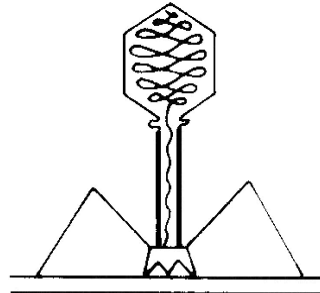
1. Tête
2. Queue
3. Acide nucléique
5 kb à 650 kb
4. Capside
5. Col
6. Gaine contractile
7. Fibres caudales
8. Spicules
9. Plaque terminale

Adsorption

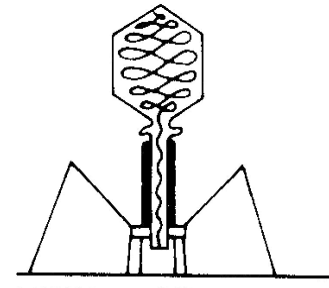
Phases d'adsorption d'un phage



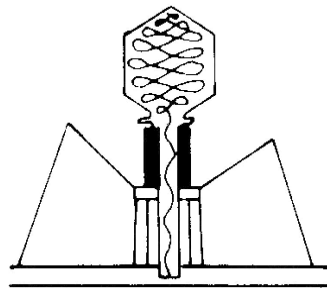
Landing



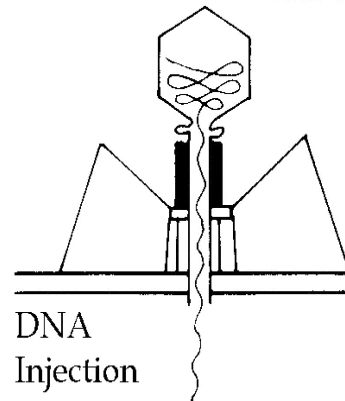
Pinning



Tail Contraction



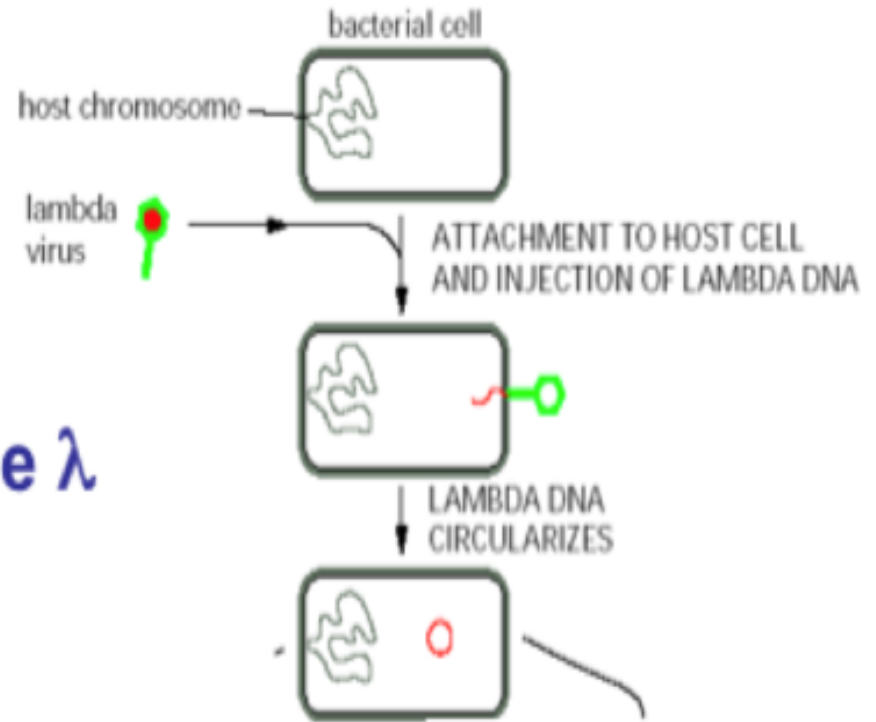
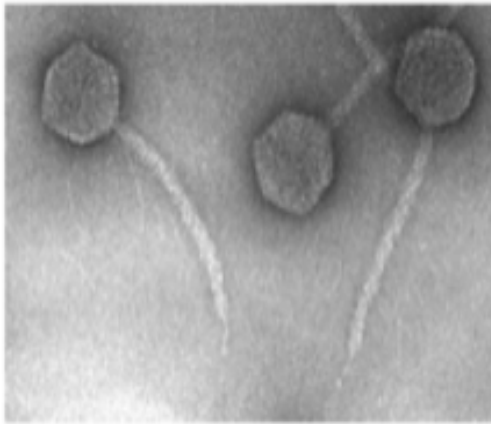
Penetration &
Unplugging



DNA
Injection

Cycle d'infection du phage λ

Cycle du bactériophage λ



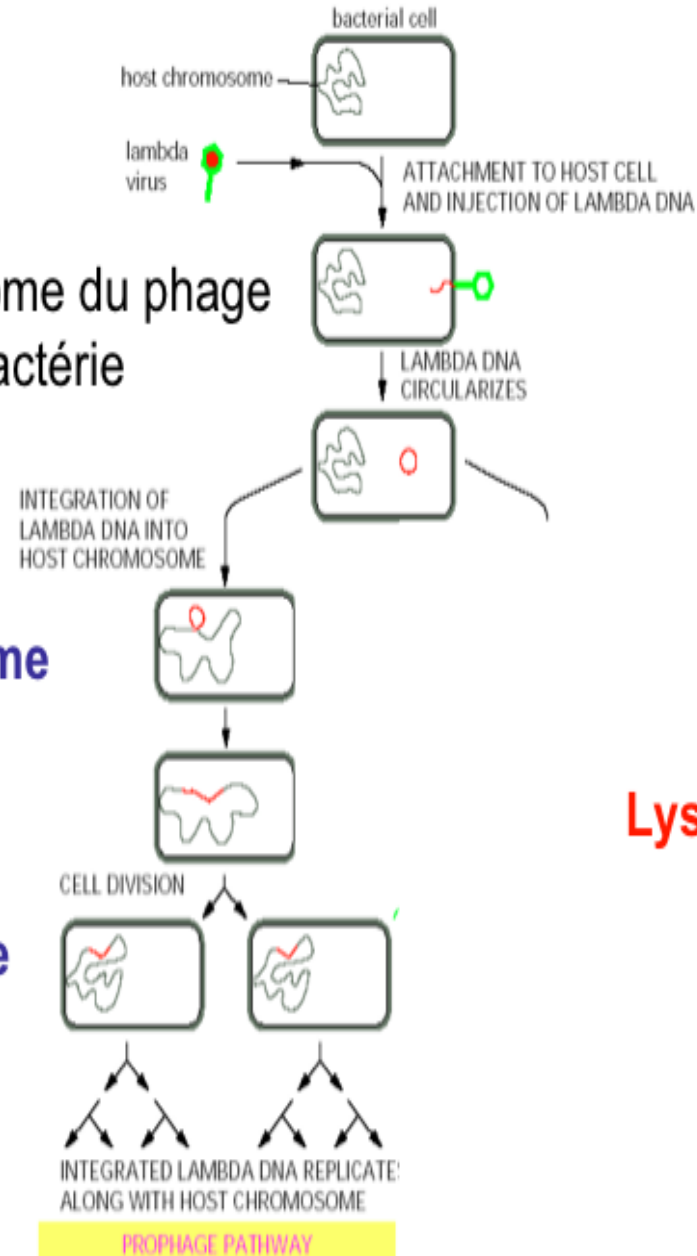
Deux possibilités : lysogénie ou lyse

Cycle lysogénique du phage λ

Intégration du génome du phage
au génome de la bactérie

phage λ sous forme
prophage

Bactérie lysogène

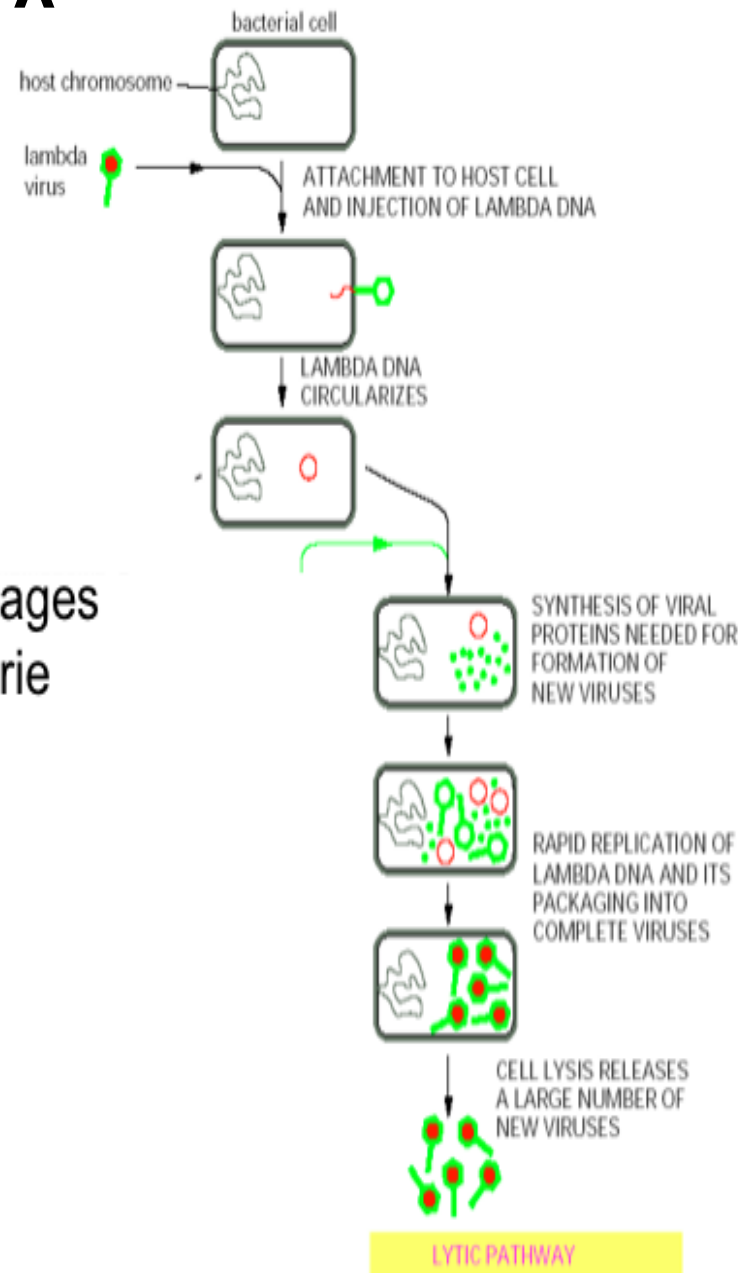


Lysogénie

Cycle lytique du phage λ

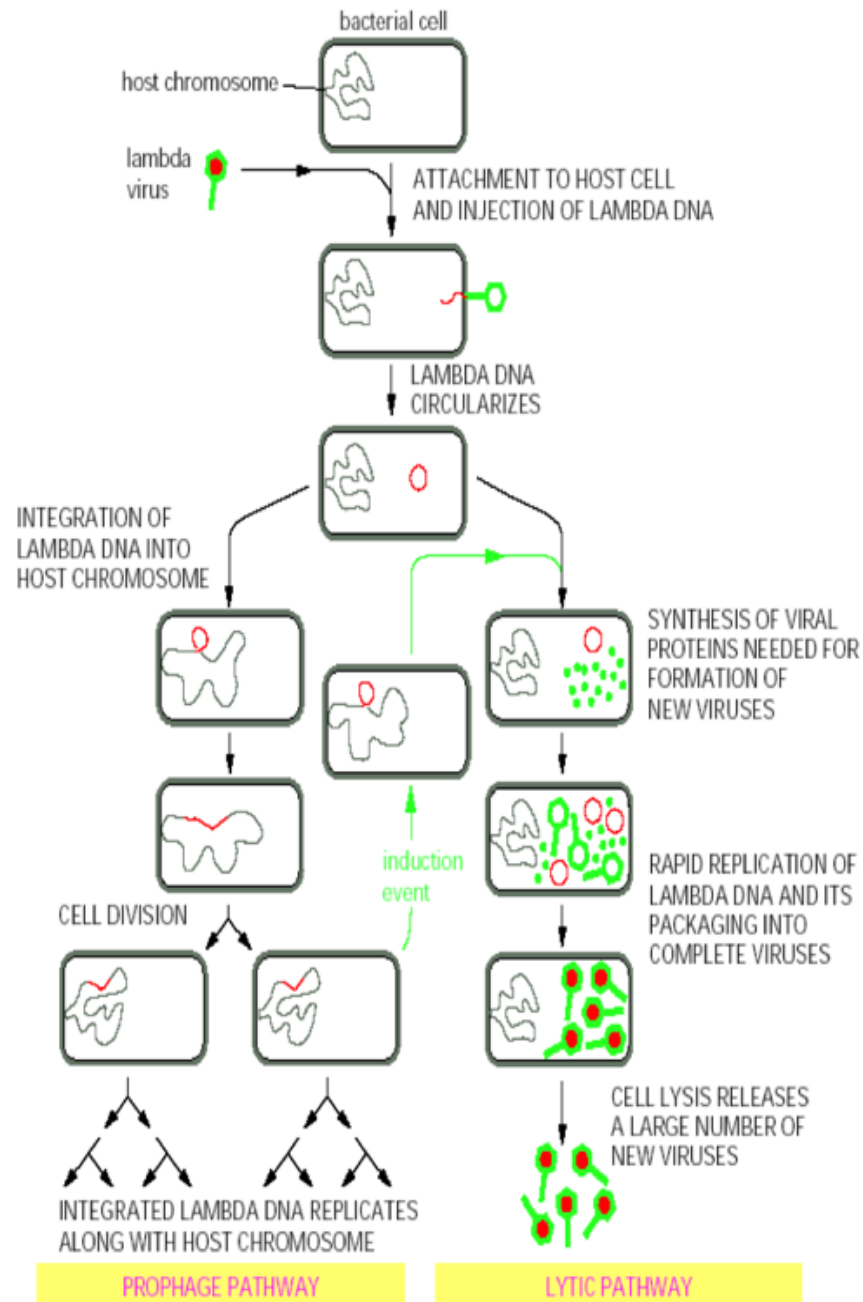
Multiplication des phages
puis lyse de la bactérie

Cycle lytique



Cycle lysogénique / lytique du phage λ

Induction
d'un cycle lytique
à partir de
bactéries lysogènes



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

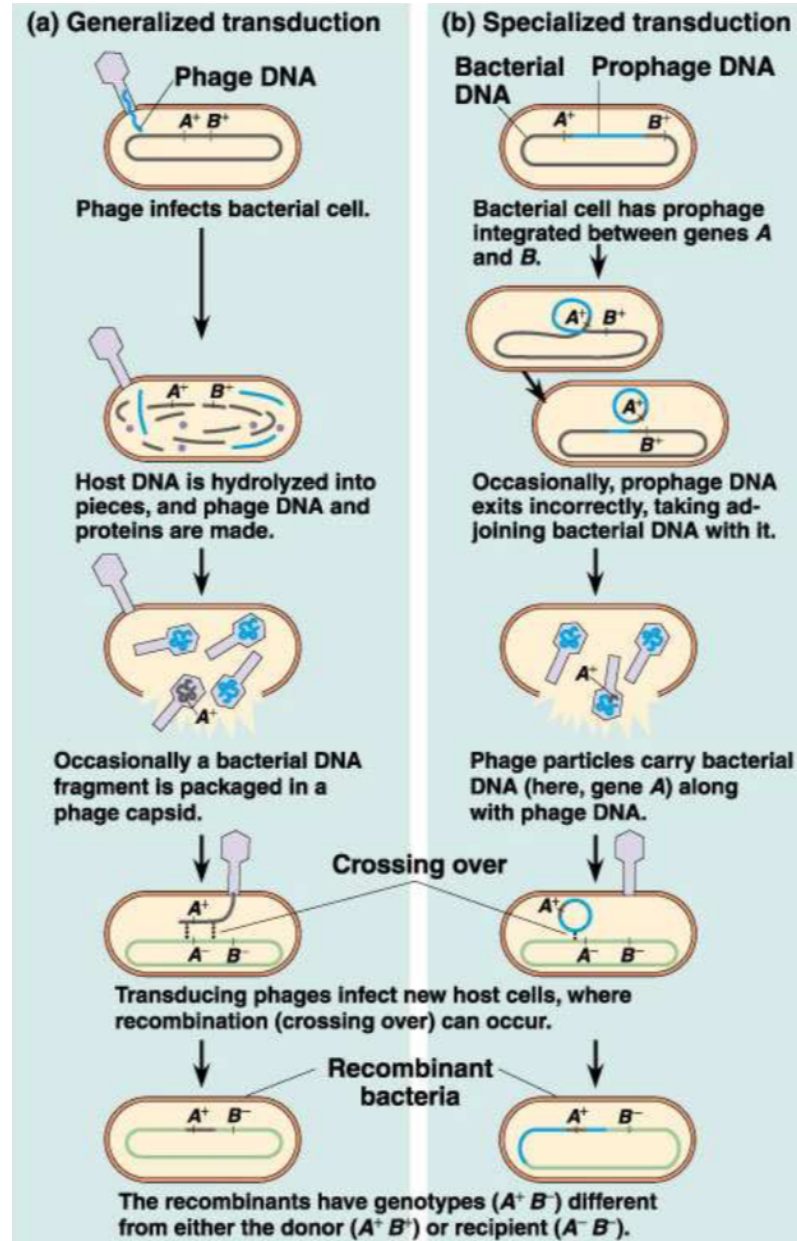
Deux types de transduction :

- **Généralisée (P1)**
- **Spécialisée (λ)**

Transduction généralisée ou spécialisée

Transduction généralisée

Toutes les régions chromosomiques sont susceptibles d'être transduites



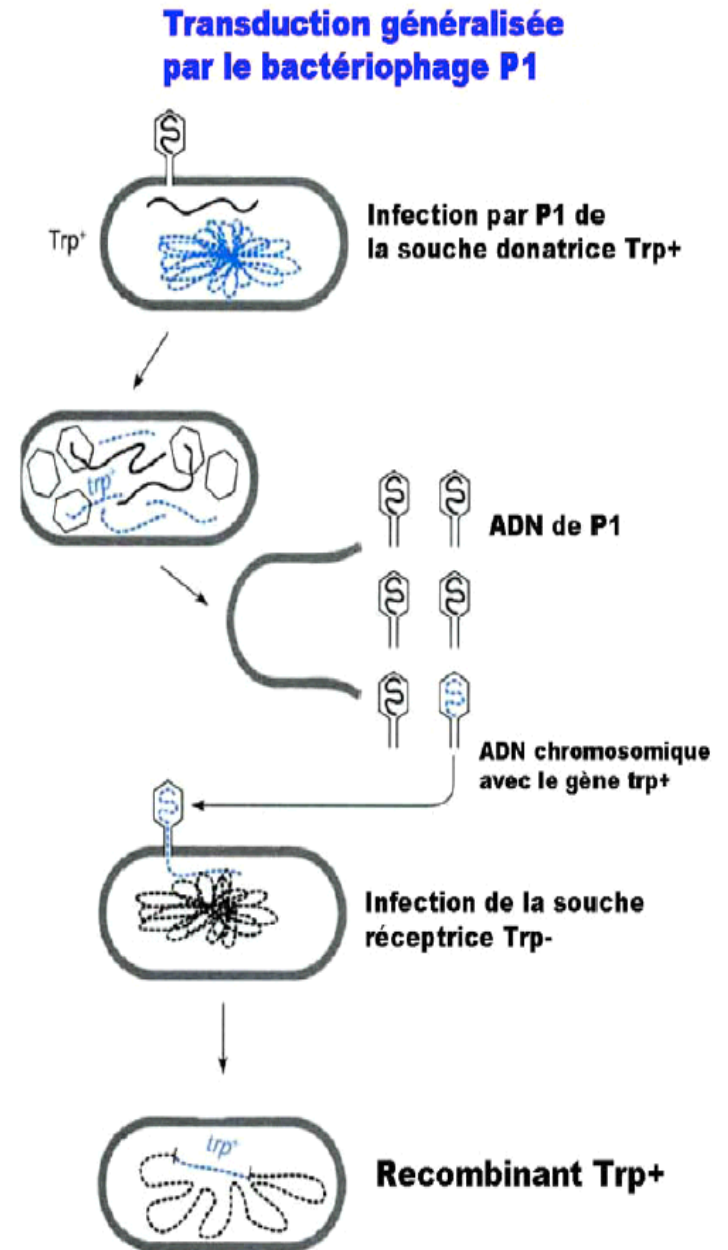
Transduction spécialisée

Une seule région chromosomique est susceptible d'être transduite

Transduction généralisée

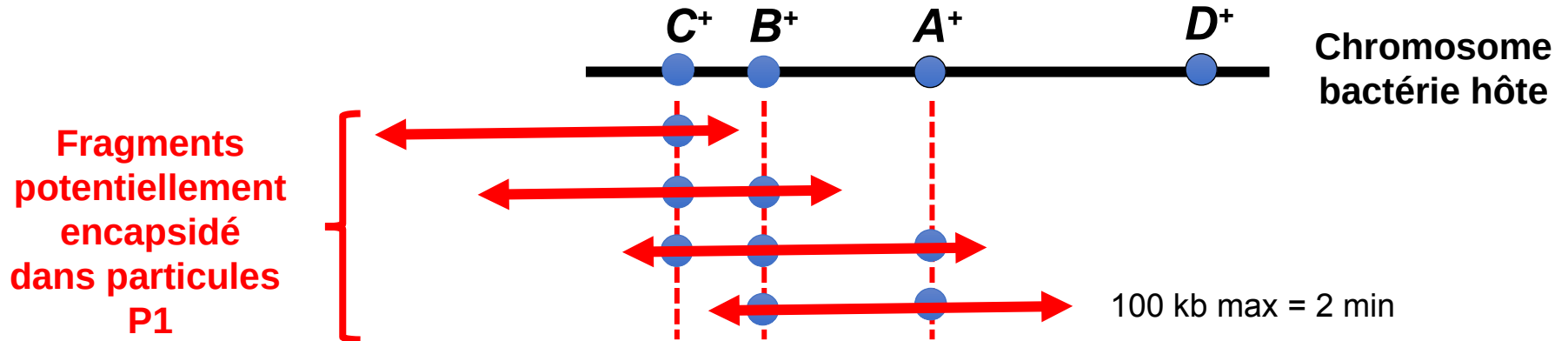
Utilisation génétique de la
transduction
généralisée par le bactériophage P1

➤ **Cartographie
génomique**



Transduction généralisée

Utilisation génétique de la transduction généralisée par le bactériophage P1



✓ Gènes co-transductibles : ✧ $C-B$ et $C-A$

✧ $B-A$

✧ $A-D$

✓ Gènes non co-transductibles : ✧ $C-D$

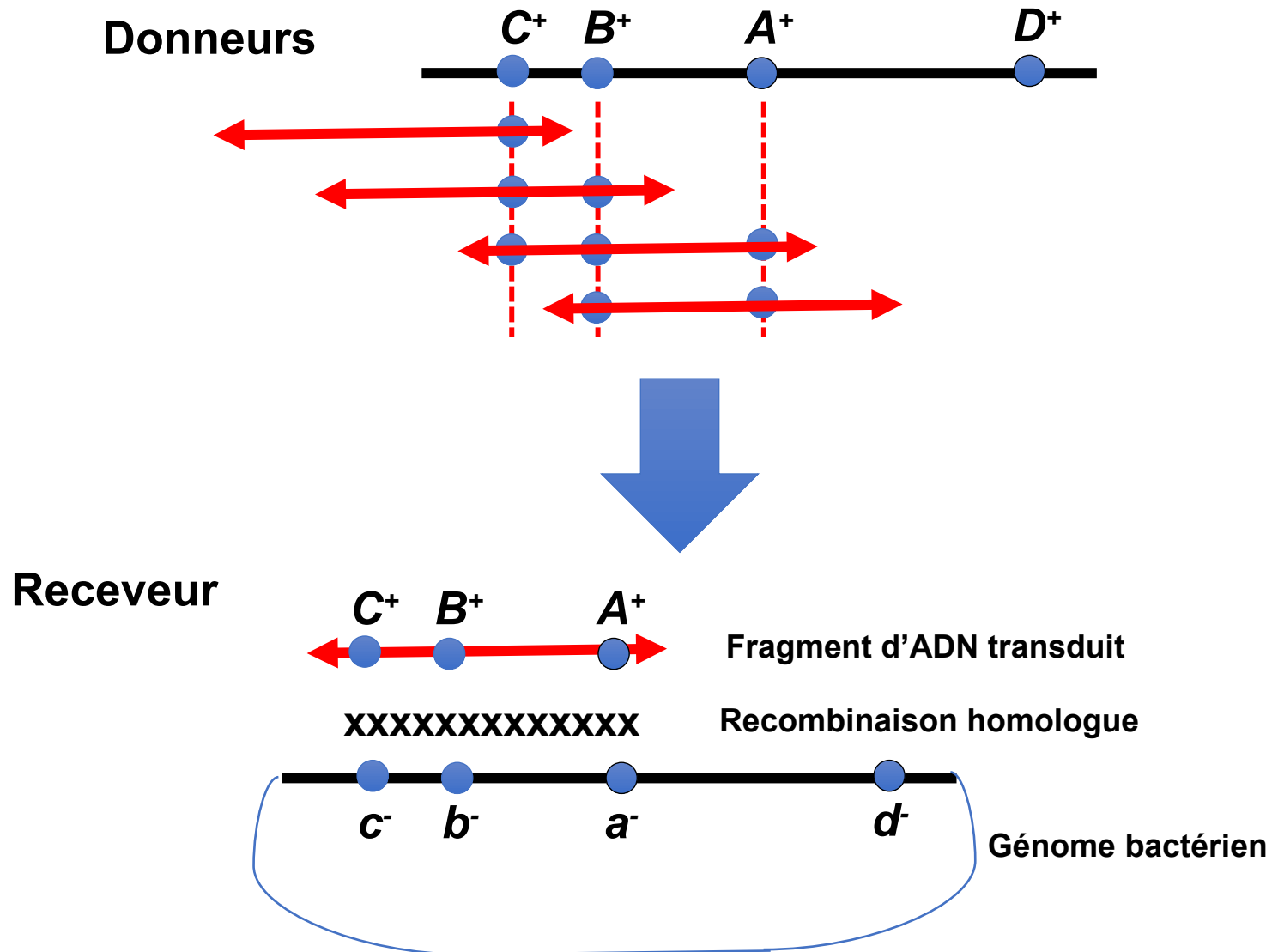
➤ Distance entre C et D ≥ 100 kb

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)
 - **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 $\approx 1.10^{-5}$**

Transduction généralisée & cartographie



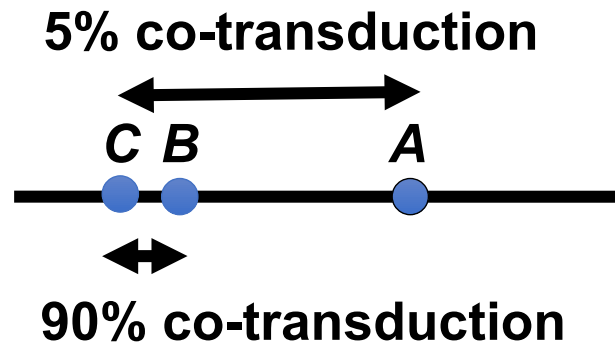
Si sélection C^+ , classes de recombinants attendus : C^+B^+ ; C^+b^- ; C^+A^+ ; C^+a^-

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



Test de fluctuation

Expérience de Salvador Luria et Max Delbrück
(1943)

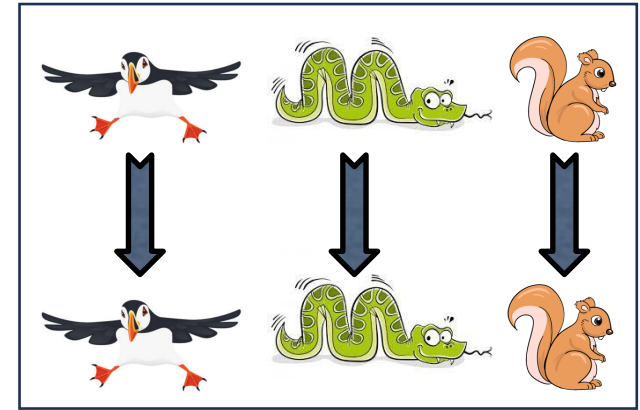
Un siècle plus tôt...

Évolution des espèces



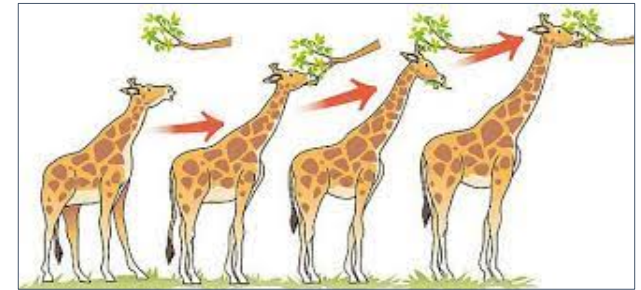
Mutations aléatoires
Sélection naturelle

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...

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

Salvador Luria
Microbiologiste

Max Delbrück
Biophysicien

Bactéries & Phages

Génétique & Statistiques

Question : comment apparaissent les mutations ?

La démarche génétique

Sélection de mutants => crible phénotypique



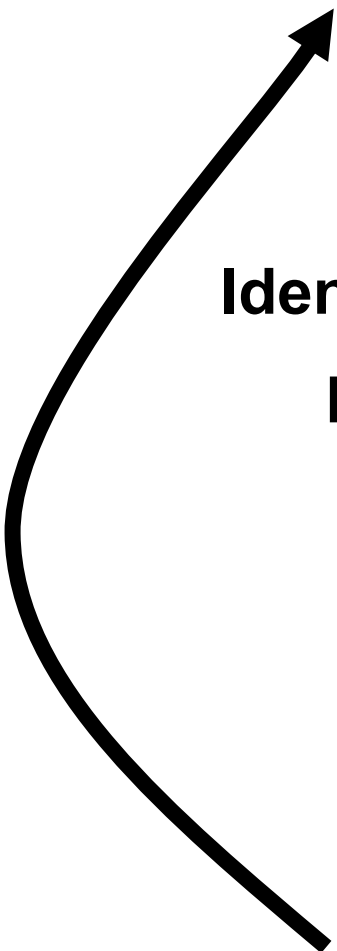
**Identification des gènes affectés
pour chacun des mutants**



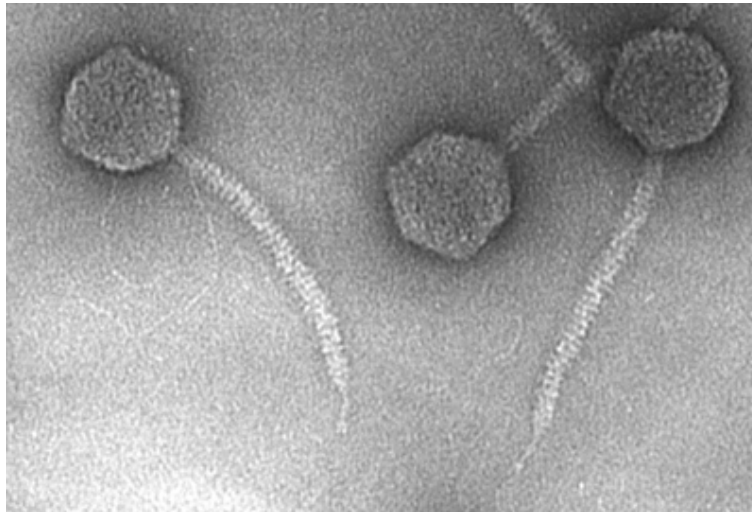
Modèles théoriques



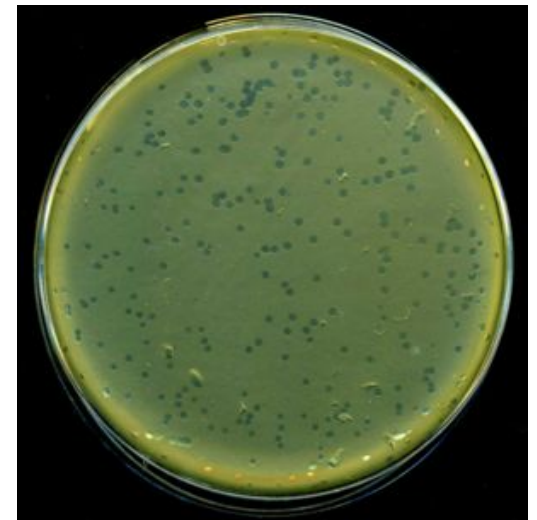
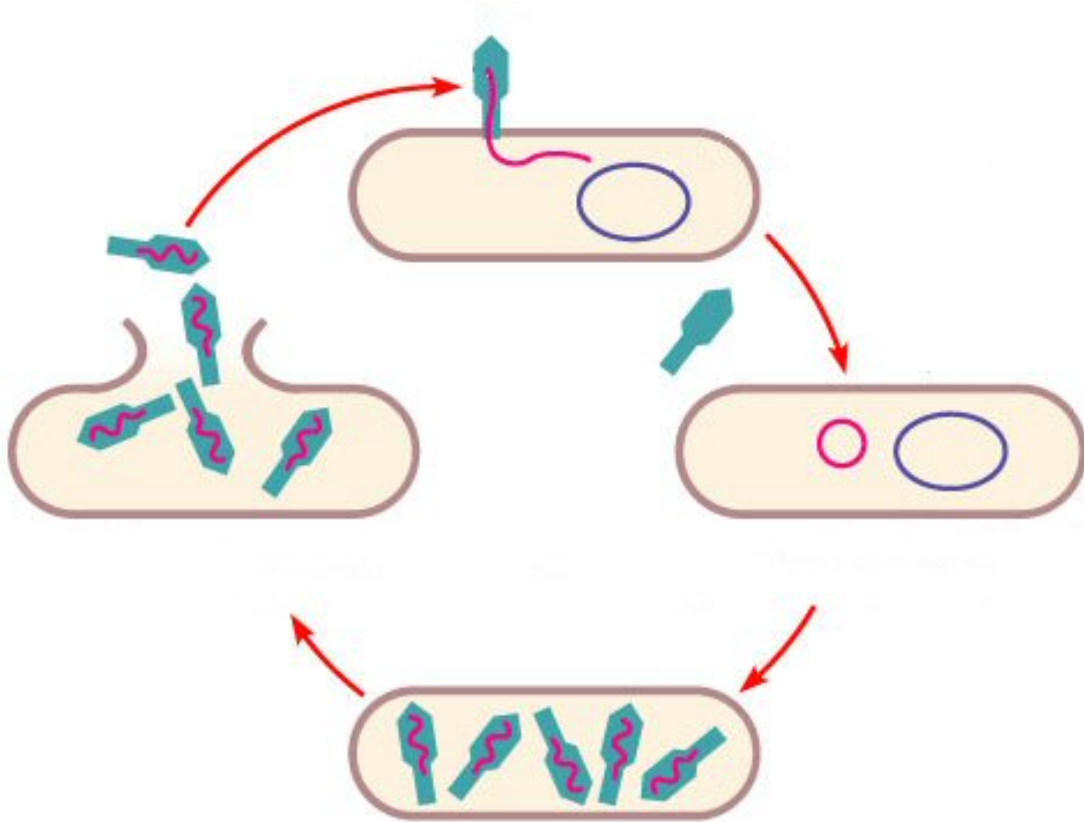
Hypothèses de travail



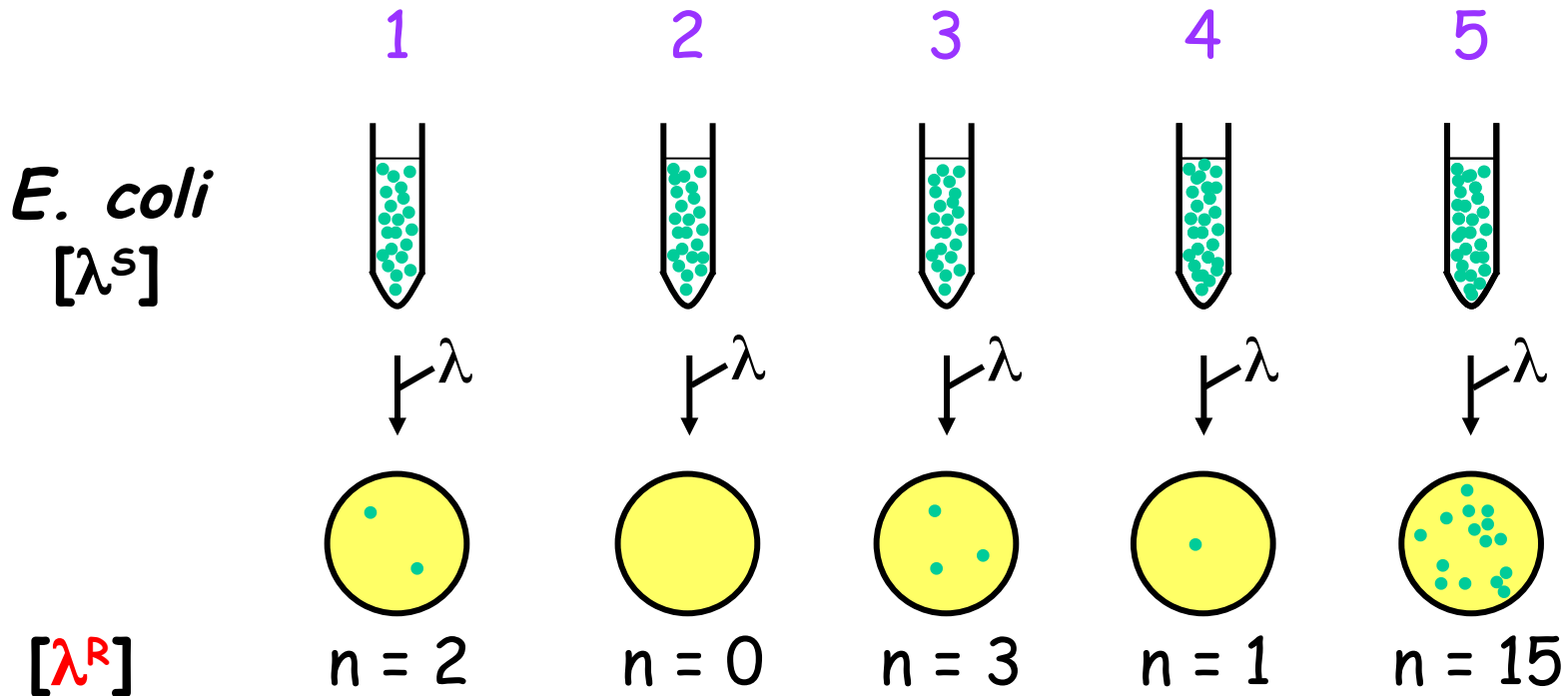
Sélection de bactéries *E. coli* résistantes à l'infection par le phage λ



Cycle lytique du phage λ



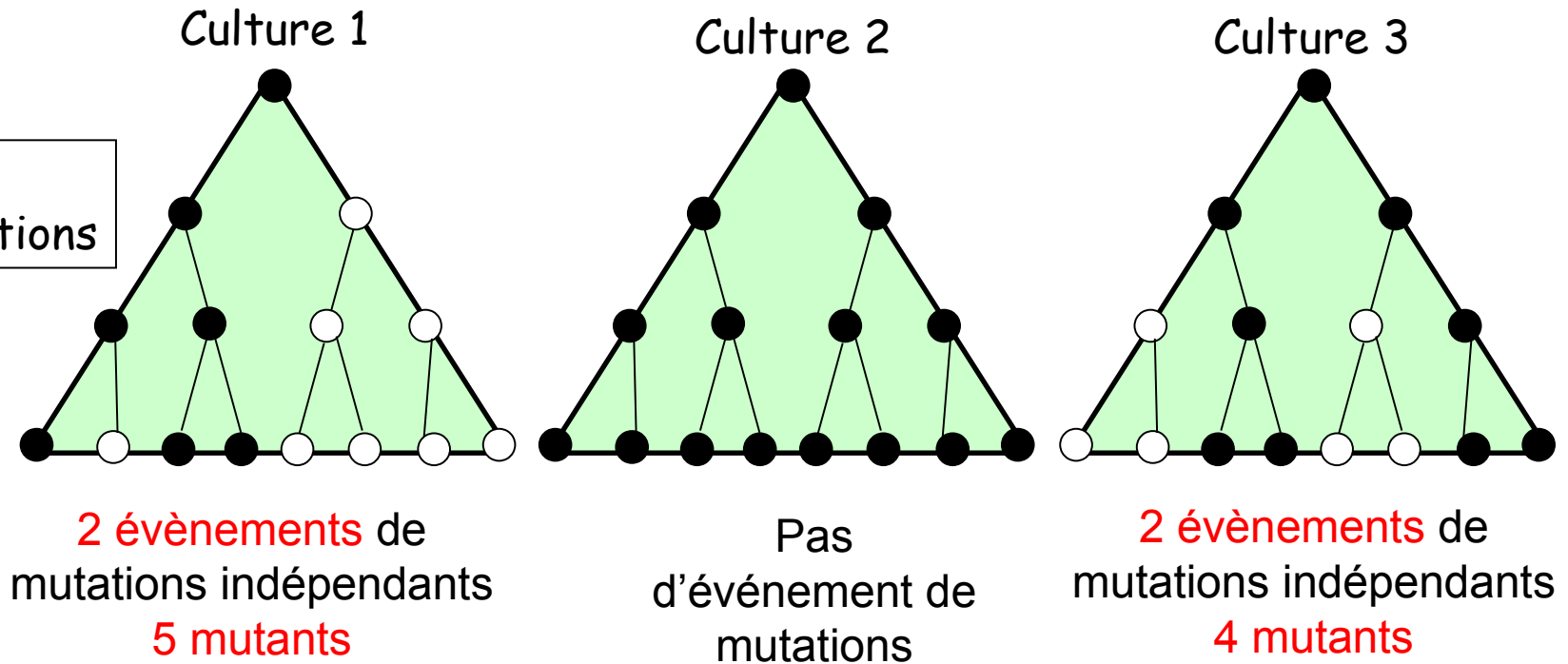
Quel protocole ?



Pourquoi des cultures indépendantes ?

Pour sélectionner des mutants indépendants !

Mutants génétiquement indépendants



- ✓ **Mutants indépendants** => issus d'évènement de mutations indépendantes
- ✓ **Si mutants issus de divisions clonales** => mutants pas indépendants

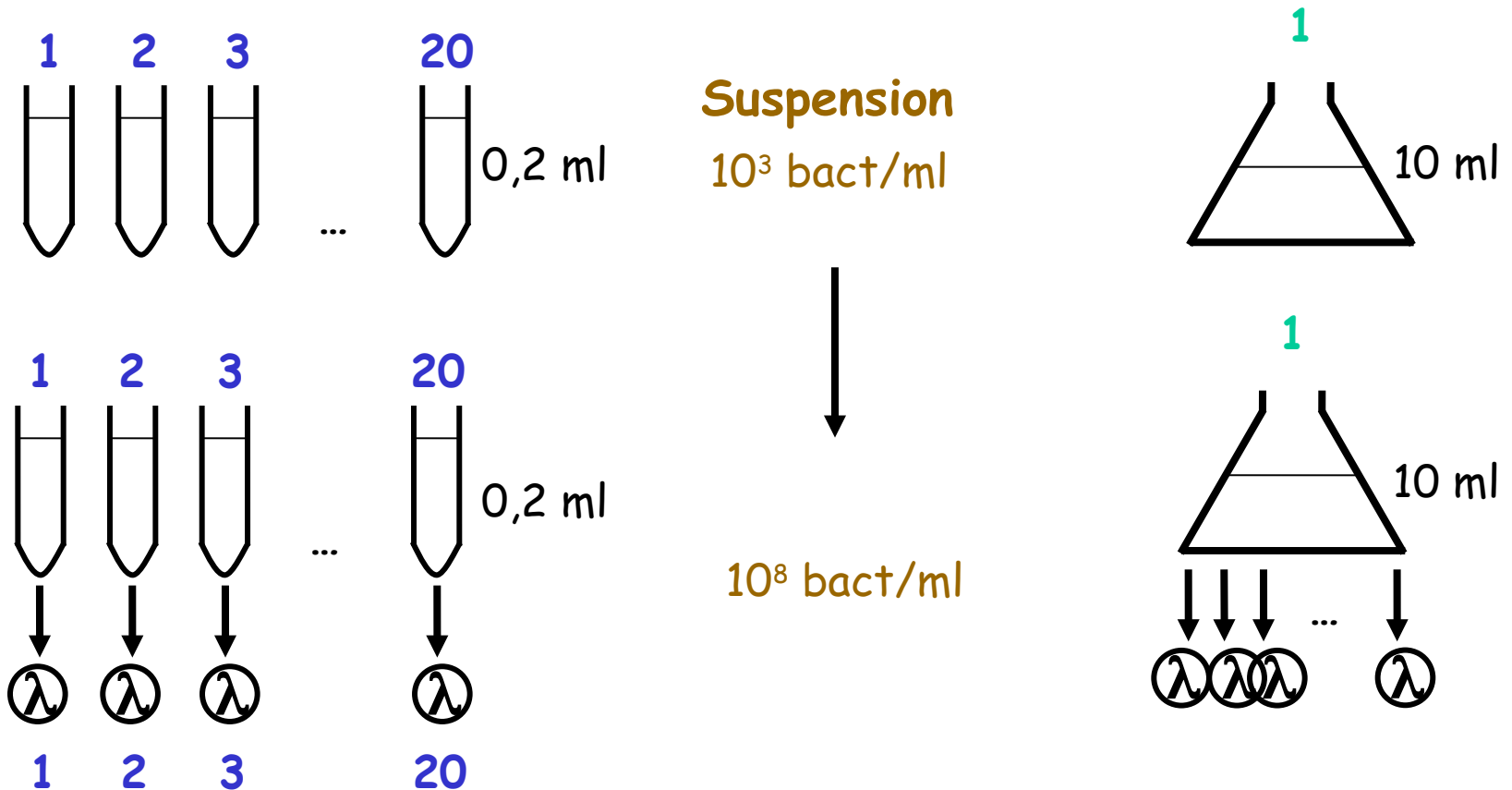
➤ 2 mutants indépendants isolés = 1 issu de culture 1 + 1 issu de culture 2

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.

Test de fluctuation : S. Luria et M. Delbrück (1943)



20 cultures **indépendantes**

20 étalements

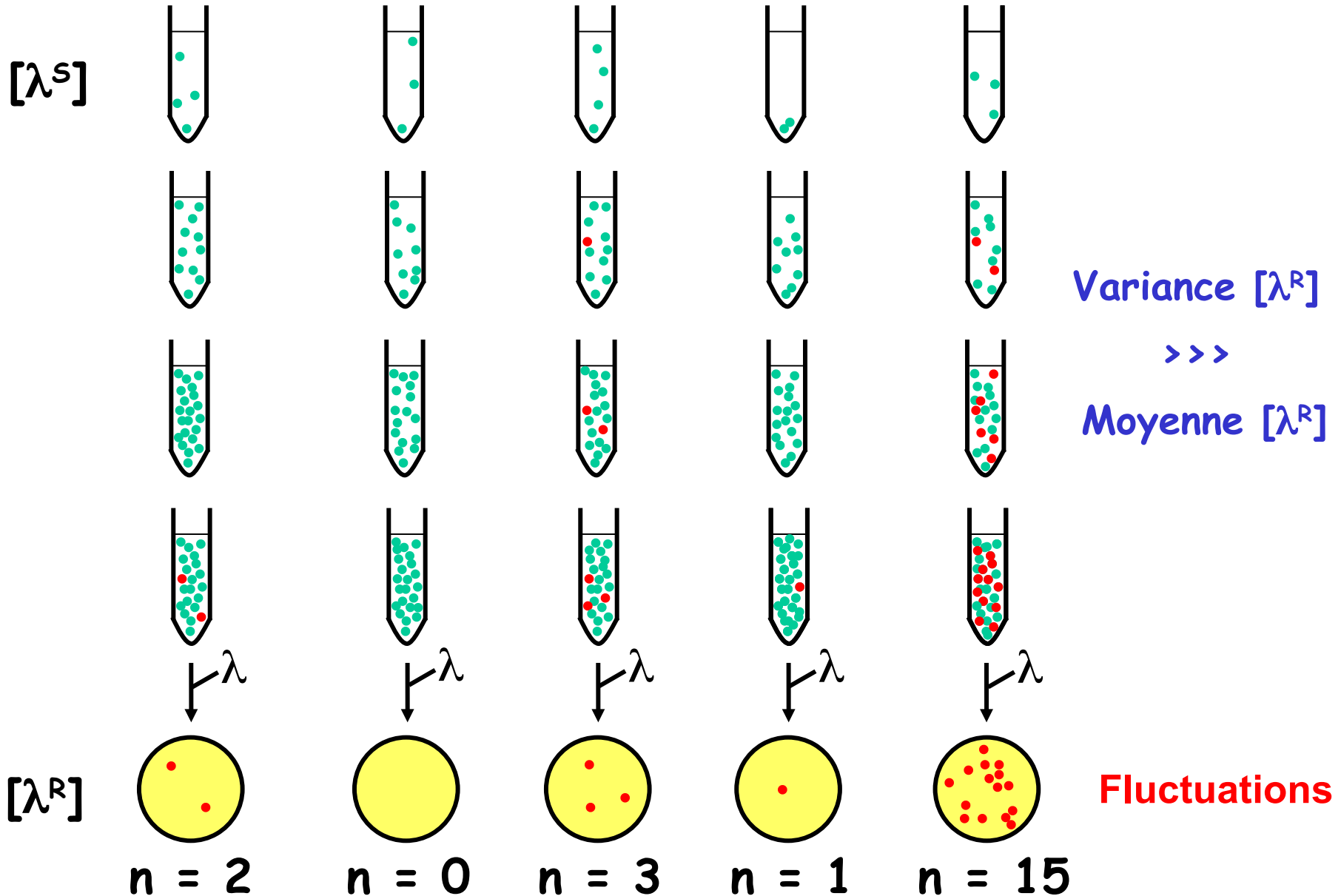
Dénombrement des $[\lambda^R]$

1 culture

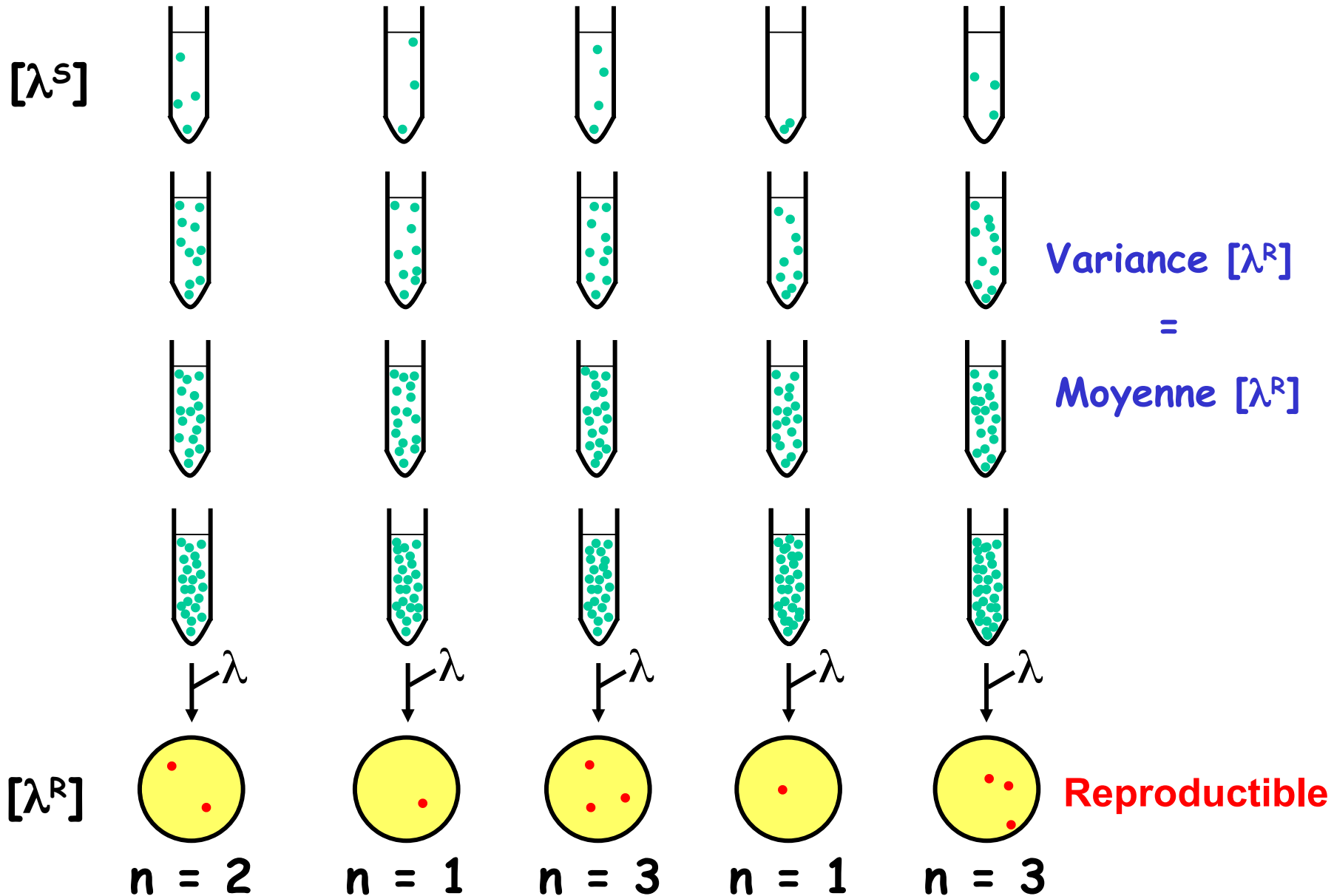
20 étalements

Dénombrement des $[\lambda^R]$

Hypothèse 1 : la mutation précède sa sélection



Hypothèse 2 : la mutation est induite par l'environnement



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

M = 11,35

V = 694

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

Culture unique [λ^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**

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 »

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)

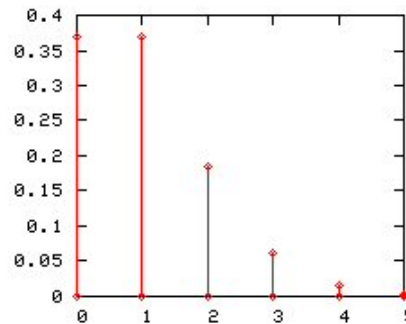
Taux de **mutation** $\neq$ Taux de **mutants**

Taux de mutation

=

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

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



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

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

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

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

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

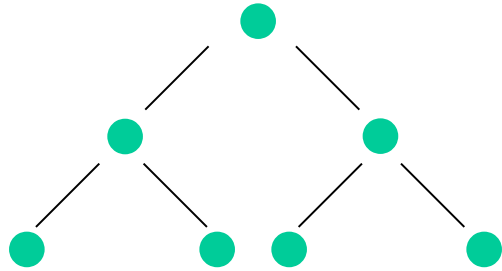
$$\Rightarrow f(0) = e^{-np}$$

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

n = nombres de divisions cellulaires

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

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

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

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

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

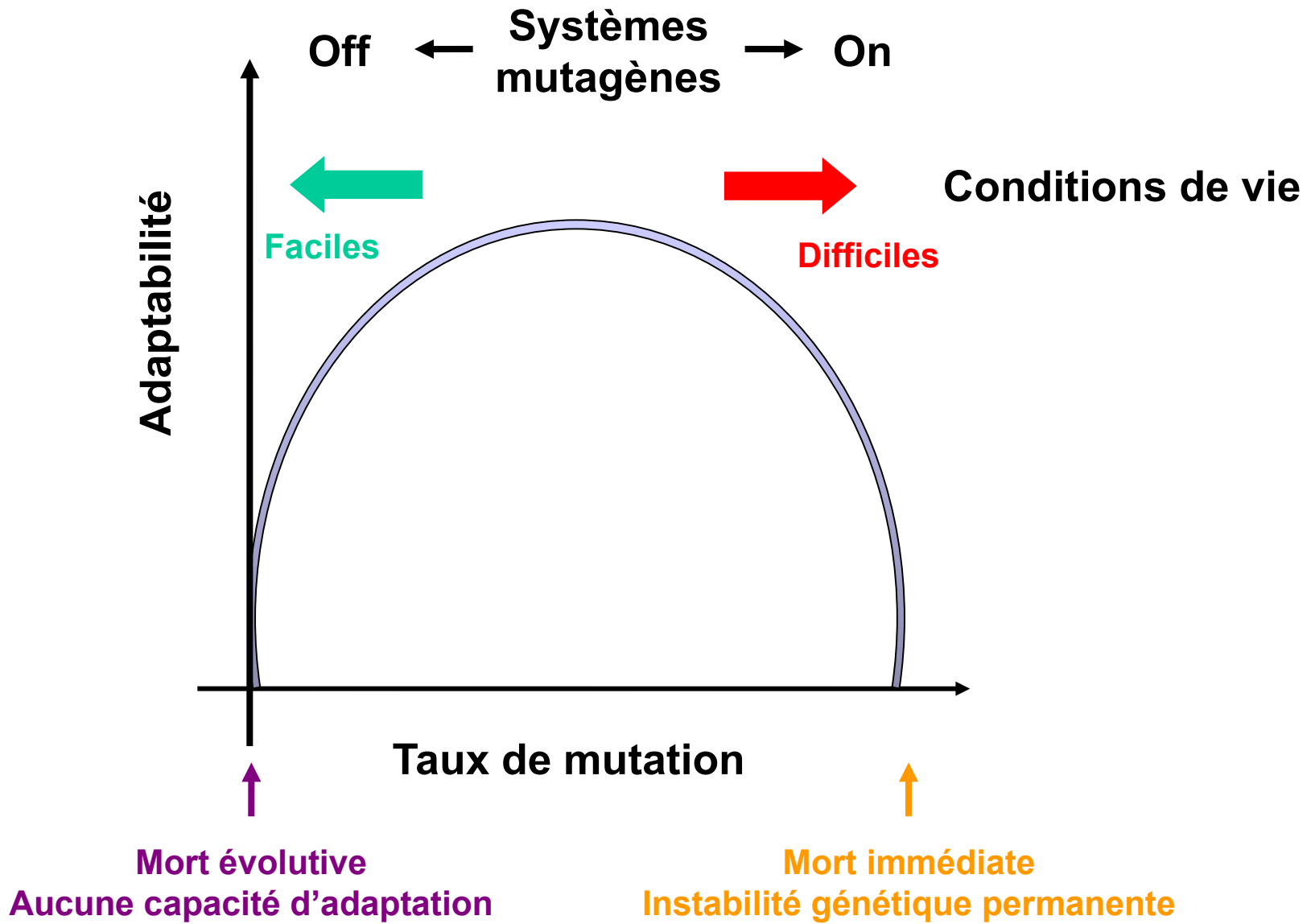
$$T = \Sigma [\lambda^R] / n_{\text{total bactéries}}$$

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

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 !





TRAITEMENT MUTAGENE

=

exposition à des agents mutagènes

augmentation du **taux de mutation**

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: 6 April 2021

Accepted: 11 August 2021

Published online: 15 September 2021

 Check for updates

Alpha Kabinet Keita^{1,2,26,52}, Fara R. Koundouno^{3,4,26}, Martin Faye^{5,26}, Ariane Düx^{6,26}, Julia Hinzmann^{4,7,8,26}, Haby Diallo¹, Ahidjo Ayoub², Frederic Le Marcis^{1,2,9}, Barré Soropogui³, Kékoura Ifono^{3,4}, Moussa M. Diagne⁵, Mamadou S. Sow^{1,10}, Joseph A. Bore^{3,11}, Sebastien Calvignac-Spencer⁶, Nicole Vidal², Jacob Camara², Mamadou B. Keita¹², Annick Renevey^{4,7}, Amadou Diallo⁵, Abdoul K. Soumah¹, Saa L. Millimono^{3,4}, Almudena Mari-Saez⁶, Mamadou Diop⁵, Ahmadou Doré³, Fodé Y. Soumah¹⁰, Kaka Kourouma¹², Nathalie J. Vielle^{4,13}, Cheikh Loucoubar⁵, Ibrahima Camara¹, Karifa Kourouma^{3,4}, Giuditta Annibaldis^{4,13}, Assaïtou Bah², Anke Thielebein^{4,7}, Meike Pahlmann^{4,7}, Steven T. Pullan^{8,11}, Miles W. Carroll^{8,11}, Joshua Quick¹⁴, Pierre Formenty¹⁵, Anais Legand¹⁶, Karla Pietro¹⁶, Michael R. Wiley^{16,17}, Noel Tordo¹⁸, Christophe Peyrefitte⁵, John T. McCrone¹⁹, Andrew Rambaut¹⁹, Youssouf Sidibé²⁰, Mamadou D. Barry²⁰, Madeleine Kourouma²⁰, Cé D. Saouromou²⁰, Mamadou Condé²⁰, Moussa Baldé¹⁰, Moriba Povogui¹, Sakoba Keita²¹, Mandiou Diakité^{22,23}, Mamadou S. Bah²², Amadou Sidibe⁹, Dembo Diakité¹⁰, Fodé B. Sako¹⁰, Fodé A. Traore¹⁰, Georges A. Ki-Zerbo¹³, Philippe Lemey²⁴, Stephan Günther^{4,7,13}, Liana E. Kafetzopoulou^{4,7,24}, Amadou A. Sal⁵, Eric Delaporte^{2,25}, Sophie Duraffour^{4,7,13,27}, Ousmane Faye^{5,27}, Fabian H. Leendertz^{6,27}, Martine Peeters^{2,27}, Abdoulaye Touré^{1,12,27} & N'. Faly Magassouba^{3,27}

Sélection de mutants => crible phénotypique



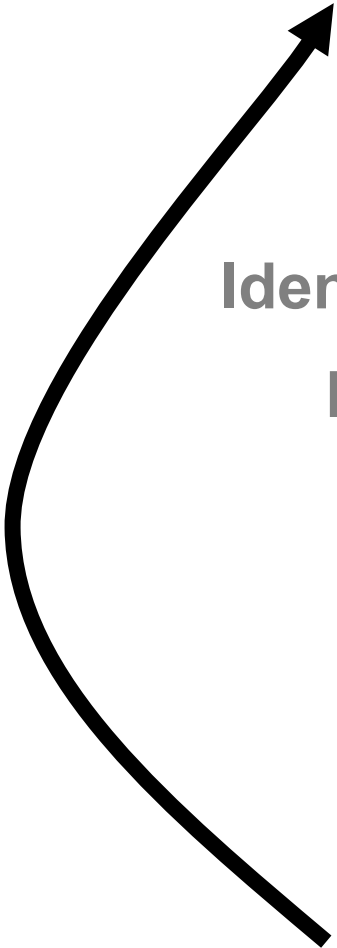
Identification des gènes affectés
pour chacun des mutants



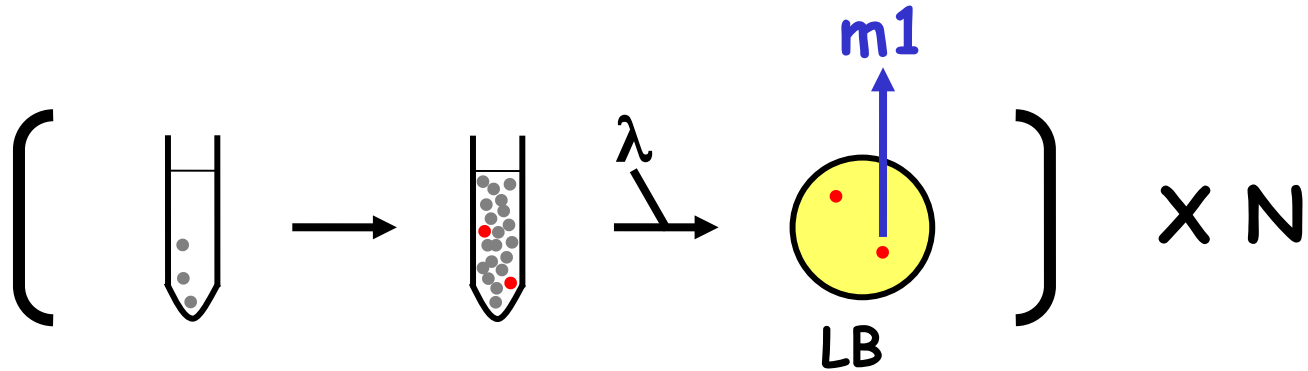
Modèles théoriques



Hypothèses de travail



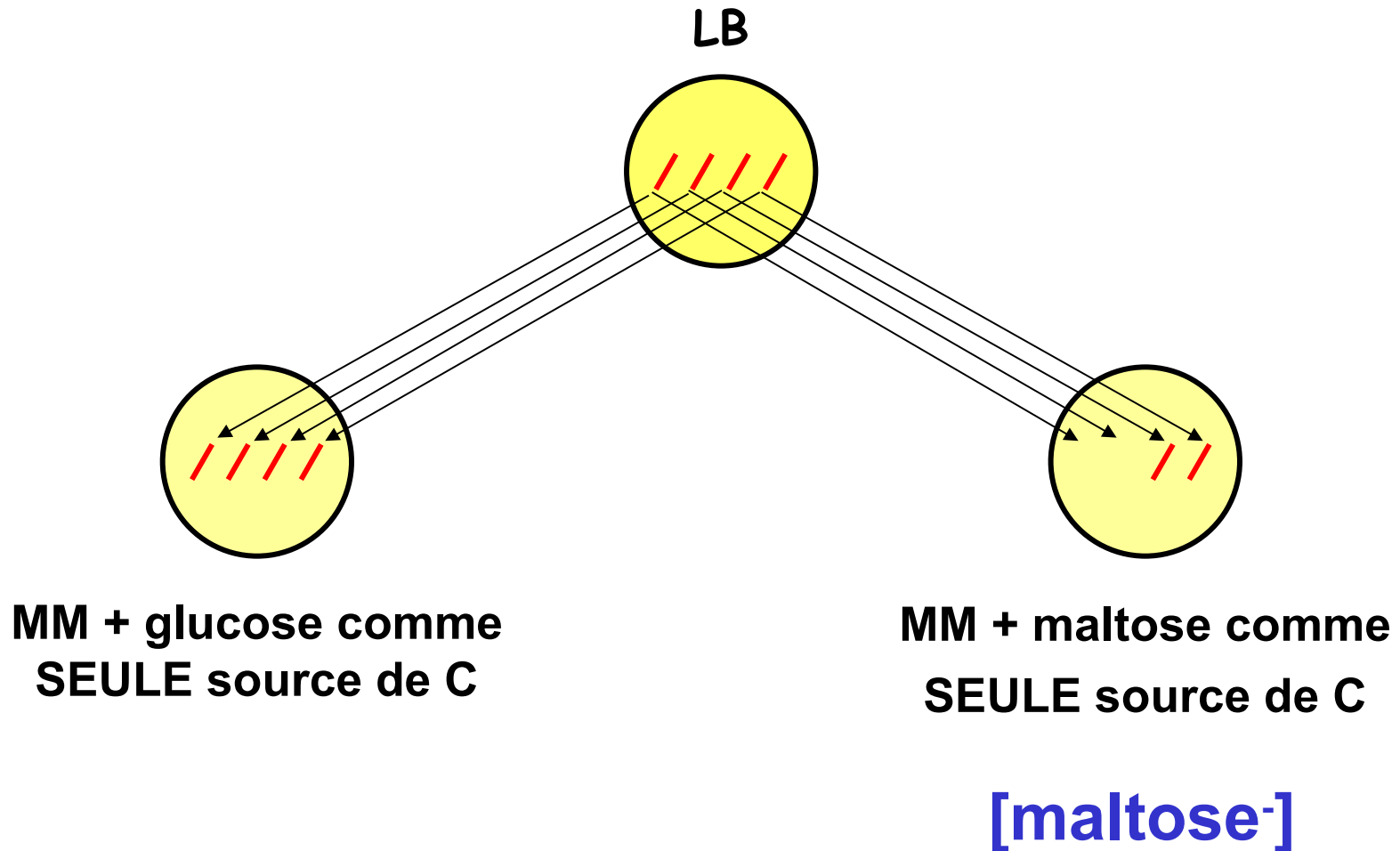
Sélection de mutants [λ^R]



crible positif

N expériences -> 4 mutants [λ^R] indépendants
m1, m2, m3 et m4

Phénotype additionnel de certains mutants [λ^R] : [maltose⁻]



4 mutants [λ^R] indépendant isolés : deux catégories

❖ 2 mutants m1 et m2 $\rightarrow$ [λ^R] et [**maltose⁻**]

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

Mutation [λ^R] : PLEIOTROPE

Sélection de mutants => crible phénotypique



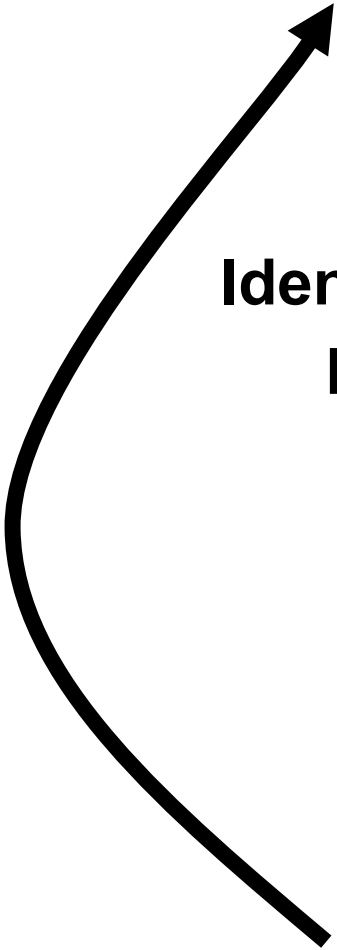
**Identification des gènes affectés
pour chacun des mutants**



Modèles théoriques



Hypothèses de travail



Identification des gènes mutés :

Clonage par complémentation fonctionnelle

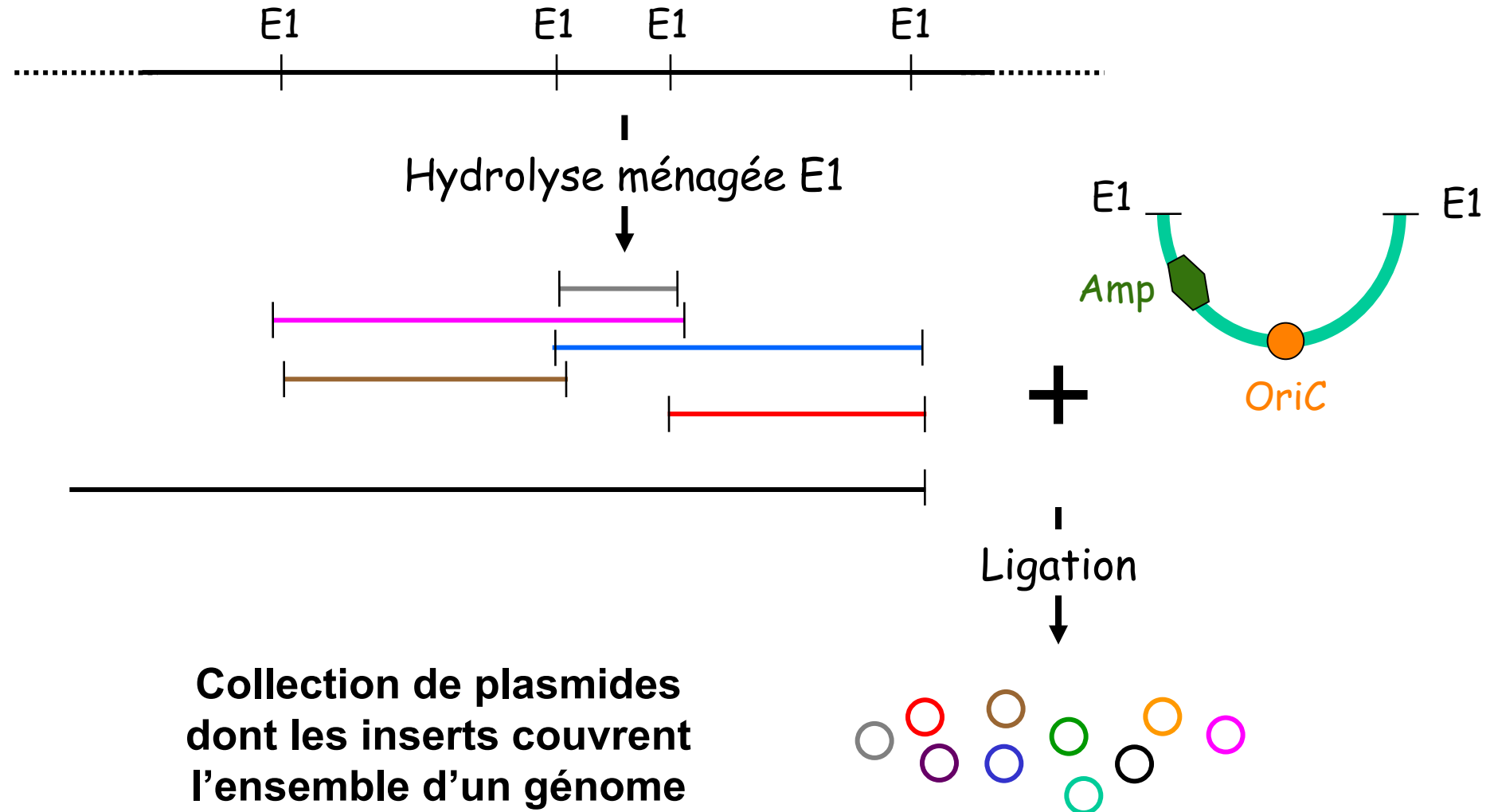
PRINCIPE :

allèle mutant -> [phénotype mutant]

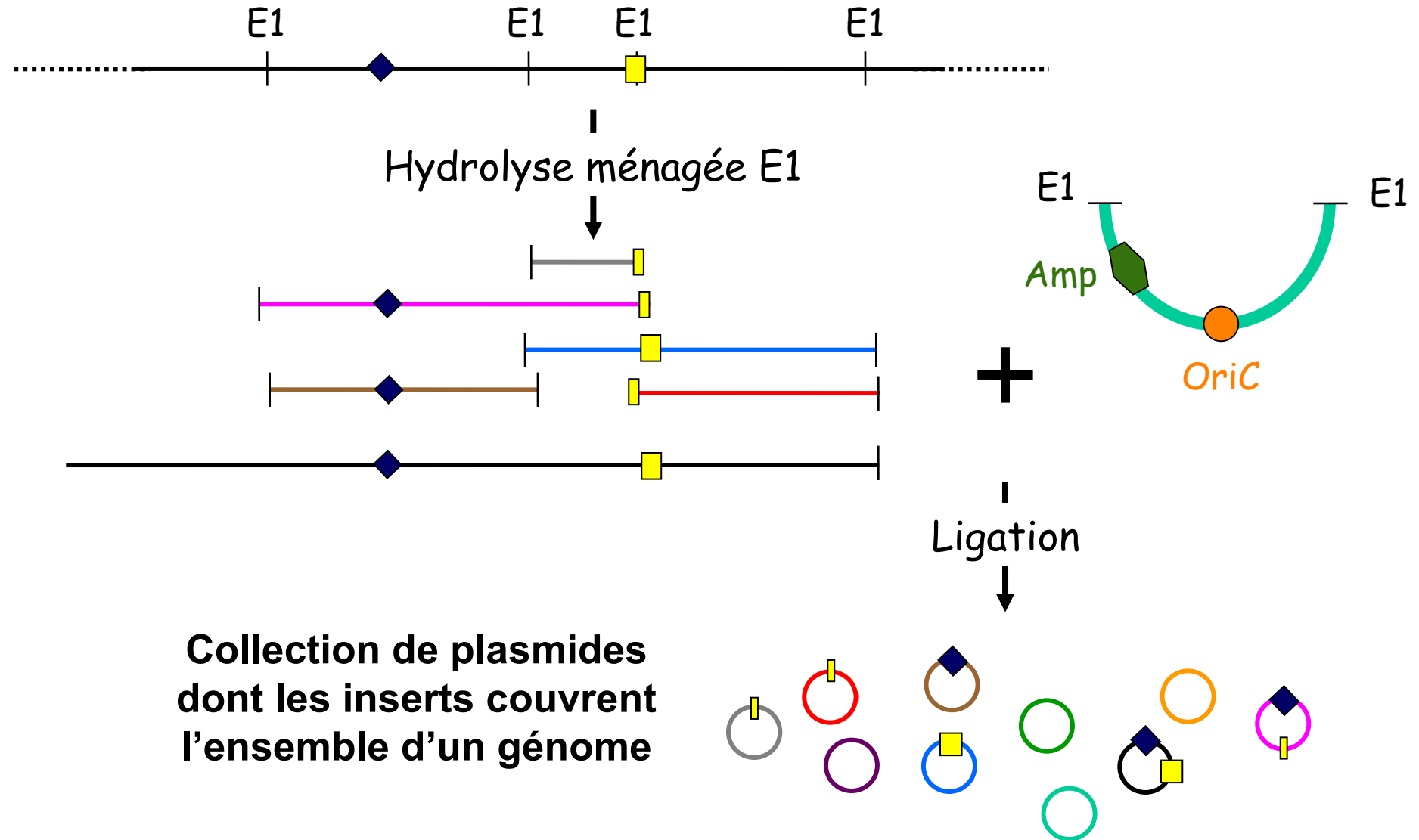
allèle mutant + allèle sauvage -> [phénotype sauvage]

SEULEMENT SI allèle sauvage > allèle mutant

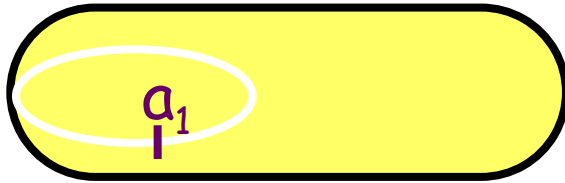
Banques d'ADN génomique



Banques d'ADN génomique

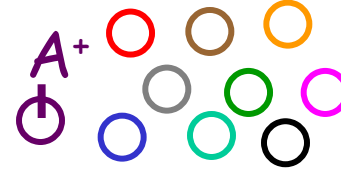


Mutant m1



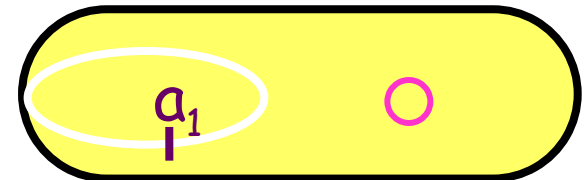
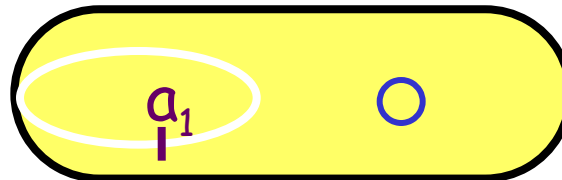
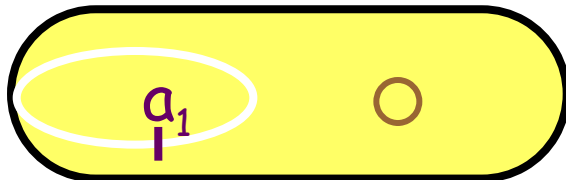
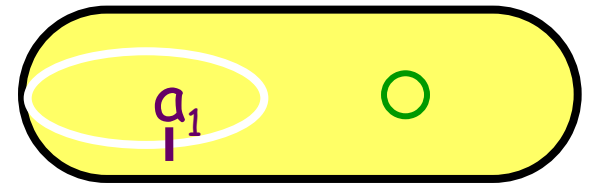
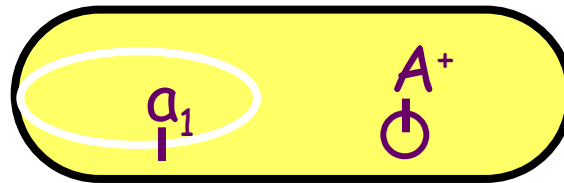
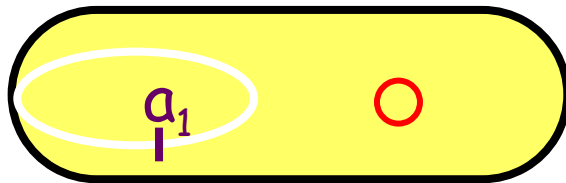
[maltose⁻]
[Amp^S]

Banque d'ADN
génomique

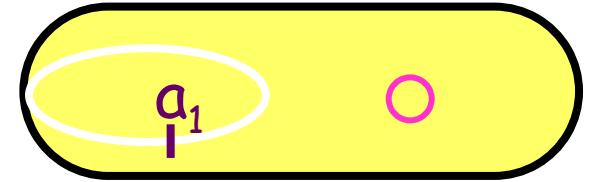
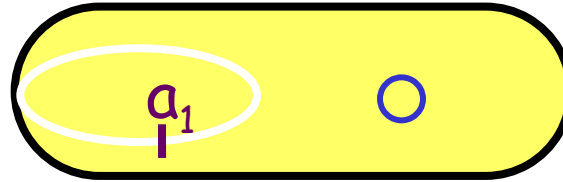
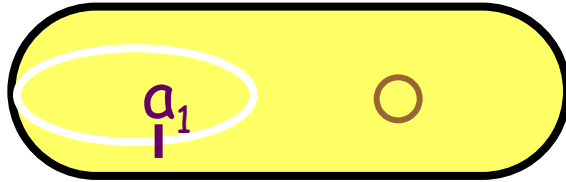
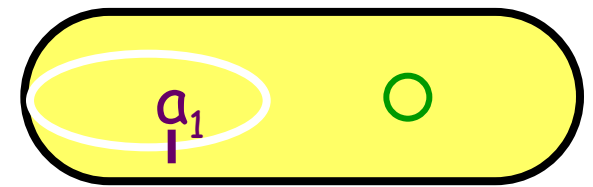
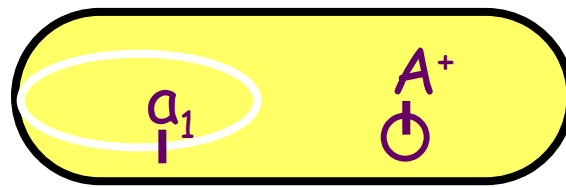
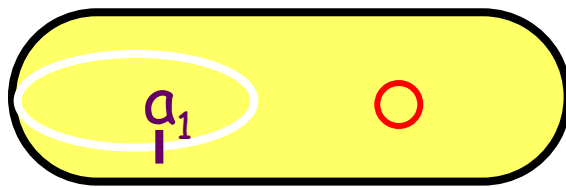


Insert
+
Vecteur
réplicatif
Amp

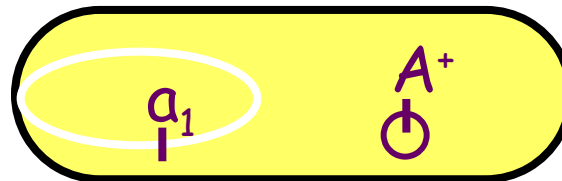
Transformation



UN SEUL plasmide par bactérie transformée




MM + maltose + Amp

[AmpR] [maltose⁺] Si $A^+ > a_1$

crible positif

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 complémente TOUS les phénotypes
associés à l'allèle mutant

Si allèle mutant < allèle sauvage

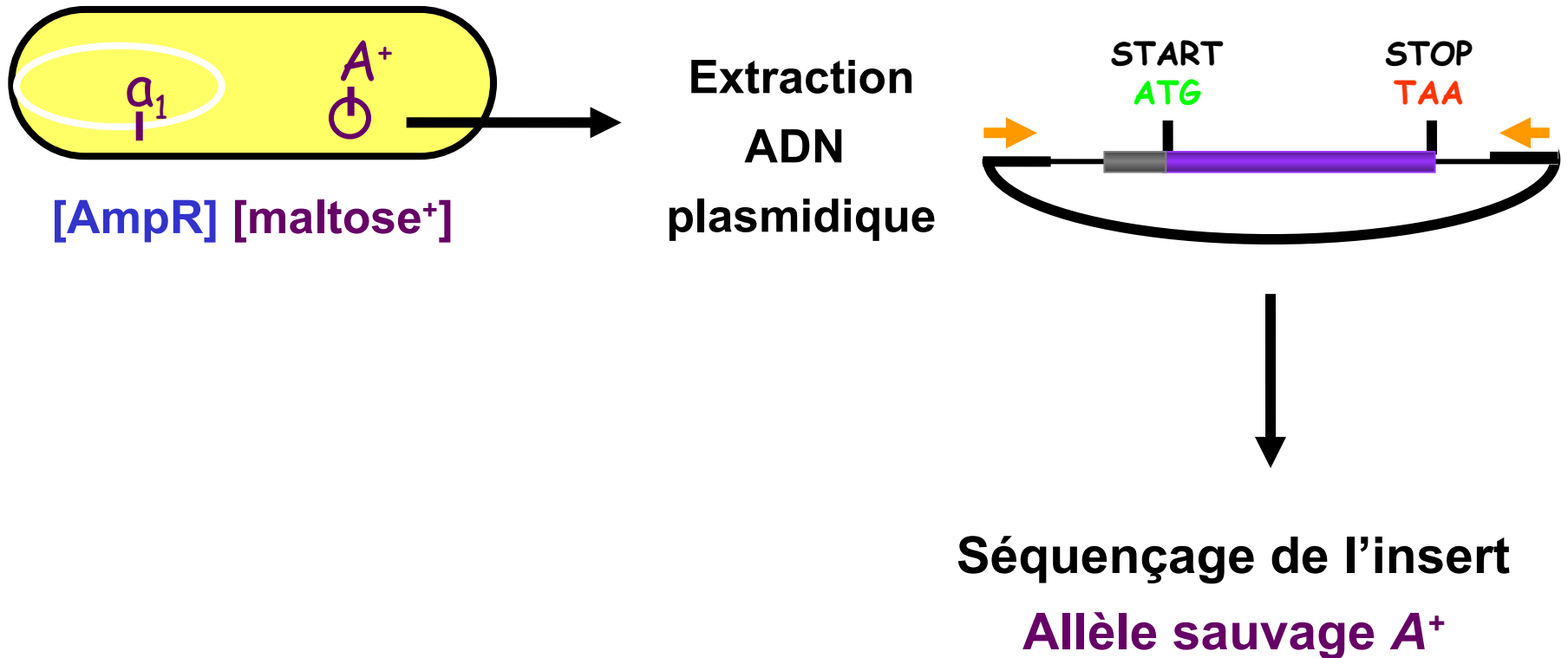
=> transformants [Amp^R] [maltose⁺] [λ^S]

Si allèle mutant > allèle sauvage

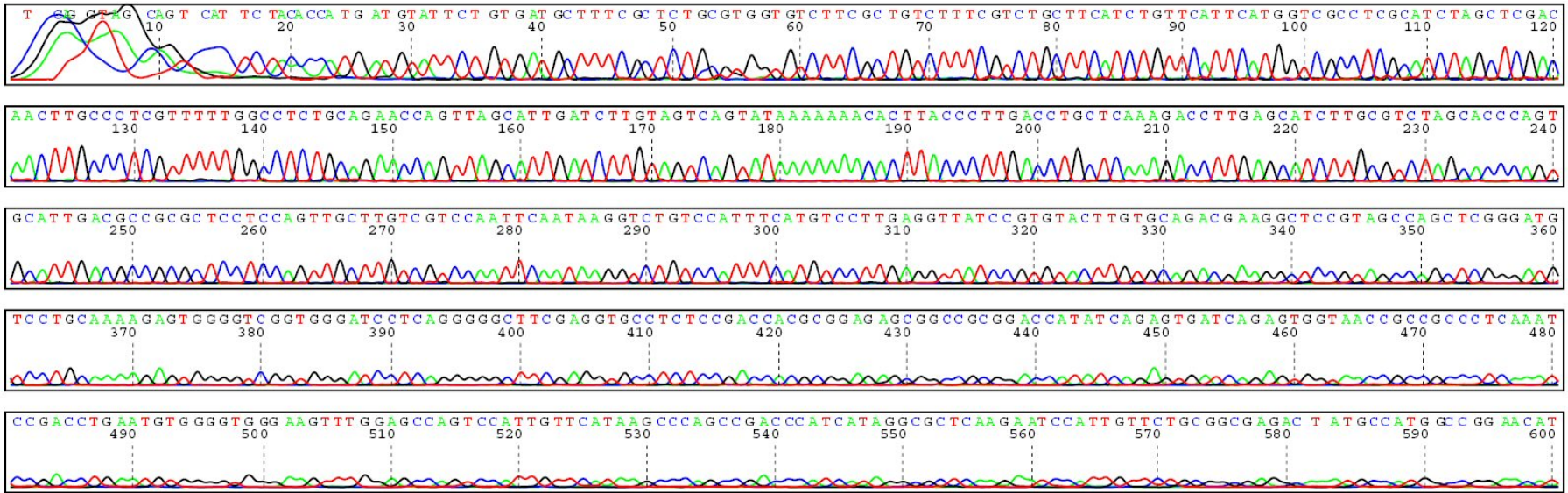
=> transformants [Amp^R] [maltose⁺] [λ^R]

Identification des gènes mutés :

séquençage de l'allèle sauvage



Séquençage par méthode de Sanger



Fonction ?

Identification des gènes mutés :
Comparaison de séquence *in silico*

Séquence nucléotidique de l'allèle sauvage



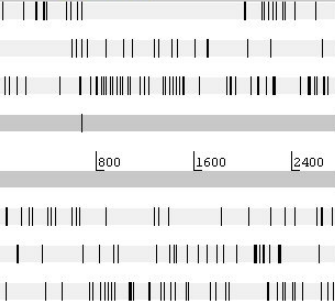
Traduction dans les 6 phases de lecture

Artemis Entry Edit: LamB.txt

File Entries Select View Goto Edit Create Write Graph Display

3 selected bases on forward strand: 676..678

Entry: ☒ LamB.txt



NTQSLSQVH*KKKKSNDSDGR[H]NITLRKLPPLAVAVAAAGVMSAQAHAVDFHGYARS GIGWTGSGGGEQQCFQTTGAQSKYRL
THKACHR*CEKRKAMTQEIE* *LLCANFLWRLPSQRA#CLLRQWLLISTAMHVPVVLVGGQVAAAVMNSVSRLLPVLKVN TVL
KHTKPV TGDVKK EKQ* LRR+ NDDYSAQTSSGGCRRSGRNVCSGNGC*FPRLCTFRYWLD R+RR*TTVPFDYRCSK#IPSW
AACACACAAAGCCTGTACAGGTGATGTGAAAAAGAAAGCAATGACTCAGGAGATAGATGATGATTACTCTGCGCAAACTTCCTCTGGCGGTTCGGCTCGCAGCGGGCGTAATGTCTGCTCAGGCAATGGCTGTTGATTTCACGGCTATGCACGTTCCGGTATTGGTTGGACAGGTAGCGGGCGGTGAACAAAGTGTTCAGAGACTACCGGTGCTCAAAGTAAATACCGTCTTC
620 640 660 680 700 720 740 760 780 800 820 840
TTGTGTGTTTCGGACAGTGTCCACTACACTTTTTCTTTCTGTTACTGAGTCCTCTATCTTACTACTAATGAGACCGCTTTGAAGGAGACCGCCAACCGCAGCGTCCGCCCGCATTACAGACGAGTCCGTTACCGACAACAAAGGTGCCGATACGTGCAAGGCCATAACCAACCTGTCCATCGCCGCCACTTGTGTGCACAAAGGTCTGATGCGCCACGAGTTTCATTATGGCAGAAC
VCLAQ* LHH SFLFAIV* SISHHNSQAFKRQRNGDCRAYHRS LCHSNIEVAICTGTNTPTCTAATFLLTELSGTS LTFVTK
CVFGTVPSTTFFSFCHSLLLYFSS#EACVEEPPQRRLLPRLTQEPLPQQNGRSHVNR YQNSLYRRRHVV TNGS+RHEFYIGDQ
FVCLRDCTIHF FFL LSEPSLIIIVRRLS GRATATAAPTIDA* AIATSKWP+AREPI PQVPLPPSCCHKWVVP A* LLYRRI

**6 protéines hypothétiques
déduites de la séquence nucléotidique**



**Algorithme « BLAST »
Basic Alignment Search Tool**

Comparaison avec des banques de protéines

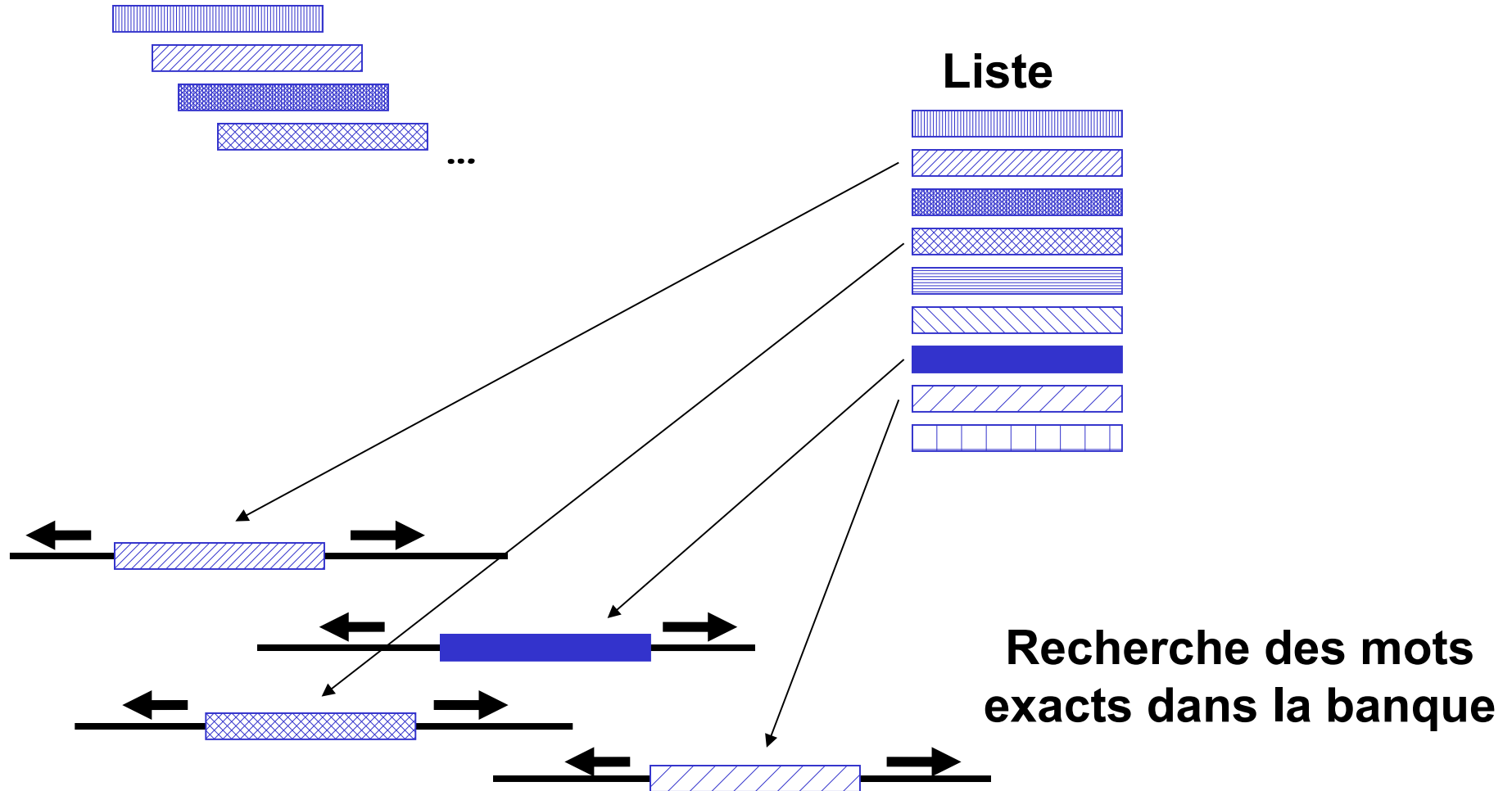
**-> recherche de similitude entre une séquence fournie
et toutes les séquences contenues dans une base de
données**



FONCTION

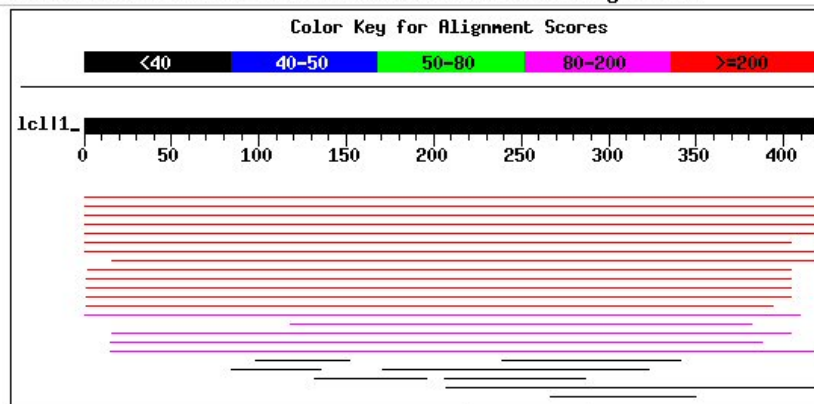
Principe d'alignement

Recherche de « mots » 3 caractères



Distribution of 27 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show define and scores. Click to show alignments



Sequences producing significant alignments:			Score (bits)	E Value
LAMB_ECOLI	(P02943)	Maltoporin precursor (Maltose-inducible porin)	887	0.0
LAMB_ECO57	(Q8X5W7)	Maltoporin precursor (Maltose-inducible porin)	872	0.0
LAMB_ECOL6	(Q8CVI4)	Maltoporin precursor (Maltose-inducible porin)	870	0.0
LAMB_SALTY	(P26466)	Maltoporin precursor (Maltose-inducible porin)	711	0.0
LAMB_SALTI	(Q8Z1T9)	Maltoporin precursor (Maltose-inducible porin)	710	0.0
LAMB_KLEPN	(P31242)	Maltoporin precursor (Maltose-inducible porin)	653	0.0
LAMB1_YERPE	(Q8ZAS9)	Maltoporin 1 precursor (Maltose-inducible p...	634	0.0
LAMB_YEREN	(Q56850)	Maltoporin (Maltose-inducible porin) (Fragment)	605	e-172
LAMB_AERSA	(Q44287)	Maltoporin precursor (Maltose-inducible porin)	288	2e-77
LAMB1_VIBPA	(P59494)	Maltoporin precursor (Maltose-inducible porin)	269	1e-71
LAMB2_AERHY	(Q8KKH1)	Maltoporin precursor (Maltose-inducible porin)	263	8e-70
LAMB1_AERHY	(Q8KKH0)	Maltoporin precursor (Maltose-inducible porin)	263	8e-70
LAMB_VIBCH	(Q56652)	Maltoporin precursor (Maltose-inducible porin)	207	4e-53
LAMB2_YERPE	(Q8ZHP0)	Maltoporin 2 precursor (Maltose-inducible p...	185	2e-46
LAMB2_VIBPA	(Q56714)	Maltoporin (Maltose-inducible porin) (Outer...	122	2e-27
YIEC_ECOLI	(P26218)	Putative outer membrane protein yieC precursor	93	1e-18

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

>LAMB_ECOLI (P02943) 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  VAVAAGVMSAQAMAVDFHGYARSGIGWTGSGGEQQCFQTTGAQSKYRLGNECETYAELKL 60
          VAVAAGVMSAQAMAVDFHGYARSGIGWTGSGGEQQCFQTTGAQSKYRLGNECETYAELKL
Sbjct: 12 VAVAAGVMSAQAMAVDFHGYARSGIGWTGSGGEQQCFQTTGAQSKYRLGNECETYAELKL 71

Query: 61  GQEVWKEGDKSFYFDTNVAYSVAQQNDWEATDPAFREANVQGKNLIEWLPGSTIWAGKRF 120
          GQEVWKEGDKSFYFDTNVAYSVAQQNDWEATDPAFREANVQGKNLIEWLPGSTIWAGKRF
Sbjct: 72  GQEVWKEGDKSFYFDTNVAYSVAQQNDWEATDPAFREANVQGKNLIEWLPGSTIWAGKRF 131

Query: 121 YQRHVDVHMIDFYYWDISGPGAGLENIDVGFGLSLAATRSSEAGGSSSFASNNIYDYTNE 180
          YQRHVDVHMIDFYYWDISGPGAGLENIDVGFGLSLAATRSSEAGGSSSFASNNIYDYTNE
Sbjct: 132 YQRHVDVHMIDFYYWDISGPGAGLENIDVGFGLSLAATRSSEAGGSSSFASNNIYDYTNE 191

Query: 181 TANDVFDVRLAQMEINPGGTLELGVDYGRANLRDNYRLVDGASKDGLFTAEHTQSVLKG 240
          TANDVFDVRLAQMEINPGGTLELGVDYGRANLRDNYRLVDGASKDGLFTAEHTQSVLKG
Sbjct: 192 TANDVFDVRLAQMEINPGGTLELGVDYGRANLRDNYRLVDGASKDGLFTAEHTQSVLKG 251

Query: 241 FNKFVVQYATDSMTSQGKGLSQSGVAFDNEKFAYNINNNGHMLRILDHGAISMGNWDM 300
          FNKFVVQYATDSMTSQGKGLSQSGVAFDNEKFAYNINNNGHMLRILDHGAISMGNWDM
Sbjct: 252 FNKFVVQYATDSMTSQGKGLSQSGVAFDNEKFAYNINNNGHMLRILDHGAISMGNWDM 311

Query: 301 MYVGMYQDINWDNDNGTKWWTVGIRPMYKWTPIMSTVMEIGYDNVESQRTGDKNNQYKIT 360
          MYVGMYQDINWDNDNGTKWWTVGIRPMYKWTPIMSTVMEIGYDNVESQRTGDKNNQYKIT
Sbjct: 312 MYVGMYQDINWDNDNGTKWWTVGIRPMYKWTPIMSTVMEIGYDNVESQRTGDKNNQYKIT 371

Query: 361 LAQQWQAGDSIWSRPAIRVFATYAKWDEKWGYDYTGADNNANFGKAVPADFNNGGSFGRG 420
          LAQQWQAGDSIWSRPAIRVFATYAKWDEKWGYDYTGADNNANFGKAVPADFNNGGSFGRG
Sbjct: 372 LAQQWQAGDSIWSRPAIRVFATYAKWDEKWGYDYTGADNNANFGKAVPADFNNGGSFGRG 431

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

-> identité parfaite

>LAMB1_YERPE (Q8ZAS9) Maltoporin 1 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 VAVAAGVMSAQAMAVDFHGYARSGIGWTGSGGEQQCFQTTGAQSKYRLGNECETYAELKL 60
+AVAAGV+S QAMAVDFHGYARSGIGWT SGGEQQCFQTTGAQSKYRLGNECETYAELKL
Sbjct: 11 LAVAAGVLSTQAMAVDFHGYARSGIGWTASGGEQQCFQTTGAQSKYRLGNECETYAELKL 70

Query: 61 GQEVWKEGDKSFYFDTNVAYSVAQQNDWEATDPAFREANVQGKNLIEWLPGSTIWAGKRF 120
GQE+WKEGDKSFY DTNVAYSV+Q++DWE+TDPAFREANVQGKNLIE LPGSTIWAGKRF
Sbjct: 71 GQELWKEGDKSFYLDTNVAYSVSQRDDWESTDPAFREANVQGKNLIESLPGSTIWAGKRF 130

Query: 121 YQRHVDVHMIDFYYWDISGPGAGLENIDVGFGLSLAATRSSEAGGSSSFASNNIYDYTNE 180
YQRHVDVHMIDFYYWDISGPGAGLE ID+GFGKLS+AATR+SE+GGSS++ N +
Sbjct: 131 YQRHVDVHMIDFYYWDISGPGAGLETIDLGFGLSVAATRNSSEGGSSAWIDNQ-RENAKY 189

Query: 181 TANDVFDVRLAQMEINPGGTLELGVDYGRANLRDNYRLVDGASKDGWLF TAEHTQS VLKG 240
T N+V+DVRLA +E NPGG+LELGVDYGRA+ ++ Y L ASKDG + TAEHTQS++ G
Sbjct: 190 TINNVYDVRLAGLETNPGGSLELGVDYGRADTQEGYSLAPNASKDGVMLTAEHTQSLMGG 249

Query: 241 FNKFVVQYATDSMTSQGKGLSQGSGVAFDNEKFAYNINNNGHMLRILDHGAISMGDNWDW 300
FNKFVVQYATDSMTS G SQG+ ++NNNGH+LR++DHGAI++ + WDM
Sbjct: 250 FNKFVVQYATDSMTSYNTGHSQGT-----SVNNNGHLLRVIDHGAINLAEKWDM 298

Query: 301 MYVGM YQDINWDNDNGTKWWTVGIRPMYKWTPIMSTVMEIGYDNVESQRTGDKNNQYKIT 360
MYV +YQDI+ DN+NG W++VG+RPMYKWTPIMST++E GYDNV+SQ TG++N QYK+T
Sbjct: 299 MYVALYQDIDLDNNGNTWYSVGVRPMYKWTPIMSTLLEAGYDNVKSQHTGERNGQYKLT 358

Query: 361 LAQQWQAGDSIWSRPAIRVFATYAKWDEK WGYDYTG NADNNANFGKAVPADFNNGGSFG 418
LAQQWQAGDSIWSRPAIRVFATYA WDEK WGY T + G N +FG
Sbjct: 359 LAQQWQAGDSIWSRPAIRVFATYANWDEK WGYSDTTGVAQDGTIGTNSRGKNNEVTFG 416

>LAMB_AERSA (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  VAAGVMSAQAMAVDFHGYARSGIGWTGSGGEQQCFQTTGAQSKYRLGNECETYAELKLGQ 62
      V A + S A AVDFHGY RSG+G + G Q Q RLGNE +TY E++LG
Sbjct: 14 VTAALASQAFAVDFHGYFRSGVGVSTDGSMTGLSDNAKQKVGRLGNEADTYGEIQLGS 73

Query: 63  EVWKEGDKSFYFDTNVAYSVAQQNDWEATDPAF-----REAN 99
      EV+ + K+FY D+ VA + NDWE+T+ F R+ N
Sbjct: 74  EVFNKDGKTFYVDSMVAMTSNGSNDWESTESKFQCTSANGTALDGCENKEDATFALRQFN 133

Query: 100 VQGNLIEWLPGSTIWAGKRFYQHRDVMIDFYWDISGPGAGLENIDVGFGLSLAATR 159
      VQ K L+ + P +T+WAGKR+YQHRDVM+ DFYYW+ISG GAG+E I G GK+S A R
Sbjct: 134 VQAKGLLGFAPEATLWAGKRYRQHRDVHISDFYYWNISGRGAGIEGIQAGPGKVSFAWVR 193

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

Query: 220 DGA----SKDGWLFTEHTQSVLKGFNKFVVQYATDSMTSQGKGLSQGSGVAFDNEKFAY 275
      A +KDG + TAE TQ +L GFNK V+QY T+ G S+ D +
Sbjct: 248 ANAQYKNAKDGVMLTAELTQGILGGFNKTVLQYGTE-----GYSKTFAFWGDRSWYGA 300

Query: 276 NINNNGHMLRILDHGAISMGDNWDMMYVGMVQDINWDNDNGTKWWTVGI--RPMYKWTPI 333
      + RI++HG I MG++W+M + +Y N D KW T+ + RPMYKW
Sbjct: 301 EAKDGADGFRIINHGVIPMGNSWEMGHQLVYGVGNDMWDNDNDKWEVMSVVARPMYKWDDF 360

Query: 334 MSTVMEIGY---DNVESQRTGDKNNQYKITLAQQWQAGDSIWSRPAIRVFATYAKWDEKW 390
      T+ E GY N + T +++ YK+TLAQ W AG S W+RP IRVFA+Y D+K
Sbjct: 361 NKTIFEGGYFKDKNKSTNGTSEEDAGYKLTLAQAWSAGSSFWARPEIRVFASYLAQDKK- 419

Query: 391 GYDYTGADNNA-----NFG 405
      + GNA NN NFG
Sbjct: 420 --EMKGNFNGGTADDTWNFG 438
```

Allèle A⁺ : LamB

-> Transporteur maltose = protéine membranaire

Artemis Entry Edit: LamB.txt

File Entries Select View Goto Edit Create Write Graph Display

Selected feature: bases 1338 amino acids 446 CDS {}

Entry: ☒ LamB.txt

CDS

800 1600 2400

S G D R M M I T T I R K I P L A Y A V A A G V M S A Q A M A V D F H G Y A R S G I E V T G S G G F D Q C F O T T G A Q S K Y R I G W E C E T Y A F E I K L G Q F V

Q E I E * * L L C A N F L W R L P S Q R A # C L L R Q W L L I S T A M H V P V L V G Q V A A V N N S V S R L P V L K V N T V L A T N V K L M L N # N W V R K C

R R + N D D Y S A Q T S S G G C R R S G R N V C S G N G C * F P R L C T F R Y W L D R + R R * T T V F P D Y R C S K # I P S W Q R M * N L C * I K I G S G S V

C A G G A T A G A A T G A T T A C T C T G C G C A A A C T T C C T C T G G C G G T T G C C G T C G C A G C G G G C G T A A T G T C T G C T C A G G C A A T G G C T G T T G A T T T C C A C G G C T A T G C A C G T T C C G G T A T T G G T T G G A C A G G T A G C G G G G T G A A C A C A C A G T G T T C C A G A C T A C C G G T G C T C A A A G T A A A T A C C G T C T T G G C A A C G A A T G T G A A C T T A T G C T G A A T T A A A A T T G G G T C A G G A A G T G T

680 700 720 740 760 780 800 820 840 860 880 900

G T C C T C T A T C T T A C T A A T G A G A C G C G T T G A A G G A G A C G C C A A C G G C A G C G T C G C C G C A T T A C A G A C A G T C C G T T A C C G A C A C T A A A G G T G C C G A T A C G T G C A A G G C A T A C C A A C C T G C C A T C G C C G C C A C T T G T T G T C A C A A A G T C T G A T G G C C A C G A G T T T C A T T A T G G C A G A A C C G T T G C T T A C A C T T T G A A T A C G A C T T A A T T T A A C C C A G T C C T T C A C A

* S I S H H N S Q A F K R Q R N G D C R A Y H R S L C H S N I E V A I C T G T N T P C T A A T F L L T E L S G T S L T F V T K A V F T F S I S F # F Q T L F H I

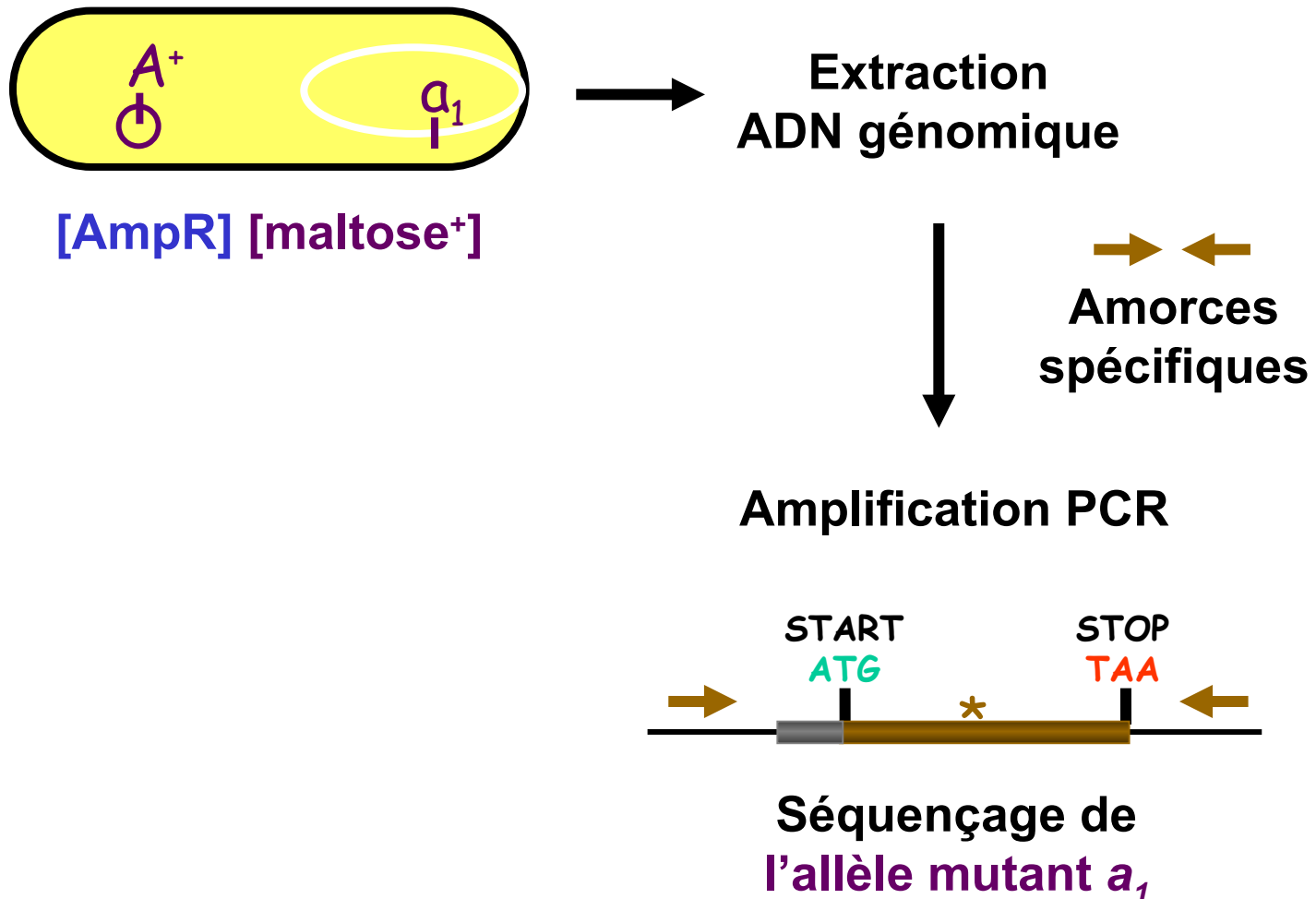
L L Y F S S # E A C V E E P P Q R R L P R L T Q E P L P Q Q N G R S H V N R Y Q N S L Y R R H V V T N G S + R H E F Y I G D Q C R I H F K H Q I L I P D P L T

P S L I I I V R R L S G R A T A T A A P T I D A * A I A T S K W P + A R E P I P Q V P L P P S C C H K W V V P A * L L Y R R P L S H S V # A S N F N P * S T H

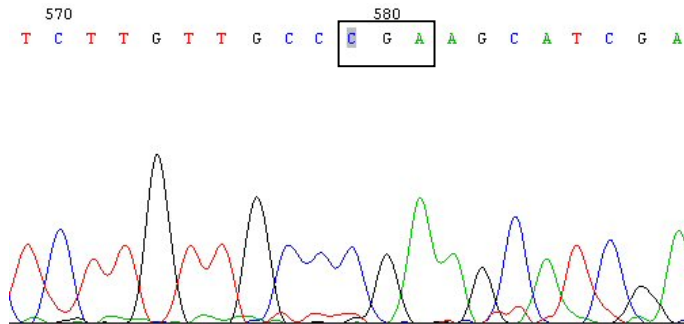
CDS 676 2013

Identification des gènes mutés :

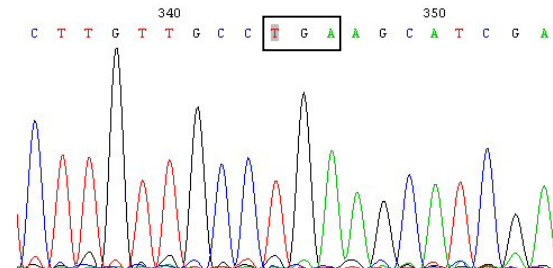
séquençage de l'allèle muté



Allèle A⁺



Allèle a₁



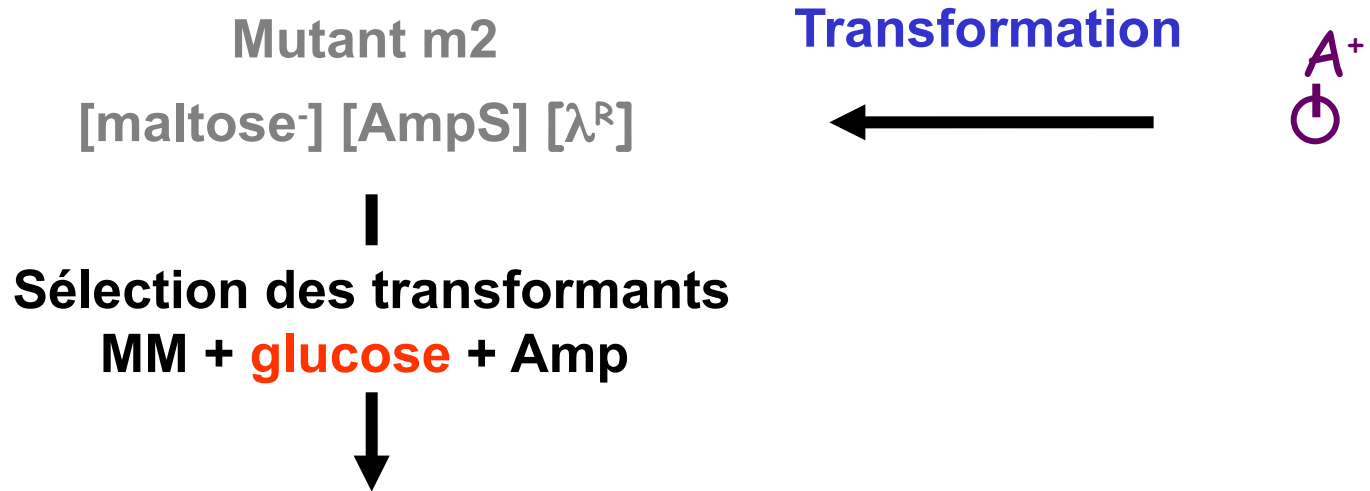
CGA -> **TGA**
Arg **STOP**

Mutation non sens
Protéine tronquée
Allèle nul

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

mutant m2 : mutation localisée dans le même gène A ?

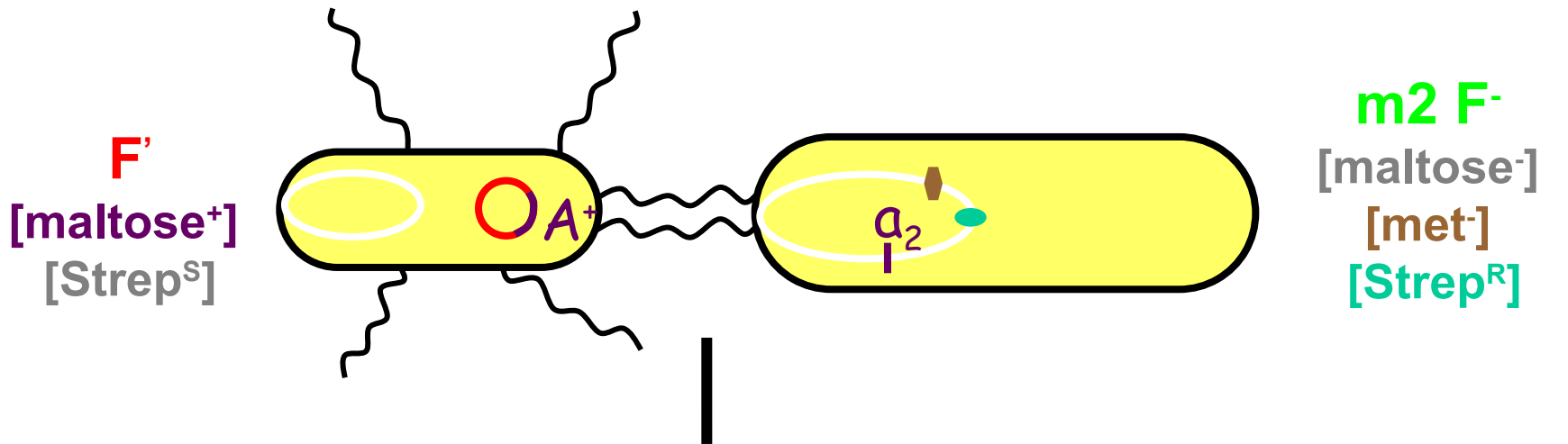
Transformation



Si [Amp^R] => [maltose⁻] alors gène muté $\neq A$

Si [Amp^R] => [maltose⁺] alors gène muté = A
a₂ nouvel allèle mutant du gène A

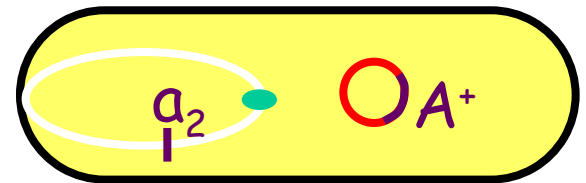
Conjugaison : mérodiplôïdes



Sélection des conjuguants

mérodiplôïdes

MM + glucose + Strep



Si [Strep^R] => [maltose⁻] alors gène muté $\neq$ A

Si [Strep^R] => [maltose⁺] alors gène muté = A

a₂ nouvel allèle mutant du gène A

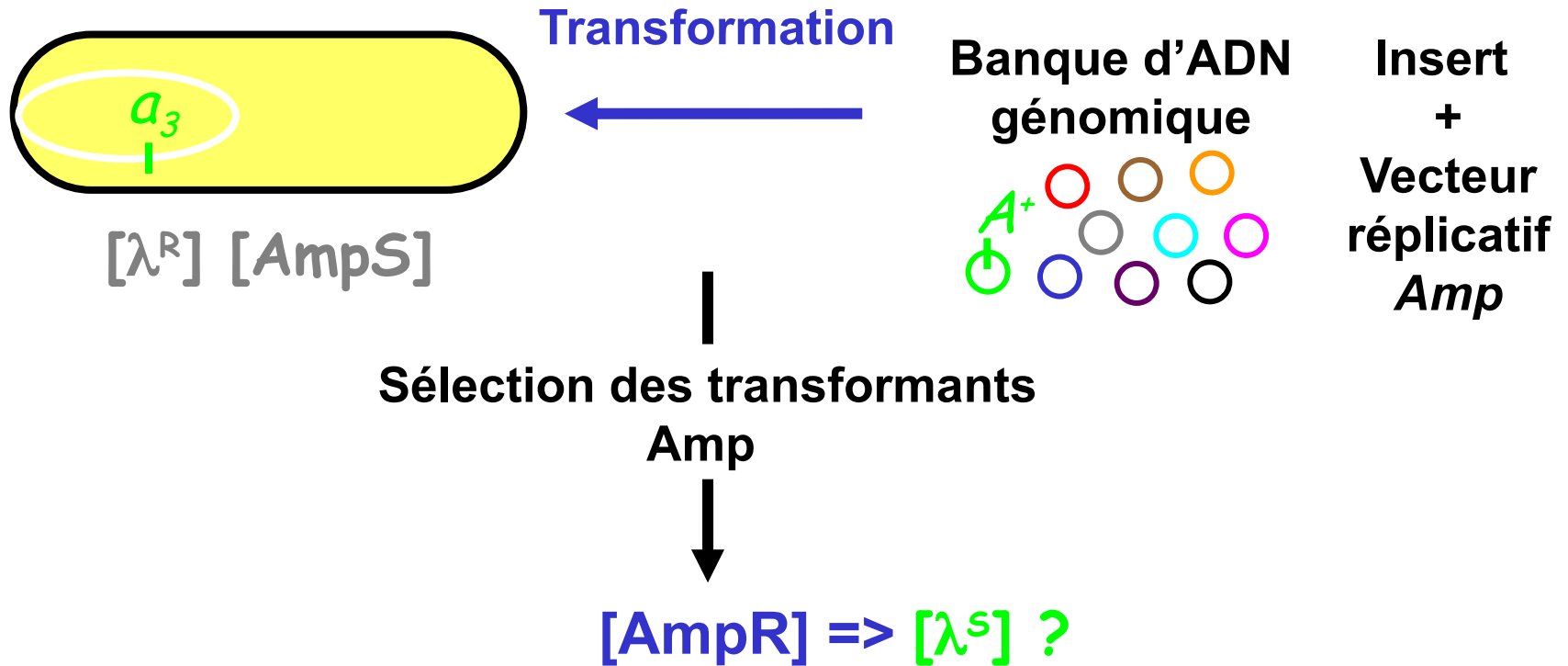
❖ 2 mutants m1 et m2 -> [λ^R] et [maltose⁻]

-> 2 allèles du gène A qui code LamB

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

-> gène(s) impliqué(s) ?

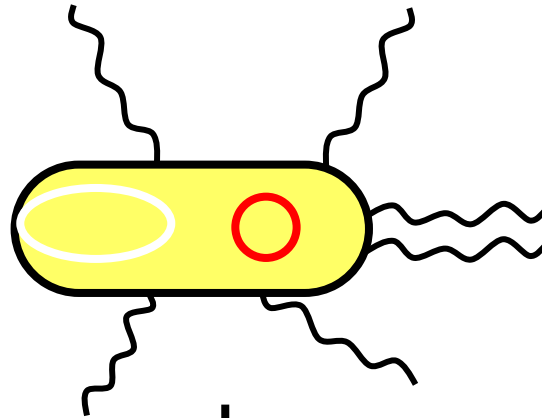
Clonage par complémentation



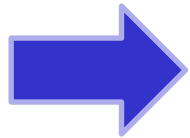
Si λ^R DOMINANT sur λ^S impossible !

Stratégie expérimentale ?

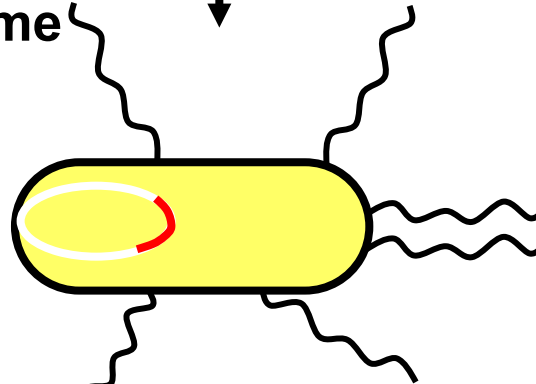
F⁺



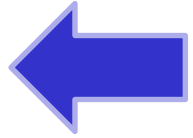
**Intégration
F dans chromosome**



Hfr



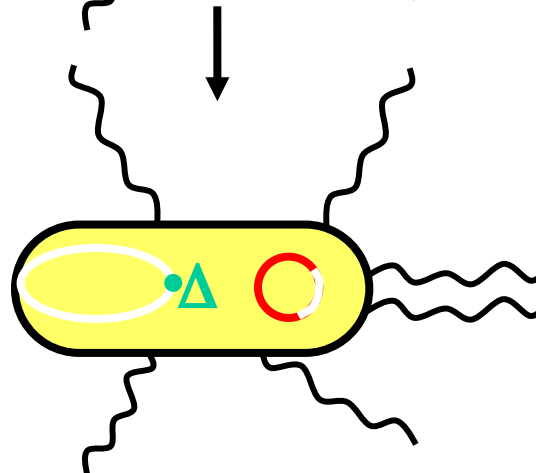
**Haute
fréquence de
recombinaison**



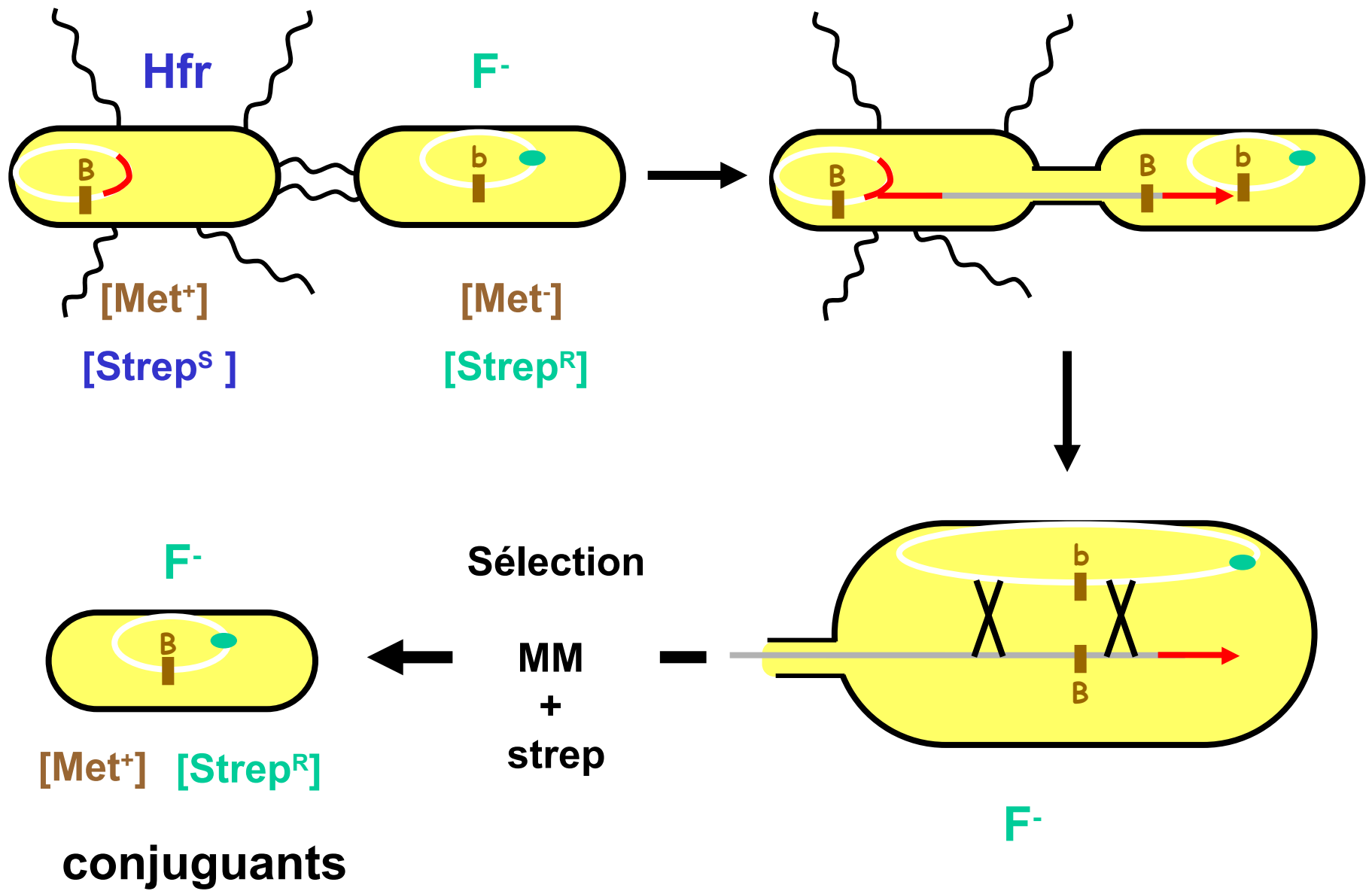
Excision de F



F'

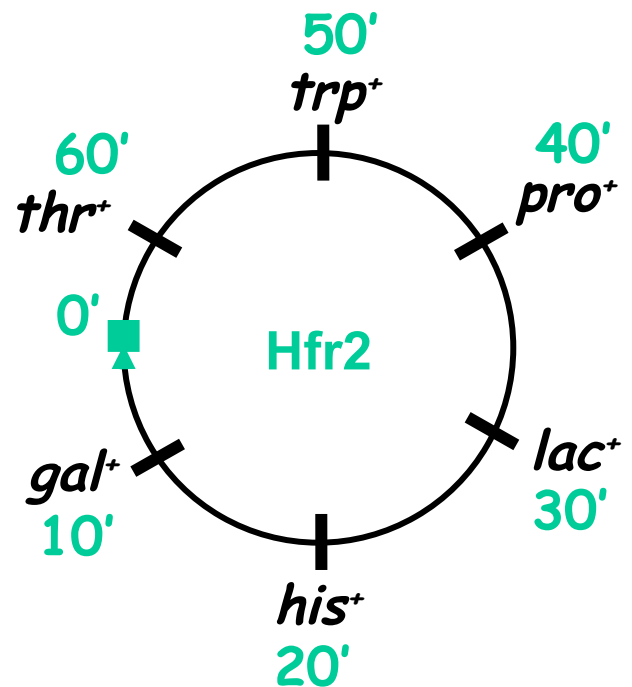
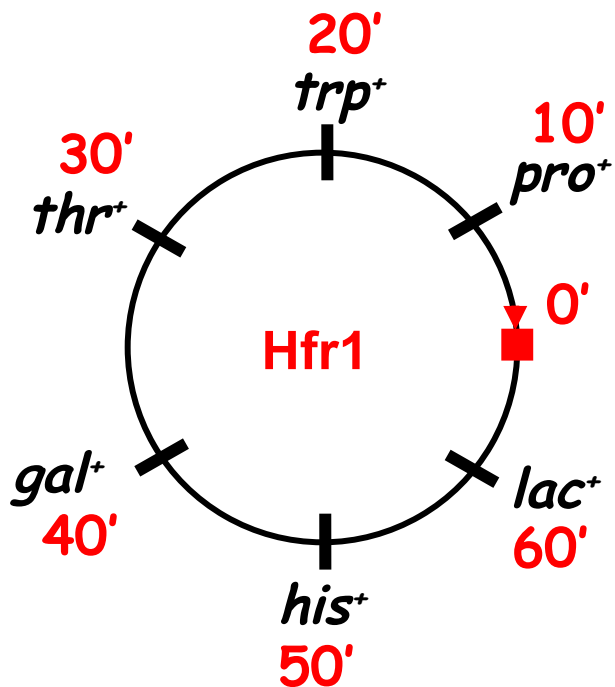
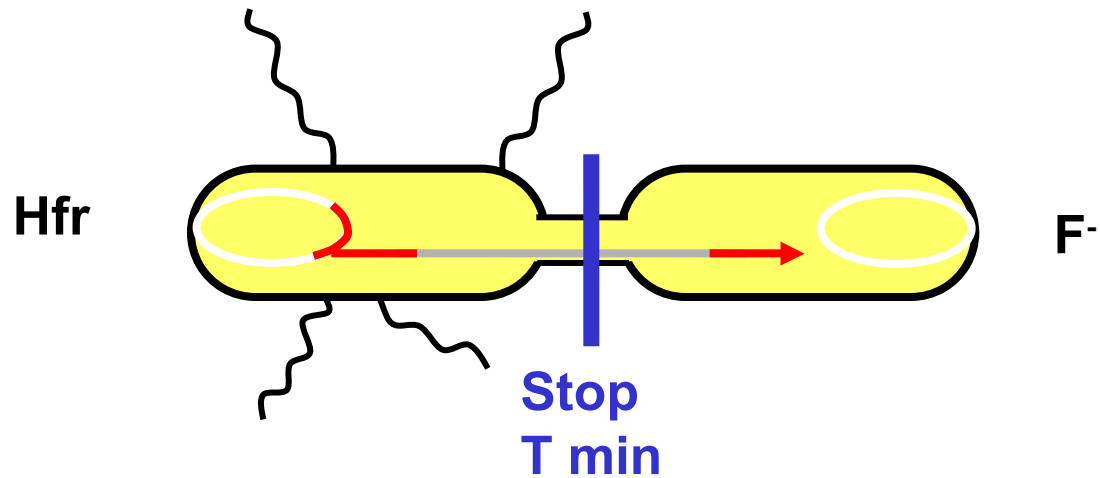


**F' portant une
délétion
chromosomique**

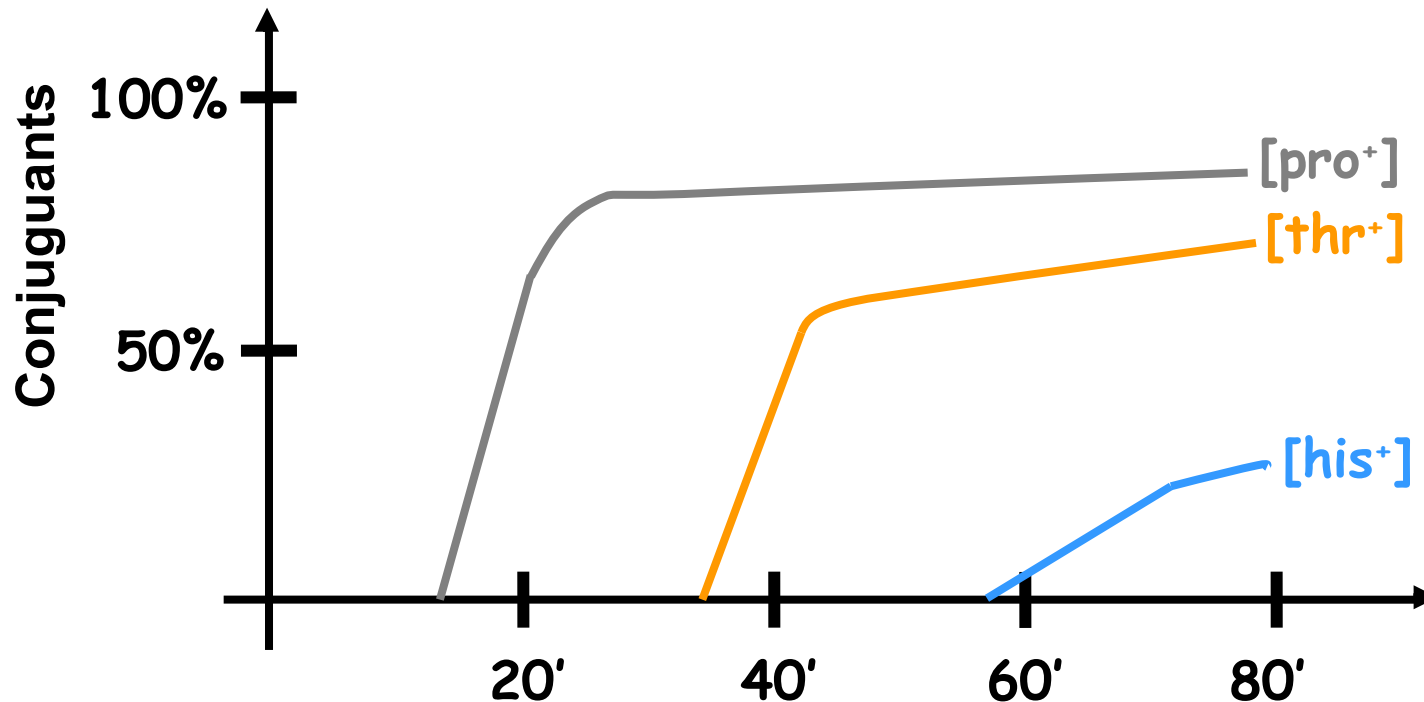
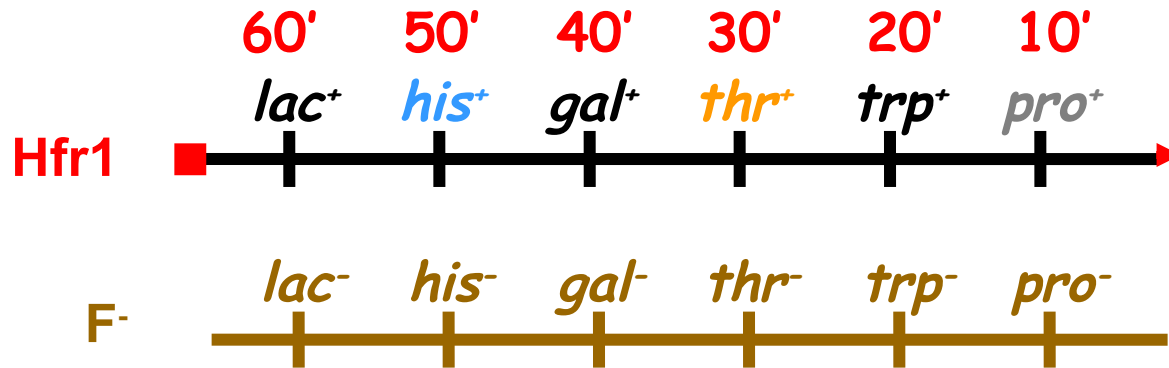


➡ **Variabilité génétique dans les populations**

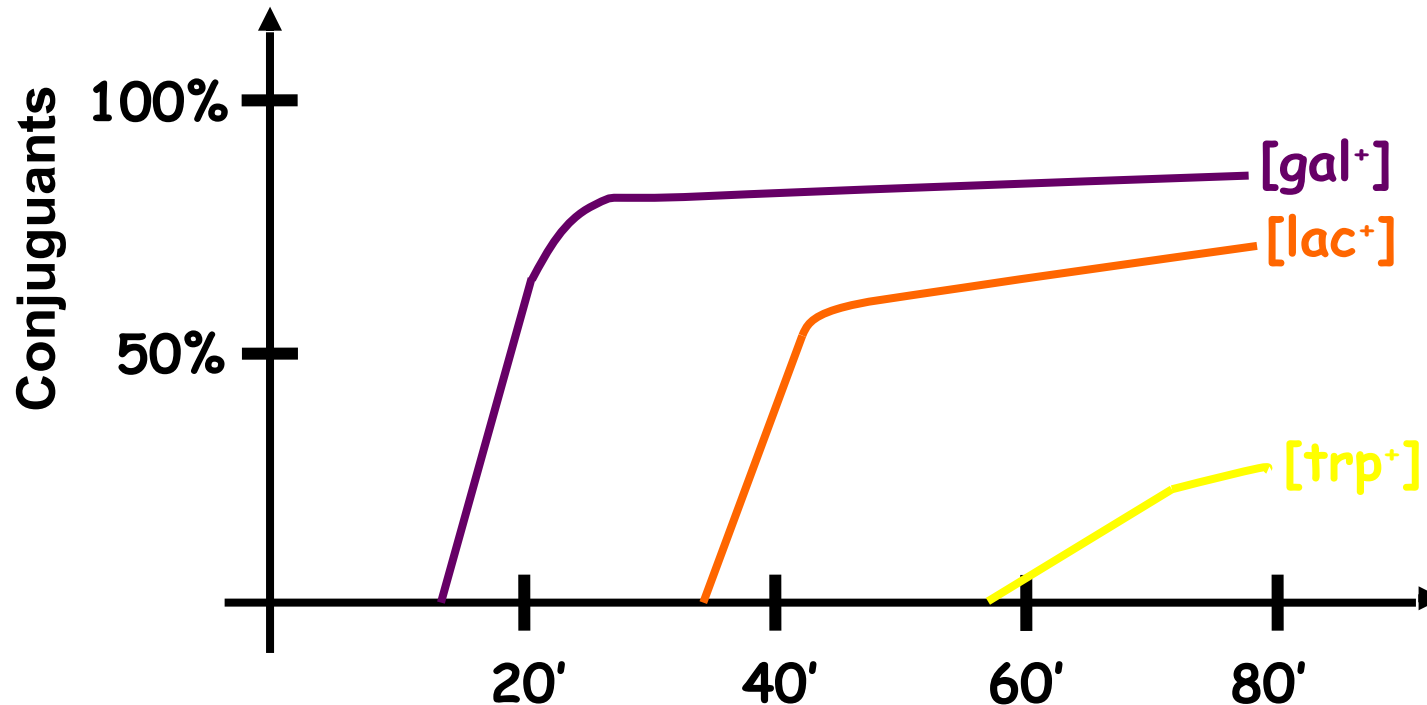
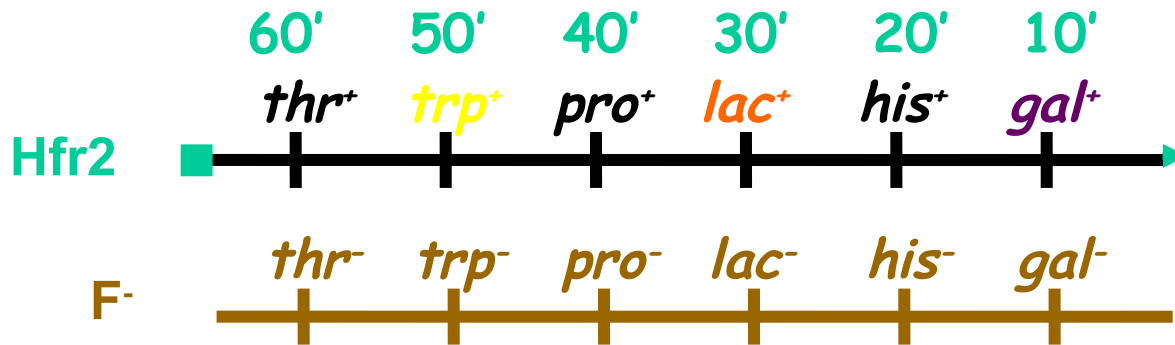
Expériences de conjugaisons interrompues



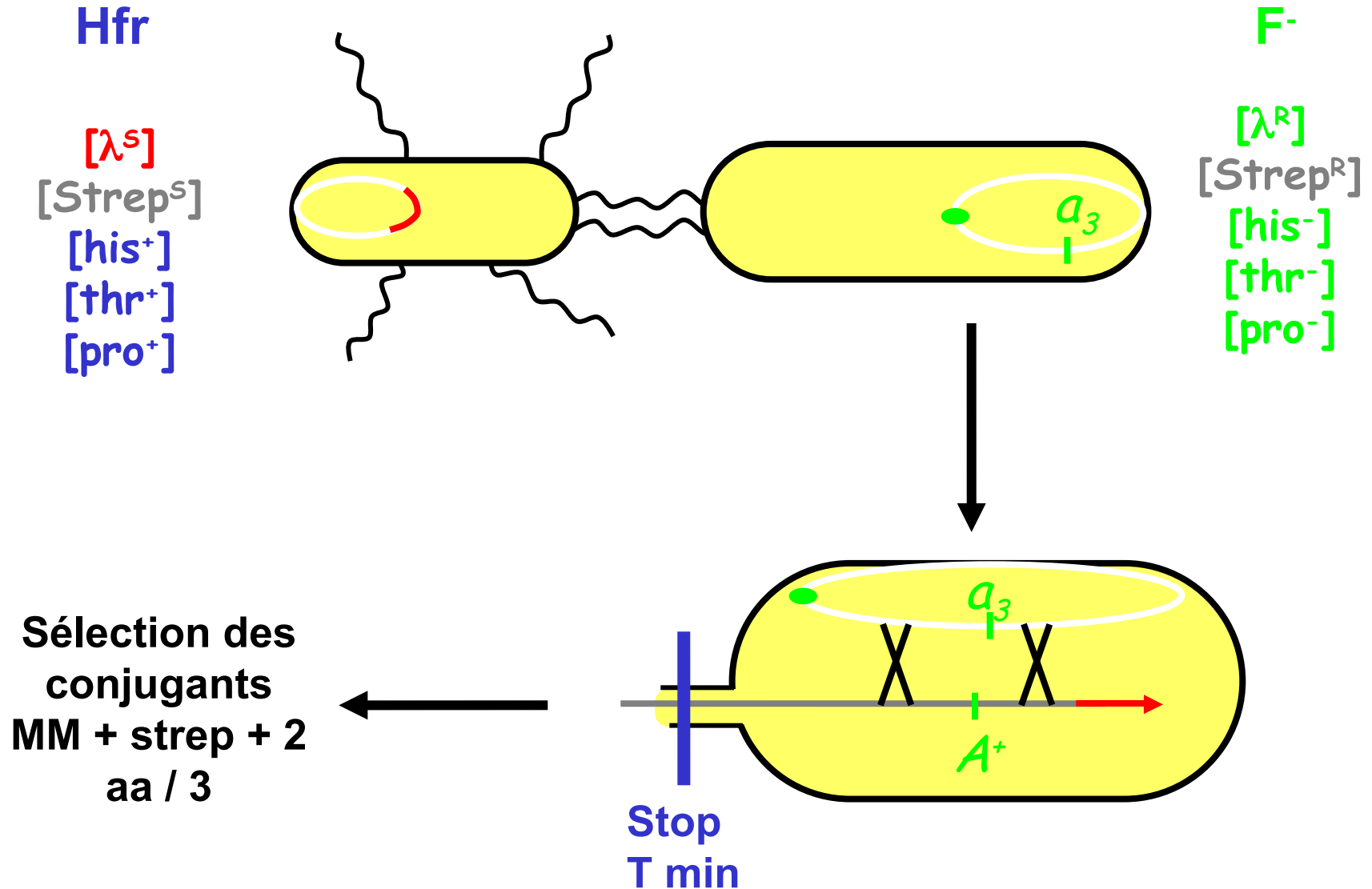
Cartographie du chromosome bactérien



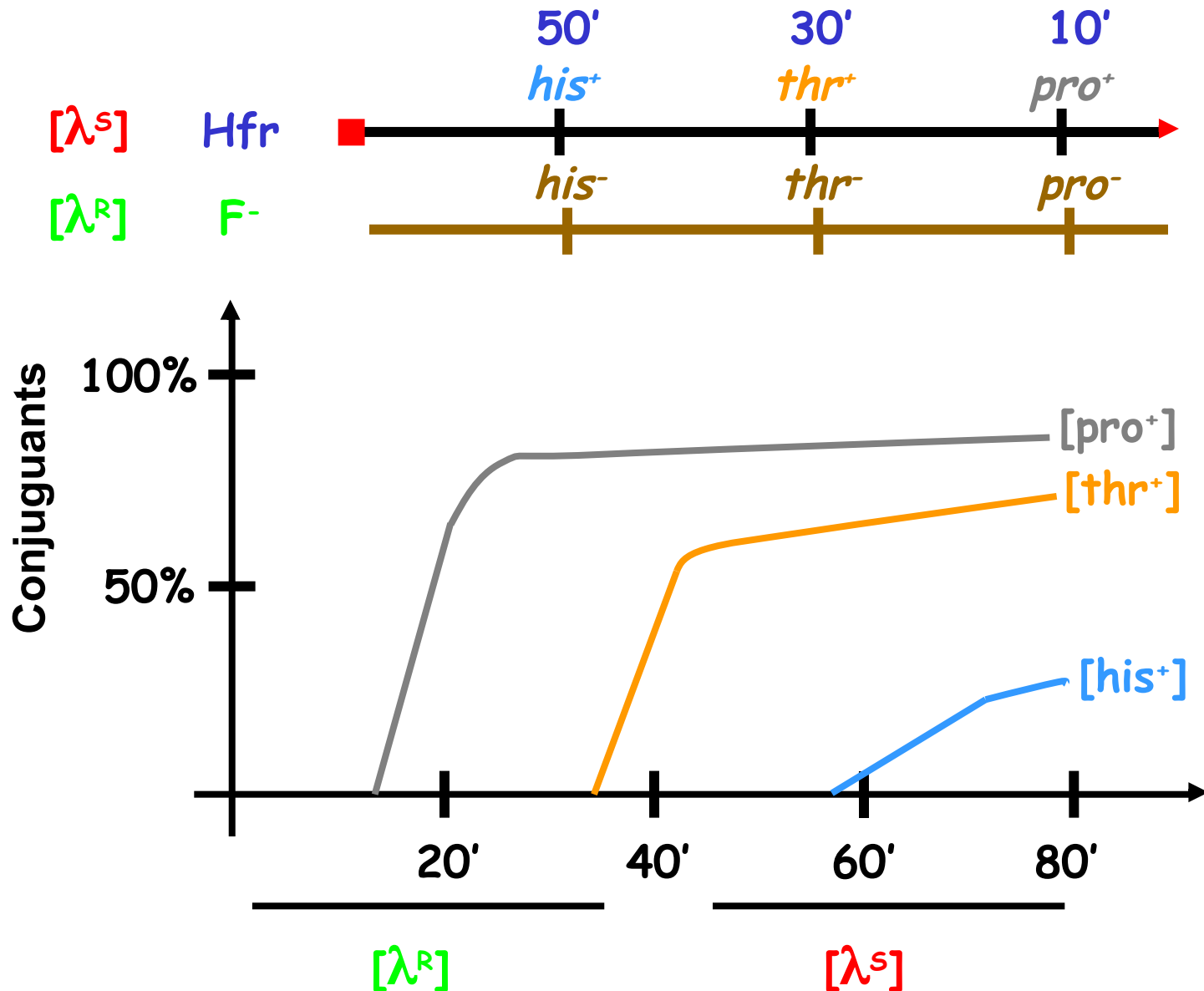
Cartographie du chromosome bactérien

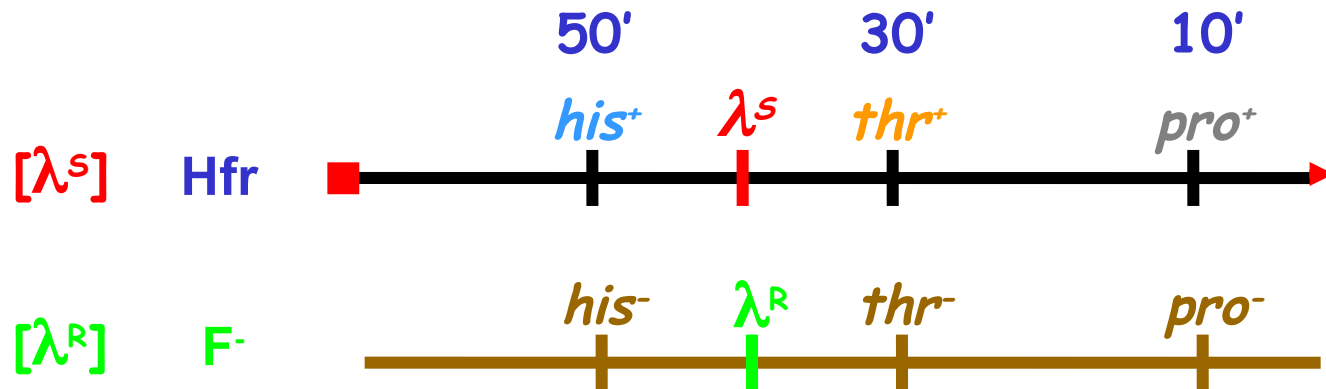


Identification des gènes mutés : **cartographie**



Identification des gènes mutés : **cartographie**





Localisation plus fine avec nouveaux marqueurs :

-> identification du gène muté : *LamB* !

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

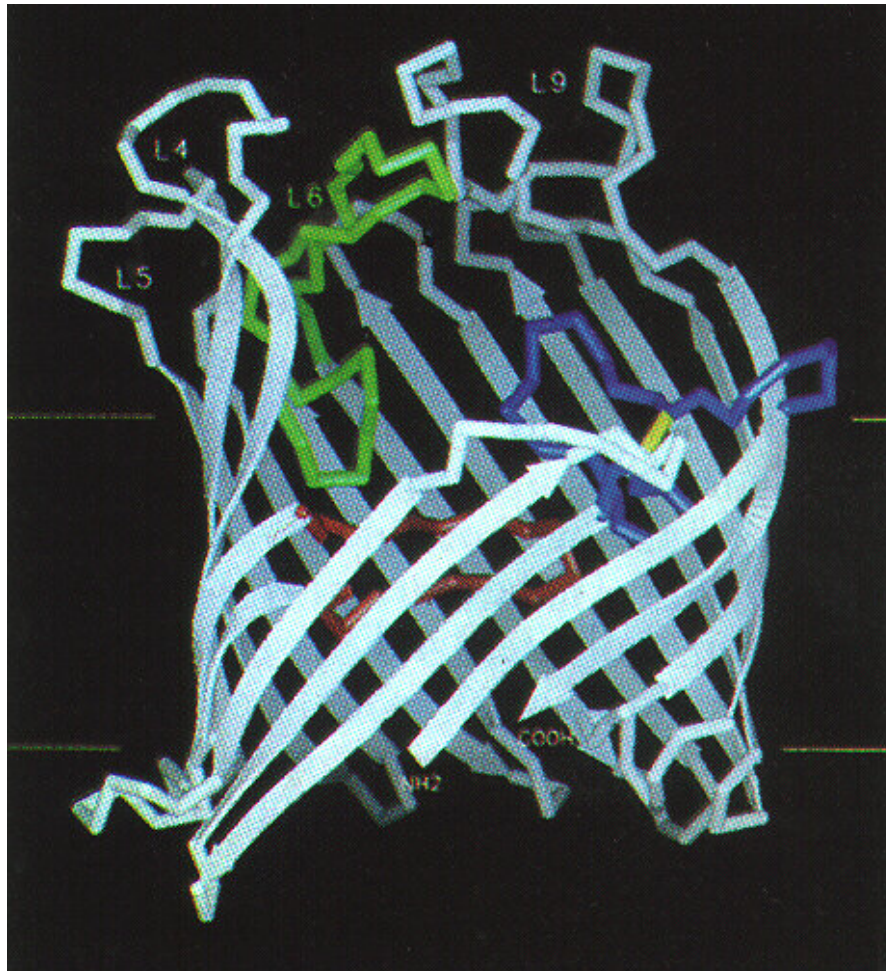
❖ 2 mutants m3 et m4 [λ^R] et [maltose⁺]

Mutation faux -sens :

substitutions position 155 (m3) et 401 (m4)

1 seul gène, *LamB*, 4 allèles différents

Structure cristallographique de LamB

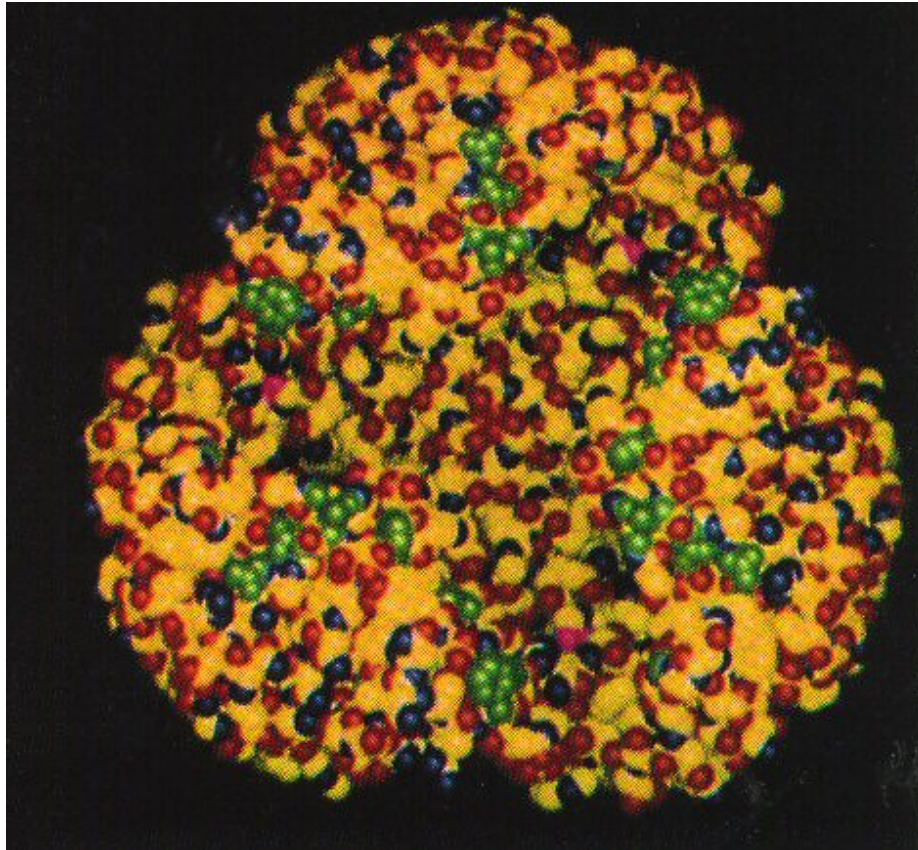


Extérieur

Membrane externe

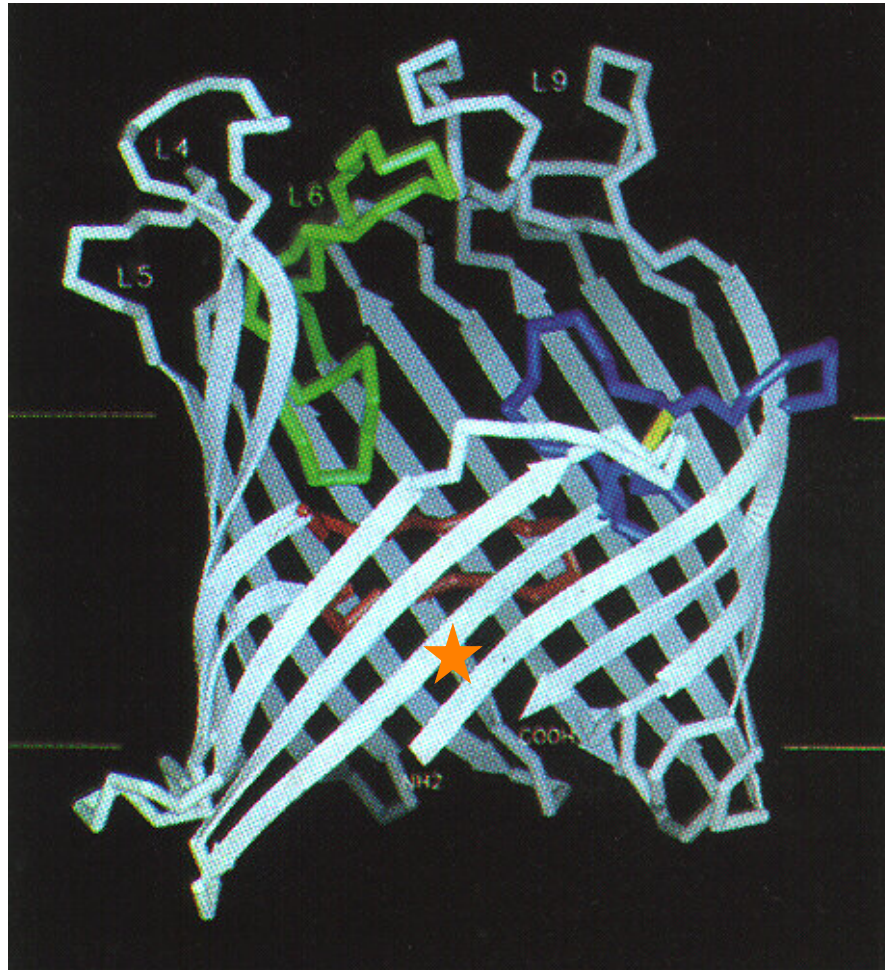
**Espace
périplasmique**

Maltoporine : un pore homotrimérique



En vert -> [λ^R] et [maltose⁺]

-> m3 et m4



Etoile orange m2 -> $[\lambda^R]$ et [maltose]

Invalidation par remplacement de gène : disruption

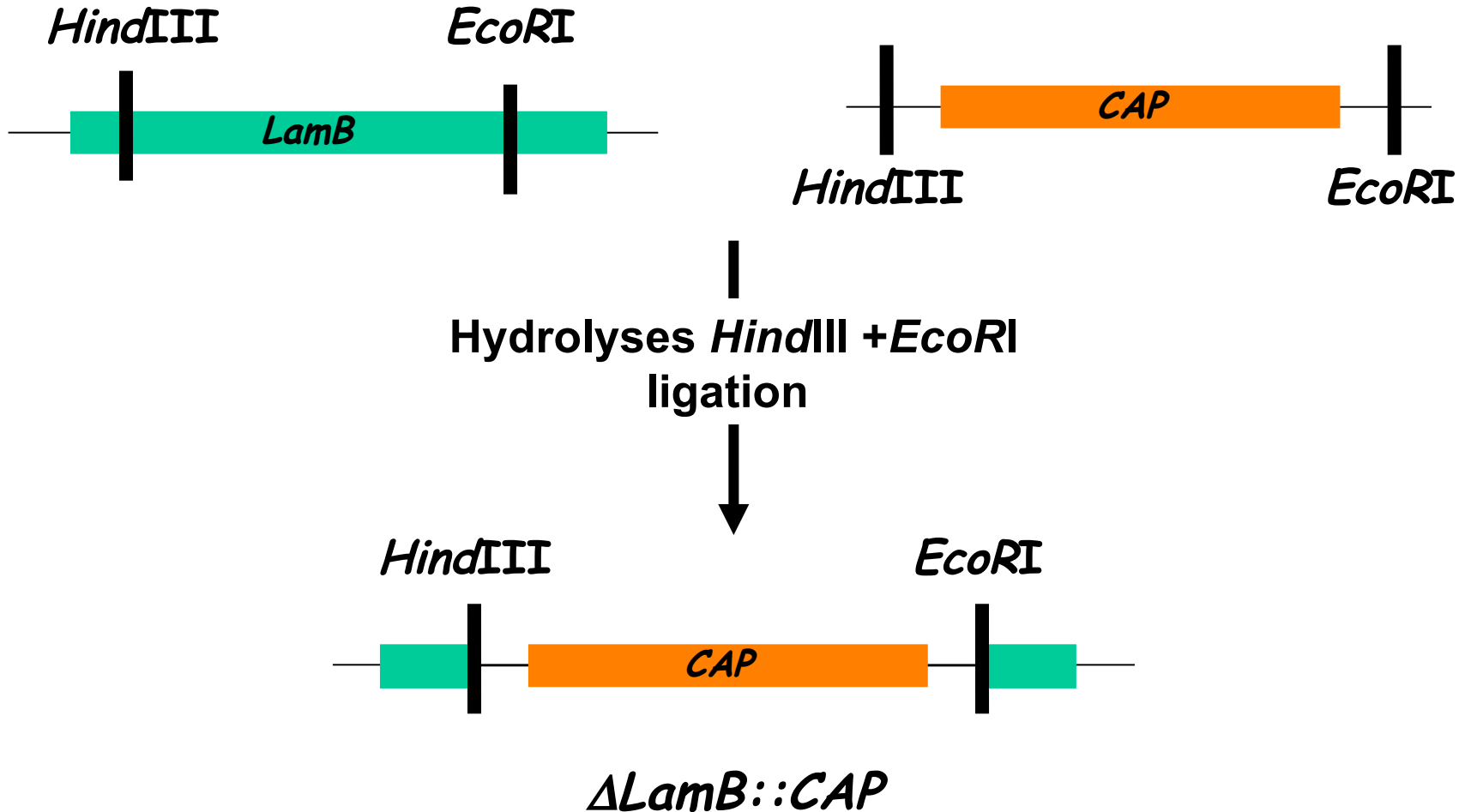
**Principe : substitution d'un allèle nul au locus d'un
allèle sauvage**

1- Construction de l'allèle muté

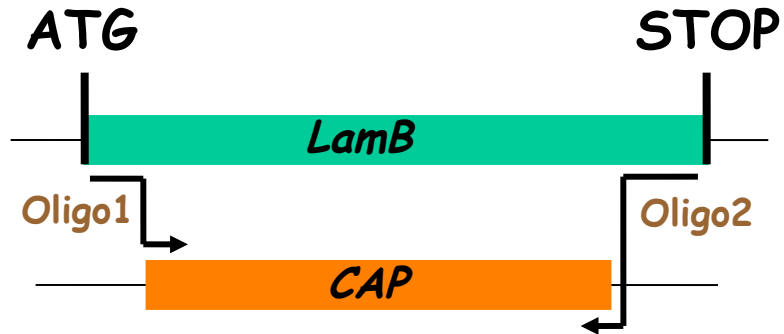
2- Transformation

3- Recombinaison homologue au locus du gène ciblé

Construction par restriction



Construction par PCR

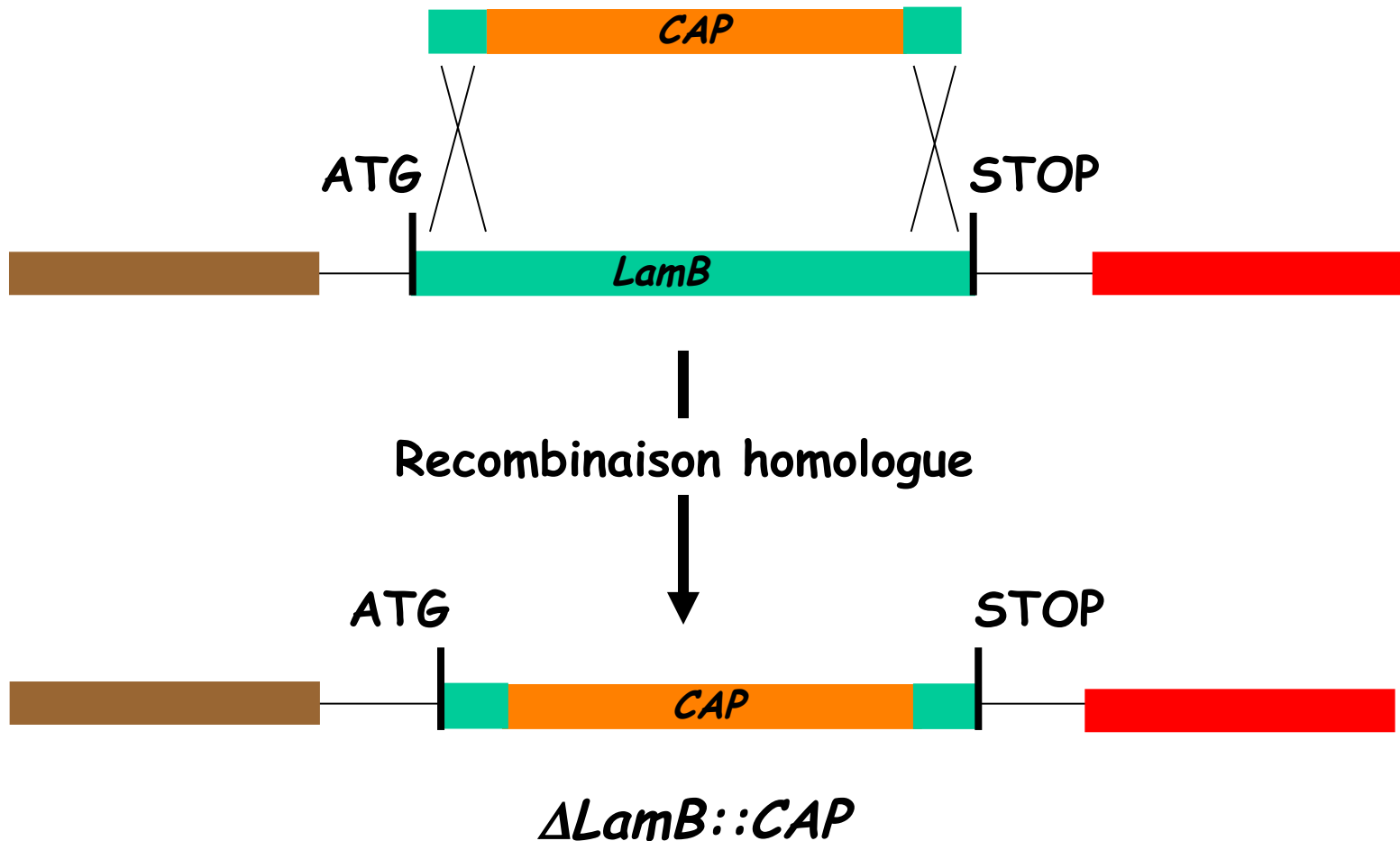


PCR



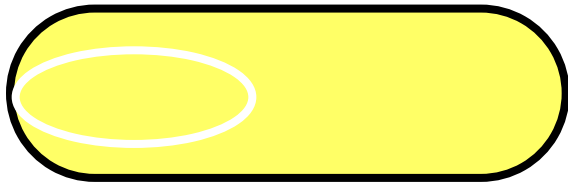
$\Delta LamB::CAP$

Remplacement de gène *in vivo* par recombinaison homologue



Sélection des délétants

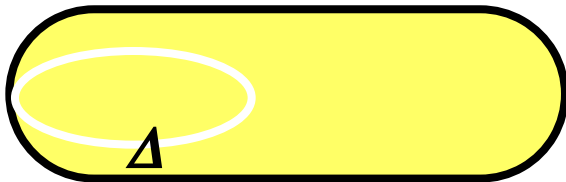
[maltose⁺] [λ^S] [CAP^S]



Transformation



MM + **glucose** + CAP

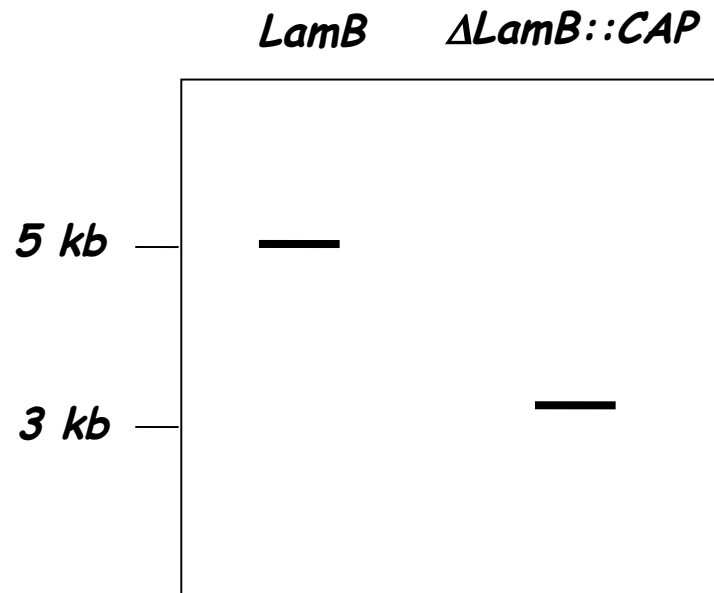
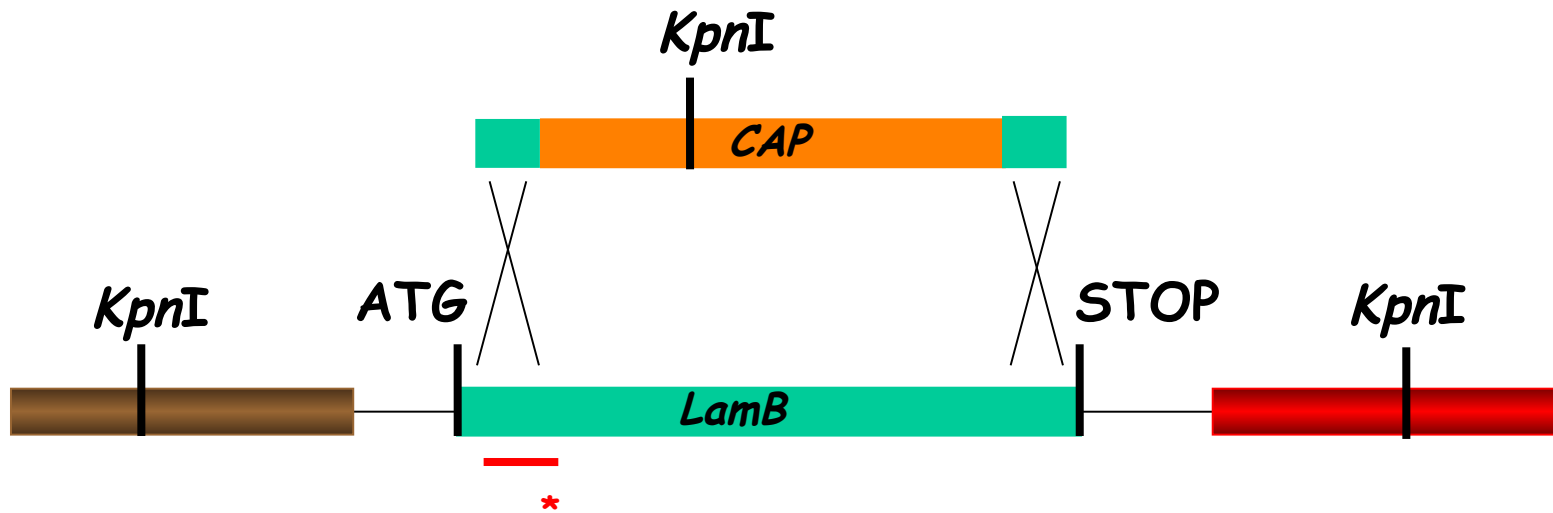


$\Delta LamB::CAP$



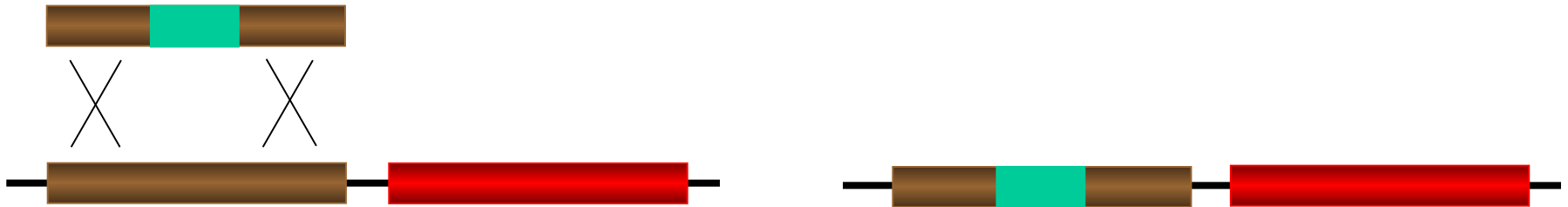
[maltose⁻]
[λ^R]

Vérification moléculaire : Southern-blot



Recombinaison: homologue ou non-homologue ?

Homologue



Non-homologue (NHEJ)



Recombinaison homologue TRES efficace

eubactéries
levures

Dans tous les autres organismes modèles :
 $f(\text{recombinaison non homologue}) \ggg f(\text{recombinaison homologue})$

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

-> RNAi cf *C. elegans*

-> *CrispR Cas9*