Eléments mobiles et instabilité génétique

Mutagénèse par insertion de transposons

TRANSPOSON = fragments d'ADN qui sont insérés dans le génome d'un organisme hôte et qui ont la propriété remarquable de se déplacer d'un point à un autre du génome

-> parasitisme moléculaire des génomes

Pas de génome dépourvu de transposons !

maïs 1950

B. Mc Clintock :

Instabilité génétique = remaniements chromosomiques

-> éléments transposables (ETs) Ac/Ds

Ac = activateur

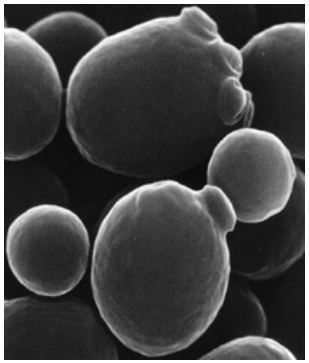
Ds = dissociateur

bactéries 1970

Séquences IS (Insertion Sequences)

-> résistances aux antibiotiques

S. cerevisiae 1980



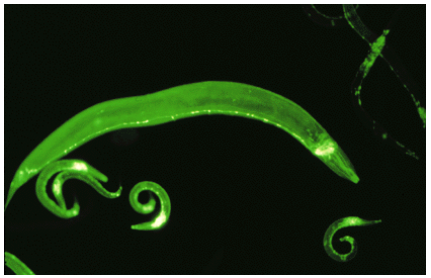
Rétrotransposon Ty

D. melanogaster 1980

Transposons famille Copia, Eléments P

Rétroéléments famille Gypsy

C. elegans 1980



Transposons famille Tc1

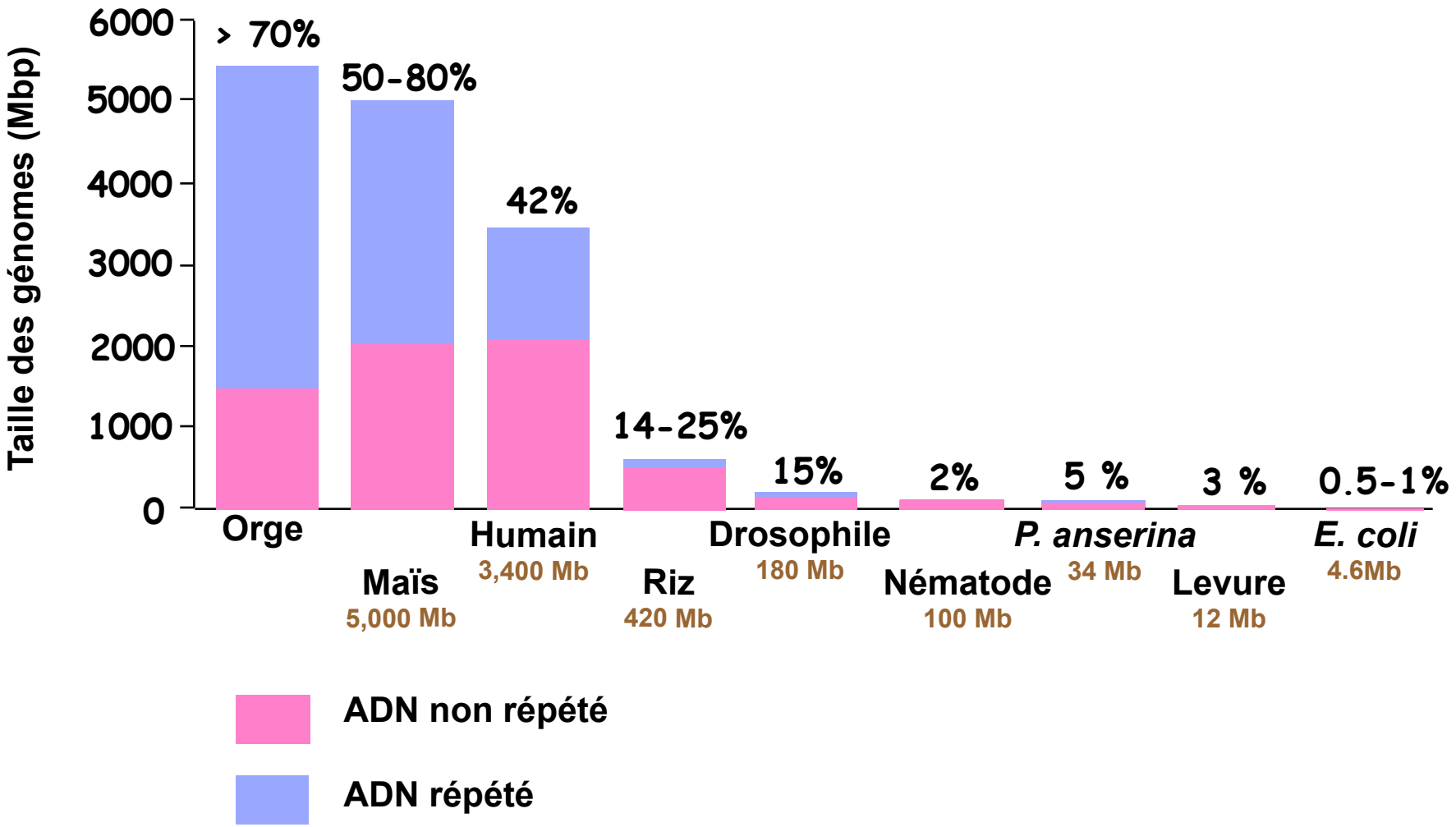
H. sapiens 1980

Rétroéléments de types
LINE et SINE

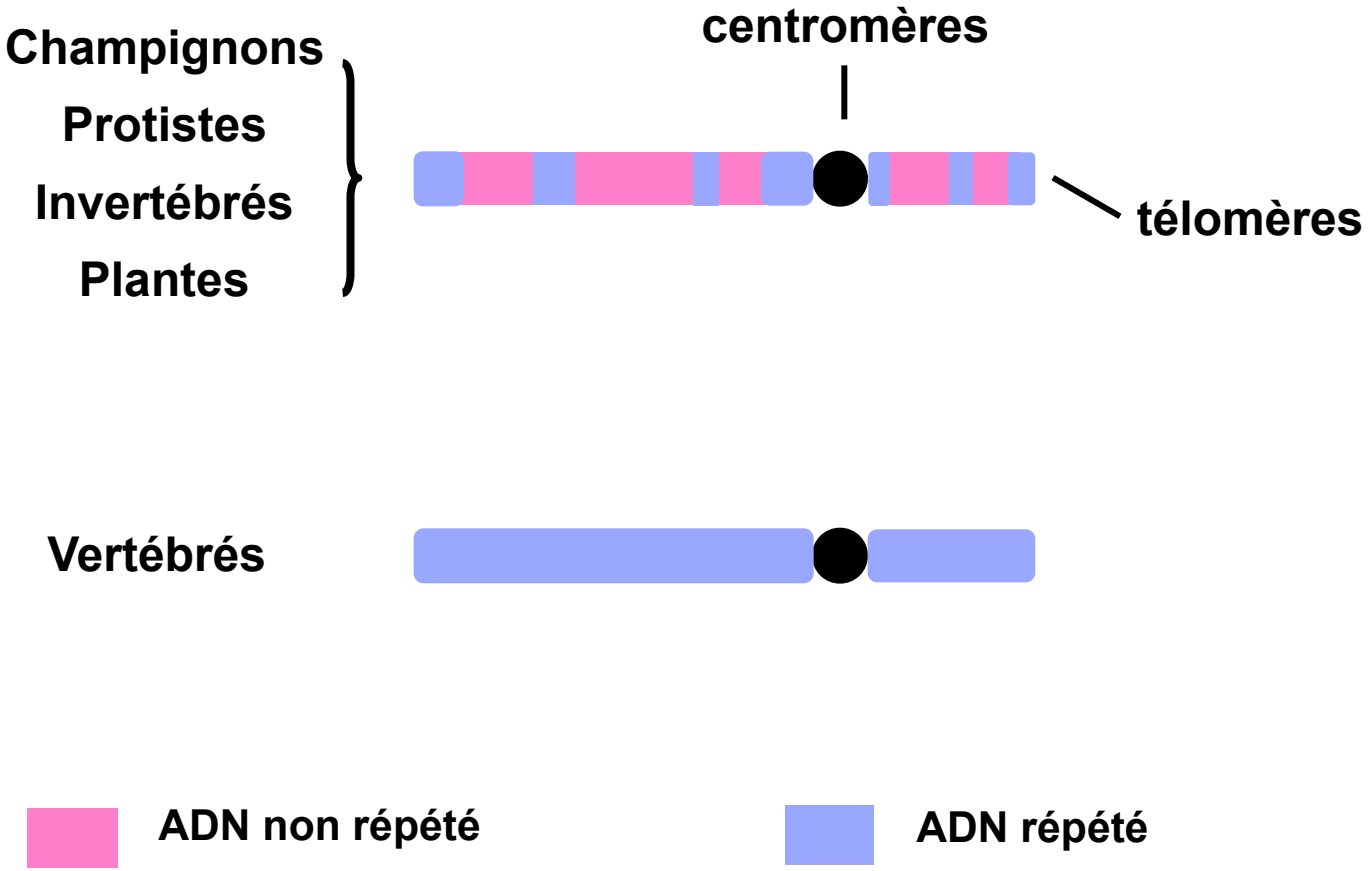
Champignons filamenteux 1990

Transposons familles Copia, Tc1/mariner, pogo
Rétroéléments famille Gypsy

Taille de génomes et proportion d'ADN répété

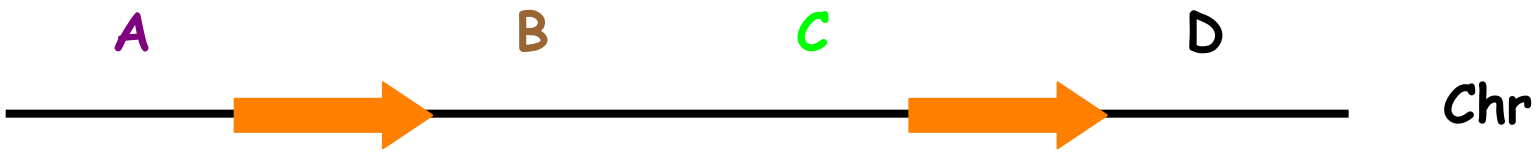


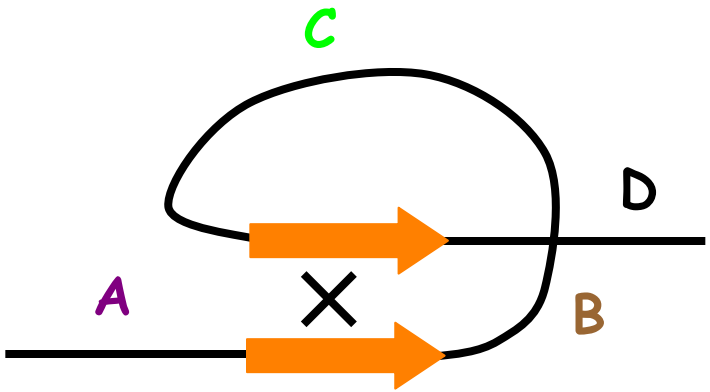
Localisation des séquences d'ADN répété dans les génomes d'eucaryotes

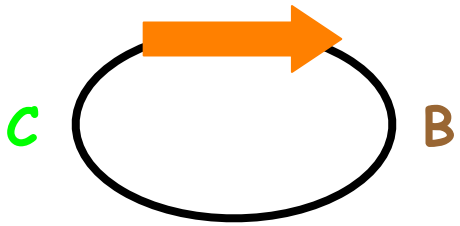


ADN répété, facteur d'instabilité chromosomique

Délétions :

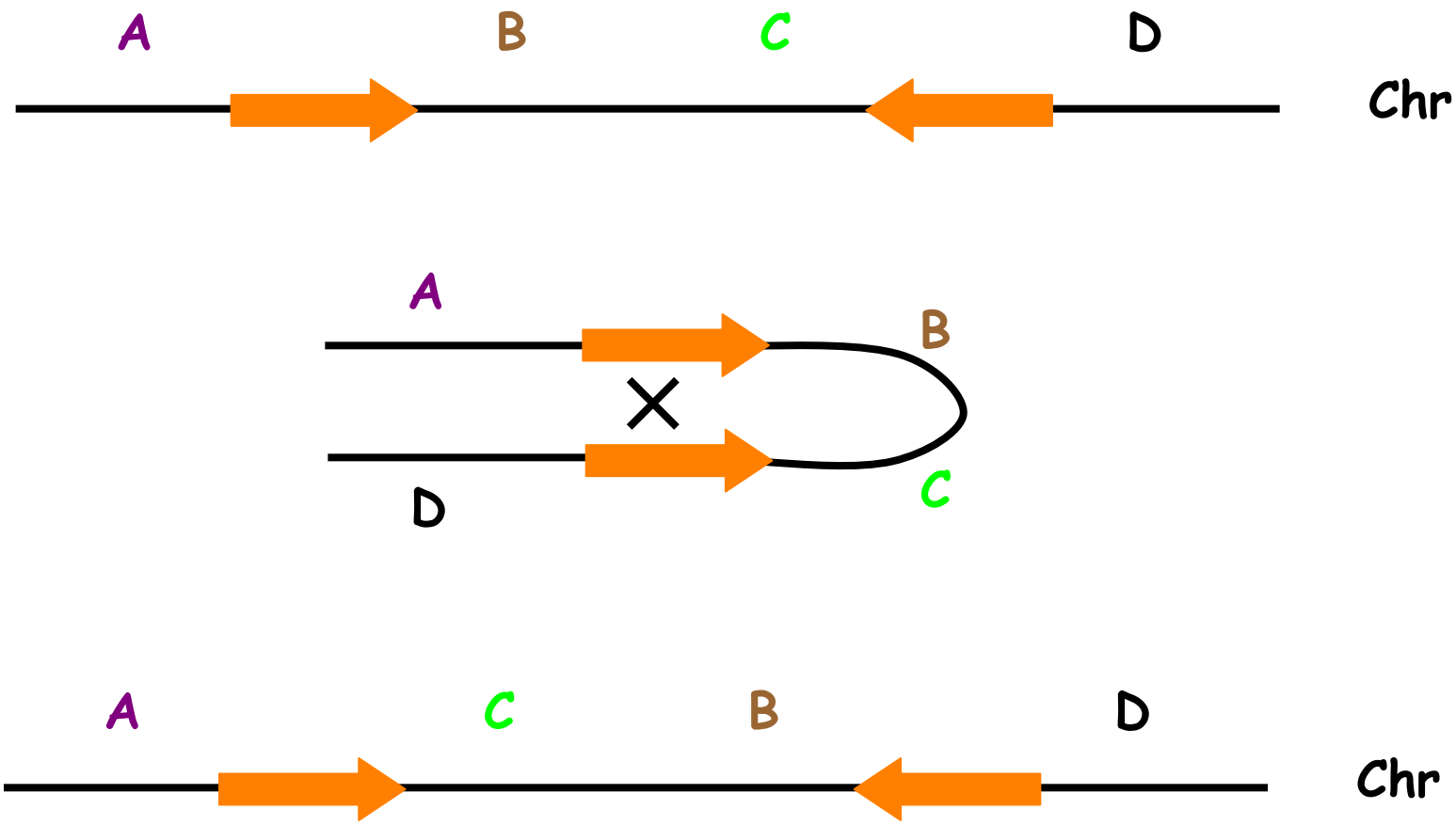






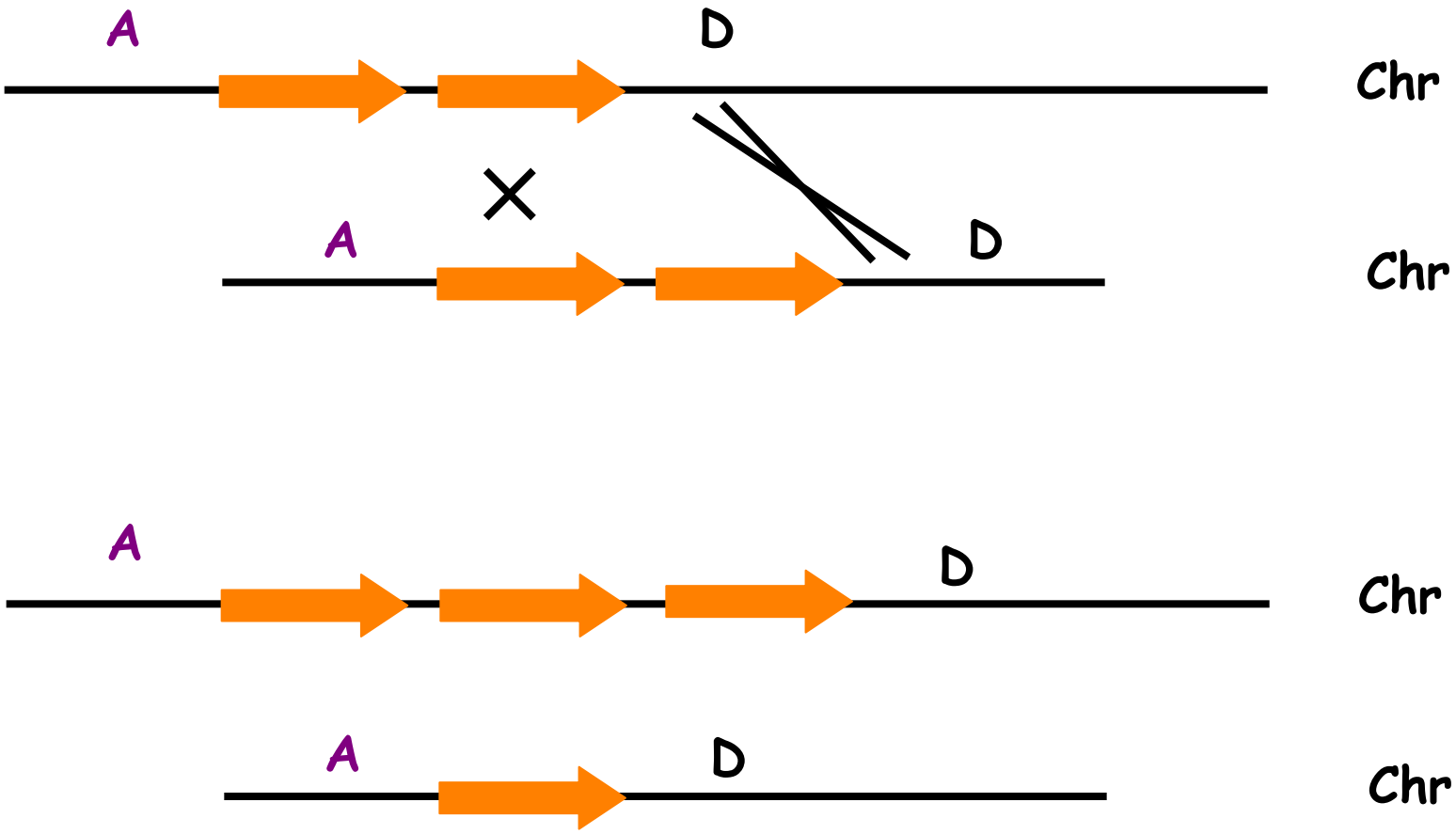
ADN répété, facteur d'instabilité chromosomique

Inversions :



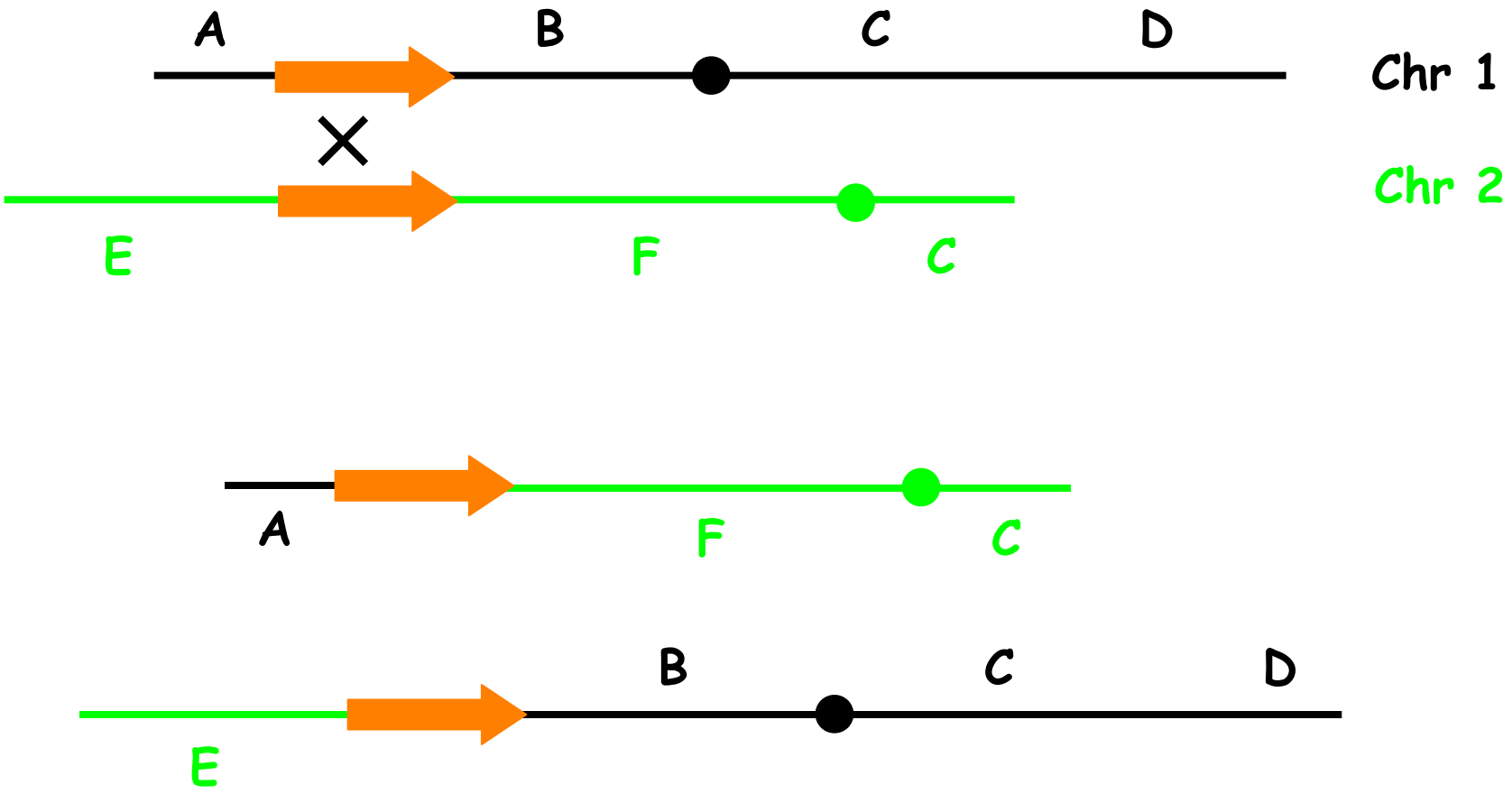
ADN répété, facteur d'instabilité chromosomique

Amplifications :

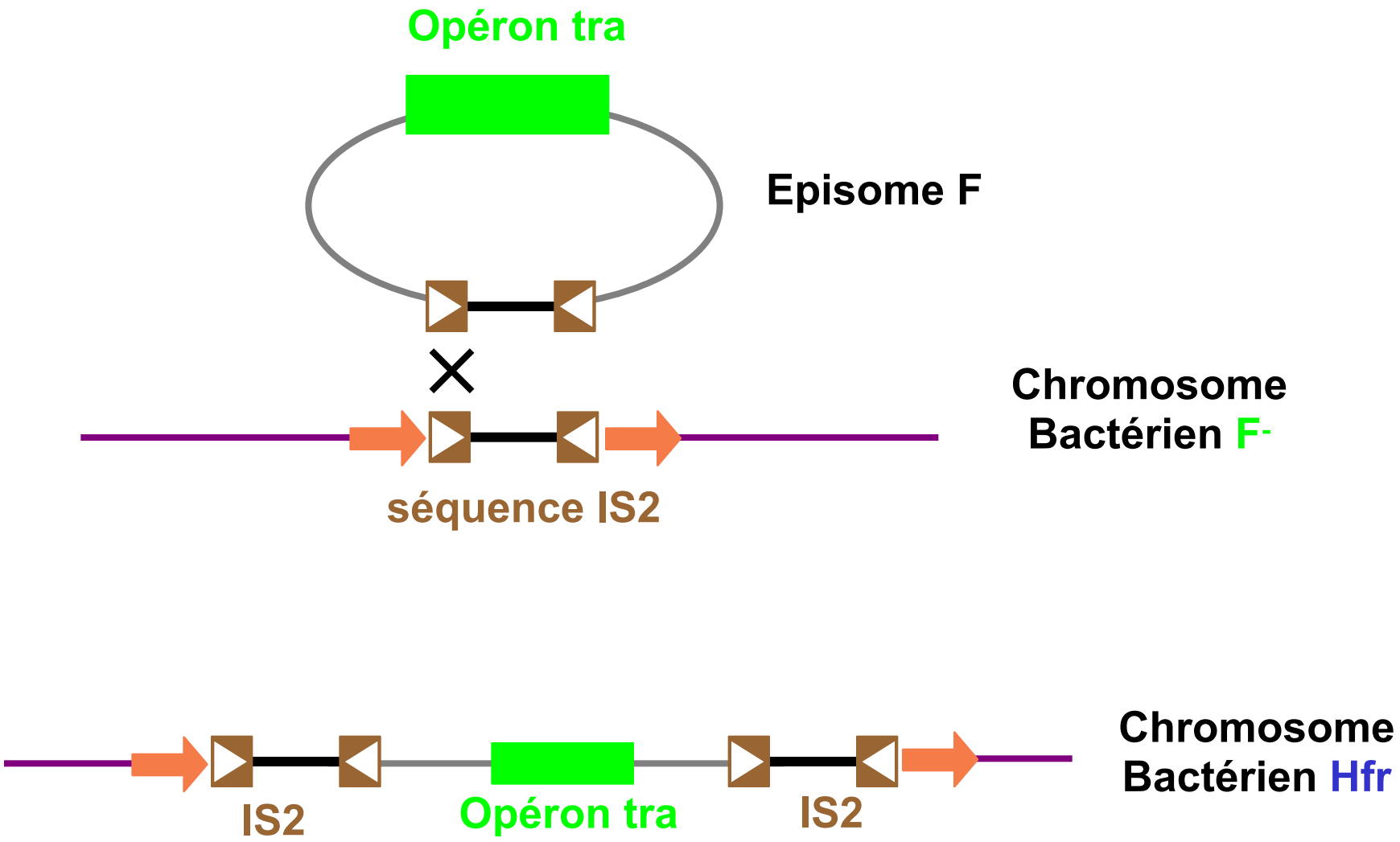


ADN répété, facteur d'instabilité chromosomique

Recombinaisons -> translocations :



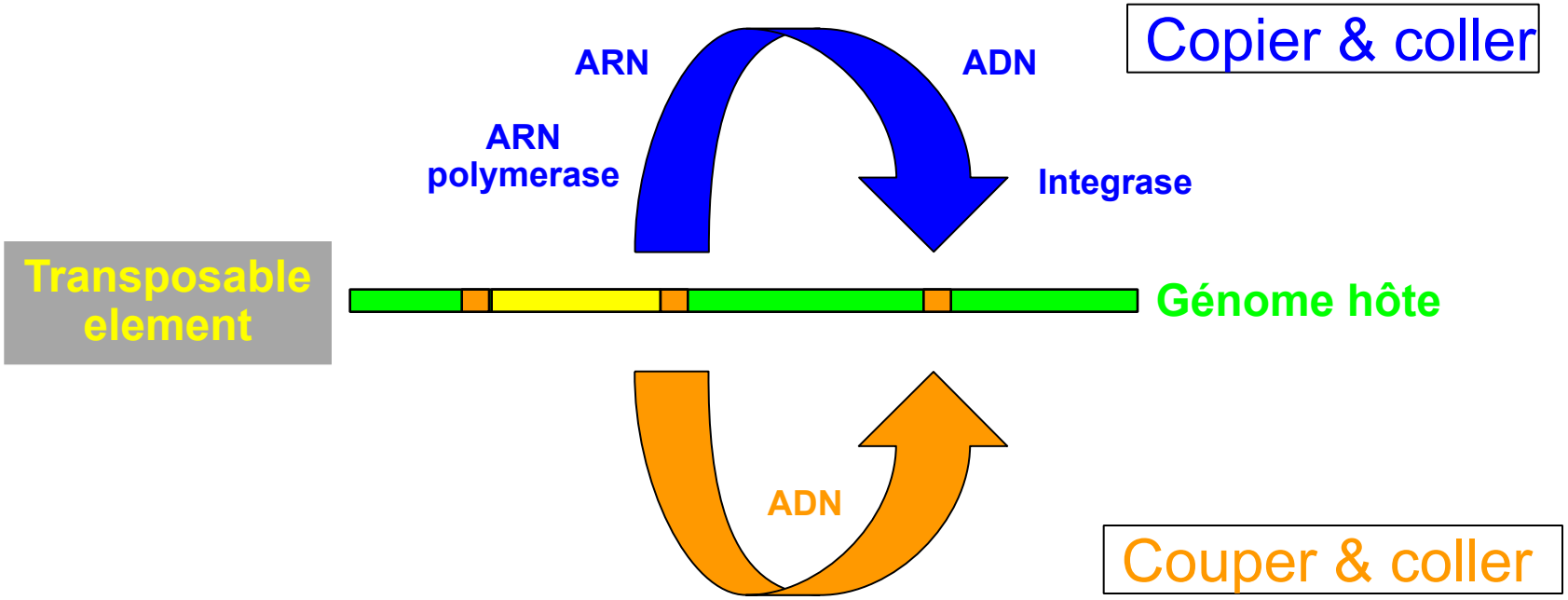
Intégration de l'épisome F dans le chromosome bactérien



Transposons eucaryotes

Transposon type I = rétro-transposons à ARN

Reverse transcriptase

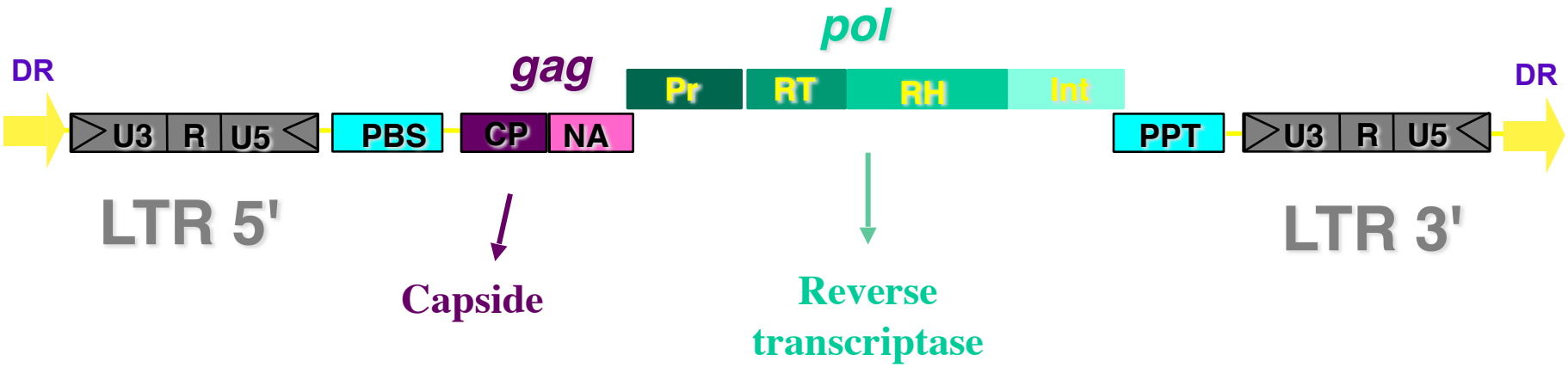


Transposon type II = transposons à ADN

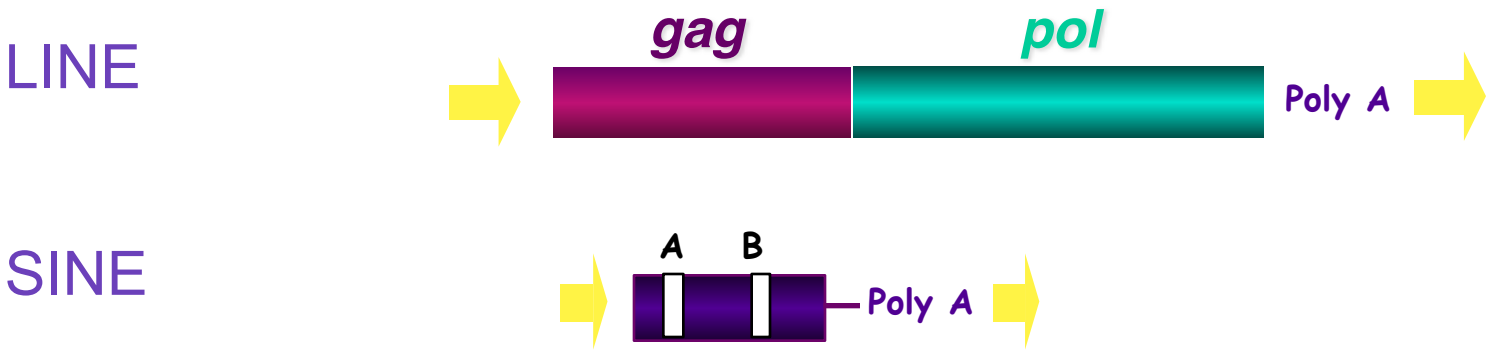
Insertion au hasard dans les génomes

Structure des transposons de type I

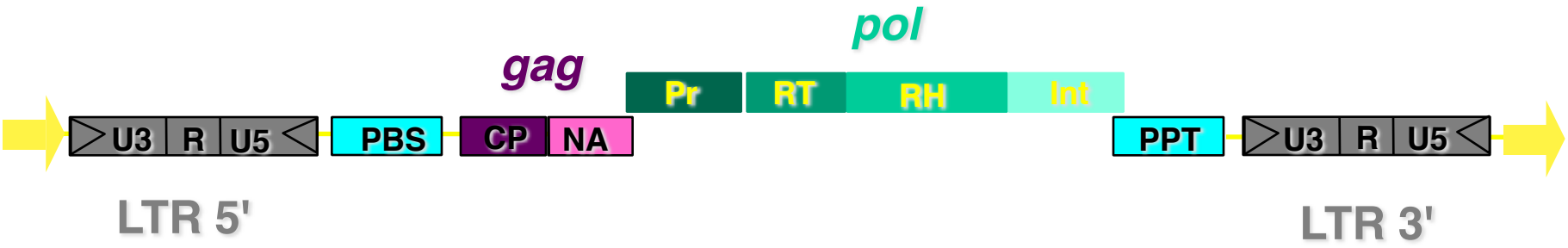
❖ **Rétrotransposons à LTR: ty3/gypsy**



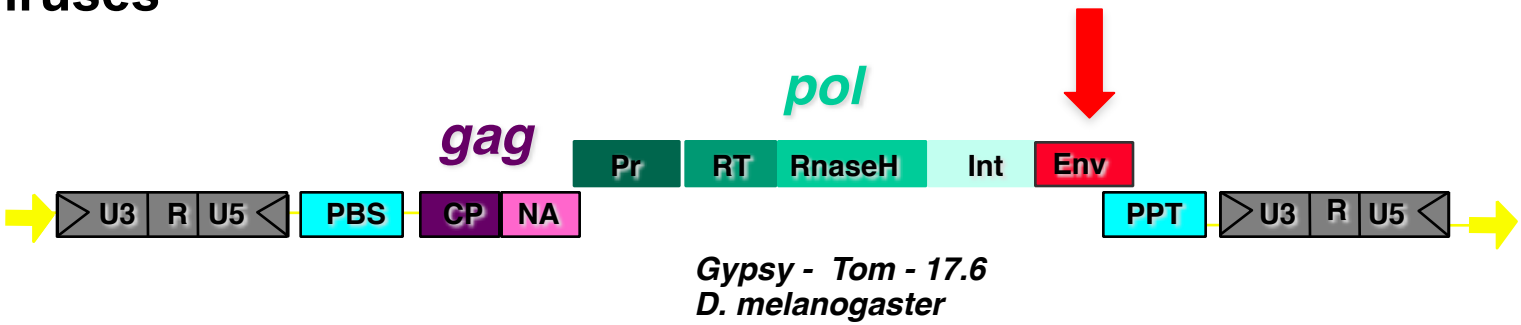
❖ **Rétrotransposons sans LTR**



❖ Rétrotransposons à LTR: ty3/gypsy



❖ Errantiviruses

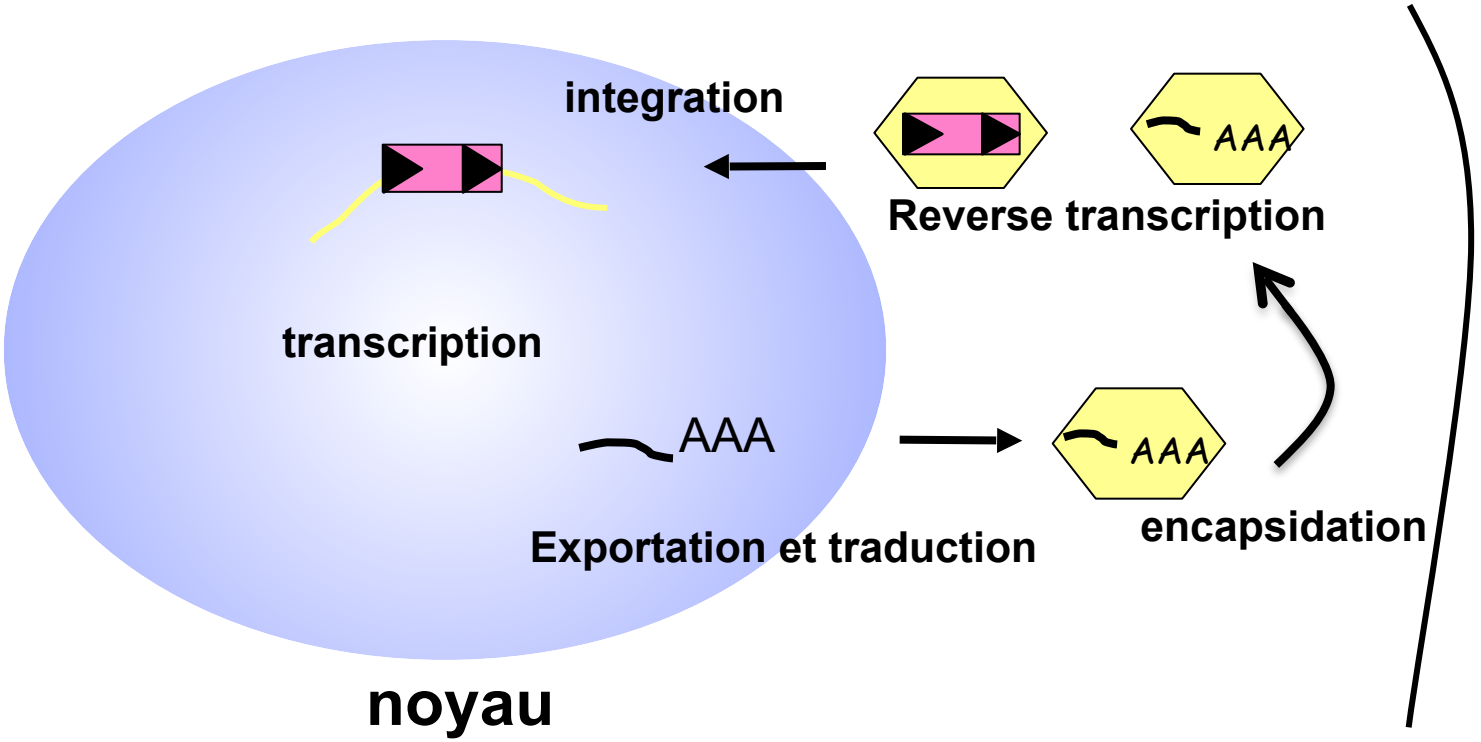


Gypsy - Tom - 17.6
D. melanogaster

Transposons de type I ou rétro-transposons

Mécanisme de transposition : **copier + coller**

intermédiaire ARN



Structure des transposons à ADN de type II

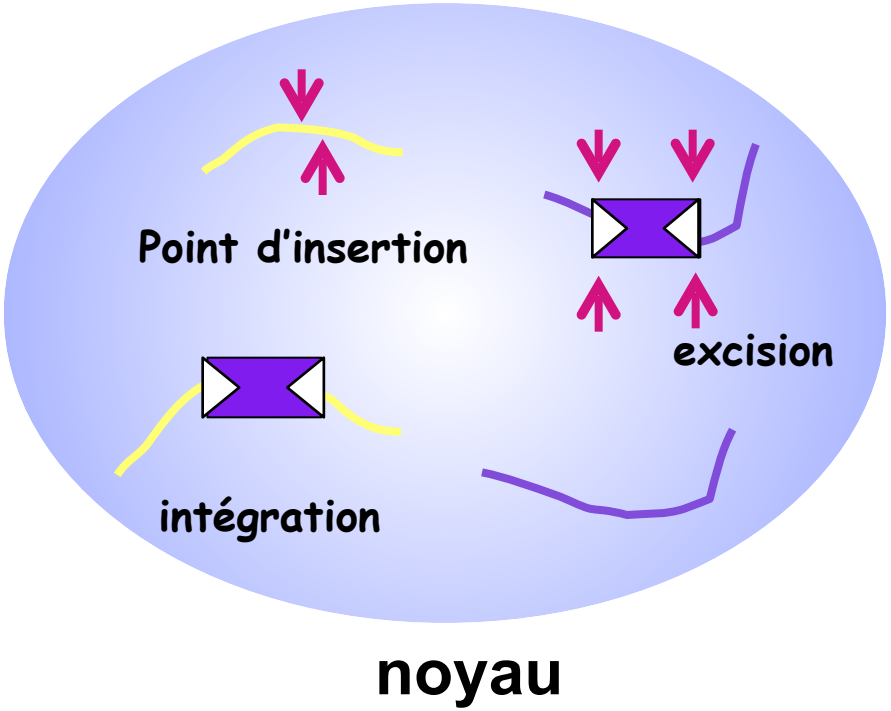
✓ **Transposons autonomes**

Tc1/mariner

✓ **Transposons non autonomes**

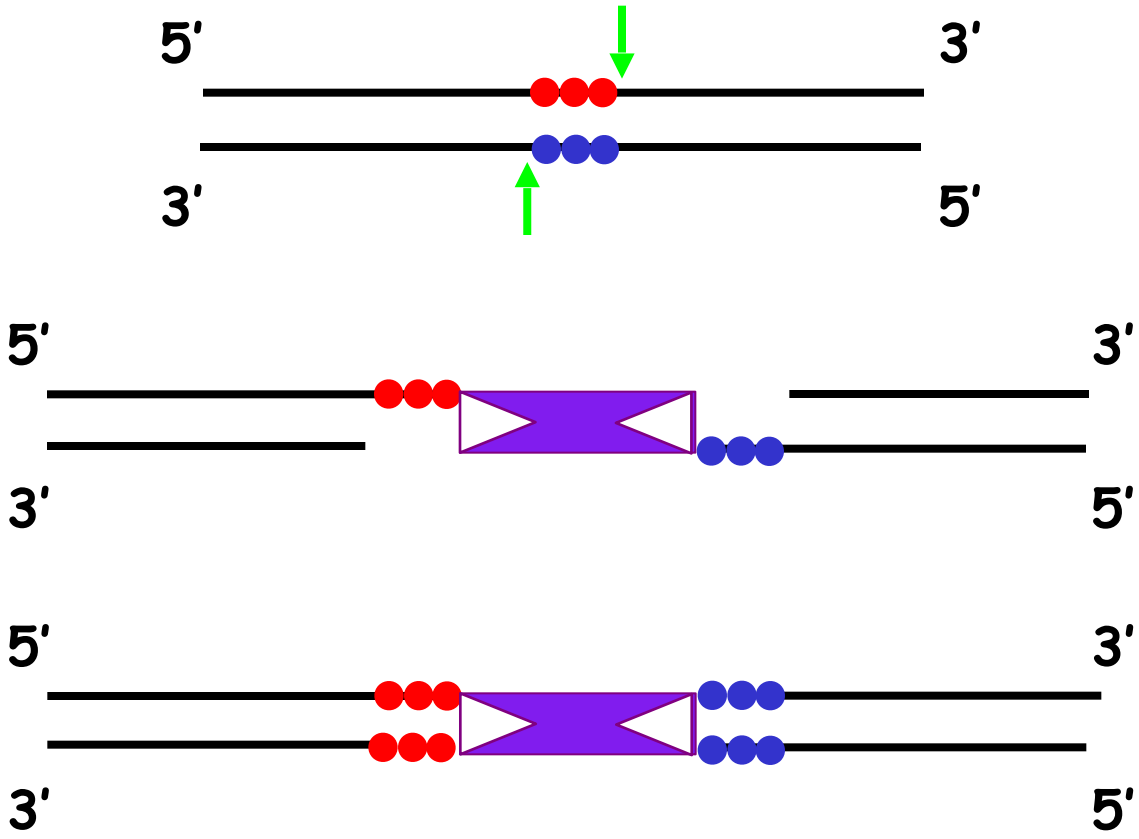
ITR = Inverted Terminal Repeat

Transposition conservative



couper + coller

Mécanisme d'insertion transposon type II



Duplications : 2-14 pb, taille constante pour un ET donné

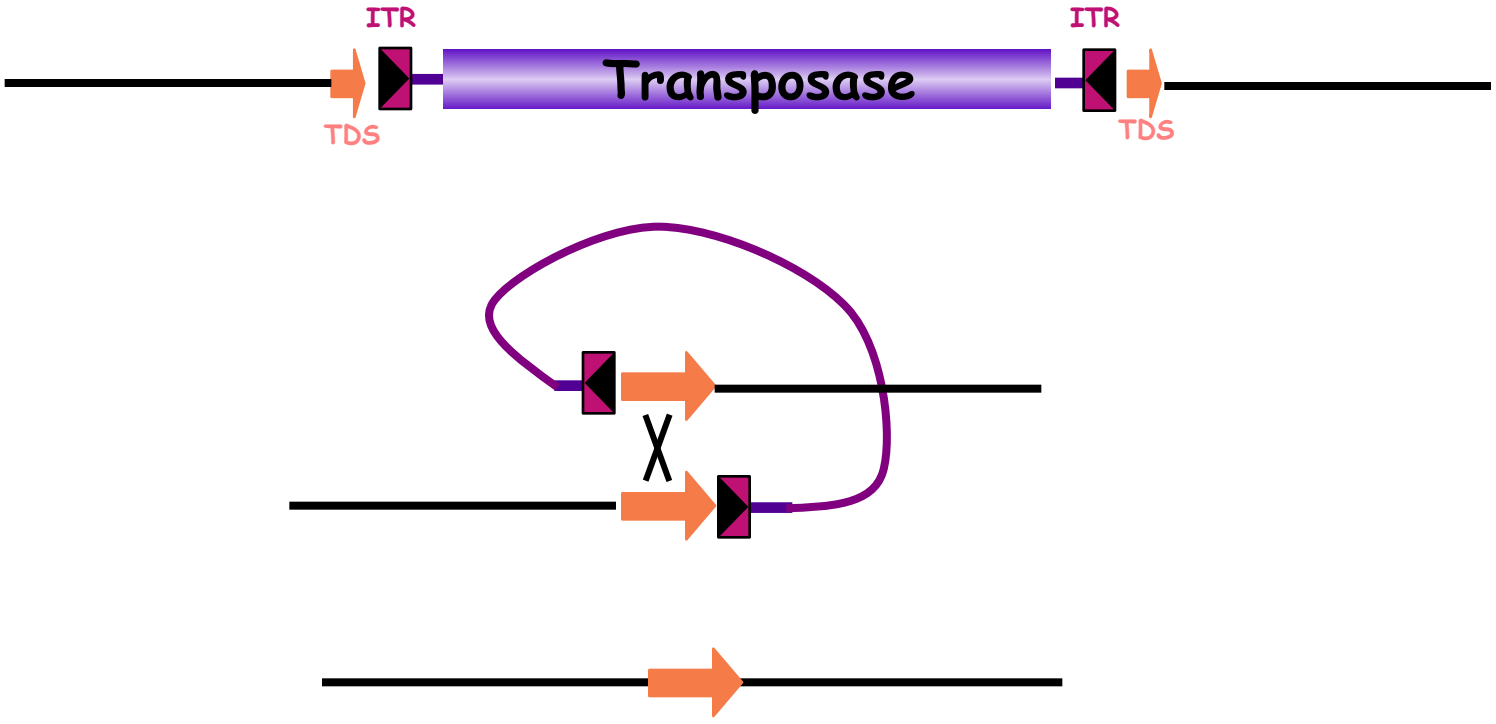
-> signature

Excision des ETs

Parfaite

-> Recombinaison entre séquences répétées en tandem (TDS)

-> restauration de la séquence sauvage



Fréquence de transposition / excision

❖ Transposons ARN type I

Ty *S. cerevisiae*

Transposition : 1 / 20 générations env 10^{-6}
Excision : env 10^{-5} à 10^{-6}

❖ Transposons ADN type II

Transposon bactérien

Transposition : env 10^{-6}
Excision : env 10^{-6}

Elément P drosophile : croisement mouche vide de P par mouche P
Transposition : env 10^{-3} à 10^{-4} soit 10^{3} fois plus que taux de mutation spontanée
Excision : jusqu'à quelques %

Mobilité des transposons et expression génique

❖ Insertion :

✓ **Dans une phase codante : interruption de l'ORF, protéine tronquée**

✓ **Dans un intron :**

- ➢ **Pas d'effet !**
- ➢ **Arrêt de la transcription dans le transposon : protéine tronquée**
- ➢ **Epissage incorrect : protéine chimère**

✓ **Dans une séquence promotrice :**

- ➢ **Dérégulation de l'expression du gène concerné**

Mobilité des transposons et expression génique

❖ Excision imparfaite :

✓ **Dans une phase codante :**

- ❖ **Si pas multiple de 3 -> décalage du cadre de lecture**

- ✓ **Recombinaison sur les LTRs : une LTR (solo) reste au site d'insertion**

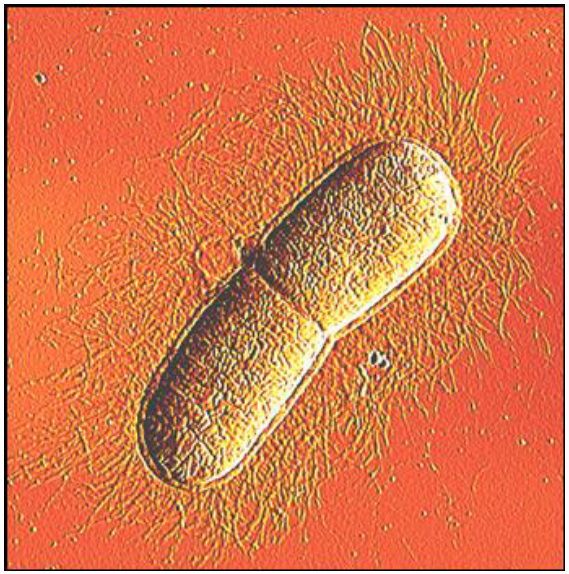
- ✓ **Cassure double brin et réparation imparfaite : délétion de matériel génomique de part et d'autre du point d'insertion**

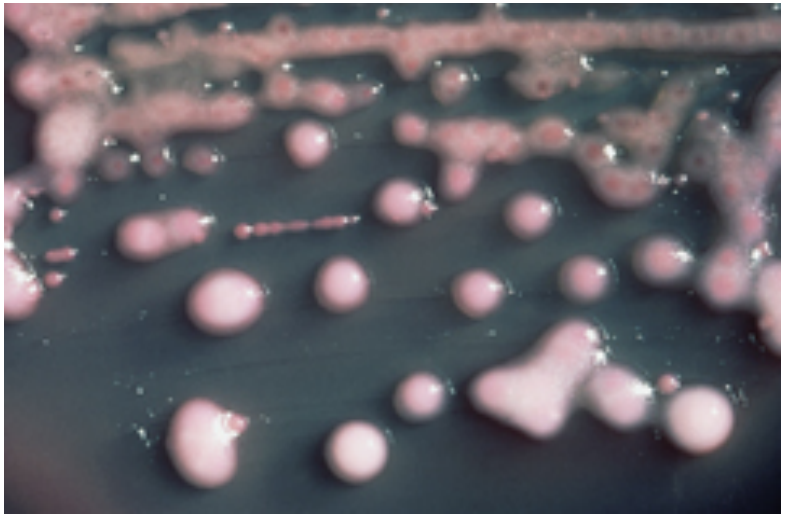
- ✓ **Réarrangement : addition (insertion) de matériel génomique**

Recherche de mutants non pathogènes chez *Klebsiella pneumoniae* par mutagénèse insertionnelle

Klebsiella pneumoniae

Entérobactérie commensale, encapsulée, à gram négative





Si pathogène : infections respiratoires
-> pneumonies, abcès pulmonaires, pleurésies et des infections intestinales

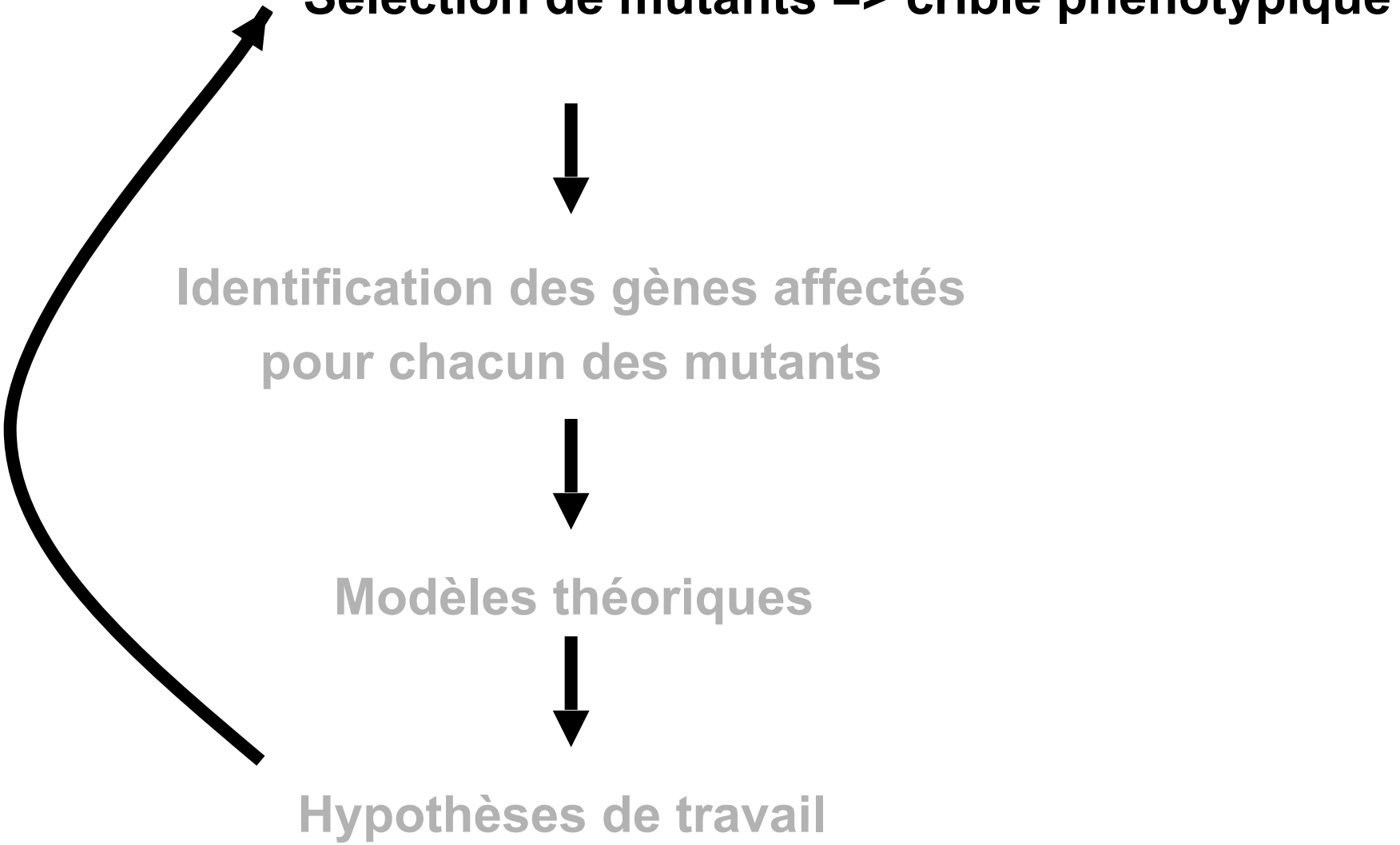
Intérêt de la mutagenèse insertionnelle

✓ **Insertion au hasard dans le génome**

✓ **Facilité de localisation des gènes affectés**

➢ **« étiquetés » grâce au transposon**

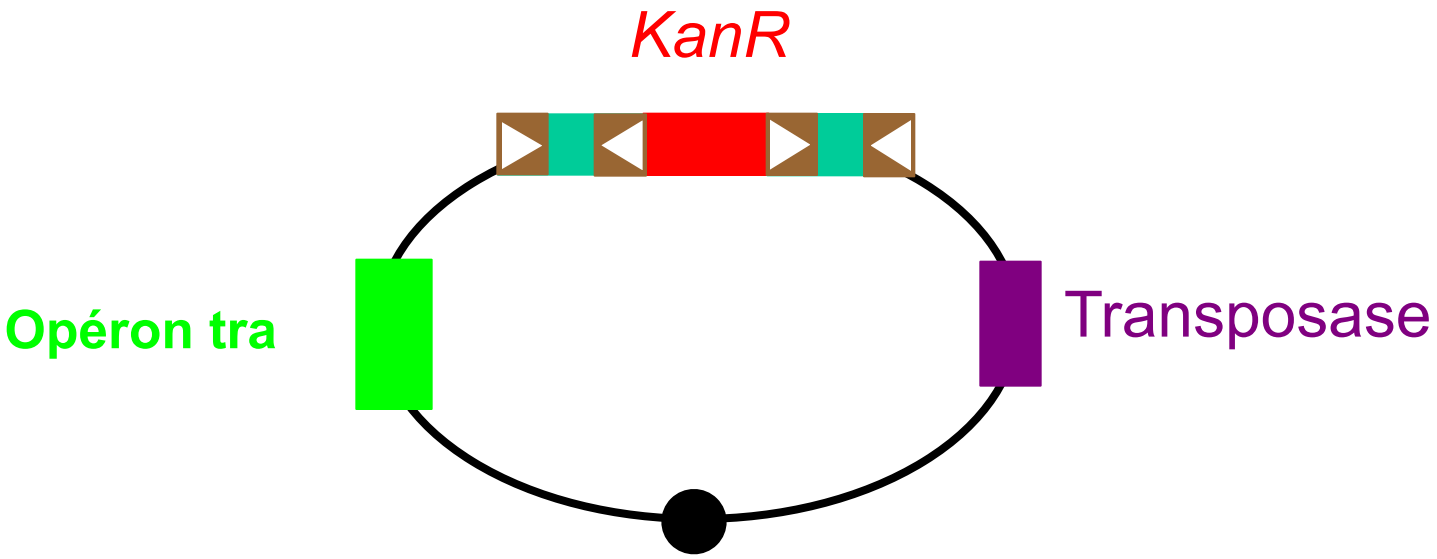
Recherche de mutants non pathogènes


Sélection de mutants => crible phénotypique
Identification des gènes affectés
pour chacun des mutants
Modèles théoriques
Hypothèses de travail

Tn5 : un transposon composé

mini-Tn5 : un transposon composé défectif

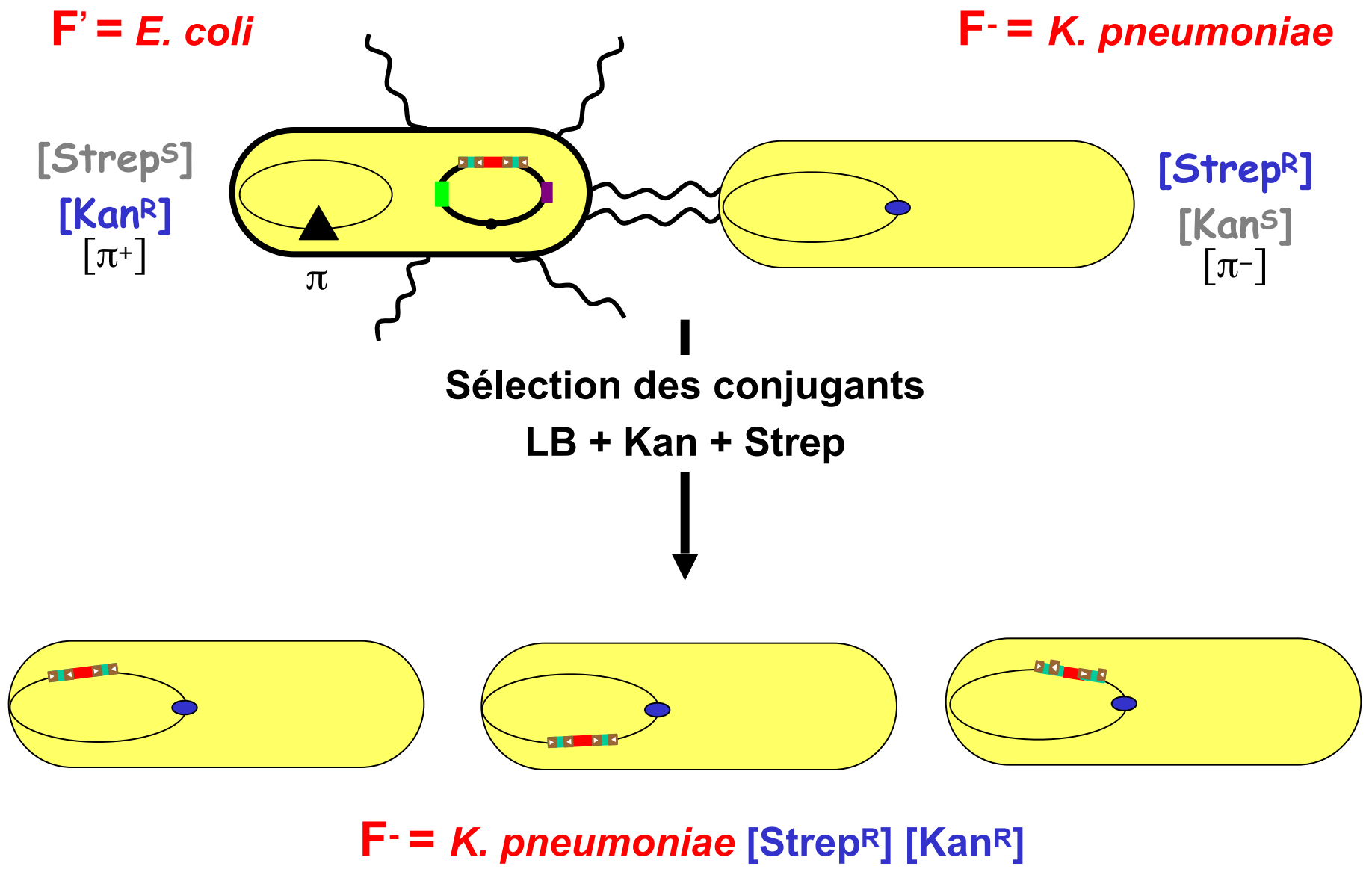
Episome à réplication conditionnelle



Origine de réplication π dépendante

	Bactérie exprimant π	**Bactérie n'exprimant pas π**
Réplication Épisome π	**Oui**	**Non**

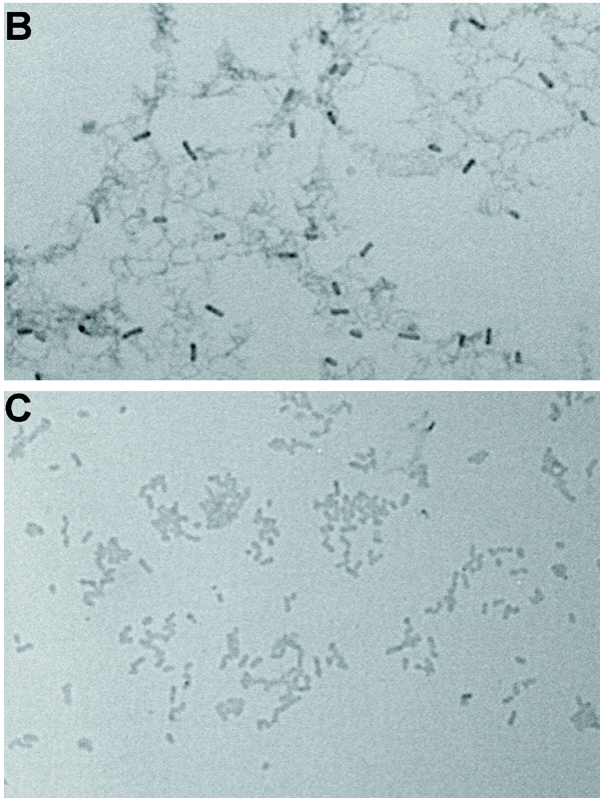
Protocole de mutagenèse



Crible phénotypique de sélection de mutants non pathogènes

Hyperviscosité [HV+]

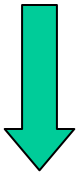
Hyperviscosité [HV+]



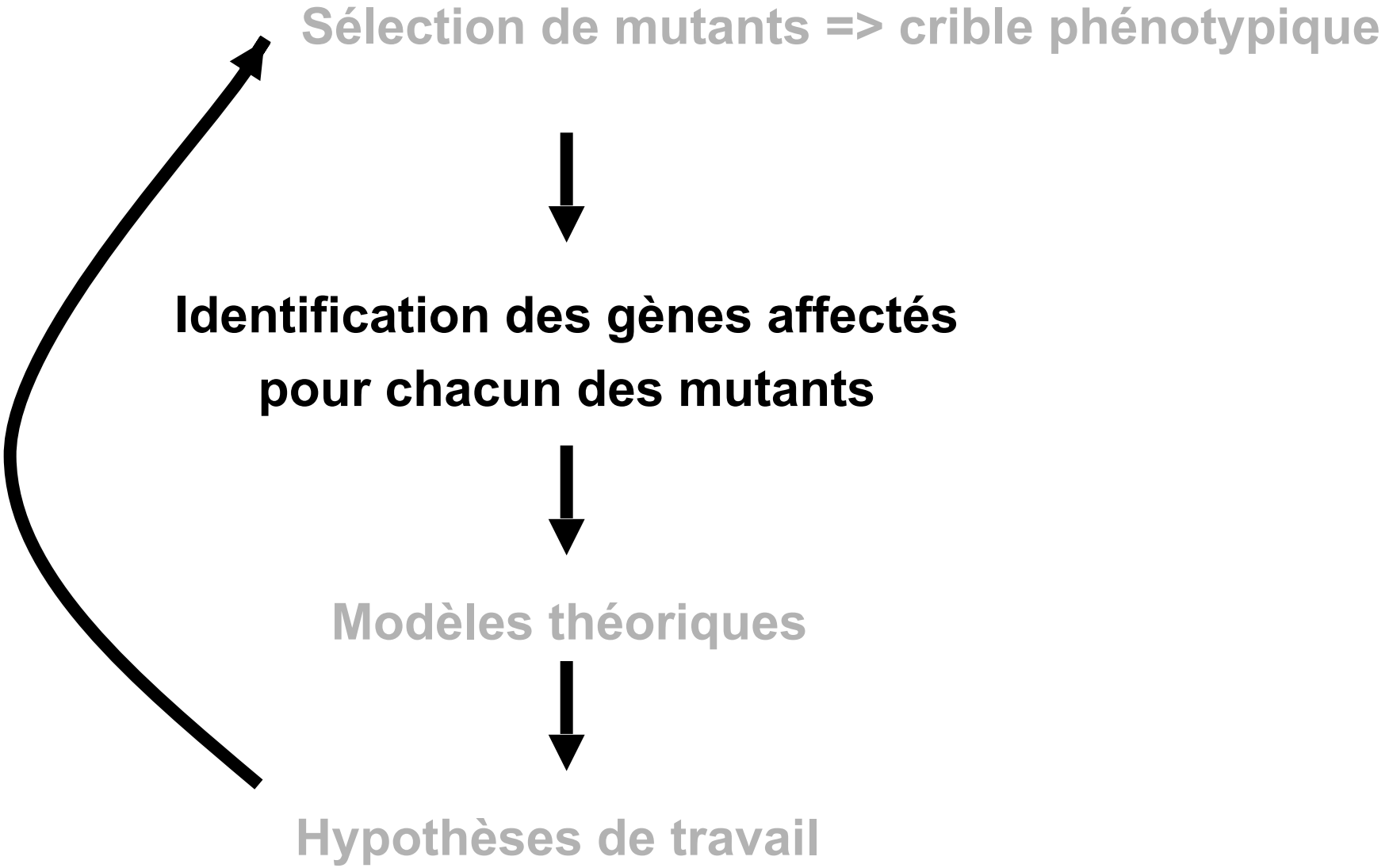
Pas d'hyperviscosité [HV-]

Résultats du crible

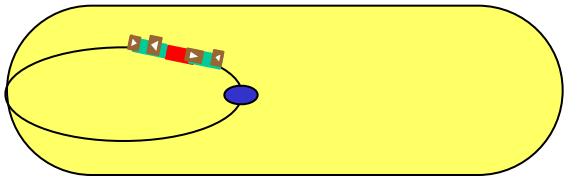
2500 conjugants analysés



15 mutants [HV^{-}]

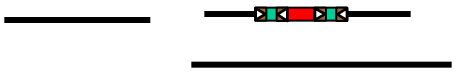

Sélection de mutants => crible phénotypique
Identification des gènes affectés
pour chacun des mutants
Modèles théoriques
Hypothèses de travail

Identification des gènes mutés par PCR inverse

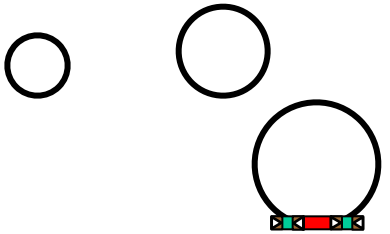


Extraction
ADN génomique

Hydrolyse
enzymatique

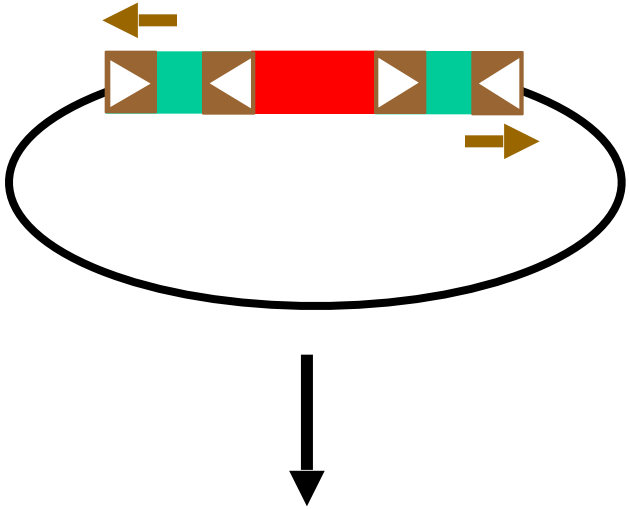


Ligation
intramoléculaire



Amplification
PCR

Amorces
Spécifiques
Mini-Tn5



Séquençage des produits de PCR = séquences flanquantes

Identification des gènes mutés

✓ Si la séquence complète du génome est disponible

Séquences flanquantes

↓

Algorithme « BLAST »

↓

Comparaison avec la banque génomique

-> recherche de la séquence nucléotidique complète

PROTEINE

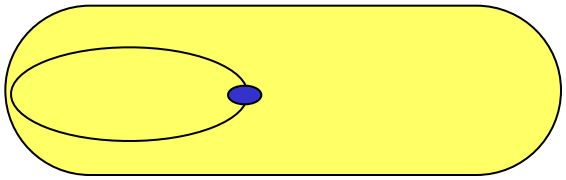
↓

FONCTION

Identification des gènes mutés

✓ **Si la séquence complète du génome n'est pas disponible**

Séquences flanquantes → **Amorces spécifiques**



***K. pneumoniae* [HV$^+$]**

→ **Extraction ADN génomique** → **Amplification PCR**

Séquençage de l'allèle interrompu

6 protéines hypothétiques

déduites de la séquence nucléotidique

↓

Algorithme « BLAST »

↓

Comparaison avec des banques de protéines

-> recherche de similitude entre une séquence fournie et toutes les séquences contenues dans une base de données (*E. coli*)

↓

FONCTION

Gènes identifiés

10 *cps* -> synthèse polysaccharide de capside

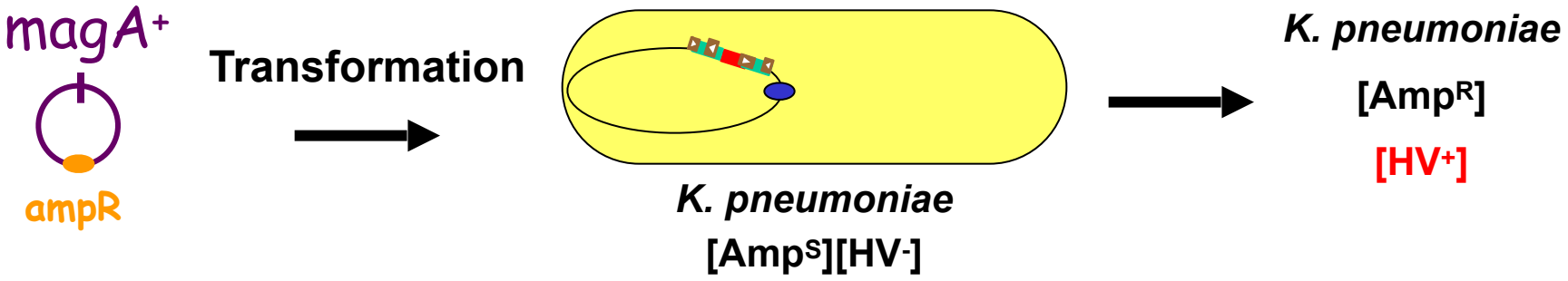
1 *wb* -> synthèse lipopolysaccharide

2 *rmpA* -> régulateur de synthèse polysaccharides de capside

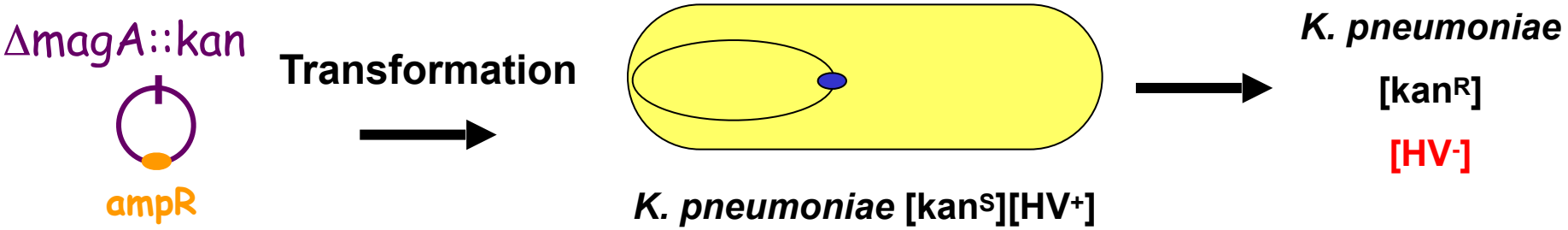
2 *magA* -> proteine hypothétique, 43 kD lipoprotéine membranaire putative

Vérifications

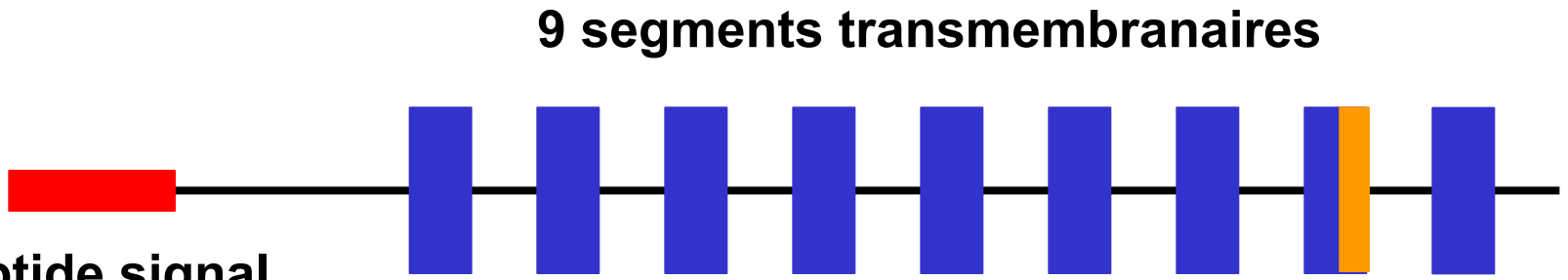
❖ Complémentation fonctionnelle



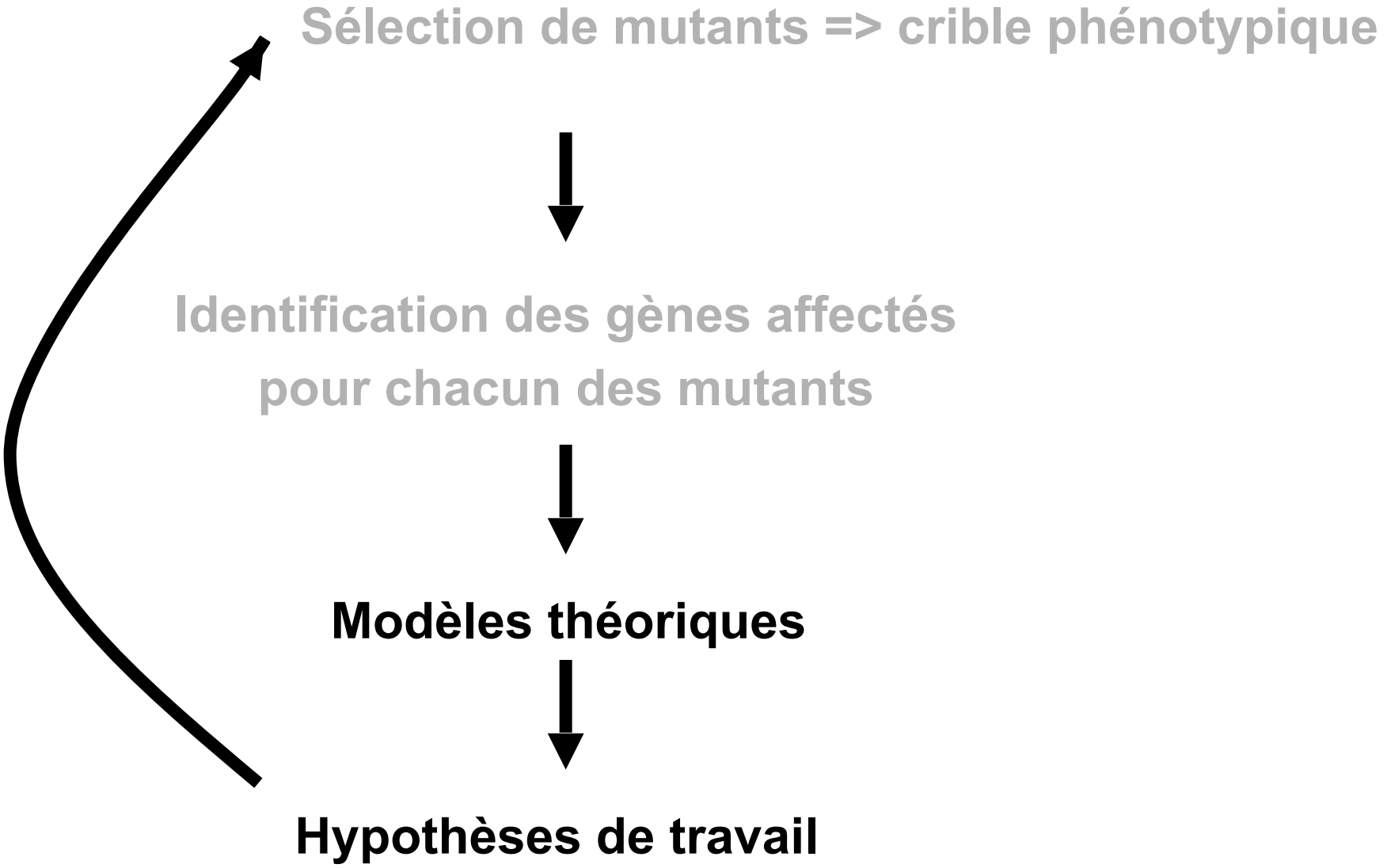
❖ Disruption de l'allèle *magA*+



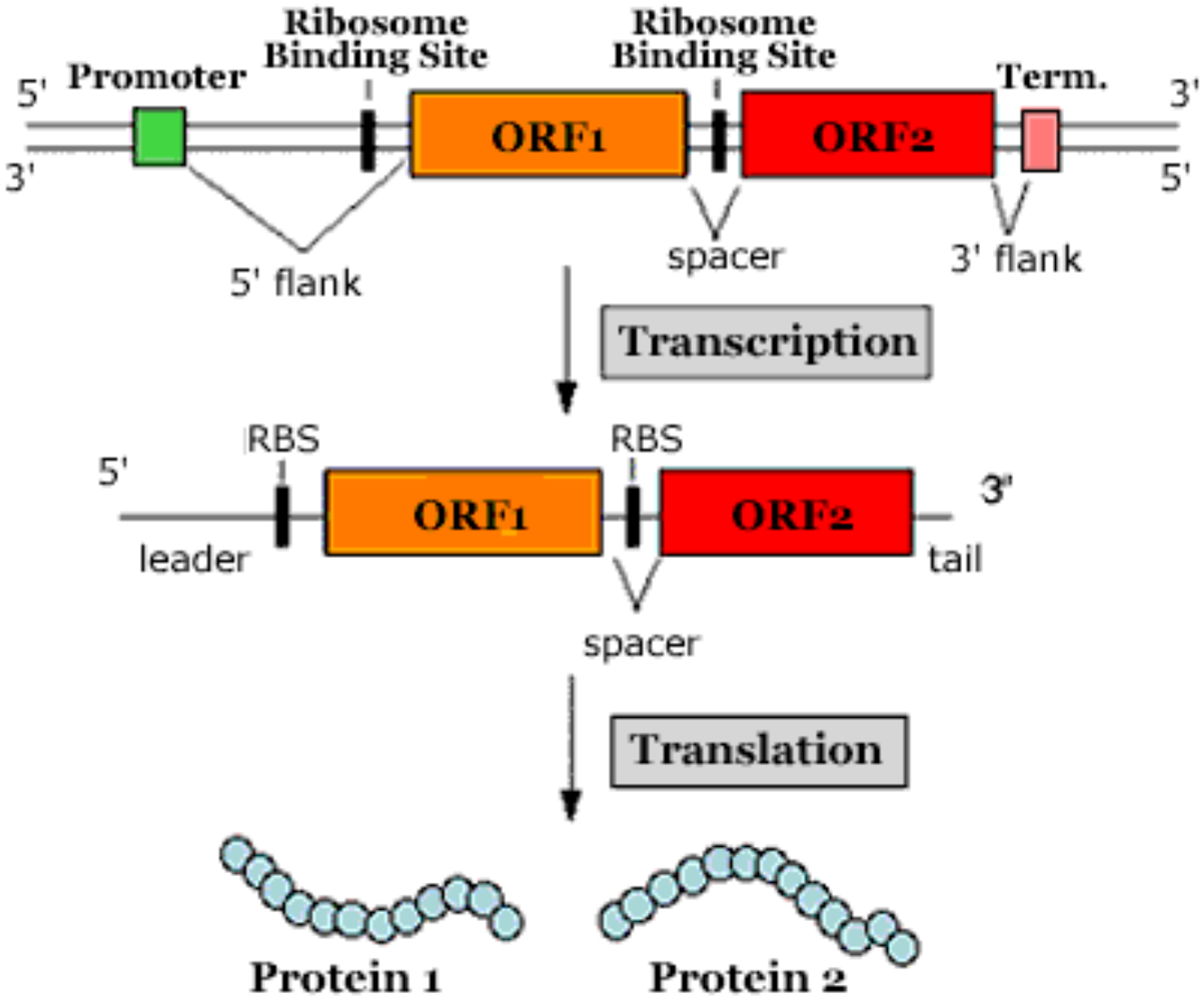
MagA -> production exopolysaccharides



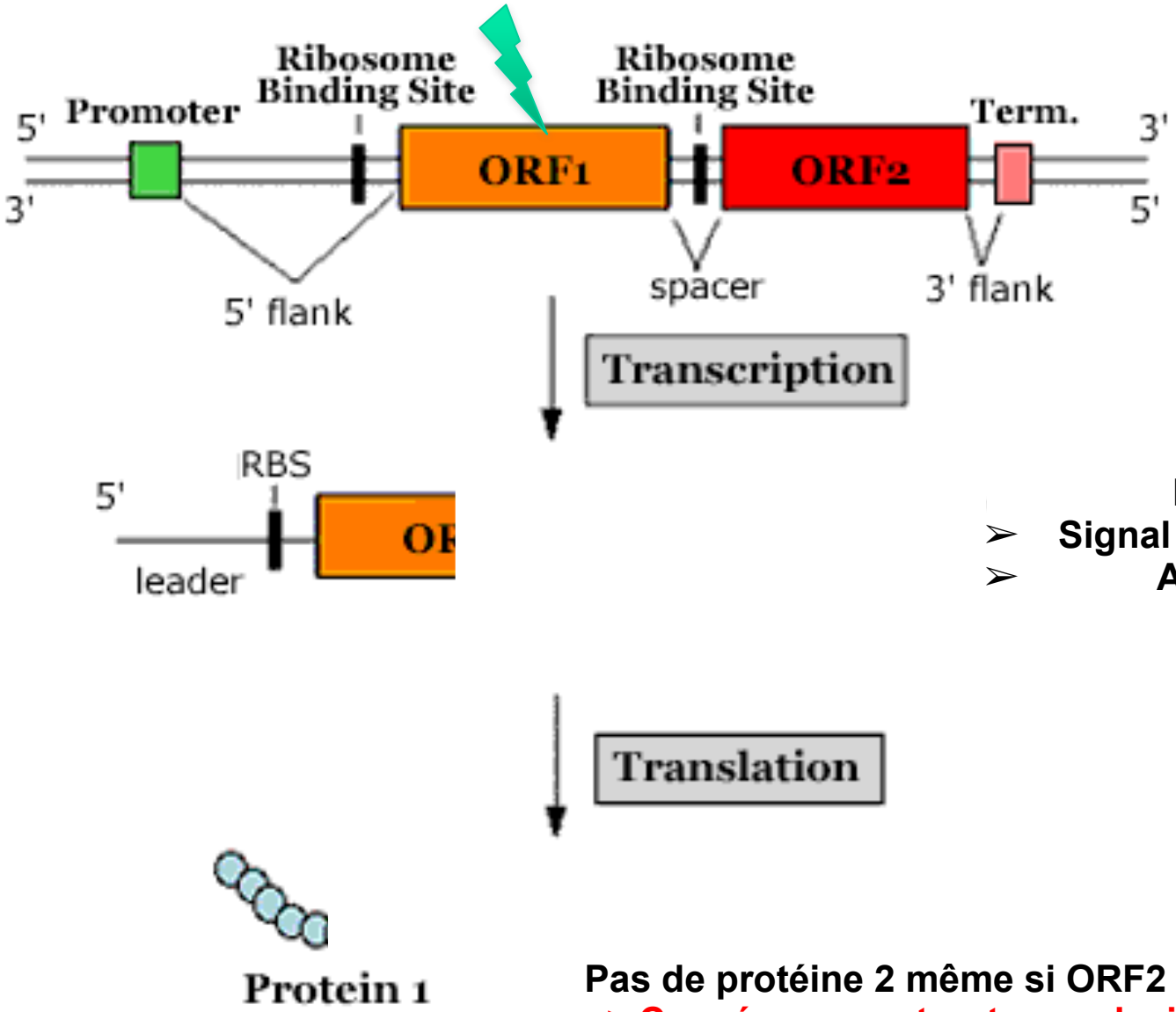
Nouvelle cible thérapeutique !


Sélection de mutants => crible phénotypique
Identification des gènes affectés
pour chacun des mutants
Modèles théoriques
Hypothèses de travail

Effets polaires



Effets polaires



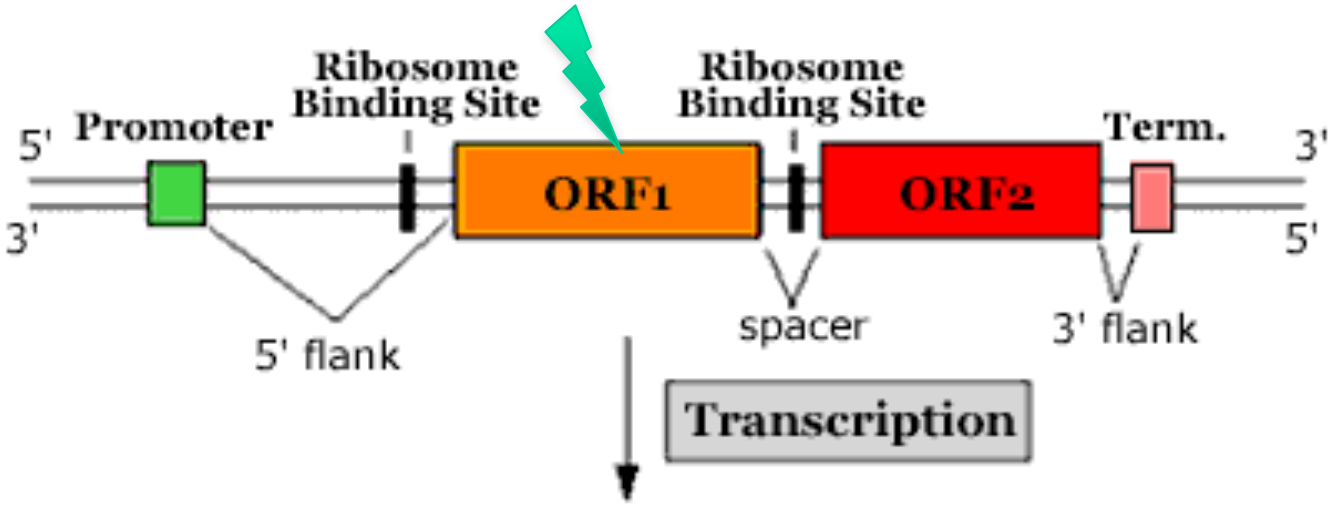
Mutations:

- **Signal fin de transcription**
- **ARNm tronqué**

Pas de protéine 2 même si ORF2 n'est pas touchée

=> Conséquence structure polycistronique

Effets polaires



Mutations

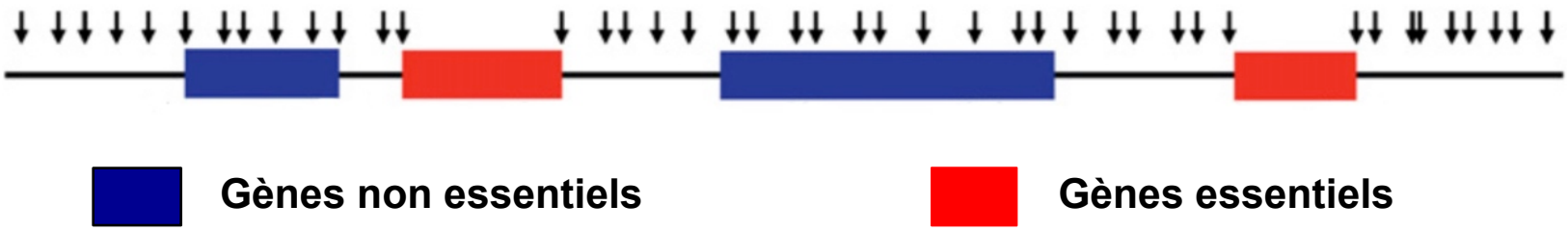
➢ **stabilité messagers**

Pas de protéine 1 ni de protéine 2 même si ORF2 n'est pas touchée

=> Conséquence structure polycistronique

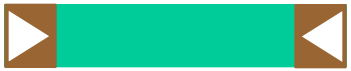
Identification des gènes essentiels chez la levure *S. cerevisiae* par mutagénèse insertionnelle saturée

Principe du crible SAturated Transposon Analysis in Yeast (SATAY)



Gènes non essentiels

Gènes essentiels



MiniDS

Transposon

pGal-Ac

Transposase

Protocole de mutagenèse

ADE2::MiniDS

pGal-Ac

[Ade⁻]

+ Gal

ADE2+

gèneX::MiniDS

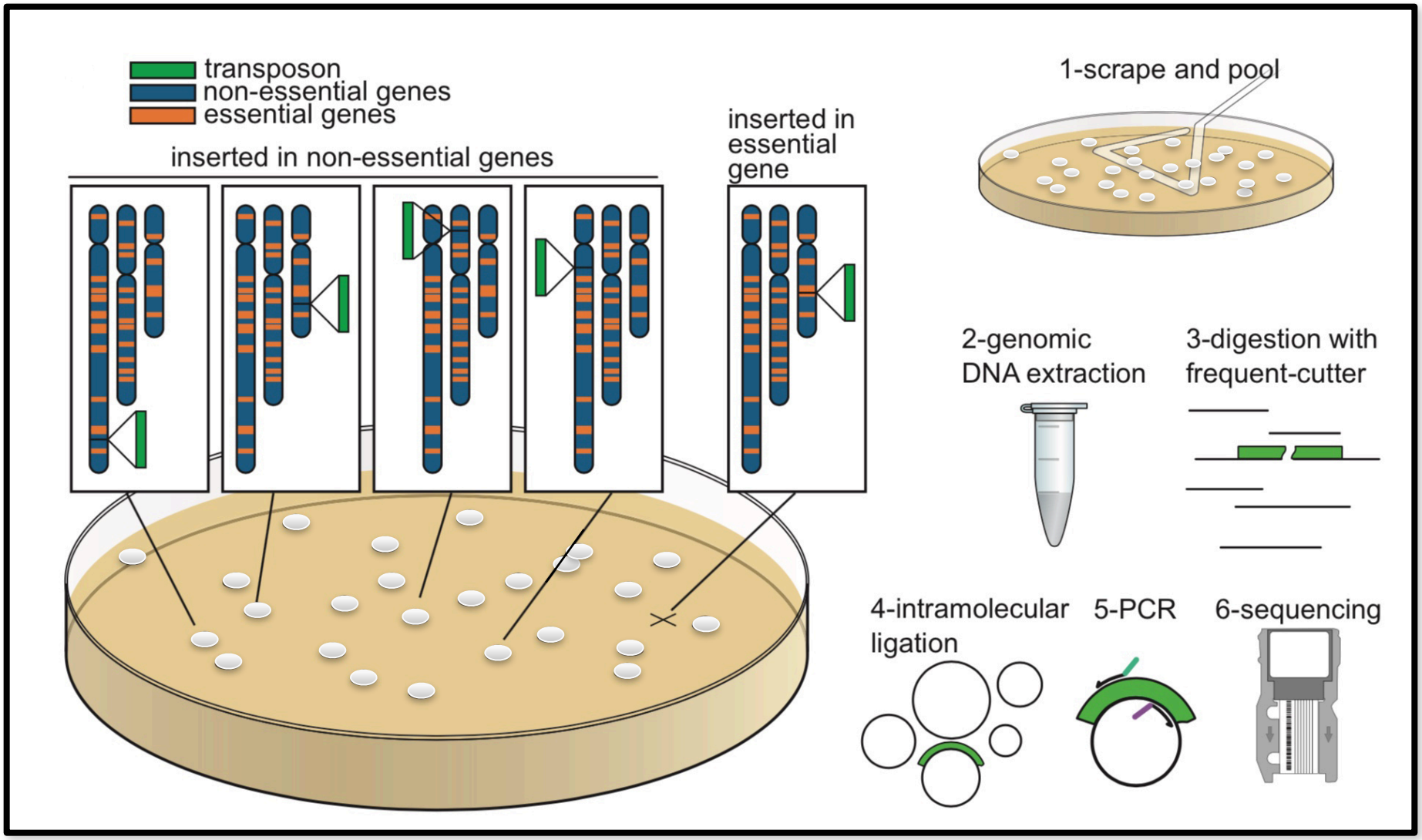
pGal-Ac

[Ade⁺]

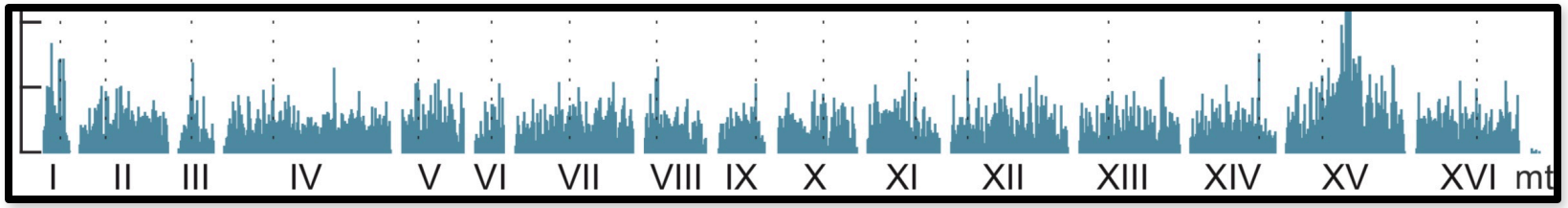
Sélection transposants

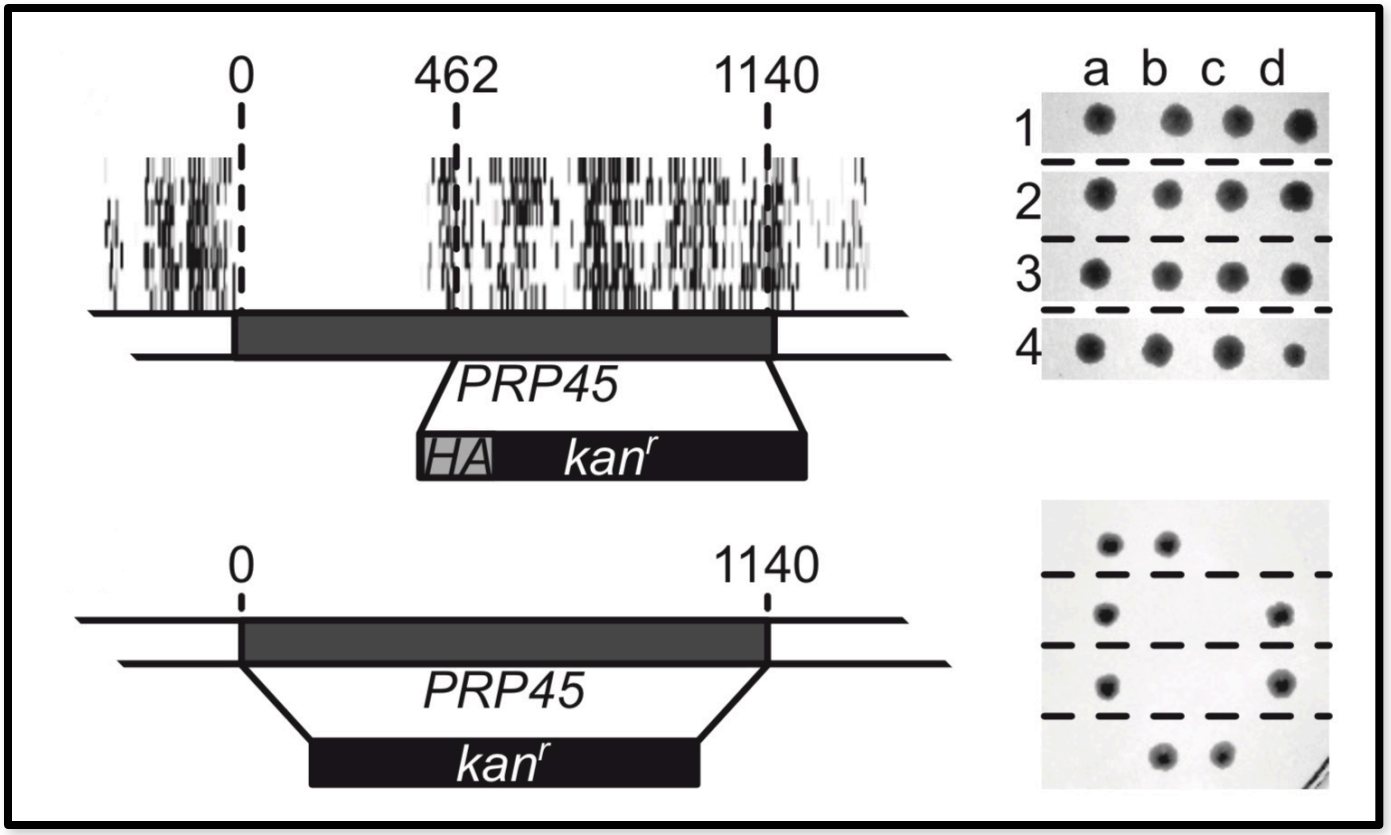
MM

Protocole d'identification des gènes mutés



Résultats du crible

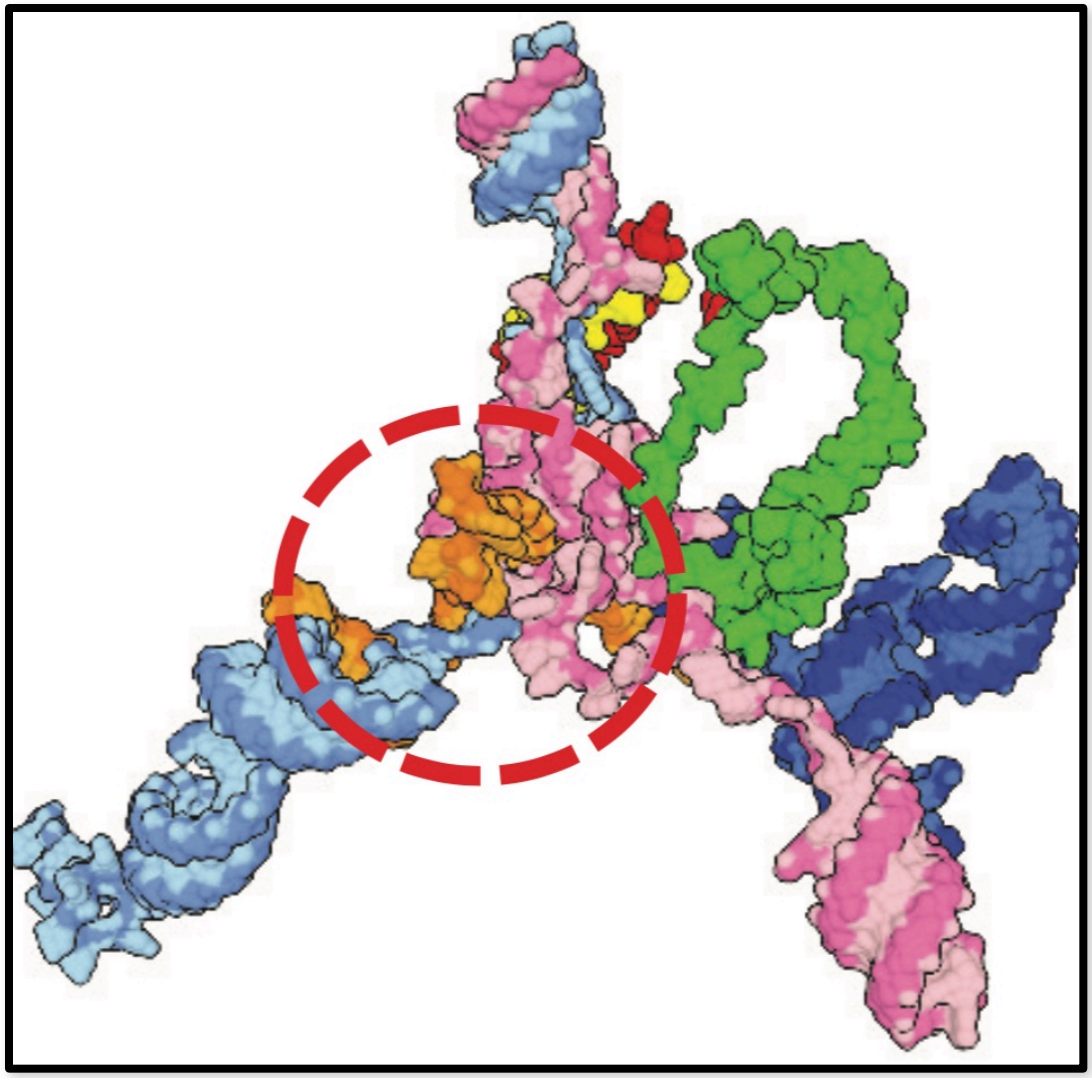




Prp45 => requise pour l'épissage des ARN pré-messagers

Analyse structure / fonction

Site catalytique



Prp45 domaine essentiel

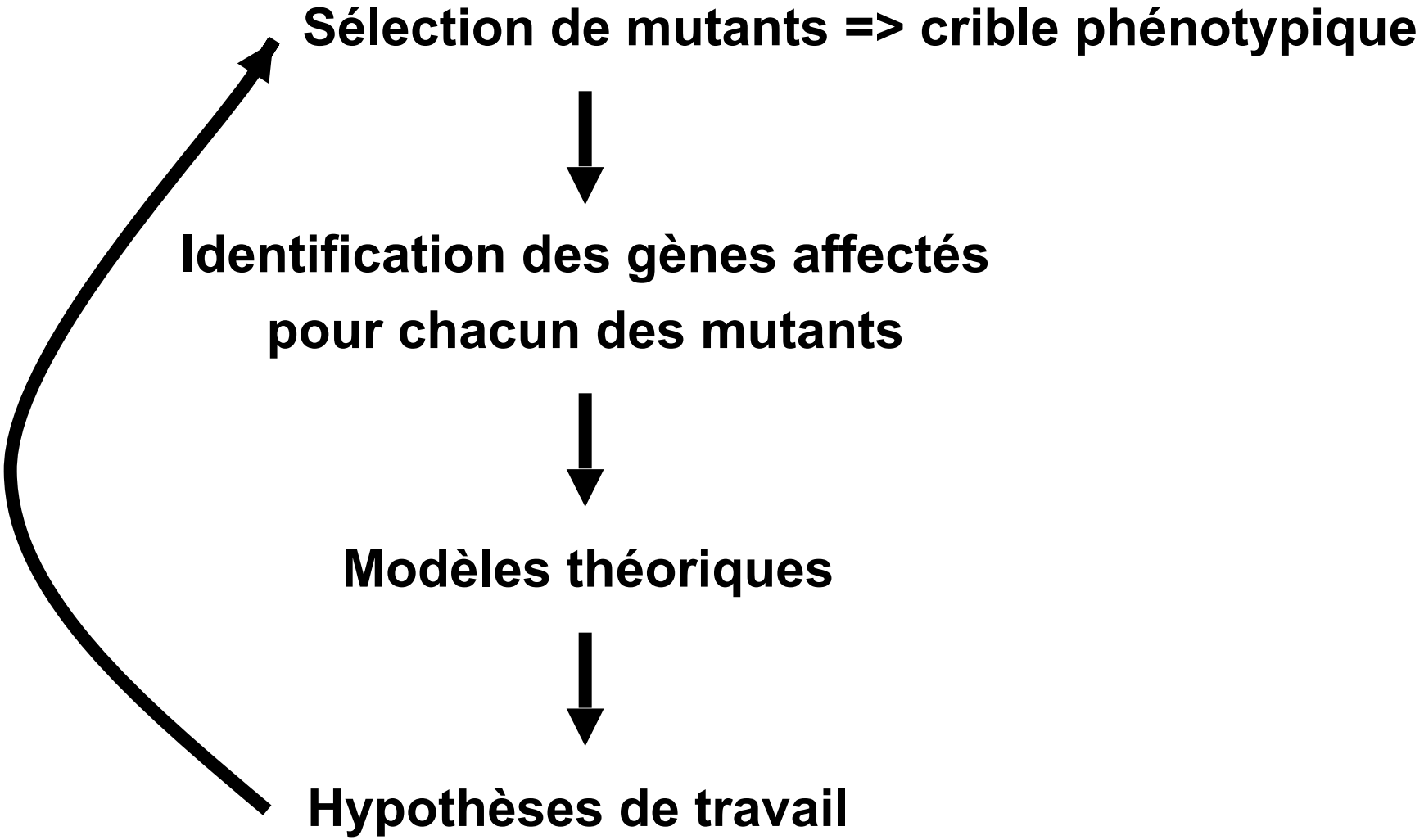
ARN pré-messager

Les interactions géniques

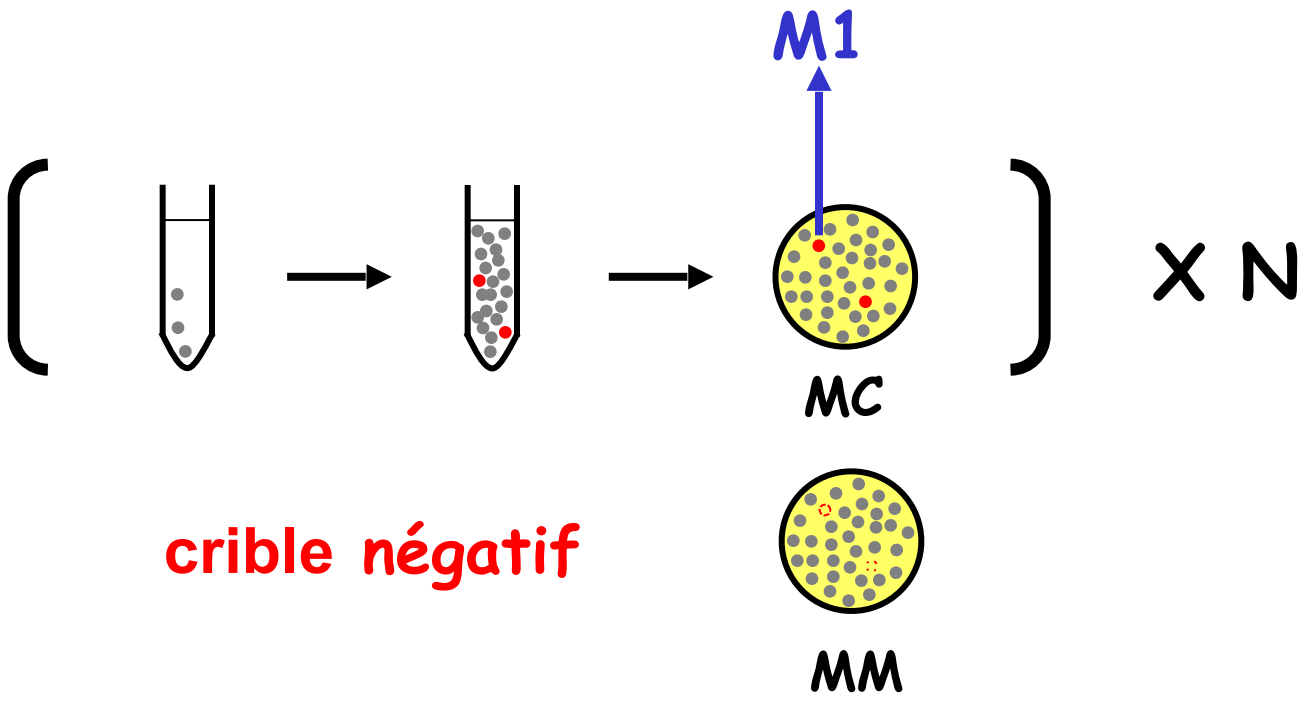
Test de complémentation

&

exceptions


Sélection de mutants => crible phénotypique
Identification des gènes affectés
pour chacun des mutants
Modèles théoriques
Hypothèses de travail

Sélection de mutants de levure [ura$^-$]



crible négatif

N expériences -> N mutants [ura$^-$] indépendants

M1, M2, M3, M4 …

Test de complémentation

[ura$^-$] M1 ✕ 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 *urA1*$_1$- [ura$^-$] (récessif, 1 site muté)
-> allèle mutant *urA1*$_2$- [ura$^-$] (récessif, 1 site muté)

[ura$^-$] M1 *urA1*$_1$- ✕ *urA1*$_2$- M2 [ura$^-$]

Fécondation

$$\frac{urA1_1^-}{urA1_2^-}$$

Diploïde -> [ura$^-$]

Test de complémentation

[ura$^-$] M1 ✕ M3 [ura$^-$]

Hypothèse 2 : M1 et M3 sont muté 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+*** ✕ ***urA1+ urA3-*** M3 [ura$^-$]

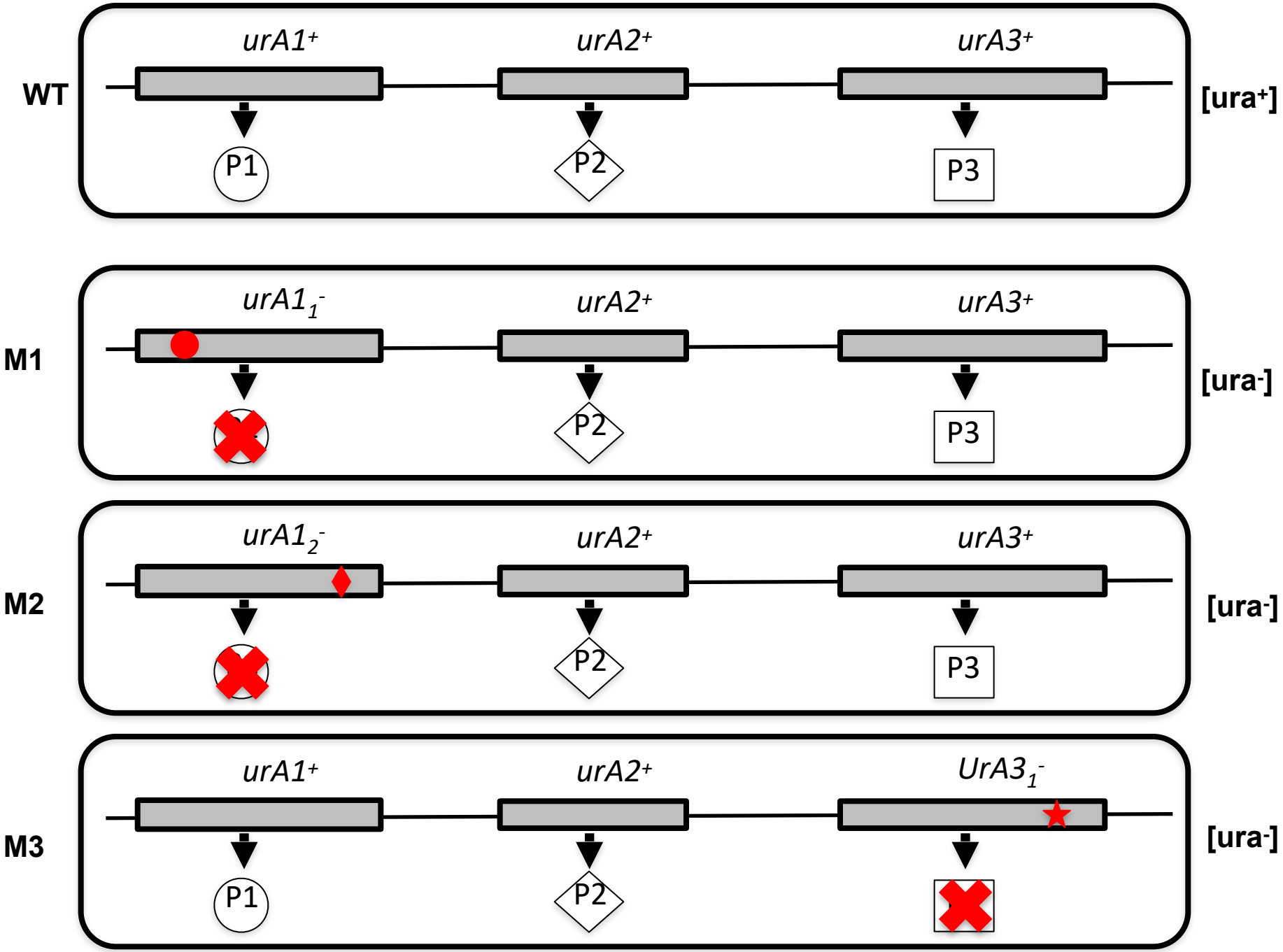
Fécondation ↓

urA1+ > urA1-

urA3+ > urA3-

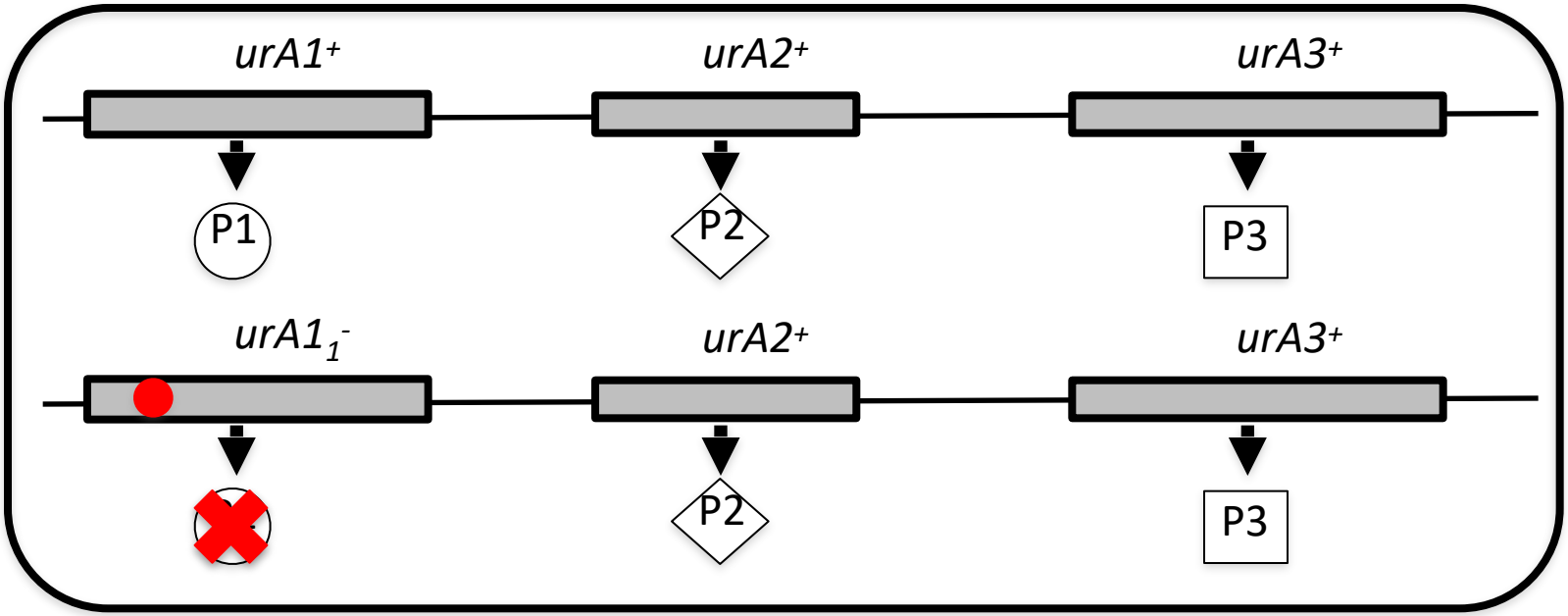
urA1- urA3+
urA1+ urA3-

Alors diploïde -> [ura$^+$] = COMPLEMENTATION FONCTIONNELLE


WT
urA1+
urA2+
urA3+
P1
P2
P3
[ura+]
M1
urA1 1-
urA2+
urA3+
P2
P3
[ura-]
M2
urA1 2-
urA2+
urA3+
P2
P3
[ura-]
M3
urA1+
urA2+
UrA3 1-
P1
P2
[ura-]

Test de dominance récessivité

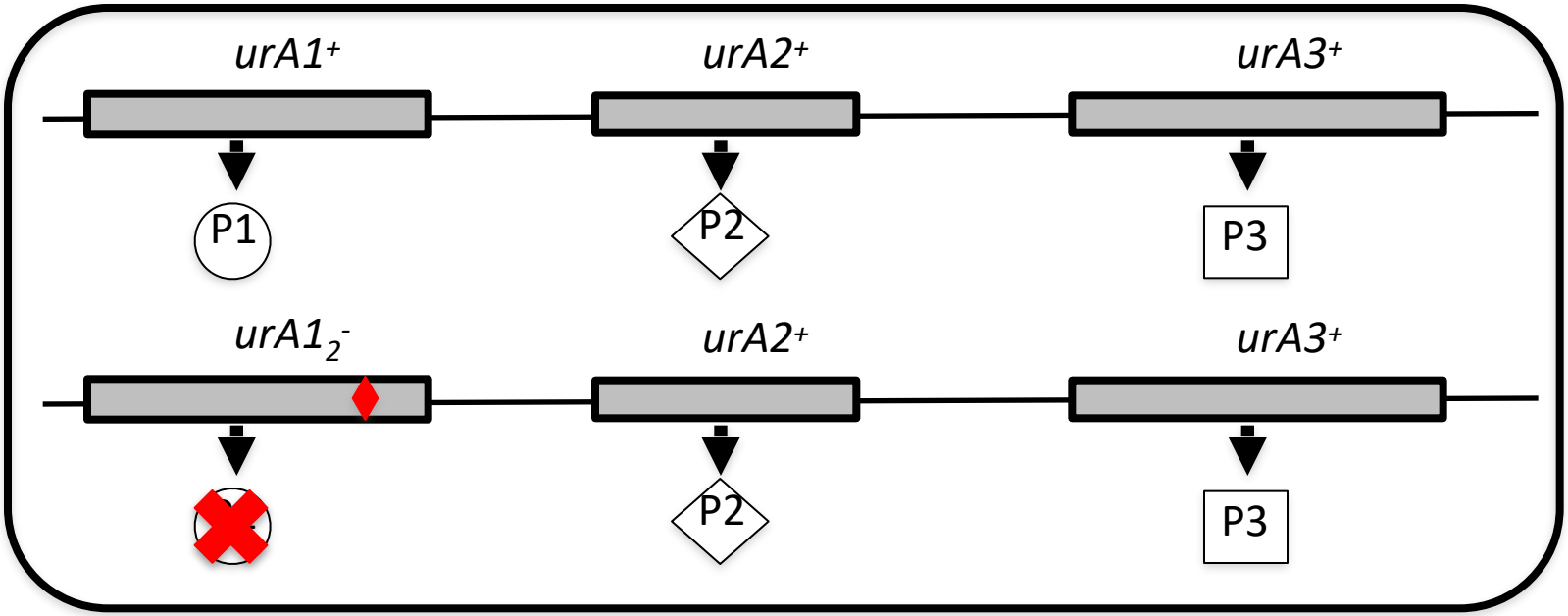
M1 X WT



Si *urA1*$^{+}$ > *urA1*$_{1}^{-}$ alors diploide [ura^{+}]

Test de dominance récessivité

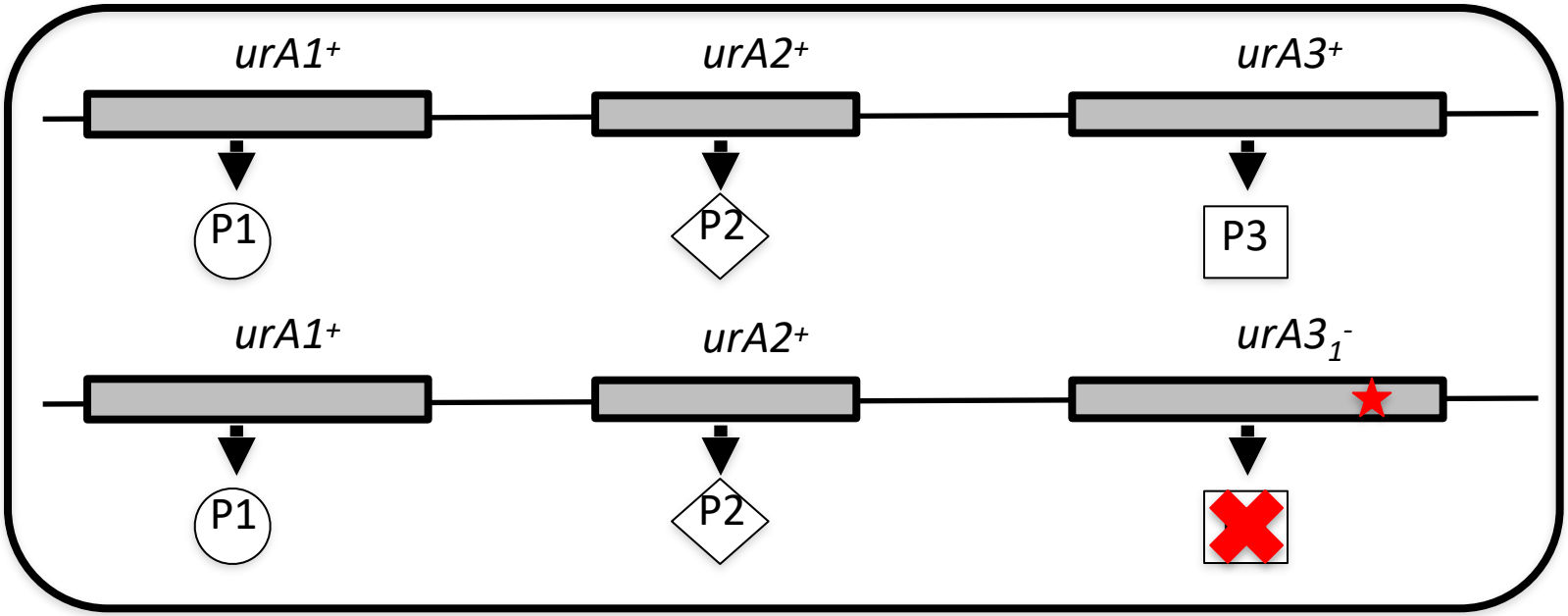
M2 X WT



Si *urA1*$^{+}$ > *urA1*$_{2}^{-}$ alors diploide [ura^{+}]

Test de dominance récessivité

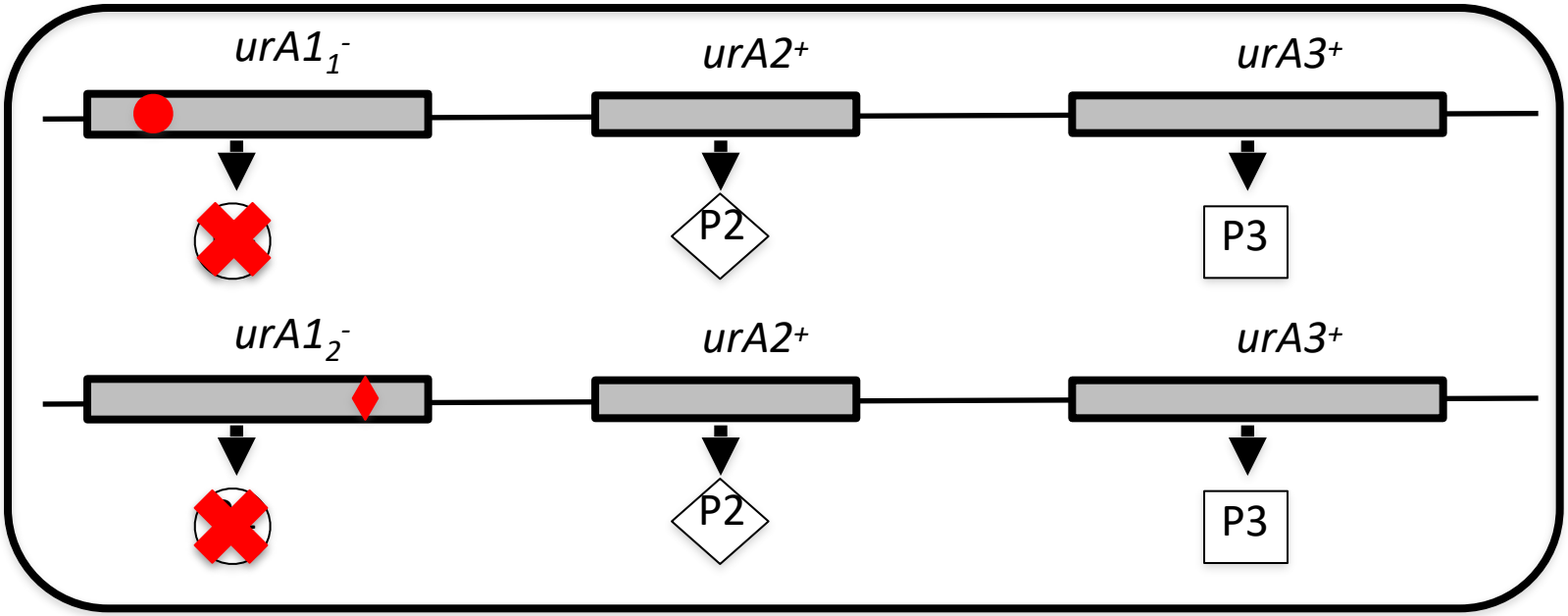
M3 X WT



Si *UrA3*$^{+}$ > *UrA3*$_{1}^{-}$ alors diploide [ura^{+}]

Test de complémentation

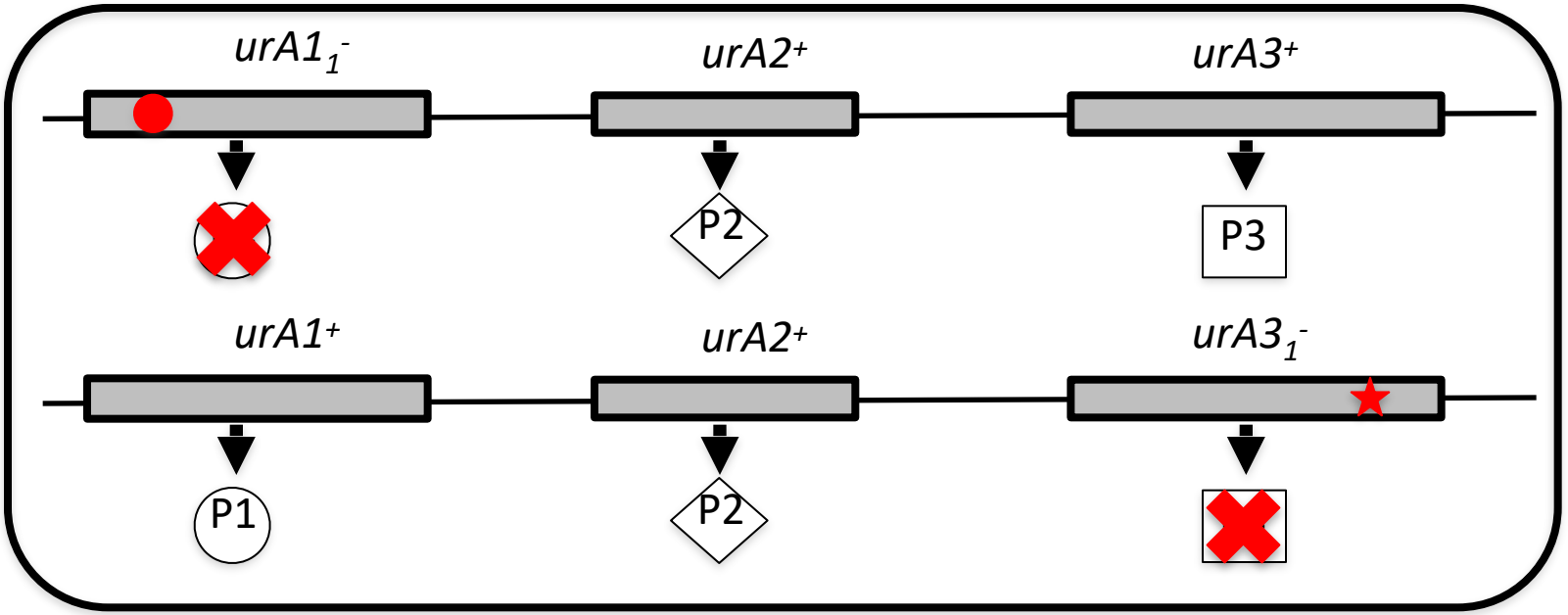
M1 X M2



diploide [ura-]

Test de complémentation

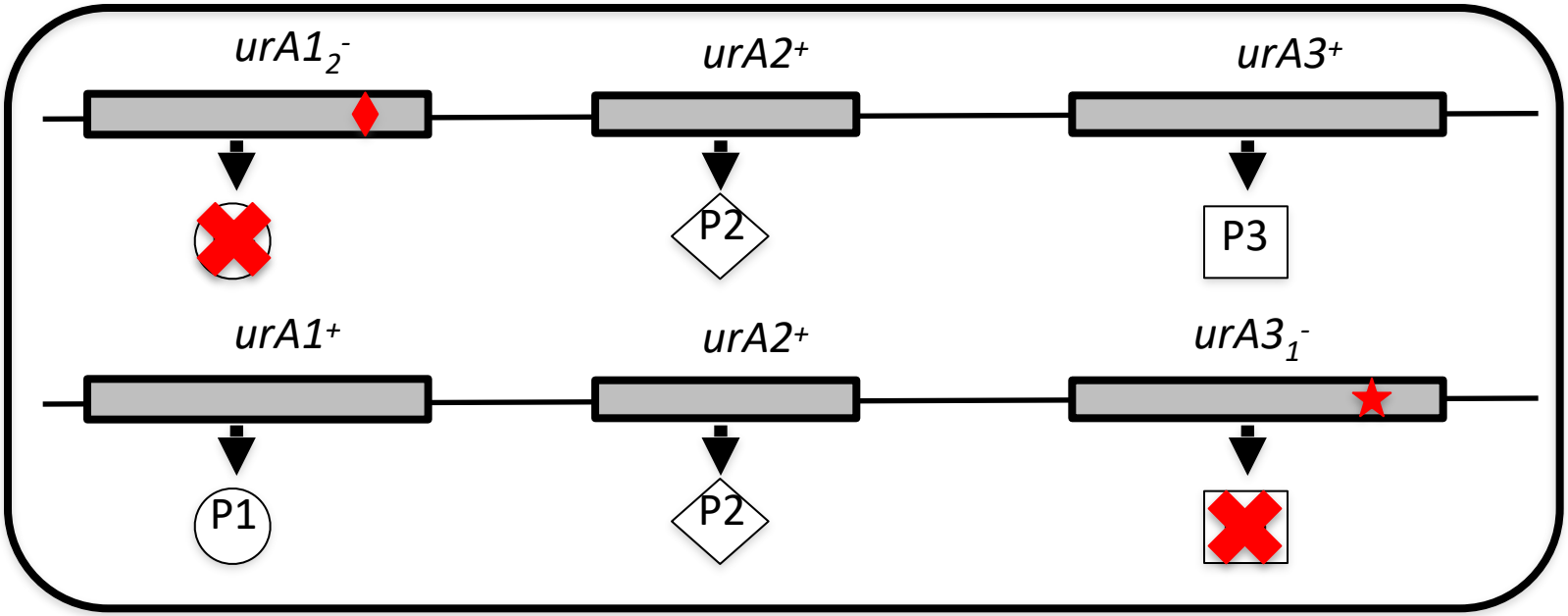
M1 X M3



diploide [ura+]

Test de complémentation

M2 X M3



diploide [ura+]

Groupes de complémentation

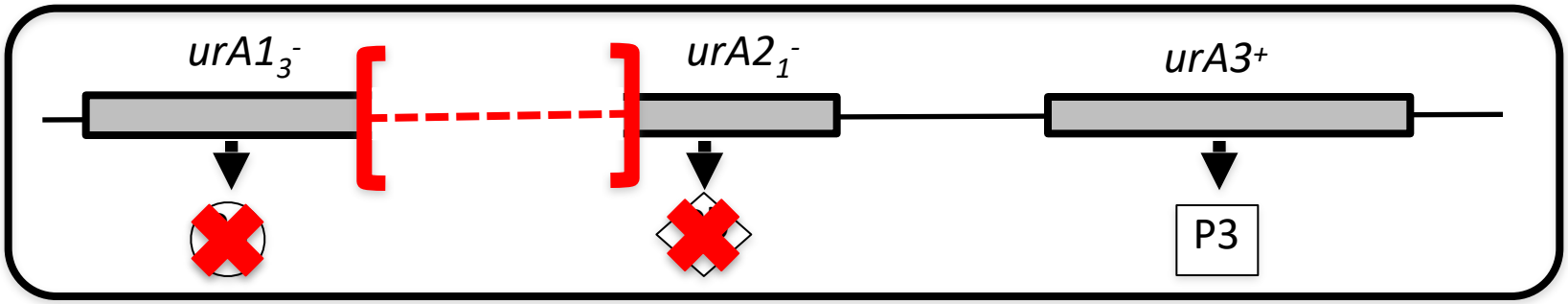
	M1	M2	M3
M1	-		
M2	-	-	
M3	+	+	-

- ◇ Groupe de complémentation 1 : M1 et M2
- ◇ Groupe de complémentation 2 : M3

⇨ 3 mutants mais seulement 2 gènes identifiés: *urA1,* 2 allèles
urA3, 1 allèle

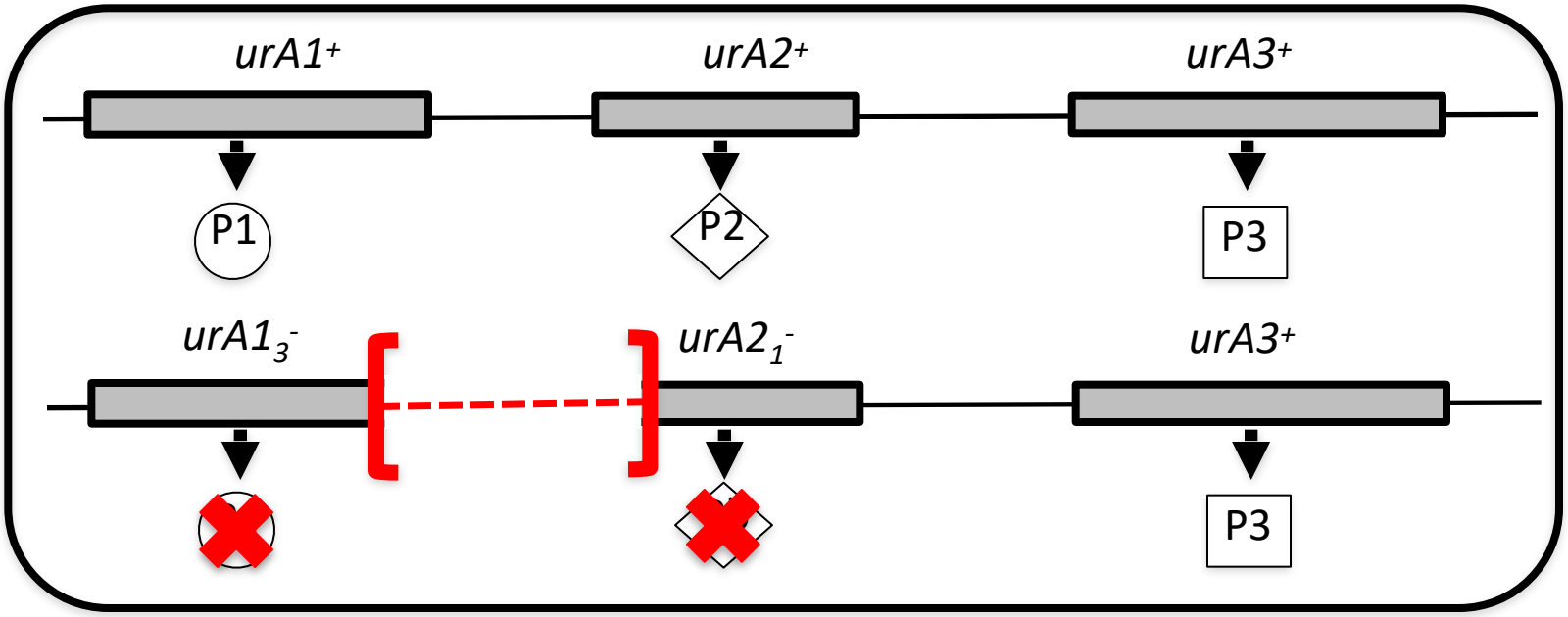
Exceptions au test de complémentation

M4



haploide [ura⁻]

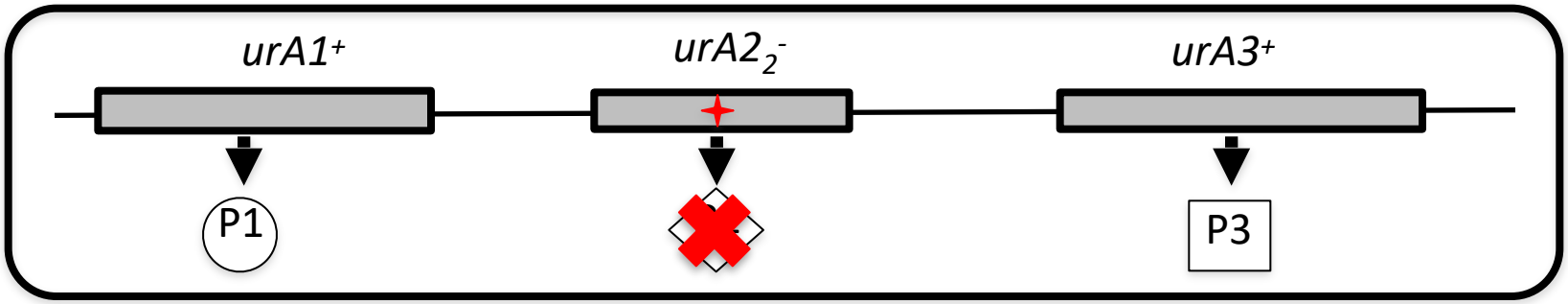
WT
X
M4



diploide [ura⁺]

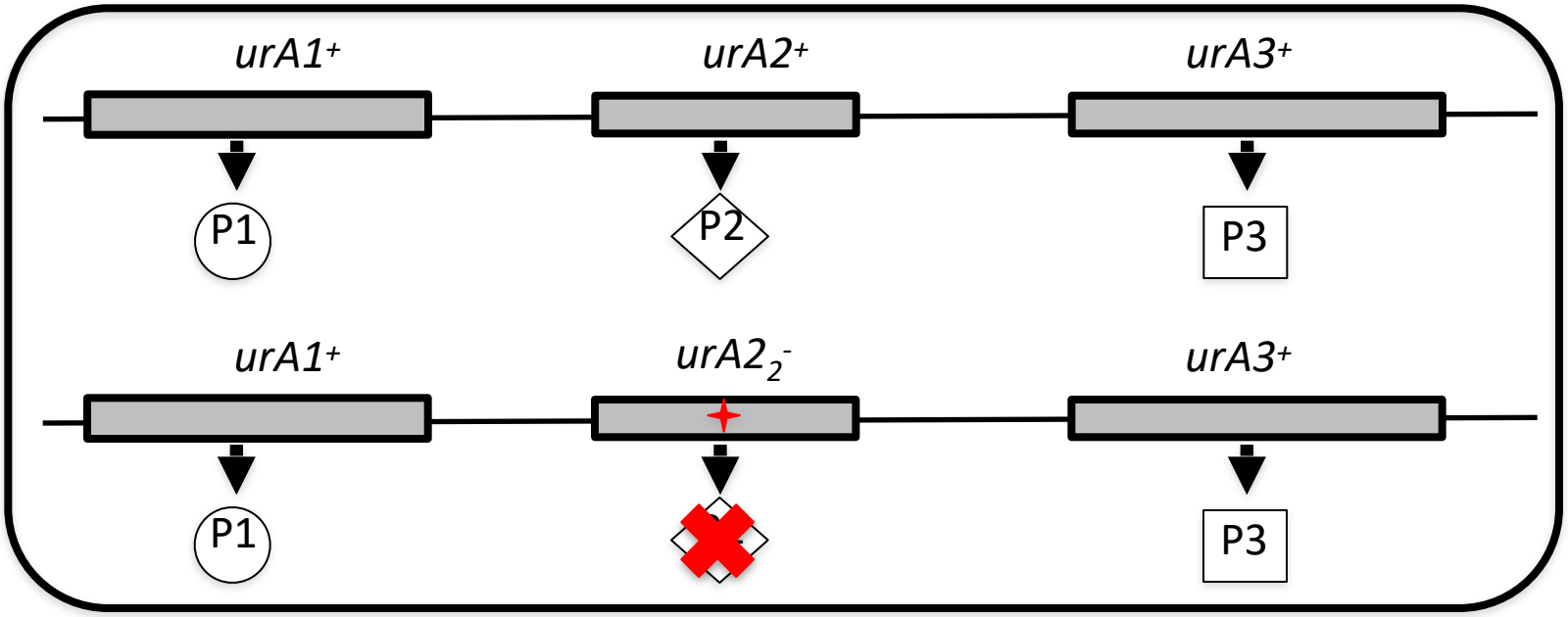
Exceptions au test de complémentation

M5



haploide [ura-]

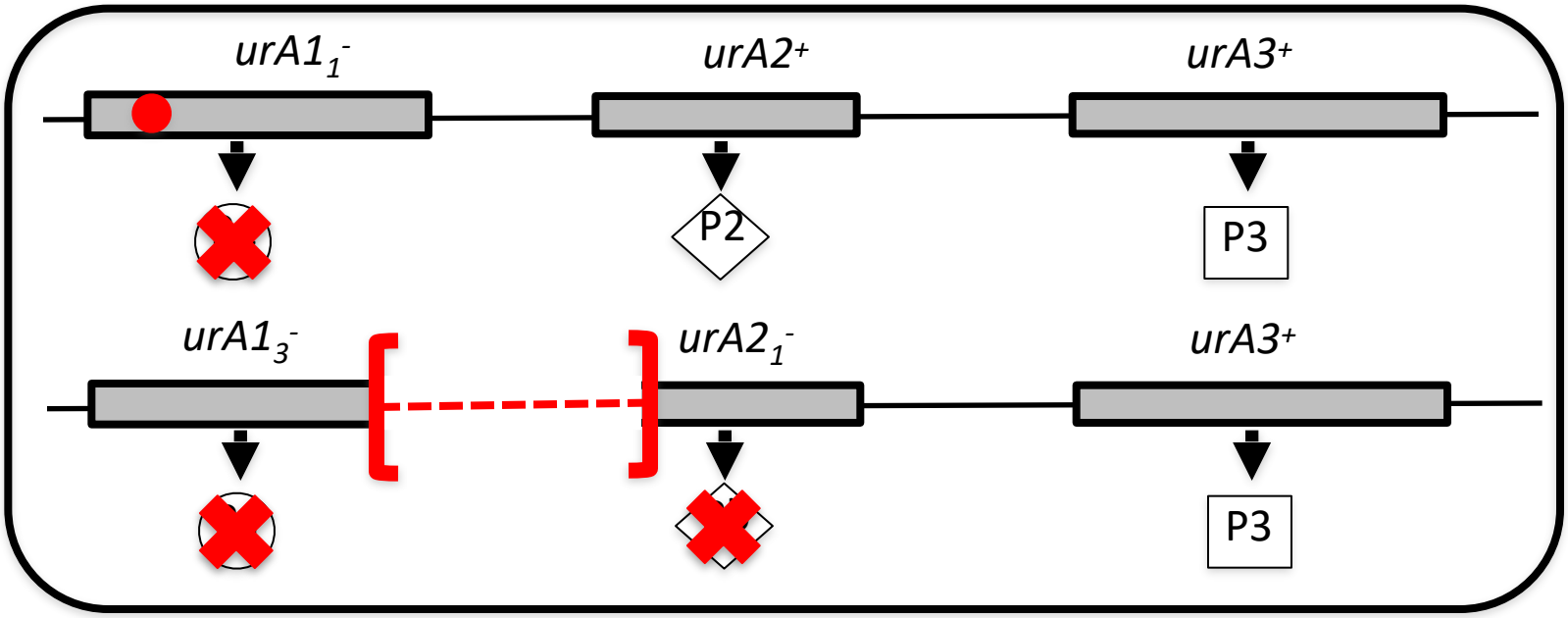
WT
X
M5



diploide [ura+]

Exceptions au test de complémentation

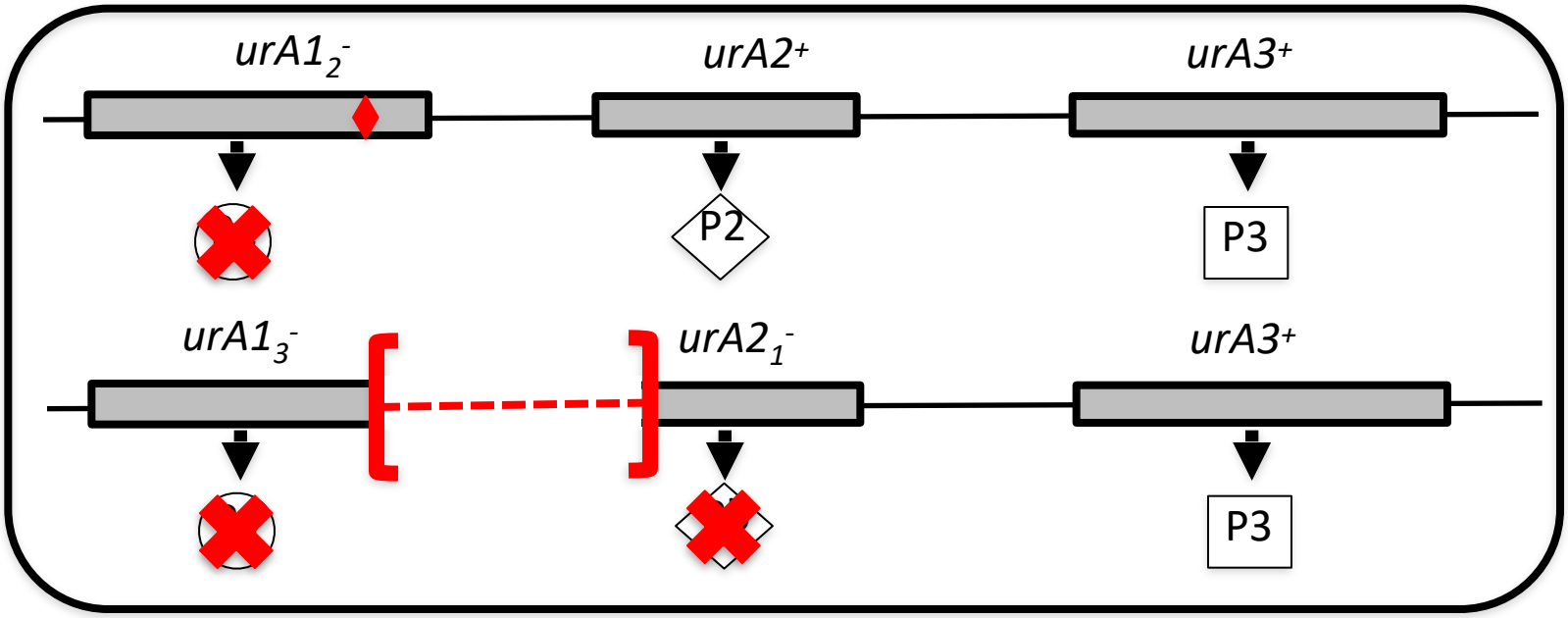
M1
X
M4



diploide [ura-]

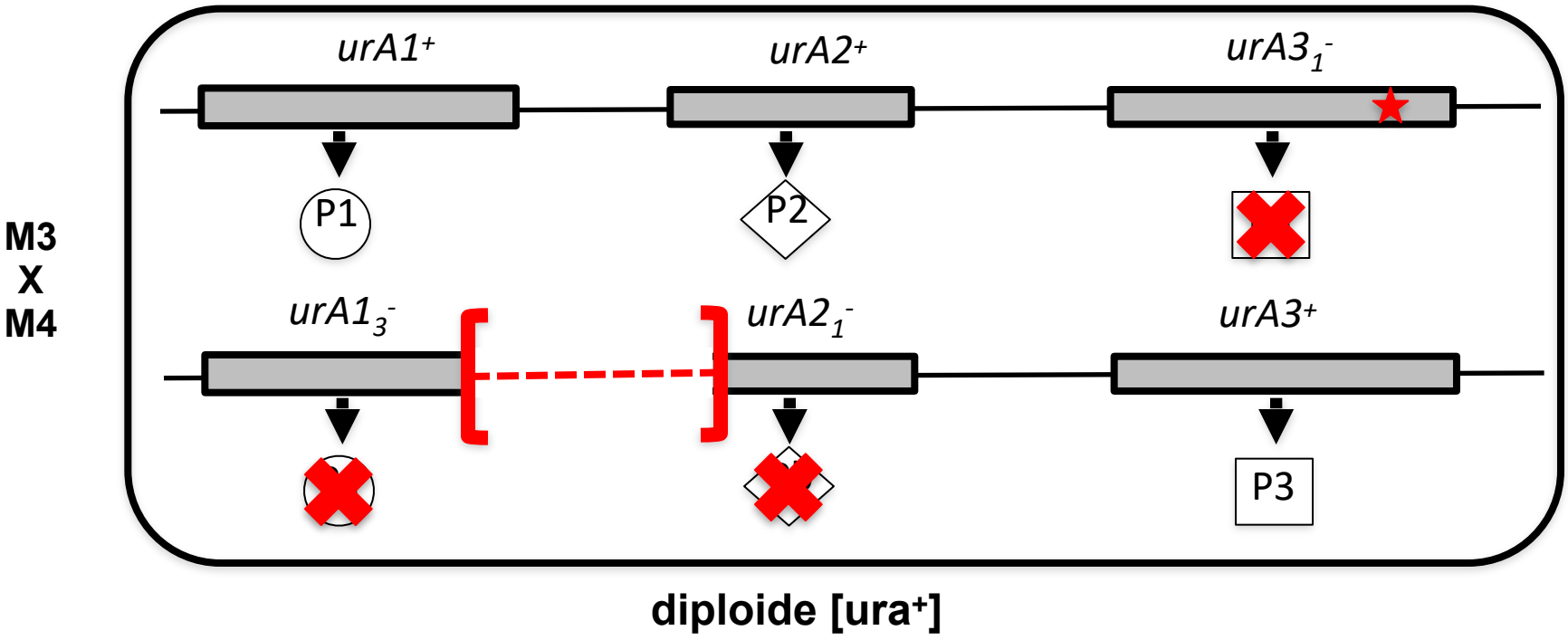
Exceptions au test de complémentation

M2
X
M4



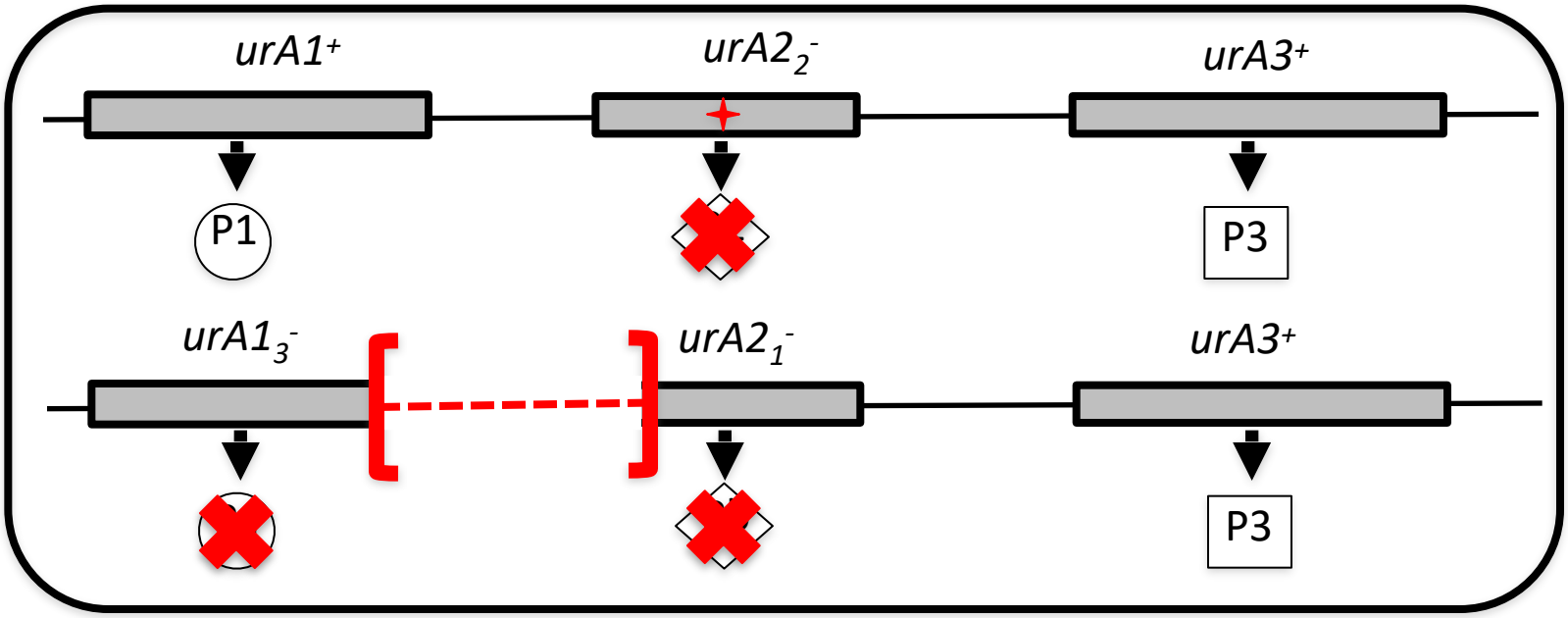
diploide [ura$^-$]

Exceptions au test de complémentation



Exceptions au test de complémentation

M5
X
M4



diploide [ura$^-$]

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
ur*A3*, 1 allèle

Exceptions au test de complémentation

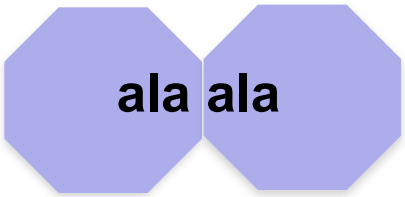
Complémentation intra-génique (ex. *Neurospora crassa*) :

3 allèles du gène *Trp3*

-> allèle sauvage *trp3*$^{+}$ [trp^{+}]
-> allèle mutant1 *trp3*$^{1-}$ [trp^{-}]
-> allèle mutant2 *trp3*$^{2-}$ [trp^{-}]

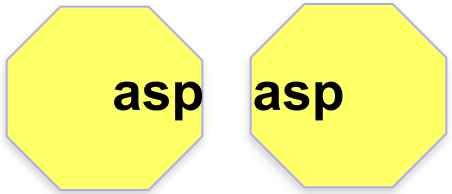
trp3+ > trp3^{1-}

trp3+ > trp3^{2-}



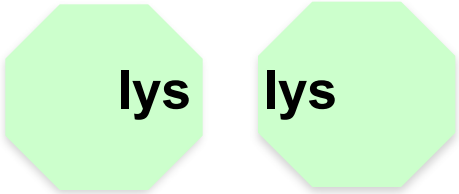
actif

trp3^{+}
trp3^{+}



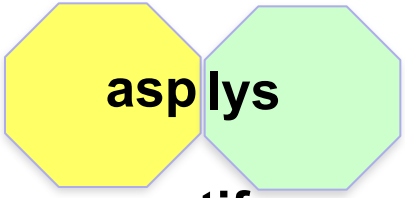
inactif

trp3^{1-}
trp3^{1-}



inactif

trp3^{2-}
trp3^{2-}



actif

trp3^{1-}
trp3^{2-}

protéines homo-multimériques : mutations altérant la charge

Exceptions au test de complémentation

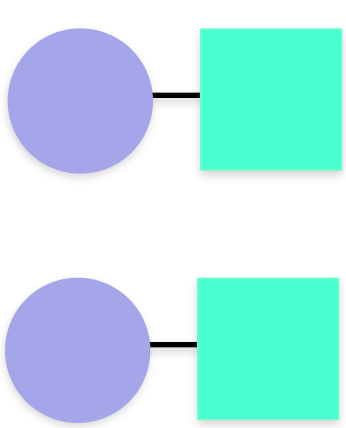
Complémentation intra-génique (ex. *Saccharomyces cerevisiae*):

3 allèles du gène *His4*

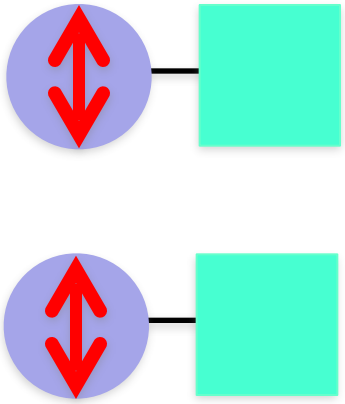
-> allèle sauvage *his4*$^{+}$ [his^{+}]
-> allèle mutant1 *his4*$^{1-}$ [his^{-}]
-> allèle mutant2 *his4*$^{2-}$ [his^{-}]

his4+ > his4^{1-}

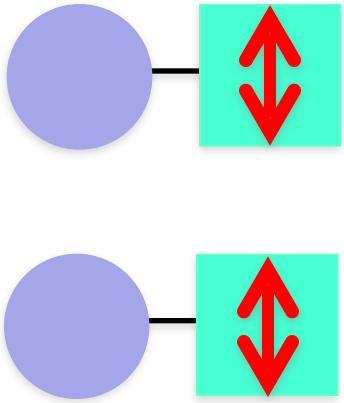
his4+ > his4^{2-}



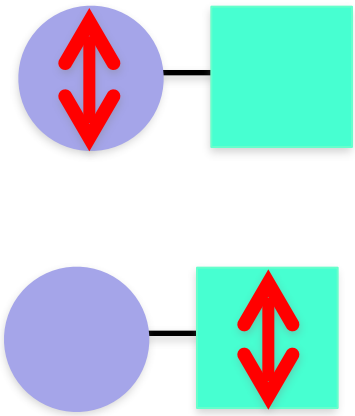
his4^{+}
his4^{+}



his4^{1-}
his4^{1-}



his4^{2-}
his4^{2-}



his4^{1-}
his4^{2-}

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

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

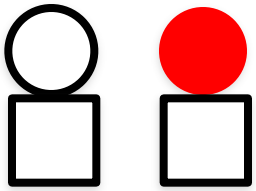
act1-1 TPM1+ / ACT1+ tpm1-	thermorésistant
act1-4 TPM1+ / ACT1+ tpm1-	thermorésistant
act1-1 SAC6+ / ACT1+ sac6-	thermorésistant
act1-4 SAC6+ / ACT1+ sac6-	**thermosensible**

Modèles expliquant l'absence de complémentation :

Protéines hétéro-multimériques (interactions stoechiométriques)

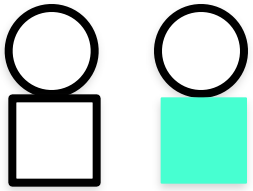
❖ Effet de dose

act1-4 SAC6+ / ACT1+ SAC6+



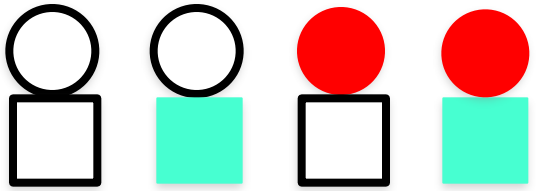
1/2 complexes actifs
➢Fonctionnels

ACT1+ SAC6+ / ACT1+ sac6-

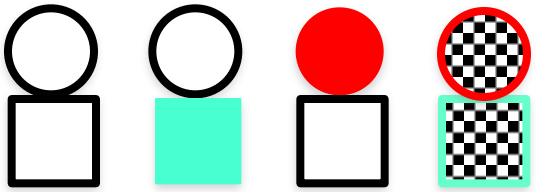


1/2 complexes actifs
➢Fonctionnels

act1-4 SAC6+ / ACT1+ sac6-



1/4 complexes actifs
➢NON fonctionnel

❖ Effet poison

act1-4 SAC6+ / ACT1+ sac6-