

LES VARIATIONS GENETIQUES

Génome = doit-être conservé et maintenu constant (survie de l'espèce)

doit-être variable (pour s'adapter aux variations environnementales)

Ces variations du matériel génétique (ADN ou ARN) sont appelées *mutations*. Ces modifications du génome:

- sont transmises directement à la descendance *si reproduction asexuée*.
- ne sont transmises à la descendance *que si elles affectent les gamètes dans le cas d'une reproduction sexuée*.

1. Les mutations.

1.1. Mise en évidence et caractéristiques des mutations.

1.1.1. Mise en évidence de mutations.

1.1.1.1. Expérience de Beadle et Tatum (1940) Notion de gènes.

Matériel: mutants de *Neurospora crassa* (champignon filamenteux) incapables de synthétiser l'arginine [Arg].

Hypothèse de Beadle et Tatum:

Un composé comme l'arginine doit être synthétisé par une succession d'étapes catalysées par des enzymes différentes. On peut définir l'ordre des différentes étapes par une analyse génétique. Pour chaque mutant on réalise un test d'auxotrophie/ prototrophie en ajoutant au milieu de culture un des intermédiaires métaboliques connus. Deux étaient connus concernant l'anabolisme de l'arginine: l'ornithine et la citrulline.

Analyse des mutants

souche [Ara]	croissance en milieu minimum additionné de:			
	rien	ornithine	citrulline	arginine
A	-	+	+	+
B	-	-	+	+
C	-	-	-	+

A --X--> ornithine ----> citrulline ----> Arginine

B ----> ornithine --X--> citrulline ----> Arginine

C ----> ornithine ----> citrulline --X--> Arginine

X : gène modifié

Donc a un gène = une enzyme.

1.1.1.2. Expérience de Lederberg.

Il voulait déterminer l'origine des mutations.

Au fur et à mesure des repiquages, le nombre de mutants augmente malgré le fait que l'on récupère les clones sur des populations qui sont soumises à des pressions de sélections.

Donc dans la suspension initiale il y avait des mutants => donc l'apparition des mutations est spontanée.

1.1.2. Caractéristiques des mutations.

Apparition spontanée,

Fréquence: 10^{-2} - 10^{-20} en moyenne 10^{-8} = fréquence d'apparition des mutations ponctuelles.

Stabilité : la mutation sera stabilisée si l'environnement apporte un avantage à la souche mutée (cad si l'environnement maintient la pression de sélection). Sinon la mutation disparaît par réversion (la fréquence de réversion est la même que celle d'apparition). Généralement les mutations sont indépendantes les unes des autres.

1.2. Différents types de mutations.

Certaines altérations du génome peuvent être très importantes en taille et décelables par un caryotype altéré ou affecter des petits fragments d'ADN chromosomique ou mitochondrial dans ce cas, le caryotype est normal.

1. 2. 1. Altérations chromosomiques. (visible chez Euvaryotes uniquement)

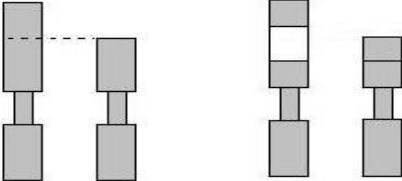
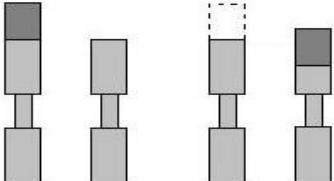
On observe 2 types d'anomalies: en nombre ou en structure.

1.2.1.1. Anomalies de nombre

Ces anomalies résultent le plus souvent d'une mauvaise ségrégation des chromosomes lors de la méiose de gamétogénèse.

1.2.1.2. Anomalies de structure

Lors d'un caryotype, on récupère les chromosomes métaphasiques, on observe la taille du bras court et du bras long.

A/ Délétions	B/ Translocation
une délétion est une élimination d'une partie de chromosome.	échange de fragment de chromatides de 2 chromosomes non homologues.
	
<p>délétion terminale délétion ségmentaire</p>	<p>translocation réciproque</p>

1. 2. 2. Modifications subtiles de l'ADN: mutations de l'ADN

Ces modifications ne sont pas perceptibles lors de réalisation de caryotypes. Il peut s'agir soit d'un remplacement d'un nucléotide par un autre: mutation ponctuelle.

- transition: une base purique est remplacée par une base purique, idem pour pyrimidiques.
- transversion: une base purique est remplacée par une base pyrimidique ou inversement.
 - De l'élimination de plusieurs nucléotides: délétion ou microdélétion.
 - De l'addition d'un ou plusieurs nucléotides: insertion.

1.3. Conséquences des mutations.

1. 3. 1. Cas des altérations chromosomiques.

Ces altérations sont en général responsables de maladies génétiques graves chez l'homme.

Trisomie: 3 exemplaires d'un chromosome au lieu de 2 (Syndrome de Down ou trisomie 21 = 3 chromosomes 21).

Monosomie: 1 exemplaires d'un chromosome au lieu de 2. La plupart des monosomies sont létales sauf la monosomie X (ex : Syndrome de Turner: individus de sexe féminin de caryotype 44 autosomes + X).

Polyploidie: Triploïdie (3n chromosomes) et tétraploïdie (4n chromosomes) sont létales.

1. 3. 2. Cas des mutations plus subtiles.

Ces mutations de l'ADN affectent le plus souvent des séquences non codantes, ou des séquences introniques ou des séquences codantes sans altérer leur fonctionnement: mutations silencieuses. Cependant certaines altèrent le fonctionnement de séquences codantes de l'ADN: les gènes. Dans ce cas on définit 2 types de mutations:

- les mutations conduisant à l'expression d'une protéine anormale: mutation faux-sens,
- les mutations empêchant l'expression de la protéine: mutations non sens.

Rq: certaines mutations peuvent être conditionnelles: ne s'expriment que dans des conditions particulières exp mutants thermosensibles.

Exemples:

• Pathologies humaines	• Mutants bactériens
<p><u>Phénylcétonurie:</u> le gène impliqué code la Phe hydroxylase. gène sauvage: enzyme fonctionnelle Arg 408 gène phénylcétonurique: enzyme inactive Trp 408. Le changement d'un acide aminé dans la protéine est responsable de la maladie.</p>	<p>- <u>Mutants morphologiques</u> Variation S → R chez les Entérobactéries dû à une modification profonde de la paroi Gram - avec perte de la couche lipopolysaccharidique, donc altération des caractères antigéniques. Variation S → R chez les Pneumocoques dû à la perte de la capsule impliquée dans la virulence.</p>
<p><u>Drépanocytose:</u> 3 cas sévères:</p> <ul style="list-style-type: none"> •Mutation ponctuelle au codon 17: <u>T</u>AG (STOP) au lieu de AAG => pas de chaîne D. •Délétion au codon 6: G-G au lieu de GAG => pas de chaîne D. •Insertion d'un nucléotide entre les codons 71 et 72: TTT <u>T</u> AGT => pas de chaîne D. 	<p>- <u>Mutants provoquant l'exigence en un facteur de croissance</u> prototrophe → auxotrophe - <u>Mutants nutritionnels</u> perte de la capacité à métaboliser un substrat (Lac+ → Lac- par inactivation de la lactose perméase) - <u>Mutants résistants aux agents antimicrobiens</u> acquisition de la résistance à un ATB</p>
<p><u>Myopathie de Duchenne:</u> Délétion d'une partie du gène: mutation non sens. <i>Enorme délétion → fonctionnement musculaire</i></p>	<p>- <u>Mutants létaux</u> Mutation affectant un gène dont le produit est indispensable à la cellule.</p>

2. Origine des mutations.

2. 1. Naturelle: due au fonctionnement même de la cellule.

2. 1. 1. Déroulement anormal de la mitose ou de la méiose.

- Erreur de ségrégation des chromosomes à la méiose/mitose,
- Résolutions altérées des chiasmas à la méiose.

2. 1. 2. Erreurs de l'ADN polymérase.

ADN polymérase incorpore 1 à 1 les nucléotides complémentaires au brin matrice. Lors de l'addition des nt, elle commet des erreurs avec une fréquence de 10^{-4} .

Selon la séquence, elle peut hésiter, tituber, balbutier, se tromper de nucléotide, en ajouter quelques uns ou ne pas en insérer quelques uns.

Fidélité du processus de réplication:

- polymérisation 10^{-4}
- activité de relecture: proof-reading: le dernier nucléotide incorporé est vérifié. 10^{-7}
- système de réparation: importance de la méthylation pour repérer le brin correct 10^{-10}

proof-reading = fragment de Klenow (ADNpol1 + activité 3'-5' exonucléasique)

Donc certaines modifications ne sont pas corrigées.

2. 1. 3. Eléments génétiques mobiles.

(...)

2. 1. 4. Prophage / Virus.

Certains ADN viraux peuvent / doivent s'insérer dans l'ADN de la cellule pour que s'effectue le cycle viral. Cette intégration peut conduire à une mutagénèse par *insertion*.

Conséquences: inactivation d'un gène ou surexpression du gène. Problème lorsque c'est un gène normalement réprimé.

2. 2. Mutaènes artificiels.

2. 2. 1. Mutagènes chimiques.

2. 2. 1. 1. Agents modifiant les bases.

a/ Acide nitreux (HNO_2) : désamination oxydative: $(-\text{NH}_2) \rightarrow (-\text{OH}) \Rightarrow$ Transitions

Adénine \rightarrow Hypoxanthine \Rightarrow AT \rightarrow (H)GC

Cytosine \rightarrow Uraciles \Rightarrow CG \rightarrow (U)AT

b/ Agents alkylants

Provoquent des méthylations de bases \Rightarrow substitutions
ex sulfonate d'éthylmethane

2. 2. 1. 2. Analogues de nucléotides.

ex 5 bromo-uracile existe sous 2 formes, une forme

- cétone analogue de T qui peut s'apparier avec A
- éinol (plus rare) qui peut s'apparier avec G

ex 2 aminopurine

- analogue de A, s'apparie avec T
- peut former 1 seule liaison H avec C

Mutation par substitution de bases de type transition.

2. 2. 1. 3. Agents intercalants.

Molécules aromatiques planes peuvent s'intercaler entre les plateaux des paires de bases adjacents ce qui conduit à l'insertion ou la délétion d'un nt ou plus.

Ex: BET ou acridine orange.

2. 2. 2. Agents mutagènes physiques.

Les radiations X et gamma sont de puissants agents mutagènes mais les lésions causées ne sont pas exactement connues.

Les radiations UV peuvent former des dimères de pyrimidine (T-T ou C-T). Ces dimères n'ont aucun sens pour les ADN ou ARN polymérase. Au cours de la réplication, l'ADN pol saute la lésion ou reste bloquée.

Mais ces altérations fréquentes sont réparées par un système de réparation de l'ADN par excision de nucléotides.

Le génome des êtres vivant évolue par transfère de matériel génétique au travers de différentes espèces par modifications des arrangements des fragments d'ADN dans un même génome.

3. Mécanismes des transfert d'ADN.

3.1. La transformation bactérienne (Griffith puis Avery et coll.)

Le phénomène a été découvert par Griffith en 1928 mais n'a été compris qu'en 1944 à la suite des expériences d'Avery, MacLeod et MacCarthy.

Sous forme encapsulés (Smooth), les pneumocoques présentent un fort pouvoir virulent et conduisent à la mort par septicémie des souris infectées en 24-48 heures. Les formes sans capsule (Rough) n'ont pas de pouvoir pathogène.

pneumocoques S	pneumocoques R	suivi de souris infectée
vivants	-	<i>Mortes par septicémie</i>
-	vivants	<i>vivantes</i>
inactivés par la chaleur	-	<i>vivantes</i>
inactivés par la chaleur	vivants	<i>Mortes par septicémie</i>

De plus, les germes isolés de la dernière souris s'avèrent être des pneumocoques S. Donc les bactéries R ont été transformées en bactéries S grâce à un pouvoir transformant.

Avery et coll (1944) montrent que le pouvoir transformant n'est autre que l'ADN.

- les caractéristiques physiques et chimiques du pouvoir transformant correspondent à celles de l'ADN
- le pouvoir transformant est insensible à la RNase (nucléase hydrolysant l'ARN), mais disparaît après traitement à la DNase (nucléase hydrolysant l'ADN)

Application en biologie moléculaire:

- la transformation bactérienne
- la transvection chez les Eucaryotes

3. 2. Conjugaison Bactérienne.

3. 2. 1. Cas de la transmission du facteur F.

Caractéristiques mises en évidence expérimentalement: exigence d'un contact direct entre les bactéries F+ et F-, insensible à l'action de la DNase, seule la bactérie F- reçoit de l'information génétique.

F+ → F-, les bactéries receveuses deviennent F+. Freq 10⁻⁶.

Donc: Conjugaison transfert unidirectionnel d'une copie d'ADN d'une bactérie donneuse vers une bactérie receveuse (donc la bactérie donneuse conserve l'information transférée).
Nécessite le contact entre deux bactéries qui s'effectue grâce aux pilis sexuels.

3. 2. 2. Cas de la transmission Hfr.

Observation d'apparition de bactéries recombinées avec une fréquence 10^{-1} à 10^{-3} , acquisition de caractères supplémentaires par transmission par le facteur F. Transmission Hfr: High Frequency of recombination.

◆ Expérience de transfert interrompu

Souche Hfr (F+) [a+ , b+ , c+ , d+ , e+] x souche F- [a- , b- , c- , d- , e-]

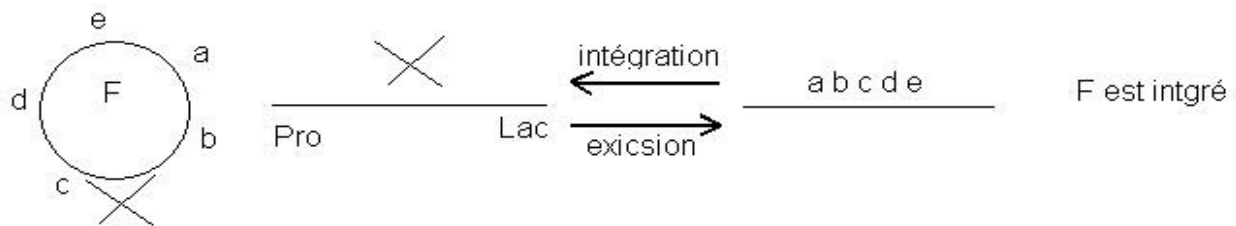
→ Conjugaison interrompue à des temps variables par agitation

t conjugaison	t1	t2>t1	t3>t2	t4>t3	t5>t4	t6>t5
phénotype des conjugants	F- [a+ , b- , c- , d- , e-]	F- [a+ , b+ , c- , d- , e-]	F- [a+ , b+ , c+ , d- , e-]	F- [a+ , b+ , c+ , d+ , e-]	F- [a+ , b+ , c+ , d+ , e-]	F+ [a+ , b+ , c+ , d+ , e+]

Tous les caractères chromosomiques de la bactérie donneuse peuvent être transférés.

◆ Souches F+ et Hfr

Souches F : F = épisome libre



Il y a plusieurs sites d'insertion du facteur F dans le génome d'*E. coll*.

◆ Mécanisme du transfert Hfr

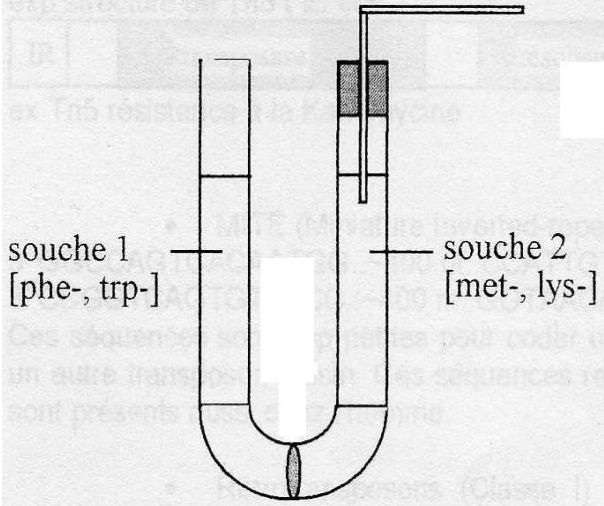
Coupe dans l'ADN du facteur F, l'extrémité 5' s'engage dans le pont de conjugaison emportant la tête de F et le chromosome bactérien. Parallèlement, il y a néosynthèse du chromosome bactérien (extrémité 3' du facteur F servant d'amorce) par l'ADN polymérase bactérienne. Le brin d'ADN transféré sert de matrice pour la synthèse d'un brin complémentaire (exogénote). Par recombinaison avec l'endogénote, il y a acquisition des caractères a+ , b+ , c+ , d+ par la bactérie receveuse.

Mécanisme exclusivement bactérien.

Cette conjugaison interrompue sert à faire des cartes chromosomiques bactériennes. On localise les gènes par rapport aux autres.

3. 3. Transduction.

3. 3. 1. Découverte historique : expérience de Lederberg et Zinder (1952)

	<p>2 souches Salmonella typhimurium auxotrophes.</p> <p><u>Analyses:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • filtre empêche le contact entre bactéries => pas de conjugaison • action Dnase, RNase ne change rien => pas de transformation <p><u>Interprétation:</u></p> <p>Pas d'ADN libre ni d'ARN qui est transféré. Donc l'ADN transféré est protégé : se sont des bactériophages qui transportent les gènes d'une bactérie à une autre.</p> <p>Mécanisme qui fonctionne bien avec les phages tempérés.</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

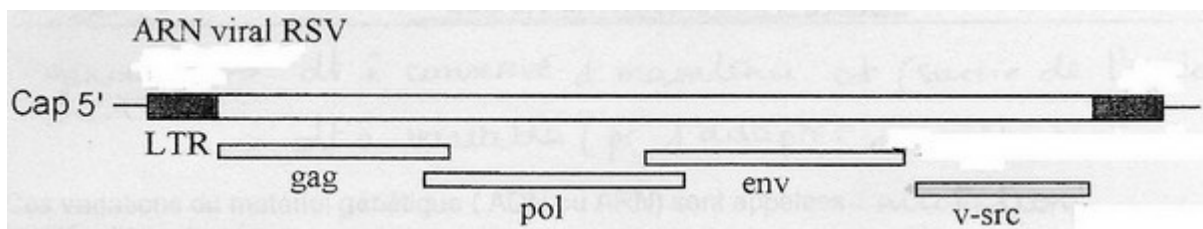
3. 3. 2. Phages transducteurs tempérés.

Cf. cours BCM

3. 3. 3. Virus transducteurs.

Exemple RSV (Rous sarcoma virus), rétrovirus transducteur:

Au niveau des cellules animales: système analogues de transduction par une famille de virus, les rétrovirus.



Responsables de cancers chez le poulet: notion de virus oncogènes.

Comment un rétrovirus devient oncogène:

- Rappel du cycle viral d'un rétrovirus
 - Utilisation du 2ème LTR comme promoteur pour générer le 2ème ARN viral encapsidé.
- Puis remaniement entre provirus.

3. 3. 4. Applications.

Utilisation des bactériophages comme vecteurs (phagemides) pour la production de simple brins d'ADN (séquences).

Utilisation des virus comme vecteurs pour la transfection de cellules Eucaryotes, en fonction de la multiplicité d'infection (nb de particules virales infectantes /cellule) on peut obtenir des efficacités de 100%. De plus l'utilisation de rétrovirus permet d'obtenir directement des clones stables.

3. 4. Transposition.

Les transposons sont des éléments génétiques mobiles capables de s'intégrer dans un ADN puis de s'exciser pour aller s'intégrer ailleurs. La transposition est permise par une activité enzymatique la transposase codée par le transposon lui-même.

On distingue 3 types de transposons :

1) Transposons bougeant directement d'une place à l'autre (classe II)

Transposons simples

- séquences d'insertion: 2 répétitions terminales inversées encadrant le gène de la transposase.
(ex IS1, IS2, IS4, ISS pour E.coli)

IR	transposase	IR
----	-------------	----

- transposons complexes: de 3 types

2 répétitions terminales inversées encadrant le gène de la transposase + autres gènes conférant au transposon des fonctions supplémentaires.

ex structure de Tn3 (*E. coli*)

IR	transposase	resolvase	β -lactamase	IR
----	-------------	-----------	--------------------	----

ex Tn5 résistance à la Kanamycine

2) MITE (Miniature Inverted-repeats Transposable Elements)

5' GGCCAGTCACAATGG ... ~ 400 nt ... CCATTGTGACTGGCC 3'

3' CCGGTCAGTGTTACC ... ~ 400 nt ... GGTAACACTGACCGG 5'

Ces séquences sont trop petites pour coder une protéine on, pense que la transposase est apportée par un autre transposon voisin. Ces séquences représentent 6% du génome du riz (soit 100 000 copies) et sont présents aussi chez l'homme.

3) Rétrotransposons (Classe I)

Il transcrivent d'abord l'ADN en ARN et utilisent une réverse transcriptase pour fabriquer une copie ADN qui s'intégrera à un autre endroit.

2 LTR encadrant une réverse transcriptase (organisation proche des rétrovirus)

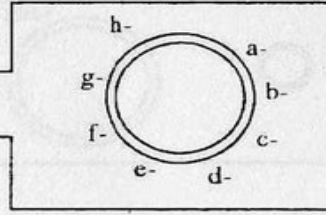
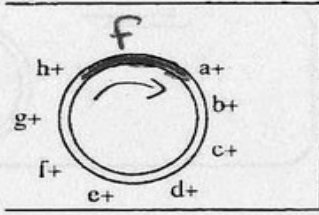
(ex Ty del levure, Bs1 du maïs...)

Mécanismes de transposition

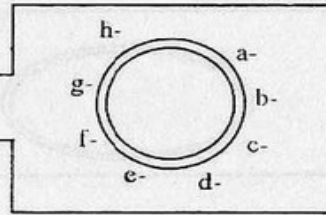
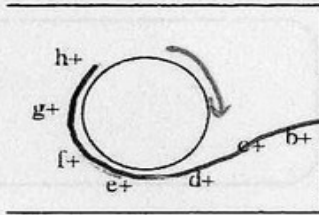
Les 2 séquences IR du transposon s'accolent et de placent devant la séquence d'ADN cible (certains s'insèrent au hasard).

Hfr (donneuse)

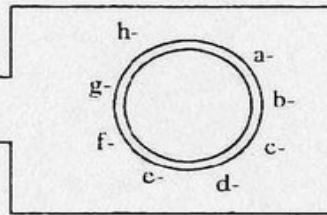
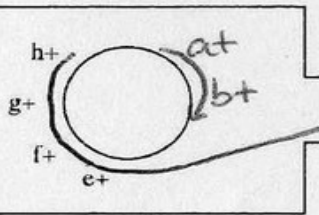
F- (receveuse)



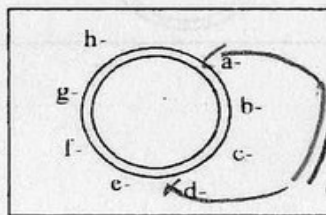
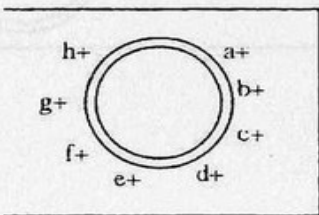
Mise en place du pont de conjugaison (pilis sexuels)



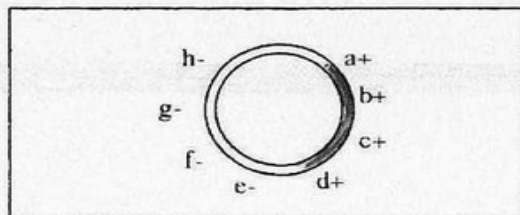
Réplication par mécanisme de cercle roulant

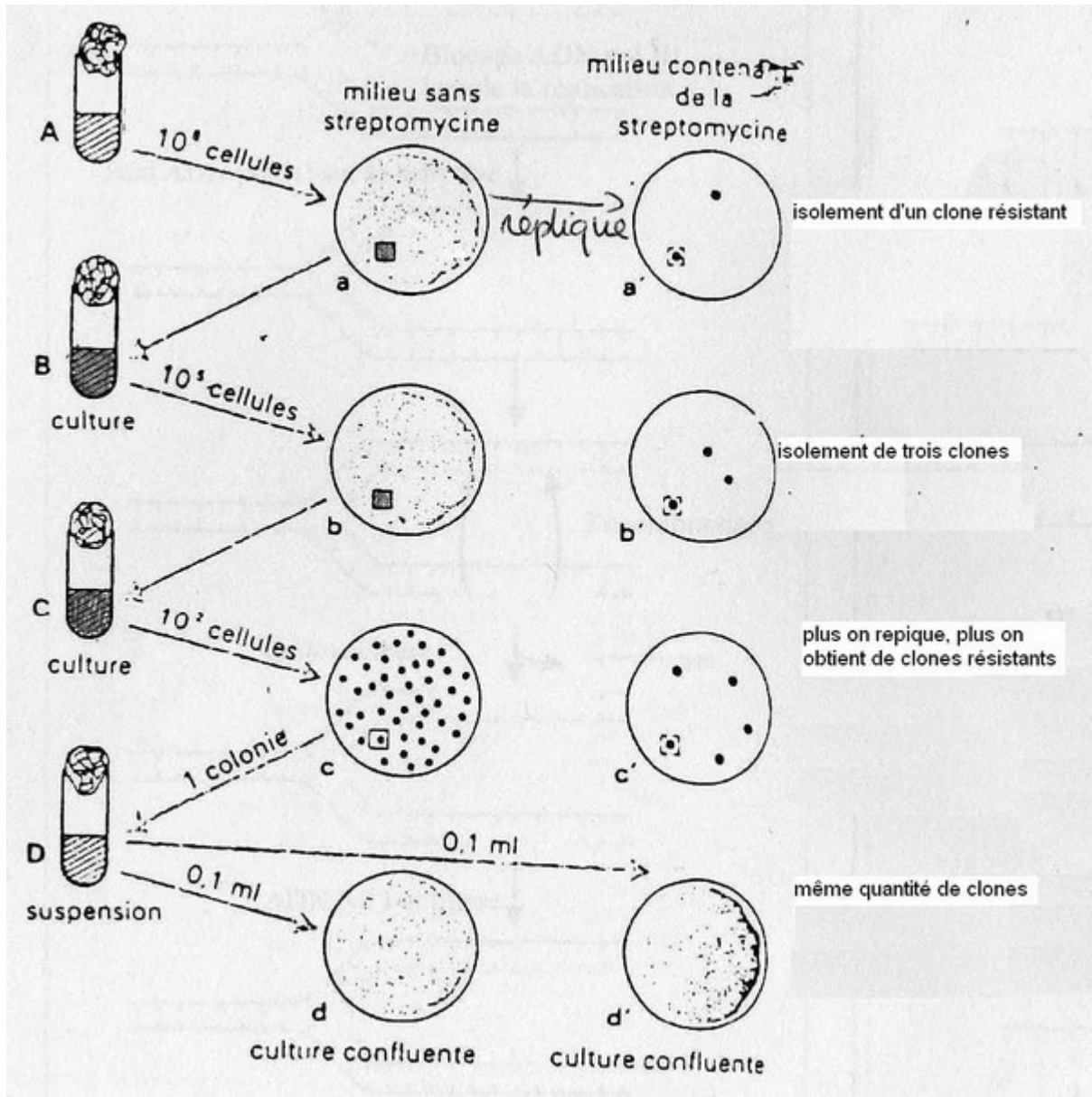


Rupture du pont

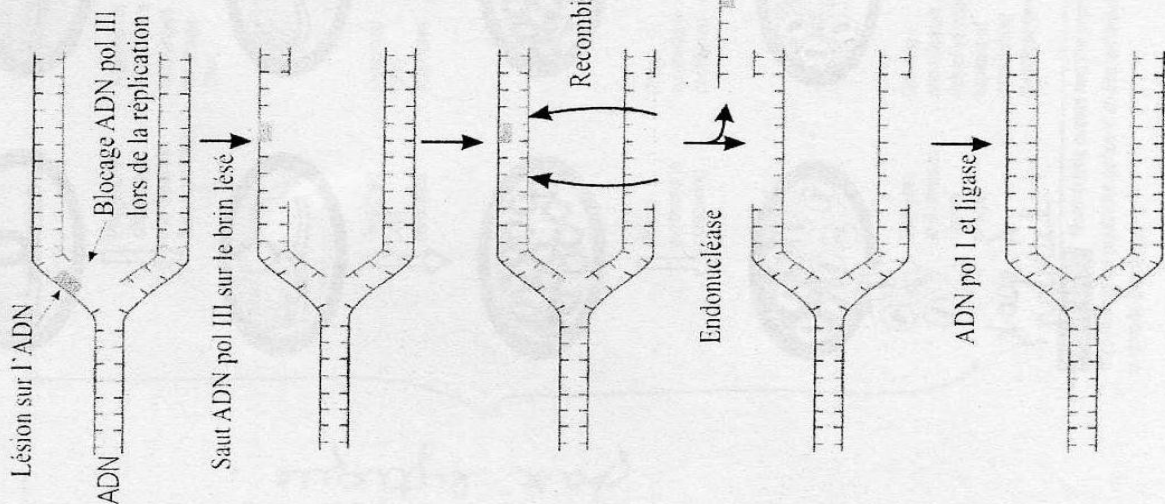


Evènement de recombinaison

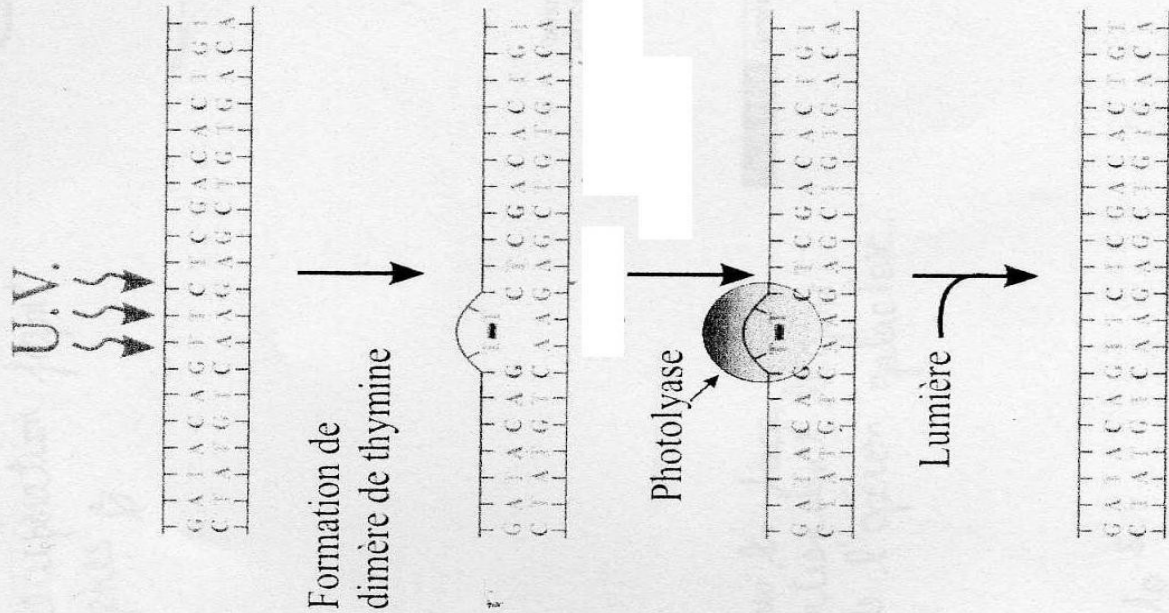




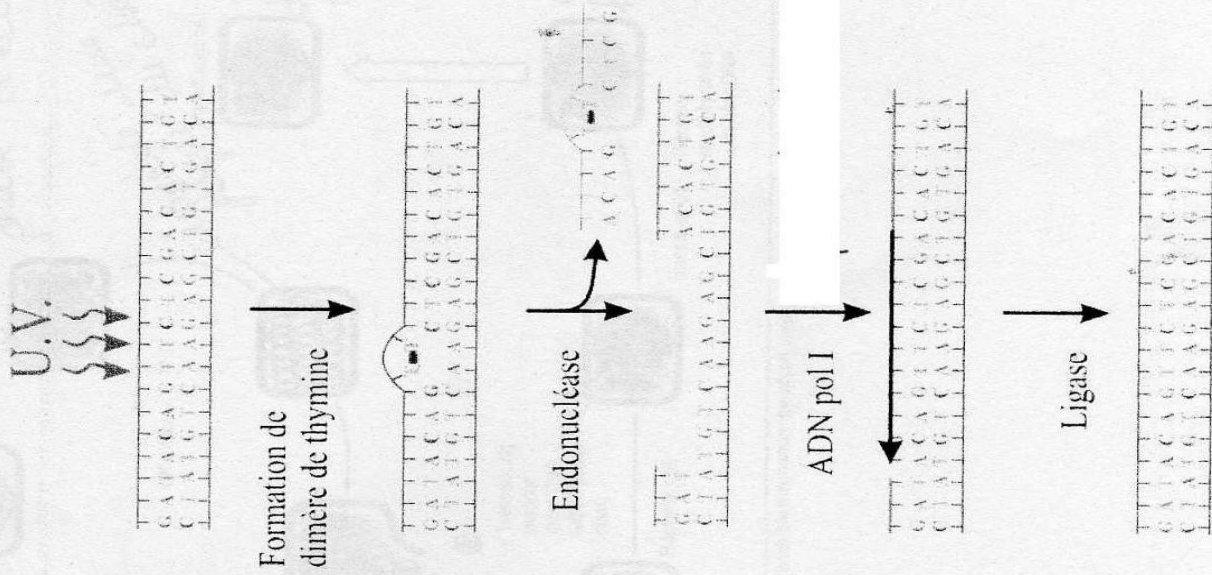
Réparation de l'ADN avec recombinaison.



Réparation de l'ADN par photoréactivation.
Exemple de réparation d'un dimère de thymine.



Réparation de l'ADN avec excision.
Exemple de réparation d'un dimère de thymine.



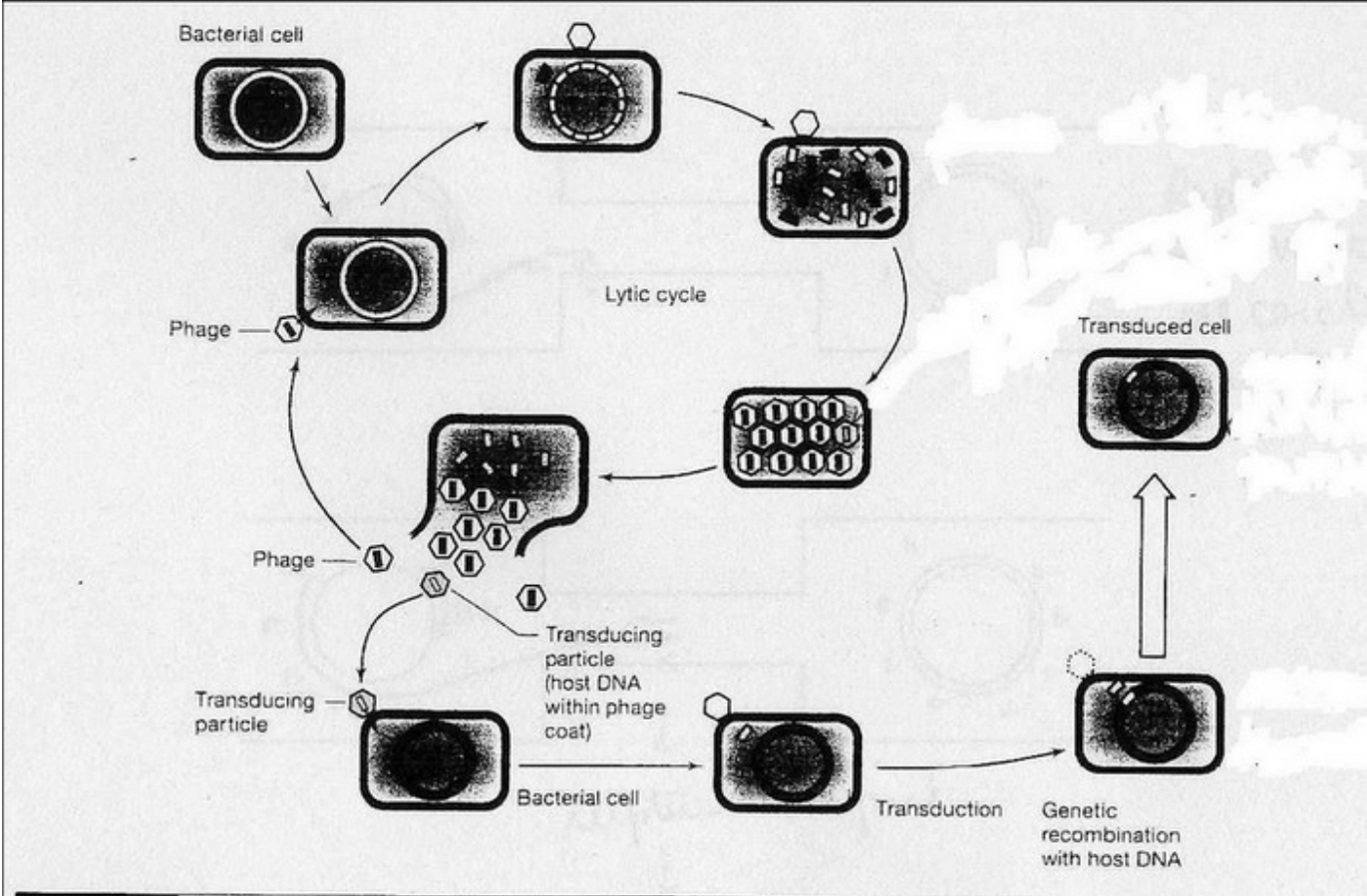


Figure 10.14 Generalized transduction: one possible mechanism by which virus (phage) particles containing host DNA can be formed.

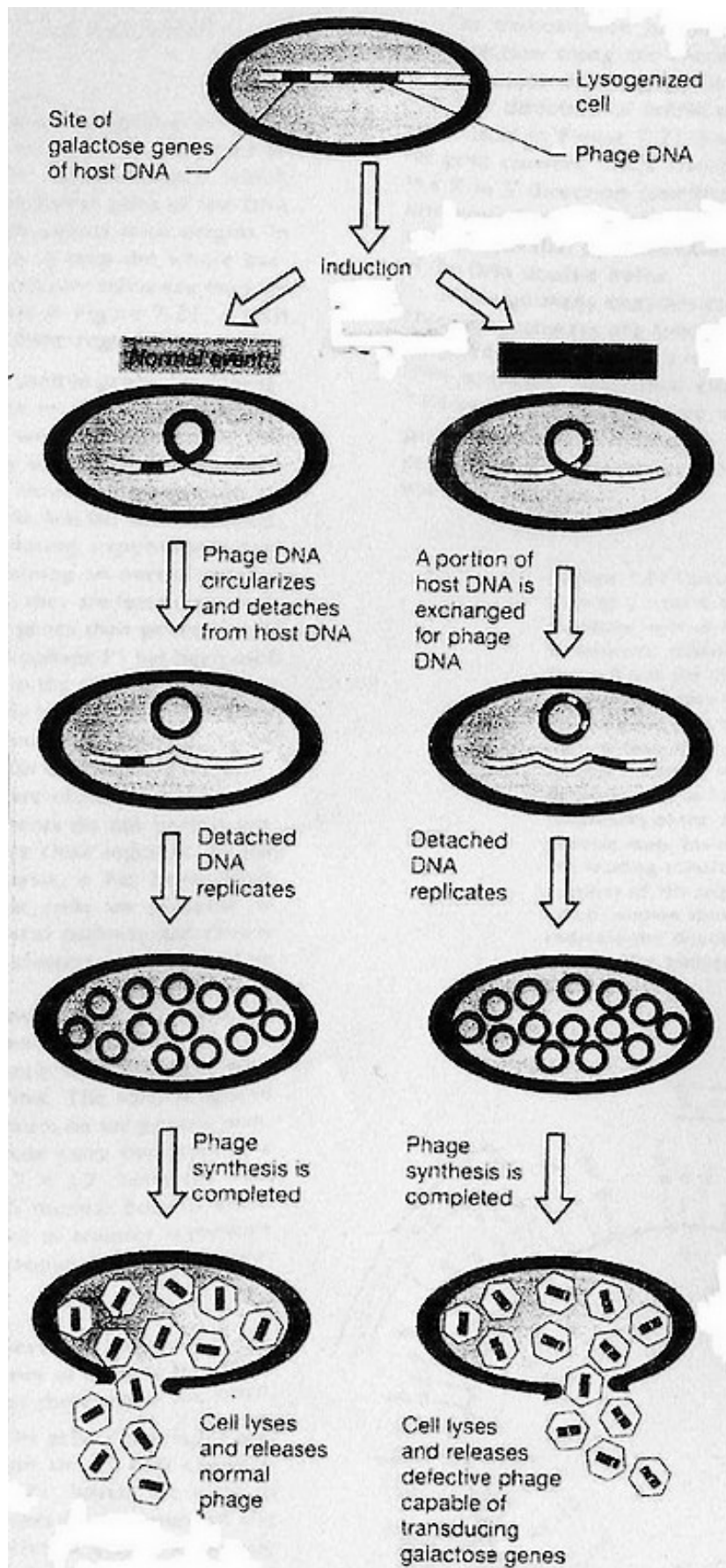


Figure 10.15 Normal lytic events and the production of particles transducing the galactose genes in an *Escherichia coli* cell containing a lambda prophage.