

1 ère partie

Du génome aux phénotypes :
comment les caractères héréditaires sont-ils contrôlés ?

ou

le gène est une unité de fonction qui peut muter.

Chapitre 7 : Lorsque deux mutants développent un même phénotype récessif, l'hétérozygote (mutant 1 + mutant 2) présente le caractère de référence ou le caractère mutant . Cette observation permet de mettre en évidence des gènes allèles.

1. Mise en évidence de complémentation entre mutants de phénotypes différents.

2. Analyse de mutants de même phénotype par le test de complémentation fonctionnelle.

2.1. mise en évidence de groupes de (non) complémentation chez des mutants de levure, auxotrophes pour l 'histidine.

2.1.1. complémentation et non complémentation.

2.1.2. groupes de (non) complémentation.

2.1.3. comparaison avec les résultats obtenus par l 'étude de l'utilisation ou de l 'accumulation de précurseurs de l 'histidine.

2.2. deux exemples d 'études génétiques chez l 'homme par l 'observation de la complémentation.

2.2.1. la surdi-mutité héréditaire n 'est pas liée à la mutation d 'un seul gène.

2.2.2. analyse d 'une prédisposition à un cancer de la peau.

2.2.2.1. méthode d 'analyse en culture de cellules.

2.2.2.2. la mutation de l 'un des 9 gènes intervenant dans la réparation peut produire la maladie.

3. Généralisation du test de complémentation fonctionnelle.

3.1. cas des mutants à caractère « positif »

3.2. le test de complémentation est universel.

3.3. le test de complémentation peut révéler qu 'une protéine est faite de plusieurs polypeptides , chacun gouverné par un gène particulier.

4. Conclusions : le test de complémentation fonctionnelle est économique et puissant. Lui seul permet de déterminer l 'allélisme.

Chapitre 7 : Lorsque deux mutants ont un même phénotype récessif, l'hétérozygote (mutant 1 + mutant 2) présente le caractère de référence ou le caractère mutant . Cette observation permet de mettre en évidence des gènes allèles.

Dans les chapitres précédents, nous avons étudié le gène et ses allèles en examinant les résultats de leur fonctionnement. Nous avons analysé des manifestations phénotypiques diverses, de référence ou mutantes, y compris en remontant jusqu'aux polypeptides.

Lorsque nous avons étudié des mutants présentant le même phénotype, nous avons pu les regrouper en examinant les précurseurs accumulés ou utilisables, ou en étudiant directement les activités enzymatiques.

Nous allons voir qu'il existe une méthodologie génétique essentielle, permettant d'arriver aisément au même résultat, avec plus de facilité et même plus de précision, dans des conditions qui découlent des conclusions obtenues dans le chapitre précédent

1. Complémentation entre mutants de phénotypes différents: exemple de la levure.

Qu'observe-t-on lorsque l'on fait coexister **deux génomes haploïdes** conduisant chacun à **un phénotype différent de celui de la souche de référence**? Que se passe-t-il par exemple si l'on constitue un diploïde de levure à partir d'une souche auxotrophe pour l'histidine et d'une souche auxotrophe pour le tryptophane?

Si l'on a bien suivi les conseils prodigués dans le chapitre précédent, la réponse immédiate et correcte à cette question doit être nette: **seule l'expérience** est capable de nous le dire !

Cette expérience est très simple : on constitue quatre diploïdes à partir de la souche de référence et des deux souches mutantes. On les réplique sur milieu minimum ou additionné de tryptophane et / ou d'histidine, ainsi que les trois souches haploïdes en cause.

La partie haute du tableau (figure 50) montre que la souche haploïde de référence croît sur milieu minimum au contraire des deux souches mutantes auxotrophes, l'une pour l'histidine (mutant 1), l'autre pour le tryptophane (mutant 2).

La partie médiane du tableau indique que les phénotypes mutants sont **récessifs**.

La partie basse du tableau montre que le diploïde (mutant 1 + mutant 2) se développe, sur milieu minimum : c'est ce résultat qui est nouveau et que nous allons interpréter. Il faut pourtant bien noter que toutes les autres souches haploïdes et diploïdes doivent être étudiées pour que le raisonnement qui va suivre ait un sens : ces **témoins** expérimentaux sont indispensables.

Ce raisonnement très simple, peut-être quasi intuitif (*il faut être prudent avec les intuitions !*) : puisque la réunion de deux génomes mutants donne un diploïde qui se développe sur milieu minimum, c'est que **le défaut métabolique découlant de la mutation affectant un génome est compensé par l'autre génome , et réciproquement...**

Voyons les choses de manière plus solide en écrivant le génotype de ce diploïde constitué à partir des deux souches auxotrophes haploïdes.

Admettons que l'auxotrophie pour l'histidine soit due à la mutation de l'un des gènes intervenant dans cette biosynthèse: soit A ce gène, a^+ l'allèle de référence et a l'allèle muté.

Admettons que l'auxotrophie pour le tryptophane soit due à la mutation d'un des gènes intervenant dans cette biosynthèse : soit B ce gène, b^+ l'allèle de référence, et b l'allèle muté.

Figure 50 : mise en évidence de complémentatio n entre mutants de phénotypes différents.				
	minimum	mn + hist	mn + tryp	mn + hist + tryp
référence	+	+	+	+
mutant 1	-	+	-	+
mutant 2	-	-	+	+
réf. + réf.	+	+	+	+
réf. + mutant 1	+	+	+	+
réf. + mutant 2	+	+	+	+
mut 1 + mut 2	+	+	+	+

Le génotype de la souche de référence est $a^+ b^+$, pour les gènes qui nous intéressent. Faisons l'*hypothèse* que chacun des mutants ne s'en distingue qu'au niveau d'un seul gène.

Le génotype de la souche auxotrophe pour l'histidine est $a b^+$ (b^+ , car si elle est classée auxotrophe pour l'histidine, cela sous-entend qu'elle ne possède *que* la différence a avec la souche de référence a^+). Le génotype de la souche auxotrophe pour le tryptophane est $a^+ b$ (a^+ , car si elle est classée auxotrophe pour le tryptophane, cela sous-entend qu'elle ne possède *que* la différence b avec la souche de référence b^+).

Le génotype de la souche diploïde constituée à partir des deux auxotrophes est donc $a / a^+ b / b^+$

Elle possède un allèle de référence pour chacun des **deux gènes** étudiés. Comme chacun des phénotypes mutants est récessif, la biosynthèse d'histidine et de tryptophane est normale : on dit qu'il y a **complémentation fonctionnelle**

2. Le classement de mutants de même phénotype par le test de complémentation fonctionnelle.

Que se passe-t-il lorsque l'on met en présence deux génomes conduisant au même phénotype mutant ? Comme pour le cas précédent disons le nettement : il n'y a pas de réponse toute faite et seule l'expérience permet de

répondre.

2.1. Mise en évidence de groupes de (non) complémentation chez des auxotrophes pour l'histidine.

Reprenons à nouveau l'exemple des 11 souches mutantes auxotrophes pour l'histidine, étudiées dans le chapitre 4. L'expérience qui suit comporte la fabrication de deux types de diploïdes : ceux déjà étudiés dans le chapitre 6 (haploïde mutant + haploïde de référence) et, ce qui est nouveau, des diploïdes correspondant à l'addition de deux génomes haploïdes conduisant à un phénotype mutant.

2.1.1. Complémentation et non complémentation.

A partir de la souche de référence et des mutants 1, 2 et 3 on peut constituer des diploïdes homozygotes : le diploïde ref. + ref. est prototrophe. Les trois autres diploïdes (1 + 1; 2 + 2; 3 + 3) sont auxotrophes. Il y a simplement redoublement de l'information génétique, ce qui ne peut pas conduire à un changement fonctionnel par rapport aux haploïdes.

On peut aussi, constituer des diploïdes hétérozygotes en additionnant le génome de la souche de référence avec celui de chacune des souches mutantes. Nous constatons à nouveau que le phénotype des souches 1, 2 et 3 est récessif.

On peut enfin constituer des **diploïdes hétérozygotes à partir de mutants différents** (1 + 2 ; 1 + 3 ; 2 + 3).

Comme depuis le début de ce chapitre, il ne faut pas avoir d'a priori quelconque: on **observe** que le diploïde (1 + 2) ne croît pas sur milieu minimum et que les diploïdes (1 + 3) et (2 + 3) croissent sur ce milieu. Que peut-on en déduire?

En ce qui concerne le diploïde (1 + 2) qui ne croît pas sur milieu minimum, le résultat est le même que pour un diploïde formé à partir du doublement du même génome mutant (1 + 1) On en déduit que les deux mutants haploïdes ont subi une mutation touchant le même gène A. Le même polypeptide est affecté, la même étape enzymatique n'est pas correctement réalisée.

Lorsque le diploïde se développe sur minimum, (1 + 3 ou 2 + 3), on est conduit à raisonner par opposition avec l'interprétation qui précède : si la même étape enzymatique n'était pas réalisée, le diploïde ne pourrait croître sur milieu minimum. Puisque ce diploïde est prototrophe, c'est que l'étape métabolique affectée n'est pas la même chez les deux haploïdes.

Les **mutations se produisent au hasard** : dans le premier cas, elles ont affecté le **même gène** chez les deux auxotrophes étudiés (1 et 2). Dans le deuxième cas, elles ont affecté des **gènes différents** chez les deux auxotrophes en cause (1 et 3). Il suffit d'écrire les génotypes pour comprendre ce qui se passe (figure 51).

On voit donc que **deux mutants** dont les mutations ont affecté le **même gène** ne **complémentent pas**.

Par contre, lorsque **deux mutants** haploïdes donnent un diploïde dont le phénotype est celui de la souche de référence, on en conclut que leurs mutations n'affectent **pas le même gène** ce qui permet la **complémentation fonctionnelle**.

Figure 51 : génotypes des haploïdes et des diploïdes, et phénotypes en découlant (1).

souche de référence haploïde	a+ b+ c+ d+	tous les gènes fonctionnels	phénotype prototrophe
souche mutante haploïde 1	a1 b+ c+ d+	gène A muté .	phénotype auxotrophe
souche mutante haploïde 2	a2 b+ c+ d+	gène A muté .	phénotype auxotrophe

souche diploïde 1+ 2	a1 b+ c+ d+ a2 b+ c+ d+	gène A muté dans les deux génomes	phénotype auxotrophe
souche de référence haploïde	a+ b+ c+ d+	tous les gènes fonctionnels	phénotype prototrophe
souche mutante haploïde 1 ou 2	a b+ c+ d+	gène A muté .	phénotype auxotrophe
souche mutante haploïde 3	a+ b+ c+ d	gène D muté .	phénotype auxotrophe
souche diploïde 1+ 3 (ou 2+3)	a b+ c+ d+ a+ b+ c+ d	double hétérozygote	phénotype prototrophe

(1): Nous avons fait l'hypothèse de mutations affectant le même gène dans le cas des mutants 1 et 2. Elles n'ont aucune raison a priori d'être strictement identiques. En effet, la mutation est un événement qui affecte un gène de bien des manières. En d'autres termes que nous connaissons bien, il y a une forte probabilité pour que deux événements mutationnels touchant le même gène créent deux allèles différents : c'est pour cela que nous les avons différenciés en les notant a_1 et a_2 . Par contre, nous n'avons pas pris cette précaution lorsque deux gènes différents sont en cause, dans les diploïdes $1+3$ ou $2+3$.

Cette manière abstraite de considérer les résultats peut être illustrée au niveau de la chaîne de biosynthèse elle-même (figure 52) :

On peut constater que tout découle de l'origine de ce phénomène de récessivité que nous avons étudié dans le chapitre précédent et qui est banal : une dose d'enzyme, un allèle de référence pour CHACUN des deux gènes permet un fonctionnement normal du diploïde doublement hétérozygote.

Figure 52 : interprétation métabolique de l 'existence ou de l 'absence de complémentation entre mutants de même phénotype.

Dans l'analyse de la récessivité, on a vu que les allèles mutants contrôlent des polypeptides inactifs. Ils ne sont pas figurés ici afin de simplifier l'illustration.

génomé haploïde de référence	a+	b+	c+	d+
polypeptides actifs	P1	P2	P3	P4
réactions enzymatiques	----->IGP----->IAP----->HIP,HOL----->Histidine			
génomé mutant 1	a1	b+	c+	d+
polypeptides actifs		P2	P3	P4
réactions enzymatiques	--/////-->	----->	----->	----->
polypeptides actifs		P2	P3	P4
génomé mutant 2	a2	b+	c+	d+
génomé mutant 1	a	b+	c+	d+
polypeptides		P2	P3	P4
réactions enzymatiques	----->IGP----->IAP ----->HIP,HOL----->Histidine			
polypeptides	P1	P2	P3	
génomé mutant 3	a+	b+	c+	d
génomé réf	a+	b+	c+	d+
polypeptides	P1	P2	P3	P4
réactions enzymatiques	----->IGP----->IAP ----->HIP,HOL----->Histidine			
polypeptides	P1	P2	P3	P4
génomé réf	a+	b+	c+	d+

2.1.2. Groupes de (non) complémentation.

La même expérience est étendue à l'ensemble des 11 mutants auxotrophes que nous connaissons déjà.

Tous ces diploïdes sont répliqués sur milieu minimum et milieu minimum contenant de l'histidine. Les résultats sont présentés dans la figure 53 qui nécessite quelques explications concernant sa présentation :

- une case du tableau représente un diploïde formé par les génomes des deux souches haploïdes qui figurent l'une

1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
2		-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
3			-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
4		+		-	+	+	+	+	+	+	-	+
5					-	+	+	-	+	+	-	+
6						-	+	+	-	+	-	+
7							-	+	+	+	-	+
8								-	+	+	-	+
9									-	+	-	+
10										-	-	+
11											-	+
réf.												+

Figure 54 : l' étude de la complémentation confirme et précise les résultats biochimiques.

Analyse successive des phénotypes par la biochimie

1,2,6,9,10,11 auxotrophes utilisent l'histidinol n'accumulent rien
groupe α

3	auxotrophe	utilise	l' histidinol	accumule	IGP	groupe
β						
4,7	auxotrophes	utilisent	l' histidinol	accumulent	IGP IAP	
groupe δ						
5,8	auxotrophes	n'utilisent pas	l'histidinol	accumulent	IGP IAP	
groupe ϵ						
HP HOL						

Les quatre groupes biochimiques et les 6 groupes de complémentation.

Groupe α	groupe I groupe III	mutants 1 , 2 , 10 mutants 6 , 9
Groupe β	groupe IV	mutant 3
Groupe δ	groupe V groupe VI	mutant 4 mutant 7
Groupe e	groupe II	mutants 5 , 8