

EXERCICES de REVISION

Ces exercices reprennent les notions des exercices d'applications et sont donnés à titre de complément pour un travail personnel.

ENONCES

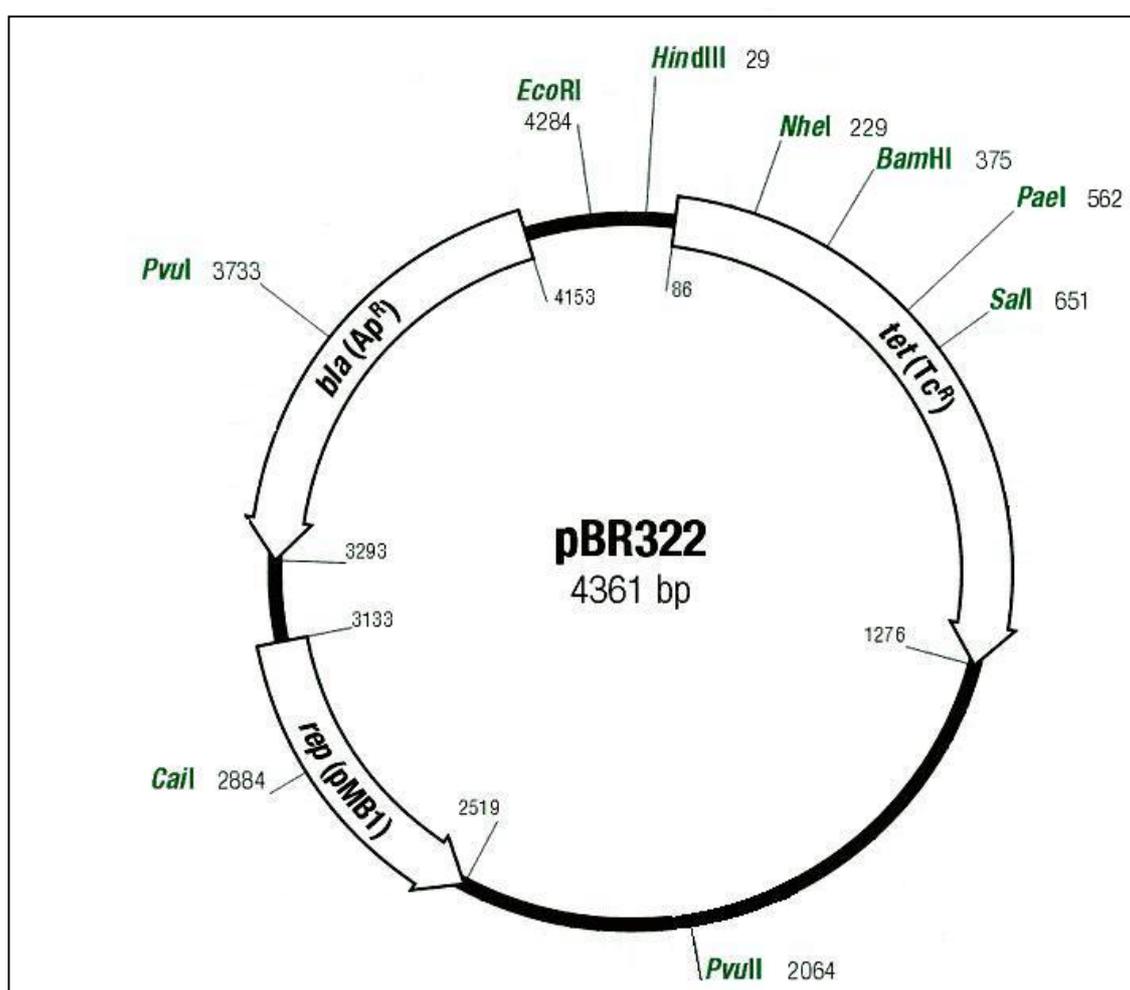
Etude de clones	2
Cartes de restriction et assemblages de clones	
Variants α et β globine	4
Un gène, de multiples phénotypes	
Phénotype	5
Complémentation	6
Analyse de mutants multiples	7
Etude d'un tétramutant	
Syndrome de Lesch-Nyhan	8
Pedigree, Test de complémentation, diagnostic prénatal	
Diagnostic prénatal de certaines \square thalassémies	13
HNPCC	16
Pedigree, consanguinité, localisation par recherche d'homozygotie	
CORRECTIONS	
Etude de clones	23
Variants α et β globine	27
Phénotype	29
Complémentation	31
Analyse de mutants multiples	34
Syndrome de Lesch-Nyhan	36
Diagnostic prénatal de certaines \square thalassémies	42
HNPCC	47

Monique MASSELOT
Génétique
Université P. et M. Curie, Paris.

Etude de clones

But : comparaison de trois clones obtenus en sous clonant un plasmide déjà isolé.

Il arrive que le fragment inséré dans un vecteur soit notablement plus grand que le gène que l'on recherche. Dans ce cas, afin de limiter l'effort de séquençage, on reprend le fragment que l'on digère de diverses façons. Les sous fragments obtenus sont de nouveau inclus dans un vecteur. Parmi les plasmides recombinés on détermine ceux qui contiennent toujours le gène d'intérêt. On cherche alors quel est le plus petit fragment qui contient le gène pour ne séquencer que lui.



Carte simplifiée de pBR322.

Enzyme de restriction	site de coupure
EcoRI	G↓AATTC
HindIII	A↓AGCTT
BamHI	G↓GATCC
Sall	G↓TCGAC
DraI	TTT↓AAA
HpaI	GTT↓AAC
PvuI	CG↓ATCG
NheI	G↓CTAGC
PaeI	GCATG↓C
Sau3A	↓GATC
Tsp509I	↓AATT
Sall	G↓TCGAC

Quelques endonucléases.

1°) On a extrait et purifié un fragment de 15 kbp d'un vecteur λ contenant le gène A. Comment peut-on le fragmenter pour avoir des sous fragments plus petits mais dont certains contiennent encore le gène A entier ?

2°) Comment intégrer ces sous fragments dans pBR322, repérer les bactéries qui contiennent un plasmide recombiné et ressortir ce sous fragment?

3°) Trois de ces sous fragments ont été retenus. On en a préparé 3 digestions différentes respectivement par ERI, ERII et ERIII, ainsi que des doubles digestions.

digestion par	Fragment A	Fragment B	Fragment C
ERI	3,2+0,4+0,3	2,6+2,2+0,3	2,6+1,8+1,7
ERII	1,8+1,1+1	3,3+1+0,8	3,3+1,7+0,8+0,3
ERI + ERII	1,4+1,1+0,7+0,4+0,3	1,9+1,4+0,8+0,7+0,3	1,9+1,4+1+0,8+0,7+0,3
ERIII	2,4+1,5	3+1,9+0,2	2,7+2,2+1,2
ERI + ERIII	2+1,2+0,4+0,3	2+1,6+1+0,3+0,2	1,7+1,6+1,2+1+0,6
ERII + ERIII	1,8+1+0,6+0,5	2,4+1+0,9+0,6+0,2	2,4+1,3+0,9+0,8+0,4+0,3

Quelle est la carte de restriction de s fragments A,B,C. Placez les uns par rapport aux autres. Quelle est la partie qui contient le gène A ?

Variants α et β globine

1°) Parmi les variants de la chaîne de l' α globine (141 AA pour le type sauvage) quelques uns sont remarquables par une chaîne plus longue :

Constant Spring	}	171 AA
Icaria		
Koya Dora		
Seal Rock		
Wayne		146 AA

La séquence d'acides aminés pour chacun est donnée dans le tableau 1

Comment peut-on rendre compte de ces différents mutants?

Que peut-on en déduire pour l'ARNm?

Quelle est la séquence de l'ARNm de la souche sauvage pour cette région ?

2°) On connaît encore d'autres variants de taille différente de celle du sauvage pour la sous unité α :

n° AA	5	6	7	114	115	116	117	118	119	120			
sauvage	Ala	Asp	Lys	Pro	Ala	Glu	Phé	Thr	Pro	Ala			
Grady	Ala	Lys		Pro	Ala	Glu	Phé	Thr	Pro	Ala			
Boyle Heights	Ala	Asp	Lys	Pro	Ala	Glu	Phé	Thr	Glu	Phé	Thr	Pro	Ala

Des variants du même type existent en plus grand nombre pour la chaîne β :

n° d'AA	16	17	18	19	22	23	24	41	42	43	44	45	46
Sauvage	Gly	Lys	Val	Asn	Glu	Val	Gly	Phé	Phé	Glu	Ser	Phé	Gly
Freiburg	Gly	Lys	Val	Asn	Glu Gly			Phé	Phé	Glu	Ser	Phé	Gly
Lyon	Gly Asn				Glu	Val	Gly	Phé	Phé	Glu	Ser	Phé	Gly
Niteroi	Gly	Lys	Val	Asn	Glu	Val	Gly	Phé	Phé	Gly			
Tochigi	Gly	Lys	Val	Asn	Glu	Val	Gly	Phé	Phé	Glu	Ser	Phé	Gly
Gun Hill	Gly	Lys	Val	Asn	Glu	Val	Gly	Phé	Phé	Glu	Ser	Phé	Gly

n° d'AA	55	56	57	58	59	60	90	91	92	93	94	95	96
Sauvage	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu
Freiburg	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu
Lyon	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu
Niteroi	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu
Tochigi	Met					Val	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu
Gun Hill	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Glu Leu						

Comment interpréter ces variants? Y a-t-il d'autres mutations possibles? Si oui pourquoi ne les a-t-on pas rencontrées?

Phénotype

Un chercheur dépose des gouttes de différentes cultures liquides de levure sur une même boîte. Il laisse croître les cellules dans chaque goutte et il envoie cette boîte à un autre laboratoire. Malheureusement le nom des souches est marqué sur le couvercle et il a oublié de repérer celui-ci par rapport à la boîte.

On sait donc seulement que parmi toutes ces souches on a les catégories suivantes :

auxotrophes pour l'adénine, incapables d'utiliser le galactose comme source de C,
résistantes à la canavanine,
auxotrophes pour l'uracile,
auxotrophes à la fois pour l'uracile et la leucine,
résistantes à l'éthionine,
auxotrophes pour la leucine,
incapables d'utiliser le glycérol comme source de C.

Sur quels milieux testeriez-vous ces souches afin de les identifier ?
Définir ce qu'est un phénotype.

Complémentation

A On a étalé des cellules d'une souche haploïde de levure [a,leu-] sur un milieu contenant de la leucine et un analogue toxique de l'arginine : la canavanine. Sur 10^9 cellules étalées on a récupéré 8 colonies.

- 1°) Quel est le phénotype de la souche de départ et celui des 8 clones obtenus ?
- 2°) Quelle est la fréquence des mutants et le taux de mutation ?
- 3°) Comment expliquer l'apparition de ces 8 colonies distinctes ?

B La mutation de chacune de ces colonies a été introduite dans une souche [α ,his -]. Chacune de ces souches a été reprise et croisée avec toutes les autres de type sexuel compatible. On teste les diploïdes ainsi obtenus sur deux milieux: milieu minimum et milieu minimum + canavanine. Tous poussent sur milieu minimum; la croissance sur le milieu additionné de canavanine est notée + dans le tableau ci-dessous :

a leu- α his-	1	2	3	4	5	6	7	8
1	+	+	-	+	-	+	-	-
2		+	-	+	-	+	-	-
3			+	+	+	-	-	+
4				+	+	+	+	+
5					+	-	-	+
6						+	-	-
7							+	-
8								+

1°) Compte tenu de la fréquence des mutants, combien de mutations est-il probable que porte chaque souche ?

2°) Expliquer le phénotype du diploïde obtenu par croisement de la souche [a, leu-] et de la souche [α , his-] portant la même mutation ?
Quel est l'intérêt des auxotrophies leu et his ?

3°) En analysant soigneusement le génotype des diploïdes rapporté dans le tableau, expliquer les résultats et les interpréter.

4°) Cette expérience est-elle complète ? Justifier votre réponse.

Analyse de mutants multiples

On a croisé deux souches haploïdes de levure, l'une entièrement prototrophe, l'autre auxotrophe pour tryptophane, lysine, adénine et leucine. Les diploïdes ont été isolés et lis à sporuler. Les spores ont été repiquées sur différents milieux de façon à définir leurs auxotrophies. Le résultat est résumé dans le tableau ci-dessous.

Phénotype des spores				Effectif
[trp]	[lys]	[ade]	[leu]	
-	-	-	-	71
+	+	+	+	71
-	-	-	+	74
+	-	+	-	47
+	+	+	-	79
-	+	-	+	56
-	-	+	-	44
+	-	+	+	53
+	+	-	+	40
-	+	-	-	51
-	-	+	+	51
+	-	-	-	31
+	+	-	-	40
-	+	+	+	29
-	+	+	-	38
+	-	-	+	25
				total = 800

Quel est le phénotype de chaque souche (Référence et Mutante) ?

Quel est le déterminisme génétique de chaque auxotrophie ?

Quelles sont les relations génétiques entre les différents gènes concernés ?

Syndrome de Lesch-Nyhan

Le syndrome de Lesch-Nyhan, caractérisé cliniquement par hyperuricémie, anomalies articulaires, retard de développement, anomalies du système nerveux, est une déficience rare (qui se rencontre à raison de 1/100 000 dans la population générale).

1°) On admettra que c'est une affection monogénique
 D'après le pedigree de la figure 1, établir :
 si cette affection est héréditaire ou non
 si oui quel est son mode de transmission (dominant/récessif, autosomique/sur l'X).

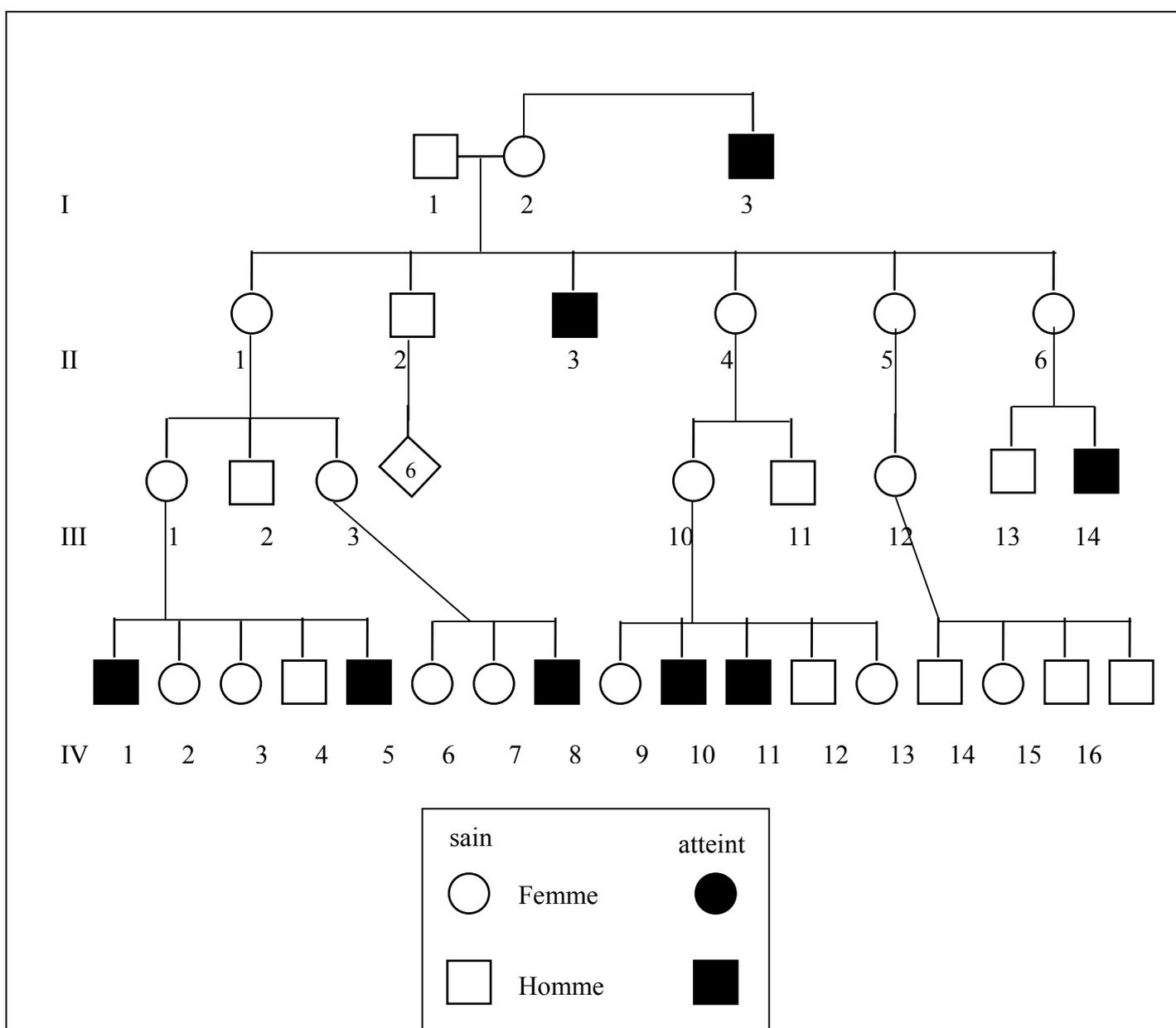


Figure 1. Transmission du syndrome de Lesch-Nyhan dans la famille A

2°) On a montré que le syndrome de Lesch-Nyhan était conféré par une déficience en Hypoxanthine PhosphoRibosyl Transférase (HPRT). On a comparé la séquence en acides aminés du polypeptide fonctionnel (sauvage) et de celui isolé chez des sujets atteints du syndrome de Lesch-Nyhan. Dans 3 cas on a trouvé un seul acide aminé de différence entre sauvage et mutant.

HPRT mutante	n° AA	AA sauvage	AA mutant
Toronto	50	Arg	Gly
London	109	Ser	Leu
Munich	03	Ser	Arg

Pour chaque HPRT variante préciser la molécule sur laquelle a eu lieu la mutation qui se transmet de génération en génération. la ou les modifications qui peuvent rendre compte de la protéine observée.

3°) Des fibroblastes de sujets normaux, Toronto et Munich sont mis en culture puis fusionnés 2 à 2. On dose l'HPRT dans ces cellules tétraploïdes (+ = présence, - = absence) :

cellules tétraploïdes obtenues par fusion de		activité HPRT
2n	+ 2n	+
sauvage	sauvage	-
Toronto	Toronto	-
Munich	Munich	-
London	London	-

Qu'attend-on dans les tétraploïdes obtenus avec les fusions suivantes (justifiez votre réponse).

Cellules tétraploïdes obtenues par fusion de	
2n	+ 2n
Toronto	sauvage
Munich	sauvage
London	sauvage
Toronto	Munich
Toronto	London
Munich	London

Quel nom donne-t-on à l'ADN qui code pour ces différentes formes d'HPRT?

4°) On a cloné un fragment A (voir figure 2) du gène codant pour l'HPRT de 0,5kbp. On l'utilise pour la détection prénatale de foetus susceptible d'être atteint du syndrome de Lesch-Nyhan dans des familles à risque.

Premier cas

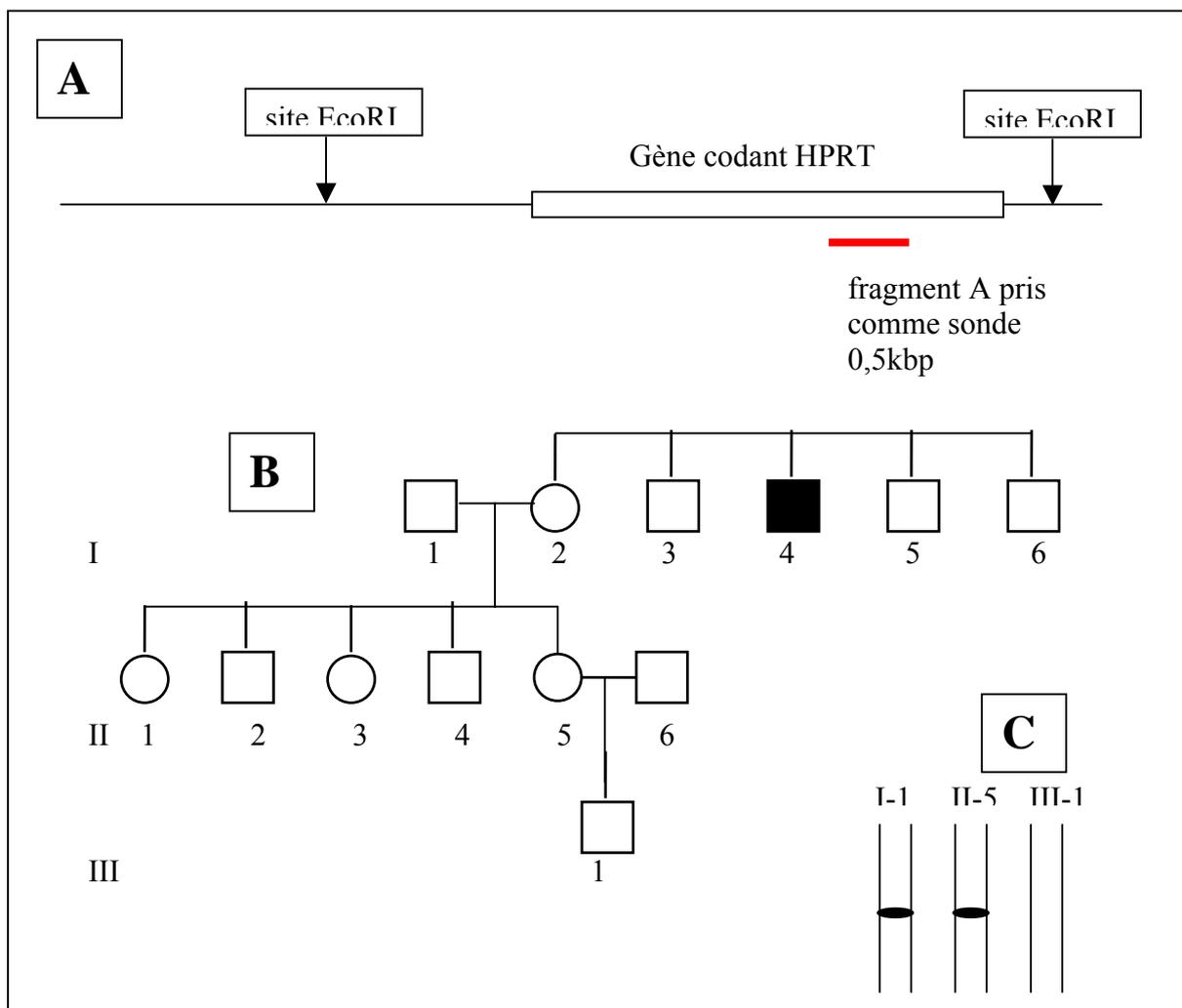


Figure 2. A: carte de la région chromosomique portant le gène codant HPRT ; B : pedigree de la famille concernée ; C : ADN génomique total digéré par Eco RI, soumis à électrophorèse, transféré sur nylon, hybridé avec la sonde de 0,5kbp dénaturée ; puis autoradiographié.

Que signifie l'absence de bande hybridant avec la sonde A pour l'individu III-1? Porte-t-il une mutation et si oui de quel type? En déduire son phénotype. Préciser le génotype des individus I-1 et II-5.

Second cas

Près du gène codant pour l'HPRT existe un polymorphisme des sites BamHI qui peut être révélé par la sonde DX10 représenté sur la figure 3.

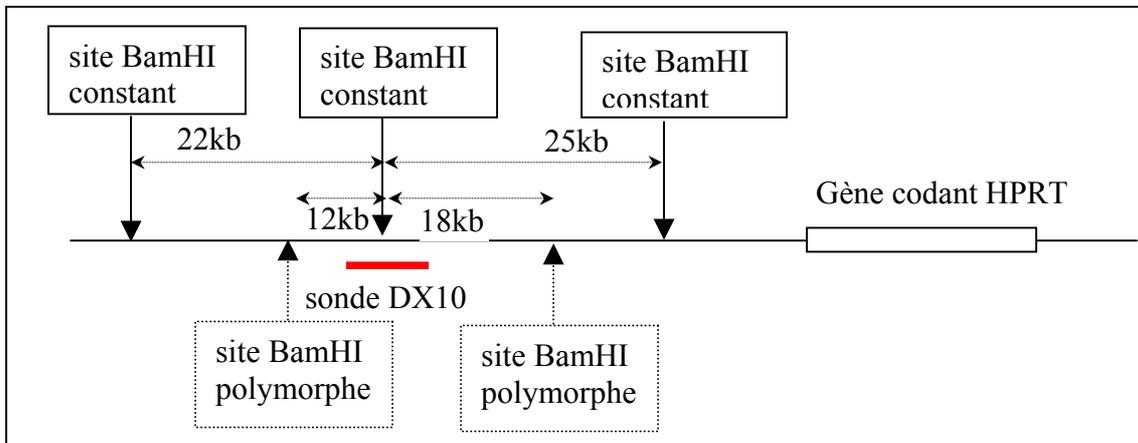


Figure 3. Carte de la région du chromosome X portant le gène codant pour l'HPRT et la zone voisine où est localisé le polymorphisme des sites BamHI

Pour un chromosome X donné quelles bandes peut révéler la sonde DX10? Dans chaque cas dessiner le chromosome X avec les sites BamHI qu'il porte.

Dans la famille à risques présentée figure 4 on a analysé l'ADN de quelques individus de la façon suivante :

- extraction de l'ADN total
- digestion complète par BamHI
- électrophorèse
- transfert sur nitrocellulose
- hybridation avec la sonde DX10 après dénaturation
- autoradiographie

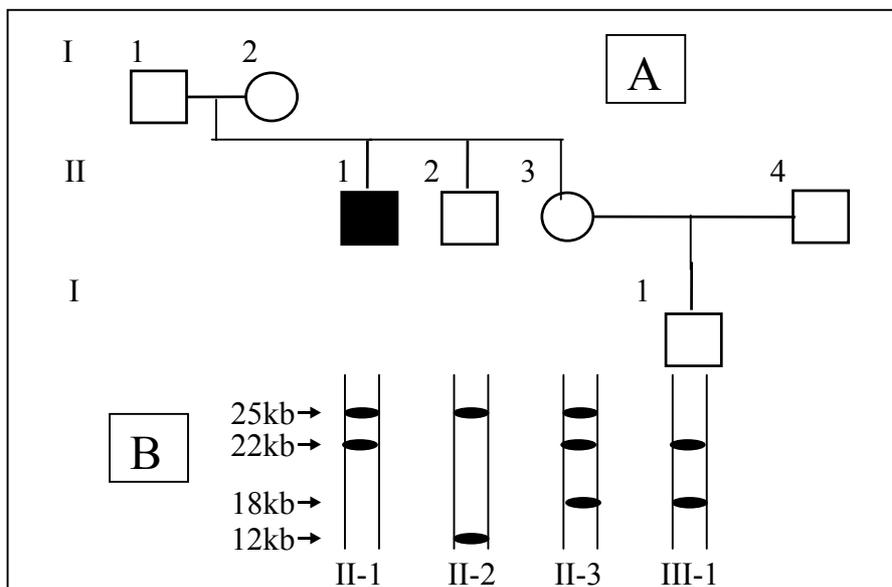


Figure 4. A: pedigree ; B: analyse des ADN digérés par BamHI

Dessiner le chromosome X porté par les individus II-1 et II-2. En déduire ceux qui sont portés par I-1.

Dessiner les chromosomes X de II-3. Duquel a hérité III-1? Quel est le phénotype de III-1?

Quelle est la différence essentielle entre le premier cas et le second?

Y a-t-il des risques inhérents à l'une ou l'autre méthode? Si oui lesquels?

Diagnostic prénatal de certaines β thalassémies

Les β thalassémies consistent en un déséquilibre du rapport β globine / α globine. Chez l'individu sain ce rapport est égal à 1. Chez le β thalassémique il est inférieur à 1 car les chaînes β sont insuffisamment représentées. C'est une maladie fréquente dans tout le bassin méditerranéen (fréquence de l'hétérozygote dans certaines populations : 10%).

1°) Transmission de la maladie

Voir le pedigree de la figure 1 en annexe.

Quel est le déterminisme génétique de la maladie (on admettra que cette affection est monogénique) :

récessif / dominant;

autosomique/ sur le chromosome X.

2°) Dans le croisement IV-9 x IV-8 quelle est la probabilité pour que l'enfant attendu soit thalassémique ? (le dosage du rapport β / α pour IV-9 indique que cet individu est hétérozygote; IV 8 n'est pas disponible pour cette analyse)

3°) On a des raisons de penser que IV-8 était un enfant illégitime. Certains de ses groupes sanguins sont connus : 0, M, Xg-. Ceux des parents sont étudiés :

	groupes ABO	groupes MN	groupes Xg
mère III-5	A	MN	Xg-
père III-7	0	N	Xg+
enfant IV-8	0	M	Xg-

Ecrire le génotype de chaque parent et de l'enfant IV-8. Conclusion?

Cela modifie-t-il la probabilité que l'enfant attendu soit thalassémique ?

Remarque :

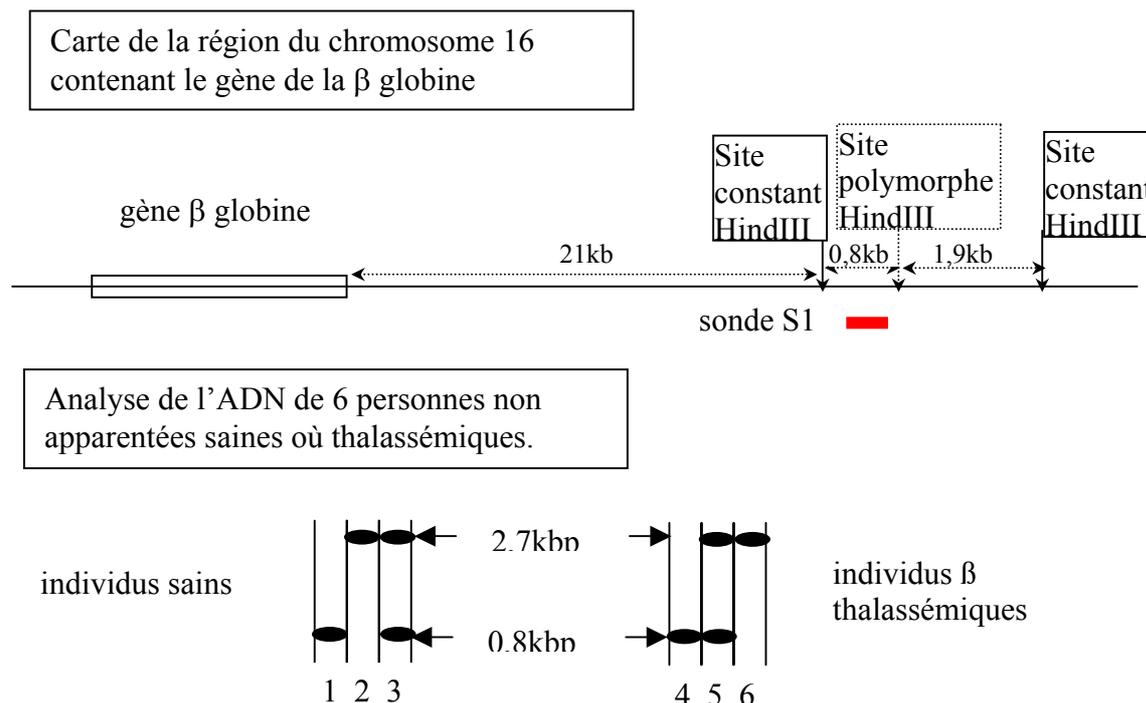
les allèles A,B,O sont autosomiques et semi-dominants

les allèles M et N sont autosomiques et semi-dominants

les allèles Xg sont sur le chromosome X avec $[Xg+] > [Xg-]$

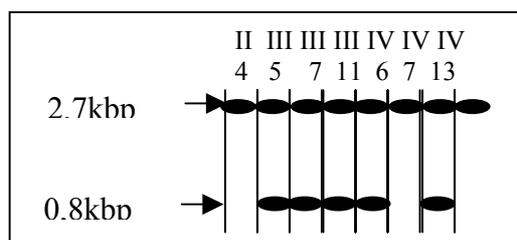
4°) La région du chromosome 16 où ont été localisés les gènes de la famille β globine a été clonée et on en connaît la carte de restriction. Dans la population générale certains sites sont toujours présents, d'autres non (Figure 2 A).

En prenant comme sonde un fragment cloné S1 d'ADNc de β globine, on hybride l'ADN génomique de plusieurs individus non apparentés (sains ou β thalassémiques) après digestion par enzyme de restriction. Quelle est la carte de cette région pour chacun d'eux (placez les sites de restriction existants et la forme allélique du gène β globine présente)?



L'ADN génomique est digéré par l'enzyme Hind III. Les produits de la digestion sont soumis à électrophorèse puis, après transfert sur nitrocellulose hybridés avec la sonde S1. Les individus 1 2 et 3 sont sains ; 4 5 et 6 thalassémiques.

5°) Croisement IV-7 x IV-13 : IV-7 a pour frère IV-6 thalassémique. IV-13 a pour grand-mère II-4 thalassémique. Les ADN totaux de ces quatre individus ainsi que ceux de leurs parents III-5, III-7 et III-11 sont extraits, digérés par l'enzyme de restriction Hind III, soumis à électrophorèse puis, après transfert, hybridés avec la sonde S1 comme précédemment.



Analyse de l'ADN génomique de quelques membres de la famille de la figure 1.

Pour chacun de ces individus, rappelez le phénotype et écrivez le génotype complet (site polymorphe HindIII et gène β).

Comment peut-on prévoir le génotype du fœtus pour le couple IV- et IV-13

Quelle est la limite de la méthode ?

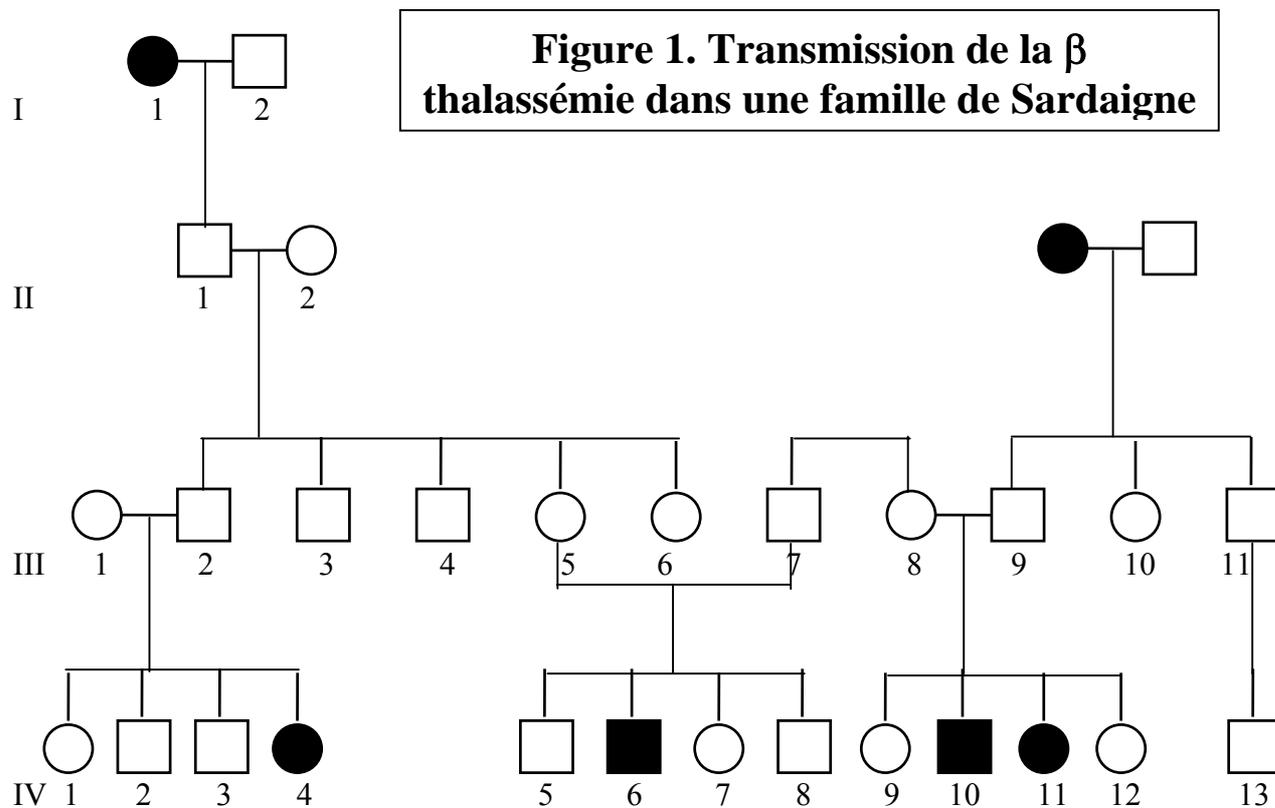
Cette méthode est-elle toujours utilisable?

-nota : l'haplotype est représenté par la (ou les) bande de restriction associée au gène β globine pour un individu donné.

Bibliographie

P.N.A.S. 79 137 (1982)

Nature 285 144 (1980)

Annexe

HNPCC

Le cancer colorectal non polypeux héréditaire (HNPCC = Hereditary Non Polypomatous Colorectal Cancer) représente 13% des cancers colorectaux dans les nations industrielles. Chez les individus prédisposés (rares), des adénocarcinomes colorectaux ou intéressants d'autres organes se développent avant l'âge de 50 ans. Actuellement on a localisé deux loci qui pourraient être responsables de cette prédisposition, l'un sur le bras court du chromosome 2 et l'autre sur le bras court du chromosome 3. En Finlande on connaît plusieurs familles dont certains membres sont atteints de HNPCC. Pour 18 d'entre elles on a pu éliminer une liaison de cette affection avec un locus du chromosome 2.

1°) Quel est le déterminisme génétique du HNPCC dans la famille 11 (fig. 1) : héréditaire, dominant/récessif, autosomique/sur l'X ? Justifiez chacune de vos conclusions.

2°) Dans cette famille on a voulu savoir si le gène responsable de l'affection pouvait être localisé sur le bras court du chromosome 3. On a donc analysé l'ADN des enfants disponibles de la seconde génération. Ce qui a permis de déterminer les haplotypes de chacun pour des microsatellites (A à L) dont la localisation sur le bras court du chromosome 3 est précisée sur la figure 2.

2a) Qu'est-ce qu'un microsatellite ?

2b) Quels avantages présente ce type de marqueur par rapport à ceux précédemment utilisés (RFLP) ?

2c) Comment détermine-t-on pour un microsatellite donné le(s) allèle(s) porté(s) par un individu ?

2d) En examinant les formes alléliques portées par chaque enfant de la famille 11 pouvez-vous préciser celles portées par les deux parents ? Le gène dont une (ou plusieurs) forme allélique est responsable du phénotype [HNPCC] peut-il être localisé sur le bras court du chromosome 3 ?

2e) Quelle est la définition d'un centimorgan (cM) ?

2f) Que s'est-il passé pour l'enfant 7 ? Cela vous permet-il de préciser la zone où le gène impliqué dans le HNPCC est localisé ?

3°) Parmi les 18 familles 5 (familles 2, 6, 10, 11 et 59) étaient originaires de trois communes groupées dans une zone rurale à faible densité de population, situées à 100km au nord de Jyväskylä alors que 4 autres étaient originaires de régions différentes (familles 3, 8, 39 et 59), ces données sont résumées dans la carte de la figure 3. Les haplotypes présentés par les membres atteints de ces familles est indiqué dans la figure 4.

Que pouvez-vous en déduire quant à l'origine probable de(s) la mutation responsable dans ces familles. Quelle précision supplémentaire vous apportent l'ensemble de ces données ?

4°) On pense que la prédisposition à certains cancers dont le HNPCC peut être due à des erreurs de réplication de l'ADN. La plupart des lignées cellulaires issues de tumeurs cancéreuses du colon contiennent des mutations de décalage du cadre de lecture par variation de la taille d'une microséquence contenant plusieurs A successifs dans un gène donné.

Chez tous les organismes vivants, la fidélité de la réplication est assurée par des gènes hautement conservés. En particulier, le gène procaryote Mut S qui assure la correction des erreurs de réplication chez les bactéries est représenté par 3 gènes homologues chez les eucaryotes. MSH2 est un de ces homologues, présent aussi bien chez l'homme que chez la souris, la drosophile ou la levure.

Il s'agit de déterminer si une mutation dans un des allèles du gène MSH2 prédispose les cellules à muter davantage. Une telle étude n'a été débutée que chez la souris où l'on n'a pas pu mettre en évidence de différence entre des cellules de génotype (MSH2+/MSH2+) et (MSH2+/msh2-) ; mais l'étude n'est que partielle et très incomplète, elle a donc été reprise chez un organisme plus simple et de manipulation aisée : la levure.

Pourquoi le résultat obtenu chez la souris ne satisfait-il pas les chercheurs qui ont étudié les cas de HNPCC (comparez avec vos conclusions sur la transmission de [HNPCC] dans la famille 11)?

4a) Méthode d'étude chez la levure.

Construction d'une souche haploïde dépourvue d'un gène MSH2+ actif .

Avec les outils actuels de la biologie moléculaire on a pu remplacer le gène MSH2 (allèle sauvage) par une construction dans laquelle une séquence conférant la résistance à la kanamycine est incluse dans le gène MSH2 (Figure 5).

Quel est le phénotype d'une souche portant cette construction ?

Construction d'une souche avec un gène témoin.

Dans une souche sauvage de levure, on a introduit un gène LYS2 modifié selon la figure 2. On y a inséré une courte séquence dont la taille peut varier selon le nombre de A inclus au site *. Lorsque 6 A sont insérés, cette modification n'inactive pas le gène LYS2 et la souche qui porte cet allèle modifié est [leu+] (Figure 6).

Pourquoi l'insertion A₆ conserve-t-elle le phénotype sauvage ?

Quel phénotype pouvez-vous prévoir pour les souches portant chacune des variantes de (A)₄ à (A)₁₄ ?

4b) Mesure de la mutabilité d'une souche.

Pour mesurer le taux de mutabilité d'une souche, on va mesurer sa capacité à réverser de la façon suivante. Une souche portant l'allèle lys2 avec l'insertion (A)₁₄ est étalée sur milieu avec lysine et après 3 jours d'incubation, la boîte est répliquée sur milieu sans lysine. Après 3 jours supplémentaires d'incubation, on compte les sous clones qui ont poussé sur ce milieu.

Expliquez ce qui s'est passé pour que des cellules soient redevenues [lys+].

En procédant de la sorte avec la souche A (MSH2+ et lys2 avec l'insertion (A)₁₄) et la souche B (souche msh2 interrompu par la cassette Kn^R et lys2 avec l'insertion (A)₁₄) on a obtenu les révertants suivants.

souche	Génotype	nombre de clones révertants pour 10 ⁸ cellules testées	taux de mutation x 10 ⁶
A	MSH2+, lys2(A) ₁₄	16	0,16
B	msh2-, lys2(A) ₁₄	160 000	1 600

Interprétez ce résultat.

4c) Etude de différents allèles du gène MSH2.

A partir d'un plasmide ne portant pas de gène MSH2 (plasmide P1), on a construit des plasmides portant différents allèles msh2 de levure portant des mutations identiques à celles observées pour des cellules de cancer colorectal dans ce même gène humain MSH2. Ces mutations (de type substitution) affectent en particulier un motif biochimiquement important de 8 aminoacides (de la position 688 à la position 695).

plasmide	allèle msh2	position de la substitution	Aminoacide trouvé chez le sauvage	Aminoacide trouvé chez le mutant
P+	MSH2+	-	-	-
P1	sans	-	-	-
PG693S	G693S	693	Gly	Ser
PG688A	G688A	688	Gly	Ala
PG693A	G693A	693	Gly	Ala
pK694A	K694A	694	Lys	Ala
PS695A	S695A	695	Ser	Ala

On a ensuite introduit ces plasmides soit dans la souche A soit dans la souche B et on a mesuré la mutabilité de la souche obtenue (résultats dans les deux tableaux suivants).

plasmide reçu par la souche A (MSH2+)	taux de mutabilité	taux relatif
aucun	0,16	1
P1	0,16	1
P+	0,15	1
PG693S	1400	9300
PG688A	3	20
PG693A	1050	7000
pK694A	920	6100
PS695A	4100	27000

plasmide reçu par la souche B(msh2-)	taux de mutabilité	taux relatif
aucun	700	8800
P1	620	8800
P+	0,07	1
PG693S	2600	37000
PG688A	14	200
PG693A	1300	18000
pK694A	1600	22000
PS695A	1400	20000

Le taux de mutabilité est calculé comme précédemment. Le taux relatif est obtenu en faisant le rapport entre le taux obtenu pour la souche donnée et la valeur du taux de mutabilité de la souche sauvage A seule (en tenant compte de la limite de confiance qui peut varier d'une expérience à l'autre, ce qui explique que $0,15/0,16 = 0,16/0,16 = 0,07/0,16 = 1$).

Interprétez ces résultats :

pour chaque combinaison (cellule + plasmide), écrivez le génotype de la cellule transformée résultante pour le gène MSH2 et le phénotype observé.

que se passe-t-il lorsque deux allèles différents sont mis en présence ?

que met-on en évidence dans le tableau avec la souche A ?

et avec la souche B ?

rapprochez ces résultats chez la levure de ce qui a été observé chez l'homme.

Bibliographie

Nystrom-Lahti M, Sistonen P, Mecklin JP, Pylkkanen L, Aaltonen LA, Jarvinen H, Weissenbach J, de la Chapelle A, Peltomaki P. (1994). Close linkage to chromosome 3p and conservation of ancestral founding haplotype in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **91**(13):6054-8.

Drotschmann K., A.B. Clark, H.T. Tran, M. A. Resnick, D. A. Gordenin, T. A. Kunkel (1999) .Mutator phenotypes of yeast strains heterozygous for mutations in the *MSH2* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. **96**, pp. 2970–2975.

H. T. Tran, N. P. Degtyareva, N. N. Koloteva, A. Sugino, H. Masumoto, D. A. Gordenin, M. A. Resnick (1995) Replication Slippage between Distant Short Repeats in *Saccharomyces cerevisiae* Depends on the Direction of Replication and the *RAD50* and *RAD52* Genes *Mol. Cel. Biol.*, Vol. **15**, No. 10 p. 5607–5617

H. T. Tran, J. D. Keen, M. Krickler, M. A. Resnick, D. A. Gordenin (1997). Hypermutability of Homonucleotide Runs in Mismatch Repair and DNA Polymerase Proofreading Yeast Mutants. *Mol. Cel. Biol.* Vol. **17**, No. 5 p. 2859–2865

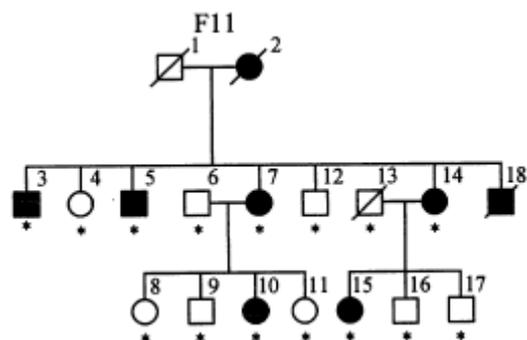


Figure 1. Famille finlandaise 11. Les sujets atteints sont en noir, barrés, ils sont morts, le point indique qu'ils sont disponibles pour d'éventuelles analyses ADN.

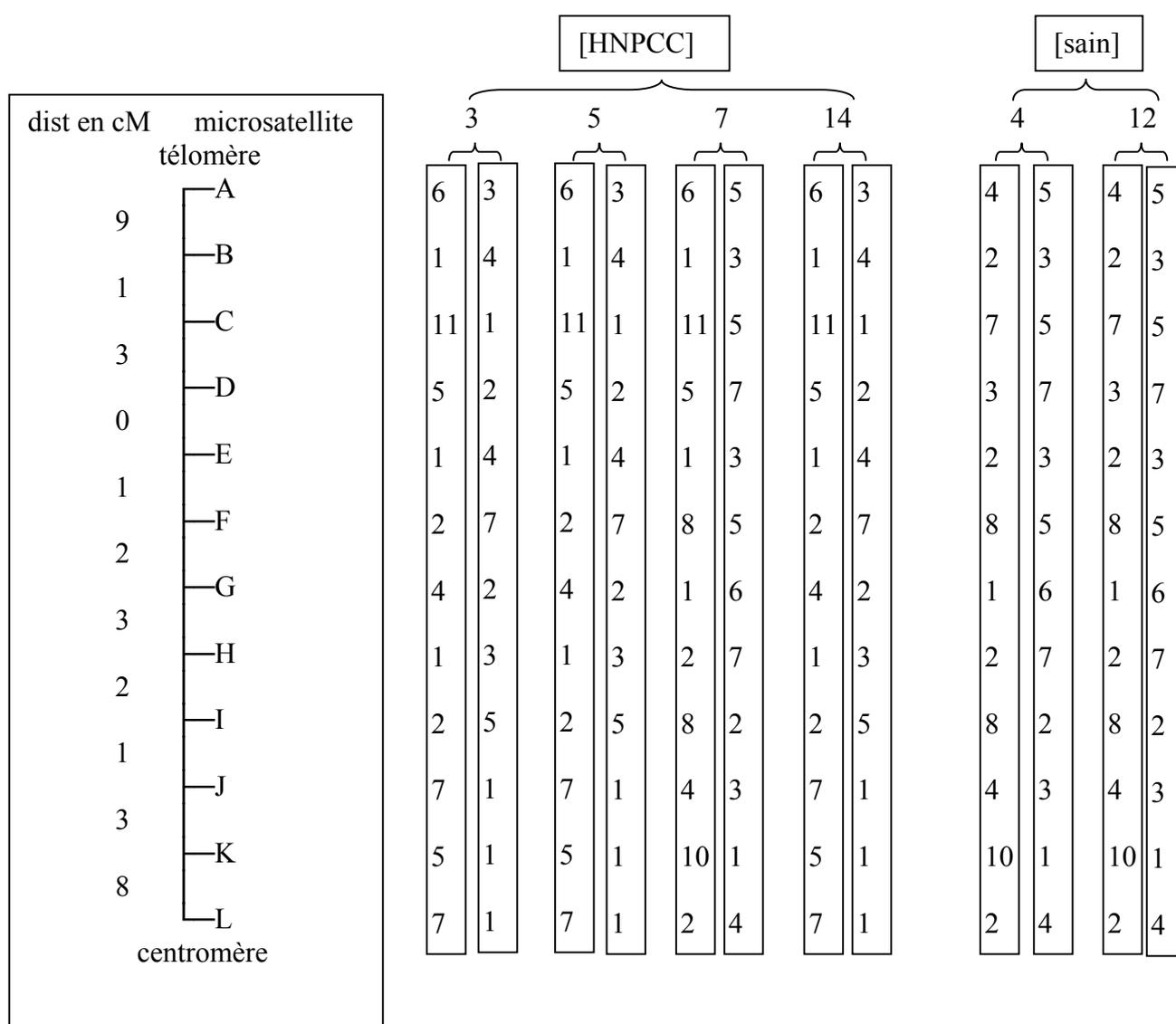


Figure 2. Haplotypes pour 12 marqueurs microsatellites du bras court de chromosome 3. Chaque rectangle représente un chromosome. Les positions respectives des microsatellites sont indiquées sur la gauche.

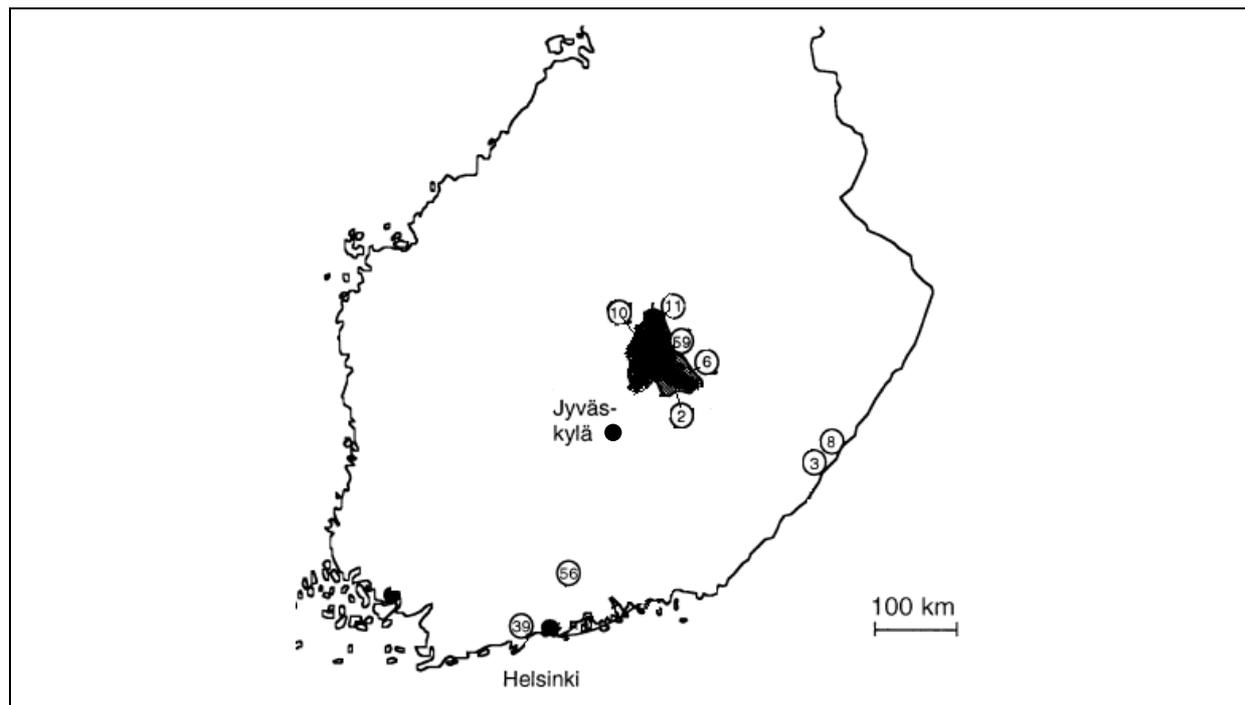


Figure 3. Carte de Finlande montrant l'origine géographique de différentes familles HNPCC étudiées. En noir le territoire des 3 paroisses situées 100km au nord de Jyväskylä, berceau des familles 2, 6, 10, 11 et 59

cM Marqueurs		Descendants atteints																
		F2			F3		F6	F8		F10		F11		F39	F56	F59		
pter		23	7	46	6	23	15	13	6	6	19	5	7	9	6	6	17	24
9	A	7	7	7	2	6	2	2	7	3	3	6	6	6	6	7	2	7
1	B	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	7	1	1	1
0	C	11	11	11	8	8	11	9	2	11	11	11	11	2	11	11	11	11
0	D	5	5	5	1	1	5	5	5	5	5	5	5	6	2	5	5	5
1	E	1	1	1	1	1	1	10	10	1	1	1	1	7	7	1	1	1
2	F	2	2	2	2	2	2	8	8	2	2	2	8	8	1	2	2	2
3	G	4	4	4	4	4	4	3	3	4	4	4	1	2	4	4	4	4
2	H	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1
1	I	2	2	2	3	3	2	6	6	2	2	2	8	6	8	2	2	2
3	J	7	7	7	2	2	7	9	9	7	7	7	4	7	7	7	7	7
8	K	2	4	2	3	10	5	5	5	1	5	5	10	3	3	5	5	3
	L	7	2	12	7	12	1	12	12	7	1	7	2	7	12	1	1	12
	cen																	

Figure 4. Analyse des haplotypes des sujets atteints dans différentes familles. Pour chaque famille, l'haplotype de gauche, en grisé est celui que l'on retrouve en général chez les sujets malades. Les autres de la même famille présentent différents événements de recombinaison (encadrés sur fond blanc).

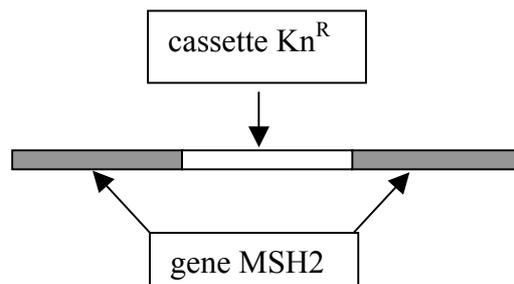


Figure 5. Construction inactivant le gène MSH2

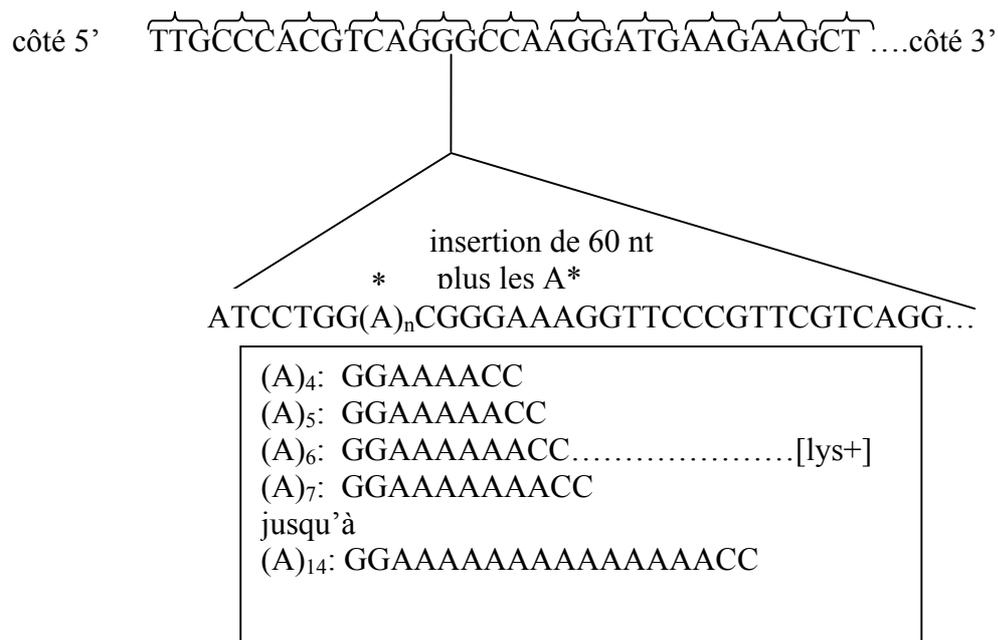


Figure 6. La phase de lecture du gène LYS2 (allèle sauvage) est indiquée sur la première ligne.. En dessous on montre l'insertion que l'on introduit dans ce gène avec les diverses variations possibles et pour l'une d'entre elles (A)₆ le phénotype de la souche qui porte cette forme allélique.

CORRECTIONS

Etude de clones

1°) Le problème est ici différent de la préparation d'un ADN génomique entier pour constituer une banque. La fragmentation doit être limitée. On va donc choisir des enzymes qui ne risquent pas de pulvériser les 15kb

une enzyme ayant un site de 4bp coupe des morceaux de 256bp ($1/256=1/(4)^4$)

une enzyme ayant un site de 5bp coupe des morceaux de 1024bp ($1/1024=1/(4)^5$)

une enzyme ayant un site de 6bp coupe des morceaux de 4096bp ($1/4096=1/(4)^6$)

une enzyme ayant un site de 7bp coupe des morceaux de 16384bp ($1/16384=1/(4)^7$)

le premier cas donne des morceaux plus petits que le plus petit gène envisageable (polypeptide ≥ 100 AA)

le second est limité mais envisageable

le troisième est correct

le dernier (ou des enzymes ayant un site encore plus grand) est beaucoup trop rare pour avoir une probabilité de couper les 15kbp.

On peut donc tenter une digestion du fragment par Sall (ou BamHI ou PvuI) qui donnera des extrémités cohésives ou par DraI (ou HpaI) qui donnera des bouts francs.

Ces diverses digestions seront complètes.

2°) Les extrémités des sous fragments et de pBR322 linéarisé doivent être compatibles. Si on a une extrémité cohésive il va falloir digérer le plasmide par la même enzyme de restriction ou une compatible.

Si on a un bout franc, on digèrera pBr par BamHI (par exemple) puis on fera agir la nucléase si l'exonucléase qui ne digère que l'AND simple brin) pour rendre les extrémités de pBR linéarisé compatibles.

Dans tous les cas il faudra faire une digestion complète de pBR par une enzyme qui n'y a qu'un site.

Il faut également se préoccuper de la récupération des sous fragments pour une étude approfondie.

digestion du fragment de 15kbp	digestion de pBR	site reconstitué par ligation	propriétés des bactéries ayant reçu un plasmide recombiné
BamHI	BamHI	BamHI	Amp ^R , Tet ^S
Sall	Sall	Sall	Amp ^R , Tet ^S
PvuI	PvuI	PvuI	Amp ^S , Tet ^R
DraI	BamHI + S1	CGAAA 0 ER	Amp ^R , Tet ^S
HpaI	BamHI + S1	GTTC 0 ER	Amp ^R , Tet ^S

Dans les deux derniers cas il faudra faire une double digestion du plasmide recombiné par NheI et PaeI le fragment ne sera augmenté que de 333bp pour récupérer le sous fragment.

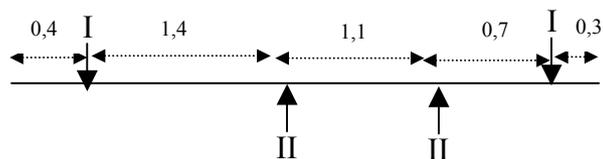
La sélection des bactéries transformées se fait sur un milieu additionné d'ampicilline (sauf pour la digestion PvuI ou il faut la remplacer par la tétracycline).

Le repérage des clones portant un plasmide recombiné se fait par répliques sur milieu 1(+Amp +Tet) et milieu 2 (+Amp ;ou Tet dans le cas de PvuI). Les clones qui ne poussent que sur le milieu 2 sont ceux que l'on recherche.

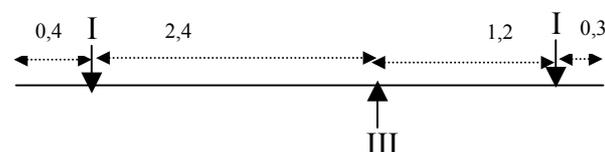
3°) Carte du sous fragment A

taille = 3,9kbp

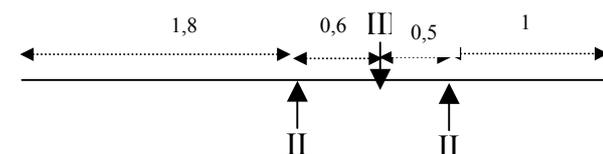
ERI	0,4+	3,2	+0,3
ERI + ERII	0,4+1,4+	+1,1+0,7+	0,3
ERII	1,8	+1,1+	1



ERI	0,4+	3,2	+0,3
ERI + ERIII	0,4+	2 + 1,2	+0,3
ERIII	2,4	+	1,5



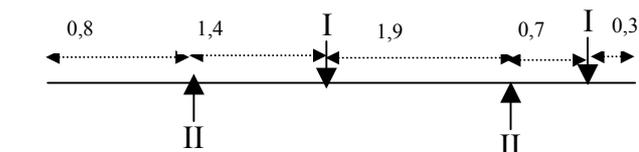
ERII	1,8	+1,1	+1
ERII + ERIII	1,8	+0,6+	0,5 + 1
ERIII	2,4	+	1,5



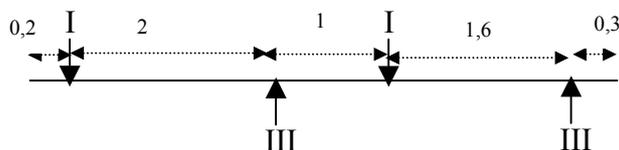
Carte du sous fragment B

taille = 5,1kbp

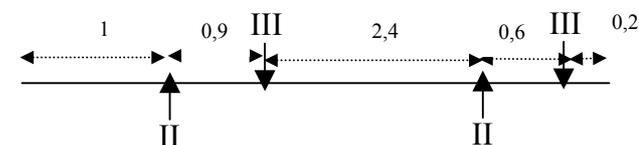
ERI	2,2 + 2,6	+0,3
ERI + ERII	0,8+1,4+1,9+	0,7+0,3
ERII	0,8+	3,3 + 1



ERI	2,2 + 2,6	+0,3
ERI + ERIII	0,2+2+1+1,6+	0,3
ERIII	0,2+	3 + 1,9



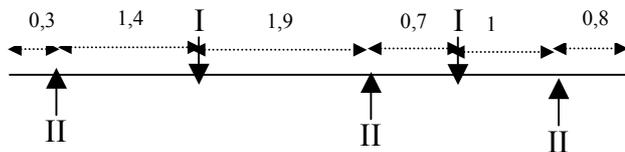
ERII	0,8	+	3,3	+1
ERII + ERIII	2,4+1,3+0,9+	0,8+0,4+	0,3	
ERIII	0,2+	3	+ 1,9	



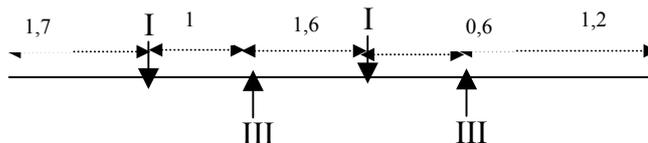
Carte du sous fragment C

taille = 6,1kbp

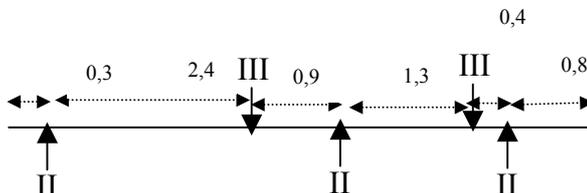
ERI 1,7 + 2,6 + 1,8
 ERI + ERII 0,3+1,4+1,9+0,7+1+0,8
 ERII 0,3+ 3,3 + 1,7 +0,8



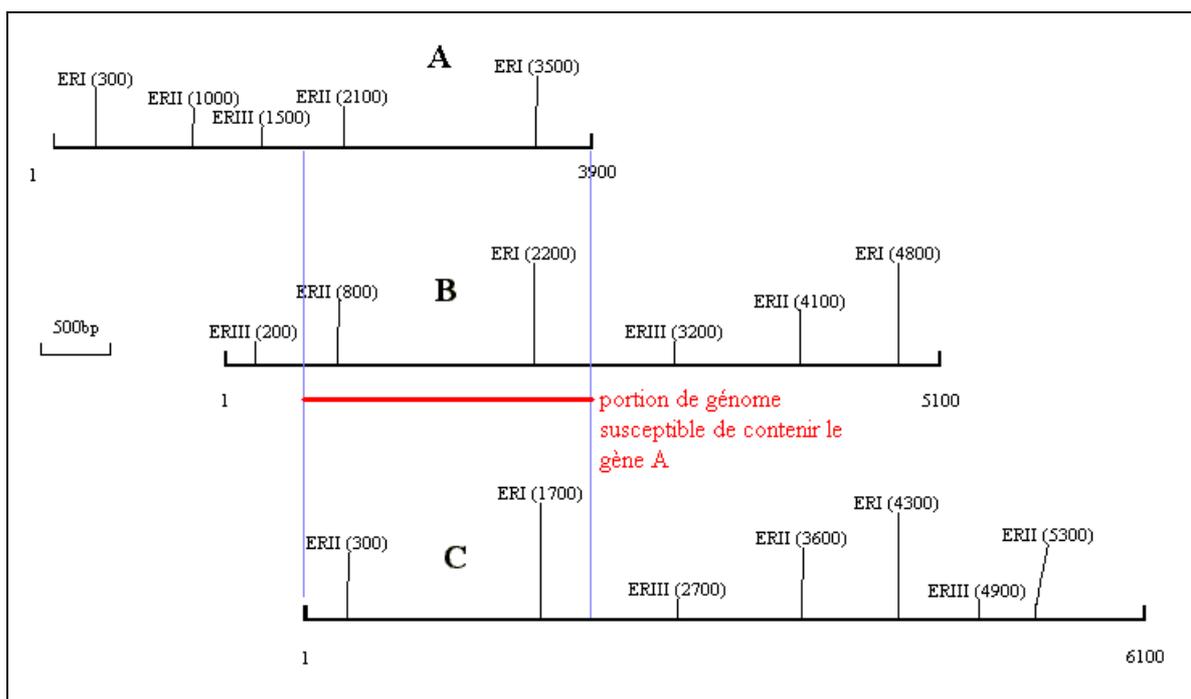
ERI 1,7+ 2,6 + 1,8
 ERI + ERIII 1,7+1+1,6+0,6+1,2
 ERIII 2,7 + 2,2 +1,2



ERII 0,3+ 3,3 + 1,7 +0,8
 ERII + ERIII 0,3+2,4+0,9+1,3+0,4+0,8
 ERIII 2,7 + 2,2 + 1,2



La superposition des cartes de restriction des 3 fragments montre qu'ils sont chevauchants. Le gène A doit se trouver sur la partie commune.



VARIANTS α et β GLOBINE

1°) Tous ces mutants sont des mutants où le codon non sens normal n'est plus reconnu comme tel et la traduction continue jusqu'au prochain codon non sens dans la nouvelle phase de lecture.

Les 4 variants CS, Icaria, Koya Dora et Seal Rock ont une séquence plus longue identique à un seul acide aminé près, le 142e. Le codon non sens de la souche sauvage a dû muter de telle sorte qu'il est devenu sens et que la lecture s'est prolongée en phase avec ce qui précède jusqu'au codon non sens suivant qui est en position 172.

Sauvage

protéine :	Stop
ARNm	UAA ou UAG
ADN brin transcrit	ATT ATC
brin non transcrit	TAA TAG

Constant Spring

protéine :	Gln
ARNm	CAA ou CAG
ADN brin transcrit	GTT GTC
brin non transcrit	CAA CAG

La mutation porte sur la première paire de bases du triplet (A/T \rightarrow G/C).

Icaria

protéine :	Lys
ARNm	AAA ou AAG
ADN brin transcrit	TTT TTC
brin non transcrit	AAA AAG

La mutation porte sur la première base du triplet (A/T \rightarrow T/A).

Koya Dora

protéine :	Ser
ARNm	UCx ou AGU ou AGC
ADN brin transcrit	AGx TCA TCG
brin non transcrit	TCx AGT AGC

La mutation porte sur la seconde paire de bases du triplet. Il faut prendre le triplet correspond au codon UCx (sinon il faut plus d'un événement et c'est moins probable).

Seal Rock

protéine :	S Glu
ARNm	GAA ou GAG
ADN brin transcrit	CTT CTC
brin non transcrit	GAA GAG

La mutation porte sur la première paire de bases du triplet (A/T \rightarrow C/G).

Pour le dernier mutant la séquence supplémentaire est différente. Elle est donc lue dans une phase différente, un cadre de lecture modifié. En effet, si l'on voulait garder le même cadre, il faudrait, pour obtenir cette séquence protéique un grand nombre de mutations, ce qui est improbable.

Wayne : délétion de la dernière paire de bases du triplet 139. En opérant ce changement on voit que l'on retrouve la séquence des bases du sauvage mais avec un autre cadre de lecture

En comparant les séquences de CS et Wayne on peut établir la séquence sans ambiguïté (et sans faire de séquençage chimique ou biochimique):

ARNm	UACCGUCAAGCUGGAGCCUCGGU
ADN brin non transcrit	TACCGTCAAGCTGGAGCCTCGGT
Phase de lecture sauvage	TAC CGT TAA GCT GGA GCC TCG GT
Phase de lecture Constant Spring	TAC CGT CAA GCT GGA GCC TCG GTetc
Phase de lecture Wayne	T ACC GTC AAG CTG GAG CCT CGG Tetc

Puisque la traduction peut se poursuivre c'est que l'ARNm ne se termine pas immédiatement à la fin du gène de structure.

2°) Tous ces mutants ne présentent pas de modification de cadre de lecture. Il manque seulement un ou plusieurs acides aminés. Ils ont donc tous subi des délétions d'autant de fois 3 bases qu'il leur manque d'acides aminés.

délétion de 3 paires de bases Grady, Freiburg

délétion de 6 paires de bases Lyon

délétion de 9 paires de bases Niteroi

délétion de 12 paires de bases Tochigi

délétion de 15 paires de bases Gun Hill

addition (duplication) de 9 paires de bases Boyle

On devrait pouvoir trouver toutes les tailles de délétion mais leur apparition entraînerait un tel bouleversement de la protéine (car provoquant un décalage du cadre de lecture) qu'elles ne sont pas viables donc on ne les pas observées.

Phénotype

Parmi ces différents types de mutants on peut en reconnaître plusieurs classes.

Les auxotrophes pour un produit final d'une voie de biosynthèse. Pour leur permettre de pousser il faut leur fournir le produit qu'ils ne savent plus faire. Ceux qui sont incapables d'utiliser une source potentielle de carbone et d'énergie, car ils manquent d'une des activités enzymatiques nécessaires au catabolisme de ce sucre.

Contrairement à la classe précédente il ne faut pas leur fournir ce sucre comme seule source de carbone mais leur en fournir une autre. Ceux qui sont devenus résistants à un analogue d'un produit qui sert à l'édification des protéines (ou des acides nucléiques). Les mutants résistants se distingueront de la souche sauvage s'ils sont mis en présence de l'analogue.

On peut donc envisager de tester chacune de ces catégories séparément.

Pour les auxotrophes, il faut identifier ceux qui exigent Ade, Ura et Leu ainsi que distinguer ceux qui exigent Ura ou leu de ceux qui sont double auxotrophes pour les deux. On va préparer une boîte mère de milieu complet (tous les mutants poussent) qui sera répliquée (par la technique du velours) sur plusieurs milieux (et dans cet ordre afin que l'on soit sûr que ce qui a poussé sur le dernier milieu ait été déposé sur tous les autres milieux, même si aucune croissance n'est observable).

Phénotype	milieu minimum	milieu minimum +Ade + Ura	milieu minimum +Ade + Leu	milieu minimum +Leu + Ura	milieu minimum +Ade + Leu + Ura
[Ade-]	-	+	+	-	+
[Ura-]	-	+	-	+	+
[Leu-]	-	-	+	+	+
[Leu-, Ura-]	-	-	-	+	+

Pour les non-utilisateurs il faut préparer des milieux avec les sucres non utilisés et un milieu avec un sucre utilisable (en général on prend le glucose).

Phénotype	milieu avec glycérol comme seule source de carbone	milieu avec galactose comme seule source de carbone	milieu avec glucose comme seule source de carbone
[gly ^{non U}]	-	+	+
[gal ^{non U}]	+	-	+

Pour les souches résistantes il faut préparer un milieu contenant un des analogues à la fois.

Phénotype	milieu minimum + canavanine	milieu minimum + éthionine	milieu minimum
[Eth ^R]	-	+	+
[Can ^R]	+	-	+

Si l'on veut tester toutes les souches en un seul lot il faudra prévoir pour chaque milieu, la source de carbone et les suppléments nécessaires.

source de carbone	galactose	glycérol	glucose						
supplément	0	0	0	0	0	Ade Ura	Ade Leu	Leu Ura	Ade Leu Ura
inhibiteur de croissance	0	0	éthionine	canavanine	0	0	0	0	0
[Ade-]	-	-	-	-	-	+	+	-	+
[Ura-]	-	-	-	-	-	+	-	+	+
[Leu-]	-	-	-	-	-	+	-	+	+
[Leu-, Ura-]	-	-	-	-	-	+	-	-	+
[gly ^{non U}]	-	+	-	-	+	+	+	+	+
[gal ^{non U}]	+	-	-	-	+	+	+	+	+
[Eth ^R]	+	+	+	-	+	+	+	+	+
[Can ^R]	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Sauvage	+	+	-	-	+	+	+	+	+

Selon les milieux utilisés des souches de génotype différents auront le même comportement (tous les auxotrophes en présence d'un inhibiteur de croissance, par exemple) et présenteront le même phénotype.

Phénotype : l'aspect (ou le comportement de croissance ou non croissance) d'un organisme résultant de l'interaction entre le phénotype et le milieu dans lequel l'organisme est placé.

Complémentation

A 1°) Les mutants récupérés sont [a leu⁻ canR]

2°) Leur fréquence est de

$$\frac{8}{10^9} = 8 \times 10^{-9}$$

Ces huit mutants peuvent provenir d'un événement mutationnel au moins ou de 8 au plus, ce qui donne comme estimation du taux de mutation :

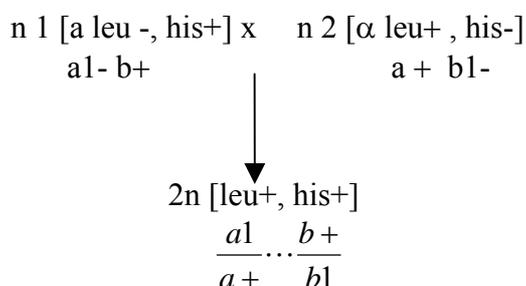
$$10^{-9} < \text{taux de mutation} < 8 \times 10^{-9}$$

3°) La culture a d'abord été faite en milieu liquide pour avoir assez de cellules à étaler. Au cours de cette culture il a pu y avoir des mutations dont certaines conféraient la résistance à la canavanine. Lorsque les cellules ont été mises en présence de l'analogue, seules les résistantes ont été capables de pousser.

B 1°) probabilité d'un simple mutant de l'ordre de 10^{-8}
 probabilité d'un double mutant de l'ordre de 10^{-16}

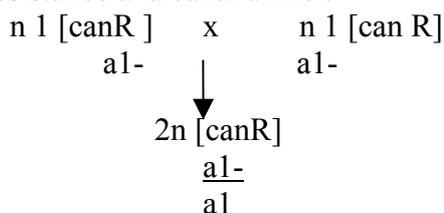
On n'a observé que quelques mutants donc ils ont une forte probabilité d'être simples mutants.

2°) Sur milieu minimum chacun des haploïdes auxotrophes est incapable de pousser. Ces auxotrophies sont des phénotypes récessifs devant le phénotype sauvage. Le diploïde qui reçoit un allèle muté et un allèle sauvage pour chacun des deux gènes est prototrophe. Sur milieu minimum il n'y a que lui qui pousse.



Convention	
Gène A :	allèle a+ qui confère [leu+] allèle a1 qui confère [leu-]
Gène B :	allèle b+ qui confère [his+] allèle b1 qui confère [his-]

3°) On a deux types de croisements ceux qui donnent un diploïde résistant et ceux qui donnent un diploïde sensible. L'un des deux correspond au cas de deux gènes en jeu et l'autre au cas du même gène. Les croisements s'écrivent de la façon suivante en ne tenant compte que de la résistance à la canavanine :



Convention	
Gène A :	allèle a+ qui confère [CanS] allèle a1 qui confère [CanR]

On voit que l'homozygote est résistant.

$$\begin{array}{ccc}
 n\ 1\ [canR] & \times & n\ 3\ [canR] \\
 a1-b+ & & a+ b1- \\
 & \downarrow & \\
 2n\ [can\ S] & \frac{a-1}{a+} \dots \frac{b+}{b-1} &
 \end{array}$$

Si le diploïde est sensible c'est qu'il n'est pas homozygote pour un allèle muté.

Il y a complémentation : restauration du phénotype sauvage.

$$\begin{array}{ccc}
 n\ 1\ [canR] & \times & n\ 2[can R] \\
 a1- & & a2 \\
 & \downarrow & \\
 2n\ [canR] & & \\
 \frac{a1-}{a2-} & &
 \end{array}$$

Le diploïde est résistant, il ne porte aucun allèle sauvage du gène A

Il n'y a pas restauration du phénotype sauvage donc pas de complémentation.

Les diploïdes sensibles représentent le cas de deux gènes différents et les résistants le cas du même gène touché dans les deux haploïdes.

On peut définir 3 groupes de complémentation :

groupeA	groupeB	groupeC
1	3	7
2	4	4
4	5	
6	8	

Les groupes correspondent à 3 gènes mutés. Le mutant 4 pose un problème puisqu'il faudrait faire l'hypothèse qu'il est triple mutant. Ce qui est fortement improbable. Une autre hypothèse serait que les trois gènes A, B et C soient cointigus et que le mutant 4 résulte d'une délétion qui les englobe tous.

4°) Mais dans cette expérience il manque le croisement par la souche sauvage qui permet d'établir la récessivité du phénotype résistant devant le phénotype sensible. Pour toutes les souches sauf 4 cette récessivité ne peut être mise en doute puisque la sensibilité du diploïde entre deux mutants de groupes de complémentation différents en est la preuve :

$$\begin{array}{ccc}
 n1 \text{ [canR]} & \times & n3 \text{ [can R]} \\
 a1- b+ & & a+ b1- \\
 & \downarrow & \\
 2n \text{ [can S]b} & \frac{a1-}{a+} \dots \frac{b+}{b1-} &
 \end{array}$$

Dans le cas du mutant 4 on ne peut affirmer la même chose puisqu'aucun des diploïdes construits avec 4 comme parent n'est sensible. L'hypothèse la plus probable est que la mutation du mutant 4 confère un phénotype résistant dominant sur le phénotype sensible. Il faut faire le croisement par sauvage qui donnerait si la résistance est dominante sur la sensibilité :

$$\begin{array}{ccc}
 n4 \text{ [can R]} & \times & n+ \text{ [can S]} \\
 a4- & & a+ \\
 & \downarrow & \\
 2n \text{ [canR]} & & \\
 \frac{a_4^-}{a^+} & &
 \end{array}$$

Analyse de mutants multiples

La souche mutante a pour phénotype [Trp-, Lys-, Ade-, Leu-] et la souche de référence s'en distingue par ses prototrophies vis à vis des mêmes métabolites, phénotype [Trp+, Lys+, Ade+, Leu+].

On observe 16 types différents de spores : chaque auxotrophie ségrège indépendamment donc on peut affirmer que chacune est déterminée génétiquement par un (ou plusieurs) gène différent des autres auxotrophies.

Il faut d'abord examiner chaque auxotrophie séparément .

Pour le tryptophane on a

$$[\text{Trp-}] = 71 + 74 + 56 + 44 + 51 + 51 + 29 + 38 = 414$$

$$[\text{Trp+}] = 71 + 47 + 79 + 53 + 40 + 31 + 40 + 25 = 386$$

Cette proportion est-elle statistiquement compatible avec une ségrégation 2/2 ? Un test du critérium χ^2 de Pearson répond à cette question. ATTENTION les calculs se font toujours sur les EFFECTIFS(et non sur les fréquences relatives).

$$\chi^2 = \sum_1^n \frac{(N_{att} - N_{obs})^2}{N_{att}} = \frac{(400 - 414)^2}{400} + \frac{(400 - 386)^2}{400} = 0,98$$

Avec :

Natt= Effectif attendu sous l'hypothèse,

Nobs = Effectif observé,

n = nombre de classes observées.

Le degré de liberté est ici 1. Il suffit d'avoir fixé l'effectif d'une catégorie pour connaître celui de l'autre, sur un total de 800 spores observées. Avec 1 degré de liberté, la valeur du Chi2 théorique à partir de laquelle l'hypothèse doit être rejetée au seuil de probabilité de 5% est de 3,84, Puisque la valeur du Chi2 calculé est inférieure à la valeur théorique: $0,98 < 3,84$, l'hypothèse d'une ségrégation 2/2 ne peut donc être rejetée. On conclut que l'auxotrophie pour le tryptophane est gouvernée pour un gène A. On procède de la même façon pour les autres auxotrophies.

auxotrophie	exigeant	prototrophe	χ^2^*	conclusion
Lys	71+74+47+44+53+51+31+25 = 396	71+79+56+40+51+29+38 = 404	0,08 <3,84	2/2 1 gène
Ade	71+74+56+40+51+31+40+25 = 388	71+47+79+44+53+51+29+38 = 412	0,72 <3,84	2/2 1 gène
Leu	71+47+56+53+40+51+29+25 = 401	71+74+56+53+40+51+29+25 = 399	0,005 <3,84	2/2 1 gène

*l'écart avec les effectifs théoriques est dans chaque cas plus petit que dans le cas précédent il est donc superflu de le calculer.

Les 4 auxotrophies sont donc monogéniques

gène A 2 allèles : a+ qui confère [Trp+] et a1 qui confère [Trp-]

gène B 2 allèles : b+ qui confère [Lys+] et b1 qui confère [Lys-]

gène C 2 allèles : c+ qui confère [Ade+] et c1 qui confère [Ade-]

gène D 2 allèles : d+ qui confère [Leu+] et d1 qui confère [Leu-]

Ces gènes sont-ils liés ou indépendants ? Il faut regarder chaque couple possible.

Pour les auxotrophies trp et lys on dénombre 4 types de spores.

Le croisement s'écrit

n S. Ref [Trp+, Lys+] a+ b+ x n S. Mutante [Trp-, Lys-] a1 b1

$$\downarrow$$

$$2n \frac{a1 \dots b1}{a+ \quad b+}$$

$$\downarrow$$

4 types de spores haploïdes

$$\left. \begin{array}{l} a1 \ b1 \ [Trp- \ Lys-] \\ a+ \ b+ \ [Trp+ \ Lys+] \end{array} \right\} P$$

$$\left. \begin{array}{l} a1 \ b+ \ [Trp- \ Lys+] \\ a+ \ b1 \ [Trp+ \ Lys-] \end{array} \right\} R$$

nombre de spores	a1 b1 [Trp- Lys-]	71+74+44+51 = 240	} P= 230+240=470
	a+ b+ [Trp+ Lys+]	71+79+40+40 = 230	
	a1 b+ [Trp- Lys+]	56+51+29+38 = 174	} R= 174+156=330
	a+ b1 [Trp+ Lys-]	47+53+31+25 = 156	

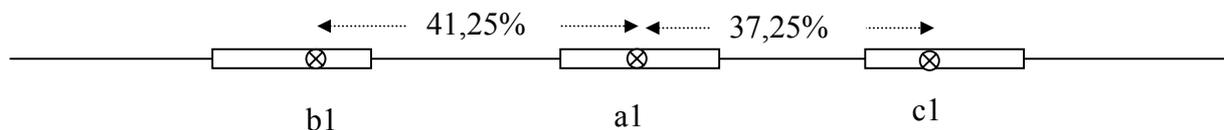
On constate que P>R donc les gènes sont liés et on calcule leur % de recombinaison.

$$D_{a1,b1} = \frac{330}{470+330} \times 100 = 41,25\% \text{ de recombinaison.}$$

On examine de la même manière tous les autres couples.

couple	[+ +]	[- -]	[- +]	[+ -]	P	R	conclusion
Trp, Ade	71+47+79+53 = 250	71+74+56+51 = 252	44+51+29+38 = 162	40+31+40+25 = 136	502	298	P>R Da1,c1=37,25%
Trp, Leu	71+53+40+25 = 189	71+44+51+38 = 204	74+56+51+29 = 210	47+79+31+40 = 197	393	407	P=R indépendance
Lys, Ade	71+79+29+38 = 217	71+74+31+25 = 201	47+44+53+51 = 195	56+40+51+40 = 187	418	382	P=R indépendance
Lys, Leu	71+56+40+29 = 196	71+47+44+31 = 193	74+53+51+25 = 203	79+51+40+38 = 208	389	411	P=R indépendance
Ade, Leu	71+53+51+29 = 204	71+51+31+40 = 193	74+56+40+25 = 195	47+79+44+38 = 208	397	403	P=R indépendance

On peut construire la carte suivante



Pour le gène D on ne peut préciser.

Remarquons que B et C n'apparaissent pas liés lorsqu'on ne regarde qu'eux, mais en considérant A on peut les relier.

Syndrome de Lesch-Nyhan

1°) Dans cette famille la fréquence des individus atteints est significativement supérieure à ce que l'on trouve dans la population générale. Ce doit donc être héréditaire

Dans le pedigree de la figure 1 on peut noter plusieurs couples (seul le parent issu de la famille est représenté) de phénotype sain qui ont plusieurs enfants malades. Le phénotype atteint [LN] est récessif devant le phénotype sauvage. Seuls apparaissent des mâles atteints ce qui évoque un gène sur l'X. De plus ce sont toujours les femmes qui font partie de la famille

M: mâle [+] x F: femelle [+]																			
<p style="text-align: center;">Hypothèse gène autosomique</p> <p>S'ils ont des enfants atteints c'est qu'ils sont porteurs.</p> $\begin{array}{cc} \underline{a-} & \times & \underline{a-} \\ a+ & & a+ \\ \downarrow & & \downarrow \\ \text{2 types de gamètes} \end{array}$ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td></td> <td>a-</td> <td>a+</td> </tr> <tr> <td>a-</td> <td>a-/a-[atteint]</td> <td>a-/a+[sain]</td> </tr> <tr> <td>a+</td> <td>a-/a+[sain]</td> <td>a-/a+[sain]</td> </tr> </table> <p>mâles et femelles [+] et [m] la présence d'une femelle [m] élimine l'hypothèse sur l'X</p>		a-	a+	a-	a-/a-[atteint]	a-/a+[sain]	a+	a-/a+[sain]	a-/a+[sain]	<p style="text-align: center;">Hypothèse gène sur l'X</p> <p>S'ils ont des enfants atteints c'est que la femelle est porteuse.</p> $\begin{array}{cc} \underline{a+} & \times & \underline{a-} \\ \neg & & a+ \\ \downarrow & & \downarrow \\ \text{2 types de gamètes} \end{array}$ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td></td> <td>a-</td> <td>a+</td> </tr> <tr> <td>\neg</td> <td>a-/\neg M[atteint]</td> <td>a+/\neg M[sain]</td> </tr> <tr> <td>a+</td> <td>a-/a+ F[saine]</td> <td>a-/a+ F[saine]</td> </tr> </table> <p>mâles [+] et [m] femelles [+] seules des considérations statistiques peuvent faire pencher pour cette hypothèse en l'absence de filles [m].</p>		a-	a+	\neg	a-/ \neg M[atteint]	a+/ \neg M[sain]	a+	a-/a+ F[saine]	a-/a+ F[saine]
	a-	a+																	
a-	a-/a-[atteint]	a-/a+[sain]																	
a+	a-/a+[sain]	a-/a+[sain]																	
	a-	a+																	
\neg	a-/ \neg M[atteint]	a+/ \neg M[sain]																	
a+	a-/a+ F[saine]	a-/a+ F[saine]																	

Pour établir cette localisation on peut dans tous les croisements qui donnent des enfants atteints étudier la répartition des descendants par classe phénotypique.

couples	mâles		femelles	
	sains	malades	saines	malades
parents de I-2 et I-3		1	1	
I-1 et I-2	1	1	4	
II-6	1	1		
III-1	1	2	2	
III-3		1	2	
III-10	1	2	2	
total observé	4	8	11	0
attendu si gène autosomique	$12 \times 3/4 = 9$	$12 \times 1/4 = 3$	$11 \times 3/4 = 8,25$	$7 \times 1/4 = 2,75$

Il faut que les nombres soient suffisants pour que l'absence d'une catégorie soit probante. Ici parmi les filles, l'hypothèse autosomique prévoit 2,75 (<5) pour les malades, le test du χ^2 ne peut pas s'appliquer.

On peut compter le nombre de couples d'individus sains qui ont eu des enfants atteints (ici 6).

Puisque la fréquence des [LN] est 10^{-5} (q^2) celle de l'allèle muté est donc de 0,0032 (q) et celle des hétérozygotes ($2pq$) 0,0064 si le gène est autosomique.

Dans l'hypothèse autosomique le mâle qui est puisé dans la population générale doit être hétérozygote. Répété 6 fois ce tirage a une probabilité de $(0,0064)^6 = 6,4 \times 10^{-14}$.

Dans l'hypothèse sur l'X le mâle sain ne peut être que porteur de l'allèle a^+ et sa fréquence est 1. Puisqu'en génétique, on retient l'hypothèse la plus probable, on considère que le gène en cause est localisé sur l'X. Avec cette hypothèse ce sont toujours des femmes qui transmettent la maladie, il n'y a donc pas de contradiction.

2°) C'est toujours l'ADN qui porte les mutations transmissibles puisqu'il constitue le matériel héréditaire. Il faut donc considérer les modifications au niveau de cette molécule informative.

	sauvage	mutant Toronto
acide aminé	Arg	Gly
codons ARNm	AGA AGG CGx	GGx
paires du triplet ADN	AGA AGG CGx TCT TCC GCx	CCx GGx

Substitution au niveau de la première base du triplet 50 : la paire A/T est remplacée.

	sauvage	mutant London
acide aminé	Ser	Leu
codons ARNm	Ucx AGC AGU	CUx UUA UUG
paires du triplet ADN	TCx AGC AGT Agx TCG TCA	CTx TTA TTG GAx AAT AAC

Substitution au niveau de la seconde base du triplet 109.

	sauvage	mutant Munich
acide aminé	Ser	Arg
codons ARNm	Ucx AGC AGU	AGA AGG CGx
paires du triplet ADN	TCx AGC AGT Agx TCG TCA	AGA AGG CGx TCT TCC GCx

Substitution au niveau de la troisième base du triplet 103, ou de la seconde base si le codon du mutant est CGC ou CGU.

3°) Les cellules mises en culture proviennent d'individus atteints donc homozygotes. Elles sont aussi homozygotes. Quand on construit un hybride entre deux homozygotes on obtient un tétraploïde hétérozygote ou homozygote. Dans le cas présent on sait que le phénotype [LN] est récessif devant le phénotype [sain]. Le tétraploïde (mutant x sauvage) est hétérozygote et doit être [HPRT+] alors que les tétraploïdes (mutant x mutant) hétérozygotes (ils sont chacun homozygotes pour une forme allélique différente du gène codant l'enzyme HPRT) sont touchés dans le même gène et ne doivent pas avoir d'HPRT. Leur phénotype est donc [HPRT-]. C'est ainsi que l'on définit de façon fonctionnelle un gène de structure.

4°) Premier cas

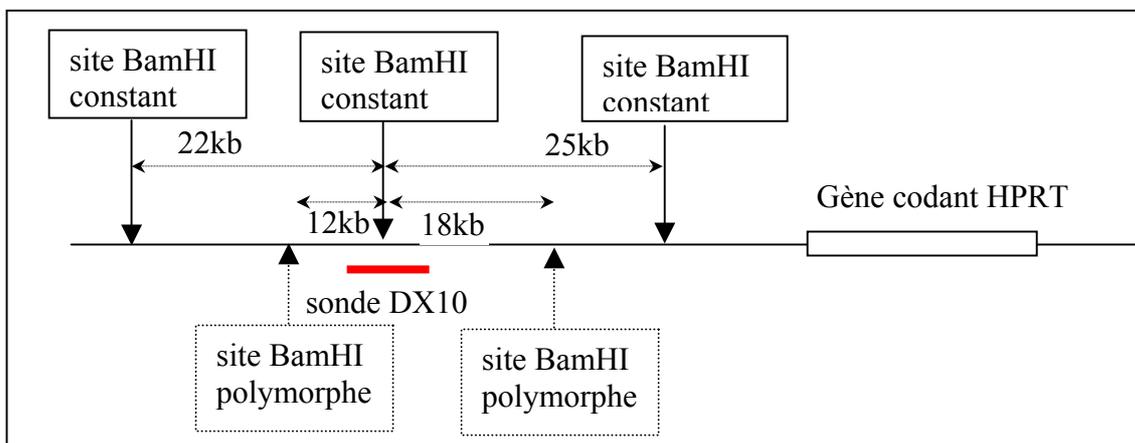
L'individu III-1 est trop jeune pour que son phénotype soit déjà connu. Dans son ADN génomique on ne trouve pas de portion qui hybride avec la sonde. Cela signifie qu'il ne porte pas cette région. C'est donc un hémizyote (car il ne porte qu'un chromosome X) pour une délétion du gène HPRT ou du moins d'une partie de ce gène. Son phénotype sera [LN]. Sa mère II-5 et sa grand-mère qui lui ont transmis la déficience sont des hétérozygotes saines mais porteuses.

III-1 $\frac{a_1^-}{-}$

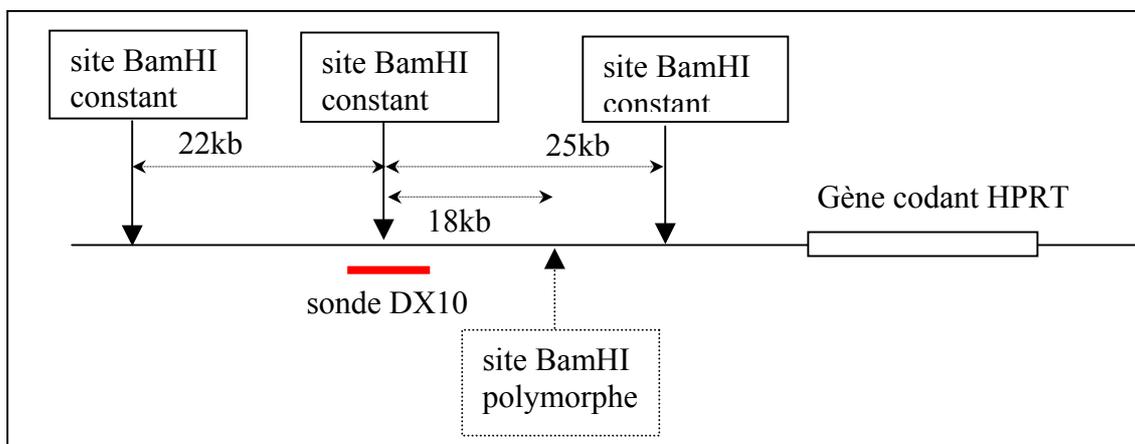
II-5 et I-1 $\frac{a_1^-}{a^+}$

Second cas

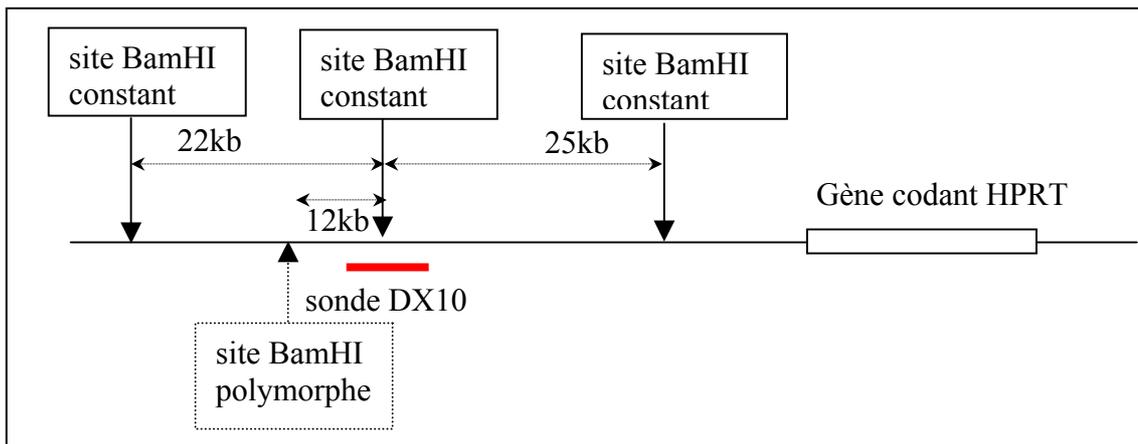
Il y a 4 formes possibles pour le chromosome X (deux sites présentant chacun 2 états possibles : le site existe ou il n'existe pas)



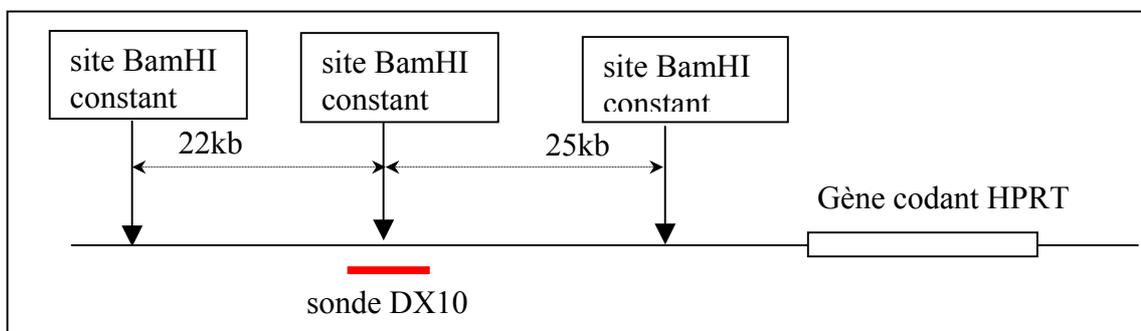
Forme I : Les deux sites polymorphes existent, la sonde révélera deux bandes de 12 et 18 kbp.



Forme II : Un des deux sites n'existe pas, la sonde révélera deux bandes de 22 et 18 kbp.

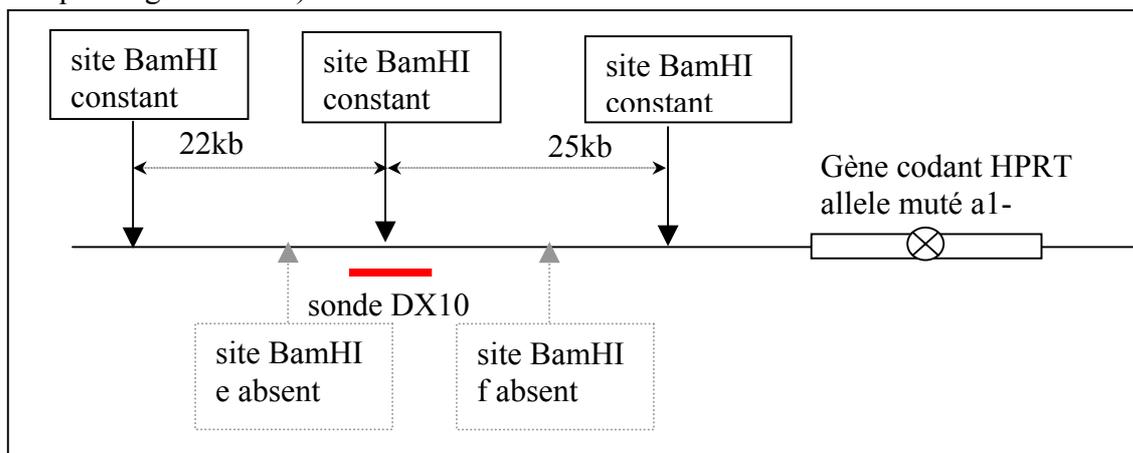


Forme III : Si c'est l'autre site qui n'existe plus, la sonde révélera deux bandes de 12 et 25kbp.



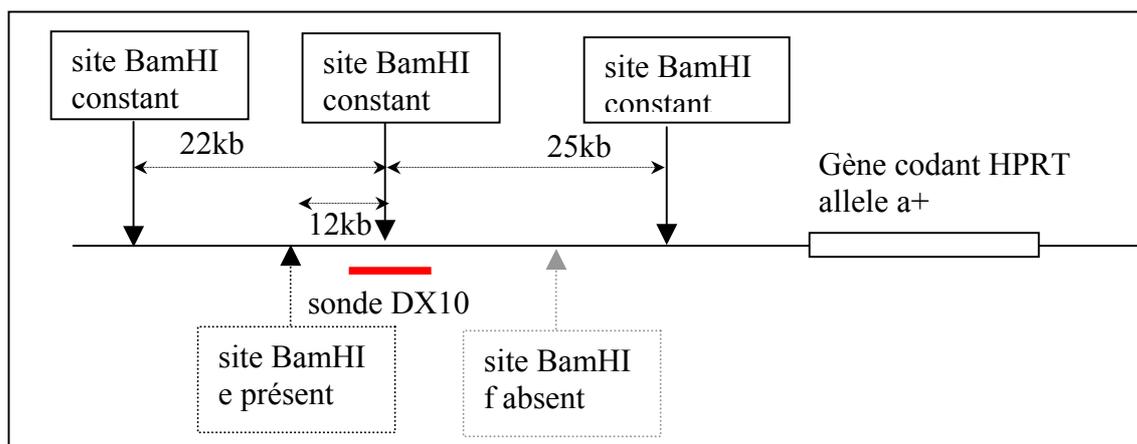
Forme IV : Enfin si aucun des sites polymorphes n'existe, la sonde révélera deux bandes de 22 et 25kbp.

II-1 est un mâle qui porte le chromosome X hérité de sa mère I-1 et pour lequel la sonde DX10 révèle 2 bandes 22 et 25 kbp. Son chromosome X est, pour les sites BamHI de la forme IV. On peut le représenter comme ci-dessous (en plus de la forme IV, on connaît la forme allélique du gène HPRT).



Son génotype s'écrit $\frac{e^- f^- a_1^-}{\neg}$

II-2 est un mâle [sain] qui porte le chromosome X ci dessous qu'il a hérité de sa mère I-1. C'est pour les sites e et f une forme 3 associée avec l'allèle sauvage du gène A.



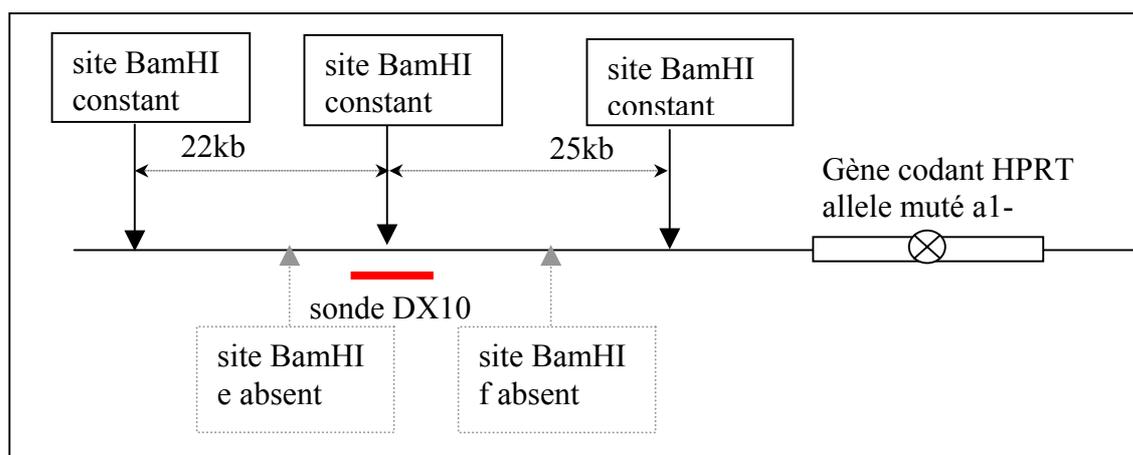
Son génotype s'écrit $\frac{e^+ f^- a^+}{-}$.

La mère I-1 possède donc les deux chromosomes et son génotype s'écrit : $\frac{e^- f^- a_1^-}{e^+ f^- a^+}$. Si on avait testé son ADN on aurait mis en évidence les bandes 12, 22 et 25kbp.

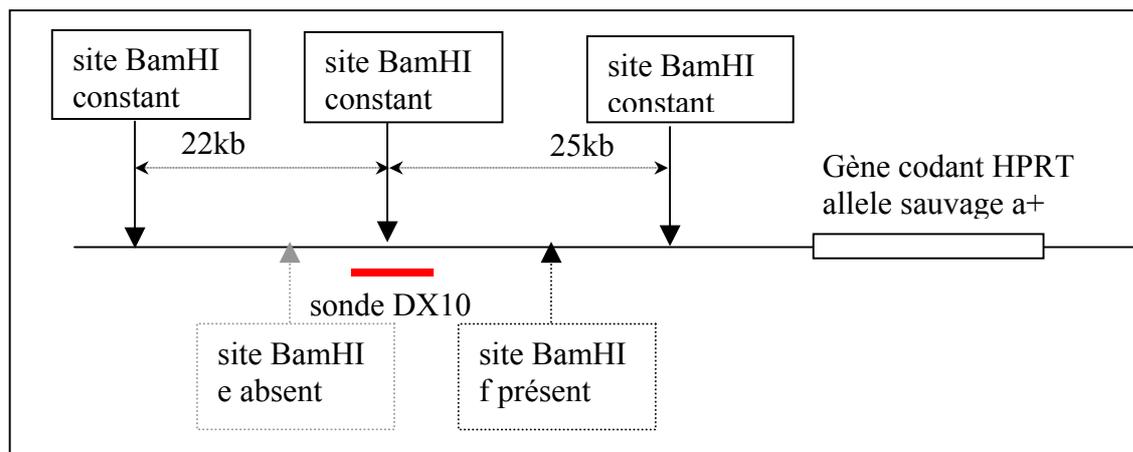
La fille II-3 qui présente l'haplotype 25, 22, 18 n'a pu recevoir de sa mère que le chromosome qu'a reçu son frère II-1. L'autre chromosome X lui vient de son père et porte un allèle sauvage pour le gène HPRT puisqu'il n'est pas malade. Elle a pour génotype :

$$\frac{e^- f^- a_1^- \cdot \text{Chr. maternel}}{e^- f^+ a^+ \cdot \text{Chr. paternel}}$$

Provenant de sa mère, elle possède le chromosome :



Et provenant de son père, elle possède le chromosome :



A son fils III-1 qui présente l'haplotype 18; 22 elle a légué l'X qu'elle tenait de son père et qui porte l'allèle a^+ . Donc s'il n'y a pas eu de crossing over son fils est de génotype $\frac{e^- f^+ a^+}{-}$, il est donc [sain].

Dans le premier cas on met en évidence la mutation elle-même.. Dans le second cas on repère la région du gène par un site voisin mais pas par la mutation elle-même. Il peut donc toujours y avoir des échanges (CO) entre les deux sites considérés (site facultatif et site de la mutation responsable de la maladie). Dans ce cas rare la prévision est faussée.

Diagnostic prénatal de certaines β thalassémies

1°) Dans le pedigree présent la thalassémie est héréditaire, c'est un phénotype récessif devant le phénotype sain puisque plusieurs enfants atteints sont issus de parents sains ce qui exclue l'éventualité d'une mutation (phénomène trop rare pour être rencontré plus d'une fois dans une fratrie). Le gène responsable est autosomique puisque l'on trouve des filles atteintes issues de deux parents sains. Si le gène était porté par le chromosome X seules les femmes pourraient être porteuses saines et ne légueraient qu'à leurs fils un allèle muté non masqué par un allèle sauvage venant du père sain hémizyote.

2°) IV-8 ayant des frères et soeurs atteints est issu de parent hétérozygotes il a donc 0,5 de probabilité d'être lui-même hétérozygote parmi les 3/4 de la descendance saine. ce qui fait une probabilité de 0,66 d'être à la fois sain et hétérozygote.

Si l'un des conjoints est sain homozygote (β^+/β^+), il n'y a aucun risque d'avoir un enfant thalassémique

Si les deux conjoints sont hétérozygotes ils produisent chacun moitié de gamètes (β^+) et moitié de gamètes (β^-). La probabilité qu'un gamète (β^-) en rencontre un autre est donc $0,5 \times 0,5 = 0,25$.

Le risque d'avoir un enfant atteint est donc de $0,25 \times 0,66 = 0,1650$

On peut présenter ces différentes probabilités sous forme de tableau, comme ci-dessous.

IV-8	Génotype	homozygote sain β^+/β^+ Pb 1/3	sain porteur β^-/β^+ Pb 2/3	
	Gamètes	β^+ Pb 1	β^+ Pb 1/2	β^- Pb 1/2
Gamètes de IV-9	β^+ Pb 1/2	β^+/β^+ [sain] Pb = $1 \times 1/2 \times 1/3 = 1/6$	β^+/β^+ [sain] Pb = $2/3 \times 1/2 \times 1/2 = 1/6$	β^+/β^+ [sain] Pb = $2/3 \times 1/2 \times 1/2 = 1/6$
	β^- Pb 1/2	β^-/β^+ [sain] Pb = $1 \times 1/2 \times 1/3 = 1/6$	β^-/β^+ [sain] Pb = $2/3 \times 1/2 \times 1/2 = 1/6$	β^-/β^- [thalassémique] Pb = $2/3 \times 1/2 \times 1/2 = 1/6$

Ce qui fait une probabilité globale de 1/6 (soit 0,166) d'avoir un enfant thalassémique.

3°) Le génotype de l'enfant IV-8 ne peut être que

$$\frac{0}{0} \frac{M}{M} \frac{Xg^-}{Xg^-}$$

$$\frac{0}{0} \frac{M}{M} \frac{-}{-}$$

Celui de sa mère doit donc être

$$\frac{A}{0} \frac{M}{N} \frac{Xg^-}{Xg^-}$$

$$\frac{0}{0} \frac{N}{N} \frac{Xg^-}{Xg^-}$$

et celui de son père supposé III-7

$$\frac{0}{0} \frac{N}{N} \frac{Xg^+}{Xg^+}$$

$$\frac{0}{0} \frac{N}{N} \frac{-}{-}$$

Ces deux parents ne peuvent avoir comme enfants que ceux qui sont compatibles avec ces génotypes (à la mutation près, qui est peu probable et que dans un premier temps on négligera).

gamètes ♂	A, M, Xg-	A, N, Xg-	O, M, Xg-	O, N, Xg-
O, N, Xg-	$\frac{A}{0} \frac{M}{N} \frac{Xg-}{Xg-}$ [fille A, MN, Xg-]	$\frac{A}{0} \frac{N}{N} \frac{Xg-}{Xg-}$ [fille A, N, Xg-]	$\frac{0}{0} \frac{M}{N} \frac{Xg-}{Xg-}$ [fille O, M, Xg-]	$\frac{0}{0} \frac{N}{N} \frac{Xg-}{Xg-}$ [fille O, N, Xg-]
O, N, -	$\frac{A}{0} \frac{M}{N} \frac{Xg-}{-}$ [garçon A, MN, Xg-]	$\frac{A}{0} \frac{N}{N} \frac{Xg-}{-}$ [garçon A, N, Xg-]	$\frac{0}{0} \frac{M}{N} \frac{Xg-}{-}$ [garçon O, MN, Xg-]	$\frac{0}{0} \frac{N}{N} \frac{Xg-}{-}$ [garçon O, N, Xg-]

Ce couple ne peut donc pas avoir de garçon de groupe M. Cette constatation n'est pas suffisante à elle seule pour rejeter la paternité de III-7. Il faudrait pour cela analyser d'autres marqueurs polymorphes (types RFLP ou microsatellites) afin que plusieurs excluent la paternité de III-7 avec une probabilité >99% au moins.

On peut donc alors considérer que le père de IV-8 est issu de la population générale puisqu'on n'a aucune information à son sujet et sa probabilité d'être hétérozygote est 0,1. Pour IV-8 la probabilité d'être porteur sain se calcule par le tableau suivant

Père issu de la population générale →	homozygote sain Pb = 0,9	sain mais porteur Pb 0,1	
gamètes Femelle ↓	b+ Pb = 1	b+ Pb = 1/2	b- Pb = 1/2
b+ Pb = 1/2	homozygote sain Pb = 0,9*1/2 = 0,45	homozygote sain Pb = 0,1*1/2*1/2 = 0,025	porteur Pb = 0,1*1/2*1/2 = 0,025
b- Pb = 1/2	porteur Pb = 0,9*1/2 = 0,45	porteur Pb = 0,1*1/2*1/2 = 0,025	thalassémique Pb = 0,1*1/2*1/2 = 0,025

On sait que IV-8 est sain (0,975 des cas). Parmi ces cas la probabilité d'être porteur est de $0,45 + (0,025*2) = 0,50$. Ce qui fait pour IV-8 une probabilité d'être porteur sachant qu'il est sain de

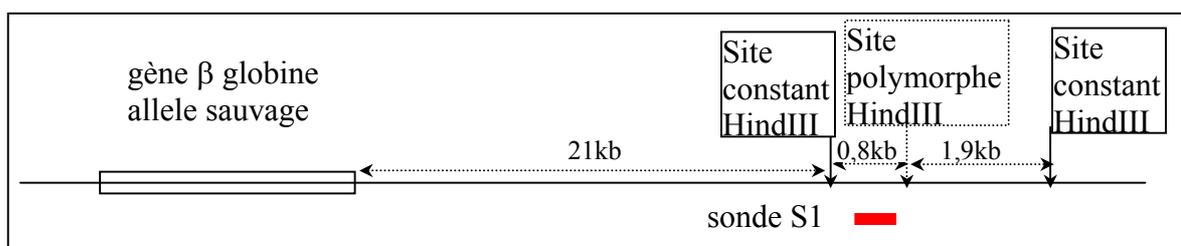
$$Pb = 0,5/0,975 = 0,5128\dots$$

Le tableau de la question précédente devient :

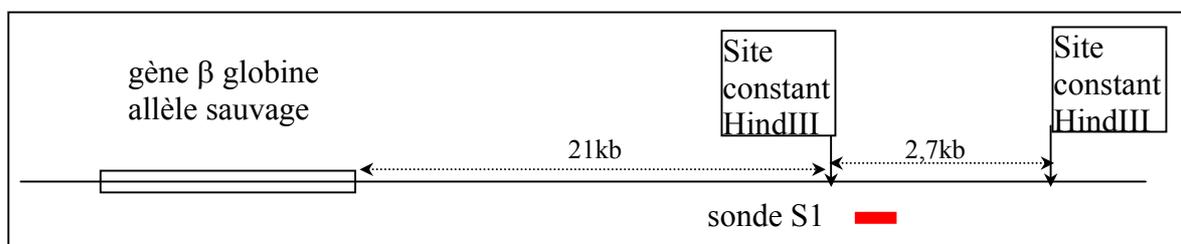
IV-8	Génotype	homozygote sain β^+/β^+ Pb 0,5128	sain porteur β^-/β^+ Pb 0,4872	
	Gamètes	β^+ Pb 1	β^+ Pb 1/2	β^- Pb 1/2
Gamètes de IV-9	β^+ Pb 1/2	β^+/β^+ [sain] Pb = $1 \times 1/2 \times 0,5128$	β^+/β^+ [sain] Pb = $1/2 \times 1/2 \times 0,4872$	β^+/β^+ [sain] Pb = $1/2 \times 1/2 \times 0,4872$
	β^- Pb 1/2	β^-/β^+ [sain] Pb = $1 \times 1/2 \times 0,5128$	β^-/β^+ [sain] Pb = $1/2 \times 1/2 \times 0,4872$	β^-/β^- [thalassémique] Pb = $1/2 \times 1/2 \times 0,4872$

Ce qui fait une probabilité globale de 0,1218 (on arrondit à 0,122) d'avoir un descendant thalassémique.

4°) carte de l'individu 1 : il est homozygote pour le chromosome 16 de la forme suivante (forme I).



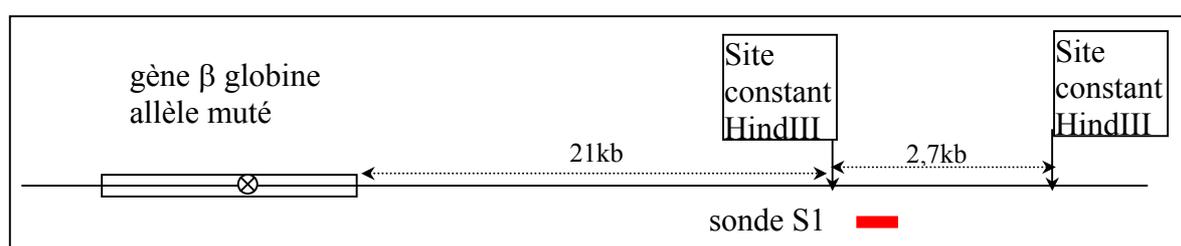
carte de l'individu 2 : il est homozygote pour le chromosome 16 de la forme suivante (forme II).



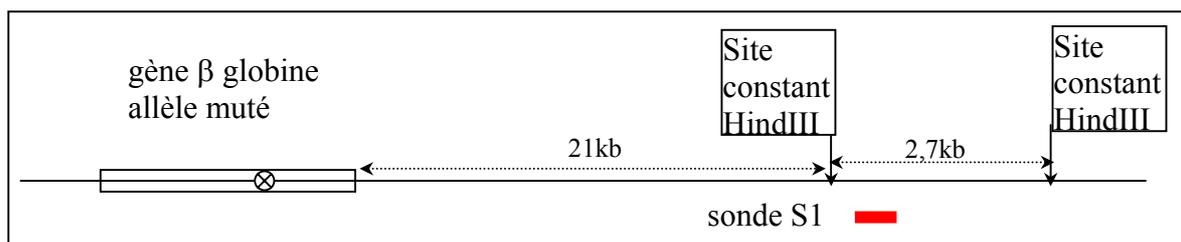
carte de l'individu 3 : il est hétérozygote portant un chromosome 16 de la forme I et un de la forme II.

Pour chacun de ces trois personnes il est possible que dans 10% des cas, l'un, (mais pas l'autre) des chromosomes porte un allèle muté du gène β .

carte de l'individu 4 : il est homozygote pour le chromosome 16 de la forme suivante (forme III).



carte de l'individu 6 : il est homozygote pour le chromosome 16 de la forme suivante (forme IV).



carte de l'individu 5 : il est hétérozygote portant une forme 3 et une forme 4 pour le chromosome 16.

Remarque le site polymorphe est près du gène b mais la mutation et le site sont deux choses différentes on peut avoir ou non le site H* et être ou non sain.

5°) L'individu IV-6 est homozygote pour la forme 4 du chromosome. on peut écrire son génotype en désignant par H le site polymorphe : forme h- l'enzyme ne coupe pas (fragment de 2,7kbp) ; h+ l'enzyme coupe l'ADN (fragment de 0,8kbp)

$$\frac{\beta-, h-}{\beta-, h-}$$

II-4 a le même génotype.

Les parents de la génération III, III-5, 7 et 13 sont hétérozygotes à la fois pour le gène β et le site h. Ils sont apparentés donc ont reçu l'allèle b muté d'un ancêtre commun chez qui (en l'absence de CO puisque B et h sont très proches) il était associé avec la forme h- (ce que l'on retrouve chez les thalassémiques de la famille II-4 et IV-6). Leur génotype s'écrit :

$$\frac{\beta+, h+}{\beta-, h-}$$

Les sujets IV-7 et IV-13 ont reçu de leurs parents un chromosome portant h+ et un portant h-, donc probablement associé à $\beta-$ (en l'absence de CO).

Ils ont comme génotype

$$\frac{\beta+, h+}{\beta-, h-}$$

En l'absence de CO chacun produira seulement 2 types de gamètes : $\beta-, h-$ et $\beta+, h+$.

On peut examiner les différents descendants possibles.

gamètes ♂	$\beta+, h+$	$\beta-, h-$
♀		
$\beta+, h+$	$\frac{\beta+, h+}{\beta+, h+}$ [sain, 0,8kbp]	$\frac{\beta+, h+}{\beta-, h-}$ [sain, 0,8kbp et 2,7kbp]
$\beta-, h-$	$\frac{\beta+, h+}{\beta-, h-}$ [sain, 0,8kbp et 2,7kbp]	$\frac{\beta-, h-}{\beta-, h-}$ [thalassémique, 2,7kbp]

On peut remarquer que seul l'individu thalassémique ne présente que la bande 2,7kbp qui est identifiable sur toute cellule à n'importe quel moment de la vie (intra-utérine ou extra-utérine).

Ce tableau de gamètes ne tient pas compte de crossing-over entre la mutation et le site polymorphe. Si, comme c'est le cas ici, ces sites sont proches ce cas est rare. Alors il y a correspondance entre l'haplotype et le génotype et donc le phénotype du descendant. Néanmoins le risque de la méthode est d'être en présence d'un cas rare de crossing-over. Dans ce cas la prédiction devient fausse.

Pour être utilisée cette méthode doit utiliser un site polymorphe le plus proche possible de la mutation.

Si les conjoints sont homozygotes pour le site polymorphe ou si leurs phases sont inverse ($\frac{\beta+, h+}{\beta-, h-}$ pour l'un et $\frac{\beta+, h+}{\beta-, h-}$ pour l'autre), il n'y a plus de prédiction possible.

HNPCC

1°) Des maladies sont observées à chaque génération, ce qui suggère une dominance du phénotype atteint sur normal. Si le phénotype atteint était récessif, il faudrait que les 3 conjoints issus de la population générale soient porteurs sains ce qui est relativement peu probable puisque les malades HNPCC sont rares, par contre si le phénotype atteint est dominant l'individu 2 suffit à rendre compte de tous les malades aux générations suivantes. Donc

[HNPCC] < [sain]

Dans ce cas les seules descendance qui permettent de trancher entre la localisation autosomique ou sur l'X sont celles de mâles atteints. Si le gène est sur l'X tous les fils de tels pères seront sains et les filles seront toutes atteintes, par contre s'ils ont filles et garçons sains et atteints on peut conclure à une localisation autosomique. Dans la famille 11 seules les femmes atteintes ont eu une descendance : on ne peut donc pas conclure.

2°) 2a) un microsatellite est la répétition un nombre variable de fois d'un court motif nucléique (de 1 à 5 ou 6 nucléotides).

2b) Alors que les RFLP n'ont que deux formes possibles: le site de coupure existe ou pas, un microsatellite peut présenter de nombreuses formes distinctes par changement du nombre de répétitions. Cela rend plus probable, pour un marqueur microsatellite donné, qu'un individu soit hétérozygote, donc porteur d'information.

2c) Un microsatellite est défini par son motif de base et par deux séquences uniques qui l'encadrent et permettent sa localisation précise dans le génome.

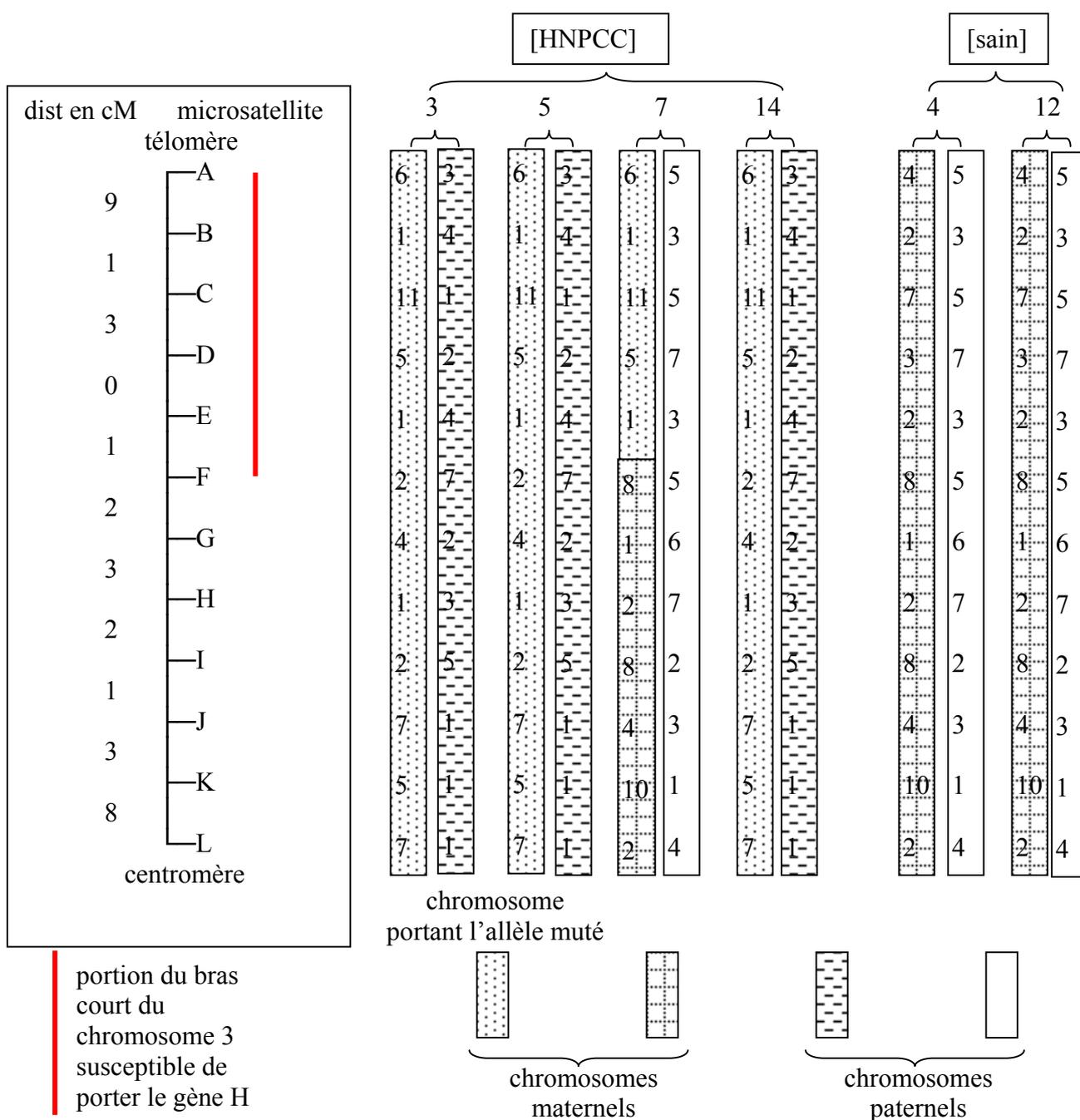
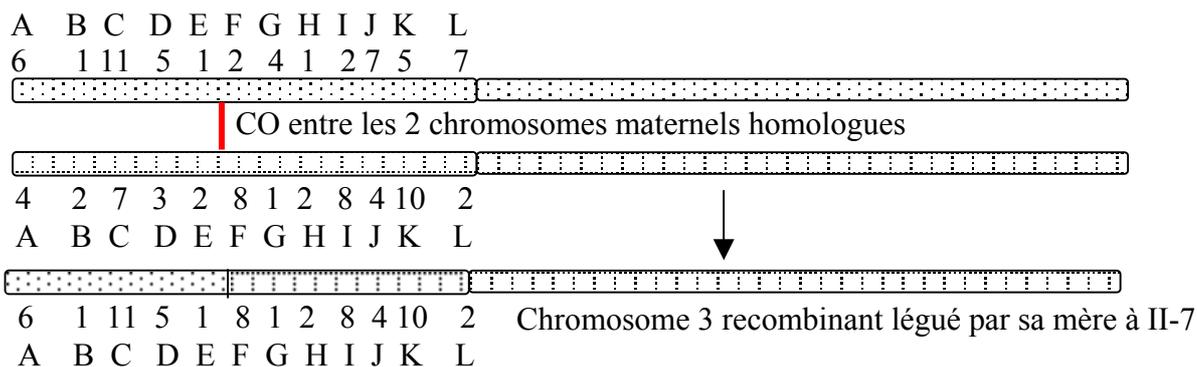
Pour déterminer les formes d'un microsatellite portées par un individu diploïde, on extrait son ADN génomique total de cellules (globules blancs, cellules de la muqueuse buccale, etc.) et on l'utilise comme matrice pour amplifier les régions encadrées par les amorces complémentaires des deux séquences uniques. Pour cela on fait une réaction de PCR. Les produits de cette PCR sont analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide afin de déterminer leurs tailles.

2d) Le chromosome portant les formes 6, 1, 11, 5, 1, 2, 2, 4, 1, 2, 7, 5, 7 est commun à trois enfants malades et absent chez les enfants bien portants. Il doit donc porter l'allèle muté cause de la maladie et il a été hérité de la mère I-2.

2e) Un centimorgan est une unité de distance génétique correspondant à une fréquence de 1% de recombinaison (chez l'homme 1cM correspond en moyenne à 10⁶bp).

2f) Le quatrième enfant malade porte une partie de ce chromosome qui a recombinaison avec son homologue (au moment de la méiose maternelle, ce qui permet d'identifier le second chromosome maternel : 4, 2, 7, 3, 2, 8, 1, 2, 8, 4, 10, 2 ; portant lui l'allèle sauvage pour ce gène que l'on appellera H).

Puisque II-7 est malade c'est qu'il a reçu l'allèle muté qui doit donc se trouver dans la portion comprise entre le télomère et le microsatellite F (voir la figure ci-dessus).



Origine des chromosomes 3 reçus par les individus de la génération II.

3°) les familles 2, 6, 10, 11 et 59 présentent toutes un même chromosome 3 qui porte l'allèle responsable de la maladie. Géographiquement, ces 5 familles sont regroupées dans la proximité de Jyväskylä, région nord. On peut donc supposer que la mutation est apparue une seule fois dans cette région et que le bras court du chromosome 3 n'a pas encore été beaucoup remanié par des échanges (CO) puisqu'on le reconnaît encore.

Ceci implique que ces familles doivent avoir une même origine même si le souvenir en est perdu. Dans ces régions nord finlandaises, la densité de population est suffisamment faible pour favoriser des croisements consanguins. que la mutation soit apparue assez récemment puisque le bras court du chromosome 3 sur lequel est apparue la mutation est encore reconnaissable

L'examen des recombinaisons observées permet d'exclure comme position possible pour le gène H la zone télomérique contenant les microsatellites A à C. Le gène H doit donc se trouver entre les microsatellites C et F (ceux-ci étant exclus).^{4°} Chez l'homme on a vu que le phénotype HNPCC est dominant sur le phénotype sain, alors que chez la souris l'hétérozygote est sain. Soit ce résultat est discutable, soit le gène étudié n'est pas un modèle convenable pour la maladie humaine.

4a) La souche qui porte le gène MSH2 interrompu par la cassette KanR doit être devenue [Kan^R]. De plus le gène msh2 étant inactivé, la capacité de réparation de l'ADN doit être devenue moins performante (et pas simplement abolie car de nombreux autres gènes interviennent dans ce mécanisme dont certains peuvent plus ou moins se substituer à msh2), ce qui se traduira par une baisse de capacité à réparer des lésions de l'ADN à la suite d'irradiation (par les UV par exemple). Le phénotype de ce mutant (msh2-) pourrait être [UV^S]. En résumé le phénotype attendu pour la souche portant le gène MSH2 interrompu par la cassette pourrait être [Kan^R, UV^S].

Si le gène LYS2 avec l'insertion de 6A confère le phénotype [Lys+] alors que si le nombre de A est 4 ou 5 le phénotype est [Lys-], cela signifie que cette portion du gène peut être modifiée sans altérer la fonctionnalité de la protéine ; à condition que la portion 3' ne soit pas lue avec un décalage. Lorsque 6 A sont dans l'insert cela fait une addition totale de 60+6=66nt qui respecte le cadre de lecture de ce qui suit. Par contre 64 et 65 nt ajoutés créent un décalage. Pour cette raison on peut supposer que si le nombre de A ajoutés est multiple de 3 il respecte le cadre de lecture et la protéine est toujours fonctionnelle. Par contre si les A ajoutés sont non multiples de 3 (4, 5, 7, 8, 10, 11, 13 et 14) la fin de la protéine est lue avec un décalage et sa séquence protéique est totalement bouleversée entraînant une perte de fonction et un phénotype [Lys-].

4b) Parmi les cellules [Lys-], il y a à chaque réplication d'ADN quelques erreurs (en particulier dans des zones de répétition telles que A₁₄). L'activité de correction des mauvais appariements dûs à ces erreurs doit les faire disparaître en majorité ; il ne subsiste que de rares erreurs non corrigées qui génèrent des mutations (par exemple A₁₄ => A₁₂). Si l'on est passé de 14 répétitions à un nombre de A multiple de 3 on observera la réversion de [Lys-] => [Lys+]. Comparer des souches MSH2+ (souche A) et msh2- (souche B) permet de vérifier si l'état de l'allèle msh2 influe vraiment sur l'aptitude à réparer. Les résultats montrent en effet que la souche A qui possède l'allèle sauvage présente 10⁴ fois moins de révertants que la souche B (allèle msh2 interrompu). Elle a donc mieux réparé son ADN que la souche mutante B.

4c) Transformations de la souche A

A sans plasmide représente le niveau de base de la mutabilité (la référence). Lorsque cette souche reçoit un plasmide P1 natif (sans gène *msh2*) ou un plasmide P+ (qui porte un allèle MSH2 sauvage), ce taux relatif n'est pas modifié. Le plasmide seul ou portant l'allèle sauvage n'altère pas la mutabilité de la souche A (ces expériences constituent les témoins).

Par contre chaque fois que le plasmide porte un allèle muté du gène *msh2*, on constate que la souche présente une mutabilité augmentée (dans des proportions très variées en fonction de l'allèle muté porté par le plasmide). Le génotype de ces transformants (diploïdes partiels)

s'écrit $\frac{MSH2+}{msh2- (G693S)}$ (ou un des 4 autres allèles) et le phénotype est [hyper mutable],

alors que la souche a était [peu mutable]. Ce résultat montre que la dominance du phénotype HNPCC est retrouvée chez la levure dans la dominance de l'hyper mutabilité sur le phénotype sauvage. On peut classer les diverses formes alléliques en fonction de leur phénotype plus ou moins mutable : G688A, K694A, G693A, G693S, S695A.

Avec la souche B, l'addition d'un plasmide natif ne modifie pas le phénotype du mutant. Par contre l'addition d'un plasmide P+ qui porte un allèle sauvage ramène le taux de mutabilité du mutant à celui de la souche sauvage. Dans ce cas (comme chez la souris) le phénotype [hyper mutable] est récessif devant le phénotype [peu mutable].

Si l'on met en présence deux formes alléliques mutées différentes (une forme totalement inactive : le gène *msh2* interrompu par la cassette KanR et une portant une mutation faux sens), on constate que le phénotype [hypermutable] du mutant faux sens est dominant sur le phénotype [mutable] du mutant qui a perdu toute la fonction. Ici encore on peut tenter un classement par ordre croissant des mutants faux sens : G688A, G693A, S695A, K694A et G693S.

souche	plasmide	génotype	phénotype	taux relatif de mutabilité	Dominance ou récessivité du phénotype conféré par l'allèle plasmidique*
A	-	MSH2+	peu mutable	1	-
	P1	MSH2	peu mutable	1	-
	P+	MSH2/MSH2+	peu mutable	1	-
	PG688A	MSH2+/msh2 ⁻ 688	hyper mutable	20	Dominant
	PG693A	MSH2+/msh2 ⁻ 693A	hyper mutable	7000	Dominant
	PG693S	MSH2+/msh2 ⁻ 693S	hyper mutable	9300	Dominant
	PK694A	MSH2+/msh2 ⁻ 694	hyper mutable	6100	Dominant
PS695A	MSH2+/msh2 ⁻ 695	hyper mutable	27000	Dominant	
B	-	msh2 ⁻	hyper mutable	8800	-
	P1	msh2 ⁻	hyper mutable	8800	-
	P+	msh2 ⁻ /MSH2+	peu mutable	1	Dominant
	PG688A	msh2 ⁻ /msh2 ⁻ 688	hyper mutable	200	Dominant
	PG693A	msh2 ⁻ /msh2 ⁻ 693A	hyper mutable	18000	Dominant
	PG693S	msh2 ⁻ /msh2 ⁻ 693S	hyper mutable	37000	Dominant
	PK694A	msh2 ⁻ /msh2 ⁻ 694	hyper mutable	22000	Dominant
	PS695A	msh2 ⁻ /msh2 ⁻ 695	hyper mutable	20000	

* par rapport au phénotype conféré par l'allèle chromosomique.

Chez l'homme on n'a pas observé de phénotype correspondant au type de mutation présent dans la souche B (serait-ce létal ?, ou par hasard n'en n'a-t-on pas encore rencontré ?).

On peut proposer un modèle suivant lequel l'allèle sauvage du gène MSH2 code une protéine P qui joue un rôle actif dans la réparation de l'ADN. Pour jouer ce rôle elle interagit au sein d'un complexe protéique C.

Dans le cas de la mutation du type de celle portée par la souche B il n'y a plus de protéine P fabriquée ce qui inactive le complexe C. Chez un diploïde *msh2*-/*MSH2*+, la fabrication de la protéine active P est restaurée et le complexe C retrouve sa fonctionnalité ([hyper mutabilité]<[peu mutable]).

Dans le cas des mutants de type faux sens une protéine P' voisine de la protéine P est synthétisée, qui est encore capable d'interagir avec les autres éléments du complexe et qui l'inactive. Chez un diploïde *MSH2*+/*msh2*-693 par exemple, les deux protéines P et P' sont synthétisées et la présence de la forme P' suffit à inactiver le complexe C avec lequel elle interagit ([hyper mutabilité]>[peu mutable]). Chez un diploïde *msh2*-/*msh2*-693 une seule forme de la protéine, P' est synthétisée qui inactive le complexe C. Ces diploïdes doivent présenter un phénotype équivalent à un haploïde portant uniquement la mutation faux sens.

