

# EXERCICES DE GENETIQUE ET DE GENETIQUE MOLECULAIRE

## PARTIE II

Ces exercices d'applications de cours ont pour but de présenter les principales notions de la génétique fondamentale. Ils sont proposés avec un corrigé. Quelques mots clés indiquent les points abordés par chaque sujet.

Dystrophie rétinienne Pedigree, diagnostic prénatal, RFLP, clonage de gène par hybridation	2
Glycosylation Pedigree chez l'homme et modèle levure, métabolisme,	10
Maladie de Wilson Modèle levure pour cette maladie, activités d'allèles humains chez la levure vecteur de recombinaison, analyse moléculaire	19
Métabolisme de la levure :ILV Test de complémentation fonctionnelle, analyse de ségrégations	31
Biosynthèse du tryptophane chez la levure Voie métabolique, complémentation, réversion, clonage	39
Biosynthèse de l'adénine chez les eucaryotes Test de complémentation, recombinaison, clonage fonctionnel	44
Biosynthèse de l'arginine De la levure à l'homme, Test de complémentation, ségrégation, recombinaison, clonage fonctionnel	51

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

## Dystrophie rétinienne

Dans tout l'exercice, on considérera que les maladies sont monogéniques (il suffit d'une mutation dans un seul gène pour déterminer le phénotype atteint).

Les effets du déficit alimentaire en vitamine A sur l'œil humain sont bien connus. Ils se traduisent par une kératinisation et une perte de transparence cornéenne, une sécheresse oculaire et une incapacité à voir dans la pénombre. Un tableau clinique semblable dû cette fois à la dégénérescence des photorécepteurs (cônes et bâtonnets) se produit en cas d'anomalies génétiques du métabolisme oculaire de la vitamine A. Ce métabolisme n'est effectué que dans l'épithélium pigmentaire de la rétine.

1°) Une dystrophie rétinienne sévère dès les premières années, évoluant rapidement vers une cécité entre 20 et 30 ans est en rapport avec une atteinte des cônes et des bâtonnets. Cette affection rare ( $<10^{-4}$ ) a été diagnostiquée dans la famille A (figure 1).

Indiquez quel est le mode de transmission de cette affection en donnant les arguments qui soutiennent vos conclusions.

2°) Grâce à des marqueurs RFLP, on a pu déterminer la localisation du gène en jeu dans cette famille : sur le bras court du chromosome 1, proche de la sonde anonyme D1S1665. Ce gène a ensuite été cloné et séquencé. Il s'étend sur 20 kbp et est constitué de 14 exons qui codent pour un ARNm de 2,7 kb.

Dans la famille B (figure 2) apparaissent 5 enfants atteints de dystrophie rétinienne, à la génération IV. Pour tous les enfants de la fratrie, ainsi que pour leurs parents, on a étudié l'haplotype pour deux RFLP dont les caractéristiques sont données dans le tableau ci-dessous.

Sonde anonyme	enzyme de restriction	localisation chromosomique	nombre d'haplotypes connus
D1S1665	MspI	bras court chromosome 1	3
D15S116	SacI	bras long chromosome 15	3

Les deux familles présentent-elles le même défaut génétique? Justifiez votre réponse.

3°) Quel serait le résultat d'une union entre A-V-1 et B-IV-4 ? Justifiez votre réponse.

4°) Une équipe de chercheurs a montré qu'il était possible de transférer des gènes par l'intermédiaire d'adénovirus recombinant (capacité maximum de 8 kbp pour un ADN étranger) en les injectant dans l'espace sous rétinien de rats nouveau-nés. Cette technologie suscite des ouvertures nouvelles pour le traitement de certaines rétinopathies (comme celles de la famille A, par exemple). Expliquez pourquoi et dites quelle stratégie vous adopteriez pour construire l'adénovirus recombinant utilisable à des fins thérapeutiques dans le cas de la famille A, en justifiant vos choix.

## Bibliographie

Maw, M.A. et al (1997) Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature Genetics* **17** pp198-200

Gu, S. et al (1997) Mutations in *RPE65* cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nature Genetics* **17** pp194-197

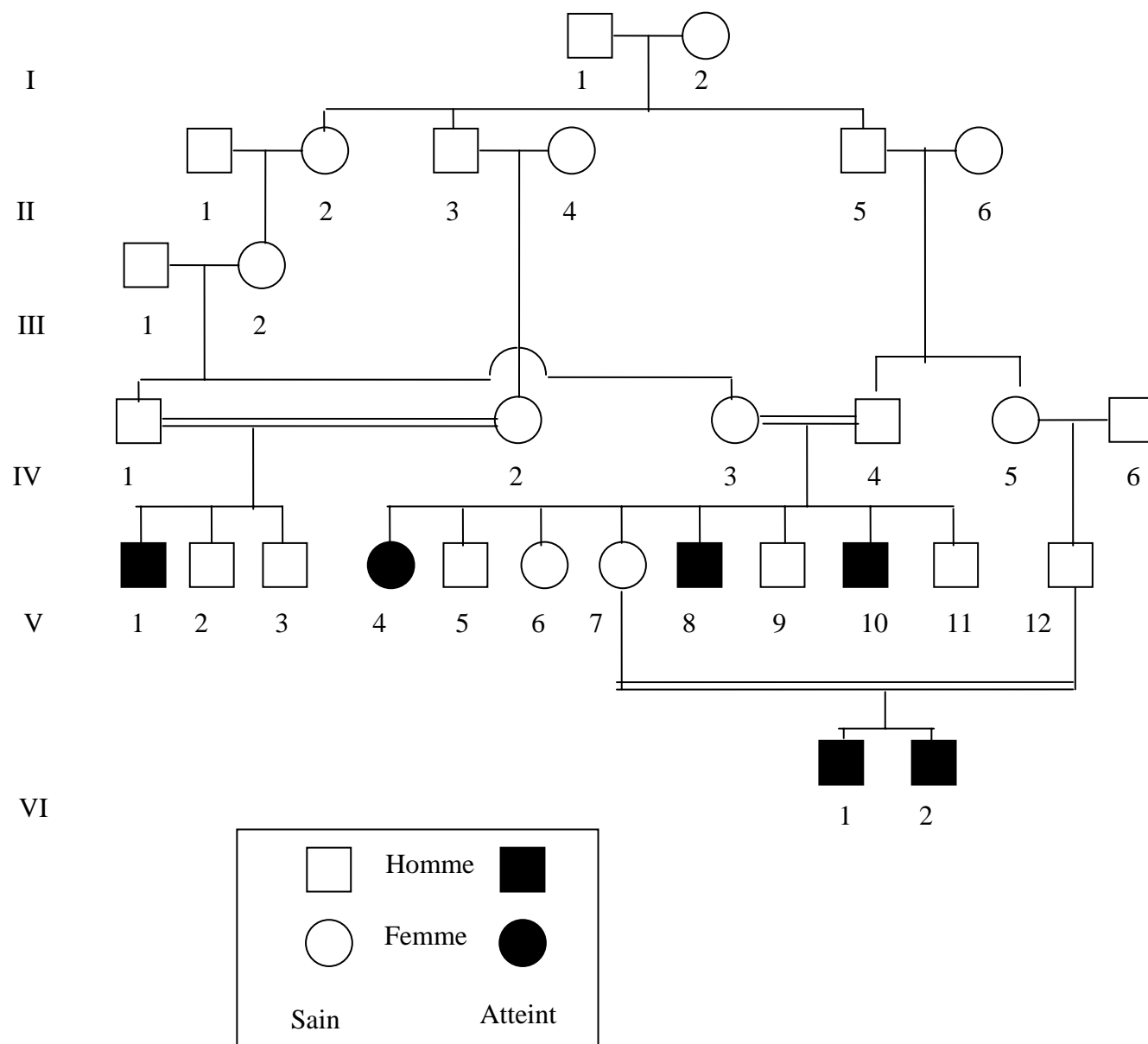
Ribeau, F. et al (1997) In vivo adenovirus-mediated gene transfer to newborn rat retinal pigment epithelial cells. *C.R.Acad.Sci.Paris III* **320** pp523-532

Nicoletti, A. et al (1995) Molecular characterization of the human gene encoding an abundant 61 kDa protein specific to the retinal pigment epithelium. *Hum. Mol. Genet.* **4** pp 641-649

Hamel, C.P. et F. Marlhens (1998) Des mutations des gènes contrôlant le métabolisme des rétinoïdes 11-*cis* responsables de dystrophies rétinienne sévères. *Med/Sci* **14** pp754-757

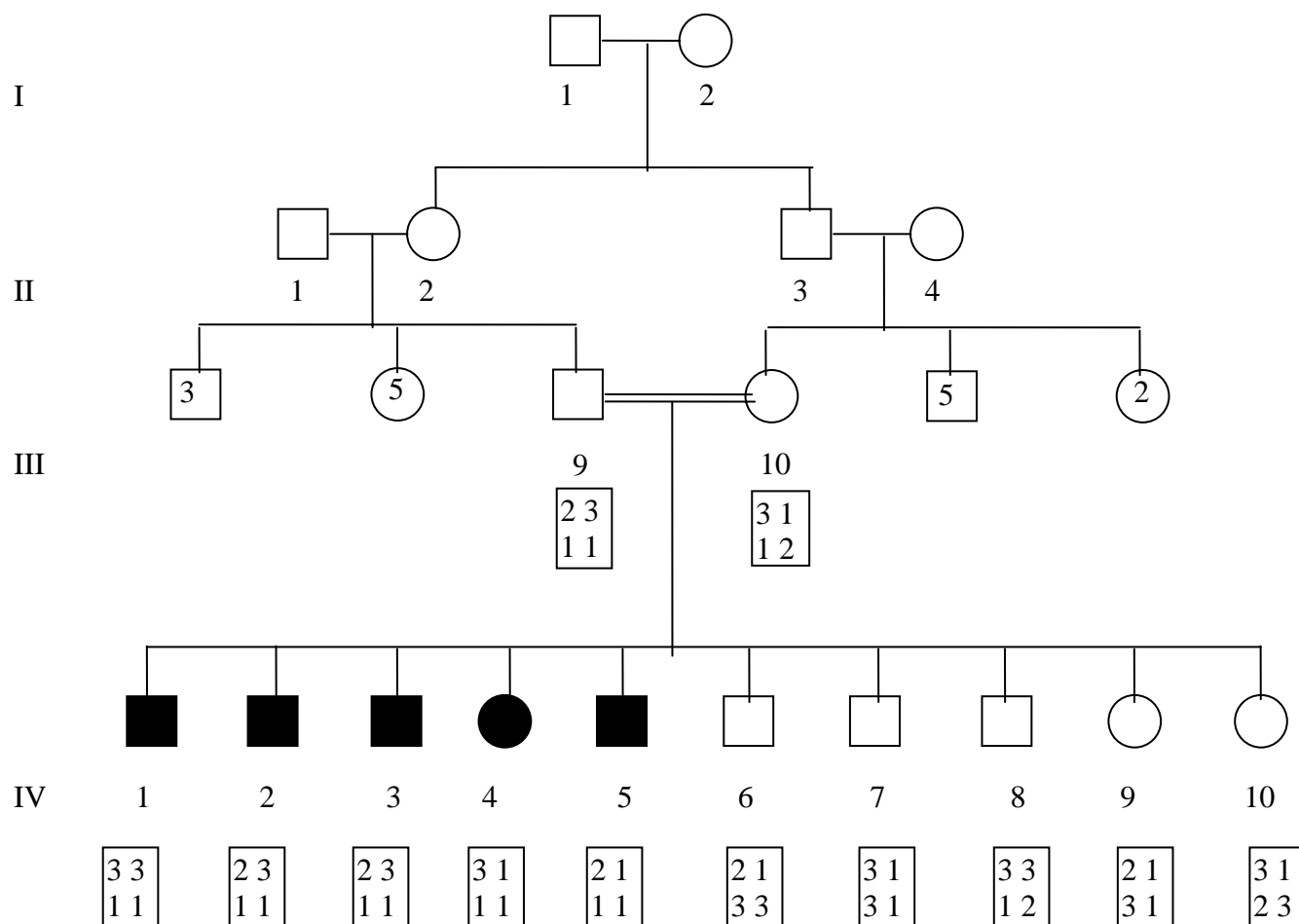
Figure 1

Pédigree de la famille A



**Figure 2**

Pédigree de la famille B avec, dans certains rectangles, les haplotypes obtenus pour D1S1665 (ligne supérieure) et D15S116 (ligne inférieure).



3 1 : haplotype pour D1S1665
2 1 : haplotype pour D15S116

## Corrigé: Dystrophie rétinienne

1°) Dans cette famille, les enfants atteints de rétinite sont nés d'unions consanguines. Cela laisse soupçonner une récessivité de la rétinite devant l'état sain. En effet, la consanguinité favorise l'homozygotie chez les descendants de telles unions pour une forme allélique d'un gène héritée d'un ancêtre commun. Si cet allèle confère un phénotype altéré, ces homozygotes présentent ce phénotype. De plus on voit plusieurs enfants atteints nés d'un couple de parents non atteints. La rareté de l'événement mutationnel rend très improbable une telle fratrie. Il faut donc en rendre compte en admettant que chacun des deux parents est un porteur sain, ce qui confirme la récessivité du phénotype Rétinite devant le phénotype sain.

Le couple IV-3 x IV-4 présente trois enfants atteints dont une fille et deux garçons. Deux hypothèses sont envisageables pour le gène impliqué : soit autosomique, soit sur l'X. Examinons les résultats prévisibles dans chaque hypothèse.

### Localisation autosomique du gène

Mère  $2n \frac{a+}{a1}$  [saine] x Père  $2n \frac{a+}{a1}$  [sain]

↓  
2 types de gamètes      2 types de gamètes

	a+	a1
a+	$\frac{a+}{a+}$ fetg[sain]	$\frac{a+}{a1}$ fetg[sain]
a1	$\frac{a+}{a1}$ fetg[sain]	$\frac{a1}{a1}$ fetg[R]

Dans ce cas, filles (f) et garçons (g) peuvent être atteints

### Localisation du gène sur l'X

Mère  $2n \frac{a+}{a1}$  [saine] x Père  $2n \frac{a+}{\neg}$  [sain]

↓  
2 types de gamètes      2 types de gamètes

	a+	$\neg$
a+	$\frac{a+}{a+}$ f[saine]	$\frac{a+}{\neg}$ g[sain]
a1	$\frac{a+}{a1}$ f[saine]	$\frac{a1}{\neg}$ g[R]

Dans cette hypothèse et avec ce type de couple, il ne peut y avoir que des garçons (g) atteints

Puisque ce couple a, entre autre, une fille atteinte, le gène impliqué ne peut être qu'autosomique.

Conclusion : déterminisme récessif autosomique de la maladie.

2°) Le déterminisme génétique dans la famille B est du même type récessif autosomique que dans la famille A. Les arguments sont les mêmes.

Puisque un marqueur polymorphe du chromosome 1 et un du chromosome 15 sont utilisés, on va pouvoir déterminer l'état parental ou recombiné des gamètes qui ont donné les enfants atteints qui ont pour génotype pour le gène A  $\frac{a1}{a1}$ . Les enfants sains étant  $\frac{a1}{a+}$  ou  $\frac{a+}{a+}$  ne permettront pas de préciser.

Les parents ont pour génotype en ne regardant que le gène A et le chromosome 1, pour le père [sain, 2,3]  $\frac{a+}{a1} \dots \frac{2}{3}$  ou  $\frac{a+}{a1} \dots \frac{3}{2}$  et pour la mère [saine, 3,1]  $\frac{a+}{a1} \dots \frac{1}{3}$  ou  $\frac{a+}{a1} \dots \frac{3}{1}$  car on ne connaît pas la phase des allèles des deux formes (ce qui a été hérité d'un même parent)

enfant	gamète du père	si phase 1 $\frac{a+}{a1} \dots \frac{2}{3}$	si phase 2 $\frac{a+}{a1} \dots \frac{3}{2}$	gamète de la mère	si phase 1 $\frac{a+}{a1} \dots \frac{1}{3}$	si phase 2 $\frac{a+}{a1} \dots \frac{3}{1}$
IV-1[R, 3,3)	a1,3	P	R	a1, 3	P	R
IV-2[R, 2,3)	a1, 2	R	P	a1, 3	P	R
IV-3[R, 2,3)	a1, 2	R	P	a1, 3	P	R
IV-4[R, 3,1)	a1, 3	P	R	a1, 1	R	P
IV-5[R, 2,1)	a1, 2	R	P	a1, 1	R	P

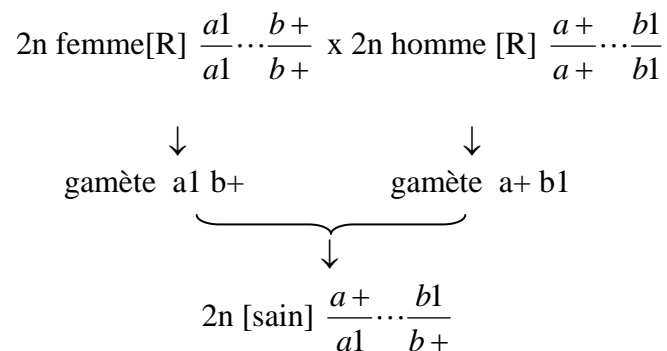
Que ce soit dans la phase 1 ou 2, il y a des gamètes parentaux et recombinés en quantité équivalente. On ne peut pas dire que le site du marqueur polymorphe D1S1665 soit lié au gène A. Ceci permet déjà d'exclure le gène impliqué dans la famille A.

La même analyse avec le marqueur polymorphe du chromosome 15 donne les interprétations suivantes. Il faut remarquer que le père n'apporte aucune information puisqu'il est [sain, 1,1] de génotype  $\frac{a+}{a1} \dots \frac{1}{1}$ . Les gamètes P et R ne peuvent donc pas être distingués.

enfant	gamète de la mère	si phase 1 $\frac{a+}{a1} \dots \frac{1}{2}$	si phase 2 $\frac{a+}{a1} \dots \frac{2}{1}$
IV-1[R, 1,1)	a1, 1	R	P
IV-2[R, 1,1)	a1, 1	R	P
IV-3[R, 1,1)	a1, 1	R	P
IV-4[R, 1,1)	a1, 1	R	P
IV-5[R, 1,1)	a1, 1	R	P

On constate que dans l'hypothèse de la phase 2, tous les gamètes sont de type parental. Alors on ne peut exclure que le gène impliqué dans cette famille (appelons le B puisqu'il est différent du précédent) soit proche du marqueur D15S116. Pour confirmer (ou infirmer) cela il faudrait étudier d'autres marqueurs polymorphes proches si possible avec plus de formes alléliques pour que les deux parents soient informatifs.

3°) Les deux parents A-V-1 et B-IV-4 tous deux atteints sont chacun homozygotes pour l'allèle déficient du gène impliqué dans leur famille respective. Ils ne donnent qu'un seul type de gamètes. Le père (famille A) apporte un gamète  $a1\ b+$  et la mère (famille B) un gamète  $a+\ b1$ . L'organisme diploïde résultant de l'union de ces deux gamètes aura donc une copie intacte de chaque gène. Puisque la dystrophie rétinienne est récessive, le descendant sera donc non atteint bien que porteur. Il s'agit d'un test de complémentation et le croisement s'écrit :



4°) Connaître le gène en cause permet de cloner soit le gène génomique (en plusieurs fragments s'il est trop grand) ou l'ADNc copie de l'ARNm après épissage (en un seul fragment car de 2,7 kbp). La protéine s'exprimant spécifiquement dans des cellules de la rétine, on pourrait tenter de sauver la fonctionnalité de ces cellules en leur fournissant l'information qui leur manque génétiquement. Cette information doit permettre de fabriquer la protéine, donc un vecteur (vecteur d'expression portant un promoteur de type eucaryote) recombiné sur l'ADNc serait un bon candidat pour cette fonction de sauvetage. Des problèmes (de maturation post transcriptionnelle, par exemple) ne sont cependant pas impossibles.

#### Préparation de la banque d'ADNc

- extraction de l'ARN total de cellules de la rétine de cellules sauvages. Ces cellules expriment la protéine recherchée donc leur ARN est enrichi en ARNm pour cette protéine.
- A l'aide d'une colonne d'oligo dT purification des ARNm (tous ceux des cellules rétinienne).
- Copie par la reverse transcriptase des ARNm en ADNc simple brin avec comme amorce des oligodT.
- Hydrolyse à la soude de l'ARN matrice afin de libérer le premier brin. La RT a la propriété d'amorcer la réplication du second brin en faisant une boucle et en recommençant la copie. Par contre comme elle n'a pas d'activité de relecture, les erreurs sont plus fréquentes qu'avec une ADN polymérase classique, c'est pourquoi on préfère ce second type d'enzyme pour la synthèse du 2<sup>ème</sup> brin d'ADN.
- L'ADNc double brin obtenu a d'un côté une boucle qui ne permet pas la recombinaison avec d'autres fragments d'ADN. Il faut digérer cette boucle simple brin avec la nucléase S1 (spécialisée dans la digestion de 'ADN simple brin).
- On a choisi un vecteur d'expression dans les cellules de mammifère (de type adénovirus). On le digère avec une enzyme de restriction qui le coupe en un seul point.



Après avoir rendu les extrémités libres des ADNc et des vecteurs digérés compatibles (bouts francs ou collants), on religie les deux ensemble. La banque ainsi obtenue peut être amplifiée dans une culture de tissu mammalien.

#### **Détection des clones contenant l'ADNc recherché**

- Transfert de l'ADN des clones sur membrane.
- Hybridation avec comme sonde un fragment déjà cloné du gène qui soit une partie exonique de ce gène, fragment marqué radioactivement.
- L'autoradiographie permet de révéler le ou les clones intéressants

NB : l'utilisation des adénovirus dans ces techniques est actuellement remise en question.

# Glycosylation

## A Glycosylation chez l'homme

Le syndrome de glycoprotéine déficiente en carbohydate (CDG) représente un groupe de maladies génétiques caractérisées par une N glycosylation anormale. Les patients atteints de CDG présentent un grand nombre d'anomalies glycoprotéiques qui provoquent dysmorphies, encéphalopathies et perturbations d'autres organes. Un sous-ensemble de ce syndrome est constitué par une glycosylation sur l'asparagine. Les patients de ce type présentent un retard psychomoteur et des épisodes de perte de connaissance, ainsi que des symptômes plus spécifiques variant d'un individu à un autre. L'étendue et la gravité des symptômes varient également d'un patient à un autre.

1°) En admettant que le CDG est monogénique, comment peut-on expliquer cette hétérogénéité ?

La famille A présente plusieurs membres atteints de CDG (figure 1).

2°) Quel est le mode de transmission de cette affection (dominance ou récessivité ; gène sur l'X ou autosomique). Justifiez.

## B Glycosylation chez la levure

On a isolé de nombreux mutants de levure présentant une incapacité à glycosyler. Ils présentent un phénotype de sensibilité à la tunicamycine (inhibiteur de la glycosylation) [ $tm^S$ ] alors qu'une souche sauvage de référence est résistante à la même dose [ $tm^R$ ]. De plus on constate que certains de ces mutants sont incapables de croître à 36°C contrairement à la souche sauvage.

Chacun de ces mutants est croisé par la souche sauvage. Le diploïde est mis à pousser sur milieu minimum puis répliqué sur milieu additionné de tunicamycine. Dans tous les cas les clones diploïdes poussent. Ces diploïdes, mis à sporuler produisent tous autant de spores résistantes que de spores sensibles.

3°) Interprétez ces résultats en écrivant un croisement type.

Chaque mutant est croisé par tous les autres. Les diploïdes obtenus sont repiqués sur milieu additionné de tunicamycine. Dans le tableau 1 leur croissance sur ce milieu est indiquée par « + ».

4°) Ecrivez deux croisements judicieusement choisis, puis interprétez l'ensemble des résultats du tableau 1.

L'un de ces mutants, M1, est déficient dans la glycosylation de résidus asparagine dans les protéines du réticulum endoplasmique

5°) Proposez une méthode pour isoler un vecteur recombiné portant le gène en cause chez ce mutant. Vous préciserez en quelques lignes la banque utilisée et sa constitution, les éléments indispensables du vecteur et le crible utilisé pour isoler le bon clone.

## C Utilisation du modèle levure pour l'étude du gène humain

Cette voie métabolique est hautement conservée au sein des eucaryotes. On peut donc espérer que les gènes en jeu chez la levure et les mammifères présentent une certaine ressemblance.

En comparant des portions séquencées du génome humain avec la séquence du gène (que l'on appelle ALG1) génomique de la levure, isolé précédemment, on a pu définir une séquence (430bp) susceptible d'appartenir à un gène humain homologue du gène de levure. Cette séquence utilisée comme sonde a permis de repérer dans la banque d'ADNc humain un nouveau clone dont les extrémités ont servi à définir des amorces oligonucléotidiques.. Ces amorces permettent d'amplifier un ADNc de 1,8kbp d'une banque d'ADNc de cerveau fœtal humain. Il contient une phase ouverte de lecture codant un polypeptide de 464 acides aminés.

Le fragment d'ADNc, digéré du côté 5' par l'enzyme BamHI (G↓GATCC) et du côté 3' par Sall(G↓TCGAC), est inséré dans le plasmide pYX (figure 2). Les plasmides obtenus sont utilisés pour transformer des cellules de levure d'une souche portant une délétion du gène *ura3* et une mutation dans le gène *alg1* (souche M1).

6°) Pourquoi a-t-on pris un fragment d'ADNc ? Dessinez le plasmide recombiné construit. Quelle propriété(s) va-t-il conférer à une cellule transformée ? Comment sélectionner ces cellules ?

On constate que les cellules transformées ont récupéré une résistance normale à la tunicamycine.

7°) Qu'en concluez vous ?

Dernièrement deux enfants (NK et GM morts respectivement à 5 mois et 11 semaines) présentant une CDG particulièrement grave ont été observés. Des cultures de fibroblastes de chaque patient et de leurs parents ont été mis en culture. Une extraction d'ARNm a permis d'amplifier la (ou les )forme(s) du gène précédent pour chaque culture en utilisant les mêmes sondes que ci-dessus. Les ADNc inclus dans le vecteur pYX

1. ont été séquencés
2. ont servi pour transformer des cellules de levure de la souche M1. Les cellules transformées ont été mises à pousser à 26 et 36°C sur un milieu sans uracile

La séquence a également été déterminée pour 100 personnes indemnes de CDG et non apparentées. Toutes ont présenté la même séquence. Par contre la séquence des malades a présenté une substitution en position 773 et 1025 (1 étant le premier nucléotide de la phase ouverte de l'ADNc). Les résultats sont résumés dans les tableaux 2 et 3.

8°) Etablissez le génotype de chaque individu. Combien de formes alléliques sont en jeu pour l'homologue humain du gène de levure ALG1 ? Pourquoi a-t-on éprouvé le besoin d'analyser le génotype de 100 personnes non atteintes ?

9°) Interprétez les résultats du tableau 3.

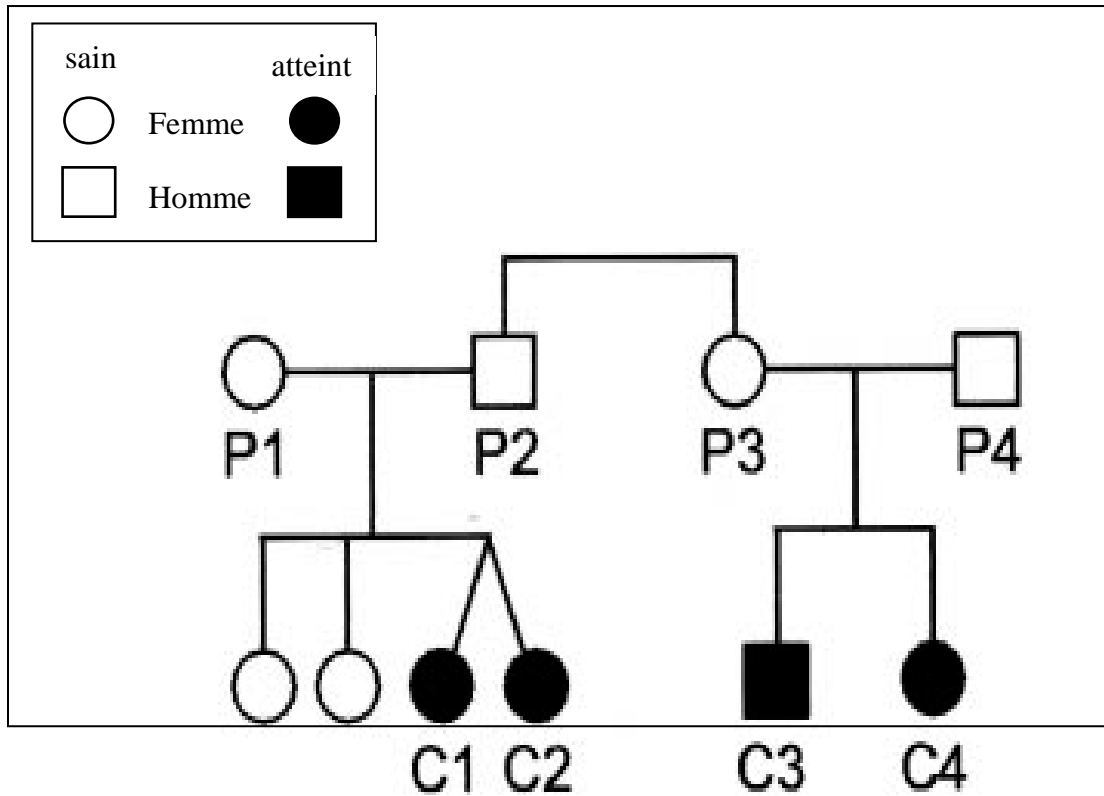
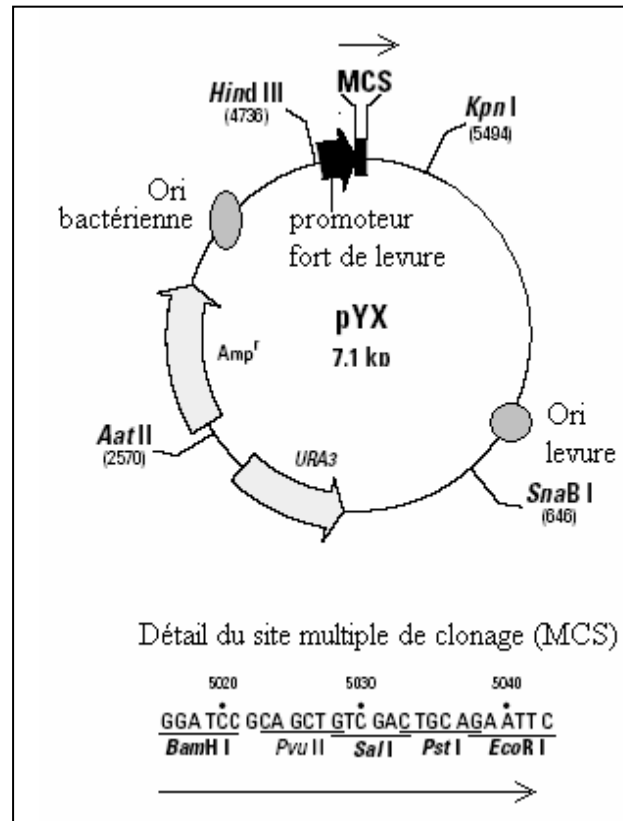


Figure 1. Pedigree de la famille A.

mutants	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
M1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M2		-	+	+	+	+	+	+	+	+
M3			-	-	+	+	-	+	+	+
M4				-	+	+	-	+	+	+
M5					-	+	-	+	+	-
M6						-	+	-	+	+
M7							-	+	+	-
M8								-	+	+
M9									-	+
M10										-

Tableau 1. Croissance sur tunicamycine des diploïdes obtenus par croisement de deux souches mutantes



**Figure 2. Carte du plasmide pYX.**

sujet	phénotype	Position 773	Position 1025
100 non apparentés	[sain]	C	A
NK	[CDG]	T et C	C et A
Père de NK	[sain]	T et C	A
Mère de NK	[sain]	C	C et A
GM	[CDG]	T	A
Père de GM	[sain]	T et C	A
Mère de GM	[sain]	T et C	A

**Tableau 2. Séquençage des deux allèles du gène humain homologue de ALG1 de levure. Du nucléotide 1 à 1841, seules deux positions 773 et 1025 sont polymorphes.**

Cellules M1 transformées par le plasmide pYX recombiné ou non	Croissance sur milieu sans uracile	
	à 26°C	à 36°C
natif (non recombiné)	+	-
+allèle ALG1+	+	+
+ homologue humain fonctionnel de ALG1	+	+
+ homologue humain de ALG1 muté en 773	+	-
+ homologue humain de ALG1 muté en 1025	+	-

**Tableau 3. Résultats de la transformation de cellules de la souche M1 par divers plasmides.**

## Bibliographie

Imbach T., Burda P., Khnert P., Wevers R. A., Aebi M., Berger E. G., Hennet T.(1999).A mutation in the human ortholog of the *Saccharomyces cerevisiae* *ALG6* gene causes carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type-Ic Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. **96**, pp. 6982–6987.

Kranz C., Denecke J., Lehle L., Sohlbach K., Jeske S., Meinhardt F., Rossi R., Gudowius S., Marquardt T.(2004). Congenital Disorder of Glycosylation Type I<sub>k</sub> (CDG-I<sub>k</sub>): A Defect of Mannosyltransferase I. Am. J. Hum. Genet. **74**:545–551.

Shimma Y., A. Nishikawa , B. bin Kassim A. Eto , Y. Jigami (1997).A defect in GTP synthesis affects mannose outer chain elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genet **256**: pp469-480

Takahashi T, Honda R, Nishikawa Y.(2000). Cloning of the human cDNA which can complement the defect of the yeast mannosyltransferase I-deficient mutant alg 1. Glycobiology.**10**(3):pp321-7.

## Corrigé : Glycosylation

1°) On peut émettre l'hypothèse que la glycosylation se fait par une suite de réactions enzymatiques (comparable à une chaîne de biosynthèse) où divers gènes interviennent. Alors des mutations dans des gènes différents peuvent conférer des phénotypes plus ou moins différents. De plus, un gène peut présenter de nombreuses formes alléliques qui peuvent conférer des phénotypes également distinguables.

2°) Dans la famille A plusieurs enfants sont touchés ce qui exclut la possibilité d'une mutation de novo entre génération parentale et F1.

Les parents qui ont transmis la CDG à certains de leurs enfants sont sains donc le phénotype [CDG] est récessif devant le phénotype [sain]. (Dominance, récessivité sont des propriétés phénotypiques et non des propriétés des allèles. Ici le mot « gène » désigne l'ensemble des allèles existant pour ce gène ; parler d'un gène dominant ou récessif n'a aucun sens)

Dans ce pedigree, on constate que filles et garçons sont atteints. Si le gène était sur l'X, les pères ne pourraient pas être porteurs, et seuls les garçons pourraient être atteints dans les couples de deux parents sains. (On peut aussi écrire un croisement de ce type dans chaque hypothèse et voir que seule l'hypothèse « gène autosomique » prévoit des filles atteintes).

3°) Chez la levure

Mutant n [tm <sup>S</sup> ]	x	Sauvage n [tm <sup>R</sup> ]	
			donc [tm <sup>S</sup> ] récessif devant [tm <sup>R</sup> ]
		2n [tm <sup>R</sup> ]	
		↓	
		spores [tm <sup>S</sup> ] 50%	
		spores [tm <sup>R</sup> ] 50%	la ségrégation 2/2 permet de conclure que

l'hypothèse monogénique est la plus simple avec un seul gène A en jeu, ce qui permet d'écrire le croisement :

Mutant n [tm <sup>S</sup> ]	x	Sauvage n [tm <sup>R</sup> ]	
a1		a+	
		2n [tm <sup>R</sup> ]	
		$\frac{a1}{a+}$	
		↓	
		spores [tm <sup>S</sup> ] 50% de génotype a1	
		spores [tm <sup>R</sup> ] 50% de génotype a+	

4°) Les mutants , de même phénotype , ont tous un phénotype récessif devant celui de la souche sauvage. On peut donc interpréter le Test de Complémentation Fonctionnelle (TCF).

M1 n [tm <sup>S</sup> ]	x	M2 n [tm <sup>S</sup> ]
		2n [tm <sup>R</sup> ]

Puisque le diploïde a récupéré le phénotype sauvage c'est que chacun des haploïdes lui a fourni l'allèle sauvage qui faisait défaut à l'autre et que les deux mutants sont mutés dans des gènes différents (A et B)

$$\begin{array}{c}
 \text{M1 n [tm}^{\text{S}}\text{]} \quad \times \quad \text{M2 n [tm}^{\text{S}}\text{]} \\
 \text{a1 b+} \qquad \qquad \qquad \text{a+ b1} \\
 2\text{n [tm}^{\text{R}}\text{]} \\
 \frac{\text{a1}}{\text{a+}} \dots \frac{\text{b+}}{\text{b1}},
 \end{array}$$

les pointillés indiquent que l'on ignore si les gènes sont liés ou indépendants.

$$\begin{array}{c}
 \text{M1 n [tm}^{\text{S}}\text{]} \quad \times \quad \text{M3 n [tm}^{\text{S}}\text{]} \\
 2\text{n [tm}^{\text{S}}\text{]}
 \end{array}$$

Le diploïde est encore sensible. Le phénotype sauvage n'a pas été rétabli ce qui indique qu'aucun des parent n'a apporté l'allèle sauvage pour le gène impliqué. Il n'y a pas de complémentation. Les deux mutants sont touchés dans le même gène.

$$\begin{array}{c}
 \text{M1 n [tm}^{\text{S}}\text{]} \quad \times \quad \text{M2 n [tm}^{\text{S}}\text{]} \\
 \text{a1} \qquad \qquad \qquad \text{a2} \\
 2\text{n [tm}^{\text{R}}\text{]} \\
 \frac{\text{a1}}{\text{a2}},
 \end{array}$$

a1 et a2 indique que les deux mutants étant indépendants, ils portent très probablement des allèles différents.

### Interprétation de l'ensemble du tableau.

gène	A	B	C	D	E
mutants	1	3	5	6	9
	2	4	7	8	
		7	10		

Il y a 5 groupes de complémentation.

Le mutant 7 qui appartient à deux groupes doit être touché dans deux gènes B et C (génotype b7 c7).

5°) On veut cloner un gène de levure chez la levure. Il n'y aura pas de problème pour épisser l'ARNm (chez la levure il y a très peu de gènes morcelés ; et si c'est le cas les cellules ont le nécessaire pour l'épissage). On partira donc de l'ADN génomique (quand on peut l'éviter, il est toujours préférable d'éviter de manipuler l'ARN beaucoup plus fragile) d'une souche sauvage au moins pour le gène que l'on recherche (ALG1). Pour construire la banque on va pratiquer sur cet ADN une digestion partielle par un enzyme à site fréquent (site à 4 nucléotides par exemple) afin d'avoir des fragments chevauchants que l'on pourra ensuite ordonner.

Ces fragments seront insérés dans un plasmide qui doit au moins posséder une origine de type levure et un gène de sélection (par exemple URA3+). On peut également utiliser un plasmide navette (qui est construit pour effectuer des transferts de la levure à la bactérie). Le plasmide pYX est de ce type avec une origine levure et une origine bactérienne, un gène de sélection levure URA3+ et un gène de sélection bactérienne AmpR. L'insertion se fera dans un site de restriction qui aura des extrémités libres compatibles avec les extrémités libres des fragments (par exemple, pour la digestion partielle Sau3A (↓GATC) et pour le plasmide BamHI (G↓GATCC) site unique en dehors des gènes de sélection et des origines.

Les cellules de levures utilisées pour la transformation devront être (ura3- alg1-) [ura-,tm<sup>S</sup>].



Seules celles qui auront reçu un plasmide auront récupéré la prototrophie pour l'uracile [ura+]. Parmi elles, celles qui auront reçu un plasmide portant l'allèle ALG1+ seront [tm<sup>R</sup>].

6°) Dans le cas de l'ADN humain il pourrait se poser des problèmes d'épissage (et le gène génomique risquerait d'être trop grand pour un plasmide), c'est pourquoi on part de l'ADN copie de l'ARNm.

Le plasmide recombiné est comme pYX, avec en plus l'insert d'ADNc humain dans le site de clonage. Il faut noter (et le dessin devrait le faire ressortir) que l'orientation du fragment est unique puisque les deux sites de restriction avant et après sont différents et non compatibles. L'insert ira de 5' coté promoteur vers 3' côté terminateur.

Le plasmide porte le gène de sélection URA3+ donc les cellules réceptrices devront être (ura3-) [ura-]. Les cellules transformées deviendront [ura+].

7°) Comme le plasmide a été recombiné sur un ADNc humain amplifié, un grand nombre de plasmides recombinés sont semblables. On constate que ce plasmide recombiné sauve les cellules transformées de la sensibilité à la tunicamycine. Donc le gène humain est fonctionnel chez la levure.

8°) Dans ce qui suit ce n'est pas la résistance à la tunicamycine qui est utilisée mais la thermosensibilité (due à la même mutation)

Dans un sujet, on a amplifié avec deux sondes oligonucléotidiques qui vraisemblablement ne contiennent pas le site muté. Ces sondes vont amplifier toutes les formes alléliques.

Pour les parents, on constate qu'elles permettent de déceler en une position deux nucléotides, en une même position l'un pour un allèle, l'autre pour l'autre allèle.

Cas de GM

Ses deux parents sont hétérozygotes (2 formes en 773), et lui est homozygote: il a reçu les deux allèles mutés

Père et mère  $\frac{alg1}{alg+}$  GM  $\frac{alg1}{alg1}$

L'allèle alg1 ayant une substitution de C par T en position 773

Pour NK chaque parent est également hétérozygote mais chacun porte un allèle muté différent alg1 déjà défini ou alg2 : A remplacé par C en 1025

Père  $\frac{alg1}{alg+}$  mère  $\frac{alg2}{alg+}$  NK  $\frac{alg1}{alg2}$

Dans certains cas, on peut observer dans la population générale un polymorphisme qui n'entraîne pas de maladie: dans de tels cas il y a des variations de nucléotides en certaines positions chez des sujets sains. C'est pour être sûr que les différences observées ici sont bien responsables de [CDG] que l'on a étudié 100 sujets sains non apparentés.

9°) Chacun des 3 allèles humain est testé séparément sur un mutant de levure (alg-) [th<sup>S</sup>].

Les témoins

- Plasmide natif : montre que les cellules transformées par le plasmide natif (sans insert) restent thermosensibles. Le plasmide ne les modifie pas.
- Plasmide recombiné sur l'allèle sauvage de levure est redevenu thermorésistant : l'allèle sauvage est bien fonctionnel
- Plasmide recombiné sur l'allèle sauvage humain est redevenu thermorésistant : l'allèle sauvage humain est fonctionnel comme son homologue de levure

### L'expérience

- Le plasmide recombiné sur l'allèle mutant en position 773 humain est resté thermosensible : l'allèle mutant a perdu sa capacité à sauver le mutant de levure. L'allèle mutant humain s'exprime également comme un mutant chez la levure
- Le plasmide recombiné sur l'allèle mutant en position 1025 humain est resté thermosensible : l'allèle mutant a perdu sa capacité à sauver le mutant de levure. L'allèle mutant humain s'exprime également comme un mutant chez la levure.

Le système de glycosylation de la levure est suffisamment semblable à celui de l'homme pour que la levure puisse servir d'organisme modèle pour cette forme de CDG.

## Maladie de Wilson

Dans tout l'exercice, on considérera que la maladie de Wilson est monogénique.

Le cuivre est un élément qui est indispensable à titre de traces pour de nombreux organismes. Chez les mammifères c'est un cofacteur pour de nombreuses protéines enzymatiques. Ces enzymes Cu-dépendants sont cruciaux dans divers processus du métabolisme oxydatif (respiration, détoxification des radicaux libres, synthèse des neurotransmetteurs et maturation du tissu connectif). Une de ces protéines, la céruloplasmine (protéine P4 de la figure 1) a une activité ferroxidase qui semble indispensable pour la libération du Fer dans la circulation (mais on ignore les bases biochimiques de ces réactions).

Récemment, des gènes responsables de la maladie de Wilson et la maladie de Menkes (deux maladies humaines voisines) ont été clonés et identifiés. Ils semblent coder pour des ATPases transporteurs de Cu.

### A La maladie humaine de Wilson

La maladie de Wilson est due à des anomalies dans le transport du cuivre. Son incidence mondiale est de 1 atteint parmi 35 000. Elle est caractérisée par des malaises chroniques hépatiques et / ou neurologiques et s'accompagne souvent de malformation rénale. Les symptômes de cette maladie sont dus au dépôt de cuivre dans le foie, le cerveau et les reins résultant d'une excrétion biliaire sérieusement réduite du cuivre.

1°) Le pedigree de la famille F où plusieurs cas de maladie de Wilson ont été repérés est représenté sur la figure 2. Dans cette famille, quel est le mode de transmission de cette maladie (dominant ou récessif, autosomique ou sur l'X). Justifiez vos réponses en incluant les arguments statistiques s'ils sont nécessaires.

2°) La connaissance du génome humain permettant de localiser des gènes dans des régions chromosomiques caractérisées par des marqueurs spécifiques polymorphes n'entraînant aucune pathologie (RFLP et microsatellites), on a utilisé de tels marqueurs balisant tout le génome de 10 cM en 10 cM. Les résultats obtenus pour le marqueur D13S31 situé sur le bras long du chromosome 13 (bande n°14-3) sont reportés sur la figure 3.

En examinant le phénotype pour le marqueur D13S31 et la maladie de Wilson, en déduire, lorsque cela est possible, le génotype des individus et le type probable des gamètes fournis par la génération II. Que pouvez-vous en conclure?

### B Etude de mutants de levure

Compte tenu de l'importance fondamentale du métabolisme oxydatif, il est raisonnable de penser que le métabolisme du Cu peut être bien conservé de la levure à l'homme. C'est pourquoi afin de mieux comprendre la maladie humaine de Wilson, on a recherché un modèle levure avec des mutants modifiés par rapport à la souche de référence pour le métabolisme du cuivre et du fer. Un schéma de maintien du milieu interne de la cellule de levure est proposé sur la figure 1

On a isolé 5 mutants indépendants de levure qui se distinguent par leur incapacité à croître sur un milieu uniquement respirable (la source de carbone est le glycérol) alors qu'ils poussent sur un milieu respirable et fermentable (la source de carbone est le glucose). On a également mesuré leur capacité à absorber le Fer dans différents milieux.

Tableau 1. Croissance et absorption de Fe de différentes souches de levure.

souche	Croissance sur				Absorption de Fe sur milieu	
	glycérol	glycérol + Fe	glycérol + Cu	Glucose	glucose	glucose + Cu
référence	+	+	+	+	4	4
mutant 1	-	-	+	+	0	10
mutant 2	-	+	+	+	0	10
mutant 3	-	+	-	+	0	0
mutant 4	-	+	+	+	0	10
mutant 5	-	+	-	+	0	0

1°) Chaque mutant est croisé par la souche de référence et les diploïdes obtenus sont mis à croître sur un milieu contenant du glycérol et sur un milieu contenant du glucose. Tous poussent sur chacun de ces deux milieux.

Qu'en concluez-vous?

2°) Chacun des mutants est croisé par tous les autres. Les diploïdes sont à nouveau repiqués sur un milieu contenant du glycérol comme source de carbone et sur un milieu contenant du glucose. Alors que tous poussent sur milieu avec glucose certains ne poussent pas sur milieu avec glycérol. Le tableau 2 donne l'ensemble des résultats: + croissance sur glycérol, - pas de croissance sur glycérol.

Tableau 2

	Mutant 1	Mutant 2	Mutant 3	Mutant 4	Mutant 5
Mutant 1	-	+	+	+	+
Mutant 2		-	+	-	-
Mutant 3			-	+	-
Mutant 4				-	-
Mutant 5					-

Quel est le but de cette expérience?

Interprétez les résultats en détaillant un croisement de chaque type.

3°) Les diploïdes obtenus au 1°) (mutant x souche de référence) sont mis à sporuler et les spores sont étalées sur milieu complet, puis repiquées sur deux milieux l'un avec du glycérol et l'autre avec du glucose comme source de carbone. On compte les colonies haploïdes qui poussent sur chaque type de milieu.

Le tableau 3 donne l'ensemble des résultats.

Tableau 3

diploïde	spores poussant sur glucose	spores poussant sur glycérol
mutant 1 x souche de référence	30	15
mutant 2 x souche de référence	25	13
mutant 3 x souche de référence	19	9
mutant 4 x souche de référence	25	12
mutant 5 x souche de référence	35	8

Interprétez ces résultats en détaillant un croisement de chaque type. Conclusion ?

## C Utilisation du modèle levure pour la compréhension de la maladie humaine.

L'ADNc du gène dont des mutations sont responsables de la maladie de Wilson (gène B) a été cloné dans un plasmide de levure possédant une origine de répliation qui permet à une cellule d'en posséder de multiples copies. De plus ce plasmide pG3 comporte un gène fonctionnel (t+) qui permet à une souche de levure portant une mutation t1 qui lui confère une auxotrophie vis à vis du tryptophane (phénotype[trp-] ) de pousser en l'absence de tryptophane. Le plasmide pG3 recombinaison avec l'ADNc du gène B est appelé pGB

1°) Le mutant 2 porteur également d'une mutation (t-) a été transformé par de l'ADN plasmidique de pG3 ainsi que par de l'ADN du plasmide recombinaison pGB. Dans chaque cas on étale d'abord les cellules après transformation sur milieu glucosé dépourvu de tryptophane.

Quel type de cellules peut pousser sur ce milieu?

Ces cellules sont ensuite répliquées sur milieu dont la source de carbone est le glycérol sans Cu ni Fe.

Quel type de cellules peut pousser sur ce milieu?

Les résultats sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 4.

Cellules réceptrices	ADN transformant	nb de cellules sur glucose sans Trp	nb de cellules sur glycérol sans Fe ni Cu
mutant 2	-	0	-
mutant 2	pG3	958	0
mutant 2	pGB	746	746

Interprétation de ces résultats.

2°) On a répertorié un certain nombre de formes différentes du gène A qui se distinguent de la forme de référence. Ces diverses modifications entraînent la variation d'un acide aminé dans la protéine résultante. Dans certains cas il semble clair que cette modification soit la cause de la maladie de Wilson. Mais dans d'autres cas il est possible que la protéine modifiée soit aussi fonctionnelle que la protéine de référence et que la cause de la mutation soit indépendante. Parmi les populations étudiées il faudrait examiner de nombreux gènes A chez des sujets sains pour voir s'il existe des formes rares compatibles avec une protéine fonctionnelle. Ceci n'a été que rarement fait car trop laborieux.

L'existence du modèle levure donne une autre méthode d'approche de la question. Chaque forme mutante de l'ADNc a été intégrée dans un plasmide de type pG3 pour donner un plasmide de type pGB porteur d'une mutation rencontrée dans l'espèce humaine. Chacun de ces plasmides recombinés a été utilisé pour transformer des cellules du mutant 2. Les cellules transformantes ont été repiquées sur milieu glycérol sans Fe ni Cu et mises à pousser soit à 30°C soit à 37°C. Par ailleurs, on a mesuré la vitesse de croissance de ces mêmes transformants en milieu liquide glycérol sans Fe ni Cu. L'ensemble de ces résultats est résumé dans le tableau 5 où chaque mutant a pour nom l'acide aminé de référence suivi de sa position dans la protéine et de l'acide aminé trouvé chez le mutant (nota: on parle de mutant lorsque la forme modifiée entraîne une modification de phénotype et de variant dans le cas contraire).

Tableau 5

Nom de la forme modifiée	Phénotype associé chez l'homme	Croissance des transformants M2+pGa sur glycérol sans Fe ni Cu		
		croissance à 30°C	croissance à 37°C	vitesse de croissance en milieu liquide
m2	levure mutée	-	-	0,021 <i>a</i>
m2 + A	sain	+	+	0,114
m2 + D765N	maladie de Wilson	+	+	0,111
m2 + R778L	maladie de Wilson	-	-	0,041 <i>a</i>
m2 + R778Q	maladie de Wilson	+/-	-	0,058 <i>a</i>
m2 + G943S	maladie de Wilson	+	-	0,100 <i>a</i>
m2 + P992L	maladie de Wilson	-	-	0,033 <i>a</i>
m2 + M769V*	?	+	-	0,109 <i>a</i>
m2 + L776V*	?	+	+	0,113
m2 + T977M*	sain ?	-	-	0,022 <i>a</i>
m2 + V995A*	sain ?	+	+	0,111

*a* :valeur statistiquement différente de la valeur de référence 0,114

\* voir détails ci-dessous.

Les formes M769V et L776V sont les seules différences avec la forme de référence trouvée chez certains sujets atteints de la maladie de Wilson, on peut donc penser que c'est la cause de la maladie. De plus dans les populations où ces formes ont été trouvées, on ne les a jamais mises en évidence chez des sujets sains.

Les formes T977M et V995A ont été trouvées chez des sujets atteints de la maladie de Wilson originaires de l'Europe du nord, qui étaient porteurs d'une autre modification du gène A. Par contre on n'a pas cherché si dans cette population ces variations étaient retrouvées chez des sujets sains. On pense plutôt que ces formes sont des variants sains du gène A.

Expliquez le principe des expériences de transformation dont le résultat est résumé par le tableau 5.

Interprétez ces résultats. Qu'en concluez-vous pour les formes présentées ici: sont-elles responsables de la maladie ou ne représentent-elles que des formes variantes rares mais fonctionnelles? Justifiez votre opinion, discutez et proposez des hypothèses lorsqu'il en est besoin.

### Bibliographie

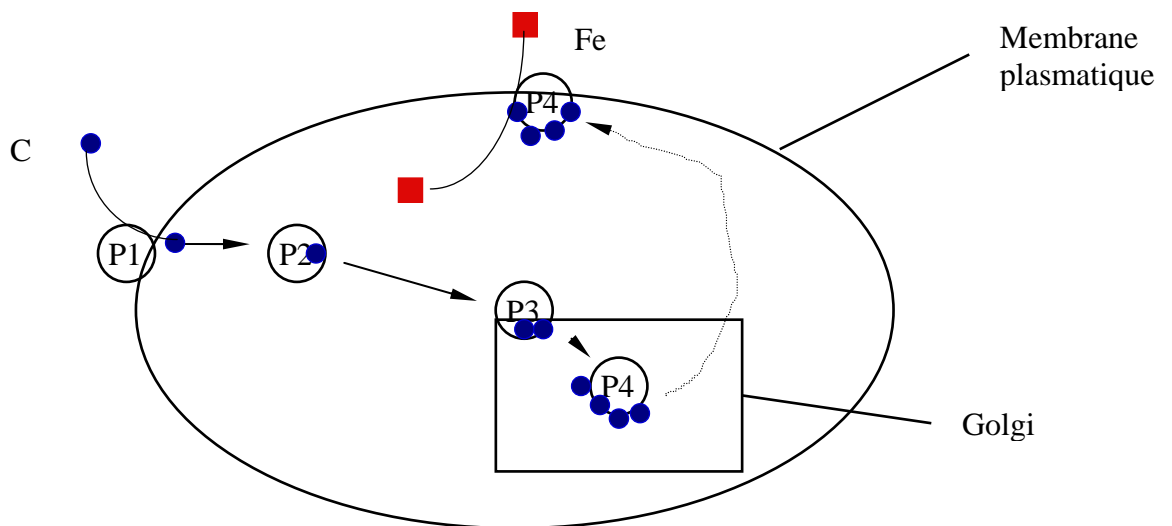
Forbes J.R. and D. W. Cox (1998). Functional characterization of missense mutations in ATP7B: Wilson disease mutation or normal variant? *Am. J. Hum. Genet.* **63** pp1663-74

Lin S. J., R.A. Pufahl, A. Dancis, T. V. O'Halloran and V.C. Culotta (1997). A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J. Biol. Chem.* **272** pp 9215-20

Yuan D. S., R.Stearman, A. Dancis, T. Dunn, T. Beeler and R. D. Klausner (1995). The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to ceruloplasmine-like oxidase required for iron uptake. *Proc.Natl. Acad. Sci.* **92** pp 2632-36

Farrer L. A., A. M. Bowcock, J. M. Hebert, B. Bonn -Tamir, M. Giagheddu, P. St. George-Hyslop, M. Frydman et al (1991). Predictive testing for Wilson disease using tightly linked and flanking DNA markers. *Neurology* **41** pp 992-9

Figure 1. Modèle de régulation de la concentration intracellulaire de Cu et Fe: une protéine P1 fait pénétrer le Cu au travers de la membrane plasmatique, une protéine P2 se complexe alors avec un élément Cu et le délivre à une autre protéine P3 qui reçoit en tout 2 Cu et les fait pénétrer dans le Golgi afin de complexer une protéine P4 avec 4 Cu. Cette protéine ainsi complex e est capable de rejoindre la membrane



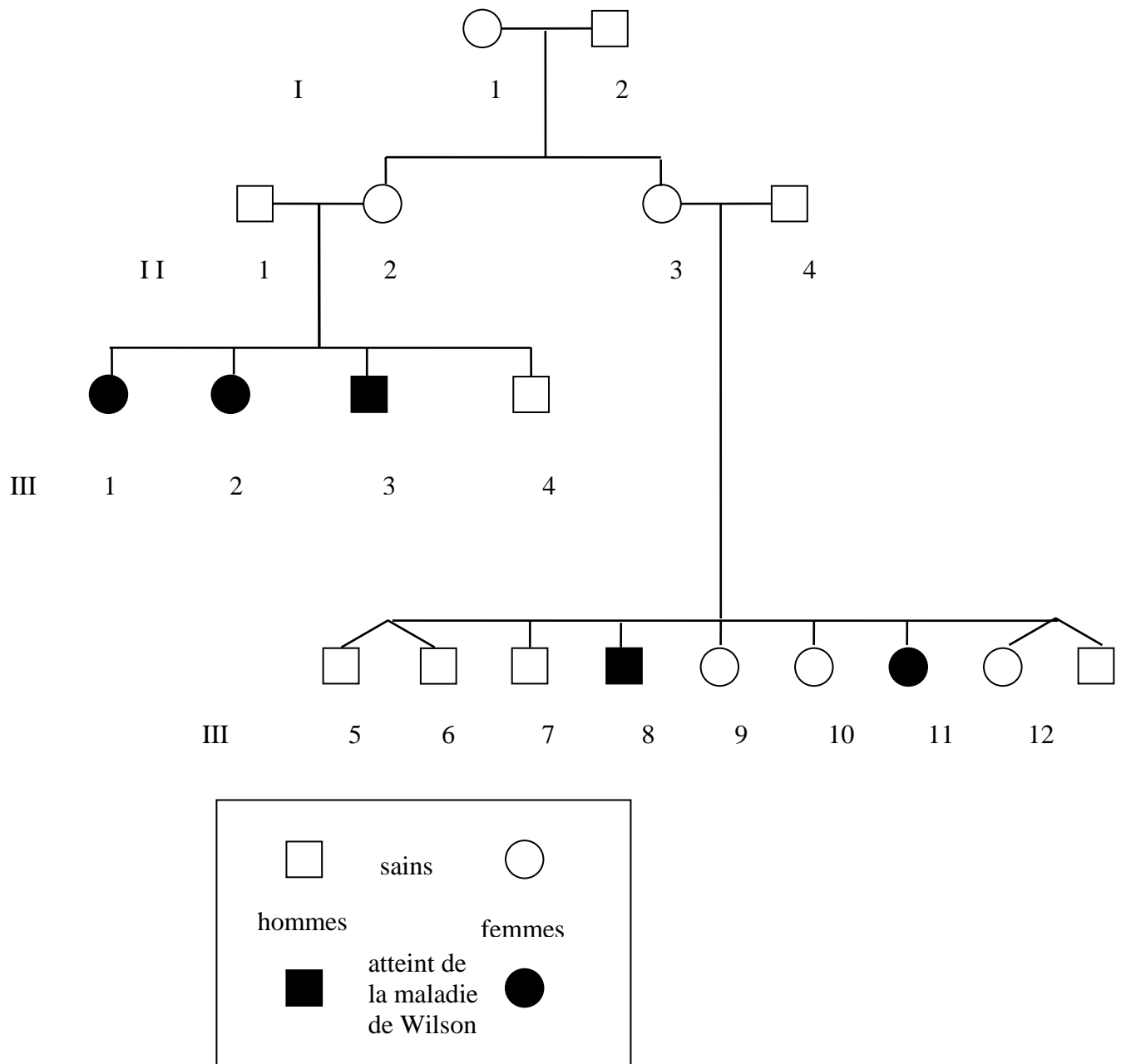


Figure 2. Pedigree de la famille F.



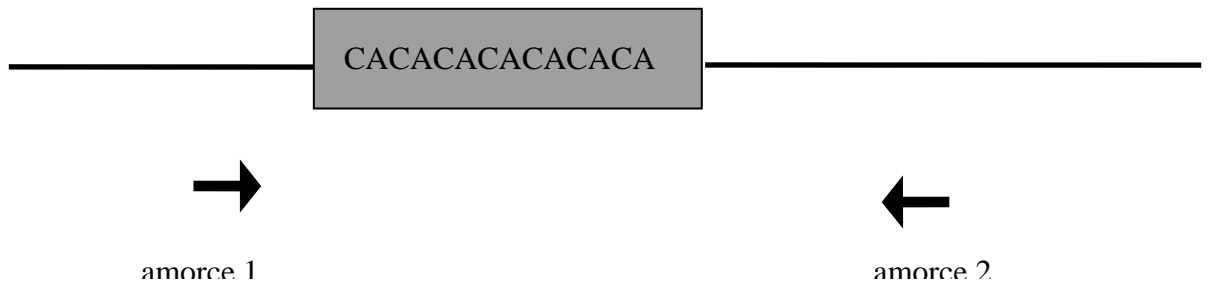


Figure 3 A. Carte schématique d'un fragment du bras long du chromosome 13 montrant le polymorphisme du nombre de répétitions du motif (CA) ainsi que la position des amorces uniques qui l'encadrent et permettent d'amplifier ce microsatellite. Selon les individus on peut observer de 15 à 70 répétitions.

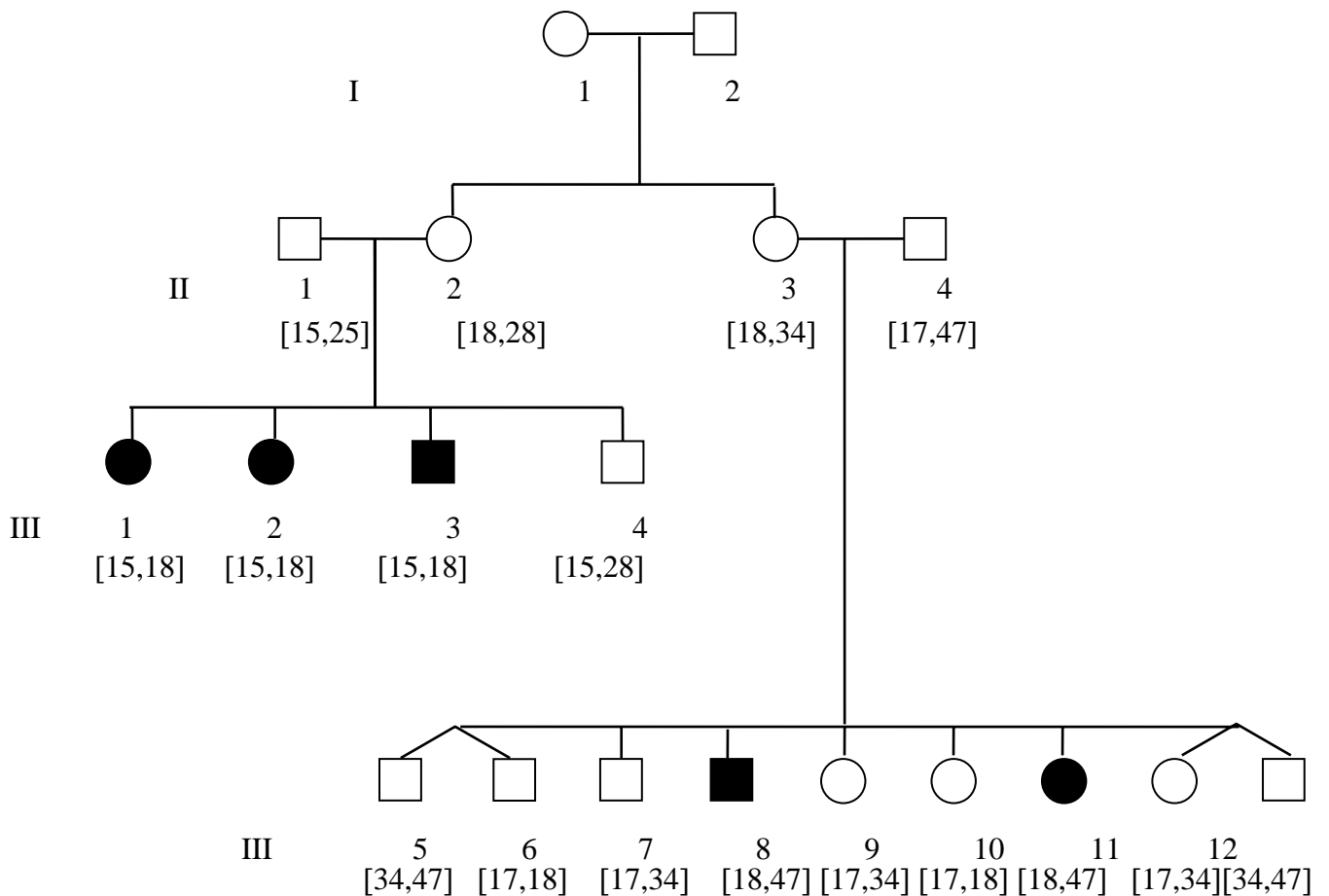


Figure 3 B. Pedigree de la famille F avec l'état du marqueur polymorphe D13S31 (deux formes alléliques possibles: 1 et 2).

## Corrigé: Maladie de Wilson

### A La maladie humaine de Wilson

1°) L'incidence de la maladie dans la population générale étant de 1/35 000, cette fréquence est significativement supérieure dans la famille F où elle est donc probablement héréditaire. Un couple de parents sains a plusieurs enfants malades. Ils doivent donc être porteurs de l'allèle muté qui confère la maladie. Puisqu'ils sont sains c'est que la maladie est récessive devant l'état sain.

Ce couple de parents sains a à la fois des filles et des garçons atteints, le gène impliqué dans cette maladie ne peut donc être qu'autosomique.

mâle [m] x femelle [+]
------------------------

#### Hypothèse gène AUTOSOMIQUE

<u>a-</u>	x	<u>a+</u>
a+		a+
↓		↓
2t.g.		1 type de gamètes

	a+
a-	a-/a+ [atteint]
a+	a+/a+ [sain]

mâles et femelles  
[+] et [m]

La présence, dans la descendance de mâles atteints ou de femelles atteintes élimine l'hypothèse de la localisation sur l'X.

#### hypothèse gène SUR l'X

<u>a-</u>	x	<u>a+</u>
¬		a+
↓		↓
2 types de gamètes		1 t.g.

	a+
¬	a+/¬ mâle [sain]
a-	a-/a+ femelle [atteinte]

mâles [+]  
et femelles [atteinte]

Seules des considérations statistiques peuvent faire pencher pour cette hypothèse en l'absence de filles [+] et de mâles [m].

2°) Les microsatellites sont des marqueurs polymorphes codominants, c'est à dire qu'une personne qui a pour phénotype [15,18] pour un microsatellite donné porte pour ce microsatellite, sur un chromosome 15 répétitions et sur son homologue 18 répétitions. On cherche à déterminer si le gène en cause et le microsatellite D13S31 sont liés. Pour cela il faut déterminer si les gamètes qui ont produits les enfants des générations III et IV sont parentaux ou recombinés.

On peut remarquer que les parents de la génération II sont tous hétérozygotes pour le gène qui est cause de la maladie de Wilson (gène W ; génotype w-/w+) ainsi que pour le microsatellite D13S31. Dans les enfants du couple II-1 x II-2 il y a 3 malades qui sont tous

w-/w- et 15/18. Leur génotype complet s'écrit donc  $\frac{15}{18} \dots \frac{w-}{w-}$  et chaque parent a

fourni un gamète soit (15, w-) soit (18, w-). On peut écrire le génotype des parents : pour

II-1  $\frac{15}{25} \dots \frac{w-}{w+}$  et pour II-2,  $\frac{28}{18} \dots \frac{w+}{w-}$ . Avec le même raisonnement on peut

écrire les génotypes de s malades III-8 et 11  $\frac{47}{18} \dots \frac{w-}{w-}$  et des parents II-3

$\frac{34}{18} \dots \frac{w+}{w-}$  et II-4  $\frac{17}{47} \dots \frac{w-}{w+}$ .

On va examiner le phénotype de tous les descendants de la génération III en cherchant des arguments pour réfuter l'hypothèse de la liaison entre le gène W et le microsatellite D13S31.

	gamètes paternels				gamètes maternels			
	15, w- P	25, w+ P	15, w+ R	25, w- R	18, w- P	28, w+ P	18, w+ R	28, w- R
couple II-1 et 2								
III-1 [malade]	15, w-				18, w-			
III-2 [malade]	15, w-				18, w-			
III-3 [malade]	15, w-				18, w-			
III-4 [sain]	15, w-					28, w+		
couple II-3 et 4	18, w-	34, w+	18, w+	34, w-	17, w+	47, w-	17, w-	47, w+
III-5 [sain]		34, w+				47, w-		
III-6 [sain]		34, w+			17, w+			
III-7 [sain]		34, w+			17, w+			
III-8 [malade]	18, w-					47, w-		
III-9 [sain]		34, w+			17, w+			
III-10 [sain]		34, w+			17, w+			
III-11 [malade]	18, w-					47, w-		
III-12 [sain]		34, w+			17, w+			
III-13		34, w+				47, w-		

On constate qu'aucun événement de recombinaison n'est nécessaire pour rendre compte de ce pedigree, ce qui suggère une liaison possible entre le gène W et le microsatellite D13S31, qu'il reste à confirmer par d'autres éléments.

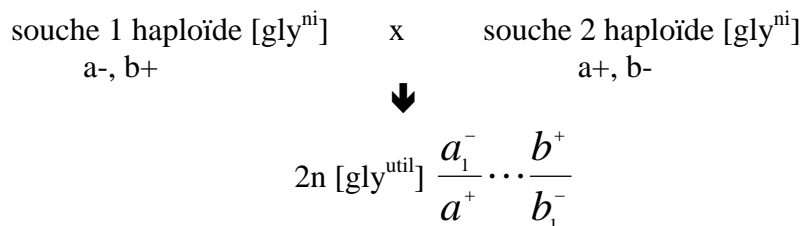
## B Etude de mutants de levure

Les phénotypes des mutants tous [gly<sup>non utilisateurs</sup>] sont cependant différents : 1 est seul de son espèce, 2 et 4 se ressemblent mais ils sont différents de 3 et 5 qui ont la même expression.

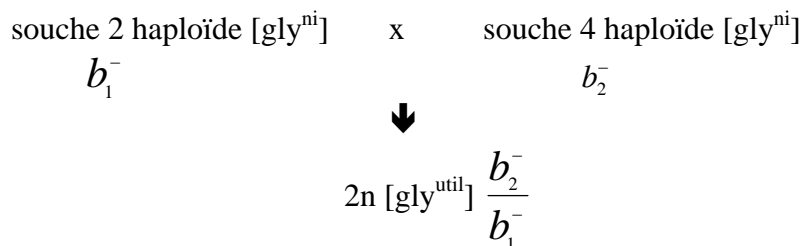
1°) Le croisement par la souche sauvage et l'examen du phénotype du diploïde permet de déterminer quel est le phénotype qui s'exprime chez un hétérozygote. Ici on voit que dans tous les cas, le phénotype [gly<sup>ni</sup>] est récessif devant le phénotype [gly<sup>util</sup>].

2°) Le croisement des mutants de même phénotype [gly<sup>ni</sup>] et l'examen du phénotype du diploïde permet de déterminer si la mise en commun de deux génomes haploïdes permet de restaurer un phénotype sauvage, ce qui est le signe que la déficience n'est pas la même chez chaque haploïde.

Dans le croisement 1 x 2, le diploïde est capable de croître sur glycérol donc l'allèle muté fourni par la souche 1 a pour homologue un allèle sauvage fourni par la souche 2, et vice versa. Les deux souches complémentent, elles sont mutées dans deux gènes différents.



Dans le cas du croisement 2 x 4, le diploïde ne redevient pas sauvage, donc aucun des deux parents n'a fourni à l'autre l'allèle sauvage qui lui faisait défaut. Il n'y a pas de complémentation, les deux souches sont mutées dans le même gène.



On peut ainsi définir 3 gènes.

gène A	gène B	gène C
mutant 1 : allèle a1	mutant 2: allèle b1 mutant 4: allèle b2 mutant 5: allèle b3	mutant 3: allèle c1 mutant 5: allèle c2

Il faut remarquer que le mutant 5 doit être muté dans 2 gènes à la fois.

3°) Comme dans la première question on croise chaque mutant non utilisateur par la souche sauvage de référence et on analyse la descendance haploïde de ce diploïde, après méiose. On n'observe que des spores  $[gly^{ni}]$  et  $[gly^{util}]$ .

croisement	spores $[gly^{ni}]$	spores $[gly^{util}]$ .
1 x +	15 $\cong$ 50%	15 $\cong$ 50%
2 x +	12 $\cong$ 50%	13 $\cong$ 50%
3 x +	10 $\cong$ 50%	9 $\cong$ 50%
4 x +	13 $\cong$ 50%	12 $\cong$ 50%
5 x +	27 $\neq$ 50%	8 $\neq$ 50%

Dans les 4 premiers croisements on voit une ségrégation 2/2 des produits de la méiose qui s'interprète le plus simplement comme l'expression d'un seul gène sous deux formes alléliques différentes présentent chez le diploïde hétérozygote.

souche 2 haploïde  $[gly^{ni}]$  x souche sauvage haploïde  $[gly^{util}]$   
 $b_1^-$   $b^+$

↓  
 $2n [gly^{util}] \frac{b^+}{b_1^-}$   
 ↓

2 types de spores en proportions égales  $\left\{ \begin{array}{l} b_1^-, [gly^{ni}] \\ b^+, [gly^{util}] \end{array} \right.$

Dans le dernier croisement il est évident que la proportion des deux types de spores est différent de 2/2. Il faut au moins deux gènes pour rendre compte d'une telle ségrégation.

Faisons l'hypothèse que les deux gènes B et C sont indépendants. Dans ce cas on attend autant de spores de génotype parental que de génotype recombiné.

souche 5 haploïde  $[gly^{ni}]$  x souche sauvage haploïde  $[gly^{util}]$   
 $b_3^-, c_2^-$   $b^+, c^+$

↓  
 $2n [gly^{util}] \frac{b^+}{b_3^-} \dots \frac{c^+}{c_2^-}$   
 ↓

2 types de spores en proportions égales  $\left\{ \begin{array}{l} \text{Parentales} \left\{ \begin{array}{l} b^+, c^+, [gly^{util}] \\ b_3^-, c_2^-, [gly^{ni}] \end{array} \right. \\ \text{Recombinées} \left\{ \begin{array}{l} b_3^-, c^+, [gly^{ni}] \\ b^+, c_2^-, [gly^{ni}] \end{array} \right. \end{array} \right. \text{ soit } 3/4 \text{ des spores } [gly^{ni}]$

Sur 35 spores observées on en attend donc théoriquement  $35 \times 3/4 = 26,25$  non utilisatrices et  $35 \times 3/4 = 8,75$  utilisatrice, proportions tout à fait comparables à celles observées. Cette hypothèse de deux gènes indépendants génétiquement est donc acceptable. Ces deux gènes sont soit sur 2 chromosomes différents soit loin (distance  $\geq 50\%$  recombinaison) sur le même chromosome, on ne peut préciser.

Ce résultat confirme que le mutant 5 est un double mutant (cf. question précédente).

## **C Utilisation du modèle levure pour la compréhension de la maladie humaine.**

1°) Récupérer les cellules devenues [Trp+] à partir d'une souche [Trp-] permet d'isoler les cellules qui ont été transformées par un plasmide portant l'allèle sauvage du gène *t* (*t+*), c'est n'importe quel plasmide pG3 natif ou recombiné, éventuellement il peut aussi y avoir de rares révertants d mutant d'origine.

Lorsqu'on étale sur milieu avec glycérol comme seule source de carbone, la souche 2 est incapable de pousser même si elle a reçu un plasmide natif pG3. Elle ne peut pousser que si elle a reçu un plasmide pG3 recombiné qui porte le gène *B* qui lui fait défaut (plasmide pGB) ou si en plus d'un plasmide natif pG3, elle a subi une réversion de l'allèle muté *b* (événement rare). Le tableau 4 montre que dans le cas de la transformation par pGB, toutes les cellules devenues [Trp+] sont également devenues [gly<sup>util</sup>], il ne peut donc s'agir d'une réversion. C'est le plasmide pGB qui porte l'allèle sauvage de *B* qui fait défaut à la souche mutante2.

2°) Ici on clone chaque forme variante du gène *B* dans un plasmide de type pG3. On obtient autant de plasmides différents que de variants. On essaie de transformer des cellules déficientes en gène *B* (souche 2) et on regarde le phénotype des transformants obtenus. Pour les formes D765N, L776V et V995A on constate que le plasmide recombinant redonne à la cellule la capacité à pousser sur glycérol aussi bien à 37°C qu'à 30°C et que la vitesse de croissance en milieu glycérol est redevenue de type sauvage. C'est une indication que la protéine est toujours active, soit on a une forme variante non responsable de la maladie, une autre mutation reste à découvrir ; soit la protéine est active mais dans l'organisme humain, mal localisée elle ne peut exprimer sa fonctionnalité.

Pour les formes R778L, R778Q, P992L et T977M on constate que les plasmides sont incapables de rendre les cellules du mutant 2 aptes à pousser sur glycérol. Ces formes doivent bien être responsables de la maladie de Wilson.

Quant aux formes G943S et M769V, bien que rétablissant une croissance de la souche 2 sur glycérol à 30°C, elles ne permettent pas la croissance dans ces conditions à 37°C indiquant une thermosensibilité de la protéine. Or, dans l'espèce humaine cette protéine doit rester active à 37°C donc ces formes sont très probablement responsables de la maladie de Wilson.

## Métabolisme de la levure : ILV

Au cours d'un déménagement un laboratoire a mélangé différentes souches de levure et essaie de refaire le tri. Toutes les souches sont haploïdes. Les souches dont on a perdu le génotype sont incapables de synthétiser isoleucine, leucine et/ou valine (certaines étapes de la biosynthèse de chacun de ces acides aminés sont catalysées par une enzyme commune, voir annexe).

1°) Tout d'abord on veut définir le phénotype de ces différentes souches en les testant sur plusieurs milieux :

souche	mm	mm+iso+leu+val	mm+arg	mm+iso+leu+val +arg
1	+	+	+	+
2	-	+	-	+
3	-	+	-	+
4	-	+	-	+
5	-	+	-	+
6	-	+	-	+
7	-	-	-	+
8	-	+	-	+
9	-	+	-	+
10	-	+	-	+
11	-	+	-	+

mm = milieu minimum

iso=isoleucine ; val=valine ; leu=leucine ; arg=arginine

+ = croissance ; - = pas de croissance

Quel est le phénotype de chacune de ces souches?

2°) Afin de préciser les exigences auxotrophiques on teste toutes les souches sur les milieux suivants:

souche	mm	mm+leu	mm+val	mm+iso	mm+val+iso	mm+val+iso+leu
1	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	+
3	-	+	-	-	-	+
4	-	+	-	-	-	+
5	-	+	-	-	-	+
6	-	+	-	-	-	+
7*	-	-	-	+	+	+
8	-	-	-	-	-	+
9	-	-	-	-	-	+
10	-	-	-	+	+	+
11	-	-	-	-	-	+

\* dans le cas du mutant 7 de l'arg a été ajoutée dans tous les milieux.

Ceci permet-il de préciser la ou les étapes susceptibles d'être déficientes pour chaque mutant?

3°) Chaque souche est croisée avec la souche 1. On teste le diploïde sur milieu minimum. Chaque diploïde est ensuite mis à sporuler. Les spores sont étalées sur milieu complet. On détermine leur phénotype en répliquant les boîtes de milieu complet sur différents milieux.

croisement	diploïde (2n) sur mm	spores(n)			
		mm	mm+val+iso+ leu	mm+arg	mm+val+leu+ iso+arg
1x2	+	45	91	nt	nt
1x3	+	23	50	nt	nt
1x4	+	31	59	nt	nt
1x5	-	15	28	nt	nt
1x6	+	14	30	nt	nt
1x7	+	43	57	58	113
1x8	+	22	45	nt	nt
1x9	+	24	50	nt	nt
1x10	+	29	53	nt	nt
1x11	+	12	23	nt	nt

nt = non testé

Pourquoi n'a-t-on utilisé les deux derniers milieux que pour le croisement 1 x 7 ?

Quel est le but de cette étude?

Interprétez les résultats concernant le diploïde, puis concernant les produits de la méiose.



4°) Toutes les souches auxotrophes sont ensuite croisées entre elles et le phénotype du diploïde est testé sur milieu minimum :

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

Quel est le but de ces croisements? (donner un exemple de chacun des cas type).  
Interprétez les résultats.

5°) Certains des diploïdes précédents sont mis à sporuler et les spores étalées sur milieu complet sont ensuite répliquées sur différents milieux.

Croisement	mm (+arg*)	mm(+arg*)+iso+leu+val
2 x 3 <sup>&amp;</sup>		
2 x 4 <sup>&amp;</sup>		
2 x 7 <sup>&amp;</sup>		
2 x 8 <sup>&amp;</sup>		
3 x 4 <sup>&amp;</sup>		
3 x 7 <sup>&amp;</sup>	25	100
3 x 8 <sup>&amp;</sup>		
4 x 7 <sup>&amp;</sup>		
4 x 8 <sup>&amp;</sup>		
4 x 9 <sup>&amp;</sup>		
7 x 8 <sup>&amp;</sup>		
8 x 9 <sup>&amp;</sup>		
2 x 9	1	200

\*l'arginine est ajoutée dans tous les cas pour ne pas tenir compte de la mutation conférant le phénotype [arg-] portée par la souche 7.

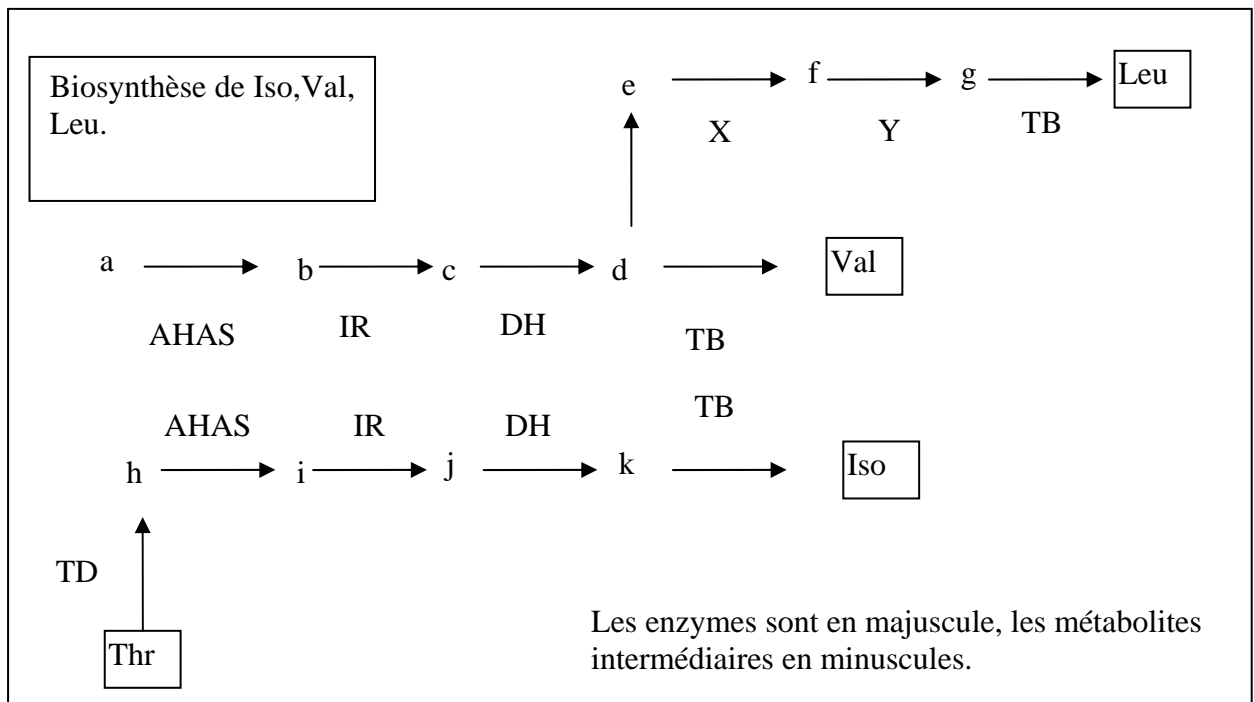
<sup>&</sup> tous ces croisements sont du même type et donnent les mêmes résultats

Pourquoi n'a-t-on pas étudié tous les diploïdes ?

Quel est le but de cette dernière étude ?

Interprétez les résultats.

## Annexe



## Corrigé : Métabolisme de la levure : ILV

1°) souche 1 [sauvage]  
 souche 2 [ilv-] avec ilv = iso + leu + val  
 souche 3 [ilv-]  
 souche 4 [ilv-]  
 souche 5 [ilv-]  
 souche 6 [ilv-]  
 souche 7 [ilv-, arg-]  
 souche 8 [ilv-]  
 souche 9 [ilv-]  
 souche 10 [ilv -]  
 souche 11 [ilv -]

2°) On peut classer les mutants suivant leurs auxotrophies précises.

Les [val-, leu-, iso-] peuvent être mutés dans un gène qui code pour une protéine composant un des enzymes suivants : AHAS, IR, DH, TB. ce sont les mutants 2, 8, 9 et 11.

Les [leu-] peuvent être mutés dans un gène qui code pour une protéine spécifiques de la biosynthèse de la leucine composant un des enzymes suivant X ou Y. Ce sont les mutants 3, 4, 5 et 6.

Les [iso-] peuvent être mutés dans un gène qui code pour une protéine spécifiques de la biosynthèse de l'isoleucine, composant l'enzyme TD. Ce sont les mutants 7 et 10.

3°) Le but de cette étude est de connaître le déterminisme génétique (dominance/récessivité, nombre de mutations portées par un mutant).

L'observation du phénotype du diploïde permet de dire que dans le cas des mutants 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 et 11 le phénotype [ilv-] est récessif devant le phénotype sauvage. Pour le mutant 5 le phénotype auxotrophe est dominant sur le phénotype sauvage.

Sur milieu minimum ne poussent que les spores prototrophes alors que sur milieu +iso+val+leu poussent les spores [ilv+] et les [ilv -]. Il faut donc d'abord compter le nombre de spores de chaque type.

Croisement	spores[ilv+]	spores[ilv-]
1x2	45	46
1x3	23	27
1x4	31	28
1x5	15	13
1x6	14	16
1x8	22	23
1x9	24	26
1x10	29	24
1x11	12	11

**Dans tous ces cas, sauf 7, la ségrégation 2/2 montre qu'il n'y a qu'un gène muté.**

L'auxotrophie en arginine n'intervient qu'avec le mutant 7.

Pour le croisement avec le mutant 7 on voit apparaître 4 types de spores :

$$[\text{ilv}^-, \text{arg}^-] \ 113 - 43 - 14 - 15 = 41$$

$$[\text{ilv}^+, \text{arg}^+] \ 43$$

$$[\text{ilv}^-, \text{arg}^+] \ 57 - 43 = 14$$

$$[\text{ilv}^+, \text{arg}^-] \ 58 - 43 = 15$$

Il y a donc au moins deux gènes en jeu.

Déterminisme du caractère arg

$$\text{spores } [\text{arg}^-] \ 41 + 15 = 56$$

$$\text{spores } [\text{arg}^+] \ 43 + 14 = 57$$

Il y a ségrégation 2/2 donc un seul gène en jeu : gène A.

Déterminisme du caractère ilv

$$\text{spores } [\text{ilv}^-] \ 41 + 14 = 55$$

$$\text{spores } [\text{ilv}^+] \ 43 + 15 = 58$$

Il y a ségrégation 2/2 donc un seul gène en jeu : gène B.

On peut maintenant écrire le croisement :

$$n \ 7 \ [\text{ilv}^-, \text{arg}^-] \times \ n \ 1 \ [\text{ilv}^+, \text{arg}^+]$$

$$a1^- \ b1^- \qquad a^+ \ b^+$$



$$2n \ [\text{ilv}^+, \text{arg}^+]$$

$$\frac{a1^-}{a^+} \quad - \quad \frac{b1^-}{b^+}$$

MEIOSE



4 types de spores

$$\left. \begin{array}{l} b1^-, a1^- \ [\text{ilv}^-, \text{arg}^-] \ 113 - 43 - 14 - 15 = 41 \\ b^+ a^+ \ [\text{ilv}^+, \text{arg}^+] \ 43 \end{array} \right\} \text{parentaux} = 84$$

$$\left. \begin{array}{l} b1^-, a^+ \ [\text{ilv}^-, \text{arg}^+] \ 57 - 43 = 14 \\ b^+ a1^- \ [\text{ilv}^+, \text{arg}^-] \ 58 - 43 = 15 \end{array} \right\} \text{recombinés} = 29$$

P>R donc les allèles des gènes A et B ne migrent pas indépendamment à la méiose; les gènes sont proches sur le même chromosome.

$$\text{distance } a1, b1 = \frac{29}{84 + 29} \times 100 = 25,7 \text{ UR}$$

4°) Le but de ces croisements est de déterminer les relations de dominance et récessivité entre les phénotypes [mutant] et [sauvage] et également de déterminer si deux mutants ayant le même phénotype sont touchés dans le même gène ou dans des gènes différents.

Dans chaque croisement entre une souche sauvage et une souche mutante, le diploïde est de phénotype [ilv<sup>+</sup>] donc le phénotype [ilv<sup>-</sup>] est récessif devant le phénotype [ilv<sup>+</sup>]. Au génotype diploïde du type  $\frac{a^+}{a1^-}$  correspond le phénotype [ilv<sup>+</sup>]

a1<sup>-</sup>

Seul le mutant 5 ne remplit pas cette condition et doit être exclu du test de complémentation.

Dans le croisement 3 x 2 l'haploïde 3 est porteur d'une mutation (au moins) qui inactive un gène qu'on appellera C. Cet allèle différent de celui de la souche sauvage sera noté (c1-). Le diploïde résultant du croisement a reçu l'allèle (c1-) du mutant 3. Puisque son phénotype est [ilv+] c'est que l'autre allèle est (c+). L'autre haploïde 2 est donc (c+) mais il est auxotrophe pour le tryptophane et donc muté dans un autre gène: D, il porte l'allèle (d1-) que le diploïde a reçu. L'autre allèle est forcément (d+) puisque le diploïde est prototrophe. Donc l'haploïde 3 a pour génotype (c1- d+) et l'haploïde 2 (c+ d1-). Il y a COMPLEMENTATION: les deux haploïdes sont mutés sur DES GENES DIFFERENTS.

Le croisement s'écrit:

$$\begin{array}{ccc}
 n\ 3\ [ilv-] & \times & n\ 2\ [ilv-] \\
 c\ 1-, d+ & & c\ +, d1- \\
 & \downarrow & \\
 2n\ [ilv+] & & \\
 c\ 1- & - & d\ 1- \\
 c+ & & d+
 \end{array}$$

Dans le croisement 3 x 6 l'haploïde 3 est porteur d'une mutation (au moins) qui inactive le gène C. Cet allèle différent de celui de la souche sauvage sera noté (c3-). Le diploïde résultant du croisement a reçu l'allèle (c3-) du mutant 3. Puisque son phénotype est [ilv -] c'est que l'autre allèle est aussi (c -). L'autre haploïde 6 est donc (c6-) ce qui est suffisant pour rendre compte de son auxotrophie pour le tryptophane. Donc l'haploïde 3 a pour génotype (c3-) et l'haploïde 6 (c6-). Il n'y a PAS COMPLEMENTATION, les deux haploïdes sont mutés sur LE MEME GENE.

Le croisement s'écrit:

$$\begin{array}{ccc}
 n\ 3\ [ilv - ] & \times & n\ 6\ [ilv-] \\
 c3- & & c6- \\
 & \downarrow & \\
 2n\ [ilv -] & & \\
 \underline{c3-} & & \\
 c6- & &
 \end{array}$$

On nomme les deux allèles 3 et 6 afin de préciser qu'ils n'ont aucune raison d'être identiques.

L'examen de tout le tableau permet de définir 6 gènes:

mutants du gène D	mutants du gène C	mutants du gène E	mutants du gène A	mutants du gène F	mutants du gène G
3	2	4	7	8	9
6			10	11	

5°) On n'a étudié qu'un représentant de chaque gène.

Les croisements sont du type :

$$\begin{array}{ccc} n 2 [ilv-] & \times & n 3 [ilv-] \\ c 1-, d+ & & c + d1- \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \downarrow \\ 2n [ilv + ] \\ \begin{array}{cc} \underline{c1-} & - & \underline{d+} \\ c+ & & d1 - \end{array} \\ | \\ \text{MEIOSE} \\ \downarrow \\ \begin{array}{l} c1-, d1- [ilv -] \\ c +, d+ [ilv +] \\ c +, d1- [ilv -] \\ c1-, d+ [ilv+] \end{array} \end{array}$$

) parentaux  
) recombines

Dans tous les croisements sauf 2 x 9 on trouve 25 spores [ilv + ] parmi 100 soit 50 parentaux et 50 recombines.  $P = R$  et les gènes sont indépendants génétiquement soit sur deux chromosomes soit loin sur le même chromosome.

Pour le dernier croisement  $P > R$ , les deux gènes ne sont séparés que par :

$$\frac{1 \times 2}{200} \times 100 = 1 \text{ UR}$$

## Biosynthèse du tryptophane chez la levure

Une souche sauvage haploïde de levure a été mutagénisée et traitée à la mycostatine en milieu minimum. Après partition de la culture et croissance en milieu supplémenté en tryptophane on a récupéré 10 colonies isolées indépendamment auxotrophes pour le tryptophane.

1°) D'après des études préalables sur des bactéries on connaît déjà des produits susceptibles de remplacer le tryptophane pour permettre la croissance des auxotrophes [Trp-]

souche	Milieu minimum additionné de			
	0	ac Anthranilique	Indole	Trp
+	+	+	+	+
1	-	-	+	+
2	-	-	+	+
3	-	-	+	+
4	-	+	+	+
5	-	-	-	+
6	-	-	+	+
7	-	-	+	+
8	-	-	-	+
9	-	-	-	+
10	-	-	+	+

Effectuer un premier classement de ces mutants et ordonner les intermédiaires métaboliques dans une voie de biosynthèse lorsque cela est possible.

2°) Certaines de ces souches accumulent plus ou moins de différents produits.

souche	produit accumulé			
	ac phénylpyruvique	ac anthranilique	Indole	Trp
+	+	+	+	+
1	++	-	-	-
2	+	++	-	-
3	+	++	-	-
4	++	-	-	-
5	+	+	++	-
6	+	++	-	-
7	++	-	-	-
8	+	+	++	-
9	+	+	++	-
10	+	++	-	-

Ces résultats sont-ils compatibles avec les précédents? Justifier votre réponse.

3°) Pour étudier le nombre de gènes en jeu, toutes ces souches sont croisées entre elles et avec la souche sauvage. Le diploïde obtenu est testé sur milieu minimum :

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>+</b>
<b>1</b>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<b>2</b>		-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
<b>3</b>			-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>4</b>				-	+	+	+	+	+	+	+
<b>5</b>					-	-	+	-	-	+	+
<b>6</b>						-	+	+	+	-	+
<b>7</b>							-	+	+	+	+
<b>8</b>								-	-	+	+
<b>9</b>									-	+	+
<b>10</b>										-	+

Interpréter ces résultats.

4°) Chaque souche cultivée en milieu minimum additionné de tryptophane en quantité limitante fournit un extrait brut acellulaire sur lequel on dose les activités enzymatiques :

souche	AASase	PRtransférase	PRAIsomérase	InGPSase	TSase
+	+	+	+	+	+
<b>1</b>	-	+	+	-	+
<b>2</b>	+	+	-	+	+
<b>3</b>	+	-	+	+	+
<b>4</b>	-	+	+	+	+
<b>5</b>	+	+	+	+	-

Compléter les classements précédents.

5°) On étale  $10^9$  cellules de ces 5 souches sur milieu minimum et on compte le nombre de clones qui se développent. Leur fréquence est donnée dans le tableau suivant.

mutant	fréquence des clones poussant sur milieu minimum
<b>1</b>	$5 \times 10^{-7}$
<b>2</b>	$10^{-6}$
<b>3</b>	$1,3 \times 10^{-7}$
<b>4</b>	$8,4 \times 10^{-7}$
<b>5</b>	$1,1 \times 10^{-6}$

Que sont ces clones?

On n'a pu obtenir aucun clone à partir du mutant 6.

Interprétez ces résultats. Cela vous aide-t-il à interpréter le mutant 1 ?

6°) Proposez une stratégie de clonage du(des) gène(s) codant l'AASase. Précisez le type de banque utilisé ainsi que le type de vecteur utilisé pour la constituer.



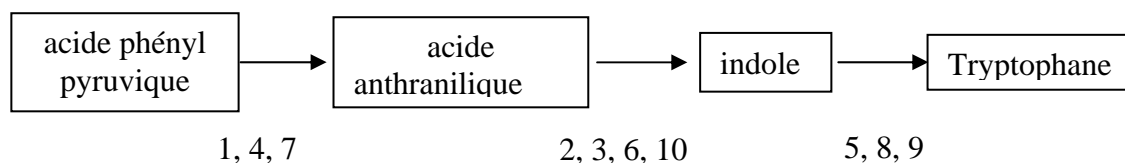
## Corrigé : Biosynthèse du tryptophane chez la levure

Revoir attentivement le cycle de la levure dans le cours: il y a alternance des deux phases haploïde et diploïde qui sont toutes deux observables.

1°) Certains mutants sont capables d'utiliser l'acide anthranilique d'autres l'indole. Ces deux produits peuvent être des intermédiaires dans la chaîne de biosynthèse du tryptophane ou des précurseurs de ces intermédiaires.



2°) Les produits accumulés sont des intermédiaires. Le mutant qui en accumule un ne sait pas l'utiliser parce qu'il a une mutation dans le gène qui code pour la protéine enzymatique qui modifie ce produit.



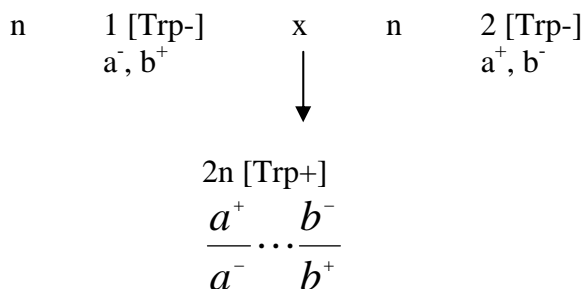
Un problème se pose pour les mutants 1 et 7 qui n'utilisent pas l'acide anthranilique et cependant ne l'accumulent pas.

3°) Dans chaque croisement entre une souche sauvage et une souche mutante, le diploïde est de phénotype [Trp+] donc le phénotype [Trp-] est récessif sur le phénotype [Trp+].

Au génotype diploïde du type  $\frac{a^+}{a^-}$  correspond le phénotype [Trp+].

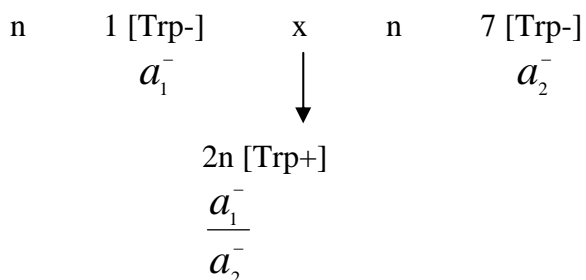
Dans le croisement 1 x 2 l'haploïde 1 est porteur d'une mutation (au moins) qui inactive un gène qu'on appellera A. Cet allèle différent de celui de la souche sauvage sera noté  $a^-$ . Le diploïde résultant du croisement a reçu l'allèle  $a^-$  du mutant 1. Puisque son phénotype est [Trp+] c'est que l'autre allèle est  $a^+$ . L'autre haploïde 2 est donc  $a^+$ , mais il est auxotrophe pour le tryptophane et donc muté dans un autre gène B, il porte l'allèle  $b^-$  que le diploïde a reçu. L'autre allèle est forcément  $b^+$  puisque le diploïde est prototrophe. Donc l'haploïde 1 a pour génotype ( $a^-, b^+$ ) et l'haploïde 2 ( $a^+, b^-$ ). Il y a un **complémentation**: les deux haploïdes sont mutés sur des gènes **différents**.

Le croisement s'écrit:



4°a) Dans le croisement 1 x 7 l'haploïde 1 est porteur de la mutation a- comme précédemment. Le diploïde résultant du croisement a reçu a- du mutant 1. Puisque son phénotype est [Trp-] c'est que l'autre allèle est aussi a-. L'haploïde 7 est donc a- ce qui est suffisant pour rendre compte de son auxotrophie pour le tryptophane. Donc l'haploïde 1 a pour génotype (a-) et l'haploïde 7 (a-). Il n'y a **pas** complémentation, les deux haploïdes sont mutés sur le **même** gène.

Le croisement s'écrit:

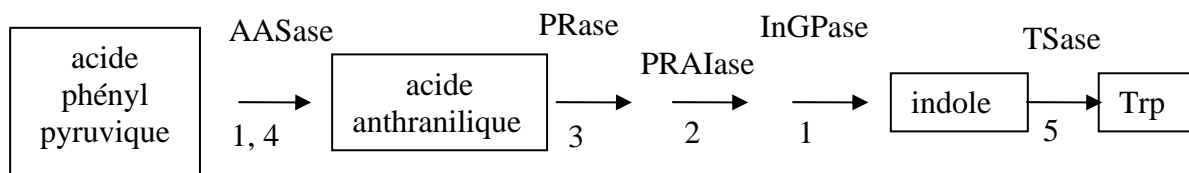


On nomme les deux allèles 1 et 2 afin de préciser qu'ils n'ont aucune raison d'être identiques.

L'examen de tout le tableau permet de définir 5 gènes:

mutants du gène A	mutants du gène B	mutants du gène C	mutants du gène D	mutants du gène E
1	2			5
7	6	3	4	8
	10			9

4°b) Les déficiences enzymatiques permettent de placer les activités enzymatiques et les mutants.



Deux hypothèses peuvent rendre compte du mutant 1 :

- soit c'est un double mutant. dans ce cas l'AASase doit être une enzyme polymérique dont une sous unité est codée par le gène a et l'autre codée par le gène d. Dans le mutant 1 on a le gène a muté et aussi un autre qui code pour l'InGPase. Quant à 7 il peut être muté seulement dans le gène a ou dans le gène d.
- soit c'est un simple mutant qui code pour une sous unité qui à elle seule possède l'activité InGPase et qui complexée avec la sous unité codée par le gène d possède l'activité AASase.

5°) On voit que tous les mutants sont capables de reverser avec une fréquence comparable et de l'ordre d'une mutation nique. Ce sont donc tous des simples mutants. Le gène a code une sous unité qui présente deux fonctions enzymatiques.

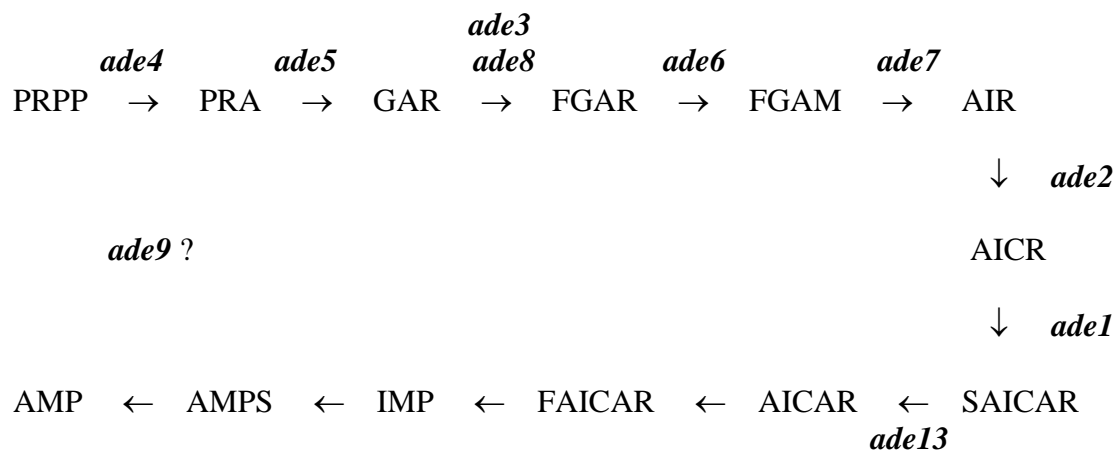
6°) Pour cloner les deux gènes qui codent pour les deux sous unités de l'AASase, gènes A et D, on va chercher le ou les clones capables de rendre les souches 1 et 4 (qui sont auxotrophes pour le Trp) prototrophes. La levure ne présentant que très peu de gènes morcelés on peut utiliser une banque d'ADN génomique préparée dans un plasmide navette qui porte une origine de réplication bactérienne et une origine de réplication de type levure (ARS ou 2 $\mu$ ). De plus ce plasmide doit posséder un gène de sélection pour repérer les bactéries transformantes (AmpR, par exemple) et un gène de sélection pour repérer les cellules de levure transformées (LEU2+ par exemple).

L'usage d'un plasmide navette permettra d'amplifier la banque avec *E. coli* (une souche [AmpS] sera transformée par l'ensemble de la banque, les clones [AmpR] constitueront la banque amplifiée.

Le criblage de la banque devra être fait en transformant des cellules de levure (leu2-,a-) et des cellules (leu2-, d-) toutes deux de phénotype [Leu-, Trp-]. Une première sélection sur milieu minimum additionné de Trp permettra de récupérer les cellules qui auront reçu un plasmide (témoin de transformation). Ces cellules répliquées sur milieu minimum donneront peut-être quelques clones [Leu+, Trp+] qui contiendront probablement un plasmide recombiné sur le gène cherché (A ou D).

## Biosynthèse de l'adénine chez les eucaryotes

La biosynthèse de l'adénine est connue chez la levure.



1°) On a isolé des mutants qui présentent le phénotype [ade-]. Ils correspondent à des gènes contrôlant plusieurs des étapes de cette biosynthèse. L'étape biochimique bloquée par une mutation dans le gène *ade9* n'est pas déterminée.

Afin de localiser ces gènes les uns par rapport aux autres, on effectue une série de croisements entre souches mutantes haploïdes. Les diploïdes provenant de chaque croisement sont mis à sporuler et l'on étudie la descendance méiotique en vrac. Les spores germent sur milieu complet et les colonies ainsi obtenues sont répliquées sur milieu minimum et milieu minimum additionné d'adénine. Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant:

croisement	spores poussant sur	
	milieu minimum	milieu minimum + adénine
<i>ade2xade5</i>	43	155
<i>ade2xade7</i>	46	176
<i>ade2xade8</i>	37	142
<i>ade2xade9</i>	39	210
<i>ade5xade7</i>	1	309
<i>ade5xade8</i>	25	98
<i>ade5xade9</i>	31	123
<i>ade8xade9</i>	11	42

$\chi^2$  à 5% de risque si ddl=1 : 3,84  
si ddl=2 : 5,99

Déterminez les relations d'indépendance ou de liaison qui sont ainsi mises en évidence. Etablissez la carte génétique. Calculez les distances lorsque cela est possible.

2°) On veut étudier cette voie métabolique chez les mammifères. Pour cela on a effectué une mutagenèse sur des cellules en culture et l'on a recueilli 12 lignées cellulaires exigeantes en adénine (numérotées de 1 à 12).

Des fusions de cellules entre les différentes souches prises deux à deux ainsi qu'entre souche mutante et souche sauvage de référence ( S ) sont effectuées. On regarde si les lignées issues de la fusion sont prototrophes (notés +) ou non (notés -). Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	S
1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
2		-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
3			-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
4				-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
5					-	-	+	+	+	+	+	+	+
6						-	+	+	+	+	+	+	+
7							-	+	+	+	-	+	+
8								-	+	-	+	+	+
9									-	+	+	+	+
10										-	+	+	+
11											-	+	+
12												-	+

S = cellules sauvages de référence.

(On considérera pour simplifier que les souches mutantes sont diploïdes homozygotes et les lignées fusionnées tétraploïdes)

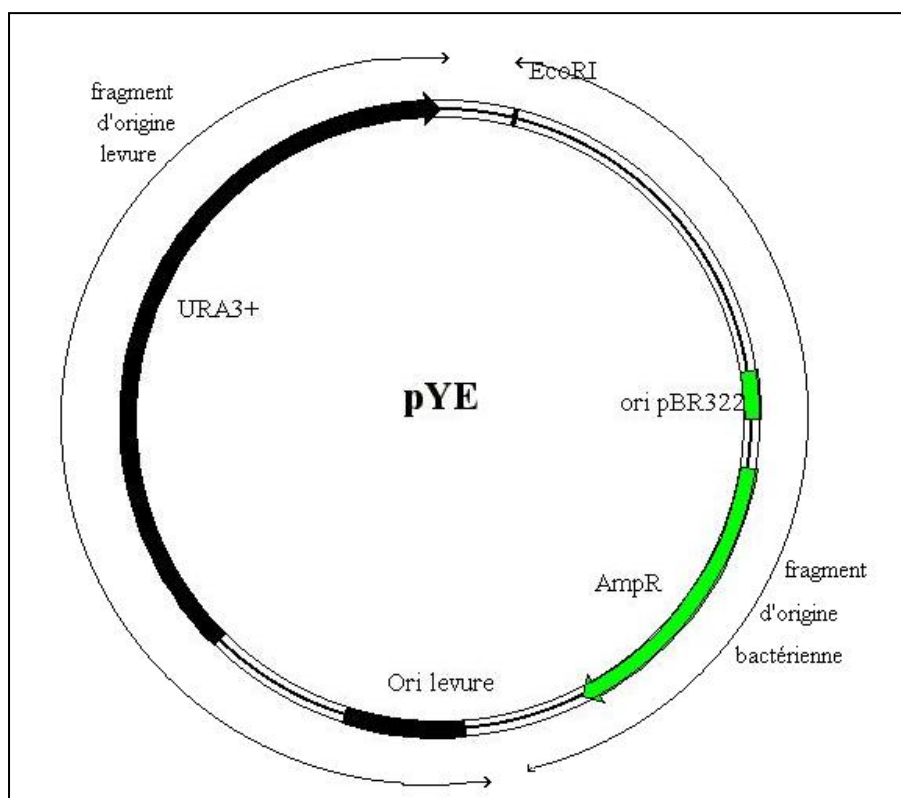
Quel est le but de cette expérience?

Donnez le principe de l'analyse et l'interprétation des résultats.

3°) L'étude génétique et biochimique des différents mutants obtenus montre que la voie de biosynthèse comporte les mêmes étapes chez les mammifères et la levure. On se propose maintenant de cloner les gènes humains intervenant dans cette voie métabolique.

- a) On réalise tout d'abord une banque d'ADN à partir des ARN messagers humains extraits de cellules sauvages en culture en prenant comme vecteur le plasmide pYE. Ce plasmide qui possède l'origine (Ori) de répllication de pBR322 et une origine de répllication de type levure peut se répliquer dans E.coli et dans la levure. Il comporte de plus la forme sauvage du gène de levure *ura3* + et le gène de résistance à l'ampicilline *Amp<sup>R</sup>* de pBR 322 (voir la carte ci-dessous). La banque est établie dans E.coli mais le plasmide peut aussi être transféré à des cellules de levure.

Donnez les principales étapes de la constitution de cette banque en les justifiant. (une demi page maximum, les détails purement techniques peuvent être omis)



**Plasmide navette pYE.**

b) Après un certain nombre d'opérations, on a isolé de cette banque 6 clones susceptibles de contenir un gène humain intervenant dans la voie de biosynthèse de l'adénine (pa, pb, pc, pd, pe, pf).

L'ADN plasmidique issu de chacun de ces clones a été utilisé pour transformer différentes souches de levure portant une forme allélique mutée du gène *ura3* et une forme allélique mutée d'un gène *ade* (*ade1*, *ade 2*, *ade 3*, *ade 5*, *ade 7* ou *ade 8*), ce qui leur confère le phénotype [*ura -*, *ade -*]. On sélectionne les cellules survivantes sur milieu dépourvu d'uracile. Les clones ainsi récupérés sont répliqués sur milieu dépourvu d'adénine.

Alors que toutes les souches utilisées, lorsqu'elles ont reçu un plasmide, donnent des cellules qui poussent sur milieu sans uracile, certaines seulement donnent des cellules qui poussent sur milieu sans adénine.

génotype de la souche réceptrice	croissance	origine de l'ADN ajouté							
		sans	pYE	pa	pb	pc	pd	pe	pf
ura3-ade1-	sans ura	-	+	+	+	+	+	+	+
	sans ade	-	-	-	-	-	-	-	-
ura3-ade2-	sans ura	-	+	+	+	+	+	+	+
	sans ade	-	-	-	+	-	-	-	-
ura3-ade3-	sans ura	-	+	+	+	+	+	+	+
	sans ade	-	-	-	-	+	-	-	-
ura3-ade5-	sans ura	-	+	+	+	+	+	+	+
	sans ade	-	-	-	-	-	-	-	-
ura3-ade7-	sans ura	-	+	+	+	+	+	+	+
	sans ade	-	-	-	-	-	-	-	-
ura3-ade8-	sans ura	-	+	+	+	+	+	+	+
	sans ade	-	-	-	-	-	-	-	+

+ : croissance des cellules transformées

- : absence de croissance des cellules transformées.

A quoi est due l'apparition de cellules sur milieu

- sans uracile ?
- sans adénine ?

Quel est l'intérêt des témoins

- sans ADN ?
- avec l'ADN de pYE natif ?

Que pouvez vous conclure pour les plasmides recombinés pa à pf?

### Bibliographie

P.N.A.S. **71** 2057-2061 (1974)

P.N.A.S. **78** 405-409 (1981)

P.N.A.S. **87** 2916-2920 (1990)

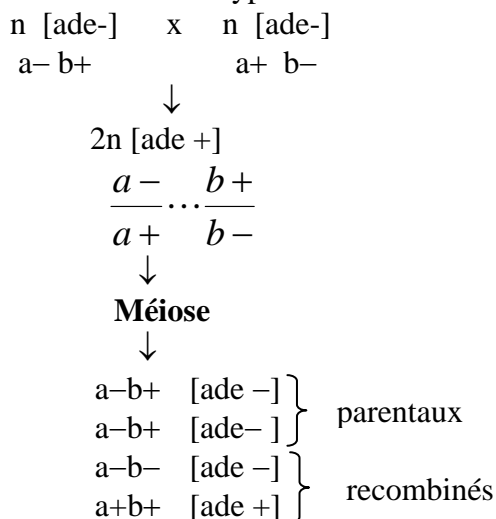
Curr Genet **18** 287-291 (1990)

## Corrigé Biosynthèse de l'adénine chez les eucaryotes.

Sur milieu minimum ne poussent que les spores prototrophes alors que sur milieu +ade poussent les spores [+] et les [ade-]. Il faut donc d'abord compter le nombre de spores de chaque type.

croisement	spores[ade+]	spores[ade-]
ade2xade5	43	112
ade2xade7	46	130
ade2xade8	37	105
ade2xade9	39	171
ade5xade7	1	308
ade5xade8	25	73
ade5xade9	31	92
ade8xade9	11	31

Les croisements sont du type :



Si P=R on doit observer  $\text{ade}+=1/2R=1/2 P$  et  $\text{ade}=(1/2 P)+ R$  soit les proportions 1/4 de prototrophes et 3/4 d'auxotrophes. On va donc tester cette hypothèse en faisant le  $\chi^2$ . Le  $\chi^2$  se fait sur les résultats expérimentaux et non sur des valeurs calculées à partir de ces résultats, les calculs intermédiaires introduisant des degrés de liberté supplémentaires qui diminueraient la fiabilité du test)

croisement	sp.R	sp.P	$\chi^2$ (Hyp :[+]=1/4, [-]=3/4)
ade2xade5	86	69	0,62
ade2xade7	92	84	0,12
ade2xade8	74	68	0,08
ade2xade9	78	132	4,63
ade5xade7	2	307	>>3,84
ade5xade8	50	48	0,04
ade5xade9	62	61	0,008
ade8xade9	22	20	0,09



Dans tous les croisements où le  $\chi^2$  est inférieur à 3,84 (ddl=1) on a autant de parentaux que de recombinés.  $P = R$  et les gènes sont indépendants génétiquement, soit sur deux chromosomes, soit loin sur le même chromosome.

Pour les croisements  $ade2 \times ade9$  et  $ade5 \times ade7$ ,  $P > R$ , les deux gènes ne sont séparés que par :

$$ade2 - ade9 = \frac{78}{78 + 132} \times 100 = 37,14 \% \text{ de recombinaison}$$

$$ade5 - ade7 = \frac{2}{2 + 307} \times 100 = 0,65 \% \text{ de recombinaison}$$

2°) Il s'agit d'un test de complémentation destiné à déterminer si deux mutants sont touchés dans le même gène ou dans des gènes différents.

Dans chaque croisement entre une souche sauvage et une souche mutante, le diploïde est de phénotype [ade+] donc le phénotype [ade-] est récessif devant le phénotype [ade+]. Au génotype diploïde du type  $\frac{a^+}{a^-}$  correspond le phénotype [ade+].

Dans le croisement 3 x 2 l'haploïde 3 est porteur d'une mutation (au moins) qui inactive un gène qu'on appellera A. Cet allèle différent de celui de la souche sauvage sera noté (a1-). Le diploïde résultant du croisement a reçu l'allèle (a1-) du mutant 3. Puisque son phénotype est [ade + ] c'est que l'autre allèle est (a +) . L'autre haploïde 2 est donc (a+) mais il est auxotrophe pour l'adénine et donc muté dans un autre gène: B, il porte l'allèle (b1-) que le diploïde a reçu. L'autre allèle est forcément (b +) puisque le diploïde est prototrophe. Donc l'haploïde 3 a pour génotype (a1- b+) et l'haploïde 2 (a+ b1-). Il y a **complémentation**: les deux haploïdes sont mutés sur des gènes **différents**. Le croisement s'écrit:

$$\begin{array}{ccc} n\ 3\ [ade-] & \times & n\ 2\ [ade-] \\ a^- b^+ & & a^+ b^- \\ \downarrow & & \\ 2n\ [ade + ] & & \\ \frac{a_1^- \dots b^+}{a^+ \dots b_1^-} & & \end{array}$$

Dans le croisement 3 x 8 l'haploïde 3 est porteur d'une mutation (au moins) qui inactive le gène A. Cet allèle différent de celui de la souche sauvage sera noté (a1-) comme précédemment. Le diploïde résultant du croisement a reçu l'allèle (a1-) du mutant 3. Puisque son phénotype est [ade-] c'est que l'autre allèle est aussi (a-). L'autre haploïde 8 est donc (a-) ce qui est suffisant pour rendre compte de son auxotrophie pour l'adénine. Donc l'haploïde 3 a pour génotype (a1-) et l'haploïde 8 (a2 -). Il n'y a **pas** complémentation, les deux haploïdes sont mutés sur le **même** gène. Le croisement s'écrit:

$$\begin{array}{ccc} n\ 3\ [ade -] & \times & n\ 8\ [ade-] \\ a1- & & a2 - \\ \downarrow & & \\ 2n\ [ade -] & & \frac{a_1^-}{a_2^-} \end{array}$$

On nomme les deux allèles  $a_1$  et  $a_2$  afin de préciser qu'ils n'ont aucune raison d'être identiques.

L'examen de tout le tableau permet de définir 7 gènes:

mutants du gène A	mutants du gène B	mutants du gène C	mutants du gène D	mutants du gène E	mutants du gène F	mutants du gène G
1	2	3	4	7	9	12
9	10	8	5	11		
		10	6			

La souche 10 est mutée dans les gènes B et C. C'est donc un double mutant.

3°) a) Pour cloner l'ADN copie il faut extraire l'ARN total puis isoler l'ARNm caractérisé par une queue polyA en 3. L'ARN total est centrifugé en gradient de sucrose et on ne garde que ce qui est entre 5 et 16S (tailles minima et maxima pour des ARNm). On élimine ainsi la majeure partie des ARNt et des ARNr 18 et 28S. Cette fraction est mise sur colonne d'oligo dT. Les ARN polyA sont retenus et on les élue ensuite en augmentant la concentration en sels. Avec une amorce oligo dT comme primer on fait copier l'ARNm par la reverse transcriptase. Le second brin de l'ADNc est complété par la polymérase Klenow par exemple (plus fiable que la reverse transcriptase car possédant une activité de relecture). La boucle de réplication est éliminée par traitement à la nucléase S1 qui ne digère que l'ADN simple brin.

Ensuite il faut mettre des bouts collants aux fragments ainsi obtenus (on ne va pas digérer cet ADNc qui représente une copie fonctionnelle du gène !) : Après traitement à l'EcoRI méthylase qui rend inaccessibles les sites EcoRI en les méthylant, on fait agir une ligase en présence de linkers EcoRI (petits morceaux oligonucléotidiques double brin, <20bp), contenant un site EcoRI) puis on digère par EcoRI.

Par ailleurs on a préparé un plasmide digéré par EcoRI. Les produits des deux digestion sont mélangés et reliqués. Le tout est utilisé pour transformer des bactéries sensibles à l'ampicilline. On sélectionne les bactéries AmpR qui ont reçu un plasmide (recombiné ou non). C'est l'étape d'amplification de la banque : chaque vecteur unique est hébergé par une bactérie qui va donner un clone bactérien (environ  $10^4$  bactéries contenant chacune 50 plasmides soit une amplification d'un facteur  $5 \times 10^5$ )

b) Sur milieu sans uracile on récupère les levures qui ont reçu de l'ADN plasmidique. Sur milieu sans adénine on teste si dans le plasmide reçu par la levure il y a un gène fonctionnel qui soit apte à suppléer la déficience de la cellule réceptrice. Le témoin sans ADN permet de vérifier les auxotrophies de la levure réceptrice avant transformation. Celui avec pYE natif sert à contrôler que le plasmide seul ne modifie pas l'auxotrophie pour l'adénine (pas de croissance sur le milieu sans ade) et que les cellules utilisées étaient bien aptes à accepter de l'ADN extérieur (croissance sur le milieu sans ura).

Les plasmides pa, pd et pe n'ont pas intégré de gène permettant de compléter une des souches de levure utilisées. Le plasmide pb contient le gène humain de forme sauvage analogue à ade2. Le plasmide pc contient le gène humain de forme sauvage analogue à ade3. Le plasmide pf contient le gène humain de forme sauvage analogue à ade8.

## Biosynthèse de l'arginine

On possède une collection de souches haploïdes (M1 à M9) de levures qui se distinguent de la souche de référence (S) par leur auxotrophie vis à vis de l'arginine

1°) On croise toutes ces souches entre elles. Pour cela, les souches de type sexuel  $\alpha$  sont toutes auxotrophes pour l'adénine et celles de type  $a$  pour le tryptophane. Ces deux auxotrophies sont récessives devant la prototrophie. Chaque souche existe donc sous deux versions :

pour la souche M1  $\alpha$  [arg-] et toutes les mutantes  
 $\alpha$  [arg-, ade-]  $a$  [arg-, trp-]  
 Pour la souche S  $a$  [ade-]  
 $\alpha$  [trp-]

$\alpha$ \ a	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	S
M1	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
M2		-	+	-	+	+	-	+	-	+
M3			-	-	-	-	+	+	+	+
M4				-	-	-	-	-	-	-
M5					-	-	+	+	+	+
M6						-	+	+	+	+
M7							-	+	-	+
M8								-	+	+
M9									-	+

**Tableau 1. Croisement de toutes les souches haploïdes entre elles et étude du phénotype du diploïdes, - =[arg-], + =[arg+]**

- Quel est le but de ces croisements ?
- Comment peut-on isoler tous les diploïdes ? (Ecrivez un croisement à titre d'exemple)
- Ecrivez 4 croisements judicieusement choisis en indiquant les conclusions que vous en tirez.
- Analysez les résultats du tableau 1

2°) Pour tous les diploïdes du type mutant x sauvage (sauf M2) on trouve autant de spores [arg-] que de spores [arg+].

Pour le diploïde issu de M2 on obtient 27 spores [arg-] et 9 spores [arg+].

Interprétation. Ces résultats sont-ils cohérents avec les précédents ?

3°) Certains diploïdes du type mutant x mutant sont mis à sporuler. Le phénotype des spores est analysé du seul point de vue de l'arginine (Tableau 2).

Croisement	Phénotype du diploïde	Phénotype des spores	
		[arg+]	[arg-]
1 x 3	[arg+]	8	27
1 x 4	[arg-]	4	12
1 x 7	[arg+]	0	19
1 x 8	[arg+]	5	15
3 x 4	[arg-]	7	21
3 x 8	[arg+]	8	25
7 x 8	[arg+]	6	15

**Tableau 2. nombre de spores de chaque type obtenu après méiose de diploïdes hétérozygotes.**

Détaillez un croisement, puis donnez l'interprétation de l'ensemble de ces résultats en un tableau.

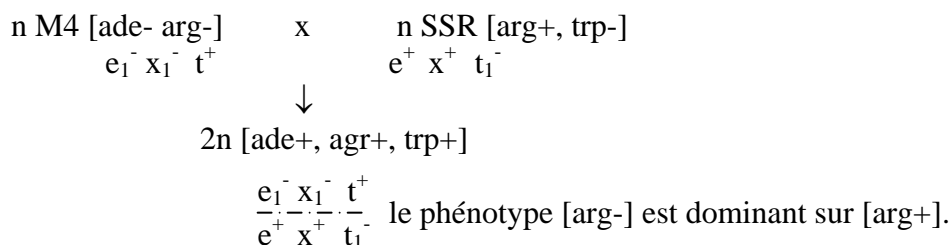
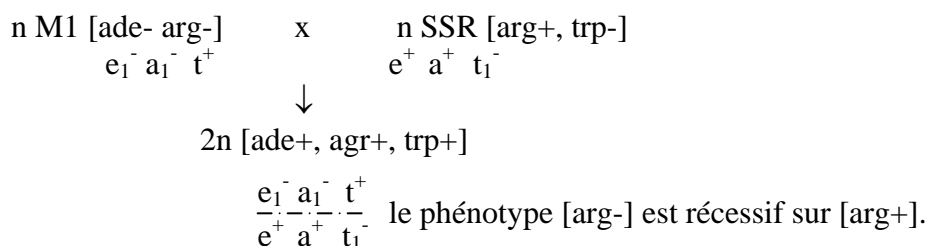
4°) Comment cloneriez-vous l'allèle sauvage du gène muté dans la souche M1 ? Vous préciserez la banque utilisée, le type de plasmide, avec ses éléments essentiels (justifiez), et la méthode de criblage du gène cherché ; les autres détails techniques sont inutiles.

## Corrigé Biosynthèse de l'arginine

### 1°) Isolement des diploïdes

Les souches sont  $\alpha$  [ade-, arg-] ou  $\alpha$  [arg-, trp-]. Les diploïdes pousseront ou pas sans arginine. Par contre, puisque [ade-] et [trp-] sont récessifs devant la protrophie, le diploïde entre deux souches de ces types sera [ade+, trp+] et poussera sur un milieu minimum, il faudra seulement y avoir ajouté de l'arginine.

Les souches mutantes croisées par la souche sauvage de référence donnent toutes des diploïdes [arg+], sauf le mutant M4. cela montre que le phénotype [arg-] est récessif devant le phénotype [arg+] sauf pour M4 qui présente au contraire un phénotype [arg-] dominant. Cela signifie que les diploïdes hétérozygotes seront [arg+] s'ils portent un allèle sauvage du gène. La conséquence c'est que le mutant M4 qui empêche la forme sauvage de s'exprimer devra être exclu d'un test de complémentation fonctionnelle.



Dans le tableau qui est le résultat du test de complémentation (sauf la dernière colonne), on veut déterminer les mutants qui sont mutés dans le même gène.

Le principe de ce test :

- Si les deux haploïdes apportent tous les deux un allèle muté pour un gène donné, le diploïde ne pourra pas pousser sans arginine, il n'y a pas complémentation, les deux mutants sont touchés dans le même gène,
- Si chacun des haploïdes fournit au diploïde l'allèle sauvage qui manque à l'autre parent, la protrophie du diploïde est au contraire rétablie. Il y a complémentation, les deux mutants sont touchés dans des gènes différents.

Ces deux cas sont illustrés par les croisements M1 x M2 et M1 x M3.

$$\begin{array}{ccc} n \text{ M1 [arg-]} & \times & n \text{ M2 [arg-]} \\ a_1^- & & a_2^- \\ & \downarrow & \\ 2n \text{ [arg-]} & \frac{a_1^-}{a_2^-} & \end{array}$$

$$\begin{array}{ccc} n \text{ M1 [arg-]} & \times & n \text{ M2 [arg-]} \\ a_1^- b^+ & & a^+ b_1^- \\ & \downarrow & \\ 2n \text{ [arg+]} & \frac{a_1^-}{a^+} \frac{b^+}{b_1} & \end{array}$$

L'examen de tout le tableau permet de définir 4 gènes ( ne pas oublier l'exclusion de M4)

Gène A	Gène B	Gène C	Gène D
M1	M3	M7	M8
M2	M5	M9	
	M6	M2	

On constate que M2 doit être un double mutant dans les gènes A et C.

2°) Dans tous les cas (sauf M2), le diploïde hétérozygote obtenu en croisant un mutant ar la souche sauvage produit autant de spores haploïdes [arg+] que de spores [arg-]. C'est l'indication qu'il suffit d'un seul gène pour rendre compte de ce résultat.

$$\begin{array}{ccc} n \text{ M1 [arg-]} & \times & n \text{ SSR [arg+]} \\ a_1^- & & a^+ \\ & \downarrow & \\ 2n \text{ [arg+]} & & \\ & \frac{a_1^-}{a^+} & \text{le phénotype [arg-] est récessif sur [arg+].} \end{array}$$

Méiose :

$$\begin{array}{l} 50\% a^+ \text{ [arg+]} \\ 50\% a_1^- \text{ [arg-]} \end{array}$$

Dans le cas du mutant M2 on a un excès de spores [arg-]. Il doit donc y avoir plus d'un gène en jeu. C'est ce qu'indiquait déjà le test de complémentation fonctionnelle.

$$\begin{array}{ccc} n \text{ M2 [arg-]} & \times & n \text{ SSR [arg+]} \\ a_1^- c_1^- & & a^+ c^+ \\ & \downarrow & \\ 2n \text{ [arg+]} & \frac{a_1^-}{a^+} \frac{c_1^-}{c^+} & \end{array}$$

En plus 10 gènes sont impliqués dans la biosynthèse de l'arginine.

gène	[]	protéine	fonction	exon	localisation	Local P
Arg4	Arg-	argininosuccinateLyase	1ère étape bios Arg	1 lg 1392bp	VIII 12®	cytosol
Arg3	Arg-	Ornithine carbamoyl transferase	6ème étape bios Arg	1(1017bp)	X -61(L)	cytosol
Arg5-6	Arg-	Enz bifonctionnelle NacetylglutamylPtransferase Acetylglutamate kinase	2 et 3èmes étape bios Arg	1(2592)	V 55®	Matrice mitochondriale
ECM40 = Arg7	Arg-leaky	Ornithine acetyl transferase	5ème étape bios Arg act :ac gluSase	1(1326)	XIII (396378-395053)	Matrice mitochondriale
Arg1 = Arg10	Arg-	Arginino succinate synthetase	Convertit la citrulline en arg-succinate	1(1263)	XV -56(L)	cytosol
Arg8	Arg-	Acetyl ornithine transferase	4ème étape bios Orn	1(1272)	XV -130(L)	Matrice mitochondriale
Arg2 = HRB574	Arg-	Acetyl glutamate synthetase	Se complexe avec arg5,6 1ère étape bios Orn	1(1725)	X(306048-307772)	Matrice mitochondriale
CPA1	Arg+	Petite ssunité CPSase	Bios Citrulline	1(1236)	XV(882895-884130)	cytosol
CPA2	Arg+	Grande ssunité CPSase	Bios Citrulline	1(3357)	X(632856-629500)	cytosol
ORT1 = Arg11	Arg-bradytrophe	Exporte l'ornithine de la mitochondrie		1(879)	XV(570807-569929)	Membrane mitochondriale

#### 4 dans la régulation

gène	[]	protéine	fonction	exon	localisation	Local P
Arg80 = ARGR1	Arg-	Régulateur avec arg81 et arg82	Facteur de transcription avec site de liaison à l'ADN	1(534)	XIII 36®	noyau
Arg81 = ARGR2	Arg-	Protéine à doigts de zinc	Cofacteur de transcription	1(2643)	XIII -63(L)	noyau
Arg82 = ARGR3 = IPK2	Arg-	Inositol ou Pinositol kinase	régulateur	1(1068)	IV 95®	Arg-
Arg84	Arg-	Inconnu, ne serait-ce pas une fonction régulatrice en cis (type Promoteur ?)			V 55® donc lié à arg5,6	

Voir la figure de la voie métabolique sur la source SGD : <http://www.yeastgenome.org/>