

ANALYSE GENETIQUE ET MUTATIONS

I. RAPPELS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

L'étude des organismes présentant des mutations permet la compréhension de phénomènes physiologiques : en effet, en étudiant un organisme présentant un dysfonctionnement d'une de ses fonctions puis en déterminant la mutation responsable de ce dysfonctionnement, on déduit le rôle et la séquence du gène.

- ✚ **Génotype** : Ensemble des gènes (normaux/sauvages ou mutés) d'un individu, Il conditionne le phénotype.
- ✚ **Phénotype** : Apparence d'un individu, il est fonction du **génotype** mais aussi de l'**environnement** (interaction de l'environnement avec les gènes ou épigénèse).
- ✚ **Organisme haploïde** : Cellule ou individu possédant une copie de chaque chromosome (ex : Gamètes *Cf cours de BDR*).
- ✚ **Organisme diploïde** : Cellule ou individu possédant deux copies de chaque chromosome (ex : cellules somatiques).

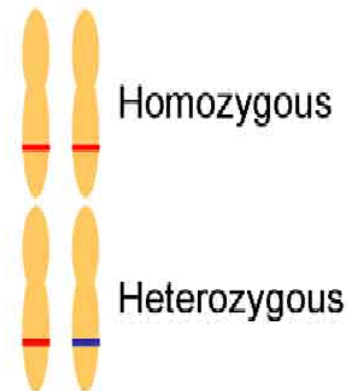
II. NOTION DE POLYMORPHISME ET D'HOMOZYGOTIE/HETEROZYGOTIE

Une cellule diploïde possède **deux allèles du même gène** : l'un hérité de la mère et l'autre du père (si la cellule est obtenue par la reproduction sexuée).

Pour un même gène, il y a plusieurs allèles différents (ex : le gène *EYCL3* code pour la couleur des yeux, il possède plusieurs allèles responsables des différentes couleurs d'yeux observables Bleu/Vert/Marron/Gris).

On parle de **polymorphisme génétique**.

- ✚ Si un organisme possède deux allèles **identiques** : Il est dit **homozygote** (en reprenant l'exemple précédent : un individu Marron/Marron pour le gène *EYCL3*).
- ✚ Si un organisme possède deux allèles **différents** : il est dit **hétérozygote** (en reprenant l'exemple précédent : un individu Gris/Bleu pour le gène *EYCL3*).



NB : La notion d'homozygotie et d'hétérozygotie se réfère au **phénotype** obtenu, il existe toujours de **légères variations** dans la **séquence nucléotidique des allèles, même s'ils codent pour le même phénotype** (ex : l'allèle « bleu » de la mère peut être génétiquement différent de l'allèle « bleu » du père mais ils engendreront des enfants qui auront les yeux bleus).

III. NOTION DE DOMINANCE/RECESSIVITE

Un allèle est considéré comme **dominant** lorsqu'il impose son phénotype, même à l'état hétérozygote.

Un allèle est dit **récessif** lorsqu'il s'exprime uniquement à l'état homozygote.

✚ Caractérisation des mutations :

On parle d'une mutation **gain de fonction** si elle est dominante (car une mutation dominante engendrera l'expression d'un ARNm puis d'une protéine de fonction différente).

Une mutation récessive est dite **perte de fonction** car elle codera pour une protéine non fonctionnelle.

IV. NOTION DE COMPLEMENTATION

✚ **Complémentation** : Habilité à restaurer une fonction en combinant, dans une même cellule, deux gènes dont au moins un est muté.

✚ **Groupe de complémentation** : ensemble de mutants qui ne complémentent pas entre eux.

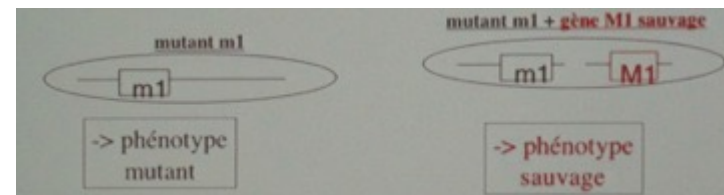
Objectif : à l'aide d'un test de complémentation, on souhaite savoir si deux mutations correspondent au même gène ou à deux gènes différents.

Principe : Le test de complémentation consiste à combiner dans une même cellule (un organisme diploïde) **les deux mutations** et d'observer le phénotype qui va en découler (restauration du phénotype sauvage ou pas).

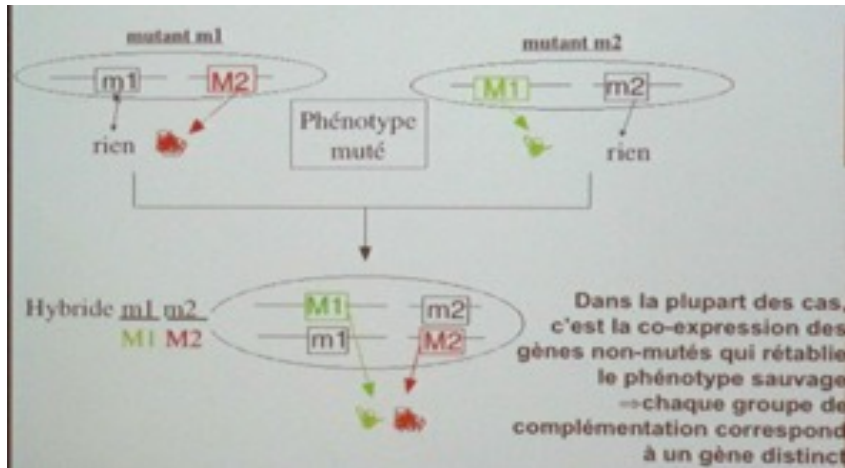
Pour réaliser le test de complémentation, un pré-requis est indispensable : **les mutations doivent être récessives** (impossible de restaurer le phénotype sauvage ou de déterminer laquelle des deux mutations s'exprime si elles sont dominantes).

Il faut donc obligatoirement effectuer un **test de récessivité** avant le **test de complémentation**.

✚ **Test de récessivité** : On combine le gène sauvage avec le gène muté, si le phénotype sauvage est restauré la mutation est récessive



✚ **Test de complémentation** : on combine les deux gènes mutés et on note le phénotype observé.



✚ Si le phénotype obtenu est **sauvage** : il y a **complémentation**. On peut suggérer que les deux allèles mutés sont sur des gènes différents (car si les gènes sont différents, ils ont chacun leur correspondant sauvage dominant sur l'autre allèle).

NB : on suggère que les allèles sont sur des gènes mutés car parfois, deux allèles mutés sur le **MEME** gène rétablissent le phénotype sauvage, c'est la **suppression intragénique** (la seconde mutation touche le même gène que la première, mais en un site différent).

✚ Si le phénotype obtenu est **muté** : il n'y a **pas** **complémentation**. On affirme/démontre que les deux allèles mutés sont sur le même gène (car si le gène touché est le même, il n'existe que des versions mutés et récessives du gène).

Application médicale : lorsqu'on découvre une maladie génétique rare (entre 5000 et 8000 maladies à ce jour) présentant des signes

cliniques particuliers (*ex* : *Perte de peau importante*), on fait fusionner des cellules de patient atteints de la maladie rare avec des cellules de malades touchés par des maladies génétiques connues aux signes cliniques similaires, afin de savoir si la mutation génétique entraînant la maladie rare est sur un gène codant pour l'une des fonctions altérées dans les autres maladies.

Tableau récapitulatif du test de complémentation

Phénotype observé après le test :	<u>Phénotype sauvage</u>	<u>Phénotype muté</u>
<u>Complémentation</u>	OUI	NON complémentation
<u>Groupe(s) de complémentation</u>	Distincts	Même groupe de complémentation
<u>Conclusion</u>	On <u>suggère</u> que les allèles sont sur des gènes différents (car possibilité de suppression intragénique).	On <u>affirme</u> et <u>démontre</u> que les allèles sont sur le même gène.

Mnémono phonétique : -Phénotype sauvage / Groupe de complémentation séparé / suggère que les gènes sont séparés.

-Phénotype muté / Même groupe de complémentation / affirme que les allèles sont sur le même gène.

V. MUTATION CONDITIONNELLES

Le principe de ces mutations conditionnelles est que le gène muté exprimera un phénotype différent en **fonction des conditions de culture**.

Par exemple : l'expression phénotypique d'un gène peut dépendre de la température (**mutations thermosensibles**).

- **Mutations thermosensibles** : la mutation ne va s'exprimer qu'à une température élevée.
- **Mutation cryosensible** : la mutation ne va s'exprimer qu'à une température basse voir très faible.

NB : On dit que la température est **permissive** quand le caractère mutant **ne s'exprime pas** et qu'on observe un phénotype sauvage.

On dit que la température est **non permissive** quand le caractère mutant **s'exprime** et qu'on observe un phénotype muté.

Ce type de mutation a notamment permis d'identifier les différents check-point du cycle cellulaire, en modifiant à intervalles réguliers les conditions expérimentales, pour étudier précisément les contrôles effectués par la cellule.

VI. TRANSGENESE

La **transgénèse** est l'introduction d'un nouveau gène (transgène) dans une cellule ou un organisme, alors appelé **transgénique**.

Pour transférer un gène dans la cellule, on utilise des techniques comme la micro-injection, l'électroporation, etc...
(Cf fiche sur la microscopie)

✚ Deux cas de figure :

- Le gène est absorbé dans le nucléoplasme mais **ne s'intègre pas au génome**, il sera reconnu par la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle mais son expression ne sera que **transitoire**.
- Le gène est absorbé dans le nucléoplasme et **s'intègre** dans le génome de la cellule hôte, son expression sera **permanente** et perdurera lors des divisions (donc chez les cellules filles).
- ✚ On distingue différents types de recombinaison dans le génome :
- **La recombinaison illégitime**, qui s'effectue au **hasard**, sans homologie avec la séquence du gène sur lequel il se greffe, ce type de recombinaison est **fréquent**.

- **La recombinaison homologue par intégration ciblée**, qui est **séquence spécifique** (le gène introduit s'intègre dans une région possédant une succession de nucléotides correspondant aux extrémités de sa propre séquence) et beaucoup **plus rare** (forme de protection contre les virus).

Dans les deux cas, pour maximiser le taux de recombinaison génétique, on introduit aussi un **gène de résistance aux antibiotiques** (type puromycine) au début de la séquence du transgène. On place ensuite les cellules sous antibiotiques afin de sélectionner uniquement celles qui ont intégré le transgène (et donc le gène de résistance) qui sont les cellules survivantes.

✚ Applications de la transgénèse :

- ▶ **Visualisation de protéines spécifiques de matière dynamique** (Cf fiche sur la microscopie),
- ▶ **Inactiver totalement un gène de manière spécifique** (ou **Knock-out**) : On introduit un transgène comportant des séquences homologues au gène à inhiber (on l'inactive en supprimant sa phase codante et en la remplaçant par le gène de résistance à la Puromycine),
- ▶ **Inactiver partiellement un gène de manière spécifique** (**knock-down**) : Cette méthode repose sur la fabrication d'ARN interférents (ou siRNA) complémentaires de la séquence (ou d'une partie) du gène. Le siRNA va détruire les ARN messagers issus de la transcription du gène en se fixant sur ceux-ci. Cependant,

contrairement au knock-out, l'activité du gène persiste mais est plus ou moins atténuée (en fonction de la concentration de siRNA introduit) car certains ARNm ne sont **pas détruits** par les siRNA. (Cette technique est une piste pour le traitement de certaines maladies ou les gènes sont surexprimés, comme les cancers).

- ▶ **Tracer l'activité d'un gène au cours du développement** (**knock-In**) : on souhaite tracer l'expression d'un gène et non pas détruire son expression, on introduit un transgène conservant la séquence codante du gène étudié, auquel on ajoute un gène de résistance aux antibiotiques (ça ne change pas) et **le gène de la GFP** ou de la **β -galactosidase** (qui produit une protéine bleue en présence de lactose). On recombine ensuite le transgène de manière homologue et on peut suivre son activité dans le temps et dans l'espace.



Knock-in du gène *HoxB8* chez l'embryon