

B\ Différents types de mutants et les stratégies d'isolement (repérage et isolement).

Une souche **auxotrophe** est incapable de synthétiser un constituant cellulaire.

Une souche **prototrophe** est capable de synthétiser tous ses constituants cellulaires sur un milieu minimum (eau, sels minéraux, sucre).

Les **mutants de sucre** : ces mutants sont incapables de d'utiliser un sucre donné comme source d'énergie (C et N).

Les **mutants de résistance** (à un composé toxique) : c'est un mutant qui pousse même en présence d'un composé toxique.

Les **mutants de fonctions essentielles** ou **Mutants conditionnels** : en conditions permissives, la mutation ne s'exprime pas et la bactérie pousse. En conditions non permissives, la mutation s'exprime et la bactérie meure. On trouve dans ce cas, les mutants thermosensibles. Ce sont des mutations qui changent un acide aminé, donc il y a variation dans la structure tridimensionnelle de la protéine.

Isolement :

- Mutant de résistance : sélection.
- Mutant auxotrophe : repérage.
- Mutant de sucre : repérage.
- Mutant conditionnel : repérage.

1\ Sélection.

Si la fréquence de mutation de résistance à l'ampicilline est de 10^{-9} , on fait une structure d'au moins 10^9 cellules ; on centrifuge puis on étale sur une boîte contenant de l'ampicilline. Sur les 10^9 cellules, une seule poussera → La souche est isolée.

2\ Repérage.

Repérage de mutants d'auxotrophie, de sucre et conditionnels.

Si la fréquence Arg résistance est égale à 10^{-6} , on étale sur une première boîte de milieu complet : tout pousse.

On repique ensuite sur une seconde boîte sans arginine et l'on regarde ce qui ne pousse pas et par corrélation avec la boîte 1, on repère la souche.

Pour espérer repère un mutant, on doit faire un million de boîtes !!! Pour diminuer le nombre de boîtes, on peut augmenter la fréquence de mutation par mutagenèse.

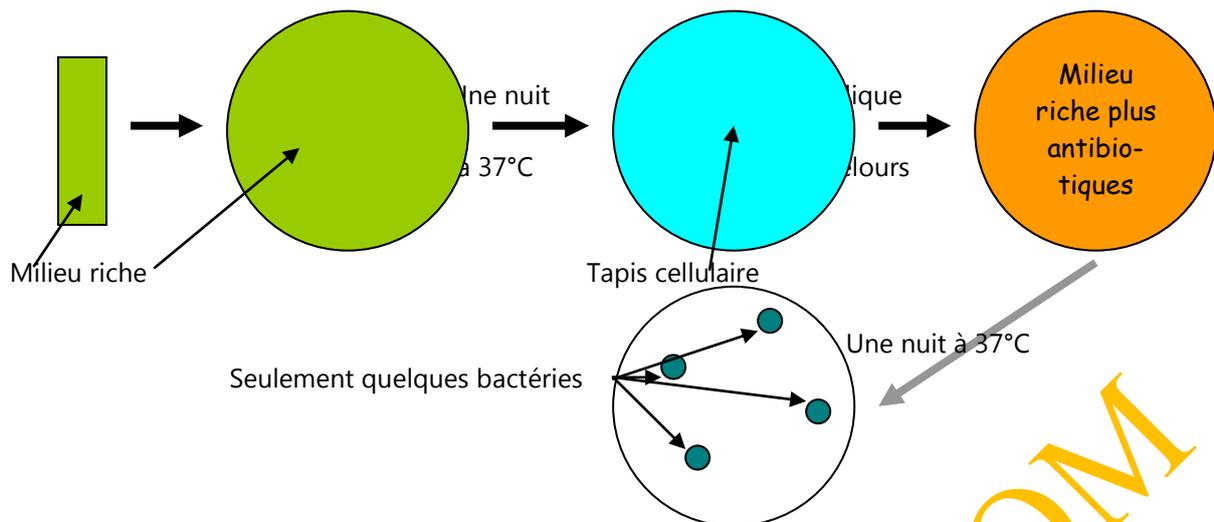
III\ Mutation spontanée – Nature des mutations – Suppression.

On a deux hypothèses quant à l'apparition des mutations :

- Au hasard : ce sont des mutations spontanées ou directes.
- Pour s'adapter : on parle dans ce cas de mutations adaptatives.

A\ Expérience de démonstration (Lederberg 1952).

10^6 cellules



On prend des échantillons mutants déterminés par l'expérience I sur le tapis cellulaire et l'on recommence autant d'expériences que d'échantillons.

Si l'on obtient la même fréquence de mutation qu'en I, la mutation est dite adaptative.

Si la fréquence augmente à chaque expérimentation, on parle alors de mutations spontanées.

On note que si la fréquence augmente jusqu'à 100% pour de nombreux cycles, c'est que l'on est en présence de mutation spontanée indépendante de l'agent sélectif (c'est un dogme).

B\ Nature des mutations.

1\ Mutations ponctuelles.

Les mutations ponctuelles concernent un seul nucléotide. Il existe différents types de mutations ponctuelles :

- Conservatives.
- Faux sens.
- Non sens.
- Décalantes.

Mutation conservative : cette mutation ne modifie pas l'acide aminé intégré dans la chaîne polypeptidique. En effet, le code génétique est dégénéré.

Mutation faux sens : cette mutation entraîne l'incorporation d'un mauvais acide aminé dans la chaîne polypeptidique. Si cet acide aminé est important, on obtient un phénotype mutant.

Mutation non sens : il y a remplacement d'un nucléotide par un autre et engendre ainsi un codon stop. C'est aussi un cas d'apparition de phénotype mutant.

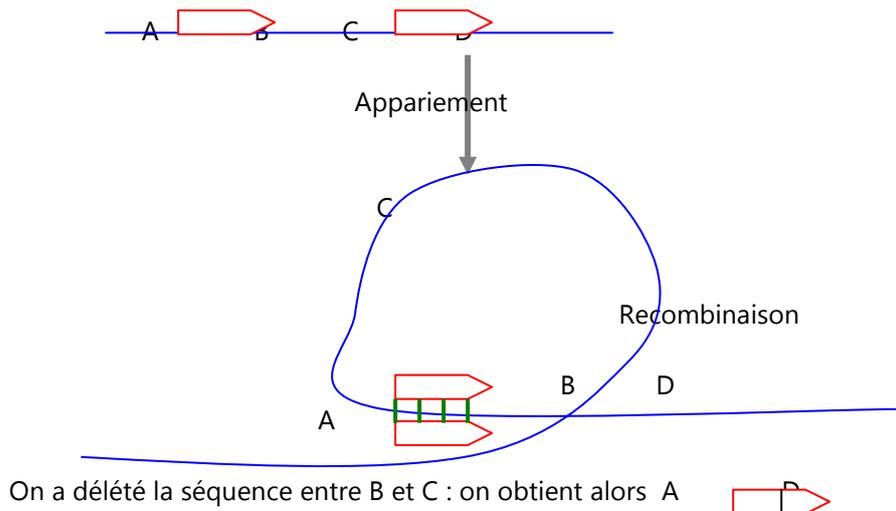
Mutation décalante : il s'agit ici de la délétion ou de l'insertion d'un nucléotide qui décale le cadre de lecture. Il y a souvent engendrement d'une mutation faux sens et apparition d'un peptide incorrect et donc un phénotype mutant.

2\ Remaniements génétiques.

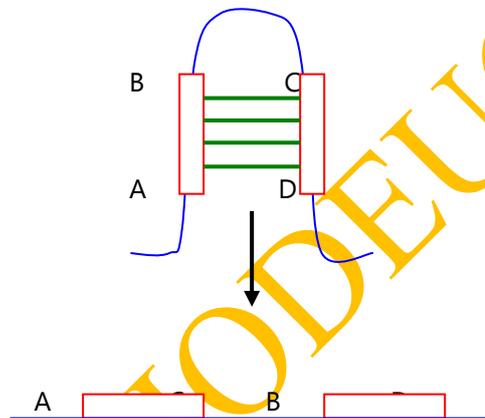
Les remaniements génétiques concernent diverses centaines de nucléotides. Il existe différents types de remaniements :

- inversion – délétion – duplication : ces trois phénomènes impliquent un processus de recombinaison homologue.

α\ Délétion.



β Inversion.

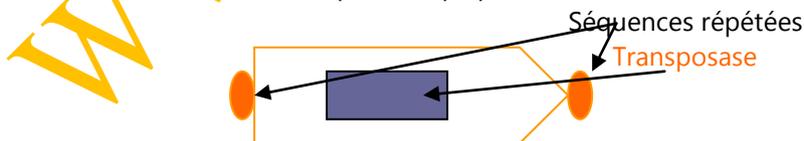


Ces remaniements permettent, au cours de l'évolution, de faire évoluer les gènes essentiels.

γ Les séquences homologues.

EGM : Elément Genetic Mobil ; IS : Insertion sequence ; Tn : Transposon.

- IS : c'est un fragment d'à peu près 700pb. On trouve plusieurs copies de IS sur le chromosome. Ce sont des séquences qui permettent des recombinaisons homologues.



La transposase et les séquences répétées sont nécessaires à la transposition.

- Tn : le transposon est un élément composite constitué de deux IS en répétition inversée, encadrant un morceau d'ADN portant un gène de résistance ç un antibiotique. Le fragment fait plusieurs Kb.



Le transposon « transpose » car IS contient la transposase et les séquences aux extrémités des IS. Le gène entre les IS n'intervient pas.

Tout peut être transposé, soit, seulement un IS, soit, tout le chromosome (→ Transposition inverse) à l'extérieur des IS → On a soit Tn, soit le chromosome, soit un IS qui transpose.

3\ Suppression.

Une seconde mutation va supprimer l'effet de la première. Une seconde mutation intragénique se situe dans le même gène que la première. Une seconde mutation extragénique se déroule dans un autre gène que la première.

Les mutations intragéniques sont rares. Elles suppriment les mutations non sens, faux sens et décalantes.

Les mutations extragéniques peuvent être :

- Indirectes.

Ces mutations permettent d'identifier les différents partenaires d'un même processus de biosynthèse. Exemple du métabolisme du glucose :

Galactose → (GalK) → Galactose-1P → (GalE) → UDP-Glucose.

- Si tout va bien, on obtient du glucose.
 - S'il y a mutation de GalE, il y aura accumulation de Galactose-1P toxique, donc, mort de l'individu.
 - Si la mutation a lieu sur GalK, on observe une accumulation de galactose, non toxique. Il y a mise en évidence d'un nouveau gène GalK qui appartient à la chaîne du métabolisme.
- Directes informationnelles : elles concernent les gènes des ARNt.

La seconde mutation a lieu dans le gène de l'ARNt et implique la mutation de l'anticodon de cet ARN. Ce nouvel ARNt va pouvoir insérer un acide aminé dans la chaîne polypeptidique, même s'il lit un codon stop, la chaîne continue.

Exemple de mutation :

- Mutation supE : elle inclut Glu en face du codon stop AMBRE (UAG).
 - Mutation supF : elle inclut Tyr en face du codon AMBRE.
 - Mutation supL : elle inclut Lys en face dans codons AMBRE et OCHRE (UGA).
 - Remarques : AMBRE → UAG ; OCHRE → UGA ; OPALE → UAA.
- Indirect informationnelles : elles concernent les gènes impliqués dans la traduction des ARNm en affectant l'efficacité.

C\ Nature des mutations.

1\ Fidélité de la réplication.

Les mutations apparaissent essentiellement au moment de la réplication. Cette mutation va être fixée au cycle de réplication suivant.

Si, pendant la réplication, il y a erreur, la cellule peut réaliser une correction. Cela explique pourquoi, in vivo, le taux de mutation est très faible.

2\ Modification de base.

La modification de base se déroule après la réplication.

Par exemple, une cytosine qui perd son NH₂ devient une tyrosine. La mutation sera fixée par la réplication.

3\ Réarrangements.

Les réarrangements ont lieu pendant la synthèse ou après la réplication. Ce sont des phénomènes très rares.

IV\ Mutagenèse.

On peut réaliser une mutagenèse par des agents chimiques (NitrosoGuanidine), par des agents physiques (UV qui créent des dimères de T), avec des transposons (très pratique).

On augmente la fréquence de transposition en accroissant l'expression de la transposase. Si la transposition porte un gène de plasmide juste à côté d'un gène chromosomique, cela les lie. Les deux phénotypes seront toujours retrouvés ensemble. Si un des deux gènes n'est pas sélectionnable et qu'on le lie à un gène sélectionnable, cela le fait passer d'une situation de repérage à une situation de sélection → C'est un avantage.

Comme inconvénient, on ne pourra pas isoler de mutant de ce genre essentiel car, quand un transposon entre dans un gène, il l'inactive.

Mutagenèse dirigée.

WWW.BIODEUG.COM