

2 ème partie

D'une génération à l'autre

ou :

comment les gènes sont-ils transmis et brassés ?

**Chapitre 11 Etude de la troisième conséquence de la méiose, la recombinaison intrachromosomique : cas de la levure.**

- |   |             |
|---|-------------|
| <b>1. Recombinaison entre gènes.</b>  | <b>page</b> |
| <i>1.1. mise en évidence.</i>   |             |
| <i>1.2. étude de tétrades et mécanisme de la recombinaison intrachromosomique.</i>  |             |
| <i>1.3. fréquence de recombines.</i>  |             |
| <b>2. Recombinaison entre gènes et centromères.</b>   | <b>page</b> |
| <b>3. Liaison et distance génétique.</b>  | <b>page</b> |
| <i>3.1. les fréquences faibles sont additives : la fréquence de recombines exprime une distance génétique proportionnelle à la distance réelle.</i> |             |
| <i>3.2. les fréquences élevées ne sont pas additives.</i>   |             |
| 3.2.1. analyse caractère par caractère.   |             |
| 3.2.2. analyse simultanée de deux caractères.   |             |
| <b>4. Notion de recombinaison intragénique.</b>   | <b>page</b> |
| <b>5. Carte génétique de la levure.</b>   | <b>page</b> |
| <b>6. Conclusions.</b>  | <b>page</b> |

## Chapitre 11 : Etude de la troisième conséquence de la méiose, la recombinaison intrachromosomique : cas de la levure.

Jusqu'à présent, nous avons considéré les chromosomes comme des structures ayant une intégrité totale au cours des divisions, grâce à la réplication semi conservative. Autant cela est totalement exact au cours des mitoses, autant nous allons voir que les choses sont moins simples au cours de la méiose. Dans ce chapitre, nous allons étudier la destinée de gènes situés sur le même chromosome. Nous le ferons ici chez la levure, en attendant d'envisager des généralisations, chez d'autres organismes, dans le chapitre suivant.

### 1. Recombinaison entre gènes situés sur le même chromosome.

#### 1.1. Mise en évidence.

La souche de phénotype [ his- ] utilisée dans le chapitre précédent est croisée avec une souche de phénotype auxotrophe pour la méthionine [ met- ]. Par répliques on constate qu'il existe 4 catégories de spores, en quantités non identiques, même si l'on tient compte de variations d'échantillonnage :

$$439 \text{ [ his- met+ ]} \quad 420 \text{ [ his+ met- ]} \quad 68 \text{ [ his+ met+ ]} \quad 73 \text{ [ his - met- ]}$$

Suivons tous les conseils prodigués dans les chapitres précédents et **ne brûlons pas la moindre étape !!**

- l'hypothèse d'une seule différence génétique correspondant à la différence phénotypique [ his- ] / [ his+ ] peut être conservée puisque nous observons 512 individus (439+73) [ his- ] et 488 individus (420+68) [ his+ ] ( $X^2$  non significatif). Ce résultat confirme celui observé dans le chapitre précédent, ce qui n'est pas étonnant puisque le même mutant auxotrophe pour l'histidine est étudié.

Soient a et a+ les deux allèles du gène en cause

- l'hypothèse d'une seule différence génétique correspondant à la différence phénotypique [ met- ] / [ met+ ] peut également être conservée puisque nous décomptons 507 individus ( 439+68 ) [ met+ ] et 493 individus (420+73) [ met- ] ( $X^2$  non significatif).

Soient b et b+ les deux allèles du gène en cause

- nous constatons qu'il existe une recombinaison des **caractères** et que *qualitativement* le résultat est le même que celui observé dans le chapitre précédent : il existe deux associations parentales et deux associations recombinées.

Les hypothèses envisagées sont jusque là strictement identiques à celles envisagées dans le croisement [ his- ] X [ try- ] du chapitre précédent. Mais l'observation quantitative des résultats expérimentaux pose un nouveau problème :

en effet, si les deux couples d'allèles a / a+ et b / b+ sont sur des chromosomes différents, nous nous attendons à observer des quantités égales des 4 phénotypes possibles ( les deux parentaux, correspondant aux génotypes ab+ et a+b, les deux recombinés, correspondant aux génotypes a+b+ et a-b- ). Comme ce n'est pas le cas nous ne pouvons pas conserver l'hypothèse : les deux gènes envisagés ne sont pas sur des chromosomes différents. Et,

**s'ils ne sont pas sur des chromosomes différents... on voit mal comment ne pas faire une hypothèse très simple : les deux gènes sont sur le même chromosome !**

**Cette situation n'empêche manifestement pas la production (aspect qualitatif) de recombinés. Mais, on observe que les combinaisons parentales sont majoritaires (aspect quantitatif) : il n'y a donc pas indépendance génétique. On dit qu'il existe une liaison génétique ou que les gènes les gènes sont liés**

## 1.2. Etude de tétrades et mécanisme de la recombinaison intra-chromosomique.

400 tétrades issues du même diploïde sont étudiées :

294 sont ditypes parentales : 2 [ his-met+ ] et 2 [ his+ met- ]  
5 sont ditypes recombinées : 2 [ his+ met+ ] et 2 [ his - met - ]  
101 sont tétratypés : 1 [his-met+] 1 [his+ met-] 1 [his+met+] 1 [his-met-].

Il y a ségrégation 2 / 2 dans toutes les tétrades, pour la différence phénotypique [his-] / [his+] (donc un seul gène en cause). Il y a également ségrégation 2/2 pour la différence phénotypique [ met-] / [met+] ( donc un seul gène en cause).

Si ces deux couples d'allèles sont sur des chromosomes différents, on s'attend à observer autant de tétrades ditypes parentales que de tétrades ditypes recombinées : ce n'est manifestement pas le cas. Puisqu'on ne peut conserver l'hypothèse de deux chromosomes différents nous sommes conduits, comme dans l'analyse des spores en vrac, à imaginer que les deux gènes sont sur le même chromosome.

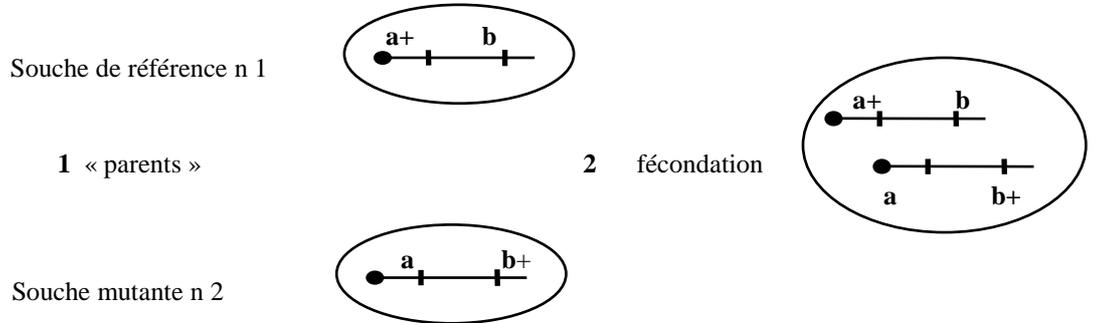
L'obtention de tétrades ditypes parentales correspond à une succession d'évènements qui est banale : après constitution du diploïde, il y a duplication de l'ADN, appariement des chromosomes homologues, puis une deuxième division . On obtient des tétrades contenant 2 individus ab+ et deux individus a+b (figure 80).

Ces **tétrades ditypes parentales sont les plus nombreuses**. A côté d'elles, on observe des tétrades tétratypés ( ab+ , a+b , a+b+ , ab ) et de rares tétrades ditypes recombinées ( 2 a+ b+ et 2 ab ) ( 1 ).

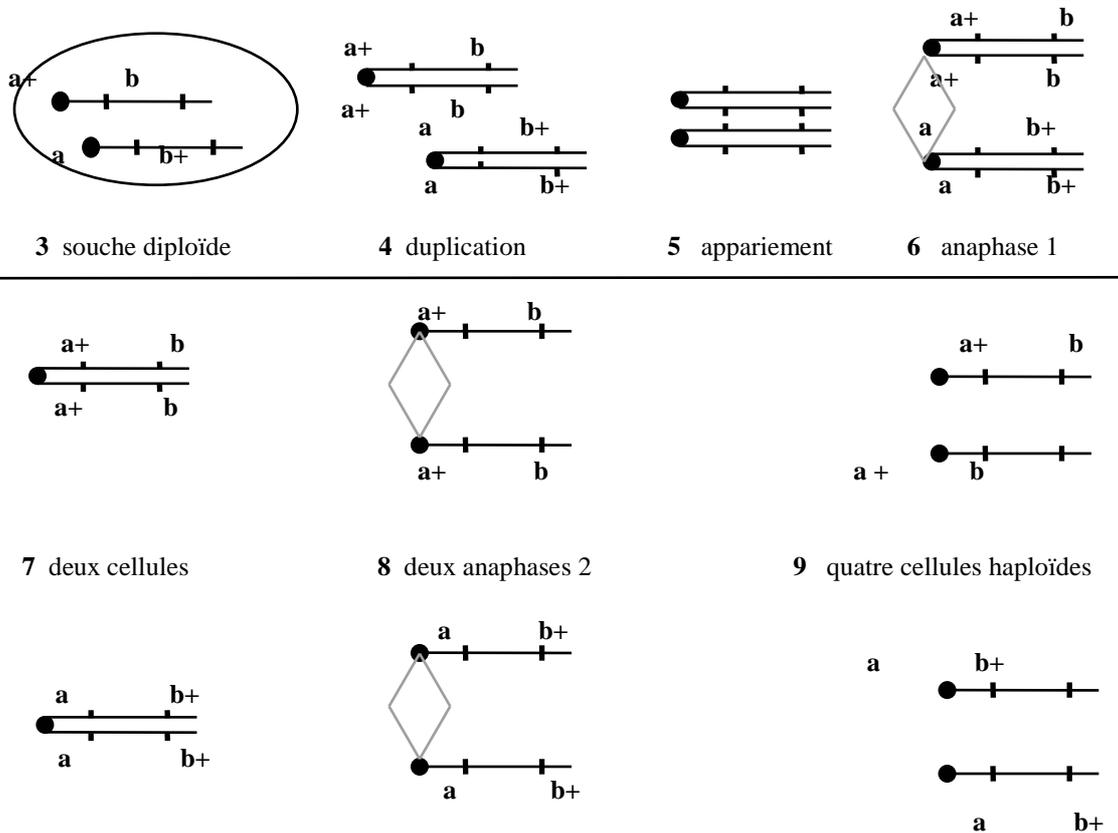
**Figure 80 : obtention des tétrades ditypes parentales dans le cas de gènes situés sur le même chromosome.**

(le même que celui des figures 62 et 66).

P  
r  
é  
l  
i  
m  
i  
n  
a  
i  
r  
e  
s



M  
E  
I  
O  
S  
E



(1) : l'existence d'autres types de tétrades poserait bien des problèmes : même remarque que note 1 page 144.

Ces tétrades tétratypiques et ditypes recombinées proviennent d'évènements affectant l'ADN : les longues molécules appariées subissent des phénomènes de coupure et de réunion, grâce à un arsenal complexe de protéines, dont certaines ont des propriétés proches de celles des enzymes intervenant dans les processus de réparation (figure 57).

Ces phénomènes se produisent après la réplication et affectent deux chromatides.

Lorsque les deux chromatides affectés sont issus de la même molécule modèle (on dit qu'elles sont soeurs), il n'y a pas de conséquence *visible*.

Par contre, lorsque les deux chromatides affectés sont issus de molécules-modèles différentes (on dit alors qu'elles sont « non-soeurs »), il y a échange réciproque de matériel génétique ou **crossing over** (3). Si un seul crossing over se produit, les deux autres chromatides non-soeurs restent intacts. À la suite des deux divisions de la méiose, on obtient alors une tétrade contenant 4 spores différentes. Deux correspondent aux chromosomes-fils intacts (deux génotypes parentaux) ; deux spores correspondent aux chromosomes-fils ayant subi un échange réciproque (deux génotypes recombinés) : il s'agit donc d'une **tétrade tétratypique** (figure 81, 5 bis, 6 bis, 7 bis et encart 30).

Il peut se produire plusieurs crossing over. Lorsque deux se produisent entre les deux gènes considérés et qu'ils affectent les 4 chromatides, on obtient 4 spores de génotypes recombinés, formant une tétrade ditype recombinée (figure 81, 5 ter, 6 ter, 7 ter et encart 30).

On observe que les tétrades ditypes recombinées sont plus rares que les tétrades tétratypiques, elles-mêmes plus rares que les tétrades ditypes parentales.

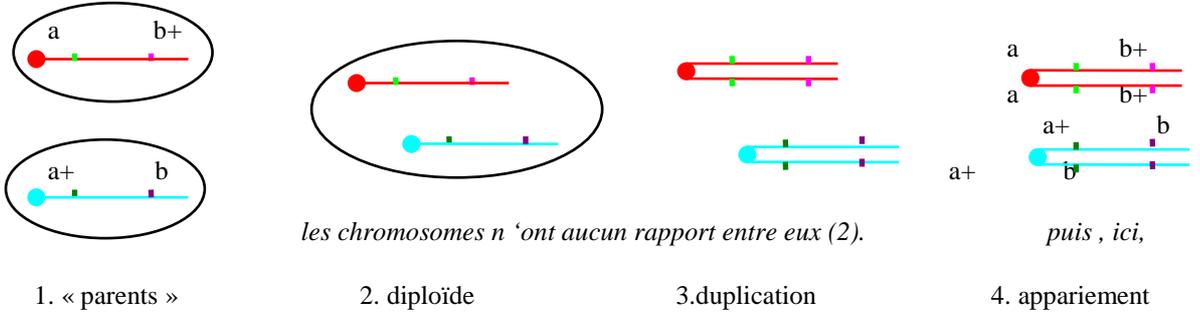
**Cela signifie que l'absence de crossing over est plus fréquente que l'existence d'un crossing over affectant deux chromosomes-fils différents, elle-même plus fréquente que 2 crossing over affectant les 4 chromosomes fils**

**pas de crossing over > 1 crossing over > 2 crossing over**

## Figure 81 : conséquences de crossing over entre chromatides non soeurs.

a = ■ a+ = ■ b = ■ b+ = ■

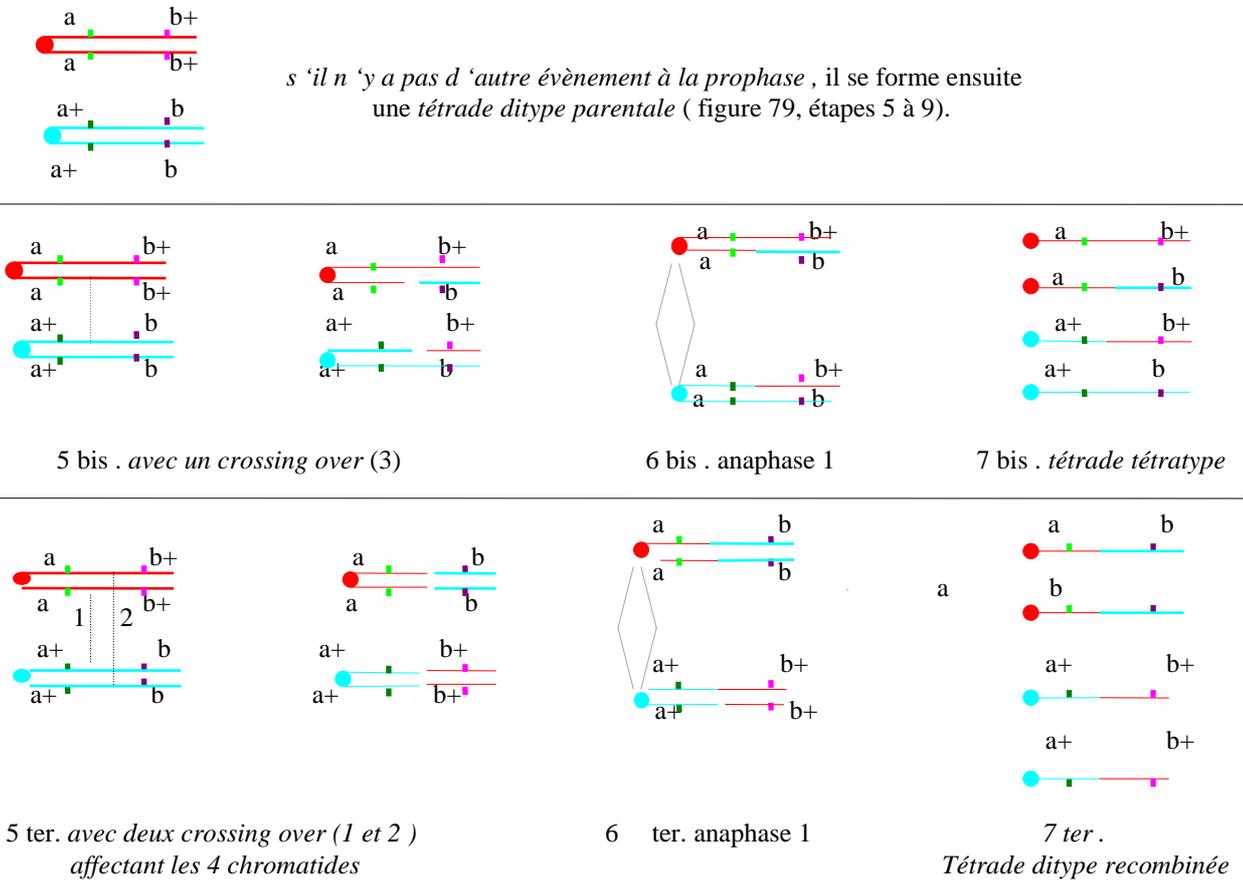
évènements communs à toute méiose :



*les chromosomes n'ont aucun rapport entre eux (2).*

*puis, ici,*

*s'il n'y a pas d'autre évènement à la prophase, il se forme ensuite une tétrade ditype parentale (figure 79, étapes 5 à 9).*



( 2 ) : Les schémas des stades 1 , 2 , 3 ne reflètent pas du tout la réalité : les chromosomes sont en réalité très superposés et enchevêtrés les uns avec les autres . Ce désordre réel est symbolisé par le décalage entre les deux centromères. Par contre, au stade suivant, l'appariement est figuré par une mise en ordre des centromères et des gènes : le dessin est alors beaucoup plus proche de la réalité.

(3) : Le terme « crossing-over » est tellement entré dans le langage des généticiens qu'il est vain de vouloir s'en passer. A une époque lointaine où le français pouvait encore espérer concurrencer les langages anglo-saxons , on a tenté de le remplacer par « enjambement réciproque » . Cette traduction a fait tellement sourire qu'elle a été abandonnée. « Echange réciproque » sera parfois utilisé dans ce texte mais sans illusion...

### 1.3. Fréquence des recombinés.

Elle est mesurée de la même manière que dans le chapitre précédent. Il s'agit du rapport du nombre des produits de la méiose qui sont recombinés, ramené au nombre total d'individus haploïdes considérés. Dans le cas qui nous intéresse ici les associations parentales sont  $ab^+$  et  $a^+b$ , les génotypes recombinés sont  $ab$ ,  $a^+b^+$ . Nous avons donc :

$$\text{Fréquence de génotypes recombinés} = \frac{ab + a^+b^+}{ab^+ + a^+b + ab + a^+b^+}$$

Ce calcul est direct en ce qui concerne les spores en vrac : parmi les 1000 spores étudiées, il y a 73 spores [ $his$ - $met$ -] et 68 spores [ $his$ +  $met$ +] dont les génotypes sont recombinés, soit donc  $141 / 1000 = 0,141$  recombinés.

Lorsque l'on dispose de tétrades il faut être un peu plus attentif : le nombre total de spores étudiées est de 1600 (400 tétrades contenant chacune 4 spores), détermination qui ne pose aucun problème. Par contre, quel est le nombre de spores de génotype recombiné ? Il y en a 20 dans les tétrades ditypes recombinées (5 tétrades dont les 4 spores sont de génotype recombiné). Il y en a 202 dans les tétrades tétratypiques (101 tétrades dont 2 spores seulement correspondent à l'un ou à l'autre des génotypes recombinés - les deux autres étant de l'un ou l'autre des génotypes parentaux.).

la fréquence de recombinés est ici de  $20 + 202 / 1600 = 0,126$  recombinés

Le test statistique habituel montre très facilement que les deux résultats observés, en spores (0,141) et en tétrades (0,126) ne sont pas significativement différents (4).

## 2. Recombinaison entre gènes et centromères

Nous avons vu qu'il existe également des tétrades tétratypiques correspondant à quatre combinaisons génétiques dans le cas de gènes situés sur des chromosomes différents. Dans le chapitre précédent nous n'avons pas interprété leur existence. Manifestement la migration des centromères ne peut les expliquer. Par contre, la possibilité de crossing over permet d'en rendre compte : il suffit d'un **crossing-over entre l'un des deux gènes et son centromère pour que l'on obtienne une tétrade tétratypique. Lorsque deux gènes sont sur des chromosomes différents** Cela ne change strictement rien à la fréquence de recombinés qui, dans le cas de chromosomes différents, correspondent, rappelons le, à la migration aléatoire des centromères. D'ailleurs, en spores en vrac ou en gamètes, rien n'aurait été observé! (5).

Comme on peut l'imaginer facilement, plus le gène est éloigné de son centromère, plus il peut se produire de crossing over : la fréquence de tétrades tétratypiques obtenues lorsque l'on croise deux mutants permet d'estimer leur distance à leur centromère respectif (5).

## 3. Liaison et distance génétique.

### 3.1. la fréquence de recombinés est une constante pour deux gènes donnés.

Lorsque deux différences phénotypiques correspondent à deux différences génétiques seulement, on observe une fréquence de recombinés de 0,50 (les gènes sont génétiquement indépendants) ou une fréquence inférieure à 0,50 (les gènes sont liés, c'est à dire situés sur le même chromosome).

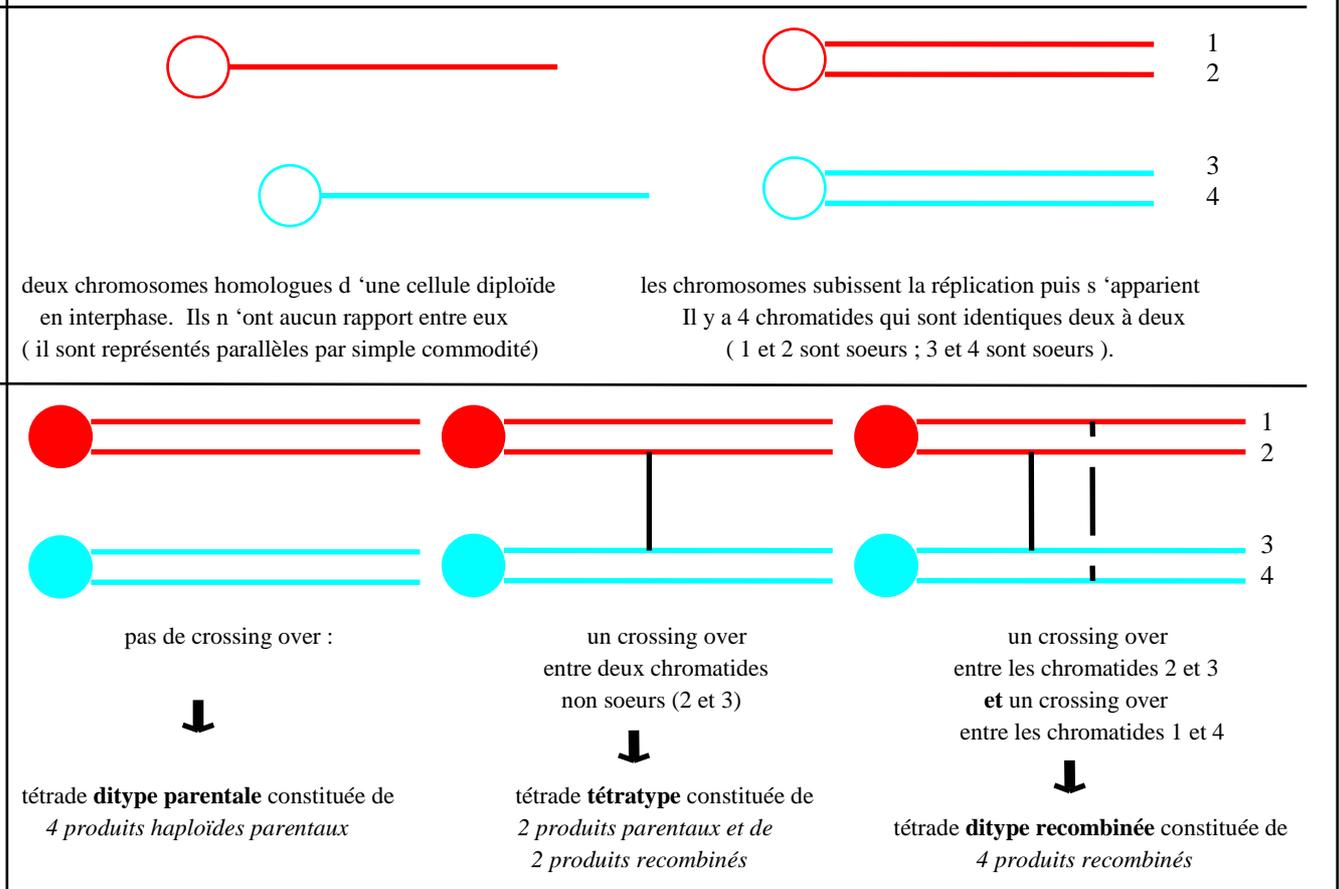
Ces **fréquences de recombinés sont reproductibles** lorsque l'on fait plusieurs fois l'analyse d'un même croisement (aux variations d'échantillonnage près)

On constate également que la fréquence de recombinés est la même que le croisement soit en cis ou en trans : trans :  $ab^+ \times a^+b$  : les recombinés sont  $ab$  et  $a^+b^+$  ; cis :  $ab \times a^+b^+$  : les recombinés sont  $ab^+$  et  $a^+b$  (6).

Ces deux constatations indiquent que <b>la fréquence de recombinés est caractéristique des deux gènes étudiés.</b>
--

**Encart 30** : et encore un peu de vocabulaire ! Et encore les mêmes choses dites ( un peu ) autrement !

On a l'habitude de parler de **chromatides** juste après la réplication et de **chromosomes-fils** dans les produits de la méiose : en réalité, les deux termes sont biologiquement synonymes. Tous les deux désignent une molécule d'ADN provenant de la réplication d'une molécule modèle ( et éventuellement modifiée par les crossing over). Les dessins qui suivent résument ce que l'on a vu dans la figure 80 .



(4) : rappel : le  $\chi^2$  se fait sur les nombres et non sur les fréquences

(5) : dans ce chapitre nous ne faisons qu'effleurer quelques points qui ont fait les délices des généticiens « formels », il y a déjà quelques temps. Les diverses précautions oratoires qui sont prises nécessiteraient des développements importants pour être sérieusement expliquées. Nous avons jugé qu'ils sortent du cadre de cet ouvrage

(6) : cis et trans sont une nomenclature créée par les chimistes . Elle a été reprise par les généticiens lorsqu'ils ont défini le gène comme unité fonctionnelle. . Nous n'avons pas jugé nécessaire, à notre niveau d'analyse, de définir le **cistron** dans le chapitre 7 . Les lecteurs qui connaîtraient ce terme peuvent le remplacer par celui de gène. Par contre , s'ils souhaitent le conserver dans leur vocabulaire , ils doivent être capables d'expliquer que le test de complémentation fonctionnelle ( étude de  $a/a^+$  , de  $b/b^+$  et de  $ab^+/a+b$  ) est une variante un peu moins rigoureuse que le test cis - trans ( étude de  $ab^+/a+b$  et de  $ab/a+b^+$ ). Tout cela est un exemple de ce qui est commenté dans la note 5, ci-dessus.

### 3.2. les fréquences faibles sont additives : la fréquence de recombines exprime une distance génétique.

On dispose de trois souches mutantes haploïdes de levure : l'une est auxotrophe pour le tryptophane, [try-] ; la deuxième est auxotrophe pour l'histidine, [his-] ; la troisième n'utilise pas le galactose comme source de carbone, [gal-] (7), tandis que la souche de référence est prototrophe pour le tryptophane, [try+] et l'histidine, [his+] et croît sur un milieu contenant du galactose, [gal+].

Le croisement de chacune des souches mutantes avec la souche de référence indique (figure 82) que chacun des caractères mutants étudiés ici est à déterminisme monogénique : en effet, aux variations d'échantillonnage près, on trouve autant de [try-] que de [try+], autant de [his-] que de [his+] autant de [gal-] que de [gal+] (les X<sup>2</sup> ne sont pas significatifs)

cette observation se retrouve dans les croisements entre souches mutantes:

[try-] X [his-] : 602 [try-], 600 [try+], 608 [his- 594 his+]

[try-] X [gal-] : 609 [try-], 607 [try+], 603 [gal- 613 gal+]

[his-] X [gal-] : 688 [his-], 704 [his+], 701 [gal- 691 gal+]

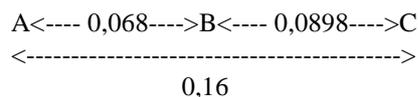
Par ailleurs, le croisement de [try-] par [his-] produit 0,068 recombines. Celui de [try-] par [gal-] en donne 0,160. Enfin le croisement [his-] X [gal-] donne 0,090 de spores semblables à la souche de référence [his+ gal+] ou doubles mutantes [his- gal-].

Résumons nous: tout d'abord, nous avons ainsi déterminé trois gènes :

A : a pour [try-] / a+ pour [try+] ; B : b pour [his-] / b+ pour [his+] ; C : c pour [gal-] / c+ pour [gal+].

Puis nous avons observé que A et B sont liés, A et C sont liés, B et C sont liés. Ces trois gènes **liés** sont situés sur le **même chromosome**.

On remarque que la fréquence de recombines A C (0,160) est très proche de la **somme** de la fréquence de recombines AB et de la fréquence de recombines BC : 0,068 + 0,09 = 0,158. Une hypothèse unificatrice rend très bien compte des résultats. Elle est représentée ci-dessous et elle signifie tout simplement que le gène B est situé entre les gènes A et C



Il ne s'agit pas d'un résultat dû au hasard. L'étude de nombreux autres cas conduit à la même constatation : aux variations d'échantillonnage près, les fréquences de recombines peuvent se comporter comme des **grandeurs additives**.

Cette constatation est facile à interpréter : le crossing over, qui est le résultat d'évènements enzymatiques, est d'autant plus fréquent que la longueur d'ADN entre deux gènes est grande. Autrement dit, la fréquence de recombines, qui est une **distance génétique** est en rapport direct avec la **distance physique** entre les gènes.

En première approximation, une distance génétique s'exprime de la manière suivante (si le croisement étudié est a+ b X a b+, comme ici) :

$$d = \frac{\text{nbre de chromosomes recombines observés}}{\text{nbre total de chromosomes étudiés}} \times 100 = \frac{ab + a^+b^+}{ab^+ + a^+b + ab + a^+b^+} \times 100$$

**Par convention, 1% de recombines représente l'unité de distance génétique que l'on appelle centimorgan (8).**

**Figure 82 : mise en évidence de liaisons entre 3 gènes de levure.**

<u>[try-] X ref :</u>	<u>[his-] X ref</u>	<u>[gal-] X ref</u>
spores [ try - ] : 125 spores [ try+]: 137	spores [ his -] 98 spores [ his+] 89	spores [ gal -] 112 spores [ gal+] 117
<u>[try -] X [his -]</u>	<u>[try -] X [gal -]</u>	<u>[his -] x [gal -]</u>
spores [ try -]        557 spores [ his -]        563 spores [ try - his -]    45 spores [ try+his+]    37	spores [ try - ]        514 spores [gal - ]        508 spores [ try - gal -]    95 spores [ try+ gal+]    99	spores [ his - ]        627 spores [ gal -]        640 spores [ his - gal -]    61 spores [ his+gal+]    64

(7) : attention à la notation des phénotypes : [gal -] signifie « incapable d'utiliser le galactose » tandis que [ gal+ ] est capable de s'en satisfaire comme source de carbone . Il ne faut pas traduire par « auxotrophe ou prototrophe pour le galactose ».

(8): « centimorgan » honore un généticien du nom de Morgan , qui travaillait sur la drosophile , matériel qu'il a « inventé » vers 1914.

### 3.3. les distances élevées ne sont pas additives.

On croise une souche de référence prototrophe ,avec une souche mutante qui est auxotrophe à la fois pour le tryptophane, la lysine, l 'adénine et la leucine . La souche diploïde obtenue, mise dans des conditions de sporulation , donne 800 spores qui ont été analysées par répliques sur différents milieux ( figure 83 ).

#### 3.3.1.analyse caractère par caractère.

S 'il n y avait qu 'une différence génétique entre la souche mutante et la souche de référence on ne devrait trouver que des spores identiques aux deux parents , en nombres égaux : des prototrophes et des tétra-auxotrophes. Comme ce n 'est manifestement pas le cas, plusieurs gènes sont en cause.

Faisons l 'hypothèse d 'un déterminisme monogénique pour chacun des caractères d 'auxotrophie. Pour conserver ou non cette hypothèse, nous devons dénombrer les spores, caractère par caractère (figure 84) .

$$[ \text{trp} - ] : 71+74+56+44+51+51+29+38 = 414 \quad [ \text{trp} + ] : 71+47+79+53+40+31+40+25 = 386$$

$$[ \text{lys} - ] : 71+74+47+44+53+51+31+25 = 396 \quad [ \text{lys} + ] : 71+79+56+40+51+40+29+38 = 404$$

$$[ \text{ade} - ] : 71+74+56+40+51+31+40+25 = 388 \quad [ \text{ade} + ] : 71+47+79+44+53+51+29+38 = 412$$

$$[ \text{leu} - ] : 71+47+79+44+51+31+40+38 = 401 \quad [ \text{leu} + ] : 71+74+56+53+40+51+29+25 = 399$$

Dans chaque cas, le test  $X^2$  montre que les nombres observés ne sont pas statistiquement différents de ceux que l 'on attend en théorie , dans l 'hypothèse d 'une seule différence génétique ( 50% / 50% ) , soit donc ici 400 de chaque type , dans chaque opposition auxotrophes / prototrophes. Dans chaque cas on peut donc conserver l 'hypothèse monogénique, ce qui conduit à écrire le diploïde (9):

$$\frac{a}{a+} \quad \dots \quad \frac{b}{b+} \quad \dots \quad \frac{c}{c+} \quad \dots \quad \frac{d}{d+}$$

#### 3.3.2. Analyse simultanées de deux caractères

Les résultats correspondent à une fréquence de recombinés non différente de 0,50 dans tous les croisements, à l 'exception de A X B (0,41) et de A X C (0, 37): A est donc lié à la fois à B et à C. Pourtant, on ne retrouve pas la belle logique du cas précédent : B et C donnent une fréquence de recombinés de 0,50 et *apparaissent* ainsi non liés. En réalité, cette contradiction n 'est qu 'apparente, nous allons voir pourquoi.

<b>Figure 83 : analyse génétique d 'une souche tétra-auxotrophe.</b>										
Pour simplifier la présentation des résultats les phénotypes sont représentés dans chaque colonne par + (prototrophes pour le caractère) ou par - (auxotrophes pour le caractère ).  Exemple : il y a 47 spores [ try + lys - ade + leu - ] .	try	lys	ade	leu		trp	lys	ade	leu	
	-	-	-	-	71	+	+	-	+	40
	+	+	+	+	71	-	+	-	-	51
	-	-	-	+	74	-	-	+	+	51
	+	-	+	-	47	+	-	-	-	31
	+	+	+	-	79	+	+	-	-	40
	-	+	-	+	56	-	+	+	+	29
	-	-	+	-	44	-	+	+	-	38
	+	-	+	+	53	+	-	-	+	25

**Figure 84 : analyse simultanée de deux caractères de la souche tétra-auxotrophe.**

Les sommes représentent les individus parentaux ( ex : 470 ) ou recombinés ( ex : 330 )  
pour chaque couple de caractères .

	types	[ try - lys - ] = ab	[ try+lys+ ] = a+b+	[ try - lys - ] = a b+	[ try + lys - ] = a+b
A / B	nombres	71 + 74 + 44 + 51	71 + 79 + 40 + 40	56 + 51 + 29 + 38	47 + 53 + 31 + 25
	somme	470		330	
	types	[ try - ade - ] = ac	[ try+ ade+ ] = a+c+	[ try - ade+ ] = ac+	[ try+ ade - ] = a+c
A / C	nombres	71 + 74 + 56 + 51	71 + 47 = 79 + 53	44 + 51 + 29 + 38	40 + 31 + 40 + 25
	somme	502		298	
	types	[ try - leu - ] = ad	[ try+ leu + ] = a+d+	[ try - leu+ ] = ad+	[ try+ leu - ] = a+d
A / D	nombres	71 + 44 + 51 + 38	71 + 53 + 40 + 25	74 + 56 + 51 + 29	47 + 79 + 31 + 40
	somme	393		407	
	types	[ lys - ade - ] = bc	[ lys+ ade+ ] = b+c+	[ lys - ade+ ] = bc+	[ lys+ ade - ] = b+c
B / C	nombres	71 + 74 + 31 + 25	71 + 79 + 29 + 38	47 + 44 + 53 + 51	56 + 40 + 51 + 40
	somme	418		382	
	types	[ lys - leu - ] = bd	[ lys+ leu+ ] = b+d+	[ lys- leu+ ] = bd+	[ lys+ leu - ] = b+d
B / D	nombres	71 + 47 + 44 + 31	71 + 56 + 40 + 29	74 + 53 + 51 + 25	79 + 51 + 40 + 38
	somme	389		411	
	types	[ ade - leu - ] = cd	[ade+ leu+ ] = c+d+	[ ade - leu + ] = bd+	[ ade+ leu - ] = b+d
C / D	nombres	71 + 51 + 31 + 40	71 + 53 + 51 + 29	74 + 56 + 40 + 25	47 + 79 + 44 + 38
	somme	397		403	

( 9 ) : les pointillés symbolisent l 'ignorance dans laquelle on est en ce qui concerne la liaison ou l 'indépendance. Cette représentation commode est pourtant rarement utilisée : il est donc opportun de l 'expliciter lorsqu 'on l 'utilise.

La fréquence de recombinés est un fait expérimental : est-ce que cette fréquence représente toujours correctement la fréquence des événements de recombinaison ? Poser la question doit interpellier le lecteur : s'il examine à nouveau la figure 80 et l 'encart 30, il peut constater que les tétrades ditypes recombinées correspondent à deux crossing over qui ont affecté les 4 chromatides. La figure 85 montre que les double crossing over peuvent correspondre à d 'autres situations, donnant des tétrades différentes.

**La fréquence de recombinés** est donc en réalité une **estimation minimale** des individus correspondant à des **remaniements**. Lorsque la distance entre les gènes est faible, l 'erreur est négligeable car les événements doubles sont très rares (10). Lorsque une certaine distance (11) est dépassée, les doubles (voire triples ou multiples événements) deviennent monnaie courante. Certains des individus observés en tant que parentaux, peuvent en réalité correspondre à des chromosomes remaniés deux ou plusieurs fois.

L'expression de la distance génétique devrait être :

$$d = \frac{\text{nombre de remaniements}}{\text{nombre total de chromosomes fils}} \times 100$$

alors que l'on doit la plupart du temps **se contenter** de l'expression déjà vue :

$$d = \frac{\text{nombre de chromosomes remaniés observés}}{\text{nombre total de chromosomes fils}} \times 100$$

Il ne faut pas croire qu'il s'agit d'un détail. Par exemple ce défaut d'analyse explique l'apparente incohérence des résultats enregistrés plus haut :

AXB (  $d = 0,41$  ) ; AXD (  $d = 0,37$  ) donc A lié à B et à D. Mais, BXD  $d = 0,50$  donc B et D *apparemment* non liés

En réalité , B et D sont situés de part et d'autre de A. Ils sont donc très éloignés, *au moins* à 78 centimorgans l'un de l'autre (  $41 + 37$  ). La fréquence de leurs recombines **ne peut** cependant **pas** dépasser 0,50, pour la simple raison, que certains des très nombreux crossing over qui peuvent se produire s'annulent les uns les autres . Finalement, on en arrive à une égalité entre les 4 catégories de génotypes possibles (  $bd+$  et  $b+d$  , parentales ,  $bd$  et  $b+d+$  , recombines ) et à une fréquence de recombines de 0,50.

Pour mieux comprendre, on peut illustrer la fréquence de recombines en fonction de la distance *physique* entre les gènes . D'abord proportionnelle à la distance physique, la fréquence de recombines observés, tend vers 0,50 qui est la valeur obtenue lorsque la distance physique est très grande (figure 86).

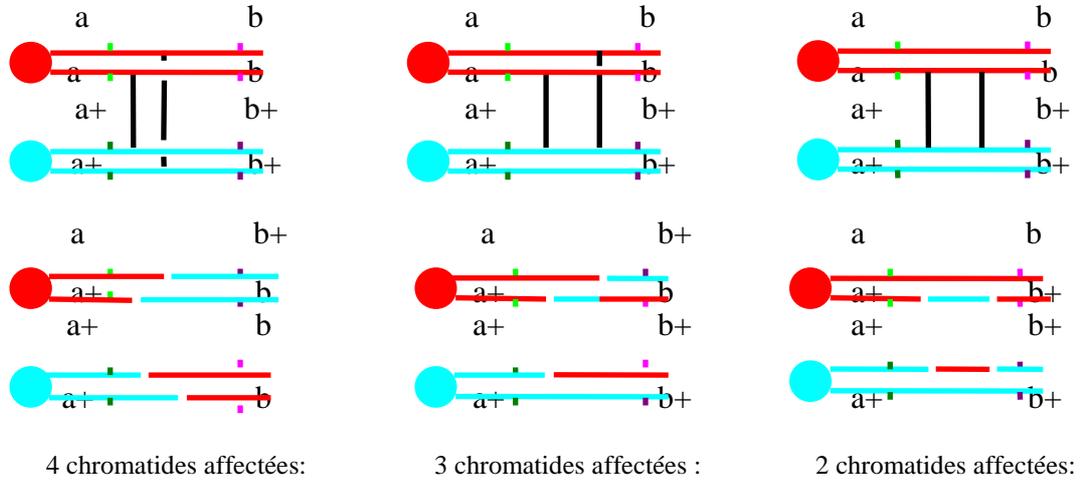
Cette observation éclaire notre manière de conclure le chapitre 10 :

« *Lorsque deux gènes sont situés sur deux chromosomes différents la fréquence de recombines est de 0,50* ». est une proposition tout à fait correcte ( évidemment ! ! ).

Mais il faut être attentif : lorsqu'on observe une fréquence de 0,50, cela peut aussi correspondre dans certains cas à deux gènes situés très loin l'un de l'autre sur le même chromosome d'où la non-réversibilité de la proposition :

**autant la liaison génétique est sans ambiguïté ( une fréquence de recombines inférieure à 0,50 correspond à deux gènes situés sur le même chromosome) , autant l'indépendance génétique ( 0,50 de recombines ) peut être due à l'indépendance physique ( 2 gènes sur 2 chromosomes différents) ou non ( 2 gènes très éloignés sur un même chromosome).**

**Figure 85 : résultats des doubles crossing-over.**



après les deux divisions on obtient

tétrades ditypes recombinées

les 4 individus sont recombinés et observés en tant que tel.

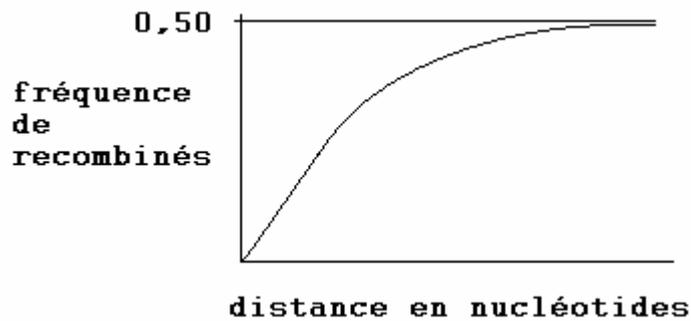
tétrades tétratypes

un chromosome doublement **remanié** donne un individu de type *parental*

tétrades ditypes parentales

les 2 chromosomes doublement **remaniés** donnent 2 individus de type *parental*

**Figure 86 : fréquence de recombinés et distance physique entre deux gènes liés.**



(10) : l'expression de la fréquence d'un double crossing-over est de l'ordre du carré de l'évènement simple.

(11) : la distance physique entre gènes donnant une fréquence de recombinés directement proportionnelle dépend de l'organisme considéré.

#### 4. Notion de recombinaison intragénique.

On possède des souches mutantes, qui n'utilisent pas le galactose comme source de carbone : elles sont notées [gal-] (12). On étudie trois de ces souches A, B, C, obtenues de manière indépendante. Une première expérience indique que le déterminisme génétique du phénotype mutant est monogénique dans chaque cas, car on obtient autant de [gal+] que de [gal-] dans des spores issues du croisement de chaque mutant avec la souche de référence ( $\chi^2$  non significatif).

Les mutants sont ensuite étudiés classiquement, tout d'abord en constituant des diploïdes (figure 87). On conclut que le caractère de chacun des mutants est récessif (chapitre 6) et que les souches A et B ne complètent pas. Il s'agit d'allèles du même gène alors que la souche C est affectée pour un gène différent de celui de A et de B puisque 'il y a complémentation (chapitre 7).

Puis, les diploïdes mutants sont mis dans des conditions de sporulation. Une première expérience indique que 200 spores issues de chacun des trois diploïdes mutants ne donnent aucune spore [gal+]. L'expérimentateur n'est pas étonné par ce résultat, en ce qui concerne A et B, puisque 'il sait que les deux souches sont affectées dans le même gène.

Lorsqu'il pousse plus loin l'expérience en étudiant 200.000 spores, il trouve quelques spores sur un milieu galactose :

A X B 12 spores [gal+]                      A X C 20 spores [gal+]                      B X C 5 spores [gal+]

Comment expliquer l'apparition de spores [gal+] et les fréquences de ces spores (13) dans les trois croisements?

Soient a, b et c les mutations en question (la souche de référence étant a+b+c+). Les trois diploïdes peuvent être écrits

<p>A X B :      a b+ -----           a+ b</p>	<p>A X C :      a c+ -----           a+ c</p>	<p>B X C :      b c+ -----           b+ c</p>
---	---	---

Dans les trois cas, on obtient des individus [gal+] par **recombinaison** : ils sont respectivement a + b+, a + c +, b+ c + dans chacune des trois descendance. Leur **petit nombre** sur 200.000 spores indique une **liaison génétique très forte**.

La recombinaison que nous connaissons est réciproque : cela implique que des doubles mutants (ab, ac ou bc) sont produits dans des proportions équivalentes. Il est raisonnable (14) de penser qu'ils sont de phénotype [gal-] : ils sont alors confondus avec les individus de génotypes parentaux. Nous n'observons en réalité que la *moitié* des recombinants.

Les distances génétiques sont donc *ici* :

$$A / B : \frac{a+b+ \times 2}{200000} \times 100 = 12 \cdot 10^{-3}$$

$$A / C : \frac{a+c+ \times 2}{200000} \times 100 = 20 \cdot 10^{-3}$$

$$B / C : \frac{b+c+ \times 2}{200000} \times 100 = 5 \cdot 10^{-3}$$

Il s'agit de distances très inférieures à celles que nous avons observées jusqu'à présent. Cependant, on peut montrer à l'aide d'autres expériences, qu'elles sont également **additives**. Nous pouvons donc ordonner les trois mutations de la manière utilisée classiquement pour les grandes distances, comme nous l'avons fait plus haut (malgré la variabilité d'échantillonnage, grande sur des effectifs faibles) :

$$a <--- 24 \cdot 10^{-3} ---> b <--- 10 \cdot 10^{-3} ---> c$$

$$a <-----40 \cdot 10^{-3}-----> c$$

**Figure 87: dominance/récessivité , complémentation de mutants [ gal- ] .**

diploïde	croissance du diploïde sur	
	glucose	galactose
A X ref	+	+
B X ref	+	+
C X ref	+	+
A X B	+	-
A X C	+	+
B X C	+	+

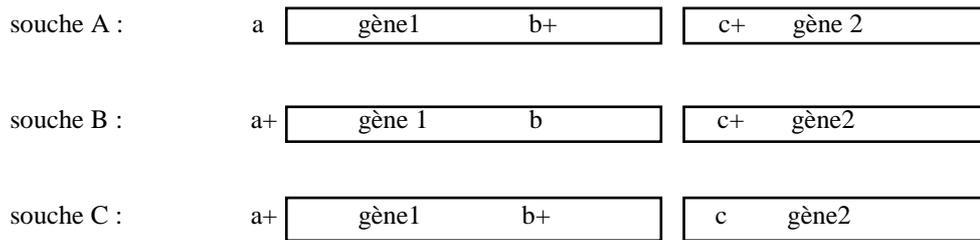
(12) : faire toujours attention à ce que signifie [ gal - ] .

(13) : la fréquence de spores prototrophes est trop élevée pour être interprétée par un phénomène de mutation produisant des revertants (page 66) .

(14) : admettons que *a* et *b* soient des mutations ponctuelles, conduisant chacune à une différence d 'acide aminé par rapport à la séquence polypeptidique de référence. La présence simultanée de *a* et de *b* produira probablement un polypeptide possédant deux différences d 'acides aminés avec la séquence de référence Il sera généralement inactif.

L'analyse s'arrêterait là si nous n'avions pas les résultats du test de complémentation. La connaissance de ces résultats nous permet de compléter notre analyse en tenant compte de l'existence de deux gènes.

$$\begin{array}{l}
 a <----- 24. 10^{-3}-----> b <---10. 10^{-3}--> c \\
 a <-----40.10^{-3}-----> c
 \end{array}$$



La délimitation des deux gènes et la limite entre eux sont dessinées pour les besoins de l'exposé, de manière arbitraire. En réalité, cette limite physique ne nous est pas connue avec les résultats dont nous disposons : nous savons seulement que a et b sont des mutations du même gène et que c affecte un autre gène, proche du précédent ( 15 ).

On constate donc que la recombinaison génétique peut se produire avec une fréquence très faible, correspondant à de très faibles distances moléculaires, y compris à l'intérieur d'un même gène, (ici, lorsqu'on s'intéresse au croisement A X B ). Cela ne doit pas nous étonner car il n'y a pas de rupture de nature moléculaire entre les gènes :

**les phénomènes de recombinaison ignorent le découpage de l'ADN en unités de fonction .**

Dans l'exemple que nous avons détaillé on remarquera que la fréquence de recombinaison A / B (mutations affectant le même gène ) est plus grande que la recombinaison B / C mutations qui affectent deux gènes différents, mais proches .

**Il n'est donc pas possible de déterminer l'appartenance d'une mutation à l'un des gènes par l'étude de la recombinaison.**

*(15) : on a démontré que la situation réelle des mutations donnant le [gal - ] est bien celle qui est représentée dans la figure : les deux gènes sont jointifs. Bien entendu, l'exemple a été choisi pour faire réfléchir !!!*

## 5. Carte génétique de la levure.

Une coopération internationale entre les nombreux chercheurs travaillant sur la levure a permis de collecter toutes les informations de liaison génétique entre de très nombreux gènes, repérés par leurs mutations.

Par exemple, voilà un ensemble d'informations concernant 12 gènes :

A est lié à J et L	B est lié à J et D	C est lié à B	
H est lié à G et F	E est lié à G	K est lié à F et I	I est lié à K

Tous les autres croisements indiquent une indépendance génétique

Ces résultats permettent de montrer que les 12 gènes forment seulement deux groupes de liaison :

1 : L---A---J---D---B---C, reconstitué à partir des recouvrements suivants:

$$\begin{array}{c} L---A---J \\ J---D---B \\ B---C \end{array}$$

2 : E--G---H---F---K---I- reconstitué à partir des recouvrements suivants:

$$\begin{array}{c} E---G \\ G---H---F \\ F---K \\ K---I \end{array}$$

Ces résultats sont les seuls possibles. Par exemple, si C était entre B et D , on aurait dû observer une liaison C/D ( intervalle qui serait plus petit que B/D pour lequel on a observé une liaison ) , ce qui n'est pas le cas. On place donc C « à droite » (16) de B.

Ce type d'analyses a permis d'établir une **carte génétique** très détaillée de la levure. La figure 88 illustre son état en 1985 , lorsque 568 gènes étaient localisés. On constate qu'il existe 16 groupes de liaisons auxquels de très nombreux gènes sont rattachés et trois petits ensembles de gènes liés n'étaient pas encore reliés à l'un de ces chromosomes ( XVII , F6 et F11 de la figure ) (17). Le tout couvre environ 4500 centimorgans (18).

En 1989, 1200 gènes étaient localisés : cette illustration n'a pas été retenue car la figure aurait été pratiquement illisible.

Par ailleurs, depuis 1996, on dispose de la séquence complète du génome, ce qui donne accès directement à la carte physique , qui permet de constater que la levure possède réellement 16 chromosomes et environ 6.300 gènes - voir chapitre 14 -.

On voit donc que l'établissement d'une carte génétique classique , qui établit le nombre de **groupes de liaison** , donne une bonne indication du nombre de **chromosomes** d'un organisme lorsque les analyses génétiques sont très complètes .

(16) : « à droite » est évidemment conventionnel.

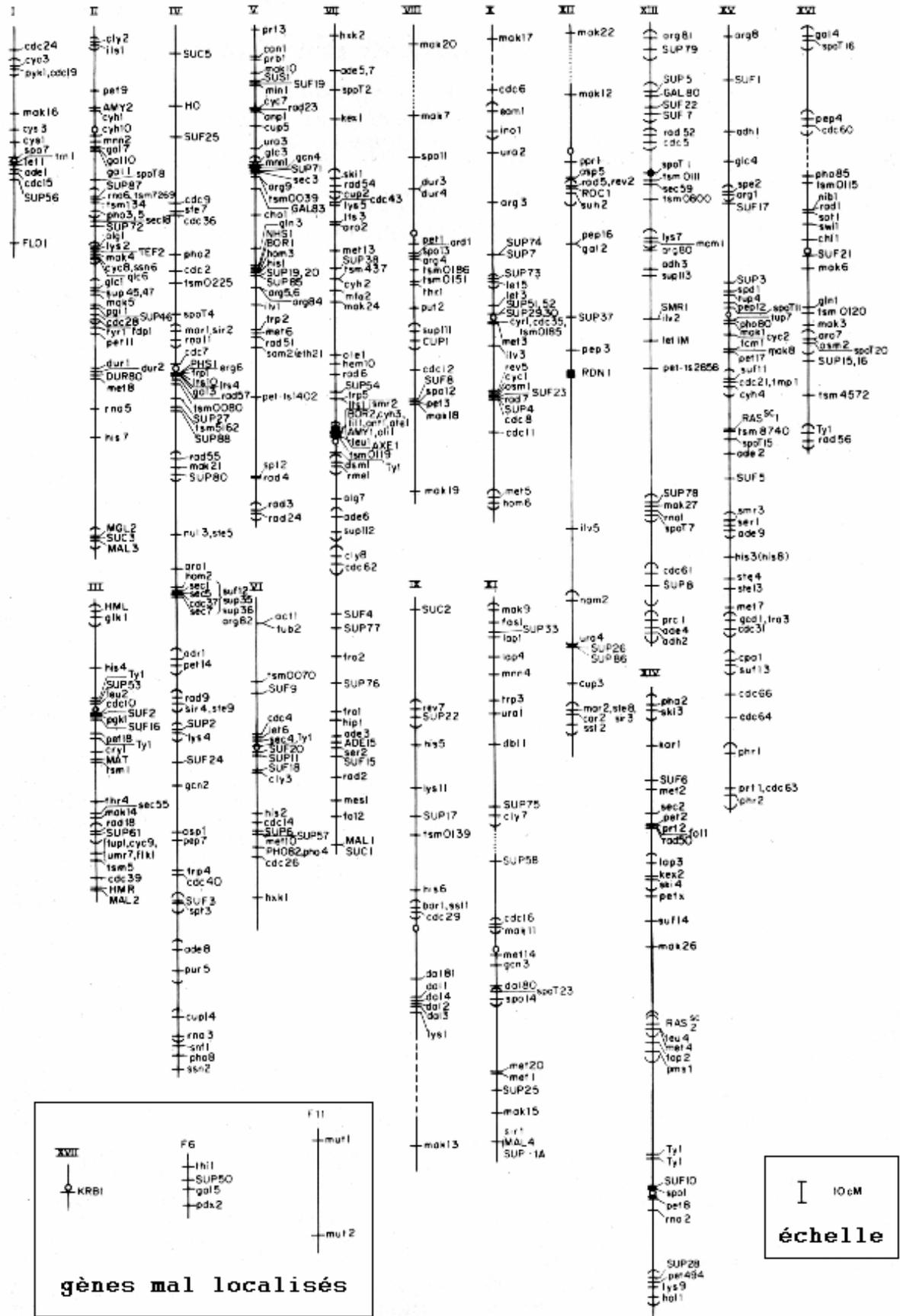
(17) : chacun de ces trois ensembles est maintenant relié à l'un des 16 chromosomes.

(18) : ces 4500 centimorgans correspondent aux  $12 \cdot 10^6$  nucléotides de la levure. La connaissance de ces deux mesures des chromosomes permettent de donner un ordre de grandeur au centimorgan :

$$12 \cdot 10^6 / 4,5 \cdot 10^3 \cong 2600 \text{ nucléotides.}$$

Cette estimation implique que la fréquence de recombinaison soit identique tout au long des chromosomes, alors que la situation est plus complexe. Malgré les imprécisions, on peut cependant constater que l'ordre de grandeur de l'unité de recombinaison chez la levure est proche de celle de notre gène théorique (sans intron) de 1000 nucléotides.

Figure 88 : état de la carte génétique de la levure en 1985.



## 6. Conclusions.

Dans le chapitre précédent nous avons vu que lorsque des gènes sont situés sur des chromosomes différents, on observe des recombinaisons, avec une fréquence de 50 %.

**Qualitativement**, nous venons de voir qu'on observe également des **recombinaisons**, lorsque les **gènes** sont situés sur le **même chromosome**. On observe même des recombinaisons lorsqu'on étudie deux allèles différents d'un même gène (encart 31).

Les différences avec la situation décrite dans le chapitre précédent sont quantitatives.

Nous venons de montrer qu'une **fréquence de recombinaison significativement inférieure à 0,50 correspond à deux gènes situés sur le même chromosome**, lorsqu'on étudie les produits de la méiose d'un diploïde doublement hétérozygote.

Chez la levure il est facile de montrer que cette **recombinaison intrachromosomique** se produit au **stade 4 chromosomes-fils**, grâce à l'observation des tétrades tétratypiques. Cela est vrai chez tous les organismes eucaryotes.

Lorsque les fréquences ne sont **pas trop élevées**, elles sont additives et expriment des **distances** génétiques, reflets plus ou moins directs des distances physiques.

Par contre **deux gènes situés très loin** l'un de l'autre sur un même chromosome, peuvent être séparés avec une fréquence de 0,50 qui mime les résultats obtenus pour des gènes situés sur des chromosomes différents (18)

Lorsqu'elles sont **très petites**, il faut bien se garder d'utiliser l'analyse de la recombinaison pour autre chose que ce qu'elle peut nous apprendre. On peut montrer que les **mutations** étudiées sont **plus ou moins proches**, mais on ne peut pas savoir si elles affectent des gènes différents ou non, par exemple dans la situation que nous avons étudiée, lorsque des mutants de même phénotype affectent deux gènes différents qui se trouvent très proches.

L'étude de la recombinaison intrachromosomique débouche sur l'établissement d'une carte génétique, sur laquelle on peut repérer, au moins en théorie, l'emplacement des centaines de gènes affectés par les centaines de milliers de mutants obtenus et étudiés chez la levure.

Ce travail, déjà redoutable chez la levure, est encore plus complexe chez des organismes ne pouvant être analysés au niveau de la phase haploïde. Nous allons voir, dans le chapitre qui suit, comment ces analyses sont conduites chez la drosophile et l'homme.

Dans la troisième partie de l'ouvrage, nous verrons comment on passe d'une connaissance indirecte (les cartes génétiques) à une description directe des génomes, via des cartes physiques, pour en arriver finalement à leur connaissance moléculaire, grâce au séquençage.

**Encart 31 : attention !!** pour qu'il y ait **recombinaison**, il faut au moins deux différences : c'est le cas lorsque on étudie des mutations affectant des gènes différents ; c'est aussi le cas lorsqu'on étudie deux allèles différents de l'allèle de référence et différents entre eux. Ce n'est **jamais** le cas lorsqu'on étudie le croisement de la souche de référence avec un simple mutant (chapitre 9). L'expérience montre que cette remarque n'est pas évidente pour tout le monde.

(18): encore une fois, redisons le, afin d'inviter le lecteur à bien suivre .... « Si des gènes sont situés sur des chromosomes différents, la fréquence de recombinaison est de 50% » n'implique pas qu'une fréquence de 50% corresponde à des gènes situés sur des chromosomes différents.

