

Université Mohamed V
Département de biologie
Unité de génétique

Polycopié de travaux pratiques
de génétique
S4

Année 2014 / 2015

Fait par Pr. Lina Tazi

La Drosophile -*Drosophila melanogaster*- 2n=8 - Monohybridisme -

I - PRESENTATION DE LA DROSOPHILE

a/ Systématique

Embranchement des *Arthropodes*
invertébrés possédant un squelette externe et des appendices articulés
Classe des *Insectes*
corps articulé est recouvert d'un tégument chitineux (tête, thorax et abdomen)
Ordre des *Diptères* Qui a deux ailes
Famille des *Drosophilidées*

La drosophile est l'un des organismes diploïdes les mieux connus des généticiens. C'est en étudiant la transmission des caractères héréditaires dans cette espèce que Morgan a pu établir dans les années 1930 la théorie chromosomique de l'hérédité.

Drosophila vient du grec drosos (rosée) et du suffixe phila (qui aime), ce terme signifie donc « qui aime la rosée. »

Melanogaster vient de melanos (noir) et de gaster (estomac), il s'agit donc de « la mouche à ventre noir. »

C'est un insecte diptère Brachycère (antennes courtes et trapues) plus communément connu sous le nom de **mouche du vinaigre** et que l'on rencontre sur les fruits très mûrs car il a un chimiotactisme positif vis à vis de l'acide malique et de l'alcool butylique. C'est une espèce **cosmopolite** et présente une **domesticité** très forte.

b/ Avantages de la drosophile

La drosophile a souvent été un matériel de choix pour les expériences génétiques, les qualités qui ont contribué à son immense succès sont en effet,

- Sa grande facilité d'élevage (milieu peu coûteux et facilement réalisable)
- Sa petite taille (requiert peu d'espace)
- Sa reproduction en laboratoire en nombre suffisamment élevé rend possible les analyses statistiques: chaque femelle pond 200 œufs.
- Son cycle de vie très court (10j à 25°C) permet d'obtenir de nombreuses générations en un temps relativement limité.
- La durée du cycle varie avec la température; elle est de 15 jours à 22°C et de 10 jours à 25°C.
- De plus, on reconnaît aisément la souche sauvage car les caractères morphologiques sont constants (hérités).
- La plupart des mutations portent sur des caractères très distincts du type « sauvage », donc leur transmission est facile à suivre au fil des générations.
- Les principales mutations portent sur la couleur du corps, des yeux, la taille et la forme des ailes et des soies etc.
- La drosophile possède des chromosomes en nombre réduit (2n=8).
- La présence de chromosomes géants au niveau des glandes salivaires.
- Contrairement à la souche sauvage, la plupart des souches mutantes vivent difficilement dans la nature et doivent être conservées en élevage au laboratoire.

II - CYCLE DU DEVELOPPEMENT DE LA DROSOPHILE

La durée du cycle varie en fonction des conditions d'élevage (T°) et de la souche considérée, pour une souche sauvage à 24°C :

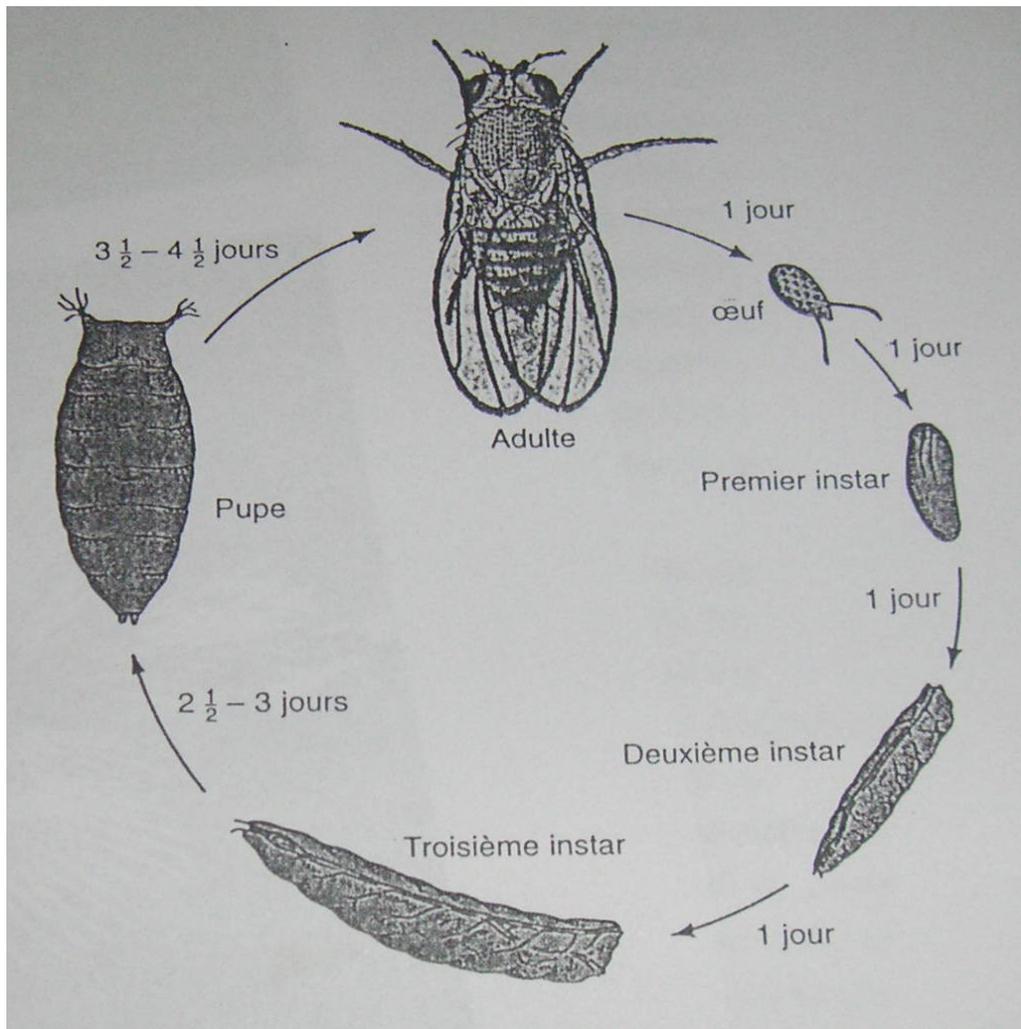


Figure 1-Cycle de développement de la drosophile

Les œufs (0.5mm) sont pondus juste après la fécondation : ils sont blancs, ovoïdes et possèdent 2 appendices qui leur permettent de se maintenir à la surface du milieu. Ces œufs éclosent au bout de 22-24h pour donner des larves qui commencent immédiatement à se nourrir.

Les larves (2mm) ou asticots passent par 3 stades larvaires :

L1 : pendant 24h, elle se nourrit en surface

L2 : « », elle commence à creuser le milieu

L3 : la larve continue à s'enfouir et modifie ainsi le pH et la composition de la microflore du milieu

Cette phase d'ingestion dure 3 jours après éclosion.

Stade puppe (3mm) La larve arrête de se nourrir, se fixe sur un support solide pour passer au stade puppe, qui se produit après 5 jours. La puppe durcie, s'assombrie et elle se contracte. Dans un stade avancé la larve subit la **métamorphose** à partir des disques imaginaux et on peut observer au travers l'individu adulte. L'éclosion débute 4 à 5j plus tard.

Les mouches adultes éclosent avec les ailes collées au corps, l'abdomen long, fin et sans pigmentation.

Les expansions alaires apparaissent environ 1 heure après, puis le corps se pigmente après 2 à 3h.

L'émergence, sortie de l'**imago (insecte adulte)** se fait par l'**operculum (orifice)**, est diurne.

La drosophile a un cycle **diplobiontique** : C'est la phase diploïde qui prédomine, la phase haploïde est réduite aux gamètes.

La fécondation a lieu dans le corps de la femelle, la pénétration du spermatozoïde déclenche la méiose dans la cellule femelle, et la caryogamie intervient aussitôt après. Les spermatozoïdes sont recueillis par la femelle au cours de la copulation et stockés dans un réceptacle séminal : **Les spermathèques**. Donc, il lui suffit d'être fécondée une seule fois pour qu'une femelle puisse pondre plusieurs générations (maintien de l'espèce).

Remarques :

- L'éclosion des adultes se fait en deux vagues successives, ce sont tout d'abord les mâles qui éclosent puis les femelles.
- Les individus mutés ont un cycle légèrement plus long que celui des individus sauvages et la mortalité embryonnaire est plus élevée chez les mutés.
- Par ailleurs, si le substrat est jugé inadéquat par la mouche, elle peut conserver ses oeufs intra-utérin jusqu'à trouver une zone de ponte plus propice. Dès lors, le développement post embryonnaire commence dans l'utérus.

III - PARTICULARITE DE L'ESPECE

a/ Différenciation morphologique des 2 sexes Chez la drosophile:

- Les femelles sont relativement plus grandes que les mâles
- La forme de l'abdomen chez la femelle est pointue et entièrement striée tandis que chez le mâle l'abdomen a une forme arrondie et son extrémité est très mélanisée.
- Les mâles présentent au niveau du 1^{er} article du tarse de la paire de pattes antérieures des peignes sexuels (touffe de poils noirs).

b/ Biologie sexuelle

Les mâles n'ont pas d'activité sexuelle pendant les 9 heures qui suivent leur émergence. Les femelles ne sont pas fécondables pendant les 4 premières heures qui suivent leur émergence (bouchon vaginal), Elles ne commencent à pondre qu'à partir de 24h avec une période maximale de ponte vers le 4^{ème} jour.

c/ Cytologie et génétique

La drosophile possède dans les cellules de ses glandes salivaires des chromosomes géants, appelés Chromosomes **polyténiques**, ils sont composés de 2/3 euchromatine (gènes) et d'1/3 hétérochromatine (séquences répétées) et ils sont facilement observables au microscope.

On estime la taille de son génome à 120 millions de paires de bases, pour environ 13 600 gènes.

Son **génome** est **18** fois plus petit que celui de l'homme, et possède 2 fois moins de gènes que l'homme. Il formé de 4 paires de chromosomes :

3 paires d'autosomes, semblables chez le ♂ et la ♀

- Chromosome 2 à centromère quasi médian
- Chromosome 3 à centromère à l'extrémité
- Chromosome 4 (hétéro chromatique)-court

1 paire d'hétérochromosomes : chromosome 1 (XX ou XY)

- La ♀ possède une paire de chromosomes homologues XX, qui sont dits homogamétiques.
- les ♂ possèdent un chromosome X et un Y, ils sont dits hétérogamétiques.

On connaît un très grand nombre de mutations, de très nombreux gènes ont été localisés sur les chromosomes X, II et III et de très rares sur le IV et Y.

De ce fait les marqueurs récessifs présents sur le chromosome X s'expriment librement chez les mâles.

Important : il n'y a jamais de crossing-over chez le mâle, quelle que soit la paire chromosomique considérée.

IV - DESCRIPTION DE QUELQUES MUTATIONS

a/ Les yeux

Coloration

w	white	blanc
v	vermillon	rouge orangé vif
bw	brown	brunâtre
se	sepia	noir

Morphologie

b	bar	Dimensions réduites
ey	eyeless	Absence totale

b/ Les ailes

ct	cut	Bord postérieur en pointes
m	Miniature	Dimensions réduites
vg	Vestigial	Dimensions très réduites
cy	curly	Extrémités recourbées

c/ La couleur du corps

y	Yellow	Jaune
b	black	nervures alaires noires
e	ebony	Noire

d/ Les soies

sc	scute	réduction du nombre de soies
f	forked	Soies plus courtes et recourbées
b1	bristle	Soies courtes et plus épaisses
h	hairless	Suppression de soies

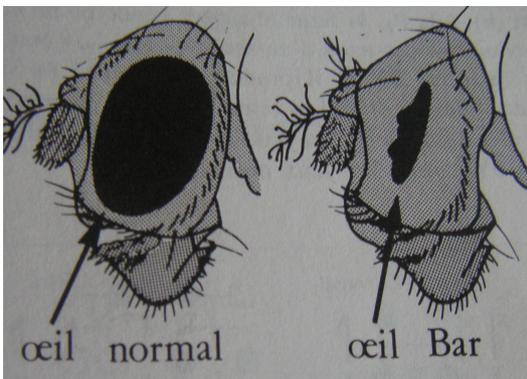


Figure 2- Mutation Bar de la forme des yeux chez la drosophile

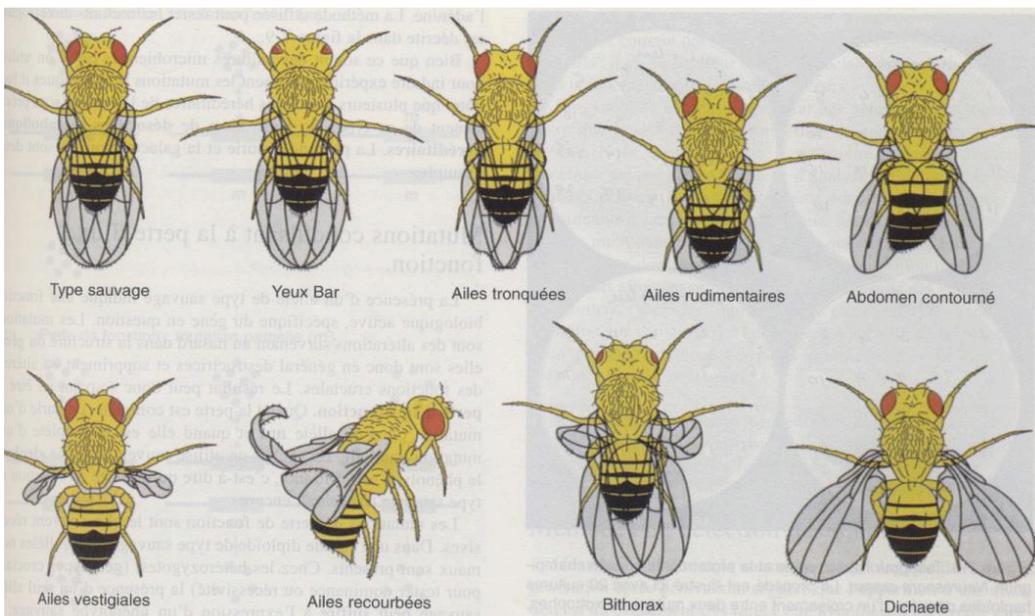


Figure 3 - Mutations des ailes chez la drosophile

V - EXPERIMENTATION

a/ Constitution de la collection

La première étape essentielle pour entreprendre un élevage de Drosophiles est la constitution de stock ; un stock sauvage et différents des stocks mutants.

Le Type sauvage

C'est la souche de référence la plus utilisée. Le type Oregon-R, est le plus représentatif de la « Drosophile normale ».

Le stock mutant

11500 stocks mutants sont dans 160 laboratoires dans le monde entier et sont répertoriés au sein d'une liste structurée en 3 sections : gènes, chromosomes et mutants; ce qui facilite la classification et la recherche du mutant désiré.

b/ Conditions de milieu

La température est maintenue à 25°C, le taux d'humidité est de plus de 70%.

La composition et les quantités du substrat standard pour maintenir les souches sont,

Pour un litre de milieu de culture :

Semoule de maïs		80 à 100g
Levure de bière	80g	
Agar-agar		16g
Moldex	54ml	
Eau distillée		compléter à 1l

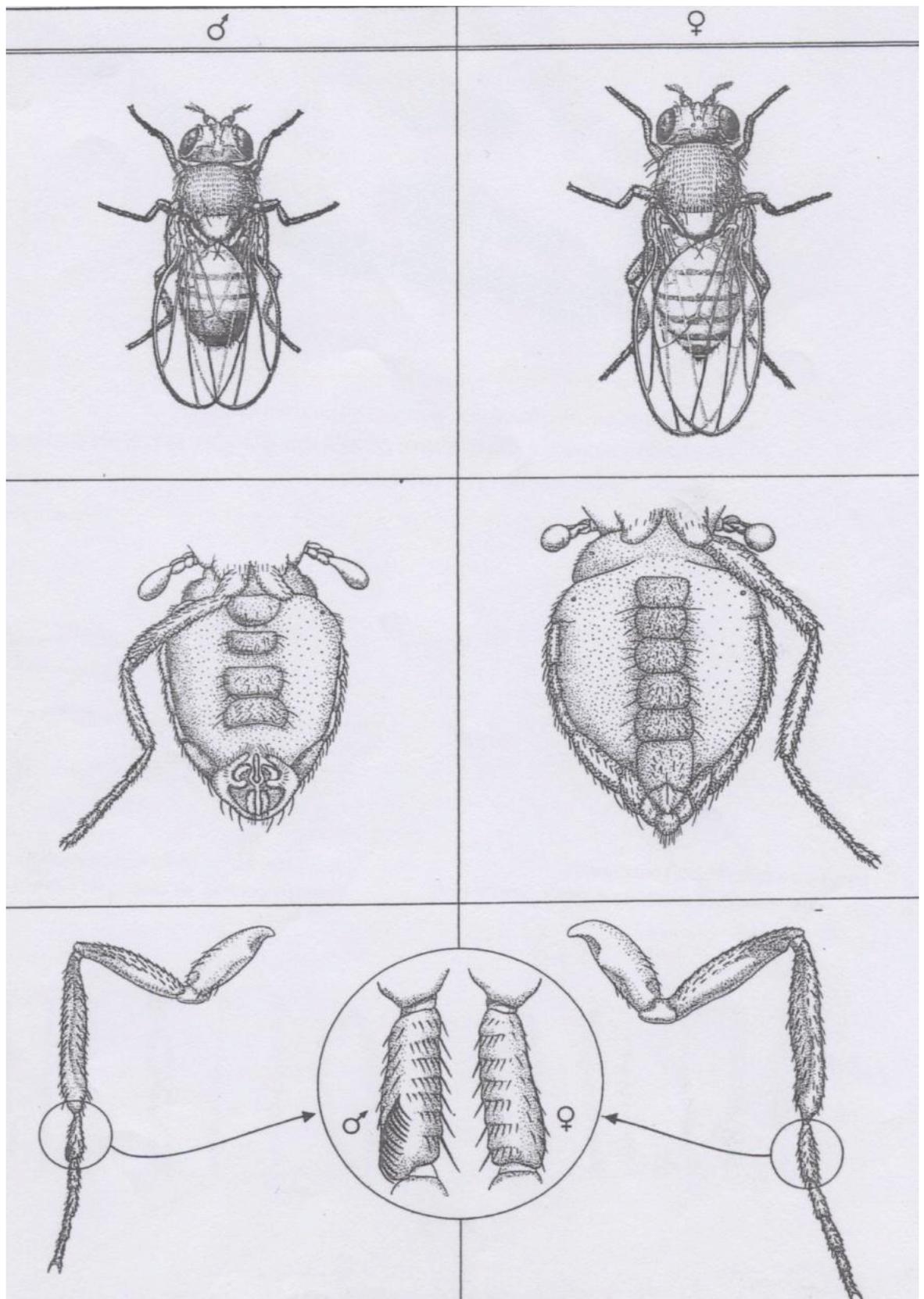
Pour un maintien de la souche le milieu devra être renouvelé une fois par mois.

c/ Réalisation d'un croisement entre deux souches

Il faut procéder comme pour un élevage classique mais cette fois, il faut choisir les mâles d'une souche et les femelles d'une autre souche en les triant sous la loupe.

Les femelles doivent être vierges si l'on veut réaliser un croisement correct. Il faudrait donc, les trier entre 6 à 8 heures après leur éclosion.

- les anesthésier à l'éther (attention au dosage),
 - dès que les mouches ont cessé de bouger, les verser afin de les trier rapidement.
 - prélever 3 mâles et 3 femelles, les mettre dans un tube de réanimation
 - les verser dans la bouteille de culture, qu'une fois bien réveillées.
 - mettre à l'étuve (23°C)
 - au bout de 7 jours on peut observer les larves à la surface du milieu
 - éliminer les parents (mélange de génération !)
 - 15 jours après la fécondation, on est en mesure d'examiner les mouches appartenant à la génération F₁.
- Pour obtenir une F₂, on procède de la même manière en croisant un mâle et une femelle F₁.



Peigne
sexuel chez
le mâle

Figure 4 - Dimorphisme sexuel chez la drosophile (taille, abdomen et peigne sexuel)

VI - TEST DE CONFORMITE χ^2

a/ Principe

Il sert à comparer des résultats théoriques aux résultats observés.

L'utilisation du χ^2 pour l'analyse des résultats d'expérience génétique a deux limitations importantes :

- Les éléments du calcul doivent être eux-mêmes les effectifs de classe et non les pourcentages ou les proportions déduites de ces effectifs.

- On ne doit pas l'utiliser quand une des classes a un effectif théorique inférieur à 25.

H_0 étant le modèle théorique de référence ou l'hypothèse nulle

Une hypothèse génétique s'étend d'ordinaire à plusieurs classes phénotypiques. Pour l'estimer, nous avons besoin d'un test qui nous permette d'associer une probabilité aux écarts observés dans un échantillon par rapport aux fréquences attendues et de décider si lesdits écarts révèlent ou non du seul hasard. Ce test doit également tenir compte de la taille de l'échantillon et du nombre de variables (ddl).

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_i - T_i)^2}{T_i} = \frac{(O_1 - T_1)^2}{T_1} + \frac{(O_2 - T_2)^2}{T_2} + \frac{(O_3 - T_3)^2}{T_3} + \dots + \frac{(O_n - T_n)^2}{T_n}$$

O_i et T_i représentent respectivement les effectifs observés et expérimentaux de la classe i , n étant le nombre de classes. \sum indique qu'il faut sommer les différentes valeurs de l'expression qu'il gouverne, lorsque i varie de 1 à n par valeurs entières.

Suivant le nombre de degré de liberté, à chaque valeur correspond la probabilité qu'un écart égal ou supérieur à l'écart observé soit le fait du seul hasard.

d.d.l (degré de liberté) = [nombre de classes phénotypiques] - 1

Tableau de Distribution du χ^2

Degré de liberté	Probabilité	
	0.05	0.01
1	3.84	6.64
2	5.99	9.21
3	7.82	11.34

Si $\chi^2_{calculé} < \chi^2_{table}$

La différence est donc non significative est l'hypothèse est à retenir

b/ Modèle théorique

Classes phénotypiques	observées	fréquences	théoriques	Obs.-thé	(obs-thé) ²	(Obs-thé) ² / thé
[classe 1]		Fréq. 1	T x fréq. 1			
[classe 2]		Fréq. 2	T x fréq. 2			
[classe n] etc.						
total	T	1				$\sum \chi^2_{cal}$

c/ Exemple d'application

Chez la drosophile on dispose de 2 lignées pures homozygotes, l'une à ailes vestigiales et l'autre à ailes longues, le croisement de ces deux souches donne en F1 100% d'ailes longues. Génération issue du croisement de F1XF0 (récessif), donne 62 mouches à ailes longues et 58 mouches à ailes vestigiales. Interpréter ce résultat.

Partie expérimentale

Observation des différentes étapes du développement : œufs, larves et pupes

Différenciation des mâles et des femelles adultes de la souche sauvage :

- Forme, coloration et taille de l'abdomen
- Taille relative du corps
- peignes sexuels et organes sexuels externes chez la femelle

Observations des souches mutantes

Lignées	Couleurs des yeux	Formes des ailes	Couleur du corps	Forme des soies
1. sauvage				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				

Observation des individus F2 du croisement.

Classes phénotypiques Observées	[]	[]	Total
Mâles			
Femelles			
Total Observés			

1/ Que pouvez vous conclure des résultats de F1 ?

2/ Quel est le gène muté dans votre croisement ?

3/ Est-il lié au sexe? Pourquoi ?

4/ Indiquez le génotype et le phénotype des F2, F1 et celui des parents F0 et faites l'interprétation chromosomique complète.

5/ Emettez une hypothèse

6/ Vérifiez vos résultats à l'aide d'un test X² et faites une conclusion

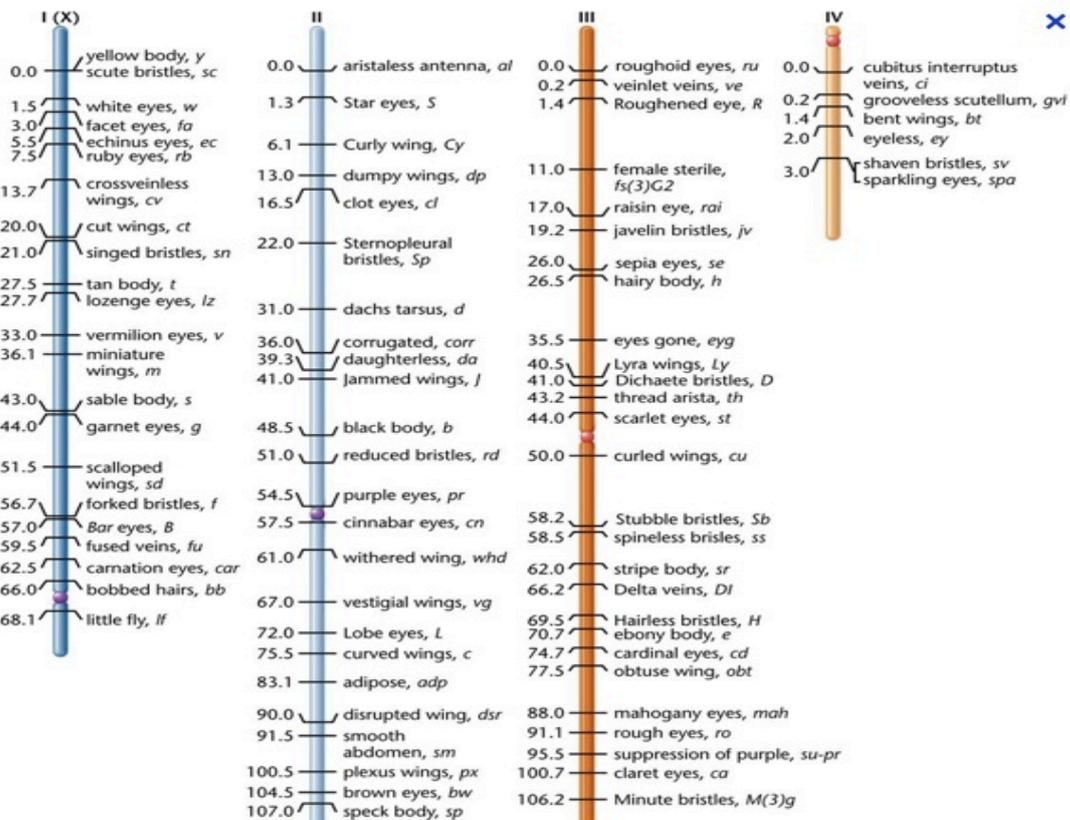


Figure 5 - Carte génétique des 4 chromosomes de la drosophile

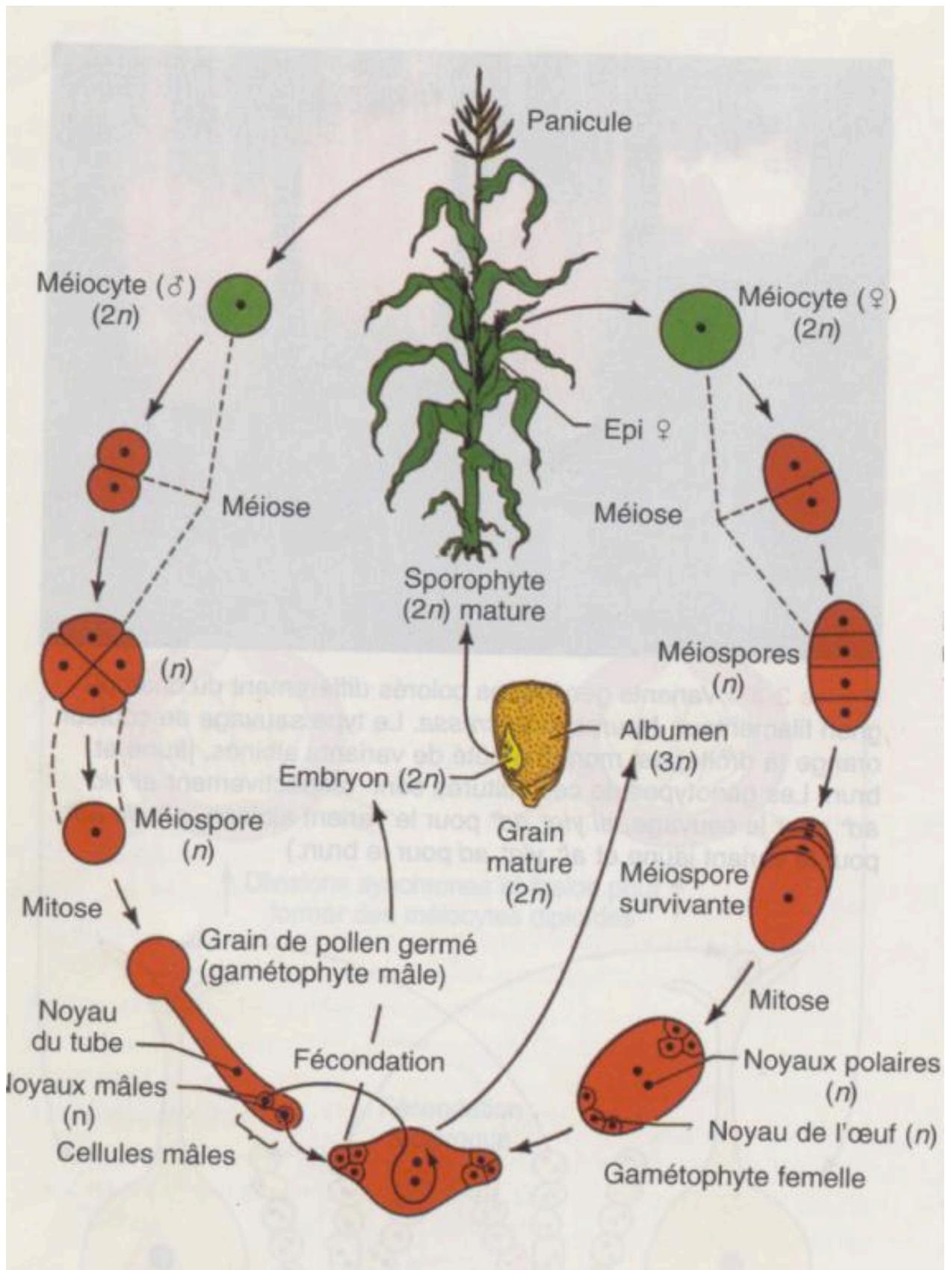


Figure 6 - Cycle de développement du maïs

Le Maïs *Zea mays* L. $2n=20$
Dihybridisme d'indépendance, d'épistasie et de liaison F₂/ FT

I - PRESENTATION DU MAIS

D'origine américaine, le maïs est une plante annuelle présentant des organes végétatifs très développés. Cette plante est une graminée à haute tige qui peut atteindre 5m.

a/ Systematique

Embranchement des Phanérogames : les organes de reproduction sont visibles

S-Embranchement des Angiosperme : Les graines sont protégées

Classe des Monocotylédones : la plantule a un seul cotylédon

Famille des Graminacées : Plante aux épis de fleurs peu voyants

II - BIOLOGIE FLORALE

a/ Organisation de l'appareil reproducteur

Comme la plupart des Angiospermes, le Maïs est une plante **monoïque** Les fleurs sont unisexuées et deux types d'inflorescences sont présentes sur un même pied ; l'inflorescence femelle est un épi situé à l'aisselle d'une feuille et l'inflorescence mâle est une panicule située au sommet de la plante. Dans les deux cas, l'unité morphologique de base est un épi d'épillets.

b/ Cycle de développement

Le gamétophyte mâle provient d'un méiocyste de la panicule. Le gamétophyte femelle est produit à partir d'un méiocyste de l'épi femelle.

Chez le Maïs, **la fécondation est double** : elle aboutit à la formation d'un zygote principal qui est l'embryon diploïde (2n) et d'un zygote accessoire qui est l'albumen triploïde (3n) ou endosperme qui assure la nutrition de l'embryon durant la germination.

Le fait que la floraison du Maïs soit **protandre** le taux de fécondation croisée est de 95%. C'est donc une espèce essentiellement **allogame** Les 5% d'autofécondation montrent qu'il n'y a pas de système d'incompatibilité entre les gamètes d'un même pied.

Le fruit est un **caryopse** qui est un fruit sec indéhiscent dont le péricarpe est soudé au tégument de la graine.

Remarques :

La génération F_n reste sur le pied ♀ de la génération F_{n-1}.

L'étude statistique du Maïs porte sur les épis.

Les caractères étudiés : coloration et forme des grains, concernent l'albumen triploïde visible à travers la paroi incolore du caryopse. L'embryon n'est pas visible.

Exemple : le génotype de l'albumen (3n) d'une graine F₁ n'est pas le même selon le sens du croisement

Dans le croisement ♂ a/a X ♀, A/A l'albumen est de génotype A/A/a et de phénotype [A], correspondant au génotype A/a de l'embryon diploïde non visible.

Dans le croisement ♂ A/A X ♀, a/a l'albumen est de génotype A/a/a et de phénotype [A], correspondant au génotype A/a de l'embryon diploïde non visible.

III - METHODES DE CROISEMENTS

a/ Croisement par allofécondation artificielle de 2 lignées pures A et B (qui diffèrent par un ou plusieurs caractères): F₁ → Fo_A X Fo_B

Après avoir semé les grains Fo représentant la lignée A, on obtient des pieds Fo_A avec des fleurs Fo_A. On procède de la même façon pour obtenir des fleurs Fo_B.

Avant la maturité des étamines du pied considéré comme ♀, on coupe l'inflorescence ♂.

Et pour éviter l'infestation par un pollen étranger inconnu, on enveloppe d'un sachet les épis de fleurs ♀ sur le pied Fo_A.

Puis sur le pied Fo_B, considéré comme ♂ on récolte le pollen des fleurs afin d'en induire les fleurs ♀ du pied Fo_A lorsque les pistils seront arrivés à maturité.

La maturation des caryopses F₁ se fait donc sur le pied Fo_A.

Ce premier croisement a pour but de réunir les deux allèles d'un gène dans un même individu, les individus utilisés pour ce croisement sont de **lignées pures**. La descendance est donc **homogène** et identique au parent dominant et renferme des couples d'allèles à l'état **hétérozygote**.

La ségrégation des allèles d'un gène se produit lors de la méiose, mais au niveau des phénotypes aucune ségrégation ne peut être mise en évidence et pour cela c'est les deux croisements, F₂ et FT qui le permettront.

b/ Test Cross FT par allogamie artificielle : F_T → Fo_a (récessif) X F₁

Après avoir semé les grains F₁, on obtient des pieds F₁ portant des fleurs F₁.

Avant la maturité des étamines du pied F₁ considéré comme ♀, on coupe l'inflorescence ♂.

Et pour éviter l'infestation par un pollen étranger inconnu, on couvre d'un sachet les épis de fleurs ♀ du pied F₁.

Puis sur le pied Fo_A, considéré comme ♂ on récolte le pollen des fleurs afin d'en induire les fleurs ♀ du pied F₁, lorsque les pistils seront arrivés à maturité.

La maturation des caryopses F_T se fait donc sur le pied F₁, ♀.

c/ Autofécondation artificielle : F₂ → F₁ X F₁

Après avoir semé les grains F₁, on obtient des pieds F₁ avec des fleurs F₁.

Après la maturité des étamines du pied F₁, on récolte les grains de pollen.

Et pour éviter l'infestation par un pollen étranger inconnu, on couvre d'un sachet les épis de fleurs ♀ du même pied.

Puis lorsque les pistils seront arrivés à maturité sur ce pied, on les induit de pollen récolté sur ce même pied.

La maturation des caryopses F₂ se fait donc sur le pied F₁.

IV - NATURE CHIMIQUE DE L'ALBUMEN ET LA FORME

Certains gènes gouvernent la teneur de l'albumen en amylose, amylopectine, glycogènes, dextrine et glucose. Il y a trois variétés de Maïs suivant la partie supérieure de l'albumen :

Zea mays indurata (Maïs corné) :

La couche cornée est répartie autour de la partie farineuse centrale qui est plus épaisse au sommet, d'où un grain de forme arrondi.

Zea mays indentata (Maïs denté) :

La couche cornée est localisée sur les bords et absente au sommet, d'où un grain en forme de dent avec un sommet déprimé.

Zea mays eveta (pop corp):

La couche cornée est très abondante et la partie farineuse est très réduite d'où un grain en pointe au sommet.

D'autres gènes modifient la nature chimique et la forme comme :

ChrII	gène f1 <i>floury</i>	concentration forte en amylose
ChrIII	gène sh2	<i>shrunked2</i> réduction de la partie farineuse
ChrV	gène bt1	<i>brittle1</i> grain fripé
ChrIV	su1	<i>sugary1</i> grain déprimé

V - STRUCTURE ET COLORATION DU GRAIN

Le grain est constitué de trois parties : l'enveloppe, le germe et l'albumen

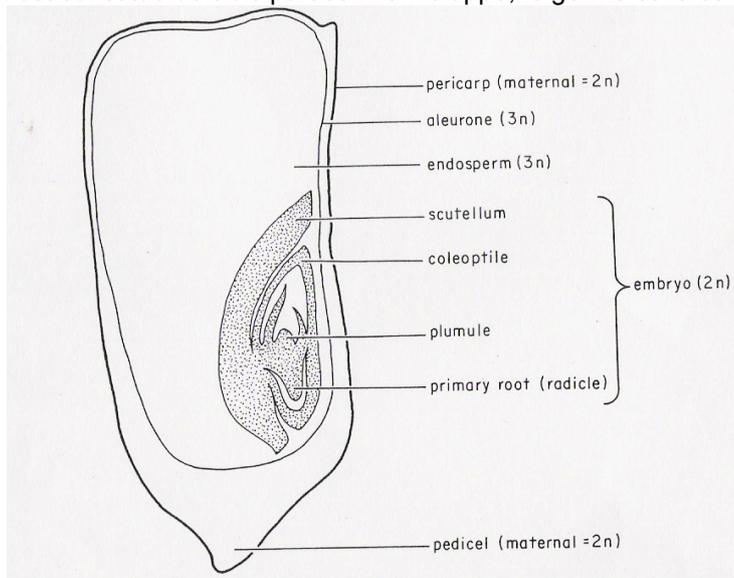


Figure 7 - Coupe sagittale d'un grain de maïs

a/ Péricarpe (2n) : L'enveloppe

D'origine maternelle, le péricarpe représente la paroi de l'ovaire et le tégument de l'ovule tous deux sont soudés. Ils font partie de la génération Fn-1 (maternelle), il est souvent incolore. Dans d'autres graines il peut prendre d'autres colorations :

ChrIX	gène bp	coloration marron
ChrII	Ch	coloration chocolat
ChrI	P	péricarpe coloré

b/ Albumen (3n) : Couche à aleurone

Une série de gènes épistatiques répondent à la synthèse d'un pigment « anthocyanique » qui donne une coloration de la couche d'aleurone du grain de Maïs. Ces gènes sont portés par différents chromosomes :

ChrIX	gène C	aleurone coloré
ChrX	R	Red seedling
ChrIII	A1	Anthociane 1
Chr V	A2	Anthociane 2
Chr V	Pr	Aleurone violet
Chr V	I	Inhibitor

c/ Le germe : Albumen au sens strict

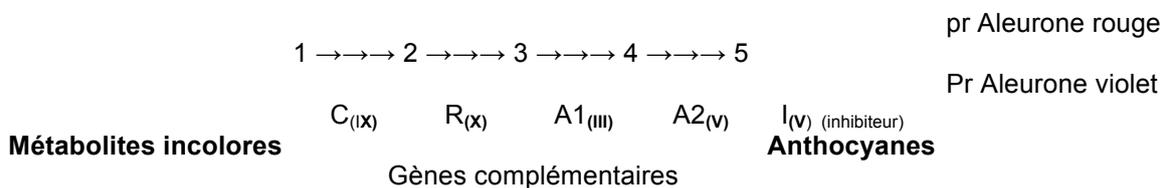
Il comprend l'embryon et le cotylédon qui l'entoure. Sa partie cornée est appelée l'endosperme et sa coloration est due à des pigments caroténoïdes.

ChrVI	gène Y1/y1	endosperme jaune1
ChrV	Y2/y2	endosperme jaune2

d/ La Partie farineuse (interne) est toujours blanche quel que soit le génotype.

VI - INTERACTION GENIQUE : exemple coloration des grains de maïs

Biosynthèse de la Chaîne métabolique de Anthocyanes (aleurone):



Lorsqu'il y a un exemplaire dominant de chacun des gènes qui interviennent dans cette chaîne de biosynthèse des anthocyanes et ceci sur toute la chaîne, l'aleurone est coloré. Celui-ci est coloré en rouge si l'allèle *pr/pr* (récessif) est sous forme homozygote, et coloré en violet, si l'allèle *Pr//*. (dominant) intervient dans la chaîne. Cette chaîne n'est plus fonctionnelle et l'aleurone n'est pas coloré si le gène *I* (inhibiteur) s'exprime ou si dans une des étapes de la chaîne intervient un allèle récessif homozygote pour *c,r,a1* ou *a2*. C'est à dire que chaque allèle contrôle une étape essentielle dans la production du pigment et l'absence d'une de ces étapes conduit à la non fabrication du pigment, ces gènes sont donc complémentaires ils sont dits **épistatiques** car ils interagissent entre eux.

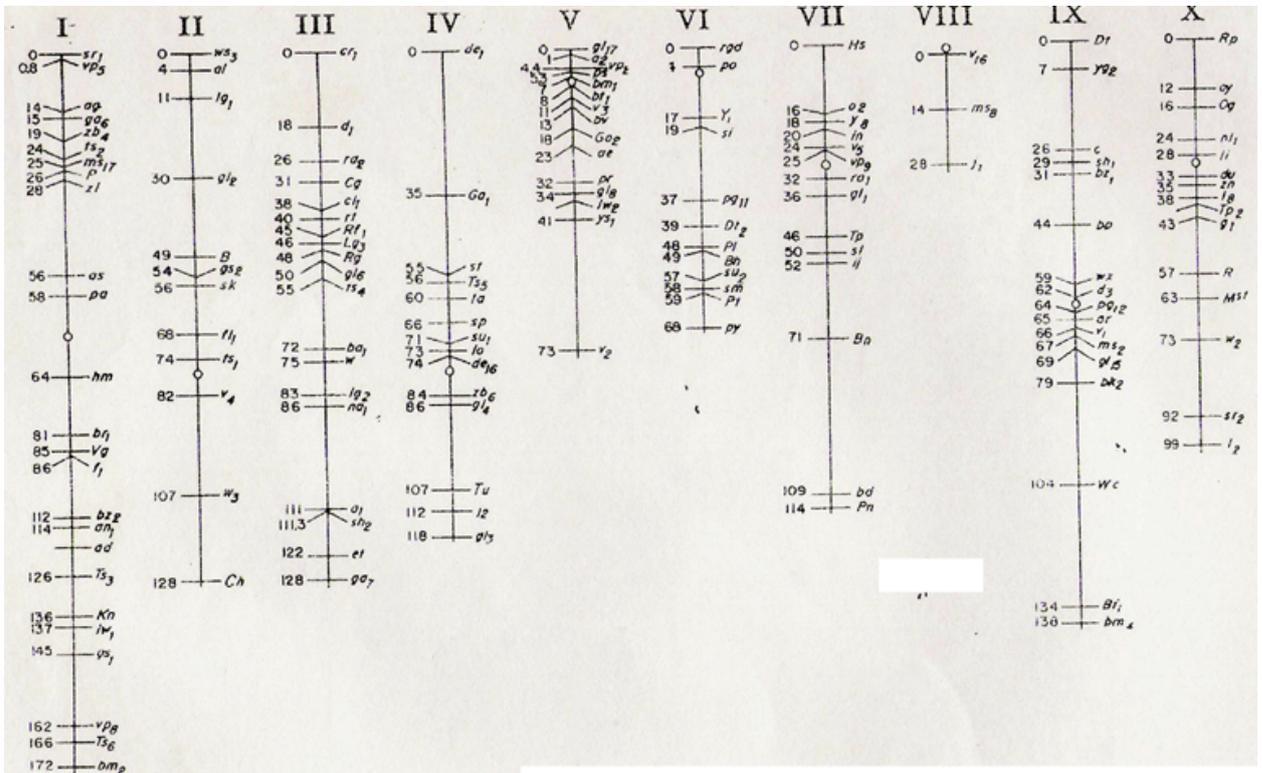


Figure 8 - Cartographie des 10 chromosomes de maïs

Partie expérimentale
Observation des épis et interprétation

- 1/ Observer et reconnaître les différents phénotypes
- 2/ Compter les graines méthodiquement

Phénotypes	[]	[]	[]	[]
Effectifs				

- 3/ Séparer les caractères : coloration / forme
- 4/ Emettre une première hypothèse
- 5/ Effectuer un échiquier de croisement (génotype Fo, F1 et F2 ou FT)
- 6/ Vérifier l'hypothèse par un test du χ^2 ou cartographier les gènes
- 7/ Faire une conclusion.

SORDARIA macrospora n=7 Analyse des tétrades chez les Haploïdes

I - AVANTAGES DES HAPLOIDES

Les champignons sont un matériel de choix dans l'analyse génétique car :

- Dans leur génome, il n'y a qu'un seul allèle de chaque gène : Ainsi, chaque caractère est le produit de l'expression d'un gène.
- Il n'y a ni Dominance, ni récessivité : donc le génotype est déduit directement à partir du phénotype.
- Une seule génération suffit pour analyser chacun des 4 produits d'une méiose unique (analyse des tétrades).
- Leur cycle est court, il est de 7 à 9 jours.
- Leur Condition de culture est facile et peu coûteuse.
- Il existe de nombreux mutants biochimiques.
- Un asques représente une méiose, les spores représentent les « gamètes »

II - SORDARIA macrospora n=7

Sordaria macrospora est une moisissure couramment utilisée dans les laboratoires de génétique pour étudier la correspondance gènes - enzymes. C'est un champignon **ascomycète à tétrades ordonnées**.

a / Systématique

Règne des Fungi
Division Ascomycètes
Classe des Sordariomycetes
Genre *Sordaria*

b/ Caractéristiques Biologiques

C'est une espèce **homothalique** (homomixie), c'est à dire que les asques d'une colonie haploïde peut réaliser un cycle cellulaire complet : produire des gamètes (par différenciation de certains articles du micélium), fusion de ces gamètes, fécondation, méiose, mitose et formation d'ascospores (les 8 spores disposées sont en enfilade dans les asques). Son cycle est **haplobiontique**. La couleur "sauvage" des spores est habituellement brune car les spores sauvages fabriquent de la mélanine, pigment brun. Les spores de certaines souches mutantes ne fabriquent pas de mélanine. De ce fait, elles ont une couleur claire.

c/ Conditions et milieux de culture

Pour réussir une culture de *Sordaria*, il faudrait une température de 26°C, une humidité à 70%, de la lumière et un **milieu de fructification** synthétique qui contient de la dextrine blonde (comme source de carbone), de l'urée, de la biotine et de la thianine (comme source d'azote), et des oligo-éléments. Lorsque l'on croise 2 souches génétiquement différentes, à la confrontation entre les deux souches on trouvera des asques hybrides.

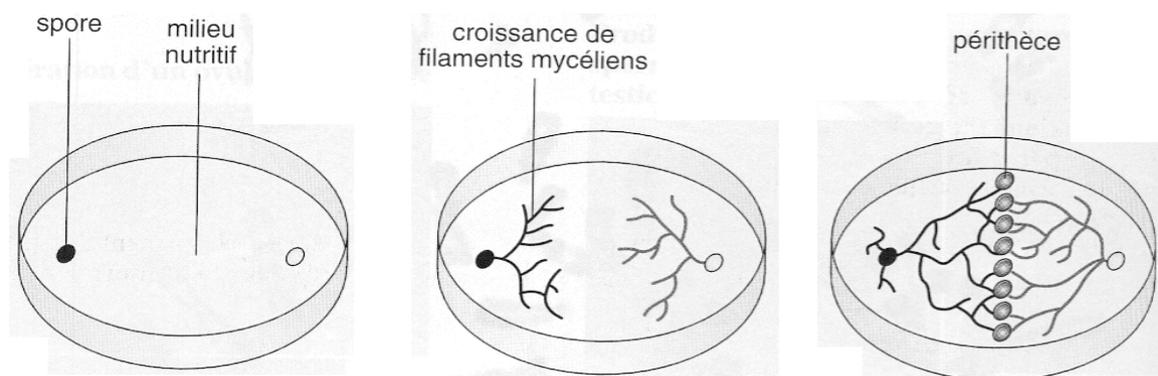
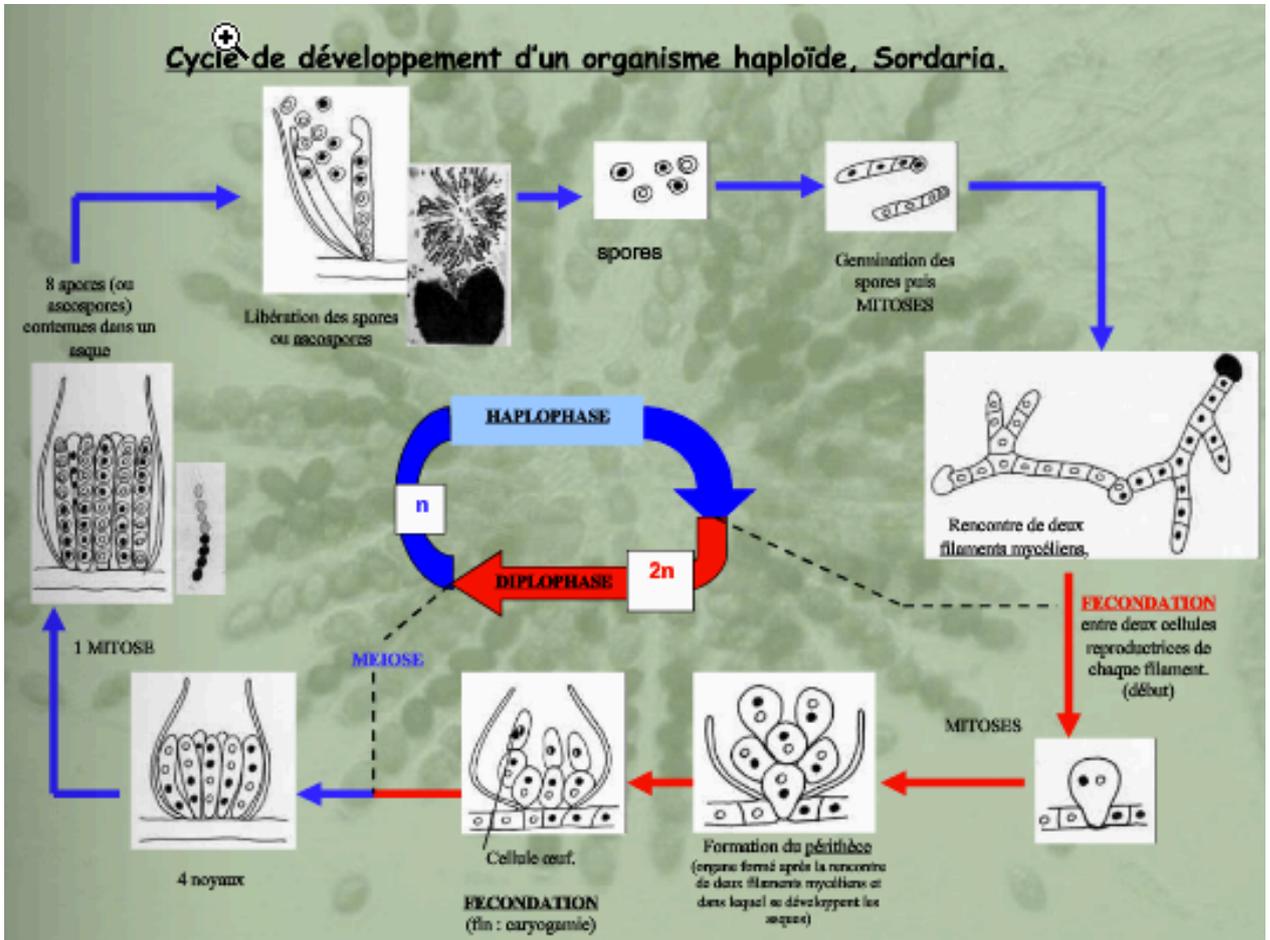


Figure 9 - Technique de croisement

III - CYCLE DE DEVELOPPEMENT

Si on place dans une boîte de culture des spores de chacune des souches N (à spores noires) et J (à spores jaunes) en des points opposés. Ces spores donnent naissance chacune à un mycélium s'étalant à la surface du milieu de culture. Lorsque les deux mycélium se rencontrent, il y a fécondation, fusion de 2 noyaux et formation de nombreux zygotes enfermés dans une fructification, le **périthèce**.



Les zygotes formés subissent immédiatement la méiose : chaque zygote donne donc naissance à quatre cellules filles haploïdes. Chacune d'entre elle subit ensuite une mitose banale et devient une spore. Chaque spore exprime l'allèle du gène de coloration qu'elle contient (elle apparaît claire ou foncée). Un des grands avantages de cette espèce est que depuis le zygote jusqu'aux spores, les cellules sont enfermées dans une enveloppe cylindrique, l'**asque**. De ce fait, les cellules filles formées lors de chaque division restent superposées. Aussi, l'ordre des couleurs des huit spores permet de déduire certains événements de la méiose et, en particulier, s'il y a eu ou non des échanges de segments chromosomiques dans la zone du chromosome située entre le centromère et le gène : en effet, s'il n'y a pas eu de recombinaison dans cette zone, les spores seront regroupées en deux groupes de quatre spores identiques selon deux dispositions possibles d'égale probabilité, ces asques sont dits **asques pré-réduits** : Le 1/2 asque est homogène, les allèles N et J ont été séparés lors de la 1ère division de méiose (pré-réduction). Ces 2 types d'asques résultent de la disposition aléatoire des homologues lors de la métaphase I et de leur séparation en anaphase.

Si, au contraire, il y a eu une recombinaison dans cette zone, les spores seront regroupées deux à deux selon quatre dispositions possibles d'égale probabilité, ces asques sont dits **post-réduits** : 4 Types d'asques, au 1/2 asque hétérogène, la séparation des allèles ne s'effectue qu'à la deuxième division (post-réduction). Cela signifie qu'en fin de 1ère division chaque chromosome est hybride et possède un allèle B et un allèle N, en raison d'échange de chromatide.

Les événements d'échanges de segments chromosomiques étant en nombre proportionnel à la distance gène - centromère, leur pourcentage traduit cette distance.

IV - ANALYSE DES TETRADES

A partir du 8^{ème} jour, on prélève les périthèces qui se trouvent sur la ligne de contact des 2 mycéliums et on place leur contenu dans une goutte d'eau entre lame et lamelle.

Dans ces périthèces on peut observer différents types d'asques:

pré et post réduits ou bien en cas de di-hybridisme des DP, DR et tétra-types.

- Croisements **mono-factoriels**,

L'observation des asques (post ou pré réduits) et l'évaluation de leur % nous permet de déterminer la distance gène –centromère.

Le % des asques post-réduits est le nombre d'asque post réduits **sur** le total des asques (post et pré réduits).

La distance est $\%R = \%asques\ post-réduits / 2$

-Croisements **bi-factoriels**,

L'observation des asques **DP** (di-types parentaux), **DR** (di-types recombinés) et **T** (tétra-types) et leur %, nous permet de savoir :

Si $\%DP = \%DR$, **Les deux gènes qui interviennent sont indépendants :**

Si $0 \leq \%T \leq 66,7$

- Les gènes sont sur **2 chromosomes différents**.

Si $\%T = 66,7$

- Les gènes sont sur **le même chromosome** : ils sont liés physiquement et indépendant génétiquement , dans ce cas la distance entre les deux gènes est

Si $\%DP > \%DR$, **les gènes sont liés :**

La distance est : $\%R = [(DR + \frac{1}{2} T) / DP+DR+T] \times 100$

V - CONCLUSION

L'étude de ces croisements fait ressortir les notions suivantes :

- Les spores haploïdes, sont le siège d'aucun mélange des caractères : **Loi de pureté des gamètes**

- Un asque hybride renferme toujours 4 spores de chaque parent : **Loi de ségrégation des caractères parentaux**.

- La disposition des spores dans l'asque traduit l'intervention ou non d'un **Crossing-Over** (situé entre le gène et le centromère) durant la prophase de la première division (réductionnelle) de la méiose.

PARTIE EXPERIMENTALE **Observation et calcul des distances**

Monohybridisme :

1/ Faites un schéma permettant d'expliquer le comportement des chromosomes à la méiose qui rende compte du résultat d'un asque post-réduit : quels sont les asques résultant d'un CO et quelles sont les chromatides impliquées.

2/ Comptez le nombre d'asques des deux types en observant la disposition des ascospores dans chacun des asques : Calculez la distance gène-centromère en centimorgan.

3/ Expliquez pourquoi l'expression de la distance est seulement la moitié du pourcentage des asques post-réduits.

Dihybridisme :

4/ Déterminez la liaison des gènes (indépendants ou liés) et calculez la distance si les gènes sont liés.

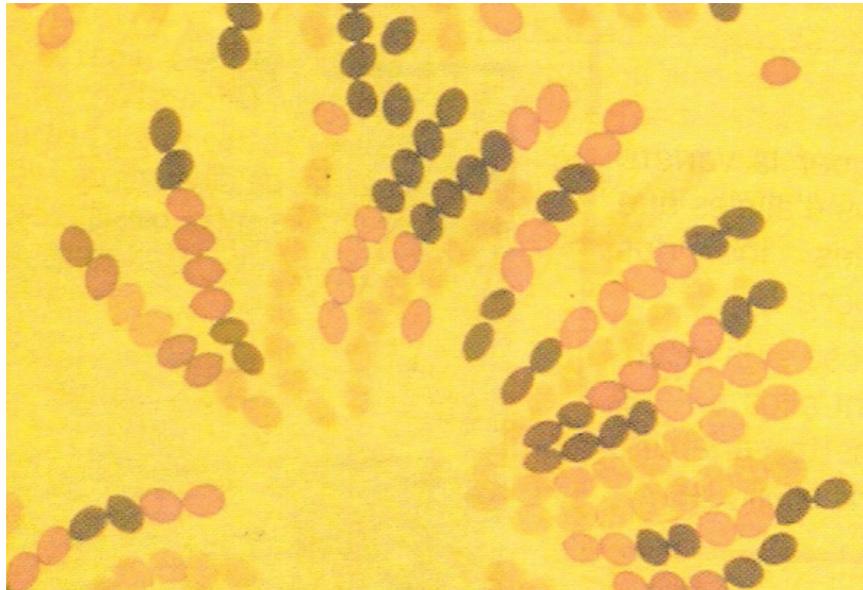
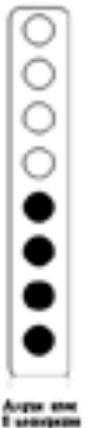
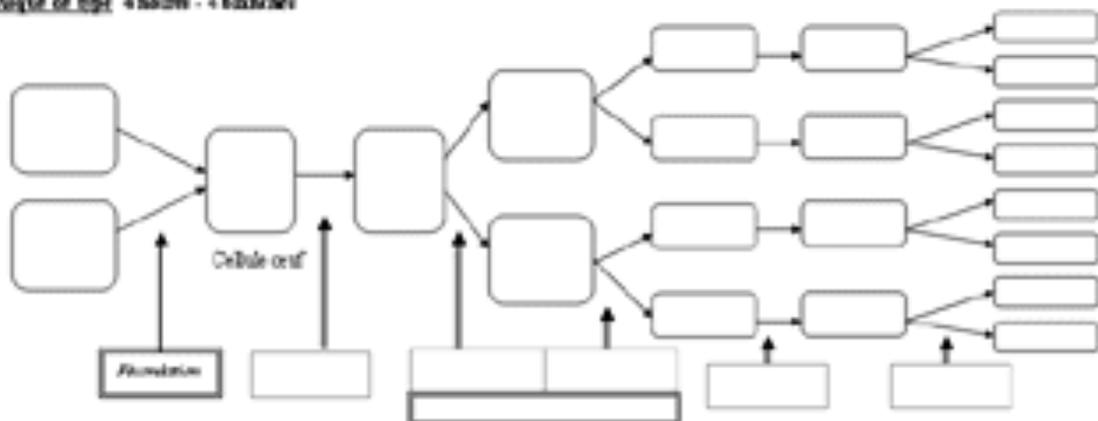


Figure 10 - Asques pré et post réduits contenus dans un périthèce

Asque de type 4 noires - 4 blanches



Asque de type 2 noires-2 blanches-2 noires-2 blanches

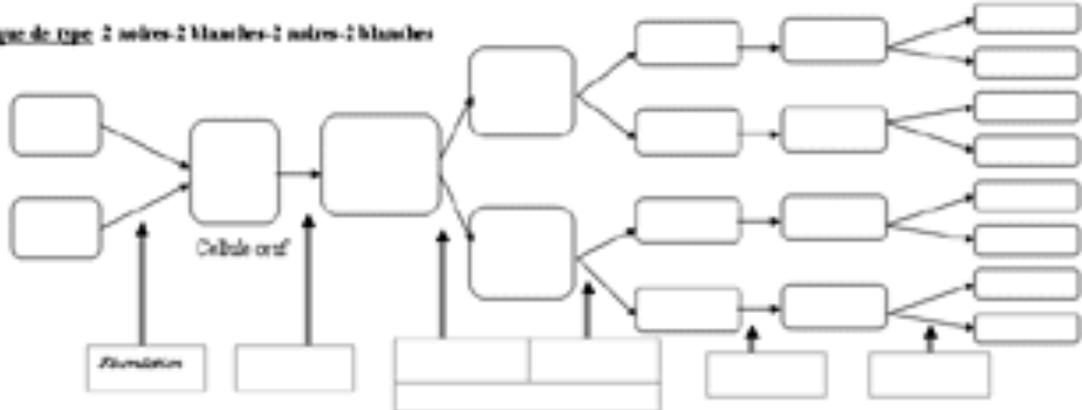
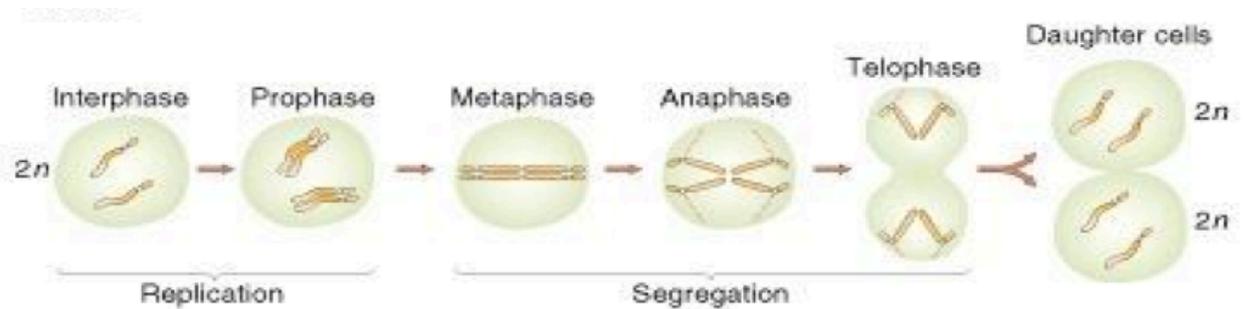


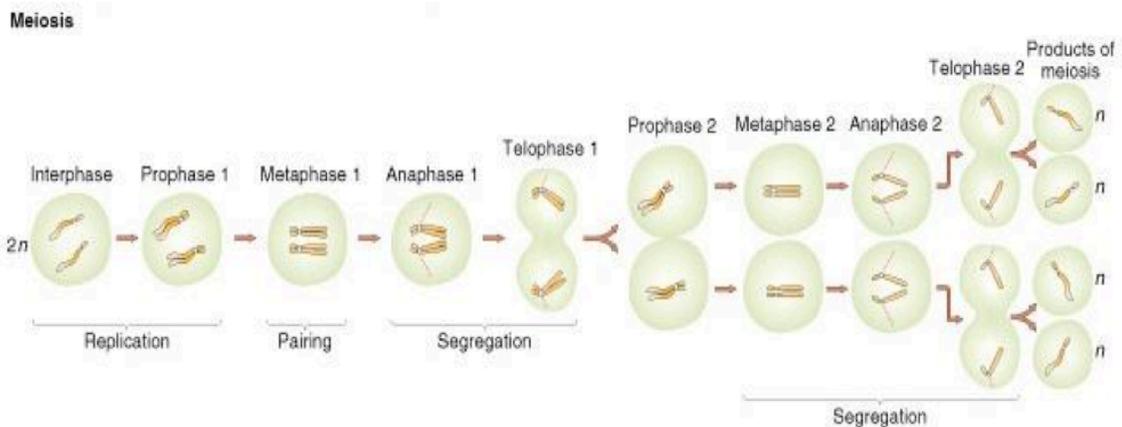
Figure 11 - formation des asques à 8 spores (méiose et mitose)

La méiose et la mitose : Rappels

Phase de la mitose



Phase de la méiose



Outils:

- 4 bandes de papier de 1cm X 10 cm rouges
- 4 « « 1cm X 6 cm rouges
- 4 bandes de papier de 1cm X 2 cm rouges
- 4 « « 1cm X 2 cm bleues
- 4 bandes de papier de 1cmX10 cm bleues
- 4 « « 1cmX 6 cm bleues

1- Simuler une mitose avec 3 chromosomes $2n=3$, puis haploïde $n=3$

2- Simuler une méiose, sans CO, puis, avec CO en marquant deux gènes A/a et B/b sur la bande.

3- Simuler une méiose, en supposant que la bande bleue de 6 cm est une paire d'hétérosomes avec Y qui ne porte pas de gène.