

# PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE DE L'AMÉLOGÉNINE



## PRÉPARER

Ce qu'il faut faire avant d'expérimenter

- METTRE EN ŒUVRE LE THERMOCYCLEUR 2
- PRÉPARER LE GEL D'AGAROSE 3-5

THERMOCYCLEUR



Logiciel

DIDACTIQUE



## EXPÉRIMENTER

Apprendre à mettre en œuvre un protocole

- TP PAS À PAS 6-15
  - ▶ DÉTERMINATION DU SEXE GÉNÉTIQUE D'UN INDIVIDU



## INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE 15-20
2. MUTATION ET MALADIE GÉNÉTIQUE 21-28
3. RECHERCHE DE PARENTÉ CHEZ LES MAMMIFÈRES 29-37
4. L'ÉPISSAGE DIFFÉRENCIÉ 38-50



## RESSOURCES

Fiches techniques, matériels, documents, ...



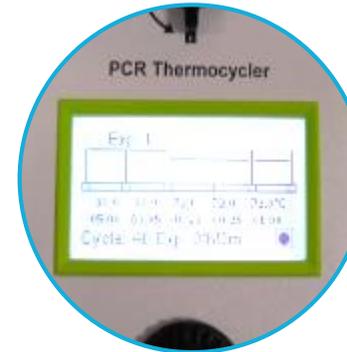
1 Connecter le thermocycleur PCR au secteur



2 Mettre le thermocycleur PCR en fonctionnement



3 Choisir le programme Modèle 1



Thermocycleur PCR  
En savoir plus > page 58

Ordinateur

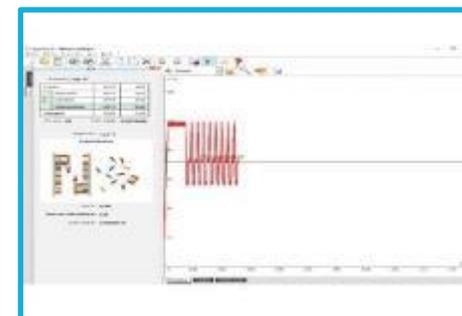
OPTION



4 Connecter le thermocycleur PCR à l'ordinateur



5 Allumer l'ordinateur



6 Télécharger puis lancer le logiciel didactique PCR



### MATÉRIEL

#### > Appareillage

- Balance 0,01 g 1
- Agitateur magnétique chauffant 1
- Support de gel + peigne 1

#### > Verrerie et petit matériel

- Fiole jaugée 250 mL 1
- Éprouvette graduée 100 mL 1
- Erlenmeyer 100 mL 1
- Verre de montre 1
- Entonnoir 1
- Spatule 1
- Thermomètre 1
- Moule coulage gel 1

#### > Produits

- Tampon TAE concentré 10X
- Agarose

#### > À disposition

- 1 pissette d'eau distillée
- Ruban adhésif de peintre
- Gants - Blouse - Lunettes

### PRÉPARER LE TAMPON

Verser le contenu du flacon de TAE 10X (25 mL) dans une fiole jaugée de 250 mL



Rincer 3x le flacon à l'eau distillée, verser cette eau de rinçage directement dans la fiole



3 X

Compléter la fiole en eau distillée jusqu'au trait de jauge (250 mL)

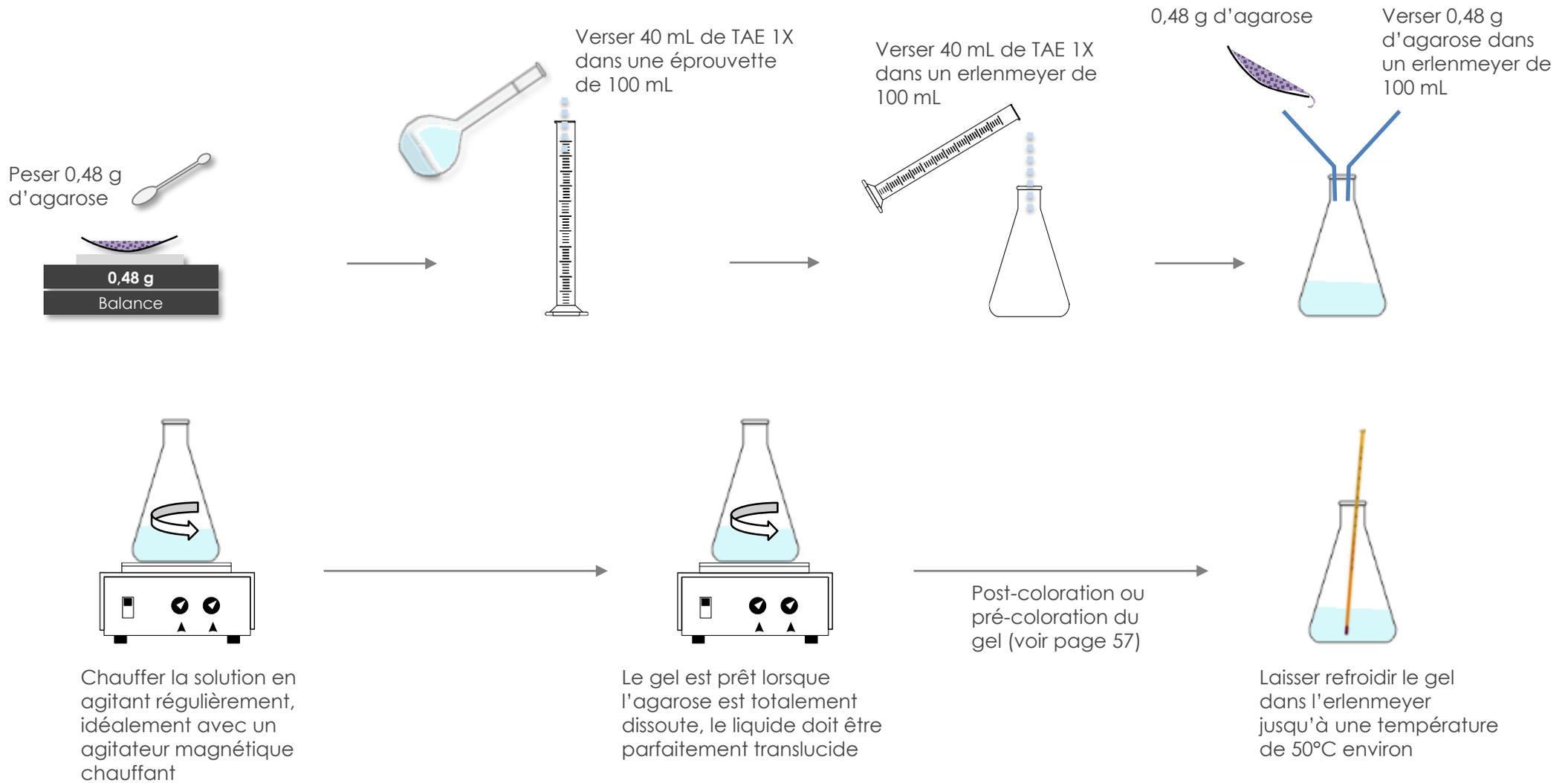


Vérifier le trait de jauge





### PRÉPARER LE GEL D'AGAROSE 1,2 %

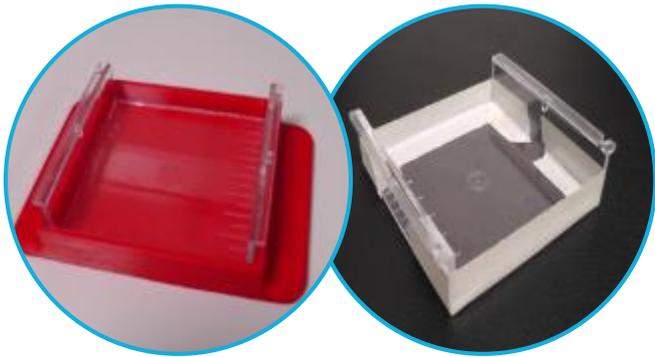


La nouvelle génération de colorants fluorescents facilite grandement les étapes de révélation. En fonction de la résolution de séparation des bandes d'ADN souhaitée, le gel peut être soit pré-coloré, ou alors coloré après la migration.



### COULER LE GEL D'AGAROSE

Positionner le support du gel dans le moule (ou préparer le support du gel en bouchant ses extrémités à l'aide de ruban adhésif pour peintre). Posez-le sur une surface parfaitement horizontale.



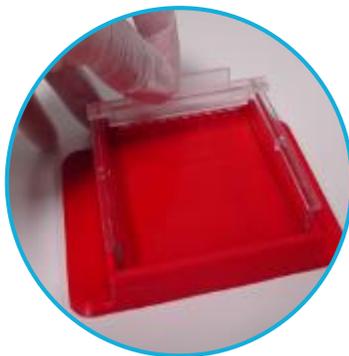
Couler le gel à 50°C dans le support sur une épaisseur de 0,5 cm environ.



#### Astuce

Si des bulles apparaissent, vous pouvez les faire éclater à l'aide d'un cône pour micropipette avant la solidification du gel.

Poser le peigne à sa place, pour former les puits lors du refroidissement du gel. Laisser le gel refroidir (15 – 20 min), en le mettant au réfrigérateur si nécessaire (ne transporter le support avec le gel que si celui-ci est déjà bien figé).



Une fois le gel complètement solidifié, retirer doucement le peigne dans un mouvement vertical, pour ne pas percer ou fêler les puits.



#### Astuce

Il est plus facile de retirer le peigne si le gel est immergé dans du tampon (mise en place dans la cuve avant de retirer le peigne).

Le gel peut être utilisé immédiatement ou conservé quelques jours au réfrigérateur dans du tampon de migration TAE 1X (une fois retiré du support).



### TP PAS À PAS

Un profil génétique est unique chez un individu ; on utilise, pour le déterminer, deux techniques : la PCR puis l'électrophorèse. La technique de la PCR permet d'amplifier une séquence spécifique d'ADN.

**UTILISATION DU GÈNE DE L'AMÉLOGÉNINE POUR LA DÉTERMINATION DU SEXE GÉNÉTIQUE D'UN INDIVIDU.**

## EXPÉRIMENTATION

### > Contextualisation

Dans le cadre de la découverte d'un fragment d'os humain sur une scène de crime, les experts sur place concluent que la détermination du sexe de la victime sur des bases biométriques (taille et forme des os comme le bassin, le crâne, le fémur etc...) est impossible.

Le recours à la biologie moléculaire est la seule solution pour déterminer le sexe génétique de la victime.

### > Hypothèse

Le gène de l'amélogénine est un gène qui code pour une protéine rentrant dans la composition de l'émail des dents et dont la séquence est différente en taille entre celle présente sur le chromosome X (1268 pb) et le chromosome Y (1088pb)

Le gène de l'amélogénine est plus long sur le chromosome X que sur le chromosome Y ; ainsi, lors de la migration des séquences de ce gène par électrophorèse d'agarose, on observera 1 bande correspondant aux deux mêmes longueurs de gène chez la femme (AMELX, AMELX) et 2 bandes de longueurs différentes chez l'homme (AMELX, AMELY).

### > Ce que l'on cherche

Comment différencier le sexe par l'utilisation du profil génétique (amplification d'un gène spécifique) ?  
Amplifier le nombre de copies de l'ADN de chaque gène par PCR, pour les rendre détectables et identifiables par électrophorèse.

## MATÉRIEL

### > Matériel par poste

• <b>Thermocycleur didactique</b>	1
• <b>Logiciel didactique</b>	1
• <b>Kit PCR amélogénine</b>	1
• Micropipette 25 µL + cônes adaptés	1
• Micropipette 0,5 – 10 µL + cônes adaptés	1
• Portoir pour tubes PCR	1
• Cuve à électrophorèse	1
• Alimentation pour cuve à électrophorèse	1
• Bécher 50 mL	1
• Transilluminateur	1
• Chambre noire pour transilluminateur	1
• Moule de coulage gel	1

### > À disposition

- 1 gel d'agarose 1,2 %
- ADN à déterminer
- ADN masculin & féminin
- Gants – Blouse - Lunettes
- Glace pilée
- Papier aluminium
- Colorant ADN GelGreen®
- Tampon TAE 1X
- Eau distillée



### VÉRIFIER AVANT DE COMMENCER LE TP

- > **Le thermocycleur** (page 2)  
Programme Modèle 1
- > **Le gel d'agarose 1,2 %** (pages 3 à 5)



### METTRE EN ŒUVRE LE TP - 1/7

#### > Préparer les tubes réactionnels

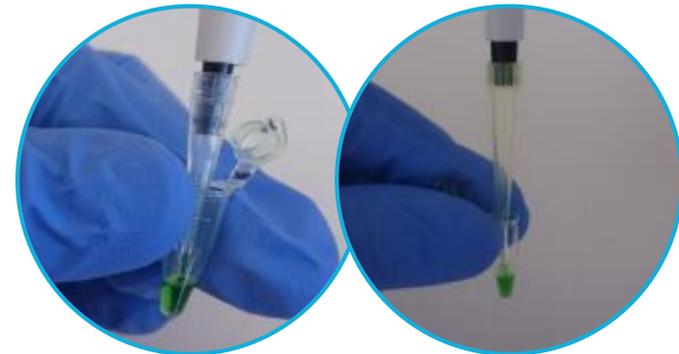


- Manipuler de préférence sur la glace, pour ne pas activer la Taq polymérase prématurément.
- Porter des gants (ou se laver très soigneusement les mains) pour éviter la contamination des échantillons avec de la DNase, enzyme détruisant l'ADN, présente naturellement sur la peau.

**1** Annoter le tube (nom de la personne ou Masculin/Féminin, par exemple).



**2** **Attention :** changer de cône avant chaque changement de solution. Déposer :  
- 25 µL de PCR mix (tube à pastille verte),  
- 25 µL de Primer mix (tube à pastille bleue).

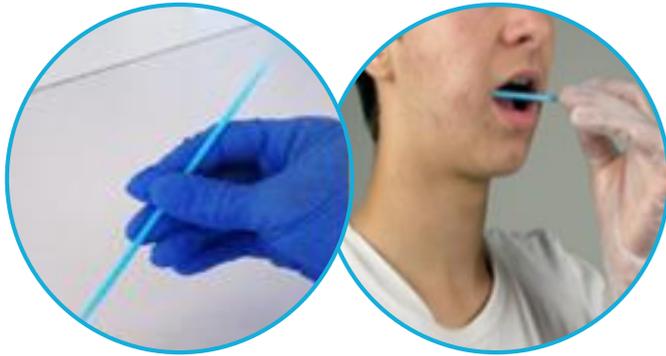




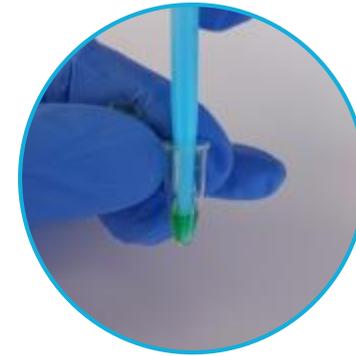
### METTRE EN ŒUVRE LE TP - 2/7



- 3 Frotter l'intérieur de la joue d'un individu de sexe masculin avec la pointe stérile, perpendiculairement à la joue, 3 à 4 fois, pour détacher des cellules (sources de l'ADN qui sera amplifié).



- 4 Introduire la pointe dans le milieu réactionnel, remuer doucement puis la ressortir en prenant garde d'emporter le moins de milieu possible.



- 5 Refermer le tube. On utilisera plutôt une pression verticale ferme, mais modérée, entre le pouce et l'index en évitant des pressions latérales.



- 6 Déposer le tube dans le thermocycleur. Répéter les étapes 1 à 6 précédentes en prélevant l'ADN d'un individu de sexe féminin. Préparer également discrètement un tube réactionnel contenant l'ADN à déterminer (masculin ou féminin).





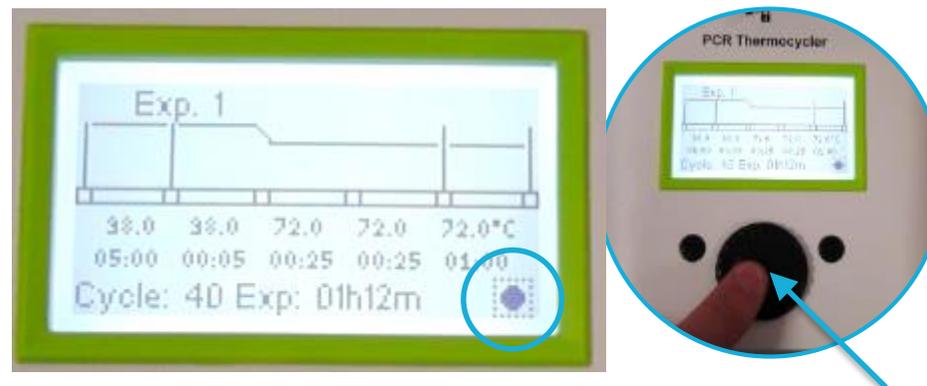
### METTRE EN ŒUVRE LE TP - 3/7

#### > Amplification

- 1 Une fois tous les tubes en place dans le thermocycleur, fermer le couvercle.



- 2 Placer le curseur sur ● et appuyer sur OK pour lancer le programme Modèle 1.



#### > Préparer l'ADN amplifié

Une fois l'amplification terminée, récupérer les tubes. Dans chaque tube, ajouter 2  $\mu$ L de DNA release (tube à pastille rouge). Mélanger par pipetage doux.



#### **Astuce**

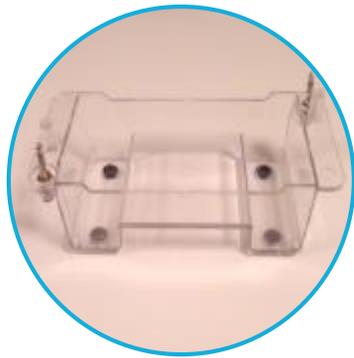
En fin de cycle, les tubes peuvent être stockés à 4 °C pendant 48 heures.



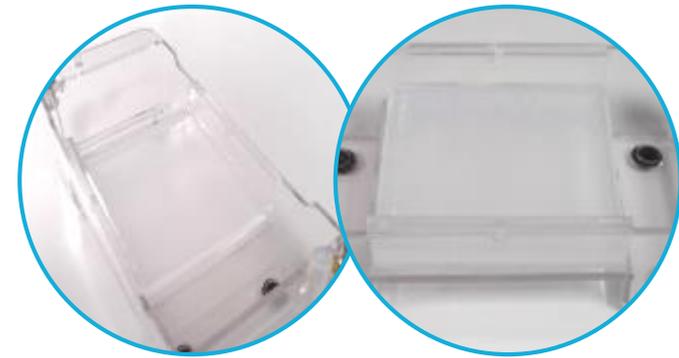
### METTRE EN ŒUVRE LE TP - 4/7

#### > Préparer le dispositif pour électrophorèse

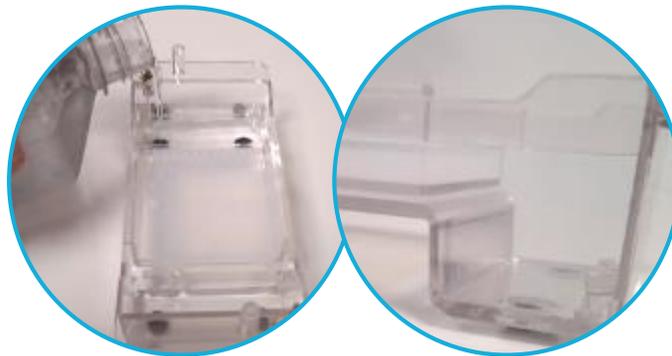
- 1 Poser la cuve à électrophorèse sur une surface parfaitement horizontale.



- 2 Poser le gel dans son support à l'intérieur de la cuve, les puits vers la cathode (borne négative).



- 3 Remplir la cuve de TAE 1X jusqu'à légèrement recouvrir le gel de 1 à 2 mm.





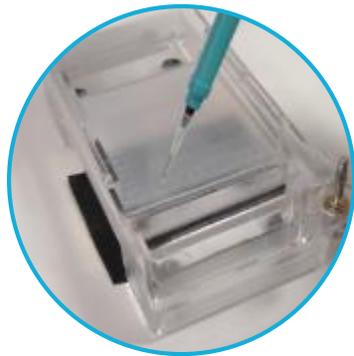
### METTRE EN ŒUVRE LE TP - 5/7

#### > Dépôts

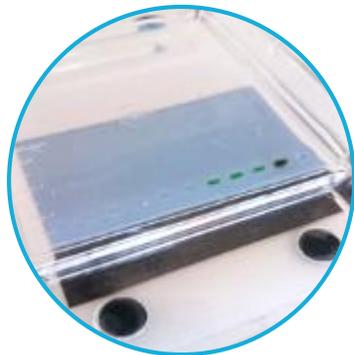


- Avant tout, s'assurer que le DNA release a bien été ajouté aux produits de PCR dans les tubes.
- Changer de cône à chaque changement de produit.
- L'ADN est chargé négativement, il migrera vers le pôle positif. Déposer l'ADN près du pôle négatif (cordon électrique noir).

- 1 1<sup>er</sup> puit : déposer 10  $\mu$ L de marqueur de poids moléculaire (tube à pastille jaune).



- 2 Puits suivants : déposer 8  $\mu$ L de produit de PCR (1 puit par tube).



#### **Astuce**

Pour rendre les puits plus visibles et faciliter les dépôts, il est utile de glisser un morceau de papier noir sous la cuve.

#### **Astuce**

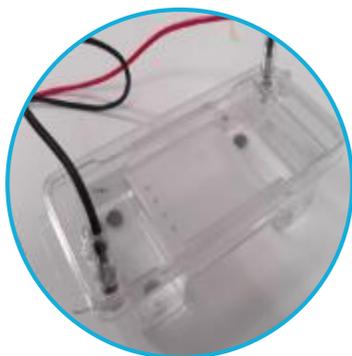
Pour éviter les fuites de produit hors des puits et les bulles d'air lors des dépôts, déposer très lentement à mi-hauteur dans les puits et arrêter avant que le cône ne soit entièrement vide (ne pas dépasser la 1<sup>ère</sup> butée du piston de la micropipette).



### METTRE EN ŒUVRE LE TP - 6/7

#### > Migration

1 Poser le couvercle sur la cuve.



2 Relier la cuve au générateur, en prenant bien garde à la polarité.



3 Régler l'alimentation sur 140 V (ou moins, la migration sera plus propre, mais plus longue).



4 Lancer la migration en mettant l'alimentation sous tension.

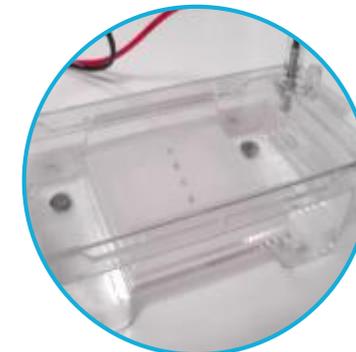
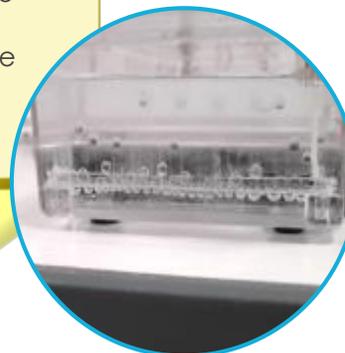


#### Astuce

Surveiller l'apparition de petites bulles sur les électrodes de la cuve, si elles n'apparaissent pas, c'est que le courant ne circule pas.

Surveiller le départ du colorant témoin de migration. S'il part dans le mauvais sens (vers l'arrière du gel, au risque de sortir de celui-ci) mettre immédiatement hors tension et inverser les branchements sur l'alimentation avant de relancer la migration.

5 Une fois le front de migration (visible grâce au colorant) arrivé aux 2/3 ou 3/4 du gel (environ 20 à 30 min à 140V), mettre le circuit hors tension pour stopper la migration et sortir le gel de la cuve pour le colorer.





### METTRE EN ŒUVRE LE TP - 7/7

#### > Coloration (post-coloration)

- 1 Préparer la solution du bain de coloration. Dans un bécher, verser 4,5  $\mu\text{L}$  de GelGreen<sup>®</sup> pour 25 mL d'eau distillée.



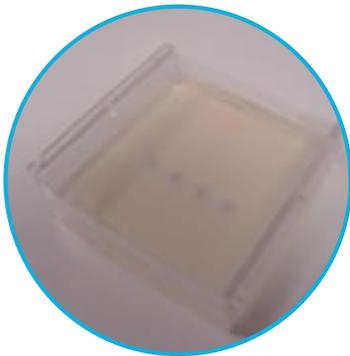
- 2 Si le TP a lieu plus tard (2h max.), protéger le bécher de la lumière à l'aide d'un aluminium.



- 3 Verser le contenu du bécher dans une petite cuve pour limiter au maximum les volumes morts.



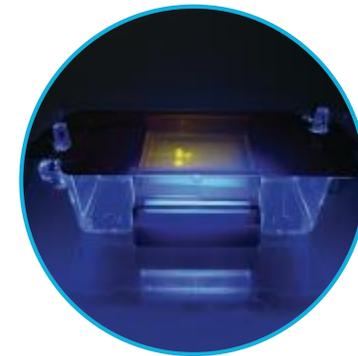
- 4 Faire tremper le gel 30 minutes, en couvrant d'un aluminium ou protéger de la lumière sous la chambre noire.



#### **Astuce**

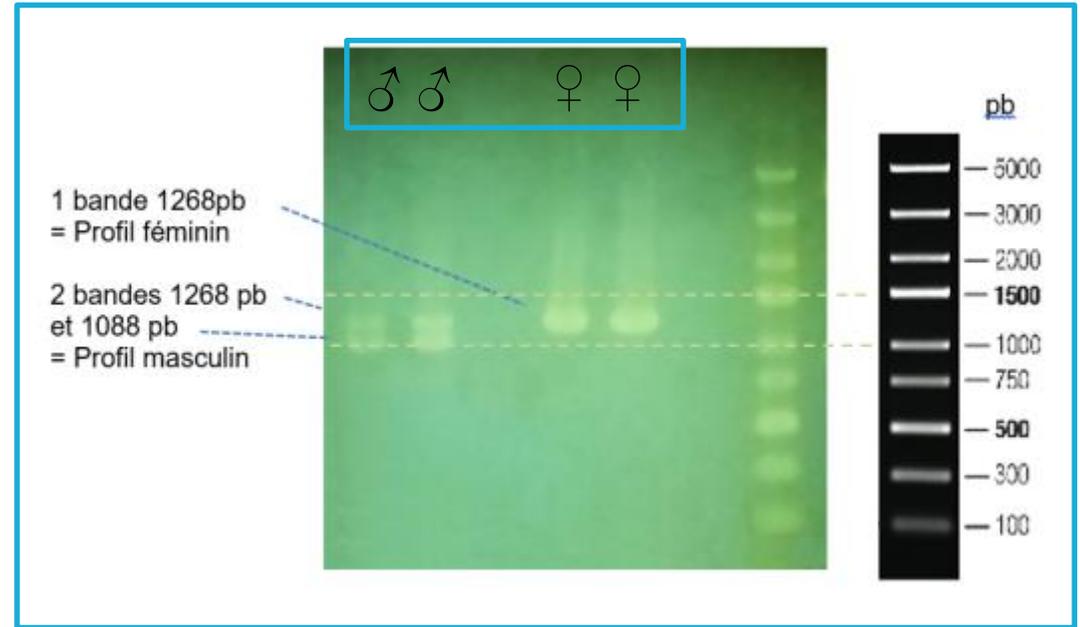
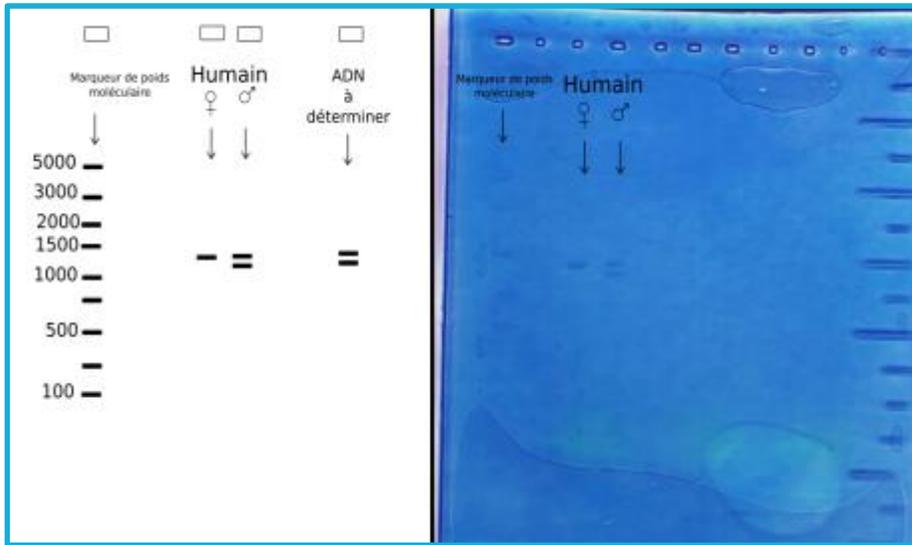
Pour économiser du colorant ou si on ne dispose pas de petit récipient adapté au gel, après l'électrophorèse il suffit d'entourer le gel et son support d'un film étirable type Parafilm<sup>®</sup> M pour étanchéifier les côtés ouverts puis on dépose 10 mL de solution additionnée de 2  $\mu\text{L}$  de GelGreen<sup>®</sup> pendant 30 à 45 minutes à l'obscurité.

- 5 La lecture s'effectue sur le transilluminateur .





### EXEMPLES DE RÉSULTATS



### EXPLOITATION DES RÉSULTATS



#### > Analyse

L'ADN du fragment d'os contient 2 séquences de tailles différentes du gène : 1268 paires de bases pour AMELX et 1088 pb pour AMELY.

#### > Conclusion

La PCR a permis l'amplification du nombre de copies de l'ADN des gènes AMEL.

Puis, l'électrophorèse a permis de différencier 2 fragments de gènes, de longueurs différentes, confirmant le génotype sexuel masculin de l'individu auquel appartenait le fragment d'os.

Le profilage génétique est donc une méthode efficace et rapide pour déterminer le sexe génétique d'un individu.

# PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE DE L'AMÉLOGÉNINE

THERMOCYCLEUR  
+  
Logiciel  
DIDACTIQUE



## PRÉPARER

Ce qu'il faut faire avant d'expérimenter

- METTRE EN ŒUVRE LE THERMOCYCLEUR 2
- PRÉPARER LE GEL D'AGAROSE 3-5

## EXPÉRIMENTER

Apprendre à mettre en œuvre un protocole

- TP PAS À PAS 6-15
  - ▶ DÉTERMINATION DU SEXE GÉNÉTIQUE D'UN INDIVIDU

## INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE 15-20
2. MUTATION ET MALADIE GÉNÉTIQUE 21-28
3. RECHERCHE DE PARENTÉ CHEZ LES MAMMIFÈRES 29-37
4. L'ÉPISSAGE DIFFÉRENCIÉ 38-50

## RESSOURCES

Fiches techniques, matériels, documents, ...





## INVESTIGATION 1 > DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE

### EXPÉRIMENTATION

#### > Contextualisation

La plupart des gènes présents sur le chromosome X ne sont pas présents sur le chromosome Y, créant une diversité génétique « physique » de fait, puisque ces gènes sont uniques chez l'homme (XY) mais en double chez la femme (XX).

Cependant, il existe des gènes présents sur le chromosome X et sur le chromosome Y, pour autant ces gènes présentent des allèles différentes.

Ces différences entre les allèles peuvent être liées à des différences de taille et/ ou de séquence d'ADN, qui signent une diversité génétique entre l'homme et la femme au niveau moléculaire.

De plus l'étude comparative chez différentes espèces, des séquences de ce gène permet-elle de remonter à la séquence de l'ancêtre commun ?

#### > Ce que l'on cherche

Ce TP permet de démontrer la variabilité entre les allèles d'un gène homologue porté par les chromosomes sexuels X et Y, au niveau de leur taille et de leur séquence.

Par extension, via l'analyse des séquences d'autres mammifères, on cherche à reconstruire l'arbre d'évolution génétique de ce gène.

#### > Ce que l'on veut montrer

Différences de taille des allèles AMEL X et AMEL Y, après amplification par PCR et migration par électrophorèse.

Différences des séquences AMEL X et AMEL Y à l'aide du logiciel Anagène dans l'espèce humaine.

Utilisation du logiciel Phylogène pour confirmer la séquence ancestrale des mammifères du gène AMELX.

### MATÉRIEL

#### > Matériel par poste

• <b>Thermocycleur didactique</b>	1
• <b>Logiciel didactique</b>	1
• <b>Kit PCR amélogénine</b>	1
• Micropipette 25 µL + cônes adaptés	1
• Micropipette 0,5 – 10 µL + cônes adaptés	1
• Portoir pour tubes PCR	1
• Cuve à électrophorèse	1
• Alimentation pour cuve à électrophorèse	1
• Bécher 50 mL	1
• Transilluminateur	1
• Chambre noire pour transilluminateur	1
• Moule de coulage gel	1

#### > À disposition

- 1 gel d'agarose 1,2 %
- ADN masculin et féminin
- Gants – Blouse - Lunettes
- Glace pilée
- Papier aluminium
- Colorant ADN GelGreen®
- Tampon TAE 1X
- Eau distillée
- Logiciel Phylogène
- Logiciel Anagène





## VÉRIFIER AVANT DE COMMENCER LE TP

### > Le thermocycleur (page 2)

Programme Modèle 1

### > Le gel d'agarose 1,2 % (pages 3 à 5)

## METTRE EN ŒUVRE LE TP

### > Préparer les tubes réactionnels

Déposer :

- 25  $\mu$ L de PCR mix (tube à pastille verte),
- 25  $\mu$ L de Primer mix (tube à pastille bleue).

Prélever de l'ADN sur deux élèves des deux sexes, masculin et féminin. Dans la mesure du possible, il peut être intéressant de comparer des séquences d'autres espèces, avec la même méthode d'échantillonnage.

Préparer les tubes réactionnels contenant l'ADN masculin et féminin.

### > Amplification

Lancer le programme Modèle 1.

### > Préparer l'ADN amplifié

Ajouter 2  $\mu$ L de DNA release (tube à pastille rouge). Mélanger par pipetage doux.

### > Préparer le dispositif pour électrophorèse

### > Dépôts

1<sup>er</sup> puit : 10  $\mu$ L de marqueur de poids moléculaire (tube à pastille jaune).

2<sup>ème</sup> puit : 8  $\mu$ L de produit PCR ADN masculin.

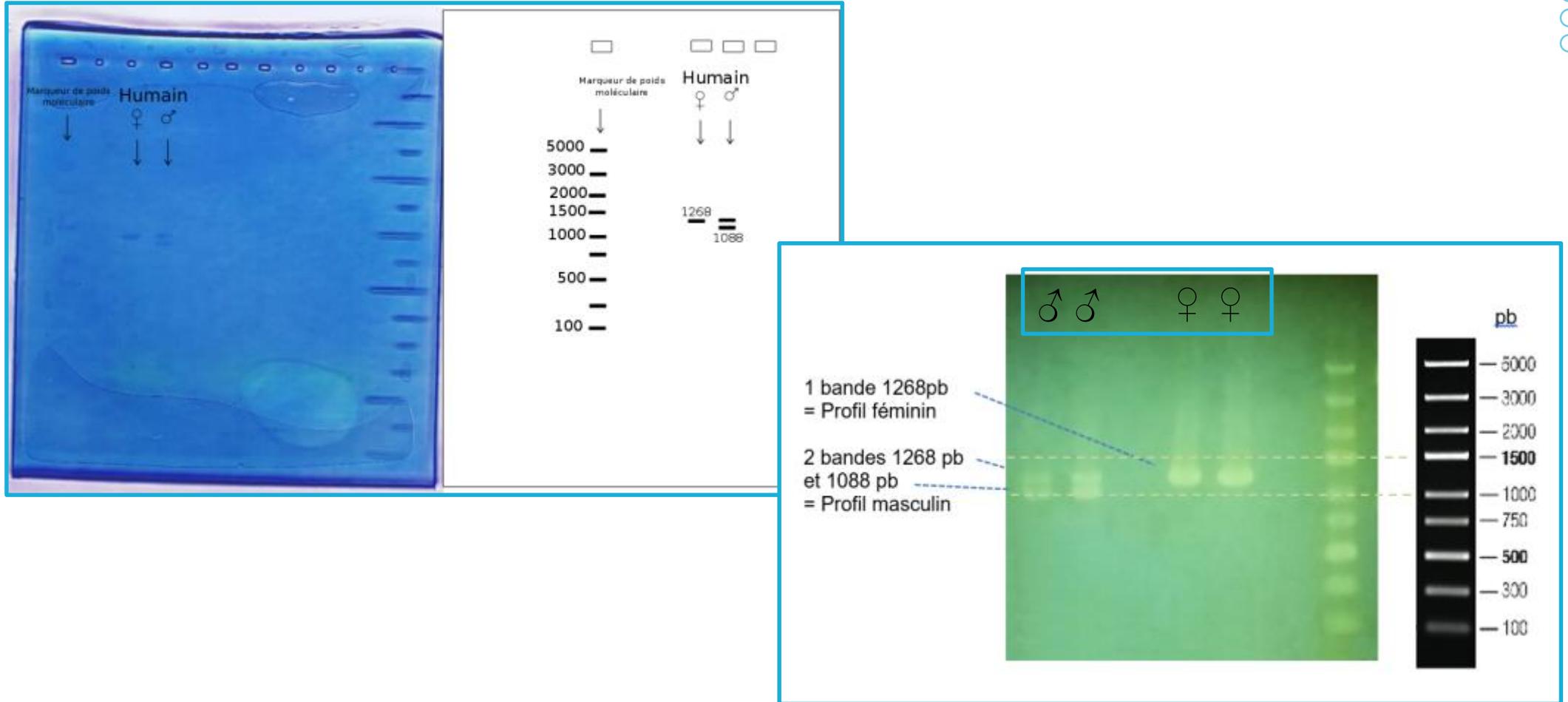
3<sup>ème</sup> puit : 8  $\mu$ L de produit PCR ADN féminin.

### > Post-coloration





## EXEMPLES DE RÉSULTATS



## EXPLOITATION DES RÉSULTATS -1/3



### > Analyse

Les résultats montrent que les séquences sont de tailles différentes entre l'allèle présent sur le chromosome X (AMELX) et l'allèle présent sur le chromosome Y : 1268 paires de bases pour AMELX et 1088 pb pour AMELY.



## EXPLOITATION DES RÉSULTATS -2/3

### > Comparaison des séquences avec Anagène

Affichage des séquences

	1060	1070	1080	1090
AMELX	AACCTCAGTCAAGTTAATGAATCTCTTTAACTCCCATAACI			
AMELY	ACTCACATTCTCAGGCTATCAATGTTGACAGGA			

Sélection : 0/2 lignes

Affichage des séquences

	1250	1260	1270
AMELX	CACATTCTCAGGCTATCAATGTTGACAGGA		
AMELY			

Sélection : 0/2 lignes

On observe, par comparaison des séquences avec Anagène, une différence de taille entre l'allèle présent sur le chromosome X et l'allèle présent sur le chromosome Y.  
La comparaison des séquences avec discontinuité permet d'expliquer cette différence de taille.

Comparaison avec alignement

	50	50	210	490	500	590	560	670	1280
Traitement									
Identités	**** **	*** **	*** **	*****	*****	*****	*****	**** *****	
AMELX	CCGAGAT	GTI	AGC	CACAGATGTTATTCTTACTA	ACTTTGTGATTTAATATTGTTT	CTGATTATTTTTT	TGACAGGA		
AMELY	---	A	AAAGTC	---	TGAC	---	A	---	---

Sélection : 0/4 lignes

Informations

AMELY

Séquence d'ADN alignée

longueur : 1088 bases (sans compter les discontinuités)

-> 964 bases identiques à la séquence de référence AMELX ,  
soit 88,6 % d'identité

le signe - représente les identités  
le signe \_ représente les discontinuités

Commentaires:  
AMELY <ADN> <NonAMELY>

On observe sur l'allèle situé sur le chromosome X de nombreuses délétions qui permettent d'expliquer la différence de taille entre les séquences présentes sur les deux chromosomes.

L'allèle du gène de l'amélogénine présent sur le chromosome Y est moins soumis aux pressions de sélection ; ainsi, cet allèle a conservé plus de mutations.

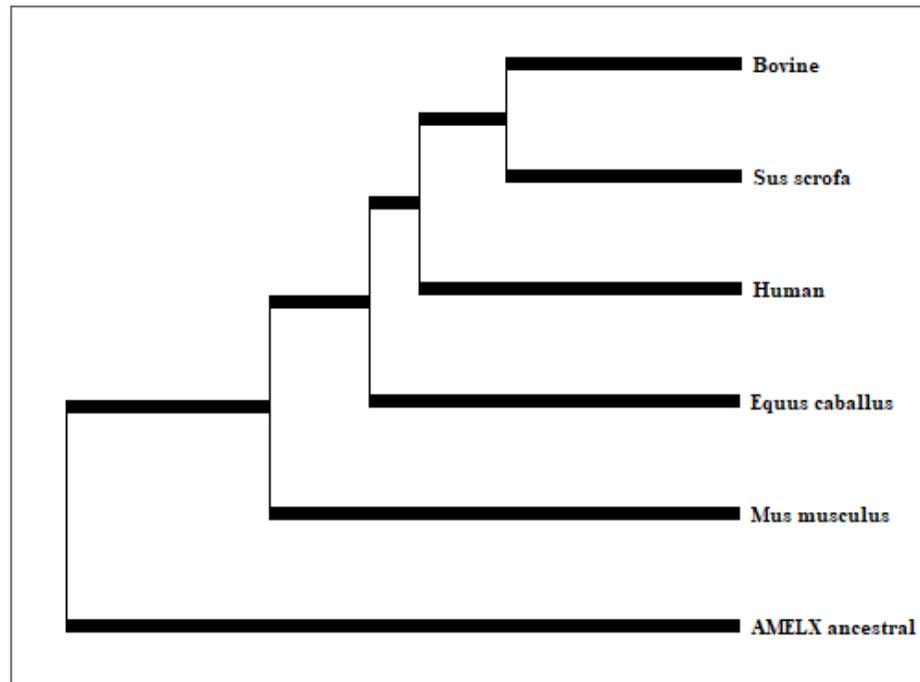


## EXPLOITATION DES RÉSULTATS -3/3

### > Utilisation de Phylogène pour confirmer / infirmer la séquence ancestrale des mammifères du gène AMELX

Dans leurs travaux publiés dans l'article « Molecular Evolution of Amelogenin in Mammals », Sydney Delgado, Marc Girondot et Jean-Yves Sire ont pu déterminer la séquence ancestrale hypothétique du gène de l'amélogénine des mammifères.

A partir de la séquence, un arbre de parenté peut être établi avec les séquences du gène chez d'autres espèces de mammifères afin de confirmer ou infirmer l'hypothèse de la séquence ancestrale.



Arbre phylogénétique de la séquence du gène de l'amélogénine présente sur le chromosome X chez différentes espèces de mammifères.

### > Conclusion

La séquence déterminée semble bien posséder un caractère ancestral. Ainsi l'étude de l'arbre permet de déterminer la parenté des mammifères. Ainsi, cette étude permet de montrer que la différence entre deux séquences d'un même gène est liée à l'existence de mutations dans la séquence d'ADN. Les phénomènes d'évolution (sélection naturelle et dérive génétique) ont sélectionné différentes séquences qui proviennent de la séquence possédée par l'ancêtre commun (séquence ancestrale).



# PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE DE L'AMÉLOGÉNINE

THERMOCYCLEUR  
+  
Logiciel  
DIDACTIQUE



## PRÉPARER

Ce qu'il faut faire avant d'expérimenter

- METTRE EN ŒUVRE LE THERMOCYCLEUR 2
- PRÉPARER LE GEL D'AGAROSE 3-5

## EXPÉRIMENTER

Apprendre à mettre en œuvre un protocole

- TP PAS À PAS 6-15
  - ▶ DÉTERMINATION DU SEXE GÉNÉTIQUE D'UN INDIVIDU

## INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE 15-20
2. MUTATION ET MALADIE GÉNÉTIQUE 21-28
3. RECHERCHE DE PARENTÉ CHEZ LES MAMMIFÈRES 29-37
4. L'ÉPISSAGE DIFFÉRENCIÉ 38-50

## RESSOURCES

Fiches techniques, matériels, documents, ...





## INVESTIGATION 2 > MUTATION ET MALADIE GÉNÉTIQUE : L'AMÉLOGÉNÈSE IMPARFAITE

### MISE EN SITUATION PÉDAGOGIQUE

Il est préférable d'aborder cette séquence pédagogique après avoir au préalable traité d'un cas de maladie autosomale comme la mucoviscidose ou l'hémochromatose et d'un cas d'hérédité liée au sexe comme le daltonisme.

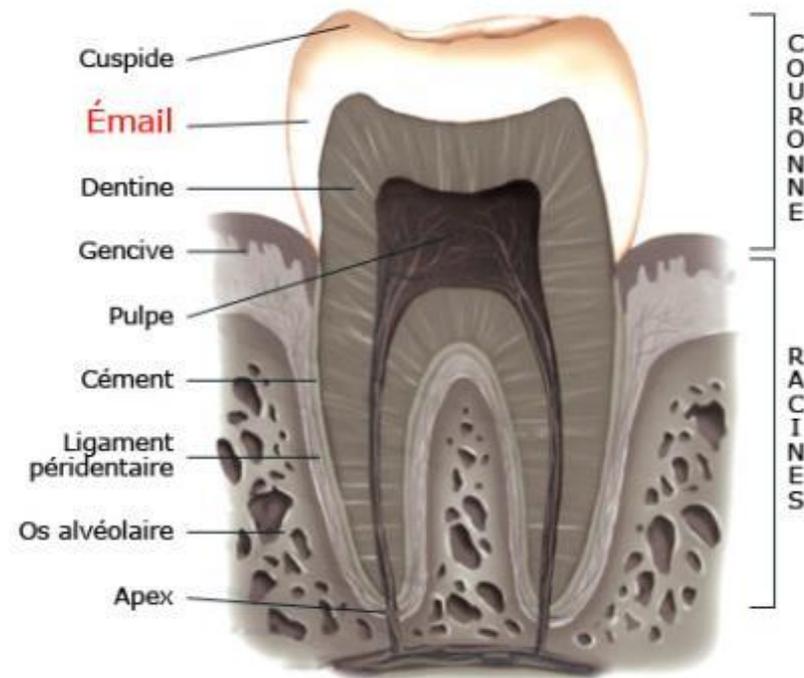
Le contexte scientifique propose un arbre généalogique d'une famille atteinte d'amélogénèse imparfaite, la localisation des gènes AMEL sur les chromosomes X et Y et des données sur la synthèse de l'émail. Grâce à l'amélogénine, les élèves vont pouvoir s'interroger sur ce cas curieux d'hérédité liée au sexe. AMEL étant porté à la fois par X et par Y, et la forme mutée du gène étant récessive, la maladie devrait affecter de la même façon les filles et les garçons.

L'hypothèse d'une différence entre AMEL X et AMEL Y peut alors être posée et vérifiée par amplification et révélation par PCR et électrophorèse sur les garçons et les filles de la classe.

### CONTEXTE SCIENTIFIQUE - 1/5

#### > Les amélogénines et l'émail dentaire

L'émail est la partie externe de la couronne des dents. Cette substance, qui recouvre la dentine, est la plus dure et la plus minéralisée de l'organisme, mais bien qu'étant minéralisée, la mise en place de l'émail nécessite une matrice architecturale protéique. Les amélogénines sont les protéines quantitativement les plus importantes de la matrice de l'émail, elles représentent 90% du total des protéines nécessaires à la formation de l'émail.



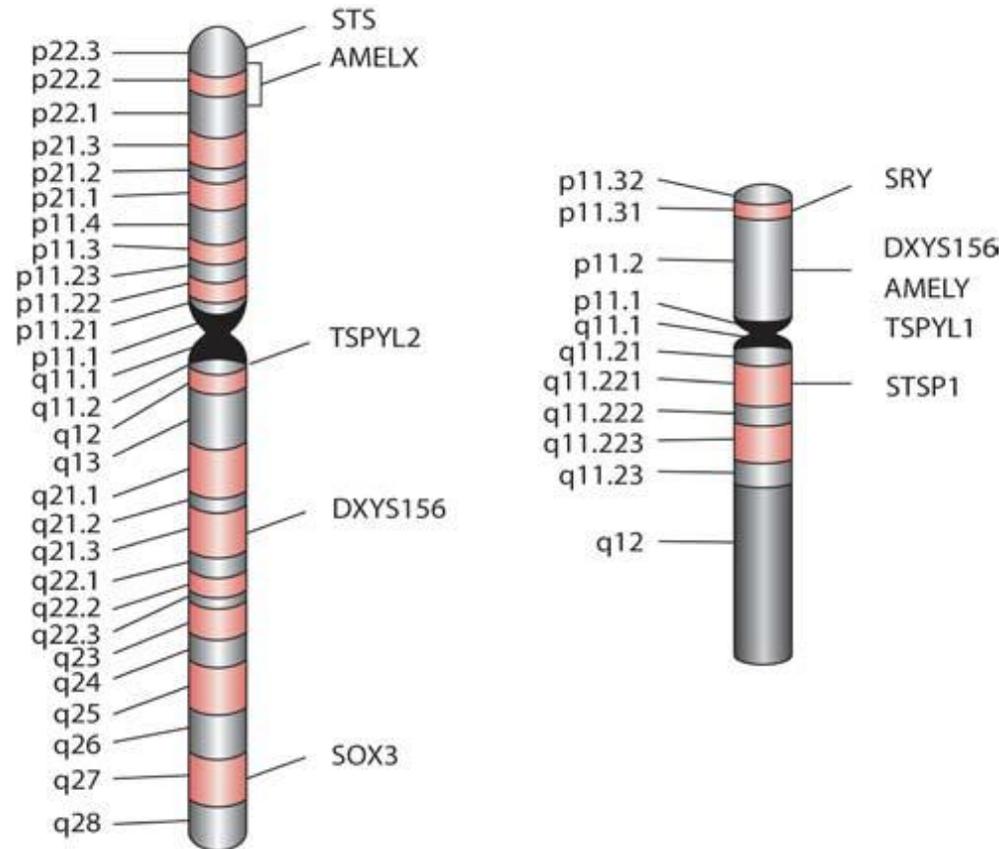


## CONTEXTE SCIENTIFIQUE - 2/5

### > La génétique de la synthèse des amélogénines

Les amélogénines sont des protéines codées par un gène porté par le chromosome sexuel X (gène AMELX) et par un gène porté par le chromosome sexuel Y (gène AMELY). Les protéines issues de la traduction de ces deux gènes sont légèrement différentes, elles présentent 91% d'homologies entre leurs séquences. Chez l'homme, les deux gènes sont exprimés, mais la transcription du gène AMELY ne représente que 10% du taux de transcription d'AMELX, de ce fait la quantité de protéine provenant de ce gène est très faible, et donc il n'y a pas de différence entre l'émail des hommes et celui des femmes. Il n'y a pas de dimorphisme sexuel.

Localisation du gène AMEL sur les chromosomes X (à gauche) et Y (à droite)



Source : THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE, Margaux OBLED, 26 avril 2016, LILLE 2



## CONTEXTE SCIENTIFIQUE - 3/5

### > Quelles différences entre les gènes AMELX et AMELY ?

Le gène AMEL, initialement séquencé par Nakahori et al, se trouve sur les deux chromosomes X et Y (numéro d'accès sur GenBank M55418 pour AMELX et M55419 pour AMELY). Il y a des différences de séquence et de taille entre eux. Le gène AMELX a une taille de 2872 pb et est situé sur la région Xp22.1-Xp22.3 du chromosome X, tandis que le gène AMELY a une taille de 3272 pb et est situé sur la région Yp11.2 du chromosome Y.

Le faible taux de transcription du gène AMELY par rapport à AMELX fait que la protéine issue d'AMELY a un rôle quasi-nul dans le développement de l'émail dentaire. Au cours de l'histoire de l'évolution humaine des mutations ont pu s'accumuler dans ce gène sans entraîner de désavantage sélectif pour les individus porteurs. Parmi ces mutations, des additions ont sans doute « augmenté » la taille du gène AMELY par rapport à AMELX.

Ces mutations, sans impact pour les individus, ont été transmises par les pères à leurs fils se sont progressivement répandus dans la population.

### > Alors que AMELY est plus grand que AMELX, on obtient après électrophorèse une bande de taille plus courte pour AMELY que pour AMELX. Comment l'expliquer ?

Après amplification par PCR des séquences de ce gène, on observe par électrophorèse pour la femme 1 seule bande correspondant aux deux mêmes longueurs de gène chez la femme (AMELX, AMELX) et 2 bandes de longueurs différentes chez l'homme (AMELX, AMELY). La bande correspondant à AMELX a une longueur de 1268 pb alors que celle correspondant à AMELY a une longueur de 1088pb. Cette différence de taille s'explique par le fait que la totalité de la séquence génique n'est pas amplifiée par PCR. Seule une portion choisie de la séquence des gènes est amplifiée puis révélée par l'électrophorèse. Ici l'amplification de séquence par PCR se fait dans une zone choisie où le gène AMELY a subi de nombreuses délétions par rapport à AMELX. Cette séquence est donc plus courte pour AMELY que pour AMELX.





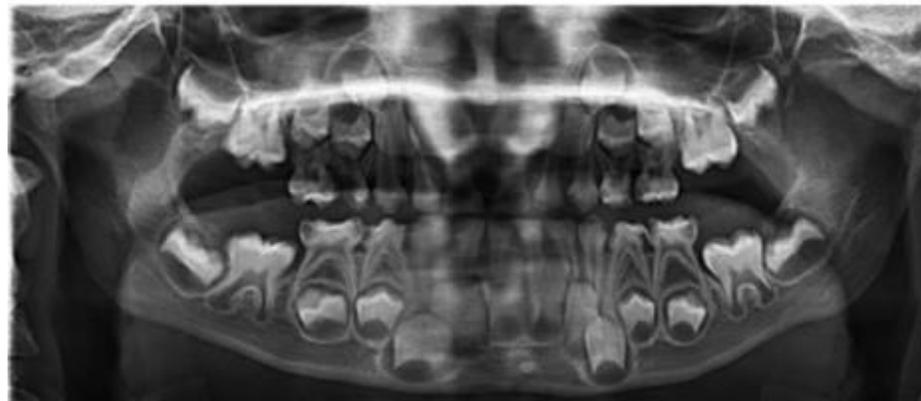
## CONTEXTE SCIENTIFIQUE - 4/5

### > L'amélogenèse imparfaite est liée au sexe

L'amélogenèse imparfaite (ou AI) est une maladie génétique correspondant à une anomalie du développement affectant la formation de l'émail de toutes les dents, temporaires et/ou permanentes. Cela cause leur fragilité et un préjudice esthétique. Comme plusieurs protéines interviennent dans la formation de l'émail dentaire et que les gènes codants sont situés sur des autosomes ou les gonosomes, l'AI peut avoir un mode de transmission autosomique ou gonosomique. Nous ne nous intéresserons ici qu'au défaut de synthèse de l'amélogénine dont le gène AMEL est porté par X et Y. Lorsqu'un garçon reçoit de sa mère un chromosome X porteur d'une version mutée du gène AMELX, la protéine issue de la traduction de ce gène est non fonctionnelle. Cette synthèse quantitativement importante, n'est pas compensée par la faible synthèse d'amélogénine fonctionnelle issue d'AMELY. L'émail n'est donc pas produit chez les garçons porteurs d'un gène AMELX muté. Chez les filles, la pathologie est plus discrète. La mutation du gène AMEL engendre un émail strié. Les dents présentent des bandes d'émail normales alternées avec des bandes dénuées d'émail.



Radiographie chez un individu sain



Radiographie panoramique d'une amélogenèse imparfaite  
(source : Dr Thomas Trentesaux)

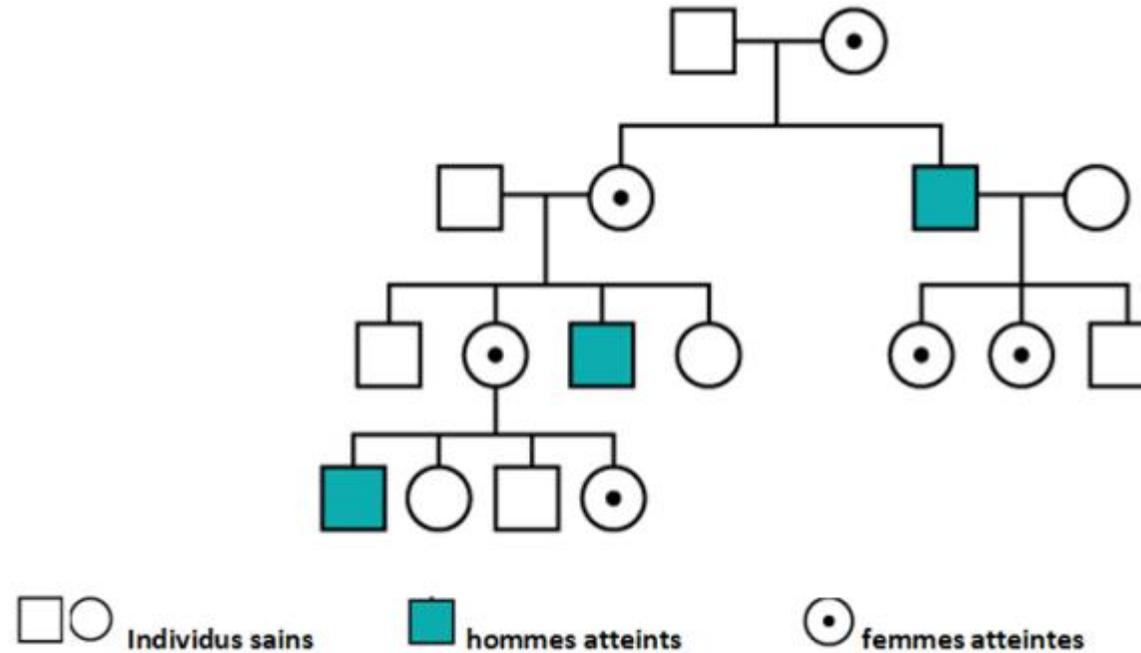




## CONTEXTE SCIENTIFIQUE - 5/5



Arbre généalogique d'une famille atteinte d'amélogénèse imparfaite liée au gène AMEL



### > Une explication à l'expression différente de la pathologie selon le sexe

Lorsqu'une fille reçoit un chromosome X porteur d'un gène AMEL muté, la synthèse d'amélogénine non fonctionnelle devrait pouvoir être compensée par l'autre chromosome X porteur d'une version non mutée du gène AMEL. Mais chez tous les mammifères femelles un des deux chromosomes X est inactivé aléatoirement dans chaque cellule lors du développement embryonnaire. Une fois cette inactivation réalisée, elle se transmet à l'identique aux cellules filles à chaque division cellulaire. Des groupes de cellules adjacentes possèdent donc les mêmes propriétés. Cette inactivation aléatoire du chromosome X permet donc d'expliquer l'alternance de bandes avec émail et de bandes sans émail sur les dents des filles atteintes d'AI.

Chez les garçons porteurs d'un X avec AMEL muté, cette version mutée du gène n'est pas compensée par AMEL Y en raison du faible taux d'expression de ce gène. L'amélogénine n'est pas du tout (ou trop peu) synthétisée et l'émail n'est pas produit.



## CE QUE L'ON CHERCHE

### > Hypothèse

Le gène AMEL étant porté à la fois par X et par Y, et la forme mutée du gène étant récessive, la maladie devrait affecter de la même façon les filles et les garçons or ce n'est pas ce que l'on constate.

L'hypothèse d'une différence entre AMEL X et AMEL Y peut alors être posée et vérifiée par amplification par PCR suivie d'une révélation par électrophorèse sur les garçons et les filles de la classe.

## METTRE EN ŒUVRE LE TP

### Mise en œuvre et interprétation identique au TP pas à pas (pages 6 à 14)

#### Pour résumer

- > Préparer les tubes réactionnels
  - 25 µL de PCR mix (tube à pastille verte),
  - 25 µL de Primer mix (tube à pastille bleue).
  - Frottis buccaux d'individus féminins et masculin.
- > Amplification
  - Lancer le programme Modèle 1.
- > Préparer l'ADN amplifié
  - Ajouter 2 µL de DNA release (tube à pastille rouge).
- > Préparer le dispositif pour électrophorèse en gel 1,2 % en tampon TAE.

## MATÉRIEL

### > Matériel par poste

• <b>Thermocycleur didactique</b>	1
• <b>Logiciel didactique</b>	1
• <b>Kit PCR amélogénine</b>	1
• Micropipette 25 µL + cônes adaptés	1
• Micropipette 0,5 – 10 µL + cônes adaptés	1
• Portoir pour tubes PCR	1
• Cuve à électrophorèse	1
• Alimentation pour cuve à électrophorèse	1
• Bécher 50 mL	1
• Transilluminateur	1
• Chambre noire pour transilluminateur	1
• Moule de coulage gel	11

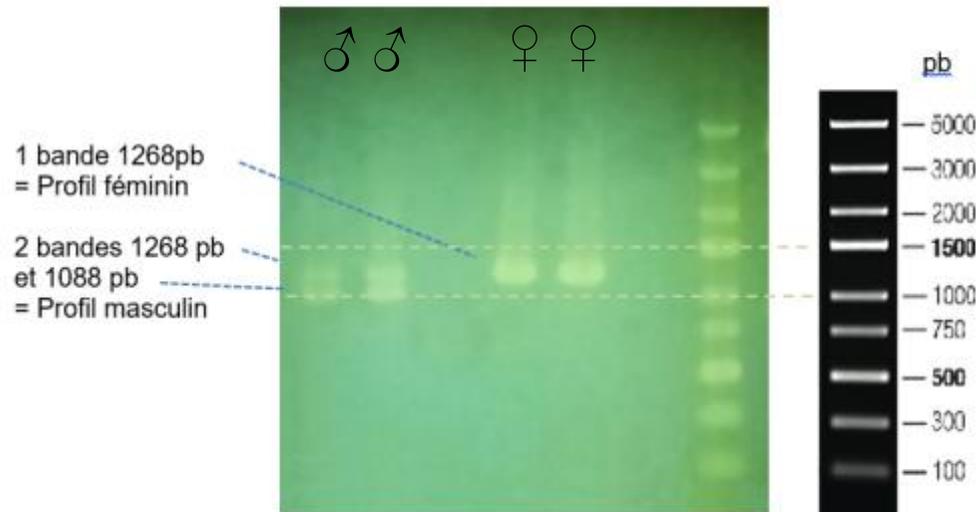
### > À disposition

- 1 gel d'agarose 1,2 %
- ADN masculin
- ADN féminin
- Gants – Blouse - Lunettes
- Glace pilée
- Papier aluminium
- Colorant ADN GelGreen®
- Tampon TAE 1X
- Eau distillée





## EXEMPLES DE RÉSULTATS



## INTERPRÉTATION

L'amplification et l'électrophorèse vont révéler qu'effectivement AMEL X et AMEL Y possèdent des tailles différentes. On observe que le génotypage des filles donne une seule bande qui correspond aux deux fragments d'AMEL X superposés. Le génotypage des garçons donne deux bandes. Le fragment AMEL Y est plus court et migre donc plus loin sur le gel d'électrophorèse.

Toutefois cette différence de taille ne suffit pas à expliquer l'hérédité liée au sexe de l'AI. Des données complémentaires sur le taux d'expression des deux gènes et sur l'inactivation d'un des deux X chez les filles sont nécessaires.

### > Des alternatives à cette démarche

Selon le niveau des élèves, il est possible de simplifier la démarche en n'évoquant pas l'AI discrète chez les filles. Cela permet de traiter alors l'AI comme une hérédité liée au sexe plus classique. Seule la différence entre AMEL X et AMEL Y et la différence d'expression des deux gènes seront nécessaires pour fournir une explication. On pourra ainsi s'affranchir du processus d'inactivation d'un des deux chromosomes X.



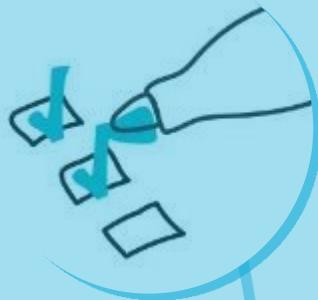
# PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE DE L'AMÉLOGÉNINE

THERMOCYCLEUR

+

Logiciel

DIDACTIQUE



## RESSOURCES

Fiches techniques, matériels, documents, ...

## PRÉPARER

Ce qu'il faut faire avant d'expérimenter

- METTRE EN ŒUVRE LE THERMOCYCLEUR 2
- PRÉPARER LE GEL D'AGAROSE 3-5

## EXPÉRIMENTER

Apprendre à mettre en œuvre un protocole

- TP PAS À PAS 6-15
  - ▶ DÉTERMINATION DU SEXE GÉNÉTIQUE D'UN INDIVIDU

## INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE 15-20
2. MUTATION ET MALADIE GÉNÉTIQUE 21-28
3. RECHERCHE DE PARENTÉ CHEZ LES MAMMIFÈRES 29-37
4. L'ÉPISSAGE DIFFÉRENCIÉ 38-50



## INVESTIGATION 3 > RECHERCHE DE PARENTÉ CHEZ LES MAMMIFÈRES

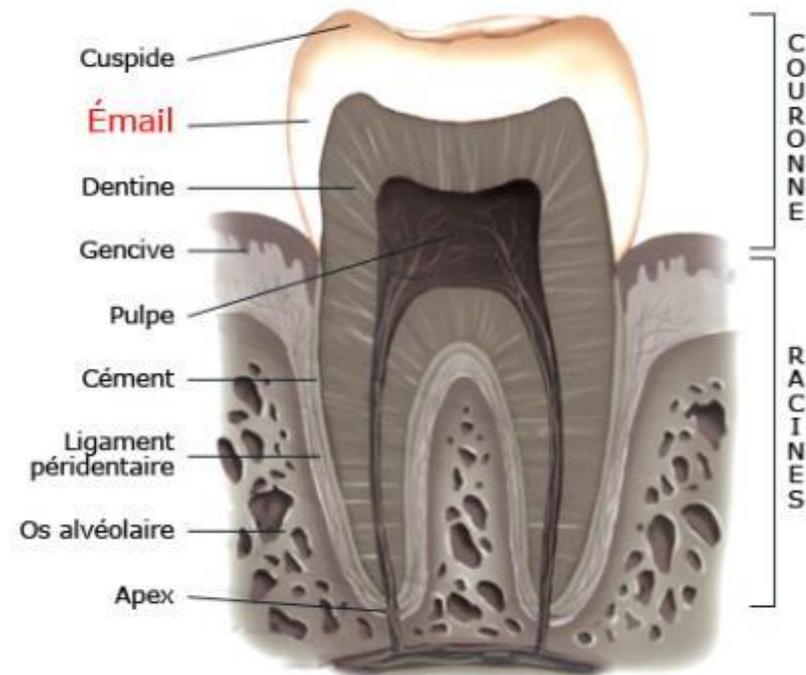
### MISE EN SITUATION PÉDAGOGIQUE

La protéine amélogénine est le composant majeur du développement de l'émail des mammifères, dans lequel elle représente environ 90% de la teneur en protéines (Termine et al., 1980, Fincham et al., 1983, Sasaki et Shimokawa, 1995, Delgado et al, 2004). En tant que protéine prédominante, l'amélogénine joue un rôle essentiel dans le développement de l'émail. Le gène de l'amélogénine est un gène qui a été particulièrement conservé chez les mammifères, il pourrait donc être utilisé afin de déterminer la phylogénie des mammifères puis celle des primates.

### CONTEXTE SCIENTIFIQUE - 1/3

#### > Les amélogénines et l'émail dentaire des mammifères

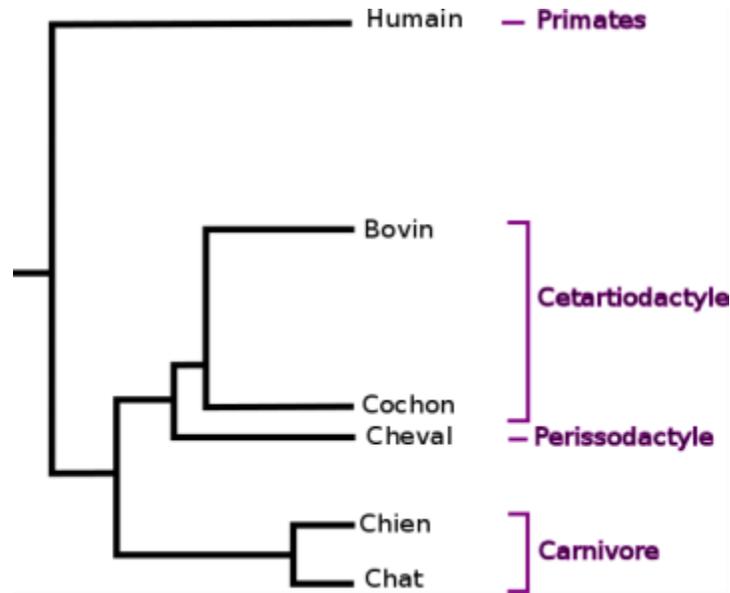
L'émail est la partie externe de la couronne des dents. Cette substance, qui recouvre la dentine, est la plus dure et la plus minéralisée de l'organisme, mais bien qu'étant minéralisée, la mise en place de l'émail nécessite une matrice architecturale protéique. Les amélogénines sont les protéines quantitativement les plus importantes de la matrice de l'émail, elles représentent 90% du total des protéines nécessaires à la formation de l'émail.





## CONTEXTE SCIENTIFIQUE - 2/3

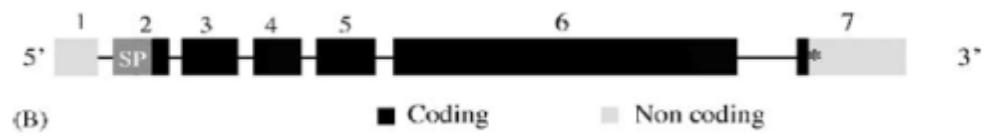
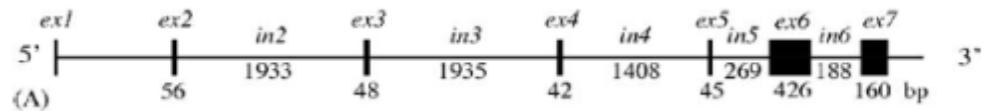
Document 1 : Arbre phylogénétique simplifié des mammifères (Madsen et al in Delgado et al, 2004).



Document 2 : Gène de l'amélogénine.

(A) Structure du gène

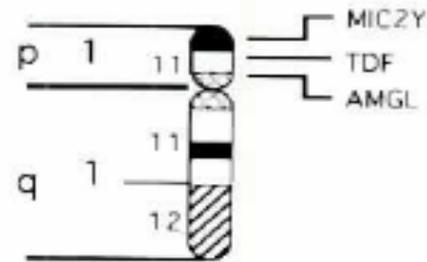
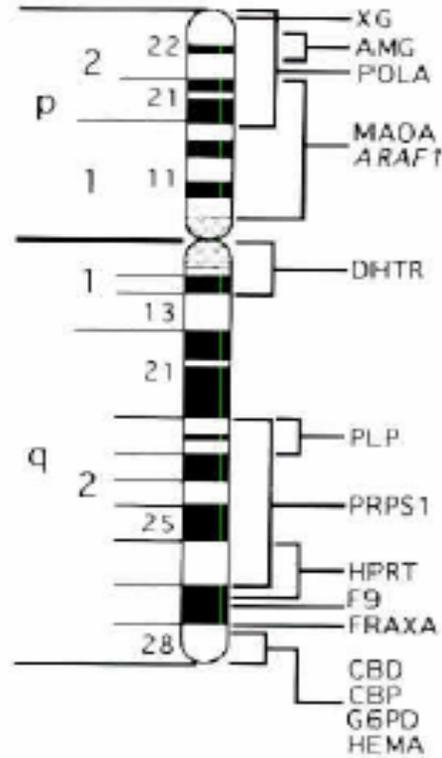
(B) Séquences codantes et non codantes – L'exon 1 est non codant et une grande partie de l'exon 2 code pour le peptide signal (Delgado et al, 2004)





## CONTEXTE SCIENTIFIQUE - 3/3

Document 3 : Cartographie du gène de l'amélogénine AMG sur le chromosome X et sur le chromosome Y.





## EXPÉRIMENTATION

### > Hypothèse

L'amélogénine étant le composé majeur de l'émail des dents des mammifères, on peut émettre l'hypothèse que sa séquence génétique est particulièrement bien conservé au cours de l'évolution. On pourrait alors utiliser le gène de l'amélogénine afin de confirmer ou infirmer la phylogénie des mammifères puis celle des primates.

### > Ce que l'on cherche

Les amorces du kit amélogénine ont été spécifiquement conçues à partir de séquences génétiques humaines des gènes AMEL X et Y. A partir du couple d'amorces est-il possible de mettre en évidence des séquences AMEL chez d'autres espèces de mammifères ?

On va tester le génome provenant de cellules d'autres espèces de mammifère. On va donc échantillonner à partir d'animaux de notre environnement ou de viande alimentaire fraîche :

- bœuf,
- porc,
- chien, chats,
- chevaux.

### À PROPOS DE LA DÉMARCHE

L'amplification PCR et la migration sur gel d'agarose sont suivies d'une construction d'arbre phylogénétique à l'aide de logiciel et de comparaison de séquences.

## MATÉRIEL

### > Matériel par poste

• <b>Thermocycleur didactique</b>	1
• <b>Logiciel didactique</b>	1
• <b>Kit PCR amélogénine</b>	1
• Micropipette 25 µL + cônes adaptés	1
• Micropipette 0,5 – 10 µL + cônes adaptés	1
• Portoir pour tubes PCR	1
• Cuve à électrophorèse	1
• Alimentation pour cuve à électrophorèse	1
• Bécher 50 mL	1
• Transilluminateur	1
• Chambre noire pour transilluminateur	1
• Moule de coulage gel	1

### > À disposition

- 1 gel d'agarose 1,2 %
- ADN masculin
- ADN féminin
- ADN animaux
- Gants – Blouse - Lunettes
- Glace pilée
- Papier aluminium
- Colorant ADN GelGreen®
- Tampon TAE 1X
- Eau distillée





## METTRE EN ŒUVRE LE TP

### > Préparer les tubes réactionnels voir TP pas à pas (pages 6 à 14)

- 25 µL de PCR mix (tube à pastille verte),
- 25 µL de Primer mix (tube à pastille bleue).

- Echantillons d'ADN de mammifères

> 2 possibilités : prélèvement de cellules buccales chez nos animaux de compagnie ou prélèvement de cellules à partir d'abats d'animaux (foie).

### > Amplification

Lancer le programme Modèle 1.

### > Préparer l'ADN amplifié

Ajouter 2 µL de DNA release (tube à pastille rouge).

### > Préparer le dispositif pour électrophorèse en gel 1,2 % en tampon TAE.

Dépôts (à titre d'exemple)

1<sup>er</sup> puit : 10 µL de marqueur de poids moléculaire (tube à pastille jaune).

2<sup>ème</sup> puit : 8 µL de produit PCR ADN homme.

3<sup>ème</sup> puit : 8 µL de produit PCR ADN femme.

4<sup>ème</sup> puit : 8 µL de produit PCR ADN taureau.

5<sup>ème</sup> puit : 8 µL de produit PCR ADN vache.

6<sup>ème</sup> puit : 8 µL de produit PCR ADN cheval.

7<sup>ème</sup> puit : 8 µL de produit PCR ADN jument.

8<sup>ème</sup> puit : 8 µL de produit PCR ADN cochon.

9<sup>ème</sup> puit : 8 µL de produit PCR ADN truie.

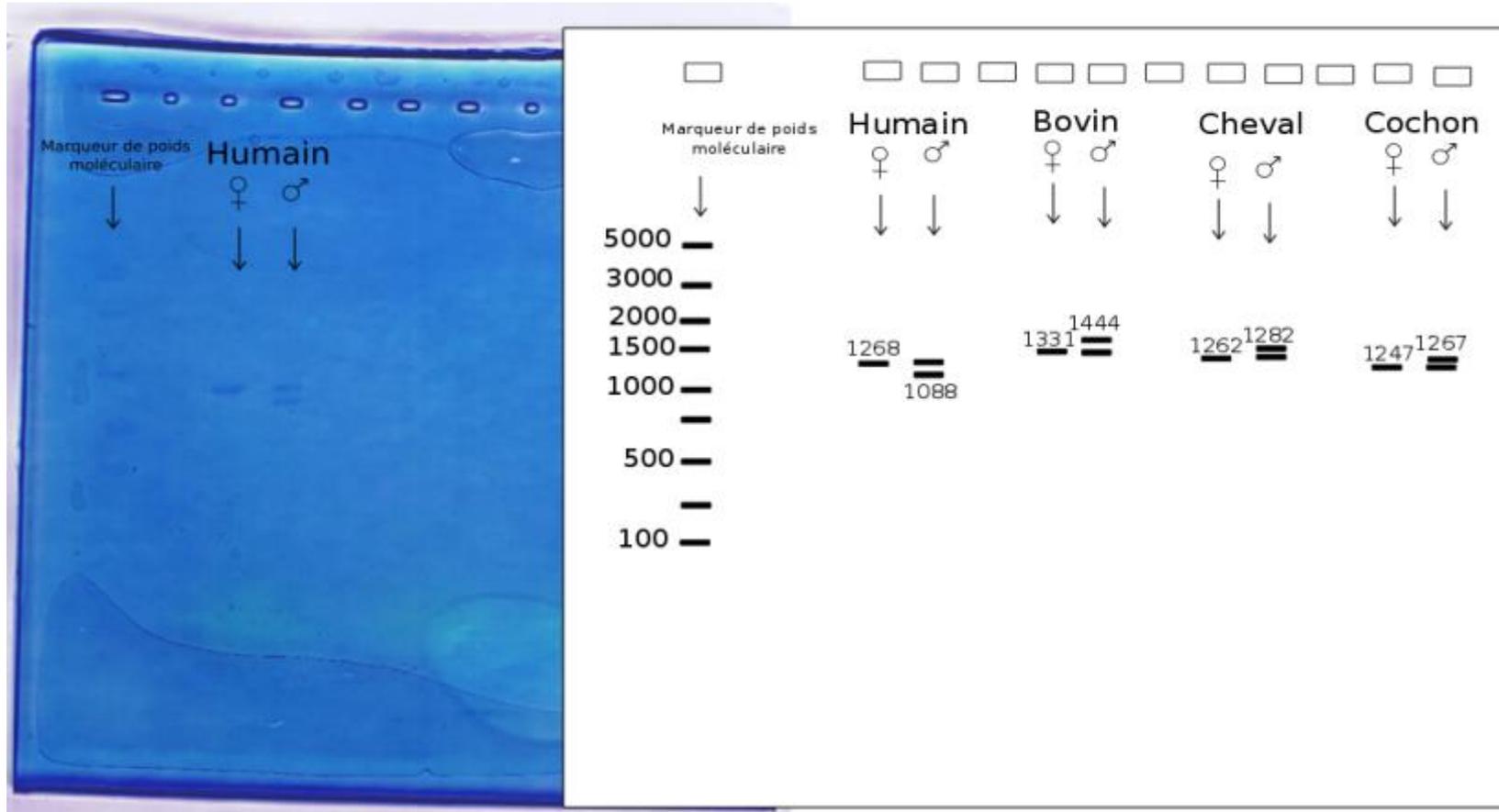
### > Révélation

La pré-coloration est possible, mais ici on pourra privilégier si possible la post-coloration qui permet d'avoir une migration bien résolue et augmenter les chances de détecter des bribes de séquences amplifiées.





## EXEMPLES DE RÉSULTATS - 1/2



### > Etude de la comparaison des gènes de l'amélogénine par étude de la migration sur gel d'agarose

L'étude de la migration du gène de l'amélogénine chez ces mammifères montre qu'il existe peu de différences dans la taille du gène entre les espèces, par contre, on observe qu'au sein de ces espèces, la taille du gène de l'amélogénine diffère entre celui situé sur le chromosome X (1268 pb) et celui situé sur le chromosome Y (1088 pb).



## EXEMPLES DE RÉSULTATS - 2/2



### > Construction d'arbres phylogénétiques

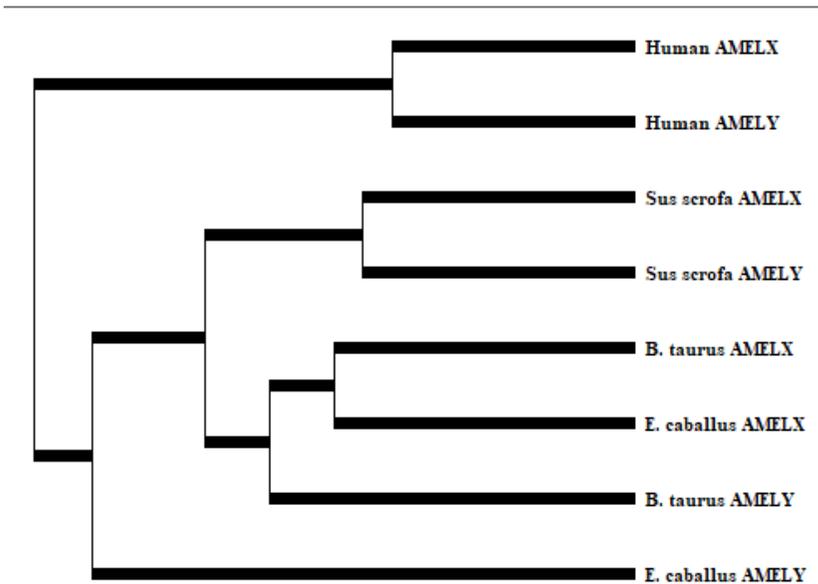
Lancer le logiciel de construction d'arbres phylogénétiques.

Comparer les séquences d'ARNm des espèces précédentes.

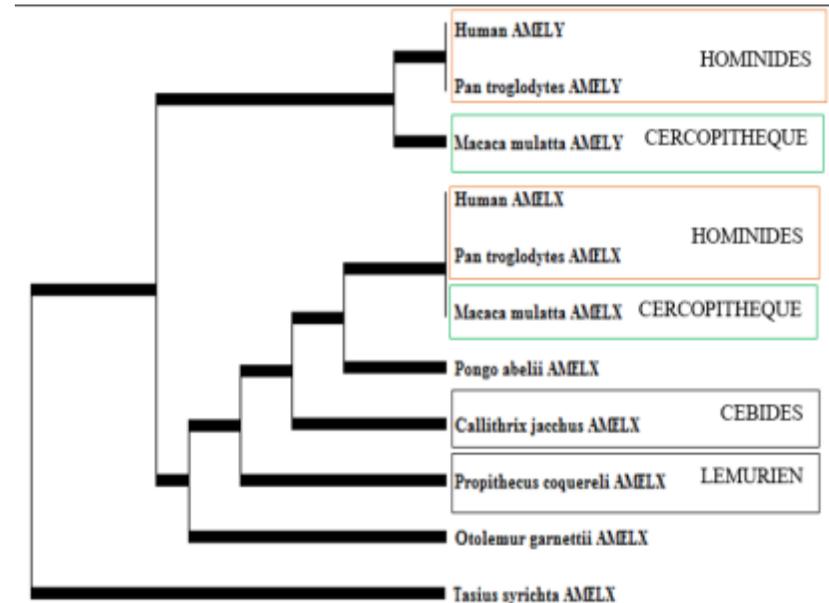
Analyser les résultats et discuter de l'appartenance de l'espèce humaine au groupe phylogénétique des mammifères.

Comparer les séquences d'ARNm des différentes espèces de primate.

Analyser les résultats et discuter de l'appartenance de l'espèce humaine au groupe phylogénétique des primates.



Arbre phylogénétique de l'ADN amplifié de l'amélogénine chez différents mammifères



Arbre phylogénétique de l'ARNm de l'amélogénine chez différents primates



## EXPLOITATION DES RÉSULTATS



### > Étude de la comparaison des gènes de l'amélogénine par comparaison moléculaire de l'ARNm grâce au logiciel Phylogène chez les mammifères

La comparaison moléculaire montre que les séquences X et Y sont relativement similaires (homologues) au sein d'une même espèce chez les euthériens.

Le gène de l'amélogénine est un gène qui a migré chez l'ancêtre des Euthériens sur les chromosomes sexuels.

Le gène sur le chromosome Y joue un rôle minoritaire dans l'amélogénèse, ainsi il n'est pas lié aux mêmes pressions de sélection que le même gène sur le chromosome X. Les taux de mutation ne sont pas équivalents, le gène du chromosome Y évolue donc plus vite que celui du X et c'est ce qui explique la différence entre les séquences de ce gène entre les chromosomes.

Remarque : Aujourd'hui il est présent sur le chromosome X de tous les mammifères, alors qu'il a disparu du chromosome Y de certains mammifères. Cela n'a pas d'importance car le gène du chromosome X à lui seul est capable d'induire la formation de l'émail. Au départ, il était présent sur le chromosome X et sur le chromosome Y (des mâles) mais au cours de l'évolution, le chromosome Y s'est mis à dégénérer car la partie qui porte des gènes communs avec le chromosome X s'est réduite alors que la partie qui porte les gènes spécifiques aux caractères sexuels mâles a augmenté.

### > Étude de la comparaison des gènes de l'amélogénine par comparaison moléculaire de l'ARNm grâce au logiciel Phylogène chez les primates

On observe que dans cet arbre, les gènes X et Y appartiennent à 2 lignées différentes même si au sein de l'évolution d'un gène (sur un des chromosomes), on observe globalement la différenciation entre les singes de l'ancien monde et du nouveau monde.

Les deux gènes évoluent séparément depuis quelques millions d'années en raison d'une absence de recombinaison entre les chromosomes X et Y.

Le gène Y se comporte comme un gène à part de celui du X. En revanche, la phylogénie à travers le gène de l'amélogénine reste très similaire à la phylogénie globale des primates.

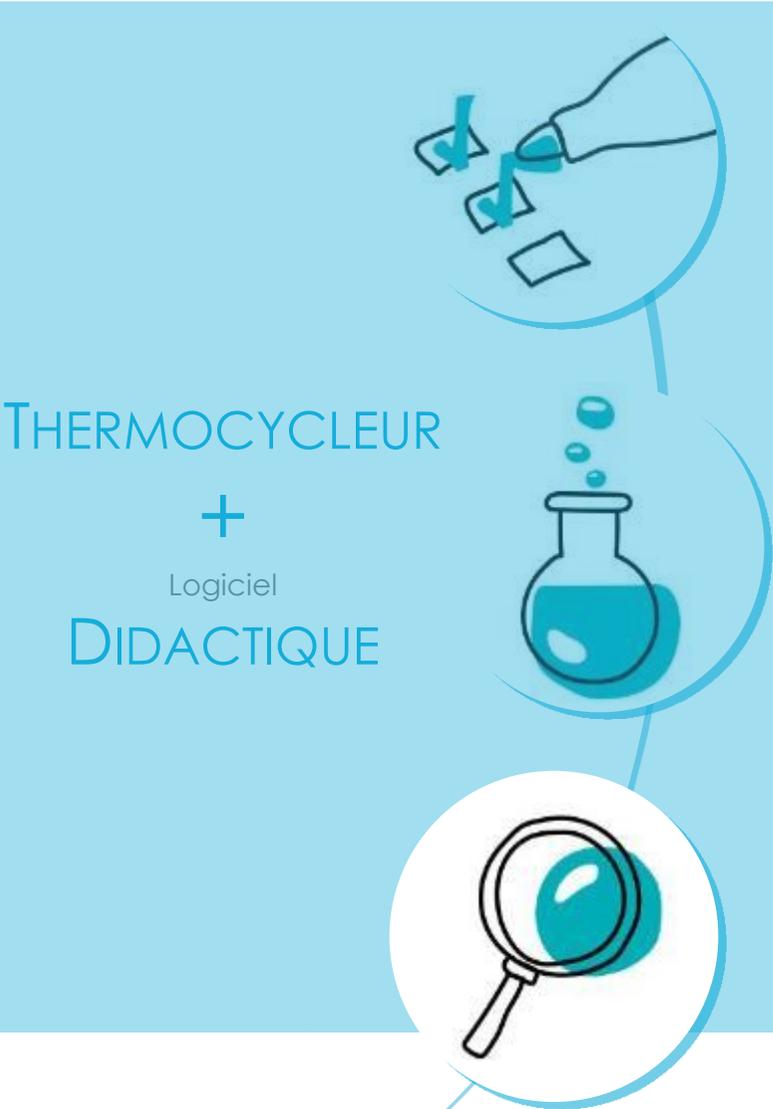
On peut en conclure que l'Homme est une espèce proche de celle du chimpanzé et se situe dans la famille des grands singes.

### > Conclusion

On peut donc conclure que le gène de l'amélogénine permet de confirmer les arbres phylogénétiques actuels des mammifères et des primates ainsi que la place de l'humain au sein de ces arbres phylogénétiques.



# PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE DE L'AMÉLOGÉNINE



## PRÉPARER

Ce qu'il faut faire avant d'expérimenter

- METTRE EN ŒUVRE LE THERMOCYCLEUR 2
- PRÉPARER LE GEL D'AGAROSE 3-5

## EXPÉRIMENTER

Apprendre à mettre en œuvre un protocole

- TP PAS À PAS 6-15
  - ▶ DÉTERMINATION DU SEXE GÉNÉTIQUE D'UN INDIVIDU

## INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE 15-20
2. MUTATION ET MALADIE GÉNÉTIQUE 21-28
3. RECHERCHE DE PARENTÉ CHEZ LES MAMMIFÈRES 29-37
4. L'ÉPISSAGE DIFFÉRENCIÉ 38-50

## RESSOURCES

Fiches techniques, matériels, documents, ...





## INVESTIGATION 4 > DÉTERMINATION DE L'ÉPISSAGE DIFFÉRENCIEL ENTRE LE CHROMOSOME X ET LE CHROMOSOME Y

### EXPÉRIMENTATION

#### > Contextualisation

La protéine amélogénine est le composant majeur du développement de l'émail des mammifères, dans lequel elle représente environ 90% de la teneur en protéines (Termine et al., 1980, Fincham et al., 1983, Sasaki et Shimokawa, 1995 in Delgado et al, 2004). En tant que protéine prédominante, l'amélogénine joue un rôle essentiel dans le développement de l'émail.

#### > L'hypothèse

L'hypothèse d'une différence entre AMEL X et AMEL Y peut alors être posée et vérifiée par amplification par PCR suivie d'une révélation par électrophorèse sur les garçons et les filles de la classe

#### > Ce que l'on cherche

Comment peut-on étudier la structure d'un gène et en déduire les séquences codantes et non codantes ?

### MATÉRIEL

#### > Matériel par poste

• Thermocycleur didactique	1
• Logiciel didactique	1
• Kit PCR amélogénine	1
• Micropipette 25 µL + cônes adaptés	1
• Micropipette 0,5 – 10 µL + cônes adaptés	1
• Portoir pour tubes PCR	1
• Cuve à électrophorèse	1
• Alimentation pour cuve à électrophorèse	1
• Bécher 50 mL	1
• Transilluminateur	1
• Chambre noire pour transilluminateur	1
• Moule de coulage gel	1

#### > À disposition

- 1 gel d'agarose 1,2 %
- ADN masculin et féminin
- Gants – Blouse - Lunettes
- Glace pilée
- Papier aluminium
- Colorant ADN GelGreen®
- Tampon TAE 1X
- Eau distillée
- Logiciel Anagène

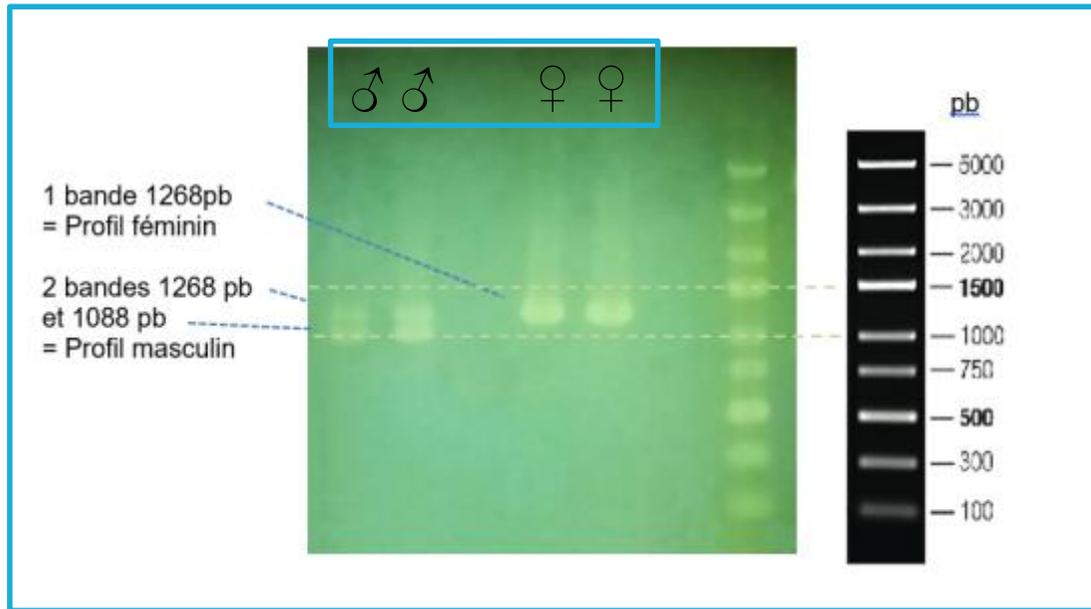




## METTRE EN ŒUVRE LE TP

> Mise en œuvre identique au TP pas à pas page 6 à 14

## EXEMPLES DE RÉSULTATS



## > Analyse

On observe sur le gel la différence de migration entre l'allèle présent sur le chromosome X (1268 pb) et l'allèle présent sur le chromosome Y (1088 pb).

Comment expliquer cette différence de séquence ?



## EXPLOITATION DES RÉSULTATS - 1/8



### > Comparaison des séquences avec Anagène

Comparaison avec alignement

50 60

Traitement	<	>	0
Identités	<	>	0
AMELX	<	>	0
AMELY	<	>	0

Sélection : 0/4 lignes

```
***** ** *****
ATCCAGAT_____GTTTCTCA
-----A--AAAGTG-----
```

270

```
** *****
AC__CAGCTTG
--TGAC-----
```

310 320

```
**** **
GTAAGATGTTATTTAAACTC
---A--
```

480 490 500

```
* ***** **
;TCCTCAACCTCTTACTAAGTTTGTGATTTT
-----
```

Comparaison avec alignement

590 600 610 620 630 640 650 660 670

Traitement	<	>	0
Identités	<	>	0
AMELX	<	>	0
AMELY	<	>	0

Sélection : 0/4 lignes

```
***** ***** ***** * ** * ** ***** ***** ***** **
CAAAATATTGTTTGGAGAGTAATATAGTTAATGAATATGAAAAGTGCTTTGTCAAGTATAATATGAGCAAGGTTACTGATTATTTT
-----A-----CA-T--A--C-----A-----
```

950 960 1220

```
***** ***** ** * ** ***** *****
TTGTGACATCAAGAAAAAATG ICAAAAT_TTTTAC
-----G--G--G-----
```

Informations Anagène :  
Alignement multiple de séquences d'ADN :  
Identités des séquences  
l'alignement comprend 1281 bases  
-> 964 bases identiques (représentées par le signe \*)  
soit 75,3 % d'identité

AMELX  
Séquence d'ADN alignée  
longueur : 1268 bases (sans compter les discontinuités)  
-> référence pour la comparaison

AMELY  
Séquence d'ADN alignée  
longueur : 1088 bases (sans compter les discontinuités)  
-> 964 bases identiques à la séquence de référence  
AMELX,  
soit 88,6 % d'identité



## EXPLOITATION DES RÉSULTATS - 2/8

### > Comparaison des séquences avec Anagène

#### Informations Anagène :

Alignement multiple de séquences d'ADN : Identités des séquences

l'alignement comprend 1281 bases

-> 964 bases identiques (représentées par le signe \*)

soit 75,3 % d'identité

-----  
AMELX

Séquence d'ADN alignée

longueur : 1268 bases (sans compter les discontinuités)

-> référence pour la comparaison

-----  
AMELY

Séquence d'ADN alignée

longueur : 1088 bases (sans compter les discontinuités)

-> 964 bases identiques à la séquence de référence AMELX ,

soit 88,6 % d'identité  
-----

### > Analyse

La comparaison des deux séquences par Anagène montre des délétions de 193 pb sur AMELY et 13 pb sur AMELX, on observe donc, comme sur le gel, une différence de 180pb entre les deux séquences.

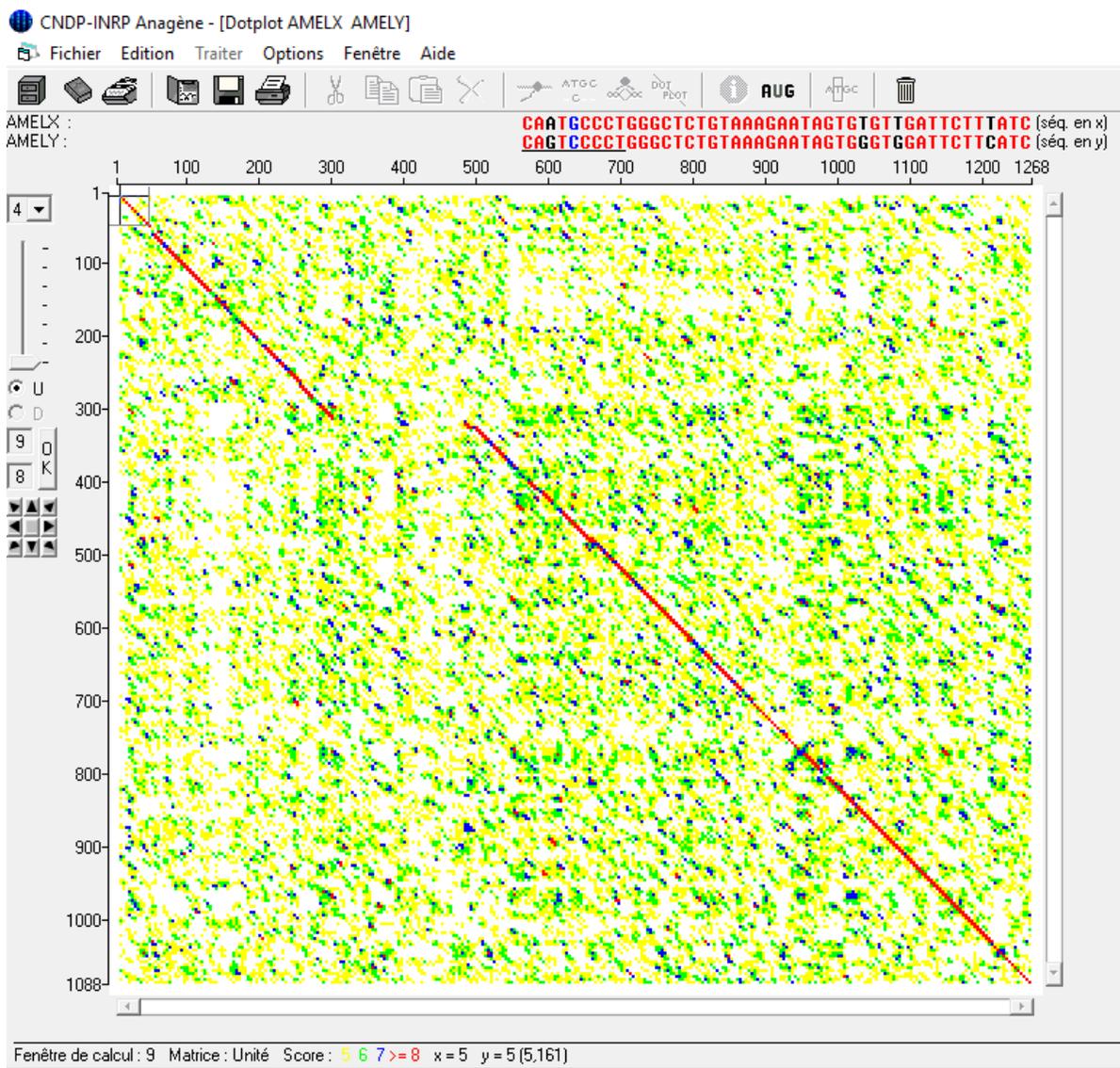
→Utilisation de la fonction DotPlot d'Anagène : comparaison graphique de séquences





## EXPLOITATION DES RÉSULTATS - 3/8

### > Utilisation de la fonction DotPlot du logiciel Anagène : comparaison graphique de séquences



#### > Analyse

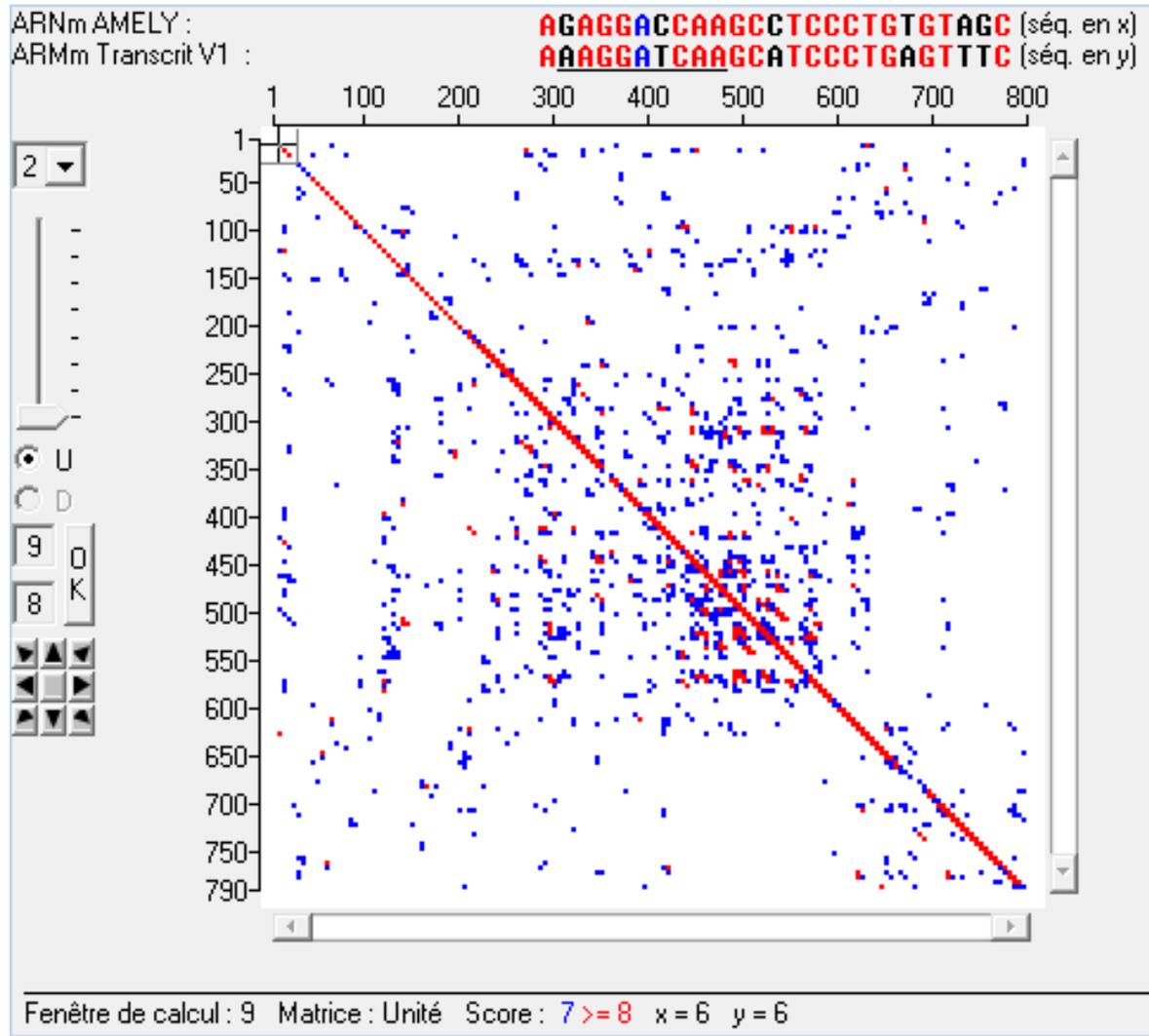
On observe, dans l'étude graphique de comparaison de séquences, que les deux allèles sont majoritairement semblables.

Pourtant AMELX (allèle présent sur le chromosome X) possède des séquences qui ne sont pas présentes sur AMELY (allèle présent sur le chromosome Y).





## EXPLOITATION DES RÉSULTATS - 4/8



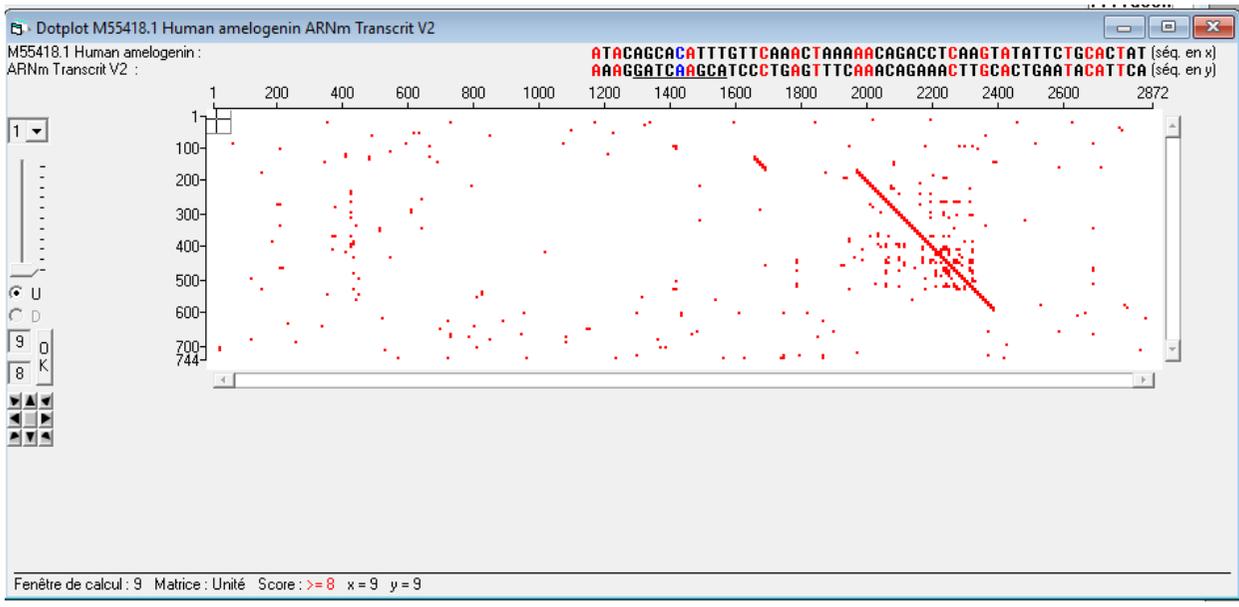
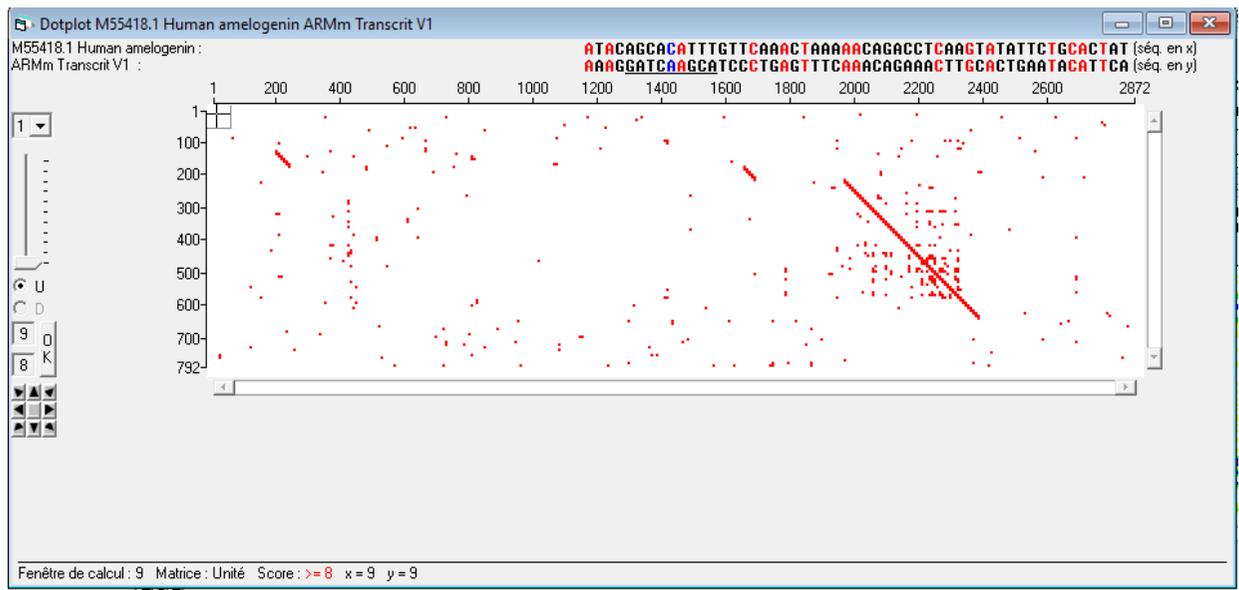
### > Analyse

La comparaison graphique des séquences d'ARNm d'AMELX et d'ARNm d'AMELY permet de montrer que les différences de séquences entre AMELX et AMELY sont basées sur les différences dans la répartition et/ou taille des introns et non sur celles des exons, très similaires.



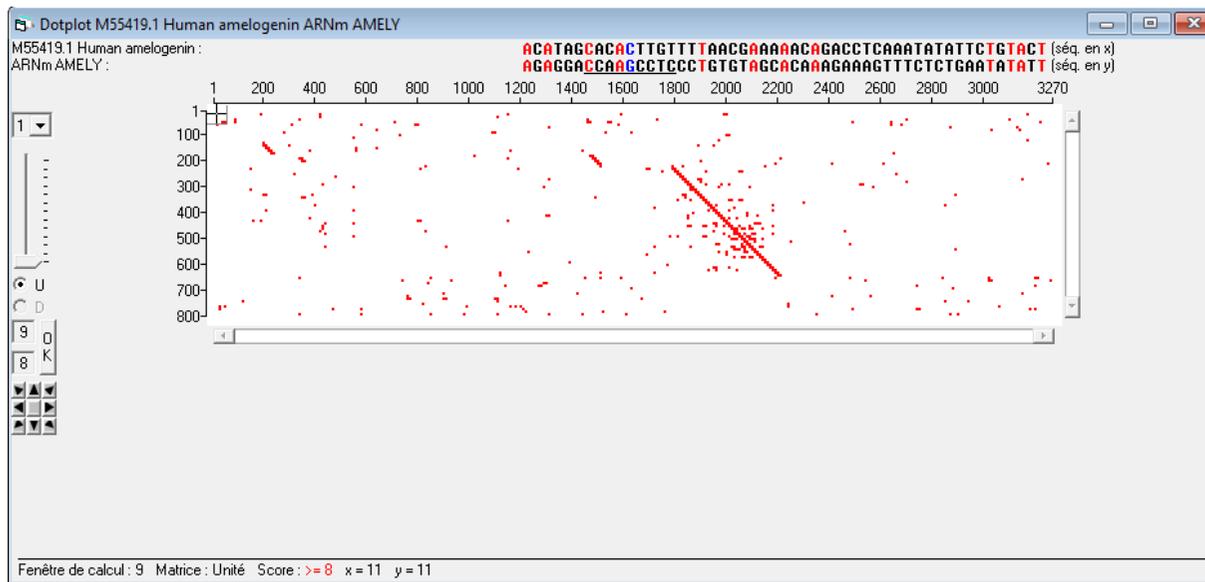
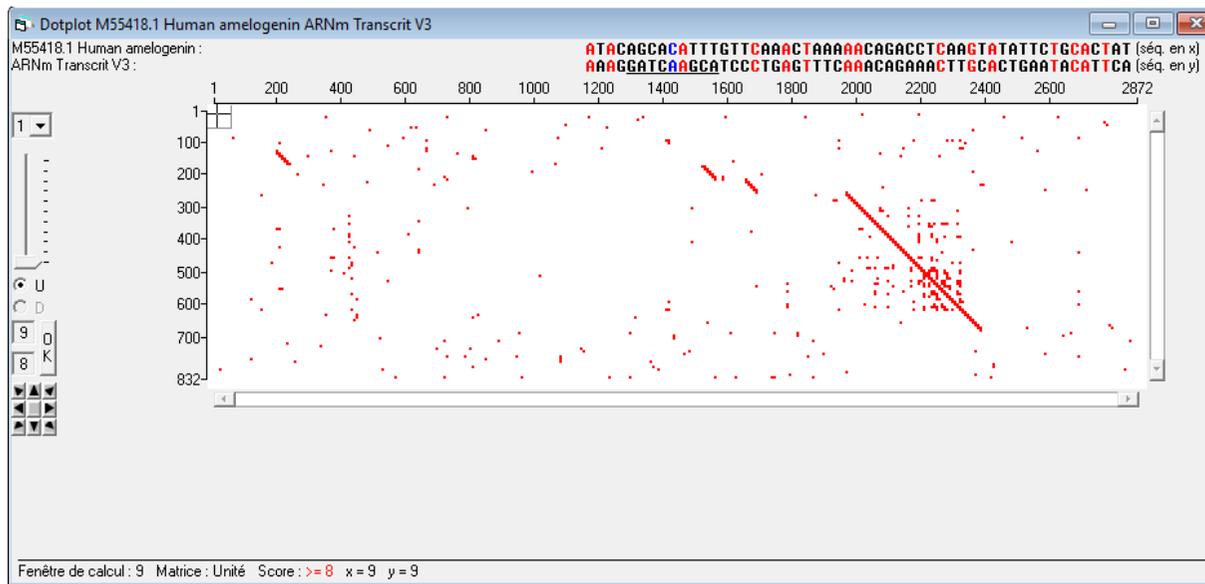


## EXPLOITATION DES RÉSULTATS - 5/8





## EXPLOITATION DES RÉSULTATS - 6/8





## EXPLOITATION DES RÉSULTATS - 7/8

### > Conclusion sur la structure du gène sur les chromosomes sexuels

> A partir des résultats obtenus grâce à la fonction DotPlot d'Anagène, il est possible de déterminer la structure initiale du gène (répartition introns et exons). Pour chaque ARNm, la séquence qui a été codée est déterminée :

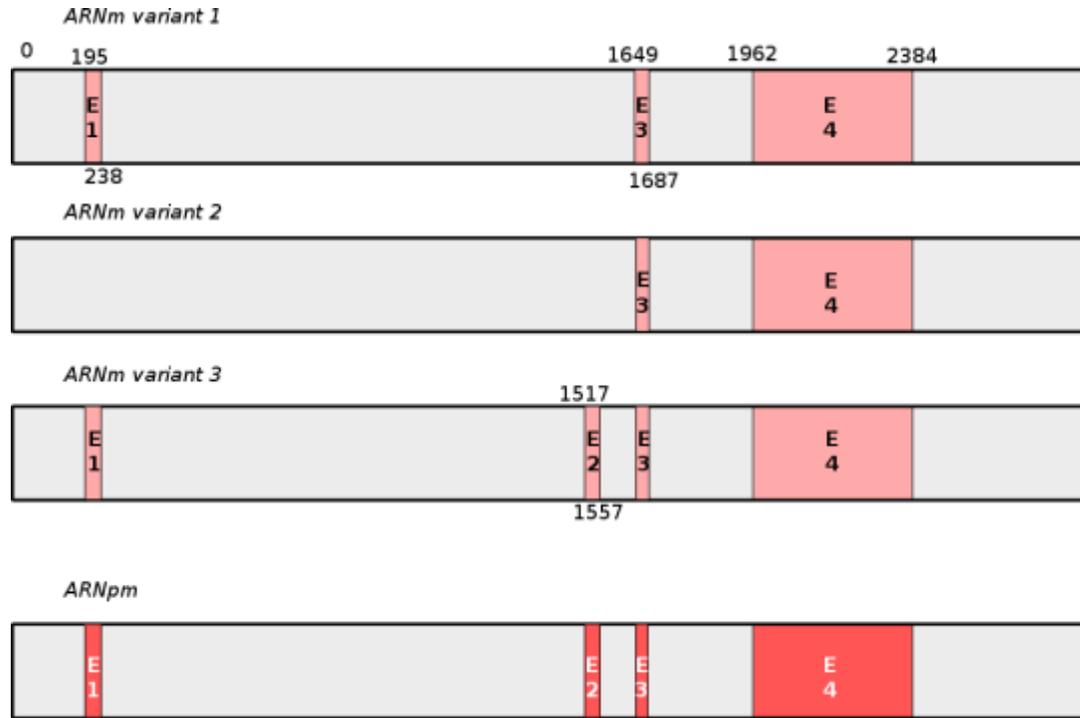


Schéma : Structure des différents variants d'ARNm après épissage alternatif de l'ARN pré-messager (issu de la transcription du gène AMELX (E correspond aux séquences exoniques, les introns sont représentés par les parties grisées).

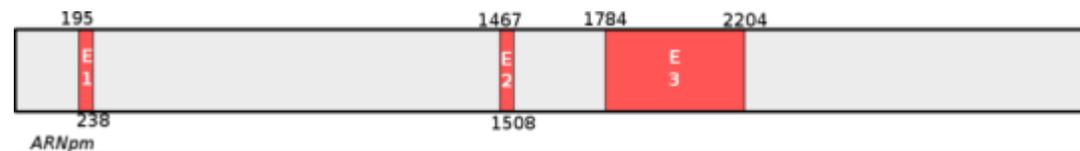


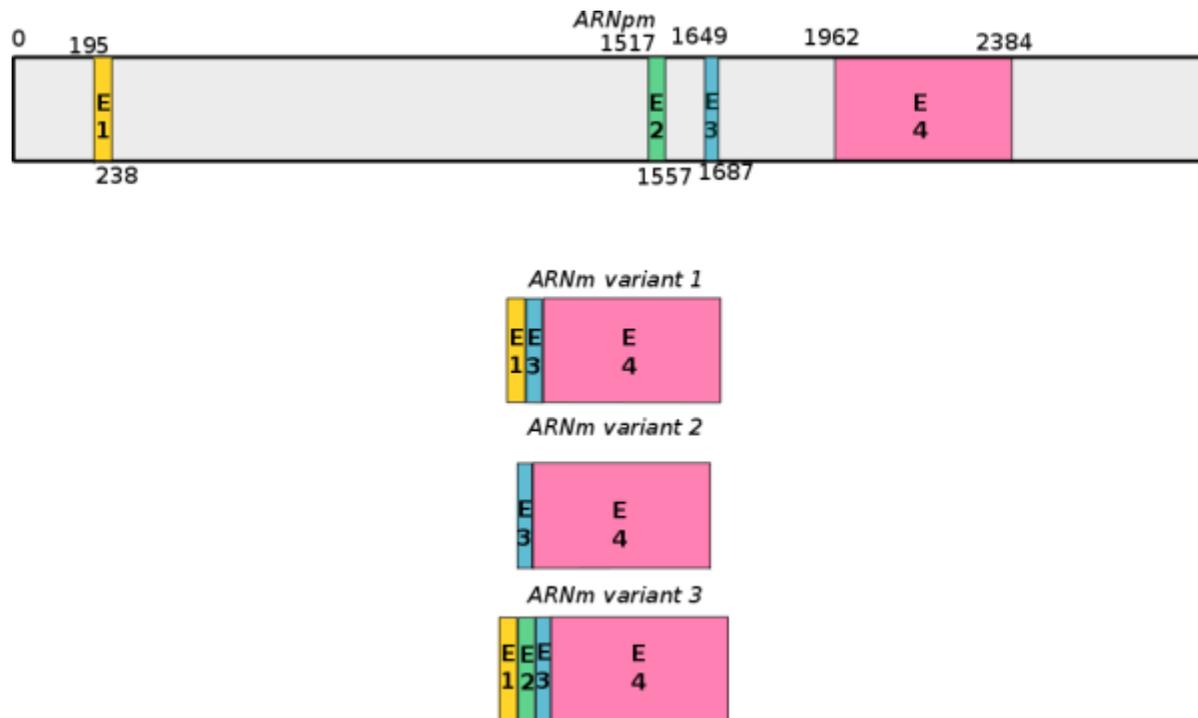
Schéma de la structure de l'ARN pré messager issu de la transcription du gène AMELY (E correspond aux séquences exoniques, les introns sont représentés par les parties grisées).



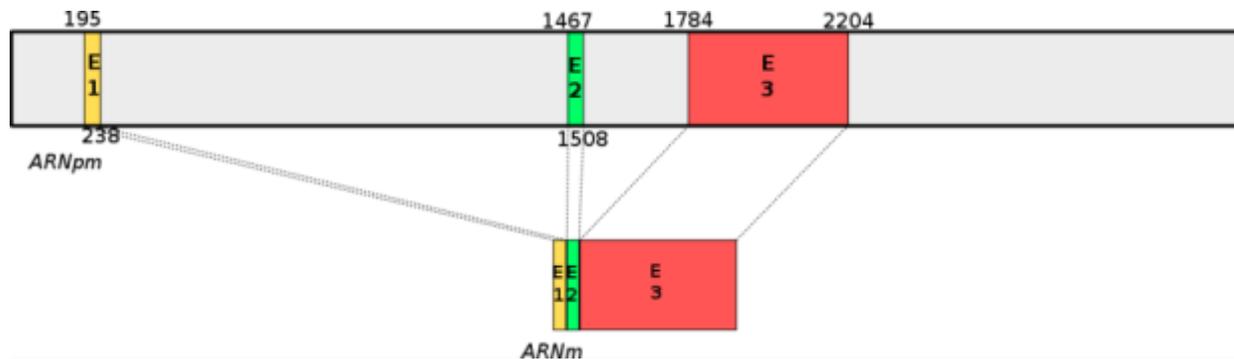


## EXPLOITATION DES RÉSULTATS - 8/8

> Étude de l'épissage alternatif du gène AMELX chez l'humain :



> Étude de l'épissage du gène AMELY chez l'humain :





## CONCLUSION - 1/2

### > Comparaison des séquences AMELX et AMELY

L'étude par un logiciel de comparaison de séquences (Anagène) montre que la différence entre les séquences du gène de l'amélogénine présentes sur les chromosomes X et Y est liée à de nombreuses délétions et insertions entre les deux chromosomes.

Il semble que les mutations ont tendance à s'accumuler de façon plus importante sur le chromosome Y. En effet, le chromosome X permet de produire des protéines fonctionnelles, le chromosome Y est donc moins soumis aux pressions de sélections et peut donc accumuler de nombreuses mutations sans que celles-ci aient un effet sur la production de la protéine. AMELY est masqué par AMELX et ne peut pas fournir de protéine fonctionnelle même lorsque AMELX est lui-même non fonctionnel (Lagerstrom M, Dahl N, Nakahori Y, Nakagome Y, Backman B, Landegren U, et al. A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Genomics* 1991;10:971—5.).

L'évolution particulière d'AMELY peut être comprise lorsqu'on considère l'évolution des chromosomes sexuels. Les chromosomes X et Y des mammifères ont évolué à partir d'une paire d'autosomes d'un ancêtre commun de type reptile (thérapside), il y a 250 millions d'années. Lors de l'évolution des mammifères, 4 inversions multigéniques successives se sont produites sur le chromosome Y. Ces inversions ont conduit à une recombinaison restreinte (« restricted combinations ») entre X et Y. AMELY étant localisé près du locus d'inversion non recombinant « non-recombining inversion locus », ceci a entraîné un faible taux de recombinaison (Iwase M, Satta Y, Hirai Y, Hirai H, Imai H, Takahata N. The amelogenin loci span an ancient pseudoautosomal boundary in diverse mammalian species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5258—63.).

AMELY peut donc tendre vers un pseudogène. La dernière inversion s'est produite au début de l'évolution euthérienne (mammifères placentaires, il y a 150 Millions d'années) et l'analyse des quelques séquences AMELY indique que les loci d' AMELY sont devenus non recombinants séparément dans chaque lignée et, dans certaines espèces, cela s'est produit longtemps après la diversification euthérienne. (Sire, Delgado, Fromentin, Girondot. Amelogenin : lessons from evolution. *Archives of Oral Biology* (2005) 50, 205—212).





## CONCLUSION - 2/2

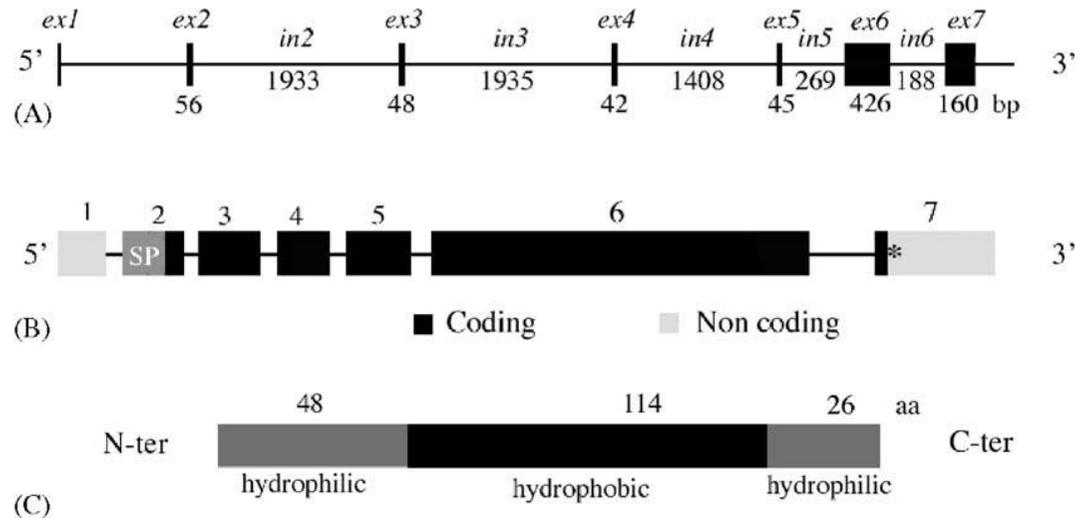
### > Étude de l'épissage du gène de l'amélogénine

La comparaison par la fonction DotPlot du logiciel Anagène permet de déterminer les séquences hautement semblables entre le gène et l'ARNm ; il peut donc être déduit de cette analyse les séquences transcrites (exons) et les séquences non transcrites (introns).

Grâce à l'étude de ces séquences, nous avons pu déterminer que l'ARN pré-messager du gène de l'amélogénine présent sur le chromosome X possède au moins 4 séquences exoniques et 5 séquences introniques.

La structure de ce gène a particulièrement été étudiée dans l'article « Amelogenin : lessons from evolution » de Jean-Yves Sire, Sidney Delgado, Delphine Fromentin et Marc Girondot (Equipe « Evolution et Développement du Squelette », Université Paris 6 – Pierre et Marie Curie, Paris).

Les chercheurs ont pu déterminer la présence de 7 exons dans la structure du gène sur le chromosome X :



Document : Gène de l'amélogénine.

(A) Structure du gène. Les 5 premiers exons (ex1-ex5) sont petits (42-46 pb) et l'exon 6 (426 pb) et 7 (160 pb) sont plus importants.

(B) Exons codants et non codants. L'exon 1 n'est pas codé, la grande partie de l'exon 2 code pour un peptide signal, et seulement les 3 premiers nucléotides de l'exon 7 codent pour la protéine.

(C) Représentation linéaire de la protéine originelle.

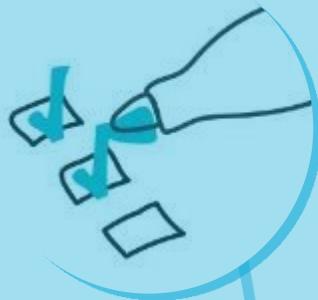
# PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE DE L'AMÉLOGÉNINE

THERMOCYCLEUR

+

Logiciel

DIDACTIQUE



## RESSOURCES

Fiches techniques, matériels, documents, ...

## PRÉPARER

Ce qu'il faut faire avant d'expérimenter

- METTRE EN ŒUVRE LE THERMOCYCLEUR 2
- PRÉPARER LE GEL D'AGAROSE 3-5

## EXPÉRIMENTER

Apprendre à mettre en œuvre un protocole

- TP PAS À PAS 6-15
  - ▶ DÉTERMINATION DU SEXE GÉNÉTIQUE D'UN INDIVIDU

## INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE 15-20
2. MUTATION ET MALADIE GÉNÉTIQUE 21-28
3. RECHERCHE DE PARENTÉ CHEZ LES MAMMIFÈRES 29-37
4. L'ÉPISSAGE DIFFÉRENCIÉ 38-50



PRINCIPE DE LA PCR - 1/2



PRINCIPE DE LA PCR : AMPLIFICATION DU NOMBRE DE MOLECULES D'ADN > 10<sup>9</sup>

UN CYCLE

... N CYCLES



T > + 95°C

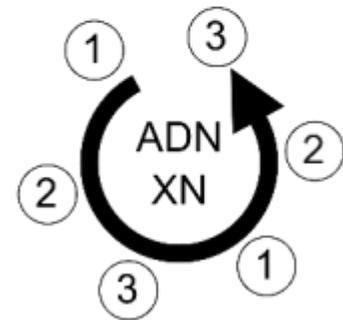
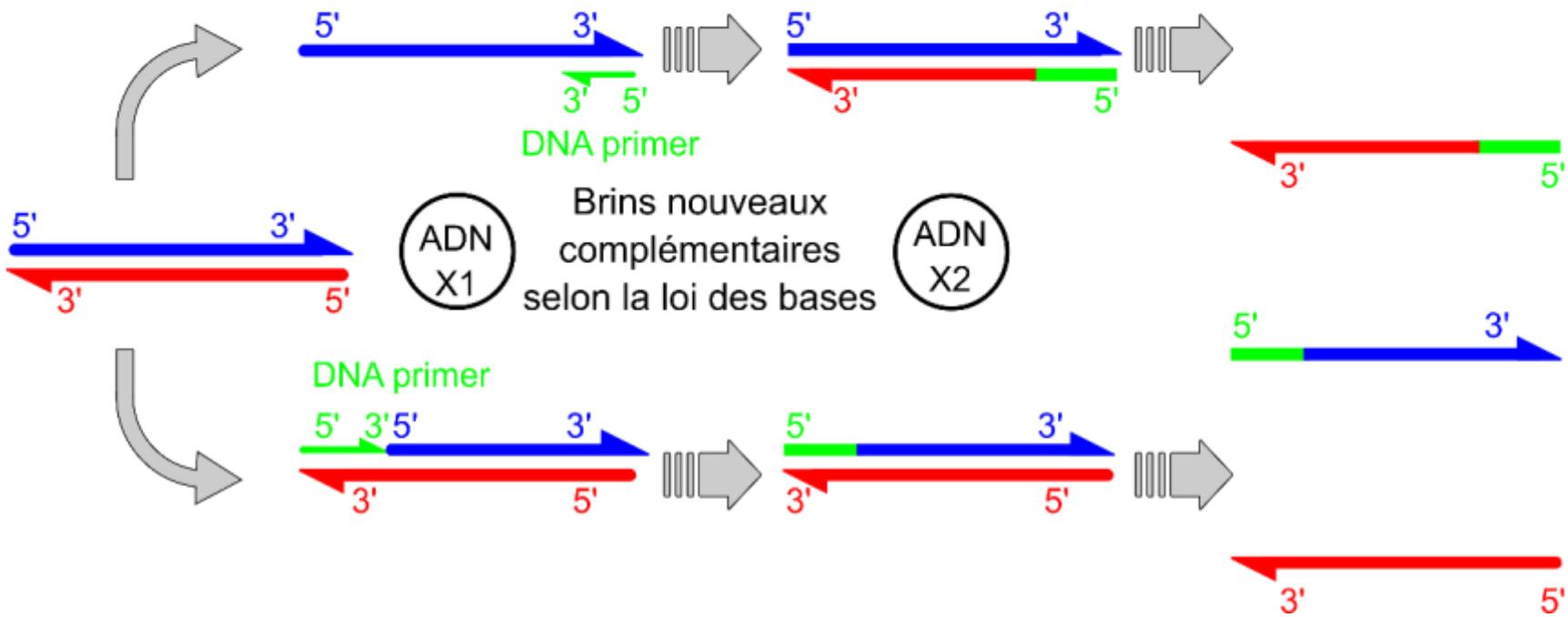
DNA primer  
spécifiques au gène

DNA primer

Brins nouveaux  
complémentaires  
selon la loi des bases

ADN  
X1

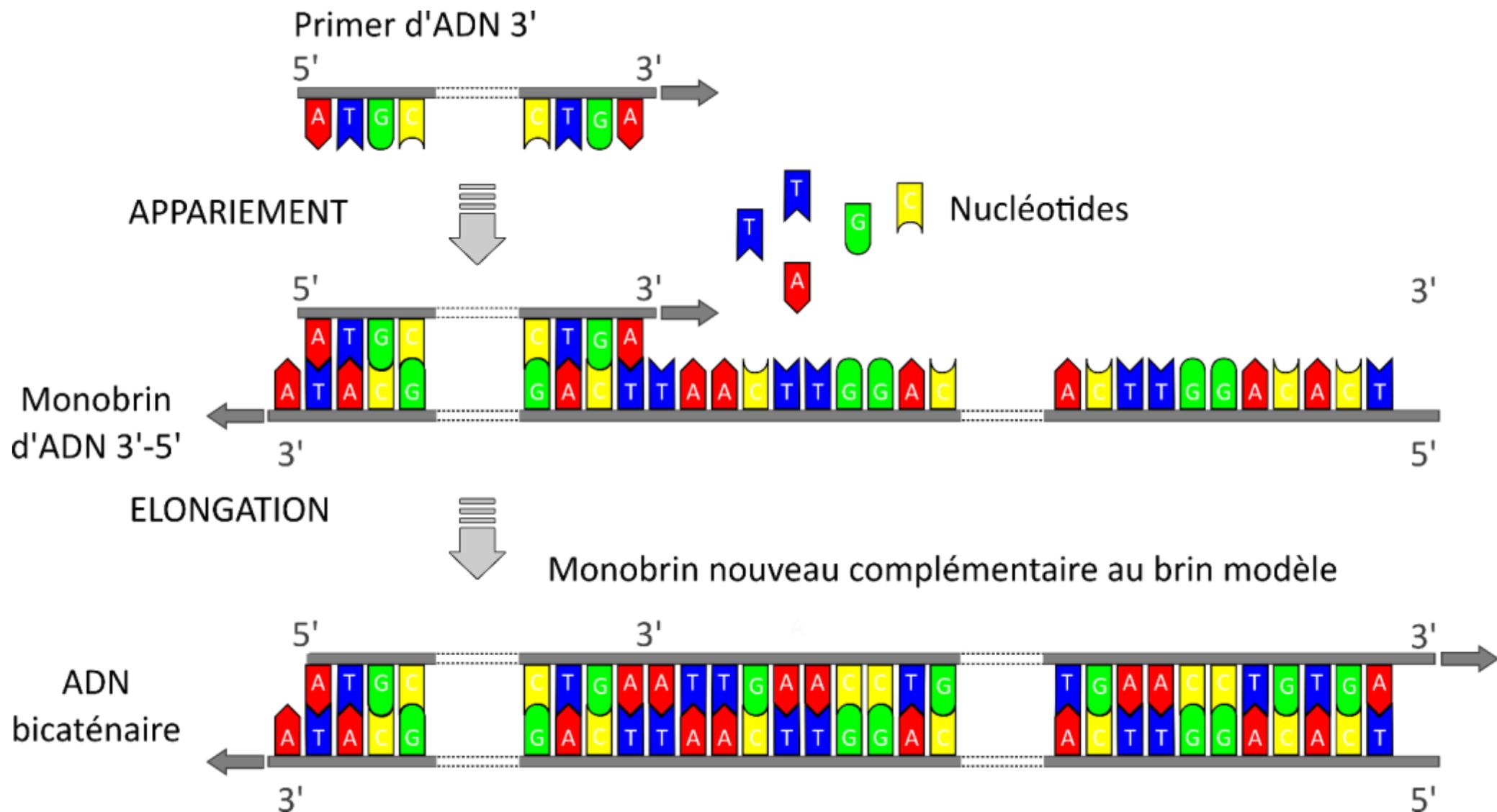
ADN  
X2



N > 10<sup>9</sup>!



PRINCIPE DE LA PCR - 2/2





## FABRICATION D'UN GEL D'AGAROSE - 1/3

### > Principe

Pour réaliser une électrophorèse, le gel d'agarose représente une solution aisée, rapide, et peu coûteuse.

Fabrication d'un gel à partir de tampon TAE concentré 10 fois et d'agarose. 3 étapes : réalisation du tampon TAE 1X, fabrication du gel et coulage du gel.

Il est tout à fait possible d'utiliser un autre tampon (TBE ou TGV, par exemple).

### > Matériel

#### > Appareillage

- |                                  |   |
|----------------------------------|---|
| • Balance 0,01 g                 | 1 |
| • Agitateur magnétique chauffant | 1 |
| • Support de gel + peigne        | 1 |

#### > Produits

- Tampon TAE concentré 10X
- Agarose

#### > Verrerie et petit matériel

- |                             |   |
|-----------------------------|---|
| • Fiole jaugée 250 mL       | 1 |
| • Éprouvette graduée 100 mL | 1 |
| • Erlenmeyer 100 mL         | 1 |
| • Verre de montre           | 1 |
| • Entonnoir                 | 1 |
| • Spatule                   | 1 |
| • Thermomètre               | 1 |

#### > À disposition

- Eau distillée
- Ruban adhésif de peintre
- Gants - Blouse - Lunettes

### > Mode opératoire – Préparation du tampon 1X

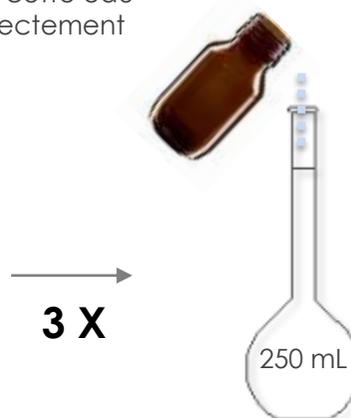
Verser le contenu du flacon de TAE 10X (25 mL) dans une fiole jaugée de 250 mL



Rincer 3x le flacon à l'eau distillée, verser cette eau de rinçage directement dans la fiole



Compléter la fiole en eau distillée jusqu'au trait de jauge (250 mL)



Vérifier le trait de jauge



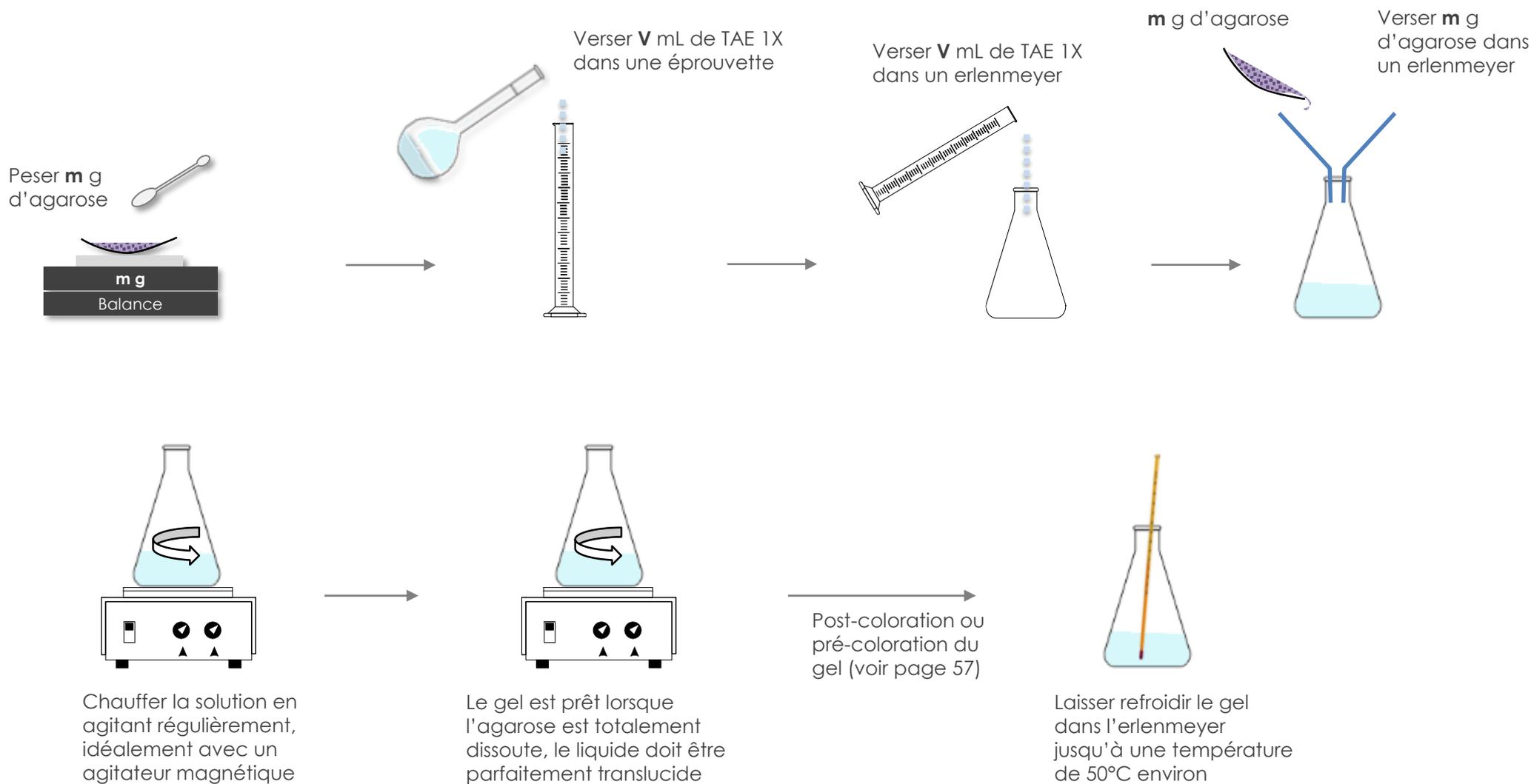


## FABRICATION D'UN GEL D'AGAROSE - 2/3

### > Mode opératoire – Préparation du gel à X %

Méthode de calcul pour réaliser un gel d'agarose à X % (pourcentage massique) :

masse à peser (**m** en gramme) pour un volume (**V** en mL) ►  $m = V \times X / 100$

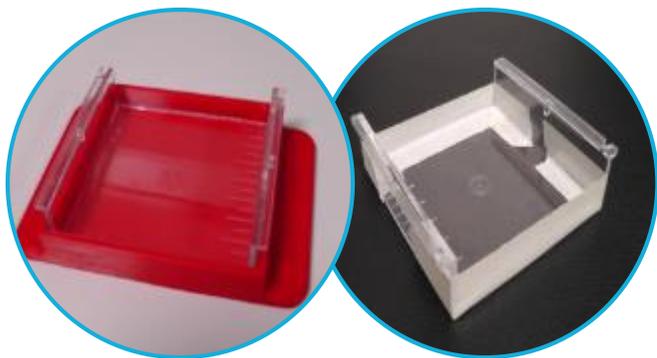




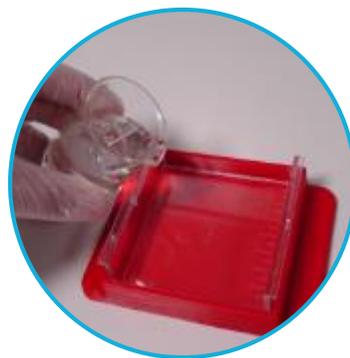
## FABRICATION D'UN GEL D'AGAROSE - 3/3

### > Mode opératoire – Couler le gel d'agarose

Positionner le support du gel dans le moule (ou préparer le support du gel en bouchant ses extrémités à l'aide de ruban adhésif pour peintre). Posez-le sur une surface parfaitement horizontale.

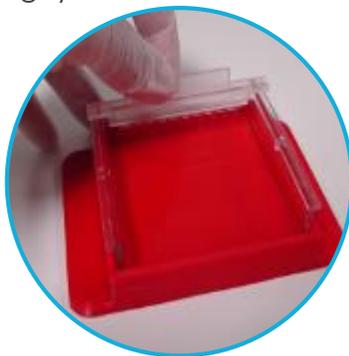


Couler le gel à 50°C dans le support sur une épaisseur de 0,5 cm environ.

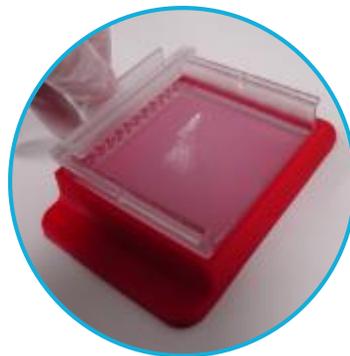


**Astuce**  
Si des bulles apparaissent, vous pouvez les faire éclater à l'aide d'un cône pour micropipette avant la solidification du gel.

Poser le peigne à sa place, pour former les puits lors du refroidissement du gel. Laisser le gel refroidir (15 – 20 min), en le mettant au réfrigérateur si nécessaire (ne transporter le support avec le gel que si celui-ci est déjà bien figé).



Une fois le gel complètement solidifié, retirer doucement le peigne dans un mouvement vertical, pour ne pas percer ou fêler les puits.



**Astuce**  
Il est plus facile de retirer le peigne si le gel est immergé dans du tampon (mise en place dans la cuve avant de retirer le peigne).

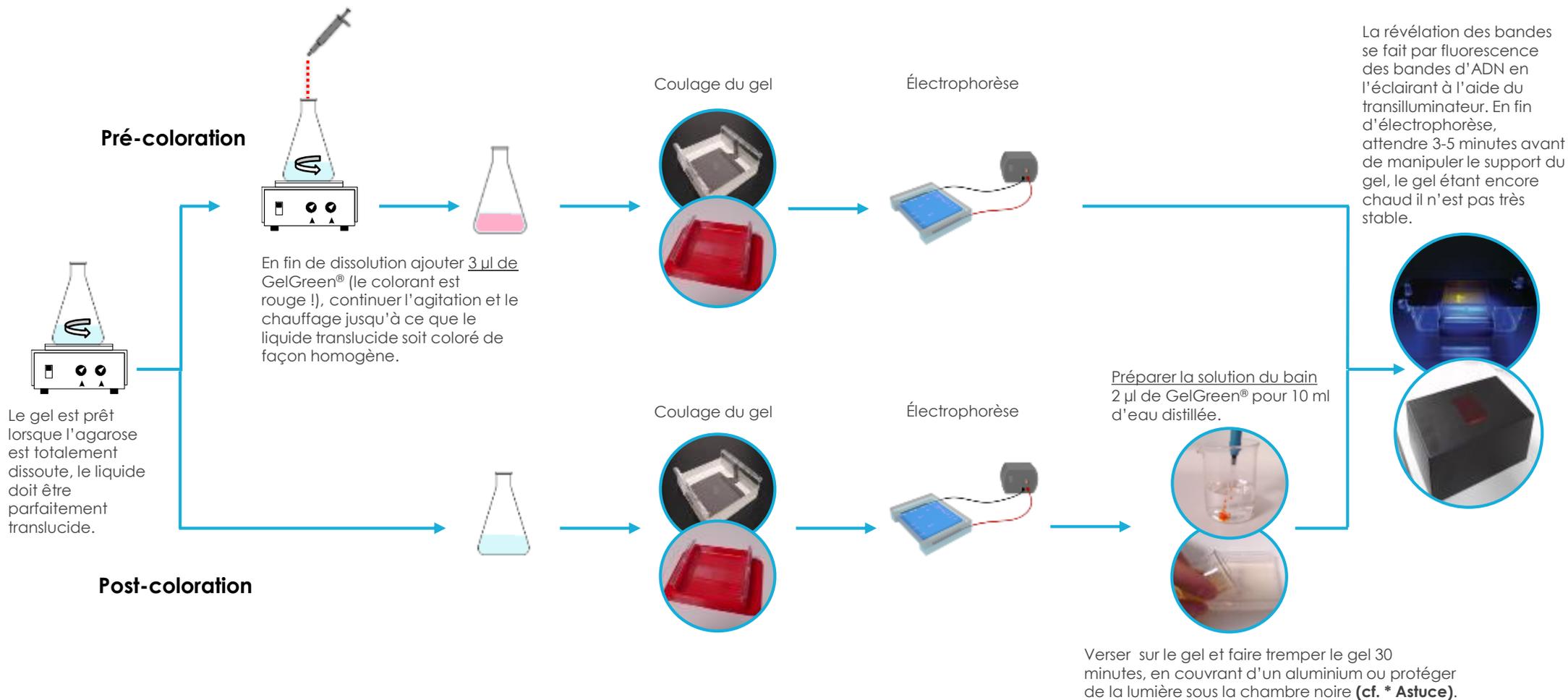
Le gel peut être utilisé immédiatement ou conservé quelques jours au réfrigérateur dans du tampon de migration TAE 1X (une fois ôté du support).



## PRÉ-COLORATION / POST-COLORATION DU GEL D'AGAROSE : 2 POSSIBILITÉS

> Pré-coloration : solution rapide (5 minutes après l'électrophorèse) mais moins résolue, à utiliser dans le cas de révélation d'une bande unique ou si les poids des bandes à séparer sont éloignés.

> Post-coloration : solution plus longue (compter 35 min de trempage), par contre la qualité de migration est optimum car le colorant GelGreen® qui est une longue chaîne chromophore se fixe sur l'ADN après l'électrophorèse, il ne gêne donc pas la migration de l'ADN.



### \* Astuce

- > On peut réutiliser le même bain au moins 2 fois au cours de la même journée (protéger la solution de la lumière).
- > Pour économiser du colorant ou si on ne dispose pas de petit récipient adapté au gel, après l'électrophorèse il suffit d'entourer le gel et son support d'un film étirable type Parafilm® M pour étanchéifier les côtés ouverts puis on dépose 10 ml d'eau déminéralisée additionnée de 2 µl de GelGreen® pendant 30 à 45 minutes à l'obscurité.



## THERMOCYCLEUR DIDACTIQUE - PCR

### > Descriptif

Thermocycleur avec écran et molette pour l'affichage et la programmation des cycles.

### > Caractéristiques techniques

**Capacité** : 9 microtubes de 0,2 mL.

**Ecran** : 128 X 64.

**Dimension** : 225 x 140 x 100 mm.

Livré avec logiciel didactique de pilotage pour PC à télécharger.

**Nombre de programmes enregistrés** : 4.

**Nombre de programmes personnalisables** : 4.

**Nombre de cycles de température possibles** : de 1 à 99.

**Gamme de température** : jusqu'à 99 °C.

**Précision d'affichage** : 0.1 °C.

**Précision de la régulation** :  $\pm 0.2$  °C.





## TOUT LE MATÉRIEL NÉCESSAIRE À LA RÉALISATION DE CES TP

### > Matériel

• <b>Thermocycleur didactique</b>	591 106	1
• <b>Logiciel didactique</b>	Inclus	1
• Kit PCR variation du gène de l'amélogénine	111 126	1
• Micropipette 25 µL	703 878	1
• Cônes 10 – 200 µL	724 108	1
• Micropipette 0,5 – 10 µL + cônes adaptés	703 814	1
• Cônes 0,1 – 10 µL	724 105	1
• Portoir pour tubes PCR	701 208	1
• Cuve à électrophorèse	591 031	1
• Alimentation pour cuve à électrophorèse	281 120	1
• Transilluminateur	527 004	1
• Chambre noire pour transilluminateur	527 010	1
• Balance 0,01 g	701 420	1
• Agitateur magnétique chauffant	701 571	1
• Thermomètre 60°C	253 067	1
• Moule de coulage gel	999 999	1

### > Verrerie

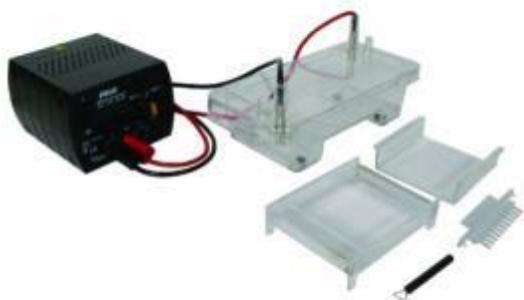
• Bécher 50 mL	713 118	1
• Bécher 100 mL	713 119	1
• Fiole jaugée 250 mL	713 041	1
• Éprouvette graduée 100 mL	723 165	1
• Erlenmeyer 100 mL	713 138	1
• Verre de montre Ø 60 mm	713 066	1
• Entonnoir à poudre	723 090	1
• Spatule double inox	703 283	1

### > Consommables

• Tampon TAE 10X	107 609	1
• Eau distillée 5 L	107 625	1
• Colorant ADN GelGreen®	107 455	1
• Agarose poudre 25 g	107 032	1

### > Sécurité

• Gants taille L – boîte de 100	150 038	1
• Blouse taille L	150 074	1
• Lunettes	150 093	1



> Ensemble Electrophorèse 999 999



> Thermocycleur 591 106

