

# PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE TAS2R38 ET DE LA SENSIBILITÉ AU PTC

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 6-14
  - ▶ DÉTERMINATION DE LA MUTATION SUR LE GÈNE ET LIAISON GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE

## INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. RÉSULTATS ET ANALYSE DES MIGRATIONS – LES ENZYMES DE RESTRICTION 15-22
2. GÉNOTYPE DE PTC ET RELATION GÉNOTYPE/PHÉNOTYPE 23-30
3. SÉLECTION ÉQUILBRÉE ET AVANTAGE DU GÉNOTYPE AVI/AVI 31-35
4. LE GÈNE PTC ET L'ÉVOLUTION DES GRANDS SINGES 36-42
5. VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE ET THÉORIE DE L' « OUT OF AFRICA » - LE PRINCIPE DES MUTATIONS FONDATRICES 43-47
6. GÉNOTYPE, PHÉNOTYPE ET SANTÉ 48-53



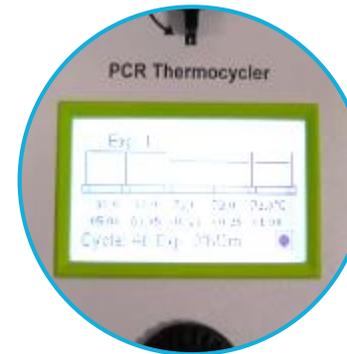
1 Connecter le thermocycleur PCR au secteur



2 Mettre le thermocycleur PCR en fonctionnement



3 Choisir le programme Modèle 1



Thermocycleur PCR  
En savoir plus > page 58

Ordinateur

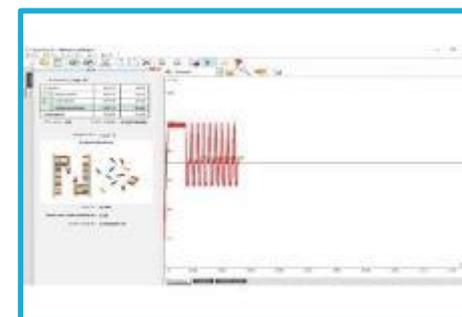
OPTION



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 |

#### > Produits

- Tampon TAE concentré 10X
- Agarose

#### > Verrerie et petit matériel

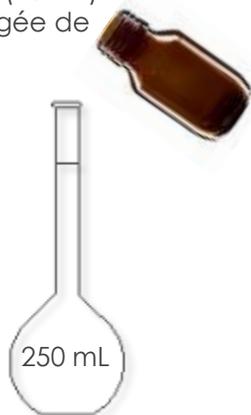
- |                             |   |
|-----------------------------|---|
| • Fiole jaugée 250 mL       | 1 |
| • Éprouvette graduée 100 mL | 1 |
| • Erlenmeyer 100 mL         | 1 |
| • Verre de montre           | 1 |
| • Entonnoir                 | 1 |
| • Spatule                   | 1 |
| • Thermomètre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

#### > 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)

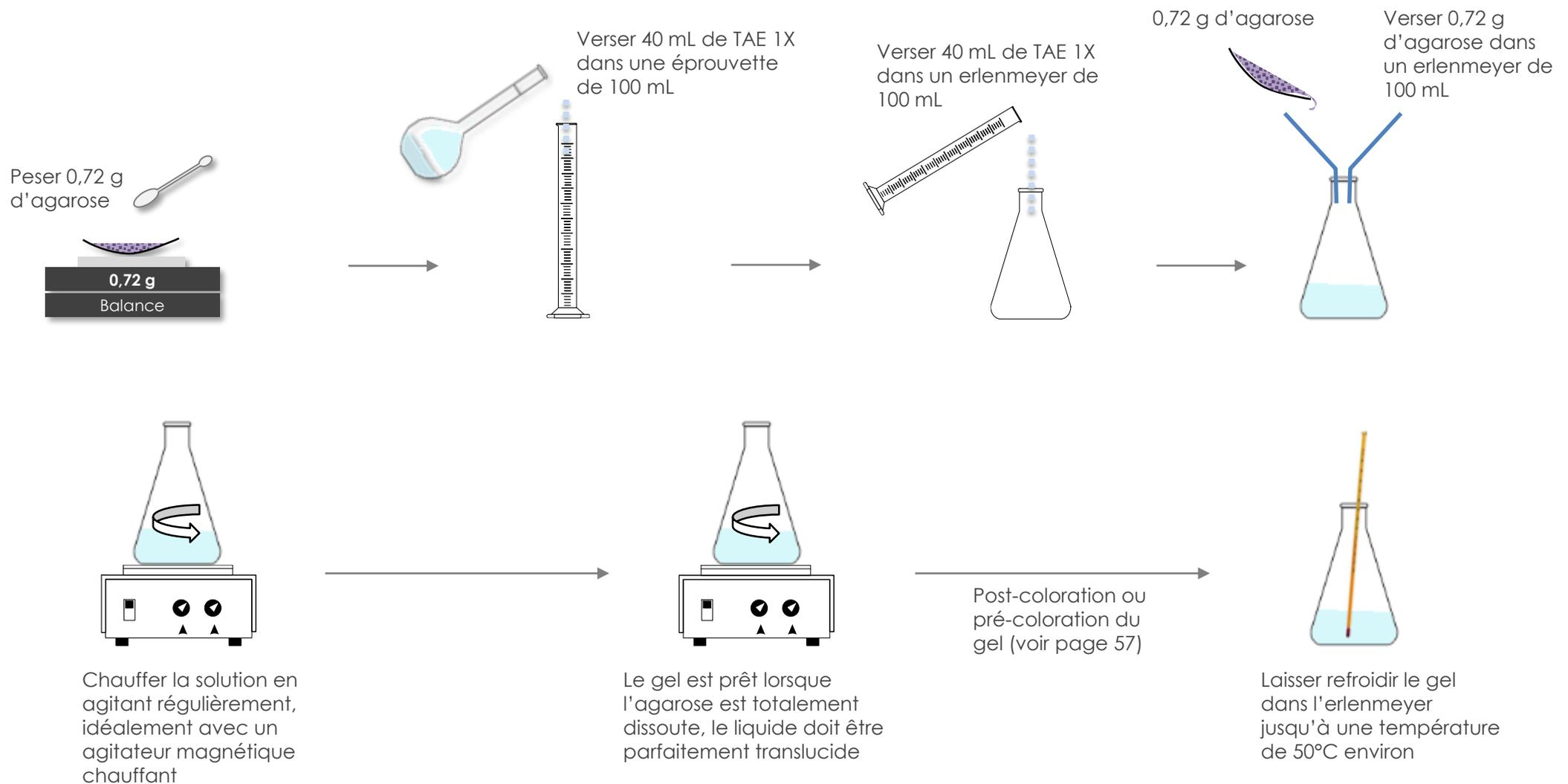


Vérifier le trait de jauge





### PRÉPARER LE GEL D'AGAROSE 1,8 %

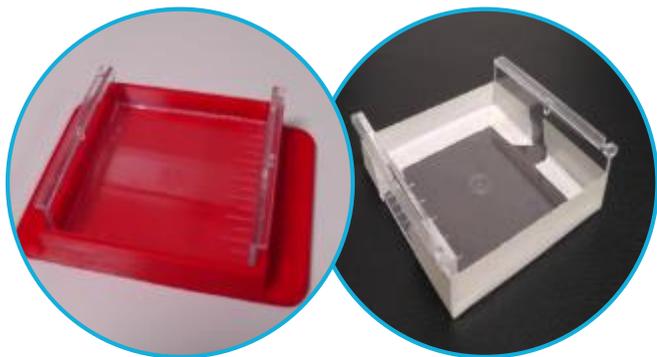


La nouvelle génération de colorants fluorescents facilite grandement les étapes de révélation. En fonction de la résolution de séparation des bandes d'ADN souhaitée, le gel peut être soit pré-coloré, ou alors coloré après la migration.

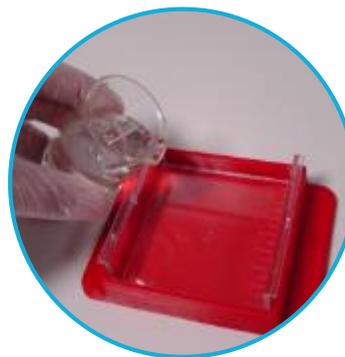


### COULER LE GEL D'AGAROSE

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.



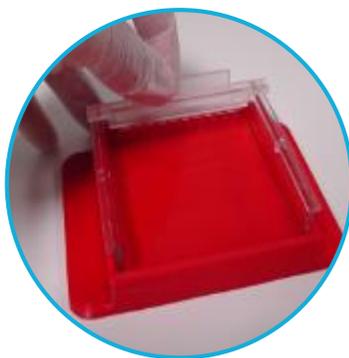
Couler le gel à 50°C dans le support sur une épaisseur de 0,5 cm environ.



#### **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.

### DÉTERMINATION DE LA MUTATION SUR LE GÈNE TAS2R38 ET LIAISON GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE – SENSIBILITÉ AU PTC

## EXPÉRIMENTATION

### > Contextualisation

Le gène TAS2r38 code pour la sensibilité au goût amer. Certaines personnes sont y sont plus sensibles que d'autres

### > Hypothèse

Lorsqu'un individu possède la version mutée du gène TAS2R38, sa sensibilité au goût amer (PTC) est amoindrie, voire nulle.

### > Ce que l'on cherche

Comment déterminer le génotype des individus (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

• 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 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 1,8 %** (pages 3 à 5)



### METTRE EN ŒUVRE LE TP - 1/7

#### > Préparer les tubes réactionnels

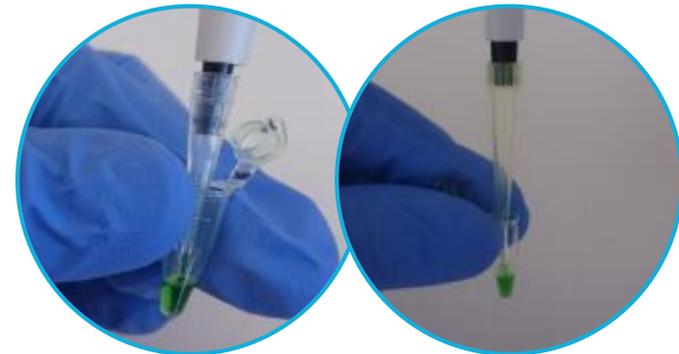


- Manipuler de préférence sur la glace, pour ne pas activer la Taq polymérase prématurément.
- Porter des gants (ou se laver très soigneusement les mains) pour éviter la contamination des échantillons avec de la DNase, enzyme détruisant l'ADN, présente naturellement sur la peau.

**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).





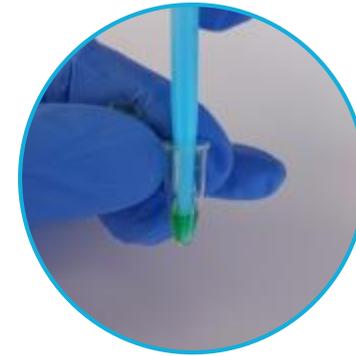
### METTRE EN ŒUVRE LE TP - 2/7



- 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).





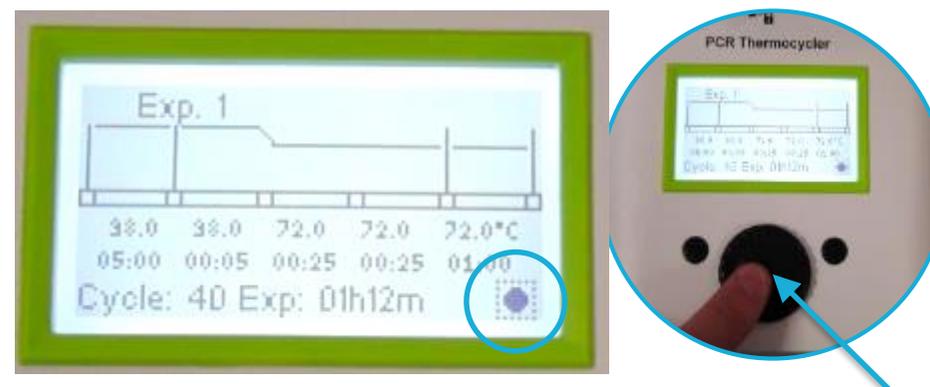
### METTRE EN ŒUVRE LE TP - 3/7

#### > 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.



#### > Digestion enzymatique

Après l'amplification, chaque tube est séparé en 2.

- Prélever 25 µl et déposer dans un nouveau microtube PCR 0.2 ml, (le microtube est identifié).
- 1 tube va recevoir l'enzyme de restriction
- 1 tube est mis au réfrigérateur le temps de la digestion, il servira de témoin
- Prélever 1 µl d'enzyme BsuRI (HaeIII) déposer dans le microtube PCR, mélanger par pipetage doux.
- Placer le tube dans le thermocycleur,
- Sélectionner le programme « Bain marie » du thermocycleur (programme disponible uniquement sur les thermocycleurs 9 tubes / version 2019)
- Régler une plage de 20 min à 37°C

#### Astuce

Après digestion sortir les tubes et réaliser la préparation de l'électrophorèse ou si besoin l'électrophorèse peut donc se dérouler ultérieurement lors d'une autre séance.

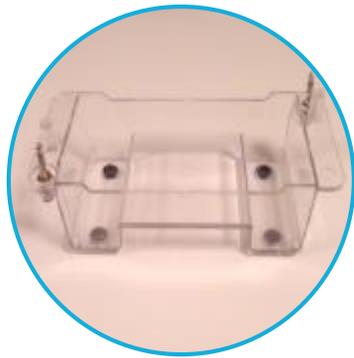
Les tubes peuvent être stockés à -18 °C plusieurs semaines, après décongélation des tubes procéder comme indiqué



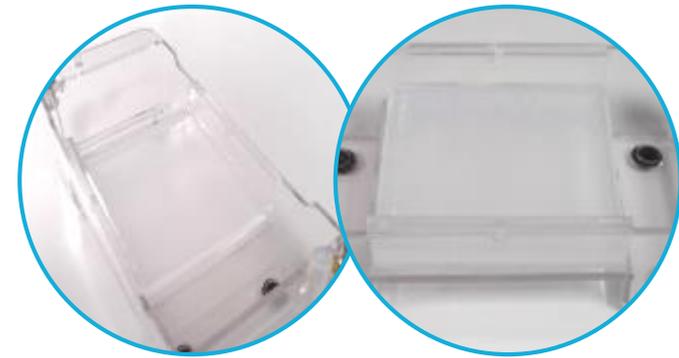
### METTRE EN ŒUVRE LE TP - 4/7

#### > Préparer le dispositif pour électrophorèse

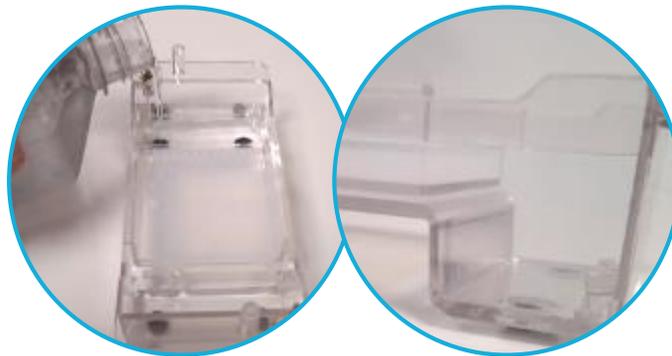
- 1 Poser la cuve à électrophorèse sur une surface parfaitement horizontale.



- 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.





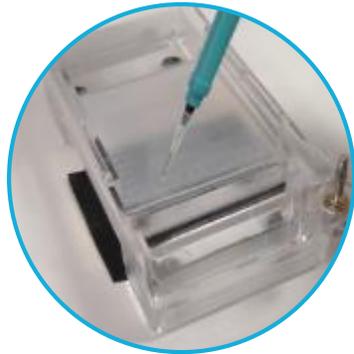
### METTRE EN ŒUVRE LE TP - 5/7

#### > Dépôts

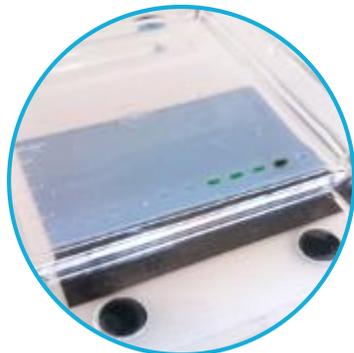


- Changer de cône à chaque changement de produit.
- L'ADN est chargé négativement, il migrera vers le pôle positif. Déposer l'ADN près du pôle négatif (cordon électrique noir).

- 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).

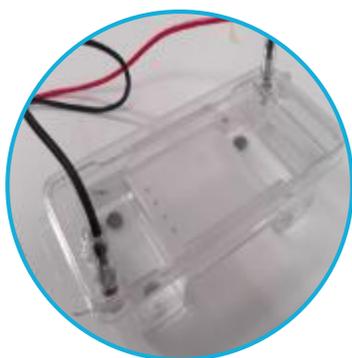




### METTRE EN ŒUVRE LE TP - 6/7

#### > 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.

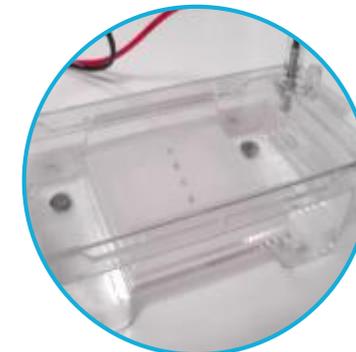
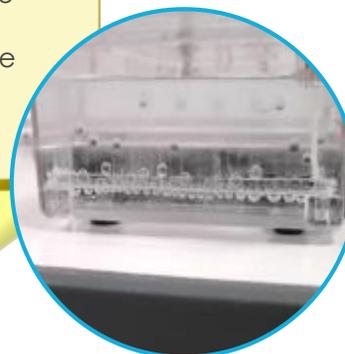


#### Astuce

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.



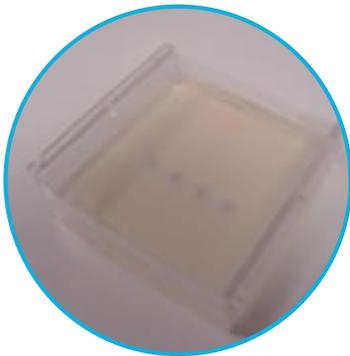
2 Si le TP a lieu plus tard (2h max.), protéger le bécher de la lumière à l'aide d'un aluminium.



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



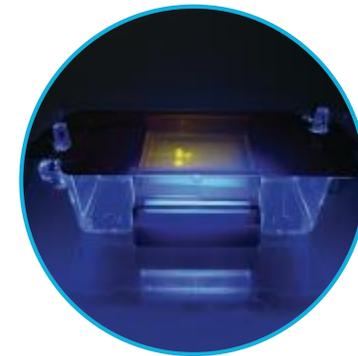
4 Faire tremper le gel 30 minutes, en couvrant d'un aluminium ou protéger de la lumière sous la chambre noire.



#### **Astuce**

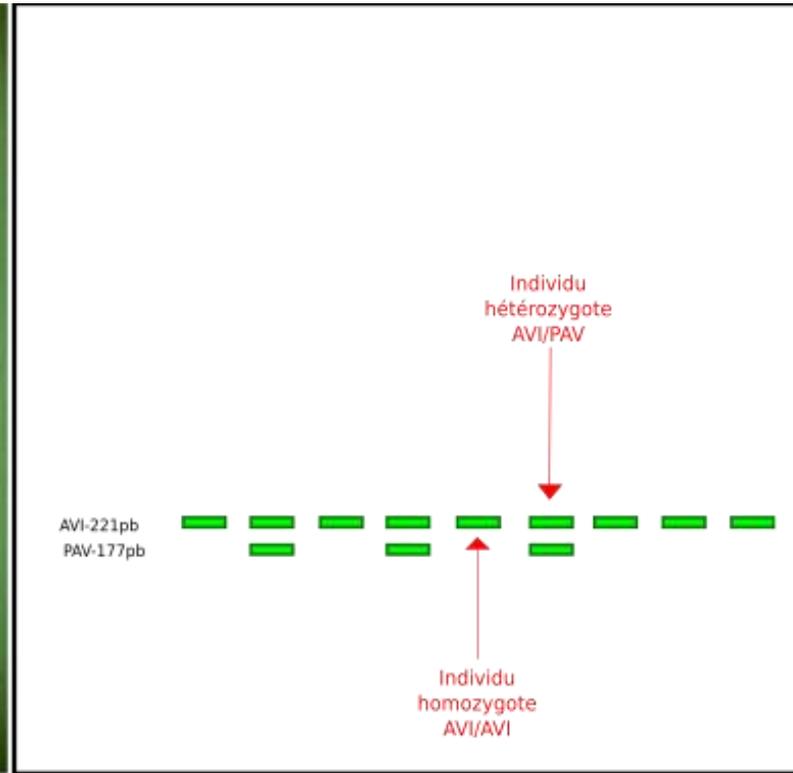
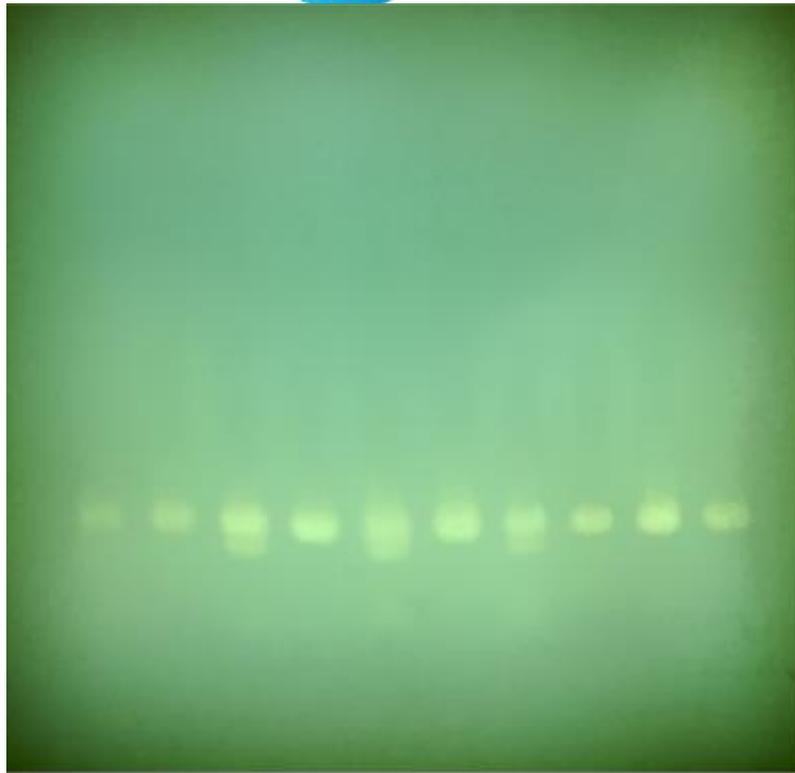
Pour économiser du colorant ou si on ne dispose pas de petit récipient adapté au gel, après l'électrophorèse il suffit d'entourer le gel et son support d'un film étirable type Parafilm<sup>®</sup> M pour étanchéifier les côtés ouverts puis on dépose 10 mL de solution additionnée de 2  $\mu\text{L}$  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'analyse de l'ADN de différents individus montre des variations alléliques : les individus sont soit AVI/PAV ou AVI/AVI. Or les individus AVI/PAV sont plus sensibles au test du PTC que les individus AVI/AVI.

#### > Conclusion

La PCR a permis l'amplification du nombre de copies de l'ADN du gène TAS2R38 contenant (AVI) ou pas (PAV) la mutation. Puis, l'électrophorèse a permis de différencier 2 fragments de gènes, de longueurs différentes, confirmant la diversité génétique des individus étudiés.

L'étude phénotypique du gène (sensibilité au goût amer) a permis de mettre en évidence le lien entre génotype et phénotype.

# PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE TAS2R38 ET DE LA SENSIBILITÉ AU PTC

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 6-14
  - ▶ DÉTERMINATION DE LA MUTATION SUR LE GÈNE ET LIAISON GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE

## INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. RÉSULTATS ET ANALYSE DES MIGRATIONS – LES ENZYMES DE RESTRICTION 15-22
2. GÉNOTYPE DE PTC ET RELATION GÉNOTYPE/PHÉNOTYPE 23-30
3. SÉLECTION ÉQUILBRÉE ET AVANTAGE DU GÉNOTYPE AVI/AVI 31-35
4. LE GÈNE PTC ET L'ÉVOLUTION DES GRANDS SINGES 36-42
5. VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE ET THÉORIE DE L' « OUT OF AFRICA » - LE PRINCIPE DES MUTATIONS FONDATRICES 43-47
6. GÉNOTYPE, PHÉNOTYPE ET SANTÉ 48-53

## RESSOURCES

Fiches techniques, matériels, documents, ...



## INVESTIGATION 1 > Résultats et analyse des migrations – les enzymes de restriction

### MISE EN SITUATION PÉDAGOGIQUE

La variation de la sensibilité gustative au composé amer phénylthiocarbamide (PTC) est l'un des traits mendéliens les plus connus chez les populations humaines, se classant aux côtés de la couleur des yeux et du type de sang dans le canon des exemples classiques. L'attrait de PTC tient en grande partie au fait qu'il est presque impossible de deviner son phénotype sans un test explicite. Pourtant, une fois testé, le phénotype est si frappant qu'il est amusant. Cette propriété est importante, en particulier dans le domaine de l'éducation, car elle peut pimenter des leçons sur l'héritage. L'attrait de PTC en tant que marqueur génétique facile à saisir mais très riche en informations est moins évident, surtout aujourd'hui. C'est cet aspect du trait qui a fait de PTC un instrument important dans les premières tentatives d'analyse du génome humain. Le lien entre une sensibilité gustative variable et un aspect du comportement si manifestement lié à la forme physique - le choix d'un régime alimentaire - soulève depuis longtemps une question fondamentale : la sélection naturelle a-t-elle agi sur ce trait ? (Wooding et al., 2006)

### CONTEXTE SCIENTIFIQUE - 1/5

> Structure du gène TAS2R38 localisé sur le chromosome 7p (Campbell et al., 2012)

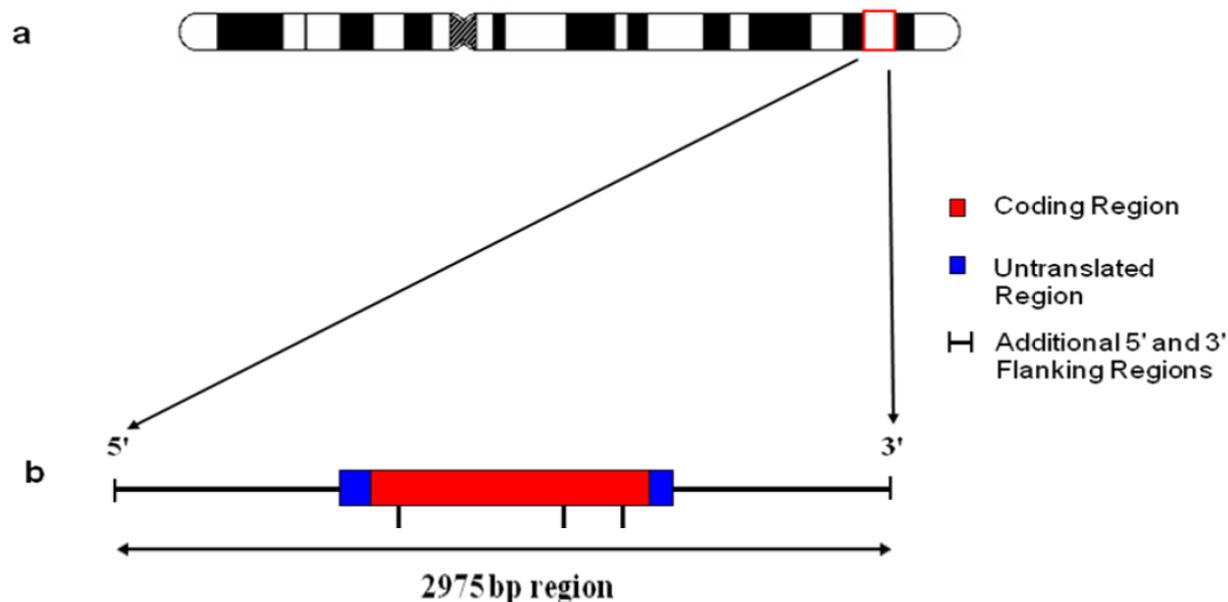


Figure : La structure du gène TAS2R38 et sa localisation dans le génome :  
 Le gène TAS2R38 est localisé sur le bras long du chromosome 7 (7q34)  
 Le gène TAS2R38 consiste en un seul exon codant de 1,002 pb (en rouge), et deux régions non traduites (en bleu) de part et d'autre de la région codante. Les lignes horizontales représentent les régions non codantes supplémentaires séquencées en amont et en aval du gène (c). La flèche horizontale indique la séquence totale de 2 975 pb.



## CE QUE L'ON CHERCHE

### > Hypothèse

La taille des segment d'ADN mutée ou non mutés du gène TAS2R38 possèdent la même taille. On peut différencier les allèle mutés des allèles non mutés par l'intermédiaire d'une digestion enzymatique qui couperait un des fragments en deux parties de poids moléculaires différents.

## 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

• 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	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

Afin de déterminer les génotypes associés à différents phénotypes, l'ADN d'individus gouteurs et non gouteurs de PTC sera amplifié par PCR puis mis à migrer.

→ A partir des séquences des primers et du logiciel Anagène, déterminez la taille des séquences amplifiées du gène TAS2R38, que pouvez-vous en conclure.

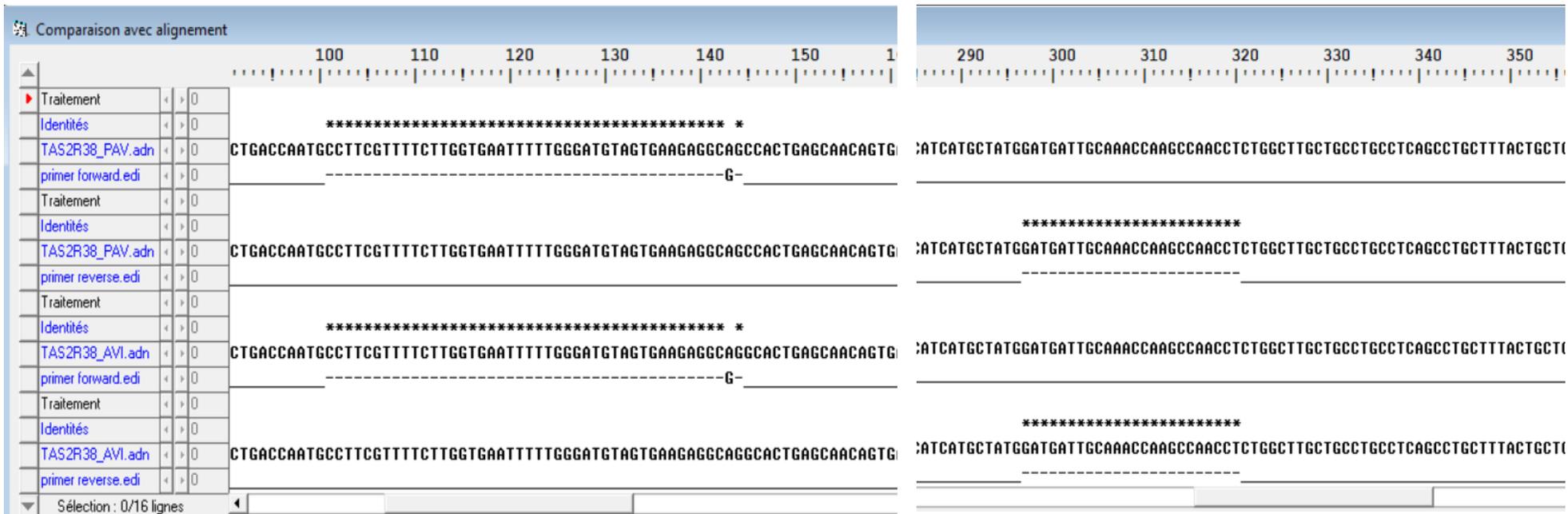
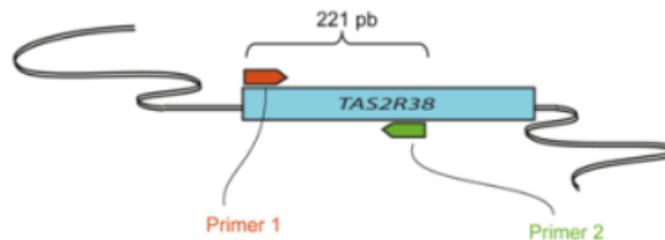


Figure : Comparaison des séquences de nucléotides avec le logiciel Anagène

On observe que la taille des séquences amplifiées est la même :  $321 - 100 = 221$  paires de bases, ainsi il ne sera pas possible de différencier les phénotypes par migration des séquences. Afin de différencier les séquences, il faut couper une des deux séquences sur une mutation qui les différencie ; on utilise alors les enzymes de restriction.



Source : Bioutils.ch



## EXPLOITATION DES RÉSULTATS 2/5

→ Principe et utilisation de l'enzyme de restriction HaeIII.

Une enzyme de restriction est une protéine capable de couper un fragment d'ADN au niveau d'une séquence de nucléotides caractéristique appelée site de restriction.

Chaque enzyme de restriction reconnaît ainsi un site spécifique. Plusieurs centaines d'enzymes de restriction sont actuellement connues. Naturellement présentes chez un grand nombre d'espèces de bactéries, ce qui leur permet de couper l'ADN des virus bactériophages, ces enzymes sont devenues des outils importants en génie génétique (Wikipédia)

HaeIII est l'une des nombreuses enzymes de restriction (endonucléases) découvertes depuis 1970. Il s'agit de la troisième endonucléase isolée de la bactérie *Haemophilus aegyptius*. Son poids moléculaire est de 37126 pb. Le site de reconnaissance de l'enzyme, l'endroit où il coupe les molécules d'ADN, est la séquence nucléotidique GGCC. Le gène de cette enzyme a été séquencé et cloné.

→ A partir du logiciel Rastop/Libmol, ouvrez le fichier « 1dct.pdb ». Mettez les fragments d'ADN sous forme de ruban et observez l'organisation de la protéine HaeIII et son insertion sur l'ADN (source : <https://www.rcsb.org/3d-view/1DCT/1>)

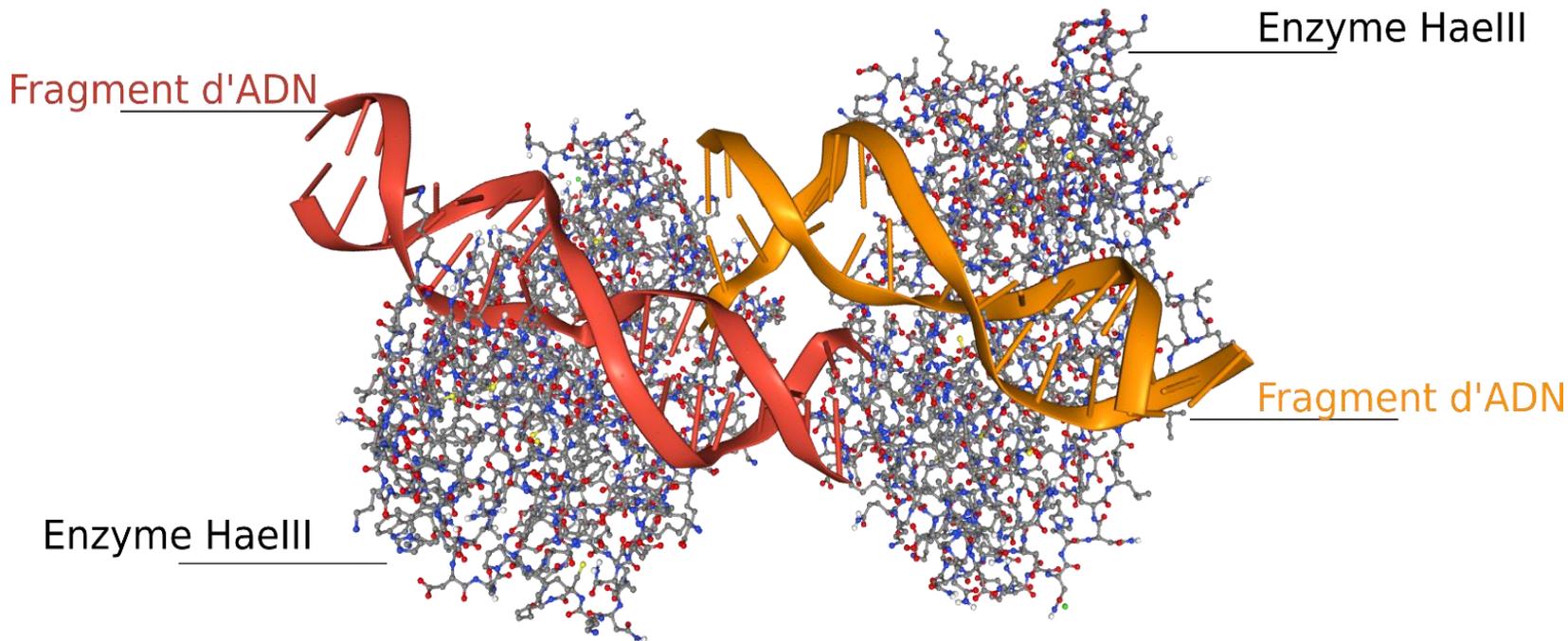


Figure : Représentation moléculaire de l'interaction entre les enzymes HaeIII et des fragments d'ADN sur les sites de restriction



## EXPLOITATION DES RÉSULTATS 3/5

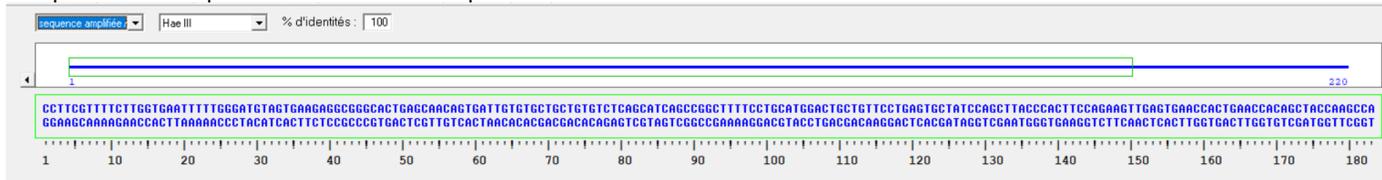
→ A partir de la séquence de « séquence amplifiée PAV » et « séquence amplifiée AVI », déterminez le fragment d'ADN qui va être coupé puis déterminez la taille des fragments attendus.

Note : Une des amorces a été conçue pour apporter le site de restriction pour l'enzyme. Le site de restriction enzymatique est donc créé par la réaction PCR. Pour un individu sensible, la séquence 5'GGCC 3' va apparaître (voir notice du TP)

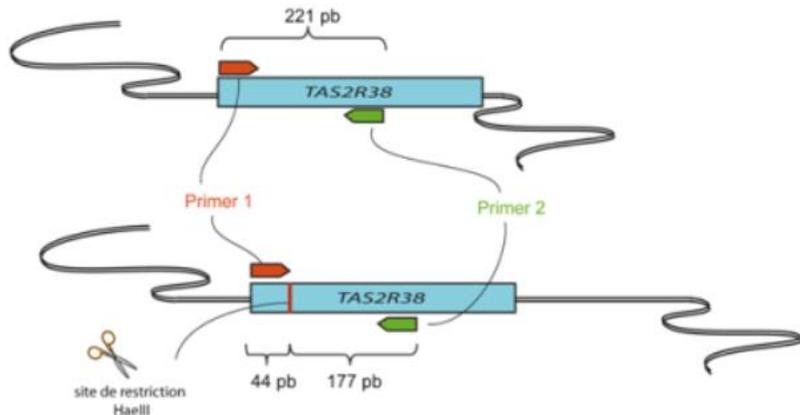
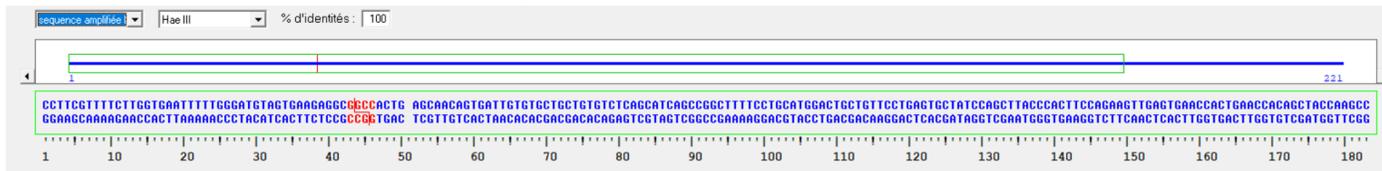
- Ouvrez les séquences avec Anagène
- cliquez sur « traiter », « action enzymatique » ou F9, « enzyme de restriction de la tyrosinase »
- cliquer sur HaeIII puis sur « Ajouter » puis « OK »

### → Résultats :

Séquence amplifiée AVI soit 221 pb :



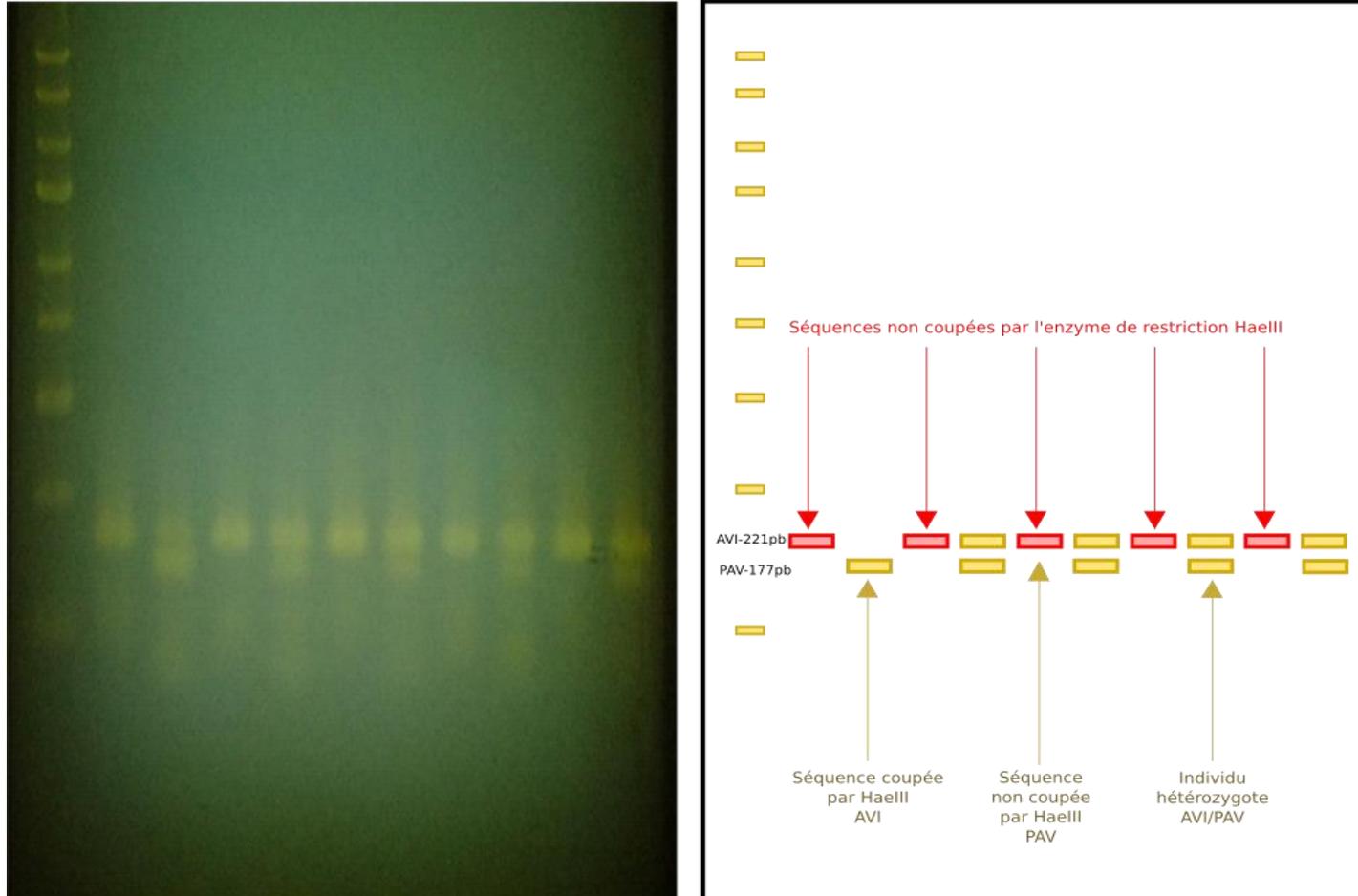
Séquence amplifiée PAV soit 44+177pb :



Dans le cas de l'utilisation de l'enzyme de restriction HaeIII après amplification, on observe que la séquence amplifiée AVI ne sera pas coupée. Ainsi le fragment amplifié sera de 221 pb  
A l'inverse, la séquence amplifiée PAV sera coupée au niveau des paires de bases GGCC et donc produire 2 fragments : 44 et 177 paires de bases.



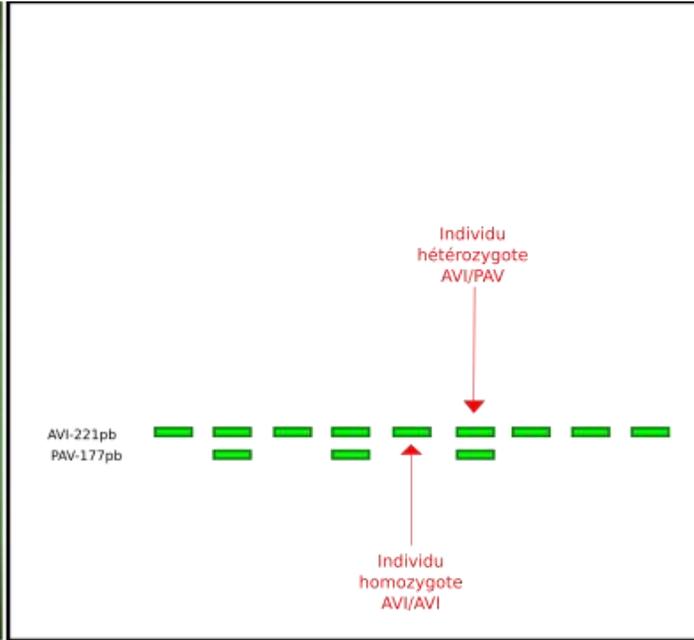
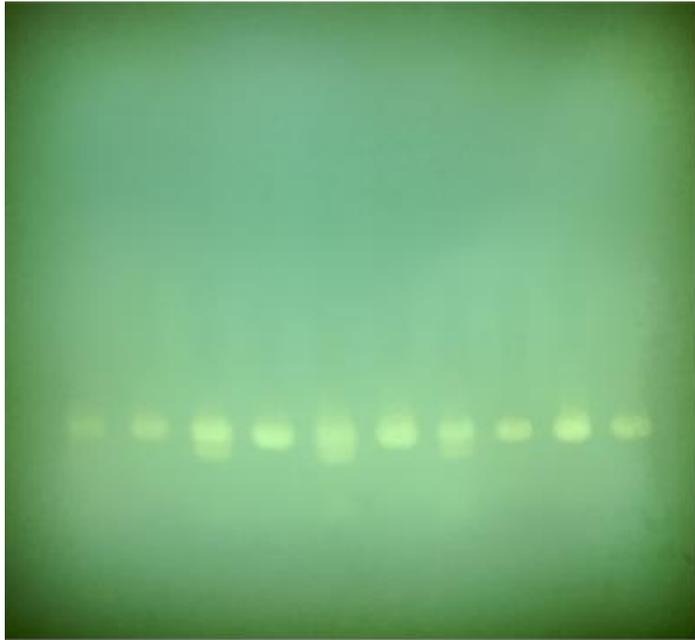
## EXPLOITATION DES RÉSULTATS 4/5



Nous observons bien une séquence de 221 pb lorsque la migration de la séquence n'a pas été précédé de la digestion enzymatique  
 Nous observons aussi une séquence de 221 pb lorsque l'absence du site de restriction n'a pas permis à l'enzyme de couper la séquence – cas de l'allèle AVI  
 Nous observons une séquence de 177 pb lorsque l'enzyme a coupé la molécule d'ADN au niveau du site de restriction. Le fragment de 44 pb n'est pas visible puisqu'il a migré au-delà du gel.



## EXPLOITATION DES RÉSULTATS 5/5

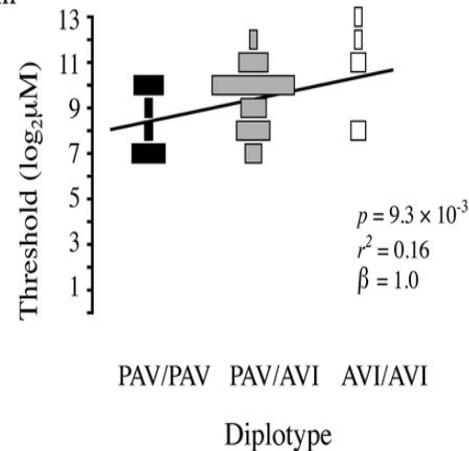


L'étude des migrations des séquences d'ADN montre deux génotypes différents associés à trois phénotypes :

- Des individus homozygotes AVI/AVI (ou 221/221) dont le phénotype est l'absence de sensibilité au PTC : « non sensible »
  - Des individus homozygotes PAV/PAV (ou 177/177) dont le phénotype est la sensibilité importante au PTC : « super sensible »
  - Des individus hétérozygote PAV/AVI (ou 221/177) dont le phénotype est la quasi absence de sensibilité au PTC
- Nous pouvons en déduire que l'allèle AVI est dominante sur l'allèle PAV

→ Quel est le lien entre ces mutations et ce phénotype macroscopique ?

Goïtrin



PTC

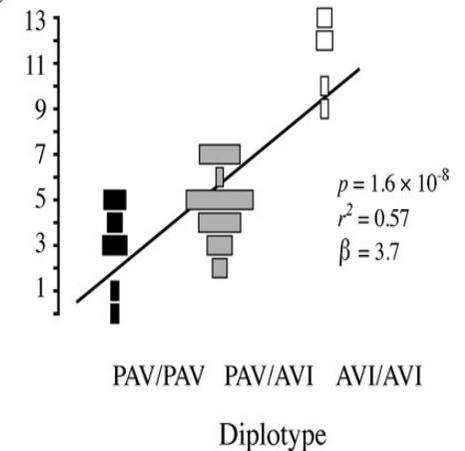


Figure : graphique représentant le seuil de sensibilité à la goitricité et au PTC en fonction des trois principaux génotypes dans une population (Source : Wooding et al., 2010)

# PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE TAS2R38 ET DE LA SENSIBILITÉ AU PTC

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 6-14
  - ▶ DÉTERMINATION DE LA MUTATION SUR LE GÈNE ET LIAISON GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE

## INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. RÉSULTATS ET ANALYSE DES MIGRATIONS – LES ENZYMES DE RESTRICTION 15-22
2. GÉNOTYPE DE PTC ET RELATION GÉNOTYPE/PHÉNOTYPE 23-30
3. SÉLECTION ÉQUILBRÉE ET AVANTAGE DU GÉNOTYPE AVI/AVI 31-35
4. LE GÈNE PTC ET L'ÉVOLUTION DES GRANDS SINGES 36-42
5. VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE ET THÉORIE DE L' « OUT OF AFRICA » - LE PRINCIPE DES MUTATIONS FONDATRICES 43-47
6. GÉNOTYPE, PHÉNOTYPE ET SANTÉ 48-53

## RESSOURCES

Fiches techniques, matériels, documents, ...



## CE QUE L'ON CHERCHE

### > Hypothèse :

Il existe un lien entre la mutation TAS2R38 et l'absence de sensibilité au PTC.

On peut emmètre l'hypothèse que cette absence de sensibilité peut être liée à l'absence de fonctionnement des récepteurs de gout au PTC.

## 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

• 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	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



## INVESTIGATION 2 > Génotype de PTC et relation génotype / phénotype

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 1/6

#### → Comparaison des séquences par anagène (source : svf académie de Lyon)

A partir des données, comparez les séquences des allèles PAV et AVI du gène TAS2R38 à l'aide du logiciel Rastop

The screenshots show sequence alignment in Rastop. The top screenshot compares DNA sequences (TAS2R38\_PAV.adn and TAS2R38\_AVI.adn) with positions 130-150, 780-790, and 880-890. The bottom screenshot compares protein sequences (TAS2R38\_PAV.pro and TAS2R38\_AVI.pro) with positions 140-150, 770-790, and 880-890, showing amino acid differences.

Il existe trois mutations de l'ADN identifiées dans ce gène :

Position du nucléotide	Changement de nucléotide		Changement de codon		Changement d'acide aminé		Position de l'acide aminé	
	PAV	AVI	PAV	AVI	PAV	AVI	PAV	AVI
145	C	G	CCA	GCA	Proline	Alanine	49	
785	C	T	GCT	GTT	Alanine	Valine	262	
886	G	A	GTC	ATC	Valine	Isoleucine	296	



## INVESTIGATION 2 > Génotype de PTC et relation génotype / phénotype

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 2/6

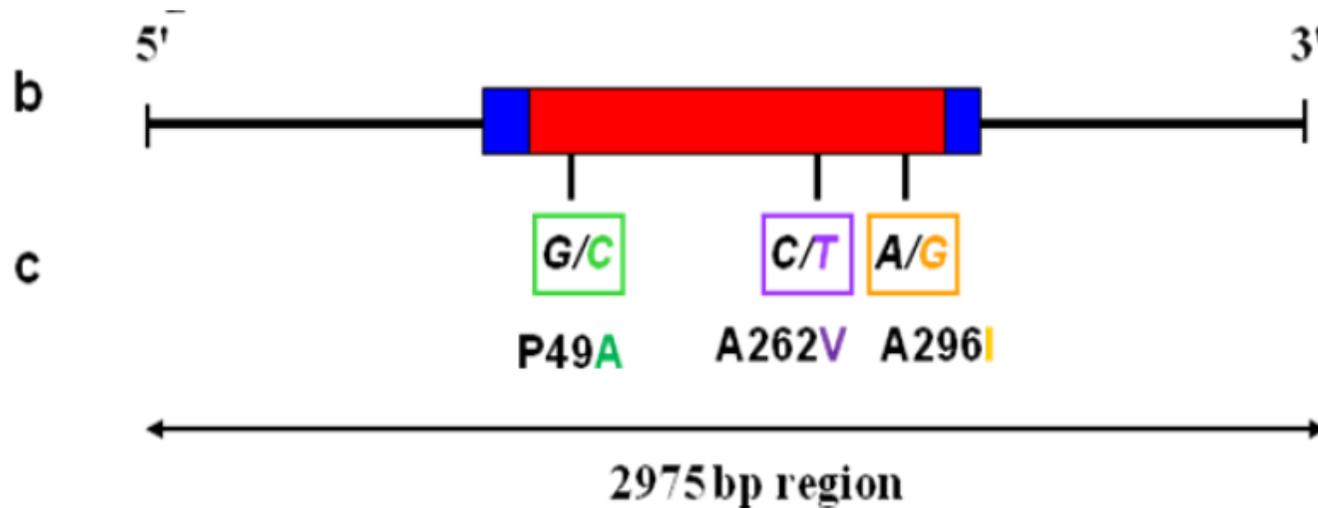
Le PTC est extrêmement amer pour certains individus mais est aussi en grande partie insipide pour d'autres. Cette différence de perception a été attribuée à 2 formes communes du gène TAS2R38 qui présentent des différences de nucléotides (SNP ou single nucléotide polymorphism) sur 3 sites :

- la position 49 des acides aminés (AA), où Pro ou Ala est codé,
- la position AA 262, où Ala ou Val est codé, et
- AA position 296, où Val ou Ile est codé,

Cela donne lieu à deux haplotypes fréquents, hTAS2R38 PAV et hTAS2R38 AVI

- hTAS2R38PAV montre une sensibilité importante au PTC
- hTAS2R38AVI ne montre pas de sensibilité au PTC.

#### Structure du gène TAS2R38 :





## INVESTIGATION 2 > Génotype de PTC et relation génotype / phénotype

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 3/6

#### ➔ Lien génotype – phénotype moléculaire -structure du récepteur

- A partir du logiciel Rastop/Libmol, ouvrez le fichier correspondant à la protéine codée par l'allèle PAV du gène TASR38
- Choisissez la représentation en ruban et mettez en évidence les différents domaines de la protéine (récepteur) à partir du tableau suivant :

Feature Key	Positions	Length (number of amino acids)	Description
Topological domain	1-17	17	Extracellular
Transmembrane	18-38	21	TM1
Topological domain	39-55	17	Cytoplasmic
Transmembrane	56-76	21	TM2
Topological domain	77-94	18	Extracellular
Transmembrane	95-115	21	TM3
Topological domain	116-142	27	Cytoplasmic
Transmembrane	143-163	21	TM4
Topological domain	164-190	27	Extracellular
Transmembrane	191-211	21	TM5
Topological domain	212-251	40	Cytoplasmic
Transmembrane	252-272	21	TM6
Topological domain	273-276	4	Extracellular
Transmembrane	277-297	21	TM7
Topological domain	298-333	36	Cytoplasmic

Tableau représentant la structure du récepteur TAS2R38. Le gène code pour une protéine transmembranaire (TM) qui reconnaît un ligand en dehors la cellule (extracellulaire) et active la transduction d'un signal à l'intérieur de la cellule (cytoplasmique). Ce tableau indique les domaines des acides aminés du récepteur (protéine) en lien avec les membranes interne ou externe de la cellule (Campbell et al. 2012)



## INVESTIGATION 2 > **Génotype de PTC et relation génotype / phénotype**

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 4/6

- Représentez l'espace de la membrane plasmique à travers laquelle passe le récepteur :

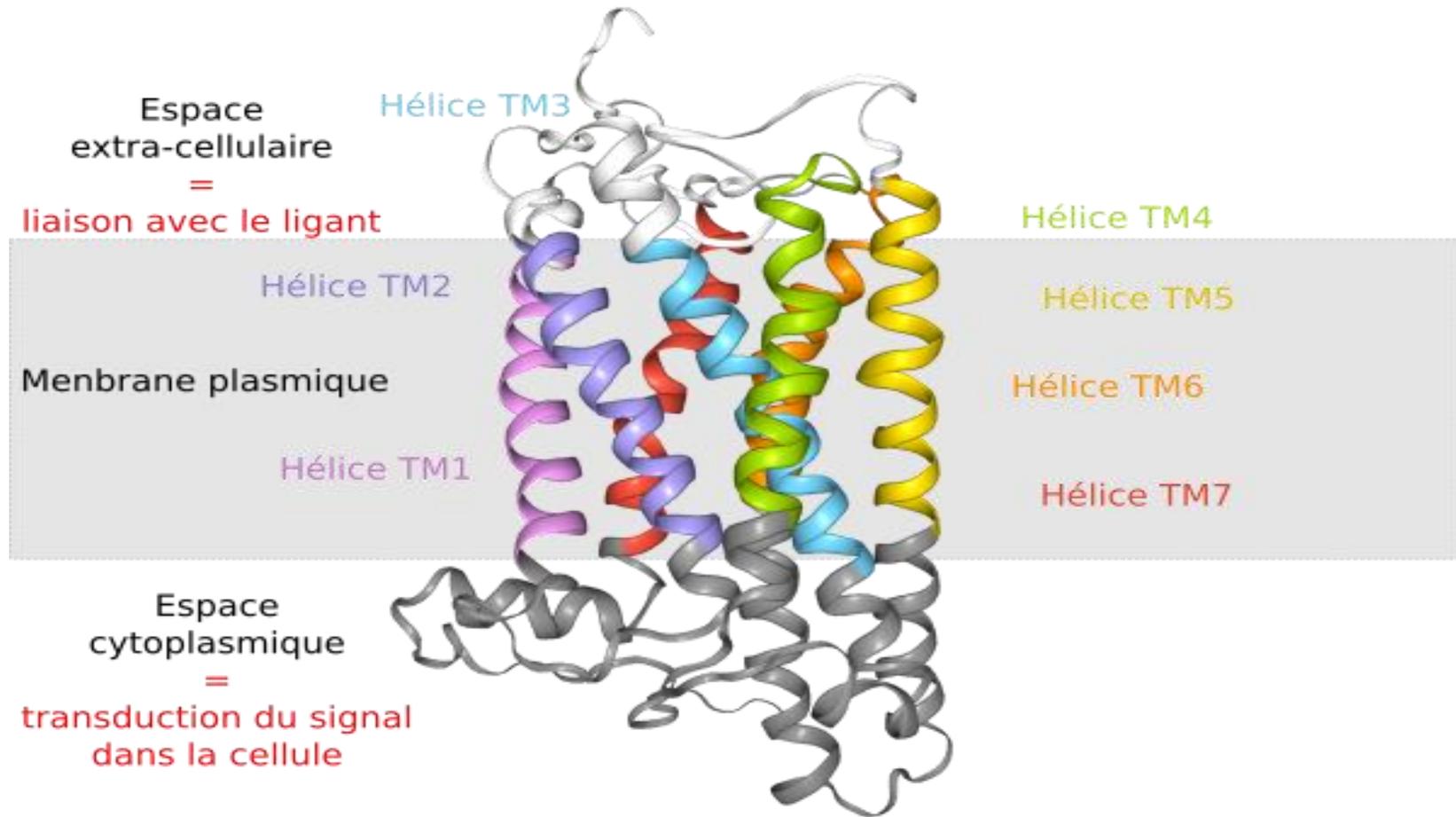


Schéma : Représentation moléculaire du récepteur protéique TAS2R38 à partir du logiciel Libmol



## INVESTIGATION 2 > **Génotype de PTC et relation génotype / phénotype**

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 5/6

- A partir du logiciel Rastop/Libmol, ouvrez les fichiers correspondants aux protéines codées par les séquences des allèles PAV et AVI du gène TAS2R38 puis comparez ces protéines en mettant en évidence les acides aminés mutés.

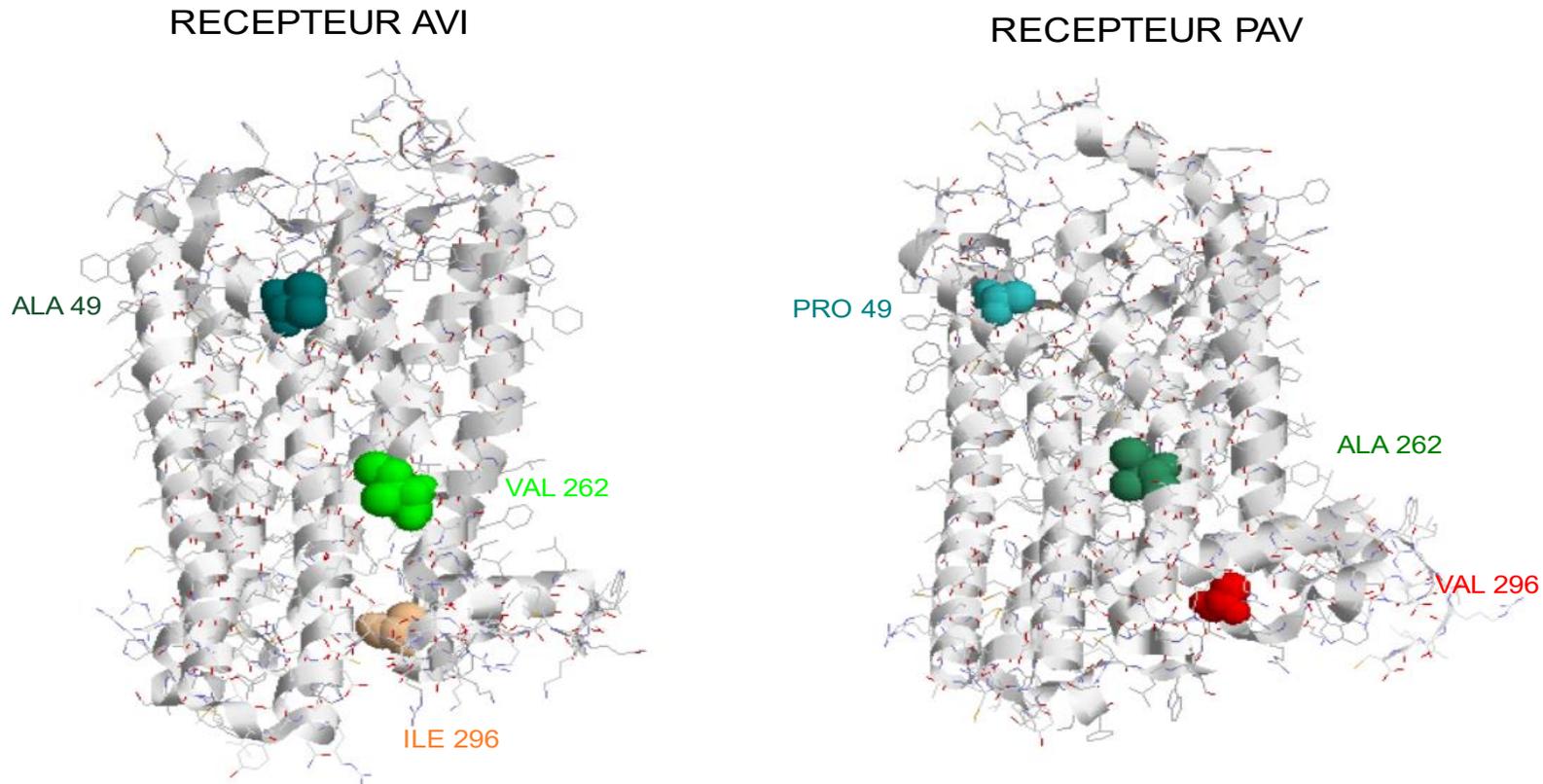


Schéma : Représentation moléculaire des récepteurs protéiques TAS2R38 variant PAV et variant AVI à partir du logiciel Rastop



## INVESTIGATION 2 > Génotype de PTC et relation génotype / phénotype

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 6/6

Récepteur non sensible (AVI)

Récepteur sensible (PAV)

**Structure : sept hélices transmembranaires (TM) du récepteur dans la bicouche lipidique (Abrol et al., 2015)**  
 Le récepteur au goût amer est une protéine insérée dans la bicouche lipidique des cellules gustatives.  
 La forme du récepteur présente sept hélices transmembranaires (TM).  
 La forme du récepteur sensible présente deux liaisons hydrogène interhélicales : Y(Tyrosine)199 (TM5) - W(Tryptophane)108 (TM3) et W(Tryptophane)108 (TM3) – A(Alanine)262 (TM6).  
 La forme du récepteur non sensible affiche deux liaisons hydrogène interhélicales différentes : W(Tryptophane)108 (TM3) – A(Alanine)261 (TM6) et Y(Tyrosine)199 (TM5) – A(Alanine)266 (TM6).

Le document ci-dessus représente les liaisons entre les protéines et le PTC.

- Que pouvez-vous en déduire sur l'origine de la différence de la sensibilité au PTC

Le phénotype – différence de sensibilité au PTC – provient potentiellement de la différence de modes de liaison du ligand (ici PTC) au récepteur de goût amer.

Le PTC (chez le variant PAV – sensible) établirait des liaisons hydrogène avec l'Alanine 262 situé au niveau de l'hélice transmembranaire 6 et la Tyrosine 199 au niveau de l'hélice transmembranaire 5.

Ces liaisons activent le récepteur qui transmet alors le goût amer.

La mutation d'Alanine en Valine, en position 262, ne permet pas l'établissement des mêmes liaisons hydrogène. Les liaisons se font alors entre la cystéine 198. Ainsi, en présence de PTC, le récepteur n'est pas activé de la même façon et ainsi ne transmet pas l'information « goût amer ».

(Abrol et al., 2015)

# PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE TAS2R38 ET DE LA SENSIBILITÉ AU PTC

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 6-14
  - ▶ DÉTERMINATION DE LA MUTATION SUR LE GÈNE ET LIAISON GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE

## INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. RÉSULTATS ET ANALYSE DES MIGRATIONS – LES ENZYMES DE RESTRICTION 15-22
2. GÉNOTYPE DE PTC ET RELATION GÉNOTYPE/PHÉNOTYPE 23-30
3. SÉLECTION ÉQUILBRÉE ET AVANTAGE DU GÉNOTYPE AVI/AVI 31-35
4. LE GÈNE PTC ET L'ÉVOLUTION DES GRANDS SINGES 36-42
5. VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE ET THÉORIE DE L' « OUT OF AFRICA » - LE PRINCIPE DES MUTATIONS FONDATRICES 43-47
6. GÉNOTYPE, PHÉNOTYPE ET SANTÉ 48-53



## RESSOURCES

Fiches techniques, matériels, documents, ...



## CE QUE L'ON CHERCHE

### > Hypothèse :

Il semble que la perception du goût amer est un avantage dans l'évitement de composés toxiques produits par les plantes (comme les crucifères)

Ainsi, la répartition des fréquences alléliques (PAV et AVI) a été étudiées et on devrait s'attendre à une sélection de l'allèle PAV (sensible – gouteur) au dépend de l'allèle AVI :

## 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

• 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	11

### > À disposition

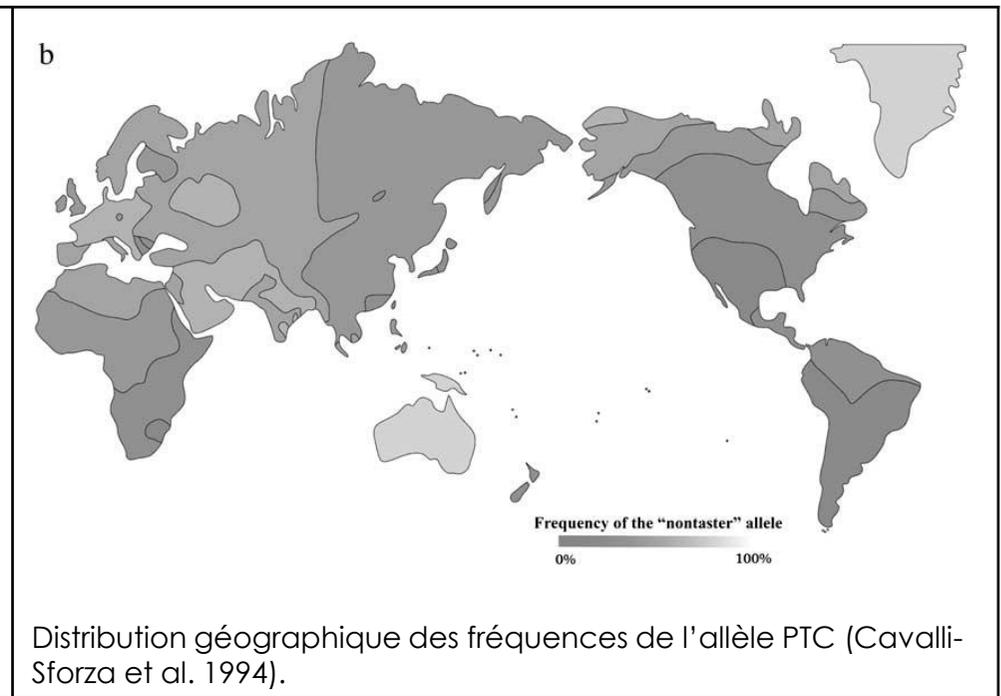
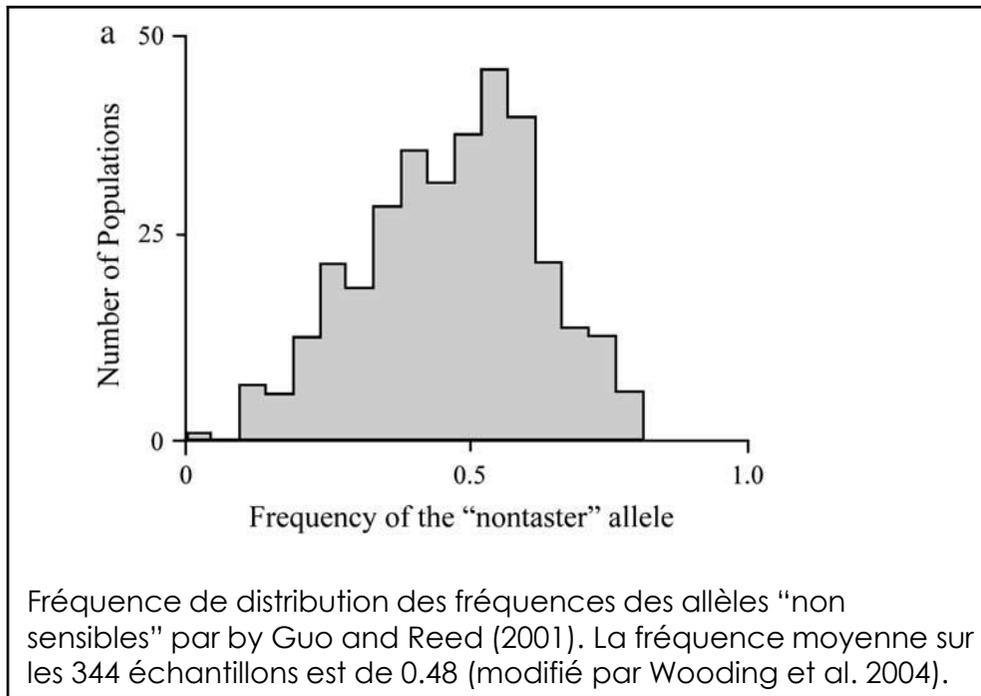
- 1 gel d'agarose 1,2 %
- ADN masculin
- ADN féminin
- Gants – Blouse - Lunettes
- Glace pilée
- Papier aluminium
- Colorant ADN GelGreen®
- Tampon TAE 1X
- Eau distillée



## INVESTIGATION 3 > Sélection équilibrée et avantage du génotype AVI/AVI

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 1/3

→ Les documents ci-dessous représentent l'étude de la répartition des fréquences alléliques dans la population humaine et sa répartition géographique. Quelle hypothèse pouvez-vous émettre à partir de ces résultats :



On observe le maintien des deux allèles (PAV et AVI) à des fréquences similaires même s'il y a des variations géographiques. La coexistence de plusieurs allèles pour un gène ou locus donnés, dans une population est liée à la sélection équilibrante. Ce type de sélection rare amène une maintenance de polymorphisme (coexistence de plusieurs allèles pour un gène à une fréquence élevée > 1%) dans une population. Il y a donc plusieurs phénotypes optimaux pour différents traits. C'est ici le cas pour les génotypes (AVI/AVI), (AVI/PAV) et (PAV/PAV)

**Quel est alors l'avantage de l'absence de sensibilité au PTC ? Est-ce que l'allèle non-testeur est sans fonction ou participe-il la perception de composés autres que le PTC ? (Wooding 2018)**



## INVESTIGATION 3 > Sélection équilibrée et avantage du génotype AVI/AVI

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 2/3

Etude des associations entre les mutations de TAS2R38 et le goût du fruit de *Antidesma bunius* (Risso et al 2018)

A)



B)



*A. bunius* ou bignay est originaire d'Asie du Sud-Est, des Philippines et du nord de l'Australie.

Son fruit est petit (environ 0,5 cm), rond, constitué d'une seule graine entourée d'une fine couche de pulpe et poussant en grappes comme le raisin (figure 1B). Les fruits mûrissent à des vitesses différentes, donnant aux grappes en train de mûrir une apparence frappante avec des baies blanches, rouges et noires. Les fruits *A. Bunius* ne sont généralement pas consommés crus en raison de leur acidité et de leur astringence, mais ils constituent un ingrédient populaire dans les produits sucrés, cuits ou fermentés tels que les gelées, les jus de fruits et le vin. Le thé *A. bunius*, un autre produit populaire, est dérivé de l'écorce de l'arbre

*A. Bunius* et fruits.

(A) La hauteur des arbres *Bunius* atteint 30 m. Crédit : D.J. Stang 2007 — CC BY-SA IGO 4.0.

(B) Les fruits poussent en grappes et mûrissent à des vitesses différentes, ce qui leur donne un aspect éclatant. Credit: Asit K. Ghosh 2010 - CC BY-SA IGO 3.0.



## INVESTIGATION 3 > Sélection équilibrée et avantage du génotype AVI/AVI

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 3/3

Etude des associations entre les mutations de TAS2R38 et le goût du fruit de *Antidesma bunius* (Risso et al 2018)

Genotype	Phenotypic Response		Allele	Agonists
	PTC	<i>A. bunius</i>		
PAV/PAV	✓	x	PAV	Phenylthiocarbamide (PTC) Allyl Isothiocyanate Goitrin Ethylpyrazine Limonin Phenethyl Isothiocyanate Sinigrin Yohimbine Methimazole Propylthiouracil
PAV/AVI	✓	✓		
AVI/AVI	x	✓		
↓			AVI	
Allele	Functional Response			
PAV	✓	x	Compounds in <i>A. bunius</i> Other compounds?	
AVI	x	✓		

Représentation simplifiée des résultats de Risso et al.  
Les coches indiquent une réponse, les x n'indiquent aucune réponse.

Allèles TAS2R38 et agonistes  
L'allèle TAS2R38-PAV est sensible non seulement au PTC, mais également de nombreux composés structurellement apparentés. Les agonistes spécifiques de TAS2R38-AVI ne sont pas connus ; Cependant, les conclusions de Risso et al indiquent que ces composés sont présents chez *A. bunius*.

La variation dans TAS2R38 prédit la perception du goût amer du fruit *A. bunius*, comme dans PTC. Cependant, l'association est à l'opposé des PTC : les mutations associées à une sensibilité élevée de PTC sont associées à une sensibilité faible à *A. bunius* et, inversement, **les mutations associées à une sensibilité faible à PTC sont associées à une sensibilité élevée à *A. bunius***

**Conclusion :** Si le PAV permet la perception d'un ensemble de composés et l'AVI permet la perception d'un autre, les hétérozygotes devraient être capables de percevoir les deux. Cela pourrait conférer un avantage sélectif aux hétérozygotes, ce qui permettrait de maintenir les populations humaines des deux allèles.

# PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE TAS2R38 ET DE LA SENSIBILITÉ AU PTC

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 6-14
  - ▶ DÉTERMINATION DE LA MUTATION SUR LE GÈNE ET LIAISON GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE

## INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. RÉSULTATS ET ANALYSE DES MIGRATIONS – LES ENZYMES DE RESTRICTION 15-22
2. GÉNOTYPE DE PTC ET RELATION GÉNOTYPE/PHÉNOTYPE 23-30
3. SÉLECTION ÉQUILBRÉE ET AVANTAGE DU GÉNOTYPE AVI/AVI 31-35
4. LE GÈNE PTC ET L'ÉVOLUTION DES GRANDS SINGES 36-42
5. VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE ET THÉORIE DE L' « OUT OF AFRICA » - LE PRINCIPE DES MUTATIONS FONDATRICES 43-47
6. GÉNOTYPE, PHÉNOTYPE ET SANTÉ 48-53

## RESSOURCES

Fiches techniques, matériels, documents, ...



## INVESTIGATION 4 > Le gène PTC et l'évolution des grands singes

### CONTEXTE SCIENTIFIQUE

En 1923, la communauté scientifique exprimait peu d'intérêt quant à la possibilité que la sélection naturelle, considérée comme "d'importance mineure, ne puisse au mieux que provoquer de petites adaptations", pourrait être un moteur important évolution.

Alors que les travaux théoriques sur les relations entre génétique, sélection naturelle et évolution étaient bien développés à ce moment-là, les effets génétiques de la sélection chez l'homme n'étaient pas encore bien démontrés empiriquement.

Fisher, Ford et Huxley ont raconté plus tard qu'au cours des discussions sur la possibilité que les fréquences des groupes sanguins trouvées chez l'homme soient déterminées par une balance d'influences sélectives, il est apparu à l'un des auteurs intéressant d'étudier la sensibilité au goût amer chez des singes anthropoïdes.

" Ainsi, les trois ont reconnu que la sensibilité au PTC représentait une occasion unique de tester l'hypothèse selon laquelle la sélection naturelle aurait agi sur un gène humain spécifique. Avec l'aide du Dr. Riddell de Glasgow, Fisher a été en mesure de se procurer des solutions graduées composées de « 2% de sucre en tout et de zéro, 6 1/4, 50 ou 400 parties par million de PTC ». Puis, avec l'aide de F. A. E. Crew et du Dr. Gillespie, ces solutions ont été présentées à huit chimpanzés et à un orang-outan au zoo d'Edimbourg, apparemment en boisson

Luca Cavalli-Sforza raconta qu'« Apparemment, on se demandait s'il serait possible de déterminer, à partir de la réaction d'un animal, s'il s'agissait d'un goûteur ou non ; Cependant, "le premier animal qu'ils ont testé les a sortis de tout trouble, car il a regardé Fisher dans les yeux et lui a craché la solution dessus ".

Selon les résultats de l'expérience d'Edinburgh : six des huit chimpanzés testés sont sensibles au PTC.

Fisher comprit immédiatement l'importance de la découverte et écrivit à Ford: «Il me semble extrêmement passionnant qu'il y ait un polymorphisme avec un ratio de gènes apparemment stable depuis des millions d'années dans une quantité que nous pensions initialement tout à fait sans Selon M. Fisher, si la variation de la sensibilité au PTC est suffisamment complexe pour n'avoir évolué qu'une seule fois, la présence de polymorphisme chez les humains et les chimpanzés ne peut être expliquée que par une seule origine des allèles préalablement testeur et non sensible avant divergence évolutive de ces deux espèces, suivie du maintien des deux allèles au sein de chaque espèce

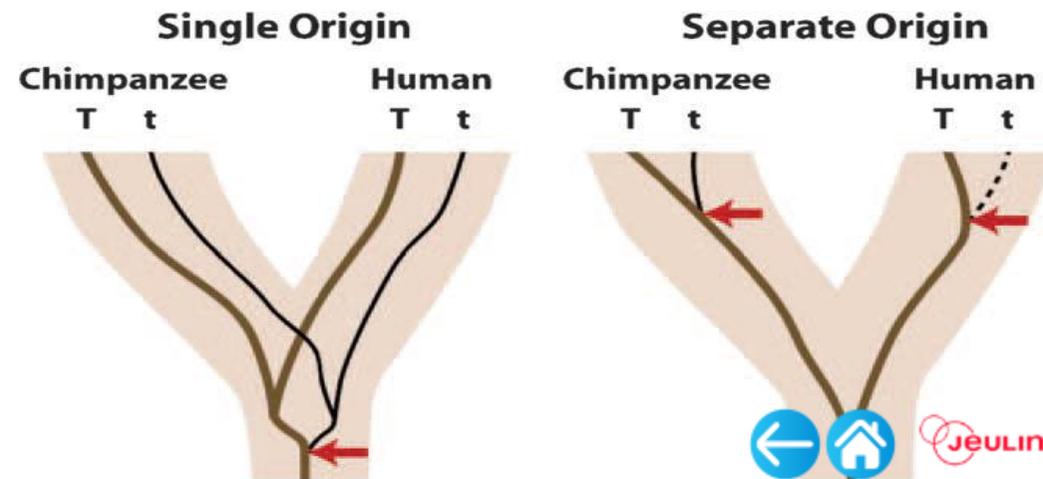
Figure : Hypothèses sur l'origine des allèles goûteurs et non-goûteurs de PTC.

À gauche : L'hypothèse de « l'origine unique » de Fisher. Dans cette hypothèse, les allèles goûteur (T) et non testeur (t) ont divergé avant la divergence des espèces homme-chimpanzé. Ensuite, les deux allèles ont été maintenus séparément dans chaque espèce jusqu'à présent.

A droite : L'hypothèse de « l'origine distincte » de Wooding (2006). Selon cette hypothèse, les allèles non-goûteurs sont dérivés d'allèles de goûteurs deux fois - une fois par espèce - après la divergence entre l'homme et le chimpanzé.

Les flèches indiquent des événements de divergence.

Le principe de parcimonie devrait favoriser l'hypothèse de Fisher, l'hypothèse de Wooding avec 2 innovations est beaucoup moins parcimonieuse.





## CE QUE L'ON CHERCHE

### > Hypothèse :

La perception du goût amer est présente chez plusieurs espèces de grands singes. On peut émettre l'hypothèse que les grands singes partagent cette mutation selon le principe de parcimonie.

## 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

• 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	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



## INVESTIGATION 4 > Sélection équilibrée et avantage du génotype AVI/AVI

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 1/4

→ Peut-on confirmer ou infirmer les différentes hypothèses sur l'origine des mutations déterminant la sensibilité au PTC chez les grands singes ?

Le gène a été séquencé chez les grands singes et les séquences sont comparées avec Phylogène

A partir des séquences du gène TAS2R38, peut-on mettre en évidence l'évolution des grands singes

A partir des séquences du gène et du logiciel Phylogène, construisez un arbre phylogénétique (UPGMA) du gène chez les grands singes.

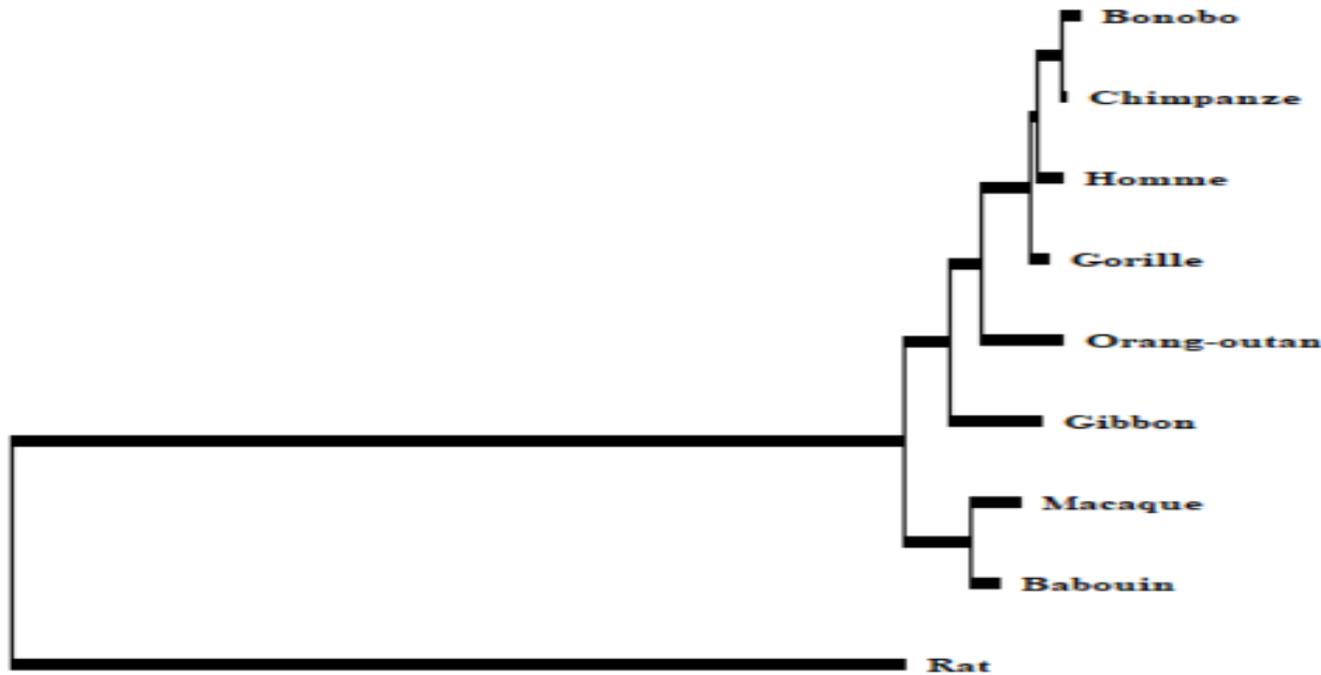


Figure : Arbre phylogénétique du gène TAS2R38 chez les grands singes

Le gène de TAS2R38 permet de retrouver la phylogénie des grands singes

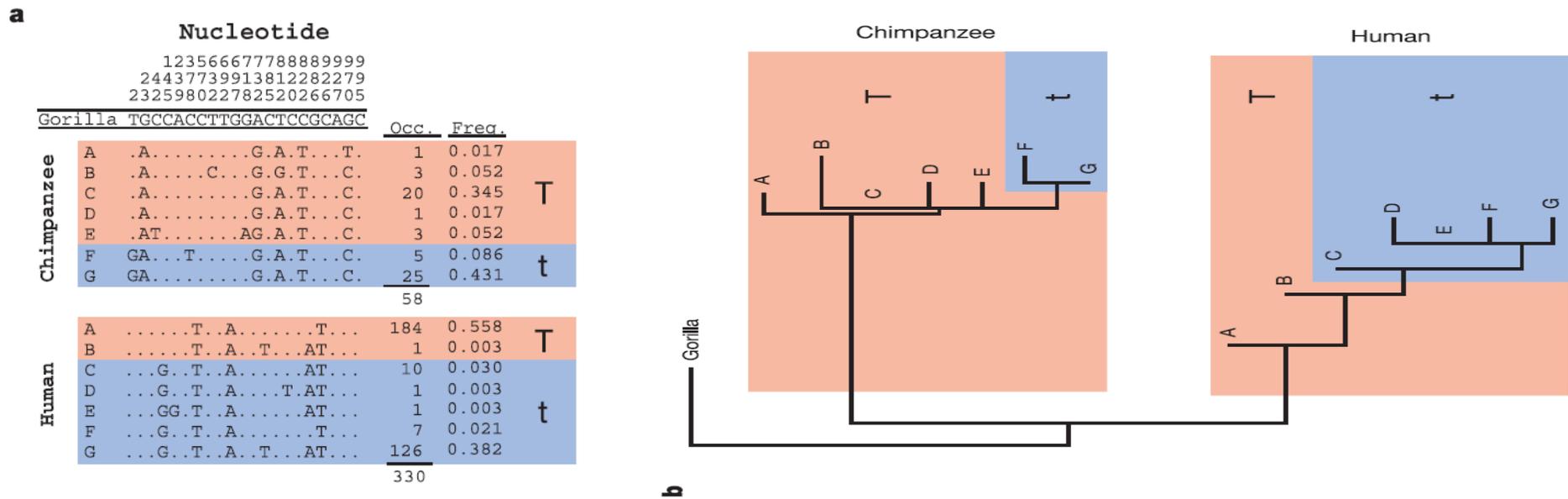
Il semble, ainsi, que les chimpanzés et les humains possèdent des gènes TAS2R38 très proches mais ces résultats ne permettent pas de confirmer ou d'infirmer les hypothèses précédentes



## INVESTIGATION 4 > Sélection équilibrée et avantage du génotype AVI/AVI

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 2/4

**Wooding, en 2006, a séquencé le gène TAS2R38 d'individus possédant des allèles sensible (T) et non sensible (t). Les résultats ont été représentés sous la forme d'arbre phylogénétique. Que pouvez-vous conclure ?**



Chez les humains, la sensibilité variable aux PTC est largement contrôlée par la ségrégation de deux allèles communs au locus TAS2R38, qui code des variants du récepteur avec des affinités de ligand différentes

On peut observer ici que la sensibilité au goût de PTC chez les chimpanzés est également contrôlée par deux allèles communs de TAS2R38 ; Cependant, aucun de ces allèles n'est partagé avec les humains.

Au lieu de cela, une mutation du codon d'initiation entraîne l'utilisation d'un autre codon de départ en aval et la production d'un variant de récepteur tronqué qui ne répond pas au CTP in vitro. Les tests d'association de la sensibilité au CTP dans une cohorte de chimpanzés en captivité ont confirmé que le génotype du chimpanzé TAS2R38 prédit avec précision le statut de dégustateur in vivo. Par conséquent, bien que les observations de Fisher et autres 1 soient exactes, leur explication était fautive. Les humains et les chimpanzés partagent une sensibilité gustative variable aux composés amers induits par les variants du récepteur PTC, mais la base moléculaire de cette variation est apparue à deux reprises, indépendamment, chez les deux espèces. (Wooding et al., 2006)



## INVESTIGATION 4 > Sélection équilibrée et avantage du génotype AVI/AVI

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 3/4

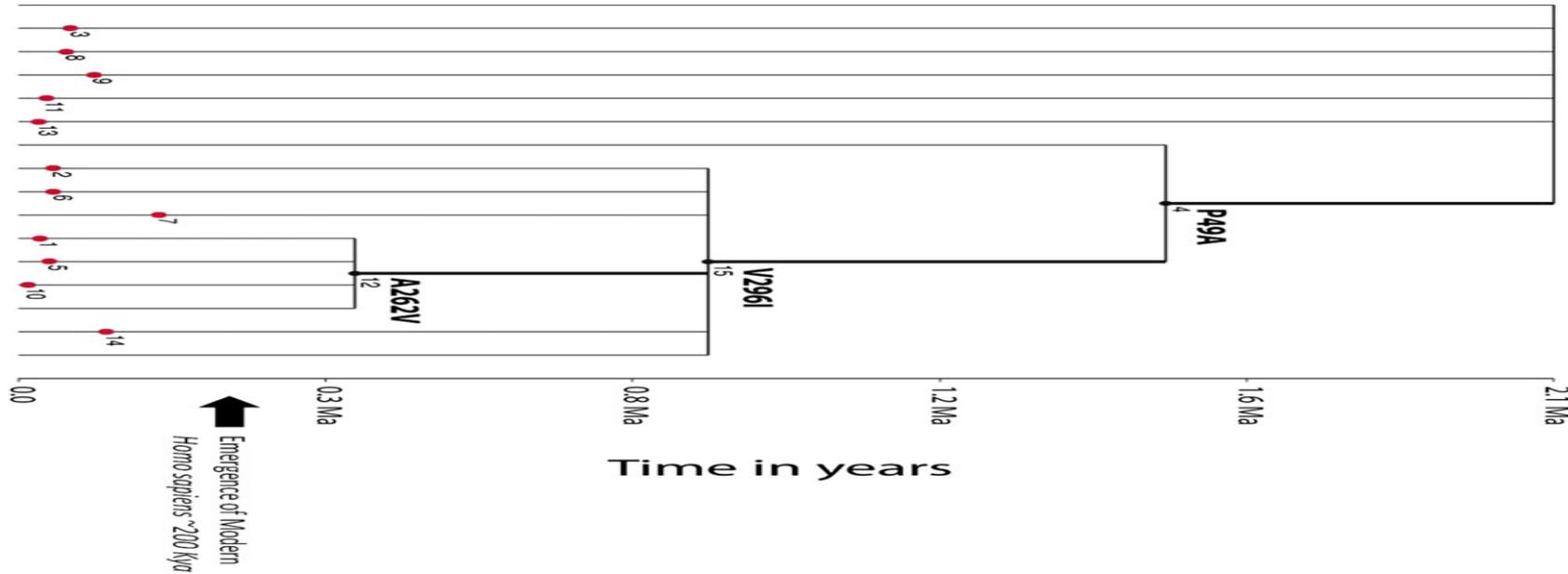


Figure : Arbre phylogénétique du gène TAS2R38.

Les mutations courantes sont représentées par des points noirs et les mutations rares par des points rouges. Les âges des polymorphismes sont des estimations moyennes

Les mutations clés définissant les haplotypes d'acides aminés sont numérotées.

L'échelle à droite représente le temps en années et la flèche représente le point où les humains modernes ont évolué (kya il y a 5 000 ans).

(Campbell et al., 2012)

Wooding et ses collègues (2006) ont démontré que la capacité à goûter le PTC est un trait ancestral chez l'homme et le chimpanzé et que les variants associés à une sensibilité diminuée ont évolué indépendamment chez ces espèces après leur divergence (5–6 Ma). L'époque du dernier ancêtre commun (TMRCA ou time to most recent common ancestor) des allèles (P49A : 1,3 million ± 242 211, V296I : 336 000 ± 89 845 et A262V : 1,0 million ± 267 268 années) suggère que des variants communs influençant la sensibilité au PTC ont surgi dans la lignée Homo avant l'émergence de l'Homo sapiens moderne.



## INVESTIGATION 4 > Sélection équilibrée et avantage du génotype AVI/AVI

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 4/4

#### → Qu'en est-il de Neandertal ?

La perception du goût est importante pour la nutrition et la santé, chez les espèces d'Homo actuelles et anciennes. Homo neanderthalensis était une espèce vivant en Europe et en Asie occidentale d'il y a environ un demi-million d'années à environ 28 000 ans. Il est donc intéressant de déterminer si la variation observée dans la perception du goût chez l'homme moderne existait aussi chez les Néandertaliens.

```

TTGGGATGTAGTGAAGAGGCAGSCACTGAGCAACAGTGATTGTGTGCTGCTGTGTCTCAGCAT
s1 (2390)                ..C.....
s2 (1)                   ..C.....A.....
s3 (1914)                ..G.....
s4 (1)                   ..GT.....
s5 (1)                   ..G..T.....

```

	Nombre de sequences	Pourcentage	Aa produit	Phénotype
Total	4307			
C en position 145	2391	55.51%	Proline	Sensible
G en position 145	1916	44.49%	Alanine	Non-sensible

Figure : Résultats de séquençage du gène TAS2R38 sur la position du 49ème acide aminé de El Sidron. C correspond à la proline (sensible à l'amertume) et G correspond à l'alanine (insensible à l'amertume) (Lalueza-Fox et al., 2009)

Dans la mesure où plus de la moitié des clones TAS2R38 montrent une des deux mutations, il semble très vraisemblable que l'individu Neandertal soit hétérozygote A49P est donc gouteur mais moins que les homozygotes

Lalueza-Fox (2009) a amplifié et séquencé l'acide aminé 49 du gène TAS2R38 dans l'échantillon de Neandertal non contaminé d'El Sidro en 1253 et a déterminé qu'il était hétérozygote. Ainsi, ce Néandertalien était sensible au goût amer, bien qu'il soit probablement légèrement moins sensible à un homozygote PAV. Cela indique que la variation dans la perception du goût amer précède la divergence des lignées conduisant aux Néandertaliens et aux humains modernes.

# PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE TAS2R38 ET DE LA SENSIBILITÉ AU PTC

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 6-14
  - ▶ DÉTERMINATION DE LA MUTATION SUR LE GÈNE ET LIAISON GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE

## INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. RÉSULTATS ET ANALYSE DES MIGRATIONS – LES ENZYMES DE RESTRICTION 15-22
2. GÉNOTYPE DE PTC ET RELATION GÉNOTYPE/PHÉNOTYPE 23-30
3. SÉLECTION ÉQUILBRÉE ET AVANTAGE DU GÉNOTYPE AVI/AVI 31-35
4. LE GÈNE PTC ET L'ÉVOLUTION DES GRANDS SINGES 36-42
5. VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE ET THÉORIE DE L' « OUT OF AFRICA » - LE PRINCIPE DES MUTATIONS FONDATRICES 43-47
6. GÉNOTYPE, PHÉNOTYPE ET SANTÉ 48-53



## INVESTIGATION 5 > Variabilité génétique et théorie de l' « Out Of Africa » - Le principe de mutation fondatrices

### CE QUE L'ON CHERCHE

#### > Hypothèse :

Néandertal était potentiellement sensible au goût amer. Donc la variation dans la perception du goût amer précède la divergence des lignées conduisant aux Néandertaliens et aux humains modernes. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'étude des mutations sur le gène TAS2R38 pourrait nous permettre d'étudier l'évolution des populations humaines modernes.

### 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

• 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	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



## INVESTIGATION 5 > Variabilité génétique et théorie de l' « Out Of Africa » - Le principe de mutation fondatrices

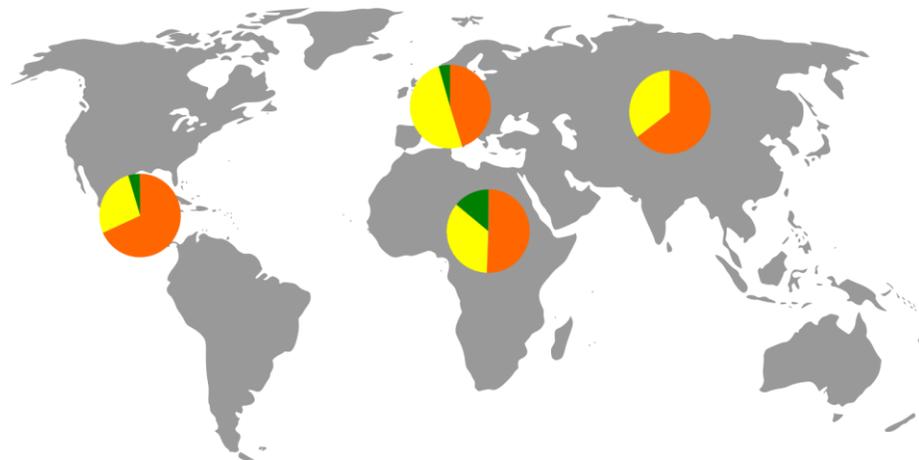
### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 1/3

→ Déterminez la répartition mondiale des haplotypes (PAV, AVI et autres haplotypes)

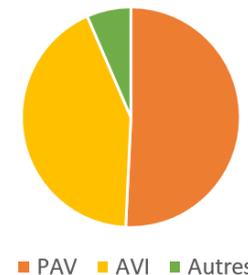
Population	PAV	AVI	Autres
Total	50,76%	42,70%	6,54%
Africains	50,76%	35,18%	14,06%
Asiatiques	64,51%	35,31%	0,18%
Européens	45,66%	49,22%	5,12%
Américains	68,61%	26,69%	4,70%

Tableau : distribution détaillée des haplotypes de TAS2R38 dans les populations étudiées (Risso et al., 2016)

A partir des données ci-dessus, créez une carte de la répartition mondiale des différents haplotypes (PAV, AVI et autres) ainsi qu'un graphique représentant le pourcentage total de chaque haplotype



Proportion des différents haplotypes dans la population mondiale

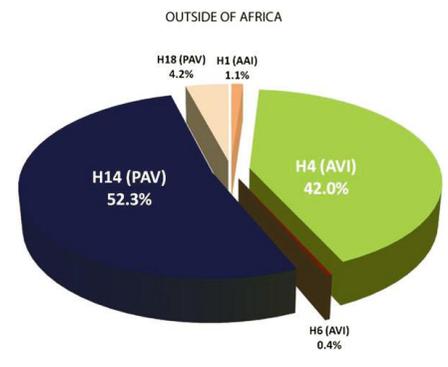
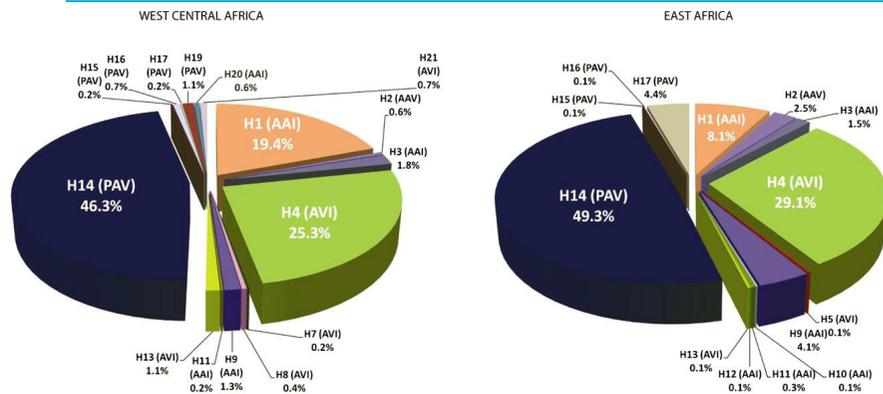


Document : Distribution mondiale des haplotypes PAV, AVI et autres (AAI, AVI, PVI).

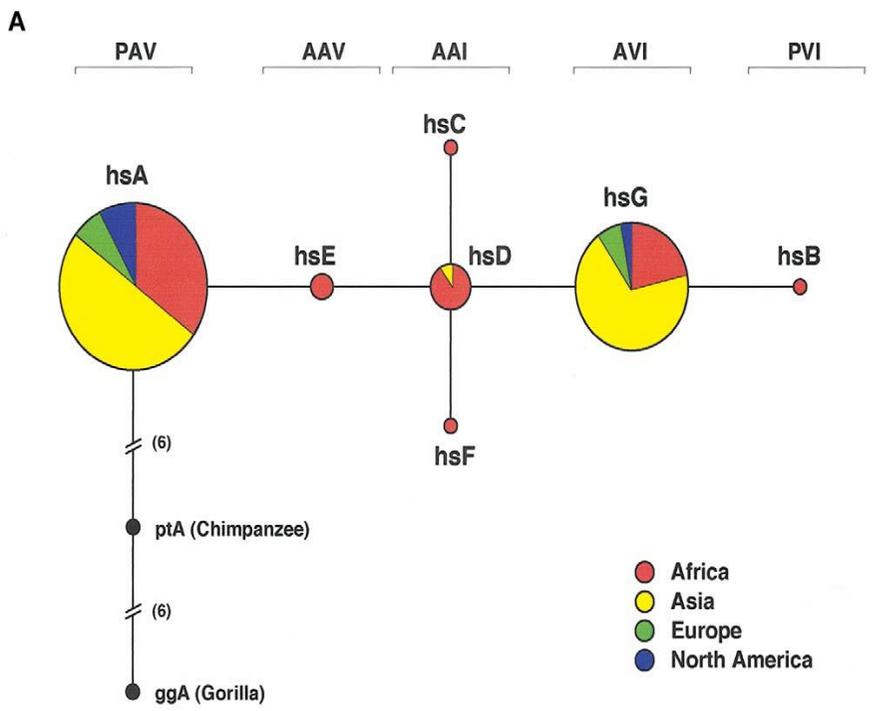


## INVESTIGATION 5 > Variabilité génétique et théorie de l' « Out Of Africa » - Le principe de mutation fondatrices

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 2/3



Document : Distribution africaines des différents haplotypes. (Campbell et al., 2012)



**- Quelle hypothèse pouvez-vous émettre sur l'origine de cette répartition mondiale puis africaine des différents haplotypes ?**

Figure : Arborescence des relations entre les haplotypes du gène PTC et les fréquences d'haplotype. A, chaque cercle représente un haplotype et la taille de chaque cercle représente la fréquence relative de l'haplotype. Chaque connexion entre les haplotypes correspond à une substitution de nucléotide, sauf indication entre parenthèses (Wooding et al., 2004)



# INVESTIGATION 5 > Variabilité génétique et théorie de l' « Out Of Africa » - Le principe de mutation fondatrices

## EXPLOITATION DES RÉSULTATS 3/3

On observe que les africains ont des niveaux plus élevés de diversité génétique et phénotypique sur le gène TAS2R38. Ainsi les populations africaines ont une gamme de sensibilités au goût amer plus étendue que celle observées en dehors d'Afrique.

Cette observation peut être expliquée par deux phénomènes :

- les variants communs qui influencent la sensibilité au PTC ont surgi dans la lignée Homo avant l'émergence de l'Homme moderne, et l'âge ancien de la variation P49A trouvé chez Neandertal montre que le polymorphisme était présent chez l'ancêtre commun aux sapiens et Neandertal. Le maintien de ces variations chez ces populations serait expliqué par les pressions de sélection d'équilibrage qui tendraient à maintenir les différents haplotypes.
- A l'inverse, le goulot d'étranglement de la population lors de l'expansion géographique des humains modernes africains au cours des 100 000 dernières années pourrait avoir entraîné une perte de variant d'haplotypes chez les non-africains

**Conclusion : Environ 75% de la population mondiale possède un génotype PAV/PAV ou PAV/AVI sont sensibles à la goitrite et 25% sont insensibles.**

**Tous les êtres humains insensibles descendent d'un individu fondateur doté d'une altération génétique. La perception de l'amertume protège contre l'ingestion de substances végétales toxiques mais il semble que le récepteur insensible au PTC soit sensible à d'autres types de substances toxiques (comme les composants de A. bunioides)**

**Les mutations fondatrices sont contenues dans un segment très court de l'ADN ancestral (haplotype constitué seulement de 30 000 paires de bases), le fondateur est probablement vieux de plus de 100 000 ans.**

**Les mutations du gène renseignent sur les premières migrations humaines. La répartition et la fréquence actuelles confirment les témoignages anthropologiques et archéologiques montrant que la population originelle des êtres humains vivait en Afrique et qu'un petit groupe est parti, il y a environ 75 000 ans, pour conquérir les 5 autres continents ; c'est l'hypothèse « Out Of Africa ». Toutes les populations non africaines existantes sont leur descendance. (Les mutations fondatrices, Pour la Science n°337, nov. 2005)**

# PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE TAS2R38 ET DE LA SENSIBILITÉ AU PTC

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 6-14
  - ▶ DÉTERMINATION DE LA MUTATION SUR LE GÈNE ET LIAISON GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE

## INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. RÉSULTATS ET ANALYSE DES MIGRATIONS – LES ENZYMES DE RESTRICTION 15-22
2. GÉNOTYPE DE PTC ET RELATION GÉNOTYPE/PHÉNOTYPE 23-30
3. SÉLECTION ÉQUILBRÉE ET AVANTAGE DU GÉNOTYPE AVI/AVI 31-35
4. LE GÈNE PTC ET L'ÉVOLUTION DES GRANDS SINGES 36-42
5. VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE ET THÉORIE DE L' « OUT OF AFRICA » - LE PRINCIPE DES MUTATIONS FONDATRICES 43-47
6. GÉNOTYPE, PHÉNOTYPE ET SANTÉ 48-53



## RESSOURCES

Fiches techniques, matériels, documents, ...



## INVESTIGATION 6 > **Génotype, phénotype et santé**

### CE QUE L'ON CHERCHE

#### > Hypothèse :

La présence d'une mutations sur le gène TAS2R38 est responsable de l'absence de sensibilité au gout amer, et donc une appétence plus importante pour les composés contenant du PTC.

On peut alors émettre l'hypothèse que sensibilité à l'amertume ou son absence peut avoir un impact important sur la consommation de différentes substances, et donc un impact sur la santé

### 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

• 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	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



## INVESTIGATION 6 > Génotype, phénotype et santé

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 1/4

#### → Sensibilité au PTC et tabac

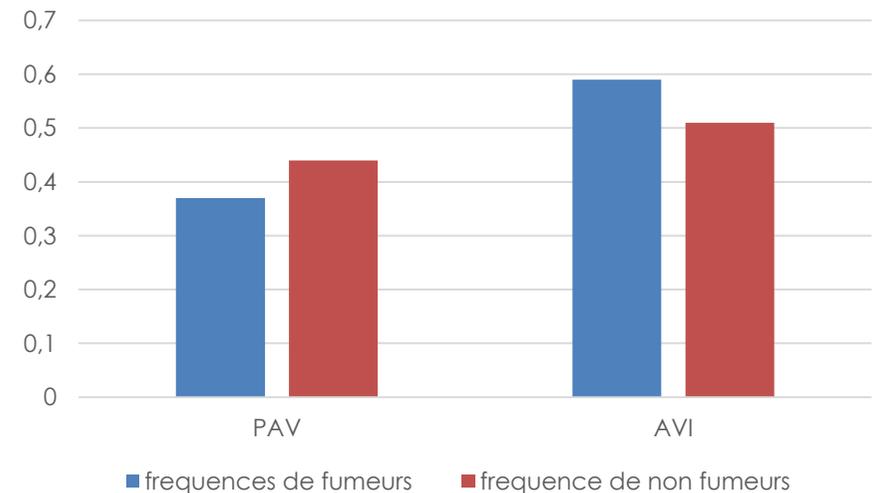
Le tabagisme est un problème de santé majeur dans le monde et une cause majeure de maladies évitables. Les cigarettes et les autres produits du tabac contiennent des composés amers, dont la nicotine, qui contribuent aux propriétés chimio sensorielles du tabac et stimulent de multiples systèmes sensoriels, y compris les voies de transduction du goût. Étant donné que le goût amer a évolué pour identifier les composés potentiellement toxiques et ainsi protéger des aliments nocifs, l'aversion pour ce goût peut prévenir le tabagisme et la dépendance à la nicotine.

L'hypothèse est que les haplotypes TAS2R38 auraient une influence sur le tabagisme et la dépendance à la nicotine, a été démontré car ce gène a une expression plus faible chez les fumeurs que chez les non-fumeurs [15]. (Risso et al., 2016)

Table 2. Distribution of TAS2R38 haplotypes between smokers and non-smokers in the DHS population.

Haplotype	Frequency Smokers	Frequency Non-Smokers	P-value
<b>African Americans:</b>			
PAV	0.47	0.48	0.18
AVI	0.33	0.32	0.61
AAI	0.19	0.19	0.60
AAV	0.01	0.01	0.12
<b>European Americans:</b>			
PAV	0.37	0.44	0.003
AVI	0.59	0.51	0.002
AAV	0.04	0.04	0.620

Distribution des haplotypes TAS2R38 entre les individus fumeurs et non fumeurs dans la population d'américains d'origine européenne



Conclusion : les haplotypes TAS2R38 semblent être des facteurs contribuant à la consommation de tabac d'après cette étude comportementale, les porteurs d'haplotypes PAV et les individus sensibles de PTC étant moins susceptibles de fumer.

Nous concluons que les haplotypes TAS2R38 sont associés au tabagisme chez les Européens d'origine américaine, mais pas chez les populations afro-américaines. Le statut de dégustateur PTC peut jouer un rôle dans la protection des personnes contre le tabagisme dans des populations spécifiques.



## INVESTIGATION 6 > Génotype, phénotype et santé

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 2/4

#### → Sensibilité au PTC et consommation de légumes

Dans une étude, des chercheurs ont testé le concept selon lequel les participants à une intervention diététique visant à promouvoir des habitudes alimentaires saines pour le cœur peuvent réagir différemment en fonction de leur prédisposition génétique à la perception du goût amer par le gène TAS2R38 et des variants alléliques pouvant affecter la signalisation par les récepteurs et, partant, la perception de composés au goût amer trouvés dans de nombreux légumes.

Hypothèse de base :

1. Les participants avec le diplotype TAS2R38 amer sans dégustateur consommeront plus de portions de légumes par jour au départ que les participants avec des diplotypes dégustateurs intermédiaires ou amers.
2. Le diplotype TAS2R38 atténuera l'effet de l'intervention HHL sur la consommation de légumes, de sorte que les participants avec un diplotype dégustateur amer auront une augmentation de la consommation déclarée de légumes inférieure à celle des participants possédant un diplotype amer sans dégustateur après six mois de l'intervention.

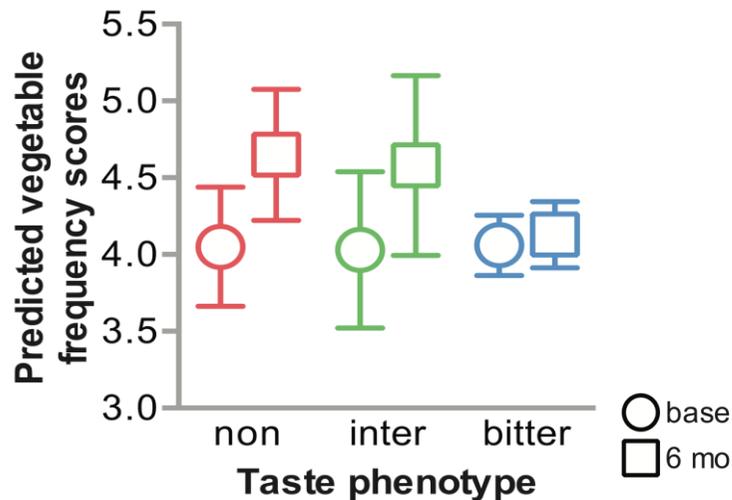


Figure : Consommation de légumes au début et au bout de 6 mois, classée par phénotype de goût amer TAS2R38.

L'apport en légumes prévu est représenté par un graphique au début de l'étude (base) ou au bout de 6 mois (6 mo), groupés par phénotype : non-sensible au goût amers (non), moyennement sensible (inter), ou sensible (bitter).

Les participants ont signalé une fréquence de consommation de légumes similaire, indépendante de leur prédisposition génétique à la sensibilité au goût amer. Pourtant, après intervention, il semble qu'il y a une interaction entre la sensibilité au goût amer et l'augmentation de la consommation de légumes



## INVESTIGATION 6 > **Génotype, phénotype et santé**

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 3/4

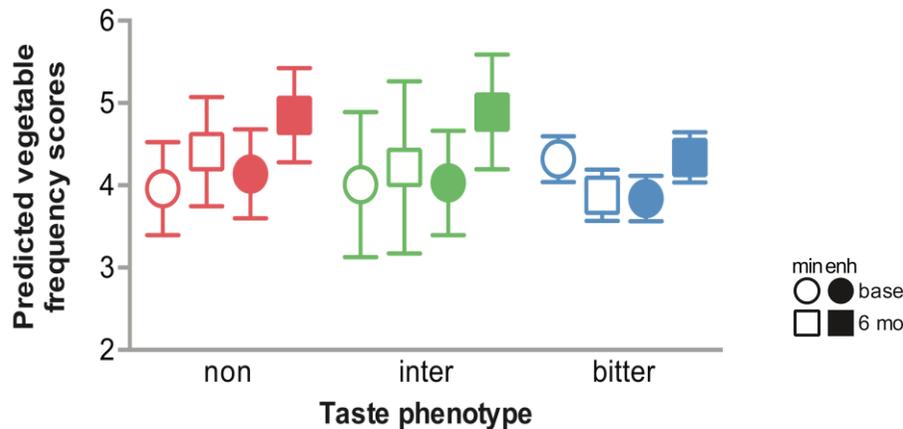


Figure : Consommation de légumes au départ et au bout de 6 mois dans le cadre d'une intervention simple (min) ou approfondie (enh) classée par phénotype de goût amer TAS2R38.

Conclusion : La fréquence de base de consommation de légumes ne correspondait peu aux diplotypes de goût amer. Cependant, six mois après l'intervention, les participants à l'intervention renforcée ont augmenté leur fréquence de consommation de légumes et, au sein de ce groupe d'intervention, les individus non sensible et moyennement sensibles ont enregistré la plus forte augmentation de la consommation de légumes.

En revanche, dans le groupe d'intervention minimale, les participants sensibles ont montré une diminution de la consommation de légumes. Les individus sensibles et moyennement sensibles ont davantage augmenté la consommation de légumes dans les deux interventions que ceux qui perçoivent l'amertume.

Ainsi, les futures applications de la médecine de précision pourraient prendre en compte la variation génétique des gènes de perception du goût amer lors de la conception d'interventions diététiques.

**Cette étude démontre un concept selon lequel les gènes associés à la perception du goût amer peuvent influencer sur la fréquence de l'ingestion de légumes dans le contexte d'une intervention.**

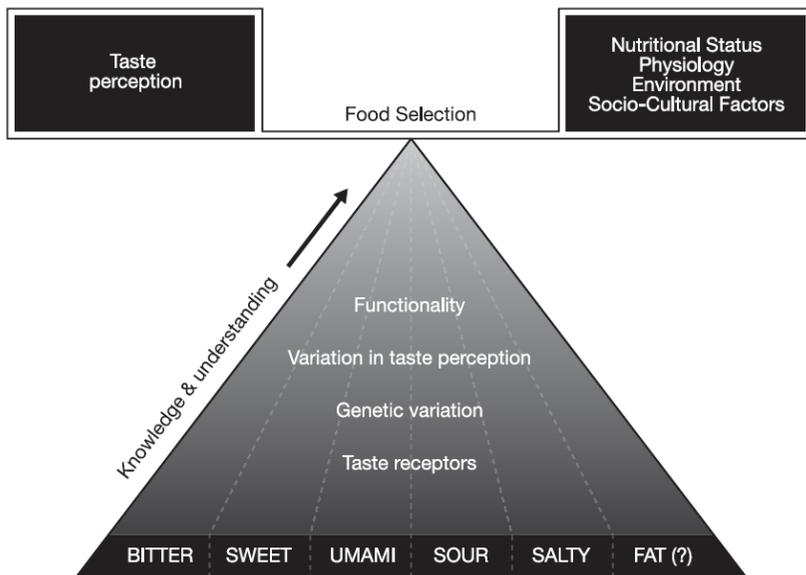
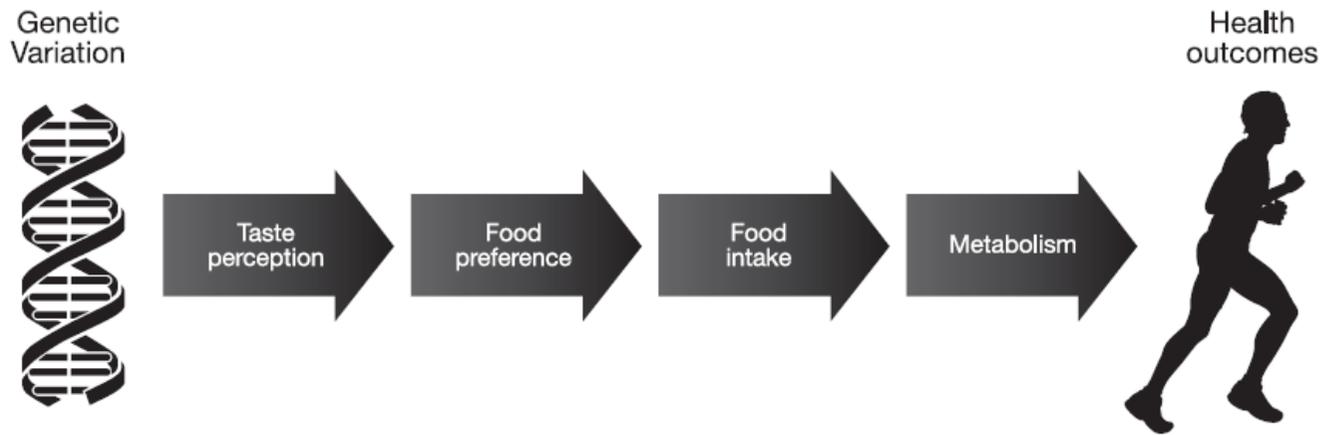
**La variabilité de la fréquence de consommation de légumes selon le phénotype de perception du goût amer des participants pourrait aider à expliquer pourquoi les interventions de changement alimentaire génèrent des résultats mitigés**

**Le goût a une forte influence sur les habitudes alimentaires des individus et doit être pris en compte lors de la conception d'interventions visant à modifier le régime alimentaire et lors de la mise au point de nouvelles approches de médecine de prévention pour les interventions axées sur le mode de vie. (Calancie et al., 2018)**



## INVESTIGATION 6 > Génotype, phénotype et santé

### EXPLOITATION DES RÉSULTATS 4/4



**Les études d'association génique ont établi un lien entre la variation génétique des récepteurs du goût et le risque de maladie. Cela peut être dû aux différences de perception du goût, ce qui peut entraîner des différences de préférences alimentaires et de consommation alimentaire. Cette variation de l'apport alimentaire peut à son tour affecter le métabolisme et les résultats pour la santé (Garcia Bailo et al., 2008)**

# PCR : APPROCHE EXPÉRIMENTALE DE LA GÉNOMIQUE L'EXEMPLE DU GÈNE TAS2R38 ET DE LA SENSIBILITÉ AU PTC

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 6-14
  - ▶ DÉTERMINATION DE LA MUTATION SUR LE GÈNE ET LIAISON GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE

## INVESTIGATION

Découvrir les expériences réalisées avec le même matériel

1. RÉSULTATS ET ANALYSE DES MIGRATIONS – LES ENZYMES DE RESTRICTION 15-22
2. GÉNOTYPE DE PTC ET RELATION GÉNOTYPE/PHÉNOTYPE 23-30
3. SÉLECTION ÉQUILBRÉE ET AVANTAGE DU GÉNOTYPE AVI/AVI 31-35
4. LE GÈNE PTC ET L'ÉVOLUTION DES GRANDS SINGES 36-42
5. VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE ET THÉORIE DE L' « OUT OF AFRICA » - LE PRINCIPE DES MUTATIONS FONDATRICES 43-47
6. GÉNOTYPE, PHÉNOTYPE ET SANTÉ 48-53



## SOURCES

- Abrol R, Tan J, Hui H, Goddard W.A., Pandol S.J., Structural Basis for a Bitter Taste Receptor Activation and its Potential Role in Targeting Diabetes. *Functional Foods in Health and Disease* 2015; 5(3): 117-125
- Calancie, Larissa & Keyserling, Thomas & Taillie, Lindsey Smith & Robasky, Kimberly & Patterson, Cam & S. Ammerman, Alice & Schisler, Jonathan. (2018). TAS2R38 Predisposition to Bitter Taste Associated with Differential Changes in Vegetable Intake in Response to a Community-Based Dietary Intervention. *G3-Genes Genomes Genetics*. 8. g3.300547.2018. 10.1534/g3.118.300547.
- Campbell M, Ranciaro A, Froment A, Hirbo J, Omar S, Bodo J.M, Nyambo T, Lema G, Zinshteyn D, Drayna D, Breslin P, Tishkoff S. 2012. Evolution of Functionally Diverse Alleles Associated with PTC Bitter Taste Sensitivity in Africa. *Mol Biol Evol*. 29(4) : 1141–1153
- Garcia-Bailo, Bibiana & Toguri, Clare & Eny, Karen & El-Sohemy, Ahmed. (2008). Genetic Variation in Taste and Its Influence on Food Selection. *Omics: a journal of integrative biology*. 13. 69-80. 10.1089/omi.2008.0031.
- Lalueza-Fox, C., E. Gigli, E., de la Rasilla, M., Fortea, J., Rosas, A., 2009. Bitter taste perception in Neanderthals through the analysis of the TAS2R38 gene. *Biology Letters* 5 : 809-811.
- S Riso, Davide & Mezzavilla, Massimo & Pagani, Luca & Robino, Antonietta & Morini, Gabriella & Tofanelli, Sergio & Carrai, Maura & Campa, Daniele & Barale, Roberto & Caradonna, Fabio & Gasparini, Paolo & Luiselli, Donata & Wooding, Stephen & Drayna, Dennis. (2016). Global diversity in the TAS2R38 bitter taste receptor: Revisiting a classic evolutionary PROPosal. *Scientific Reports*. 6. 10.1038/srep25506.
- Riso D, Sainz E, Morini G, Tofanelli S, Drayna D. 2018. Taste perception of *Antidesma bunius* fruit and its relationships to bitter taste receptor gene haplotypes. *Chem Senses*.
- Wooding, S., B. Bufe, C. Grassi, M. T. Howard, A. C. Stone et al., 2006 Independent evolution of bitter-taste sensitivity in humans and chimpanzees. *Nature* (440):930-934.
- Wooding S, Gunn H, Ramos P, Thalmann S, Xing C, Meyerhof W. 2010. Genetics and bitter taste responses to goitrin, a plant toxin found in vegetables. *Chem Senses*. 35(8):685–692.



## PROGRAMMES - 1/3



### 2<sup>nd</sup> – Programme 2019

#### Thème 1 : La Terre, la vie et l'organisation du vivant

#### Biodiversité, résultat et étape de l'évolution

Notion	Connaissances	Capacités
Le échelles de la biodiversité	Au sein de chaque espèce, la diversité des individus repose sur la variabilité de l'ADN : c'est la diversité génétique. Différents allèles d'un même gène coexistent dans une même population, ils sont issus de mutations qui se sont produites au cours des générations. Notions fondamentales : biodiversité, échelles de biodiversité, variabilité, mutation, allèle.	- Caractériser la variabilité phénotypique chez une espèce commune animale ou végétale et envisager les causes de cette variabilité.
La biodiversité change au cours du temps.	La biodiversité évolue en permanence. Cette évolution est observable sur de courtes échelles de temps, tant au niveau génétique que spécifique.	Extraire et mettre en relation des informations montrant des exemples actuels de diversifications génétiques ou de spéciations
L'évolution de la biodiversité au cours du temps s'explique par des forces évolutives s'exerçant au niveau des populations		Réfléchir sur les conséquences de l'apparition aléatoire de mutants sur la dynamique d'une population.





## PROGRAMMES - 2/3



1S – Programme de spécialité - 2019		
Thème 1 : La Terre, la vie et l'organisation du vivant		
Transmission, variation et expression du patrimoine génétique		
Notion	Connaissances	Capacités
La réplication de l'ADN		Concevoir et/ou réaliser une réaction de PCR (amplification en chaîne par polymérase) en déterminant la durée de chaque étape du cycle de PCR. Calculer le nombre de copies obtenues après chaque cycle.
Mutation de l'ADN et variabilité génétique	Les mutations sont à l'origine de la diversité des allèles au cours du temps. Selon leur nature elles ont des effets variés sur le phénotype	Recenser et exploiter des informations sur la diversité allélique au sein des populations (par exemple humaine).
L'histoire humaine lue dans son génome	<p>La diversité allélique entre les génomes humains individuels permet de les identifier et, par comparaison, de reconstituer leurs relations de parentés.</p> <p>Grâce aux techniques modernes, on peut connaître les génomes d'êtres humains disparus à partir de restes fossiles. En les comparant aux génomes actuels, on peut ainsi reconstituer les principales étapes de l'histoire humaine récente.</p> <p>Certaines variations génétiques résultent d'une sélection actuelle ou passée.</p> <p>Objectifs : les élèves apprennent que les génomes portent en eux-mêmes les traces de l'histoire de leurs ancêtres. Ces traces s'altèrent avec le temps mais permettent néanmoins de remonter à un grand nombre de générations.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rechercher et exploiter des documents montrant comment a été déterminée la première séquence du génome humain.</li> <li>- Explorer quelques stratégies et outils informatiques de comparaisons de séquences entre génomes individuels.</li> <li>- Rechercher et exploiter des documents sur les génomes de néandertaliens et/ou de dénisoviens.</li> <li>- Rechercher et exploiter des documents montrant l'existence d'allèles néandertaliens dans les génomes humains actuels.</li> </ul>
L'expression du patrimoine génétique	Le phénotype résulte de l'ensemble des produits de l'ADN (protéines et ARN) présents dans la cellule. Il dépend du patrimoine génétique et de son expression. L'activité des gènes de la cellule est régulée sous l'influence de facteurs internes à l'organisme (développement) et externes (réponses aux conditions de l'environnement).	Caractériser à l'aide d'un exemple les différentes échelles d'un phénotype (moléculaire, cellulaire, de l'organisme).





## 1S – Programme de spécialité - 2019

### Thème 3 : Corps humain et santé

#### Variation génétique et santé

Notion	Connaissances	Capacités
Patrimoine génétique et santé	<p>Certains allèles de certains gènes rendent plus probable l'apparition d'une pathologie. Le fond génétique individuel intervient dans la santé de l'individu.</p> <p>De plus, mode de vie et conditions de milieu peuvent interagir dans la probabilité d'apparition d'une pathologie (on peut citer, par exemple, la sensibilité aux rayonnements solaire)</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Appréhender de manière critique les conditions de validité d'affirmations lues ou entendues concernant la responsabilité d'un gène ou d'un facteur de l'environnement dans le développement d'une maladie.</li><li>- Savoir expliciter ses comportements face à un risque de santé pour exercer sa responsabilité individuelle ou collective</li></ul>



## LE SYSTÈME GUSTATIF

Le système gustatif chez les mammifères comprend des cellules réceptrices du goût (TRC) organisées en papilles gustatives dans la langue, de trois types - fongiformes, foliées et vallées. Il existe également un nombre important de papilles au goût non lingual dans le palais, l'oropharynx, le larynx, l'épiglotte et le haut de l'œsophage.

Les extrémités apicales des CRT sont exposées à la cavité buccale et interagissent avec les stimuli gustatifs, généralement des molécules hydrosolubles. Cette interaction génère des signaux qui sont transmis au cerveau via des branches de trois nerfs crâniens, VII (facial), IX (glossopharyngé) et X (vague). Une branche du nerf VII, le nerf de la corde tympanique, envoie des fibres à la partie antérieure de la langue, y compris les papilles fongiformes et éventuellement à la partie antérieure des papilles foliées. L'autre branche du nerf VII, le plus gros nerf pétreux, envoie des fibres aux papilles gustatives du palais mou. Les axones du nerf glossopharyngé innervent les papilles foliées et vallées et, éventuellement, les papilles gustatives du pharynx. Les axones du nerf vague innervent les papilles gustatives de l'épiglotte, du larynx et de l'œsophage supérieur (170). Ces neurones ganglionnaires de premier ordre se terminent dans la partie rostrale du noyau du tractus solitaire dans la médulla. Les projections supérieures du noyau solitaire comprennent le noyau parabrachial, la région gustative thalamique, le cortex gustatif insulaire-opéculaire (primaire), la région gustative corticale caudolatérale orbitofrontale (secondaire), l'amygdale, l'hypothalamus et le ganglion basal (144).

Cette large représentation de l'information gustative dans le cerveau sert probablement à l'intégrer à des signaux interoceptifs (faim, satiété, appétits spécialisés) et extéroceptifs (vision, olfaction, somatosensation) et à générer des réponses comportementales aux stimuli gustatifs. Le traitement central du goût permet de percevoir différents aspects du goût : qualité, intensité, hédonisme (agréable ou désagréable), emplacement et persistance.

La survie de tous les animaux dépend de la consommation de nutriments. Cependant, les sources de nutriments contiennent souvent aussi des substances toxiques. Le goût aide les animaux à décider si un aliment est bénéfique pour eux et doit être consommé ou s'il est dangereux pour eux et doit être rejeté. Probablement, le goût a évolué pour assurer que les animaux choisissent une nourriture adaptée aux besoins de leur corps.

Le consensus actuel est que les sensations gustatives humaines peuvent être divisées en cinq qualités : amer, acide, salé, sucré et umami. Le goût amer, indique souvent la présence de toxines dans les aliments. Les goûts amers et acides peuvent également signaler des aliments gâtés.



## 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

①  
DENATURATION

②  
APPARIEMENT

③  
ELONGATION

①  
DENATURATION

T > + 95°C

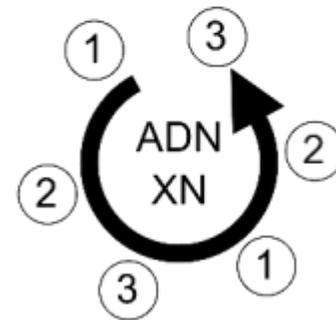
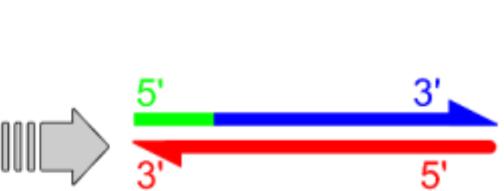
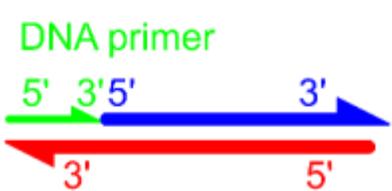
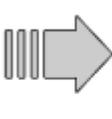
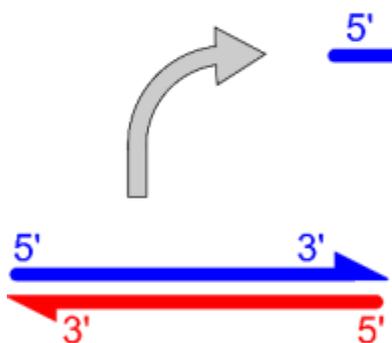
DNA primer  
spécifiques au gène

DNA primer

Brins nouveaux  
complémentaires  
selon la loi des bases

ADN  
X1

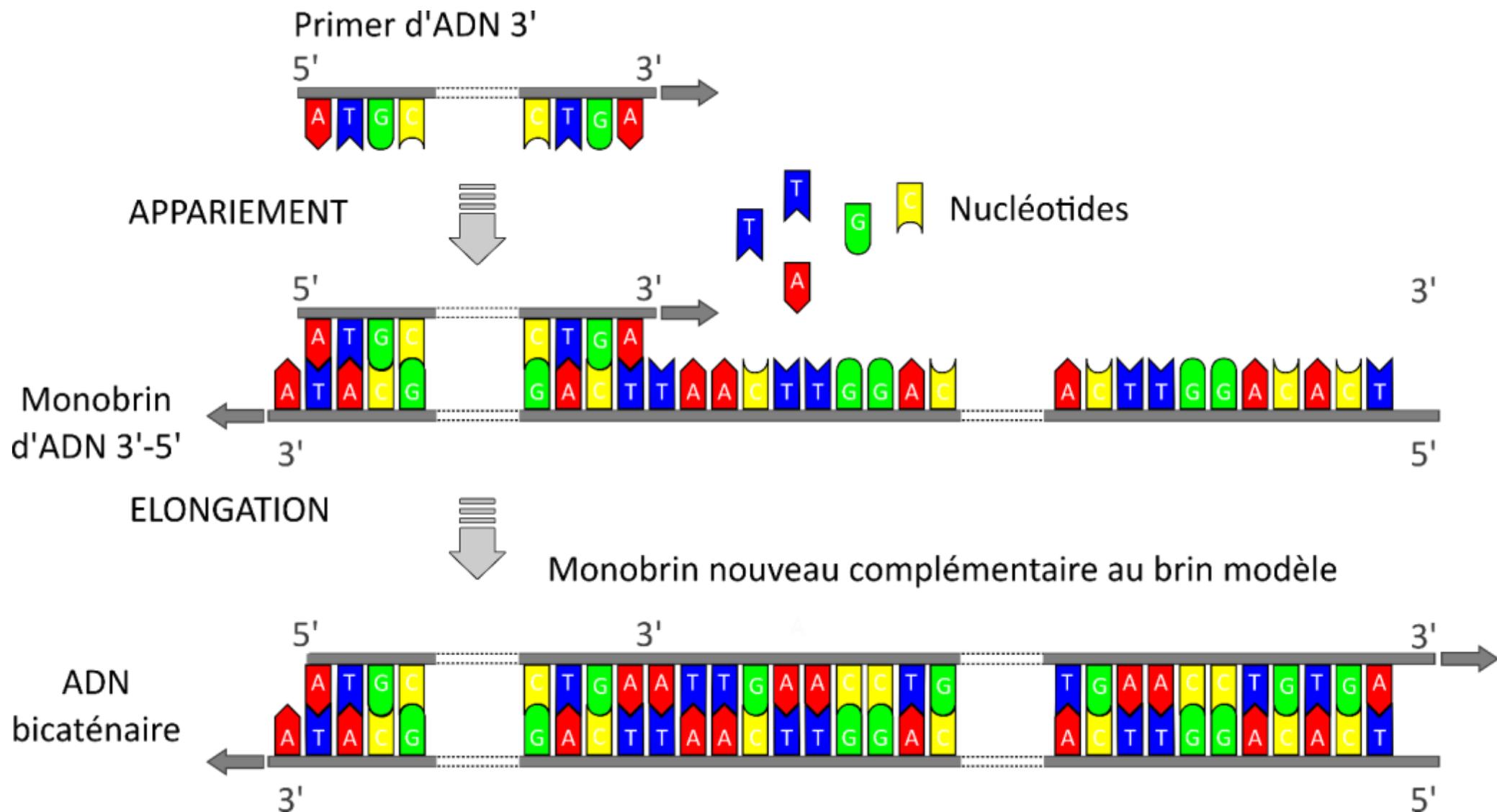
ADN  
X2



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



## PRINCIPE DE LA PCR - 2/2





## PHÉNOTYPE ET DÉTECTION DU GOUT AMER - 1/2



Figure : Biodiversité agricole - Diversité des choux cultivés au Conquet (H. Kempf)

Pratiquement toutes les plantes utilisent des défenses chimiques pour dissuader les herbivores. La famille de plantes Brassicacée, qui comprend des légumes crucifères (figure 2) tels que le chou, les choux de Bruxelles, le chou frisé et les navets, utilise un système composé de 2 composants principaux : les glucosinolates et la myrosinase

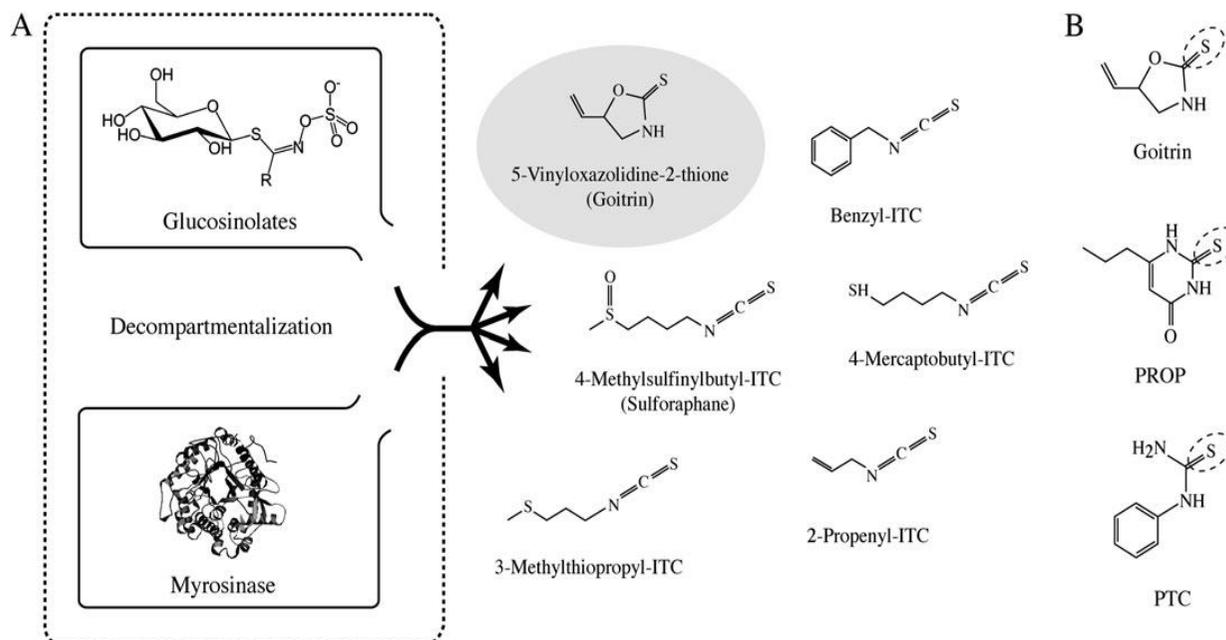


Figure : Réactions du glucosinolate – myrosinase et structures chimiques

(A) Les glucosinolates et la myrosinase sont séparés dans les tissus végétaux, ce qui empêche la réaction. Quand ils se mélangent, ils réagissent en produisant une variété de produits nocifs. Les produits fabriqués dépendent de la gamme de glucosinolates présents dans la plante, qui varie selon les espèces et les variétés. La plupart sont des isothiocyanates, des nitriles et des thiocyanates. La 5-vinyloxazolidine-thione, la goitrine, est ombrée.

(B) Structures chimiques de la goitrine, PROP, et PTC. La partie N-C = S jugée importante pour conférer un goût amer dualiste est encerclée (Wooding et al., 2010).

Dans la plante en bonne santé, ceux-ci sont compartimentés pour empêcher la réaction. Cependant, lorsque les tissus de la plante sont endommagés (par exemple par la mastication), les compartiments se décomposent et les glucosinolates et la myrosinase réagissent, produisant une explosion de produits secondaires nocifs assimilée à une "bombe".

La goitrine (5-vinyloxazolidine-2-thione) est l'un des produits les plus abondants dans les réactions glucosinolate – myrosinase. Il résulte de l'hydrolyse du 2-hydroxy-3-butényl glucosinolate (progoitrine). La goitrine est un puissant inhibiteur de la peroxydase thyroïdienne, qui joue un rôle central dans l'organification de l'iode (Gaitan, 1990).



## PHÉNOTYPE ET DÉTECTION DU GOUT AMER - 2/2

Ainsi, la consommation de goitrine interfère avec la synthèse de l'hormone thyroïdienne (TH). Les quantités de goitrine présentes dans les plantes alimentaires ne sont généralement pas suffisantes pour provoquer un dysfonctionnement de la thyroïde chez des populations en bonne santé. Cependant, l'exposition est un facteur de risque de goitre et de pathologies associées dans les populations carencées en iode, où la production de TH est déjà altérée.

La structure de la goitrine est semblable à celle des composés synthétiques que sont le 6-propyl-2-thiouracile (PROP) et le phénylthiocarbamide (PTC)

→ **L'objectif de ces travaux pratiques est d'étudier le lien entre le génotype et les divers phénotypes dans la sensibilité au gout amer**

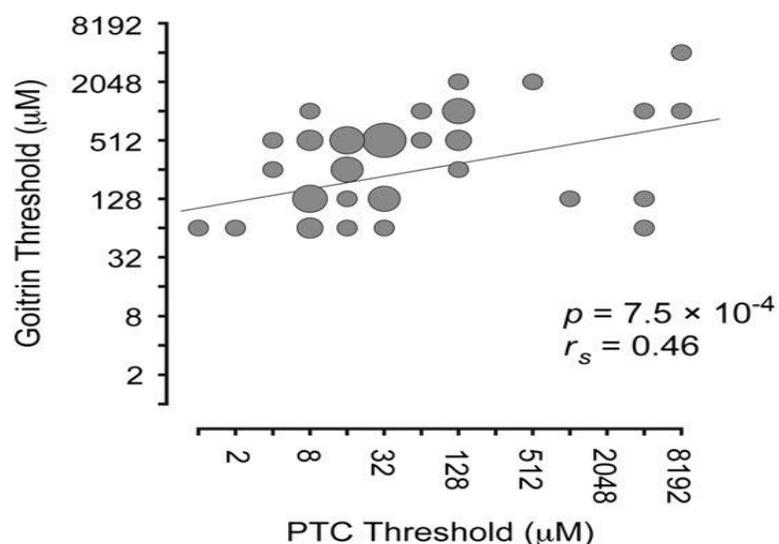


Figure : Graphique correspondant à la corrélation entre les seuils de détection de la goitrine et du PTC.

Le seuil correspond à la concentration minimale à laquelle un composé particulier peut être perçu.

Ces seuils sont obtenus en testant l'aptitude des sujets à distinguer les solutions de contrôle des solutions d'un goût, qui sont présentées à des concentrations croissantes jusqu'à ce qu'elles soient correctement identifiées (Wooding et al., 2010) L'expérience mise en œuvre sur un groupe de 50 individus, la taille des cercle est proportionnelle au nombre d'occurrences

Ce document montre une corrélation entre la perception de la goitrine et du PTC, molécules chimiquement semblables (cyclique et souffrées) Le PTC peut donc être utilisé comme substitut à l'analyse de la perception de la goitrine (sans l'effet toxique) et ainsi étudier les liens entre le génotype et les différents phénotypes (moléculaires, cellulaires et macroscopiques)

Alors que certaines personnes les trouvent intensément amères, d'autres les trouvent presque insipides. Un simple test sur papier permet de déterminer les individus dit gouteur de PTC et les individus « non gouteurs » de PTC.

Une grande partie de la variation de perception de PTC est due à des mutations du gène TAS2R38 localisé sur le chromosome 7q, qui code un récepteur de goût amer.

Les réponses gustatives aux légumes contenant de la goitrine varient à la suite de mutations du gène TAS2R38 et la capacité à percevoir PTC (Wooding et al. 2010)



## 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)

3 X



Vérifier le trait de jauge



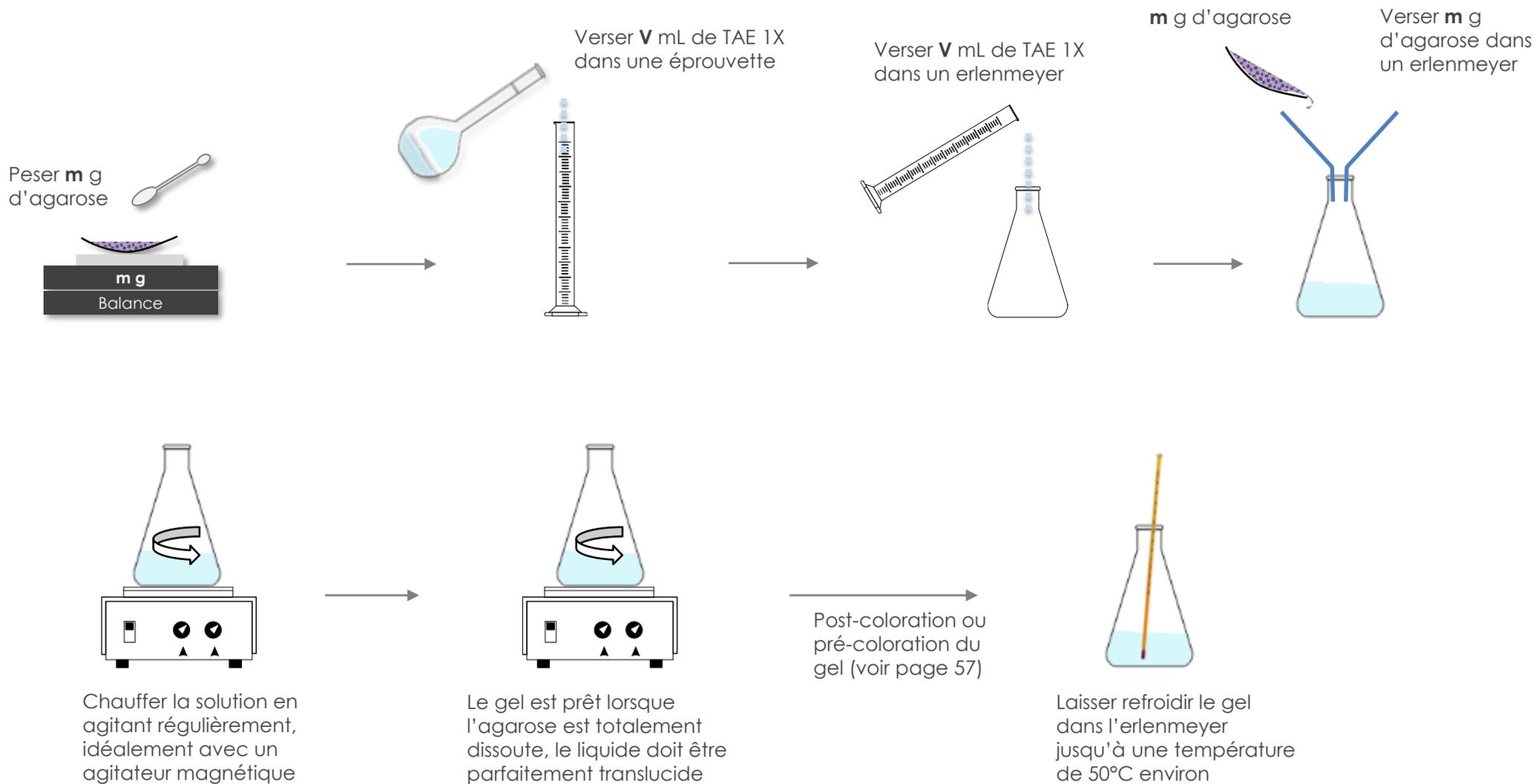


## FABRICATION D'UN GEL D'AGAROSE - 2/3

### > 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) ►  $m = V \times X / 100$

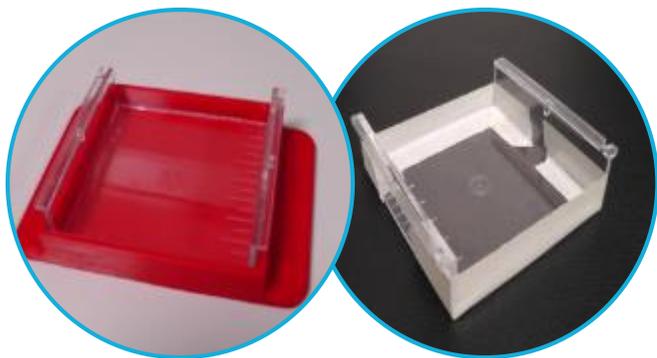




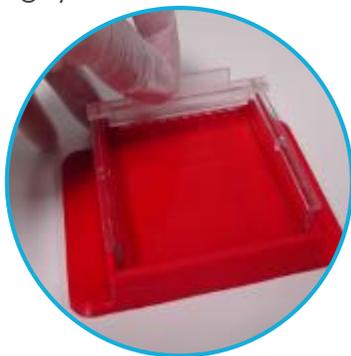
## FABRICATION D'UN GEL D'AGAROSE - 3/3

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

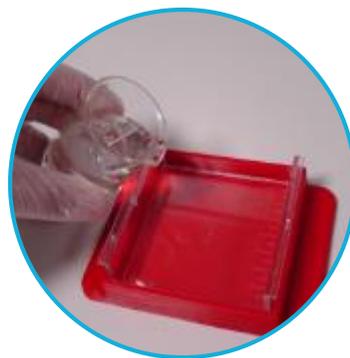
Positionner le support du gel dans le moule (ou préparer le support du gel en bouchant ses extrémités à l'aide de ruban adhésif pour peintre). Posez-le sur une surface parfaitement horizontale.



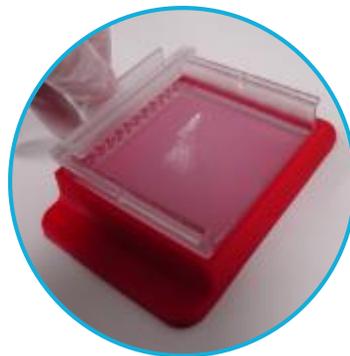
Poser le peigne à sa place, pour former les puits lors du refroidissement du gel. Laisser le gel refroidir (15 – 20 min), en le mettant au réfrigérateur si nécessaire (ne transporter le support avec le gel que si celui-ci est déjà bien figé).



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



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



#### **Astuce**

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

#### **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).

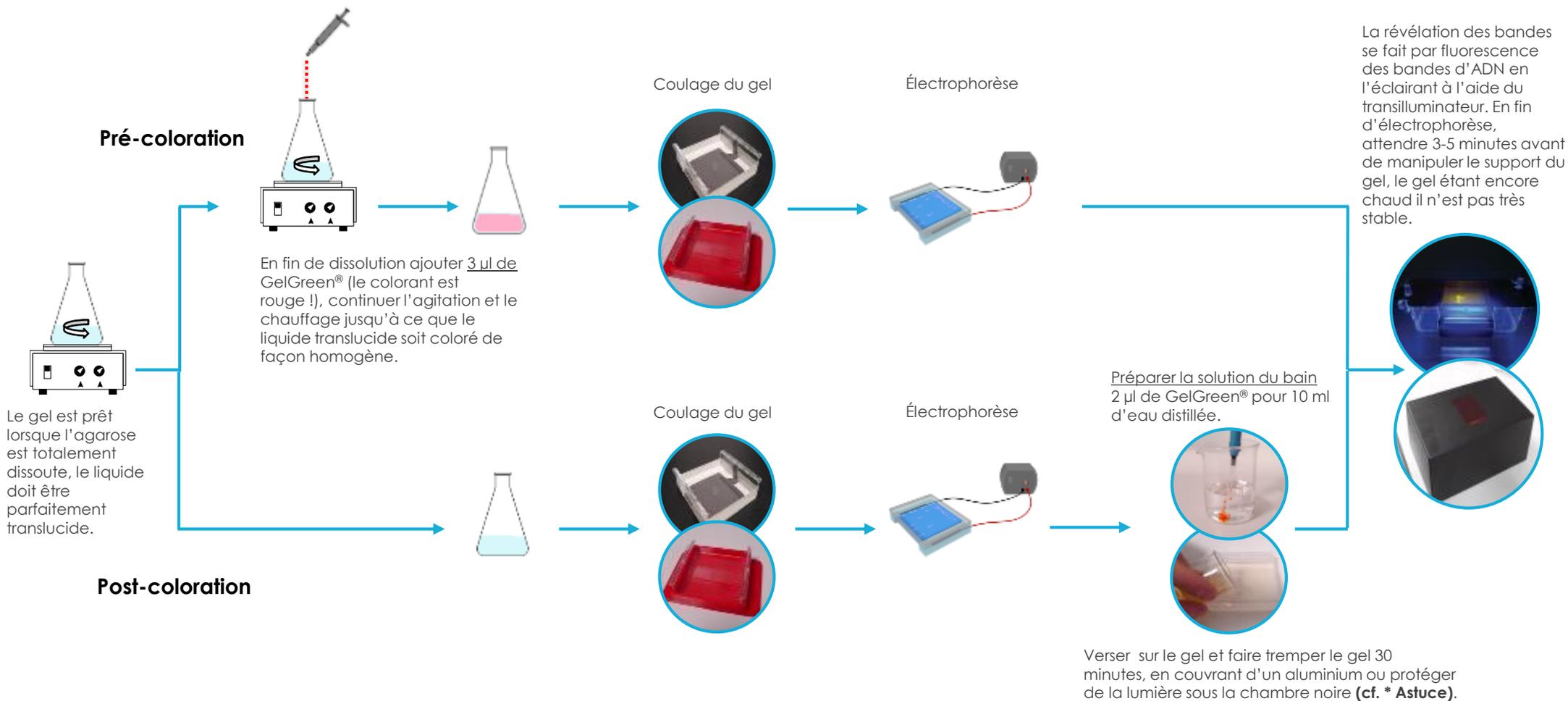
Le gel peut être utilisé immédiatement ou conservé quelques jours au réfrigérateur dans du tampon de migration TAE 1X (une fois ôté du support).



## 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 ; Lot de 96	724 108	1
• Micropipette 0,5 – 10 µL	703 814	1
• Cônes 0,1 – 10 µL ; Lot de 96	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 591 031 + 281 120



> Thermocycleur 591 106

