

# Génétique

Electrophorèse d'ADN

**Réf :117 277**

## **Kit Syndrome de Frasier et différenciation sexuelle**

Français – p 1

Version : 4209

## Sommaire

1 Syndrome de Frasier	2
2 Réactifs et matériels	3
3 Mode opératoire	4
4 Résultats et interprétation	5
5 Assistance technique	6

## Annexes

<b>Dossier scientifique et pédagogique</b>	<b>7</b>
« Différenciation sexuelle et syndrome de Frasier une étude génétique par électrophorèse d'ADN »	

## **1 Le syndrome de Frasier**

### **1.1 Intérêt pédagogique**

Le syndrome de Frasier a été décrit pour la première fois en 1964\*, cette description initiale a permis d'identifier et de caractériser ce syndrome rare comme une entité clinique distincte.

Cette activité montre que le sexe génétique (XX/XY) ne détermine pas toujours le sexe phénotypique. Cette mutation illustre la complexité de la différenciation sexuelle, en montrant les liens étroits entre le développement des gonades et des reins. Au niveau moléculaire, d'épissage alternatif du gène WT1 apporte un éclairage complémentaire à la compréhension des mécanismes de la différenciation et démontre que le gène SRY n'est pas seul à être impliqué.

\* Frasier, SD; Bashore, SD; Bashore, RA; Mosier, HD (May 1964). "Gonadoblastoma associated with pure gonadal dysgenesis in monozygous twins". J. Pediatr. 64 (5): 740–5.

### **1.2 Caractéristiques**

Le syndrome de Frasier est une maladie extrêmement rare. Bien que sa prévalence exacte ne soit pas connue avec précision, les données disponibles indiquent moins de 150 cas ont été rapportés dans la littérature médicale à ce jour.

La prévalence de cette maladie n'est pas connue, ce qui rend difficile l'estimation précise du nombre de personnes atteintes à l'échelle mondiale. De plus, certains cas peuvent ne pas être diagnostiqués ou rapportés, ce qui complique davantage l'évaluation de sa prévalence réelle.

Le syndrome de Frasier est une maladie génétique rare qui affecte principalement le développement des organes génitaux et des reins.

La maladie rénale, qui se manifeste par l'apparition d'une protéinurie avec syndrome néphrotique, évolue sans rémission vers l'insuffisance rénale terminale et des anomalies génitales qui ne sont présentes que chez les patients XY, avec typiquement des organes génitaux externes de type féminin, normaux, et des gonades indifférenciées.

Chez les sujets XX, il n'y a pas d'anomalies génitales, elles présentent cependant des pathologies rénales atteintes de

Les principaux symptômes du syndrome sont

- Néphropathie glomérulaire progressive (maladie rénale)
- Dysgénésie gonadique (développement anormal des gonades des sujets XY)
- Risque élevé de tumeur de Wilms (cancer du rein infantile)
- Un risque élevé de gonadoblastome (tumeur de petites taille benigne)

### **1.1 Principe du TP**

L'activité propose de réaliser un diagnostic, par comparaison entre deux individus sains XX et XY et un troisième individu XY atteint du syndrome de Frasier.

Le test génétique est en deux étapes, en premier une amplification PCR de type PCR ARMS et en second une électrophorèse des amplicons obtenus afin d'identifier les mutations présentes dans les gènes étudiés.

Les élèves font effectuer cette dernière étape en classe grâce aux fragments d'ADN prêt à déposer fournis.

Dans ce test, les amplifications PCR ciblent 2 gènes impliqués dans la différenciation sexuelle les gènes SRY et WT1.

Le gène **SRY (Sex-determining Region Y)** est le principal déterminant du développement du sexe masculin chez les mammifères. Ce gène situé sur le chromosome Y initie la cascade de signalisation qui conduit à la différenciation des testicules et au développement des caractères sexuels mâles.

Le gène **WT1 (pour Wilms Tumor 1)** est localisé dans l'intron 9 du gène sur le bras court du chromosome 11. Il a été initialement découvert en raison de son implication dans des cancers du rein chez l'enfant.

→ Dossier scientifique et pédagogique complet en annexe (p7)

### ❖ Le principe de l'électrophorèse d'ADN en gel

En milieu légèrement basique, l'ADN se comporte comme une chaîne polyanionique (groupements phosphates ionisés). Placés dans un gel d'agarose et soumis à un champ électrique, des fragments d'ADN de tailles différentes migrent plus ou moins rapidement suivant leur masse moléculaire. La charge relative des fragments étant la même, c'est essentiellement l'effet de tamisage exercé par le gel qui influe sur la migration. La vitesse de déplacement diminue donc avec la taille des fragments, celle-ci étant exprimée en nombre de paires de bases (pb) ou en kb (1 kb = 1000 pb).

## 2 Réactifs et matériels

### 2.1 Les solutions d'ADN

Les solutions ADN de ce kit, correspondent aux résultats (fictifs) de l'amplification par PCR de l'ADN à tester. **Les solutions d'ADN sont calibrées et ne nécessitent aucune préparation.**

**Format 40 élèves (20 binômes) :**

**25 tests complets soit 75 dépôts à analyser**

1 test correspond à déterminer lequel des deux gènes, *SrY* ou *WT1*, est responsable du syndrome de Frasier :

- 1 dépôt témoin XX
- 1 dépôt témoin XY
- 1 dépôt test patient Frasier

**+ 10 dépôts Echelle de poids moléculaire (jusqu'à 10 gels)**

1 dépôt échelle de poids moléculaire par gel électrophorèse

Durée globale de la séance 30 à 40 minutes

Dont migration électrophorèse : 20 minutes

### 2.2 Matériels et produits nécessaires

#### Composition du kit :

- |                               |        |
|-------------------------------|--------|
| • Tube 1 témoin XX            | 220 µL |
| • Tube 2 témoin XY            | 220 µL |
| • Tube 3 test patient Frasier | 220 µL |



- |                      |       |
|----------------------|-------|
| • Marqueur de taille | 90 µL |
|----------------------|-------|

#### Consommables nécessaires (non fournis)

Agarose

Tampon TAE

Colorant GelGreen

Réf. 107 646 : cette référence regroupe tous les consommables indispensables pour réaliser 10 mini gels d'agarose pour système compact avec fluorescence (Agarose 4 g / TAE 10 x 200 mL / colorant GelGreen 30 µl)

Matériels complémentaires :

- Cuve à électrophorèse ADN
- Micropipettes 2-20 µl

### 3 Mode opératoire

#### 3.1 Préparation des solutions

❖ **Préparation du tampon TAE 1X pour 1L :**

- Le volume de tampon nécessaire par cuve est d'environ 150 mL (tampon migration).

Verser le contenu du flacon de tampon TAE 10X (Tris Acétate EDTA) dans 900 ml d'eau distillée, bien mélanger.

*\* En fonction du nombre de gel et du nombre de système électrophorèse utilisés au cours du TP, le volume de TAE 1 X à préparer doit être adapté.*



Dispositif électrophorèse  
Tout-en-un

❖ **Préparation et coulage d'un gel d'agarose à 1,5 % :**

- Verser 15 mL de tampon TAE 1X dans un erlenmeyer de 50 mL.
- Peser 0,22 g d'agarose dans une capsule et le verser en pluie fine dans le tampon TAE.
- Mettre l'erlenmeyer contenant le TAE et l'agarose au micro-onde pendant 20 à 30 secondes – stopper à l'apparition de l'ébullition - (ou sur un agitateur magnétique chauffant avec un turbulent jusqu'à dissolution complète).
- S'assurer que la solution est parfaitement translucide
- Ajouter 2 µl de colorant GelGreen à l'aide de la micropipette, bien agiter l'erlenmeyer
- Laisser l'erlenmeyer refroidir quelques instants sur la paillasse 2 à 3 min, puis verser dans le moule équipé du peigne à petites dents.

[La manipulation est également réalisable avec des capsules de gélose prédosées à 2 %]

❖ **Préparation de l'ADN**

- Les solutions sont directement prêtes à l'emploi, il convient à l'enseignant de faire des aliquots de chaque échantillon avant la séance.
- Avant la séance, décongeler les tubes Eppendorf.

Idéalement décongeler les contenants environ 5 minutes sous l'eau chaude, puis les plonger dans l'eau glacée pendant deux minutes. Cela permet, par chocs thermiques, de séparer les fragments qui auraient pu s'associer à nouveau et d'autre part d'éviter la nouvelle formation de bouts collés.

Le produit supporte aisément une succession de plusieurs alternances de congélation-décongélation sans perdre ses propriétés. Mais il faut réduire au minimum la durée de décongélation pendant laquelle une dégradation occasionnelle par des micro-organismes est possible.

### 3.2 Dépôt de l'ADN

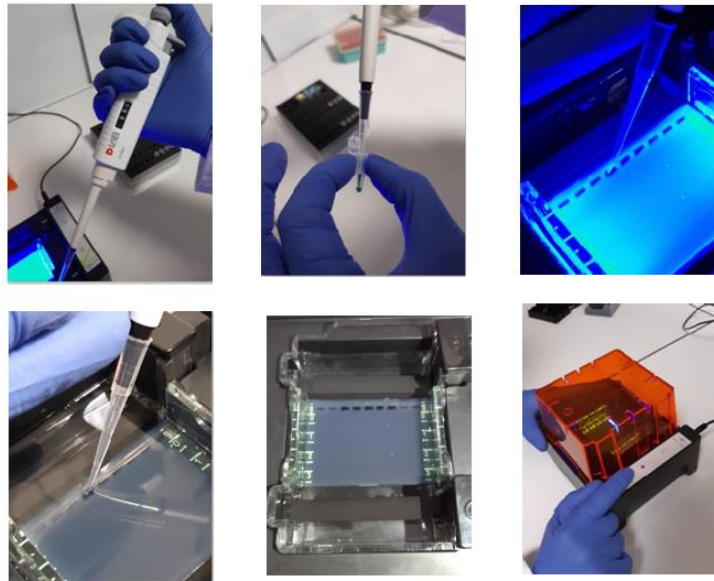
A l'aide d'une micropipette, déposer :

- 8  $\mu$ L d'ADN
- 8  $\mu$ L pour l'échelle de poids moléculaire

phorEasy



8  $\mu$ L par puits

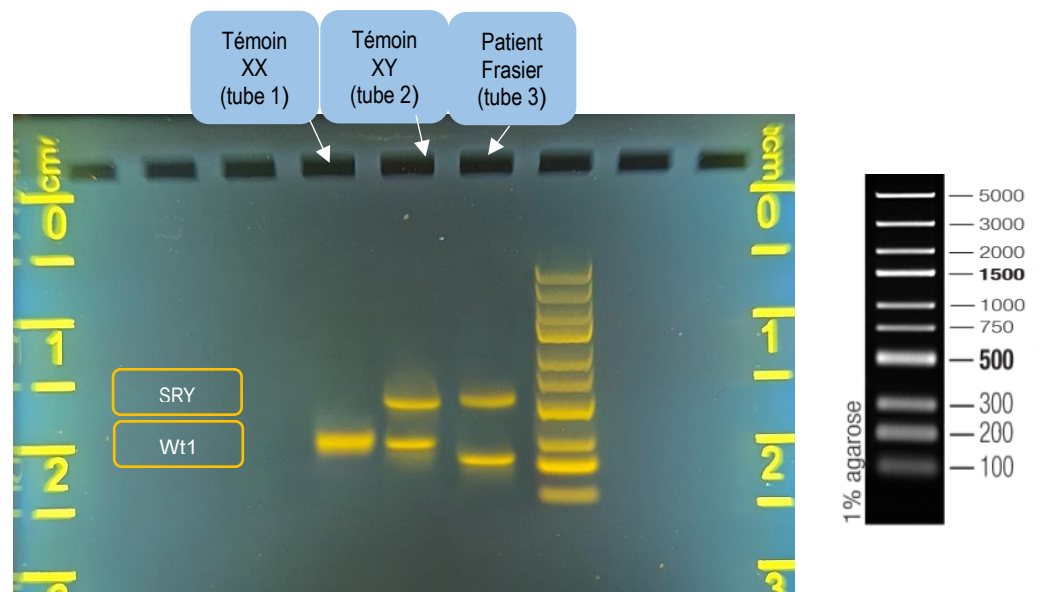


Durée de migration 15 à 20 minutes pour les systèmes compacts  
 Révélation → Transilluminateur intégré = révélation en temps réel

## 4 Résultats et exploitations

Rappel : L'activité propose de réaliser un diagnostic, par comparaison entre deux individus sains XX et XY et un troisième individu XY atteint du syndrome de Frasier.

Résultats attendus : Le fragment SRY amplifié aura une taille de 530 pb et le fragment WT1, une taille de 322 pb.



Patients	Gènes cibles	Taille Fragments
Témoin XX	SRY Wt1	aucun 322
Témoin XY	SRY Wt1	530 322
Patient syndrome Frasier	SRY Wt1	530 265

On constate que chez le patient atteint du syndrome de Frasier, qui possède un génotype mâle (XY) mais qui possède un appareil génital féminin, le gène WT1 migre différemment du Wt1 du témoin.

SRY n'est pas modifié, il n'est pas impliqué dans ce dysfonctionnement de mise en place des organes uro-génitaux. Cela montre que SRY n'est pas le seul responsable du développement des organes sexuels (gonades), Wt1 intervient également dans ces processus

## **5 Assistance Technique**

Pour tous réglages, et renseignements contacter le **Support Technique** au  
**09 69 32 02 10 (prix d'un appel local, non surtaxé).**

**JEULIN – S.A.V.**  
468 rue Jacques Monod  
CS 21900  
27019 EVREUX CEDEX France



**ANNEXES**  
**Dossier scientifique et pédagogique**

**DIFFERENCIATION SEXUELLE ET SYNDROME DE FRASIER**

**UNE ETUDE GENETIQUE PAR ELECTROPHORESE D'ADN**

**EN CLASSE DE SECONDE**  
**OU**  
**EN PREMIERE SPECIALITE SVT**



## LE CONTEXTE SCIENTIFIQUE

La mise en place de l'appareil génital se réalise au cours du développement embryonnaire sous le contrôle de plusieurs gènes et hormones.

Chez les Mammifères, alors que la cellule œuf possède déjà un sexe identifiable par la présence des chromosomes sexuels X et Y, l'appareil génital embryonnaire se présente d'abord sous une forme indifférenciée, sans aucun caractère mâle ou femelle décelable.

Chez l'humain cet état indifférencié perdure jusqu'à la 7ème semaine de développement. A partir de la 8ème semaine, l'appareil génital débute sa différenciation par une évolution des gonades en testicules ou ovaires.

Le gène SRY (pour Sex determining Region of Y chromosome), découvert en 1985 et présent uniquement chez les individus de sexe masculin, a longtemps été considéré comme le seul gène intervenant dans la différenciation sexuelle des gonades. En effet, chez les individus XY, des mutations du gène SRY ou des inhibitions de son expression, conduisent à la différenciation des gonades en ovaires. De ce fait, on a longtemps pensé l'ovaire comme « un mode par défaut », avec comme idée que, chez les individus XX, l'absence de gène SRY conduit à une différenciation des gonades en ovaires.

On sait aujourd'hui que cette explication est incorrecte.

Le gène WT1 (pour Wilms Tumor 1) est localisé sur le bras court du chromosome 11. Ce gène a été initialement découvert en raison de son implication, lorsqu'il est altéré, dans les tumeurs de Wilms (les cancers du rein les plus fréquents chez l'enfant), mais la découverte de son rôle dans la différenciation de l'ovaire est très récente. Les travaux publiés en 2023 par Elodie Grégoire, chercheuse à l'Institut de biologie Valrose à Nice, ont permis de mettre en évidence le rôle de WT1 dans la formation de l'ovaire.

Grâce à un épissage alternatif, WT1 permet la synthèse de deux protéines légèrement différentes ; la protéine +KTS et la protéine -KTS. Ces deux protéines isoformes (qui sont issues d'un même gène) se distinguent par la présence (pour +KTS), ou par l'absence (pour -KTS) de trois acides aminés (une lysine symbolisée par la lettre K, une thréonine symbolisée par T et une sérine S).

Certaines mutations de WT1 entraîne une surexpression de la protéine -KTS et un déficit en protéine +KTS. L'équipe d'Elodie Grégoire a montré que des souris présentant de telles mutations développent des ovaires quel que soit leur sexe génétique. Par ailleurs, les chercheurs ont constaté que des animaux surexprimant -KTS tout en ayant un taux normal de +KTS développent également tous des ovaires. Cette observation confirme -au moins chez la souris- que la surexpression de -KTS, indépendamment du taux de +KTS, déclenche le développement ovarien, que l'individu soit XX ou XY. Enfin, les chercheurs ont pu montrer que l'absence de -KTS empêche la différenciation de l'ovaire. Les cellules gonadiques restent bloquées à un stade de cellules indifférenciées.

*« Nos différentes expériences montrent que -KTS est exprimé chez les animaux des deux sexes. Toutefois, SRY agit plus tôt, de sorte que le développement des testicules est assuré chez les individus XY. En revanche, si l'expression de SRY est altérée ou retardée, ou si -KTS est surexprimée prématurément, la différenciation en cellules ovariennes est accélérée et entraîne la formation systématique d'organes génitaux féminins », décrit Elodie Grégoire.*

## LA SITUATION PEDAGOGIQUE

Le syndrome de Frasier se caractérise par une altération de la fonction rénale à laquelle s'ajoute, chez les individus XY, des voies génitales femelles et un développement des gonades en ovaires (figures 1 et 2).

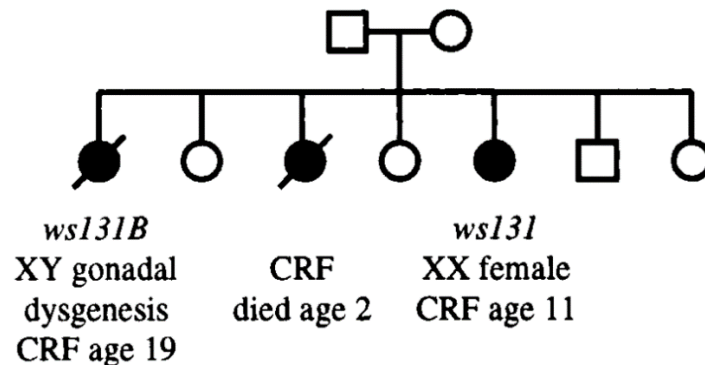


Figure 1 : Arbre généalogique d'une famille dont certains membres sont atteints du syndrome de Frasier.

Trois membres de la famille sont touchés. Les individus II-1 et II-5 ont développé une insuffisance rénale complète (CRF) respectivement à 19 et 11 ans. L'individu II-1 possède un appareil génital féminin mais son caryotype a révélé qu'il est porteur des chromosomes sexuels X et Y.

Pour le patient II-3 qui est mort à l'âge de 2 ans, aucun caryotype n'est disponible.

Source : Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. Barbara Klamt, Ania Koziell, Francis Poulat, Peter Wieacker, Peter Scambler, Philippe Berta and Manfred Gessler, *Human Molecular Genetics*, 1998

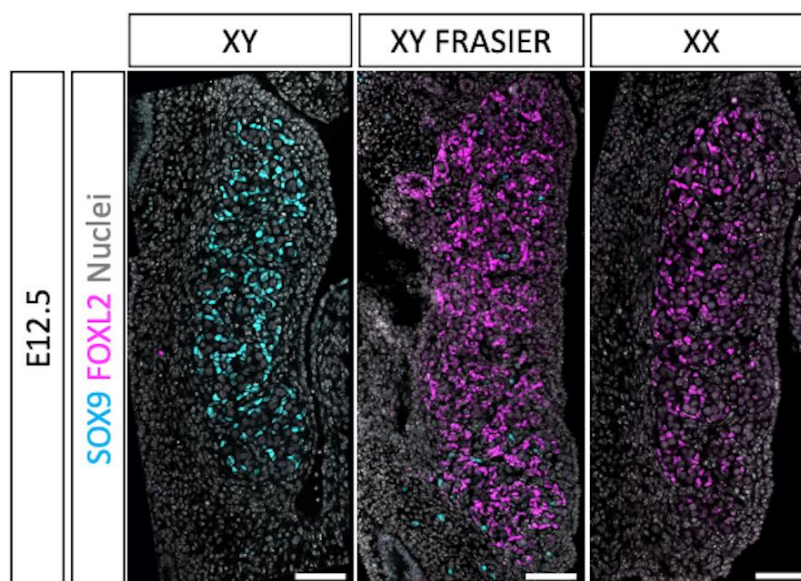


Figure 2 : Expression du marqueur de cellules des testicules (en bleu) et du marqueur de cellules ovariennes (en magenta) montrant l'inversion de sexe dans une gonade XY d'un modèle animal du syndrome de Frasier.

Crédit photo : Marie-Christine Chaboissier.

Alors que le gène *SRY* est identifié depuis 30 ans comme le responsable de la différenciation des gonades en testicules, des travaux datant de 2023 ont montré que le gène *WT1*, porté par le chromosome 11, est nécessaire à la différenciation des gonades en ovaires.

L'objectif de l'activité est de déterminer lequel des deux gènes, *SRY* ou *WT1*, est responsable du syndrome de Frasier.

Ce TP se présente sous la forme d'un diagnostic établi par comparaison entre des individus sains XX et XY et un individu XY atteint du syndrome de Frasier. Le test génétique est basé sur le principe d'une PCR ARMS permettant d'identifier par électrophorèse les mutations présentes dans les gènes étudiés. Les résultats en classe sont obtenus en 20 minutes.

L'activité permet d'introduire, dès la classe de Seconde, la réalisation d'une électrophorèse d'ADN et révèle lequel des deux gènes, *SrY* ou *WT1*, est impliqué dans le syndrome de Frasier.

La taille des amplicons pour les gènes sauvages et mutés (figure 3) permet de repérer dans le résultat de l'électrophorèse (figure 4) que chez les individus XY atteints d'un syndrome de Frasier, c'est le gène *WT1* qui est muté alors que le gène *SrY* ne présente aucune mutation. Ce résultat met en évidence que *SrY* n'est pas le seul gène impliqué dans la différenciation des gonades et que *WT1* intervient également dans cette différenciation. Le rôle exact de *WT1* pourra être précisé aux élèves à partir des informations fournies dans la rubrique « LE CONTEXTE SCIENTIFIQUE » ou dans la rubrique « POUR ALLER PLUS LOIN », ci-après.

		Taille de l'amplicon en paires de bases
Gène <i>SrY</i>	Séquence non mutée	530
	Séquence mutée	516
Gène <i>WT1</i>	Séquence non mutée	322
	Séquence mutée	265

Figure 3 : taille des amplicons pour les gènes *SrY* et *WT1*, sauvages ou mutés



Figure 4 : résultat d'une électrophorèse d'ADN après amplification par PCR des gènes *SrY* et *WT1* chez différents individus. XX et XY : individus sains féminins et masculins. XYfrasier : individu de phénotype féminin, atteint du syndrome de Frasier et porteur des chromosomes sexuels X et Y.

### POUR ALLER PLUS LOIN...

Le gène *WT1* comporte 10 exons et 9 introns (figure 5).

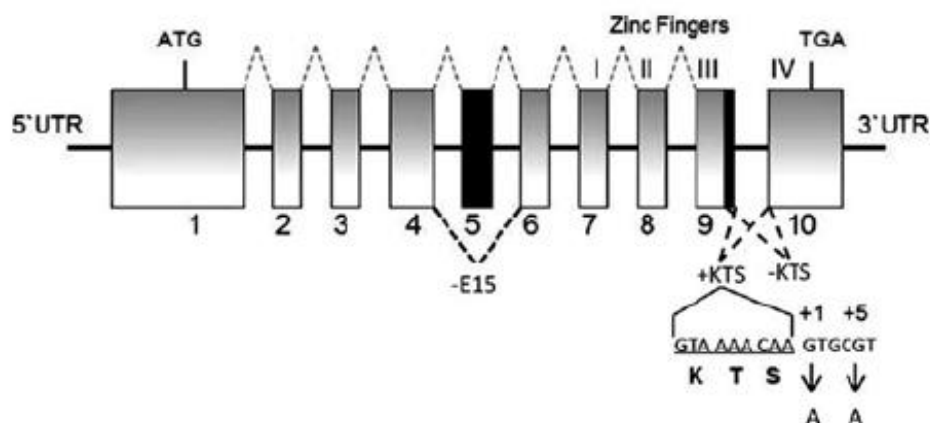


Figure 5 : Représentation des exons et introns *WT1* montrant l'épissage de 1 à 9 pour former l'isoforme *WT1* avec l'exon 5 (lignes grises en pointillés au-dessus des cases) et trois événements d'épissage alternatifs (lignes noires en pointillés sous les cases) conduisant à des isoformes sans exon 5 (-E15), et +KTS ou -KTS. La séquence nucléotidique codant pour +KTS est notée. Les numéros d'exon sont présentés sous les encadrés. ATG et TGA correspondent respectivement aux codons de début et d'arrêt de la traduction.

Source : *Frasier syndrome: four new cases with unusual presentations*, Mara Sanches Guaragna & al. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, novembre 2012

Grâce à un épissage alternatif, *WT1* permet la synthèse de deux protéines isoformes +KTS et -KTS. Des études ont montré que chez les patients atteints d'un syndrome de Frasier, les mutations se situent au niveau de l'intron 9. Aucune protéine mutante n'est produite mais ces mutations perturbent l'épissage alternatif et modifient le rapport isoforme +/-KTS du gène *WT1*. L'analyse par PCR de l'expression du gène *WT1* a été réalisée sur l'ARNm du tissu gonadique d'un patient atteint du syndrome de Frasier et d'un fragment de rein normal humain (figure 6). L'échantillon témoin (NK) montre un rapport d'ARN+KTS/ARN-KTS de 2,4 alors qu'il n'est que d'environ 0,5 dans les gonades d'un patient atteint du syndrome de Frasier (JA et JA#).

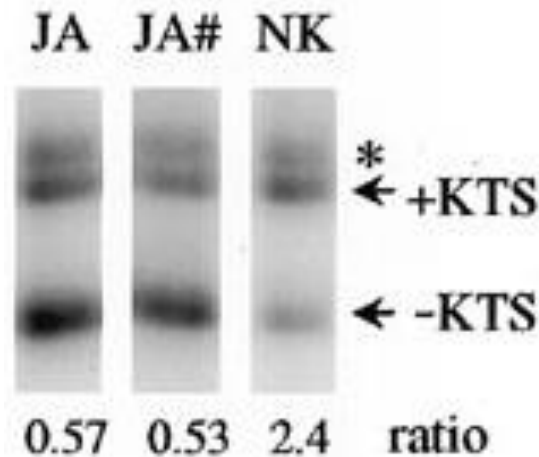


Figure 6 : analyse par PCR et électrophorèse d'ARN issu de l'expression du gène *WT1*.

JA et JA# : tissu gonadique d'un patient atteint du syndrome de Frasier. NK : tissu d'un rein normal. (\* la bande au-dessus de l'isoforme +KTS est un artefact lié à la technique de PCR)

Source : *Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms.* Barbara Klamt, Ania Koziell, Francis Poulat, Peter Wieacker, Peter Scambler, Philippe Berta and Manfred Gessler, *Human Molecular Genetics*, 1998

Chez l'ensemble des patients atteints du syndrome de Frasier étudiés, on retrouve les mutations au niveau de l'intron 9. Chez la majorité d'entre eux, ces mutations touchent les nucléotides 4 ou 5 de l'intron 9. Ces mutations sont les substitutions +4 C → T et +5 G → A. Quelques patients avec des mutations au niveau des nucléotides 2 ou 6 sont également connus, mais dans tous les cas ces mutations ont les mêmes conséquences phénotypiques.

## **SOURCES DOCUMENTAIRES**

1. Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. Barbara Klamt, Ania Koziell, Francis Poulat, Peter Wieacker, Peter Scambler, Philippe Berta and Manfred Gessler, Human Molecular Genetics, 1998  
[https://www.researchgate.net/figure/The-WT1-splice-mutations-alter-the-KTS-isoform-ratio-of-WT1-RT-PCR-analysis-of-WT1\\_fig2\\_51298116](https://www.researchgate.net/figure/The-WT1-splice-mutations-alter-the-KTS-isoform-ratio-of-WT1-RT-PCR-analysis-of-WT1_fig2_51298116)
2. Syndrome de Frasier  
<https://www.orpha.net/fr/disease/detail/347>
3. The same mutation affecting the splicing of WT1 gene is present on Frasier syndrome patients with or without Wilms' tumor, A S Barbosa, C G Hadjiathanasiou, C Theodoridis, A Papathanasiou, A Tar, M Merksz, B Györvári, C Sultan, R Dumas, F Jaubert, P Niaudet, C A Moreira-Filho, C Cotinot, M Fellous, Human mutation 1999  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10094551/>
4. The -KTS splice variant of WT1 is essential for ovarian determination in mice, Elodie p. Grégoire & al. Science, Novembre 2023  
<https://www.science.org/doi/10.1126/science.add8831>
5. L'origine du développement des ovaires enfin découverte, INSERM, décembre 2023  
<https://www.inserm.fr/actualite/lorigine-du-developpement-des-ovaires-enfin-decouverte/>
6. On connaît enfin le gène à l'origine de l'ovaire, The conversation, 6 novembre 2023  
<https://theconversation.com/on-connaît-enfin-le-gene-a-lorigine-de-lovaire-217022>
7. La tardive découverte du gène de l'ovaire, Radio France, janvier 2024  
<https://www.radiofrance.fr/franceculture/podcasts/avec-sciences/la-tardive-decouverte-du-gene-de-l-ovaire-8223105>
8. Frasier syndrome: four new cases with unusual presentations, Mara Sanches Guaragna & al. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, novembre 2012  
[https://www.researchgate.net/publication/234086114\\_Frasier\\_syndrome\\_Four\\_new\\_cases\\_with\\_unusual\\_presentations](https://www.researchgate.net/publication/234086114_Frasier_syndrome_Four_new_cases_with_unusual_presentations)