

Génétique

Electrophorèse d'ADN

Réf :117 230

Kit Évolution du gène AMEL (électrophorèse d'ADN)

Français – p 1

Version : 2301

1 Introduction

L'amélogénine est la protéine majoritaire (quantité > 90%) liée à la formation de l'émail dentaire chez les mammifères. Elle joue donc un rôle très important dans la protection des dents (Termine et al., 1980). Le gène de l'amélogénine est présent chez les mammifères mais également chez de nombreux vertébrés : crocodiliens, lézards, grenouilles, tritons, coelacanthé... chez lesquels le gène, fonctionnel, sert aussi à mettre en place l'émail dentaire.

L'amélogénine est indispensable à la formation d'un émail dentaire bien minéralisé qui protégera la dent contre les agressions extérieures, les abrasions, tout ce qui risque d'abîmer la dent au cours de la vie d'un animal. On peut donc supposer que toutes les mutations qui rendront le gène de l'amélogénine non fonctionnel seront éliminées par la sélection naturelle car les animaux atteints ne pourront plus se nourrir et mourront avant l'âge de la reproduction. Chez l'homme, des mutations ont été trouvées (des délétions ou des substitutions de nucléotides) dans la séquence du gène de l'amélogénine. Ces mutations sont responsables d'une maladie génétique appelée *amélogénèse imparfaite*, qui se caractérise par un émail dentaire fragile, cassant, voire absent. Il a aussi été démontré que le gène de l'amélogénine est non fonctionnel et que la protéine de l'amélogénine n'est plus fabriquée chez les animaux qui ont perdu leurs dents comme les oiseaux, les tortues ou les baleines à fanons.

Les oiseaux ont perdu leurs dents il y a 116 millions d'années. Ils possèdent un gène de l'amélogénine qui n'est plus soumis à la pression de sélection et qui subit des mutations modifiant sa séquence au point qu'il devient difficilement reconnaissable.

Chez les baleines à fanons (comme la baleine bleue ou la baleine à bosse) qui se nourrissent en filtrant l'eau de mer pour avaler des petites crevettes (le krill), la perte des dents est plus récente (quelques millions d'années seulement) et le gène est également non fonctionnel.

❖ 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).

Format 40 élèves :

20 tests soit 80 dépôts à analyser

1 test correspond à :

- 1 dépôt ADN amplifié Humain (8 µl)
- 1 dépôt ADN amplifié Lémurien (8 µl)
- 1 dépôt ADN amplifié Rorqual (8 µl)
- 1 dépôt ADN amplifié Poule (8 µl)

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

1 dépôt échelle de poids moléculaire par gel électrophorèse (8 µl)

Durée globale de la séance 30 à 40 minutes

Dont migration électrophorèse : 15 - 20 minutes

2 Matériels et produits nécessaires

Composition du kit :

- Tube 1 Homo sapiens 175 µL
- Tube 2 Lémurien 175 µL
- Tube 3 Rorqual 175 µL
- Tube 4 Gallus (poulet) 175 µL



- Marqueur de taille 90 µL

Consommables nécessaires (non fournis)

Agarose

Tampon TAE

Colorant

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 10X 200 ml / colorant GelGreen 30 µl)

Matériels complémentaires :

- Cuve à électrophorèse ADN
- Micropipettes 2-20 µl

3 Principe de l'expérience

Au cours de cette activité d'électrophorèse d'ADN, on aborde les notions de mutations et de pression de sélection. L'analyse comparative des gènes, qui complète l'expérience montre que le gène AMEL est particulièrement bien conservé au cours de l'évolution chez les animaux qui ont besoin de dents solides pour leur alimentation. Ainsi, on retrouve un gène fonctionnel avec peu de mutation chez l'homme et le lémurien. En revanche, les oiseaux qui ont perdu leurs dents il y a 116 Ma, tout comme les baleines plus récemment (miocène moyen) gardent dans leur génome les traces d'un gène AMEL mais non exprimé (présence de codon stop dans la séquence).

L'élève pourra déduire que la perte des dents est une innovation évolutive et constatera qu'un gène non fonctionnel accumule des mutations de plus en plus nombreuses au cours du temps (analyse des séquences).

Pour l'amplification par PCR, on a recherché des fragments de gène AMEL, homologue au fragment humain, dans d'autres espèces (Exon 6, chr X). La taille de ces fragments est sans lien avec la taille globale du gène AMEL réellement présente dans le génome de l'espèce.

Nom usuel	Nom scientifique	Classe	Ordre	Organes buccaux	Chromosome gène AMEL	Séquence amplifiée
Humain	Homo sapiens	Mammifère	Primates	Dents émaillées	X et Y (mâle)	X =1200 Y=980
Lémurien de Madagascar	Lemur catta	Mammifère	Primates	Dents émaillées	X et Y (mâle)	X =1002 Y= 890
Rorqual commun	Balaenoptera physalus	Mammifère	Cétacés	Fanons	X et X (femelle)	X = 530
Poulet	Gallus gallus	Aves	Galliformes	Bec	5 (mâle)	5 = 858

Pourquoi, chez un même individu, la taille des fragments amplifiés sur les chromosomes X et Y est différente ?

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

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

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

C'est le cas du gène AMEL, en utilisant les mêmes amorces on amplifie des zones des allèles AMELX et AMELY de taille différente. On retrouve ce cas de figure chez la plupart des mammifères.

4 Mode opératoire

4.1 Préparation des solutions

❖ Préparation du tampon TAE 1X :

- 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 1350 ml d'eau distillée, bien mélanger.

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

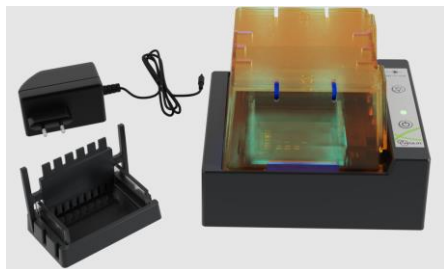
- Verser 15 mL de tampon TAE 1X dans un erlenmeyer de 50 mL.
- Peser 0,15 g d'agarose de type II dans une capsule et le verser en pluie fine dans le tampon TAE.
- Mettre l'erlenmeyer contenant le TAE et l'agarose au micro-onde pendant 20 à 30 secondes – stopper à l'apparition de l'ébullition - (*ou sur 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.

❖ 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

phorEasy



Dispositif électrophorèse
tout en un

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.

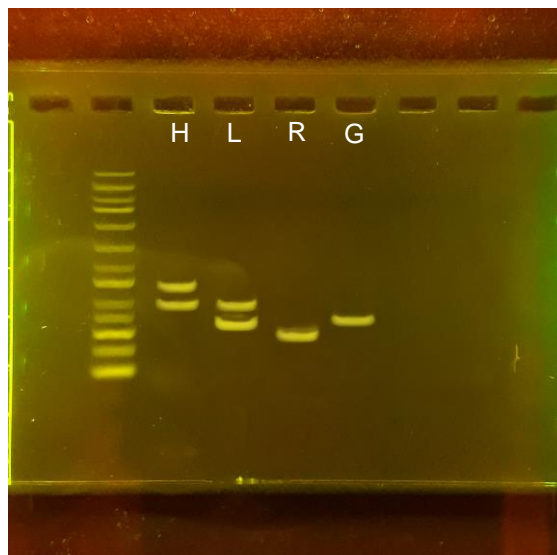
4.2 Dépôt de l'ADN

A l'aide d'une micropipette, déposer :

- 8 µl d'ADN Tubes à déposer
- 8 µl pour l'échelle de poids moléculaire

Durée de migration environ 20 minutes pour les systèmes compacts

5 Résultats et exploitations



H : gène AMEL ADN humain mâle amplifié (1200 et 980 pb)

L : gène AMEL ADN lémurien mâle amplifié (1002 et 890 pb)

R : gène AMEL ADN lorquin femelle amplifié (530 pb)

G : gène AMEL ADN poulet mâle amplifié (858 pb)

Pour rappel, les fragments amplifiés correspondent à des fractions du gène AMEL identifiées dans le génome de chaque espèce. La taille de ces fragments est sans lien avec la taille globale du gène AMEL.

Conclusion :


Des séquences de gène AMEL sont détectées et amplifiées dans tous les génomes, y compris pour les espèces qui sont dépourvues de dents. Les espèces ont probablement hérité ce gène d'un ancêtre commun, il y a plus de 600 Ma...

Exploitation au niveau des séquences

Le gène AMEL est présent chez les 2 primates, Humain et lémur, les 2 sont pourvus de dents émailées et malgré une évolution séparée datée à plus de 63 Ma, les séquences montrent une forte similitude caractérisant un lien de parenté étroit.

Le gène AMEL était présent chez l'ancêtre commun aux mammifères et dinosauriens. Chez les oiseaux, descendants des dinosauriens, le gène a cessé d'être exprimé mais il est toujours présent dans le génome. On retrouve le même phénomène avec les mammifères marins tels que les baleines à fanons (type Rorqual). En l'absence, de pression de sélection, les séquences non exprimées divergent en accumulant des mutations. La divergence s'accroît avec le temps. L'analyse des séquences montre donc une plus grande parenté entre l'humain et la baleine, tout 2 mammifères, qu'entre l'humain et la poule.

Séquences d'ADN et de protéines (calculées à partir de l'ADN).

Les  représentent des codons « stop » qui font arrêter la traduction de l'ADN en protéine.

Humain → protéine fonctionnelle

TACCCTTCCTATGGTTACGAGCCCATGGGTGGATGGCTGCACCACCAAATCATCCCCGTGCTGTCCCAACAGCAC
CCCCGACTCACACCCTGCAGCCTCATCACCACATCCCAGTGGTGCCAGCTCAGCAGCCCCGTGATCCCCCAGCAA
CCAATGATGCCCCGTTCTGGCCAACACTCCATGACTCCAATCCAACACCACCAGCCAAACCTCCCTCCGCCCCGCC
CAGCAGCCCTACCAGCCCCAGCCTGTTTCAGCCACAGCCTCACCAGCCCATGCAGCCCCAGCCACCTGTGCACCCC
ATGCAGCCCCCTGCCGCCACAGCCACCTCTGCCTCCGATGTTCCCCATGCAGCCCCCTGCCTCCCATGCTTCCTGAT
CTGACTCTGGAAGCTTGGCCATCAACAGACAAGACCAAGCGGGAGGAAGTGGATTAA

YPSYGYEPMGGWLHHQIIPVLSQQHPPTHTLQPHHHIPVVPAAQQPVIQQPMPVPGQHSMTPIQHHQPNLPPPA
QQPYQPQPVQPQPHQPMQPPVHPMQPLPPQPPPLPMFPMQPLPMLPDLTLEAWPSTDKTKREEVD*

Lémurien de Madagascar → protéine fonctionnelle

TACCCTTCCTATGGTTACGAGCCCATGGGTGGATGGCTGCACCACCAAATCATCCCCGTGCTGTCCAGCAGCAC
CCCCAGACTCACACCCTGCAGCCTCATCACCACATCCCAGTGGTACAAGCTCAGCAGCCCCGTGGTCCCCCAGCAA
CCAATGATGCCCCGTTCTGGCCAACACTCCATGACTCCAACCCATCACCACCAGCCAAACCTCCCTCCGCCCCGCC
CAGCAGCCCTTCCAGCCCCAGCCCGTTTCAGCCGCAGCCTCACCAGCCCATGCAGCCCATGCAGCCCATGCAGCCC
ATGCAGCCTATCCAGCCCATCCAGCCCATCCAGCCCCAGCCACCTCTGCACCCCATGCAGCCCCCTGCCGCCACAG
CCACATCTGCCTCCGCTGTTCCCCATGCAGCCCCCTGCCGCCCATGCTTCCCGACCTGCCTCTGGAAGCTTGGCCA
GCAACT

YPSYGYEPMGGWLHHQIIPVLSQQHPQTHTLQPHHHIPVVQAQQPVVPQQPMPVPGQHSMTPTHHHQPNLPPPA
QQPFQPPVQPQPHQPMQPMQPMQPMQPIQPIQPIQPPPLHPMQPLPPQPHLPPLFPMQPLPMLPDLPLEAWP
AT*

Rorqual commun → pas de protéine produite

TACCCGTCCTACGGTTACGAACCCATGGGTGGCTGGCTGCGTCACCAAATCATTCCCGTGGTAGCCCAGCAGGCT
GCCCTGCAGCCTCATCACCCTTCCCCATGGTGCCAGCCCAGCAGCCCGTGGTCCCCCAGCAAACCATGATGCCA
ATTCTTGCCAGCACTCCATGACTCCAAGCCAACCCACCAGCCACACCTCCCTGTGCCCGCCCAGCAGCCCGTC
CAGCCACAGCCTCACCCGCCCCTGCTGCCCCAGCCGCTCTGCCTCCGATGTTCCCCATGCAGAATCACTAGTGA
ATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCCATATGGGAGAGCTCCC

YPSYGYEPMGGWLRHQIIPVVAQQAALQPHHHFPMVPAQQPVVPQQTMMPIPGQHSMTSPQPHQPHLPVPAQQPV
QPQPHPPLLPPQPLPMPFPMQNH**IRGRLQVDPYGRAP

Poulet -> pas de protéine produite

TTCCCATTTAATGGTTACAACACTAGACAGAAGCTGACAAGAACACCAACCAGTTACAAGCAACATCTACAAATGGA
GAGCTTACTATCACCCAGCACACCCCTTGGTGGCACTCCAGCACCAGCTGATGTAAATTTCCAGGCTATTTCC
AGTTCTACCACTAGCGCAGCACCTACCAAGCCTGCCAATGCCAGCTCAAACCACACAGCTGCACACAACAAAAGA
GGCCTCAGCATCCTGCAAAATCCCAACCCACCGTTGCACCCAGTGGCTGGGGAGTCCCCATATGCACATGTGCC
CCTGTCAGGGACTCCTCTGGAGCCAAGGCAGCCAGACAACAAAGCAAAGGAAAACA

FPFNGYN*TEADKNTNQLQATSTNGELTITPAHPLGGTPAPADVNSQAISSSTTSAAPTKPANASSNHTAAHNKRGLSI
LQIPTHRCTPVAGESPYAHVPPVRDSSGAKAARQQSKGK

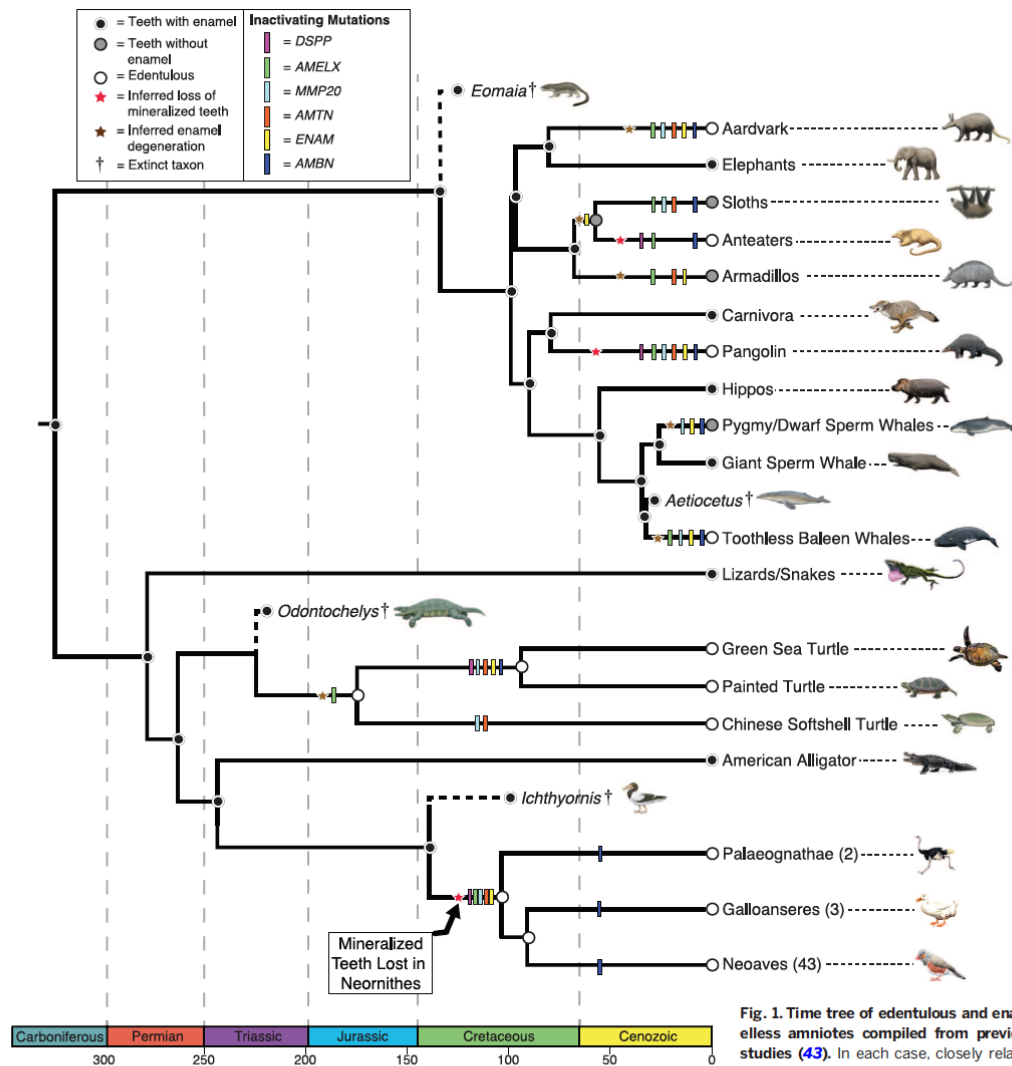


Fig. 1. Time tree of edentulous and enamelless amniotes compiled from previous studies (43). In each case, closely related extinct (*Odontochelys*, *Ichthyornis*, *Eomaia*, and *Aetiocetus*) and extant dentate taxa are also shown. Estimates for the timing of enamel loss in mammals are from fossils, phylogenetics, molecular clocks, frameshift mutations, and/or ratio of nonsynonymous to synonymous substitutions (dN/dS) (4, 12). Convergent enamel loss within Xenarthra is inferred for Pilosa (sloths and anteaters) and multiple armadillo lineages (4). Information on the enam- and dentin-related genes for pygmy/dwarf sperm whales, anteaters, and baleen whales are from previous studies (4, 11, 12, 16, 44). Hypothesized loss of mineralized teeth on the stem neornithine branch is assumed on the basis of indel substitution rates (27, 43). Numbers in brackets indicate the number of bird genomes analyzed for that particular group. Ghost branches are arbitrarily shown as representing ~5 million years, except for *Ichthyornis*, where the ghost branch was extended to accommodate the depiction of inactivating mutations on the stem Neornithes branch.

6 Assistance Technique

Pour toute question, veuillez contacter

N° Cristal : 09 69 32 02 10

Appel non surtaxé