

Génétique

Electrophorèse d'ADN

Réf :117 259

**Kit Allèle Rh Neandertal et H. sapiens pour
électrophorèse d'ADN**

Français – p 1

Version : 4210

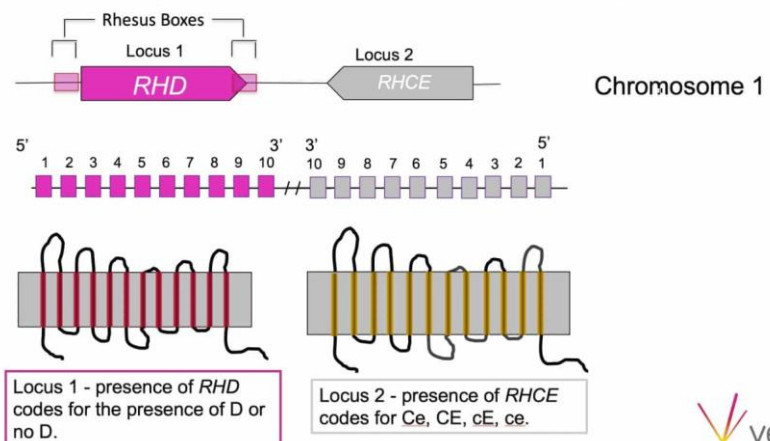
Objectif :
**Mise en évidence des allèles du groupe Rhésus chez les Néandertaliens
et relation avec la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né**

1 Introduction

Nous allons rechercher ici si le système Rhésus d'*Homo neanderthalensis* pourrait être à l'origine d'une incompatibilité biologique entre des mères néandertaliennes et des pères sapiens.

Le système RH

RH Genes → Rh Proteins



<https://www.bbguy.org/2021/05/19/090/>

Nous ciblerons notre étude sur le gène RHCE. De nos jours l'antigène RH18, codé par RHCE est présent à une fréquence élevée dans les populations humaines modernes. Il existe néanmoins un variant RHCE*ceEK qui, à l'état homozygote, entraîne une absence d'antigène, notée RH :-18. Lorsqu'une mère RH :-18 porte un enfant d'un père exprimant l'antigène RH18, elle peut produire des anticorps anti-RH18. Ces anticorps sont connus pour être à l'origine de la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né.

Principe : L'activité se présente sous la forme d'un test de d'identification des allèles du gène RHCE présents chez les néandertaliens comparés à ceux d'humains actuels non africains. Les résultats seront obtenus par électrophorèse de fragments d'ADN amplifiés par PCR.

L'ADN néandertalien n'étant pas disponible, le fragment d'ADN d'*Homo neanderthalensis* a été synthétisé à partir de la séquence du gène RHCE de Néandertal, connue grâce au séquençage du génome de cette espèce fossile. Les séquences sont définies à partir des 3 génomes séquencés : Altai , Vindja et Chagyrskaya.

L'analyse comparative du système Rhésus des 3 génomes, **a montré que le gène RHCE néandertalien présentait une très faible variabilité, tous présentent le variant phénotypique RHce EK (RHCE*01*05).**

Ce variant est plus rare chez l'homme moderne.

Les variants des gènes RHCE sont relativement peu fréquents dans les populations d'Europe de l'Ouest.

Pour l'expérience, de test d'identification des allèles Rh, on dispose de 2 séquences « néandertaliennes » de référence

Dossier pédagogique
complet à retrouver page 7

Les ADN utilisés dans ce kit pédagogique sont tous d'origine synthétique. Il s'agit d'une reconstitution.

Exon 1 -> mutation en position 48 G>C ⁽¹⁾

Exon5 : mutations 712 A>G⁽²⁾ /787⁽³⁾ A>G /800 T>A⁽⁴⁾ correspond au variant phénotypique (RHce EK)

A partir de cellules prélevées sur 3 personnes de type caucasiens, (Europe de l'ouest) nous allons rechercher simultanément par PCR les 2 formes alléliques pour ces séquences sauvages et mutées.

Principe recherche de mutation (SNV) par PCR :

A l'aide de jeux d'amorces spécifiques, il est possible d'amplifier une séquence ADN se différenciant par une seule paire de base (SNV single nucléotide variant). Ici on cible une mutation sur exon1 et 3 mutations sur exon5

Par électrophorèse, la présence du fragment amplifié indique la présence du variant recherché.

Résultats attendus

Séquence	Produit de PCR	Néandertal	Europe 1	Europe 2	Europe 3
Exon 1 : 48 G	1200	-	Oui	Oui	Oui
Exon 1 : 48 G>C ⁽¹⁾	850	Oui	-	-	Oui
Exon 5 : 712 A /787 A /800 T	530	-	Oui	Oui	Oui
Exon 5 : 712 A>G ⁽²⁾ /787 ⁽³⁾ A>G /800 T>A ⁽⁴⁾	330	Oui	-	-	-

1 : G remplacé par C

2 : position 712 A remplacé G

3 : position 787 A remplacé G

4 : position 800 T remplacé A

❖ 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 maillage 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).

Le kit se présente sous la forme de solutions d'ADN prêt à déposer dans le gel. **Les solutions d'ADN sont calibrées et ne nécessitent aucune préparation.**

Ces solutions contiennent le tampon de charge et les colorants témoins de migration.

Format 40 élèves (20 binômes) :

20 tests complets soit 80 dépôts à analyser

1 test correspond à :

- 1 dépôt ADN Néandertal reconstitué
- 1 dépôt ADN Caucasien 1
- 1 dépôt ADN Caucasien 2
- 1 dépôt ADN Caucasien 3

+ 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 : 15 - 20 minutes

2 Matériels et produits nécessaires

Composition du kit :

- Tube 1 ADN Néandertal reconstitué 175 µL
- Tube 2 ADN Caucasien 1 175 µL
- Tube 3 ADN Caucasien 2 175 µL
- Tube 4 ADN Caucasien 3 175 µL
- Marqueur de taille 90 µL

Consommables nécessaires (non fournis)

- Agarose
- Tampon TAE
- Colorant ADN

Pour réaliser 10 mini gels d'agarose → Réf. 107646

Consommables pour système électrophorèse compact avec fluorescence

- 4 g Agarose
- 200 mL TAE 10X
- 30 µl colorant GelGreen

Système compact avec fluorescence PhorEasy Jeulin (ou MiniOne).

Matériels complémentaires :

- Cuve à électrophorèse ADN
- Micropipettes 2-20 µl

3 Mode opératoire

3.1 Préparation des solutions

❖ Préparation du tampon TAE 1X :

- Le volume de tampon nécessaire par cuve est d'environ 150 mL
- Exemple de préparation pour 1 L de tampon à 1 X :
- Versez 100 ml de TAE 10X 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.*

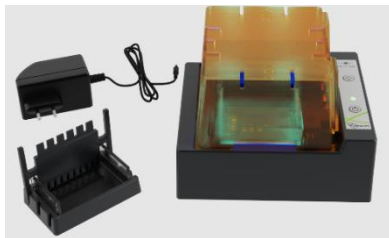
❖ Préparation et coulage d'un gel d'agarose à 1,7 % (optimale) :

- Verser 15 mL de tampon TAE 1X dans un erlenmeyer de 50 mL.
- Peser 0,25 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.

phorEasy



Dispositif électrophorèse
tout en un

- Ajouter 2 µl de colorant GelGreen à l'aide de la micropipette, bien agiter l'erenmeyer.
- Laisser l'erenmeyer refroidir quelques instants sur la paillasse 2 à 3 min, puis verser dans le moule équipé du peigne à petites dents.
- * La concentration en agarose à 1,7 % permet d'avoir une résolution optimale de la séparation des fragments d'ADN. Vous pouvez réaliser un gel à 2 % (cup) et obtenir également des très bons résultats.

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

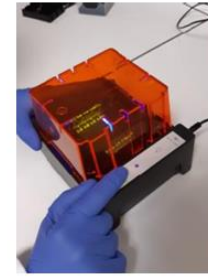
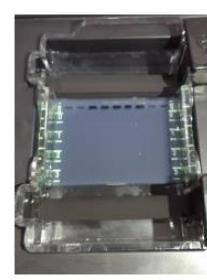
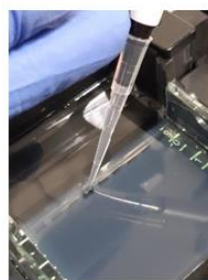
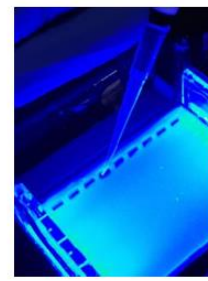
A l'aide d'une micropipette, déposer :

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

phorEasy



8 µl par puits

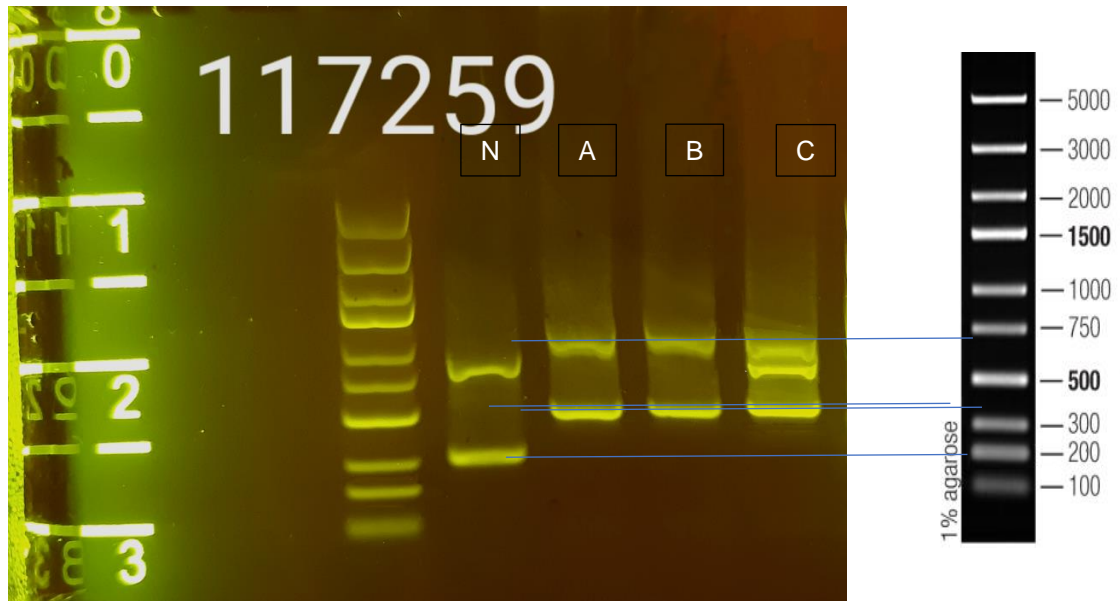


Durée de migration 15 à 20 minutes pour les systèmes compacts

3.3 Révélation

→ Transilluminateur intégré = révélation en temps réel

4 Résultats et exploitations



Interprétation.

les profils génétiques
Néandertal montre
une bande à 850pb → l'exon 1 muté
une bande à 330pb → l'exon 5 muté.

European A (H.sapiens) montre
une bande à 1200pb → l'exon 1 non muté
une bande à 330pb → l'exon 5 non muté.

European B (H.sapiens) montre
une bande à 1200pb → l'exon 1 non muté
une bande à 330pb → l'exon 5 non muté

European C (H.sapiens) montre
une bande à 1200pb → l'exon 1 non muté
une bande à 850pb → l'exon 1 muté
une bande à 330pb → l'exon 5 non muté

Européen A et B sont non mutés et homozygote / européen C est hétérozygote pour exon 1

Interprétation détaillée dans le dossier pédagogique ci-joint

5 Assistance Technique

Contacter le **Support Technique** au **09 69 32 02 10** (prix d'un appel local, non surtaxé).

JEULIN
468 rue Jacques Monod, CS 21900
27019 EVREUX CEDEX France

Dossier pédagogique

LE GENOME DES NEANDERTALIENS A L'ORIGINE DE LEUR EXTINCTION ?

Mise en évidence des allèles du groupe Rhésus chez les Néandertaliens et relation avec la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né

LE CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Dans son roman graphique « *Vo'Hounâ, une légende préhistorique* » publié en 2002 aux éditions *Soleil*, puis en 2013 par *Errance*, Emmanuel Roudier nous décrit l'histoire d'amour entre une jeune « femme ours », comprenez une néandertalienne, et un « homme long », un *Homo sapiens*. De leur union naitront des enfants hybrides (figure 1).

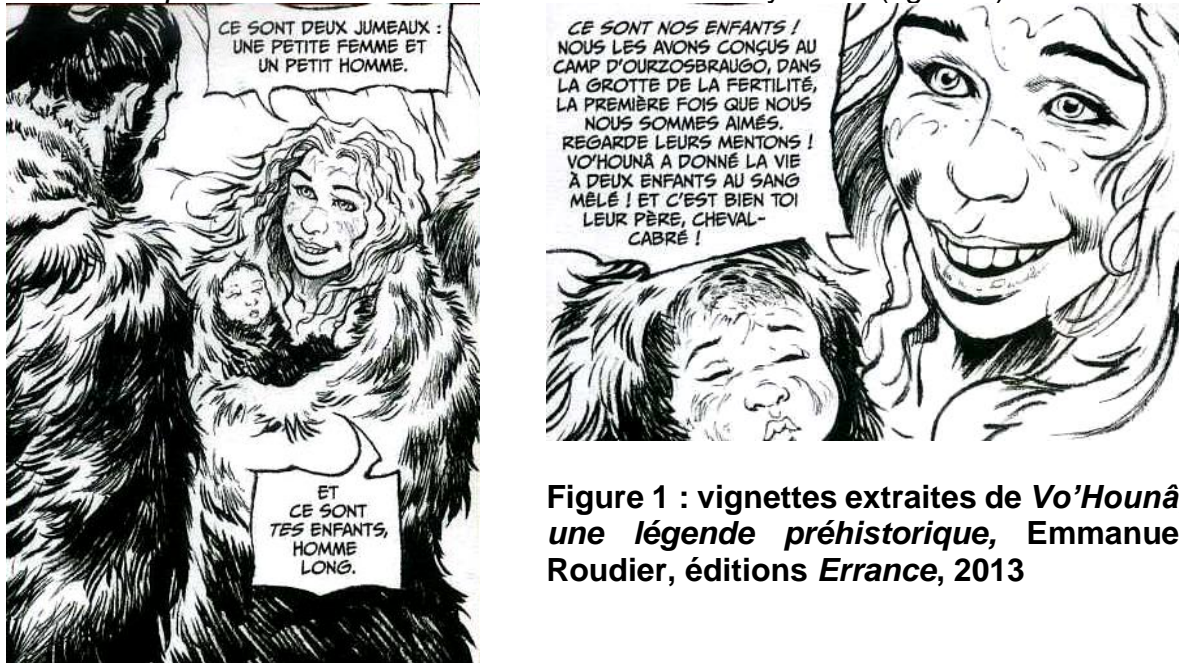


Figure 1 : vignettes extraites de *Vo'Hounâ, une légende préhistorique*, Emmanuel Roudier, éditions *Errance*, 2013

Cette prémonition artistique a depuis été validée par les découvertes scientifiques. En octobre 2022, le paléogénéticien suédois, Svante Pääbo a reçu le prix Nobel de Médecine et Physiologie pour ses travaux qui ont abouti au séquençage complet du génome de Néandertal.

Les résultats des recherches menées en génomique ont montré que le génome des humains non-africains actuels contient de 1 à 4% d'ADN néandertalien¹. Les humains actuels, en dehors de l'Afrique, sont le fruit d'une hybridation entre *Homo neanderthalensis* et *Homo sapiens*. Il y a environ 100 000 ans, *Homo sapiens* quitte le berceau africain² et rencontre Néandertal en Europe et au Proche-Orient. Ces deux humanités se sont côtoyées et accouplées et *Homo neanderthalensis* a transmis à ses descendants une partie de son patrimoine génétique. De cette lointaine ascendance, les *Homo sapiens* non africains ont hérité d'une certaine sensibilité au COVID19¹, mais aussi, comme l'ont montré des études récentes, de la forme de leur nez³ ou d'une prédisposition à la maladie du viking (encore appelée maladie de Dupuytren)⁴.

Séquencer le génome de Néandertal⁸

Alors qu'en 2003 on annonce le séquençage complet du génome humain, dès 2004 Svante Pääbo et ses équipes s'attaquent à la reconstitution des génomes d'humains fossiles. Cinq ans plus tard, Svante Pääbo annonçait avoir déchiffré plus de trois milliards des paires de bases qui composent le génome nucléaire des néandertaliens. Ce séquençage a été rendu possible grâce à la Solexa, une machine capable de traiter 40 millions de séquences en une semaine et par une méthode d'analyse consistant à séquencer de manière aléatoire l'ensemble du génome. Les séquences obtenues sont ensuite assemblées par un algorithme.

Néandertal et sapiens en Europe

Les plus anciens fossiles de morphologie néandertalienne presque complète ont des âges compris entre - 250 000 et - 110 000 ans. Les Néandertaliens les plus typiques ont des âges compris entre -100 000 et -30 000 ans, date de leur disparition. Parmi eux, les fossiles les plus complets sont datés de -42 000 ans et ont été découverts dans le Sud-Ouest de la France ou à Spy en Belgique.

Des recherches menées de 1999 à 2005 dans la grotte de Gorham à Gibraltar suggèrent que les Néandertaliens y ont vécu jusqu'à -28 000 ans. Ils auraient donc longuement cohabité avec les *Homo sapiens*, présents dans la région depuis 34 000 ans. Ces résultats sont toutefois fortement critiqués, par exemple par le paléanthropologue Joao Zilhão, de l'université de Bristol¹⁰. Des découvertes récentes de fossiles suggèrent que les Néandertaliens et les *Homo sapiens* pourraient en fait avoir coexisté en Europe pendant 5 à 6000 ans⁹.

Pourtant, malgré quelques milliers d'années de cohabitation entre sapiens et Neandertal⁹, la situation décrite par Roudier dans *Vo'Hounâ*, d'enfants nés de mères néandertaliennes et de pères sapiens n'est pas observée aujourd'hui chez les humains modernes. Les sapiens non africains actuels descendent tous d'un métissage lointain entre des pères néandertaliens et des mères sapiens. En effet, seul le génome nucléaire des sapiens actuels non africains contient de l'ADN néandertalien. Chez tous les humains actuels, l'ADN mitochondrial transmis par hérédité cytoplasmique maternelle provient exclusivement de mères sapiens⁷.

Bien entendu, la question de cet « accouplement à sens unique » se pose et plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. La possibilité d'un « choix culturel » n'est pas à exclure. On connaît dans les populations humaines actuelles des exemples de « mariages à sens unique ». C'est le cas entre les populations pygmées d'Afrique centrale avec des populations non-pygmées vivant à proximité. Même si le terme « pygmée » regroupe différentes ethnies, ces populations partagent entre elles un mode de vie chasseur-cueilleur qui exploite les ressources forestières. Les femmes pygmées sont réputées fertiles et sont très « recherchées » par les hommes agriculteurs non-pygmées et voisins des populations pygmées. A l'inverse les unions entre hommes pygmées et femmes non-pygmées sont proscrites et n'ont jamais lieu⁵. Malgré cela, l'analyse génétique d'une mandibule retrouvée en 1957 et exposée au muséum d'histoire naturelle de Vérone contredit cette hypothèse « d'une reproduction orientée ». La mandibule est datée de 35 000 ans. Son ADN mitochondrial présente une séquence propre aux néandertaliens. La morphologie de la mandibule porte, elle aussi, toutes les caractéristiques de Neandertal, mais elle possède... un menton ! Ce néandertalien tardif serait donc issu d'un métissage entre une mère néandertalienne et un père sapiens⁶ ce qui permet de rejeter l'hypothèse d'un choix culturel (figure 2).

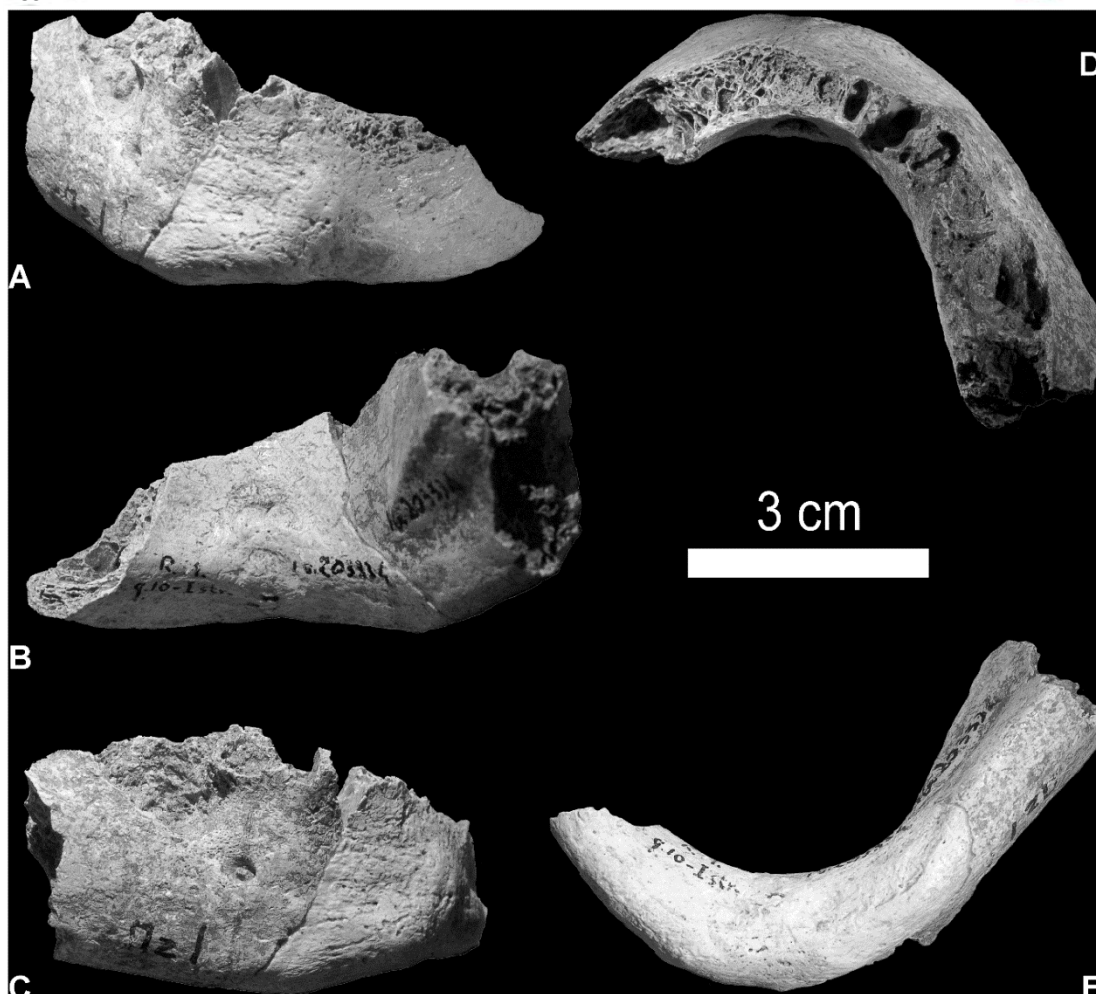


Figure 2 : Mandibule du néandertlien de Mezzena. Vue frontale : A, vue interne : B, vue latérale : C, vue supérieure : D, vue inférieure : E.

Possible Interbreeding in Late Italian Neanderthals? New Data from the Mezzena Jaw (Monti Lessini, Verona, Italy), Silvana Condemi et al. Mars 2013⁶

Une autre hypothèse évoquée est celle d'une incompatibilité biologique entre les femmes néandertaliennes et les hommes sapiens. Dans une étude publiée en 2021¹¹, des scientifiques du CNRS, d'Aix-Marseille Université et de l'Etablissement français du sang ont examiné les génomes de trois femmes néandertaliennes (Altaï, Vindija 33.19 et Chagyrskaya 8) afin de déterminer leurs groupes sanguins. Ces trois individus sont considérés comme représentatifs des populations néandertaliennes. Sur la quarantaine de systèmes qui déterminent les groupes sanguins, les scientifiques se sont concentrés sur les sept généralement considérés pour les transfusions sanguines, notamment les systèmes ABO et rhésus.

Les résultats ont montré qu'en ce qui concerne le système ABO, *Homo neanderthalensis* possède un polymorphisme équivalent à celui d'*Homo sapiens*. En revanche pour le système rhésus, les néandertaliens sont porteurs de variants alléliques codant pour des antigènes incomplets par rapport à ceux des humains modernes. Ces antigènes partiels (RhD, Rhc et Rhe) sont à l'origine d'une réponse immunitaire lorsque l'individu porteur est exposé à des antigènes complets. De plus, les néandertaliens étudiés sont porteurs du variant RHCE*ceEK à l'état homozygote. Cet allèle code pour un phénotype défini par l'absence d'un Antigène Rh nommé RH :-18 (figure 3). De nos jours cet antigène est présent à une fréquence élevée dans les populations humaines modernes. Ainsi, les mères

néandertaliennes avec des phénotypes RhD, Rhc et Rhe partiels et RH :-18, portant des fœtus de pères sapiens exprimant les formes complètes des antigènes RhD, Rhc et Rhe et exprimant l'antigène RH18, ont dû développer une immunité contre ces antigènes et ont synthétisé des anticorps anti-RhD, anti-Rhc, anti-Rhe ou encore anti-RH18. Ces anticorps sont connus pour être à l'origine de la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né qui peut aboutir à la mort des fœtus ou des nourrissons.

Les populations néandertaliennes n'ont jamais été importantes, structurées en petits groupes interconnectés d'une vingtaine d'individus qui n'ont jamais dépassé les 70 000 individus au moment de leur « âge d'or » vers -120 000 ans¹¹. Les données génétiques ont également mis en évidence la faible diversité génétique des néandertaliens (le fossile d'un individu très consanguin a été retrouvé dans l'Altaï). Cette faible variabilité est également visible dans la morphologie des néandertaliens, qui est restée la même durant les 100 000 dernières années de leur existence. Une faible variabilité génétique couplée à une incompatibilité biologique lors des métissages avec sapiens ont pu contribuer à affaiblir la descendance néandertalienne au point de conduire à la disparition de Néandertal.

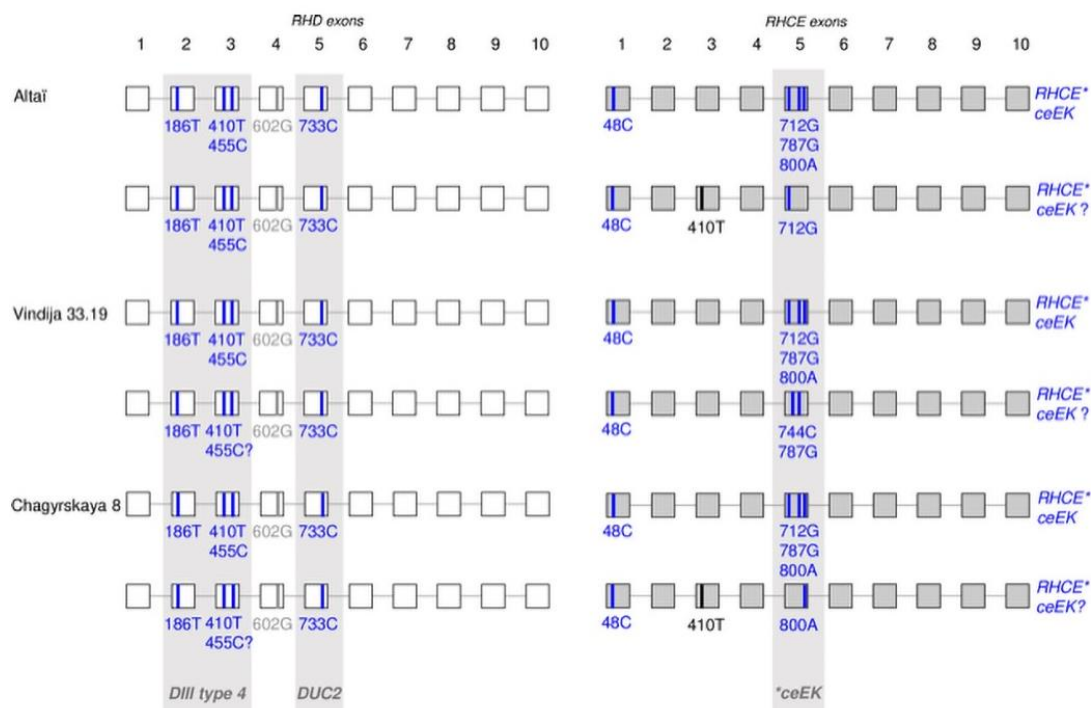


Figure 3 : représentation des différents génotypes *RHD* et *RHCE* chez Néandertal. Les carrés représentent les exons. Police noire, allèles inconnus chez l'homme moderne ; police bleue, allèles connus chez l'homme moderne ; ombre grise, arrière-plan allèle trouvé chez l'homme moderne. D'après *Blood groups of Neandertals and Denisova decrypted*, Silvana Condemi et al. *Plos One*, juillet 2021¹¹

La maladie hémolytique du nouveau-né¹²

La maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né survient lorsqu'une femme enceinte sécrète des anticorps circulants dirigés contre des antigènes hérités du père, présentés à la surface des globules rouges fœtaux. De nombreux anticorps dirigés contre des antigènes des hématies peuvent causer la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né, notamment ceux du système ABO, du système Rhésus et d'autres systèmes de groupes sanguins. Les femmes peuvent développer des anticorps en raison d'une grossesse antérieure ou d'une transfusion. Les anticorps maternels peuvent traverser le placenta pour se lier aux antigènes érythrocytaires du fœtus et déclencher leur destruction ou la suppression de l'érythropoïèse dans la moelle osseuse du fœtus. La maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né peut être asymptomatique ou se manifester par un ictère, de l'anémie et, dans la pire éventualité, elle peut causer la mort du fœtus ou du nouveau-né.

On peut déceler le risque de maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né en soumettant la mère à une épreuve de groupage sanguin et de recherche d'anticorps pendant la grossesse. Il est possible de prévenir la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né due à l'antigène RhD en administrant à la mère des anticorps anti-RhD afin d'inhiber sa réponse immunitaire aux antigènes RhD du fœtus.

Le système Rhésus

Le système Rhésus est un des principaux systèmes antigéniques érythrocytaires. Il doit son nom à un singe d'Asie du Sud-Est, Macaque rhésus (*Macaca mulatta*), qui servit d'animal d'expérience à la fin des années 1930 dans les recherches sur le sang. L'association du système antigénique érythrocytaire ABO et du système Rhésus définit les groupes sanguins.

Les protéines du système Rhésus sont codées par deux gènes, RHD et RHCE, étroitement liés, située sur le chromosome 1. Ces deux gènes possèdent de nombreux variants. 54 antigènes différents du système Rhésus sont ainsi homologués par la Société internationale de transfusion sanguine.

Les deux protéines RHD et RHCE, de 417 acides aminés chacune, sont localisées dans la membrane de hématies qu'elles traversent à douze reprises¹³.

L'analyse du système Rhésus des néandertaliens a fait apparaître que pour le gène RHD du système Néandertal présente une séquence unique, jamais rencontrée chez les humains modernes, hormis chez deux individus : un aborigène australien et un indigène papou¹¹. Peut-être les lointains descendants d'un métissage entre néandertaliens et humains modernes avant la migration de ces derniers vers l'Asie du Sud-Est...

LA SITUATION PEDAGOGIQUE

Les humains actuels non africains portent 1 à 4% d'ADN néandertalien dans leur génome nucléaire et sont donc les descendants d'une lointaine hybridation entre sapiens et Néandertal. Pourtant aucune trace de ce métissage n'apparaît dans le génome des mitochondries, ces organites cytoplasmiques qui servent à produire l'énergie des cellules et qui sont exclusivement transmises par les mères lors de la fécondation. Les mitochondries que l'on trouve chez les humains actuels contiennent toutes un génome mitochondrial exclusivement sapiens.

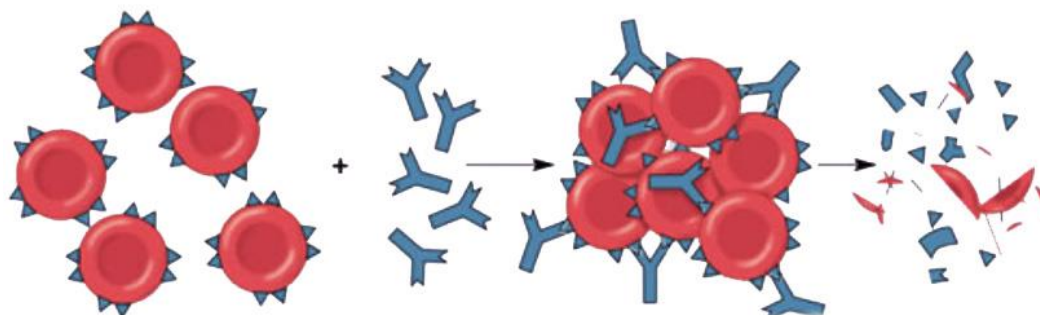
Dit autrement, cela signifie que les descendants actuels de ce métissage résultent uniquement d'unions entre des pères néandertaliens et des mères sapiens. On cherche à comprendre cette reproduction apparemment « à sens unique ».

L'une des explications proposées aujourd'hui par les scientifiques est celle d'une incompatibilité biologique entre les mères néandertaliennes et les pères sapiens. La maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né est une maladie qui résulte d'une incompatibilité entre le système rhésus des groupes sanguins de la mère et du père. Cette maladie peut entraîner le mort des fœtus ou des nourrissons et diminue donc considérablement les chances de succès de la reproduction.

Les deux gènes RHD et RHCE du système Rhésus codent des protéines localisées dans la membrane plasmique des globules rouges. Ils possèdent de nombreux allèles et les protéines paternelles portées par les globules rouges du fœtus peuvent être incompatibles avec celles de la mère : elles sont reconnues comme étant des antigènes. L'organisme de la maman produit alors des anticorps qui vont passer la barrière placentaire et s'attaquer aux globules rouges du fœtus, provoquant possiblement la mort de ce dernier.

Nous ciblerons notre étude sur le gène RHCE. Ce gène code la protéine antigénique RH18 qui est un marqueur du système rhésus présent à la surface des globules rouges. Parmi les allèles du gène RHCE, on connaît de nos jours les variants RHCE*ceEK qui, à l'état homozygotes, entraînent une absence d'antigène, notée RH :-18. Lorsqu'une mère RH :-

18 porte un enfant d'un père exprimant l'antigène RH18, elle peut produire des anticorps anti-RH18. Ces anticorps sont connus pour être à l'origine de la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né (figure 4). L'allèle RHCE*ceEK est rare dans les populations humaines actuelles.



Hématies fœtales porteuses de RH18 + anticorps maternels anti-RH18 → agglutination + hémolyse
Figure 4 : mécanisme de destruction des hématies lors de la maladie hémolytique du nouveau-né.

Objectif : nous allons rechercher ici si le système Rhésus d'*Homo neanderthalensis* peut être à l'origine d'une incompatibilité biologique entre des mères néandertaliennes et des pères sapiens.

Principe : L'activité se présente sous la forme d'un test d'identification des allèles du gène RHCE présents chez les néandertaliens comparés à ceux d'humains actuels non africains. Les résultats seront obtenus par électrophorèse de fragments d'ADN amplifiés par PCR. L'ADN néandertalien n'étant pas disponible, les fragments d'ADN d'*Homo neanderthalensis* ont été synthétisés à partir de la séquence du gène RHCE de Néandertal, connue grâce au séquençage du génome de cette espèce fossile. Les séquences sont définies à partir du génome de trois femmes néandertaliennes : Altai, Vindja et Chagyrskaya, considérées comme représentatives des populations néandertaliennes.

Le gène RHCE est un gène à 10 exons. Les variants RHCE*ceEK sont mutés au niveau de l'exon 1 et de l'exon 5. Ces variants ne permettent pas la synthèse de la protéine RH18. D'autres variants comme RHCE*C portent la mutation au niveau de l'exon 1, mais pas de l'exon 5 et permettent la synthèse de la protéine RH18.

A l'aide de jeux d'amorces spécifiques, il est possible d'amplifier de façon différente des séquences d'ADN se différenciant par une seule paire de base (SNV single nucléotide variant). Dans notre cas, les fragments amplifiés par PCR sont situés sur les exons 1 et 5 (figure 5).

		Exon 1	Exon 5	Synthèse de la protéine RH18
Allèle sauvage	Nucléotides	48 G	712 A / 787 A / 800 T	+
	Amplicons	1200pb	530pb	
Allèle RHCE*ceEK	Substitutions identifiées	48 G>C	712 A>G / 787 A>G / 800 T>A	-
	Amplicons	858pb	330pb	
Allèle RHCE*C	Substitutions identifiées	48 G>C	Pas de mutations	+
	Amplicons	858pb	530pb	

Figure 5 : séquence des exons 1 et 5 du gène RHCE et taille des amplicons (fragments d'ADN amplifiés par PCR). Seuls ont été représentés les nucléotides différenciant entre l'allèle sauvage et les variants.

La PCR est réalisée sur les fragments d'ADN néandertalien ainsi que sur l'ADN de cellules prélevées chez trois personnes originaires d'Europe. Ce sont ces amplicons que nous vous

fournissons dans ce kit. La réalisation d'une électrophorèse en classe permettra de séparer les fragments amplifiés chez chaque individu et ainsi de déterminer les allèles présents chez les individus testés (résultat en figure 6).

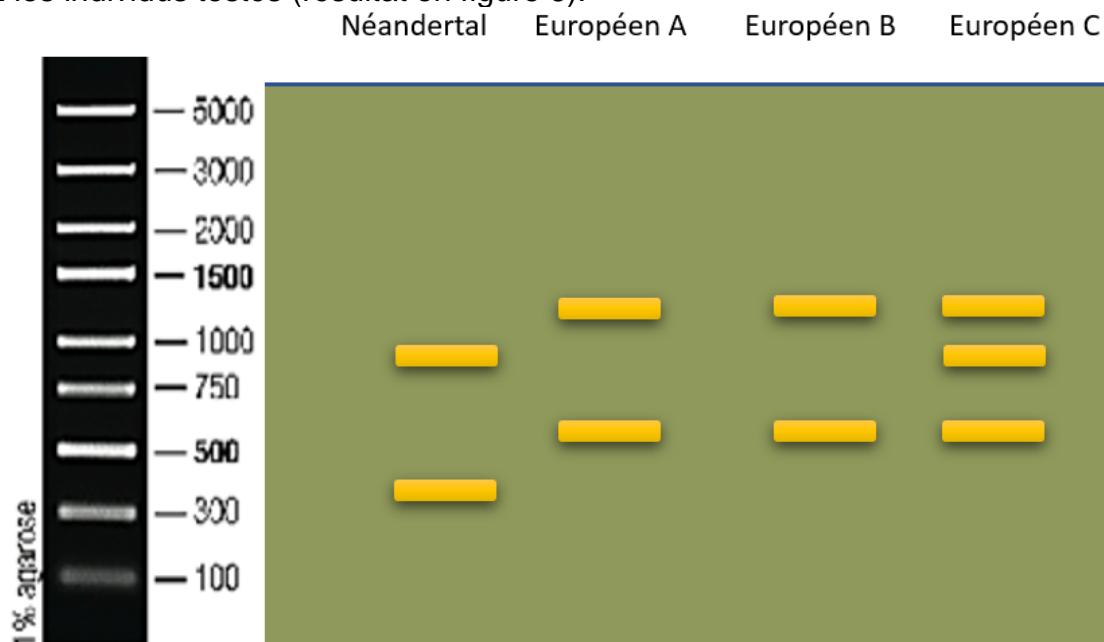


Figure 6 : représentation du gel d'électrophorèse

Interprétation : le profil génétique de Néandertal montre une bande à 850pb correspondant à l'exon 1 muté et une bande à 330pb qui correspond à l'exon 5 muté. Aucune autre bande n'apparaît. Néandertal est donc porteur de l'allèle RHCE*ceEK à l'état homozygote et ne produit donc pas la protéine RH18. Ce profil est considéré comme représentatif des populations néandertaliennes et cette situation était donc certainement fréquente chez les néandertaliens qui avaient donc un phénotype RH :-18.

Les européens A et B ont tous deux un profil à deux bandes (1200 et 530pb) correspondant aux exons 1 et 5 non mutés à l'état homozygote. Ils synthétisent donc la protéine RH18. L'européen C présente trois bandes sur son profil. Deux correspondent aux exons non mutés et une autre à l'exon 1 muté. L'européen est donc hétérozygote, porteur de l'allèle sauvage et de l'allèle RHCE*C. Ces deux allèles permettent tous deux la synthèse de la protéine RH18. Les trois européens testés ont donc un phénotype RH18 et ils transmettront obligatoirement à leurs enfants un allèle permettant la synthèse de la protéine RH18.

Il est fort probable que cette situation observée chez les sapiens actuels ait été la même chez les sapiens européens qui ont côtoyé Néandertal il y a plus de 30 000 ans. Si c'est le cas, les mères néandertaliennes RH :-18 qui ont eu des enfants avec des pères sapiens RH18, ont produit des anticorps anti-RH18 dirigés contre leurs fœtus, ce qui a très probablement entraîné de nombreux décès chez les enfants issus de telles unions.

A l'inverse, lorsque des femmes sapiens RH18 ont eu des enfants avec des pères néandertaliens RH :-18, leur fœtus n'étant pas porteur d'antigènes étrangers, elles n'ont pas produit d'anticorps dirigés contre leurs enfants. Ces derniers ont donc plus facilement survécu.

L'incompatibilité génétique entre mère néandertalienne et père sapiens est donc bien une explication possible au fait que l'on ne retrouve pas aujourd'hui de mitochondries provenant de mères néandertaliennes chez l'ensemble des humains actuels issus d'une hybridation entre sapiens et Néandertal.

SOURCES DOCUMENTAIRES

1. PRIX NOBEL DE MÉDECINE : SVANTE PÄÄBO A RÉVOLUTIONNÉ NOTRE VISION DE NÉANDERTAL, MNHN, octobre 2022
<https://www.mnhn.fr/fr/actualites/prix-nobel-de-medecine-svante-paabo-a-revolutionne-notre-vision-de-neandertal#:~:text=Prix%20Nobel%20de%20m%C3%A9decine%20%3A%20Svante%20P%C3%A4bo%20a%20r%C3%A9volutionn%C3%A9%20notre%20vision%20de%20N%C3%A9andertal,-4%20octobre%202022&text=Le%20pal%C3%A9og%C3%A9n%C3%A9ticien%20a%20re%C3%A7u%20ce,m%C3%A9decine%20et%20de%20physiologie%202022.>
2. QUAND LES HUMAINS ONT-ILS QUITTÉ L'AFRIQUE ET POURQUOI ? MNHN
<https://www.mnhn.fr/fr/quand-les-humains-ont-ils-quitte-l-afrique-et-pourquoi#:~:text=Pour%20Homo%20sapiens%2C%20lui%20aussi,000%20et%20100%20000%20ans.>
3. Automatic landmarking identifies new loci associated with face morphology and implicates Neanderthal introgression in human nasal shape, Qing Li et al. Mai 2023
<https://www.nature.com/articles/s42003-023-04838-7>
4. Major Genetic Risk Factors for Dupuytren's Disease Are Inherited From Neandertals, Richard Ågren et al. Juin 2023
<https://academic.oup.com/mbe/article/40/6/msad130/7197475?login=false>
5. COMMENT LES COMPORTEMENTS SOCIOCULTURELS INFLUENCENT LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS PYGMÉES ET NON-PYGMÉES D'AFRIQUE CENTRALE, MNHN, février 2013
<https://www.mnhn.fr/fr/communiqu%C3%A9-de-presse/comment-les-comportements-socioculturels-influencent-la-diversit%C3%A9-g%C3%A9n%C3%A9tique>
6. Possible Interbreeding in Late Italian Neanderthals? New Data from the Mezzena Jaw (Monti Lessini, Verona, Italy), Silvana Condemi et al. Mars 2013
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0059781>
7. ADN mitochondrial, Homo sapiens et Homo neanderthalensis, Gilles Furelaud, Françoise Ibarrondo, Planet-Vie, Mars 2004
<https://planet-vie.ens.fr/thematiques/evolution/lignee-humaine/adn-mitochondrial-homo-sapiens-et-homo-neanderthalensis#:~:text=4.-,ADN%20mitochondriaux%20d'Homo%20sapiens%20et%20Homo%20neanderthalensis%20%3A%20conclusions,Homo%20sapiens%20et%20Homo%20neanderthalensis.>
8. Le prix Nobel de médecine 2022 attribué à Svante Pääbo, père de la paléogénétique et décrypteur du génome de Neandertal. Rachel Mulot, Science et avenir, octobre 2022
https://www.sciencesetavenir.fr/archeo-paleo/le-prix-nobel-de-medecine-2022-attribue-a-svante-paabo-pere-de-la-paleogenetique-et-decrypteur-du-genome-de-neandertal_166779

9. Optimal linear estimation models predict 1400–2900 years of overlap between Homo sapiens and Neandertals prior to their disappearance from France and northern Spain. Igor Djakovic et al, octobre 2022
<https://www.nature.com/articles/s41598-022-19162-z>
10. Homme de Néandertal. Wikipédia
https://fr.wikipedia.org/wiki/Homme_de_N%C3%A9andertal
11. Blood groups of Neandertals and Denisova decrypted, Silvana Condemi et al. Plos One, juillet 2021
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0254175#pone.0254175.ref016>
12. La maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né et thrombopénie immune périnatale, Société canadienne du sang, 2018
<https://professionaleducation.blood.ca/fr/transfusion/guide-clinique/la-maladie-hemolytique-du-foetus-et-du-nouveau-ne-et-thrombopenie-immune#:~:text=Qu'est%2Dce%20que%20la,sur%20les%20globules%20rouges%20f%C5%93taux>
13. Système Rhésus, Wikipédia
https://fr.wikipedia.org/wiki/Syst%C3%A8me_Rh%C3%A9sus
14. Filosa Lugdivine. Etude de la variabilité des gènes des groupes sanguins dans la population des patients de l'EFS Alpes Méditerranée.. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. fhal-01690364f
<https://ephe.hal.science/hal-01690364/document>