Traduction et adaptation de la notice de MINIPCR

A RECEPTION DU COLIS :

☑ **Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
☑ **Stocker** les articles du colis dans les bonnes conditions :
Ouvrir le carton, 🌡 Placer les éléments suivants au congélateur à - 20°C 🌡

- Mélange miniPCR MASTER MIX, Load-Ready ™ comprenant :
  - La Taq polymérase
  - dNTP
  - Tampon PCR avec Mg2 +
  - Colorant de chargement sur gel
- PTC Primer Mix
- X-Tract TM Buffer : tampon d'extraction de l'ADN
- 100 bp DNA Ladder, Load-Ready™ : marqueur de taille 100 pB avec bleu de charge

Les éléments suivants se stockent à température ambiante :
Cure dents en plastiques
Microtubes à PCR

Les réactifs doivent être utilisés dans les 2 mois suivant leur réception.

Tous les composants de ce kit sont sans danger. Les règles de manipulations en laboratoire s'appliquent toutefois (le port de gants, lunettes et blouse est conseillé).
Tous les résidus peuvent être jetés à l'évier.

MATERIEL ET CONSOMMABLES NECESSAIRES

Agarose
Tampon TBE 1X
Agent révélateur de l'ADN : GELGREEN (2µL pour 20 ml de gel d'agarose)
Thermocycleur MINIPCR ou autre marque
Cuve à électrophorèse d'ADN, idéalement BLUEGEL ou autre cuve avec transilluminateur pour une visualisation en temps réelle de la migration
Micropipettes : 0.5-10 µL et 2-20 µL

MISE EN PLACE

Oiseau de nuit, ou alouette du matin

Dans ce kit, les élèves testeront leur propre génotype au locus Per3 du gène de l'horloge circadienne, associé aux préférences du comportement du sommeil chez l'homme.

Ils évalueront leur génotype après prélèvement de cellules buccales, amplification par PCR puis électrophorèse sur gel (consommables non fournis).

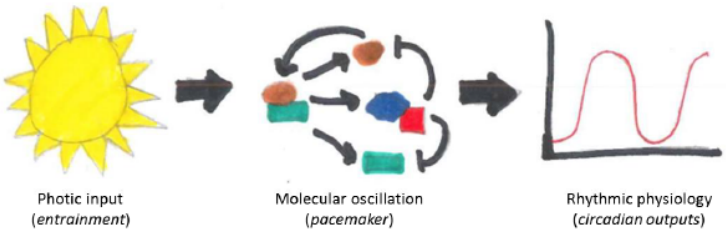
Ils évalueront leur phénotype de sommeil au moyen d'un simple questionnaire circadien, l'objectif ultime étant de se familiariser avec les horloges circadiennes et d'étudier les associations génétiques.

En 2 séances de 30 min (+1h d'amplification puis les tubes sont mis en attente au congélateur) puis 55 min.

1. Synopsis

Vous êtes-vous déjà senti en décalage horaire après avoir voyagé loin de chez vous et avez eu du mal à dormir? Vous sentez-vous habituellement fatigué au même moment de la journée, tous les jours? Ces deux phénomènes sont contrôlés par votre horloge circadienne. Les horloges circadiennes sont des chronomètres internes qui régulent la physiologie et le comportement de notre corps selon un cycle qui se répète chaque jour. Notre horloge interne dicte les moments de la journée où vous vous sentez somnolent, énergique ou affamé, et contrôle des fonctions corporelles importantes telles que la pression artérielle, la température corporelle, la libération d'hormones et le métabolisme. Chez l'homme, l'horloge circadienne devrait être légèrement supérieure à 24 heures. D'autres animaux, plantes, champignons et même des organismes unicellulaires ont également des horloges circadiennes, ce qui les aide à anticiper les transitions quotidiennes entre la lumière et les ténèbres.

Toute bonne horloge a deux caractéristiques importantes. Premièrement, il doit conserver l'heure normale et, deuxièmement, il doit pouvoir être réglé et réinitialisé. Notre horloge circadienne a ces deux caractéristiques. Nos horloges sont réglées sur environ 24 heures, mais elles peuvent également être réinitialisées par des facteurs externes, notamment la lumière du soleil; Cela garantit que votre chronomètre interne (naturellement un peu plus de 24 heures) reste synchronisé avec le jour naturel (24 heures). C'est aussi pourquoi, lorsque vous voyagez vers un nouveau fuseau horaire, votre horloge interne est initialement éteinte, ce qui provoque le décalage horaire, mais quelques jours plus tard, elle est réinitialisée sur le nouveau fuseau horaire dans lequel vous vous trouvez. Nous appelons cette capacité de l'horloge circadienne une synchronisation avec le entraînement de l'environnement.



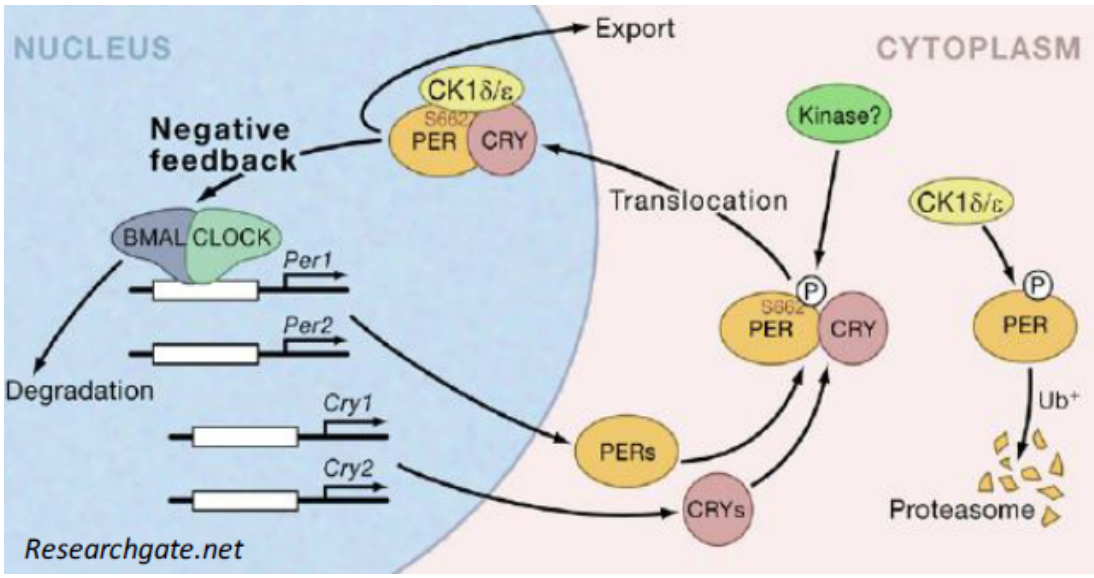
Une caractéristique fascinante de l'horloge circadienne est qu'elle fonctionne au niveau cellulaire; oui. Chaque cellule de votre corps peut garder et lire l'heure! C'est possible parce que l'horloge circadienne est contrôlée par une boucle de rétroaction génétique, dans laquelle les protéines régulent l'expression des gènes avec une périodicité de 24H. Les protéines de l'horloge circadienne présentent une rétroaction négative, ce qui signifie que les protéines produites par les gènes de l'horloge désactivent à leur tour les gènes qui les ont produites. La production de

protéines d'horloge circadiennes se poursuivra donc jusqu'à ce que les protéines atteignent une certaine concentration dans la cellule, moment auquel leur production cessera. Au fil du temps, à mesure que ces protéines d'horloge circadiennes se dégradent à un rythme régulier, leur concentration diminue jusqu'à ce qu'elle soit suffisamment basse pour permettre la reprise de l'expression des gènes. Ici, le cycle va continuer – produire des protéines jusqu'à ce que l'expression soit stoppée, dégradant les protéines jusqu'à ce que l'expression recommence. Étonnamment, le cycle quotidien d'expression et de dégradation de ces protéines a été tellement ajusté par l'évolution qu'il correspond étroitement à un jour de 24 heures.

Mécanisme moléculaire de l'horloge:

Boucles de rétroactions de transcription / traduction

Nous vivons dans un environnement cyclique en raison de la rotation de la Terre autour de son axe. Beaucoup de vies différentes des systèmes biologiques ont mis au point des horloges biologiques capables de prédire la rotation de la Terre et les alternances jour/nuit.



Cette horloge biologique contrôle le métabolisme, la biochimie et de nombreuses fonctions dans le corps, y compris nos cycles d'activité/repos.

Les cellules individuelles de notre corps ont des horloges internes. Chez l'homme et d'autres mammifères, la montre principale est une minuscule structure dans l'hypothalamus appelé le noyau suprachiasmatique (SCN). Les cellules dans le SCN (et de nombreux tissus dans le corps) peuvent chacune osciller avec une période de ~ 24 heures. Dans les années 1990, des mutants ont aidé les scientifiques à découvrir les gènes de l'horloge (tels que Clock, BMAL, Période, etc.) qui sont des fondamentaux en générant des rythmes circadiens.

Nous comprenons maintenant remarquablement bien la génétique de comportement circadien. Le mécanisme moléculaire de la horloge implique des boucles de rétroaction négative de plusieurs gènes. La transcription des facteurs BMAL1 et CLOCK forment des hétérodimères, qui activent la transcription des gènes Cryptochrome (Cry) et Période (Per) en se liant à leurs promoteurs. Les protéines CRY et PER s'accumulent progressivement dans le cytoplasme. CRY, PER et autres protéines forment des complexes qui se transloquent vers le noyau et arrêtent l'expression de la médiée par BMAL1 – CLOCK Cry et Per gènes. Cette boucle de rétroaction négative de transcription / traduction se répète toutes les 24 heures dans vos cellules! Pour en savoir plus sur ces gènes et sur d'autres gènes de l'horloge circadienne, lisez cet article de synthèse du généticien des horloges circadiennes Joe Takahashi.

Variation génétique et l'horloge

Un gène important dans ces boucles de rétroaction est le gène d'horloge circadienne de la période 3 (Per3). La recherche a trouvé qu'il y avait une variation de ce gène chez l'homme, c'est-à-dire que le gène est polymorphe. D'autres études ont trouvé qu'une forme spécifique de variation de ce gène, une répétition en tandem à nombre variable (VNTR) dans Per3 peut affecter la façon dont les horloges circadiennes sont réglées. Un VNTR est une courte séquence qui se répète plusieurs fois de suite dans un gène. Dans le cas de Per3, il existe une séquence de 54 paires de bases qui est répétée 4 fois sur un allèle et 5 fois sur une autre variante. Des recherches ont montré que le fait de porter 4 copies de cette répétition peut être associé à une préférence pour les activités du soir, tandis que 5 répétitions peut être associé à une préférence pour les activités le matin. D'après ces études, il semblerait que vos gènes puissent influer sur le fait que vous préfériez être une alouette matinale ou un noctambule!

Étant donné que les polymorphismes (variation) de cette répétition modifient la longueur de ce gène, la différence entre les gènes Per3 à 4 répétitions et à 5 répétitions peut être observée dans l'électrophorèse sur gel. Bien sûr, nous devons d'abord amplifier (faire beaucoup de copies de ce gène), pour le rendre visible sur un gel.

A propos des associations génétiques

La plupart des phénotypes sont des traits complexes, avec de multiples composants génétiques et environnementaux (c'est-à-dire, non déterminés par un seul gène). Les études d'association génétique permettent de trouver des gènes candidats ou des régions génomiques contribuant à un trait donné en recherchant une corrélation entre ce trait et la variation génétique. Une fréquence plus élevée d'un allèle (ou génotype) donné dans un échantillon d'individus qui expriment le trait peut être interprétée comme signifiant que l'allèle augmente la probabilité d'avoir ce trait spécifique. Les associations sont difficiles à établir sans équivoque et nécessitent l'obtention d'importants ensembles de données pour accroître la confiance statistique dans l'éventuelle association.

Les techniques génétiques traditionnelles tendent à rechercher des versions mutantes ou non fonctionnelles de gènes pour tenter de déterminer la fonction du gène. Bien que cette approche ait été fructueuse, elle n'était jusqu'à présent limitée aux organismes modèles cultivés en laboratoire. Cela limite la capacité des scientifiques à étudier la génétique humaine de cette manière. De plus, les techniques génétiques traditionnelles ne capturent généralement pas les variations du monde réel affectant les phénotypes du monde réel. Le pouvoir des études d'association réside dans la prise en compte de la variation phénotypique humaine et dans son aptitude à l'associer à la variation génétique réelle présente dans les populations.

Les associations peuvent être difficiles à établir, car la plupart des traits sont contrôlés par de nombreux facteurs. Prenons un trait comme la taille, par exemple. Bien que vous ayez sans doute appris que les phénotypes sont contrôlés par des allèles dominants et récessifs, les caractères complexes comme la taille sont contrôlés par des centaines de gènes. Chacun de ces gènes a des allèles différents qui peuvent vous influencer en étant un peu plus grands ou un peu plus courts. Pour la grande majorité d'entre eux, nous n'avons aucune idée si un allèle est dominant, récessif ou affiche une autre relation de dominance. Vous savez peut-être que pour un gène en particulier, vous avez un allèle associé à une augmentation de la taille. Mais c'est uniquement lorsque vous additionnez l'effet de tous les allèles de tous ces gènes et que vous incluez des influences extérieures telles que le régime alimentaire pour lesquelles votre taille réelle est établie.

C'est ce que nous essayons de tester aujourd'hui. Des associations ont été rapportées entre les allèles Per3 et les préférences du matin ou du soir, alors que d'autres études n'en ont trouvé aucune. Qu'il s'agisse ou non d'une véritable association et de la force d'une association, la question reste ouverte. Comme dans toutes les études d'association, une taille d'échantillon suffisante et des tests statistiques sont nécessaires pour établir une corrélation

réelle. Dans ce laboratoire, votre classe peut apporter les données que vous collectez pour aider à établir l'importance du gène Per3 pour déterminer les préférences du matin ou du soir!

Commençons avec la science basée sur l'investigation

Dans ce kit, vous utiliserez la PCR pour amplifier un segment du gène Per3 (à partir de votre propre ADN) et une électrophorèse sur gel pour observer directement si vous êtes porteur du génotype à 4 répétitions ou à 5 répétitions de ce VNTR dans un gène de l'horloge circadienne. Les allèles à 4 répétitions seront amplifiés en tant que fragment de 230 paires de bases, tandis que les segments à 5 répétitions seront amplifiés en tant que fragment de 284 paires de bases. Nous prendrons également un simple questionnaire d'auto-évaluation qui nous aidera à déterminer notre chronotype, ou votre préférence circadienne phénotypique (que vous soyez de type matin ou soir).

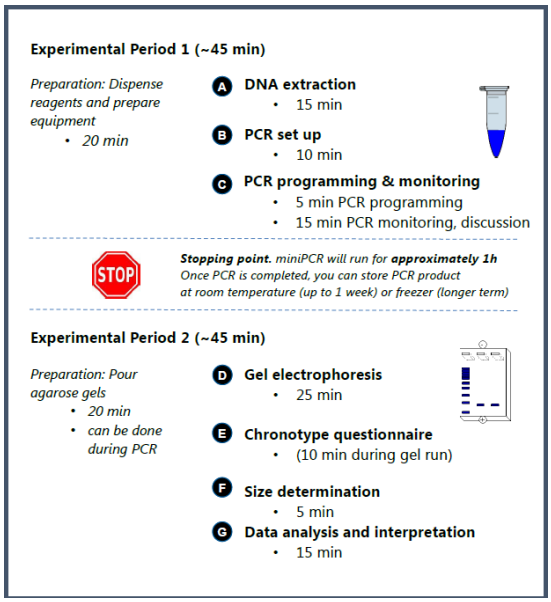
Nous espérons que la correspondance des chronotypes avec les génotypes de nombreux étudiants, et l'agrégation ultérieure des données, nous aideront à éclaircir la question de cette association génétique rapportée entre les préférences Per3 VNTR et circadiennes. Grâce à ce laboratoire, tout le monde peut devenir un chercheur en biologie circadienne!

N'oubliez pas que, comme pour de nombreux autres traits, votre horloge circadienne et vos habitudes de sommeil ne sont pas uniquement déterminées par la génétique. La société moderne est remplie de lumière artificielle, de caféine, de changements d'horaires d'alimentation, d'obligations professionnelles et scolaires, ainsi que d'autres signaux externes qui interagissent avec les comportements de sommeil intrinsèques (chronotypes). Bien que vos gènes puissent vous prédisposer à certains comportements de sommeil, votre environnement modifie néanmoins ces schémas de manière inattendue.

Note à l'enseignant:

Lors de l'établissement d'une association génétique, il est important de se rappeler que le phénotype d'un élève n'est pas très prédictif de son phénotype. En effet, c'est un message important à retenir de ce kit. Même si le Per3 est associé à la veille du matin ou du soir, cette association ne peut être constatée que lorsque l'on regarde les moyennes de grands ensembles de données. L'une des principales leçons de ce kit est que le génotype et le phénotype ne sont pas toujours liés aussi étroitement que l'on voudrait bien le croire. Le génotype et le phénotype de chaque élève ne correspondent pas comme ils pourraient s'y attendre, ce qui peut constituer un bon point de départ pour des discussions sur les phénotypes complexes, les intrants environnementaux et le déterminisme génétique.

MANIPULATION



✓ Distribuer 1 microtube PCR et un cure-dent par élève, les élèves doivent noter leurs initiales sur le côté de chaque tube (et non sur son capuchon).

REMARQUE:
Pour une efficacité maximale de l'extraction de l'ADN, il ne faut pas ***manger ou mâcher du chewing-gum environ 20 minutes avant la collecte des cellules de la joue***

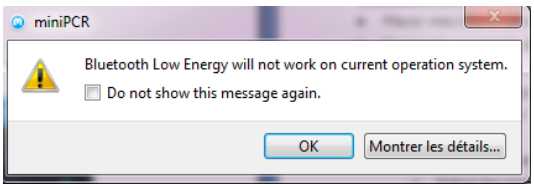
1. **Extraction d'ADN (chaque élève va faire l'ensemble de la manipulation comme décrite ci-dessous) :**

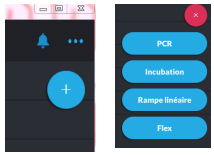
   a. **Prélèvement**

- Placer 50 µL de tampon d'extraction d'ADN X-Tract™ dans chaque tube de 200 µL.
- Gratter l'intérieur de la joue 5 à 6 fois avec un cure-dent pour recueillir les cellules au bout du cure-dent. Frottez doucement le long de la joue, ça ne doit pas faire mal!
- Trempez le cure-dent dans le tube de 200 µL en le faisant tournoyer dans le tampon X-Tract ™
- Bien agiter le cure-dent dans le tampon pour libérer les cellules
- boucher hermétiquement les tubes

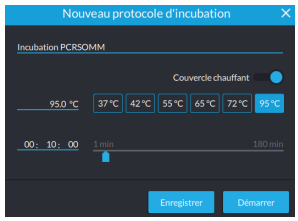
   b. **Incubation : 10 minutes à 95 ° C.**

- Utilisez le mode incubation du miniPCR ou un bain marie à 95 ° C. Veillez à bien fermer les couvercles des tubes
- Programmation du logiciel
  - Ouvrer le logiciel miniPCR
  - NB : quand le logiciel se lance sur un ordinateur le message suivant apparait : cliquer sur OK.





- Cliquer sur le '+' pour créer un programme d'incubation
- Choisir incubation
- Entrez un nom pour le protocole; par exemple "PCRSOMM groupe 1"
- Entrez les paramètres du protocole d'incubation 10 min à 95°C



- Insérer les tubes et fermer le couvercle de la machine PCR. Serrer doucement le couvercle à l'aide du bouton de réglage
- Retirer les tubes et les laisser reposer dans un portoir à température ambiante

REMARQUE:
Il est recommandé d'utiliser l'extrait d'ADN immédiatement pour la PCR

2. <u>Mise en place de la PCR : préparation des tubes</u>

REMARQUE: Les cônes des micropipettes doivent être changés à chaque pipetage !

- Ajouter les réactifs suivants dans chaque tube :

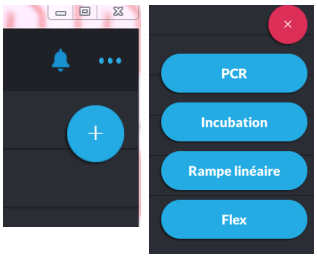
PRIMER MIX	20 µl
MASTER MIX 5X	5 µl
EXTRAIT DE L'ADN	3 µl
<u>Volume final</u>	**<u>28 µl</u>**

REMARQUE: L'ADN sera prélevé en haut du tube d'extraction, s'il y a un précipité trouble au fond du tube, veillez à ne pas le transférer dans le PCR.

- Aspirer et refouler plusieurs fois avec la micropipette pour bien mélanger les réactifs de PCR.
- Idéalement, passer les tubes à la centrifugeuse
- Boucher fermement les tubes

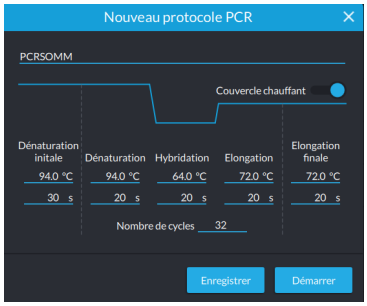
3. <u>Préparation du cycle de PCR</u>

- Placer mes tubes dans le thermocycleur
- Fermez le couvercle de la machine PCR et serrez doucement le couvercle
- Programmation et surveillance de la PCR



  - Ouvrer le logiciel miniPCR
  - Cliquer sur le '+' pour créer un programme de PCR
  - Choisir PCR
  - Entrez un nom pour le protocole; par exemple "PCRSOMM groupe 1"
  - Entrez les paramètres du protocole PCR:

    Dénaturation initiale 94 ° C 30 sec
    Dénaturation 94 ° C 20 sec
    Hybridation 57 ° C 20 sec
    Extension 72 ° C 20 sec
    Elongation finale 72°C 30 sec
    Nombre de cycles 32



  - Cliquez sur "Enregistrer" pour enregistrer le protocole.
  - Cliquez sur "Démarrer" pour lancer le cycle

NB : Assurez-vous que l'interrupteur d'alimentation à l'arrière du miniPCR est en position ON

Le logiciel miniPCR permet à chaque groupe de surveiller les paramètres de sa PCR en temps réel et d'exporter les données de réaction pour analyse sous forme de feuille de calcul.
Une fois que la PCR est terminée (environ 60 minutes), l'écran affichera: «Statut: Terminé». Tous les voyants de la machine miniPCR s'allumeront.
Vous pouvez maintenant ouvrir le couvercle miniPCR et retirer vos tubes.
Attention à ne pas toucher le couvercle en métal qui peut encore être chaud
NB : Les amplifications peuvent se conserver 1 semaine au réfrigérateur ou 1 an au congélateur.

4. Électrophorèse sur gel

Si ce TP doit être effectué sur deux périodes de cours, les gels peuvent être préparés jusqu'à un jour avant la deuxième période et conservés au réfrigérateur, dans une pellicule de plastique et à l'abri de la lumière.

A. Préparer un gel d'agarose à 2% en utilisant du TBE 1X
   a. Ajustez les volumes et les poids en fonction de la taille de votre plateau de gel
   b. Par exemple, ajoutez 1 g d'agarose à 50 ml de tampon d'électrophorèse.
      ✓ Pour blueGel ™: 0,4 g d'agarose dans 20 ml de tampon d'électrophorèse 1X TBE
   c. Mélanger les réactifs dans une fiole ou un bécher en verre et agiter pour mélanger
   d. NB :Si vous versez plus d'un gel, vous pouvez dissoudre tout l'agarose en même temps (par exemple 4 g dans 200 ml pour 4 gels).
   e. Chauffez le mélange à l'aide d'un micro-ondes ou d'une plaque chauffante jusqu'à ce que la poudre d'agarose soit dissoute et que la solution devienne claire
   f. Soyez prudent, car le mélange a tendance à faire des bulles et est très chaud
   g. Laisser la solution d'agarose refroidir pendant environ 2-3 minutes à la température ambiante.
   h. Agiter la fiole par intermittence
   i. Le révélateur d'ADN GelGreen est conseillé avec ce kit, ajoutez maintenant 2 µL pour 20 ml de gel

Vous pouvez également travailler avec le SAFEGREEN, mais il se place dans l'échantillon juste avant les dépôts. Avec ce kit, le résultat est un peu moins bon car il y a déjà une solution de dépôt dans les réactifs MINIPCR, qui diminue un peu la sensibilité du SAFEGREEN. Cela dit, cela reste tout à fait exploitable. Le résultat avec le SAFEGREEN est toutefois meilleur sans solution de dépôt (qu'il remplace) par exemple dans nos kits SORDALAB. Attention vous ne pouvez pas utiliser GelGreen et SAFEGREEN, c'est l'un ou l'autre !

   j. Versez la solution d'agarose dans le plateau de coulée de gel avec un peigne (le peigne a 13 puits est idéal pour faire plus de dépôts par gel, si vos élèves sont à l'aise pour le dépôt (puits plus petits). Sinon préférez le côté 9 puits qui fera de plus gros puits.
   k. Laissez le gel se solidifier complètement (jusqu'à ce qu'il soit ferme au toucher) et retirez le peigne. Typiquement, 10-20 minutes
   l. Placez le gel dans la chambre d'électrophorèse et recouvrez-le de tampon d'électrophorèse 1X TBE.

B. Electrophorèse sur gel: dépôts des échantillons
   a. Assurez-vous que le gel est complètement immergé dans un tampon d'électrophorèse
   b. Assurez-vous qu'il n'y a pas de bulles d'air dans les puits (secouez doucement le gel si les bulles doivent être délogées)
   c. Remplissez tous les réservoirs de la chambre d'électrophorèse et ajoutez juste assez de tampon pour couvrir le gel et les puits
   d. Utilisateurs de blueGel ™: n'utilisez pas plus de 25 ml de tampon d'électrophorèse.

e. **Charger les échantillons d'ADN sur le gel dans l'ordre suivant en cas d'utilisation du GelGreen :**

Puits 1: marqueur de taille d'ADN : 10 µL ; Puits 2: 14µL de l'échantillon 1 ; Puits 3: 14 µL de l'échantillon 2
Puits 4: 14 µL de l'échantillon 3, etc…

f. **Charger les échantillons d'ADN sur le gel dans l'ordre suivant en cas d'utilisation du SAFEGREEN :**
g. Ajouter 3µL de SAFEGREEN dans chaque échantillon
h. Bien homogénéiser, puis déposer 15µL d'échantillon dans les puits
i. Pour le marqueur de poids moléculaire, il faut ajouter 2µL de SAFEGREEN pour 10 µL de marqueur. Préparer un tube correspondant en fonction du nombre de dépôt de marqueur qie vous souhaitez faire (cela dépend du nombre de dépôt que vous faites faire par gel : 1 dépôt de marqueur par ligne de dépôt sur chaque gel est suffisant)

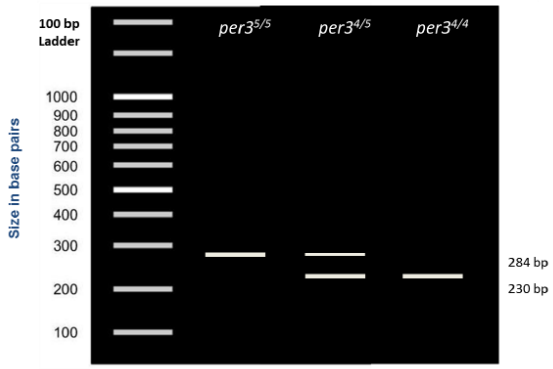
Remarque: il n'est pas nécessaire d'ajouter un colorant de chargement de gel à vos échantillons.

j. Placez le couvercle sur la boîte d'électrophorèse en gel
k. Assurez-vous que les bornes des électrodes sont bien en place
l. Avec une cuve autre que BLUEGEL : réglez la tension à 100-130V et procédez à une électrophorèse pendant ~20 minutes ou jusqu'à ce que le colorant coloré ait progressé jusqu'à environ la moitié de la longueur du gel
m. si vous utilisez blueGel ™, appuyez simplement sur le bouton «Run». Vous pouvez également allumer la lumière et suivre la migration en temps réel.
n. Vérifiez que de petites bulles se forment près des bornes dans la boîte
o. Des temps d'électrophorèse plus longs donneront une meilleure résolution de taille
p. Une fois l'électrophorèse terminée, mettez l'appareil hors tension et retirez le gel de la boîte.

C. <u>Détermination de la taille et interprétation</u>

a. Placez le gel sur le transilluminateur à lumière bleue
Si vous utilisez blueGel ™, appuyez simplement sur le bouton de l'illuminateur.
Si vous utilisez une lampe à UV (déconseillé), couvrez toute la peau exposée et couvrez les yeux avec des lunettes de protection anti-UV.
b. Vérifier la présence du produit PCR (fluorescent)
c. Assurez-vous que la résolution de la bande d'ADN est suffisante dans la plage de 100 à 300 paires de bases (pb) de l'échelle d'ADN à 100 pb.
    a. Faites fonctionner le gel plus longtemps si nécessaire pour augmenter la résolution
    b. L'échelle d'ADN devrait ressembler approximativement à l'illustration
    c. Prendre en photo le gel
    d. Avec BLUEGEL : placer la chambre noire, permet de prendre facilement une belle photo

D. Résultats attendus



Cette image schématique montre les résultats expérimentaux idéalisés.
L'intensité des bandes dépendra de:
o l'efficacité de la réaction PCR
o La qualité des réactifs de détection et du système

• Les schémas de migration du produit de PCR varieront en fonction de :
o La durée de l'électrophorèse
o la tension d'électrophorèse

Une étude a révélé la distribution suivante des génotypes chez les étudiants universitaires norvégiens:
o 192 *per*3$^{4-4}$ (44%)
o 191 *per*3$^{4-5}$ (44%)
o 49 *per*3$^{5-5}$ (11%)

▪ Pouvez-vous déterminer la fréquence des allèles *per*3$^{4-4}$ et $^{-5}$ dans cet échantillon?
▪… Et dans ta classe?

QUESTIONNAIRE: DU MATIN AU SOIR ?

Ce questionnaire d'autoévaluation permettant de déterminer votre chronotype de rythme circadien peut être effectué pendant les cycles de PCR ou d'électrophorèse sur gel.
Nom (ou numéro d'échantillon): _____ Date: _____

Pour chaque question, veuillez sélectionner la réponse qui vous décrit le mieux en encerclant la valeur qui indique le mieux ce que vous avez ressenti au cours des dernières semaines.

1. Approximativement à quelle heure te lèverais-tu si tu étais entièrement libre de planifier ta journée?
[5] de 5h00 à 6h30 (de 05h00 à 06h00)
[4] 6 h 30 à 7 h 45 (6 h 30 à 07 h 45)
[3] 7 h 45 à 9 h 45 (de 07 h 45 à 09 h 45)
[2] De 9h45 à 11h00 (de 09h45 à 11h00)
[1] 11h00-12h00 (11h00-12h00)

2. Approximativement à quelle heure iriez-vous au lit si vous étiez entièrement libre de planifier votre soir?

[5] 20h à 21h (20h à 21h)
[4] De 21 h à 22 h 15 (de 21 h à 22 h 15)
[3] 22 h 15 à 12 h 30 (22 h 15 à 30 h 30)
[2] 12 h 30 à 13 h 45 (00 h 30 à 01 h 45)
[1] 1 h 45 à 3 h 00 (de 01 h 45 à 03 h)

3. Si vous devez généralement vous lever le matin à quelle heure compter sur un réveil?

[4] Pas du tout
[3] légèrement
[2] Un peu
[1] beaucoup

4. Dans quelle mesure trouvez-vous qu'il est facile de se lever le matin (quand vous n'êtes pas réveillé?) inopinément)?

[1] Très difficile
[2] Un peu difficile
[3] Assez facile
[4] Très facile

5. A quel point vous sentez-vous alerte pendant la première demi-heure après votre réveil?

[1] Pas du tout alerte
[2] Légèrement alerte
[3] Assez alerte
[4] Très alerte

6. Avez-vous faim pendant la première demi-heure après votre réveil?

[1] Pas du tout faim
[2] légèrement faim
[3] Assez faim
[4] Très faim

7. Comment vous sentez-vous pendant la première demi-heure après votre réveil?

[1] Très fatigué
[2] Assez fatigué
[3] Assez rafraîchi
[4] Très rafraîchi

8. Si vous n'aviez aucun engagement le lendemain, à quelle heure iriez-vous au lit par rapport à votre heure de coucher habituelle?

[4] Rarement ou jamais plus tard
[3] Moins d'une heure plus tard
[2] 1-2 heures plus tard
[1] Plus de 2 heures plus tard

9. Vous avez décidé de faire de l'exercice physique. Un ami suggère que vous le fassiez pendant une heure deux fois par semaine et que le meilleur moment pour lui se situe entre 7h et 8h (07h08). Ne gardant à l'esprit que votre propre «horloge» interne, comment pensez-vous que vous performeriez?

[4] serait en bonne forme
[3] Serait sous une forme raisonnable
[2] trouverait difficile
[1] trouverait cela très difficile

10. Vers quelle heure du soir vous sentez-vous fatigué et avez besoin de dormir?

[5] 20h à 21h (20h à 21h)
[4] De 21 h à 22 h 15 (de 21 h à 22 h 15)
[3] 22 h 15 à 12 h 45 (22 h 15 à 00 h 45)
[2] De 12h45 à 2h00 (de 00h45 à 02h00)
[1] de 2h00 à 3h00 (de 02h00 à 03h00)

11. Vous voulez être au maximum de vos performances pour un test dont vous savez qu'il sera épuisant mentalement et durera deux heures. Vous êtes entièrement libre de planifier votre journée. En considérant uniquement votre "horloge interne", lequel des quatre temps de test choisiriez-vous?

[6] 8 heures-10 heures (08-10 heures)
[4] 11 heures-13 heures (11-13 heures)
[2] 15h-17h (15-17h)
[0] 19 heures – 21 heures (19–21 h)

12. Si vous étiez au lit à 23 heures (23 heures), à quel point seriez-vous fatigué?

[0] Pas du tout fatigué
[2] Un peu fatigué
[3] Assez fatigué
[5] Très fatigué

13. Pour une raison quelconque, vous êtes allé vous coucher plusieurs heures plus tard que d'habitude, mais il n'est pas nécessaire de vous lever à toute heure du lendemain matin. Lequel des suivants êtes-vous le plus susceptible de faire?

[4] Se réveille à l'heure habituelle, mais ne s'endort pas
[3] Se réveillera à l'heure habituelle et s'assoupira ensuite
[2] Se réveillera à l'heure habituelle, mais s'endormira à nouveau
[1] Ne se réveille pas plus tard que d'habitude

14. Une nuit, vous devez rester éveillé entre 4h et 6h (4h-6h) pour pouvoir effectuer une veille de nuit. Vous n'avez aucun engagement de temps le lendemain. Laquelle des alternatives vous conviendrait le mieux?

[1] Je n'irais pas me coucher avant la fin du quart
[2] Je ferais une sieste avant et je dormirais après
[3] Prendrait un bon sommeil avant et sieste après
[4] Je ne dormirais que devant la montre

15. Tu as deux heures de dur travail physique. Vous êtes entièrement libre de planifier votre journée.
En considérant uniquement votre "horloge interne", lequel des temps suivants choisiriez-vous?

[4] 8 heures-10 heures (08-10 heures)
[3] 11 heures-13 heures (11-13 heures)
[2] 15h-17h (15-17h)
[1] 19 heures-21 heures (19–21 h)

16. Vous avez décidé de faire de l'exercice physique. Une amie suggère que vous le fassiez pour une heure deux fois par semaine. Le meilleur moment pour elle est entre 22 et 23 heures. Si vous ne pensez qu'à votre horloge interne, à quel point pensez-vous que vous performeriez?

[1] serait en bonne forme
[2] Serait sous une forme raisonnable
[3] trouverait difficile
[4] trouverait cela très difficile

17. Suppose que tu peux choisir tes propres heures de travail. Supposons que vous travaillez cinq heures par jour (pauses comprises), que votre travail est intéressant et que vous êtes rémunéré en fonction de vos performances. Vers quelle heure choisirais-tu de commencer?

[5] 5 heures débutant entre 4 h et 8 h (05 h 08)
[4] 5 heures entre 08h00 et 09h00
[3] 5 heures au départ de 9h à 14h
[2] 5 heures entre 14 h et 17 h
[1] 5 heures entre 17 h et 04 h (17 h 04)

18. Vers quelle heure de la journée vous sentez-vous le mieux?

[5] 5 à 8 heures (05 à 08 h)
[4] 8h-10h (08h-10h)
[3] 10 heures-17 heures (10-17 heures)
[2] 17 heures-22 heures
[1] 10 heures – 5 heures (22 h 05)

19. On parle de «types du matin» et de «types de soirée». Lequel de ces types vous considérez-vous?

[6] Certainement un type du matin
[4] Plutôt un type matinal qu'un type soirée
[2] Plutôt un type de soirée qu'un type de matin
[1] Certainement un type de soirée

INTERPRÉTER ET UTILISER VOTRE SCORE DE MATINÉE ET DE SOIRÉE

Ce questionnaire comporte 19 questions, chacune comportant un certain nombre de points. Tout d'abord, additionnez les points encadrés et entrez votre score total matin-soir ici: _____

Les scores peuvent aller de 16 à 86.

- Les scores de 41 et moins indiquent «types de soirée».
- Les scores entre 42 et 58 indiquent des "types intermédiaires".
- Les scores de 59 et plus indiquent «types du matin».

16-30	31-41	42-58	59-69	70-86
Definite evening	Moderate evening	Intermediate	Moderate morning	Definite morning

Parfois, une personne a des problèmes avec le questionnaire. Par exemple, il est difficile de répondre à certaines questions si vous avez eu un horaire de travail posté, si vous ne travaillez pas ou si votre heure de coucher est inhabituellement en retard. Vos réponses peuvent être influencées par une maladie ou des médicaments que vous prenez.

Une façon de vérifier ceci est de demander si votre score du matin au soir correspond approximativement aux heures de début et de réveil indiquées ci-dessous:

Score	16-30	31-41	42-58	59-69	70-86
Sleep onset	2.00 am-3.00 am	12.45 am-2.00 am	10.45 pm-12.45 am	9.30 pm - 10.45 pm	9.00 pm – 9.30 pm
Wake up	10.00 am - 11.30 am	8.30 am-10.00 am	6.30 am - 8.30 am	5.00 am – 6.30 am	4.00 am – 5.00 am

Partagez vos données: aidez-nous à mieux comprendre cette association génétique postulée.

La plupart des phénotypes sont des traits complexes, avec de multiples composantes génétiques et environnementales. Les associations génétiques sont difficiles à établir sans équivoque, et les études d'association sont notoirement difficiles à reproduire, notamment en raison de la taille réduite de l'échantillon. En compilant des données anonymisées dans nos salles de classe, nous pouvons contribuer à une meilleure compréhension de cette association supposée entre les allèles Per3 et les préférences de sommeil.

Si vous souhaitez ajouter des données anonymisées de votre classe à cette enquête en cours, veuillez contacter: team@minipcr.com.

Nous sommes heureux de fournir des conseils sur la collecte, l'anonymisation et le partage de données (dans le format fourni ici: https://www.minipcr.com/wp-content/uploads/sleep-lab-data.xlsx).

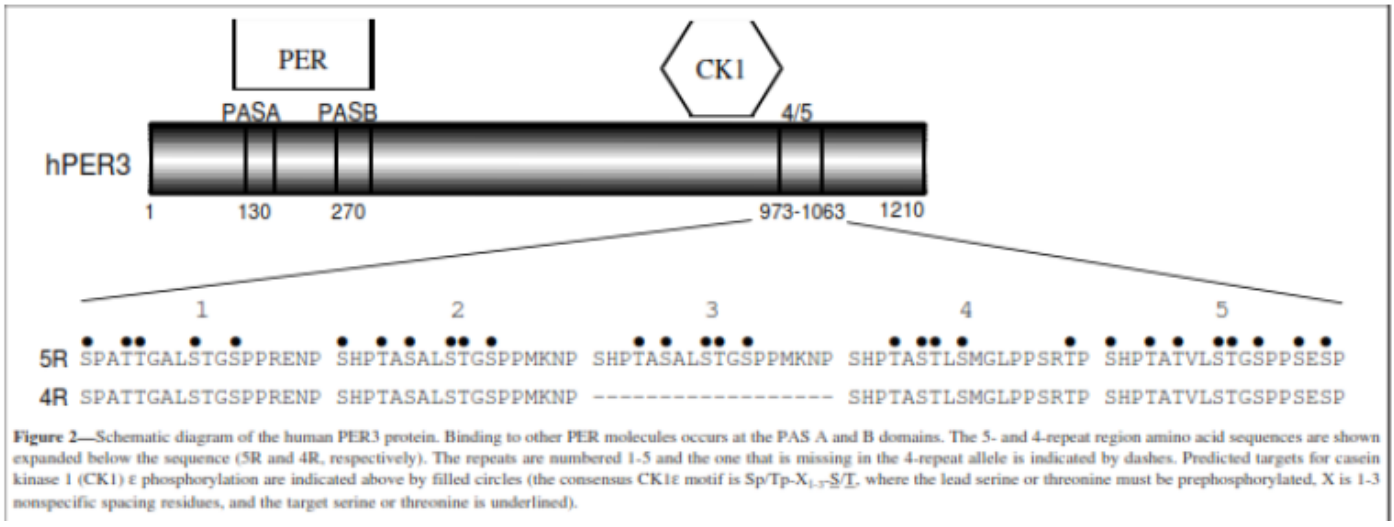


Figure 2—Schematic diagram of the human PER3 protein. Binding to other PER molecules occurs at the PAS A and B domains. The 5- and 4-repeat region amino acid sequences are shown expanded below the sequence (5R and 4R, respectively). The repeats are numbered 1-5 and the one that is missing in the 4-repeat allele is indicated by dashes. Predicted targets for casein kinase 1 (CK1) ε phosphorylation are indicated above by filled circles (the consensus CK1ε motif is Sp/Tp-X_{1-3}-S/T, where the lead serine or threonine must be prephosphorylated, X is 1-3 nonspecific spacing residues, and the target serine or threonine is underlined).

Pour rappel, CLOCK et BMAL1 sont des facteurs de transcription activant l'expression des gènes de l'horloge circadienne, comprenant Période (PER) et Cryptochrome (CRY). Les protéines PER et CRY sont à leur tour des répresseurs de l'activité CLOCK / BMAL1, interrompant leur propre activation.

Les protéines PER et CRY s'accumulent tout au long de la journée circadienne et culminent tôt dans la nuit lorsqu'elles entrent dans le noyau et désactivent leur propre transcription en bloquant Clock et Bmal1 (voir l'encadré p. 5 pour un modèle schématique).

Les protéines PER subissent une phosphorylation par deux kinases, des enzymes qui phosphorylent (relient de manière covalente des groupes phosphate) à d'autres protéines dans le cadre de processus de signalisation dans la cellule. Les kinases de la boucle de rétroaction circadienne sont les caséine kinase 1 δ et ε (CK1δ et CK1ε) et il est connu que, en phosphorylant les protéines PER et CRY, elles les ciblent en vue de leur dégradation, ce qui entraîne une diminution des niveaux de protéines PER et CRY au début de la journée circadienne. . Avec de faibles niveaux

PER et CRY, la répression de Clock / BMAL1 est levée et la transcription peut recommencer. Ainsi, un nouveau cycle circadien commence tôt dans la journée prospective.
Hypothèses d'un modèle où PERIOD3 subit une phosphorylation de la même manière que celle décrite ci-dessus et que le VNTR à 5 répétitions ajoute de nouveaux sites de phosphorylation à la protéine PER3, demandez aux étudiants de dessiner un modèle permettant au polymorphisme de Per35 / 5 de provoquer un phénotype de l'alouette du matin.

QUESTIONS D'ETUDE

1. Quels sont certains processus physiologiques contrôlés par votre horloge circadienne?
• cycles veille-sommeil
• libération d'hormones
• Température corporelle
• Évitement des prédateurs à l'état sauvage
• Captage d'énergie (plantes)
• Horloge circadienne anormale associée à l'obésité, au diabète, à la dépression et aux troubles bipolaires
2. Les gens doivent souvent se lever plus tôt le matin les jours de semaine que les week-ends. Pour cette raison, les gens se couchent souvent tôt les soirs de la semaine, mais veillent tard le week-end. D'après ce que vous avez appris sur les horloges circadiennes, que pensez-vous d'avoir un horaire différent à différents moments de la semaine?
• Les rythmes circadiens sont résistants au changement sur des périodes aussi courtes.
• Bien qu'une personne puisse modifier son cycle veille-sommeil avec des entrées provenant de sources lumineuses ou autres, une telle commutation rapide d'horaires horaires ne sera probablement pas bien tolérée.
3. Les personnes qui travaillent de nuit sont souvent diagnostiquées avec ce qu'on appelle un «trouble du travail posté». Le trouble se caractérise par une somnolence excessive lorsque vous essayez de vous éveiller (tout en travaillant tard le soir) et par le fait de ne pas pouvoir dormir lorsque vous essayez de le faire (pendant le jour). Ceci en dépit du fait que ces travailleurs vont souvent essayer de garder le même horaire pendant de longues périodes. Pourquoi pourrait-il être difficile de changer votre rythme circadien pour être éveillé la nuit et dormir la journée même lorsque vous essayez de dormir autant que vous le voulez normalement?
• Vos rythmes circadiens peuvent être réinitialisés en fonction d'influences extérieures, ce qui permet de décaler votre horloge.
• Cependant, de nombreuses influences extérieures qui contrôlent votre horloge circadienne sont hors de votre contrôle. La principale de ces influences est la lumière du soleil.
• Une personne travaillant de nuit aura toujours une horloge fortement influencée par les cycles de luminosité et d'obscurité.
L'horloge circadienne est décrite comme une «boucle de rétroaction négative de transcription-traduction». Qu'est-ce qu'une boucle de rétroaction négative? Pouvez-vous décrire une boucle de rétroaction négative de transcription-traduction en termes simples?
• Une boucle de contre-réaction est une boucle dans laquelle l'augmentation d'un signal réduit à son tour la production de ce même signal.
• Une boucle de rétroaction négative de transcription-traduction est une boucle dans laquelle le produit de la traduction d'un gène en protéine entraîne l'inhibition de la transcription dans le même gène que celui qui a produit la protéine.
• L'augmentation d'une protéine dans la cellule entraînera une diminution de la production de cette même protéine.
5. Quels sont les deux allèles discutés dans ce laboratoire? Comment diffèrent-ils génétiquement?

• Le gène Per3 a deux allèles. Ils diffèrent par le nombre de VNTR (répétitions) trouvés dans le gène. Un allèle a 4 répétitions. L'autre a 5 répétitions. Ils diffèrent donc en longueur de 54 paires de bases (taille de l'unité répétitive).

6. Pour quelles raisons le fait d'avoir un allèle montrant une association avec un certain trait ne signifie-t-il pas qu'une personne présente réellement ce trait?

• La plupart des traits sont complexes et sous l'influence de nombreux gènes différents.

• Connaître les allèles d'un seul gène peut indiquer à une personne qu'elle est plus susceptible d'afficher un trait particulier, mais le phénotype réel dépend de l'entrée totale de nombreux allèles dans plusieurs loci, chacun ayant des effets différents.

• Les facteurs environnementaux peuvent également affecter les phénotypes de manière à masquer les intrants génétiques.

7. Le fait d'être une «personne du matin» ou une «personne du soir» dépend-il uniquement de votre horloge circadienne?

• Préférablement pas. De nombreux facteurs affectent les horloges circadiennes, notamment les facteurs environnementaux tels que la lumière artificielle, l'environnement social et les habitudes comportementales.

8. La génétique inverse utilise des techniques telles que l'étouffement d'un gène (l'éteindre) pour apprendre les effets que cela a sur l'organisme. Quels pourraient être certains avantages des études d'association par rapport aux techniques de génétique inverse? Quelles pourraient être les limitations?

• La génétique inverse utilisant des mutants et des knockouts n'est pas possible chez l'homme pour plusieurs raisons.

• Les études d'association permettent d'identifier les variations génétiques humaines réelles dans les populations affectant un phénotype d'intérêt.

• Une des limites est que les associations peuvent être très difficiles à établir et ont tendance à exiger de très grands ensembles de données et des contrôles adéquats pour atteindre une signification statistique.

Questions post-laboratoire

1. Selon le questionnaire, êtes-vous un «type soirée», «type matin» ou «type intermédiaire»? Votre résultat correspond-il à ce que vous pensez normalement de vous-même?

2. Quel est votre génotype et, en supposant que l'association génétique soit vérifiée, que suggère-t-il à propos de votre phénotype attendu?

3. Quelles sont les raisons pour lesquelles votre génotype et le phénotype perçu peuvent ne pas avoir correspondu?

• L'association dans ce laboratoire n'est toujours pas fermement établie. Il est possible que le génotype Per3 n'affecte pas les préférences du matin ou du soir.

• Les facteurs environnementaux peuvent avoir de grandes répercussions sur le sommeil: caféine, horaires de réveil artificiel, etc.

• Le sommeil est un trait génétique complexe, et d'autres gènes sont connus pour influencer ou modifier ce phénotype d'une autre manière.

4. Regardez maintenant les données de votre classe. Quel est le score moyen du soir pour les élèves homozygotes 4/4, 4/5 hétérozygotes et 5/5 homozygotes? Pourquoi est-il plus important d'examiner les moyennes de groupe que les scores individuels?

• Les associations ne prédisent pas nécessairement bien les phénotypes individuels. L'arrière-plan génétique peut masquer l'influence de gènes uniques, tout comme les facteurs environnementaux.

• Les moyennes des groupes peuvent indiquer une tendance chez les individus ayant un allèle particulier à montrer un phénotype particulier, même lorsque le groupe présente un degré de variation élevé.

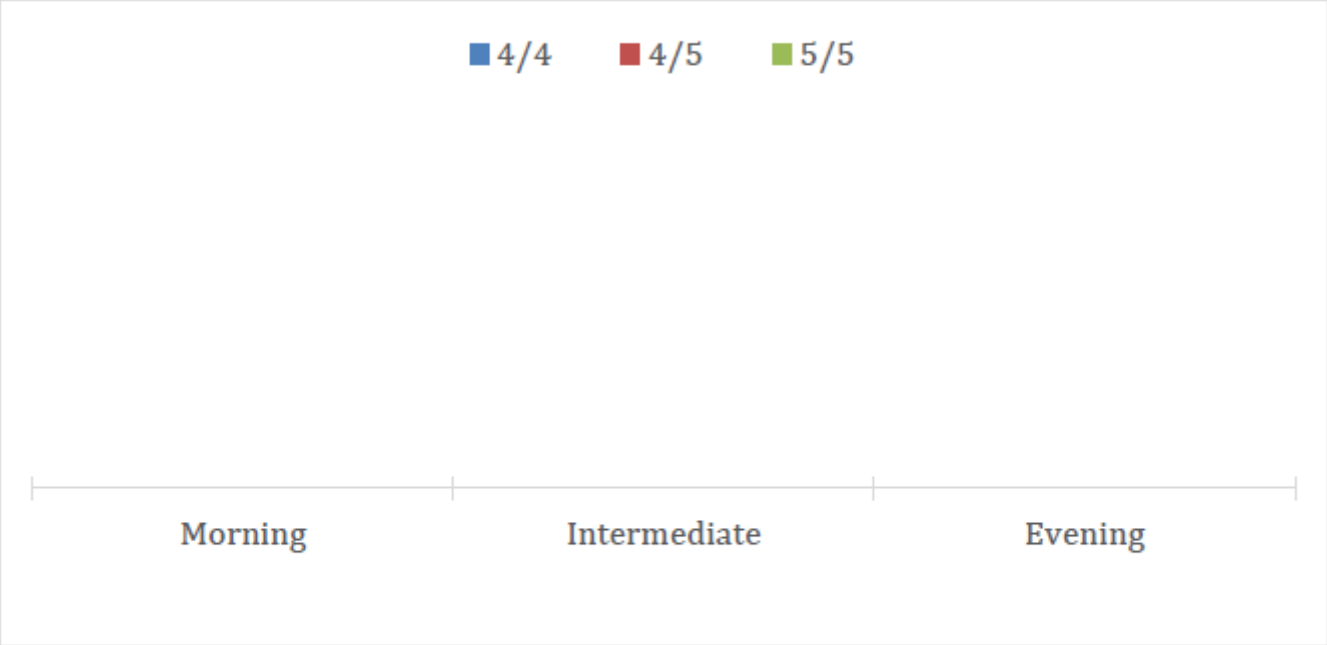
Examinons maintenant les données de classe légèrement différemment.

5. Combien d'allèles totaux à 4 répétitions y avait-il dans vos données de classe?

▪ N'oubliez pas que 4/4 homozygotes ont chacun 2 allèles. 4/5 hétérozygotes n'en auront qu'un.
6. Quel pourcentage des allèles totaux pour chaque allèle de phénotype à 4 répétitions?
7. Combien y a-t-il d'allèles totaux à 5 répétitions dans vos données de classe?
▪ N'oubliez pas que 5/5 homozygotes ont chacun 2 allèles. 4/5 hétérozygotes n'en auront qu'un.
8. Quel pourcentage des allèles totaux pour chaque allèle de phénotype à 4 répétitions?
9. Comparez les deux ensembles de pourcentages. Voyez-vous une tendance à partir des données?
10. Les données de votre classe montrent-elles une association possible entre l'allèle Per3 et la préférence du matin ou du soir?
11. Pourquoi devriez-vous utiliser des échantillons de grande taille et un test statistique pour déterminer si une association est réelle ou non?
• De nombreuses associations ont un petit effet. Il est très possible qu'une petite taille d'échantillon ne capture pas d'association en raison d'une erreur d'échantillonnage.
• Un test statistique est nécessaire pour établir la probabilité qu'une corrélation puisse être due au hasard. Il est presque certain que les données collectées dans ce laboratoire indiqueront une tendance d'une certaine ampleur. Un test statistique peut nous dire si nous devons être certains que notre association doit être considérée comme un mécanisme génétique réel.

L'ANALYSE DES DONNEES

Créez un graphique à barres de vos données de classe. Pour chaque chronotype, indiquez combien de chaque génotype étaient présents dans votre classe. (Chaque chronotype devrait avoir trois barres.)



Créer un graphique montrant le score moyen en soirée pour chaque génotype

REFERENCES AND TEACHING RESOURCES

1. "Circadian Clock." *Wikipedia.*

2. "Clockwork Genes. Discoveries in Biological Time." *HHMI Biointeractive*.

3. "The Mammalian Molecular Clock Model." *HHMI Biointeractive*.

4. Archer, SN et. al. "A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference." *Sleep.* 2003 Jun 15;26(4):413-5.

5. Ebisawa, T., Uchiyama, M., Kajimura, N., Mishima, K., Kamei, Y., Katoh, M., Watanabe, T., Sekimoto, M., Shibui, K., Kim, K., et al. "Association of structural polymorphisms in the human *period3* gene with delayed sleep phase syndrome". *EMBO Reports*. 2001. 2, 342–346. 10.

6. Ko, Caroline and Takahasi, Joseph. "Molecular components of the mammalian circadian clock." *Human Molecular Genetics.*

7. Osland TM, et al., "Association study of a variable-number tandem repeat polymorphism in the clock gene PERIOD3 and chronotype in Norwegian university students." *Chronobiol Int.* 2011 Nov;28(9):764-70.

8. Viola, AU et. al. "Per3 polymorphism predicts sleep structure and waking performance." *Current Biology.* 2007 Apr 3;17(7):613-8. Epub 2007 Mar 8