



UNIVERSITÉ DE FRIBOURG
UNIVERSITÄT FREIBURG

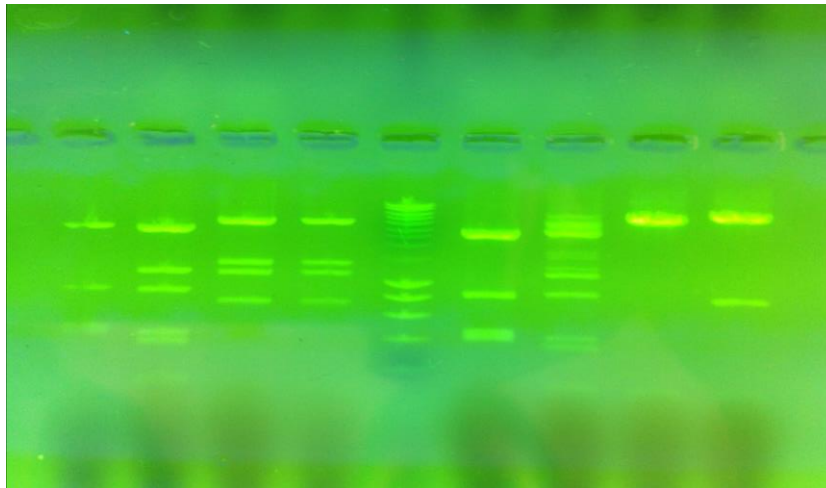
Valise Pédagogique: À la découverte de l'ADN

Une collaboration entre l'Université de Fribourg
et le Musée d'histoire naturelle de Fribourg

L'ADN en phylogénie moléculaire Identification et classification d'espèces

Protocole pour l'enseignant

Sophie BONGARD, Valentin Grandjean, Yann Fragnière
Marie-Pierre Chevron



Relecture : Luc Le Grand, Catherine Pfister Aspert, Lisa Schild
Remerciements : PD D^r Christian Lexer, PD D^r Gregor Kozlowski rand, Mme Marjorie
Berthouzoz, D^r Peter Wandeler

Introduction

La valise pédagogique "À la découverte de l'ADN", accompagnée du kit de l'École de l'ADN de Nîmes, permet d'appliquer en classe la technique des RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Quatre scénarios sont proposés :

- Protocole A :
L'ADN dans la **résistance bactérienne aux antibiotiques** : Identification d'une souche bactérienne grâce à son profil ADN
- Protocole B :
L'ADN dans les **diagnostics médicaux** : Détection d'une maladie génétique chez un patient et analyse de la mutation
- Protocole C :
L'ADN dans les **enquêtes criminelles** : Établissement du profil génétique de trois suspects comparé à de l'ADN trouvé sur une scène de crime
- Protocole D :
L'ADN dans l'**identification et classification d'espèces**: Identification d'une espèce grâce à son profil ADN et construction d'un arbre phylogénétique

Des protocoles accompagnés de théorie et d'exercices sont proposés pour ces quatre expériences dans les documents à l'attention des élèves, disponibles en ligne sur le site du musée : http://www.fr.ch/mhn/fr/pub/ecoles/valise_adn.htm

Ce document à l'attention des enseignants reprend en détail chaque étape de l'expérience pour le scénario D « Identification et classification d'espèces». En attirant votre attention sur les manipulations délicates, il devrait vous permettre d'anticiper de nombreux problèmes pouvant intervenir durant le travail.

Des informations sur le matériel, les produits et leur fonction dans l'expérience sont présentées en bleu dans le texte. Vous devez en prendre connaissance, car certains de ces points concernent la sécurité des élèves (Midori Green, rayonnement UVb).

Une interprétation des résultats est également proposée.

En espérant que cette valise et les documents qui l'accompagnent satisferont vos attentes et celles de vos élèves, il ne nous reste qu'à vous souhaiter, chers collègues, une fructueuse expérience.

Propositions de séquences

Proposition 1

- ♣ Séance 1 : (2x45 min - labo)
 - Lecture du protocole
 - Digestion enzymatique
 - Théorie
- ♣ Séance 2 : (2x45 min - labo)
 - Préparation du TAE
 - Préparation du gel d'agarose
 - Electrophorèse
 - Théorie
 - Révélation du gel
- ♣ Séance 3 : (45 min - cours)
 - Analyse des résultats et discussionVoir propositions dans « Prolongations » ci-après.

Proposition 2

- ♣ Séance 1 : (45 min - cours)
 - Théorie
 - Lecture du protocole
 - Utilisation des micropipettes
 - Étiquetage des microtubes
- ♣ Séance 2 : (2x45 min - labo)
 - Préparation du TAE
 - Préparation du gel d'agarose
 - Digestion enzymatique
 - Electrophorèse
 - Révélation du gel
- ♣ Séance 3 : (45 min - cours)
 - Analyse des résultats et discussionVoir propositions dans « Prolongations » ci-après.

Matériel

Valise 1 (noir) :

Chambre UV
Lampe UV
Centrifugeuse
Micropipettes (5x 20µl, 5x 200µl)
Portoirs pour microtubes (3x)
Prises électriques (3x)
Générateur pour électrophorèse
Bain sec chauffant avec bloc aluminium
Vitre pour chambre UV avec cache lumière
Cuve à électrophorèse
Supports de gel (1x) avec peignes (2x)
Pointes de micropipettes
Microtubes
Gants en latex
Agarose
Midori Green
Tampon TAE 50X (Tris-Acétate, EDTA)



Valise 2 (orange/noir) :

LED Illuminator
Agitateur/Plaque chauffante
Centrifugeuse
Micropipettes (6x 20µl, 6x 200µl)
Portoirs/boîtes pour microtubes (2x)
Prises électriques (4x)
Générateur pour électrophorèse
Bain sec chauffant avec bloc aluminium (2x)
Support pour couler les gels
Cuve à électrophorèse
Supports de gel (6x) avec peignes (4x)
Pointes de micropipettes
Microtubes
Gants en latex
Agarose
Midori Green
Tampon TAE 50X (Tris-Acétate, EDTA)



Objets à organiser (non fournis)

Micro-onde, balance de précision, erlenmeyer, eau distillée stérile

Contenu du kit

A commander à l'École de l'ADN de Nîmes : <http://www.ecole-adn.fr/>

Kit « Phylogénie moléculaire »

- ♣ Solutions d'ADN (4 types)
- ♣ Tampon de digestion 10X
- ♣ Enzyme de restriction (Pst1)
- ♣ Tampon de charge
- ♣ Marqueur de taille

Le kit "Empreinte et diagnostic génétique: polymorphisme de restriction" présente différents échantillons d'ADN. Il s'agit de constructions génétiques préparées à partir d'ADN plasmidique contenant différents inserts d'ADN de souris. Ces constructions permettent d'illustrer l'utilisation de la technique des RFLP pour établir un profil ADN. Le profilage d'ADN est utilisé dans l'identification de personnes (enquêtes criminelles), dans la recherche de mutations (pour détecter une maladie génétique ou pour établir des liens de parenté (phylogénie, tests de paternité, ...).

Indications expérimentales

Partie I

Le kit reçu de l'École de l'ADN de Nîmes contient 4 types d'ADN différents. Le n°3 sera considéré comme celui de la Sabline bernoise. Il incombe au professeur de répartir au préalable celui-ci dans deux récipients (l'un deviendra l'échantillon inconnu n°3 des élèves, l'autre le n°5 qui servira de profil de référence de la Sabline bernoise).

Les élèves recevront donc 5 tubes, notés par exemple :

- Site 1 (échantillon récolté au site 1)
- Site 2 (échantillon récolté au site 2)
- Site 3 (échantillon récolté au site 3)
- Site 4 (échantillon récolté au site 4)
- Réf (ADN de la Sabline bernoise)

Pour alléger le travail, la digestion sera faite avec une seule enzyme de restriction (Pst1), ce qui sera suffisant pour obtenir 4 profils différents. Après avoir réalisé la digestion et fait migrer les différents ADN, les élèves compareront les profils des ADN des 4 sites avec celui de la Sabline bernoise, et ainsi trouveront quel site abrite la plante à protéger.

Partie II

Le travail peut ensuite être poursuivi sur ordinateur.

On expliquera aux élèves que les échantillons d'ADN des plantes récoltées ont été envoyés dans un laboratoire pour être séquencés et que l'on a reçu les résultats en retour.

(Pour renforcer la cohérence et la transition entre les parties I et II, les enseignants qui le souhaitent peuvent découper les bandes du gel d'électrophorèse et annoncer aux élèves qu'ils vont le purifier, l'amplifier par PCR et l'envoyer au laboratoire pour séquençage. C'est une pratique qui se fait encore maintenant en laboratoire.)

Grâce au logiciel gratuit Seaview, on pourra comparer les 4 séquences d'ADN et créer un arbre phylogénétique. Les séquences sous forme de fichier texte et le logiciel Seaview sont à télécharger sur le site du musée d'histoire naturelle. Un protocole détaillé pour l'utilisation du logiciel est inclus dans le document destiné aux élèves.

Prolongations

La thématique du laboratoire peut également faire l'objet d'un débat sur la nécessité de la conservation de la biodiversité. En effet, les élèves seront peut-être amenés à se questionner sur l'utilité de préserver une plante telle que la Sabline bernoise.

Manipulations

Préparation du TAE

La première étape consiste à préparer le tampon TAE qui sera utilisé pour le gel d'agarose et le bain d'électrophorèse (dans lequel trempera le gel).

✧ TAE :

Le TAE constitue une solution ionique (tris, acétate, EDTA) permettant au courant de passer. C'est un tampon basique qui a pour propriété de maintenir les molécules d'ADN sous leur forme chargée négativement (déprotonée) et de prévenir partiellement la dégradation des molécules d'ADN par désactivation de certaines enzymes.

Pour une question de transport, le tampon est fourni en solution mère concentrée (TAE **50X**). Il doit donc être dilué dans de l'eau distillée à raison de 1/50. (10 ml TAE 50X dans 500 ml H₂O -> TAE 1X) Sont nécessaires : 60 ml pour la réalisation du gel, 500 ml pour remplir la cuve (réutilisable, à conserver après expérience). Une partie du tampon étant perdue par évaporation, électrolyse et lors de manipulations du gel, on prévoit un léger excès (préparer environ 600 ml total). Pour une seconde utilisation, 100 ml sont généralement suffisants pour préparer le gel et compléter le tampon recyclé de la cuve.

Préparation du gel d'agarose

✧ Agarose :

L'agarose est un polymère à base d'agar-agar. Après dissolution dans un solvant par chauffage, sa polymérisation aboutit à la formation d'un gel plus ou moins dense en fonction de la concentration. C'est dans ce gel que les fragments d'ADN seront séparés en fonction de leur taille. Les concentrations d'agarose utilisées pour la préparation des gels sont déterminées en fonction de différents facteurs : taille des fragments à séparer, qualité de ségrégation recherchée, temps à disposition. Pour cette expérience, un gel d'agarose 0.67% est proposé.

Quantités (dépend de la taille du support de gel):

Support de gel	Agarose	TAE 1X	Midori Green
100 ml (Valise 2)	0.65 g	100 ml	10 µl
80 ml (Valise 2)	0.55 g	80 ml	8 µl
60 ml (Valise 1)	0.4 g	60 ml	6 µl
50 ml (Valise 2)	0.35 g	50 ml	5 µl
20 ml (Valise 2)	0.15 g	20 ml	2 µl

Mélanger l'agarose avec le TAE 1X et porter à ébullition (par exemple au micro-onde). Pour limiter un maximum l'évaporation, on utilise de préférence un erlenmeyer assez grand. ATTENTION : La solution mousse à ébullition, déborde rapidement et peut éclabousser !!! Elle doit donc être surveillée attentivement et retirée rapidement dès l'apparition des bulles (attention aux éclaboussures possibles, portez des manches longues et des gants). L'agarose peut former une plaque gélatineuse au fond du récipient. Dans ce cas, agiter doucement pour la décoller et porter à ébullition une seconde fois.

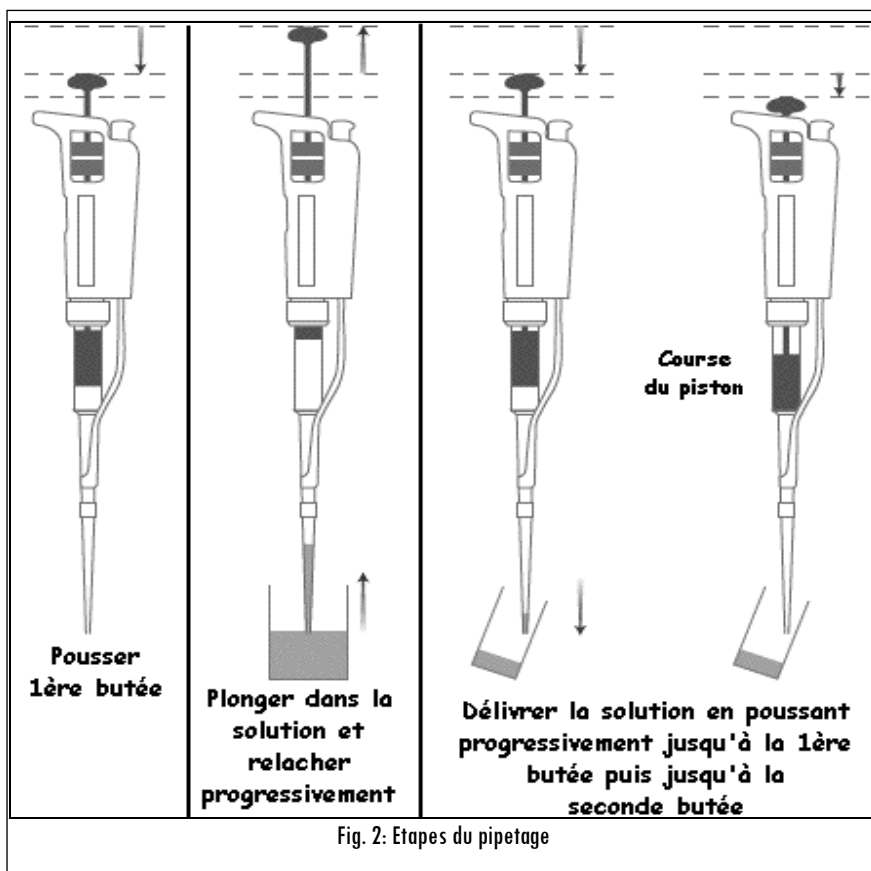
Laisser refroidir 2 minutes la solution puis rajouter l'agent intercalant (Midori Green). Mélanger immédiatement par agitation. Couler le gel dans le moule et positionner les peignes pour former les puits. Poser le système sur une surface plane à température ambiante jusqu'à polymérisation. (Valise 1 : Le gel peut être coulé directement dans la cuve d'électrophorèse. Il suffit de tourner le moule à gel de 90 degrés pour que l'agarose liquide ne puisse pas sortir. Ne pas oublier de tourner le gel en position de migration avant de mettre le TAE et les échantillons.)

▲ MIDORI GREEN

Le Midori Green est utilisé comme marqueur de l'ADN. Il a la faculté de se lier aux molécules d'ADN et, dans cette configuration, fluoresce sous exposition aux UV. L'action d'intercalation (propriété de se fixer entre les deux brins d'une molécule d'ADN) de cette substance est à l'origine **d'effets mutagènes importants**, pouvant être également cancérigènes et tératogènes. Bien qu'un risque d'exposition soit relativement faible, lors de la manipulation des gels (concentration très faible), **LE PORT DES GANTS EST OBLIGATOIRE**. La préparation du gel requiert le pipetage d'une solution concentrée. Nous recommandons donc que cette étape soit effectuée par vos soins.

Le Midori Green étant coloré, ce premier pipetage réalisé par vous peut être mis à profit pour montrer aux élèves ce que représente un volume de 1 µl dans une pointe de pipette et éviter ainsi des erreurs ultérieures d'échelle de pipetage. Il est important de consacrer un certain temps à l'introduction du fonctionnement des micropipettes (Fig. 2).

On peut demander aux élèves de s'entraîner à pipeter 1 µl d'eau et de faire de petites gouttes sur une surface plane (une table ou une paillasse) pour prendre connaissance des volumes manipulés.

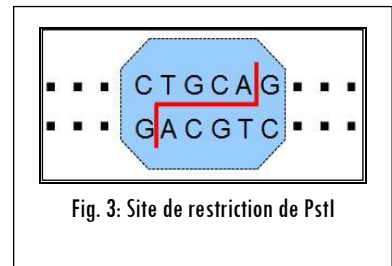


Le matériel jetable ayant ou pouvant avoir été en contact avec du Midori Green doit être jeté directement dans une **poubelle à déchets contaminés (bidon blanc)**. Le matériel réutilisable (verrerie principalement) doit être soigneusement nettoyé au savon et rincé à l'eau déminéralisée (port des gants impératif pendant le nettoyage également). Les MICROPIPETTES ne seront pas nettoyées au savon.

Digestion enzymatique

✦ Enzymes de restriction :

Le découpage des molécules d'ADN en fragments peut être effectué par différentes enzymes de restriction. Chacune d'entre elles reconnaît un site de restriction spécifique (séquence de nucléotides généralement palindromique, Fig. 3). Après liaison, elles catalysent une réaction d'hydrolyse. Température et pH sont contrôlés de manière à favoriser la cinétique de cette réaction. Pour cette raison, on l'effectue à une température de 37 °C et dans une solution tamponnée à un pH de 7.5. A noter que la majorité des enzymes utilisées en laboratoire ont une cinétique optimale en conditions dites "physiologiques".



Avant la préparation de tout échantillon, il est important d'étiqueter les microtubes ou de les numéroter au feutre indélébile avec référence des contenus sur papier. Au cours des manipulations, chaque groupe a besoin d'une poubelle à portée de main pour les pointes de pipettes et microtubes utilisés. De simples béciers peuvent être utilisés à cet effet et vidés en fin de séance.

✦ Produits et concentrations :

Le volume de la solution de digestion est défini en fonction du volume des puits de chargement du gel, dans notre cas 20 µl. La quantité d'ADN à digérer est quant à elle choisie en fonction du volume de chargement et de la taille des fragments à séparer. Avec nos paramètres, environ 100 ng d'ADN sont nécessaires par puits (8 µl de la solution d'ADN fournie dans le kit). La solution mère du tampon de digestion étant concentrée **10X**, on en ajoute 2 µl. Dans ces conditions, 1 µl de solution d'enzyme concentrée sont suffisants pour une digestion efficace.

Ainsi pour un volume total de 20 µl on déposera : 9 µl d'eau distillée, 8 µl d'ADN, 2 µl de tampon de digestion et 1 µl d'enzyme. Pour être certain que tous les éléments soient bien en contact les uns des autres, les différentes solutions préparées seront centrifugées quelques secondes..

✦ Centrifugation :

Cette étape permet de chasser les bulles d'air du mélange et récupérer les microgouttes déposées contre la paroi des microtubes. Lorsque l'on travaille avec des volumes de l'ordre du microlitre, cette étape est essentielle pour assurer l'homogénéité des différents composés en solution. Lors de chaque centrifugation, il est important de veiller à ce que chaque échantillon placé sur le rotor ait son équivalent de masse égale à l'emplacement opposé (tubes contrepoids). Un mauvais équilibrage entraînerait des vibrations pouvant provoquer la rupture du rotor.

Après centrifugation, les échantillons sont incubés 45 minutes (minimum 20 minutes) à 37 degrés. Ils peuvent alors être conservés au congélateur ou directement utilisés pour l'électrophorèse.

✦ Temps de digestion :

Les fournisseurs recommandent généralement au moins 45 minutes d'incubation afin d'assurer une digestion complète. La vitesse de réaction dépendant de la fréquence de rencontre entre substrat (ADN non-hydrolysé) et enzymes, elle est particulièrement élevée pendant les premières minutes et décroît rapidement avec la disparition du substrat. Afin de pouvoir effectuer cette expérience au cours d'une séance de TP de 90 minutes, le temps de digestion peut être réduit significativement sans trop perturber le résultat final.

Electrophorèse

Après polymérisation du gel d'agarose, les peignes formant les puits de chargement peuvent être retirés délicatement. Les deux côtés de la cuve sont remplis de TAE jusqu'à hauteur du gel qui est alors placé dans la cuve en position de migration. Le gel étant particulièrement glissant et fragile, cette opération doit être effectuée avec précaution (maintenir la tranche avec un doigt, port de gants impératif). Du TAE est ajouté jusqu'à recouvrement du gel. D'éventuelles bulles d'air dans les puits de chargement peuvent être retirées par une légère secousse ou aspirées à la pipette.

Après incubation, 4 μ l de tampon de charge sont ajoutés aux échantillons d'ADN hydrolysé.

✧ Tampon de charge :

Le tampon de charge a pour fonction d'augmenter la densité de la solution pour qu'elle reste au fond des puits lors du chargement. Il contient également un colorant permettant de visualiser le chargement ainsi que l'évolution de la migration. On prévoit un excès de volume (dans notre cas 24 μ l total pour un chargement de 20 μ l) de manière à compenser l'évaporation qui a lieu au cours des manipulations. En laboratoire, on évite ce problème en travaillant sur glace à des températures proches de 0°C.

Les échantillons, après une centrifugation de quelques secondes, peuvent être chargés dans les puits de chargement. On ajoute généralement une échelle (marqueur de taille) permettant d'estimer la taille des fragments obtenus par digestion.

✧ Marqueur de taille :

Le marqueur de taille se présente sous la forme d'une solution à charger dans un puits adjacent aux échantillons, et contient des fragments d'ADN de tailles connues. Après migration, l'avancée de ces derniers dans le gel sera comparée à celle des fragments étudiés (Fig. 4). Le marqueur de taille est généralement chargé dans un puits du bord, suivi directement des échantillons à analyser (ne pas oublier de noter sur papier l'ordre de chargement).

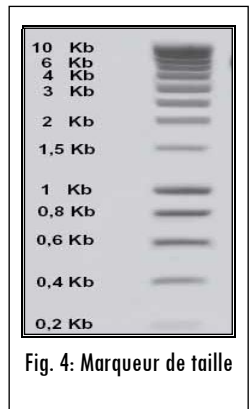


Fig. 4: Marqueur de taille

L'étape du chargement est délicate et doit être effectuée avec soin. Le volume désiré (5 μ l pour le marqueur de taille, 20 μ l pour les échantillons) est pipeté lentement de manière à ne pas former de bulles dans la pointe de pipette. Cette dernière est positionnée dans un puits assez profondément en prenant garde de ne pas en abîmer le fond ou les bords. Le chargement est déversé délicatement de manière à limiter le tourbillonnement du liquide. Il est important de s'arrêter au premier cran d'arrêt du piston de la pipette (ou seulement très légèrement après) pour ne pas injecter de bulle d'air dans le puits, ce qui aurait pour conséquence d'expulser et diluer le chargement dans le TAE de la cuve.

Après chargement, le couvercle est fixé en prenant garde de ne pas déplacer ou secouer le système. Une fois la tension appliquée, les molécules d'ADN chargées négativement vont migrer en direction de l'anode.

✧ Anode, cathode et électrolyse :

Il est à noter que lorsque l'appareil est sous tension, il s'effectue une électrolyse de l'eau au niveau des électrodes (observable par la formation de bulles : oxygène à l'anode, hydrogène à la cathode). On parle d'anode dans sa définition chimique où elle est le siège d'une réaction d'oxydation. Cette dernière est connectée au pôle positif du générateur.

L'appareil est donc branché au générateur avec le pôle négatif du côté des puits de chargement. La tension est fixée à 100 volts (l'intensité s'adapte automatiquement en fonction de la résistance du milieu). Avec la concentration d'agarose utilisée et pour les fragments étudiés dans cette expérience, on obtient une séparation suffisante après environ 30 minutes de migration.

Révélation des fragments

Valise 1 (ultra-violets) :

✧ **Rayonnement UVb :**

Le Midori Green lié aux molécules d'ADN fluoresce sous UVb (Midori Green : 270 à 290 nm). Ces rayons sont responsables du bronzage, du vieillissement de la peau et de brûlures importantes (durée, intensité). Les rayonnements intenses sont particulièrement nocifs pour les yeux (destruction des cellules externes du globe oculaire, pouvant aller jusqu'à une cécité). **IL EST DONC IMPERATIF DE N'ALLUMER LA LAMPE QUE DANS LA CHAMBRE UV PREVUE A CET EFFET.**

✧ **Chambre UV :**

La chambre UV de la valise 1 est composée d'une lampe posée sur une boîte en plastique, elle-même équipée d'une vitre de protection et d'un cache empêchant la lumière extérieure de pénétrer dans la chambre lors de l'observation. Les gels à observer sont déposés par une ouverture munie d'un rideau ayant pour double fonction de protéger l'observateur du rayonnement UV et d'isoler la chambre de la lumière extérieure.

La migration ayant été stoppée par arrêt du générateur, le gel (toujours aussi glissant et fragile) peut être sorti du bain (avec son support) et glissé délicatement hors de son support dans la chambre UV. Rideau fermé, la lampe peut être allumée et le gel observé par la vitre de protection. Par convention, la lecture d'un gel s'effectue verticalement, puits de chargement vers le haut. Des photographies du gel peuvent éventuellement être effectuées par cette même vitre pour une analyse ultérieure des résultats.

Valise 2 (LED) :

Dans la valise 2, les lumières LED sont intégrées à la vitre et posée directement sur la cuve d'électrophorèse. Par convention, la lecture d'un gel s'effectue verticalement, puits de chargement vers le haut. Des photographies du gel peuvent éventuellement être effectuées par cette même vitre pour une analyse ultérieure des résultats.

Rangement

Les gants, les pointes de pipette et tubes peuvent être jetés à la poubelle.

Tout le matériel à l'**exception des pipettes** est nettoyé consciencieusement au savon (port des gants), séché et rangé à sa place dans la valise.

Le TAE du bain peut être conservé au frais, directement dans la cuve à électrophorèse, pour une utilisation ultérieure. S'il n'est pas réutilisé il doit être évacué avec les produits contaminés liquides.

Le gel peut être conservé au frais, recouvert de TAE afin d'éviter sa dessiccation. Le volume de TAE ne doit pas être excessif pour limiter la diffusion du Midori Green. On peut par exemple le placer dans la cuve à électrophorèse, support tourné en position de "coulage de gel" et recouvert de 5 ml de TAE. Si le gel n'est pas réutilisé il doit être évacué avec les déchets contaminés.

Interprétation des résultats

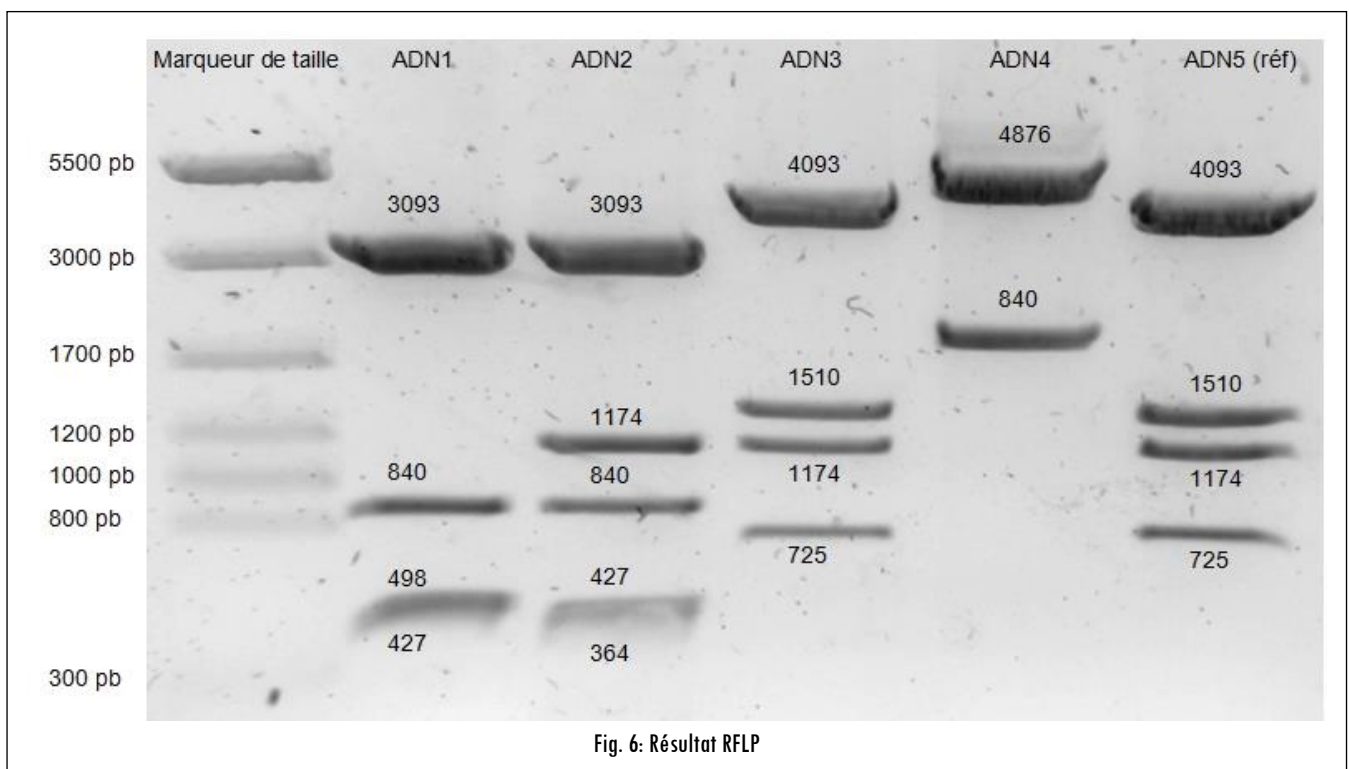
Des photographies du gel sous UV peuvent être effectuées et utilisées pour l'analyse des résultats. Cependant, il peut arriver que leur qualité soit moyenne et que certaines bandes visibles à l'œil nu n'apparaissent pas sur la photo. Il est donc conseillé de faire relever par les élèves les bandes observées sur une feuille quadrillée (en commençant par le marqueur de taille et en s'y référant pour le niveau des fragments digérés).

Le kit "Phylogénie moléculaire" présente différents échantillons d'ADN. Il permet d'illustrer l'utilisation de la technique des RFLP pour identifier une espèce, bien que cette technique ne soit en réalité plus beaucoup utilisée aujourd'hui, le séquençage de l'ADN étant devenu abordable et performant. La deuxième phase du laboratoire (travail avec le logiciel Seaview) permet d'établir le lien avec la méthode du séquençage d'ADN.

▲ Profil ADN :

Pour établir un profil ADN, on n'analyse généralement pas ce dernier dans sa totalité. Seules certaines régions sont étudiées après avoir été amplifiées par PCR. Pour la détermination d'espèces, on sélectionne des régions du génome qui sont très conservées pour une même espèce, mais qui diffèrent souvent d'une espèce à l'autre. Régulièrement, dans le cas des plantes, les scientifiques utilisent l'ADN chloroplastique (gène *ndhA* dans ce laboratoire). A partir d'une séquence d'ADN suffisamment longue et en utilisant différentes enzymes de restriction, la technique des RFLP permet d'attribuer avec une probabilité élevée (plus de 99.9%) un échantillon d'ADN à un individu ou à une espèce.

Certaines sources d'erreur peuvent perturber le résultat et compliquer son interprétation. Un résultat type peut alors être fourni aux élèves (Fig. 6).



▲ **Sources d'erreurs :**

Dans certains cas, il est possible que les bandes correspondant aux fragments d'ADN de petit poids moléculaire ne soient pas ou peu visibles sur le gel d'agarose, notamment les bandes correspondant aux fragments de 118 pb et de 317 pb. Cela est dû principalement au fait que plus les fragments sont petits, plus la quantité d'ADN (masse) dans les bandes est faible. De plus, les petits fragments d'ADN diffusent facilement dans le gel, ce qui diminue encore le signal.

Il peut également arriver que l'hydrolyse des ADN par les enzymes de restriction ne soit que partielle. Ce phénomène se traduit par la présence de bandes surnuméraires de haut poids moléculaire (6158 ou 4858 pb), généralement peu visibles.

L'électrophorèse des échantillons d'hydrolyse montre les fragments suivants :

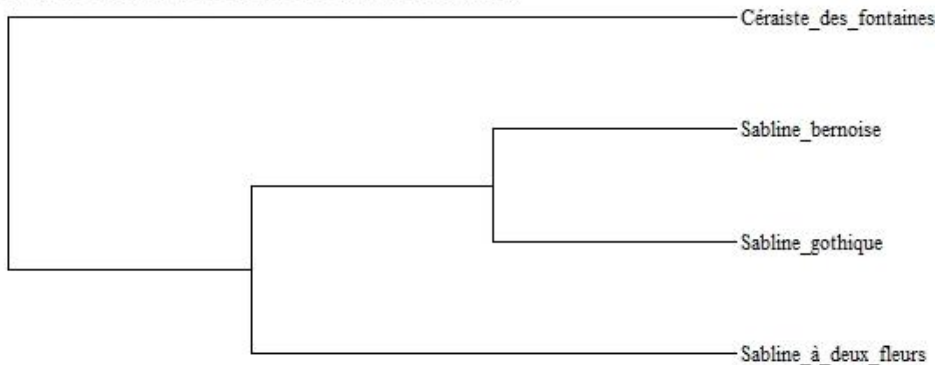
- ▲ ADN 1 par Pst1 (P1) : 3093pb, 840pb, 498pb, 427pb
- ▲ ADN 2 par Pst1 (P2) : 3093pb, 1174pb 840pb, 427pb, 364pb, 134pb, 126pb
- ▲ ADN 3 par Pst1 (P3) : 4093pb, 1510pb 1175pb 725pb
- ▲ ADN 4 par Pst1 (P4) : 4876pb, 1954pb
- ▲ ADN 5 par Pst1 (P3) : 4093pb, 1510pb 1175pb 725pb

Attention : les fragments proches en taille ainsi que ceux inférieurs à 150 pb ne sont pas visibles sur la photo du gel.

Création de l'arbre phylogénique :

Après avoir traité les séquences avec le logiciel Seaview, l'arbre phylogénétique obtenu est le suivant :

Dnapars, 1 best trees, 1071 steps, 3351 sites (85 informative)



Note : Comme indiqué dans le protocole fourni aux élèves, bien s'assurer de choisir l'option « clustalo » (dans Align > Alignment options) au moment de générer l'arbre phylogénétique. Sinon, des divergences d'arbres peuvent apparaître selon que le logiciel est exécuté sur Mac ou sur PC.

On peut l'interpréter de la manière suivante :

Parmi les quatre espèces étudiées, la plus étroitement apparentée à la Sabline bernoise est la Sabline gothique, et la plus éloignée de la Sabline bernoise est la Céraiste des fontaines.

Dans la fiche de compte-rendu élèves, les questions posées en Q6 concernent les manipulations de base effectuées avec le logiciel Seaview. En voici les solutions :

- *Comparez les quatre séquences en positions 1714, respectivement 2762.*
Position 1714 : la base est la même pour les 4 séquences (Adénine) ;
Position 2762 : 3 bases différentes (C pour Céraiste des fontaines, G pour Sabline bernoise et Sabline à deux fleurs, A pour Sabline gothique).
- *Recherchez une position où la base de la Sabline à deux fleurs diffère des trois autres.*
Positions possibles : 12, 52, 91, 211, 238, 249, 326, 352, 365, 407, 414, 467, 498, 519, 529, 534, 543, 557, 585, 606, 639, 648, 673, 678, 688, 696, 714, 747, 758, 773, 783, 785, 803, 807, 813, 815, 820, 824, 825, 833, 835, 858, 859, 894, 897, 899, 900, 901, 925, 938, 939, 948, 949, 953, 954, 955, 989, 1003, 1077, 1081, 1089, 1092, 1101, 1130, 1132, 1133, 1158, 1180, 1188, 1190, 1192, 1193, 1197, 1204, 1206, 1226, 1234, 1241, 1251, 1257, 1288, 1290, 1291, 1294, 1295, 1296, 1303, 1319, 1325, 1326, 1332, 1339, 1357, 1358, 1360, 1365, 1386, 1401, 1407, 1433, 1434, 1447, 1459, 1466, 1484, 1493, 1494, 1495, 1500, 1504, 1511, 1532, 1535, 1537, 1541, 1542, 1544, 1555, 1565, 1569, 1578, 1582, 1587, 1614, 1649, 1665, 1674, 1704, 1721, 1723, 1732, 1733, 1734, 1750, 1758, 1772, 1794, 1815, 1819, 1820, 1821, 1823, 1832, 1833, 1836, 1837, 1841, 1854, 1890, 1898, 1899, 1904, 1905, 1951, 1957, 1979, 1990, 1994, 1999, 2002, 2007, 2008, 2010, 2017, 2034, 2046, 2057, 2077, 2084, 2085, 2108, 2119, 2123, 2124, 2128, 2138, 2151, 2156, 2175, 2180, 2185, 2210, 2217, 2230, 2242, 2244, 2256, 2265, 2295, 2300, 2311, 2320, 2347, 2364, 2374, 2388, 2437, 2444, 2455, 2467, 2509, 2563, 2618, 2635, 2655, 2661, 2665, 2674, 2687, 2693, 2695, 2702, 2738, 2763, 2764, 2799, 2807, 2812, 2822, 2826, 2827, 2858, 2868, 2889, 2904, 2918, 2921, 2937, 2949, 2956, 3000, 3028, 3048, 3051, 3072, 3085, 3096, 3102, 3122, 3123, 3138, 3148, 3149, 3163, 3167, 3168, 3219, 3246, 3263, 3273, 3290, 3336, 3338, 3342, 3353, 3425.
- *Que se passe-t-il pour la Sabline gothique en position 3305 ?*
Le tiret indique qu'elle n'a pas de base correspondante aux 3 autres séquences (= homologue).

ANNEXE

Sélection de photos à l'usage du professeur, permettant de montrer les similitudes morphologiques entre *Arenaria bernensis* et d'autres espèces proches.

Arenaria bernensis



Arenaria biflora



Arenaria gothica



Arenaria multicaulis



Arenaria ciliata



Arenaria serpyllifolia



Cerastium fontanum

