



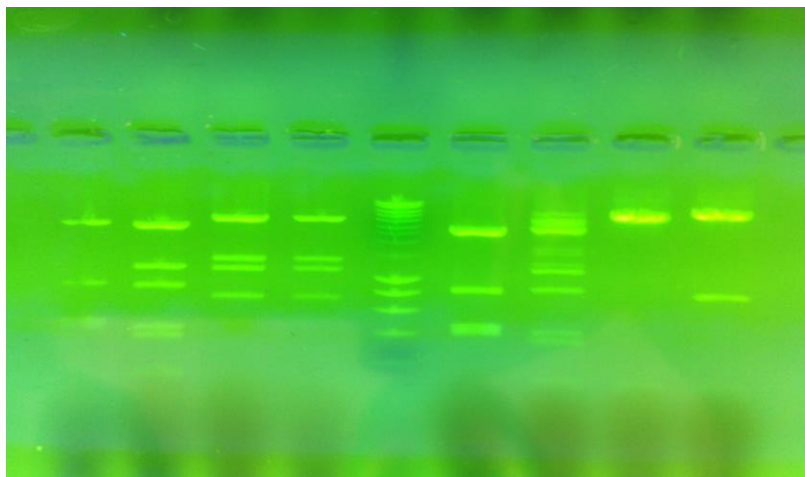
UNIVERSITÉ DE FRIBOURG
UNIVERSITÄT FREIBURG

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 dans le diagnostic médical

Protocole pour l'enseignant

Léonard Cardinaux, Adrien Pairraud, Marie-Pierre Chevron



Relecture : Le Grand Luc , Catherine Pfister Aspert, Lisa Schild
Remerciements : D^r Peter Wandeler, Jean-Christophe Lallement

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 B « L'ADN dans les diagnostics médicaux ». 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 enquête médicale.

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

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

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-Acetate, 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)
Supports 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-Acetate, 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 « Empreinte et diagnostic génétiques : polymorphisme et restriction »

- ♣ Solutions d'ADN (3 types)
- ♣ Tampon de digestion 10X
- ♣ Enzymes de restriction (PstI, XhoI)
- ♣ 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, ...)).

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.

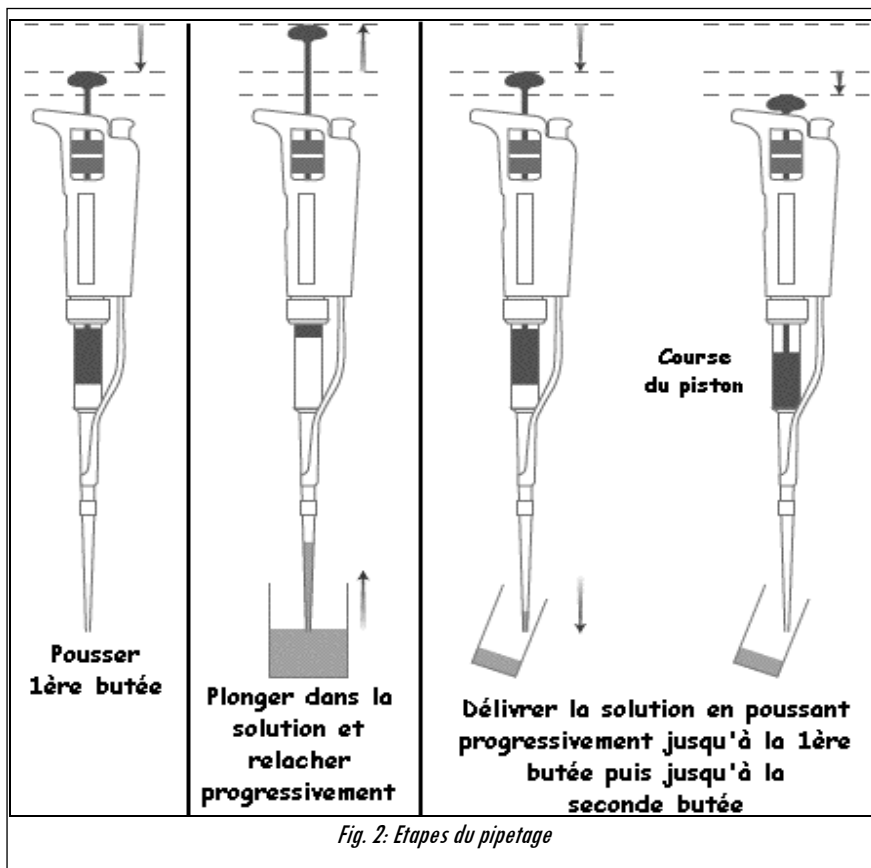
Laisser refroidir 2 minutes la solution puis rajouter l'agent intercalant (Midori Green). Mélanger immédiatement par agitation. Couler le gel dans le moule et positionner les peignes pour former les puits. Poser le système sur une surface plane à température ambiante jusqu'à polymérisation. (Valise 1 : 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.

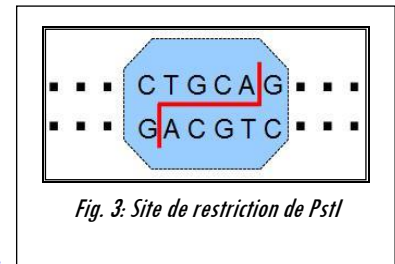


Le matériel jetable ayant ou pouvant avoir été en contact avec du Midori Green doit être jeté directement dans une **poubelle à déchets contaminés (bidon blanc)**. Le matériel réutilisable (verrerie principalement) doit être soigneusement nettoyé au savon et rincé à l'eau déminéralisée (port des gants 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 sur papier des contenus. 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 quant à elle est 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 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).

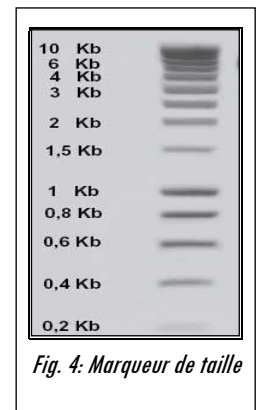


Fig. 4: Marqueur de taille

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 les 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 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).

- ⤴ **Profil ADN dans le cas de la recherche de mutations (substitutions, délétions, duplications):** On travaille plutôt sur des régions d'ADN codant et très conservé d'un individu à l'autre (au contraire de ce que l'on fait dans le cas d'une recherche d'identité de personne – cf protocole enquêtes criminelles).
- ⤴ Pour établir un profil ADN en vue de la détection de mutations dans le cas de pathologie, on travaille le plus souvent à partir d'ADN amplifié par **PCR** :
Dans une pathologie génétique donnée, le ou les gènes impliqués sont le plus souvent connus et aujourd'hui séquencés. On connaît donc les séquences d'ADN qui encadrent tel ou tel gène ou tel point chaud de mutations à l'intérieur d'un gène particulier impliqué dans une pathologie. Et on peut par PCR amplifier cette région d'ADN. En effet, en utilisant des amorces d'ADN spécifiques (petites séquences d'ADN synthétique qui vont aller se coller de part à d'autre de la séquence à amplifier) et une enzyme permettant de polymériser de l'ADN (Taq polymérase), on peut produire une grande quantité de la région d'ADN recherchée, ce qui nous permettra ensuite de pouvoir l'étudier.

L'ADN1 représente d'ADN du patient amplifié par PCR

L'ADN 2 représente l'échantillon de référence, c'est-à-dire celui d'une personne saine.

Dans le cadre de cet atelier, L'ADN 1 représente l'échantillon test, en l'occurrence celui d'une personne atteinte d'une maladie génétique monogénique comme la myopathie de Duchenne. Une lecture qualitative des résultats permet de déterminer que l'ADN 1 est muté (simple comparaison des profils RFLP, les régions codantes du génome étant généralement fortement conservées d'un individu à l'autre).

Dans des classes de bon niveau, il peut être demandé aux élèves d'aller plus loin dans l'interprétation des résultats. Effectivement, l'analyse des profils de restriction permet de reconstituer la carte de restriction de l'ADN 1 du patient. Ils peuvent ainsi déterminer de quel type de mutation il s'agit: ici une délétion. Ils peuvent en déterminer la taille et localiser sa position sur l'ADN. Pour cela, ils doivent disposer de la carte de restriction de l'ADN 2, ADN de référence correspondant à la carte de restriction du gène non muté (Fig. 5).

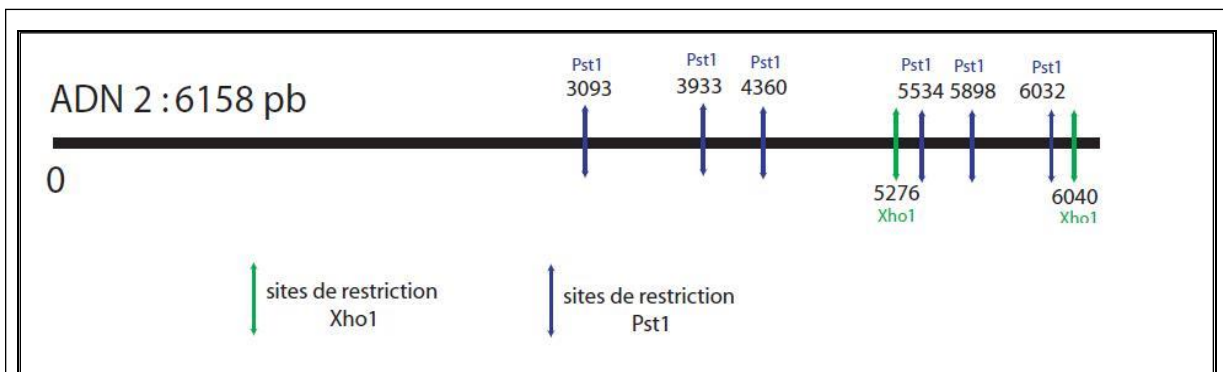


Fig. 5: Sites de restriction, ADN sain

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

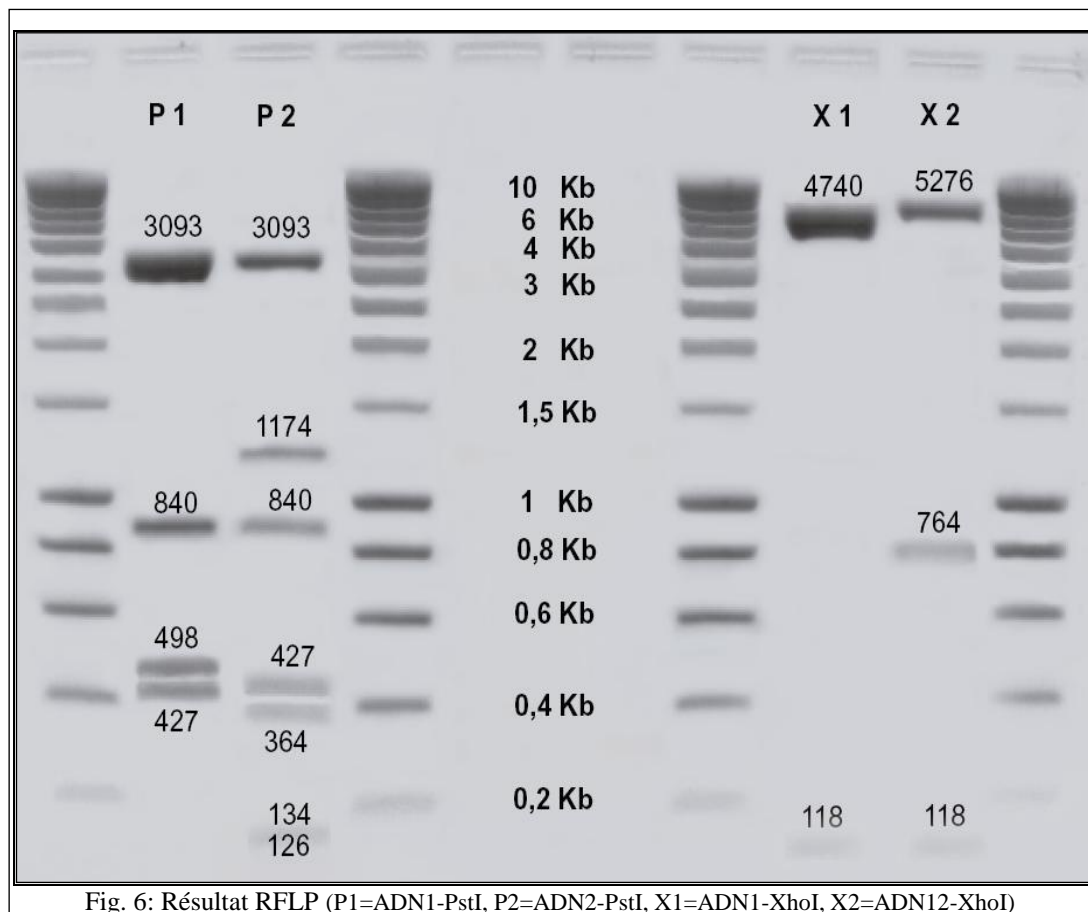


Fig. 6: Résultat RFLP (P1=ADN1-PstI, P2=ADN2-PstI, X1=ADN1-XhoI, X2=ADN12-XhoI)

▲ 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.

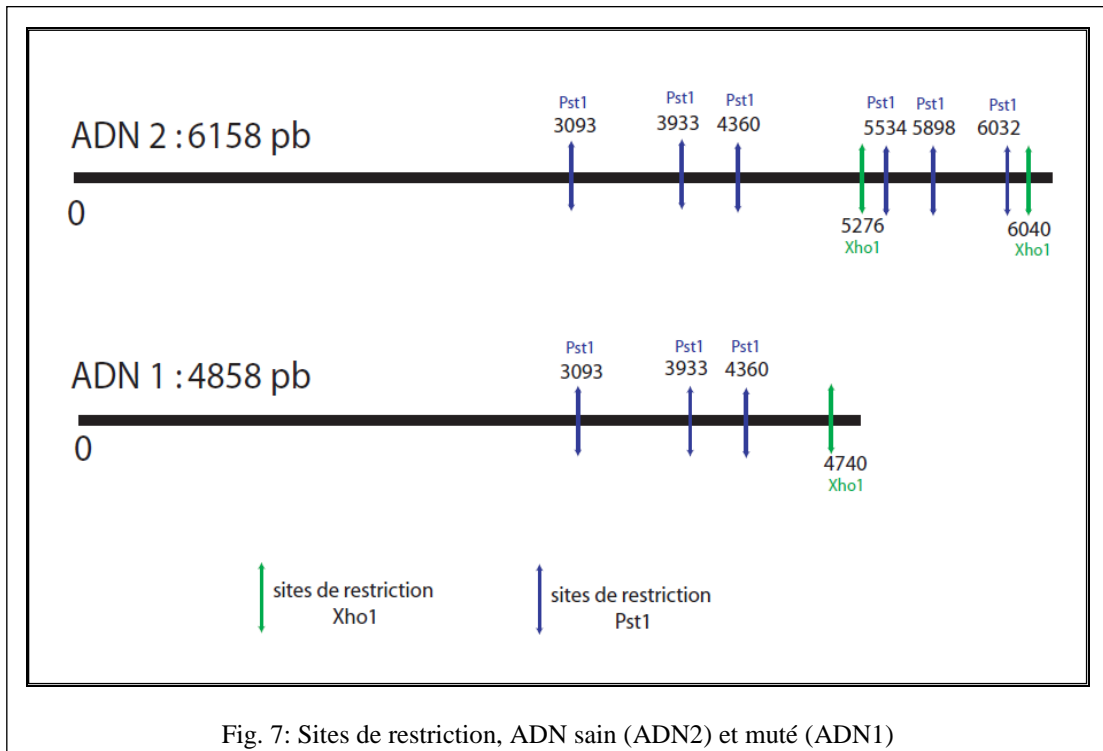
L'électrophorèse des échantillons d'hydrolyse montre les fragments suivants :

- ▲ ADN 1 par PstI (P1) : 3093pb, 840pb, 498pb, 427pb
- ▲ ADN 2 par PstI (P2) : 3093pb, 1174pb, 840pb, 427pb, 364pb, 134pb, 126pb
- ▲ ADN 1 par XhoI (X1) : 4740pb, 118pb
- ▲ ADN 2 par XhoI (X2) : 5276pb, 764pb, 118pb

Si l'on additionne la taille des fragments obtenus après digestion, on peut déduire que l'ADN 1 est plus court que l'ADN 2 d'environ 1300 pb et que la mutation est donc une **délétion**.

L'analyse des profils obtenus avec XhoI montre que le site XhoI situé en position 5276 sur l'ADN 2 n'est plus présent sur l'ADN 1. On peut donc en déduire que la délétion se situe autour de ce site de restriction.

Les profils obtenus avec PstI viennent préciser l'analyse. Les fragments de 3093, 840 et 427 pb sont conservés d'un ADN à l'autre. Les bandes de 1174, 364, 136 et 126 pb de l'ADN 2 sont absentes du profil de l'ADN 1. Les trois derniers sites de restriction de PstI ont donc été perdus (Fig. 7).



Le site XhoI à 6040 pb ayant été conservé, on en déduit que la délétion se termine entre 6032 et 6040 pb. Connaissant la taille du fragment délété (1300 pb), on établit son début entre 4732 et 4740 pb. On peut finalement expliquer la présence d'une bande à 498 pb pour l'ADN 1 qui représente, sur la séquence d'ADN 2, une partie du fragment de 1174 pb adjointe à une partie du fragment de 126 pb.