



UNIVERSITÉ DE FRIBOURG
UNIVERSITÄT FREIBURG

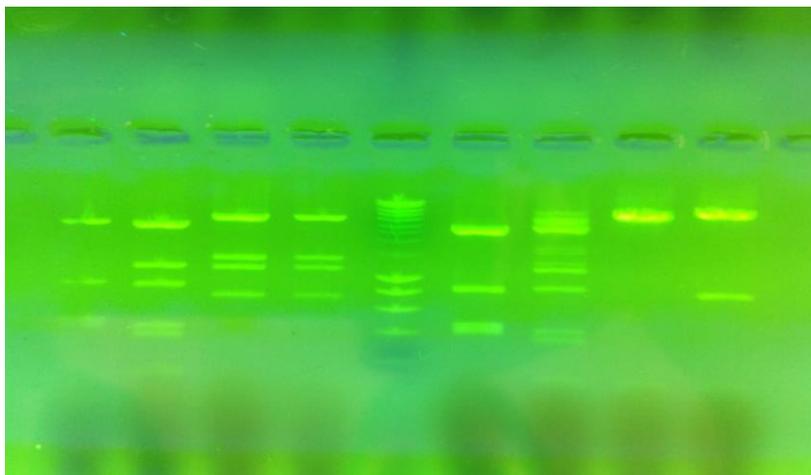
Valise Pédagogique: À la découverte de l'ADN

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 les élèves

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,
Mme Marjorie Berthouzoz, D^r Peter Wandeler

INTRODUCTION

Réchauffement climatique, pollution, construction de routes et de bâtiments ... Toutes ces perturbations provoquées par l'Homme sont souvent dramatiques pour nombre d'animaux et de végétaux.

De nos jours, l'habitat de nombreuses espèces s'est tellement détérioré que si rien n'est fait, elles sont vouées à disparaître dans un avenir très proche.

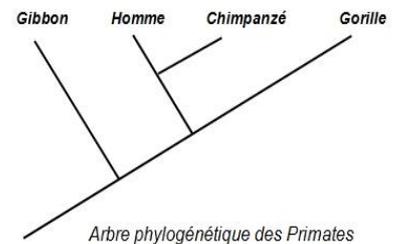
C'est le cas notamment d'une espèce végétale du canton de Fribourg : la **Sabline bernoise (*Arenaria bernensis*)**. Cette petite plante à fleurs blanches pousse dans les endroits caillouteux des Préalpes. Elle passe souvent inaperçue, pourtant il s'agit d'une plante à protéger, car cette espèce particulière est très rare et nous devons protéger son habitat pour qu'elle puisse continuer à vivre. La Sabline bernoise ressemble fortement à d'autres espèces de Sablines très proches mais non en danger de disparition. Il faut donc cibler les endroits dans lesquels elle pousse spécifiquement car il est impossible pour des raisons financières évidentes de protéger toutes les montagnes. Il faut donc pouvoir identifier la plante sans risque de se tromper, et on dispose pour cela maintenant d'un moyen moderne supplémentaire pour identifier une espèce : l'analyse de l'ADN.



Votre travail de scientifique :

Vous allez recevoir 5 échantillons d'ADN. Parmi ceux-ci, 4 proviennent de Caryophyllacées (plantes de la famille des Sablines) récoltés dans 4 endroits différents des Préalpes. Le dernier correspond à l'ADN de la Sabline bernoise et servira de référence pour le comparer aux 4 autres échantillons, afin de savoir si l'un des endroits abrite la Sabline bernoise. Dans ce cas, ce sera un habitat à protéger en priorité !

Dans un deuxième temps, de la même manière que l'on aime connaître les liens de parenté qui unissent l'Homme, le Chimpanzé, le Gorille ou le Gibbon, (arbre ci-contre), on aimerait savoir quel lien de parenté lie la Sabline bernoise aux autres Caryophyllacées récoltées. La Sabline bernoise s'est-elle distinguée plus tôt ou plus tard au cours de l'évolution, des autres Caryophyllacées présents dans nos échantillons ? Pour ce faire, vous allez construire un arbre phylogénétique à l'aide d'un logiciel nommé Seaview.



CONTENUS

Cet atelier expérimental propose d'illustrer par la réalisation d'une expérience complète de biologie moléculaire, les notions d'ADN, de gène, de mutations, d'enzymes de restriction, de séquences, de phylogénie moléculaire, de parenté évolutive et de polymorphisme de restriction, notions abordées dans les programmes du secondaire II. Les fiches pédagogiques accompagnant l'expérience permettent de guider le travail

La valise pédagogique contient tout le matériel de laboratoire nécessaire à la mise en œuvre de la technique dite des RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction). Les élèves sont amenés à réaliser les manipulations suivantes :

- Hydrolyse enzymatique d'ADN
- Séparation des fragments par électrophorèse en gel d'agarose
- Comparaison des profils de restriction
- Alignement de séquences ADN et établissement d'un arbre phylogénétique dans un logiciel de phylogénie moléculaire (Seaview)



BASES THÉORIQUES

Fiche 1 : Enzymes de restriction et RFLP

Fiche 2 : Electrophorèse en gel d'agarose

Fiche 3 : Phylogénie moléculaire



MANIPULATIONS

Fiche 4 : Matériel et sécurité

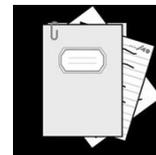
Fiche 5 : Protocole expérimental

Fiche 6 : Utilisation du logiciel Seaview



RESULTATS ET REFLEXION

Fiche 7 : Compte-rendu



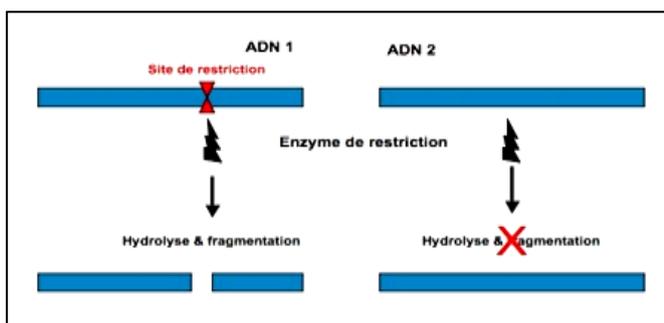
Comparaison de deux ADN polymorphes

Des échantillons d'ADN peuvent être comparés afin de savoir s'ils diffèrent dans leurs séquences nucléotidiques. Les échantillons d'ADN peuvent provenir de n'importe quel organisme vivant. Il peut s'agir d'échantillons de patients pour la détection d'une maladie génétique, d'échantillons prélevés sur une scène de crime, d'échantillons de différentes espèces animales ou végétales à comparer.

Digestion enzymatique et enzymes de restriction

La digestion enzymatique est une technique utilisant des enzymes de restriction pour découper l'ADN. Une enzyme de restriction hydrolyse n'importe quel fragment d'ADN si celui-ci présente une courte séquence spécifique (site de restriction) allant de 4 à 8 nucléotides. Chaque enzyme possède un site de reconnaissance propre. Si une séquence d'ADN possède cette séquence spécifique, elle est fragmentée par l'enzyme, sinon elle reste intacte.

Exemples de sites de restriction	
PstI	XhoI
5' ...CTGCA▼G... 3'	5' ...C▼TCGAG... 3'
3' ...G▲ACGTC... 5'	3' ...GAGCT▲C... 5'



Les premières enzymes de restriction ont été découvertes en 1962 par le suisse Werner Arber. Il a montré que ces enzymes servent aux bactéries, dépourvues de système immunitaire, pour se défendre contre les virus (phages) qui les infectent. Elles sont capables de couper l'ADN du phage au niveau de sites de restriction différents en fonction des enzymes.

En 1970, l'Américain Hamilton O. Smith purifie la première enzyme de restriction (HaeI) à partir de la bactérie *Haemophilus influenzae*. L'année suivante, son compatriote Daniel Nathans l'utilise pour découper l'ADN du virus SV40. Ces trois chercheurs recevront, en 1978, le prix Nobel de médecine.

On a depuis isolé une centaine de ces enzymes de restriction, véritables ciseaux moléculaires qui permettent de couper l'ADN à volonté et qui ont permis de développer un nombre considérable de techniques en génie génétique. Parmi celles-ci, la production d'organismes génétiquement modifiés, ou bien encore la méthode (décrite ci-dessous) dite des RFLP ; cette dernière méthode étant aujourd'hui incontournable en biologie contemporaine.

Polymorphismes de longueurs des fragments de restriction : RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

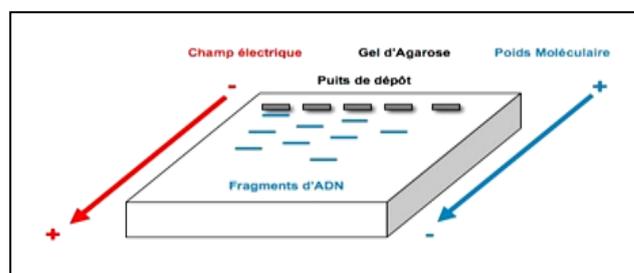
Les polymorphismes de longueurs des fragments de restriction s'appuient sur les propriétés particulières des enzymes de restriction. Celles-ci coupent indifféremment les régions d'ADN codantes et non-codantes en reconnaissant des sites de restriction spécifiques qui peuvent être présents en plus ou moins grand nombre. La petite taille des sites de restriction et leur grand nombre dans un génome les rendent particulièrement sensibles à tout changement de séquence nucléotidique : mutations par délétion, insertion, translocation chromosomique ...

Les enzymes de restriction sont donc utilisées pour révéler le polymorphisme existant entre des ADN provenant d'un génome, d'un gène isolé, d'un plasmide, etc.

Seule ou associée à d'autres techniques (PCR et hybridation moléculaire principalement), la méthode RFLP est utilisée afin d'identifier des espèces, des variétés, des individus. Elle permet d'établir des phylogénies moléculaires, de diagnostiquer certaines maladies génétiques, d'établir une filiation, ou encore de rechercher un coupable dans une enquête criminelle.

Migration par électrophorèse

Les fragments obtenus par digestion enzymatique sont déposés dans un gel d'agarose puis soumis à un champ électrique. Ils vont ainsi migrer dans le gel suivant leur poids moléculaire (les petits rapidement, les grands plus lentement).

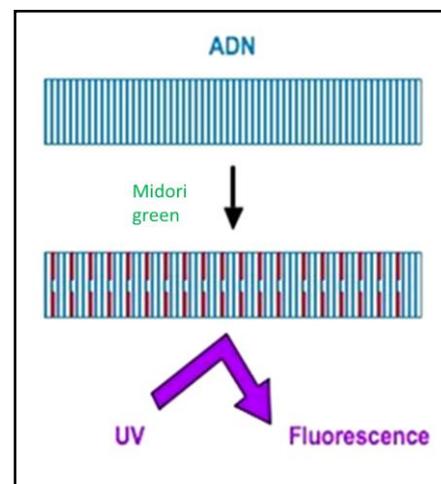


L'ajout d'un colorant permet d'augmenter la densité de la solution contenant les fragments d'ADN et de suivre leur migration dans le gel.

👉 Détails : cf. Fiche 2

Révélation du gel

Après migration, les fragments d'ADN n'étant pas visibles à l'œil nu, il faut procéder à une étape de révélation. Pour cela on a précédemment ajouté au gel un composé chimique, le Midori Green, qui se fixe sur l'ADN et fluoresce sous lumière bleue. Il est également possible d'utiliser d'autres produits de révélation.

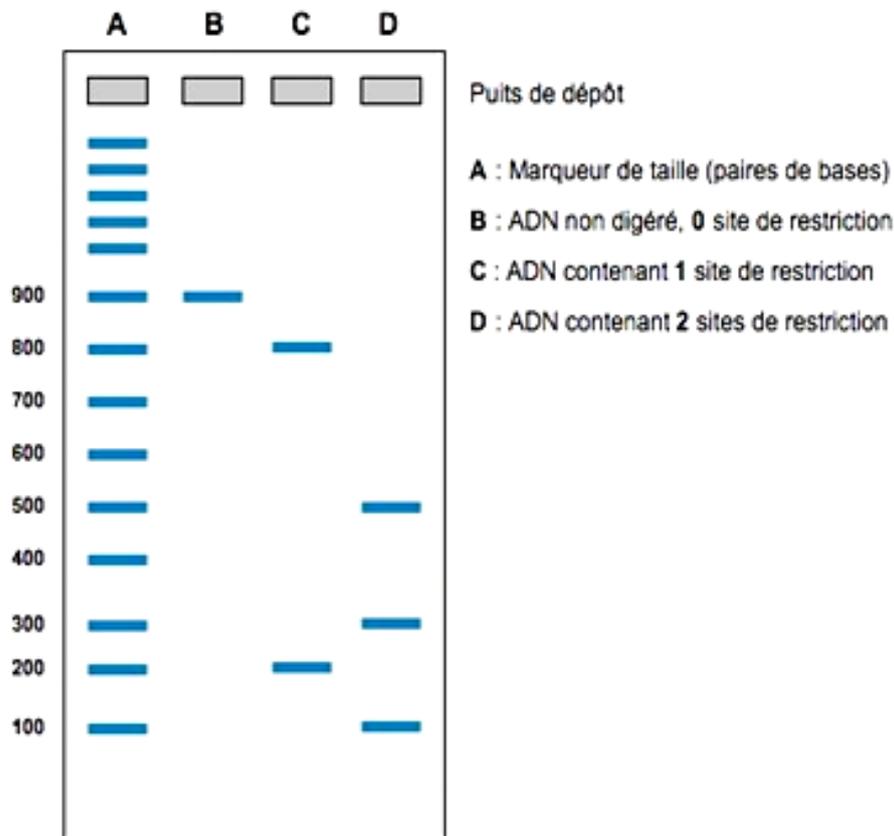


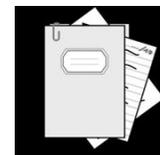
Analyse des profils obtenus

Les résultats obtenus se présentent sous la forme d'une photographie montrant les bandes d'ADN fluorescentes à la lumière bleue.

Un échantillon non digéré apparaît sous la forme d'une bande unique. Un échantillon soumis à hydrolyse présente une ou plusieurs bandes de tailles différentes en fonction du nombre de sites de restriction qu'il contient.

La taille des morceaux d'ADN obtenus est déterminée par comparaison avec un marqueur de référence constitué de fragments d'ADN dont la taille est connue et standardisée.



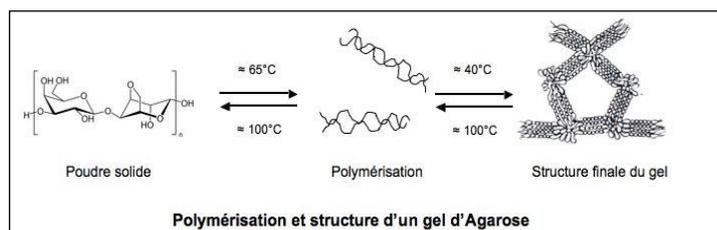


Cette méthode permet de séparer des fragments linéaires d'ADN linéaires selon leur poids moléculaire en les soumettant à un champ électrique linéaire dans un gel poreux.

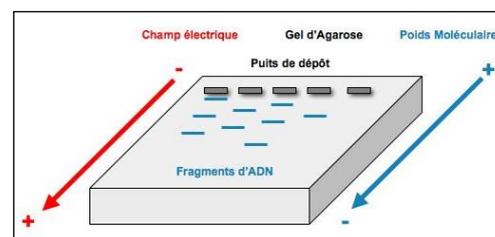
Une molécule d'ADN est un polynucléotide, chaque nucléotide est composé de 3 types de résidus : le désoxyribose, la base azotée, le groupement phosphate H_2PO_4 qui peut s'ioniser en PO_4^{2-} .

En milieu basique, le tampon TAE utilisé a un pH proche de 8, l'ADN va se charger négativement ($H_2PO_4 \rightarrow 2 H^+ + PO_4^{2-}$), et devient une chaîne polyanionique. La charge électrique est uniforme et, les molécules vont donc migrer en direction de la borne positive, c'est pourquoi on effectue les dépôts du côté de la borne négative.

L'agarose est un polymère gélifiant à base d'agar-agar purifié composé essentiellement de galactose non ramifié. Il est extrait de la paroi cellulaire de certaines algues rouges. On le retrouve sous des formes moins pures pour la fabrication des milieux de cultures *in vitro* et comme additif alimentaire (E 406).

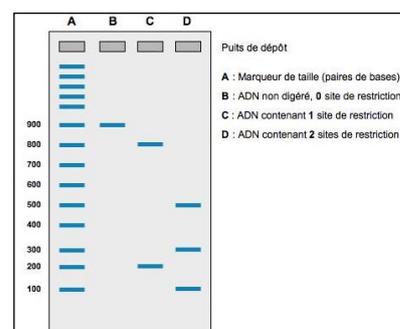


La migration de l'ADN sous l'effet du champ électrique va se réaliser dans l'épaisseur du gel poreux d'Agarose dans lequel l'ADN a été déposé. Les pores de ce gel vont se comporter comme un tamis qui freine le déplacement des fragments d'ADN. La résistance du gel à la migration des fragments est proportionnelle à leur taille, les plus petits fragments migrent le plus vite donc le plus loin.



La concentration du gel en agarose va influencer sur la résolution de celui-ci. Plus un gel est concentré en Agarose, plus il permet de séparer des fragments de petite taille ou des fragments ne différant que de quelques nucléotides. Si la résolution est insuffisante, trop peu d'Agarose ou trop d'ADN semblable, on obtient généralement une traînée (« smear »). La limite usuelle de résolution se situe aux environs de 300pb. Pour des séparations plus fines, il faut généralement recourir à des gels de polyacrylamide.

On remarquera que l'épaisseur et la fluorescence des bandes visualisées sur le profil électrophorétique décroît avec la distance au dépôt. Ceci est dû à certaines propriétés du Midori Green. Celui-ci est fluorescent aux rayons UV, et se fixe entre les bases de l'ADN. La quantité de Midori Green de chaque bande est proportionnelle au nombre de nucléotides d'ADN sur lequel il s'est fixé. L'épaisseur et la fluorescence des bandes d'électrophorèse, vues sur la table UV/ lampe LED, est donc proportionnelle à la taille des ADN: ce sont bien les ADN les plus gros qui migrent le moins loin.





Qu'est-ce que c'est ?

La **phylogénie** est l'étude des relations de parenté entre les êtres vivants et a pour but de comprendre l'évolution des organismes vivants. La **phylogénie moléculaire**, quant à elle, analyse les différences héréditaires au niveau des macromolécules biologiques, telles que l'ADN, l'ARN ou les protéines, afin d'obtenir de nouvelles informations sur l'histoire évolutive des êtres vivants. En effet, les caractères morphologiques ou anatomiques ne permettent pas toujours de différencier deux espèces très proches. Ainsi, dans le cas des Sablines, généralement très proches « visuellement », il est nécessaire d'obtenir des informations supplémentaires de leur ADN respectif, pour pouvoir différencier les espèces.

Origine

Faisant suite à l'avènement de la biologie moléculaire, la phylogénie moléculaire tient son origine dans les années 1960, avec le développement du séquençage des protéines. En 1956 déjà, Frederick Sanger, biochimiste britannique, et ses collègues publièrent une étude proposant une comparaison limitée de la séquence d'insuline entre espèces. Dès lors, d'autres scientifiques ont rapidement reconnu le grand potentiel d'utiliser des séquences de molécules biologiques pour construire la phylogénie des êtres vivants. Peu à peu, avec l'amélioration des techniques de séquençage, la comparaison complète de séquences d'acides aminés et d'ADN homologues est devenue réalisable.

Qu'apporte-t-elle ?

L'avènement de la phylogénie moléculaire a profondément remanié la vision de la classification des organismes et permet actuellement de mieux comprendre l'évolution de certains traits morphologiques d'organismes vivants.

Les différences plus ou moins grandes dans les séquences de macromolécules biologiques permettent de déterminer si deux ou plusieurs espèces sont proches ou éloignées du point de vue de l'évolution. Elles permettent également d'identifier une espèce, une population ou un individu selon son profil génétique. L'analyse génétique peut être faite par plusieurs méthodes : la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), qui sera utilisée dans notre cas ; la PCR (Polymerase Chain Reaction), qu'on associe souvent à la première ; ainsi que le séquençage. Ce dernier consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN ou d'ARN, ou celui d'acides aminés dans le cas d'une protéine. Il est devenu un outil essentiel pour la classification des espèces. Plus ces séquences sont similaires entre des espèces données, plus leur lien de parenté est fort (*voir figure ci-dessous*).

				5				10			15			20			25											
Chimpanze	A	T	G	T	T	G	A	C	T	C	T	A	A	C	T	C	G	C	A	T	C	C	A	C	A	C	T	G
Gorille	A	T	G	T	T	G	A	C	T	C	T	A	A	C	T	C	G	C	A	T	C	C	G	C	A	C	T	G
Orang-outan	A	T	G	T	T	G	A	C	T	C	T	A	A	C	T	C	A	C	A	T	C	T	G	C	G	C	T	G

Alignement de séquences d'ADN de trois espèces de Primates.

Dans ce cas, le gorille présente une différence d'un seul nucléotide avec le chimpanzé, alors que l'orang-outan en présente 4 : le gorille est donc plus proche parent du chimpanzé que ne l'est l'orang-outan.

Molécules utilisables

Les régions de l'ADN des organismes n'évoluent pas toutes à la même vitesse. Certaines régions évoluent rapidement et permettent d'étudier des relations à faible échelle, par exemple entre individus d'une même population ou entre espèces très proches. Pour étudier les relations entre espèces plus éloignées, on utilisera plutôt l'ADN mitochondrial au sein des animaux et l'ADN chloroplastique au sein des végétaux, ou alors l'ADN ribosomal. En effet, ces régions d'ADN sont homologues chez un grand nombre d'espèces. De plus, elles contiennent plusieurs gènes, permettant une comparaison plus précise. Ce laboratoire se penche sur le **gène *ndhA***, contenu dans les chloroplastes de très nombreuses plantes.

Construction d'arbres phylogénétiques

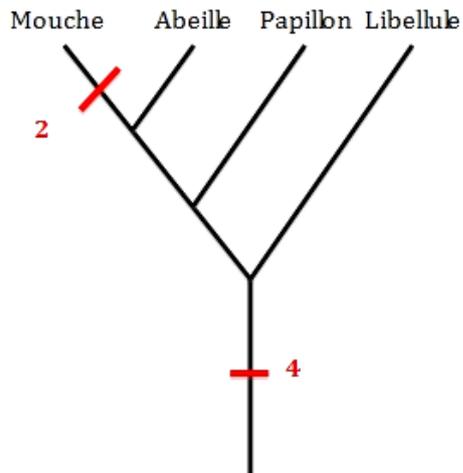
Les résultats d'une analyse de phylogénie moléculaire sont généralement révélés sous forme d'**arbre phylogénétique**. Premièrement, il est nécessaire de posséder un jeu de données suffisamment grand et concernant des séquences homologues des êtres vivants pour lesquels on cherche à établir des liens de parenté. Deuxièmement, ces séquences homologues vont être alignées, généralement à l'aide d'un programme informatique (*le logiciel Seaview dans notre cas, voir Fiche 4*). Cet alignement de séquences requiert néanmoins souvent une édition manuelle, afin d'éliminer les positions ambiguës des séquences traitées. Troisièmement, une analyse comparative des séquences peut être réalisée, grâce à un algorithme de reconstruction phylogénétique, afin d'obtenir l'arbre phylogénétique des **taxons** (espèces ou groupes d'espèces) examinés.

Les dernières avancées dans le domaine de la phylogénie moléculaire ont pu être réalisées grâce à l'amélioration de ces méthodes de reconstruction, notamment celle du **maximum de parcimonie**, utilisée dans ce laboratoire.

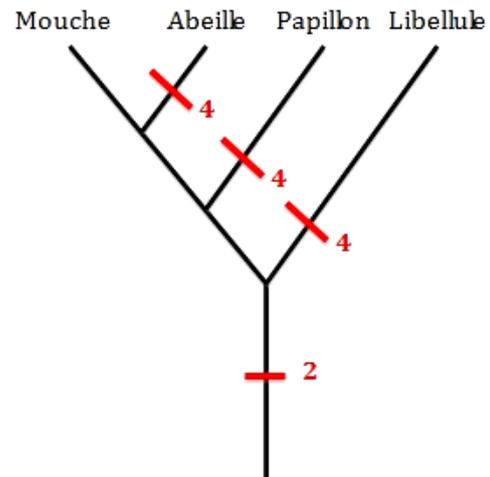
Le maximum de parcimonie (MP) consiste à déterminer, parmi plusieurs arbres, celui qui possède le moins de changements évolutifs (voir exemple ci-après). Cette méthode donne de bonnes phylogénies pour des séquences proches, comme c'est le cas pour les espèces analysées dans cette expérience.

Un exemple (méthode MP)

Les insectes possèdent généralement deux ou quatre ailes. Quel nombre d'ailes est apparu en premier ? En comparant des séquences nucléotidiques de mouche, d'abeille, de papillon et de libellule, voici deux arbres expliquant l'apparition des caractères « 4 ailes » et « 2 ailes ».



Ce premier arbre nécessite seulement deux changements évolutifs.



Ce deuxième arbre requiert quatre changements évolutifs.

Dans l'exemple ci-dessus, l'arbre qui explique de la manière la plus parcimonieuse les liens entre les quatre taxons considérés est le premier, car il ne nécessite que deux changements évolutifs. Ainsi, il est plus probable que le caractère « 4 ailes » soit apparu en premier. Le caractère « 2 ailes » se serait développé plus tard pour former l'ordre des Diptères (Mouches).



1. Sécurité et bonnes pratiques de laboratoire

Ce travail pratique requiert rigueur, habileté et respect des règles d'hygiène et de sécurité. Il faut donc prêter attention aux consignes suivantes :

- ✓ Le matériel de laboratoire est fragile et onéreux
Manipulez-le avec le plus grand soin, en particulier les centrifugeuses, micropipettes et générateurs d'électrophorèse.
- ✓ Le matériel biologique est sensible à la température et aux contaminations
Veillez à la propreté des plans de travail, des mains et du matériel de paillasse. Respectez les indications de température notamment pour le stockage des enzymes.
Annotez clairement tous les tubes en précisant leur contenu et l'opérateur.
- ✓ Certains appareils et produits sont potentiellement dangereux
En particulier, la manipulation des gels contenant le Midori Green (cancérigène) doit se faire avec des gants en latex. Les UV peuvent provoquer de graves brûlures. En cas d'exposition directe, il convient donc de porter des gants et de se protéger avec un masque adapté.

Une zone de travail dédiée à l'utilisation du Midori Green doit être aménagée. En particulier, on place un papier absorbant sous les cuves d'électrophorèse. Avant rangement dans la valise, tout le matériel est nettoyé méticuleusement afin d'éliminer toute trace de Midori Green (cuve, support, chambre de révélation ...).

➔ **En cas de doute, ne pas hésiter à demander de l'aide.**

2. Matériel à disposition

Laboratoire :

Micropipettes
Centrifugeuse
Portoirs pour microtubes
Incubateur
Balance de précision
Micro-onde
Support de gel et peignes
Cuve et générateur à électrophorèse
Erlenmeyer et éprouvette
Chambre UV ou LED

Réactifs et Consommables :

Pointes de pipette
Microtubes
Eau distillée stérile
Tampon TAE (Tris-Acétate, EDTA)
Agarose
Midori Green
Tampon de charge
Marqueur de taille
Tampon de digestion
Gants en latex

Matériel biologique :

Échantillons ADN pour test, Enzyme Pst1 et son tampon



1. Digestion enzymatique

Par poste :

- 1x « ADN 1-Site1 » 8 µl
- 1x « ADN 2-Site2 » 8 µl
- 1x « ADN 3-Site3 » 8 µl
- 1x « ADN 4-Site4 » 8 µl
- 1x « ADN 5-Référence » 8 µl
- H₂O stérile 45 µl
- Pst1 5 µl
- Tampon 10 µl

- ✓ Dans des microtubes, réaliser à l'aide de la micropipette les préparations indiquées dans le tableau ci-dessous. Changer d'embout après chaque pipetage. Faire très attention aux volumes prélevés !

Echantillon	ADN	H2O	Tampon	Enz. Pst1	Vol. final
Site1	8µl ADN1	9 µl	2 µl	1 µl	20 µl
Site2	8µl ADN2	9 µl	2 µl	1 µl	20 µl
Site3	8µl ADN3	9 µl	2 µl	1 µl	20 µl
Site4	8µl ADN4	9 µl	2 µl	1 µl	20 µl
Réf	8µl ADN5	9 µl	2 µl	1 µl	20 µl

- ✓ Centrifuger rapidement puis incuber les échantillons à 37°C pendant 20-45 min

2. Préparation des gels d'Agarose– PORT DES GANTS OBLIGATOIRE

- ✓ Sur la balance de précision peser l'Agarose
- ✓ Avec l'éprouvette graduée mesurer le TAE 1X
- ✓ Dans l'Erlenmeyer mélanger Agarose et TAE, puis porter à ébullition à la micro-onde. (ATTENTION AUX ECLABOUSSURES)
- ✓ Laisser refroidir le mélange 2 minutes puis ajouter le Midori Green (N'oubliez pas les gants!)
- ✓ Couler le mélange dans le support plastique sans faire de bulles, déposer les peignes puis laisser polymériser sans déplacer le gel avant polymérisation complète. Le gel pourra être conservé à 4°C sous plastique (pour éviter qu'il sèche). (Ne pas mettre dans un frigo servant à l'alimentation)

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

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

3. Dépôts des échantillons et électrophorèse – PORT DES GANTS OBLIGATOIRE

- ✓ Sur le gel solidifié, retirer délicatement le peigne afin de créer les puits de dépôt
- ✓ Déposer le gel et son support dans la cuve à électrophorèse
- ✓ Ajouter du TAE 1X à recouvrement du gel (~500 ml)
- ✓ Sortir les échantillons digérés et ajouter à chacun 4µl de tampon de charge
- ✓ Déposer 5µl de marqueur de taille dans un premier puits
- ✓ Déposer ensuite délicatement 20µl de chaque échantillon dans des puits de dépôt successifs. Changer de pointe entre chaque dépôt !
- ✓ Fermer la cuve d'électrophorèse et la brancher au générateur, pôle négatif (noir) du côté des puits de dépôt
- ✓ Faire migrer le gel 30 min à 100 V (*l'ampérage se règle automatiquement*)

4. Révélation des gels – PORT DES GANTS OBLIGATOIRE

- ✓ Arrêter le générateur et retirer le couvercle de la cuve
- ✓ Chambre UV: Sortir le gel et son support de la cuve, égoutter, placer le gel dans la chambre UV et prendre la photographie
- ✓ Lampe LED: Laisser le gel dans la cuvette et recouvrir avec le couvercle avec lampe LED intégrée, allumer la lampe et prendre la photographie



Le logiciel Seaview

Le logiciel Seaview, développé par le Pôle Bioinformatique de l'Université de Lyon, permet de comparer des séquences nucléotidiques en les alignant, fournissant ainsi des informations au niveau de la phylogénie moléculaire.

Le logiciel est en anglais, mais son utilisation très facile et aidée par la marche à suivre ci-dessous, conçue spécialement pour l'expérience de la valise ADN.

Installation

Le logiciel gratuit Seaview ne requiert pas d'installation particulière : on peut directement lancer le fichier exécutable.

La valise pédagogique ADN contient un CD avec ces fichiers exécutables pour Windows, Macintosh et Linux, respectivement. Le logiciel peut également être téléchargé à partir de la page internet <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html> (page en anglais).

A partir du CD :

Windows : 1) Copier le dossier « Seaview4 (Windows) » sur le Bureau
2) Ouvrir ce dossier puis ouvrir le fichier exécutable « Seaview.exe ».

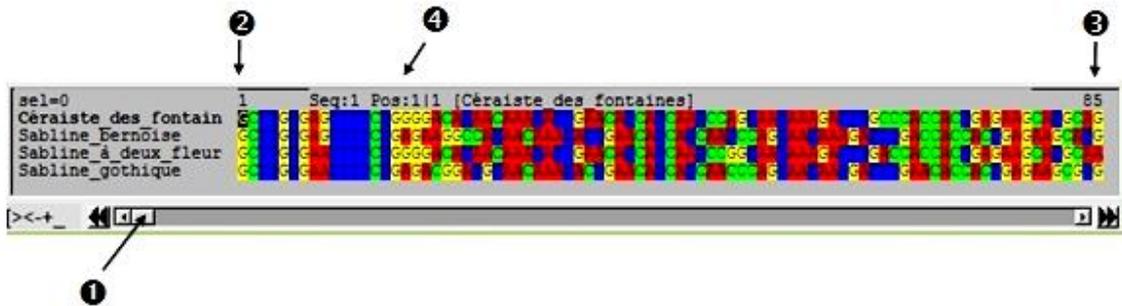
Macintosh : 1) Copier le dossier « Seaview4 (Macintosh) » sur le Bureau
2) Ouvrir ce dossier > Seaview.app > Contents > MacOS puis ouvrir le fichier exécutable « Seaview »

Linux : 1) Copier le dossier « Seaview4 (Linux) » sur le Bureau
2) Ouvrir ce dossier puis ouvrir le fichier exécutable « Seaview ».

Le CD inclus dans la valise contient également les séquences d'ADN qui seront comparées par le logiciel. Les 4 séquences d'ADN se trouvent dans un même fichier nommé « Séquences ADN.txt ».

Marche à suivre pour l'expérience

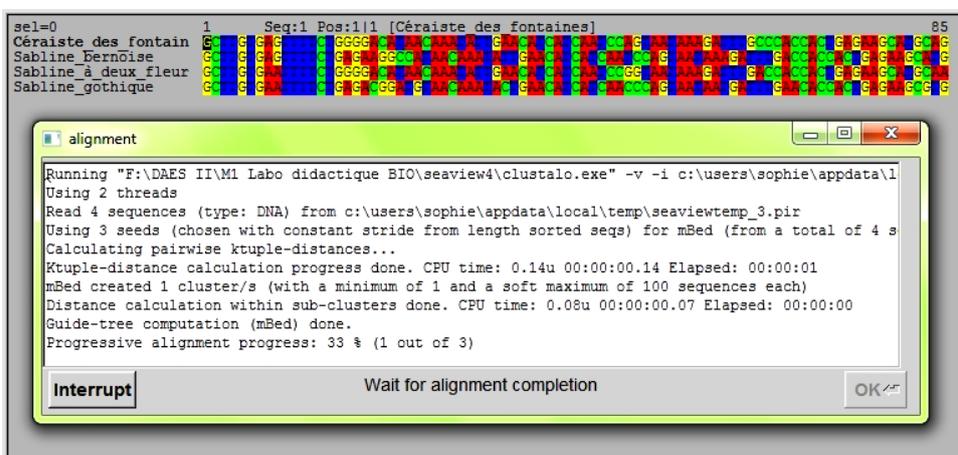
1. Exécuter le logiciel « Seaview.exe ».
2. **Chargement des séquences** : File > Open > rechercher le fichier « Séquences ADN.txt » sur le CD, le sélectionner et cliquer sur « Open ».



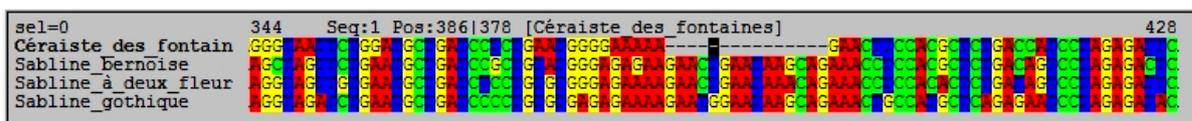
Chaque base est surlignée d'une couleur différente (G : jaune, C : vert, T : bleu, A : rouge). Au bas de la fenêtre, le curseur ❶ permet de faire défiler les séquences de gauche à droite. En-dessus des séquences est indiquée la position des bases aux extrêmes gauche ❷ et droite ❸ du fragment de séquence affiché dans la fenêtre. On peut cliquer sur n'importe quelle base ; en-dessus des séquences est indiquée la position du curseur et la séquence dans laquelle on se trouve ❹ (seq = séquence, pos = position). Le menu Props > Fontsize permet d'augmenter la taille des caractères.

3. **Alignement des séquences :** Tout d'abord, aller dans le menu Align > Alignment options et contrôler que l'option « clustalo » est sélectionnée. Puis cliquer sur Align > Align all.

Une fenêtre « alignment » s'ouvre. L'alignement dure quelques secondes. Lorsqu'il est terminé, cliquer sur OK pour fermer la fenêtre.

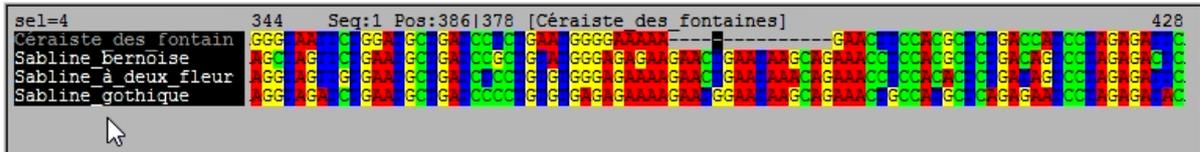


Les séquences sont maintenant alignées les unes en dessous des autres. Un tiret signifie que la séquence en question ne possède pas de nucléotide correspondant pour une position donnée (voir par exemple en position 386 sur l'image ci-dessous).



4. Etablissement de l'arbre phylogénétique :

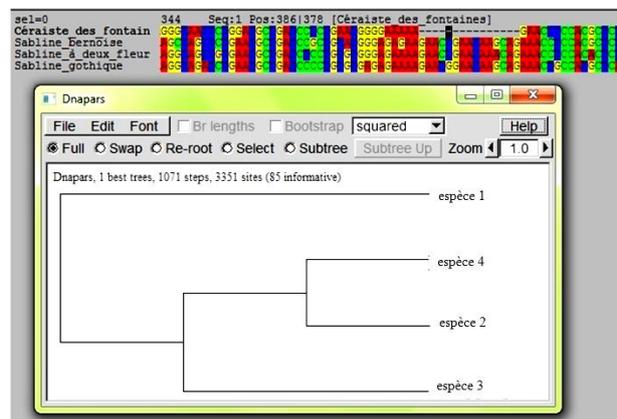
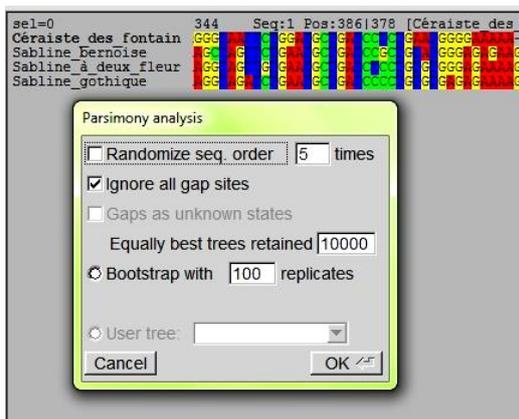
Attention : avant d'effectuer cette étape, contrôler que l'on a sélectionné les 4 séquences (pour ce faire, cliquer successivement sur le nom de chacune d'elles ; celui-ci s'affiche alors surligné en noir comme sur l'image ci-dessous) ou aucune des 4 (le nom apparaît alors sur fond gris, comme sur l'image du point 3).



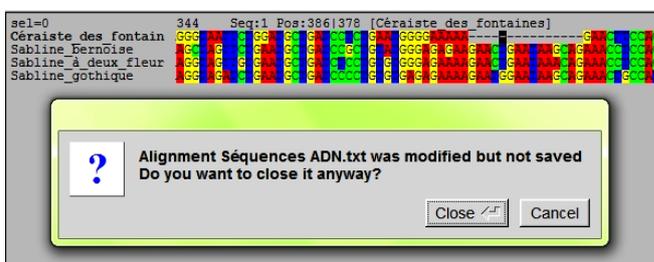
Cliquer sur Trees > Parsimony.

Une fenêtre « Parsimony analysis » s'ouvre. Ne pas changer les paramètres et cliquer sur OK.

Une autre fenêtre (« Dnapars ») s'ouvre alors avec l'arbre phylogénétique résolu.



5. Quitter le programme : cliquer soit sur l'icône de la fenêtre, soit File > Quit. Une fenêtre de confirmation apparaît : cliquer sur « Close ».





Nom :

Protection de la biodiversité : la Sabline bernoise

La Sabline bernoise est une petite plante à fleurs blanches qui pousse uniquement dans les cantons de Berne et de Fribourg, dans les endroits caillouteux des Préalpes. Elle est donc très rare.

Lors d'une excursion, un chercheur a récolté quatre échantillons de Sablines dans quatre endroits différents des Préalpes. On souhaite savoir si l'un de ces échantillons est une Sabline bernoise, dont il faudrait alors protéger l'habitat pour éviter qu'elle ne disparaisse.

Le problème est que cette plante ressemble fortement à d'autres espèces de Sablines très proches. On ne peut donc pas se baser sur des critères morphologiques (forme, taille, couleur, ...) pour les différencier. Au lieu de cela, nous allons comparer leur ADN, qui nous permettra de les identifier sans nous tromper (voir Fiche 3).

L'ADN prélevé sur les quatre plantes récoltées correspond respectivement aux échantillons « ADN Site1 », « ADN Site2 », « ADN Site3 » et « ADN Site4 » utilisés dans cette expérience. Le profil génétique de la Sabline bernoise est connu et représenté par l'« ADN 5 » qui nous servira de référence.



A l'aide de la fiche 3 « Phylogénie moléculaire », répondez aux questions suivantes :

- Dans le cas des Sablines, pour quelle raison recourez-vous à une analyse moléculaire ?

- Quel type de séquences d'ADN compare-t-on dans le cas des Sablines ?

- A quel moment de votre expérience recourez-vous au séquençage ? A quel type de biomolécule l'appliquez-vous ?

Q2

Avant de pouvoir procéder à la digestion enzymatique, plusieurs étapes expérimentales ont été nécessaires. Lesquelles ?

Q3

Quelle est la charge électrique de l'ADN dans la cuve d'électrophorèse ?
Quels facteurs vont déterminer la vitesse de migration des fragments d'ADN dans le gel d'agarose ?

Q4

Le tableau suivant présente le nombre de sites de restriction théoriques pour l'enzyme Pst1 sur le gène *ndhA* chez la Sabline bernoise ainsi que chez une autre plante prétexte (non identifiée). Indiquez le profil de restriction (nombre de bandes) attendu dans chaque cas.

	Sabline bernoise	Plante XY
nb de sites de restriction	3	5
Profil de restriction (nombre de bandes)		

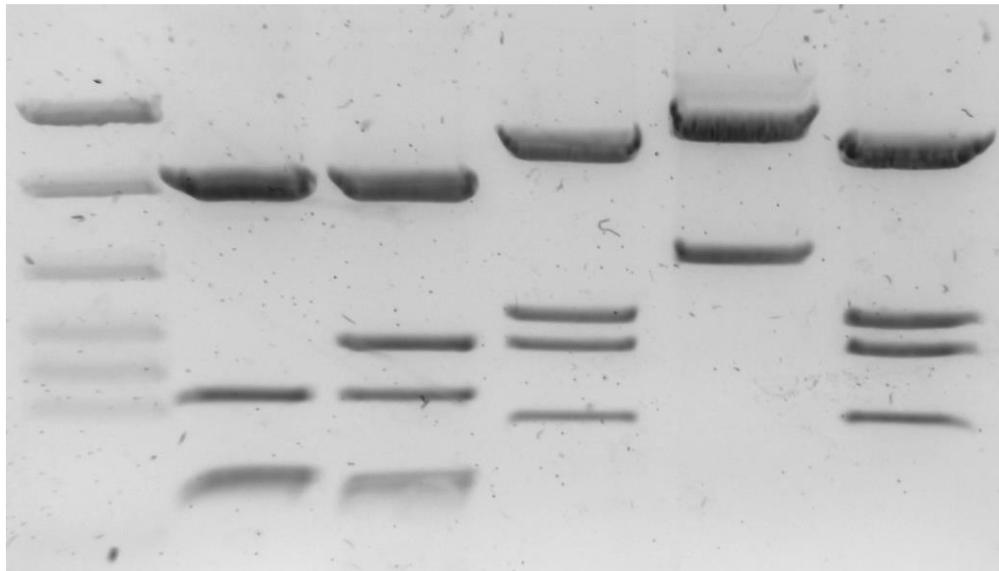
Q5

La photographie ci-dessous présente (en négatif) les résultats que vous avez obtenus après révélation de votre gel d'électrophorèse.

Légendez soigneusement la figure en indiquant le nom des échantillons (y compris le marqueur de taille), l'enzyme utilisée et la taille des fragments de digestion.

Pouvez-vous repérer les différences observables entre les profils de restriction des différents échantillons ?

Concluez-vous que l'un des échantillons récoltés est une Sabline bernoise ? Si oui, lequel ?



Coupe PstI – gène *ndhA*



Q6

Après avoir réalisé la migration par électrophorèse, vous envoyez vos échantillons d'ADN à un laboratoire qui en établit la séquence détaillée et identifie les espèces auxquelles ils appartiennent. Les résultats que vous recevez sont contenus dans un fichier informatique (« Séquences ADN.txt »). Vous allez maintenant les comparer grâce au logiciel Seaview, afin de connaître les relations de parenté évolutive entre les différentes espèces de plantes.

Une fois les séquences chargées et alignées dans Seaview, répondez aux questions suivantes :

- Comparez les quatre séquences en positions 1714, respectivement 2762.

- Recherchez une position où la base de la Sabline à deux fleurs diffère des trois autres.

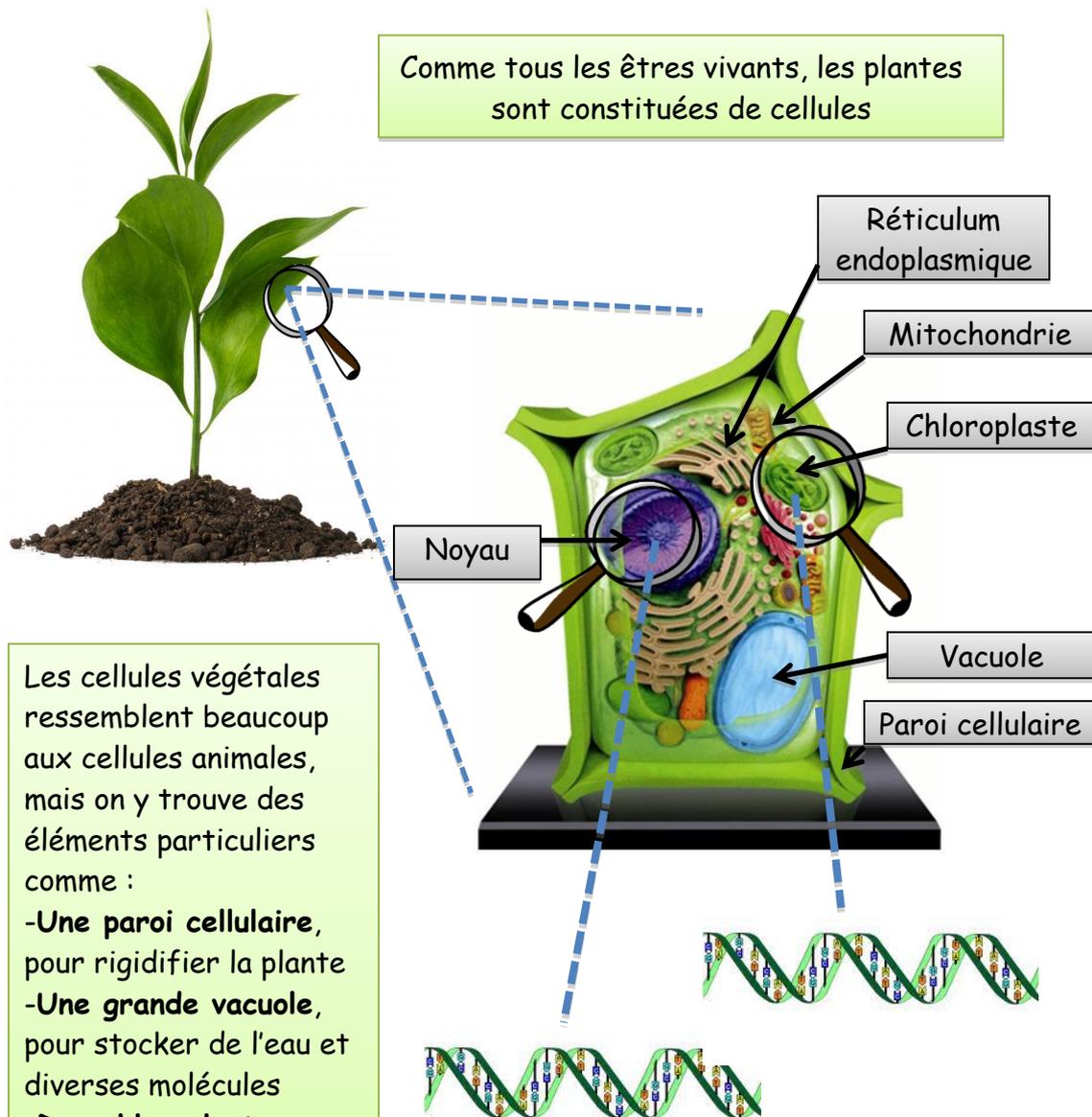
- Que se passe-t-il pour la Sabline gothique en position 3305 ?

Reproduisez ci-dessous l'arbre phylogénétique obtenu grâce au logiciel Seaview.

Parmi les 4 espèces étudiées, laquelle est la plus étroitement apparentée à la Sabline bernoise ? Laquelle en est la plus éloignée ?

ANNEXE 1

L'ADN et les plantes



On trouve de l'ADN en grande quantité dans le noyau des cellules végétales. Cet ADN code pour la plus grande partie des protéines produites par la plante. Il se condense en chromosomes durant la mitose. Certaines plantes peuvent former plus de 1000 chromosomes !

La moitié de cet ADN provient de la « mère » de la plante et l'autre du « père ».

On trouve également de l'ADN en faible quantité dans les chloroplastes et les mitochondries. Cet ADN est transmis uniquement par la « mère » de la plante. Puisqu'il n'y a pas de brassage génétique pour cet ADN, il varie très lentement au cours des générations. Pour cette raison, les scientifiques l'utilisent souvent pour étudier l'évolution des espèces.

ANNEXE 2

Fiche d'identité de la Sabline bernoise

Nom scientifique : *Arenaria bernensis*
Nom français : Sabline bernoise
Famille : Caryophyllacées
Division : Angiospermes (plantes à fleurs)

Habitat :

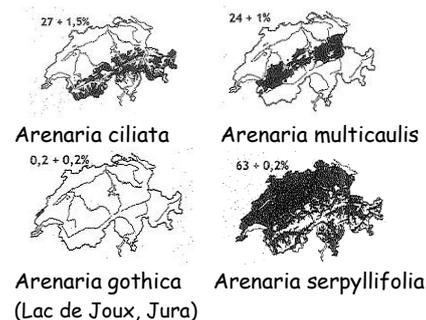
pentons rocailleuses (difficiles d'accès) des
Préalpes fribourgeoises et bernoises
zones très ensoleillées, sol moyennement
humide
étages subalpin (1800 à 2400 m d'altitude,
forêts de conifères) et alpin (2400 à
3000 m d'altitude, au dessus de la
limite des forêts)



Découverte : en 1955 par le botaniste neuchâtelois Claude Favarger, dans la région du Gantrisch (BE).

Le saviez-vous ? La nouvelle espèce découverte par Favarger fut appelée *Arenaria bernensis* car on ne la connaissait alors que dans la région du Stockhorn et du Gantrisch (Oberland bernois). Elle n'a été découverte dans le canton de Fribourg que dans les années 1970. On sait aujourd'hui que la plupart des populations - et les plus grandes - poussent en sol fribourgeois.

Comparaison avec les aires de répartition suisses d'espèces apparentées :



Statut de conservation : espèce menacée

Floraison : juillet-août

Caractéristiques :

- ☼ taille : 5-10 cm de haut
- ☼ pétales blancs de 7-8 mm (plus grands que ceux d'*Arenaria ciliata*, la Sabline ciliée)
- ☼ 1 à 2 fleurs par tige (au contraire d'*Arenaria multicaulis* qui peut en porter jusqu'à 7 par tige)
- ☼ tiges rampantes

Liens intéressants :

- > www.infoflora.ch
- > www.tela-botanica.org
- > http://www.unifr.ch/biology/assets/files/BSC_Lexer_2012.pdf

Source : *Flora Helvetica*, 2012
(4^{ème} éd. et 5. Aufl.)