Construction d'un arbre phylogénétique avec Seaview

Février 2022 Email: mathieu_mortz@uqar.ca

Lien téléchargement Seaview 5.0.4 : http://doua.prabi.fr/software/seaview

1- Rechercher dans la littérature des valeurs de « nombre d'œufs par portée » et/ou « taille des œufs » pour environ 25 espèces parmi les 115 poissons du jeu de données

Une fois les données récoltées :

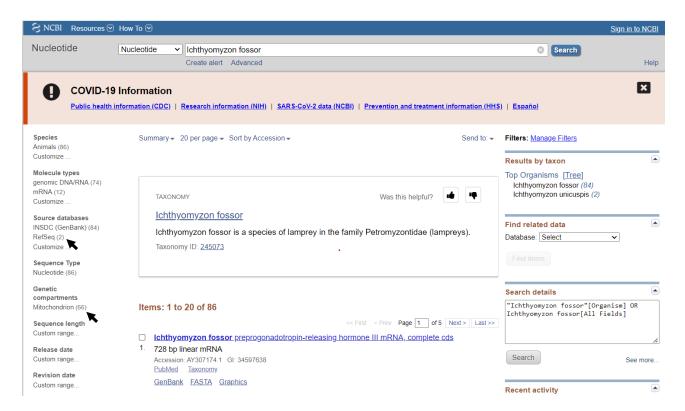
2- Récupérer les séquences d'ADN mitochondrial des 25 espèces de poissons

Exemple pour 1 espèce :

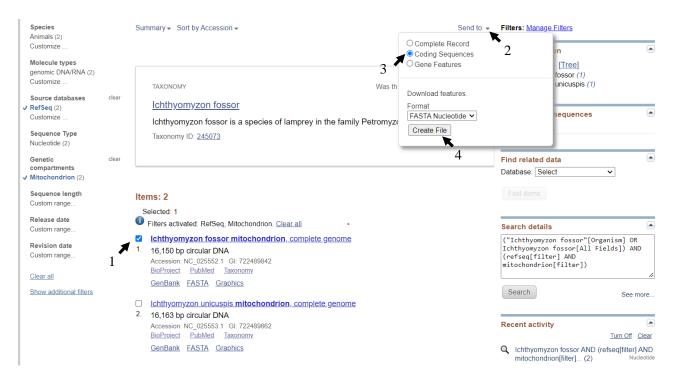
- Recherche de séquences pour l'espèce *Ichtyomozon fossor* https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/



- Sélectionner les filtres « RefSeq » et « Mitochondrion »



- Sélectionner une des séquences proposées, puis « Send to », « Coding Sequences » et « Create File » au format « FASTA Nucleotide »



- Le fichier crée contient alors les 13 séquences des gènes codant de l'ADN mitochondrial. Pour récupérer la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S, cliquer sur le lien de la séquence d'ADN mitochondrial sélectionné précédemment. Retrouver dans la liste de gènes celui qui code pour l'ARNr 16S:

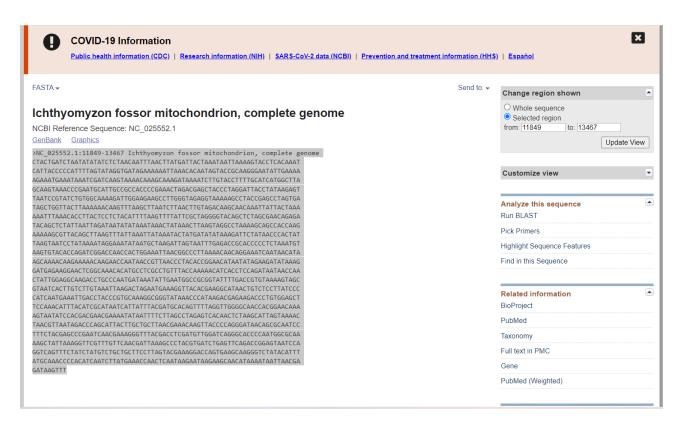
```
translation="MSHQPSIIRKNNPLLSLGNSMLVDLPSPANISAWWNFGSLLSLC"/
                 LIVQIITGLILAMHYTANTELAFSSVMHICRDVNNGWLMRNLHANGASMFFICIYAHI
                 GRGIYYGSYLYKETWNIGVILFTLTAATAFVGYVLPWGOMSFWGATVITNLISATPYV
                 GDDIVVWLWGGFSVSNATLTRFFTFHFILPFILAAMTMIHIMFLHQTGSSNPMGINSN
                 LDKIOFHPYFSFKDILGFVMLLSILFMISLMAPNMLGEPDNFIFANPLSTPPHIKPEW
                 YFLFAYAILRSIPNKLGGVLALVMAILILLIIPLTHTSKQRGMQFRPLAQTMFWILIA
                 NLTLLTWLGGEPAEYPFTTMTQIASTVYFLIFILILPTLGYLEDKILSMPNKLKYSLI
                 complement(10734..10804)
tRNA
                 /product="tRNA-Pro"
tRNA
                 10818..10885
                 /product="tRNA-Phe
rRNA
                 10886..11777
                 /product="125 ribosomal RNA'
tRNA
                 11778..11848
                 /product="tRNA-Val
                 11849..1346
                 /product "165 ribosomal RNA
                 13468..13541
tRNA
                 /product="tRNA-Leu
                 /codon_recognized="UUR'
13546..14511
gene
                 /gene="ND1"
                 /db_xref="GeneID:<u>22161478</u>"
                 13546..14511
                 /gene="ND1"
                 /codon_start=1
                 /transl_table=<u>2</u>
                 /product="NADH dehydrogenase subunit 1"
                 /protein_id="YP_009106940.1"
                 /db_xref="GeneID:22161478"
                 /translation="MLIMLTSTLILILMVLLAVAFLTMVERKTLGYMQFRKGPNVVGF
                 MGLLQPIADGVKLFLKEPVWPLTASPTLFIVTPIMALTLALALWMFIPMPQSITTINI
                 TLLVIMAMSSLSVYTTLVSGWASNSKYALIGALRAVAQTISYEVSLGLILLCLVTLTG
                 NFSLQAFIYTQEHTWFLLSNWPLAAMWFVSTLAETNRTPFDLTEGESELVSGFNVEYA
                 GGPFALFFLAEYSNILFMNTLTTIMFLGPLGSNNLNILPIINIMMKTTPLIILFLWIR
                 ASYPRFRYDQLMHLMWKNFLPLNLALFTLQLSLTISFGGTGVPKM'
```

Cliquer sur le lien, puis..

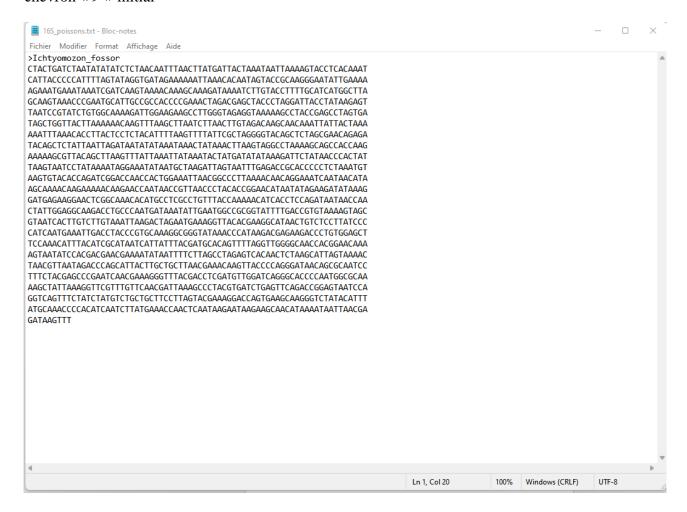


...accéder à la séquence au format FASTA

- Copier la séquence avec l'en-tête, et coller dans un fichier .txt nommer « 16S_poissons »



- Remplacer l'en-tête par le nom de l'espèce, en remplacement l'espace par « _ » et en gardant le chevron « > » initial



Pour les 25 espèces sélectionnées préalablement, vous aurez donc à la fin 25 fichiers différents contenant les séquence des 13 gènes mitochondriaux pour chacune des 25 espèces. Les 25 séquences des gènes 16S seront pour leur part récoltées séparément dans le fichier « 16S_poissons.txt » dans lequel vous les collerez les unes à la suite des autres.

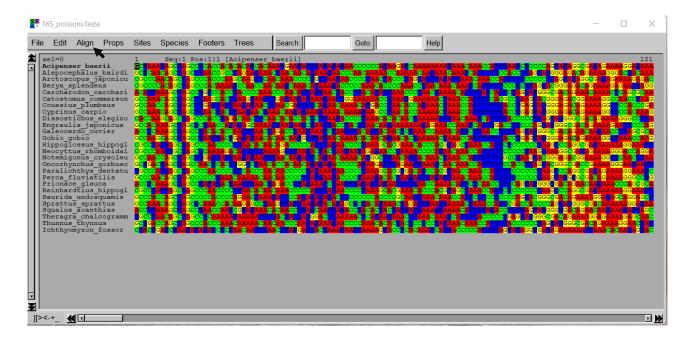
C'est sur ce fichier que nous travaillerons ensuite pour réaliser l'alignement puis l'arbre phylogénétique.

3- Réaliser l'alignement des séquences 16S des 25 espèces étudiées

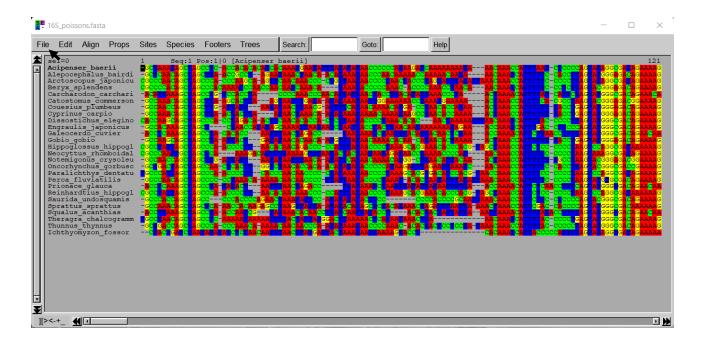
Dans un premier temps, ajouter aux 25 séquences 16S récoltées la séquence 16S de l'espèce *Ichtyomozon fossor* fourni avec le tutoriel. Puis enregister en modifiant l'extension du fichier « 16S_poissons.txt » par « 16S_poissons.fasta »

- Télécharger le programme Seaview 5.0.4 et ouvrir le fichier « 16S_poissons.fasta » dans le programme

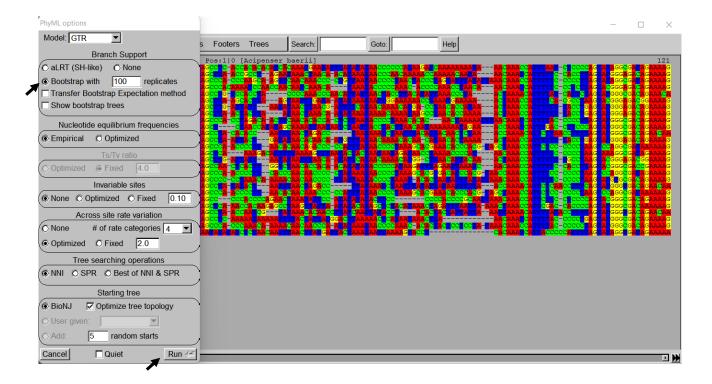
- Cliquer sur l'onglet « Align », puis dans « Alignment option », sélectionner « muscle », l'algorithme qui sera utilisé par le programme pour réaliser l'alignement de séquences



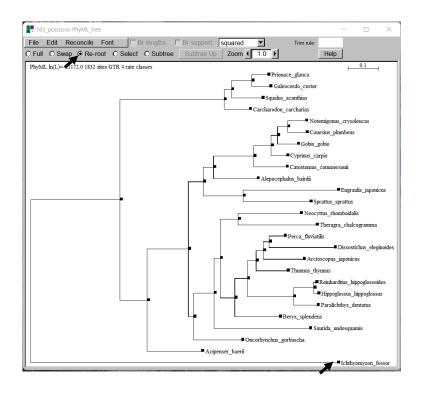
- Cliquer ensuite, toujours dans l'onglet « Align », sur « Align all ». L'opération ne devrait prendre que quelques secondes, à la suite desquelles vous aurez toutes vos séquences alignées. Sélectionner ensuite « File », puis « Save as », et enregistrer votre alignement en format FASTA en modifiant le titre par « aligned_16S_poissons.fasta »



- 3- Construction de l'arbre phylogénétique pour les 25 espèces étudiées
- Sélectionner l'onglet « Trees » puis « PhyML », un des programmes incorporés à Seaview et permettant la réalisation d'arbres phylogénétiques. Sélectionner ensuite le nombre de répétitions (bootstrap) que vous souhaitez réaliser (100 paraît convenable pour cet exercice), et cliquer sur « Run ». L'arbre final obtenu sera un arbre consensus représentant les relations majoritairement observées au cours des répétitions. Ceci permettra également d'analyser par la suite la robustesse de l'arbre phylogénétique réalisé.

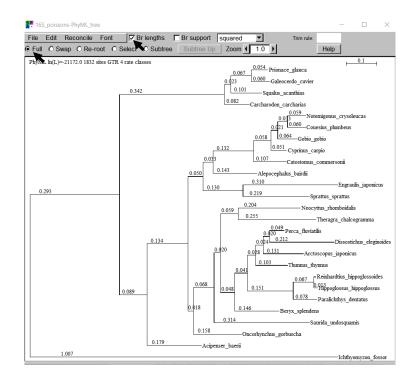


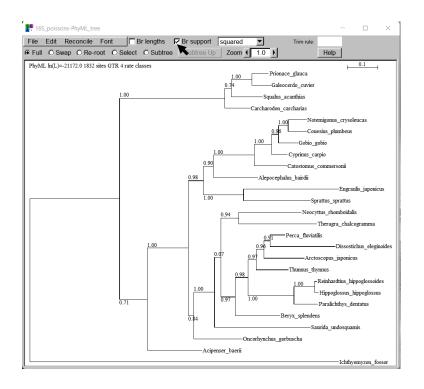
-Une fois l'arbre réalisé, il faut ensuite l'enraciner avec un « outgroup », ici une espèce génétiquement plus éloignée des autres (*Ichtyomyzon fossor*) :



Sélectionner l'onglet « Re-root » puis cliquer sur le carré noir de l'espèce avec laquelle vous voulez enraciner votre arbre

Puis sélectionner l'onglet « Full » puis cliquer sur « Br lengths » pour ajouter à l'arbre la longeur des branches





Vous pouvez également vérifier la robustesse de l'arbre réalisé en cliquant sur l'onglet « Br support ». Le nombre obtenu pour chaque branche (entre 0 et 1) indiquera le nombre de fois où la branche a été retrouvée durant les répétitions (bootstraps) (entre 0 et 100% des cas)

- Pour finir, sauvegarder l'arbre réalisé en sélectionnant « Save rooted tree » dans l'onglet « File », en renommant le fichier « arbre_16S_poissons »