

NOTICE TECHNIQUE

Phylogénie moléculaire



Réf. : K12PHY (DT-09)

Conception, réalisation, production :
École de l'ADN - 30015 Nîmes, www.ecole-adn.fr

Édition :
APBG - 69356 Lyon, www.apbg.org

Produit Français, fabriqué à Nîmes (Gard) conforme à la réglementation européenne.
Rédaction juillet 2012, version 1208
Édition :
APBG - 69356 Lyon, www.apbg.org

Rédaction Sept. 2012, version 0911A

1- PRESENTATION

1-1 Principe

Aujourd'hui, le nombre d'espèces vivantes recensées dépasse les 2 millions. En réalité, il en existerait, selon les estimations entre 10 et 30 millions.

La systématique (science de la classification) s'est enrichie d'un nouveau champ disciplinaire : la **phylogénie moléculaire**, basée sur la comparaison des séquences d'ADN qui vient compléter les méthodes traditionnelles de classification basées sur l'observation des caractères morphologiques et anatomiques.

La phylogénie moléculaire utilise les gènes des organismes vivants pour élaborer les arbres de l'évolution en comparant les caractères moléculaires (séquences nucléotidiques ou protéiques). Par rapport aux méthodes traditionnelles, la phylogénie moléculaire possède l'avantage de reposer sur la comparaison d'un très grand nombre de caractères.

En essayant de retracer l'accumulation des mutations dans les génomes au cours de l'évolution des espèces, ces méthodes modernes permettent de reconstruire l'histoire évolutive des organismes. Les espèces ont des génomes d'autant plus proches qu'elles ont divergé récemment depuis leur ancêtre commun.

Parmi cette multitude de formes vivantes, le kit se focalise seulement sur l'étude et la phylogénie de 4 espèces de l'ordre des primates : Chimpanzé, Gorille, Homme et Orang-outan.

Les séquences d'ADN des différentes espèces proviennent d'une partie du gène BRCA-1 pour « BReast CAncer » (traduction littérale « cancer du sein »). Ces séquences mesurent environ 6000 pb.

Les gènes BRCA, au nombre de 2, sont des gènes présents chez tous les mammifères, et ils appartiennent à une classe de gènes dits « gènes suppresseurs de tumeurs ». Ils interviennent dans la régulation des cycles de division cellulaire en empêchant les cellules de l'organisme de se développer de façon anarchique et incontrôlée. Spécifiquement, les gènes BRCA ont pour fonction de prévenir la prolifération incontrôlée de cellules mammaires. De fait, certaines mutations des gènes BRCA conduisent à un risque accru de développer un cancer du sein.

Dans ce kit, la technique utilisée pour comparer les séquences est basée sur le principe RFLP pour Restriction Fragment Length Polymorphism. L'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction est une technique moins lourde que le séquençage d'ADN et peut donner des indications rapides sur le niveau de variabilité d'un gène au sein d'un taxon, d'une espèce ou d'une population donnée (clade).

Les quatre ADN fournis, représentant les ADN de différentes espèces de primates (Chimpanzé, Gorille, Homme et Orang-outan) ont été préalablement hydrolysés par une enzyme de restriction. L'analyse et l'interprétation se fait directement sur gel d'agarose.

1-2 Méthodologie

Il s'agit de travaux pratiques comportant une phase expérimentale simplifiée, menée directement par l'élève avec des exigences de rigueur, d'habileté et de respect des principes d'hygiène et de sécurité.

Une telle phase pratique se replace dans l'ensemble d'un raisonnement scientifique expérimental.

2- PRESENTATION DU KIT

Ce kit présente des réactifs qui sont prêts à être déposés sur un gel d'agarose 1 % à 1, 2% maximum. Les réactifs sont fournis de sorte à réaliser 20 dépôts de 20 µl pour chaque échantillon.

2-1 Constitution du kit

- ADN Humain	450 µl ;
- ADN Chimpanzé	450 µl ;
- ADN Gorille	450 µl ;
- ADN Orang-outan	450 µl ;
- 1 tube marqueur de taille	50 µl ;

2-2 Caractéristiques et conseils d'utilisation des réactifs

- Tous les réactifs sont directement prêts à l'emploi.
- Les réactifs doivent être maintenus à 2 – 8 °C, conservés à cette température ils ont une stabilité de 4 mois à 2 – 8 °C ou 48 heures s'ils sont maintenus à température ambiante.
- Il est recommandé de ne pas maintenir les réactifs de façon prolongée à température ambiante.
- Ne pas congeler.
- Dans tous les cas se référer aux spécifications de stockage mentionnées sur l'étiquette.

3- PROTOCOLE

3-1 Matériels complémentaires nécessaires au laboratoire (non fournis) :

- Micro-pipettes ;
- Cuve à électrophorèse ;
- Appareil photo Polaroid® Gelcam pour biologie moléculaire (option) ;
- Portoirs pour tubes Eppendorfs® ;
- Marqueurs indélébiles ;
- Poubelle adaptées à la nature des déchets biologiques

3.2 Consommables

- Embouts pour micro-pipettes 200 µl ;
- tubes de type Eppendorfs® ;

3.3 Réactifs complémentaires nécessaires

Tous les réactifs nécessaires pour réaliser une électrophorèse en gel d'agarose, de 1 à 1,2%.

Voir Kit : Préparation d'un gel d'agarose réf. : DT-06

3.4 Opérations préalables aux travaux pratiques

Stérilisation du matériel et des réactifs
Aucune stérilisation ni préparation de matériel spécifique.

Préparation des gels d'agarose :
Il est conseillé de préparer le gel d'agarose pour l'électrophorèse avant la séance de travaux pratiques. Se référer à votre procédure et protocole interne au laboratoire.

Préparation des solutions :

Les solutions sont directement prêtes à l'emploi, il convient à l'enseignant de faire des aliquots de chaque échantillon avant la séance.

4- PREPARATION DE L'EXPERIMENTATION

4-1 Préparation préalable de la séance

Pour chaque poste, préparer des échantillons de 20 µl de chaque ADN et 5 µl de marqueur de taille.

- 1 x 20 µl d'ADN Humain ;
- 1 x 20 µl d'ADN Chimpanzé ;
- 1 x 20 µl d'ADN Gorille ;
- 1 x 20 µl d'ADN Orang-outan ;
- 1 x 5 µl de marqueur de taille ;

4-2 Déroulement de la séance

• Manipulation par les élèves

Les élèves déposent directement 20 µl de chaque ADN dans un puits de gel d'agarose traditionnel à 1 – 1,2 %.

Seulement 5 µl de marqueur de taille suffisent.

La révélation des fragments d'ADN se fait après une migration à 100 volts pendant 30 minutes ou 135 volts pendant 20 minutes.

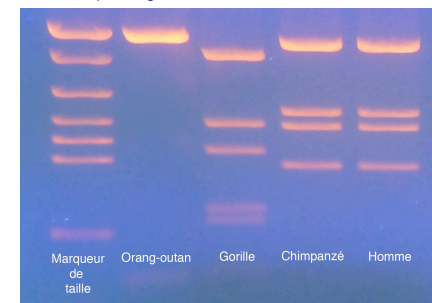
Pour la coloration de l'ADN se référer à votre procédure et protocole interne au laboratoire.

Ces échantillons sont également adaptés pour le système qui utilise les « FlashGel® Cassettes » ; il suffit avec ce système de déposer seulement 5µl d'échantillon et 2µl de marqueur de taille.

Se référer à la notice technique du produit :
Réf : DT-FG2 ou DT-FG4.

Dans tous les cas d'utilisation de gels d'agaroses spécifiques se reporter aux spécificités d'utilisation décrites par le fabricant.

Résultats après migration :



Interprétation des résultats :

Observations :

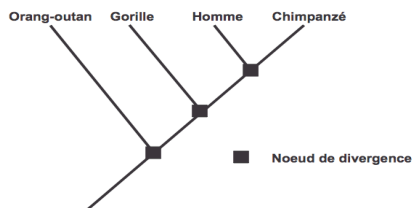
- Les profils de restriction ont été obtenus au moyen d'une seule enzyme de restriction.
- Les profils de l'homme et du chimpanzé sont identiques.
- Un seul fragment est commun entre les profils de l'Homme, du Chimpanzé et de celui du Gorille.
- Le profil de l'orang-outan est unique et ne présente aucun fragment en commun avec les trois autres espèces.

Conclusions :

- L'Homme partage un ancêtre commun plus proche avec le Chimpanzé, qu'avec le Gorille et l'Orang-outan.
- Nous pouvons aussi en déduire que le clade Homininés constitué de l'Homme, et du Chimpanzé, partage un ancêtre commun plus proche avec le Gorille que l'Orang-outan.

A l'aide de ces résultats, nous pouvons établir l'arbre phylogénétique des quatre espèces de primates.

Attention, sur cette représentation la distance entre les noeuds de divergence n'est pas représentative de l'échelle et de l'horloge évolutive.



En cas d'ingestion informez le médecin responsable ou contactez le centre antipoison le plus proche.

Précautions spécifiques :

Le port de gants et de la blouse est conseillé.
Mesures d'hygiène : se laver les mains avant et après l'expérimentation.

Dans le cadre d'une révélation des fragments d'ADN au BET, il est important de veiller à respecter rigoureusement ces recommandations :

Interdire formellement aux élèves de manipuler le gel d'agarose chargé en BET, (manipulation effectuée par le professeur préalablement formé) ;
Porter des lunettes de protection en utilisant la table UV ;
Pour l'élimination du BET chaque établissement doit se référer à sa procédure interne de « traitement des déchets ».

La fiche de consigne de sécurité MSDS est disponible en ligne sur le site www.ecole-adn.fr/MSDS

Contact commande

APBG - B.P. 8337
69356 Lyon cedex 08

tel 04 78 74 47 22
fax 04 78 01 22 14

apbg@wanadoo.fr

www.apbg.org

Informations Renseignements

Ecole de l'ADN
19, Grand Rue
BP 81295
F-30015 Nîmes Cedex 1

Tel/fax : +33 (0) 466 67 82 29

E-mail : info@ecole-adn.fr

www.ecole-adn.fr

**DNATOOLS est une marque
déposée par l'école de l'ADN**

Action parrainée par
Thermo Scientific Molecular Biology



5- CONSIGNES DE SECURITE

Les réactifs qui constituent ce kit pédagogique ne présentent aucun caractère dangereux, toxique ou pathogène.

La fiche de sécurité MSDS est disponible, sur simple demande auprès de l'École de l'ADN.

Au début de chaque formation, il est néanmoins important de sensibiliser les élèves aux risques encourus lors des manipulations :

Se référer aux mesures de sécurité d'utilisation des appareils électriques et matériels ;
Utiliser les précautions d'usage pour toutes manipulations de produits dangereux ou toxiques.