



<http://www.takween.com>

## TECHNIQUES DE SEPARATION ET D'ANALYSE EN BIOCHIMIE ET MARQUAGE DE LA DIVERSITE GENETIQUE

Cours théorique et pratique: M. BAAZIZ  
baaziz@ucam.ac.ma

## TRAVAUX PRATIQUES

### APERCU SUR LA DIVERSITE GENETIQUE DE LA PALMERAIE DE MARRAKECH COMME REVELEE PAR L'OUTIL ISOENZYMATIQUE

L'objectif du travail pratique est de trouver des éléments de réponse aux questions suivantes:

- Quelles sont les variétés de palmier dattier susceptibles d'être présentes à Marrakech ?
- Vis à vis de quelle(s) palmeraie(s) marocaine(s) la palmeraie de Marrakech montre plus d'affinité ?

#### **SUPPORTS:**

1. Polycopié détaillé
2. VCD sur la technique d'électrophorèse pratiquée au laboratoire BAP (production BAP 2000)\*
3. Données brutes des génotypes des variétés de palmier dattier cultivées au Maroc
4. Données brutes des génotypes des palmeraies marocaines.
5. Matériel et produits nécessaires la collection de folioles, l'électrophorèse et la révélation des isoenzymes.

Plus de détail est disponible sur le site web :

<http://www.biotech-ecolo.net/diversite-genetique-cours.html>



Le travail pratique (TP) porte sur une thématique en rapport avec les activités de recherche du Laboratoire de Biochimie et Biotechnologies des Plantes (BBP).

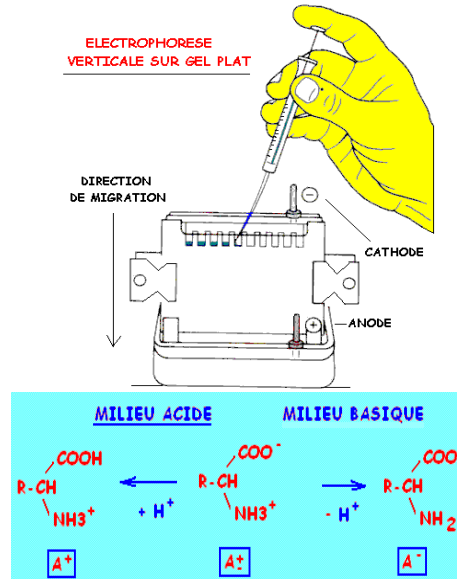
## 1. ELECTROPHORESE

L'électrophorèse est une méthode d'analyse et de séparation basée sur les critères de la **charge électrique** et la **taille** des molécules. La migration différentielle de particules chargées électriquement, se fait sous l'influence d'un champ électrique.

Seules les particules chargées positivement ou négativement sont attirées par les pôles opposés du champ électrique. Les composés qui peuvent être transformés en particules chargées par formation de complexes, sont de même sujets à une migration sous l'effet du champ électrique.

Le **pH** des solutions joue un rôle très important dans l'acquisition des charges électriques. Ainsi, dans le cas des protéines, le pH auquel la charge électrique globale est nulle est appelé **point isoélectrique (PI)**.

- Une protéine en solution portée à un pH inférieur à son PI, se comporte comme une base et capte des protons  $H^+$ . Elle devient chargée positivement.
- Une protéine mise à un pH supérieur à son PI, se comporte comme un acide et cède des protons. Elle sera chargée négativement.



### Déplacement électrophorétique

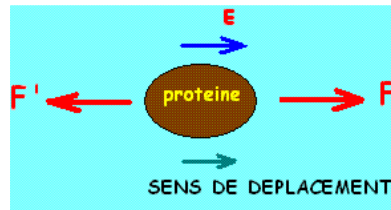
Sous l'action d'un champ électrique,  $E$ , une protéine se déplace avec une vitesse,  $v$ , proportionnelle au champ :

$$v = \mu E \quad \text{avec } \mu \text{ appelée 'mobilité électrophorétique'}$$

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (1) \quad \text{avec : } \mu \text{ en } cm^2 \cdot s^{-1} \cdot volt^{-1}, v \text{ en } cm \cdot s^{-1} \text{ et } E \text{ en } volt \cdot cm^{-1}$$

Le champ électrique ( $E$ ) crée entre 2 électrodes, exerce une force,  $F$ , sur une protéine que l'on suppose sphérique et de charge  $q$ ;

$$F = q E$$



Les forces de frottement,  $F'$ , dues à la viscosité vont s'opposer à la migration de la protéine et la freiner;

$$F' = 6 \pi \eta v r \quad \text{avec : } v : \text{vitesse de la protéine, } r : \text{rayon de la protéine et } \eta : \text{coefficient de viscosité.}$$

Lorsque les 2 forces s'équilibrent (déplacement avec une vitesse constante);

$$F = F' \quad \text{soit } q E = 6 \pi \eta v r$$

$$\text{donc : } v = \frac{qE}{6 \pi \eta r} \quad (2). \quad (2) \text{ dans } (1) : \mu = \frac{q}{6 \pi \eta r}$$

Donc, la mobilité d'une particule migrant dans un champs uniforme dépend de 3 facteurs:  $q$ ,  $\eta$  et  $r$ .

\* ***Elle est proportionnelle à sa charge (q).***

\* ***Elle est inversement proportionnelle au coefficient de viscosité du milieu (η)***

\* ***Elle est inversement proportionnelle à son rayon (r).***

## SUPPORTS DE MIGRATION UTILISES EN ELECTROPHORESE

Les supports utilisés en électrophorèse sont nombreux, avec des degrés de résolution variables. Leurs types ont permis de distinguer plusieurs appellations en électrophorèse, comme :

- **Electrophorèse en veine liquide**
- **Electrophorèse sur papier**
- **Electrophorèse sur gels (agarose, amidon, polyacrylamide...).**

*Précaution : avant sa polymérisation le polyacrylamide est neurotoxique.*

### **Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.**

Ce type d'électrophorèse peut être réalisé en utilisant des systèmes tampons dissociant ou non dissociant, continus ou non continus. L'agent dissociant le plus utilisé est le détergent anionique; Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Une fois fixé sur les protéines (à chaud) le SDS affecte une charge négative (-) à tous les polypeptides. Ces derniers migreront, donc, dans le gel de polyacrylamide selon leur taille, uniquement. Ainsi, l'expérimentateur peut déterminer le poids moléculaire (PM) des différents polypeptides en se référant à la mobilité de polypeptides de PM connus (marqueurs de PM).

Le système tampon non dissociant est recommandé pour l'électrophorèse de protéines natives, où l'interaction subunitaire, la conformation et l'activité biologique des protéines doivent être préservées. Dans ce cas, la séparation se fait sur la base de la charge et de la taille.

Les systèmes tampons discontinus (multiphasiques) utilisent différents tampons à des pH différents.

### ***Exemple de systèmes tampon discontinus : le système d'Ornstein.***

L'utilisation de tampons discontinus dans leur pH et la nature des ions, permet la concentration préalable de l'échantillon à séparer. Les gels de polyacrylamide répondant à cette condition, présentent 2 types de structures :

- Un gel de concentration (stacking gel).
- Un gel de séparation (resolving gel).

L'utilisation en électrophorèse de gels de concentration et de séparation de concentrations en polyacrylamide non convenable peut aboutir à 2 situations différentes:

- Elimination des protéines incapables de pénétrer dans le gel, dans le cas des gels très concentrés.
  - Absence de séparation des protéines de petite taille, migrant avec le front.
- Entre ces 2 extrêmes, les protéines peuvent être résolues différemment selon la concentration en polyacrylamide du gel de séparation:

(Polyacrylamide) (%)	Poids moléculaire (Kd)
15-20	10-40
10-15	40-100
5-10	100-300
5	300-500
2-5	PM > 500

### ***Révélation des protéines séparées par électrophorèse.***

La majorité des protéines solubles sont incolores. Leur visualisation sur les supports

d'électrophorèse s'effectue par des procédés histochimiques qui permettent soit de colorer les produits de dénaturation de la protéine ou une partie chimique qui lui est associée, soit d'obtenir un précipité coloré à l'emplacement de cette protéine en utilisant ses propriétés catalytiques ou antigéniques (voir cours).

## 2. TRAVAIL PRATIQUE

### COLLECTION DU MATERIEL VEGETAL.

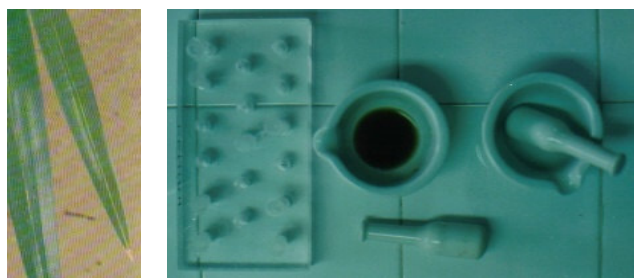
Munis de sachets et d'un bac de glace, les étudiants visitent la zone de la palmeraie la plus proche du Laboratoire pour échantillonner les folioles de palmier dattier (1 foliole par arbre). Le prélèvement concerne au moins 40 palmiers adultes. Les folioles sont numérotées et conservées dans le bac à glace. Tout le matériel végétal collecté servira dans l'étape d'extraction des enzymes en vue de l'étude du polymorphisme isoenzymatique.

### EXTRACTION DES ENZYMES A PARTIR DES FEUILLES DE PALMIER DATTIER

Des quantités de 0,25 grammes de feuilles correspondant à des morceaux de feuilles de 4 cm de long, environ sont utilisées dans l'extraction des enzymes. Après rinçage à l'eau distillée, placer chaque morceau de feuille dans un mortier maintenu dans la glace et portant le même numéro. A l'aide d'une paire de ciseaux découper finement le matériel végétal afin de faciliter son broyage à l'aide d'un pilon. Le matériel végétal, préalablement découpé, est broyé à l'aide un pilon dans 1,5 ml de tampon d'extraction des isoenzymes (TAMET pH 7,0) constitué des réactifs suivants :

Réactif	Concentration
Tris	0,5 M
Acide ascorbique	0,3 M
2-mercaptoéthanol	2% (v/v)
EDTA Na <sub>2</sub>	0,01 M
Triton X-100	0,8% (v/v)

L'extraction des enzymes se fait à froid afin d'éviter toute dénaturation possible. L'acide ascorbique et le 2 mercaptoéthanol sont des antioxydants qui empêchent partiellement l'oxydation des phénols en quinones qui peuvent provoquer l'inactivation des enzymes.



Les extraits obtenus sont transvasés dans des microtubes de 1,5 ml, puis centrifugés 7 min à 9000 g. Après centrifugation, les surnageants (extraits bruts) sont récupérés dans d'autres microtubes de même volume. Ils peuvent être utilisés immédiatement pour l'électrophorèse ou congelés à -20°C pour un usage ultérieur.

### PREPARATION DES GELS DE POLYACRYLAMIDE.

Les gels de polyacrylamides ont une épaisseur de 1 mm et sont confectionnés à l'aide de 2 plaques de verre de dimension 18 X 14 cm. La partie supérieure du gel, lieu du

dépôt des extraits enzymatiques, présente une texture à porosité large (gel de concentration, 5% en polyacrylamide). Ce gel permet de concentrer les extraits avant leur séparation sur le gel à porosité étroite (gel de séparation, 11% en polyacrylamide). La composition des 2 gels est résumée dans le tableau suivant :

### Composition (en ml) des gels de polyacrylamide à 11%.

	Gels de concentration 5% (10 ml)		Gels de séparation 11% (15 ml)		
		T.G <sup>1</sup>	T.B.E <sup>2</sup>	T.G <sup>1</sup>	T.B.E <sup>2</sup>
Acrylamide-bis acrylamide 30:0,8%		1,66	1,66	5,50	5,50
Tris-HCl 3,0 M (pH 8,8)		-	-	1,87	-
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)		2,50	-	-	-
Tampon T.B.E (pH 8,1)		-	1,50	-	2,50
Eau distillée		5,34	6,34	6,88	6,50
Persulfate d'ammonium 1,5%		0,50	0,50	0,50	0,50
TEMED		0,01	0,01	0,01	0,01

<sup>1</sup>Tampon de migration Tris-Glycine

<sup>2</sup>Tampon de migration Tris-Borate-EDTA

Tris .....0,049 M  
Glycine .....0,384 M

Tris ..... 0,890 M  
Acide borique ..... 0,890 M  
EDTA Na<sub>2</sub> ..... 0,025 M

Dilution au 1/5 (pH 8,3)

Dilution au 1/10 (pH 8,1)

### ELECTROPHORESE.

Après le dépôt des extraits (50 µl), la migration électrophorétique est effectuée à 180 V. Le front de migration est repéré par le bleu de bromophénol. La séparation dure 5 heures, environ.



### REVELATION DES ISOENZYMES

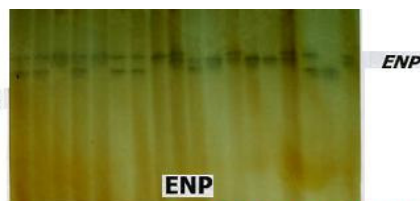
La révélation *in situ* des isoenzymes est effectuée par incubation du gel dans un mélange réactionnel contenant les substrats de l'enzyme étudiée.

Pour ce travail pratique, 2 systèmes

enzymatiques seront étudiés. Le système des estérases (EST) et celui des endopeptidases (ENP). Les mélanges réactionnels des 2 systèmes et ceux d'autres systèmes différents sont donnés en annexe.

\* Faire un schéma de l'ensemble de l'appareillage utilisé dans ce travail pratique

\* Faire un schéma du zymogramme obtenu et mesurer les R<sub>f</sub> des différentes bandes.



EXAMPLES OF ZYMOGRAMS IN THE CASE OF DATE PALM

BAP, Marrakech, Morocco

### INTERPRETATION DES RESULTATS

- Déterminer les génotypes des individus étudiés
- Déterminer les variétés de palmier dattier susceptibles d'être représentées dans la palmeraie de Marrakech

- Vis-à-vis de quelles palmeraies marocaines, la palmeraie de Marrakech est elle plus proche ?

## **MELANGES REACTIONNELS POUR LES REVELATIONS ENZYMATIQUE**

### **CLASSE DES HYDROLASES.**

#### **Estérases.**

<b>α-Naphthylacétate (dans acétone 50%)</b>	<b>0,03 g</b>
compléter à 100 ml par Tris-Hcl 0,05 M pH 7,2	
Incubation 15 min	
Rinçage du gel 2 fois par l'eau courante	
Incubation 20 min dans la solution de coloration:	
<b>Fast Blue RR salt</b>	<b>0,14 g</b>
<b>Tris-Hcl pH 7,2</b>	<b>0,05 M</b>
<b>H<sub>2</sub>O q.s.p.</b>	<b>100 ml</b>

#### **Endopéptidases.**

<b>α-N-Benzoyl-DL-Arginine-β -Naphthylamide (dans méthanol)</b>	<b>80 mg</b>
<b>Nacl 1 M</b>	<b>2 ml</b>
<b>Mgcl<sub>2</sub> 0,1 M</b>	<b>2 ml</b>
<b>Tampon acétate 0,1 M pH 5,0</b>	<b>5 ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O q.s.p.</b>	<b>100 ml</b>
Incubation 15 min puis rinçage	
Incubation jusqu'à apparition des bandes dans:	
<b>Fast Blue K</b>	<b>50 mg</b>
<b>Nacl 1 M</b>	<b>2 ml</b>
<b>Mgcl<sub>2</sub> 0,1 M</b>	<b>2 ml</b>
<b>Tampon acétate 0,1 M pH 5,0</b>	<b>5 ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O q.s.p.</b>	<b>100 ml</b>

### **CLASSE DES TRANSFERASES.**

#### **Glutamate oxaloacétate transaminase.**

<b>Acide aspartique</b>	<b>250 mg</b>
<b>acide alpha-cétoglutarique</b>	<b>100 mg</b>
<b>Tris-Hcl 0,5 M pH 7,2</b>	<b>50 ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O q.s.p.</b>	<b>100 ml</b>
Rinçage après 15 min d'incubation	
<b>Fast blue BB</b>	<b>200 mg</b>
<b>Tris-Hcl 0,5 M pH 7,2</b>	<b>50 ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O q.s.p.</b>	<b>100 ml</b>
Incubation jusqu'à apparition des bandes.	

[00\\_TechniquesSommaire](#), [01\\_TechniquesPolarite](#), [02\\_TechniquesTaille](#),  
[03\\_TechniquesForme](#), [04\\_TechniquesIonicite](#), [05\\_Electrophorese](#),  
[06\\_Isozymes1](#), [07\\_Isozymes2](#), [08\\_Isozymes3](#), [09\\_Isozymes4](#), [10\\_RFLP](#),  
[11\\_RAPD](#), [12\\_RAPD](#), [13\\_AFLP](#) ← / → [15\\_TD](#)