

# **Rapport de physiologie végétale :** **Zymogrammes**

## **Table des matières**

1. Introduction : .....	3
2. Matériel et méthodes :.....	3

• <b>Extraction des protéines</b> .....	3
• <b>Préparation des gels de polyacrylamide</b> .....	3
• <b>Migration</b> .....	4
• <b>Coloration des gels</b> .....	4
3. Résultats et discussion : .....	5
4. Conclusions : .....	6
ANNEXES .....	7

## 1. Introduction :

Le but de cette manipulation est de caractériser une plante en fonction de la trace que laissent ses protéines sur le gel d'électrophorèse.

Nous savons que la plupart des plantes ont des protéines avec des fonctions semblables mais qui diffèrent de par leur séquence en acides aminés. Cette différence de structure primaire entraîne une différence point de vue poids moléculaire et charge, et donc une différence de migration sur le gel d'électrophorèse. En observant les colorations de ces gels, on peut dès lors observer des migrations spécifiques à chaque plante et donc les différencier.

Pratiquement, six échantillons ont été distribués en simple aveugle et nous avons réalisé les zymogrammes correspondants que nous allons, ici, comparer aux zymogrammes de référence pour déterminer le meilleur marqueur enzymatique utilisable pour l'identification d'une espèce végétale.

Cette séance de travaux pratiques nous a aussi permis de nous familiariser avec les dispositifs expérimentaux et avec la réalité quotidienne du travail d'un chercheur (gestion du temps, précision, erreurs, ...)

## 2. Matériel et méthodes :

- **Extraction des protéines**

Nous disposons de six échantillons de graines différentes. Grâce à différents moyens physico-chimiques (PVP, tampon d'extraction, ultra-turrax, centrifugation) nous allons obtenir un surnageant contenant les milliers de protéines différentes de nos graines. Toutes ces manipulations se font sous hotte (à cause du  $\beta$ -mercaptoéthanol) et à 4°C afin de ne pas dénaturer les protéines.

- **Préparation des gels de polyacrylamide**

Nous allons mélanger des monomères d'acrylamide et de bisacrylamide pour les faire polymériser. L'initiation de cette polymérisation requiert la présence d'APS et de TEMED qui sont des catalyseurs produisant des radicaux libres.

Après avoir mis en place les plaques de verres et les spacers, nous prenons soin de vérifier l'étanchéité du montage. Maintenant, nous pouvons couler les gels, en prenant soin de ne pas trop traîner car, la réaction étant radicalaire, la polymérisation est rapide. Il ne faut pas oublier non plus d'ajouter un peu d'éthanol en surface des gels afin d'empêcher tout contact avec l'oxygène qui inhibe la réaction.

Nous allons premièrement couler le running gel (ou gel de séparation) qui est un gel à 8 ou 9% de polyacrylamide, avec des mailles plus serrées et maintenu à un pH de 8,8 (grâce à un tampon Tris-HCl). C'est dans ce gel qu'aura lieu la séparation des protéines selon leur charge. Ensuite, nous coulons le stacking gel (ou gel de concentration) qui lui est un gel à 3,5% de polyacrylamide, avec des mailles lâches et maintenu à un pH de 6,8 (tampon Tris-HCl). Ce gel sert à concentrer et à aligner les protéines pour qu'elles ne forment plus qu'une bande à l'intersection du running et du stacking gel. C'est aussi dans ce gel que nous posons des peignes, créant des puits qui vont guider les protéines lors de leur migration.

- **Migration**

Lors de cette manipulation, nous avons effectué une électrophorèse native, c'est à dire qui ne dénature pas les protéines. La séparation des protéines ne se fait donc pas selon leur poids moléculaire mais selon leur charge plus ou moins importante (dépendant du pH du tampon d'électrophorèse).

On remplit chaque puits avec notre surnageant de protéines sauf le premier, rempli de bleu de Bromophénol, qui nous servira à visualiser la migration.

Après avoir ajouté le tampon de glycine, nous mettons le montage sous tension à 150 volts et nous laissons migrer une heure, en vérifiant de temps en temps la position du bleu de Bromophénol.

- **Coloration des gels**

Une fois la migration terminée, nous démoulons délicatement les gels et nous les plongeons dans les trois solutions de coloration. Nous effectuons trois colorations différentes, chacune correspondant au rôle physiologique d'une protéine. Nous allons mettre en évidence la présence de trois types d'enzymes différentes : la phosphatase acide, la Glutamate Oxaloacétate Transaminase, et les estérases. Pour ce faire nous mettons, en présence de ces protéines, leurs substrats et c'est leur réaction qui déclenche une coloration sous forme de bandes.

- Coloration pour phosphatase acide (APH)

La phosphatase acide est une enzyme qui déphosphoryle une très grande gamme de substrats phosphorylés avec un optimum d'activité en milieu acide.

- Coloration pour la Glutamate Oxaloacétate Transaminase (GOT)

Le rôle de la GOT est la transamination d'acides aminés, qui transfère l'azote et crée des acides cétoniques pour le cycle de Krebs et la néoglucogenèse.

- Coloration pour les estérases (EST)

Les estérases constituent un groupe d'enzymes non spécifique qui hydrolyse les esters. Le substrat utilisé pour les mettre en évidence est l' $\alpha$ -naphtyl-acétate.

### 3. Résultats et discussion :

Les résultats obtenus (voir feuille annexe : *Groupe du 23/02/2006 : résultats zymogramme*), suite à la migration et à la coloration, sont comparés avec une banque de données (voir feuille annexe : *Zymogrammes de référence*).

Nous devons tenir compte du fait que ces résultats sont obtenus lors d'une expérience réalisée par des étudiants peu habitués aux matériels de laboratoire et que donc des erreurs d'expérimentation ne sont pas à exclure. Nous pouvons constater aussi que la coloration des APH n'a pas fonctionné lors du TP ni sur le zymogramme de référence, ce qui nous permet de dire, sans équivoques, que la coloration APH n'est pas un bon marqueur enzymatique pour les protéines considérées.

Cependant à partir des colorations GOT et EST nous pouvons établir une comparaison cohérente :

Echantillon 1 : Laitue à couper

Echantillon 2 : Chicorée frisée

Echantillon 3 : Chicorée scarole

Echantillon 4 : Radis

Echantillon 5 : Chicon

Echantillon 6 : Carottes

Nous avons pu mettre en relation les résultats obtenus avec ceux de la référence grâce au fait que les organismes d'une même espèce ont des séquences en acides aminés (et donc des séquences nucléotidiques) extrêmement semblables. Elles ont dès lors des traces semblables, mais pas identiques car il ne faut jamais oublier la notion de polymorphisme qui existe aussi au sein d'une même espèce. Le polymorphisme entre les espèces nous a permis de considérer les différentes traces comme appartenant à des espèces différentes sauf pour les deux chicorées qui ont des traces sensiblement pareilles. Nous en avons dès lors déduit qu'elles appartenaient à la même lignée évolutive, cette hypothèse s'est confirmée par nos recherches en bibliothèque qui nous ont appris l'existence de *Cichorium pumilum*, leur ancêtre commun.

Nous pouvons aussi noter que les deux chicorées et la laitue présente un spot commun, absent chez les autres espèces, ce qui nous permet d'établir, entre ces trois organismes, un lien de « parenté », en effet, ces trois espèces appartiennent toutes à la famille des *Asteraceae*.

Cela nous permet de présenter une application des zymogrammes : la phylogénie (=succession supposée des espèces (ou des genres, ordres, classes) ayant donné naissance à l'espèce ou au taxon considéré). En effet des espèces proches point de vue évolutif auront des zymogrammes présentant des similitudes marquées. Dans le même ordre d'idées, un chercheur trouvant une nouvelle espèce peut, grâce aux zymogrammes, retrouver les espèces proches de cette dernière. Une dernière application des zymogrammes pourrait être de détecter la présence ou l'abondance de certaines enzymes grâce aux spots et à leurs grosseurs.

## **4. Conclusions :**

Cette expérience nous a donc permis de mettre en évidence les différences entre les séquences primaires des protéines mises à notre disposition par l'étude des zymogrammes.

Elle nous permet aussi de dire que la coloration APH n'est pas appropriée pour l'étude des protéines végétales, mais par contre les colorations GOT et EST donnent des résultats satisfaisants.

Ces deux aspects de l'expérience combinés nous ont permis de faire une comparaison et une étude partielle du protéome des espèces végétales proposées. De là nous avons pu établir des liens évolutifs entre ces espèces. Et donc comme énoncé plus haut l'application des zymogrammes qui semble pour nous la plus intéressante est la mise en place de liens phylogénétiques.

# **ANNEXES**