



البيوكيمياء . قواعد و تطبيقات في البيوتكنولوجيات
BIOCHIMIE. BASES ET APPLICATIONS EN BIOTECHNOLOGIES

تكوين
TAKWEEN

<http://www.takween.com>

Techniques-Sommaire : <http://www.takween.com/techniques/techniques-biochimie.html>
Travaux dirigés (TD) : <http://www.takween.com/techniques/electrophorese-isoenzymes-TD.pdf>
Travaux dirigés (TP) : <http://www.takween.com/techniques/electrophorese-isoenzymes-TP.pdf>
Isozymes. Principe de détection : <http://www.takween.com/techniques/isoenzymes-detection.pdf>
Isozymes : loci, allèles : <http://www.takween.com/techniques/isoenzymes-loci-alleles.pdf>
RFLP : http://www.takween.com/techniques/10_RFLP.pdf
RAPD : http://www.takween.com/techniques/11_RAPD.pdf
AFLP : http://www.takween.com/techniques/13_AFLP.pdf
SSR (microsatellites) : <http://www.takween.com/techniques/microsatellites-SSR-marqueurs.pdf>

Les isoenzymes comme marqueurs biochimiques et moléculaires

L'évolution moléculaire a permis de montrer que certaines protéines (ensemble d'acides aminés), comme les cytochromes ou les hémoglobines chez plusieurs organismes, ont évolué à un rythme constant par substitutions successives d'acides aminés

(<http://www.takween.com/JMOL/acides-amines-visualisation.html>). Ceci signifie que des mutations 'tolérables' par le DNA (<http://www.takween.com/JMOL/nucleotides-dna-visualisation.html>) apparaissent à un taux constant dans le temps. Aussi, une population P, étudiée pour un locus donné, ne sera plus identique à elle-même après un intervalle de temps t. Son changement peut être prévisible en considérant les paramètres t (en années) et ∞ , taux de substitution par année d'un acide aminé par un autre pour une protéine moyenne dans la population P. Les valeurs de ∞ sont de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-9} /an/site d'acide aminé.

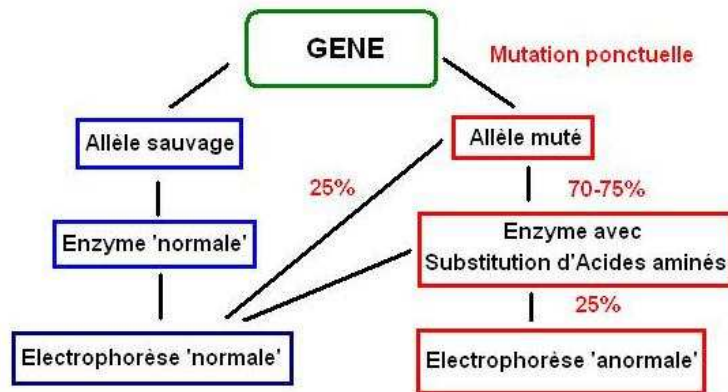
L'analyse des isoenzymes par électrophorèse (http://www.takween.com/techniques/05_Electrophorese.html) révèle la différence d'états alléliques par molécule de protéine entière (non pas par acide aminé). L'électrophorèse exploite l'ionocité comme critère moléculaire pour la séparation (<http://www.takween.com/techniques/techniques-ionicite.html>).

Origines de la variation des isoenzymes détectée par électrophorèse

Les isoenzymes correspondent à différentes formes d'une même enzyme, catalysant la même réaction, mais dont les propriétés physico-chimiques (charge électrique, taille,...) sont différentes. Les isoenzymes peuvent être d'origine cytosolique ou plastidique. Leur séparation par électrophorèse, sur gel d'amidon ou de polyacrylamide, est due à plusieurs facteurs.

Modification de la charge électrique.

La modification de la charge d'une protéine suite à un changement de la structure primaire, peut résulter d'une mutation ponctuelle, par exemple. Les conséquences qui en résultent peuvent donner des électrophorèses "anormales" (Jacobs, 1975).



Origines de la variabilité des isoenzymes

<http://www.takween.com>

Seules les substitutions d'acides aminés qui diffèrent par leurs charges peuvent être détectées. Une proportion de 25% seulement, de substitution conduit à un changement de charges électriques (aperçu sur les acides aminés (<http://www.takween.com/JMOL/acides-amines-visualisation.html>)).

Ce sont les radicaux R de la structure primaire des protéines qui affectent la charge électrique à l'ensemble de la molécule. Les 20 acides aminés peuvent être répartis en 3 groupes selon la charge électrique des radicaux R

Composition en Acides aminés (AA) d'une protéine moyenne (d'après King, J.L. & Jukes, T.H. 1969. Non-darwinian evolution. Random fixation of selectively neutral mutations. Sciences 164, 788-798.). Modifié par addition de pl.

Groupe	Acides aminés (pl)	% protéine moy.	Caractéristiques du groupe
'AA.basiques'	Lysine (9,47) Arginine (10,76) Total	7,2 4,2 11,4	Les AA. peuvent être neutre ou chargés + selon le pH du milieu.
'AA.neutres'	Serine (5,68) Leucine (6,04) Glycine (6,06) Alanine (6,10) Valine (6,00) Threonine (6,53) Proline (6,30) Isoleucine (6,04) Phénylalanine (5,91) Asparagine (5,41) Glutamine (5,65) <u>Tyrosine (5,63)</u> <u>Cystéine (5,02)</u> <u>Histidine (7,64)</u> Méthionine (5,74) Tryptophane (5,88) Total	8,1 7,6 7,4 7,4 6,8 6,2 5,0 3,8 4,0 4,4 3,7 3,3 3,3 2,9 1,8 1,3 76,9	Les chaînes latérales sont non ionisables. Les AA. sont électrostatiquement neutres une fois inclus dans une chaîne peptidique. Les AA. HIS, CYS et TYR ont des radicaux R ionisables. Mais ils ne le sont pas dans les conditions des pH utilisés en électrophorèse.
'AA.acides'	Acide aspartique (2,98) Acide glutamique (3,08) Total	5,9 5,8 11,7	Groupe R à fonction carboxylique. Les AA peuvent être neutres ou chargés négativement.
	Total général	100%	

Une protéine composée des 3 groupes d'AA. Aura une charge nette négative ou positive dépendant de la balance des charges en fonction du pH et de l'exposition des radicaux selon l'environnement et l'association des polypeptides. Un pH faible est en faveur des charges +. Un pH élevé est en faveur des charges –

Modifications post-traductionnelles.

Les modifications post-traductionnelles conduisant aux associations de sous-unités et la mise en place de structures tertiaires ou quaternaires, formation de complexes avec des glucides et des acides nucléiques, adénylation, phosphorylation, dégradation sélective...

Techniques de séparation et d'analyse en biochimie. Sommaire.

<http://www.takween.com/techniques/techniques-biochimie.html>