

Etude des protéines totales et de l'ADN issus des feuilles de *Moricandia arvensis* collectées de quatre régions du sud tunisien

Hasnaoui Néjib*, Daly Dalia*, Haj Khélil Amel*, Zorgui Lazhar**,
Chekir Ghedira Leïla*

* : Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire- Faculté de
Pharmacie- rue Avicenne- 5000 Monastir.

** : Faculté des Sciences de Gafsa

delydelia@yahoo.fr Fax : 0021676240907

RESUME

A partir des protéines et de l'ADN extraits des feuilles de *Moricandia arvensis*, collectées de quatre régions du sud tunisien, nous avons étudié la variabilité de cette plante reconnue pour ses vertus médicinales. Nous avons analysé d'une part les protéines totales extraites puis séparées par la technique SDS-PAGE. Cette méthode a révélé un degré de similitude très remarquable entre les plantes issues des quatre régions et qui varie entre 0.77 et 0.91. Nous avons effectué d'autre part, une analyse de la variabilité génétique par l'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe par la technique PCR-RAPD en utilisant trois amorces différentes. Nous avons remarqué que la similitude est plus accentuée entre les plantes collectées des régions du Sud Ouest, avec un degré de similitude pouvant atteindre 100%. Celles issues du Sud Est présentent un degré de similitude de 66%.

Mots clés: *Moricandia arvensis*, Diversité génétique, SDS-PAGE, PCR-RAPD, Marqueurs moléculaires.

SUMMARY

The DNA and proteins extracted from *Moricandia arvensis* leaves collected from four regions of south Tunisia has been the subject of our studies. The total proteins were extracted and separated by SDS-PAGE. This method showed a very remarkable similarity between the plants of the four regions which goes from 0.77 to 0.91. Also, we studied the polymorphic DNA by PCR-RAPD using three different primers. This method showed that the similarity was clearer between the plants collected from the southern west (100%). Those collected from the southern east were 66% similar.

Keywords: *Moricandia arvensis*; Genetic diversity, SDS-PAGE, PCR-RAPD, Molecular markers.

1- INTRODUCTION

En Tunisie, la flore médicinale et aromatique est très diversifiée. 500 espèces (sur un total de 2103, soit 25% des espèces) sont reconnues comme étant à vertus médicinales et aromatiques [1]. La majorité d'entre elles pousse en milieux fragiles (semi-aride et aride) et demeure encore très peu connue.

Notre recherche a porté sur *Moricandia arvensis*, espèce végétale abondante dans les milieux arides. Cette étude vise particulièrement l'analyse de la structure génotypique des populations et l'évaluation du niveau de leur divergence génétique. Les marqueurs génétiques que nous avons utilisés sont les protéines totales et l'ADN.

Le genre *Moricandia* appartient à la famille des Crucifères (ou Brassicacées) qui comprend environ 380 genres, dont 113 se trouvent dans des pays méditerranéens, et 3000 espèces dont 625 sont méditerranéennes [2]. La Moricande, *Moricandia arvensis* Ssp. *suffruticosa*, qui appartient à la famille Cruciferae est une plante pérenne, ligneuse, à feuilles charnues, cordiformes et amplexicaules (qui embrassent la tige) à la base (Figure 1).



Figure1. Feuilles de *Moricandia arvensis* Figure2. Fleurs de *Moricandia arvensis*

Les fleurs sont composées de grandes pétales violettes, de 15 à 20 mm de longueur. Les fleurs lilas et pâles [3] (Figure 2) fournissent des graines unisériées. La plante est ordinairement sous-frutescente à frutescente. Le fruit est une silique [4].

L'étude de la répartition géo-écologique de *Moricandia arvensis* en Tunisie, révèle que la plante est liée aux encroûtements gypseux des étages arides inférieurs et sahariens. Elle est répandue dans le sud tunisien: Gafsa, Tozeur, Remada, Gabès, Kébili et Degache. Les spécimens de toutes ces régions sont des gypsophytes riches en S, Ca, Mg, Na (un thiohalophile) [4].

2- MATERIEL ET METHODES

2.1- Matériel végétal

Les échantillons de *Moricandia arvensis* ont été collectés de quatre stations du sud tunisien en novembre 2003, ces régions sont Gafsa, Mélaoui, Djbel Wedhref, Menzel Habib. La partie que nous avons choisi d'étudier est constituée par les feuilles (fraîches ou sèches). La conservation a été faite au laboratoire de pharmacognosie de la faculté de pharmacie de Monastir.

2.2- Etude préliminaire des protéines totales et de l'ADN extraits des feuilles de *Moricandia arvensis*

L'analyse du polymorphisme protéique au moyen de la technique d'électrophorèse nécessite plusieurs étapes dont l'extraction des protéines.

2.2.1- Extraction des protéines totales

1g de matière fraîche est réduit en poudre par broyage, dans de l'azote liquide. 100 mg de cette poudre sont repris dans 286 μ l de tampon de lyse (Tris-HCl 62.5 mM; urée 6 M) puis soumis à une sonication à 30 volts suivie d'un choc thermique assuré par quatre bains successifs dans l'azote liquide puis dans l'eau à 37°C. Les protéines sont récupérées dans le surnageant après centrifugation à 15000 r/min pendant 30 min à 0°C. Toutes les étapes d'extraction sont effectuées à froid. 5 μ l de chaque extrait sont récupérés pour le dosage des protéines totales.

2.2.2- Préparation des gels

Les gels de polyacrylamide permettent la détermination du poids moléculaire des protéines dénaturées par le SDS à raison de 10% et le mercaptoéthanol à 5% à chaud en comparant leur migration par rapport à celle de témoins, poids moléculaires connus et traités dans les mêmes conditions. Les protéines utilisées comme témoins de migration sont: la lactate déshydrogénase 150 000 daltons (Da), l'albumine 67 000 Da, l'ovalbumine 43 000 Da, l'anhydrase carbonique 30 000 Da, un inhibiteur trypsique 20 000 Da, l'alpha-lactalbumine 15 000 Da.

Les gels sont de dimensions 80 x 70 x 0.75 mm. Différents pourcentages d'acrylamide-bisacrylamide ont été testés dans un tampon 0.375 M Tris-HCl pH 8.8. La polymérisation est obtenue par 0.025% de sulfate d'ammonium et 0.1% de tétraméthylène-diamine (TEMED). Du SDS est ajouté aux gels à raison de 0.1%. La polymérisation se fait à température ambiante. Après une heure de polymérisation, les échantillons à analyser sont repris dans le tampon de dilution des échantillons qui contient 5% de bêta-mercaptoéthanol, puis incubés pendant 5 minutes à 100°C. Ils sont déposés à raison de 25 μ g de protéines par puit.

Le tampon de migration est constitué de Tris-HCl 0.05 M, glycine 0.384 M pH 8,3 et SDS 0,1%. L'électrophorèse est effectuée à 14 mA pendant environ trois quarts d'heure.

Après migration, le gel de polyacrylamide est coloré au bleu de coomassie (R250) dissout dans le mélange éthanol-eau distillée-acide acétique. Il est ensuite transféré dans une solution de lavage constituée d'un mélange de 250 ml d'éthanol, de 100 ml d'acide acétique et de 450 ml d'eau distillée.

2.2.3- Analyse des profils protéiques

a. Calcul du rapport frontal (Rf)

L'étude du polymorphisme implique une analyse du nombre de bandes correspondantes aux protéines et de leur poids moléculaire. L'interprétation des profils obtenus consiste à attribuer à chaque bande un site d'occupation caractérisé par un R_f pour «Retardation factor» qu'on peut représenter par la formule suivante:

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la bande}}{\text{Distance parcourue par le front de migration (bleu de bromophénol)}}$$

Une courbe log du poids moléculaire des témoins = f (R_f) est alors tracée. Cette courbe étalon permet de déterminer le poids moléculaire des bandes formant le profil protéique des extraits obtenus à partir de la même plante récoltée dans des stations différentes du sud Tunisien par simple projection sur la courbe étalon.

b. Calcul de l'indice de similarité

La variabilité génétique est estimée par le biais des indices de similarité entre différents profils protéiques. Il s'agit d'une analyse qui montre le degré de similitude entre les cultivars étudiés.

L'indice de similarité est une expression du degré de similitude entre deux profils électrophorétiques. Il permet d'évaluer le polymorphisme phénotypique entre les différents individus. L'indice de similarité (IS) entre deux individus est calculé selon la formule suivante [5]:

$$IS = \frac{\text{Nombre de paires de bandes similaires}}{\text{Nombre de paires de bandes similaires} + \text{nombre de paires de bandes différentes}}$$

Cette méthode d'analyse a été adoptée par plusieurs auteurs [6]. Elle consiste à considérer que chaque bande électrophorétique, correspond à un caractère avec deux états possibles: présence ou absence. A chaque bande on donnera ensuite le numéro (1) pour la présence de bande et (0) pour l'absence de bande. On obtiendra ainsi une matrice de données qualitatives.

2.3- Analyse par PCR-RAPD

a. Extraction de l'ADN total

100 mg de jeunes folioles fraîches sont nettoyées avec de l'eau distillée puis réduites en poudre dans de l'azote liquide. L'extraction de l'ADN total est effectuée à l'aide du tampon CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) selon la méthode décrite par Doyle et Doyle, (1990). 800 µl du tampon CTAB (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2% mercaptoethanol) chauffé à 60°C seront additionnés au broyat de feuilles et mélangés vigoureusement à l'aide du vortex. Le mélange sera ensuite incubé à 60°C pendant 20 min.

b. Purification de l'ADN

Les protéines sont éliminées à l'aide d'un mélange de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (24: 25: 1). La séparation entre la phase organique et la phase aqueuse contenant l'ADN se fait après agitation, par centrifugation à 15000 tr/min pendant 5 minutes. La phase aqueuse est additionnée d'un volume égal d'isopropanol froid afin de précipiter l'ADN. Le mélange est alors placé dans la glace pendant 10 min, puis centrifugé à 15000 tr/min pendant 8 min. Le culot d'ADN est lavé avec de l'éthanol à 80% et séché au speed-vac. L'ADN séché est alors resuspendu dans 50-100 µl d'eau ou du tampon TE (10 mM de Tris pH 8.0, 1 mM EDTA). La pureté de l'ADN est vérifiée par migration sur gel d'agarose à 1 % additionné de Bromure d'éthidium (BET). La migration est faite durant 40 min dans un tampon TBE(Tris 2 M, Acétate de sodium 1 M et EDTA 50 mM pH 8.0) dilué au 1/50^{ème}

c. Analyse par PCR

L'amplification se fait dans un volume réactionnel final de 25 µl contenant 1 µl d'ADN, 2.5 µl de tampon Taq ADN polymérase, 1 µl d'amorce, 2 µl de dNTP, 1.5 U de Taq polymérase et q.s.p d'eau distillée. Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycleur dont le programme comporte une étape de séparation initiale des brins à 94°C pendant 4 min, suivie de 40 cycles d'amplification: une dénaturation à 94°C pendant 60 secondes, une hybridation à 36°C pendant une minute, une polymérisation à 72°C pendant 1 minute, puis une étape d'élongation finale à 72°C pendant 8 minutes. Les produits d'amplification sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel

d'agarose à 1.5 % contenant du BET dans un tampon TBE. Les bandes d'ADN sont visualisées et photographiées sous la lumière ultraviolette.

2.3.1- Amorces utilisées

Les amorces utilisées font partie de deux kits A et H d'Operon. Pour la mise au point de la technique, nous avons essayé 6 oligonucléotides: OPA 4, OPA 9, OPA 11, OPA 12, OPH 1, OPH 7 dont les séquences sont présentées dans le tableau 1. Finalement 3 amorces (OPA 4, OPA 9 et OPA 11), ont été choisies pour l'exploration de la variabilité génomique chez *Moricandia arvensis* Ssp. *suffruticosa*.

2.3.2- Analyse des résultats de la RAPD

Les loci déterminés par les bandes RAPD ne possèdent que deux états alléliques: soit la présence d'une bande, soit son absence, du fait de la nature codominant de ce type de marqueur moléculaire. La présence (1) et l'absence (0) de bandes ont été déterminées visuellement. Par suite, une matrice des indices de similarités entre les plantes issues des 4 régions a été dressée [7]. D'autre part, on a calculé le pouvoir résolutif (R_p) de chaque amorce selon la formule de Gilbert *et al.*[8].

L'analyse a porté sur quatre échantillons récoltés à partir de quatre stations du sud tunisien à savoir: Gafsa, Metlaoui, Djbal wedhref et Menzel habib. Sur chaque échantillon, des plantules avec des feuilles jeunes sont collectées. On a utilisé la technique SDS-PAGE pour l'analyse des protéines totales et la PCR-RAPD pour l'étude de la diversité au niveau génomique.

Tableau 1: Amorces utilisées pour l'analyse de la variabilité génomique

Amorce	Séquence de 5' à 3'
OPA 4	AATCGGGCTG
OPA 9	GGGTAACGCC
OPA 11	CAATCGCCGT
OPA 12	TCGGCGATAG
OPH 1	GGTCGGAGAA
OPH 7	CTGCATCGTG

3- RESULTATS

3.1- Résultats de l'étude préliminaire des protéines totales foliaires par SDS-PAGE

Au cours de cette étude nous avons conduit une expérimentation basée sur l'analyse des protéines totales extraites à partir de jeunes folioles de *Moricandia arvensis*. A ce sujet les protéines totales extraites ont été soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et on a obtenu les profils figurant dans la figure 3.

D'après ces profils on a pu déceler un polymorphisme en utilisant les données fournies par l'observation de l'absence ou la présence de bandes communes dans les quatre régions. En effet, la bande de poids moléculaire 210 KDa n'est présente que dans la région de M.H'bib, celles de poids moléculaires 150 et 100 KDa ne le sont pas dans la région de Gafsa alors qu'elles sont présentes dans les régions de Metlaoui, M.H'bib et Dj.Wedhref. Une bande de 63 KDa n'existe que dans le profil protéique des plantes issues de Metlaoui et de Dj.Wedhref. Enfin, les bandes de PM 54.9 et 30.2 KDa sont communes aux quatre régions et en plus elles sont très intenses. Les bandes qui sont comprises entre 50 et 15 Kda sont toutes présentes dans les quatre profils, ce qui témoigne d'une similitude prononcée à leur niveau.

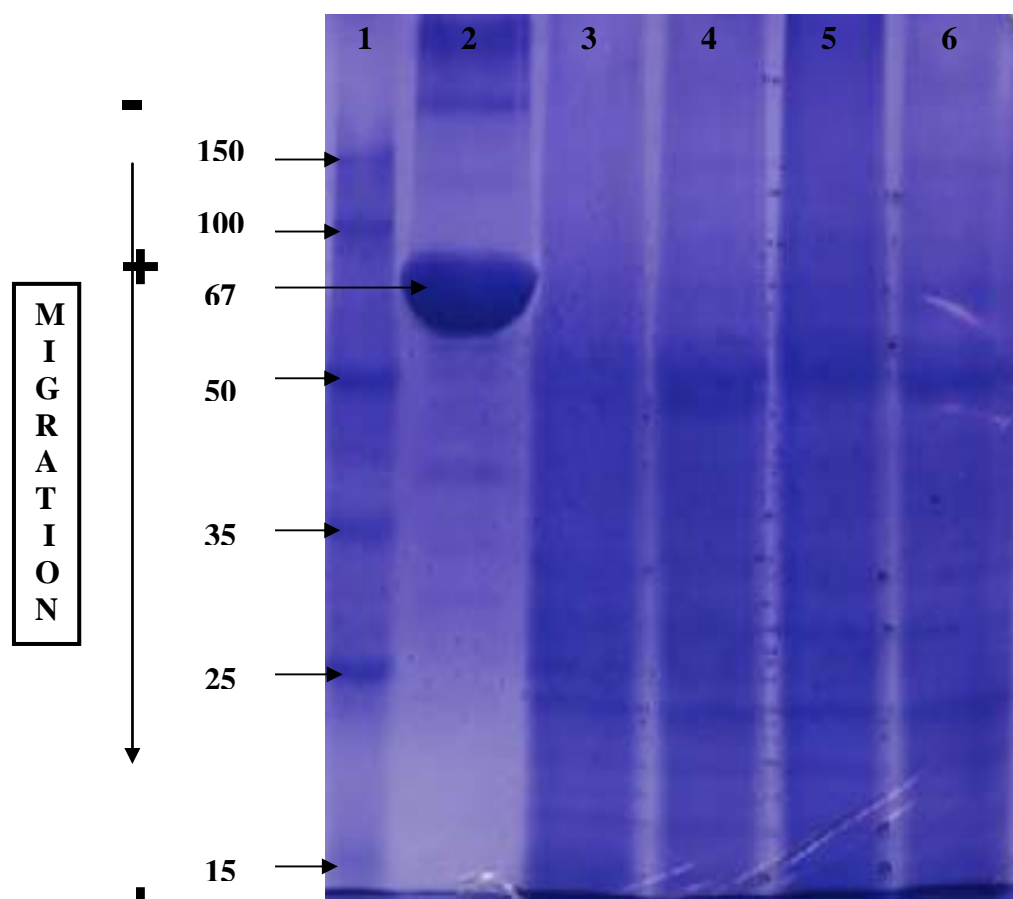


Figure 3: Profils électrophorétiques des protéines extraites à partir des feuilles de *Moricandia arvensis*

- 1 : Témoin poids moléculaire (en KDa)
- 2 : Témoin BSA
- 3 : Profil des protéines extraites des feuilles de *Moricandia arvensis* collectée de la région de Gafsa
- 4 : Profil des protéines extraites des feuilles de *Moricandia arvensis* collectée de la région de Metlaoui
- 5 : Profil des protéines extraites des feuilles de *Moricandia arvensis* collectée de la région de M.H'bib
- 6 : Profil des protéines extraites des feuilles de *Moricandia arvensis* collectée de la région de Dj. Wedhref

Cette similitude est confirmée par le calcul de l'indice de similarité. En effet, pour estimer le degré de ressemblance au niveau des phénotypes entre les différents cultivars, nous avons calculé à partir de la matrice de donnée qualitative, l'indice de similarité (IS) entre paire de cultivars, dont les valeurs sont rapportées dans le tableau 2. La plus grande similitude (IS=0.91) est entre les couples (Gafsa et Metlaoui) tous deux de la région de Gafsa. Ces deux cultivars présentent chacun 21 bandes communes contre seulement 2 bandes différentes. En revanche le minimum de ressemblance (IS=0.77) est révélé entre le couple (Gafsa De Gafsa et Menzel Hbib de Gabès). Entre ces deux cultivars il y a 21 bandes communes contre 5 bandes différentes.

Tableau 2: Matrice des indices de similarité entre les profils électrophorétiques des quatre régions

Gafsa	1,00			
Menzel H'bib	0,7	1,00		
Metlaoui	0,91	0,85	1,00	
Dj. Wedhref	0,80	0,90	0,88	1,00
	Gafsa	Menzel H'bib	Metlaoui	Dj. Wedhref

3.2- Résultats de l'analyse de la diversité génétique par la technique d'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD)

La technique RAPD nécessite au préalable une étape d'extraction et de purification d'ADN cellulaire total. Pour ce faire, les extraits d'ADN ont été testés par électrophorèse sur gel d'agarose afin d'apprécier leur qualité et d'estimer leur quantité. Les résultats montrent que les différents extraits correspondent à des solutions pures d'ADN. En effet, dans chacune des pistes nous avons observé une bande unique en absence de traînée et de contaminations par les ARN (Acides RiboNucléique). Ce résultat témoigne de l'efficacité de l'adaptation de la technique d'extraction des ADN décrite par Doyle and Doyle. D'ailleurs ces ADN ont été utilisés dans nos expériences ultérieures comme matrice au cours des amplifications par RAPD.

Dans un premier temps nous avons eu recours à une étape d'optimisation de la technique RAPD en nous assurant, surtout de sa reproductibilité. Ainsi, nous avons entrepris une expérimentation basée essentiellement sur la variation de la concentration de l'ADN matrice. Pour ce faire, de l'ADN cellulaire total, issu du matériel végétal collecté de la région de Gafsa, a été utilisé comme matrice en présence des six amorces testées: OPA4, OPA9, OPA11, OPA12, OPH1 et OPH7. Il en ressort que dans nos conditions expérimentales la concentration optimale d'ADN matrice doit être comprise entre 20 et 30 ng. De même en tenant compte de la reproductibilité des différentes expériences, les amorces OPA 4, OPA 9 et OPA11 ont été retenues.

Les résultats de cette analyse montrent que toutes les amorces retenues ont permis d'obtenir des profils d'amplification qui diffèrent selon le nombre et la taille des amplimères. La figure 4 en montre des exemples.

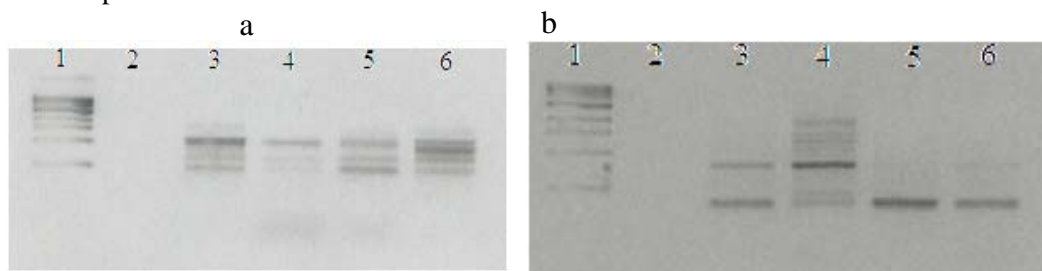


Figure 4: Amplimères obtenus par RAPD sur l'ADN de *Moricandia arvensis* par l'amorce OPA11 (a) et OPA4(b)

1: Témoin poids moléculaire, 2: Témoin négatif, 3: ADN extrait des feuilles de *Moricandia arvensis* récoltée de la région de Gafsa, 4: ADN extrait des feuilles de *Moricandia arvensis* récoltées de la région de M.H'bib, 5: ADN extrait des feuilles de *Moricandia arvensis* récoltées de la région de Metlaoui, 6: ADN extrait des feuilles de *Moricandia arvensis* récoltées de la région de Dj.Wedref

L'utilisation des trois amorces mentionnées a permis l'obtention de 35 bandes au total, dont 16 sont polymorphes. Notons qu'en générant le maximum de bandes, les amorces OPA9 et OPA11 semblent être les plus efficaces pour la mise en évidence du polymorphisme chez les échantillons analysés. D'ailleurs ces mêmes amorces présentent les pouvoirs résolutifs les plus élevés 7,5. En outre, le pouvoir collectif calculé pour toutes les amorces atteint 19.5 suggérant que la technique RAPD utilisant les 3 amorces décrites constitue une bonne approche pour l'analyse de la diversité de l'ADN chez *Moricandia arvensis*.

En plus, l'indice de similarité calculé pour toutes les plantes issues des quatre régions a montré que l'amorce OPA11 est celle qui a les indices de similarités les plus élevés et qui varient de 0,88 entre Metlaoui et Gafsa à 0,60 entre Gafsa et Wedhref. L'amorce OPA9 a montré 100% de similitude entre les profils de Metlaoui et Gafsa mais en regardant la photo on remarque que les bandes dans la région de Metlaoui sont plus intenses que celles observées dans le profil de Gafsa. Pour expliquer la similitude, l'hypothèse suivante pourrait être avancée: *Moricandia arvensis* issu de Gafsa et de Metlaoui se révèlent être sensibles aux conditions du milieu dans la mesure où ces deux régions sont situées dans le sud-ouest de la Tunisie qui est caractérisé par un climat aride inférieur à saharien et la même composition du sol (gypsophyte riche en Soufre, Calcium, Magnésium et Sodium). De même pour *Moricandia arvensis* issu de Dj. Wedhref et Menzel Habib qui sont tous les deux situés dans le sud-est de la Tunisie et par conséquent ont le même climat et la même composition du sol. Et donc les

très faibles signes de polymorphismes entre les plantes issues des quatre régions indiquent la présence d'une seule population variétale. Ainsi, il est tout à fait possible que des introductions ou des échanges de génotypes entre les endroits où pousse cette plante ont eu lieu au cours des temps, toutefois on ne possède pas suffisamment de données sur l'historique de la sélection et la dispersion de cette plante pour rendre compte de l'importance du flux de gènes dans les régions.

Remerciements:

Nous remercions vivement Monsieur le Pr. Mohamed CHAIEB pour l'identification des échantillons de plantes collectées. Nous remercions également Messieurs les Pr. Mohamed NEFFATI, Messaoud MARS et Jemni CHIBANI pour l'aide et les discussions fructueuses.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Le Flo'h E (1983) Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne, Publication scientifique Tunisienne : Programme flore et végétation Tunisienne, II, 106.
- [2] Heywood (1978) Flowering plants of the world, Ed, Oxford University Press, London.
- [3] Pottier-Alapatite G. (1981) Flore de la Tunisie, Ed, Imprimerie officielle de la république tunisienne, Tunis.
- [4] Chaieb M., Boukhris M. (1998) Flore succinte et illustrée des zones arides et sahariennes de la Tunisie, Ed, L'or du temps, 170.
- [5] Virk PS., Ford-Liyod BV., Jackson MT., Newburg HJ (1995) Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. *Heredity* (74), 170-179.
- [6] Pernes J. (1984) Gestion des ressources génétiques des plantes. Manuel ACCT Paris. 346p.
- [7] Nei M., Li W., (1979) Mathematical models for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76: 5269-5273.
- [8] Gilbert JE., Lewis EV, Wilkinson MJ. and Caligari PDS, (1999) Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 1125-1131.