



Techniques-Sommaire : <http://www.takween.com/techniques/techniques-biochimie.html>
Electrophorèse : http://www.takween.com/techniques/05_Electrophorese.html
Travaux dirigés (TD) : http://www.takween.com/techniques/15_TD.pdf
Travaux dirigés (TP) : http://www.takween.com/techniques/14_TP.pdf
Isoenzymes-mutations : <http://www.takween.com/techniques/isoenzymes-mutations.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>
Isozymes hétéromériques : <http://www.takween.com/techniques/isoenzymes-heteromériques.pdf>
RFLP : http://www.takween.com/techniques/10_RFLP.pdf
AFLP : http://www.takween.com/techniques/13_AFLP.pdf
RAPD : http://www.takween.com/techniques/11_RAPD.pdf
SSR (microsatellites) : <http://www.takween.com/techniques/microsatellites-SSR-marqueurs.pdf>

Marquage biochimique et moléculaire et études de la diversité génétique et de l'amélioration des plantes

Travail pratique

Marquage de type 'isoenzymes' chez le palmier dattier

(Interrogation type au début du TP :

<http://www.takween.com/etudiants-etudes/electrophorese-marqueurs-interrogation.pdf>)

Le travail pratique (TP) sur le marquage biochimique et moléculaire des ressources génétiques végétales et son apport dans l'étude de la diversité génétique, porte sur le polymorphisme enzymatique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Deux systèmes enzymatiques sont étudiés en utilisant les folioles. Ils correspondent aux transaminases de type glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et endopeptidases (ENP). Après électrophorèse dans des conditions non dénaturantes (voir complément du cours), les zymogrammes sont interprétés en génotypes GOT et ENP



Le matériel végétal utilisé est constitué de lots de plants issus de croisements dirigés, de vitro-plants de palmier dattier et de palmiers adultes (cultivars). L'objectif du TP est :

- ✓ Familiarisation avec l'interprétation des zymogrammes résultant du polymorphisme enzymatique du palmier dattier.
- ✓ Comparaison de lots de plants de palmier dattier sur leurs hétérozygoties
- ✓ Prédiction du palmier femelle (cultivar) et palmier mâle (dokkar) dont sont issus des lots de plants
- ✓ Estimer la conformité génétique de lots de vitro-plants issus de la culture des tissus

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 ₂	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 ¹	T.B.E ²	T.G ¹	T.B.E ²
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

¹Tampon de migration Tris-Glycine

Tris0,049 M
Glycine0,384 M

Dilution au 1/5 (pH 8,3)

²Tampon de migration Tris-Borate-EDTA

Tris 0,890 M
Acide borique 0,890 M
EDTA Na₂ 0,025 M

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.

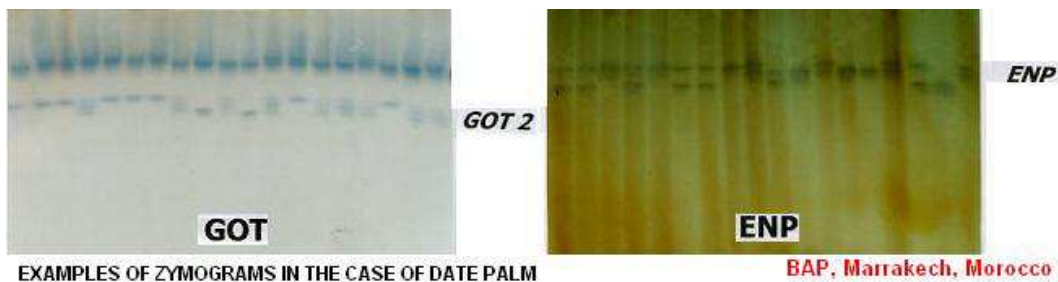


REVELATION DES ISOENZYMES

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 transaminases de type glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et celui des endopeptidases (ENP). Les mélanges réactionnels des 2 systèmes et ceux d'autres systèmes différents sont donnés en annexe.

Zymogrammes



Interprétation des zymogrammes

1. En considérant les deux exemples de zymogramme par enzyme, préciser le nombre de zones de migration des isoenzymes des ENP et de la GOT. Ceci permet d'avoir une idée sur le nombre de loci qui codent pour ces enzymes (voir cours). Caractériser les zones par la valeur moyenne de leurs Rf (mobilité relative).
2. Pour chaque locus (ou zone de migration), déterminer le nombre maximum de bandes. Sachant que le nombre de bandes le plus élevé se trouve chez les hydrides (hétérozygotes), préciser la nature de l'enzyme (structure quaternaire = nombre de sous-unités) codée par locus (voir le cours).
3. Pour chaque zone (ou locus), préciser sur combien de niveaux de migration se répartissent les différentes bandes ?. Ceci permet d'avoir une idée sur le nombre d'allèles par locus, lorsque l'enzyme est monomérique.
4. Lorsque vous aurez déterminé le nombre de loci et la nature de l'enzyme exprimée, donner l'inventaire de tous les génotypes présentés par les zymogrammes des ENP et de la GOT. Consulter la **fiche d'organisation du TP** :

Organisation :

- ✓ Consulter à l'avance, les zymogrammes (en couleurs) inclus dans le CD
- ✓ Respecter les consignes affichées dans la salle de TP.