



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-heteromeriques.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

TP 1 et 2. Séparation par électrophorèse des isoenzymes extraites du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et évaluation de la diversité génétique des palmeraies.

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.). Au moins, deux systèmes enzymatiques (selon la disponibilité) sont étudiés en utilisant les folioles. Ils correspondent aux transaminases de type glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et endopeptidases (ENP) en plus des estérases (EST) et des peroxydases (POX). Après électrophorèse dans des conditions non dénaturantes suivie de la révélation *in situ* (voir complément du cours), les zymogrammes sont interprétés en génotypes sous forme de génotypes.



Le matériel végétal utilisé est constitué de folioles prélevées de palmiers adultes mâle et femelles ou de feuilles provenant de lots de plants issus de croisements dirigés ou de vitro-plants de palmier dattier. L'objectif du TP est :

- ✓ Préparation d'extraits enzymatiques et séparation des molécules par électrophorèse dans des conditions non dénaturantes suivie de la révélation des isoenzymes sur gel (gel natif).
- ✓ 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 matériel végétal (TP 1).

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 30 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 à partir des feuilles du palmier dattier (TP 1).

Des quantités de 0,25 grammes de feuilles correspondant à des morceaux de feuilles de 3 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 d'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.

Lien vidéo : https://www.youtube.com/watch?feature=player_embedded&v=ySs_Zz0cdlk

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (TP 1).

- Préparation des gels de polyacrylamide.

Les gels de polyacrylamide ont une épaisseur de 1 mm et sont confectionnés à l'aide de 2 plaques de verre de dimension 10 x 10 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% (pour 2 plaques de 10 x 10cm).

	Gels de concentration 5% (10 ml)	Gels de séparation 11% (15 ml)
Acrylamide-bis acrylamide 30:0,8%	1,66	5,50
Tris-HCl 3,0 M (pH 8,8)	-	1,87
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)	2,50	-
Eau distillée	5,21	7,00
Persulfate d'ammonium 1,5%	0,60	0,60
TEMED	0,03	0,03

Tampon de migration Tris-Glycine (**pH 8,3**) : Tris (0,049 M), Glycine (0,384 M) dilué au 1/5

- Electrophorèse.

Après le dépôt des extraits (50 µl), la migration électrophorétique est effectuée à 170 V. Le front de migration est repéré par le bleu de bromophénol. La séparation dure 2-3 heures, environ.



- Révélation 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 la première séance du travail pratique, 2 systèmes enzymatiques seront étudiés. Le système des estérases (EST) et le système des peroxydases (POX). L'interprétation des zymogrammes concernera en plus, les transaminases de type glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et celui des endopeptidases (ENP).

Lien vidéo Préparation des gels de polyacrylamide, dépôt des échantillons et électrophorèse: https://www.youtube.com/watch?v=eAd9e2pi-rl&feature=player_embedded

Exemples de zymogrammes



Les mélanges réactionnels des différents systèmes enzymatiques sont résumés dans le tableau suivant :

<p>Peroxydase (POX)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tampon acétate pH 5,0 0,10 M - Gaiacol (dans méthanol 5%) .. 0,12 M <p>Incubation 5 min</p> <p>H₂O₂ 0,01%</p>	<p>Estérases</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tris-HCl (pH 7,2) 0,05 M - Alpha-naphthylacétate .. (à solubiliser dans acétone 50%) 0,03% <p>Incubation 15 min</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tris-HCl (pH 7,2) 0,05 M - Fast blue RR salt 0,14%
<p>Glutamate oxaloacétate transaminase (GOT)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tris-HCl (pH 8,0) 0,25 M - Acide aspartique 0,4% - Acide alpha-cétoglutarique 0,1% Fast blue BB 0,2% 	<p>Endopéptidases (ENP)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tampon acétate (pH 5,0) 0,005 M - N-Benzoyl-DL-Arginine-béta-Naphthylamide (BANA) (dans méthanol) 0,08% - NaCl 0,02 M - MgCl₂ 0,002 M <p>Rinçage et Incubation 15 minutes dans :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tampon acétate (pH 5,0) 0,05 M - Fast black K 0,05% - NaCl 0,02 M - MgCl₂ 0,002 M

Interprétation des zymogrammes (TP 2).

Les zymogrammes sujets à l'interprétation sont disponibles sur CD. Ils peuvent être consultés à travers le lien :

http://www.biotech-ecolo.net/diversite-genetique-mesures/isoenzymes-palmier-biosys.html#tp_1

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 hybrides (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

Lien vidéo GOT : http://www.youtube.com/watch?feature=player_detailpage&v=ej701d9rf9Q

Lien vidéo ENP : https://www.youtube.com/watch?feature=player_detailpage&v=5JHnclbw6H0

Organisation :

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

Le TP 3 porte sur l'étude de la diversité génétique du palmier dattier au Maroc par les marqueurs isoenzymatiques. Interprétation par le programme Biosys-. Plus de détail à travers le lien :

http://www.biotech-ecolo.net/diversite-genetique-mesures/isoenzymes-palmier-biosys.html#tp_2