



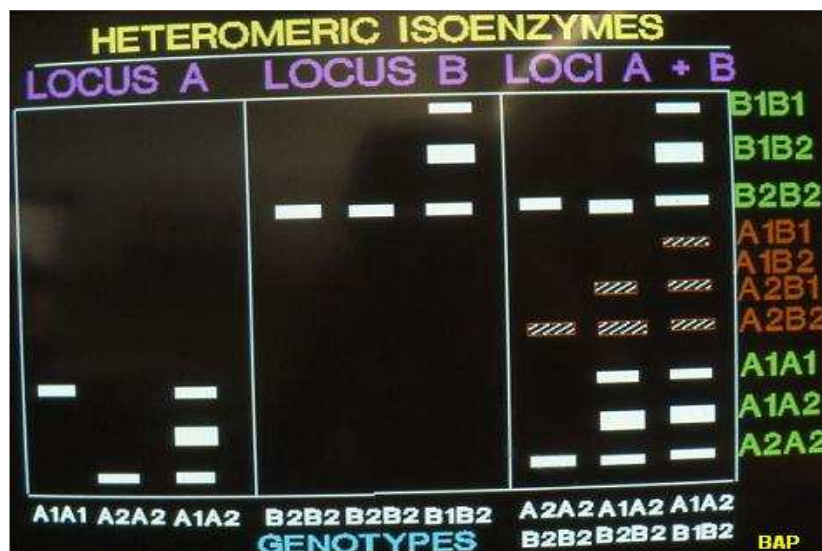
Techniques-Sommaire : <http://www.takween.com/techniques/techniques-biochimie.html>
 Electrophorèse : http://www.takween.com/techniques/05_Electrophorese.html
 Travaux dirigés (TD) : http://www.takween.com/techniques/15_TD.pdf
 Travaux dirigés (TP) : http://www.takween.com/techniques/14_TP.pdf
 Isoenzymes-mutations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

Isoenzymes hétéromériques dues à l'expression simultanée de plusieurs loci, en même temps.

Dans certains cas, les isoenzymes hétéromériques contiennent des sous unités polypeptidiques provenant de différents loci.

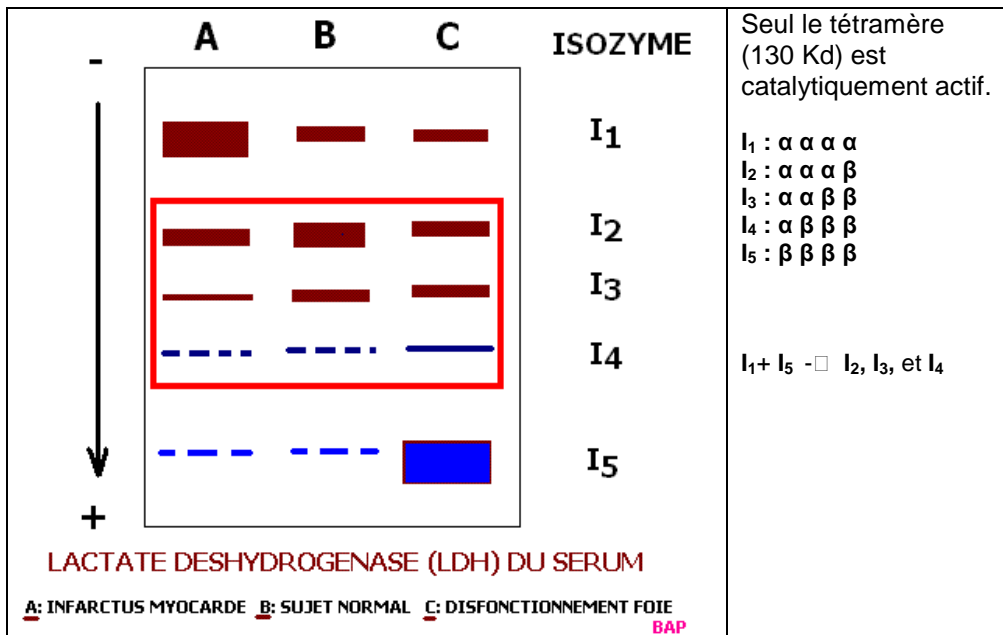
Exemple 1 : cas d'une enzyme dimérique codée par 2 loci (A et B) et 2 allèles par locus (α_1 , α_2 et β_1 , β_2).

Expression du locus A			Expression des loci A + B				
						_____ $\beta_1\beta_1$	
						_____ $\beta_1\beta_2$	
			_____	_____		_____ $\beta_2\beta_2$	
						----- $\alpha_1\beta_1$	
						----- $\alpha_1\beta_2$ et $\alpha_2\beta_1$	
			-----	-----		----- $\alpha_2\beta_2$	
	_____	_____				_____ $\alpha_2\alpha_2$	
	_____					_____ $\alpha_1\alpha_2$	
	_____					_____ $\alpha_1\alpha_1$	
Génotypes	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2	A_2A_2 B_2B_2	A_1A_2 B_2B_2	A_1A_2 B_1B_2	

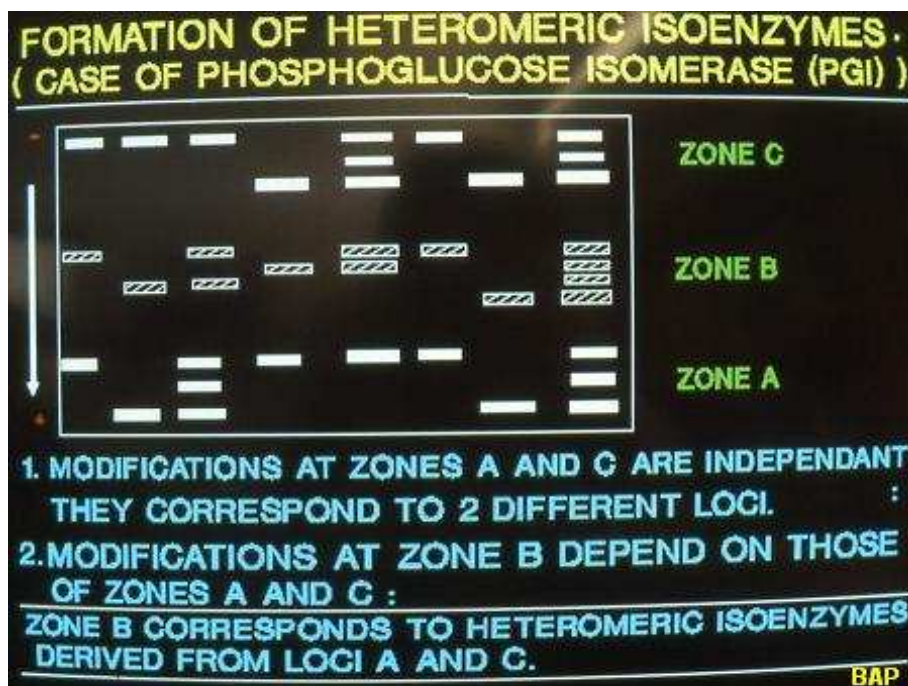


Exemple 2 : Lactate déshydrogénase (EC 1.1.1.27).

Cette enzyme qui transforme le lactate en pyruvate, est un tétramère (n = 4) à 2 sous-unités différentes α et β . Les polypeptides dérivant des loci LDHA et LDHB, correspondant aux allèles α et β , respectivement, donnent naissance non seulement aux isoenzymes homomériques avec comme structure $\alpha\alpha\alpha\alpha$ et $\beta\beta\beta\beta$ (les autres combinaisons alléliques n'apparaissent pas ?), mais également aux isoenzymes hétéromériques $\alpha\alpha\beta\beta$ et $\alpha\beta\beta\beta$. Les 5 isoenzymes varient largement dans leur proportion. Dans certains tissus (foie et muscle squelettique), le polypeptide α est produit en grande quantité par rapport au polypeptide β . Par contre, dans d'autres tissus (cœur, rein) l'inverse est observé. Ainsi, les profils électrophorétiques observés tendent à être très asymétriques.



Exemple 3 : Phosphoglucose isomerase (PGI)



En général, si un individu arrive à devenir hétérozygote sur un ou plusieurs loci, le nombre des isoenzymes attendu (i) dans ces conditions est donné par la relation suivante :

$$i = \frac{(L + h + n - 1)!}{n! (L + h - 1)!}$$

où L = nombre de loci, h = nombre de loci à l'état hétérozygote et n = nombre de sous-unités par enzyme.

Exemples :

- Une enzyme tétramérique ($n = 4$) (comme LDH), avec 2 loci ($L = 2$) et où un des loci est hétérozygote ($h = 1$), aura comme nombre total d'isoenzymes, $i = 6! / (4! \times 2!) = 15$.
- Une enzyme dimérique ($n = 2$) (comme l'alcool déshydrogénase, ADH du foie), avec hétérozygotie sur un seul des 3 loci : $L = 3$, $h = 1$ et $n = 2$ donne $i = 10$ isoenzymes.
- Les Glucose-Phosphate-Isomérasés (GPI) des Téléostéens (Poissons) est un exemple de la formation d'isoenzymes hétéromériques entre 2 loci *Gpi-1* et *Gpi-2* (voir interprétation des zymogrammes).
- Isoenzymes hétéromériques des cellules hybrides somatiques interspécifiques. Dans ce cas des isoenzymes hétéromériques contenant les chaînes polypeptidiques codées par les gènes homologues des 2 espèces différentes sont toujours formées chez les cellules hybrides provenant d'une hybridation somatique entre des espèces différentes. Les isoenzymes hétéromériques interspécifiques sont formées avec un caractère différent des isoenzymes homomériques de chaque espèce. Dans de tels cas, les zymogrammes ressemblent à ceux des hétérozygotes.

Isoenzymes secondaires

Les loci multiples avec allélisme multiple constituent les bases génétiques qui définissent les séquences d'AA des chaînes polypeptidiques qui engendrent, à leur tour, des isoenzymes particulières. Néanmoins, la complexité de plusieurs systèmes enzymatiques ne revient pas, totalement, à cette notion seule. En effet, des modifications secondaires de la protéine enzymatique prennent lieu pendant la synthèse des chaînes polypeptidiques et deviennent responsables de la complexité des zymogrammes. Les isoenzymes générées par ces changements 'post-translacionnels', sont appelées 'isoenzymes secondaires'.

Exemples de modifications post-translacionnelles :

- Déamidation des résidus de la glutamine ou d'asparagine d'une isoenzyme.
- Oxydation des groupements thiols.
- Addition de groupements phosphates.
- Addition ou délétion de groupes carbohydrates.
- Clivage d'une partie d'un polypeptide par protéolyse enzymatique.
- Polymérisation ou agrégation.
- Conformation de l'enzyme.
- Effet de la concentration des cofacteurs. Les enzymes requérant des cofacteurs (NAD, NADP) peuvent montrer une variation dans leur mobilité électrophorétique, dépendant du degré de saturation de l'enzyme avec le coenzyme. La concentration de celui ci ne doit pas être limitante.

Présence d'allèles nuls

Certains gènes de structure présentent des allèles qui ne fournissent aucun produit révélaible par électrophorèse. Ces allèles sont appelés 'silencieux' ou 'nuls'. Ils sont récessifs. Les hétérozygotes ayant un allèle nul N et un allèle actif A (individus AN) présentent le même phénotype électrophorétique que les homozygotes AA. Quant aux homozygotes NN, ils ne montrent aucune bande. Néanmoins, les hétérozygotes AN peuvent être caractérisés par des bandes moins intenses que les homozygotes AA.

Pour s'assurer de la présence d'un allèle nul, il faut faire des croisements, car la progéniture des hétérozygotes est prévisible. Aussi, il faut effectuer des électrophorèses répétitives pour s'assurer de la différence d'intensité des bandes des hétérozygotes AN.

Les allèles nuls sont fréquents parmi les gènes qui codent des estérases.

Interprétation des zymogrammes. Exemples.

L'interprétation génétique des zymogrammes (Z) est basée sur 2 approches successives:

- **Comparaison de tous les Z observés.** On peut présumer un déterminisme génétique en relevant l'hypothèse explicative la plus simple.

Les hypothèses sont confrontées à l'**analyse mendélienne de croisements** entre des individus présentant des Z différents (F1, F2, BC,...).

L'interprétation fait appel aux considérations suivantes :

1 / Individus homozygotes ou hétérozygotes ?

Les isoenzymes sont des marqueurs contrôlés par des allèles codominants. Il est plus facile de distinguer les homozygotes des hétérozygotes.

2/ Structure quaternaire de l'enzyme ?

Les hétérozygotes présentent un zymogramme à au moins $n+1$ bandes, avec $n =$ nombre de sous-unités de l'enzyme.

3/ Nombre de loci ?

Ceux ci sont caractérisés, entre autres, par des variations indépendantes des positions des bandes.

4/ Nombre d'allèles ?

Un allélisme multiple est à l'origine d'un nombre élevé de phénotypes électrophorétiques.

Enzymes monomériques (Z à 1 ou 2 bandes).

2 allèles (A1, A2).

Z	1	2	3
A2		—	—
A1	—		—

Hypothèse 1 : 2 loci avec un allèle nul chacun, dans ce cas Z3 peut être fréquent, même dans une population autogame.

Hypothèse 2 : un seul locus avec 2 allèles A1 et A2. Le Z3 représente un hétérozygote A1A2, alors que Z1 et Z2 représentent des homozygotes A1A1 et A2A2. Z1 et Z2 peuvent également représenter des hétérozygotes avec un allèle nul récessif. Dans ce cas, Z3 doit être rare dans une population autogame.

Zymogramme à bandes dédoublées.

Z	1	2	3
a2		----	----
A2 a1	----	----	----
A1	----		----

Les bandes A1 et a1 sont codées par le même allèle. a1 et a2 : isoenzymes secondaires. A2 et a1: 2 isoenzymes chevauchantes.

Exercice :

L'électrophorèse d'une première série d'extraits enzymatiques, suivie de la révélation de la MDH (malate déshydrogénase) a permis de d'obtenir les zymogrammes suivant :

Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

L'électrophorèse d'une deuxième série d'extraits a permis d'aboutir aux zymogrammes suivants :

Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		—					—		
		—					—		

Interpréter l'ensemble des zymogrammes.

Réponse.

Hypothèse 1 : Expression de 2 gènes différents à l'état homozygote.

Hypothèse 2 : Présence d'un seul locus avec 2 allèles. Les individus seraient tous hétérozygotes.

Hypothèse 3 : Présence d'un seul locus avec des isoenzymes secondaires.

L'hypothèse 2 est à rejeter car l'hétérozygote ne peut pas dépasser 50 % des individus (loi de Hardy-Weinberg). Aussi, les MDH révélée chez les végétaux et les animaux correspond à un dimère. L'électrophorèse de la deuxième série d'extraits a permis de révéler, au niveau de la deuxième zone d'activité des individus hétérozygotes avec des zymogrammes à 3 bandes caractéristiques des enzymes dimériques. La variation de la première zone est indépendante de celle de la deuxième. Il s'agit de 2 loci différents.