

Aspects qualitatif et quantitatif des peroxydases du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) étudiés chez des pieds mâles et femelles

N. QACIF¹, K. BENDIAB² & M. BAAZIZ¹

¹. Equipe de Biochimie et Biotechnologies des Plantes, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences-Semlalia, baaziz@ucam.ac.ma B.P : 2390, 40000 Marrakech, Maroc. E-mail :

². Département de Biologie, Faculté des Sciences et Techniques de Guéliz, Marrakech

Résumé

Dans le but de définir une stratégie d'amélioration et de gestion des ressources génétiques des palmeraies marginales, la distinction précoce des pieds mâles et femelles s'avère fortement recommandée. L'utilisation des marqueurs biochimiques et moléculaires devient un préalable indispensable pour atteindre ce but.

Les peroxydases (EC.1.11.1.7) sont des oxydo-réductases impliquées dans plusieurs processus dont la croissance des plantes et leur résistance aux contraintes. Afin d'étudier les propriétés physico-chimiques et catalytiques des peroxydases des folioles et des inflorescences du palmier dattier provenant de pieds mâles et femelles, une purification partielle de ces enzymes a été réalisée par précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une chromatographie sur Sephadex G25 et d'une électrophorèse préparative sur des gels de polyacrylamide à 11%.

L'électrophorèse d'extraits enzymatiques préparés à partir des folioles et des inflorescences mâles et femelles, a permis l'obtention de zymogrammes montrant deux zones d'activité (E1 et E2). L'extrait correspondant aux inflorescences femelles représente deux bandes supplémentaires au niveau de la deuxième zone E2.

Le taux de purification atteint pour les fractions des folioles femelles est de l'ordre de 46 fois et de 117 fois pour celles des mâles, alors qu'il est de l'ordre de 9.59 et 89.14 fois pour les fractions des inflorescences femelles et mâles, respectivement.

Les peroxydases du palmier dattier sont caractérisées par une grande thermostabilité avec un pH optimum de 5,8.

Mots clés : Palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L., peroxydases, pieds mâles, inflorescences, purification

Introduction

La palmeraie de Marrakech est constituée essentiellement de sujets issus de semis et dont les touffes mâles représentent actuellement plus de 54% de l'ensemble des touffes existantes [1]. Elle représente un réservoir d'hybrides, de qualité généralement moyenne et de maturité tardive. Or, l'amélioration génétique de telles palmeraies marginales est liée à l'identification des cultivars du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et la distinction précoce des pieds mâles et des pieds femelles. En considérant la pérennité de cette espèce, l'utilisation des marqueurs biochimiques et moléculaires devient nécessaire.

Les peroxydases (EC.1.11.1.7) sont des enzymes hémoprotéiques très répandues chez les êtres vivants. Chez les plantes, elles catalysent l'oxydation de différents substrats (des amines aromatiques, des phénols,...), elles interviennent ainsi dans différents phénomènes physiologiques tels que l'enracinement, la lignification, et la résistance aux stress biotiques et abiotiques [2, 3, 4, 5, 6]. L'activité des peroxydases est modulée par plusieurs facteurs physico-chimiques telle que la température, le pH et la force ionique.

L'objectif de ce travail est l'étude des aspects qualitatif et quantitatif des peroxydases en vue de leur évaluation comme marqueurs dans la détermination précoce du sexe chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.).

Matériel & méthodes

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est constitué de folioles et d'inflorescences échantillonnées de palmiers adultes mâles et femelles appartenant à la palmeraie de Marrakech. Les échantillons prélevés sont identifiés suivant le sexe du pied dont ils sont issus, et ils sont séparés en 2 lots selon le sexe mâle ou femelle.

- Purification partielle des peroxydases

La purification partielle des peroxydases des folioles et des inflorescences du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est réalisée par broyage de 30 g du matériel végétal frais. Il en résulte un extrait brut dont les protéines sont fractionnées par précipitation au sulfate d'ammonium (0 à 80 %). Les extraits sont ensuite dessalés par chromatographie d'exclusion sur colonne de Sephadex G25. L'élution est faite par le Tris-HCl 50 mM (pH 7,2). Les fractions actives sont rassemblées pour constituer un seul extrait qui est soumis à l'électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide à 11%

- Dosage de l'activité peroxydasique

L'activité peroxydasique a été dosée par spectrophotométrie à 470 nm en présence de H₂O₂ et de gaiacol.

- Séparation des peroxydases par électrophorèse

la séparation des peroxydases a été faite sur un gel de polyacrylamide à concentration uniforme 11%. Une partie du gel a servi pour la révélation in situ de l'activité enzymatique en utilisant comme substrat donneur de protons la benzidine à 0,05 % (P/V) préparée dans le tampon acétate 0,1 M (pH 5,0). La réaction est déclenchée par une solution de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ 1%. L'autre partie du gel a servi pour l'élution des formes majeures des peroxydases préalablement séparées sur gel.

Résultats & Discussion

L'électrophorèse préparative a permis d'obtenir deux fractions majeures éluées à partir des zones E1 et E2. L'extrait correspondant aux inflorescences femelles représente deux bandes supplémentaires au niveau de la deuxième zone E2 ayant des R_f de 0,4 et 0,47, ces deux bandes sont moins intenses dans l'extrait correspondant aux folioles femelles (Fig. 1, 2). La purification partielle des peroxydases de *Phoenix dactylifera* L. par élution des formes enzymatiques préalablement séparées par électrophorèse a permis d'obtenir des taux de purification variable selon la nature du matériel végétal utilisé. Ainsi, les taux de purification des peroxydases de la zone 1 calculés pour les folioles femelles et mâles sont de l'ordre de 46 fois et 117 fois respectivement. Ils sont de l'ordre de 9.59 et 89.14 fois pour le cas des inflorescences femelles et mâles, respectivement.

La purification partielle des peroxydases par électrophorèse préparative a permis de déterminer quelques caractéristiques physico-chimiques et catalytiques. Ces enzymes présentent une grande thermostabilité (Fig. 3) avec un pH optimum de 5,8 (Fig. 4).



Fig. 1. Exemple de zymogramme obtenu par électrophorèse sur gel de polyacrylamide continu à 11% des peroxydases des inflorescences femelles (IM) du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)

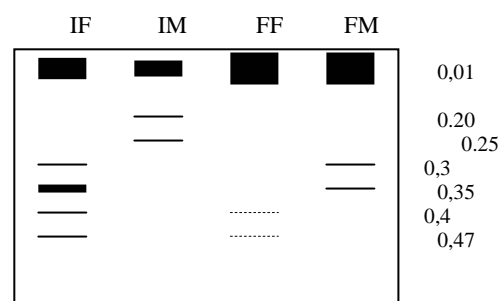


Fig. 2. phénotypes électrophorétiques des peroxydases extrapurifiées à partir des inflorescences (I) et des folioles (F) mâles (M) et femelles (F) du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)

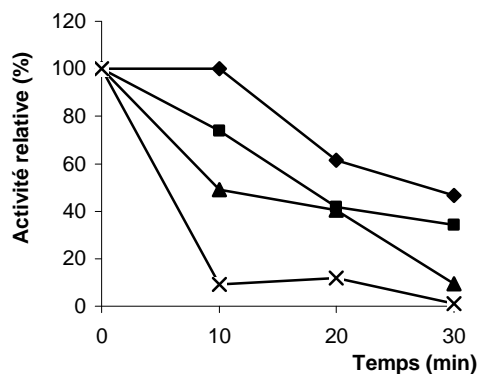


Fig. 3. Effet de la température (50 °C, 60 °C, 70°C, et 80 °C) sur l'activité des peroxydases partiellement purifiées à partir des folioles du palmier dattier

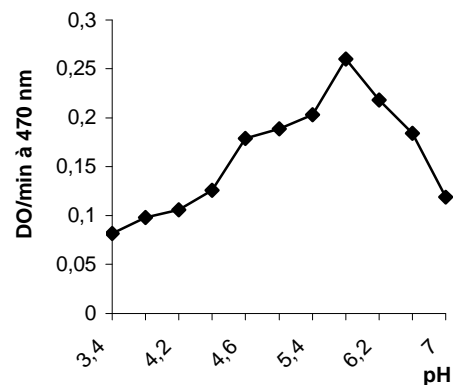


Fig.4. Effet du pH sur l'activité des peroxydases partiellement purifiées à partir des folioles du palmier dattier

En conclusion, et considérant les données bibliographiques rapportant le rôle des oxydoréductases dans la régulation des phytohormones impliquées dans la détermination sexuelle des plantes [7, 8], les peroxydases pourraient constituer après d'autres investigations complémentaires, des marqueurs potentiels pour l'identification précoce des pieds mâles et femelles chez le palmier dattier. Les études réalisées dans ce but sont en cours.

Références bibliographiques

- [1] Majourhat K., Bendiab K. & Baaziz M. (1999). Etude comparative des palmiers dattiers mâles et femelles de la région de Marrakech réalisée sur la base des phénotypes isoenzymatiques des estérases, peroxydases et endopeptidases. *Al Awamia* 100, 41-49.
- [2] Baaziz M. (1990). Contribution à l'étude des peroxydases du palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L. Relation avec la résistance de la plante à la maladie du bayoud, fusariose vasculaire à *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Thèse de doctorat d'Etat des sciences, Université Cadi Ayyad, Marrakech (Maroc), 173 p.
- [3] Gaspar T., Penel C., Hagage D. & Greppin H. (1991). Peroxidases in plant growth, differentiation and developmental processes. In: Lobarzewsky J. H., Greppin H., Penel C. & Gaspar T. (eds.), *Biochemical, Molecular, and Physiological aspects of plant peroxidases*, Univ. de Geneve : 249 – 280.
- [4] Aouad A. (1997). Contribution à l'étude des peroxydases des céréales en relation avec la résistance à la salinité. Thèse de 3^{ème} cycle, Université Cadi Ayyad, Marrakech (Maroc), 198 p.
- [5] Dunand N. & Baaziz M. (2004). Implication des peroxydases dans la maladie hôte pathogène chez le couple palmier dattier agent causal de la maladie du Bayoud. Acte du congrès international de Biochimie-Forum des jeunes chercheurs, Marrakech, Maroc, 3-6 Mai : 224.
- [6] Khales A. (2005). Contribution à l'étude des aspects qualitatif et quantitatif des peroxydases du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica* L.). Relation avec la croissance de la plante en conditions de stress salin. Thèse de doctorat ès sciences, Université Cadi Ayyad, Marrakech (Maroc), 116 p.
- [7] Bendiab K., (1998). Contribution à l'étude de la variabilité des hydrolases et des transférases chez le palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L. Apport à l'amélioration et l'étude de la structure génétique des palmeraies marocaines. Thèse de doctorat d'Etat des sciences, Université Cadi Ayyad, Marrakech (Maroc), 124 p.
- [8] Truta E., Gille E., Toth E., & Maniu M. (2002). Biochemical differences in *Cannabis sativa* L. depending on sexual phenotype. *Appl. Genet.* 43 (4), 451-462.