



## INTRODUCTION

Les Strongles gastro-intestinaux parasites des ruminants, par les pertes de production qu'ils provoquent et les coûts vétérinaires qu'ils induisent, sont une réelle préoccupation pour les éleveurs. Le développement de la résistance aux anthelmintiques rend nécessaire l'approfondissement des connaissances sur la résistance des ruminants à ces infestations.

Devant cette nécessité, le CIRAD-EMVT et l'INRA, en collaboration avec l'ILCA, l'ISRA et le CIRDES, ont initié un programme de recherche intitulé: "STRONGYLOSES GASTRO-INTESTINALES DES PETITS RUMINANTS EN MILIEU TROPICAL: RESISTANCE GENETIQUE ET MILIEU D'INFESTATION".

C'est dans ce cadre que je viens d'effectuer un stage pratique aux techniques d'extraction et de diagnose de larves infestantes de Strongles à partir d'échantillons d'herbe et aux techniques de caractérisation enzymatique de nématodes.

Le stage s'est déroulé à la station de Pathologie aviaire et Parasitologie de l'INRA (Centre de Tours-Nouzilly), sous la direction du docteur J. CABARET.

Notre séjour à l'Unité d'Ecologie parasitaire nous a permis entre autres de suivre avec intérêt les techniques parasitologiques utilisées (coprologie, coproculture, infestations expérimentales).

# I - EXTRACTION ET DIAGNOSE DE LARVES INFESTANTES DE STRONGLES A PARTIR D'ECHANTILLONS D'HERBE

## Matériel

- Bacs rectangulaires(60x40x20cm) munis de cadre grillagé
- Balance sensible
- Centrifugeuse à étoiles
- Etuve
- Sachets plastiques pour prélèvements d'herbe
- Sulfate de magnésium
- Tamis(250 et 20 $\mu$ )

## A- L'ECHANTILLONNAGE

Comme tout problème d'échantillonnage, le premier point consiste à bien définir l'objectif que l'on se fixe afin d'organiser au mieux la méthode. Les critères de choix sont de plusieurs natures et dépendent en grande partie des caractéristiques de la région étudiée, du type de pâturage et du type d'élevage pratiqué.

### 1- Dates et rythmicité des prélèvements

Dans le cas des études de dynamique de populations de larves infestantes, le rythme d'un prélèvement tous les 15 jours est préconisé. Un prélèvement par mois atténue énormément les variations enregistrées. Ce rythme peut être modulé selon les saisons: nul ou espacé pendant la saison sèche, le nombre de prélèvement peut être plus élevé aux périodes critiques telles que la saison des pluies.

### 2- Principes et dimensions de l'échantillon

Avant d'entreprendre un prélèvement, il faut bien avoir à l'esprit ce que l'on désire échantillonner: la population de larves infestantes accessible à l'animal, c'est à dire sur l'herbe, présentes sur l'ensemble de la parcelle. On l'exprime et général en nombre de L<sub>3</sub> par kg d'herbe. L'échantillonnage sera d'autant plus précis que les prélèvements seront nombreux de dimension restreinte et dispersés sur l'ensemble de la parcelle.

Lorsque la parcelle dépasse plusieurs ha, il devient nécessaire d'effectuer un échantillonnage dit en grappe, à deux niveaux. On va définir des surfaces plus restreintes, de végétation homogène, situées de façon à tenir compte de l'hétérogénéité éventuelle de la parcelle(relief, localisation d'abris ou d'abreuvoirs, végétation)

Le prélèvement élémentaire est constitué par une pincée d'herbe, prélevée aussi près de la base que possible, à la main entre le pouce et l'index ou à l'aide d'un instrument dans le cas où l'herbe est très dure

Le nombre de prélèvement est fixé à 400.

- L'opérateur prélève quatre pincées autour de 100 points(il est plus facile de compter jusqu'à 100 que jusqu'à 400).
- Ces 100 points sont répartis sur l'ensemble de la parcelle afin d'avoir une densité moyenne de larves valable pour l'ensemble de la parcelle. Cela signifie que l'opérateur vérifie qu'il a couvert le quart de la superficie lorsqu'il a prélevé autour de 25 points, la moitié de la superficie lorsqu'il en est à 50...
- La quantité d'herbe récoltée est de l'ordre de 300 à 500 g
- L'ajustement du poids(300 à 500) de l'échantillon se fait sur le nombre de brins d'herbe de chaque pincée et non pas sur le nombre de pincées.

### 3- Pâturages à bovins

Dans les pâturages à bovins, la distribution des larves infestantes de Strongles est liée à celle des bouses. Dans de nombreux cas, les bouses ou les touffes d'herbe qui les entourent (refus) sont des éléments aisément repérables sur le terrain. Il devient alors possible de concevoir un échantillonnage en tenant compte de ces éléments, le maximum de larves observées étant des les premiers centimètres qui entourent les bouses (GRUNER et SAUVE, 1982).

GRUNER et RAYNAUD (1982) proposent un double échantillonnage, près et loin des bouses afin de disposer d'une valeur maximale et d'une valeur minimale de nombre de  $L_3$  / kg d'herbe. Il est constitué

- d'une série de prélèvement dans les 5 à 10 cm autour des bouses: 4 pincées autour de 100 bouses réparties sur toute la parcelle, totalisant 300 à 500g d'herbe;
- d'une série de prélèvement à au moins 1m des bouses: 4 pincées autour de 100 bouses.

Un seul opérateur tenant deux sachets plastiques effectue simultanément les deux séries de prélèvements. Un principe consiste à éviter les bouses très fraîches lors des prélèvements (l'herbe autour ne porte toujours pas de larve).

### 4 - Pâturages à ovins

La grande dispersion des matières fécales, leur faible visibilité au sein de la végétation, font que les prélèvements des 400 pincées sont effectués selon le principe général, autour de 100 points dispersés sur l'ensemble de la parcelle.

Dans un certain nombre de cas, l'échantillonnage des matières fécales présentes sur le pâturage aide à l'appréciation de la charge parasitaire. Le prélèvement de quelques crottes ( 3 à 4 ) autour de 100 points permet d'estimer la population de larves, exprimée alors en  $L_1$  / g de fèces (matière sèche) Dans les milieux chauds et secs, relativement peu de larves sont dénombrées sur l'herbe. Par contre elles peuvent être présentes dans les matières fécales en attente de conditions favorables pour migrer. Leur estimation renseigne sur l'infestivité potentielle du pâturage.

### 5 - Etude de la disponibilité en herbe et de l'humidité pondérale

Indépendamment des 400 pincées prélevées sur l'ensemble du domaine étudié, un mètre carré de terrain, situé de façon à tenir compte de l'hétérogénéité éventuelle du terrain est désherbé au ras du sol, à l'aide d'une tondeuse. L'herbe prélevée est pesée (poids frais), puis séchée en étuve (poids sec). Ce qui nous permettra d'estimer la disponibilité de la parcelle en herbe et l'humidité pondérale ( $H_p$ ) de cette herbe

$$H_p = \frac{\text{poids frais} - \text{poids sec}}{\text{poids frais}}$$

### B - L'EXTRACTION DES LARVES

Après pesée, les échantillons d'herbe sont soumis à un trempage pendant 24 heures, puis à un tamisage

#### 1- Trempage

Dans des bacs rectangulaires, contenant 35 à 40 litres d'eau tiède avec un mouillant (teepol, twen 80), l'herbe est immergée et agitée manuellement au cours de la journée (une fois par heure). Au bout de 24 heures de trempage, le cadre grillagé placé auparavant entre l'herbe et le fond du bac est relevé, l'herbe égouttée quelques minutes, puis mise à sécher en étuve pour estimer son poids sec.

#### 2- Tamisage

L'eau de trempage est versée sur un double tamis (250 et 20  $\mu$ ), les larves étant récupérées sur le tamis fin. Ces larves sont diluées avec 50 à 100 ml d'eau puis conservées au réfrigérateur dans des boîtes à culture de cellules

### 3 - Baerman

Cette technique est utilisée pour l'extraction des larves présentes dans les matières fécales. Elle est la même qu'il s'agisse de fèces prélevés sur les pâturages ou issues d'une coproculture. Selon la quantité de matières fécales, elle sera réalisée dans un entonnoir supportant une passette; dans une coupelle ou dans un bac. Dans ces dispositifs une grille supporte l'échantillon.

Le fait de disposer d'une couche mince d'une simple épaisseur de papier filtre (type Sopalin) permet de récupérer dans l'eau sous-jacente une suspension de larves sans particules de fèces. Après 24 heures, le grillage est relevé puis égoutté, l'eau passe sur un tamis de 20 $\mu$ .

#### C - LA LECTURE

##### 1 - Concentration , partie aliquote

A l'issue du tamisage, l'échantillon est constitué par 50 à 100 ml de suspension contenant des débris végétaux et la faune extraite de l'herbe. Après décantation de quelques heures, une concentration est possible par aspiration d'une partie de l'eau au-dessus du culot. Il est en général possible de ramener le volume de l'échantillon à 50 ml, voire un peu moins.

Dans la majorité des cas, la totalité de l'échantillon n'est pas lue mais une partie aliquote de l'ordre du dixième. Il est évident que plus la partie lue sera importante, plus le résultat sera précis. Ceci est important lorsque les populations sont importantes.

##### 2 - Flottaison par centrifugation dans le sulfate de magnésium

Des pots à centrifuger à extrémité bien rodée, d'une contenance de 50 ml., sont remplis dans les proportions de 1/10<sup>e</sup> de l'échantillon plus 9/10<sup>e</sup> de sulfate de magnésium (d=1,29). Une lamelle couvre-objet est disposée à la surface. Après 3 à 5 mn de centrifugation à 1000 tours / mn, cette lamelle est mise sur une lame pour lecture au microscope puis renouvelée sur le tube à centrifuger. Une agitation du culot déposé au fond du tube facilitera la remontée de toutes les larves. En général, les trois premières lamelles sont renouvelées rapidement, nématodes libres et premières larves de Strongles remontent rapidement. Les lamelles sont renouvelées jusqu'à épuisement des larves.

D - DIAGNOSE DES LARVES INFESTANTES DE STRONGLES (Selon GRABER et PERROTIN, 1963 )

## II - ISOELECTROFOCALISATION EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

*Etude de deux isoenzymes chez Haemonchus contortus:*

*la maltate déshydrogénase(MDH) et la phosphoglucomutase(PGM)*

### A - PRINCIPE DE L'ISOFOCALISATION

C'est une technique de séparation des protéines par migration dans un gel qui présente un gradient continu de pH. Celui-ci s'établit grâce à la présence dans le gel de composés amphotères qui ont des Pi (points isoelectriques) se distribuant entre deux extrêmes qui constituent les limites du gradient de pH.

Une protéine déposée à un pH inférieur à son Pi, aura une charge nette positive et migrera vers le pôle négatif; inversement, la même protéine déposée à un pH supérieur à son Pi sera chargée négativement et se déplacera en direction du pôle positif. Dans les deux cas, elle sera amenée à rencontrer une zone du gel dont le pH correspond à son Pi ( $\text{pH} = \text{pH isoelectrique}$ ); la charge globale de la protéine est alors nulle, d'où arrêt de la migration. L'action continue du champ électrique va provoquer une accumulation de toutes les molécules ayant le même Pi, sous la forme d'une bande fine (on dit qu'il y a focalisation).

Après migration, la présence des protéines est révélée en utilisant leurs propriétés enzymatiques. On obtient alors, pour un système enzymatique donné, une image constituée par une série de bandes plus ou moins intenses et étalées, qui correspondent à des molécules ayant différents Pi.

*B - MATERIEL*

La manipulation effectuée au cours du stage a été réalisée sur des mâles d'*H. contortus*. Les vers sont prélevés par lots de 25 individus et introduits en amas, sans liquide, dans des tubes à congélation de 2 ml. Ces tubes sont stockés à -180° C, dans une bonbonne contenant de l'azote liquide.

*C - LES PRODUITS UTILISES***1 - Composition du gel**

- Solution A: Acrylamide 30 %
  - 7,5g d'acrylamide
  - 20 ml eau distillée
- Solution B: NN' méthylène bisacrylamide à 1 %
  - 0,25g NN' méthylène bisacrylamide
  - 25 ml eau distillée

Les solutions A et B se conservent à la température ambiante (20-25°) pendant 1 mois.

- Persulfate d'ammonium:
  - 0,15g de persulfate d'ammonium
  - 25ml eau distillée

Le persulfate d'ammonium se conserve pendant 12 h, c'est pourquoi il est recommandé de le préparer juste avant de couler le gel.

- Ampholytes

Les ampholytes de commerce existent en plusieurs gammes. nous avons utilisé une gamme 4 - 9 en mélangeant à part égale les ampholytes 4 - 6,5 et 6,5 - 9. Le choix des ampholytes déterminera non seulement la gamme de pH qui s'établira dans le gel, mais aussi les acides et bases que l'on utilisera pour imbiber les mèches.

**2 - Les solutions de tampon d'électrodes (cf. Annexe)**

Ces solutions servent à imbiber les mèches qui assurent la jonction entre les électrodes et le gel.

Pour le système enzymatique MDH, le tampon est à pH 7,8

Pour le système enzymatique PGM, le tampon est à pH 9,4

**3 - Les solutions mères pour la révélation enzymatique (cf. Annexe)**

Ces réactifs varient selon le système enzymatique recherché: force ionique, pH, coenzyme. Les principes de la révélation font intervenir des coenzymes (NAD, NADP) et des colorants: la Phénazine Méthiosulfate (PMS) qui est un transporteur d'électron et le Tetrazolium réduit (MTT) qui précipite en un complexe Formazène bleu.

Les solutions se préparent en deux étapes: le tris et les coenzymes sont mélangés et laissés à la température ambiante pendant quelques heures; les colorants et substrats ne sont ajoutés qu'avant la révélation.

*D - METHODOLOGIE***1 - Coulage du gel**

La solution de coulage est préparée dans une fiole à vide et comprend

- 9,6 ml eau distillée
- 2,8 ml Solution A
- 2,5 ml Solution B
- 1,16 ml d'ampholytes

On ajoute 0,5 ml de solution de persulfate à la solution de coulage dégazée. Le gel est ensuite coulé rapidement par capillarité entre deux plaques de verre appropriées. La polymérisation nécessite environ 30 mn, puis le gel est placé en chambre humide au réfrigérateur. Il peut être stocké ainsi pendant plusieurs jours.

## 2 - Préparation des extraits

Les nématodes sont décongelés, transvasés dans une boîte de Pétri contenant de l'eau physiologique froide, puis prélevés un par un. Chaque vers est coupé en deux parties égales. Chaque morceau est entièrement écrasé sur du papier Whatman n°3 à l'aide d'une baguette de verre dont le bout est perlé. Celui-ci est rincé et séché après manipulation de chaque ver-s. Les broyats sont stockés aussi brièvement que possible sur un pain de glace réfrigéré recouvert d'une feuille d'aluminium. On obtient ainsi le double d'échantillon (50 au lieu de 25); ce qui nous permettra d'opérer sur deux fronts de migration. Cette manipulation permet de pouvoir pratiquer la recherche de deux systèmes enzymatiques pour un même individu.

## 3 - Installation des extraits sur le gel

Le gel est démoulé et installé sur la plaque de refroidissement. En pratique, l'emplacement des extraits sur le gel dépend du pI des protéines étudiées, ce qui nécessite quelques tests préliminaires pour chaque système enzymatique.

Chaque lot d'échantillon est placé à 5 cm du bord du gel. A l'aide d'un scalpel, on pratique une découpe verticale du gel dans le sens de la largeur (à 5 cm du bord). On place dans la fente ainsi réalisée du bleu de bromophénol qui sert d'indicateur de migration. La mise en place des morceaux de papier sur lesquels sont écrasés les vers se fait à l'aide d'une pince fine, en les espaçant de 2 à 3 mm d'intervalle.

## 4 - Préparation des mèches d'électrodes

Les différents types d'électrolytes sont en fonction de la gamme de pH utilisée comme le montre le tableau ci-dessous:

Gradient pH	Acide +	Base -
3 - 9	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1M	Na OH 1M
4 - 6,5	CH <sub>3</sub> COOH 0,5M	Na OH 0,5M
6,5 - 9	CH <sub>3</sub> COOH 0,5M	Na OH 0,5M
5 - 8	CH <sub>3</sub> COOH 0,5M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1M	Na OH 0,5M Na OH 1M
4 - 9	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1M	Na OH 1M

On place les mèches dans un récipient approprié (type couvercle à 2 compartiments) l'une est imbibée avec 4 ml d'électrolytes acide, et l'autre avec 5 ml d'électrolytes basique et les laissant s'imprégner. Les mèches sont ensuite essorées sur du papier Joseph. A l'aide de deux pinces, on dépose la mèche acide sur le gel (côté anode), à environ 2 mm du bord du gel. On découpe ce qui débord. La même opération est réalisée avec la mèche basique (côté cathode). Les électrodes sont placées sur les mèches et le couvercle est mis en place.

## 5 - Mise en route de la focalisation

La résistance du gel se modifiant au cours de la migration, il est nécessaire, pour obtenir des résultats reproductibles de contrôler les paramètres électriques. Les électrodes sont reliées aux bornes du générateur. La focalisation est conduite comme suit:

- 300 volts, 50 amp, 10 watt pendant 30mn
- 500 volts, 100 amp, 15 watt pendant 30mn
- 1000 volts, 100 amp, 15 watt pendant 2 heures

## 6 - Révélation des systèmes enzymatiques

### a - Principe

Toutes les protéines contenues dans un extrait à analyser subissent la migration. Chaque une d'elles focalise en une zone du gel dont le pH correspond à son  $P_i$ . C'est le choix de la solution de révélation qui permet de faire apparaître tel ou tel système enzymatique. Chaque réaction utilise un substrat spécifique du système enzymatique testé, et les zones où ce substrat est transformé sont alors visibles sur le gel.

### b - Préparation des gels pour la révélation enzymatique

Lorsque la focalisation est terminée, le gel est découpé au niveau des parties anodiques (PGM) et cathodiques (MDH). Chaque morceau de gel est marqué par une découpe en haut à droite pour caractériser le sens de la migration, et déposé dans un bac de révélation.

### c - Révélation de la MDH et de la PGM

La solution de coloration correspondant à chaque système enzymatique (cf. Annexe) est versée sur une tranche de gel. La révélation se fait à 37°C, à l'obscurité jusqu'à l'apparition des tâches. Le temps de révélation est variable suivant le système enzymatique étudié (1/2 heure pour la MDH et la PGM).

## 7 - Fixation et conservation des gels

Lorsque la coloration paraît suffisante, la réaction enzymatique est stoppée par addition de fixateur (acide acétique à 5 %). On peut conserver les tranches de gel en les faisant sécher entre deux feuilles de cellophane pure à température ambiante et à l'obscurité.

## III - LA COPROLOGIE QUANTITATIVE

### A - MATERIEL

- pots en plastique
- agitateur magnétique
- tamis fin avec manche
- microscope
- cellules de Mc Master
- sulfate de magnésium ( $d=1,27$ )

### B - METHODE

- peser 5g de fèces (matière fraîche)
- mélanger avec 70 ml de sulfate de magnésium
- tamiser
- remplir les deux chambres d'une cellule de Mc Master
- attendre 10 mn
- faire la lecture sur la totalité des deux chambres (objectif x 10)

Soit,  $n_1$  le nombre d'œufs compté dans la chambre 1,

$n_2$  le nombre d'œufs compté dans la chambre 2

Le nombre d'œufs par gramme de matière fécale (OPG) est calculé selon la formule:

$$OPG = (n_1 + n_2) \times 15$$

## IV - LA COPROCULTURE

### A - CULTURE DU BROyat DES FEMELLES

#### 1 - Obtention et extraction des larves L3

Les femelles sont extraites du contenu digestif le jour même de l'autopsie et/ou le jour suivant. 10 à 20 individus sont mis sur une lame porte-objet et à l'aide d'un scalpel, on découpe les vers jusqu'à ce que les œufs renfermés dans l'utérus découpé soit libérés.

Le broyat ainsi obtenu est déposé sur du crotin stérile et humide de cheval et placé sur un morceau de papier filtre. l'ensemble est mis dans une boîte de Pétri contenant un morceau d'éponge imbibé d'eau pour maintenir l'humidité. La culture se fait à la température ambiante (20-25°).

Au bout de 10 jours, l'extraction des larves infestantes L<sub>3</sub> s'effectue par la méthode de Baerman qui consiste à laisser surnager pendant 24 heures le crotin provenant de la culture. Cette méthode se réalise sur un dispositif appelé appareil de Baerman, constitué d'un entonnoir en verre, d'un tuyau en plastique et d'un tube en verre. Les larves récupérées dans le tube sont comptées puis diluées, si nécessaire, ensuite stockées à 4° C.

### *2 - Dilution des larves infestantes*

Etant donné: leur relative fragilité, la conservation des larves L<sub>3</sub> est très délicate et exige certaines précautions. Pour limiter la mortalité des larves au cours du stockage, la préparation d'une solution à raison de 2000 larves par ml est recommandée avant la conservation à 4°C.

Le comptage des larves est fait en pipettant au moyen d'une micropipette n fois 5 ou 10 microlitres de la suspension mère, et en comptant, pour chaque dépôt mis sur la lame porte-objet, le nombre de L<sub>3</sub>.

Cette suspension ainsi obtenue est alors versée dans une boîte à culture de cellule pour le stockage, de façon à constituer un film de 2 à 3 mm d'épaisseur.

### *B - CULTURE A PARTIR DES FECES*

Les fèces récoltés et stockés à 4°C sont mis dans des bacs qui sont ensuite rangés dans une salle appropriée où les conditions de culture sont maintenues constantes (température 23-26°C, humidité 70-80 %). L'état des fèces mises en culture est vérifié tous les deux jours; ainsi la matière fécale est aérée en la remuant et si nécessaire humidifiée.

La coproculture prend fin au 10<sup>e</sup> jour avec l'extraction des larves L<sub>3</sub> par la méthode de Baerman, comme pour les cultures de broyat de femelles, à la seule différence est qu'ici l'appareil de Baerman est remplacé par un bac à l'intérieur duquel est déposé un cadre grillagé. Sur ce dernier, il est déposé successivement une feuille de papier Sopalin dédoublée, les fèces provenant de la culture. De l'eau est versée dans le bac jusqu'au ras des fèces. 24 heures après, les larves L<sub>3</sub>, contenues dans le liquide collecté dans le bac, après égouttage des fèces de quelques minutes, sont recueillies sur un tamis de 20µ de maille et mise dans des boîtes à culture de cellules. Les larves sont ensuite comptées puis conditionnées pour le stockage à 4°C.

## **CONCLUSION**

Mon travail a consisté durant ce stage à l'acquisition des techniques suivantes:

- récolte et identification de larves infestantes de Strongles sur l'herbe;
- caractérisation enzymatique de nématodes par isoélectrofocalisation en gel mince de polyacrylamide.

Ce stage, bien que de courte durée, m'a néanmoins permis de faire connaissance avec d'autres techniques parasitologiques utilisées (coprologie, coproculture, infestation expérimentales ---), et de les comparer avec celles utilisées dans notre laboratoire.

## REMERCIEMENTS

Nous adressons nos remerciements les plus chers:

- au Dr L. GRUNER pour l'accueil qu'il nous a réservé dans son laboratoire,
- au Dr J. CABARET pour la parfaite organisation du stage et par l'assistance continue qu'il a toujours manifesté pour nous assurer une bonne compréhension des techniques utilisées.
- à tous les techniciens de l'Unité d'Ecologie des parasites de l'INRA,
- au Directeur Général de l'ISRA et au Directeur des Recherches sur la santé et les Productions animales de nous avoir autorisé à effectuer cette formation.

**ANNEXE : PROTOCOLES D'ELECTROPHORESE (MDH et PGM)****A - COMPOSITION DES SOLUTIONS MERES ET TAMPON TRIS****- solution mère A****Tampou tris A (0,2 M - pH 8)**

12 g de tris  
 500 ml d'eau  
 ajouter le pH à 8 avec de l'Hcl

Mgcl<sub>2</sub> (0,1 M) : 1g pour 50 ml d'eau  
 NAD (0,015 M) : 200g pour 20 ml d'eau  
 NADP (0,013 M) : 200g pour 20 ml d'eau

NBT (0,012 M) : 200g pour 20 ml d'eau  
 MTT (0,024 M) : 200g pour 20 ml d'eau  
 PMS (0,033 M) : 200g pour 20 ml d'eau

**- solution mère B****Tampou tris B (0,1 M - pH 8)**

6,06 g de tris  
 500 ml d'eau  
 ajuster le pH à 8 avec de l'Hcl

NAD (0,038 M) : 125 mg pour 5 ml d'eau  
 NADP (0,027 M) : 100 mg pour 5 ml d'eau

MTT (0,014 M) : 30 mg pour 5 ml d'eau  
 PMS (0,07 M) : 10 MG pour 5 ml d'aeu

**B - PREPARATION DES SYSTEMES DE TAMPON D'ELECTRODES****TEB 7,8**

3,64 g tris  
 3,72 g Na<sub>2</sub>EDTA  
 1,90 g Mgcl<sub>2</sub>  
 1 l d'eau  
 ajuster à pH 7,8 avec de l'acide Borique

**TE 9,4**

12,11 g tris  
 200 mg EDTA  
 1 litre eau et ajuster le pH à 9,4 avec EDTA

**C - COMPOSITION DES SOLUTIONS DE REVELATION*****Maltate déshydrogénase (MDH) dimère ( 2 locus )*****Avec tampon TEB 7,8**

Tris-Hcl (0.1 M et pH 8) 20 ml

NAD----- 1 ml

NADP ----- 1 ml

**Avant la coloration**

MTT----- 1 ml

PMS----- 1 ml

**Malate**

50 mg d'acide malique pour 1 ml d'eau,

ajuster le pH à 8 avec NaOH : 2 ml

***Phosphoglucomutase (PGM) ( Monomère )*****Avec tampon TEB 9,4**

Tris-Hcl-----10 ml

MgCL2 0,1 M-----1 ml

NAD-----1 ml

NADP-----0,5 ml

NBT----- 1 ml

Glucose-1-phosphate---300 g

**Avant la coloration**

PMS----- 0,5 ml

G6PDH----- 20  $\mu$ 

MTT----- 1 ml