

**D.E.A. D'AMÉLIORATION DES PLANTES – 1978**

---

**MISE EN ÉVIDENCE DE CAS DE POLYMORPHISME ENZYMATIQUE**

**CHEZ LE MIL : *PENNISETUM TYPHOIDEUM (AMERICANUM)***

**Rapport de stage**  
**Marie-Catherine DUBAYLE ép. BOISSELIER**

**O.R.S.T.O.M. :**  
**Laboratoire de structure génétique des Mils.**

D.E.A. D'AMELIORATION DES PLANTES

1978

MISE EN EVIDENCE DE CAS DE POLYMORPHISME ENZYMATIQUE CHEZ LE MIL :

*PENNISETUM TYPHOIDEUM (AMERICANUM)*

RAPPORT DE STAGE

Marie-Catherine DUBAYLE ép. BOISSELIER

Ô.R.S.T.O.M. : Laboratoire de  
structure génétique des Mils.

# MISE EN EVIDENCE DE CAS DE POLYMORPHISME ENZYMATIQUE CHEZ LE MIL :

## *PENNISETUM TYPHOIDEUM (AMERICANUM)*

-----

### CHAPITRE I : ELECTROPHORESE : MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE

#### I - INTRODUCTION

- A - Approche génétique du polymorphisme enzymatique
- B - Etude de la variabilité génétique des populations

#### II - MATERIEL ET METHODES

- A - Matériel utilisé
- B - Méthodes
  - a - Extraction enzymatique :
    - + sur farine
    - + graine à graine
  - b - Technique électrophorétique
  - c - Révélation des plaques
  - d - Conservation des plaques

#### III - RESULTATS DES ZYMOGRAMMES

- A - Glutamate déshydrogénase
- B - Léucines aminopeptidases
- C - Estérases carboxyliques

#### IV - CONCLUSION

### CHAPITRE II : EXPERIMENTATION

#### I - BUT DES MANIPULATIONS.

#### II - RESULTATS

- A - Leucines aminopeptidases
  - 1°) Génétique
    - a - Zone A
    - b - Zone D
  - 2°) Pour une meilleure lecture du polymorphisme enzymatique
  - 3°) Variabilité interpopulations, étude statistique.

- a - Equilibre de Hardy - Weinberg
- b - Variabilité interpopulations

**B - Estérases carboxyliques**

1°) Génétique

- a - Autofécondations
- b - Croisements
- c - Vérifications

2°) Pour une meilleure lecture du polymorphisme enzymatique

3°) Variabilité intra et interpopulations, étude statistique

- a - Equilibre de Hardy - Weinberg
- b - Caractérisation des populations
- c - Variabilité interpopulations
  - +  $\chi^2$  de conformité
  - + Analyse des correspondances
  - + Dendrogrammes

**III - CONCLUSION**

ELECTROPHORESE : MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE

---

I - INTRODUCTION

L'étude du polymorphisme enzymatique et de la variabilité génétique des populations, utile en Amélioration des plantes, est possible grâce à l'électrophorèse.

A - APPROCHE GENETIQUE DU POLYMORPHISME ENZYMATIQUE

Les protéines peuvent exister sous différentes formes moléculaires ayant la même spécificité enzymatique. Ces différentes formes moléculaires ont reçu le terme d'"Isoenzymes" par MARKERT et MOLLER (1959).

La méthode la plus employée pour séparer les isoenzymes chez les végétaux est l'électrophorèse. Cette technique séparant les protéines grâce à la modification de charge liée aux substitutions d'acides aminés, traduit les différences alléliques et donne ainsi une représentation concrète du polymorphisme enzymatique (SHANNON 1968).

La notion de pureté variétale peut être abordée par l'étude du polymorphisme intrapopulation.

B - ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE DES POPULATIONS

L'étude du polymorphisme enzymatique donne elle même une représentation de la variabilité génétique existant au sein des diverses populations. L'étude de la variabilité interpopulations est intéressante en Amélioration des plantes car elle peut permettre d'estimer des distances génétiques entre populations (PERNES 1975), ceci ayant pour but d'améliorer le choix des populations de départ, que l'on choisira de plus grande distance génétique, pour la constitution d'hybrides vigoureux.

Pour ces études, trois enzymes ont été retenues :

- les estérases carboxyliques (EST.), pour leur présence abondante dans les graines et leur action à tous les niveaux dans le métabolisme de la plante.

- les leucines aminopeptidases (LAP), pour leur présence dans la graine et leur action à de nombreux niveaux du métabolisme de la plante.

- la glutamate déshydrogénase (GDH), pour sa spécificité beaucoup plus stricte; elle agit en un point du métabolisme azoté de la plante.

Les méthodes utilisées ont été décrites par P. HOUDIARD (rapport élève ORSTOM 1977), au besoin modifiées.

### A - MATERIEL UTILISE

Le matériel végétal étudié est composé de cinq populations récoltées lors des prospections (IBPGR - ORSTOM):

- 2 populations cultivées du Cameroun, l'une tardive (C 24) et l'autre précoce (C 25), récoltées dans le même village et pouvant correspondre à des isolats de par les marécages qui les entourent.

- 3 populations du Sénégal, une sauvage *P. violacéum* (SL 168), une cultivée tardive (SL 164) et une cultivée précoce (SL 165) appartenant au même village.

### B - METHODES

#### a - Extraction enzymatique

+ sur farine : Les graines de mil sont broyées (broyeur MILL 14920 FOSSELECTRIC) au froid à 4 ou 5°C. Les 300 mg de farine (une cinquantaine de graines) nécessaires à 2 ou 3 répétitions sont imbibés avec le tampon d'extraction (tableau I) à raison de 1ml pour 300mg, pendant 20 mn. Le mélange est ensuite filtré sur gaze, puis centrifugé pendant 10mn à 70 000g. L'extrait est obtenu en pipettant 300 $\mu$ l de surnageant, et une goutte de Bleu de Bromophénoï dilué dans du tampon de migration Tris-Glycine permet de suivre la migration.

+ graine à graine : Chaque graine est mise à imbiber pendant une heure dans du tampon d'extraction (1 goutte ou 2), puis écrasée. On récolte l'extrait par diffusion dans du papier Wattman n°3 (2mm x 10 mm) trempé dans le broyat pour le déposer dans l'encoche du gel, ou verticalement dans l'épaisseur du gel préalablement incisé: ces méthodes ne permettent pas une bonne résolution. Les meilleurs résultats ont été obtenus en écrasant la graine après imbibition d'une heure, sur un "confetti" de papier Wattman n°3, déposé pour électrophorèse sur disque à deux gels selon la méthode de DAVIS (1964).

#### b - Technique électrophorétique

L'électrophorèse se fait sur gel d'acrylamide 7% (tableau II), en plaque horizontale. La plaque fait 25 cm x 11,5 cm et 0,2 cm d'épaisseur, elle a douze encoches pour une migration en large, et six encoches pour une migration en long. Chaque encoche contient à peu près 50 $\mu$ l d'extrait.

TABLEAU I

=====

<u>TAMPON D'EXTRACTION</u> :	TGSM	0,75 ml
	Triton X100 à 1%	150 µl
	DMSO à 10%	100 µl

TGSM : - Tampon de migration Tris-Glycine (tableau III)

- Saccharose 40%
- Mercaptoéthanol 20 mM

DMSO : Diméthylsulfoxyde

- Le saccharose n'a de fonction que pour alourdir l'extrait lors d'une migration sur disque.
- L'action du Triton X 100 est une élimination des lipides membranaires dans l'extrait.
- Le DMSO augmente la perméabilité cellulaire et permet un meilleur rendement à l'extraction, sans dénaturer les protéines.

TABLEAU II

=====

<u>GEL D'ACRYLAMIDE</u> :	1 part de ①
	1 part de ②
	2 parts de ③

- ① - Hcl 1N      24 ml
- Tris      18,15 mg (Trishydroxyméthyl - aminométhane)
- TEMED     0,23 ml (Tetra méthyl éthylène diamine)
- H<sub>2</sub>O jusqu'à 100 ml
- ② - Acrylamide 28 g
- BIS        0,735 g (Méthylène.bis - acrylamide)
- H<sub>2</sub>O jusqu'à 100 ml
- ③ - Persulfate d'ammonium 140 mg pour 100 ml

Le tampon de migration utilisé est le tampon Tris-Glycine (DAVIS 1964) (tableau III).

Les modifications apportées aux méthodes décrites par P. HOUDIARD concernent principalement les conditions de migration.

Pour une migration en large :

- Préélectrophorèse d'une heure à 40 mA ce qui permet une stabilisation du voltage (travail à intensité constante), et un équilibrage du gel.
- Dépôts de 50  $\mu$ l d'extrait dans chaque encoche.
- 5 mn d'électrophorèse à 20 mA (280 volts) pour une pénétration lente de l'extrait dans le gel.
- 3h30 d'électrophorèse à 40 mA (550 - 650 volts).

Pour une migration en long : l'intensité est ajustée à 12,5 mA (500 - 700 volts), et l'électrophorèse se déroule pendant 16 à 18 heures.

Du fait de l'échauffement lié à la résistance électrique du gel, le refroidissement de la plaque tout au long de la migration est obligatoire et se fait par circulation d'eau à 3°C sous la plaque. De plus, la cuve à électrophorèse est placée dans une enceinte réfrigérée à 5°C.

#### c - Révélation des plaques

La coloration, une fois l'électrophorèse arrêtée, doit être immédiate car il y a diffusion des enzymes dans le gel, le colorant, lui, reste fixé.

+ Estérasés : Méthode de SHAW et PRASAD (1970) modifiée (tableau IV)

L'apparition des bandes se fait au bout de 10 à 15 mn, à l'obscurité et température ambiante.

L'utilisation d' $\alpha$  et de  $\beta$  naphtylacétate permet de mettre en évidence des formes enzymatiques ayant une affinité différentielle pour ces 2 isomères. L'isomère  $\alpha$  conduit à une coloration brune, l'isomère  $\beta$  à une coloration rose.

+ Leucines aminopeptidases : Méthode de SCANDALIOS (1964) modifiée (tableau IV)

Les bandes apparaissent au bout de 30 mn à l'obscurité à 37°C.

La coloration se faisant mal ou pas du tout si le gel touche les bords de la cuve de révélation, une coloration à plat étant impossible, on utilise de petites cuves verticales pour la mise en évidence des LAP.

+ Glutamate déshydrogénase : Méthode de MACKO et al. (1967) modifiée (tableau IV)

L'apparition des bandes se fait au bout de 15 mn à l'obscurité et température ambiante.

Le criblage se fait sur présence ou absence de bande essentiellement, mais





on peut également tenir compte des intensités et le passage des gels au densitomètre (spectrophotomètre UNICAM SP 1800 avec densitomètre) permet une visualisation plus concrète de l'intensité des bandes. La loi de Beer - Lambert rend impossible l'attribution d'une valeur quantitative aux différents pics observés; certaines bandes présentant une trop forte Densité Optique, on sort de la partie linéaire de la courbe. Seul l'aspect général de la courbe peut être pris en considération.

Les longueurs d'onde optimales sont de 560 nm pour les LAP et 470 nm pour les Estérases.

#### d - Conservation des plaques

Les plaques peuvent être laissées pendant une nuit dans du fixateur (Méthanol 5%, Acide acétique 7,5%), puis elles sont placées sous vide dans du Méthanol 55% pendant 24 heures. Cette déshydratation contracte les plaques à peu près du tiers, puis celles-ci sont séchées sur papier Wattman n°3 ou sur cellophane, en les plaquant sous vide dans un appareil PHARMACIA GSD-4.

### III - RESULTATS DES ZYMOGRAMMES

Le terme zymogramme désigne l'ensemble des bandes d'un extrait pour une enzyme considérée.

#### A - GLUTAMATE DESHYDROGENASE

De très mauvais résultats ont été obtenus sur plaque, la lecture étant pratiquement impossible. L'électrophorèse se fait donc sur disque à deux gels selon la méthode de DAVIS (1964) (gel de prémigration 2,5% d'acrylamide, gel de séparation 7% d'acrylamide). Cependant, les témoins révèlent des artéfacts à la coloration : en effet, les bandes observées ne sont pas toutes dues à l'activité GDH. Ces bandes parasites apparaissent sans substrat, ne se voient plus sans NAD, elles correspondent donc à une autre activité enzymatique. Elles disparaissent en dialysant l'extrait pendant une nuit contre du tampon de migration Tris-Glycine  $4,95 \cdot 10^{-3} M$  ph 8,3 dilution 10, dans notre système de révélation. Des travaux ultérieurs permettent de suspecter une activité ADH (Alcool déshydrogénase).

Si l'on ne considère pas ces bandes parasites, aucun polymorphisme enzymatique ne peut être mis en évidence; on observe toujours deux bandes de faible migration, ceci ayant été confirmé pour tous les échantillons analysés au laboratoire par M.F. RIANDEY.

#### B - LEUCINES AMINOPEPTIDASES

La lecture des zymogrammes en plaque horizontale est possible. 5.  
Au départ, l'intensité de migration étant trop forte (90 à 100 mA) pour assurer une bonne résolution, l'amélioration de la méthode a été assurée par le passage à une migration à intensité constante à 40 mA. On peut observer 3 zones sur chaque zymogramme.

D'autres modifications, quant à la technique électrophorétique et à la révélation, pourraient conduire à une amélioration de la lecture des zymogrammes.

#### C - ESTERASES

De nombreuses bandes apparaissent en électrophorèse, le polymorphisme enzymatique semble important pour cette enzyme. La lecture des zymogrammes était délicate, les migrations n'étant pas répétitives. Fréquemment des disparitions de bandes ou des dédoublements étaient observés, mais les modifications apportées à l'expérimentation (identiques aux LAP) ont permis une nette amélioration. La migration en long, avec un temps d'électrophorèse plus important, confirme la migration en large.

#### IV - CONCLUSION

La partie méthodologie est essentielle en électrophorèse car il est important de bien révéler les enzymes avant l'expérimentation afin de pouvoir interpréter correctement les résultats obtenus. Il peut exister des bandes encore invisibles.

Par son manque de polymorphisme enzymatique, l'étude de la GDH a été abandonnée. L'expérimentation portera sur l'étude des LAP et EST. qui sont plus polymorphes électrophorétiquement. Notons que parmi les trois enzymes étudiées, ce sont celles qui ont le moins de spécificité dans le métabolisme de la plante.

=====

EXPERIMENTATIONI - BUT DES MANIPULATIONS

A l'O.R.S.T.O.M. (Office de Recherche Scientifique et Technique Outre Mer) à Bondy, qui m'a accueilli pour mon stage, les travaux du B.A.P.U. (Biologie et Amélioration des plantes Utiles) se font en grande partie sur le Mil (*Pennisetum typhoïseum (americanum)*), et ce sont les travaux de P. HOUDIARD, élève ORSTOM, qui ont été à la base des recherches. Nous avons voulu étudier l'homogénéité des populations récoltées en Afrique de l'Ouest lors des prospections. Par ses techniques d'étude sur des farines de graines en mélange, P. HOUDIARD ne pouvait étudier le polymorphisme intracultivar. Pour cela, il fallait pouvoir travailler graine à graine. Une mise au point expérimentale délicate a rendu nécessaire le criblage sur l'autofécondation de vingt plantes issues de chaque population.

Un échantillonnage de vingt plantes suffit à éviter la non observation d'un type au risque de 5% (risque général en statistique).

Cette étude pourra entraîner des conclusions d'ordre génétique.

P. HOUDIARD ayant conclu dans son rapport qu'il existait plus de différences entre populations appartenant à 2 écosystèmes différents qu'entre populations différentes d'un même écosystème, nous avons comparé une population sauvage *P. violaceum* (SL 168) et deux populations cultivées (précoce: SL 165 et tardive: SL 164) d'un même village du Sénégal et deux populations cultivées (précoce: C 25 et tardive: C 24) d'un même village du Cameroun.

Une analyse des farines de population en mélange montre le polymorphisme enzymatique pour les Estérases et les Leucines aminopeptidases, reflet de différences entre ces cinq populations. La morphologie des plantes cultivées en serre permet déjà de suspecter une différence intra et intercultivar.

Un contrôle des formes alléliques a été effectué par croisement à parent constant (C 24) sur cinq plantes de chaque population.

II - RESULTATSA - LEUCINES AMINOPEPTIDASES

L'analyse des farines de graines issues d'autofécondations révèle le polymorphisme intracultivar (figure 1) et permet une interprétation génétique.

SCANDALIOS (1964 - 1965), BECKMAN et al. (1964), OTT et SCANDALIOS (1978) étudiant les LAP sur le maïs, définissent 4 zones pour leurs zymogrammes. Le mil pourrait présenter un système analogue, nous trouvons ces 4 zones sur les zymogrammes, que nous réduirons, pour des raisons matérielles, à 3 zones.

- une zone A ou trois types de bande sont observés :



- une zone B et C, d'intensité constante, caractérisée sur les zymogrammes par :



La technique électrophorétique ne permettant pas de dissocier les deux bandes constamment.

- une zone D avec trois intensités de bandes différentes, comparé à la zone B-C :



Le passage au densitomètre d'un gel permet de révéler ces trois zones (figure 2).

a - Zone A : on peut penser qu'elle est due à l'expression d'un gène à deux allèles : Fast et Slow (F et S), ou à l'expression de deux gènes, l'un ayant pour allèles S donnant une activité enzymatique et  $\$$  ne donnant aucune activité enzymatique (S dominant sur  $\$$ ). L'autre ayant pour allèles F et  $\mathcal{F}$  (F dominant sur  $\mathcal{F}$ ). Aucun individu sans bande F et S n'ayant été décelé, les allèles F et S auraient une fréquence élevée.

Parmi les croisements à parent constant effectués, l'analyse d'un croisement entre individu ayant la bande S par un individu ayant la bande F donne un zymogramme ayant les deux bandes F et S, sans bande intermédiaire.

Dans l'hypothèse d'un même gène, on aurait croisé un individu FF par un individu SS, l'hybride FS ayant deux bandes, l'enzyme serait un monomère (en accord avec la littérature).

Dans l'hypothèse de deux gènes, on aurait croisé un individu  $S\mathcal{F}\mathcal{F}\mathcal{F}$  ou  $SS\mathcal{F}\mathcal{F}$  par un individu  $\mathcal{S}\mathcal{S}\mathcal{F}\mathcal{F}$  ou  $\mathcal{S}\mathcal{S}\mathcal{F}\mathcal{F}$ , les activités se retrouvant chez l'hybride.

D'autres expérimentations sont nécessaires pour appuyer l'une ou l'autre hypothèse.

b - Zone D : l'intensité variable de cette bande peut être l'expression d'une activité enzymatique variable. C'est peut être l'expression d'un gène de régulation à deux allèles s'exprimant sans dominance, f ne donnant aucune activité enzymatique, f' une forte activité enzymatique, l'hybride ff' donnera une bande d'intensité intermédiaire.

L'analyse d'un croisement entre un individu ayant une bande de plus faible intensité

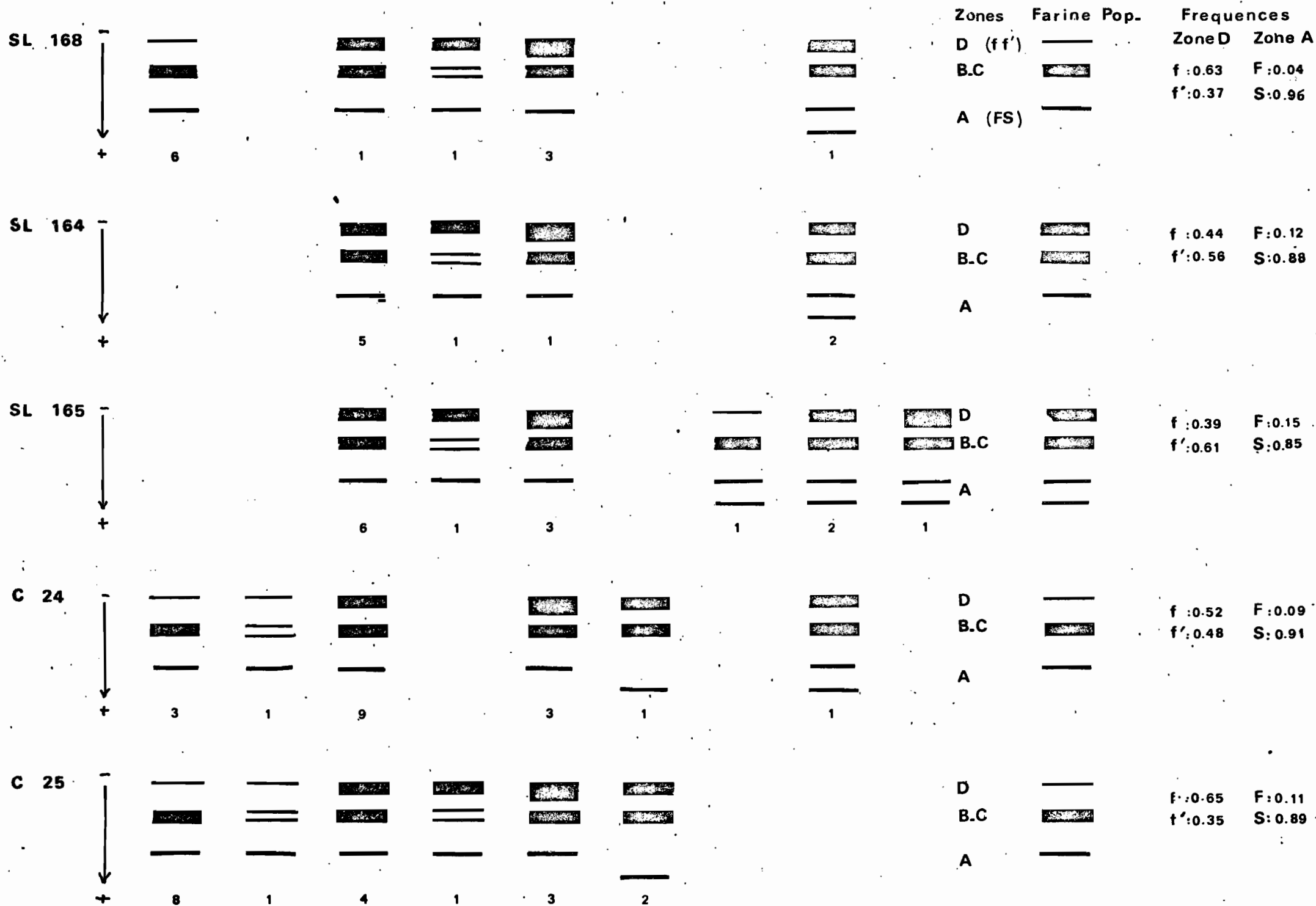


FIGURE 1 : Autofécondations LAP et Populations en mélange - Fréquences -

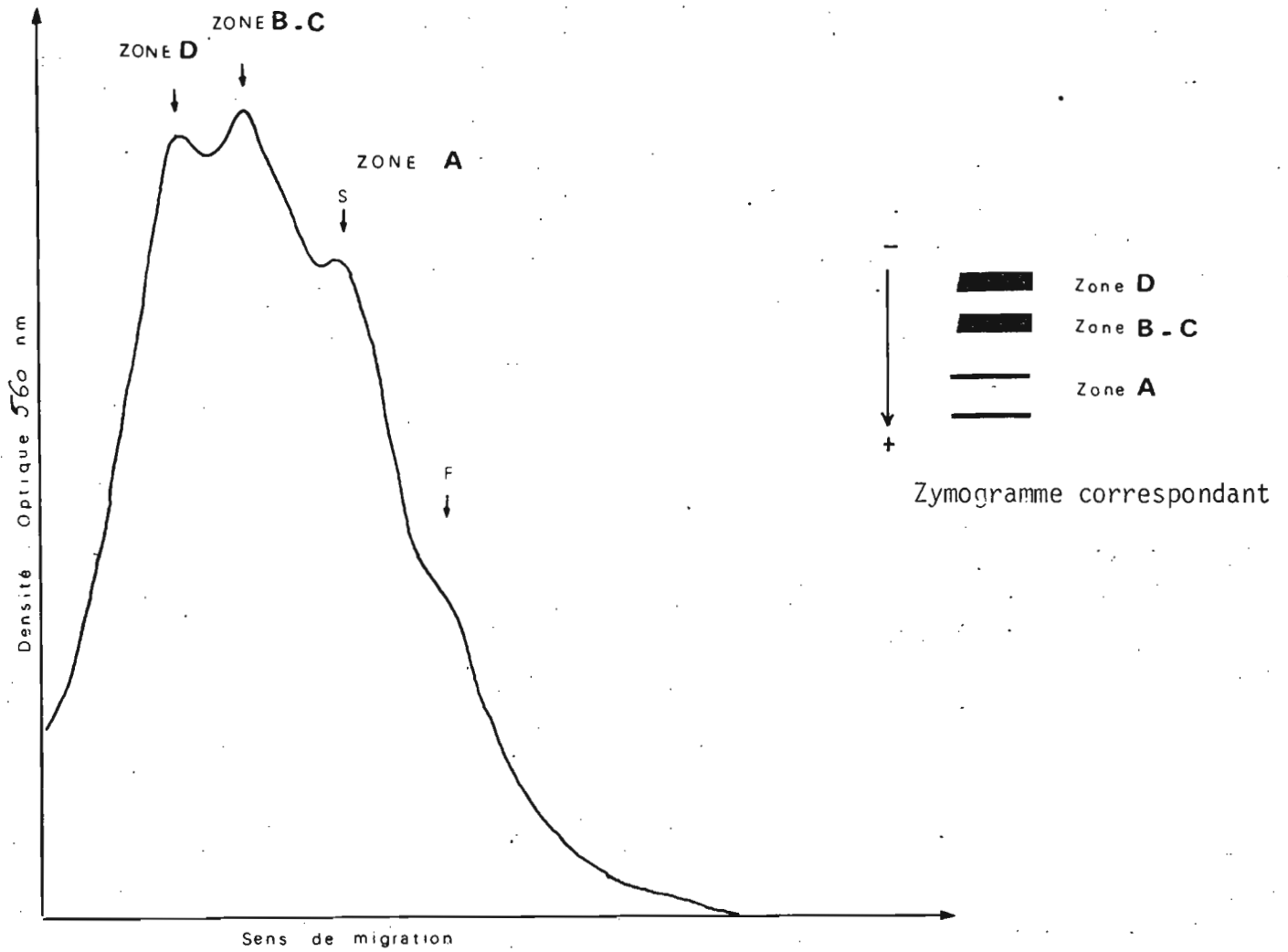


FIGURE 2 : PASSAGE AU DENSITOMETRE D'UN GEL LAP

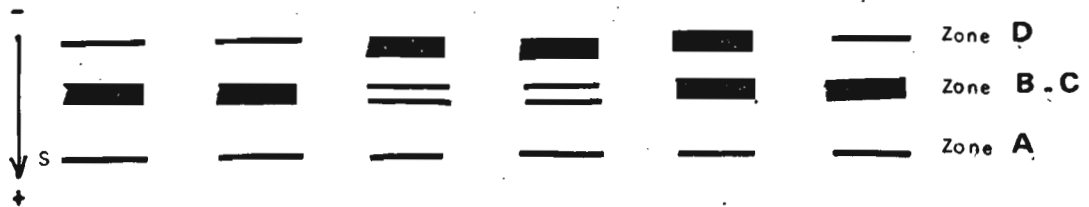
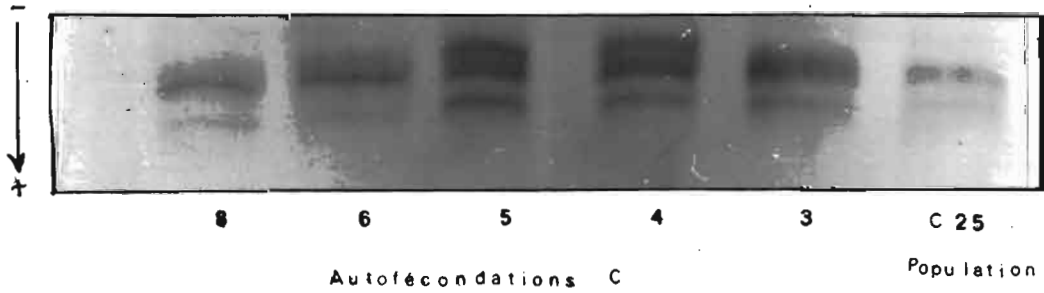


PHOTO A : POPULATION C 25 : Zymogramme de la population en mélange et zymogrammes de farine de graines issues d'autofécondations d'individus C 25.

LAP

(ff) par un individu ayant une bande de forte intensité (f'f'), révèle un 8.  
hybride ayant une bande d'intensité intermédiaire (ff'). Cette analyse ne va pas  
à l'encontre de l'hypothèse d'un gène à deux allèles sans relation de dominance.

L'hypothèse de l'expression d'un gène de régulation peut être également  
retenue, mais demandée confirmation.

### 2°) Pour une meilleure lecture du polymorphisme enzymatique

En comparant les résultats des autofécondations avec le zymogramme des  
populations en mélange (figure 1), on constate que :

- la bande F de la zone A, lorsqu'elle est peu fréquente dans la  
population (SL 168- SL 164- C 24- C 25) n'est pas visible sur le zymogramme de la  
population en mélange.

- le zymogramme de la population en mélange présente, pour  
la zone D, deux types de bandes: une faible, l'autre intermédiaire, pas de bande à  
forte intensité.

La bande est d'intensité intermédiaire pour une fréquence de f' (déter-  
-minant une forte activité enzymatique) supérieure à 50% et inversement.

Le zymogramme de la population en mélange n'est pas le reflet de la  
variabilité intracultivar (photo A). Elle est masquée. Il semble qu'il y ait effet de  
dilution. Cependant, pour la zone D, il semble qu'il y ait une relation entre fréquence  
allélique de f' et intensité de la bande sur le zymogramme de la population en mélange.

### 3°) Variabilité interpopulation, étude statistique

Les fréquences alléliques peuvent être déterminées pour chaque couple  
d'allèles par comptage allélique (figure 1). Pour la zone A, elle est calculée.  
sous l'hypothèse d'un seul gène (F.S).

#### a - Equilibre de Hardy - Weinberg :

On peut tester la panmixie par test de  $\chi^2$ . On teste l'écart entre le  
nombre d'individus observés dans chaque classe, et le nombre théorique donné par la  
loi de Hardy - Weinberg :  $np^2$ ,  $2npq$ ,  $nq^2$  (tableau V).

Pour la zone D, on ne met pas en évidence de différence significative  
au seuil de 5%, excepté pour la population SL 164. Le nombre d'individus analysés  
étant de neuf, cette différence est certainement due à un mauvais échantillonnage.

Pour la zone A, les test de  $\chi^2$  sur C 24 et C 25 révèlent une différence  
significative, on doit rejeter  $H_0$  : "les populations sont à l'équilibre de Hardy -  
Weinberg, elles évoluent en panmixie", le nombre d'individus analysés ne pouvant  
être mis en cause.

Aucune explication ne pouvant être formulée pour cet écart à la panmixie,  
on a peut être là l'ébauche d'un premier argument permettant de rejeter l'hypothèse  
d'un seul gène à deux allèles, pour ces bandes.



Génotypes Populations		ff	ff'	f'f'	$\chi^2$ 1ddl
		SL 168	Nbre Obs.	6	3
	Nbre Théo.	4.68	5.64	1.68	NS
SL 164	Nbre Obs.	0	8	1	5.87
	Nbre Théo.	1.8	4.41	2.79	*
SL 165	Nbre Obs.	1	9	4	1.35
	Nbre Théo.	2.1	6.72	5.18	NS
C 24	Nbre Obs.	4	11	3	0.89
	Nbre Théo.	5.04	9.00	3.96	NS
C 25	Nbre Obs.	9	7	3	0.73
	Nbre Théo.	8.36	8.55	2.05	NS

a - TEST  $\chi^2$  sous  $H_0$  : "les populations suivent l'équilibre de Hardy - Weinberg  
Seuil de signification : 5%  
LAP - ZONE D

Génotypes Populations		SS	SF	FF	$\chi^2$ 1ddl
		SL 168	Nbre Obs.	11	1
	Nbre Théo.	11.06	0.92	0.02	NS
SL 164	Nbre Obs.	7	2	0	0.143
	Nbre Théo.	7.13	1.76	0.11	NS
SL 165	Nbre Obs.	10	4	0	0.404
	Nbre Théo.	10.36	3.37	0.27	NS
C 24	Nbre Obs.	16	1	1	7.36
	Nbre Théo.	15.24	2.65	0.11	**
C 25	Nbre Obs.	17	0	2	17.60
	Nbre Théo.	15.05	3.72	0.23	***

b - TEST  $\chi^2$  sous  $H_0$  : "les populations suivent l'équilibre de Hardy - Weinberg  
Seuil de signification : 5%  
LAP - ZONE A (sous l'hypothèse d'un gène à deux allèles)

TABLEAU V

NS : différence non significative à 5%

\* : différence significative à 5%

\*\* : différence significative à 1%

\*\*\* : différence significative à 1%

RESSEMBLANCE INTERPOPULATION ENTRE :	POPULATIONS TESTEES	ZONE D			ZONE A	
		NOMBRE DDL	$\chi^2$	SIGNIFICA- TION	$\chi^2$	SIGNIFICA- TION
TOTALE	SL 168 SL 164 SL 165 C 24 C 25	4	5.96	NS	1.66	NS
SENEGALAIS	SL 164 SL 165 SL 168	2	2.95	NS	1.01	NS
CAMEROUNAIS	C 24 C 25	1	1.30	NS	0.11	NS
CULTIVES SENEGALAIS	SL 164 SL 165	1	0.122	NS	0.07	NS
TARDIFS	SL 164 C 24	1	0.33	NS	1.4	NS
PRECOCES	SL 165 C 25	1	4.56	*	0.21	NS

**TABEAU VI :**  $\chi^2$  DE CONFORMITE PAR COMPTAGE ALLELIQUE SUR LES LAP.  
Zone D et Zone A ( sous l'hypothèse d'un seul gène)  
Ho : "les populations testées sont identiques"  
Seuil de signification : 5%

NS : Non Significatif

\* : Significatif

L'étude de la variabilité interpopulation, de relations précocité-tardivité, etc..., peut être abordée statistiquement par un  $\chi^2$  de conformité sur comptage allélique. On teste l'hypothèse nulle  $H_0$  : "les populations testées sont identiques" (tableau VI), pour chaque couple d'allèle.

Aucune différence significative, au seuil de 5%, permettant de rejeter  $H_0$  n'a été mise en évidence, excepté pour les populations précoces pour la zone D.

Pour les deux populations précoces, appartenant à deux écosystèmes différents, on met en évidence une différence significative. Il semble donc que l'on ne puisse pas donner de relation pour tardivité et précocité pour le polymorphisme des LAP.

## B - ESTERASES CARBOXYLIQUES

### 1°) Généétique

#### a - Autofécondations

L'analyse des vingt autofécondations par population montre un polymorphisme intracultivar important. Le polymorphisme enzymatique des EST. semble plus important que celui des LAP.

L'emploi de  $\alpha$  et  $\beta$  naphtyl acétate pour la révélation des EST. donne deux colorations: l'une brune et l'autre rose. Les bandes roses migrent plus vers l'anode que les bandes brunes.

+ Bandes brunes : l'analyse des autofécondations montre peu de polymorphisme chez ces bandes brunes (figure 3-4-5-6-7), seul le C 24 possède deux bandes brunes supplémentaires (M1-M2), de faible migration, chez certains individus. Sinon, on observe quatre bandes invariables et de densité différente (M3-M4-M5-M6).

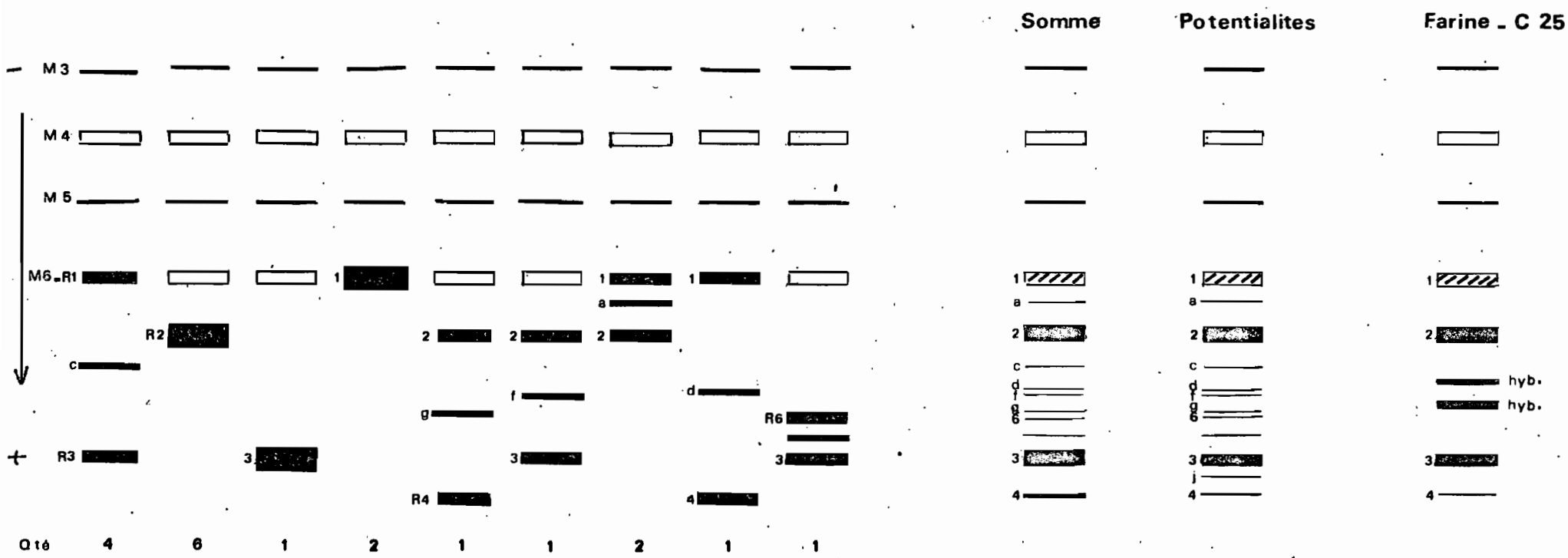
+ Bandes roses : on a un fort polymorphisme des bandes roses : un seul gène semble responsable de ce polymorphisme et 6 allèles ont pu être comptés (R1-R2-R3-R4-R5-R6). Les autofécondations révèlent des individus homozygotes ne présentant qu'une seule bande rose de forte intensité, et des individus hétérozygotes possédant trois bandes. L'enzyme est un dimère (SCHWARTZ 1964). L'hybride possède deux bandes homodimères et une bande hybride (notée par une lettre alphabétique) se situant à égale distance des homodimères, mais de plus faible intensité. En effet, une plante hétérozygote R1R5 autofécondée donne des graines :

1/4 R1R1, 1/2 R1R5, 1/4 R5R5.

Les graines R1R5 donnent 1/4 d'homodimère R1R1, 1/4 d'homodimère R5R5, et 1/2 d'hétérodimère R1R5, en électrophorèse. Sur le zymogramme des farines de graines issues d'autofécondation, il y a donc 3/8 de chaque homodimère, pour 2/8 d'hétérodimère.

Les six homodimères correspondant aux six allèles d'un même gène, ont été numérotés de 1 à 6 par ordre de découverte chronologique.





**FREQUENCES I**  
 R 1 . 0, 29  
 R 2 . 0, 42  
 R 6 . 0, 03  
 R 3 . 0, 21  
 R 4 . 0, 05

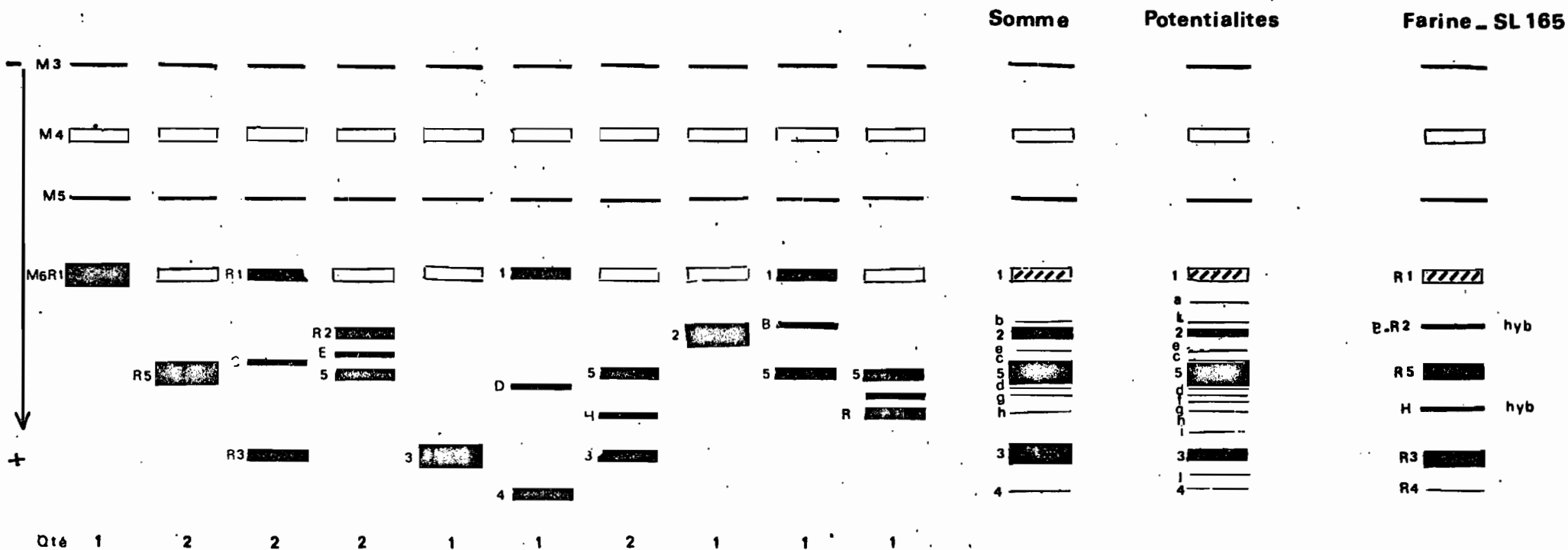
**FIGURE 4 - Zymogrammes Esterases des Autofecondations - Population C 25 -**



**FREQUENCES I**

R 1	=	0,09
R 5	=	0,65
R 3	=	0,26

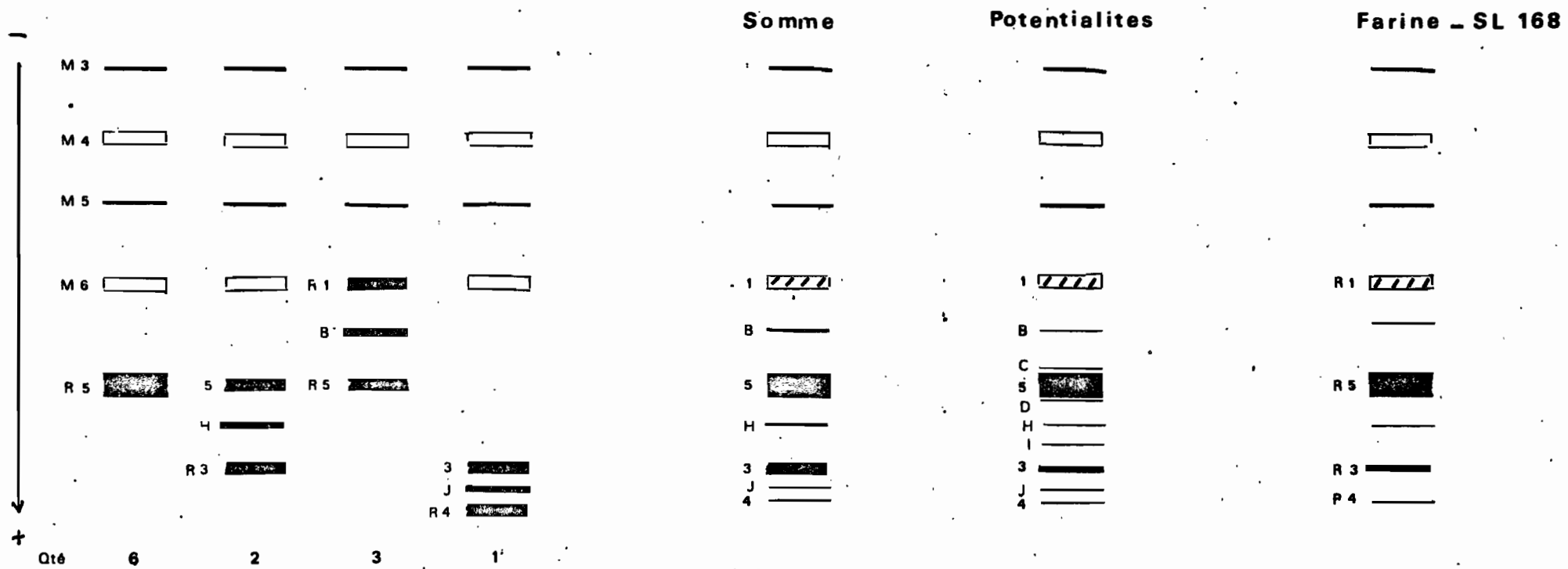
**FIGURE 5 - Zymogrammes. Esterases des Autofecondations - Population SL 164 -**



**FREQUENCES I**

R 1	.	0, 21
R 2	.	0, 14
R 5	.	0, 36
R 6	.	0, 04
R 3	.	0, 21
R 4	.	0, 04

**FIGURE 6 - Zymogrammes Esterases des Autofecondations - Population SL 165 -**



FREQUENCES I

R 1	.	0, 125
R 5	.	0, 708
R 3	.	0, 125
R 4	.	0, 041

FIGURE 7 : Zymogrammes Esterases des Autofecondations - Population SL 168 -



L'analyse des croisements à parent constant a été effectuée, les zymogrammes des farines de graines issues des croisements présentent les bandes homodimères parentales et les bandes hétérodimères issues du croisement, conformément à l'hypothèse génétique formulée (figure 8 - photo B). Par l'étude du zymogramme du descendant et de l'un des parents, on peut souvent trouver le génotype de l'autre parent.

c - Vérifications

Pour s'assurer du positionnement des bandes, pour ne pas confondre deux homodimères ayant une migration voisine, des mélanges d'extrait à volumes constants (et non quantités de protéines constantes) ont été analysés (photo C-D-E). Les résultats sont nets et sans équivoque, et cette analyse a été employée pour tester les autofécondations.

2°) Pour une meilleure lecture du polymorphisme enzymatique

Le zymogramme d'une farine de population en mélange comparée aux zymogrammes des farines de graines issues d'autofécondation, manque de netteté (photo F). Cinq allèles ont été trouvés, par analyse des autofécondations, pour la population C 25 qui figure sur la photo : 21 bandes correspondant aux homodimères et hétérodimères devraient apparaître. On en observe 6. Les bandes ayant une faible fréquence se trouvent masquées lors de la révélation: effet de dilution, et il peut y avoir superposition de bandes.

La visibilité de la diversité allélique au sein d'une population sur zymogramme de la population en mélange est nulle.

Chaque zymogramme de population en mélange a été passée au densitomètre (figure 9-10-11-12-13) et montre clairement le nombre de bandes observées. La superposition des courbes (figure 14) révèle que l'on ne peut pas déterminer avec précision la présence des allèles dans la population:

- la population SL 164 qui ne possède pas d'allèle R2 a une bande qui migre exactement à la même place que l'homodimère R2. Il s'agit de l'hétérodimère B entre R1 et R5.

- la population C 25 a une bande due à l'activité d'un hétérodimère qui migre au même endroit que l'homodimère R5.

Il devient difficile de caractériser les populations sur présence ou absence de bande, au seul regard des zymogrammes de population en mélange.

3°) Variabilité intra et intercultivar, étude statistique

Les fréquences alléliques pour chaque population sont établies à partir des résultats des autofécondations (figure 3-4-5-6-7). On a un fort polymorphisme enzymatique intrapopulation.

a - Equilibre de Hardy - Weinberg

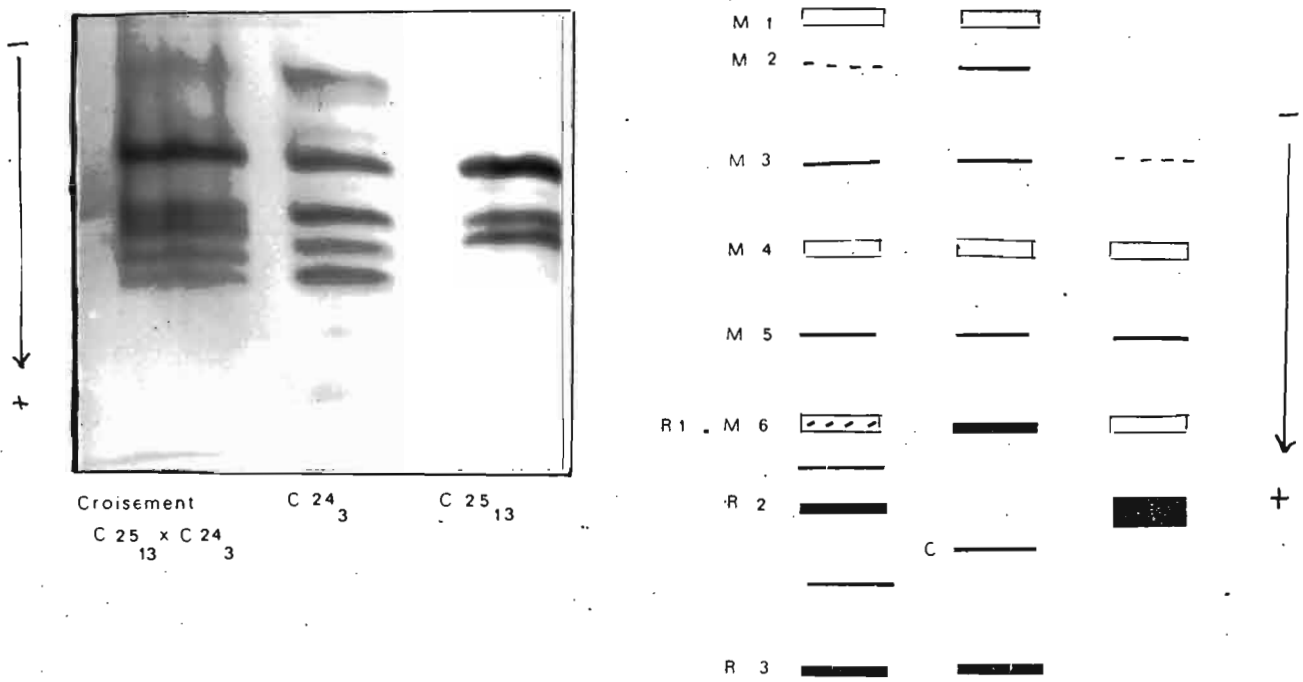


PHOTO B : ZYMOGRAMME D'UN CROISEMENT ENTRE DEUX INDIVIDUS DONT LES ZYMOGRAMMES DES AUTOFECONDATIONS SONT REPRESENTES ESTERASES

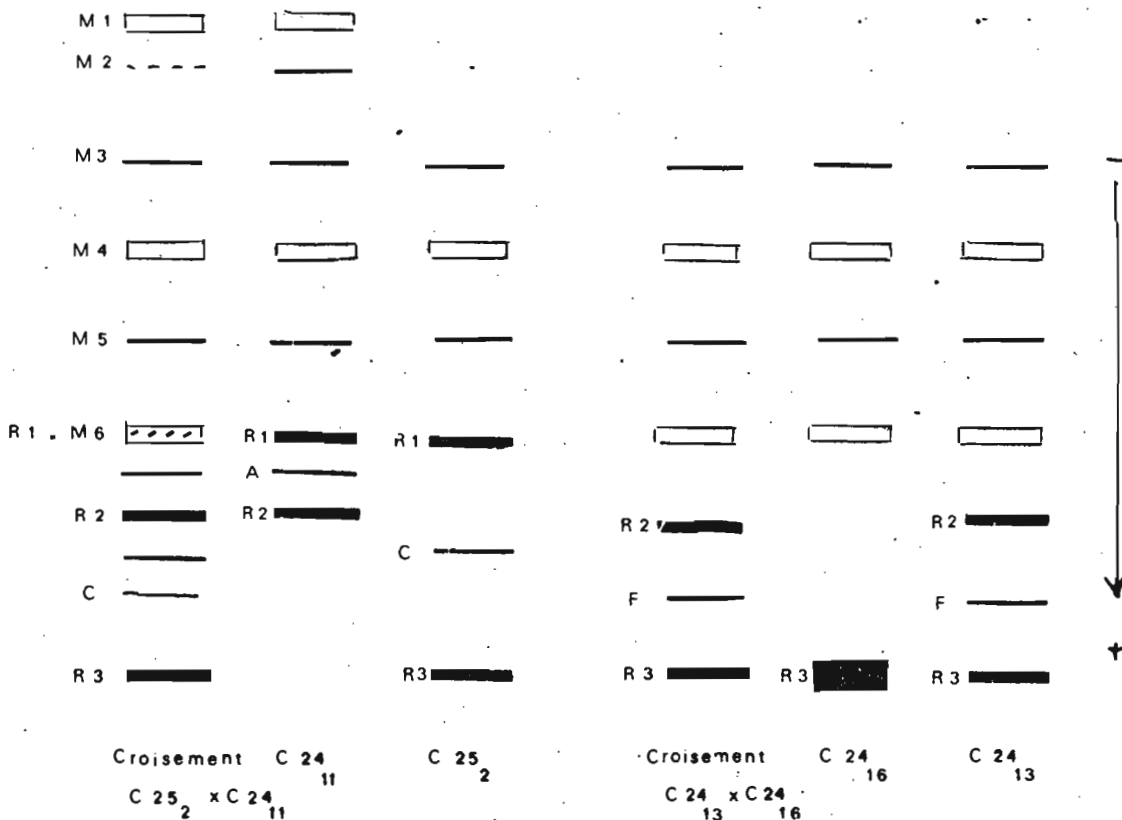
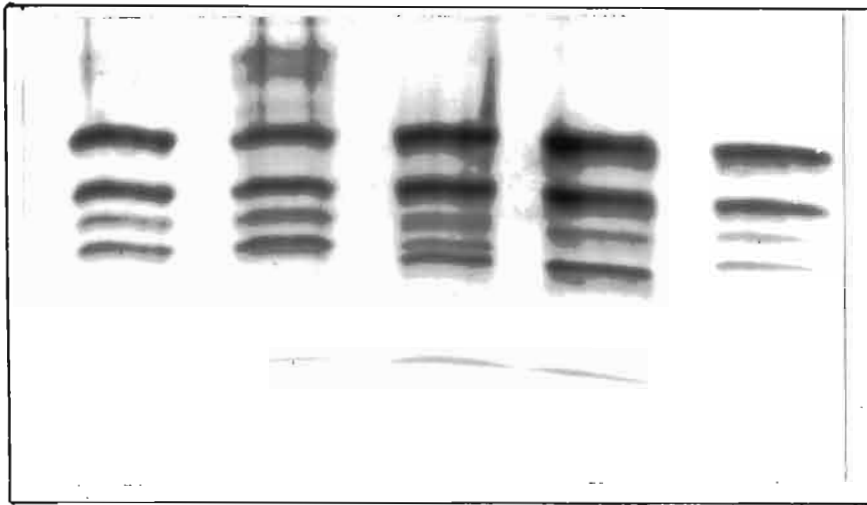
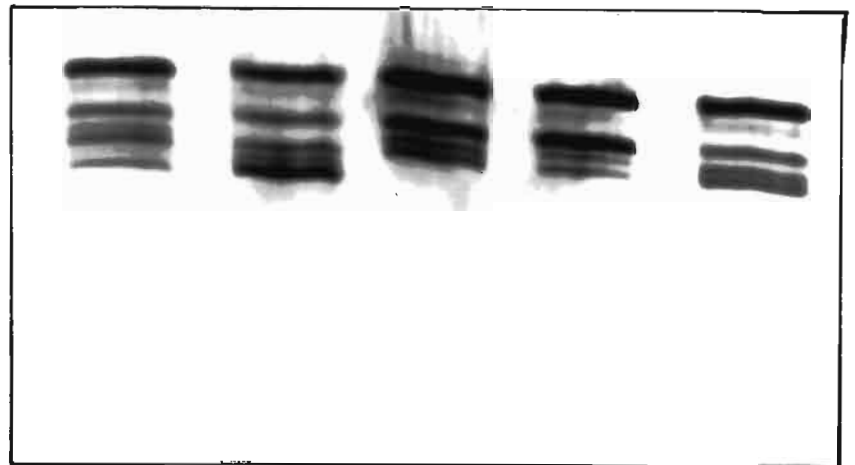


FIGURE 8 : ZYMOGRAMMES ESTERASES DE QUELQUES CROISEMENTS, ET DES AUTOFECONDATIONS PARENTALES



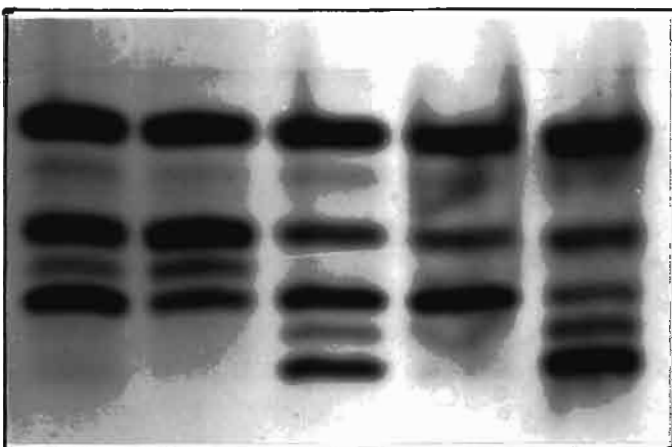
Mélange  $165_4 \times 24_3$  C  $24_3$  (R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub>) Mélange  $165_{10} \times 165_4$  SL  $165_{10}$  (R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub>) SL  $165_4$  (R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub>)

PHOTO C : ZYMOGRAMMES ESTERASES EN LARGE - VERIFICATIONS



Mélange  $165_{12} \times 165_{14}$  SL  $165_{12}$  (R<sub>5</sub>-R<sub>3</sub>) Mélange  $165_{14} \times 164_{20}$  SL  $164_{20}$  (R<sub>1</sub>-R<sub>5</sub>) SL  $165_{14}$  (R<sub>2</sub>-R<sub>5</sub>)

PHOTO D : ZYMOGRAMMES ESTERASE EN LARGE - VERIFICATIONS



Mélange  $165_{16} \times 164_{17}$  SL  $165_{16}$  (R<sub>1</sub>-R<sub>5</sub>) Mélange  $164_2 \times 164_{17}$  SL  $164_{17}$  (R<sub>5</sub>) SL  $164_2$  (R<sub>5</sub>-R<sub>3</sub>)

PHOTO E : ZYMOGRAMMES ESTERASES EN LONG - VERIFICATIONS



 Pics hétérodimères exclusivement

FREQUENCES - R1 - 0.305  
R2 - 0.361  
R5 - 0.055  
R3 - 0.166  
R4 - 0.111

ESTERASES

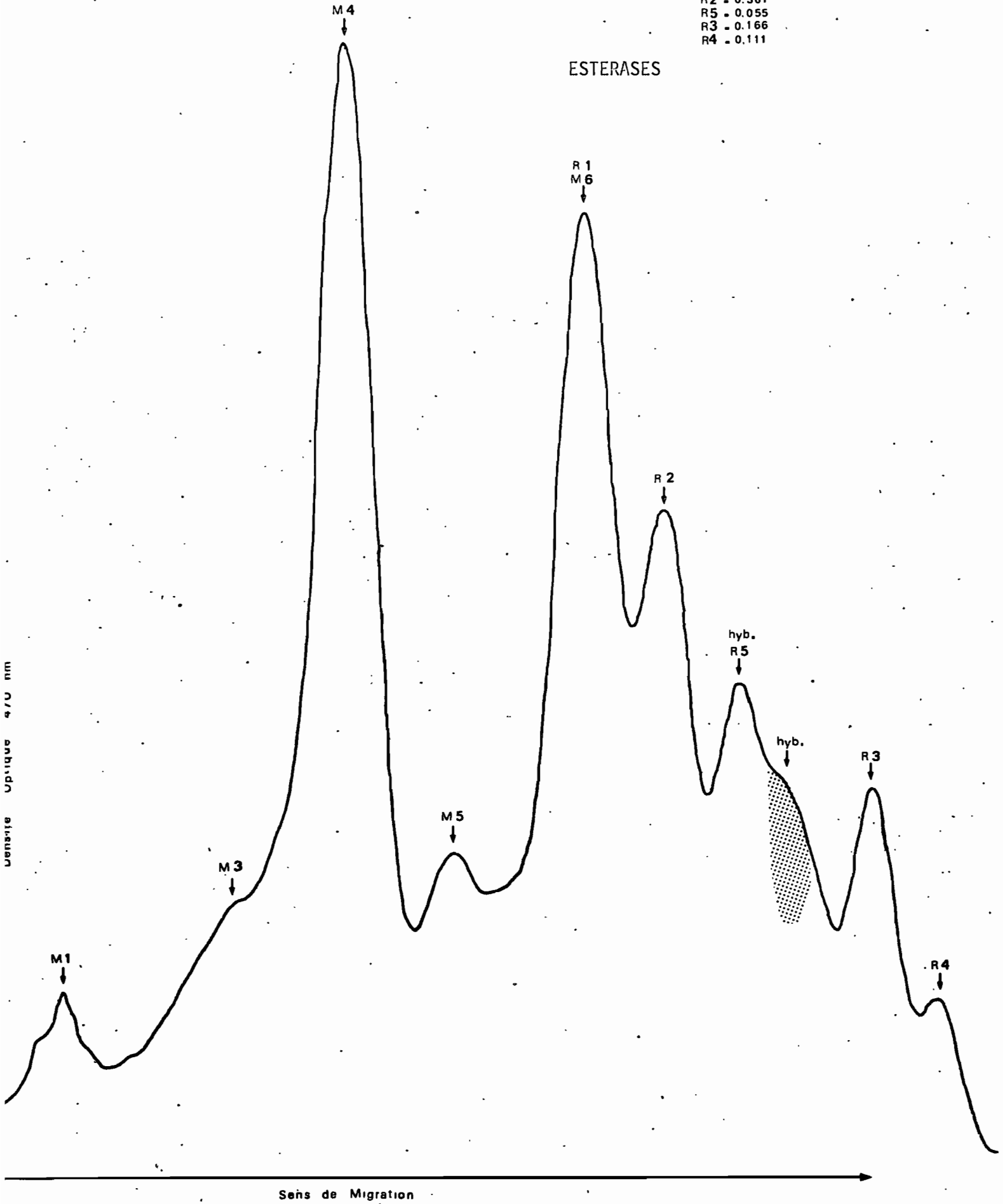


FIGURE 9 - Passage au densitomètre - Population C 24 Tardif -

FREQUENCES - R 1 - 0.29  
R 2 - 0.42  
R 6 - 0.03  
R 3 - 0.21  
R 4 - 0.05

ESTERASES

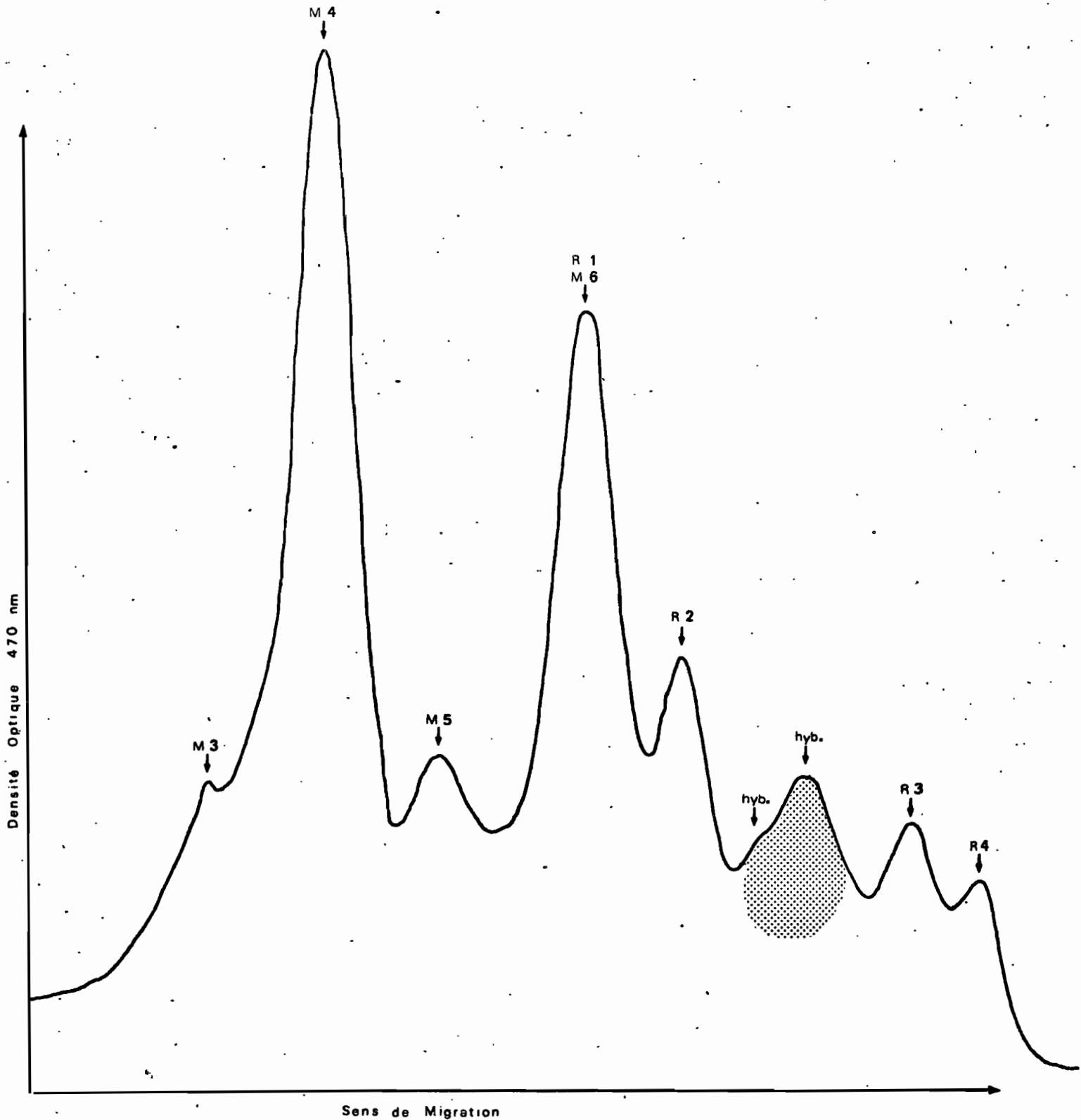


FIGURE 10 - Passage au densitomètre - Population C 25 Précoce -

FREQUENCES - R 1 - 0.09  
R 5 - 0.65  
R 3 - 0.26

ESTERASES

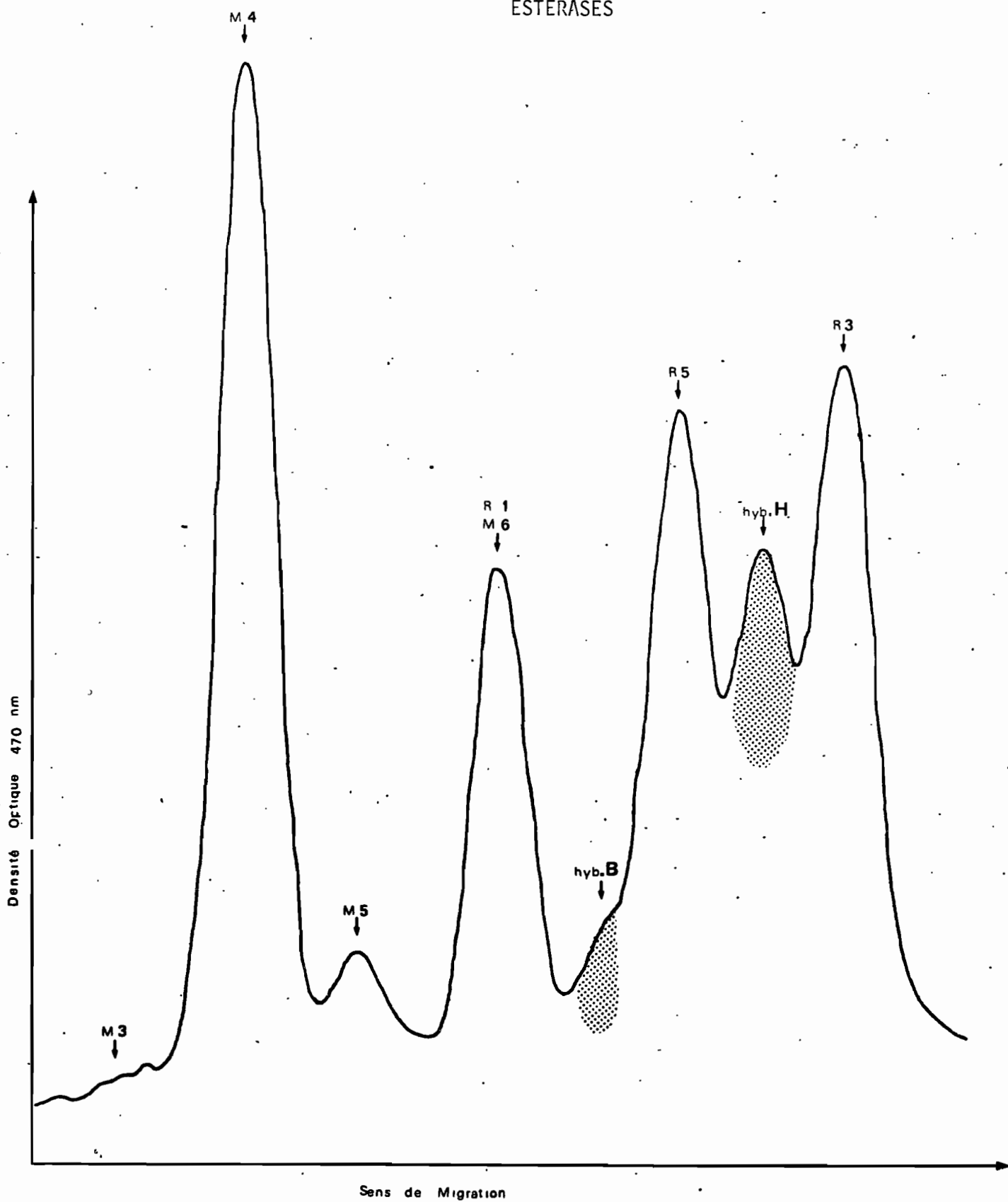


FIGURE 11 - Passage au densitomètre - Population SL 164 Tardif -

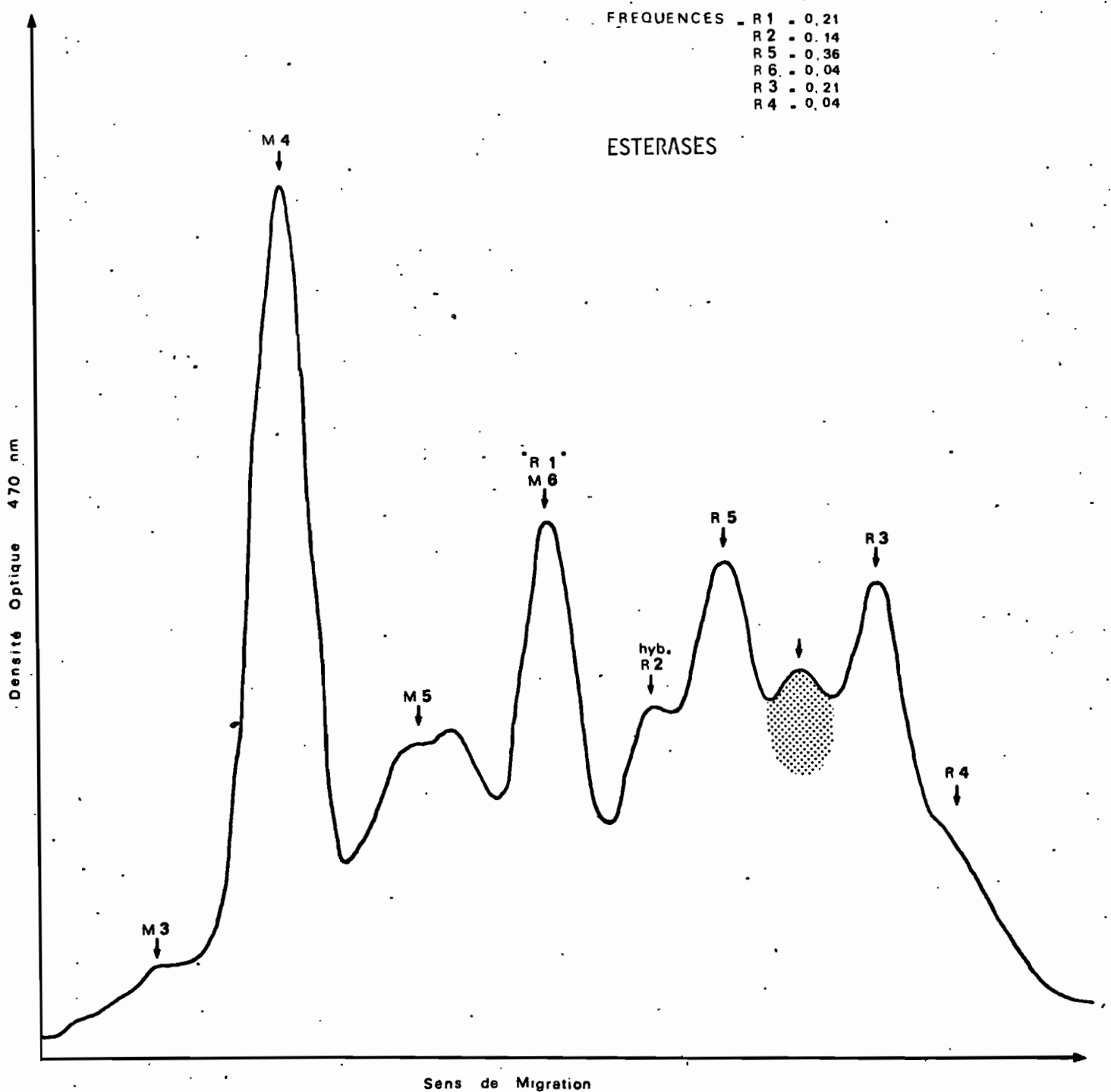


FIGURE 12 - Passage au densitométré - Population SL 165 Précoce -



FREQUENCES - R 1 . 0 . 125  
R 5 . 0 . 708  
R 3 . 0 . 125  
R 4 . 0 . 041

ESTERASES

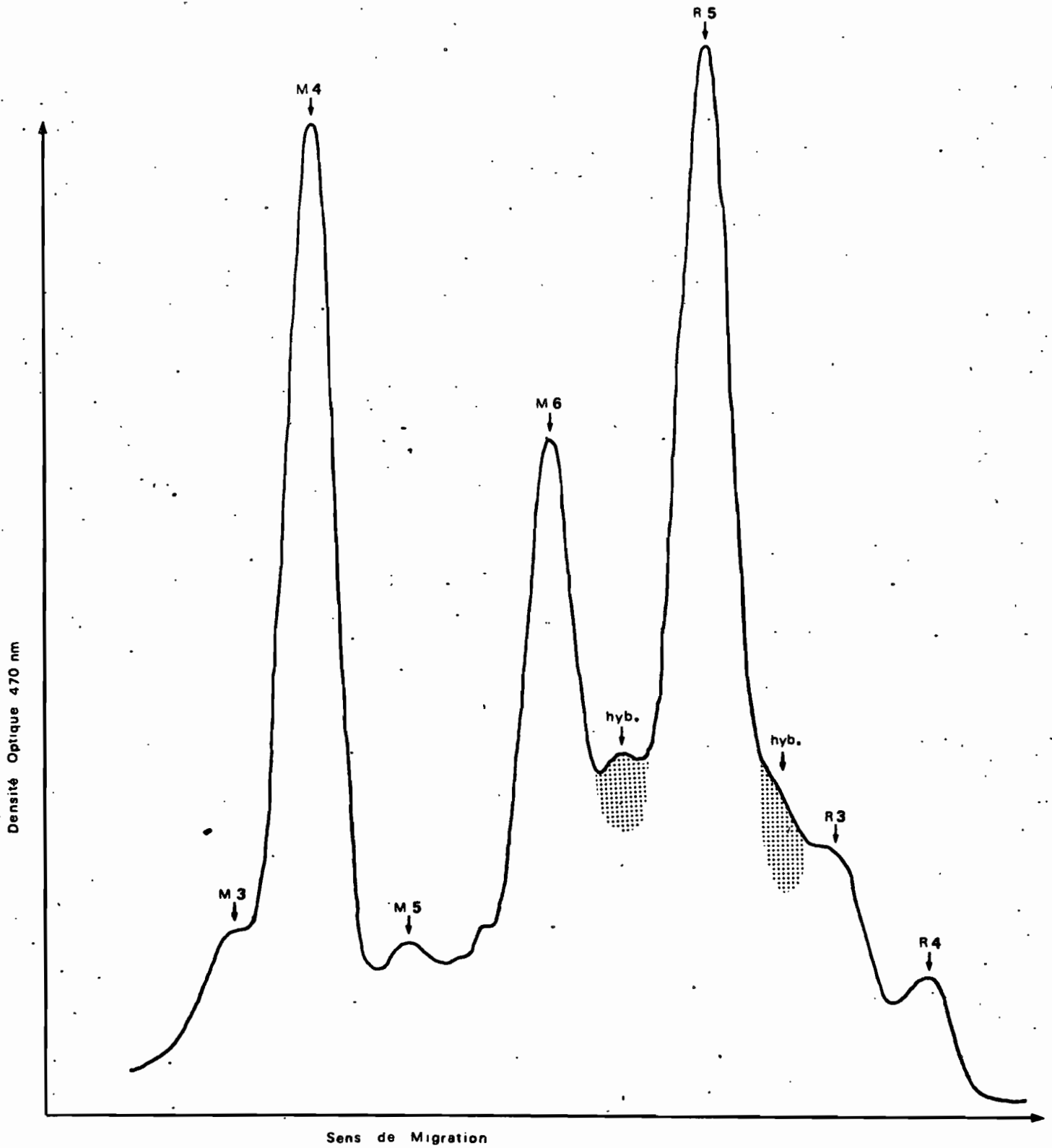
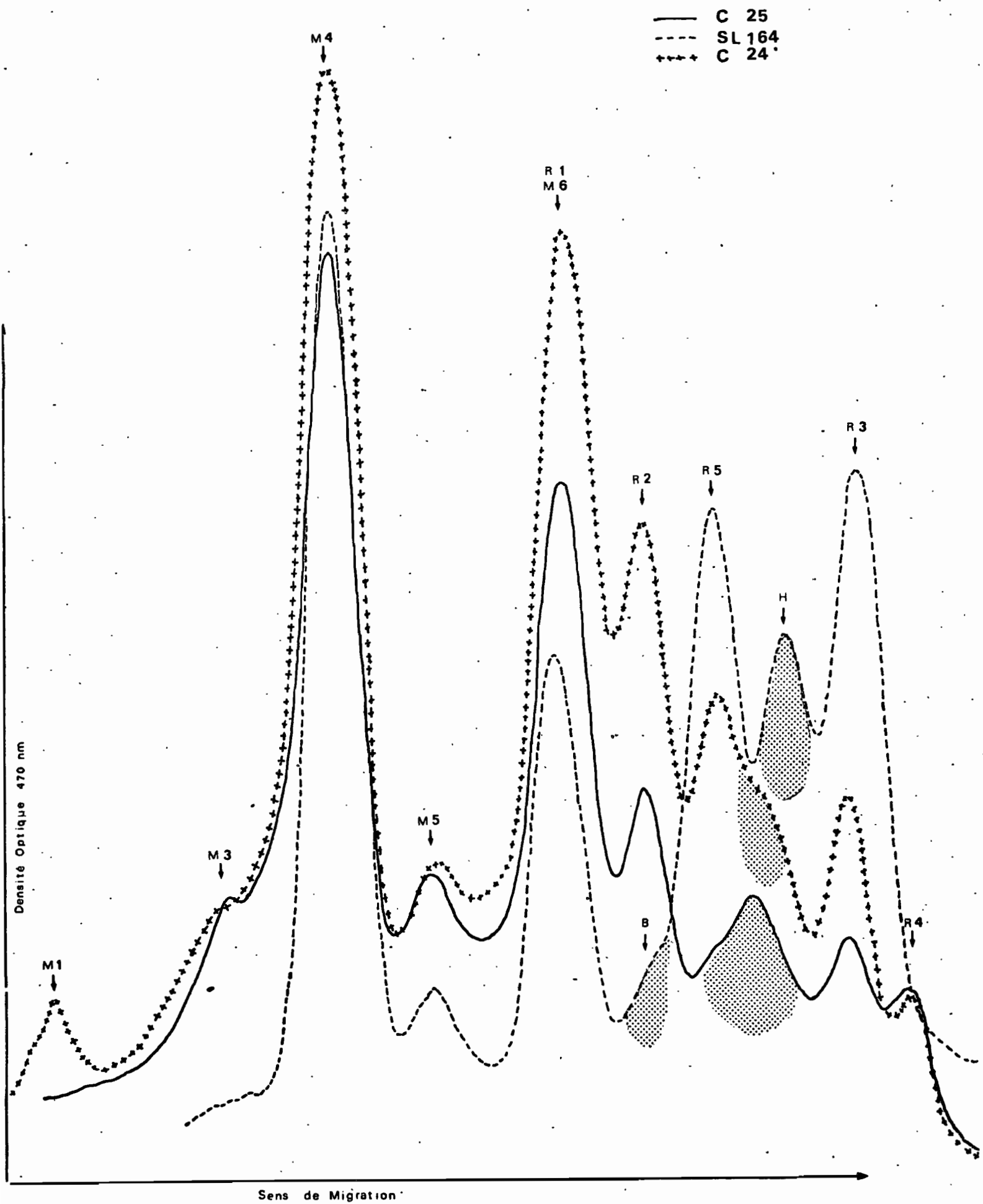


FIGURE 13 - Passage au densitometre - Population SL 168 Sauvage -



**FIGURE 14** : SUPERPOSITION DES COURBES DENSITOMETRIQUES DE ZYMOGRAMMES DE POPULATION EN MELANGE.

Les écarts à l'équilibre de Hardy - Weinberg sont testés par  $\chi^2$  11. au risque de 5% (tableau VII). Aucune différence significative n'a été mise en évidence. On peut estimer que les populations évoluent en panmixie.

#### b - Caractérisation des populations

Il semble difficile de caractériser les populations par présence ou absence de bande ou d'allèle. Les allèles sont tous plus ou moins présents dans les cinq populations étudiées, mais une caractérisation des populations par leurs fréquences alléliques semble possible.

Une relation entre fréquence allélique et intensité des bandes sur zymogramme de population en mélange semble exister. Le passage au densitomètre de ces différents zymogrammes en est le reflet (figure 9-10-11-12-13). La hauteur des pics caractérise l'intensité des bandes, bien que l'on ne puisse leur attribuer aucune valeur quantitative. Généralement, les pics les plus importants pour chaque population correspondent aux allèles ayant la plus haute fréquence. On peut remarquer que l'allure générale des courbes des populations sénégalaises est semblable, de même pour les populations camerounaises. Les populations sénégalaises et camerounaises semblent avoir des intensités de bande et des fréquences alléliques différentes.

La caractérisation des populations par leurs fréquences alléliques semble intéressante, représentative de la population, et facilement réalisable.

#### c - Variabilité interpopulation

On peut constater en effet que les populations sénégalaises ont une forte fréquence d'allèle R5, et une faible fréquence d'allèle R2, les populations camerounaises présentant une faible fréquence d'allèle R5, et une forte fréquence d'allèle R2 (tableau VIII).

+  $\chi^2$  de conformité : des tests de  $\chi^2$  de conformité ont été faits pour analyser les ressemblances entre populations, par comptage allélique (tableau IX), sous l'hypothèse nulle  $H_0$  : "la répartition des différents allèles est semblable pour les populations testées". Ils permettent de répondre à un certain nombre de questions, à savoir :

- les populations sont bien différentes, et cette différence n'est pas due uniquement à la population sauvage.
- Il existe une liaison pays: les populations camerounaises et sénégalaises semblent former deux groupes distincts.
- la population sauvage semble bien intégrée aux populations cultivées, plus que les populations cultivées sénégalaises entre elles.

Il se peut qu'il y ait des échanges géniques constants entre la population sauvage et les populations cultivées, à moins que l'on ne formule l'hypothèse d'une adaptation (mutations non neutres) à un écosystème donné. Des recherches plus approfondies et portant sur un plus grand nombre d'échantillons et de populations sont nécessaires pour vérifier les hypothèses.

Génotypes Populations		R1R1	R2R2	R5R5	R6R6	R3R3	R4R4	R1R2	R1R5	R1R6	R1R3	R1R4	R2R5	R2R6	R2R3	R2R4	R5R6	R5R3	R5R4	R6R3	R6R4	R3R4	$\chi^2$
		SL 168	Nbre Obs.	-	-	6	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
	Nbre Théo.	0.24	-	6	-	0.24	0.02	-	2.16	-	0.36	0.12	-	-	-	-	-	2.16	0.72	-	-	0.12	NS
SL 164	Nbre Obs.	-	-	6	-	1	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	4 dd1 1.94
	Nbre Théo.	0.17	-	7.14	-	1.19	-	-	2.04	-	0.85	-	-	-	-	-	-	5.78	-	-	-	-	NS
SL 165	Nbre Obs.	1	1	2	-	1	-	-	1	-	2	1	2	-	-	-	1	2	-	-	-	-	19 dd1 9.79
	Nbre Théo.	0.56	0.28	1.82	0.02	0.56	0.02	0.84	2.10	0.28	1.26	0.28	1.40	0.14	0.84	0.14	0.42	2.10	0.42	0.28	0.04	0.28	NS
C 24	Nbre Obs.	3	5	-	-	1	-	1	-	-	2	2	-	-	1	1	-	1	1	-	-	-	13 dd1 14.88
	Nbre Théo.	1.3	2.34	0.06	-	0.54	0.18	3.96	0.72	-	1.98	1.26	0.72	-	2.16	1.44	-	0.36	0.18	-	-	0.72	NS
C 25	Nbre Obs.	2	6	-	-	1	-	2	-	-	4	1	-	-	1	1	-	-	-	1	-	-	13 dd1 11.93
	Nbre Théo.	1.52	3.42	-	0.02	0.76	0.05	4.56	-	0.38	2.23	0.57	-	0.57	3.42	0.76	-	-	-	0.19	0.06	0.38	NS

TABLEAU VII : TEST  $\chi^2$  Sous  $H_0$  : " les populations sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg"

Seuil de signification : 5%

ESTERASES

NS : différence non significative

ALLELES POPULATIONS	R1	R2	R5	R6	R3	R4
SL 164	0.09	-	0.65	-	0.26	-
SL 165	0.21	0.14	0.36	0.04	0.21	0.04
SL 168	0.125	-	0.708	-	0.125	0.041
C 24	0.305	0.361	0.055	-	0.166	0.111
C 25	0.29	0.42	-	0.03	0.21	0.05

TABLEAU VIII : FREQUENCES ALLELIQUES POUR LES ESTERASES

RESSEMBLANCE INTERPOPULATION ENTRE	POPULATIONS TESTEES	NOMBRE DDL	$\chi^2$	SIGNIFICA- -TION
TOTALE	SL 168 SL 164 SL 165 C 24 C 25	20	86.133	***
CULTIVES	SL 164 SL 165 C 24 C 25	15	66.05	***
SENEGALAIS	SL 164 SL 165 SL 168	10	18.17	NS
CAMEROUNAIS	C 24 C 25	5	4.24	NS
CULTIVES SENEGALAIS	SL 164 SL 165	5	11.63	*
CULTIVE PRECOCE SL - SAUVAGE	SL 165 SL 168	5	8.56	NS
CULTIVE TARDIF SL - SAUVAGE	SL 164 SL 168	5	3.04	NS
TARDIFS	C 24 SL 164	5	40.57	***
PRECOCES	C 25 SL 165	5	18.19	**

NS: non significatif  
 \*: significatif à 5%  
 \*\*: significatif à 1%  
 \*\*\*: significatif à 0.1%

TABLEAU IX :  $\chi^2$  DE CONFORMITE POUR LES ESTERASES.

Ho : "les populations testées sont identiques, seuil de signification 5%

- aucune relation précocité-tardivité mise en évidence, 12.  
pas de liaison entre le polymorphisme enzymatique des EST. et la longueur du cycle de la plante.

+ Analyse des correspondances : Les 80 autofécondations étudiées sont notées, pour chaque bande rose ou brune, par 0 (absence de bande) ou 1 (présence de bande), et ces données sont traitées par ordinateur pour une analyse des correspondances. Le diagramme (figure 15) représente les 2 premiers axes, ils donnent le maximum de renseignements, chaque point représente un individu, chaque croix représente la population par calcul de son barycentre.

Là encore, une dissociation Sénégal - Cameroun est observable. On peut également observer que les individus de la population SL 164 et ceux de SL 168 restent bien regroupés, les individus appartenant à la population SL 165 étant plus dispersés.

Les barycentres situent la population sauvage SL 168 entre SL 164 et SL 165, ce qui est en accord avec les résultats des  $\chi^2$  de conformité étudiés précédemment.

Les individus du Cameroun, précoces et tardifs, suivent une même diversité, excepté pour les huit individus de C 24 comprenant les deux bandes brunes M1 et M2. Ces individus font dévier le barycentre de la population vers la droite.

+ Dendrogramme : Le même tableau de données a été traité sur ordinateur pour une analyse hiérarchique par distance de  $\chi^2$ . Le dendrogramme fourni (figure 16) montre une disjonction précoce entre individus comprenant les 2 bandes brunes (M1-M2) et ceux possédant l'allèle R4 d'une part, et le reste d'autre part.

Aucune disjonction Sénégal - Cameroun n'est mise en évidence, cela peut être dû au mode d'introduction des données. Les individus homozygotes, plus nombreux, ont plus de poids, et se retrouvent regroupés.

Il faudrait pouvoir traiter le programme par une analyse des fréquences.

### III - CONCLUSION

L'étude sur farine des graines issues d'autofécondation nous a permis de mettre en évidence un fort polymorphisme enzymatique intracultivar pour les EST. et les LAP, et nous a permis de dresser une étude génétique.

Les hypothèses quant à la génétique des LAP restent à vérifier. Pour les EST., on doit rechercher d'autres formes alléliques pour la coloration rose, en analysant un grand nombre de populations, venant de plusieurs écosystèmes différents.

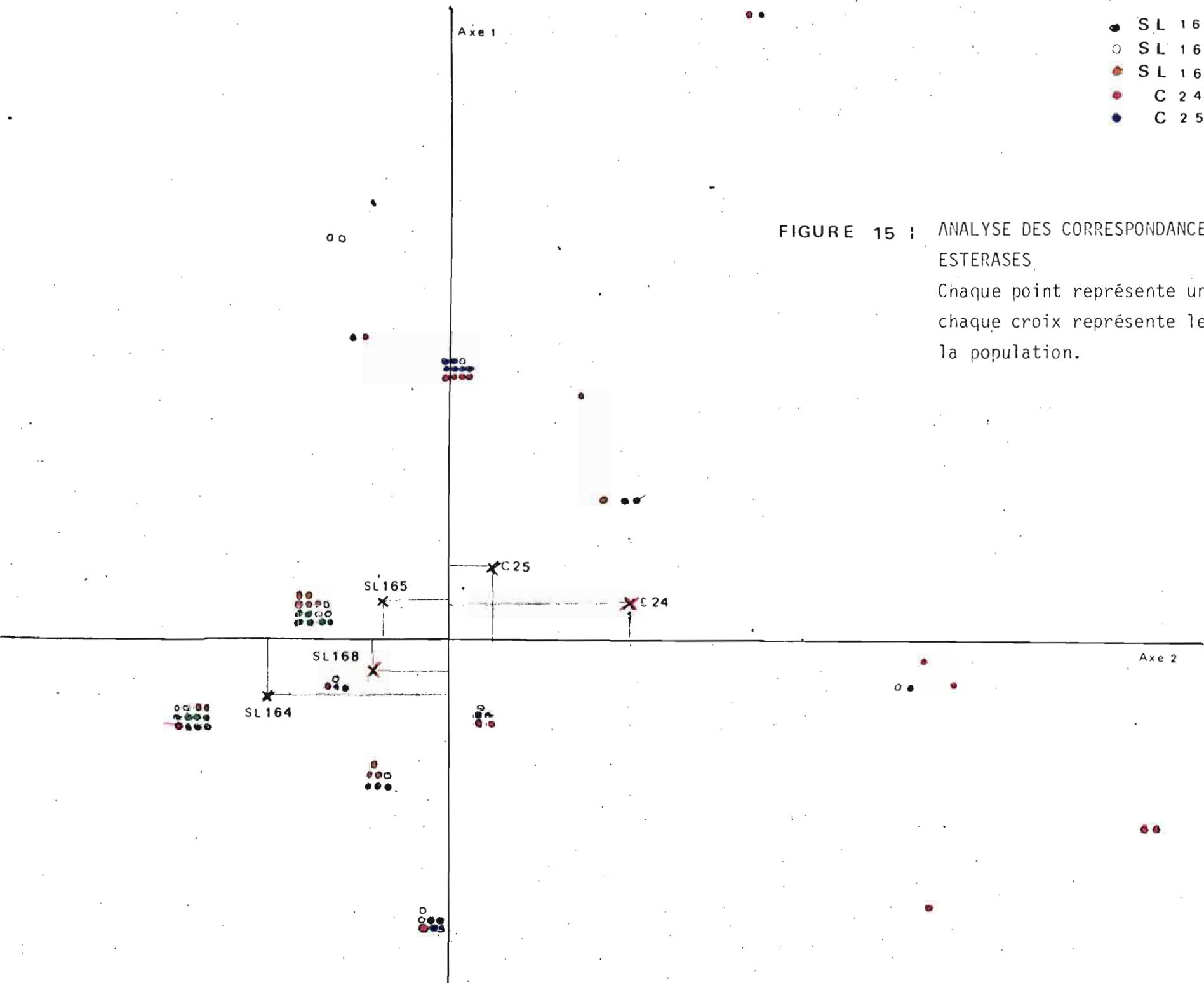
Cette étude a également permis de constater qu'une caractérisation des populations par leurs fréquences alléliques semblait être une solution d'avenir. L'analyse des farines de population en mélange est délicate à utiliser, elle ne permet pas de formuler une bonne analyse de la variabilité allélique au sein des populations.

L'analyse des farines de graines issues d'autofécondation semble par contre être un bon outil de travail pour l'étude de la variabilité, mais, pour des raisons matérielles, vingt autofécondations par population semble un nombre limite de plantes

- SL 164
- SL 165
- SL 168
- C 24
- C 25

FIGURE 15 : ANALYSE DES CORRESPONDANCES ESTERASES

Chaque point représente un individu, chaque croix représente le barycentre de la population.



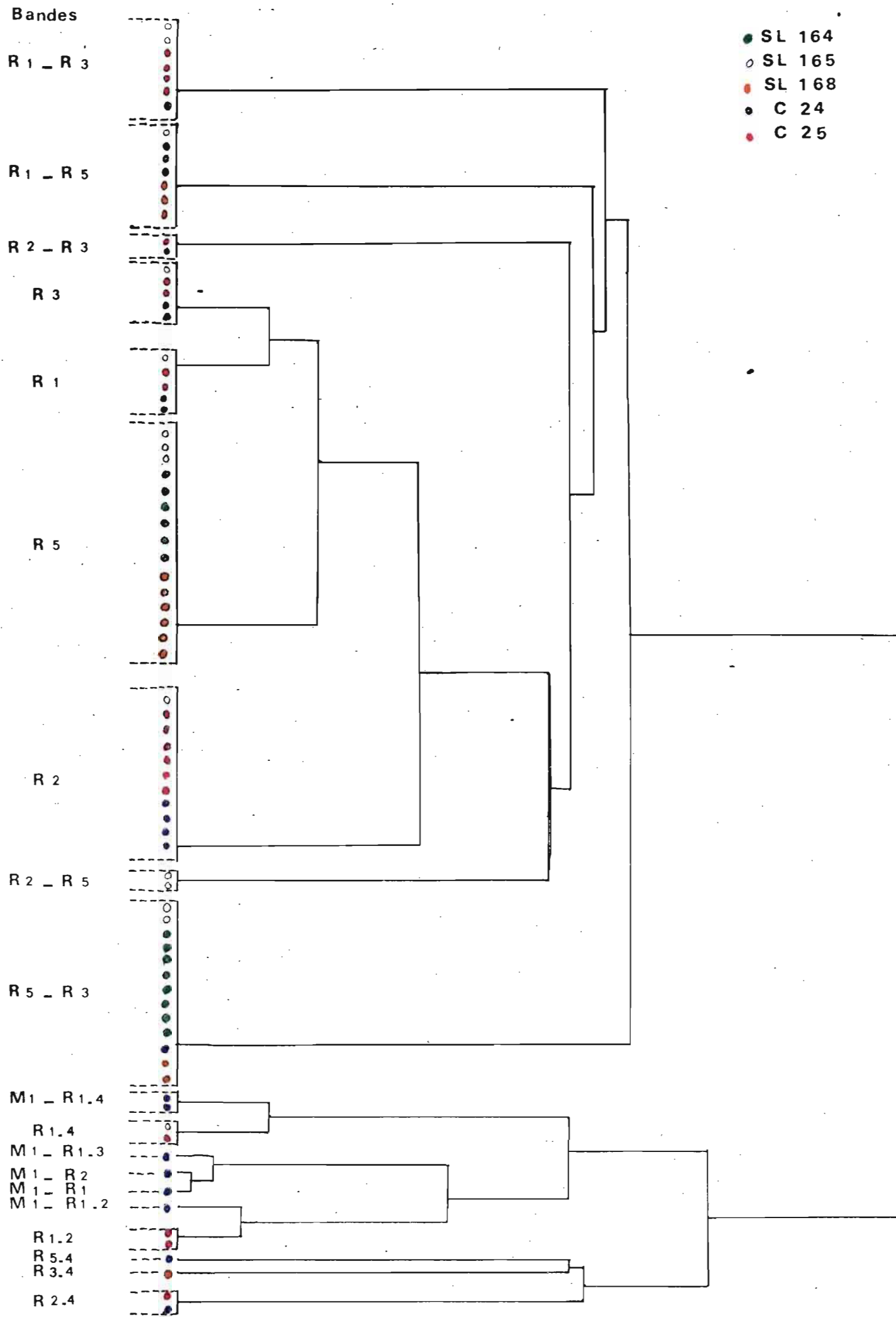


FIGURE 16 | DENDROGRAMME - Hiérarchie par distance de  $\chi^2$   
 Chaque point = un individu, chaque couleur = une population



à utiliser. De plus, l'analyse devant porter sur un grand nombre de populations, le travail deviendra vite lourd et fastidieux.

13.

Une étude graine à graine semble une solution d'avenir, permettant à la fois l'analyse rapide d'un grand nombre d'individus par population, et d'un grand nombre de cultivars différents. L'estimation des fréquences alléliques pour chaque population n'en serait que meilleure.

On a pu mettre en évidence des ressemblances entre les populations Camerounaises d'une part et sénégalaises d'autre part, pour le polymorphisme enzymatique des Estérases. On peut se demander si la différence entre les populations Sénégalaises et Camerounaises est alléatoire ou non, et formuler deux hypothèses :

- un brassage génétique, les échanges géniques entre populations tardives et précoces étant possible occasionnellement. Le flux génétique n'irait pas d'une population à l'autre lorsque celles ci sont trop lointaines.

- une adaptation, chaque population s'adaptant à son écosystème. A chaque écosystème correspondraient des fréquences alléliques différentes.

Il faut tester ces hypothèses par une étude plus approfondie, et portant sur un grand nombre de cultivars appartenant à des écosystèmes différents.

## BIBLIOGRAPHIE

=====

- BECKMAN L., SCANDALIOS J.G., and BREWBAKER J.L. (1964 b) : Genetics of LAP isozymes in maize.  
- Genetics 50 : 899 - 904
- DAVIS Baruch J. (1964) : Disc electrophoresis - II Method and application to human serum proteins.  
- Annals New-York Academy of Sciences 121 : 404 - 427
- MACKO V., HONOLD G.R., and STAHMANN M.A. (1967) : Soluble proteins and multiple enzyme forms in early growth of wheat.  
- Phytochemistry Vol 6 : 465 - 471
- MARKERT C.L., and MOLLER F. (1959) : Multiple forms of enzymes : Tissue, ontogenic and species specific patterns.  
- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 45 : 753 - 763
- OTT L., and SCANDALIOS J.G. (1978) : Genetic control and linkage relationship among aminopeptidases in maize.  
- Genetics Vol 89 nbre 1
- PERNES J. (1975) : Le matériel végétal de départ. Structure des populations naturelles Techniques de prospection. Observation du matériel récolté.  
- Agronomie Tropicale XXX - 3 : 205 - 217
- SCANDALIOS J.G. (1964) : Tissue - specific isoenzyme variations in maize  
- Journal heredity Vol. 55.6 : 281 - 285
- SCANDALIOS J.G. (1965 a) : LAP isoenzymes in maize development  
- Journal heredity 56 : 177 - 180
- SCHWARTZ D. (1964) : Genetic studies on mutant enzymes in maize IV : comparison of pH 7,5 esterases synthesized in seedling and endosperm.  
- Genetics 49 : 373 - 377
- SHANNON L.M. (1968) : Plant isoenzymes. s  
- Annual rev. Plant. Physio. Vol 19 : 187 - 210
- SHAW - PRASAD (1970) : Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes.  
- Biochem. Genet. 4 : 297 - 320