

D.E.A. D'AMÉLIORATION DES PLANTES – 1979

ETUDE DU POLYMORPHISME ENZYMATIQUE
CHEZ LE MIL (*PENNISETUM AMERICANUM S. SP. AMERICANUM*)

Rapport de stage

N'DRI COULIBALY

ORSTOM :
Biologie et Amélioration
des Plantes utiles

R A P P O R T D E S T A G E

ETUDE DU POLYMORPHISME ENZYMATIQUE CHEZ LE MIL

(PENNISETUM AMERICANUM S:SP AMERICANUM)

TABLE DES MATIERES

	PAGES
A. <u>INTRODUCTION</u>	1
B. <u>LE MATERIEL VEGETAL</u>	2
C. <u>LE SYSTEME ENZYMATIQUE ETUDIE</u>	8
I. <u>MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE</u>	8
II. <u>METHODOLOGIE</u>	8
III. <u>RESULTATS</u>	12
1. DESCRIPTION DES ZYMOGRAMMES	12
2. LES DEUX NIVEAUX DE VARIABILITE	14
2.1. Variabilité intra-échantillon	14
2.2. Variabilité inter-échantillon	14
3. APPORT DU VIOLACEUM	33
IV. <u>DISCUSSION - CONCLUSION</u>	34

BIBLIOGRAPHIE

A. INTRODUCTION

Le recours à la mutagénèse, aux formes sauvages apparentées aux espèces cultivées, les nombreuses prospections dans les centres d'origine et de diversification des végétaux, répondent au souci de disposer à tout moment d'un matériel végétal génétiquement diversifié ; en effet, c'est de cette variabilité que dépend le niveau du progrès réalisé en fin de cycle de sélection ; aussi, est-il indispensable d'en évaluer l'ampleur, au moins en début de programme. Généralement, cette diversité est estimée par la mesure des variations phénotypiques entre individus, dont une part revient à l'environnement ; du fait de l'interférence des facteurs du milieu, il n'existe pas de relation bijective entre le génotype et le phénotype. Une méthode biochimique, l'électrophorèse, permet d'aborder le problème de la variabilité génétique avec une précision meilleure que les procédés classiques.

Les méthodes électrophorétiques exploitent la propriété qu'ont les particules de migrer différemment suivant leur charge électrique, lorsqu'on les place dans un champ électrique ; en les appliquant aux protéines, elles permettent de dévoiler aisément, moyennant certaines précautions, la diversité des systèmes géniques ; en effet, chaque protéine est caractérisée par sa charge électrique qui dépend de son contenu en acides aminés ; ce contenu est révélateur d'un certain fragment d'A.D.N. ; réciproquement, toute modification affectant le gène est traduite dans la protéine, et si elle conduit à une variation significative de la charge électrique peut être détectée par l'analyse électrophorétique (on estime à au moins 25%, le pourcentage de mutations ponctuelles pouvant être ainsi révélées). La conséquence immédiate est la possibilité de construire des distances génétiques (PERNES, 1975) et non des distances phénotypiques entre individus ; de plus, on peut étudier simultanément la variabilité au niveau de plusieurs loci (LEWONTIN, 1974) ; un autre avantage est que l'effet d'une substitution allélique sur la mobilité électrique de la protéine ne dépend pas de l'environnement (LEWONTIN, 1974).

Dans le cas des enzymes, l'électrophorèse permet de mettre en évidence différentes formes moléculaires ayant la même spécificité enzymatique ; ces formes ont été désignées par le terme d'"isozymes" par MARKERT et MOLLER (1959). Nous nous proposons d'étudier la variabilité de celles des estérases des grains de mil ; mais, auparavant, il nous semble important d'évoquer quelques caractéristiques des échantillons et du système enzymatique analysés.

B. LE MATERIEL VEGETAL

Le mil, *Pennisetum americanum s.sp americanum*, est une céréale cultivée pour les besoins de l'alimentation humaine dans les parties sèches de l'Afrique Tropicale, de l'Inde, et du Pakistan ; cette graminée, allogame, diploïde ($2n = 14$) et du type métabolique C_4 côtoie dans la même espèce, des sous-espèces sauvages, dont *P. mollissimum*, *P. violaceum* (classification de BRUNKEN, 1977) avec lesquelles, elle se croise facilement ; les hybrides spontanés, appelés N'DOULS ou SHIBRAS apparaissent fréquemment dans les cultures. Les graines ont de bonnes qualités de conservation au froid, comme en témoigne l'état de celles récoltées en décembre 1974 dans le nord de la Côte d'Ivoire par deux chercheurs de l'O.R.S.T.O.M., HUTTEL et RENE J., ; la zone prospectée (carte n° 1 et 2) s'étend entre les Isohyètes 900 et 1600 mm et est occupée par trois ethnies différentes : les MALINKE à l'ouest, les SENOUFO au centre, et les LOBI à l'est. Les observations faites sur le terrain et au laboratoire peuvent se résumer en ces points :

- les champs MALINKE sont très espacés alors qu'ils sont très regroupés chez les SENOUFO (si bien que les prélèvements y ont été espacés de 5 km) ; on note une situation intermédiaire chez les LOBI

- Pour le choix des semences, prélevées sur leur récolte, les MALINKE ne sélectionnent que les gros grains (par tamisage) des plus gros épis ; en général SENOUFO et LOBI ne pratiquent pas de sélection.

- Certains faux épis (marqués en hachurés sur les histogrammes) présentent des aspects de la sous-espèce sauvage *P. violaceum* : chandelle courte, légère, de couleur violette, à grains peu serrés.

- Les caractéristiques de l'épi (longueur, diamètre, poids) tendent à distinguer les mils MALINKE des SENOUFO et des LOBI, chez lesquels on note une plus grande amplitude de variation des caractères mesurés (fig. 3 et 4) ; toutefois les mils MALINKE ont des caractères intéressants : grains souvent assez serrés, poids des chandelles souvent supérieur à la moyenne des autres régions.

41 42 43
39 38 37 36 35 34 33 32 31 30 29 28 27 26 25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1



SECTION *PENNISETUM*

ESPECES : *PENNISETUM PURPUREUM* SCHUMACH

tétraploïde (2n = 28) ; perenne

PENNISETUM AMERICANUM (L.) LEEKE

diploïde (2n = 14)
annuelle

SOUS-ESPECES

s. sp AMERICANUM

cultivé

P. typhoides
P. Nigritarum

etc. ...

s. sp MONODII

parent sauvage
du mil cultivé

P. Violaceum Lam.
P. Mollissimum Hochst

etc. ...

s. sp STENOSTACHYUM

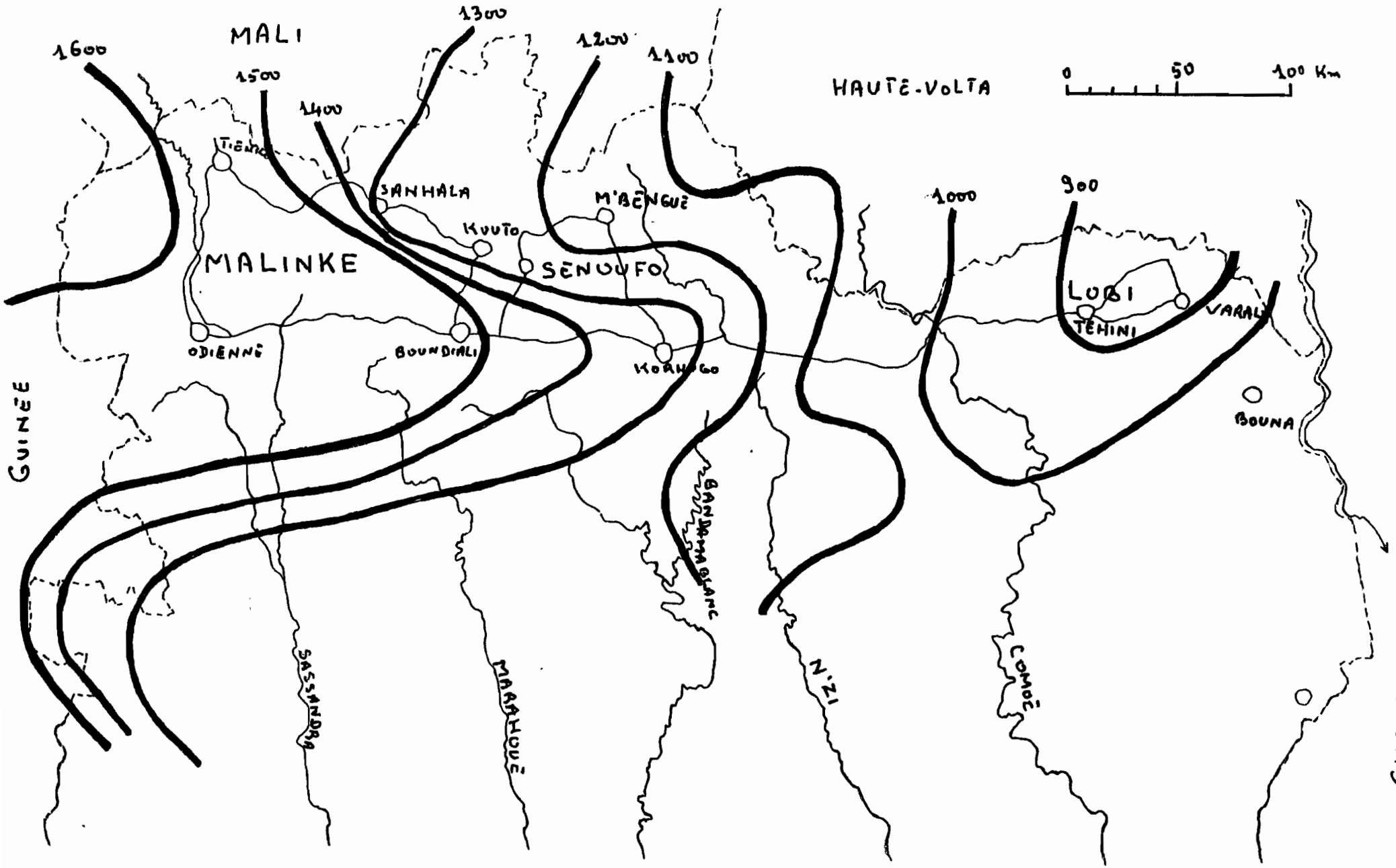
morphologiquement
intermédiaire entre
s. sp americanum et
s. sp monodii

Shibras

CLASSIFICATION DES *PENNISETUM* (BRUNKEN 1977)

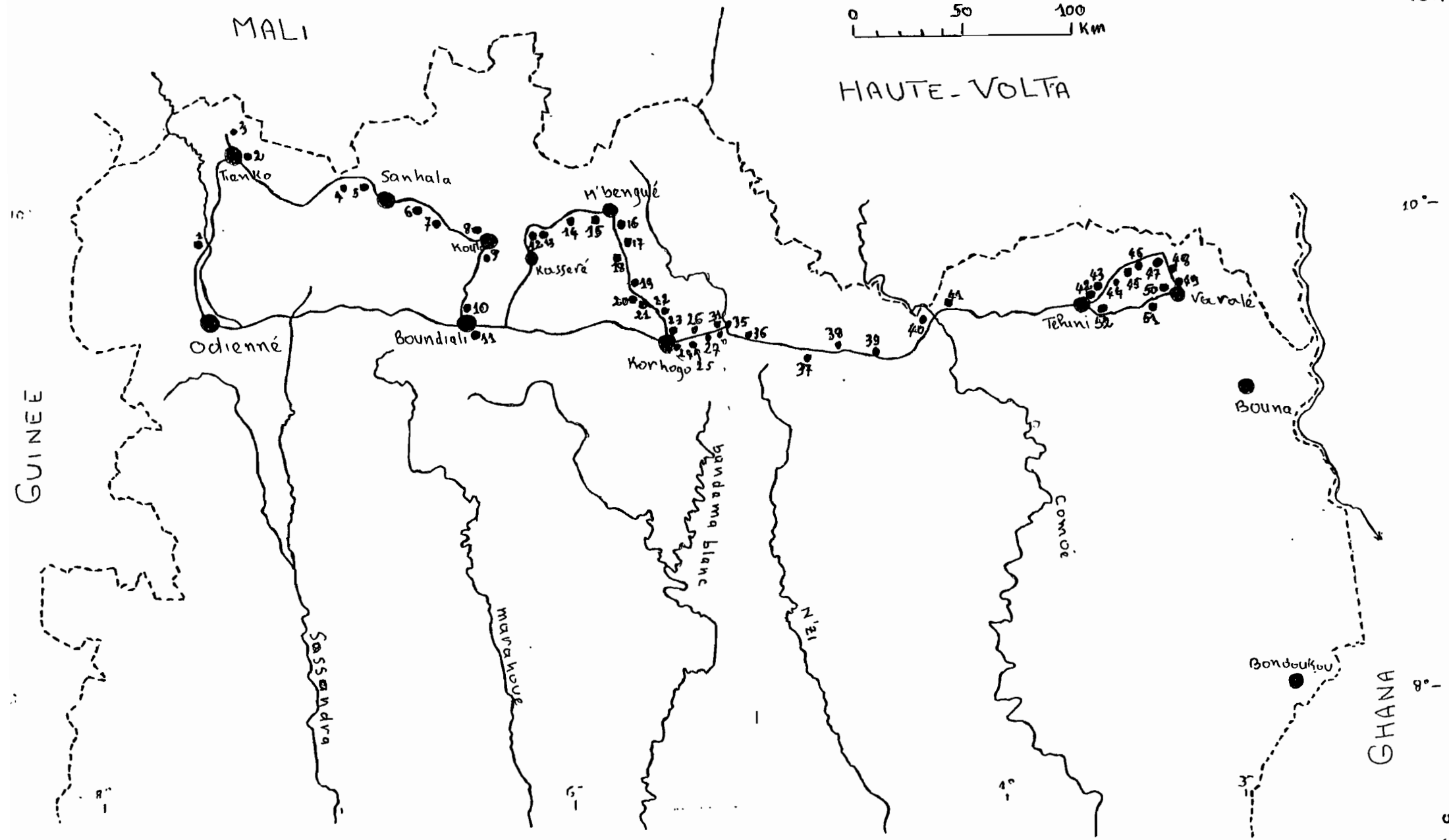
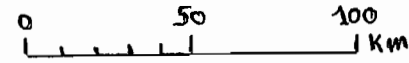
CARTE n.1 : CARTE DES ISOHYÈTES

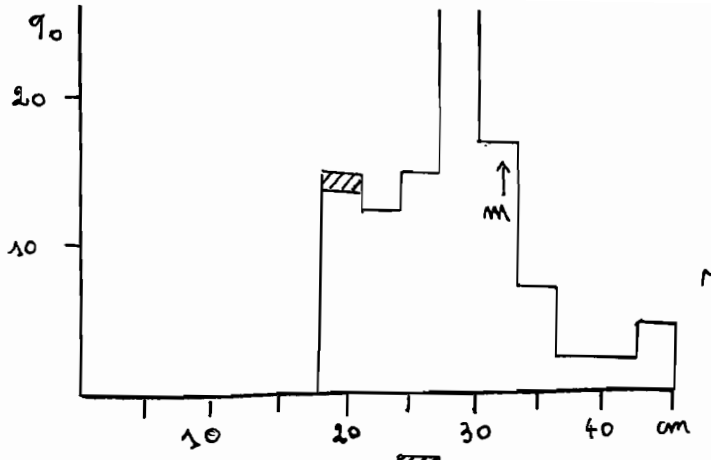
- ISOHYÈTE
- ITINÉRAIRE DE LA PROSPECTION
- PRINCIPALES AGGLOMÉRATIONS



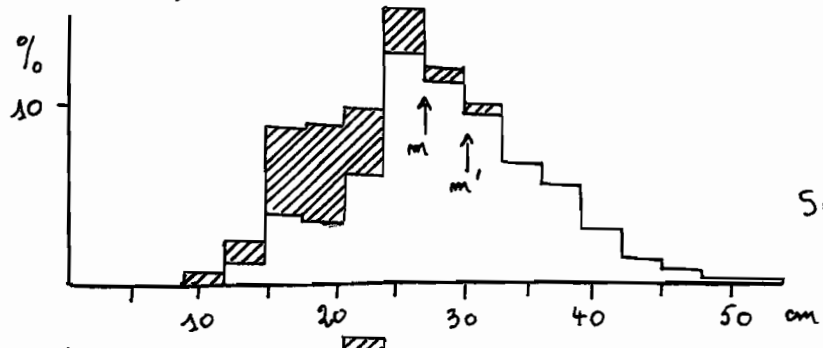
2. PROSPECTION PRELIMINAIRE DES MILS CULTIVES DANS LE NORD
DE LA COTE D'IVOIRE. 1974

- limites d'état
- itinéraire
- principales agglomérations
- emplacements des prélèvements

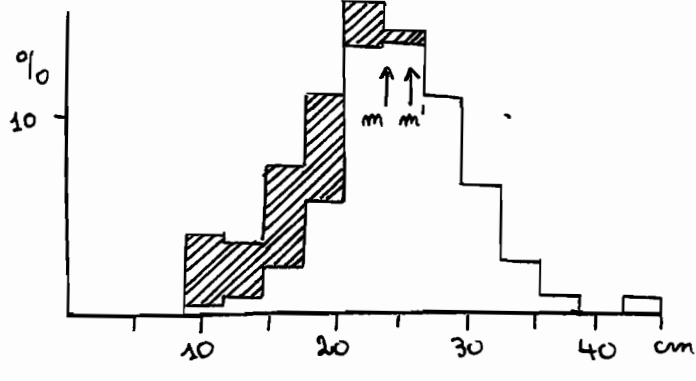




MALINKE

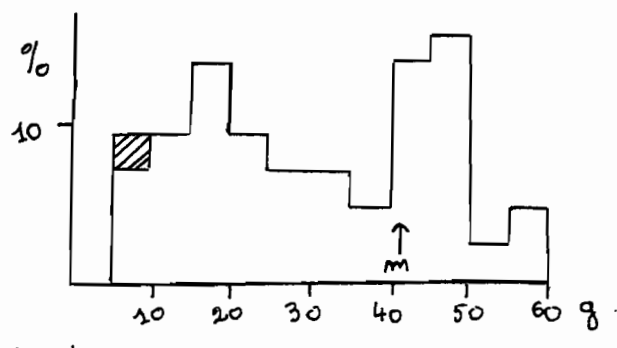


SÉNOUFO

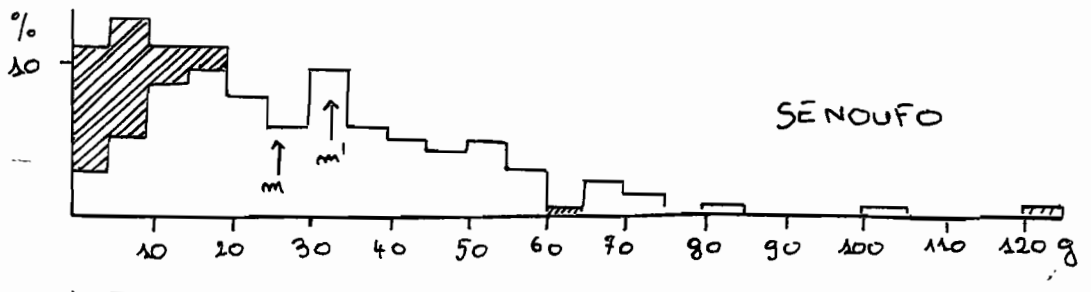


LOBI

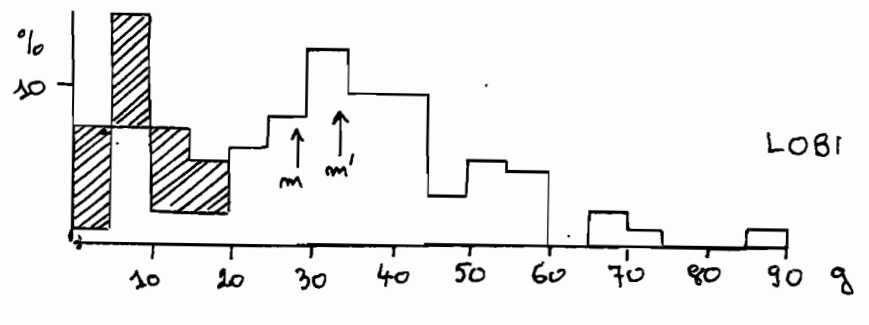
Longueur des faux épous



MALINKE



SÉNOUFO



LOBI

Poids des faux épous

▨ : N'BOULS

FIG 3

	diamètre en mm			Hauteur en mm		
	Min.	Max.	Moy.	Min.	Max.	Moy.
MALINKE	2,6	2,7	2,2	2,7	4,2	3,3
SENOUFO	2,3	2,9	2,2	2,1	4,4	3,1
LOBI	2,4	3,2	2,3	2,8	4,9	3,2

FIG 4 : CARACTERISTIQUES DES GRAINS

	ETHNIES		
	MALINKE	SENOUFO	LOBI
nombre d'échantillons récoltés	5	30	12
nombre de chandelles par échantillon	8	10	8
nombre d'échantillons analysés	3	25	10

FIG 5 : EFFECTIFS DES ECHANTILLONS

Nous avons analysé 38 échantillons (fig. 5), afin de voir si la variabilité décrite par les prospecteurs se retrouvait au niveau des estérases carboxyliques.

C. LE SYSTEME ENZYMATIQUE ETUDIE

I. MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

Les estérases forment une famille enzymatique dont le rôle est d'hydrolyser les liaisons esters. Elles ont été étudiées chez plusieurs organismes, animaux et végétaux ; ainsi, chez le poisson d'eau douce *Catostomus clarkii*, la variation des estérases du sérum est due à la ségrégation de deux allèles codominants d'un même gène, qui se manifeste électrophorétiquement par trois phénotypes (RICHARD, K. KOEHN, 1969) ; cette situation se rencontre aussi chez *Drosophila melanogaster*, où les Isozymes 6F et 6S sont contrôlés par deux allèles du locus est-6 (WRIGHT, 1963). Chez le maïs (S ... , 1964-1965), le comportement électrophorétique de l'estérase pH 7,5, codé par le gène E₁ montre une seule bande chez les individus homozygotes, et l'apparition d'une troisième bande, chez les hybrides, située à mi-distance entre les bandes parentales ; l'enzyme serait un dimère (SCHWARTZ, 1960 ; WORD, 1977 ; SHANNON, 1978). Les travaux effectués dans le laboratoire d'électrophorèse de l'O.R.S.T.O.M. par HOUDIARD (1977) et par DUBAYLE M.C. (1978), sur le mil, conduisent aux mêmes conclusions. Enfin, on note une variation qualitative et quantitative des Isozymes en fonction des tissus, et du stade de développement de la plante (SCANDALIOS, 1964).

II. METHODOLOGIE

1. ORGANE A ANALYSER

Du fait de la variation des Isozymes au cours du développement et en fonction des tissus, il convient de bien se fixer l'organe à étudier, afin d'assurer la répétitivité et la comparaison des résultats. Nous avons travaillé uniquement sur des graines, dont le métabolisme est stable ; 30 à 40 graines par échantillon, ont été analysées une à une (le mélange a été évité à cause de la mauvaise résolution des bandes).

2. PREPARATION DU GEL DE POLYACRYLAMIDE A 7,5%

Nous avons utilisé la méthode de DAVIS, nommée "Disc-électrophorèses", dans laquelle le gel est moulé en forme de cylindres dressés verticalement pendant la migration ; dans une fiole à vide on met :

- une part de la solution 1
- une part de la solution 2
- deux parts de persulfate d'ammonium (voir composition des solutions tableau I) ; après dégazage du mélange, celui-ci est coulé dans des tubes de verre de 12 cm de long et d'environ 0,6 cm de diamètre intérieur ; la gélification qui se fait à l'abri de l'air (on dépose une goutte d'eau au-dessus du gel) et à la température ambiante dure au moins une heure.

3. EXTRACTION DES ESTERASES

La graine est écrasée à la main dans un mortier, avec un pilon, et la farine recueillie dans un petit tube dans lequel on ajoute 200 µl de tampon d'extraction (voir composition tableau II). Après homogénéisation, la suspension est laissée au repos pendant au moins 20 mn (les extraits peuvent être conservés plusieurs jours dans la chambre froide) ; il n'est point besoin de centrifuger.

4. ELECTROPHORESE

Dans le surnageant, on ajoute une goutte de bleu de bromophénol 1°/00, qui permet de suivre la migration. 100 µl d'extraits sont déposés sur la colonne de gel, préalablement enfilée dans le bac supérieur de l'appareil à électrophorèse APELAB (voir fig. 6) ; le bac comporte un gel destiné à recevoir l'extrait témoin obtenu en mélangeant les farines de trois lignées dont les uniques bandes, homodimères, représentent chacune un allèle (allèle R_2 pour LIGUI ; R_6 pour THIOTANDE ; R_4 pour J104). La migration a lieu en chambre froide, et dure environ 2 h 30 mn sous un ampérage de 2,5 mA par tube de gel.

5. REVELATION

La méthode utilisée est celle de SHAW et PRASARD 1970 (voir solution d'incubation tableau IV page 20).

TABLEAU I : gel de polyacrylamide 7,5 %

Solution 1 : HCL 1 N : 24 ml
TRIS : 18,15 mg (Trishydronymethyl-aminométhane)
TEMED : 0,23 ml (Tetra méthyl éthylène-diamine)
H₂O jusqu'à 100 ml

Solution 2 : Acrylamide : 28 g
BIS : 0,735 g (Méthylène - bis - acrylamide)
H₂O jusqu'à 100 ml

Solution 3 : PERSULFATE D'AMMONIUM : 140 mg/100 ml

TABLEAU II : Tampon d'extraction

TGSM : 0,75 ml
TRITON X 100 à 1% : 150 µl (élimine les lipides membranaires)
DMSO à 10% : 100 µl (améliore l'extraction des enzymes par augmentation de la perméabilité cellulaire)
TGSM : - Tampon de migration Tris-glycine (tableau III)
- Saccharose 40% (alourdit l'extrait lors de la migration)
- Mercapto ethanol 20 mM

TABLEAU III

Tampon de migration TRIS-GLYCINE $4,95 \cdot 10^{-3}$ M pH 8,3 :
TRIS : 6 g
GLYCINE : 28,8 g
H₂O jusqu'à 1 litre à diluer 10 fois au moment de l'emploi

TABLEAU IV

Révélation des estérases :
FAST BLUERR : 100 mg
TRIS-HCL 0,05M pH 7,1 : 97 ml
 α , β NAPHTHYL ACETATE 1% : 3 ml

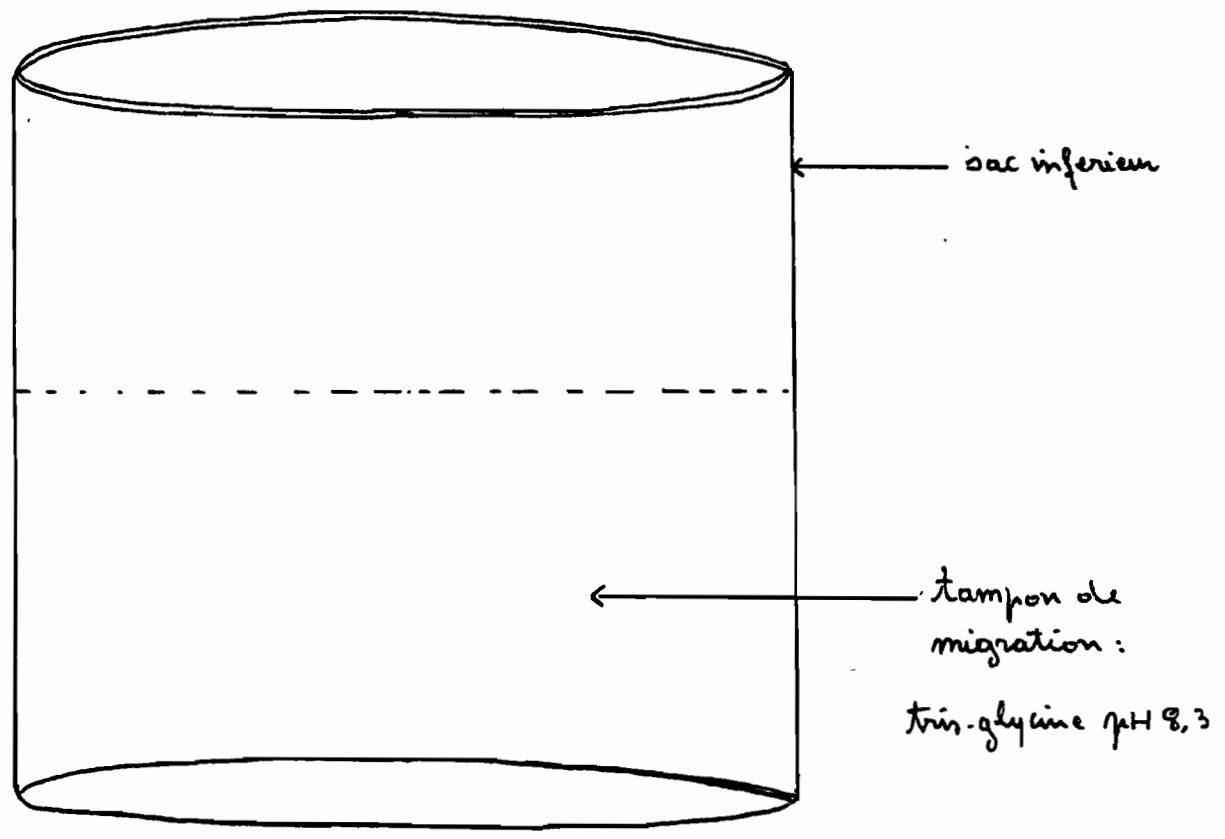
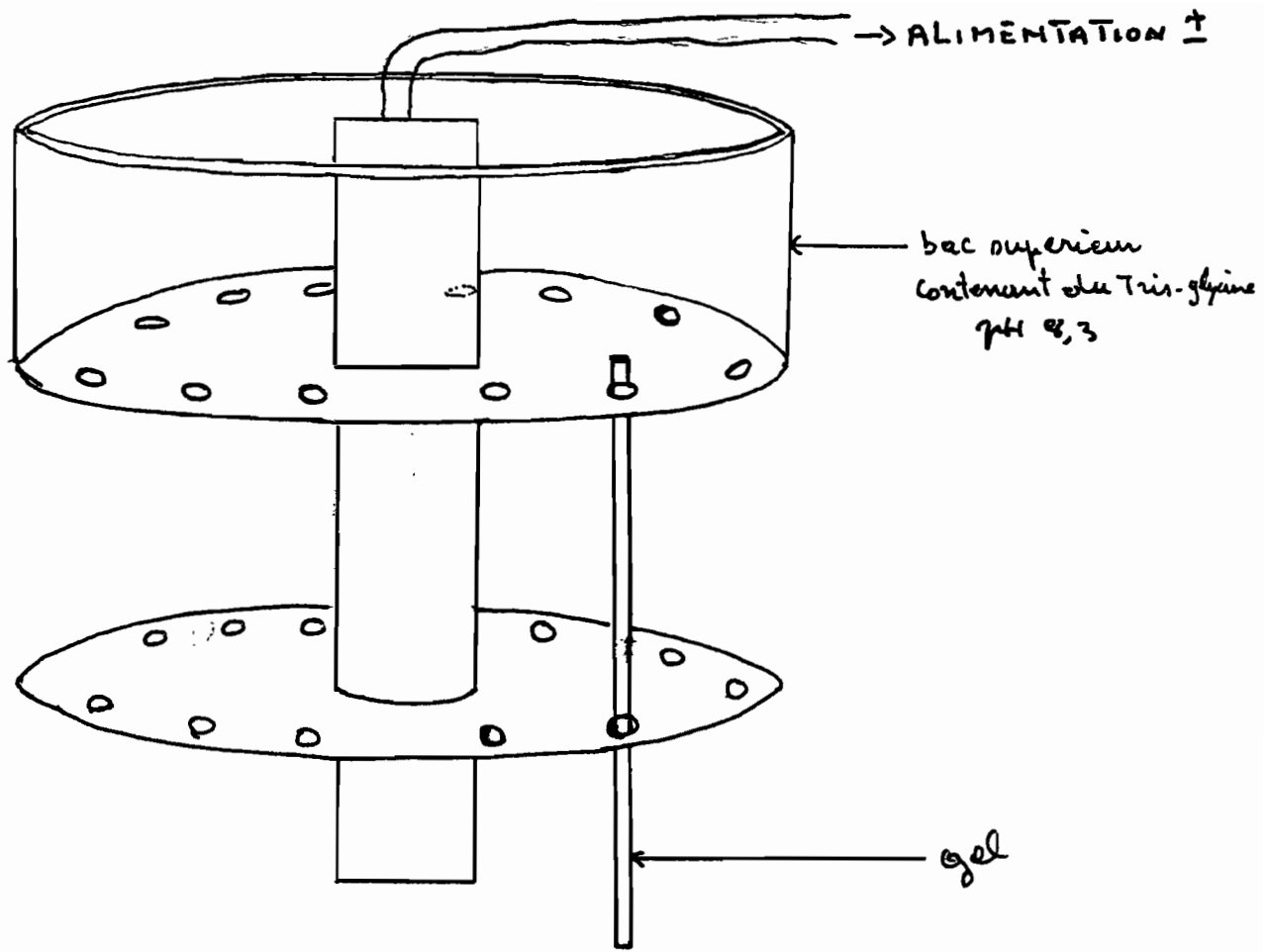


FIG. 6: SCHEMA DE L'APPAREIL A ELECTROPHORESE

L'emploi simultané de β et α -naphtyl- acétate permet de dissocier les isomères β et α des estérases ; l'incubation dure 15 mn et a lieu à l'obscurité et à la température ambiante ; la détermination des allèles se fait par comparaison avec le tube témoin et en s'aidant d'un négatoscope.

III. RESULTATS

1. DESCRIPTION DES ZYMOGRAMMES (fig. 7 page 13)

Les estérases migrent de la cathode vers l'anode. Dans la nomenclature des bandes, les chiffres indiquent l'ordre chronologique de découverte des allèles et non celui de la migration ; l'emploi d'un mélange à parts égales de α et β naphtyl acétate comme substrat de la réaction de révélation permet de distinguer deux types de bandes suivant la couleur.

1.1. LES BANDES MARRONS

Elles révèlent la présence des isomères α des estérases ; nous en avons dénombré quatre, toutes communes aux 38 échantillons étudiés ; leur déterminisme génétique n'est pas encore élucidé ; deux d'entre elles, les bandes m_4 et m_6 , facilement lisibles car intensément colorées, sont présentes dans toutes les graines ; les deux autres, m_3 et m_5 , manifestent une faible activité, parfois difficilement décelable ; une durée d'incubation prolongée (30 à 45 mn) appliquée à quelques échantillons a révélé la présence simultanée des quatre bandes marrons dans toutes les graines ; mais les bandes roses tendent à se foncer, ce qui peut rendre difficile la distinction entre les deux types de bandes, surtout entre la m_6 et la R_1 qui sont juxtaposées ; pour cette raison, ce traitement a été évité. Le manque de variabilité qui semble exister au niveau des bandes marrons, nous a amené à les exclure du reste de l'analyse qui ne concernera que les roses.

1.2. LES BANDES ROSES

Elles sont significatives de la présence des isomères β et migrent plus vite que les précédentes ; il n'y a aucune ambiguïté de

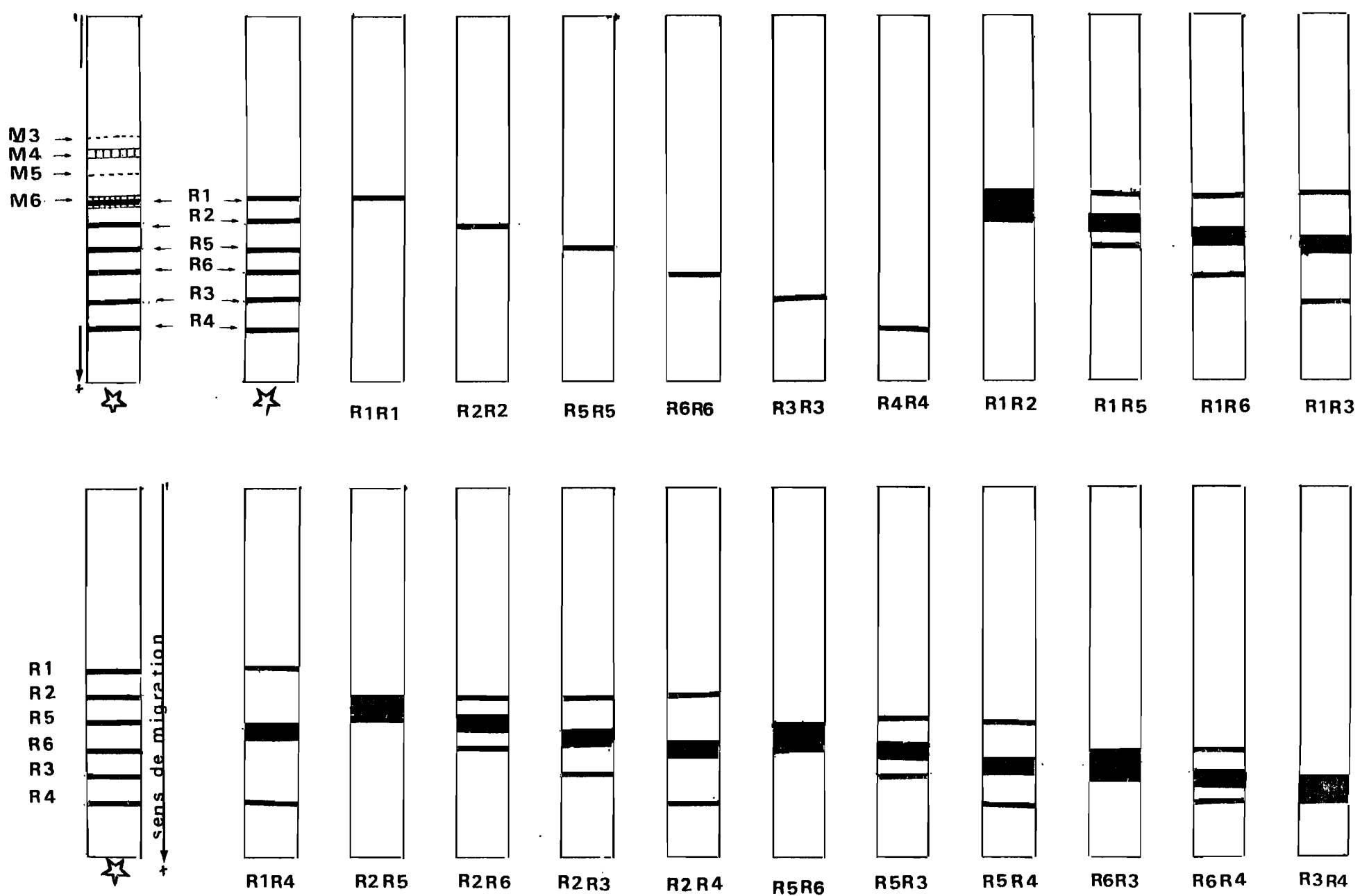


FIG 7 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS ZYMOGRAMMES
 les chiffres indiquent l'ordre de découverte des allèles

☆ position des allèles

lecture à leur niveau, et leur déterminisme génétique est bien connu : les variations observées sont dues à la disjonction d'allèles d'un même locus ; l'enzyme étant un dimère, le zymogramme correspondant à chaque graine comporte, soit une bande (homozygotie), soit trois bandes (hétérozygotie) ; dans ce dernier cas, la bande hybride, hétérodimère, est située à mi-distance entre les homodimères "parentales".

2. LES DEUX NIVEAUX DE VARIABILITE

2.1. VARIABILITE INTRA-ECHANTILLON (voir dernière page)

A l'intérieur de l'échantillon, on note une grande variabilité allélique d'une graine à l'autre ; nous avons dénombré six allèles dans chaque échantillon, sauf cinq d'entre eux qui en présentent cinq (voir tableau des fréquences alléliques, fig. 8, page 15 et 16) ; cela entraîne la présence d'un grand nombre de zymogrammes différents (page 13). Les individus se distinguent aussi par le nombre de bandes -une ou trois- qui traduit la variabilité à l'intérieur d'un locus : homozygotie, et hétérozygotie.

Les fréquences alléliques à l'intérieur d'un échantillon sont très inégales : dans chaque champ Sénoufo et Lobi, l'allèle prédominant est soit R_1 soit R_2 . Chez les Malinké, la première place revient à R_3 ou R_5 ou R_6 (voir tableau des fréquences alléliques (fig. 8, page 15-16) ; cela se répercute sur la fréquence des zymogrammes : les plus fréquents sont les combinaisons des allèles R_1 ou R_2 chez les Sénoufo et Lobi, alors qu'il s'agit des combinaisons de R_3 ou de R_6 chez les Malinké.

La multiplicité des allèles se comprend aisément quand on sait que le matériel végétal étudié n'est pas une structure à base génétique étroite, type lignée ou hybride F_1 , mais un amalgame de cultivars traditionnels n'ayant fait l'objet d'aucune sélection poussée.

2.2. VARIABILITE INTER-ECHANTILLON

Elle peut être abordée en considérant deux critères : d'une part, la variation qualitative et quantitative des allèles, et d'autre part, celle des génotypes représentés par les zymogrammes.

2.2.1. VARIATIONS DES FREQUENCES ALLELIQUES

A part cinq échantillons qui révèlent la présence de cinq allèles, tous les autres en possèdent six ; la sélection des semences effectuée par les Malinké ne semble pas préjudiciable au maintien des allèles dans les champs ; le critère présence-absence d'un allèle donné ne peut servir à distinguer les échantillons, les uns des autres ; par contre, le tableau des fréquences (page 15-16 et le classement page 17 ainsi que les représentations graphiques page 18 à 23) montrent une très grande diversité des fréquences alléliques ; ils permettent, en outre, de constater les faits suivants :

- Les échantillons peuvent se classer en deux groupes : le groupe Sénoufo-Lobi, et le groupe Malinké ; dans le premier ensemble, les allèles les plus fréquents sont R_1 et R_2 ; chez les Malinké, ce rôle est dévolu à R_3 , R_5 et R_6 .

- Entre mils Sénoufo et mils Lobi, la distinction est difficile si l'on considère uniquement R_1 et R_2 ; par contre, les fréquences R_3 , R_4 , R_5 et R_6 nous indiquent qu'il s'agit de deux groupes bien distincts.

- Le graphique 14 page 23 montre qu'il existe un gradient de la fréquence R_6 , d'est en ouest (un cline) qui se juxtapose à celui des isohyètes (carte 1).

Afin de mieux discriminer les différents échantillons, nous avons appliqué la technique de l'analyse des composantes principales au tableau des fréquences alléliques.

MALINKE

SEHOUE

Alleles Echantillons	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	nombre d'alleles
1A	8	26	<u>41</u>	6	0	19	5
2A	7	7	27	6	16	37	6
5A	15	<u>26</u>	3	6	<u>30</u>	20	6
Moyennes	10	19,67	23,67	6	15,34	25,34	
6A	31	<u>35</u>	19	5	2	10	6
8A	13	22	4	10	<u>31</u>	19	6
10A	32	<u>57</u>	2	3	7	0	5
11A	24	<u>37</u>	6	6	10	17	6
12A	17	22	17	0	20	<u>25</u>	5
13A	24	<u>35</u>	10	10	8	13	6
14A	30	<u>36</u>	11	3	15	5	6
15A	<u>40</u>	24	4	14	12	6	6
16A	<u>39</u>	29	4	7	5	16	6
17A	<u>41</u>	23	7	2	17	10	6
18A	24	<u>33</u>	12	5	18	8	6
19A	17	<u>44</u>	7	10	19	3	6
20A	<u>25</u>	20	13	12	23	7	6
20A N'doul	35	<u>39</u>	1	2	14	9	6
21A	10	<u>50</u>	6	4	15	15	6
22A ₂	<u>35</u>	22	6	4	29	4	6
23A ₂	8	<u>43</u>	7	8	25	8	6
24A	19	<u>29</u>	5	1	26	20	6
27A	<u>24</u>	19	9	4	19	22	6
27A N'doul	22	<u>32</u>	17	4	22	3	6
30A	<u>31</u>	26	19	7	9	9	6

FIG 0 TABLEAU DES FREQUENCES ALLELIQUES (à miure)

SÉNOUFO

LOBI

Alèles Echantillons	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	nombre d'allèles
34A	<u>34</u>	24	6	12	15	10	6
36A	<u>35</u>	35	2	0	21	6	5
40A	16	<u>51</u>	3	6	12	12	6
41A1	24	<u>43</u>	17	16	6	5	6
Moyennes	26,16	33,16	8,68	6,0	16,0	10,48	
42A	24	<u>45</u>	8	6	12	5	6
43A	27	<u>30</u>	17	12	4	10	6
45A	<u>37</u>	20	10	14	11	7	6
46A N'doul	21	<u>55</u>	14	5	6	0	5
47A	34	<u>36</u>	1	9	8	11	6
48A	13	<u>35</u>	16	16	15	4	6
49A	<u>28</u>	22	23	9	9	8	6
50A	<u>30</u>	21	7	27	9	6	6
51A	11	<u>31</u>	22	16	9	11	6
52A	<u>29</u>	4	4	6	14	5	6
Moyennes	25,4	29,9	11,2	12,0	9,7	6,70	
Moyennes générales	24,7	31,24	10,53	7,45	14,27	10,66	

FIG. 9 : TABLEAU DES FREQUENCES ALLELIQUES EN POURCENTAGES

 : Allèle le plus fréquent

Classement des fréquences alléliques moyennes suivant les ethnies

MALINKE : R₆ R₃ R₂ R₅ R₁ R₄

SENOUFO : R₂ R₁ R₅ R₆ R₃ R₄

LOBI : R₂ R₁ R₄ R₃ R₅ R₆

ordre décroissant

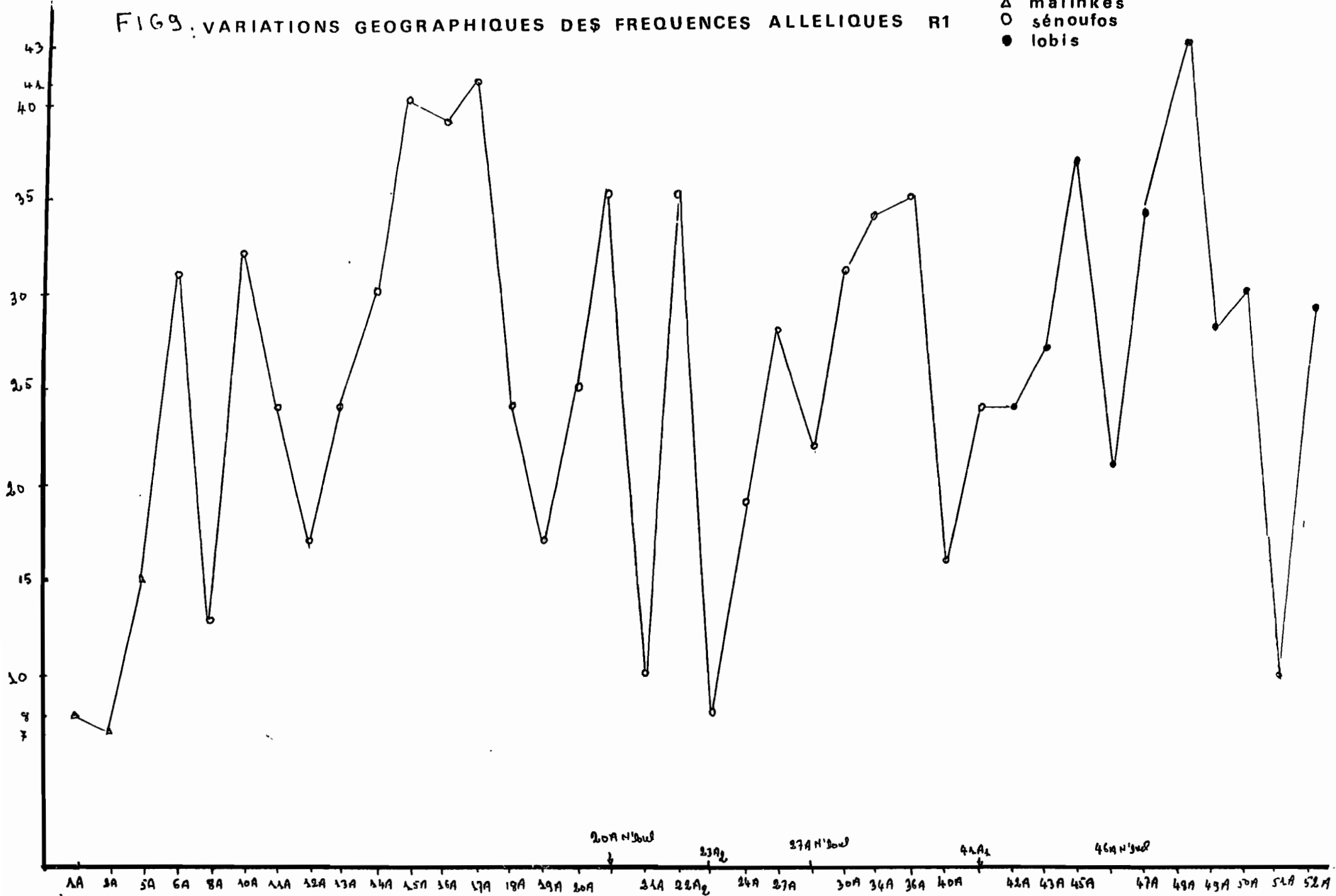
Zymogrammes les plus fréquents suivant les échantillons

MALINKE : R₃ R₃, R₆ R₆, R₃ R₆

SENOUFO et LOBI : R₁ R₁, R₂ R₂, R₁ R₂ (les 3 principaux).

FIG 9. VARIATIONS GEOGRAPHIQUES DES FREQUENCES ALLELIQUES R1

Δ malinkés
 O sénoufos
 ● lobis



20A N'goul
 23A
 27A N'goul
 41A
 46A N'goul

FIG. 10

VARIATIONS GEOGRAPHIQUES DES FREQUENCES ALLELIQUES R2

▲ malinkes
○ senoufos
● lobis

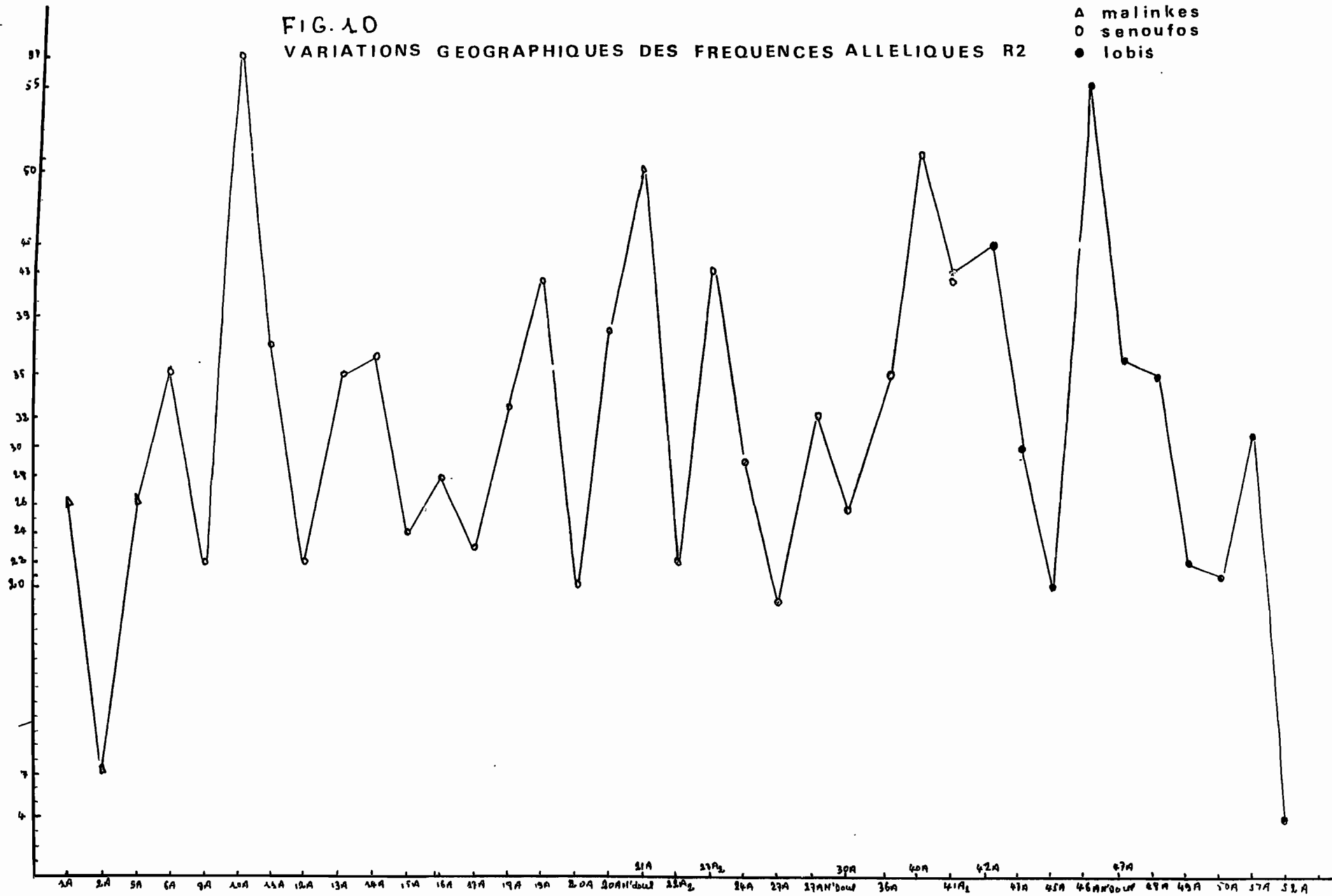


FIG 11. VARIATIONS GEOGRAPHIQUES DES FREQUENCES ALLELIQUES R3

mils
 Δ malinkés
 ○ senoufos
 ● lobis

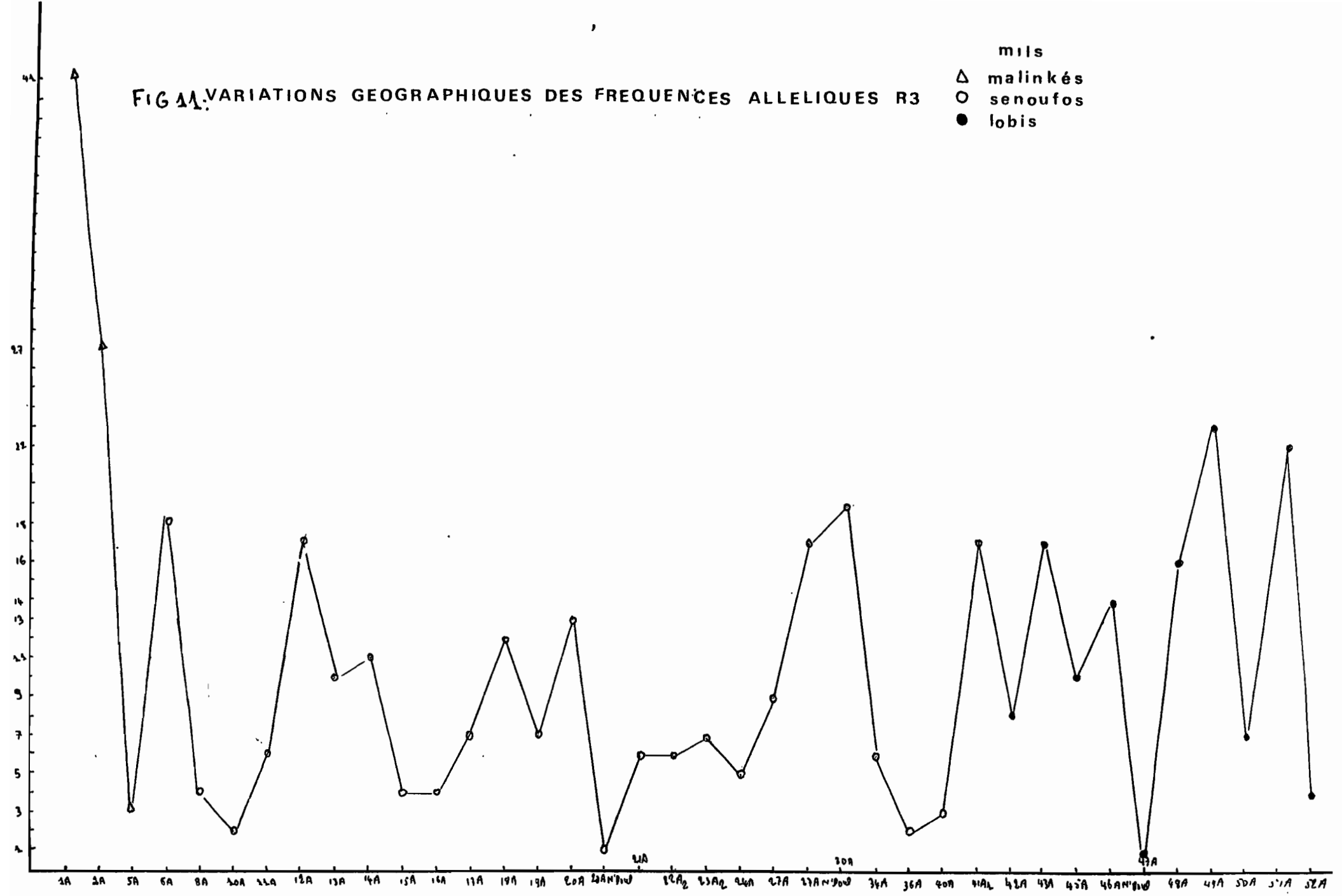


FIG 12. VARIATIONS GEOGRAPHIQUES DES FREQUENCES ALLELIQUES R4

nills
 Δ malinkés
 ○ senoufos
 ● lobis

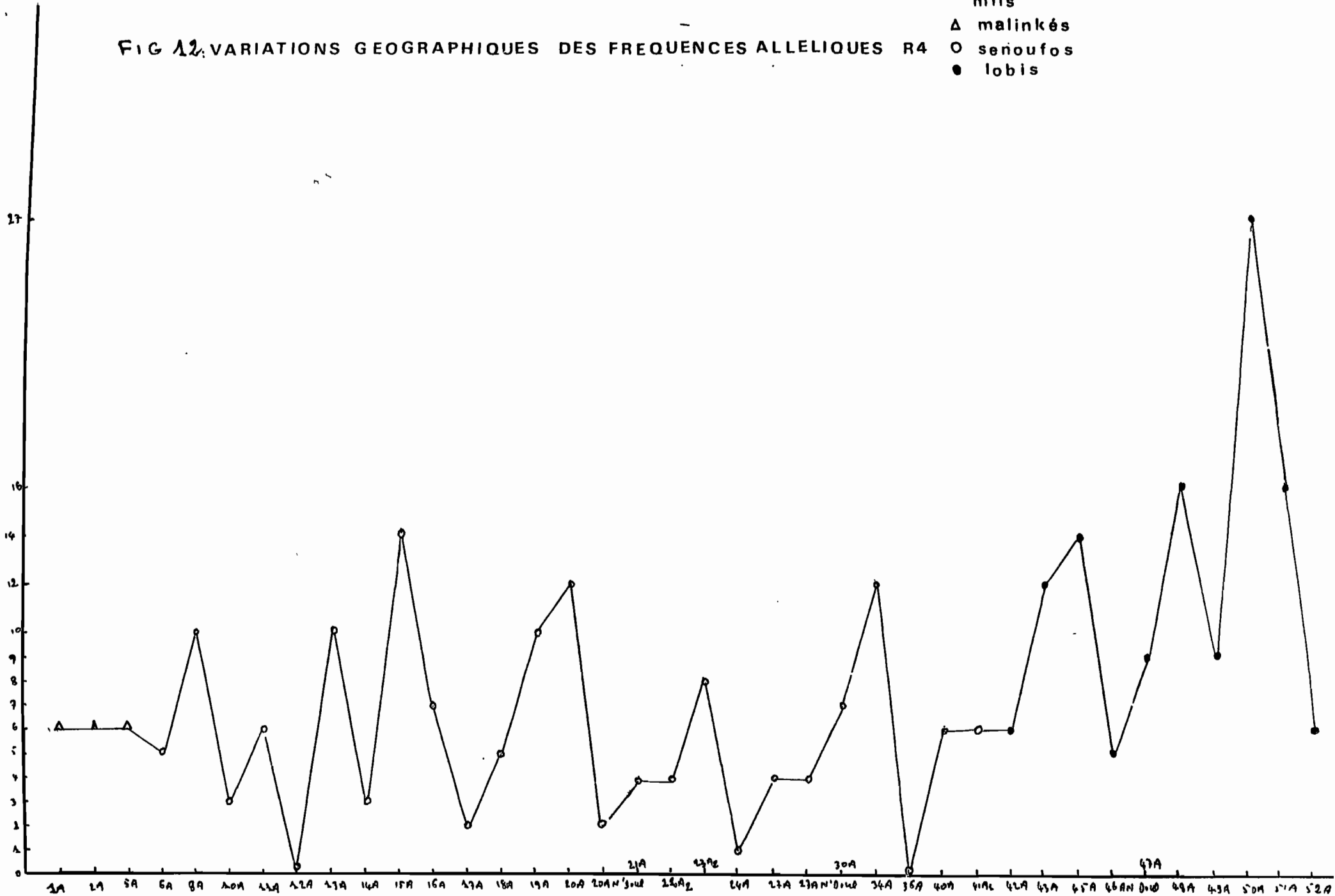
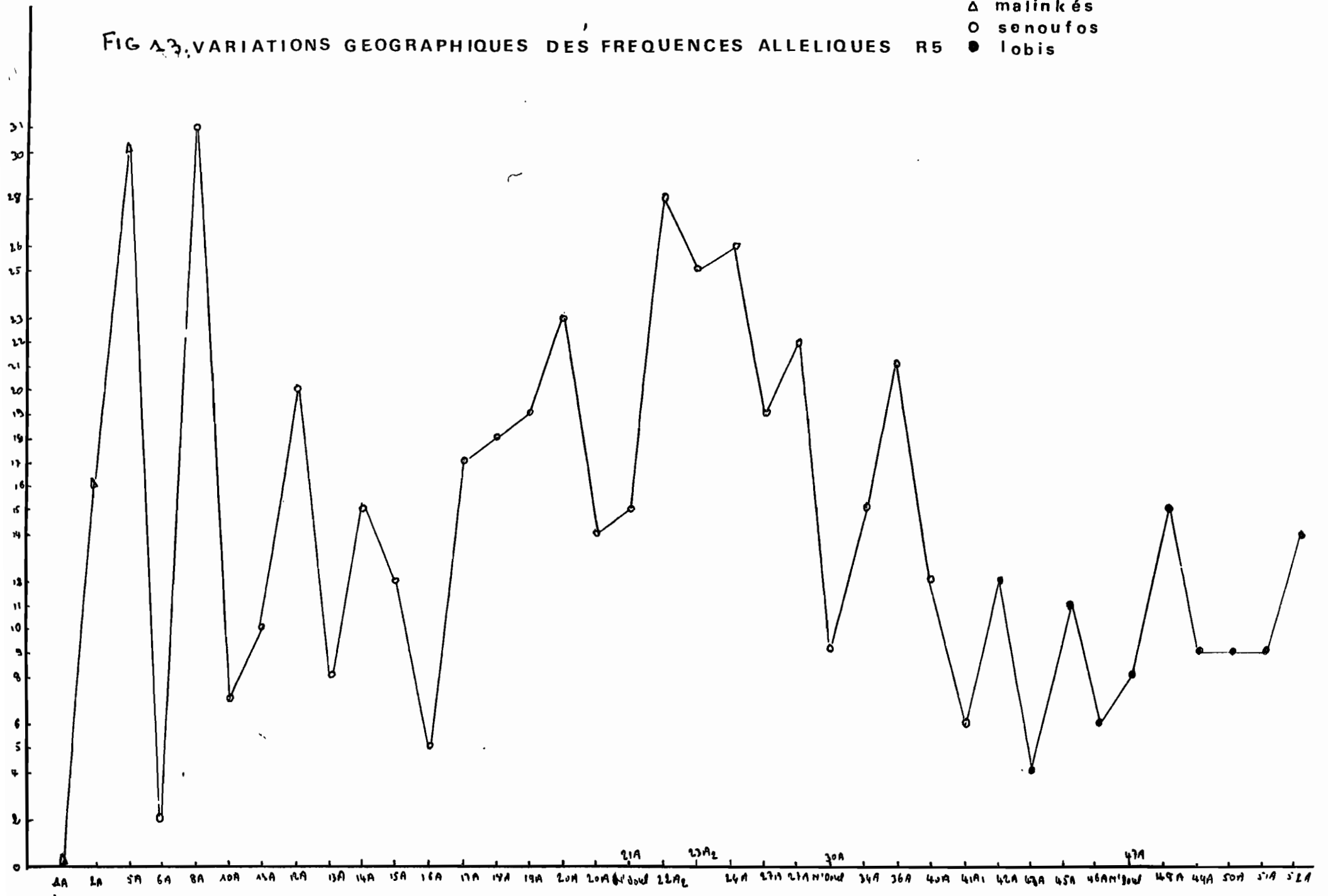


FIG 23. VARIATIONS GEOGRAPHIQUES DES FREQUENCES ALLELIQUES R5

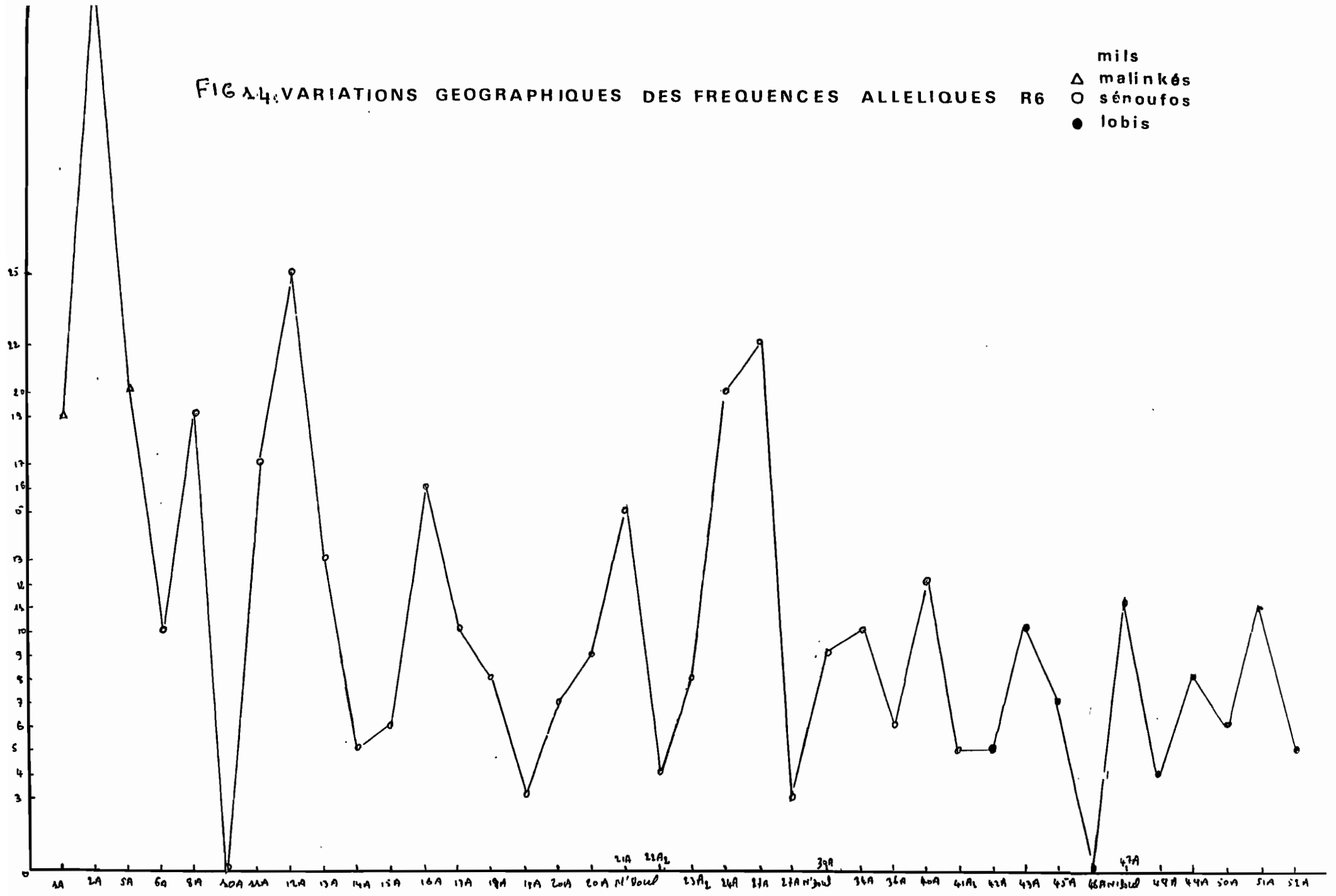
Δ malinkés
 ○ senoufos
 ● lobis



R5

FIG 24. VARIATIONS GEOGRAPHIQUES DES FREQUENCES ALLELIQUES R6

mils
 Δ malinkés
 ○ sénoufos
 ● lobis



ANALYSE DES COMPOSANTES PRINCIPALES

a - but et principe

La méthode, qui a l'avantage d'être exempte d'hypothèses restrictives, a pour principe de se ramener à partir d'une matrice de grandes dimensions, à un petit nombre de variables indépendantes entre elles, appelées facteurs, qui sont des combinaisons linéaires des variables initiales ; elle aboutit à la projection du nuage de points de départ, difficilement visualisable, dans le plan des facteurs principaux pris deux à deux. Mathématiquement, chaque axe factoriel est donné par le vecteur propre associé à chaque valeur propre de la matrice carrée symétrique $D \times D'$ (D = matrice initiale, D' = transposée de D) ; la recherche des facteurs se fait par diagonalisation de $D \times D'$.

b - Signification des axes

Le traitement à l'ordinateur des données nous fournit le tableau des saturations (corrélation des variables initiales avec les facteurs) et le pourcentage de variance expliquée par chaque axe (tableau I et II page 15). Nous n'exploiterons que les trois premiers axes qui représentent 85% de la variabilité :

- axe 1 : forte influence positive de R_2 et assez forte influence négative de R_6
- axe 2 : marqué positivement par R_1 et négativement par R_3
- axe 3 : forte participation positive de R_5 et assez forte participation négative de R_3

c - projections dans le plan des axes principaux

c.1 - plan des axes 1 et 2 (graphique 15 page 16).

La projection dans ce système d'axes ne permet pas de distinguer des agrégats bien nets ; des échantillons, proches géographiquement, se retrouvent éloignés sur le graphique ; cela confirme la grande diversité des fréquences alléliques ; en outre, comme il avait été noté plus tôt, il n'apparaît aucune discrimination entre mils Sénoufo et mils Lobi qui se caractérisent par de fortes fréquences en R_1 et en R_2 ;

Axes	1	2	3	4	5	6
pourcentage de variance expliquée par chaque axe	37,3	28,4	19,3	8,2	5,6	1,2
pourcentages cumulés	37,3	65,7	85	93,2	98,8	100

I. pourcentages de variance expliquée par chaque axe

-variables Axes	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
1	0,16	0,94	-0,41	-0,14	-0,27	-0,65
2	0,93	-0,33	-0,57	0,08	0,05	-0,37
3	0,24	0,05	-0,63	-0,32	0,89	0,21
4	0,18	0,08	-0,05	-0,68	-0,22	0,55
5	0,08	0,01	-0,31	0,61	-0,25	0,27
6	0,10	0,07	0,11	0,20	0,13	0,11

II. Tableau des saturations

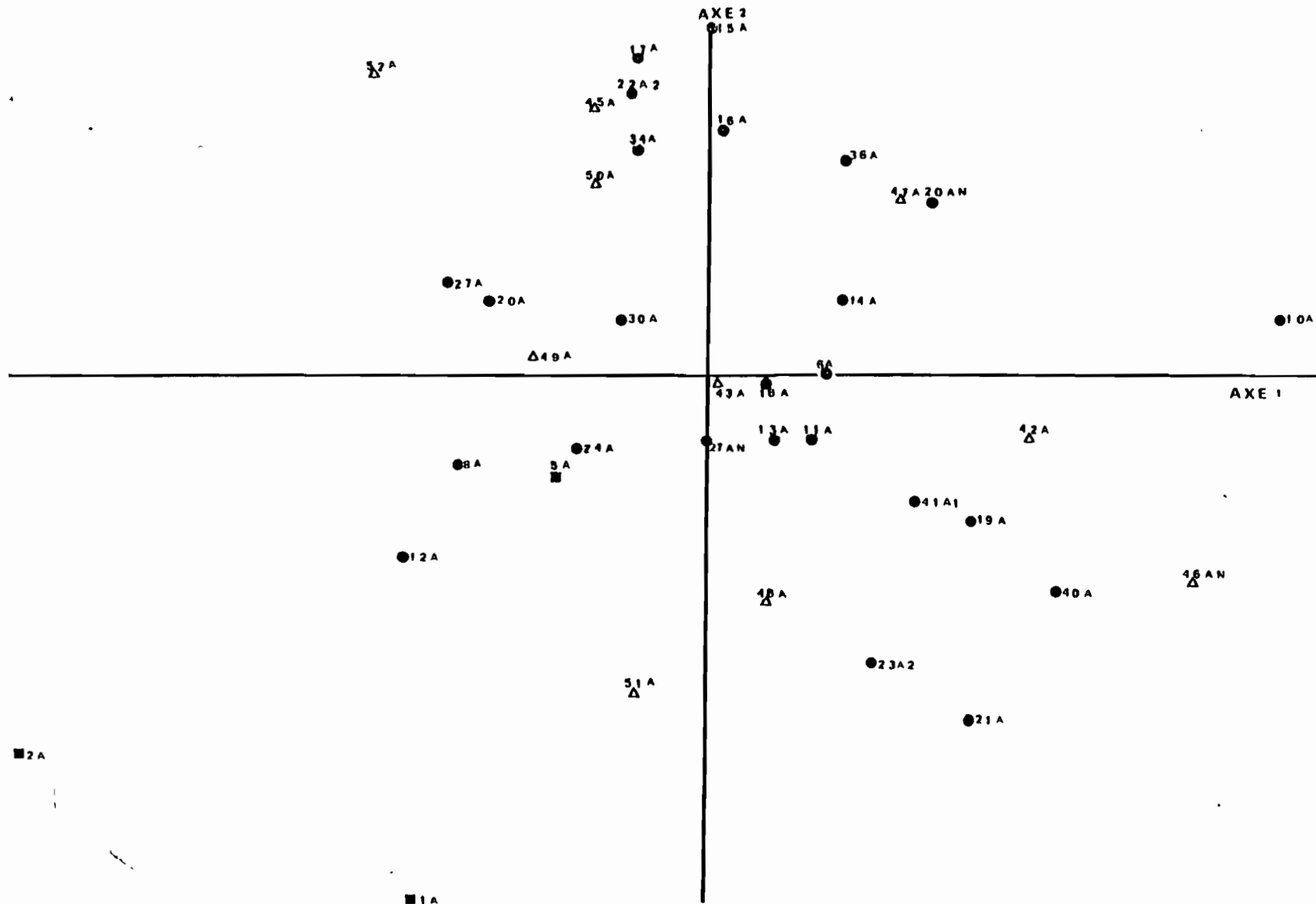


FIG 25

DIVERSITE DES FREQUENCES ALLELIQUES - PLAN DES FACTEURS 1 ET 2

■ MALINKES
● SENOUFOS
▲ LOBIS

par contre, les Lobi semblent se distinguer par leur position qui rappelle leur richesse en R_3 et R_6 ; toutefois leur faible effectif limite la portée de cette analyse.

c.2 - plan des axes 1 et 3 (graphique 16 page 28).

Les échantillons Lobi se distinguent très nettement par leur position en dessous de l'axe 1 ; ceux des Sénoufo se répartissent en majorité au dessus de cet axe, mais quelques uns d'entre eux se retrouvent avec les Lobis, ce qui indique une grande variabilité des fréquences alléliques au niveau des champs Sénoufo. Les Malinkés se signalent plus nettement ici encore par leur position à la périphérie du nuage de points ; de plus ils sont très distincts l'un de l'autre ; les fréquences R_3 , R_5 et R_6 , les plus élevées sont rencontrées séparément dans les échantillons Malinké ; cela est sans doute le résultat de la sélection des semences qui favoriserait ces allèles.

c.3 - plan des axes 2 et 3 (graphique 17 page 29).

Cette représentation est semblable à la précédente : les Lobi sont tous situés en dessous de l'axe 2 ; les Sénoufo se retrouvant un peu partout, mais en majorité au-dessus de cet axe.

En conclusion, l'analyse des composantes principales nous a révélé l'importance de l'axe trois dans la distinction entre mils Malinké, Sénoufo et Lobi ; cela indique le rôle discriminatoire des allèles R_3 et R_5 qui sont fortement corrélés à cet axe.

2.2.2. VARIABILITE AU NIVEAU DES ZYMOGRAMMES

Les six allèles répertoriés peuvent s'associer de plusieurs manières qui se manifestent, électrophorétiquement et théoriquement par 21 zymogrammes différents schématiquement représentés figure 78 pages 13

Le tableau des fréquences des zymogrammes (fig. 18 page 30 à 32) appelle les remarques suivantes :

- aucun échantillon ne possède simultanément tous les 21 zymogrammes théoriques ; le nombre varie de 7 à 17.

- aucun zymogramme n'est présent à la fois dans tous les 38 échantillons.

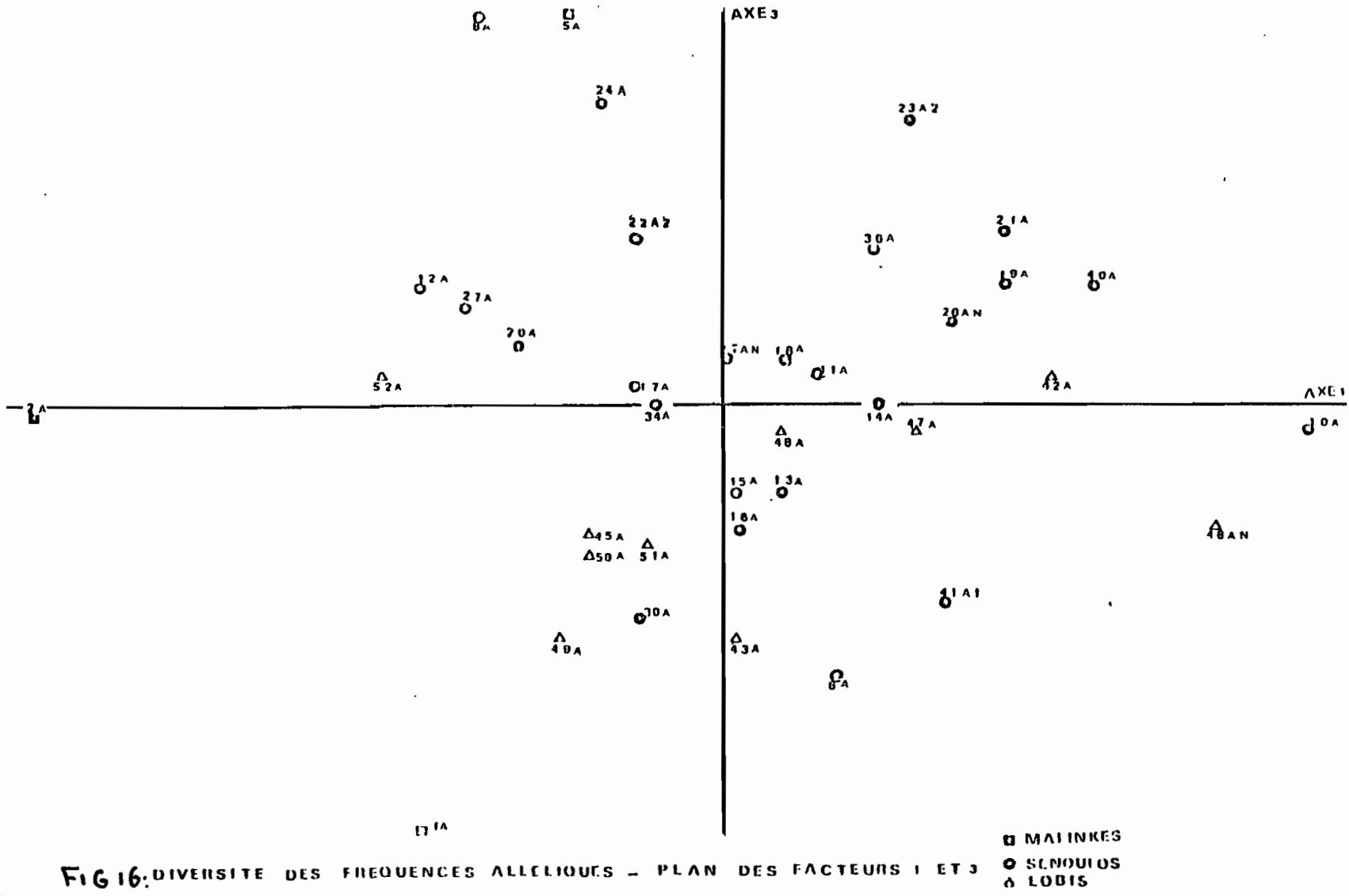


FIG 16: DIVERSITE DES FREQUENCES ALLELIQUES - PLAN DES FACTEURS 1 ET 3

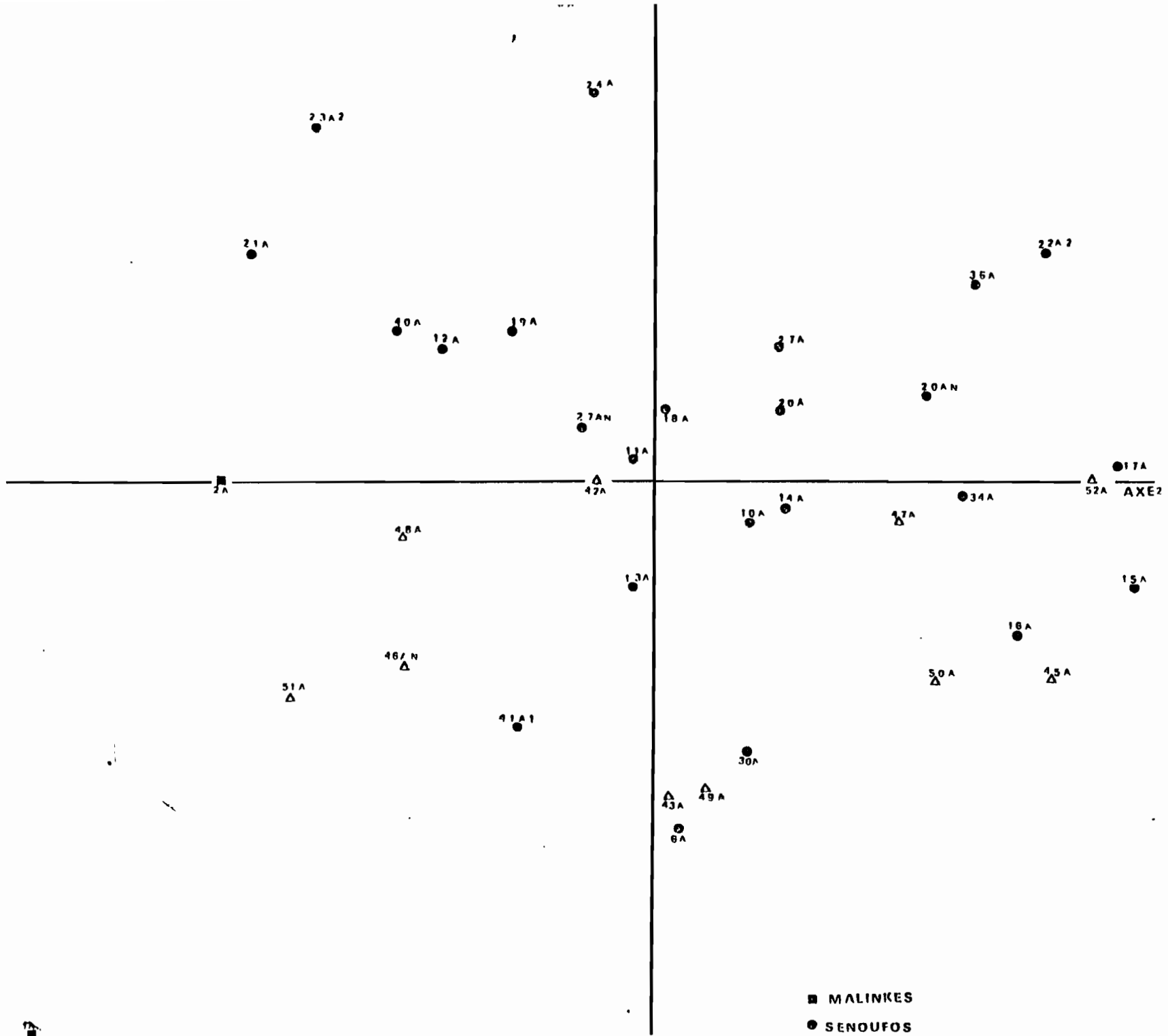


FIG. 4. DIVERSITE DES FREQUENCES ALLELIQUES - PLAN DES FACTEURS 1 ET 2

■ MALINKES
 ● SENOUFOS
 ▲ A LOUIS

MALINKÉ

SÉNOUFO

Génotypes éléments		R ₁ R ₁	R ₂ R ₂	R ₃ R ₃	R ₄ R ₄	R ₅ R ₅	R ₆ R ₆	R ₁ R ₂	R ₁ R ₃	R ₁ R ₄	R ₁ R ₅	R ₁ R ₆	R ₂ R ₃	R ₂ R ₄	R ₂ R ₅	R ₂ R ₆	R ₃ R ₄	R ₃ R ₅	R ₃ R ₆	R ₄ R ₅	R ₄ R ₆	R ₅ R ₆	nbre de zymogrammes	
ΔA		Δ0	22,5				Δ2,5	Δ2,5	2,5				Δ2,5	Δ0									9	
2A		2,5		5,0		2,5	Δ2,0	2,5	2,5			5,0		5,0	5,0	7,5	7,5	Δ0	2,5	2,5	2,5	Δ0	Δ5	
5A						Δ2,5	Δ5	7,5				2,0	2,5	5,0	Δ0	7,5	2,5				2,5	5	Δ2	
6A		Δ6,50	Δ2,0	7,0	2,50		5,0	2Δ,5	5,0				2,5	Δ2	5,0	2,5	5,0			2,5	2,5		Δ4	
8A		3,0	6,0	3,0			3,0						Δ4,5	6,0		6,0	Δ4,5	Δ2,0		3,0		Δ4,5	Δ4,5	Δ2
Δ0A		Δ3,5	Δ6,5											6,5		6,5							7	
ΔΔA		Δ4,5	ΔΔ,5				5,5	ΔΔ,5				5,5	5,5	8,5	5,5	ΔΔ,5	ΔΔ,5		3,0			5,5	Δ2	
Δ2A			6,5	6,5		3,5	6,5	Δ3,5	3,5			3,5	Δ3,5	6,5		Δ0			3,5	6,5		Δ6,5	Δ3	
Δ3A			9,5	3,0	3,0	6,5	6,5	35,5	3,0	3,0			6,5	3,0	6,5		6,5	3,0	3,0				Δ4	
Δ4A		ΔΔ,0	Δ3,5			5,5	2,5	24,5	2,5			8,0	2,5	8,0	5,5	5,5	2,5		8,0				Δ3	
Δ5A		Δ3,0				2,5	2,5	2,5	2,5	Δ5,5	5,0	5,0		Δ3,0	7,5	2,5			5,0				Δ2	
Δ6A		Δ7,0	Δ3,0				8,5	2Δ,5	2,0	4,5	8,5	8,5	2,0	6,5			3,0		2,0		2,0	2,0	Δ4	
Δ7A		Δ8,5	6,5	2,0		2,0	2,0	Δ4,5	6,5			14,5	8,5	2,0	2,0	Δ0,5	4,0		2,0		2,0	3,0	Δ6	
Δ8A		9,0	6,0				3,0	Δ8,0	6,0	3,0	3,0		6,0	6,0	Δ8,0	6,0			Δ2,0			3,0	Δ3	
Δ9A		6,5	2Δ,0			6,5		6,5	4,0	6,5	2,0	2,0	8,5	Δ0,5	Δ6,5	4,0			2,0		4,0		Δ4	

FIG 18 FRÉQUENCES DES ZYMOGRAMMES (à mière) ■ : absence du zymogramme

Genotypes échantillons	Zymogrammes																				Nombre de Zymogrammes				
	R ₁ R ₁	R ₂ R ₂	R ₃ R ₃	R ₄ R ₄	R ₅ R ₅	R ₆ R ₆	R ₇ R ₇	R ₈ R ₈	R ₁ R ₂	R ₁ R ₃	R ₁ R ₄	R ₁ R ₅	R ₁ R ₆	R ₂ R ₃	R ₂ R ₄	R ₂ R ₅	R ₂ R ₆	R ₃ R ₄	R ₃ R ₅	R ₃ R ₆		R ₄ R ₅	R ₄ R ₆	R ₅ R ₆	
20 A	12,0	5,0	5,0	5,0	7,0	2,5	5,0	9,5	2,5	9,5		2,5	12,0	9,5	2,5		5,0							7,0	16
20 A N'Doul	11,5	2,5			4,5	4,5	0,5	2,5		14,0	4,5		4,5	2,5	4,5										11
21 A		29,5					3,0	3,0		3,0	6,0	6,0	6,0	11,0	9,5		3,0				3,0	13,0		12	
22 A ₂	12,0	16,5			14,0		2,0	5,5	3,0	11,0	3,0	3,0		5,0			3,0			5,5			5,5	13	
23 A ₂		22,0			3,0		16,5				5,5	3,0	14,0	3,0		9,5			11,0	3,0	11,0			12,0	11
24 A	4,5	6,5	2,0		10,5	8,5	13,0		2,0	8,5	6,5	6,5		15,0	19,5								6,5	13	
27 A	8,0	2,0			2,0	2,0	10,0	2,0	2,0	12,0	15,5	2,0		8,0	13,5	4,0	8,0	2,0		2,0			6,0	17	
27 A N'Doul	14,0	19,5	5,5	3,0	8,5		5,5	5,5		5,5		5,5	3,0	8,5	3,0		11,0						3,0	14	
30 A	11,5	17,0	3,0		3,0	3,0	5,5	17,0	5,5	3,0	8,5	5,5	3,0	3,0		5,5	3,0						3,0	16	
34 A	3,0	9,0		3,0	3,0		20,5	9,0	11,5	11,5	9,0			2,0	6,0		3,0			3,0	3,0	3,0	3,0	15	
36 A	19,5	19,5			3,0		9,5			16,0	6,5			16,0	6,5		3,0								9
40 A	6,0	33,5	3,0				12,0		6,0	3,0			6,0	9,0	11,5								11,5	10	
41 A ₂	3,5	24,0	2,5				26,0	12,0		2,5	2,5			5,0	2,5	5,0	7,0	7,0	2,5						13
42 A	18,0	30,5	3,0	3,0	6,0	3,0	12,0						6,0	3,0	9,0		3,0						3,0	12	
43 A	12,0	19,0	7,5	5,0			14,5	11,0				5,0	2,5	2,5		7,5	5,0			2,5	5,0	2,5	2,5	15	

FIG 18 : FRÉQUENCES DES ZYMOGRAMMES (à mière) ■ : absence du zymogramme

Echantillons	Génotypes																				nombre de Zymogramme
	R ₁ R ₁	R ₂ R ₂	R ₃ R ₃	R ₄ R ₄	R ₅ R ₅	R ₆ R ₆	R ₁ R ₂	R ₁ R ₃	R ₁ R ₄	R ₁ R ₅	R ₁ R ₆	R ₂ R ₃	R ₂ R ₄	R ₂ R ₅	R ₂ R ₆	R ₃ R ₄	R ₃ R ₅	R ₃ R ₆	R ₄ R ₅	R ₄ R ₆	
45A	23,0	5,5	3,0	3,0	3,0	8,5	5,5	3,0	5,0	5,0	3,0	8,5	8,5	8,5	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	16
46A N'Doul	6,0	26,5				17,5	9,0	3,0	3,0	17,5	6,0	9,0									9
47A	11,0	8,0	3,0			32,5	3,0		11,0	3,0	9,0	11,0	2,5						2,5	5,5	12
48A	9,0	17,5	6,0	6,0	9,0		3,0	3,0	3,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	3,0					14
49A	6,0	3,0	9,5	6,0		15,5	6,0	9,5	6,0	3,0	12,5	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0					14
50A	5,5	14,5	3,0			5,5		29,5	8,5	5,5	3,0	3,0	3,0	8,5	3,0			3,0	5,5		14
51A		16,5	9,5	3,0		12,5	3,0	3,0	3,0	6,5	6,5	3,0	3,0	3,0	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	3,0	17
52A	15,0	27,5			5,0	2,5	10,0	5,0	2,5	5,0	5,0	2,5	7,5	10,0					2,5		13

FIG 18 : TABLEAU DES FREQUENCES DES ZYMOGRAMMES (FIN)

■ : absence de zymogramme

Lorsqu'on considère les groupes ethniques on note que :

- les échantillons Malinkés ont tous, les zymogrammes R_6R_6 et R_2R_6 ; il y a absence totale de R_4R_4
- les mils Lobi sont caractérisés par la présence simultanée des zymogrammes R_2R_2 , R_2R_3 et R_2R_4
- les échantillons Lobi présentent le plus grand nombre de zymogrammes : en moyenne 13,6 pour les Lobi ; 12,3 pour les Sénoufo ; 12 pour les Malinké.

Toutes ces variations peuvent être liées à celles des fréquences alléliques, ou dues à un échantillonnage d'individus insuffisant.

3. APPORT DU VIOLACEUM

Dans la collection, certains faux épis manifestaient des caractères de la sous-espèce sauvage *Pennisetum violaceum*. En ce qui concerne les estérases, on ne note aucun apport allélique par *Violaceum* ; ce résultat est conforme à celui de DUBAYLE M.C. dont les travaux (1978) ont montré que la population sauvage sénégalaise S.L. 68 de *P. violaceum* contient les mêmes allèles que les formes cultivées.

IV - DISCUSSION - CONCLUSION

L'analyse électrophorétique des estérases des grains de mil de Côte d'Ivoire a conduit aux principaux résultats suivants :

- Les six allèles mis en évidence, sont présents dans presque tous les échantillons ; mais leurs fréquences sont très fluctuantes d'un champ à l'autre.
- Les fréquences R_1 et R_2 ne peuvent servir de critère de discrimination valable pour laquelle il faut recourir aux allèles R_3 , R_4 , R_5 et R_6
- Les échantillons Malinké se situent à la périphérie du nuage de points quelque soit le système d'axes utilisé pour sa représentation graphique.
- Le groupe de Mills Sénoufo se signale par une grande variabilité des fréquences alléliques ; ce résultat peut être mis en parallèle avec le polymorphisme décrit par les prospecteurs au niveau des caractéristiques du faux-épils ; il incite à se poser la question suivante : existe-t-il une corrélation significative entre caractéristiques du faux épils et le comportement électrophorétique et la fréquence des isozymes d'estérase ? mais certains facteurs limitent la portée de l'analyse et rendent difficile l'interprétation des données :
 - le biais d'échantillonnage : il se situe à trois niveaux ; tout d'abord, les échantillons récoltés ne sont pas représentatifs de tous les mils de Côte d'Ivoire ; comme le montre la carte des prélèvements, ceux-ci n'ont pas été étendus plus au sud de la zone prospectée ; de ce fait les résultats ne sont pas extrapolables à toute la région qui s'adonne à la culture du mil. Ensuite, le nombre d'échantillons récoltés par ethnie est très inégal et trop faible pour autoriser une interprétation statistique convenable. Enfin, on peut se poser la question de savoir si les faux épils récoltés et la trentaine de graines analysées représentent bien le champ.

- Le manque d'uniformité des techniques culturales : les pratiques culturales ne sont pas identiques chez les Sénoufo ; ainsi les prospecteurs notent que certains paysans sélectionnent leurs semences ; d'autres, pratiquent le démariage ; mais il est dommage que l'on ait pas spécifié les champs dans lesquels ces opérations ont lieu.

Malgré ces restrictions, le critère présence-absence d'un allèle donné nous permet de faire un rapprochement entre nos résultats et ceux de TCHALA (communication personnelle) sur mils du Mali, Sénégal, Cameroun, Togo, Niger et Centrafrique : dans ces pays, les échantillons analysés renferment presque tous les allèles R_1 à R_6 ; ils ne diffèrent des nôtres que par un seul allèle (R_7 au Cameroun et au Niger ; R_8 au Togo ; R_9 au Sénégal). Au Mali, zone de grande culture de mil et au nord de la Côte d'Ivoire, on rencontre les mêmes allèles (R_1 à R_6) ; à la suite de cette comparaison, il semble difficile de trouver un plus grand nombre d'allèles en Côte d'Ivoire, que dans les grands centres de culture du mil (Sénégal, Mali) ; mais cela mérite d'être vérifié par une prospection à plus grande échelle.

B I B L I O G R A P H I E

3°

- ANDERSON, J.W., 1968 - Extraction of enzymes and sub-cellular organelles from plant tissues - *Phytochemistry* vol. 7 : 1973-1988
- AUTRAN, J.C., BOURDET, A., 1975 - L'identification des variétés de blé : établissement d'un tableau général de détermination fondé sur le diagramme électrophorétique des gliadines du grain - *Ann., Amélior., plantes* 25 (3) : 277-301
- BASSIRI, A., ADAMS, M.W., 1978 - Evaluation of common bean cultivar relationships by means of Isozyme electrophoretic patterns - *Euphytica* 27 : 707-720
- BASSIRI, A., 1976 - Barley cultivar identification by use of Isozyme electrophoretic patterns - *Can., J., plant science* vol 56 (1) : 1 - 6.
- BERNARD, M., AUTRAN, J.C., JOUDRIER, P., 1977 - Possibilité d'identification de certains chromosomes de seigle à l'aide de marqueurs biochimiques. *Ann., Amélior., plantes* 27 (3) : 355-362
- BROWN, A.H.D., 1978 - Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation - *theor., Appl., Genet.*, 52 145-157
- BRUNKEN, N., JERE, 1977 - A systematic study of *pennisetum sect. Pennisetum (Gramineae)* - *Amer J. bot.*, 64 (2) : 161-176.
- GARDERON, Y., AUTRAN, J.C., JOUDRIER, PH., KOBREHAL, K., 1978 - Identification des chromosomes d'*Agropyrum intermedium* impliqués dans la synthèse des gliadines, des β -amylases et des peroxydases à l'aide de lignées d'addition blé x Agropyron - *Ann., Amélior., plantes* 28 (3) : 257-267.
- DAVIS, B.J., 1964 - Disc electrophoresis. II - Method and application to human serum proteins - *Ann., N.Y., Academy of sciences* 121 : 404-427
- DE VIENNE, D., 1978 - Variabilité chez une espèce tétraploïde : Analyse Isoenzymatique et biométrique du pollen de quelques familles apparentées de luzerne. *Ann., Amélior., plantes* 28 (3) : 289-307

- DUBAYLE, M.C., 1978 - Mise en évidence de cas de polymorphisme enzymatique chez le mil : *Pennisetum Thyphoidium (Americanum)* - Rapport de D.E.A.
- FEILLET, P., 1965 - Contribution à l'étude des protéines du blé ; Influence des facteurs génétiques, agronomiques et technologiques. Ann., de Tech., agr., vol. 14 n° hors série 1
- FINE, J.M., ROPARTZ, C., 1968 - Techniques d'électrophorèse de zones Edition de la Tourelle.
- GASQUEZ, J., COMPOINT, J.P., 1977 - Mise en évidence de la variabilité génétique Infrapopulation par l'utilisation d'isozymes foliaires chez *Echinochloa crus galli* (L.) P.B. Ann., Amélior., plantes, 27 (2) 267-278
- GOTTLIEB, 1971 - Gel electrophoresis : ~~new~~ approach to the study of evolution - Bioscience vol. 21 n° 18 : 939-944.
- HAMILL, D.E., BREWBAKER, J.L., 1969 - Isozyme polymorphism in flowering plants : IV : the peroxydase Isozymes fo maize (Zea mays) Physiologia plantarum Vol. 22 : 945-958.
- HOUDIARD, P., 1977 - Polymorphisme enzymatique des *Pennisetum*. Rapport d'élève O.R.S.T.O.M.
- HUTTEL, C., RENE, J., 1974 - Compte rendu de la mission préliminaire de prospection du petit mil dans le nord de la Côte d'Ivoire : 13 au 20 décembre 1974.
- JOHNSON, G.B., 1974 - Enzyme polymorphism and metabolism science, vol. 184 : 28-37.
- KAHLER, A.L., ALLARD, R.W., 1970 - Genetics of isozyme variants in barley : I-estérases crop science vol. 10 : 444-448.
- KOEHN, R.K., 1969 - Esterases heterogeneity : dynamics of a polymorphism. Science vol. 165 943-944.

- LABASTE, P., 1977 - Les principales méthodes d'analyse factorielle : caractéristiques et exemples d'utilisation en agro-économie C.I.R.E.S.
- MACKO, V., HONOLD, G.R., STAHMANN, M.A., 1967 - Solubles proteins and multiple enzyme forms in early growth of wheat. *Phytochemistry*, Vol. 6 : 465-471
- MARSHALL, D.R., ALLARD, R.W., 1970 - Isozyme polymorphisms in natural populations of *Avena fatua* and *A. barbata* - *Heredity* 25, 373-382.
- MIEGE, J., 1975 - Les protéines des graines - Georg éditeur.
- MONTAGNE, J.C. - Le savoir faire de l'électrophorèse.
- MOSSE, J., 1973 - Hétérogénéité et polymorphisme de protéines et Isozymes végétales : aspects moléculaires et évolutifs - *Physiol., végét.*, 11 (2) : 361-384.
- PAYNE, R.C., KOSZYKOWSKI, T.J., 1978 - Esterase Isoenzyme in seed extracts among soybean cultivars - *Crop science*, vol. 18 : 557-559.
- PERNES, J., 1975 - Le matériel végétal de départ. Structure des populations naturelles. Techniques de prospection. Observation du matériel récolté. *Agronomie tropicale* x x x (3) : 205-216
- RAIMONDO CUBADDA, ENRICA QUATTRUCCI, 1974 - Séparation by gel electro-focusing and characterisation of wheat esterases - *J., sci. Fd., Agric.*, 25, 417-422.
- SCANDALIOS, J.G., 1964 - Tissue - specific isozyme variations in maize. *Heredit.*, 55 : 281-285.
- SCANDALIOS, J.G., 1974 - Isozymes in development and differentiation *Ann., Rev., plant., physiol.*, 25 : 225-258.
- SCHWARTZ, D., 1964 - Genetic studies on mutant enzymes in maize. IV. Comparison of pH 7,5 esterases synthesized in seedling and endosperm. *Genetics*, vol. 49 (3) : 373-377.

- SCHWARTZ, D., 1965 - Genetics studies on mutant enzymes In maize.
VI. Elimination of allelic Isozyme variation by glyceraldehyde treatment. *Genetics*, 52 : 1295-1302.
- SCHWARTZ, D., FUCHSMAN, L., M.C. GRATH K.H., 1965 - Allelic isozymes of the pH 7,5 esterase In maize - *Genetics* 52 : 1265-1268.
- SHAW, R.C., 1965 - Electrophoretic variation In enzyme - *Science*, vol. 49 : 936-942.
- SHANNON, L.M., 1968 - plant Isoenzymes - *Annual rev., plant., physio.*, vol. 19 : 187-210.
- SINGH, R.S., JAIN, S.K., QUALSET, C.O., 1973 - Protein electrophoresis as an aid to oat variety Identification - *Euphytica* (22) : 98-105.
- SINGH, R.S., JAIN, S.K., 1971 - Population biology of *Avena* - II - Isozyme polymorphisms In populations of the mediterranean region and central California - *Theor., Appl., gen.*, 41 : 70-84.
- STEWART, F.C., LYNDON, R.F., BARBER, J.T., 1965 - Acrylamide gel electrophoresis of soluble plant proteins : a study on pea seedlings In relation to development - *Amer., jour., Bot.*, 52 (2) : 155-164.
- TIGERSTEDT, P.M.A., 1973 - Studies on Isozyme variation In marginal and central populations of *Picea abies* - *Hereditas* 75 : 47-60.
- WILLIAMSON, J.A., KLEESE, R.A., SNYDER, J.R., 1968 - Electrophoretic variation In esterases of three varieties of oats (*Avena sativa*) - *Nature*, vol., 220.
- YADAVA, J.S., CHOWDHURY, J.B., KAKAR, N., NAINAWATEE, H.S., 1979 - Comparative electrophoretic studies of proteins and enzymes of some Brassica species - *Theor., Appl., Gen.*, 54 : 89-91.