

SYSTEMATIQUE VÉGÉTALE. — Variabilité allélique du système Alcool Deshydrogénase (ADH) chez le Mil (*Pennisetum americanum*); mise en évidence de classes d'électromorphes par différentes conditions de migration.

Note de Marie-France Lefranc-Riandey, présentée par Henri Duranton.

Remise le 16 avril 1984, acceptée le 18 juin 1984.

Les alcools déshydrogénases de Mil sont principalement sous la dépendance de deux locis A_1 et A_2 . Le locus A_1 , étudié précédemment par plusieurs auteurs existe sous trois formes alléliques S, F et C. Dans ce travail nous montrons que la variabilité de ce locus nécessite de travailler à deux pH 6 et 8, pour les migrations électrophorétiques. L'utilisation du pH 6 permet le démasquage de deux allèles nouveaux S_2 et S_3 confondus à pH 8 avec un allèle déjà connu : F; et inversement le pH 8 met en évidence l'allèle C_2 confondu avec F à pH 6. L'apparition de l'allèle S_2 à pH 6 nous a amené à distinguer les deux lignées Ligui et 23 DB qui semblaient posséder le même allèle lorsque l'électrophorèse n'était réalisée qu'à pH 8.

Un essai en électrofocalisation pour un gradient de pH de 4 à 6,5 ne nous a pas permis de séparer distinctement ces différents électromorphes.

PLANT SYSTEMATICS. — Alcohol Dehydrogenase (ADH) Allelic Variability in Pearl Millet (*Pennisetum americanum*); Effect of Electrophoresis Conditions on Electromorphic Classes.

ADH in pearl millet are in dependence of two loci A_1 and A_2 . A_1 locus, studied by several authors has 3 allelic forms S, F, C. Here we show that his variability need two pH migrating conditions: 6 and 8. Two new alleles S_2 and S_3 in the same electromorph class that allele F at pH 8, are distinguishable at pH 6. Otherwise the allele C_2 and F are confounded together at pH 6 but are different at pH 8. The detection of allele S_2 permit to separate two inbred lines Ligui and 23 DB that were identical at pH 8. Electrofocusing (pH 4-6,5) do not permit to separate correctly these different electromorphs.

INTRODUCTION. — Le système des ADH du Mil a été étudié par J. M. Leblanc [7a et b] et F. Banuett-Bourillon [1]: ces isoenzymes sont codées par deux locus indépendants A_1 et A_2 . L'électrophorèse à pH 8,4 en gel d'amidon selon Smithies [12] a permis de mettre en évidence trois allèles S, F et C pour le locus A_1 , et deux allèles X et Y pour le locus A_2 . L'association en dimère, (forme enzymatiquement active), se fait aussi bien entre monomères provenant d'un même locus (dimère homogénique) qu'entre monomères provenant de deux locus (dimère hétérogénique). Il y a donc interaction intra et inter locus. D'autre part, l'expression relative des deux loci paraît indépendante, mais dépend de l'état physiologique de l'organe ou de la plante. Sur les électrophorégrammes, ceci aboutit à trois zones d'activité inégale: la zone I, la plus lente, correspondant à l'association des produits du locus A_1 est très intense dans les semences; la zone III, la plus rapide, correspondant au locus A_2 , n'est visible que si l'on active l'ADH par l'anaérobiose; la zone II, intermédiaire, est constituée par les dimères hétérogéniques de $A_1 + A_2$. Son intensité est plus faible que celle de la zone I.

Le polymorphisme enzymatique a été beaucoup décrit aussi bien chez les animaux que chez les végétaux. Bien souvent, pour les études faites par électrophorèse, une seule condition opératoire est retenue. Dans un souci de mettre en évidence un plus grand polymorphisme, et tenant compte du fait que plusieurs isozymes (Markert et Moller [8]) peuvent ne montrer qu'une seule et même bande d'activité ou électromorphe (King et Ohta [6]), nous avons cherché à faire varier les conditions de l'électrophorèse afin de démasquer le cas échéant de nouveaux allèles aux loci codant pour l'ADH du Mil. Dans ce travail, seuls les résultats concernant la zone I, la plus variable sont rapportés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — A. Matériel végétal. — Nous avons utilisé : deux lignées 23 DB et 239 DB₂ (Mils fourragers) sélectionnés à Tifton (U.S.A.), deux autres lignées obtenues par auto-fécondations successives : Ligui, provenant de la station de Bambey (Sénégal) à partir d'un Mil tchadien; Massue, d'origine mal connue qui doit son nom à la forme de ses épis;

P 239 et P 241, 2 cultivars maliens récoltés en 1975 lors des prospections I.B.P.G.R. (1)-O.R.S.T.O.M. (2).

B. *Extraction.* — Les graines sèches sont écrasées une par une sur une plaque à godets. On ajoute ensuite une goutte d'eau distillée, on mélange avec une baguette de verre et l'on imbibe deux confettis de papier « Wathman » n° 1 de cet extrait. Un confetti sera déposé sur une plaque à pH 6 et l'autre sur une plaque à pH 8.

C. *Electrophorèse.* — Aussi bien pour la migration que pour la révélation, la méthode employée est celle de Brewer [5], remaniée par Second et Trouslot [10], pour l'électrophorèse d'enzymes de Riz : plaques d'amidon horizontales à 14 %; tampon de gel : Histidine-HCl 5 mM, pH 6 ou 8, contenant du NaCl 2,5 mM; tampon de bac : respectivement citrate NaOH 0,41 M, pH 6 ou 8. Pour la migration qui dure environ 4 h avec un courant de 9,5 V/cm, les gels d'amidon sont réfrigérés à 5°C. La révélation se fait à 37°C à l'obscurité. Les gels sont immergés dans un mélange contenant 1 ml d'éthanol absolu, 25 mg de NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide), 2 mg de PMS (Phénazine Métho Sulfate) et 20 mg de NBT (Nitrobleu Tétrazolium) pour 100 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5.

RÉSULTATS. — *Étude des quatre lignées.* — 23 DB, 239 DB₂, Massue et Ligui. Ces lignées, déjà étudiées par J. M. Leblanc ont servi de témoins. La figure 1 montre qu'à pH 8, on a bien :

23 DB = 239 DB₂ = Ligui = F,

Massue = S.

Par contre, à pH 6 on a :

23 DB = 239 DB₂ = F,

Massue = S.

Mais Ligui devient alors l'électromorphe le plus lent puisqu'il migre un peu en retrait de Massue avec lequel on pourrait le confondre. Pour cette raison, on a appelé :

Massue = S₁,

Ligui = S₂.

Grâce à l'utilisation du pH 6, on a donc pu démasquer un nouvel allèle et distinguer ainsi la lignée Ligui des lignées 23 DB et 239 DB₂ dont les bandes de migration restent fixes quelque soit le pH.

Étude de deux cultivars maliens (P 239 et P 241). — Les zymogrammes obtenus (fig. 2 et 3) montrent une variabilité supplémentaire à pH 6, surtout pour P 239. En effet, à pH 8, P 239 est homogène sauf pour les n°s 14 et 23. Par contre à pH 6, un grand nombre d'hybrides se trouvent démasqués. On voit également apparaître une bande unique de migration lente (n°s 9 et 23). Nous pensons que cette bande est l'expression d'un nouvel allèle qu'on a appelé S₃. Pour P 241 (fig. 3), il apparaît déjà à pH 8 une certaine variabilité mais elle est plus importante à pH 6.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Pour tous les zymogrammes, le sens de migration se fait de bas en haut.

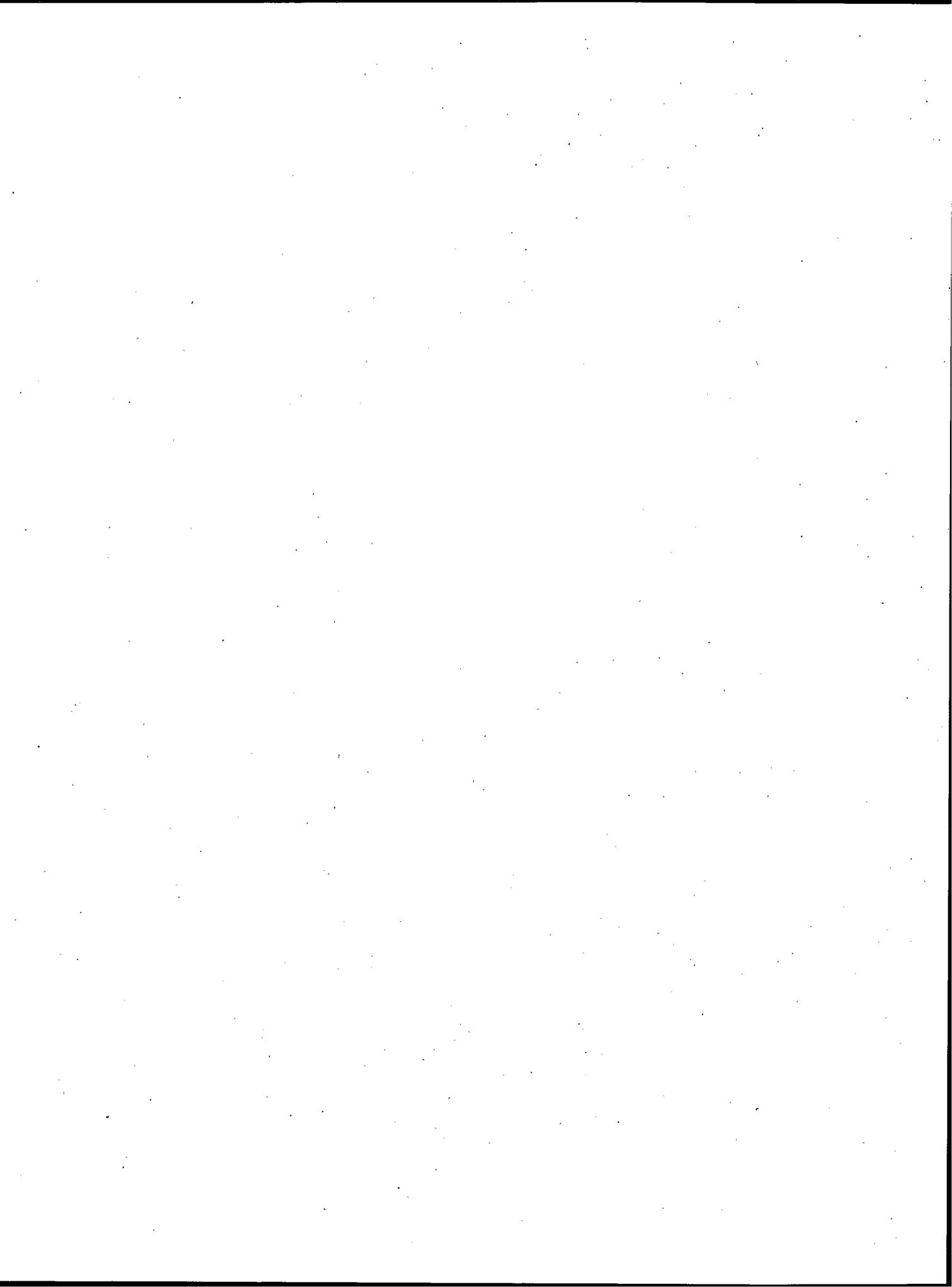
For all zymogram electrophoretic migration goes from bottom to top.

Fig. 1. — De gauche à droite pour les deux pH : 23 DB-239 DB₂-Massue-Ligui.

Fig. 1. — From left to right for the 2 pH: 23 DB-239 DB₂-Massue-Ligui.

Fig. 2. — (P 239) et 3 (P 241) : les plaques sont superposées de façon qu'un zymogramme à pH 8 soit juste au-dessus de son correspondant à pH 6.

Fig. 2. — (P 239) and 3 (P 241): The migration at pH 8 and pH 6 for the same sample is on the same vertical line.



Au vue de ces résultats, on pouvait se demander si l'utilisation du seul pH 6 n'était pas suffisante. Or l'examen de la figure 3 (P 241) montre qu'un hybride visible à pH 8 (n° 2) ne l'est plus à pH 6 (on remarque que cet hybride est nouveau : sa bande supérieure représente un allèle non encore rencontré que nous avons appelé C_2). De même les n°s 11-17-18 et 20 apparaissent comme hybrides à pH 8 alors qu'ils semblent homozygotes à pH 6. En conséquence, il apparaît que si l'on veut mettre en évidence la plus grande variabilité possible, il est indispensable d'utiliser les deux conditions opératoires.

A partir des figures 2 et 3, et compte tenu du fait que les allèles F (23 DB et 239 DB₂) et S₁ (Massue) sont fixes quel que soit le pH, on peut construire le schéma de la figure 4 donnant la place des allèles les uns par rapport aux autres. On peut remarquer que tous les allozymes sensibles au pH sont retardés à pH 6 par rapport à la place qu'ils occupent à pH 8. Il y a donc des charges positives supplémentaires mises en jeu quand on passe à pH 6 et (ou) annulation de charges négatives.

A partir de ce schéma de la figure 4, on a pu déterminer les génotypes de tous les échantillons des figures 2 et 3. L'analyse d'une autre lignée de Mil J 104 obtenue à partir de Mils Indiens nous a montré qu'on avait affaire à l'allèle C_2 (déjà trouvé chez P 241) à l'état homozygote. Nous aurons donc désormais comme témoins :

J 104 = C_2 ,
 23 DB = F,
 Massue = S₁,
 Ligui = S₂.

Le pH étant responsable du démasquage des allèles, nous avons voulu voir s'il était possible d'utiliser l'électrofocalisation pour obtenir une séparation équivalente ou même meilleure. Pour cela nous avons utilisé un gel d'acrylamide LKB (3) dans une gamme de pH allant de 4 à 6,5. Pour les quatre lignées témoins nous avons pu approximativement déterminer les points isoélectriques des bandes majeures. Ils se trouvent aux alentours de 5 mais la distance séparant certains électromorphes les uns des autres est trop faible pour permettre de lire sans ambiguïté les zymogrammes, surtout lorsque l'on a affaire à des populations. Un essai à pH 7 ne nous a pas non plus apporté d'amélioration, la place des allèles les uns par rapport aux autres est la même qu'à pH 6. On observe seulement des zymogrammes moins étalés : Massue et Ligui sont pratiquement confondus à pH 7. Par la suite, nous avons donc conservé les deux pH 6 et 8 pour les criblages.

L'étude aux deux pH d'une cinquantaine de cultivars provenant de différents pays d'Afrique de l'ouest : Sénégal, Mali, Niger, Togo, Côte-d'Ivoire, Bénin, Cameroun, R.C.A., a confirmé la présence d'allèles nouveaux démasqués par les conditions expérimentales nouvelles. L'analyse de leur fréquence très variable est actuellement en cours.

DISCUSSION ET CONCLUSION. — Grâce à cette technique, nous avons révélés des allèles nouveaux en ce qui concerne les ADH. Parmi la dizaine d'enzymes étudiées (CAT, EST, IDH, GOT, MDH, PGD, PGI, PGM, SKDH), pour une seule la phospho-glutomutase (PGM), nous avons également pu mettre en évidence un allèle nécessitant l'analyse aux deux pH pour être détecté.

Mais d'autres méthodes : dénaturation thermique (Bernstein et coll. [3]), analyse de séquence d'acides aminés (Boyer [4]) ont montré d'une part que chaque niveau électrophorétique peut apparaître comme composite et d'autre part que les substitutions pouvaient être électrophorétiquement silencieuses, ce qui montre les limites de la technique d'électrophorèse.

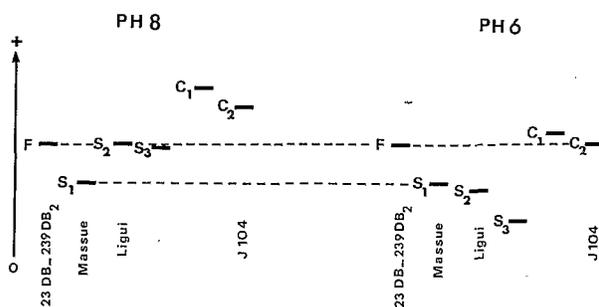


Fig. 4. — Position relative des différents allèles suivant le pH.

Fig. 4. — Allele relative position for each pH.

Cependant, Ramshaw et coll. [9], utilisant plusieurs conditions d'électrophorèse à la suite les unes des autres (Méthode séquentielle d'électrophorèse) ont montré qu'ils pouvaient détecter de 85 à 90 % des substitutions connues sur les 20 hémoglobines étudiées, alors que l'électrofocalisation pour les hémoglobines (Basset et coll. [2]) et la dénaturation thermique pour la xanthine déshydrogénase de la drosophile (Singh et coll. [11]) n'aboutissent pas à une meilleure séparation.

Donc dans l'état actuel de nos connaissances sur les ADH du Mil, la modification du pH de l'électrophorèse semble être une bonne approche nous permettant de repérer d'une manière simple un plus grand polymorphisme des gènes de structure. Il est indispensable de travailler aux deux pH car l'utilisation du pH 6 fait ressortir les allèles cachés à pH 8 et inversement le pH 8 démasque les allèles non visibles à pH 6. De plus, cela nous a permis de faire la distinction entre deux lignées telle que Ligui et 23 DB qui étaient confondues lorsque l'analyse n'était réalisée qu'au seul pH 8.

- (¹) I.B.P.G.R. : International Board for Plants Genetic Resources.
 (²) O.R.S.T.O.M. : Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer.
 (³) « Ampholine PGA plate » 1804-102 de dimensions 245 × 110 × 1 mm.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] F. BANUETT-BOURILLON et D. R. HAGUE, *Biochemical Genetics*, 17, 1979, p. 537-552.
 [2] P. BASSET, Y. BEUZARD, M. C. GAREL et J. ROSA, *Blood*, 51, 1978, p. 971-982.
 [3] S. C. BERNSTEIN, L. H. THROCKMORTON et J. L. HUBBY, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70, 1973, p. 3928-3931.
 [4] S. BOYER, *XVII^e Congrès International de Zoologie*, 1972, thème n° 5, p. 1-32.
 [5] G. J. BREWER, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1970, 185 p.
 [6] J. L. KING et T. OHTA, *Genetics*, 79, 1975, p. 681-691.
 [7] J. M. LEBLANC (a) *Thèse*, Paris-XI-Orsay, 1978, (b) *Japan J. Genetics*, 58, 1983, p. 121-131.
 [8] C. L. MARKERT et F. MOLLER, *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.*, 45, 1959, p. 753-763.
 [9] J. A. M. RAMSHAW, J. A. COYNE et R. C. LEWONTIN, *Genetics*, 93, 1979, p. 1019-1037.
 [10] G. SECOND et P. TROUSLOT, *Travaux et Documents de l'O.R.S.T.O.M.*, 120, 1980, 88 p.
 [11] R. S. SINGH, R. C. LEWONTIN et A. A. FELTON, *Genetics*, 84, 1976, p. 609-629.
 [12] O. SMITHIES, *Biochem. J.*, 61, 1955, p. 629-641.

O.R.S.T.O.M., Laboratoire d'Électrophorèse, 70, route d'Aulnay, 93140 Bondy.