

## CHAPITRE IV

### QUELQUES ILLUSTRATIONS DE L'UTILISATION DES MARQUEURS ENZYMATIQUES CHEZ LE MIL

M. SANDMEIER, S. PILATE-ANDRÉ et E. MÉTIVIER  
Laboratoire d'Evolution et Systématique Végétales, Bâtiment 362  
Université de Paris Sud ; 91405 Orsay Cedex.

La mise au point de méthodes de séparation et de caractérisation des allozymes chez le mil a permis de mettre en évidence 60 loci différents, dont les 4/5 sont polymorphes. Cet outil a été utilisé dans divers domaines :

- **La biologie reproductive du mil** : analyse des compétitions polliniques, overlapping, distorsion de ségrégation ou détermination du taux d'autofécondation ;
- **La gestion des ressources génétiques** : variations spatio-temporelles du pool pollinique en conditions naturelles, flux de gènes entre les compartiments sauvages et cultivés, structuration de la variabilité des populations naturelles et cultivées ;
- **L'analyse génétique** : la domestication, considérée comme un modèle dans l'évolution et la cartographie du génome.

Après une introduction rappelant les avantages et les inconvénients de la méthode, trois exemples sont développés : structure génétique des populations de mils africains, variations spatio-temporelles du nuage pollinique et détermination du taux de selfing.

#### I - INTRODUCTION

La précision d'une mesure dépend de la fiabilité de l'outil utilisé. Dans le cas de la variabilité génétique, le généticien des populations doit avoir à sa disposition des outils lui permettant de caractériser la variabilité génétique dont la source se trouve au niveau des gènes. Pendant longtemps, elle a été mesurée à partir de caractères morphologiques dont le déterminisme génétique est souvent polygénique, de plus, l'expression de ces gènes est souvent modifiée par les conditions environnementales dans lesquelles poussent les plantes. Depuis quelques années, on a à notre disposition un certain nombre d'outils complémentaires, qui permettent d'affiner la mesure de la diversité génétique. On peut citer les 5 catégories suivantes : les allozymes, les protéines, révélées souvent en conditions dénaturantes par électrophorèse bi-dimensionnelle, des marqueurs chimiques dont le déterminisme génétique est simple, comme par exemple les terpènes, des marqueurs chromosomiques : les différents banding ou l'hybridation *in situ*, des marqueurs révélés directement au niveau de l'ADN, permettant de révéler la variabilité de l'ensemble du génome, (les RFLP par exemple).

## II - RESULTATS

### A - Quelques généralités sur les allozymes

Découverts en 1957 par Hunter et Markert, les allozymes possèdent les avantages suivants :

- ils sont sous la dépendance de 1 ou 2 loci au maximum ; un petit nombre d'étapes est nécessaire pour traduire et transcrire le code génétique en protéines, ce qui évite des avatars post traductionnels ;
- beaucoup d'entre eux possèdent des allèles codominants permettant d'apprécier l'hétérozygotie ou de tester la panmixie des populations ;
- leur expression dépend peu des conditions environnementales de croissance des plantes ;
- leur mise en évidence est simple et peu onéreuse.

Ils présentent quelques inconvénients dont les principaux sont les suivants :

- on ne peut pas mettre en évidence la totalité de la variabilité génétique du fait de la dégénérescence du code génétique ou de l'absence de séparation des isozymes dont la charge électrique est identique ;
- on ne mesure la variabilité génétique que sur la fraction du génome codant pour des protéines ;
- la variabilité intronique n'est pas prise en compte.

Dans le groupe d'Orsay, des méthodes de séparation et de révélation des allozymes ont été mises au point. L'analyse génétique de ces marqueurs a été, en partie, réalisée. Cet outil a été largement utilisé pour aborder des problèmes de biologie et génétique des populations.

### B - Les marqueurs allozymiques mis en évidence chez le mil

Le tableau 1, tiré d'un travail de Trigui *et al.* (1986) complété par des données plus récentes, fournit la liste des marqueurs enzymatiques que nous avons inventorié chez le mil. Dans ce tableau, pour un locus donné, les allèles sont classés suivant leur mobilité électrophorétique, l'allèle 1 étant le plus lent. Le signe (-), indique que les allèles de ce locus migrent vers la cathode. \* : Allèle le plus fréquent ; 0 : Allèle récessif.

Ils représentent 60 loci, dont 12 sont monomorphes, les 48 loci polymorphes présentent 117 allèles différents. L'analyse génétique a été réalisée pour 32 d'entre eux, 20 ont des allèles codominants. La totalité de ces allozymes est révélée à partir d'extraits de feuilles ou de germinations étiolées, certains loci n'étant fonctionnels que dans l'un ou l'autre de ces organes. Un certain nombre de groupes de liaisons ont pu être constitués (Tostain 1985, Tostain et Riandey 1985, GPDP 1985). Ils ne concernent qu'une vingtaine de marqueurs, et nous ignorons sur quels chromosomes ils sont placés. De nombreuses études ont utilisé les marqueurs enzymatiques, nous ne pouvons pas toutes les citer, en voici quelques unes : l'overlapping (Trihn 1990), les compétitions gamétophytiques et les distorsions de ségrégation (Sarr 1987, Robert *et al.* 1989), la cartographie du génome du mil et notamment des gènes responsables de la domestication (Rey-Herme 1982, Joly 1984 et Pernès 1985), la structuration génétique des populations de mils africains (André-Pilate 1992), l'hétérogénéité spatio-temporelle des

nuages polliniques (Métivier, 1986 ; Cherkaoui, 1986 ; Cherid, 1986) ou la détermination des taux d'autofécondation chez le mil ; on développera plus particulièrement ces trois derniers points.

Liste des marqueurs enzymatiques chez le Mil

Enzyme	Locus	Allèle	Enzyme	Locus	Allèle	
Ak	A	0,1	POX CAT	-K	0*,1	
	B	0,1		-J	0,1*	
	C	1*		-I	0,1*	
ADH	A	1,2*,3		-H	0*,1	
	B	1,2*,3		-G	0,1	
CAT	A	1,2		-F	1*	
				-E	0*,1	
DIA	A	1,2		-D	0,1	
	B	1,2,3		-C	0,1	
END	A	1		-B	0,1	
				-A	0,1	
EST	A	0*,1	POX AN	A	0*,1	
	B	0,1*		B	0,1*	
GOT	C	0,1*		C	0*,1	
	D	0*,1		D	0*,1	
	E	1,2,3,4,5,6		E	0*,1	
HEXO	A	1,2*		F	1*	
	B	1*		G	0*,1	
				H	0,1*	
ICD	A	1,2*,3	PHOS	A	0*,1	
				B	1*	
				C	1*	
LAP	A	1,2,3		D	0*,1	
				E	0*,1	
MDH	-A	1,2		F	0*,1	
	A	1,2*3	6-PGD	A	1,2*,3	
B	1,2,3*,4,5	B		1,2*		
		C		1*		
	mmm	0*,1	PGI	A	1,2*,3,4*,5	
				PGM	A	1,2*,3,4*
					SOD	A
			B	1,2		
			C	1*		

### C - Structure génétique des populations de mil

Ces résultats sont tirés des travaux réalisés par une vingtaine d'auteurs dont les principaux furent : Pilate-André, Leblanc, Sandmeier, Tazi et Trigui. Ils complètent les analyses faites sur le même sujet, mais sur des populations différentes par Tostain *et al.* (1987 et 1989).

Les résultats montrés dans la figure 1 (dendrogramme construit à partir de la distance de Nei) ont été obtenus à partir de l'analyse de 15 loci différents sur 63 populations. L'analyse de ces résultats permet de formuler les remarques suivantes :

1) La diversité génétique est structurée en trois zones géographiques : l'Afrique de l'Ouest, l'Afrique Centrale et l'Afrique de l'Est ; les deux premières zones présentent un certain nombre d'interpénétrations alors que le groupe de l'Afrique de l'Est est bien différencié.

2) Les formes sauvages, issues pour leur quasi totalité d'Afrique de l'Ouest ne forment pas une entité structurée : elles se retrouvent au sein des populations de l'Afrique de l'Ouest. Elles ont été comparées à des cultivars récoltés dans les mêmes villages ; on peut voir que ces couples sauvage-cultivé sont très proches génétiquement, à l'exception de l'un d'eux originaire du Cameroun.

3) La variabilité intrapopulation représente environ 75 % de la variabilité totale, la variabilité entre les populations est donc faible (Pilate-André 1992).

La répartition des 3 allèles du locus ADH A chez le mil présente un cline est-ouest et nord-sud attesté par les coefficients de corrélation calculés entre la longitude ou la latitude de récolte des cultivars et la fréquence de chaque allèle (195 populations récoltées dans 21 pays africains) :

Allèle	A1	A2	A3
Latitude	0,102 ns	- 0,585**	0,610**
Longitude	0,219*	-0,578**	0,521**

(ns : Non significatif ; \* p comprise entre 0,05 et 0,01 ; \*\* p < 0,01)

La répartition des fréquences alléliques montre que l'allèle A2 est largement majoritaire à l'ouest et au nord de l'Afrique, quand on descend vers le sud, à partir du Mali, son hégémonie est contestée : au Bénin et au Togo, A3 est alors majoritaire. En Afrique Centrale, on observe une zone où A1 est majoritaire (Soudan et Tchad), mais sa zone d'influence est étroite. En Afrique de l'Est, A3 est majoritaire et les populations de la Tanzanie insulaire sont pratiquement monomorphes ( fréquence de A3 = 0,95).

Ce cline est-il le résultat de plusieurs centres de domestication du mil, d'effets fondateurs, ou d'une particularité physiologique (résistance à l'anoxie) des plantes possédant un allèle particulier ? Des analyses plus fines doivent être conduites pour répondre à cette question, cependant les coefficients de corrélation calculés entre la latitude et la longitude d'une part, et les fréquences alléliques d'autre part, pour des populations récoltées sous les mêmes isohyètes restent très largement significatifs.

### D - Variations spatio-temporelles du pool pollinique

Lors d'une prospection au Mali, Sandmeier *et al.* (1986), ont récolté à Sandaré, dans un champ sur pieds, 10 chandelles dont l'emplacement a été noté avec précision. Les plantes avaient un phénotype cultivé pour 5 d'entre elles, 3 étaient des chibras et 2 avaient le phénotype sauvage.

Ces épis ont été considérés comme des capteurs de pollen et on a pu ainsi, connaissant le génotype maternel, déterminer la composition allélique du nuage pollinique entourant la chandelle au moment de sa fécondation (Métivier 1986). Pour les 4 locus analysés, on a comparé l'homogénéité des nuages polliniques soit en fonction du compartiment biologique de la plante mère soit de l'emplacement des épis dans la parcelle. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 2, d'où on peut tirer les remarques suivantes : le nuage pollinique entourant les chibras ou les sauvages est homogène pour 3 loci sur les 4 analysés, par contre pour le compartiment cultivé, on observe une très forte hétérogénéité du pool pollinique, cette situation se confirme pour l'ensemble des chandelles. En ce qui concerne les couples ou le trio de plantes ayant poussé côte à côte, on observe également une très forte hétérogénéité du nuage pollinique.

**Tableau 2**

Hétérogénéité du nuage pollinique dans un champ de mil traditionnel à Sandaré (Mali), d'après Métivier 1986

#### a) Au sein des compartiments biologiques

Compartiment biologique	Nombre de chandelles	Allozyme			
		CAT	PGI	PGM	EST
sauvage	2	0,1ns	0,4ns	4,4ns	35,1**
cultivé	5	69,0**	44,8**	30,3**	66,2
chibra	3	6,8ns	4,1ns	0,1ns	24,0**
ensemble des chandelles	10	104,5**	57,3**	159,1**	175,2**

#### b) Entre les individus ayant poussés côte à côte

Coupe ou trio	Allozymes			
	CAT	PGI	PGM	EST
Chibra et cultivé	15,7**	14,6**	0,9ns	2,3ns
Sauvage, chibra et cultivé	7,1**	34,5**	46,5**	20,7**
Chibra et cultivé	8,1**	9,9**	0,1ns	11,0**

Les Chi<sup>2</sup> sont calculés sous l'hypothèse que les valeurs des fréquences alléliques de chaque pool pollinique est semblable à la valeur moyenne.

\*\* :  $p > 0,01$  ; ns :  $p < 0,05$  ; CAT : catalase ; PGI : phosphoglucoisomérase ; PGM : phosphoglucomutase ; EST : estérase.

On voit donc que dans un champ, ensemencé avec la même population, il se forme des micropopulations différenciées génétiquement, cette différenciation est fonction de l'emplacement de la plante dans le champ et vraisemblablement de sa date de floraison. Ce résultat est important à considérer dans le cadre d'une gestion dynamique des ressources génétiques : des précautions insuffisantes dans l'échantillonnage pouvant amener des modifications dans la composition génétique des populations.

#### **E - Détermination du taux d'autofécondation (AF)**

Des plantes tests possédant un allèle particulier au locus ADH A ont été réparties dans une parcelle emblavée par des plantes possédant un autre allèle. Sur les chandelles des plantes tests, on a pu déterminer le taux d'AF en comptant, dans la descendance, le nombre de graines homozygotes pour le locus ADH A (Sandmeier 1993). Notons que la distance de migration du pollen des plantes tests est faible, en effet les plantes situées à 0,5 mètre (les voisines immédiates des plantes tests) ont 10% de leurs graines fécondées par le pollen des plantes tests, ce pourcentage baisse à 3 % pour les plantes placées à 1 m. (deuxième ligne) alors que pour celles de la troisième ligne ce taux tombe à 0,2 %.

Les taux d'AF sont donnés dans le tableau 3, d'où l'on peut tirer les remarques suivantes :

- Les taux d'AF varient de 2,1 à 21,7 % soit de 1 à 10. Sur les 6 plantes tests ayant produit plusieurs chandelles, 5 d'entre elles ont des taux d'AF semblables bien que les conditions de floraison soient très différentes.
- On n'a pas trouvé de corrélations entre la densité du pool pollinique qui varie de 1 à 10, la date de floraison ou l'écart protogynique d'une part et le taux d'autofécondation d'autre part. Ces résultats suggèrent qu'il existe un système génétique favorisant l'autofécondation chez certains génotypes comme cela a été montré par Sarr (1987). Des expériences complémentaires devraient nous renseigner sur l'héritabilité du phénomène.

### **III - CONCLUSIONS**

Ce bref survol de l'utilisation des allozymes chez le mil a permis de montrer que cet outil pouvait être utilisé de multiples manières malgré ses limites. Une amélioration de l'outil doit être poursuivie, notamment en réalisant l'analyse génétique de la totalité des loci et en déterminant les groupes de liaisons permettant ainsi d'obtenir une véritable carte chromosomique du mil intégrant les données obtenues avec les marqueurs moléculaires. Par contre il sera difficile d'augmenter le nombre de marqueurs, nous ne pensons pas pouvoir ajouter plus de 15 nouveaux loci. L'utilisation de cet outil a permis des apports conceptuels importants dans l'étude de la biologie reproductive, de la gestion des ressources génétiques, de l'histoire de la domestication et des flux de gènes au sein du pool génique primaire du mil. Il est complémentaire des méthodes de biologie moléculaire (cf. Pilate-André, Chapitre V de ce document).

**Tableau 3**  
Taux d'autofécondation (AF) chez le mil  
(d'après Sandmeier 1993)

Plante (1)	% d'AF (2)	Chi <sup>2</sup>
43 <sub>1</sub>	21,7	-
51 <sub>1</sub>	6,3	1,56 (ns)
51 <sub>2</sub>	3,1	(2ddl)
51 <sub>3</sub>	3,2	
58 <sub>1</sub>	17,9	3,51 (ns)
58 <sub>2</sub>	19,3	(3ddl)
58 <sub>3</sub>	20,3	
58 <sub>4</sub>	12,5	
146 <sub>1</sub>	10,5	8,26 (**)
146 <sub>3</sub>	2,2	(1ddl)
151 <sub>1</sub>	14,6	0,3 (ns)
151 <sub>2</sub>	18,8	(1ddl)
156 <sub>1</sub>	5,3	3,1 (ns)
156 <sub>2</sub>	12,6	(2ddl)
156 <sub>3</sub>	10,5	
243 <sub>1</sub>	5,5	-
251 <sub>1</sub>	7,3	3,48 (ns)
251 <sub>2</sub>	2,1	(2ddl)
251 <sub>3</sub>	3,3	
258 <sub>1</sub>	13,3	-

(1) : Les différents index représentent les différentes chandelles sur les plantes test.

L'épis 1 est le plus précoce, l'épis 2 le second à fleurir *etc.*.

(2) : Test d'homogénéité du Chi<sup>2</sup> : ns : non significatif à 5% ; \*\* : significatif au seuil de 1%.

### BIBLIOGRAPHIE

JOLY-ICHENHAUSER (H.), 1984. Héritéité du syndrome de domestication chez le mil *Pennisetum typhoides* (Burm.) Stapf et Hubb. : étude comparée de descendances (F2 et rétrocroisements) issues de croisements entre plusieurs géniteurs cultivés et spontanés. Thèse, université de Paris-Sud.

- LE THI (K.), 1990. Génétique du gamétophyte mâle du mil (*Pennisetum typhoides* Stapf et Hubb.) : relations entre l'overlapping et l'organisation de la variabilité génétique des plantes haploïdes doublées (HD) issues de culture d'anthères. Thèse, Univ. Paris-Sud.
- MÉTIVIER (E.), 1986. Etude des échanges géniques en conditions naturelles entre mils sauvages et cultivés dans le village de Sandaré (Mali). DEA. Université de Paris.
- PERNÈS (J.) 1985. Evolution des plantes cultivées : l'exemple des céréales. C. R. Acad. Sci., série générale. 2 : 429-447.
- PILATE-ANDRÉ (S.), 1992. Etude de l'organisation de la diversité génétique du complexe des mils pénicillaires (*Pennisetum* ssp.) par les marqueurs enzymatiques et par l'analyse moléculaire de la région Adh. Thèse, université de Paris-Sud.
- REY-HERME (C.) 1982. Les relations génétiques entre les formes spontanées et cultivées chez le mil (*Pennisetum* sp.). Thèse, université de Paris-Sud.
- ROBERT (T.), SARR (A.) et PERNÈS (J.), 1989. Sélections sur la phase haploïde chez le mil (*Pennisetum typhoides* (Burm, Stapf et Hubb.) : effet de la température. 32 : 946-952.
- SANDMEIER (M.), 1993. Selfing rates of Pearl Millet (*Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb.) in natural conditions. Theor. Appl. Genet. (in press).
- SANDMEIER (M.), PILATE-ANDRÉ (S.) et PERNÈS (J.), 1986. Relations génétiques entre les populations de mils sauvages et cultivés : résultats d'une enquête au Mali. J. Agric. Trad. et Bot. Appl. 33 : 69-89.
- SARR (A.) 1987. Analyse génétique de l'organisation reproductive du mil (*Pennisetum typhoides* Stapf et Hubb.). Implications pour son amélioration et la gestion des ressources génétiques; Thèse, université de Paris-Sud.
- TOSTAIN (S.), 1985. Mise en évidence d'une liaison génétique entre un gène de nanisme et des marqueurs enzymatiques chez le mil pénicillaire (*Pennisetum glaucum*). 1985. Canad. J. Cytol. 27 : 751-758.
- TOSTAIN (S.) et RIANDEY (M.F.), 1985. Polymorphisme et déterminisme génétique des enzymes du mil pénicillaire (*Pennisetum glaucum*). Etude des malates déshydrogénases. Agronomie. 3 : 227-238.



- TOSTAIN (S.), RIANDEY (M.F.) and MARCHAIS (L), 1987. Enzyme diversity in pearl millet (*Pennisetum glaucum*). 1. West Africa. *Theor. Appl. Genet.* 74 : 188-193.
- TOSTAIN (S.) and MARCHAIS (L.), 1989. Enzyme diversity in pearl millet (*Pennisetum glaucum*). 2. Africa and India. *Theor. Appl. Genet.* 77 : 634-640.
- TRIGUI (N.), SANDMEIER (M.), SALANOUBAT (M.) et PERNÈS (J.), 1986. Utilisation des données enzymatiques et morphologiques pour l'étude des populations et de la domestication des plantes : I Séparation et identification génétique d'isozymes chez le mil (*Pennisetum typhoides* Burm. Stapf et Hubb.). *Agronomie.* 6 : 779-788.

Distance de Nei

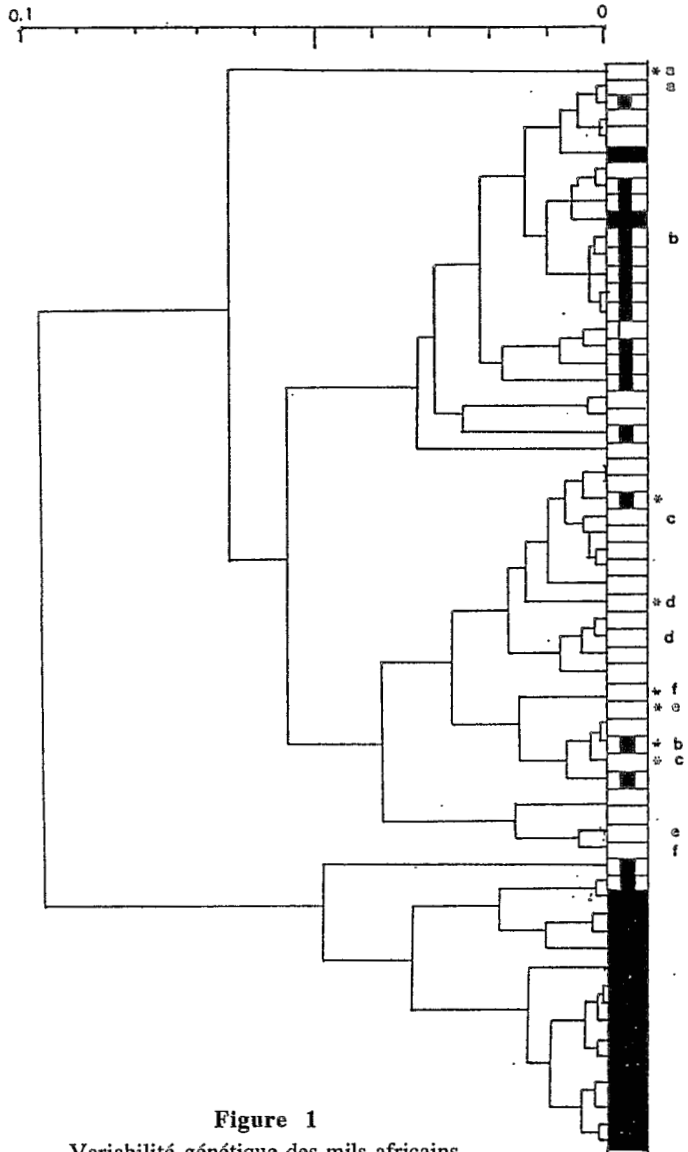


Figure 1

Variabilité génétique des mils africains

: Afrique de l'Ouest (Mauritanie, Sénégal, Mali, Burkina Faso)

: Afrique Centrale (Soudan, RCA, Cameroun, Niger)

: Afrique de l'Est (Kenya, Zambie, Tanzanie, Ouganda)

\*: Mils sauvages

Les lettres indiquent des couples (sauvage-cultivé) récoltés dans le même village.