

THÈSE DE 3ÈME CYCLE

---

JEAN MARC LEBLANC

---

ÉTUDES SUR LE SYSTÈME DES ALCOOLDÉSHYDROGÉNASES DU  
MIL : *PENNISEUM TYPHOIDEUM (AMERICANUM)* .

1978

# S O M M A I R E

Page :

INTRODUCTION .....	1
MATERIEL ET METHODES .....	5
I. Matériel végétal .....	5
A. Présentation de la plante - lignées utilisées ..	5
B. Culture du matériel végétal et caractéristiques des différents organes .....	7
1. Le pollen .....	7
2. La graine en germination .....	7
3. Les cals .....	8
4. Les plantes entières .....	10
II. Méthodes d'études .....	10
A. Conditions d'extractions .....	10
B. Préparation des extraits .....	10
1. Extrait à partir des farines de graines ..	10
2. Extrait à partir du pollen .....	11
3. Extrait à partir d'autres types d'organes.	11
C. Cinétiques enzymatiques .....	11
D. Techniques d'électrophorèse .....	11
E. Supports de migration (composition des gels et techniques appropriées) .....	12
F. Technique de révélation .....	14
G. Elution de l'ADH .....	16
H. Discussion .....	16
CHAPITRE I : ANALYSES GENETIQUES .....	18
I. Résultats des électrophorèses - Etude mendélienne ...	18
A. Introduction - Terminologie .....	18
B. Etudes des zymogrammes .....	19
1. Détermination de formes distinctes d'ADH .	19
2. Existence de différentes formes alléliques du gène A <sup>1</sup> .....	21
C. Etude mendélienne de la descendance d'un croisement	25

D. Conclusions .....	28
II. Modèle de génétique des populations avec sélection gamétique et zygotique antagonistes .....	29
A. Sélection gamétique .....	29
B. Sélection zygotique .....	30
CHAPITRE II : VARIATIONS FONCTIONNELLES DES DIFFERENTS ISOZYMES .....	33
I. Alcooldéshydrogénase et anaérobiose .....	33
II. Activités enzymatiques .....	35
A. Etude des conditions d'activation de l'ADH .....	35
1. Activité alcooldéshydrogénase lors de la morphogénèse .....	36
2. Induction par conditionnement en atmos- phères particulières .....	38
B. Etude des protéines homodimères des zones I et III	41
III. Modifications liées au type allélique du locus 1..	43
A. En absence d'activation .....	43
B. Conditions particulières .....	43
1. Observation électrophorétique .....	43
2. Activation globale .....	44
3. Discussion .....	45
C. Effet sur les hétérodimères de la zone II .....	46
D. Conclusion .....	47
CHAPITRE III : LE MIL DANS DES CONDITIONS D'ANAEROBIOSE .	49
I. Définition de l'anaérobiose .....	49
II. Respiration de la semence de mil .....	50
III. Comportement de la semence de Mil en hypoxie .....	51
IV. Discussion .....	55
CONCLUSION GENERALE .....	59
BIBLIOGRAPHIE .....	63

## I N T R O D U C T I O N

Le problème majeur du sélectionneur est devenu actuellement la conservation et l'évaluation des ressources génétiques dont il dispose .

L'expérimentateur impose, malgré lui et obligatoirement, une dérive de son matériel en multipliant sa collection dans des conditions de milieu et de reproduction qui ne sont pas celles rencontrées par les cultivars ou les écotypes originaux. Cette modification du pool génique de départ a une grande importance pour les possibilités de réalisation de variétés nouvelles qui en seront issues .

Il est donc particulièrement important d'étudier la nature de cette dérive ; une élimination systématique serait particulièrement néfaste à l'entretien de ces collections .

Cette question a été abordée sur le Mil : *Pennisetum typhoides (americanum)* , pour lequel une collecte mondiale des variétés traditionnelles et des formes sauvages est en cours (Programme IBPGR-ORSTOM) .

Pour cette étude, nous disposons ainsi d'un grand nombre de types morphologiques, réservoir de polymorphisme important pour nombre de caractères évidents .

Cette plante cultivée est souvent voisine en Afrique de son homologue sauvage; des échanges géniques importants peuvent avoir lieu, permettant une forte variabilité pour certains caractères enzymatiques. La tendance du cultivateur à choisir des plantes principa-

lement en fonction de caractères morphologiques souvent liés à des caractères de production, n'empêche pas la conservation de cette importante variabilité cachée. Le polymorphisme, peut-être fondamental pour l'adaptation d'ensemble, serait stocké chez les formes sauvages et transféré grace aux hybrides interspécifiques spontanés .

L'étude du polymorphisme de l'ADH (alcooldéshydrogénase) dans une collection de lignées et dans une série de cultivars traditionnels a permis d'aborder les problèmes posés par la réalisation et l'entretien des collections, en étudiant d'abord l'hérédité des différents isozymes et la diversité allélique pour les deux loci mis en évidence dans les différents types de matériel (lignées, cultivars).

Certaines distorsions de ségrégations et des désaccords observés entre les polymorphismes des deux types de collection, nous ont conduit à étudier certains aspects fonctionnels en contrôle de cet enzyme. L'ADH est très spécialisé dans le contrôle de la voie suivante :



dont nous verrons l'incidence dans les situations d'asphyxie qu'une plante peut rencontrer. Ce système est très étudié à différents niveaux tant chez les plantes que chez les animaux. Nous tenterons ici, à travers l'exemple du Mil, qui n'avait encore jamais été étudié, de lier divers aspects de l'étude de l'ADH : hérédité mendélienne, structure du polymorphisme des populations, régulations métaboliques en anaérobiose .

Cette approche permettra de suggérer un rôle important du système ADH dans l'adaptation aux alternances d'inondation et de sécheresse. Ces alternances sont assez typiques des effets de la saison des pluies sur les sols pauvres et sableux, terrains de culture du Mil en zone sahélienne .

DONNEES GENETIQUES SUR L'ALCOOLDESHYDROGENASE CHEZ D'AUTRES ORGANISMES QUE LE MIL .

L'étude de l'alcooldéshydrogénase sur le Maïs (*Zea mays*) a révélé l'existence de diverses formes alléliques d'un même gène ( SCHWARTZ et ENDO , 1966 ) , mis en évidence par la présence chez les individus homozygotes d'une bande bien déterminée .

En 1972, FREELING et SCHWARTZ ont étudié les relations génétiques entre les multiples formes isoenzymatiques de l'ADH du Maïs ; leur modèle fut par la suite vérifié sur d'autres espèces végétales (FREELING et SCHWARTZ, 1973) : Blé (HART, 1970 et 1971), Lupin (MARSHALL et BROVE, 1974), une espèce diploïde de *Clarkia* (GOTTLIEB, 1974), le Tournesol *Helianthus annuus* (TORRES, 1974) et l'espèce *Carthamus* L. (DUCET, 1973) .

La signification adaptative des isozymes de l'alcooldéshydrogénase est un débat qui reste ouvert. On a pu montrer chez *Drosophila melanogaster* une variation des sujets vis à vis de la tolérance à l'alcool ( DAVID , 1977 ). Un cline\* dans les fréquences des 2 types alléliques F et S, a pu être lié aux élévations de teneurs en alcool des fermentations artificielles dues à des activités humaines. La différence adaptative constatée ( BARNES et BIRLEY, 1975) semble plus liée à des différences de régulation enzymatique ( MC DONALD et AYALA , 1978 ) qu'aux différences structurelles proprement dites révélées par les différences de migrations électrophorétiques. Des résultats analogues dans les répartitions des fréquences alléliques ont été mis en évidence chez *Bromus mollis* L. ( BROWN et MARSHALL , 1974 et 1976), mais bien entendu en fonction de paramètres de milieu différents. L'étude des coefficients d'affinité montrent que l'ADH fonctionne préférentiellement chez les végétaux dans le sens aldehyde → alcool ( LEBLOVA et PERGLEROVA, 1977), et les propriétés adaptatives supposées concernant les phénomènes d'asphyxie (MC MANNON, CRAWFORD, 1971). Le rôle adaptatif de l'alcooldéshydrogénase est encore controversé (MARSHALL et BROUE, 1973, 1974 ; WIGNARAJAH et GREENWAY , 1976a et b) .

La généralité des structures mises en évidence chez les plantes de familles très variées et leurs identités avec celles observées

---

\* cline : gradient de fréquences alléliques associé à un gradient géographique .

chez le Mais (FREELING, 1973 ; SCANDALIOS, 1969 a et b ; SCHWARTZ, 1971b) souligne l'intérêt de ce système .

Nous verrons qu'il est également en œuvre chez le Mil, avec des niveaux d'activation et un polymorphisme d'isozymes remarquables, tels que cette plante puisse paraître un des meilleurs supports expérimentaux pour son analyse .

## MATERIEL.....ET.... METHODES

### I. MATÉRIEL VÉGÉTAL

#### A. PRESENTATION DE LA PLANTE - LIGNEES UTILISEES .

Le Mil : *Pennisetum typhoideum (americanum)* est une graminée tropicale annuelle, largement cultivée dans les zones sahéliennes, surtout pour sa production céréalière. Elle est diploïde ( $2n = 14$ ). La taille (0,7 à 6 mètres) et le tallage sont variables .

Les inflorescences, bisexuées, en position apicale sont en général, plus ou moins fusiformes. Celles-ci, parfois appelées chandelles, sont de faux-épis portant de nombreuses graines, incomplètement enveloppées dans leur glume, et disposées radialement autour de l'axe central. En moyenne, un pied possède de 1 à 6 chandelles récoltables .

Semés au début de la saison des pluies tropicales entre les mois de mai et juillet, il existe deux types de variétés :

- les unes (précoces) semblent assez indifférentes à la longueur du jour,
- les autres fortement photopériodiques sont induites par les jours courts et ne commencent à fleurir qu'à partir de l'équinoxe d'automne .

C'est une plante allogame préférentielle, dont les pollens peuvent franchir des distances allant jusqu'à 1 km. Ainsi les interpollinisations sont faciles, tant avec d'autres cultivars, qu'avec ses homologues sauvages : *P. violaceum* et *P. mollissimum* qui existent dans certaines zones fréquemment à proximité des champs. Toutes ces espèces sont diploïdes .



Les cultivars sont souvent très hétérogènes (taille des plantes, couleurs des grains ...). La chandelle présente un gradient de floraison, en général orienté de haut en bas. Les stigmates commencent à apparaître à l'extrémité apicale puis de proche en proche vers le bas. La sortie des étamines, 2 à 3 jours après l'apparition des stigmates, décrit le même processus. Le décalage entre floraison femelle et floraison mâle permet d'effectuer facilement les croisements :

- Juste au moment de l'épiaison, on ensache la chandelle pour éviter toute contamination par du pollen incontrôlé,

- Pour réaliser le croisement, il suffit d'apporter du pollen étranger sur les stigmates épanouis avant l'apparition des anthères. Cette pollinisation accomplie, les stigmates flétrissent et empêchent une autopollinisation possible lors de la sortie ultérieure des étamines.

- Pour autoféconder, il suffit de laisser la chandelle ensachée.

En résumé, il s'agit d'un matériel particulièrement commode pour l'expérimentation génétique par son cycle court, quand on induit convenablement sa floraison (permettant d'avoir plusieurs générations par an), par son faible nombre chromosomique ( $n = 7$ ), par les facilités d'hybridations, par la grande diversité des cultivars et leur polymorphisme important.

Nous avons utilisé principalement les deux lignées suivantes :

- 23 DB, est une lignée fourragère bien stabilisée, probablement originaire du Ghana, sélectionnée à Tifton en Georgie (USA). Ce Mil a une chandelle fusiforme, un grain gris ; son tallage et son développement foliaire sont importants, il possède un gène de nanisme récessif  $d_2$ .

- Massue, lignée issue d'un cultivar d'oasis (Mauritanien(?)) est de taille moyenne sans posséder le nanisme  $d_2$ . Ses chandelles sont plus ou moins sphériques ; les grains sont bruns sombres ; les feuilles,

sont larges ; l'aspect est robuste .

Contrairement à ses parents, dont la taille réduite rendait commodes les cultures en superserres, l'hybride de première génération peut atteindre 4 mètres, du fait de la perte du nanisme . En conditions de Phytotron ( BELLIARD et PERNES, 1977) : 12 heures de lumière à 10.000 - 12.000 lux, Massue met 54 jours pour atteindre la floraison, 23DB 65 jours .

L'analyse des descendance peut être retardée par la "dormance" des graines du Massue (1 à 2 mois) .

## B. CULTURE DU MATERIEL VEGETAL ET CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTS ORGANES .

### 1. Le pollen .

L'émission pollinique durant environ 3 à 6 jours, l'ensachage des chandelles pendant la sortie des anthères permet de récolter des échantillons dont la viabilité testée par coloration (méthode d'ALEXANDER, 1969) atteint 80% . Pour augmenter le taux de viabilité du pollen recueilli par ensachage, on pose le sac sur l'épi la veille du prélèvement, fait de préférence le matin. Une récolte d'environ 20 à 30 mg de pollen permet une extraction au mortier ; grâce à l'importante production pollinique du Mil, on évite d'avoir recours à des microtechniques .

### 2. La graine en germination .

L'étude enzymatique sur graine peut être réalisée à partir de 200 mg de poids sec (soit 20 à 50 grains suivant le génotype) ; on recueille ainsi un extrait dont l'activité est suffisamment élevée.

Les graines peuvent être mises à germer en boîte de Petri sur un papier humide. Après 12 heures de germination à 37°C, le coléoptile est bien visible. On peut fermer de façon étanche la boîte de Pétri, ce qui évite une trop grande évaporation et crée un milieu propice à l'expression de l'alcooldéshydrogénase .

Dans les expériences de plus longue durée, une désin-

fection des semences est nécessaire. Les graines sont plongées dans l'hypochlorite de sodium 50% pendant 20 mn sous vide; rincées à l'acide chlorhydrique 0.05 M; lavées cinq fois à l'eau distillée stérile puis déposées dans des boîtes de Petri stériles .

L'absence d'effet d'une telle désinfection sur le taux de germination des graines a été contrôlée; l'épais tégument qui recouvre les graines semble les protéger efficacement .

### Germination en conditions particulières :

La germination en atmosphère d'azote a lieu dans des récipients étanches après un balayage de 20 fois leur volume .

Quand le bilan respiratoire des semences n'est pas négligeable par rapport au volume du récipient pendant la durée de l'expérience, et qu'aucun renouvellement de l'atmosphère n'intervient, on parle alors de conditions "confinées". Dans ces conditions, la pression partielle d'oxygène diminue effectivement à l'intérieur du récipient ; cela permet aussi une accumulation de toutes les substances volatiles dégagées par les semences (DOIREAU, 1976).

Ainsi, 200 mg de semences (poids sec) en germination à 27°C font passer la pression partielle d'oxygène à l'intérieur d'un récipient de 250 cc de 21 à 10% en 48 heures .

Pour travailler à pression partielle d'oxygène constante, il faut donc : soit un balayage à des pressions partielles fixes, soit un récipient d'un volume tel que la quantité d'oxygène consommée par le matériel vivant soit négligeable. En cas de balayage, tous les montages sont réalisés en tubes de cuivre ou le cas échéant en tubes de caoutchouc épais, imperméables à l'oxygène .

### 3. Les cals .

Les cals de Mil sont obtenus sur des fragments de coléoptiles issus de graines stériles. Les fragments d'environ 5mm sont coupés stérilement en éliminant le méristème apical. Ils sont disposés sur le milieu décrit en Tableau I . Le 2,4-D à la concentration de 5mg/l est l'auxine qui a donné les meilleurs résultats (RANGAN, 1976) .

TABEAU I : Milieu pour culture de cals .

H <sub>2</sub> O	4 l		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	26.4 g		1,65g/l.
KNO <sub>3</sub>	30.4 g		1,80g/l.
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7.04g		0,44g/l.
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5.92g		0,37g/l.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.72g		0,17g/l.
		Oligo A	4 ml
H <sub>2</sub> O	1000 ml		25mg/l.
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	25 g		10 mg/l.
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 g		10 mg/l.
ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10 g		250 µg/l.
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	250 mg		25 µg/l.
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	25 mg		
		Fe EDTA	20 ml
H <sub>2</sub> O	1000 ml		37,3 mg/l.
Na <sub>2</sub> EDTA	7.45 g		27,8 mg/l.
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5.57 g		
		Vitamines	4 ml
H <sub>2</sub> O	20 ml		100 mg/l.
Myoinositol	2 g		5 mg/l.
Nicotinic acid	100 mg		0,5 mg/l.
Pyridosan HCl	10 mg		0,5 mg/l.
Thiamine HCl	10 mg		0,05 mg/l.
Biotine	1 mg		0,5 mg/l.
Folic acid	10 mg		
		Saccharose 2%	80 g
		Agar 0.8 %	32 g

MS.  
1962.

Solution mère

Le Ph est ajusté à 5.5 avant la cuisson .

#### 4. Les plantes entières .

Les plantes sont cultivées sur vermiculite en condition de superserre au Phytotron de Gif-sur-Yvette; elles sont arrosées de solution nutritive. L'éclairage naturel est complété jusqu'à 16 h par des tubes fluorescents, la température diurne est de 27°C, nocturne 24°C .

## II. MÉTHODES D'ÉTUDES

### A. CONDITIONS D'EXTRACTIONS .

Le tampon d'extraction a été choisi d'après les travaux de FREELING (1973) :

- pH supérieur à 8,0 pour diminuer la formation de complexes entre protéines et phénols (LOOMIS et BATAILLE, 1966) . Le tampon, Tris-HCl, est de faible molarité pour éviter une trop forte force ionique néfaste aux dimères de l'ADH, 0,01M .

- un agent anti-oxydant, du dithiotreitol à 5mM, empêchant l'accumulation des quinones .

Le tampon est utilisé à raison de 1 ml pour 200 mg de poids sec .

### B. PRÉPARATION DES EXTRAITS .

#### 1. Extrait à partir des farines de graines .

Les extractions sont faites à partir de graines sèches ou après une germination de 24 h à 37°C. Les graines sont broyées au mortier en chambre froide à 4°C avec du sable de Fontainebleau. Le broyat obtenu est centrifugé à 45000 g pendant 20 minutes à une température de 2-4°C. On récupère le surnageant délicatement à la micro-pipette, afin de ne pas remettre en suspension les lipides qui se trouvent en fine couche à la surface. C'est le surnageant qui servira aux études électrophorétiques et aux cinétiques enzymatiques .

## 2. Extrait à partir du pollen .

Le pollen fraîchement émis est récolté et broyé au mortier en chambre froide. On ajoute des billes de cellite (50 $\mu$  de diamètre) pour favoriser l'éclatement de l'exine . On contrôle au microscope le taux de grains de pollen éclatés. Après le broyage, la centrifugation et la récupération du surnageant sont identiques à celles du protocole précédent .

## 3. Extrait à partir d'autres types d'organes .

Les organes sont broyés dans du sable de Fontainebleau à raison de 1ml de tampon pour 500 mg de poids frais .

## C. CINETIQUES ENZYMATIQUES .

L'activité alcoolaldéshydrogénase des extraits est évaluée sur la réaction dans le sens  $\text{NAD}^+$  vers  $\text{NADH}$  ou éthanol vers acétaldéhyde (RACKER, 1950). On a suivi l'augmentation de densité optique à 340 nm liée à l'apparition du  $\text{NADH}$  .

Sachant qu'une millimole de  $\text{NADH}$  absorbe 6.022 unité D.O. à 340 nm, l'activité peut être exprimée en micromoles de  $\text{NADH}$  apparues par minutes. On mesure la concentration protéique par la méthode de LOWRY (1951) pour rapporter l'activité au taux de protéine dans l'extrait.

Nous avons représenté la plupart du temps les activités, en micromole de  $\text{NADH}/\text{mn}$  rapportée au poids sec, l'extraction se faisant à volume constant (Tableau II) .

## D. TECHNIQUES D'ELECTROPHORESE .

La technique de séparation électrophorétique a permis d'aborder le problème du fonctionnement enzymatique sous un jour nouveau. Par électrophorèse, il est possible de déceler la substitution d'un seul acide aminé par un autre dans une protéine. En effet si cette modification entraîne une variation de la charge nette de la protéine, sa vitesse de migration sera changée . On peut ainsi observer des différences entre des protéines traduisant les différences

alléliques . De même la nature oligomérique de certains enzymes peut être mise en évidence par l'observation de l'électrophorégramme d'individus hétérozygotes grâce aux différentes combinaisons possibles lors de la formation de la protéine active (présence de deux bandes pour une protéine monomère, de 3 bandes pour un dimère par exemple) .

Les enzymes, séparés dans des conditions qui conservent au moins une partie de leur activité , sont visualisés par leur action indirecte sur un réactif coloré spécifique .

#### E. SUPPORTS DE MIGRATION (Composition des gels et techniques appropriées)

##### 1. Sur gel d'amidon (Fig. A<sub>1</sub>)

70 µl par spot d'extraits sont déposés sur les gels d'amidon (système modifié SMITHIES, 1955). Le tampon de migration est un tampon borate 0.3 M ajusté par une solution NaOH saturée, à pH 8.4 (25°C). Le tampon de gel est un tampon borate 0.03 M ajusté par la soude à pH 8.5 (25°C) .

Pour préparer le gel , on ajoute 36 g d'amidon (gel à 12%) dans 300 ml de tampon. On chauffe dans un Erlenmeyer à la flamme d'un bec Buchner. Le mélange passe au cours de la cuisson à une phase visqueuse puis liquide. Aussitôt ce stade atteint le gel est dégazé sous vide léger pendant 1-2 min, puis coulé dans le moule. Le moule, conçu de telle manière que l'électrophorèse soit possible en position verticale, permet l'observation de 10 extraits. La migration se poursuit pendant 16 h à 4°C à raison de **460** V pour une section de 115 x 6 mm. Les conditions d'électrophorèse sur gel d'amidon sont empruntées à FREELING (1974) .

##### 2. Sur gel d'acrylamide (Fig. A<sub>2</sub>)

Nous avons utilisé la méthode de gel à 7,5% d'acrylamide ("disc electrophoresis". Les solutions qui composent les gels ont été adaptées à partir des résultats obtenus sur gel d'amidon et après observations des migrations réalisées en modifiant les nombreux paramètres (compositions, concentrations, pH) .

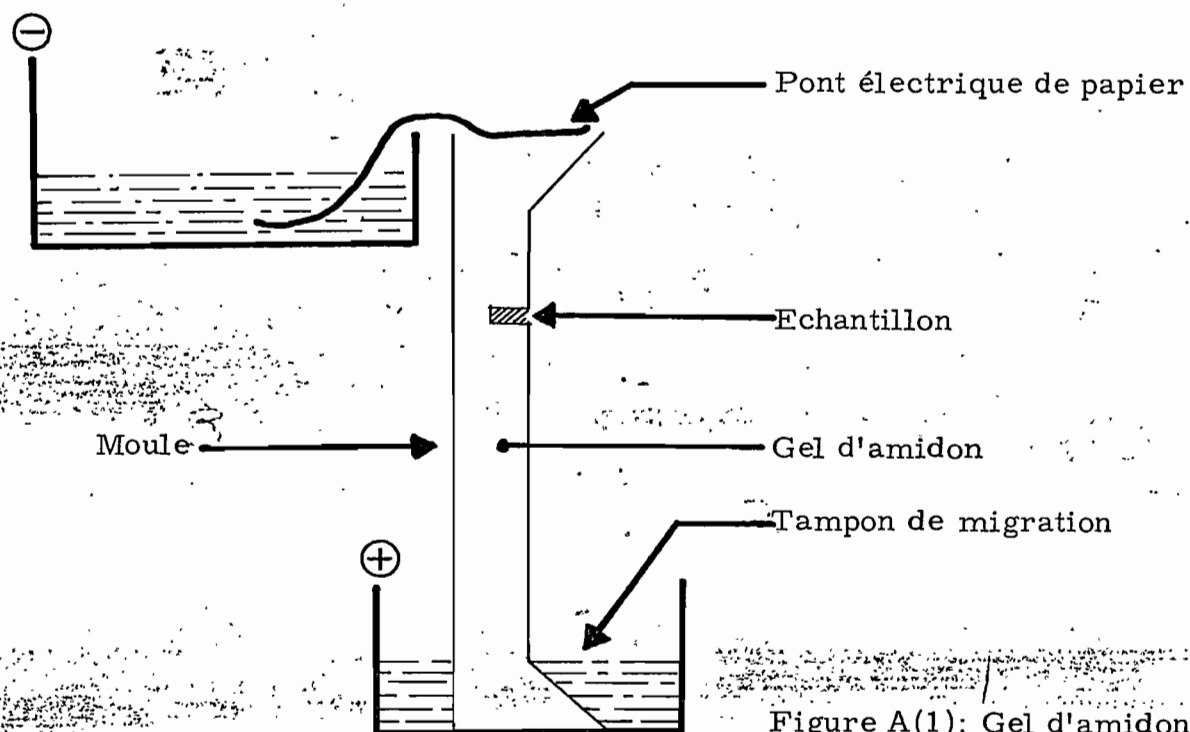


Figure A(1): Gel d'amidon

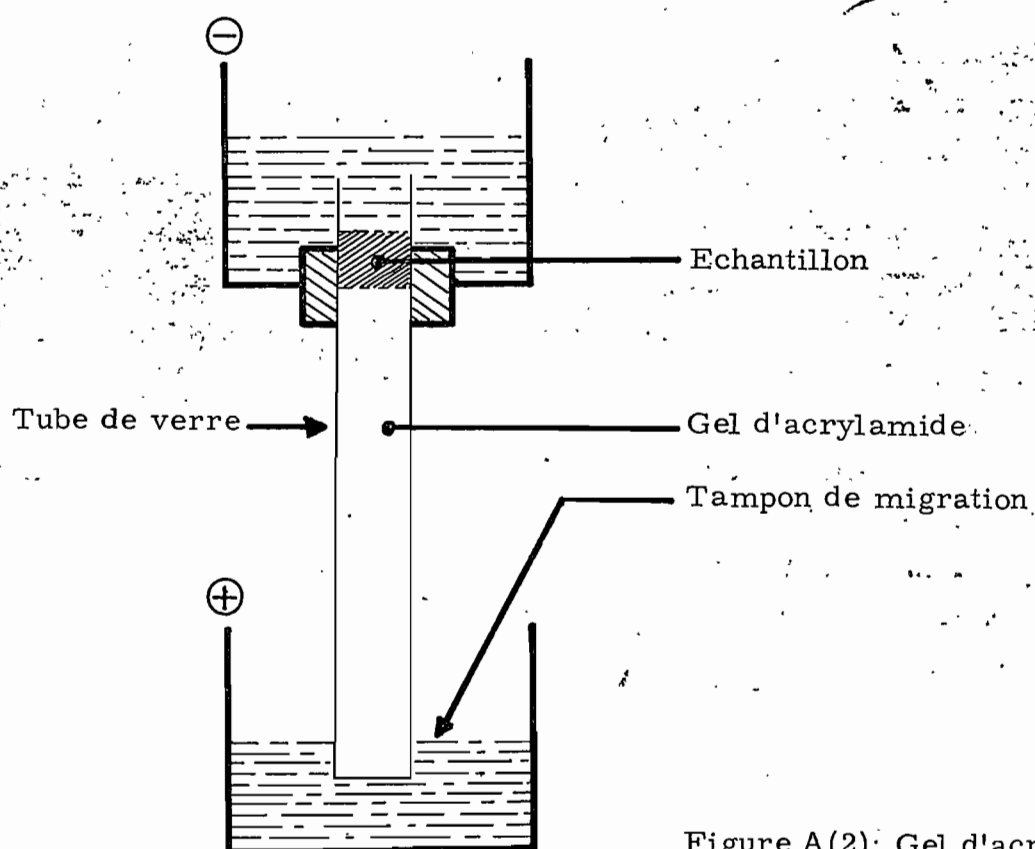


Figure A(2): Gel d'acrylamide



Le processus décrit ici est celui qui a donné le plus de satisfaction, mais la séparation des types alléliques du même locus y est encore insuffisante (Tableau III). Une augmentation des pH ne saurait améliorer nos résultats, la protéine étant alors dégradée.

Cette méthode nous a permis d'obtenir des bandes suffisamment fines pour pouvoir quantifier les activités des différents groupes protéiques à l'aide d'un lecteur de gel, l'optimum de la réaction de coloration qui permet de localiser l'enzyme se trouvant à 660 nm.

Pour le principe d'utilisation (Fig. A<sub>2</sub>) l'électrophorèse en tube nécessite un extrait de densité plus élevée que celle du tampon de bac. Cette élévation de densité est réalisée par l'apport de glycérol dans les extraits.

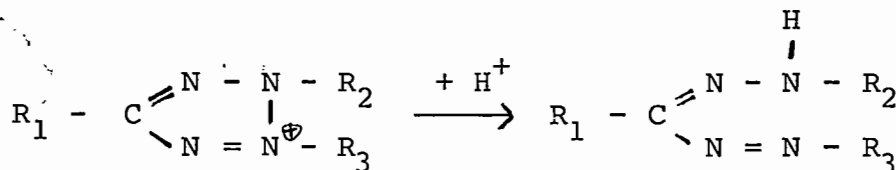
Enfin, pour obtenir un front de migration repérable, on ajoute du bleu de bromophénol dont la grande vitesse de migration servira de base de référence pour pouvoir comparer tous les gels entre lesquels la migration n'est pas toujours homogène.

Ces deux dernières opérations sont réalisées en ajoutant à l'extrait une goutte de la solution suivante (1 goutte pour 100 µl):

Tris-HCl	0.02 M	pH 8.0
+	Bleu de Bromophenol	10 mg/100 ml
+	Glycérol	1 ml/100 ml

#### F. TECHNIQUE DE REVELATION

L'activité des deshydrogénases à NAD<sup>+</sup> est mise en évidence par le transfert d'hydrogène réalisé à partir du substrat spécifique, par l'intermédiaire du coenzyme réduit et de la phénazine méthosulfate, jusqu'au sel de tétrazolium qui est à son tour réduit, en un formazan insoluble et fortement coloré (Tableau IV)



Tt			
Tris-HCL	0,1 M	pH 8,5	2,7 ml
Ethanol absolu	1,713 M		0,1 ml
NAD	$7,36 \cdot 10^{-3}$ M		0,1 ml
extrait			0,1 ml

Tableau II : Milieu réactionnel de la cinétique enzymatique.

---

Tampon de bac      Borate-NaOH pH 8,5      0,05 M

Composition des gels :

1 vol.	Borate-NaOH pH 8,5	0,5 M
	+ TEMED	0,23 ml pour 100 ml
1 vol.	Acrylamide	30 gr
	Bisacrylamide	0,8 gr
	Ajuster à 100 ml avec H <sub>2</sub> O	
1 vol.	Persulfate	280 mg/ 100 ml
1 vol.	H <sub>2</sub> O	

Tableau III : Système utilisé pour l'électrophorèse sur gel d'acrylamide de l'alcooldéshydrogénase du Mil.

---

Tris-HCL	0,1 M	pH 8,5	130 ml
Ethanol absolu			3 ml
MgCl <sub>2</sub>	1 M		0,5ml
NAD	10 mg/ml		1 ml
NBT	5 mg/ml		2 ml
PMS	5 mg/ml		0,5 ml

Le réactif est préparé extemporanément ainsi que les solutions de NAD de NBT et de PMS.

Tableau IV : Milieu de révélation de l'alcooldéshydrogénase après électrophorèse.

La réaction de révélation dure 1 heure à 37°C. Il est possible d'avoir une coloration plus rapide en augmentant les concentrations des colorants mais on augmente aussi les risques d'artéfacts (en particulier, apparition d'autres déshydrogénases) .

#### G. ELUTION DE L'ADH .

L'électrophorèse sur gel d'amidon permet une élution aisée des différentes bandes. En fin de migration, on révèle une faible portion longitudinale du gel pour localiser les différents isoenzymes. On découpe dans le gel , perpendiculairement au sens de migration, une bande de 5mm de large au niveau de l'enzyme que l'on désire éluer.

Ce fragment de gel est broyé dans un potter en rajoutant 200 µl du tampon d'extraction, puis centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 40000 g.

Pour réaliser une élution de protéines distinctes, il est nécessaire que leurs positions sur le gel soient bien séparées . C'est pour cela que nous n'avons pu éluer deux isoenzymes du même groupe protéique .

#### H. DISCUSSION .

Nous avons choisi volontairement une technique simple d'extraction, pour la rapidité d'exécution. L'électrophorèse est faite immédiatement après celle-ci pour éviter les risques de dégradations protéiques de l'enzyme ainsi récupéré. La répétabilité au niveau de l'extraction est confirmée par des mesures d'activités au spectrophotomètre .

Le gel composé de borate que nous avons utilisé pour des raisons pratiques, est connu comme étant générateur d'artéfacts . (DAUSSANT : communication personnelle). La répétabilité des zymogrammes a été contrôlée en utilisant un gel histidine HCl 5 mM à pH 8.0 avec un tampon de bac de sodium-citrate 0.40 M Titré à pH 8.0 à l'acide citrique 0.4 M. La spécificité des colorations a été contrôlée par des révélations en absence de substrat. Dans ce cas, une très forte activité enzymatique révélée par une légère coloration au même

niveau que l'acooldehydrogénase, démontre la présence d'une faible teneur d'éthanol dans les extraits .



## CHAPITRE I : ANALYSES GENETIQUES

---

### I. RÉSULTATS DES ÉLECTROPHORÈSES - ÉTUDE MENDÉLIENNE

#### A. INTRODUCTION - TERMINOLOGIE

Le terme "isoenzyme" désignera dans ce travail une forme particulière d'un enzyme donné, que la technique d'électrophorèse permet de distinguer. La bande est sur le gel la tache qui révèle l'activité d'une telle isoenzyme, tandis que les zones seront des familles de bandes proches de migrations voisines peu ou pas séparées.

Le zymogramme est l'ensemble des zones d'un extrait pour un enzyme considéré. Par convention nous représenterons les bandes par un trait plein plus ou moins épais suivant l'intensité de la coloration et un pointillé quand elles sont à peine visibles.

Nous avons cherché à distinguer au mieux les diverses abréviations concernant l'alcooldéshydrogénase :

- ADH : abréviation de l'enzyme alcooldéshydrogénase
- $A_i^j$  : définit le gène ou locus j dont le type allélique i peut être S, F ou C pour  $A^1$  et X ou Y pour  $A^2$ .
- $A_i^j A_k^j$  : définit donc le génotype de la plante considérée pour le locus j
- ik : représentera la protéine enzymatique apparaissant sur le zymogramme, par exemple SS, SX ou XY

## B. ETUDES DES ZYMOGRAMMES .

### 1. Détermination de formes distinctes d'ADH

Sur les zymogrammes d'extraits de graines de lignées de Mil (*P. typhoideum*) en se plaçant dans les meilleures conditions d'activation on a pu observer trois groupes de bandes anodiques . Ces zones sont numérotées de I à III, dans l'ordre de leur migration croissante. Chaque zone a une intensité de coloration différente, décroissante de la plus lente à la plus rapide .

On a pu obtenir plusieurs types de zymogrammes sur les extraits de graines. Trois de ces types correspondent à une variation de la zone I, tandis que deux types correspondent à des variations de la zone III. Dans tous les cas, la migration de la zone II se trouve modifiée (Fig. B<sub>1</sub>) .

La fréquence de ces types de configurations est très variable. Parmi 40 lignées testées, seule Massue différait pour la zone I. Ce n'est qu'à partir du moment où des cultivars sénégalais (Sounas) ont été étudiés qu'une troisième variation de la zone I a été trouvée .

Ces modifications de migration de la zone I ont été décrites par les formes S, F, C respectivement de migration croissante.

De même, c'est dans un autre cultivar sénégalais que nous avons observé un deuxième type de profil pour la zone III alors tous de la forme X.

Cette nouvelle configuration, produite par une bande plus rapide est définie par le type Y . Le système des alcool-déshydrogénases semble être identique à celui du Maïs (SCHWARTZ, 1969). Les figures correspondraient à des structures homogéniques en zones I et III et hétérogéniques en zone II .

Pour le Mil, la confirmation en a été apportée par les faits suivants :

- la zone II varie pour deux états de la zone I (F et S) alors que la zone III est constante (X)

- la zone II varie pour deux états de la zone III ( X et Y) alors que la zone I est constante (F)

- il est possible par élution de travailler sur la zone II (TORRES, 1976). Eluée dans un tampon de forte molarité (Tris-HCl 0.2 M pH 8,5), la protéine se dissocie en partie lors d'une congélation lente. La présence d'une bande au niveau de la zone I lors de la migration sur gel d'acrylamide de l'éluat ainsi traité provient de la réassociation de deux homomonomères .

Il n'est pas possible d'observer la zone III dans ces conditions, nous reviendrons sur cette remarque plus tard .

*voir p. 42*

## 2. Existence de différentes formes alléliques du gène $A^1$

A partir des deux lignées 23 DB ( $A^1_F A^1_F$ ) et Massue ( $A^1_S A^1_S$ ), dont le zymogramme est différent pour la zone I et II, l'électrophorèse de graines hybrides montre le zymogramme suivant (Fig. B<sub>2</sub>) :

- 3 bandes en zone I
- 2 bandes en zone II
- 1 bande en zone III

L'obtention de trois bandes en zone I, liée aux différentes combinaisons des monomères S et F , confirme la nature dimère de l'enzyme .

Les deux bandes en zone II correspondent aux différentes possibilités de combinaisons hétérogéniques entre les deux monomères du gène  $A^1$  et le monomère produit par  $A^2$ , homozygote dans le croisement (23DB et Massue sont tous deux  $A^2_X A^2_X$ ) .

On a pu révéler dans un cultivar de source sénégalaise un troisième état allélique de  $A^1$ , plus rapide ( $A^1_C$ ). Les différentes figures observables sont résumées sur la figure C<sub>1</sub>, les criblages réalisés sont résumés dans le Tableau V) . A l'inverse de ces structures simples, un criblage de 10 cultivars de Mil togolais (Cf. points d'échantillonnage en annexe), montre un polymorphisme pour les 3 types alléliques de  $A^1$  (S, F et C) tant parmi les cultivars précoces que



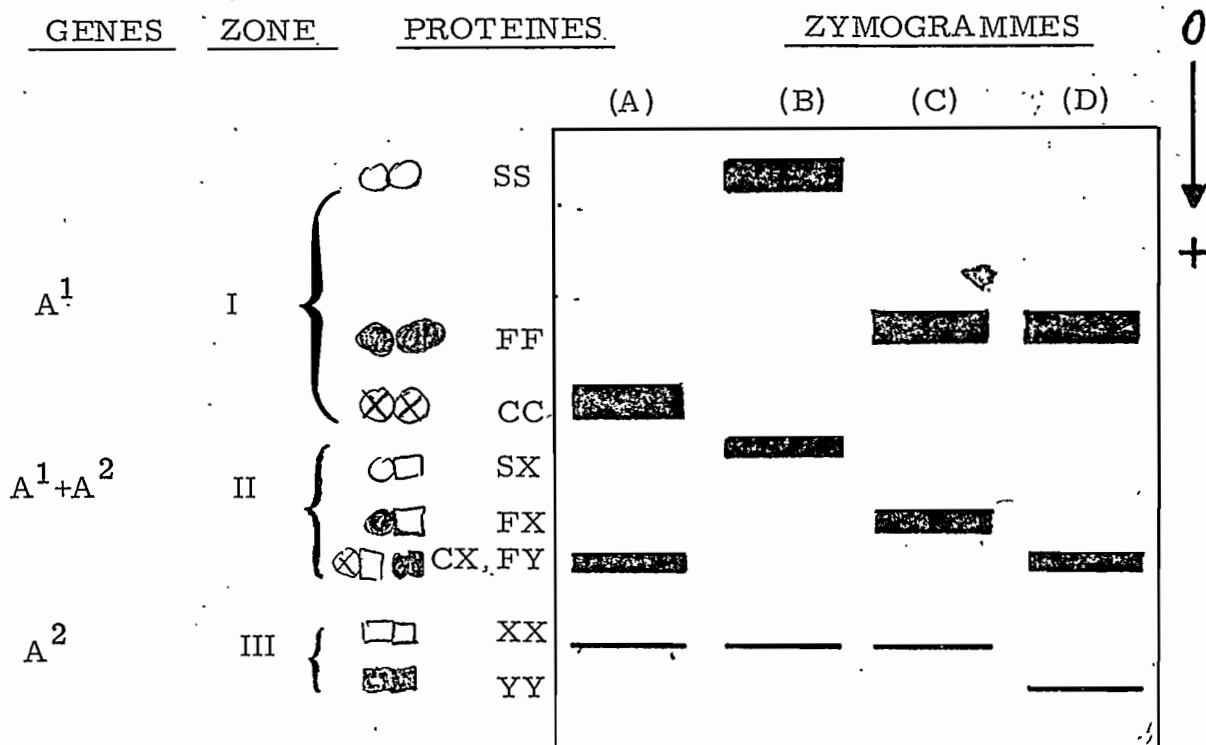


Figure B(1) - Variation des zymogrammes observés sur des semences après 12 heures de germination dans l'air confiné.

(A):  $A^1 A^1_{CC}, A^2 A^2_{XX}$  - (B):  $A^1 A^1_{SS}, A^2 A^2_{XX}$  - (C):  $A^1 A^1_{FF}, A^2 A^2_{XX}$  - (D):  $A^1 A^1_{FF}, A^2 A^2_{YY}$

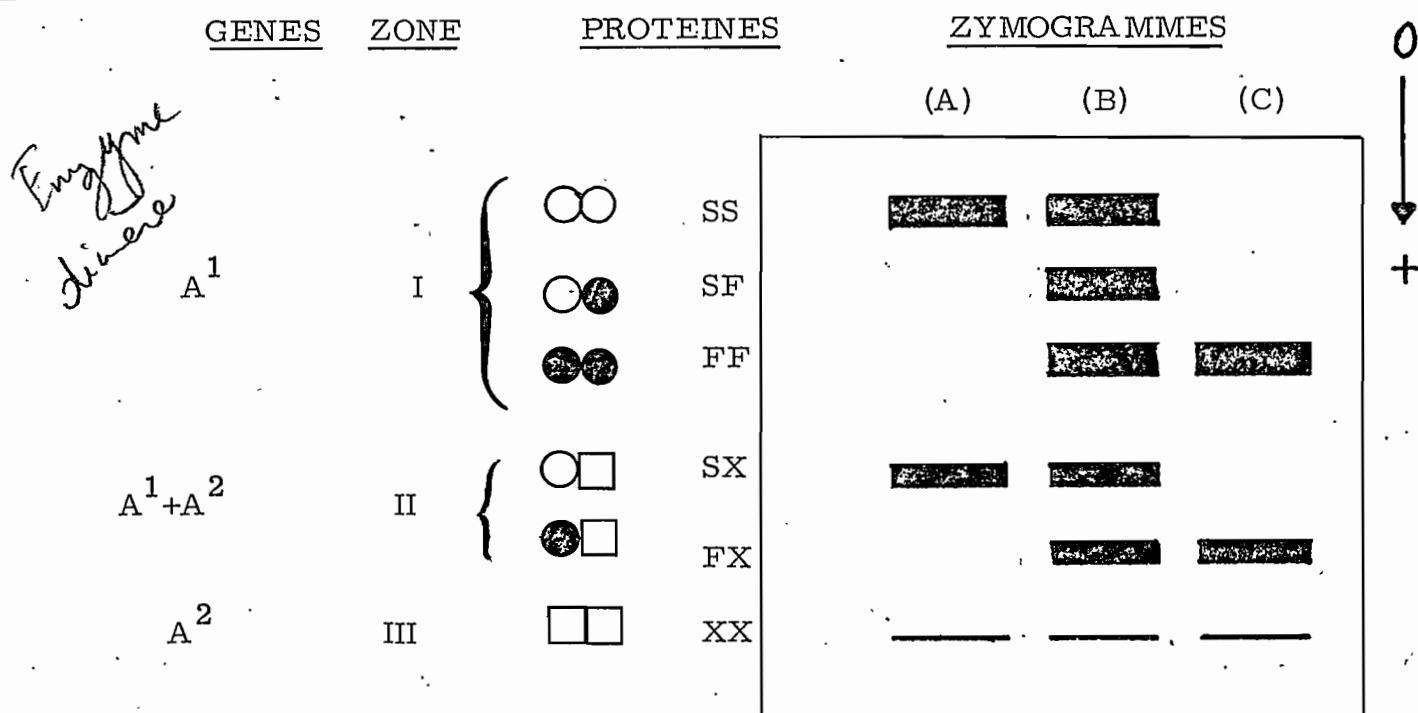
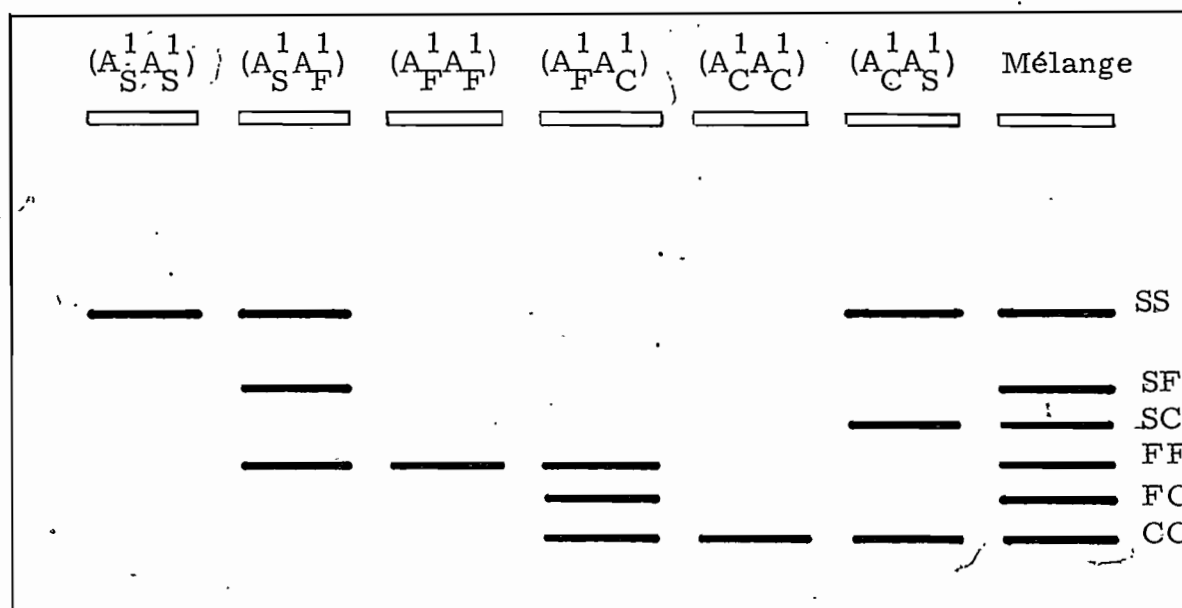


Figure B(2) - Variation des zymogrammes observés sur des semences après 12 heures de germination dans l'air confiné.

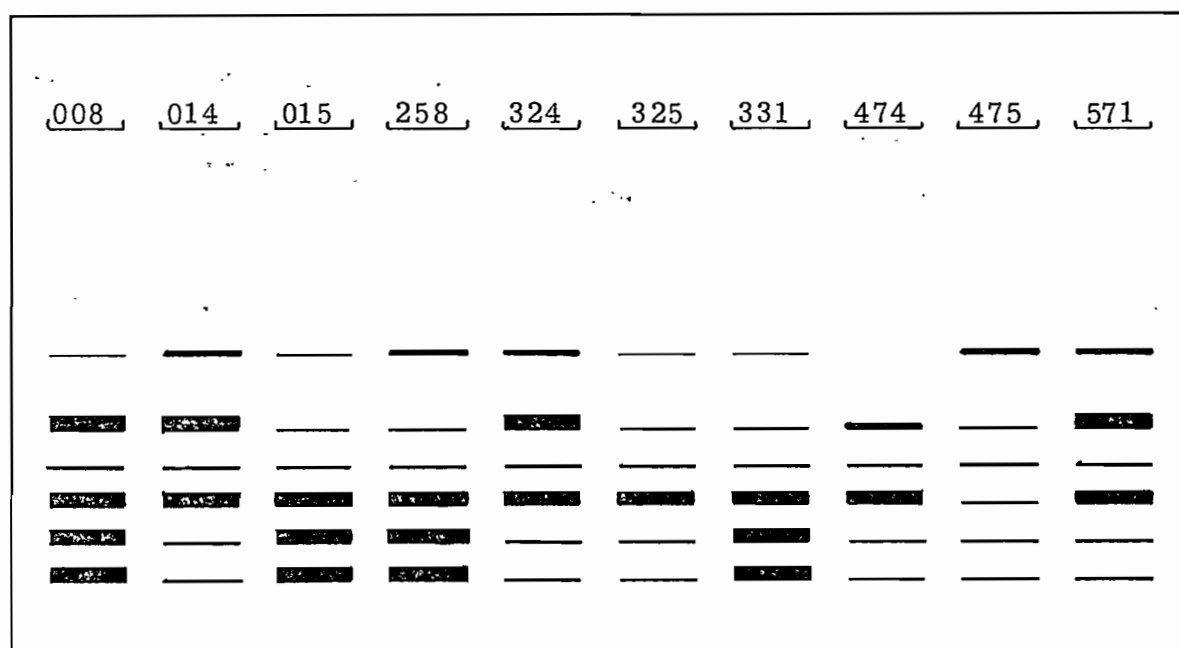
(A):  $A^1 A^1_{SS}, A^2 A^2_{XX}$  - (B):  $A^1 A^1_{SF}, A^2 A^2_{XX}$  - (C):  $A^1 A^1_{FF}, A^2 A^2_{XX}$

	<u>Mils criblés</u>	<u>Provenance</u>	<u>A<sup>1</sup></u>	<u>A<sup>2</sup></u>
M 1	Tifton 239 DB <sub>2</sub>	USA	FF	XX
M 2	Tifton 23 DB	USA	FF	XX
M 3	Ligui	Tchad - <i>cent</i>	FF	XX
M 4	I 472	Inde	FF	XX
M 5	Iniadi	Haute-Volta	FF	XX
M 6	I 472 x Nigritarum	Bambey ( Sénégal )	FF	XX
M 8	Maewa	Niger	FF	XX
M 9	Sanio	Sénégal	FF	XX
M 13	Massue	Bambey	SS	XX
M 17	Maewa	Bambey	FF	XX
M 21	Ligui x 23 DB	Gif	FF	XX
M 30	Massue x 23 DB	Gif	SF	XX
M 32	Massue x Ligui	Gif	SF	XX
M 245	Molissimum	Mali	FF	XX
M 246	Tiotandé	Sénégal	FF ?	XX
M 247	J 104	Inde	FF !	XX PH8-CF2 XX
M 251	Violaceum	Bambey	FF	XX
M 93-76	Souna	Sénégal	FF	XX
M 94-76	"	"	FF	XX
M 95-76	"	"	FF	XX
M 96-76	"	"	FF	XX
M 97-76	"	"	CF	XX
M 98-76	"	"	FF	XX
M 99-76	"	"	FF	XY
M 100-76	"	"	FF	XX
M 101-76	"	"	FF	XY
M 102-76	"	"	FF	XY
M 103-76	"	"	FF	XX
M 104-76	"	"	FF	XX
M 105-76	"	"	FF	XX
M 106-76	"	"	FF	XX
M 107-76	"	"	FF	XX
M 227-76	Sidi-Daoud	Tunisie	FF	XX
M 228-76	"	"	FF	XX
M 229-76	"	"	FF	XX
M 230-76	Zarzis	Tunisie	FF	XX
M 231-76	"	"	FF	XX
M 464-76	Oasis d'Iferouane	Niger	FF	XX
M 465-76	"	"	FF	XX
M 466-76	"	"	FF	XX
M 467-76	"	"	FF	XX
M 468-76	"	"	FF	XX
M 469-76	"	"	FF	XX
M 470-76	"	"	FF	XX
M 471-76	"	"	FF	XX
Cultivars togolais ( Prospection IBPGR-ORSTOM °12/77 )			SS, SF, FF FC CC CS	XX?

Tableau V : Géotypes des principaux Mils criblés.



C(1)- Zymogrammes sur gel d'amidon des différents types alléliques d'A<sup>1</sup>



C(2)- Zymogrammes de 10 cultivars différents issus de la prospection des mils togolais ( IBPGR-ORSTOM ) de décembre 1977.

Figure C- Mise en évidence du polymorphisme des cultivars traditionnels.

( Observation électrophorétique de la zone I )

tardifs (Fig. C<sub>2</sub>). Les extraits étant réalisés sur un mélange de 20-30 graines, les différences d'intensité relative de coloration des différentes bandes observées, montrent des fréquences alléliques variables suivant les cultivars.

C. ETUDE MENDELIENNE DE LA DESCENDANCE D'UN CROISEMENT (Fig. B<sub>2</sub>)

*non*  $A^1_S A^1_S, A^2_X A^2_X, A^1_F A^1_F, A^2_X A^2_X$ .

Cette étude a été réalisée en premier lieu pour étudier le système génétique contrôlant les isozymes de la zone I.

Nous voulions savoir si le déterminisme était simple, et pour cela nous avons étudié l'autofécondation de l'hybride 23 DB x Massue suspecté de type  $A^1_S A^1_F$ . Si pour la zone I seul un locus  $A^1$  est concerné par la ségrégation on s'attend à trouver dans la descendance  $1/4 A^1_S A^1_S$ ,  $1/2 A^1_S A^1_F$  et  $1/4 A^1_F A^1_F$ .

Pour cette étude nous avons criblé graine par graine. Les graines en germination sont écrasées entre deux "confettis" de papier filtre, imbibés dans le tampon d'extraction et l'ensemble est inclus dans une fente du gel d'amidon.

L'étude a porté sur 434 graines de la descendance de l'hybride issu du croisement Massue x 23 DB (M<sub>335-76</sub> de notre nomenclature).

Résultats.

TABLEAU VI

Individus	$A^1_S A^1_S$	$A^1_S A^1_F$	$A^1_F A^1_F$	TOTAL
Effectif observé	76	234	124	434
Fréquence observée	0,18	0,54	0,28	$\chi^2$ 1% seuil = 9,21
Fréquence théorique	0,25	0,50	0,25	
Effectif théorique	108,50	217	108,50	$\chi^2$ obs. 2 ddl : 13,28

La répartition observée diffère significativement de

la répartition théorique au seuil de 1% . La répartition observée pouvait s'interpréter par un système à 2 loci, donnant trois classes réparties 9 : 4 : 3 . Un modèle fonctionnel très particulier pourrait justifier cette répartition .

Cependant, des séries de  $F_3$  conduiraient en cas de ségrégations à des répartitions différentes de 9 : 4 : 3 du fait de la diversité des structures  $F_2$  conduisant au phénotype FS . A l'occasion des études de liaisons génétiques, nous avons analysé des  $F_2$  par les graines  $F_3$  qu'elles produisaient (Série C tableau VIII - Annexes 3). Les répartitions observées étant inchangées, l'hypothèse d'un système à 2 loci n'est pas confortée .

Il nous paraît plus raisonnable de considérer une sélection qui agit contre le type  $A^1_S$ , défavorisant les homozygotes  $A^1_S A^1_S$ , modifiant ainsi la ségrégation attendue dans la descendance d'un système simple à 1 gène . Le désavantage aurait lieu soit au niveau gamétique ou au moment de la fécondation ou du développement de la graine et pas après ce stade puisque les taux de germination observés (voisins de 100%) ne peuvent laisser de place pour une telle distorsion . Ce phénomène n'est probablement pas dû aux circonstances particulières propres à cette expérimentation; nous l'avons retrouvé avec la même intensité dans des conditions expérimentales différentes (Tableau VIII) .

Afin de vérifier la stabilité du paramètre de contre sélection nous avons utilisé un hybride Massue x 23 DB  $A^1_S A^1_F$  dans trois conditions expérimentales :

1. Plantes arrosées seulement 2 fois par semaine
2. Plantes arrosées matin et soir (Témoin). Un arrosage correspondant environ à 250 ml de solution nutritive ou d'eau désionisée, par pot .
3. Plantes " inondées" (l'eau n'avait pas la possibilité de s'écouler, la surface atteignant le collet de chaque plante) .

Les plantes ayant supporté ce traitement (le lot 1 avait beaucoup plus souffert ; les plantes des lots 2 et 3 étaient comparables) nous avons fait une étude graine par graine dans chaque série, afin d'observer les répartitions des génotypes :  $A^1_S A^1_S$ ,  $A^1_S A^1_F$  et

$A_F^1 A_F^1$  dans chaque groupe. Les résultats ont été comparés par un test de  $\chi^2$  de conformité (Tableau VII) .

TABLEAU VII

	Valeurs observées			Total
	$A_S^1 A_S^1$	$A_S^1 A_F^1$	$A_F^1 A_F^1$	
Témoin	29	88	53	170
Conditions sèches	22	59	24	105
Conditions humides	15	51	24	90
Total	66	198	101	365

Le test ne fait pas ressortir d'effet lié au régime hydrique sur les fréquences des types S et F ( $\chi^2 = 2,70$ ) .

Dans ce cas également les distorsions par rapport à 1/4, 1/2, 1/4 dans la répartition des trois génotypes est significative  $\chi^2 = 9,34$ . Ainsi à Gif, nous n'avons pas perturbé le type de ségrégation en agissant ainsi .

Les divers résultats (Tableaux VI, VII et annexe 3) soulignent, si notre interprétation est juste, que cette distorsion des ségrégations doit être un caractère fondamental du système  $A_S^1 A_F^1$  que nous étudions .

TABLEAU VIII Récapitulation des divers résultats .

	SS	SF	FF	Total
A Graines en analyse mendélienne	76 76,20	234 235,16	124 116,69	434
B* Conditions hydriques (sèches + " inondées")	37 34,24	110 105,66	48 52,43	195
C** Série de F <sub>3</sub> Plantes en ségrégation étudiée en annexe	15 15,80	51 48,77	24 24,20	90
	128	395	196	729

Les répartitions ne diffèrent significativement pas ( $\chi^2 = 1,38$ )

#### D. CONCLUSION .

Dans nos conditions d'extraction, l'alcooldéshydrogénase du Mil présente un zymogramme identique à celui du Maïs. L'électrophorégramme est probablement déterminé par deux gènes A<sup>1</sup> et A<sup>2</sup> .

Ils produisent chacun des monomères s'autodimérisant pour donner des dimères homogènes -Zone I et III- et pouvant s'hétérodimériser pour faire des dimères hétérogènes -Zone II- . Les différentes zones correspondent aux monomères attribuables aux gènes suivants :

Zone I	→	A <sup>1</sup> et A <sup>1</sup>
Zone II	→	A <sup>1</sup> et A <sup>2</sup>
Zone III	→	A <sup>2</sup> et A <sup>2</sup>

Les gènes A<sup>1</sup> et A<sup>2</sup> existent indépendamment sous plusieurs formes alléliques : S, F et C pour le premier, X et Y pour le second .

\* Afin d'avoir un tableau de valeurs indépendantes, les plantes "témoin" du Tableau VII, ont été retranchées de (B) car elles ont été comptabilisées en (A) .

\*\* Annexe 3

C'est l'apparition de deux bandes en zone II pour un Souma homozygote  $A^1_F A^1_F$  qui nous a permis de définir les deux états alléliques du gène  $A^2$ .

D'après les criblages que nous avons faits sur des mils d'origines très variées, nous avons conclu à la rareté des types  $A^1_S A^1_S$  ou  $A^1_C A^1_C$  (Tableau VIII). Nous n'avons trouvé le type  $A^1_S$  à l'état homozygote que sur une lignée Massue. Chez les Maïs cultivés en France les types S ou F sont répartis de façon plus égale.

Le polymorphisme observé sur les 10 cultivars de Mils togolais est significativement différent de la situation étudiée sur les lignées précédemment criblées. La variabilité de ces dernières ne semble pas être représentative du polymorphisme variétal observé au niveau des cultivars.

La sélection suggérée contre S lors de la fabrication des graines expliquerait bien la disparition du type  $A^1_S$  dans les collections de lignées. Dans ce cas, son existence dans les cultivars togolais, fait remarquable, doit être due à un avantage génotypique plus tardif qui rétablirait l'équilibre polymorphe.

Multipliés dans des conditions contrôlées, où l'effet génotypique au niveau de la plante ne peut s'exprimer, la disparition du type S serait presque inéluctable. Entretenir en collection le polymorphisme FS imposerait alors un contrôle rigoureux des zymogrammes ou l'établissement d'une sélection compensatrice automatique qu'il faudrait déterminer.

## II. MODÈLE DE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS AVEC SÉLECTION GAMÉTIQUE ET ZYGOTIQUE ANTAGONISTES

Pour rendre plus précise l'argumentation précédente, détaillons deux modèles.

### A. SÉLECTION GAMÉTIQUE

Nous envisageons deux types de sélection :



- Une sélection agissant uniquement sur le gamète mâle, au stade pollen, ce qui permet d'expliquer l'absence de grains avortés sur les chandelles des plantes  $F_1$ .
- Une sélection touchant également les gamètes mâles et femelles, agissant alors au niveau de la méiose, la chandelle observée ne présentant pas de graines avortées.

Nous nous limiterons pour simplifier, à l'étude de ces deux cas. Une situation intermédiaire, plus conforme aux mesures des activités polliniques observées, pourrait ne concerner une sélection entre gamètes que s'ils sont produits par un hybride SF. Les résultats seraient qualitativement les mêmes.

Pour déterminer si la sélection concerne les deux gamètes ou seulement les gamètes mâles (-femelles), il nous faudra comparer les résultats de croisements en retour sur un hybride SF pris soit comme femelle, soit comme mâle, et les rapprocher des données observées en  $F_2$ .

Si le gamète femelle, par exemple, ne subit pas l'effet de la contresélection, la ségrégation du croisement  $A^1_S A^1_F \times A^1_S A^1_S$  sera  $1/2 A^1_S A^1_S$ ,  $1/2 A^1_S A^1_F$ .

Les valeurs de sélection estimées à partir des distortions en  $F_2$  (voir calcul en annexe 1)  $s = 0,21$  pour une sélection portant sur les deux gamètes,  $s = 0,36$  pour une sélection portant seulement sur le gamète mâle.

Ces valeurs importantes expliqueraient assez bien la quasi absence des types  $A^1_S$  dans les lignées criblées et signifieraient une dérive rapide des collections.

#### B. SELECTION ZYGOTIQUE.

Nous avons donc introduit un paramètre d'avantage adaptatif ( $\sigma$ ) dont la valeur peut dépendre des écosystèmes rencontrés. Cette fois encore, pour simplifier, nous avons choisi un effet additif en faveur de S. Le tableau des coefficients de sélections  $s$  et  $\sigma$  est donc celui-ci (Tableau IX).

On peut calculer l'évolution des fréquences (après intervention de la sélection gamétique ( $s$ ) et de l'avantage zygotique ( $\sigma$ ), puis établir les conditions d'équilibre des fréquences d'une génération à l'autre (Annexe 2). Dans les deux cas considérés, il existe un intervalle de valeurs de  $s$  et de  $\sigma$  tel que le polymorphisme intracultivar soit en équilibre stable .

Les conditions d'équilibre sont distinctes dans les deux types de sélection .

Par exemple, en imaginant la situation critique  $\sigma = \frac{1}{2}$  (létalité complète au niveau zygotique du génotype FF), dans le cas d'une sélection gamétique mâle et femelle, n'importe quel avantage  $s$ , si petit soit-il, suffit pour maintenir le polymorphisme (bien qu'avec une fréquence très faible de F), alors que dans le cas d'une sélection gamétique mâle seulement le maintien du polymorphisme impose une valeur minimale élevée de  $s$  (au moins 0,67). Les résultats essentiels sont rapportés dans le Tableau IX . Les démonstrations sont données en Annexe 2 .

**TABLEAU IX : Modèle d'équilibre des populations pour 2 types de sélection**

	Gamète mâle et femelle		Gamète mâle
pour p et q $\neq 0$ $\Delta p = 0$ si	$(\sigma - s + s\sigma) + p(s - 2\sigma) = 0$		$(2\sigma - s + s\sigma) - p 2s\sigma = 0$
Valeur de p à l'équilibre $\hat{p}$	$\hat{p} = \frac{\sigma - s + s\sigma}{2\sigma - s}$		$\hat{p} = \frac{2\sigma - s + s\sigma}{2s\sigma}$
Valeur de $\sigma$ pour avoir $0 < \hat{p} < 1$ s étant donné*	$0 \leq \sigma < \frac{s}{2}$	$\frac{s}{1+s} \leq \sigma \leq \frac{1}{2}$	$\frac{s}{2+s} < \sigma < \frac{s}{2-s}$
Nature de l'équilibre	Instable $P_n \nearrow \Rightarrow P_{n+1} \nearrow$	Stable $P_n \nearrow \Rightarrow P_{n+1} \searrow$	Stable $P_n \nearrow \Rightarrow P_{n+1} \searrow$
Cas limite $\sigma = \frac{1}{2}$ $\Rightarrow$ disparition des homozygotes du type $A^1_F A^1_F$		$\sigma = \frac{1}{2}$ Condition d'équilibre du polymorphisme $s < \frac{1}{3}$ $\Rightarrow \forall s, \epsilon [0, \frac{1}{3}]$ il y a entretien du polymorphisme	$\sigma = \frac{1}{2}$ Condition d'équilibre du polymorphisme $\frac{2}{3} < s < 2$ $\forall s, \epsilon [\frac{2}{3}, 1]$ il y a entretien du polymorphisme

\* En dehors de ces intervalles de valeur l'équilibre monomorphe est stable en faveur de S ou de F suivant que  $\sigma$  est  $>$  ou  $<$  que s.

## CHAPITRE II : VARIATIONS FONCTIONNELLES DES DIFFERENTS ISOZYMES

Pour permettre l'équilibre des populations observées, il faudrait qu'au cours de la vie de la plante, l'ADH joue un rôle suffisamment important pour qu'une différence de fonctionnement suffise à modifier sérieusement les coefficients de sélection. C'est pourquoi, il nous semble important de définir ici les voies métaboliques dans lesquelles joue l'alcooldéshydrogénase .

Il est possible que tout un complexe métabolique englobant l'ADH soit coordonné dans des ensembles géniques dont les différences sont marquées par les isozymes d'ADH. Rappelons donc les grandes fonctions où s'intègre l'alcooldéshydrogénase .

### I. ALCOOLDÉSHYDROGÉNASE ET ANAÉROBIOSE

En absence d'oxygène, l'énergie apportée par la glycolyse est relativement faible. La transformation d'une mole de glucose en éthanol ne produit que 2 moles d'ATP contre 36 moles par la chaîne respiratoire (Tableau X). Les plantes pour compenser cette baisse d'énergie augmentent la vitesse d'oxydation du glucose, ce qui est défini par l'effet PASTEUR (WARBOURG, 1926).

Cependant, si le catabolisme accéléré du glucose permet le maintien d'un certain niveau énergétique, cela se traduit par l'accumulation du pyruvate qui n'entre plus dans le cycle de Krebs. Il est alors transformé soit en lactate soit en éthanol, ce qui assure la régénération de NAD nécessaire à l'entretien de la glycolyse anaérobie. Ces composés sont hautement toxiques pour les

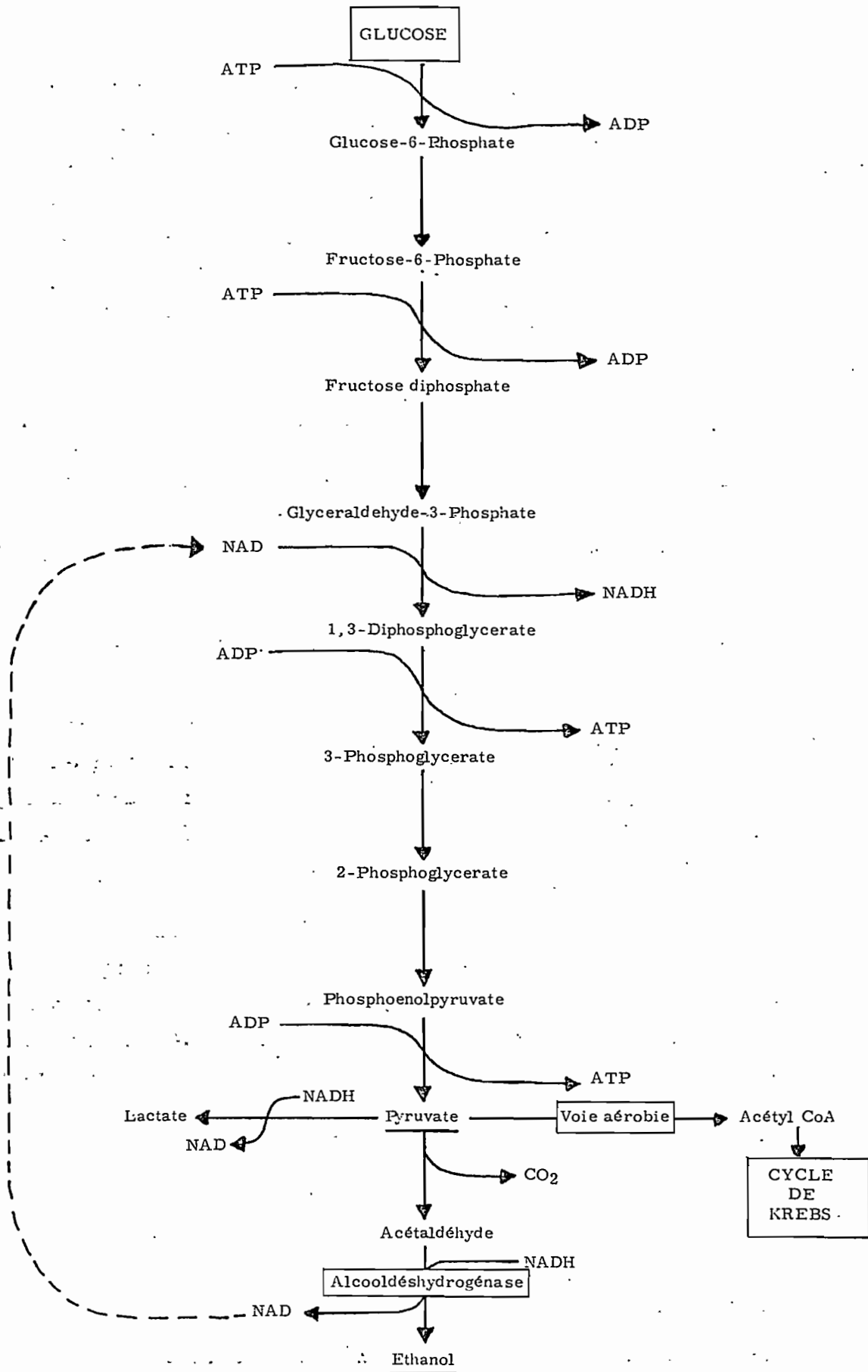


Tableau X- Voie de la glycolyse anaérobie.

cellules. La levure synthétise de grande quantité d'éthanol, mais l'excrète aisément. De même le lactate, toxique par acidification est éliminé des muscles des organismes supérieurs par le sang. Quels sont les mécanismes que possèdent les plantes qui les protègent de telles toxicités ? On a pu montrer dans certains tissus végétaux (BARKER et EL SAIFI, 1952) l'inhibition de la synthèse du lactate quand la synthèse d'éthanol commence, le pH influençant apparemment l'inhibition de la lactate déshydrogénase et l'activation de la pyruvate decarboxylase (DAVIES, 1974). Les plantes auraient ainsi un système de protection contre l'acidification lié au lactate.

On montre que des semences en milieu anoxique rejettent de l'éthanol (DOIREAU, 1972), et l'on a remarqué un dégagement d'éthanol par les racines d'arbres inondés (CHIRKOVA et GUTMAN, 1972).

D'autre part on sait aussi que la plupart des plantes adaptées à l'anoxie ont une production d'éthanol réduites dans ces conditions. On a pu montrer chez les plantes tolérantes à l'inondation une activation relativement faible de l'alcool déshydrogénase (CRAWFORD, 1967). Encore faut-il admettre une régulation en bloc de l'ADH et de la pyruvate décarboxylase, qui limiterait la dégradation du pyruvate et empêcherait une augmentation de la concentration de l'acétaldéhyde, tout aussi toxique.

Dans ce cadre, on peut imaginer qu'un organisme dont la synthèse d'éthanol et les voies globales de décarboxylation du pyruvate sont moins importantes, serait avantage dans une période d'asphyxie prolongée. La régénération ménagée du NAD ne s'accompagnant pas d'un niveau trop élevé d'éthanol ou d'acétaldéhyde toxiques.

## II. ACTIVITÉS ENZYMATIQUES

### A. ETUDE DES CONDITIONS D'ACTIVATION DE L'ADH

L'activité de l'alcool déshydrogénase varie considérablement au cours du développement de la plante et suivant les organes étudiées (SCANDALIOS, 1971). Il est important de définir clairement

les conditions inductrices de l'activité alcooldéshydrogénase chez le Mil. Ceci mettra en évidence les situations où l'alcooldéshydrogénase a un impact sur le métabolisme interne de la plante. C'est alors qu'une différence fonctionnelle enzymatique pourrait faire apparaître une différence des valeurs adaptatives .

#### 1. Activité alcooldéshydrogénase lors de la morphogenèse.

Par la révélation électrophorétique, nous avons pu montrer diverses phases activatrices de l'alcool déshydrogénase .

Dans la graine sèche on trouve une activité enzymatique alcooldéshydrogénase, signe de l'activité métabolique de la semence au repos .

Lors de la germination, l'activité essentiellement localisée dans le scutellum décroît pour devenir insignifiante quand les premières feuilles apparaissent, se dégageant du mésocotyle. Elle augmente cependant dans les racines, tout en restant malgré tout difficile à mettre en évidence par l'électrophorèse. C'est pourquoi notre travail a été principalement axé sur les semences dont l'activité est beaucoup plus forte . Ces activités sont résumées par la Figure D .

Nous avons pu remarquer que l'activité alcooldéshydrogénase des semences était très forte chez les graines "dormantes"\* Massue .

On ne trouve pas d'activité enzymatique dans les parties aériennes jusqu'à la floraison. C'est alors que l'on retrouve une activité alcooldéshydrogénase importante dans le pollen .

Une autre situation mettant en évidence une activité alcooldéshydrogénase importante : celle des cals primaires obtenus en utilisant le 2,4-D . Cette activité alcooldéshydrogénase est liée à une activation originale des gènes  $A^1$  et  $A^2$  . En effet, si dans les graines en germination et dans le pollen, les zymogrammes sont semblables - Zone I visible, zone III invisible - on observe inversement sur les cals une importante coloration de la zone III, alors

---

\* graines "dormantes": graines dont le pouvoir de germination ne s'exprime que plusieurs mois après la récolte .

# Activité ADH



Figure D - Activité alcooldéshydrogénase au niveau de divers tissus après 1 et 4 jours de germination à l'air.



que la zone I est très faiblement colorée .

La callogenèse présenterait donc une situation nettement activatrice du gène  $A^2$ . L'activité alcooldéshydrogénase sur des cals repiqués et régulièrement entretenus n'a cependant pas pu être mise en évidence .

## 2. Induction par conditionnement en atmosphères particulières.

Si des semences de Mil imbibées sont placées dans une atmosphère d'azote pur (donc nulle en oxygène) on assiste à une augmentation de l'activité alcooldéshydrogénase. En faisant germer les graines dans des atmosphères de pression partielle d'oxygène variables, il est possible de montrer une induction de l'alcooldéshydrogénase aux faibles concentrations d'oxygène. On remarque aussi qu'il existe une concentration d'oxygène au-dessus de laquelle l'activité alcooldéshydrogénase décroît (Fig. E) .

Comme pour le Riz (APP et MEISS, 1958) et le Maïs (HAGEMAN et FLESHER, 1960), l'activité ADH du Mil est liée à l'environnement d'oxygène qu'il rencontre . D'autre part, les taux d'activation observés sont comparables à ceux obtenus sur une variété hautement adaptée aux milieux inondés *Ziziana aquatica*, par SAMPUN CAMPIRANON et WILLARD KOBKKARI, 1977) . Cette augmentation d'activité est également repérable sur les zymogrammes. Dans le cas d'une activation dans l'azote pur, on peut noter la forte coloration de la zone I mais également l'apparition de la zone III, jusqu'alors non révélée sur les graines. Le manque d'oxygène se traduirait par une activation de l'activité globale de l'alcooldéshydrogénase correspondant à l'activation simultanée des gènes  $A^1$  et  $A^2$  .

Cette activation apparemment couplée des gènes  $A^1$  et  $A^2$  est très différente de la situation révélée par le zymogramme des extraits de cal.

Une autre condition de germination fait ressortir une différence d'activation des gènes  $A^1$  et  $A^2$  . En faisant germer des semences en milieu "confiné", la zone III devient bien visible, alors qu'elle ne l'est pas à l'air libre .

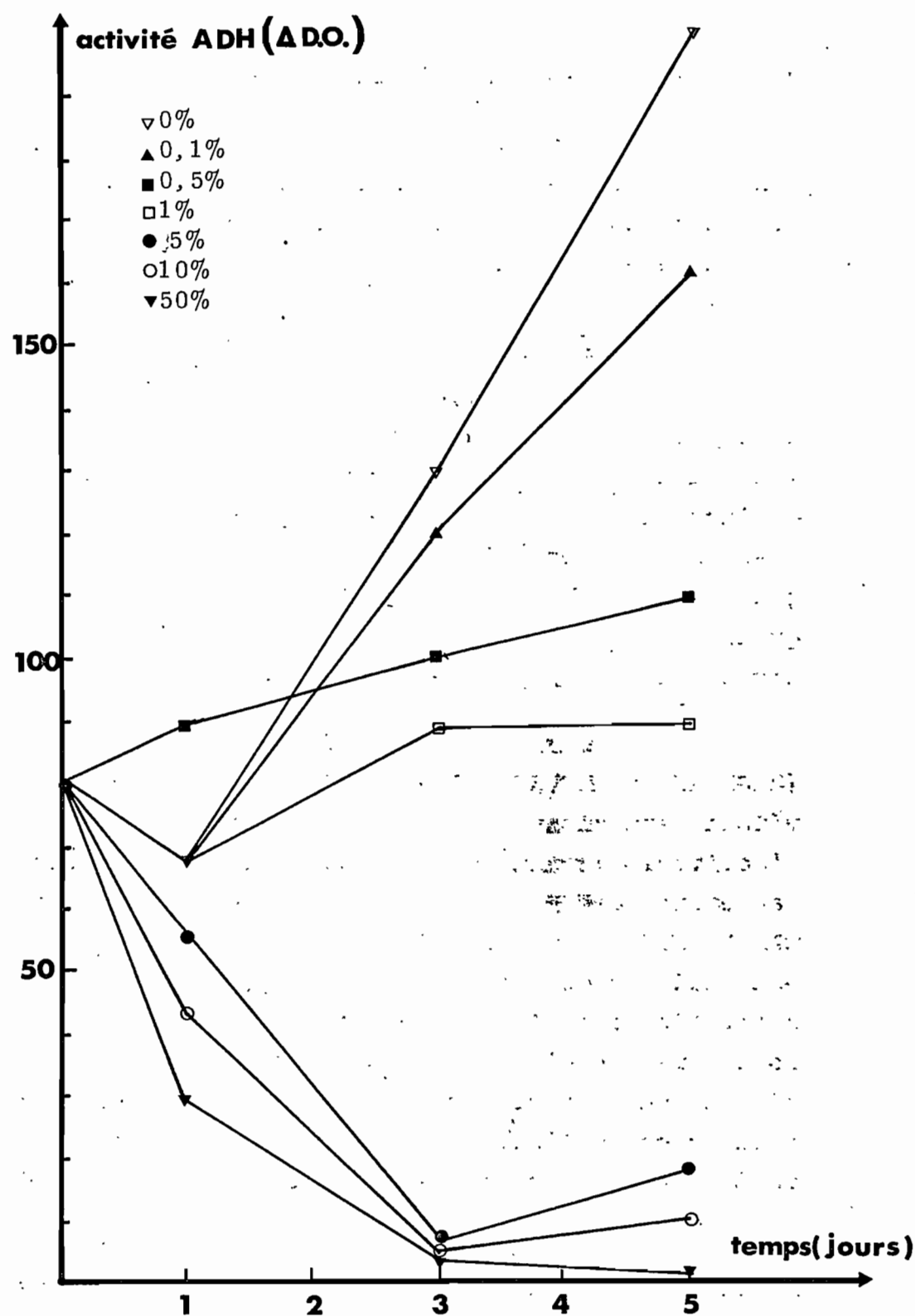


Figure E - Effet de la pression partielle d'oxygène sur l'activité ADH chez 23 DB en cours de germination.

Malgré une baisse de pression partielle d'oxygène, à l'intérieur du récipient fermé, on peut contrôler par cinétique enzymatique que dans un premier temps il n'y a pourtant pas d'activation de l'activité globale. De même le moment d'apparition de la zone III n'est pas lié directement à la pression partielle d'oxygène comme le montre l'analyse des temps nécessaires à l'apparition de la bande en fonction de la pression partielle d'oxygène dans les récipients avant leur fermeture (Fig. F).

Puisque le délai est plus court pour des concentrations d'oxygène plus élevées ce n'est pas la pression partielle d'oxygène qui est directement responsable de l'activation du gène  $A^2$ . D'autre part, comme nous l'avons dit plus haut, l'activation dans l'azote, même en balayage paraît bien corrélée des 2 loci.

Nous avons résumé les résultats (Fig. G) des observations sur l'activation des deux gènes à travers l'observation des zones I et III du zymogramme.

Notre hypothèse sera de considérer un des produits de la glycolyse anaérobie comme activation spécifique du gène  $A^2$ . La vitesse d'activation du gène  $A^2$  dépendant de la pression d'oxygène dans les récipients en début d'expérience, pourrait être liée au métabolisme plus actif constaté par une germination plus rapide.

On a pu mettre en évidence le phénomène dans l'activation du gène  $A^2$ , mais le principe actif ne nous est pas connu, bien que nous ayons montré le  $CO_2$  rejeté indépendant du phénomène.

La disparition de l'activation de  $A^2$  dans les conditions de gaz balayants, nous orientera vers un composé volatil, produit au cours de la germination (DOIREAU, 1976), en concentration plus élevée dans un matériel à fort métabolisme.

Chez le Maïs, l'effet du 2,4-D sur l'activation du gène  $ADH_2$ , révélé par le profil des zymogrammes de semences ayant germées en présence de cette auxine (FREELING, 1975), pourrait être lié à l'activité mitotique du 2,4-D favorisant un métabolisme accéléré. C'est ce phénomène analogue que nous avons révélé sur les cals de Mil.

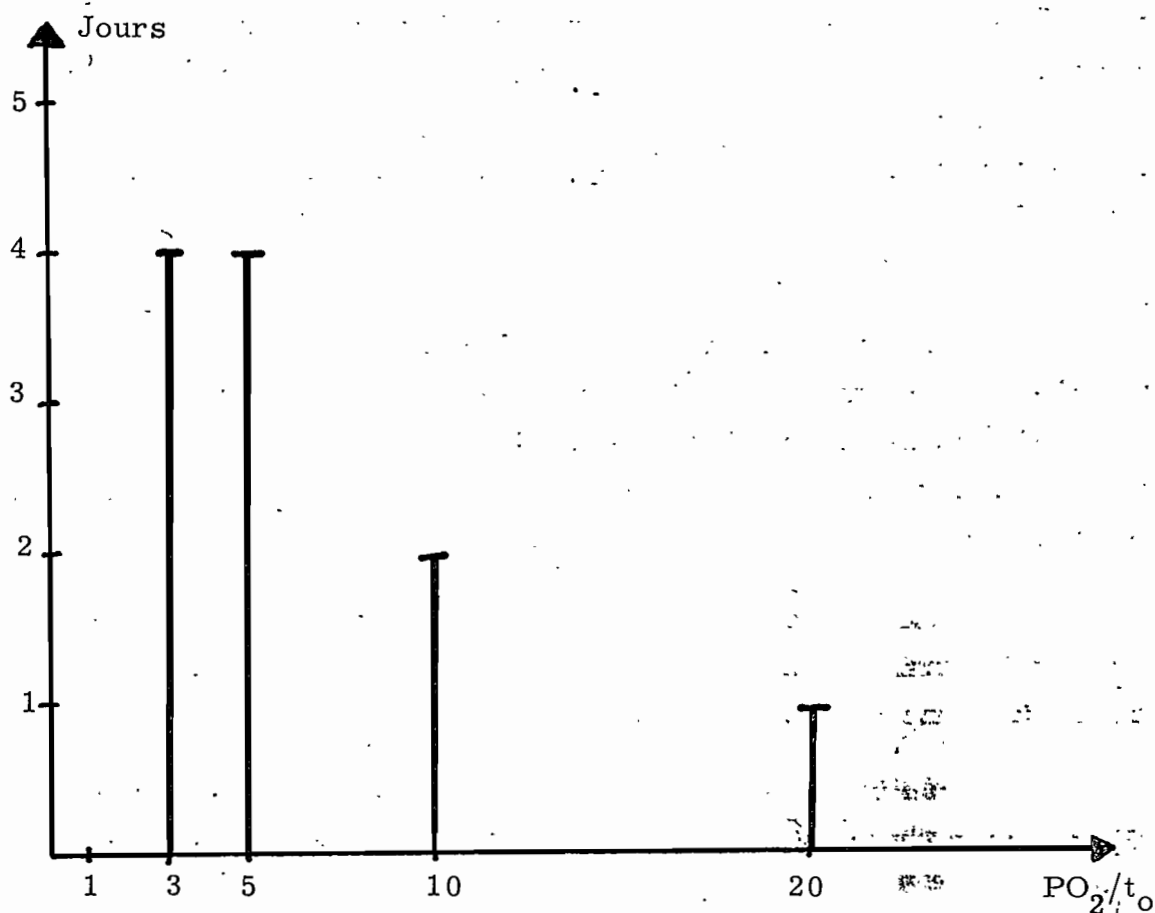


Figure F - Jour d'apparition de la zone III, sur des graines en germination en milieu confiné, en fonction de la pression partielle d'oxygène au début de l'expérience ( temps zéro )

Chaque expérience est effectuée à partir de 200 mg de 23 DB confiné dans un volume de 250 ml à 25°C.

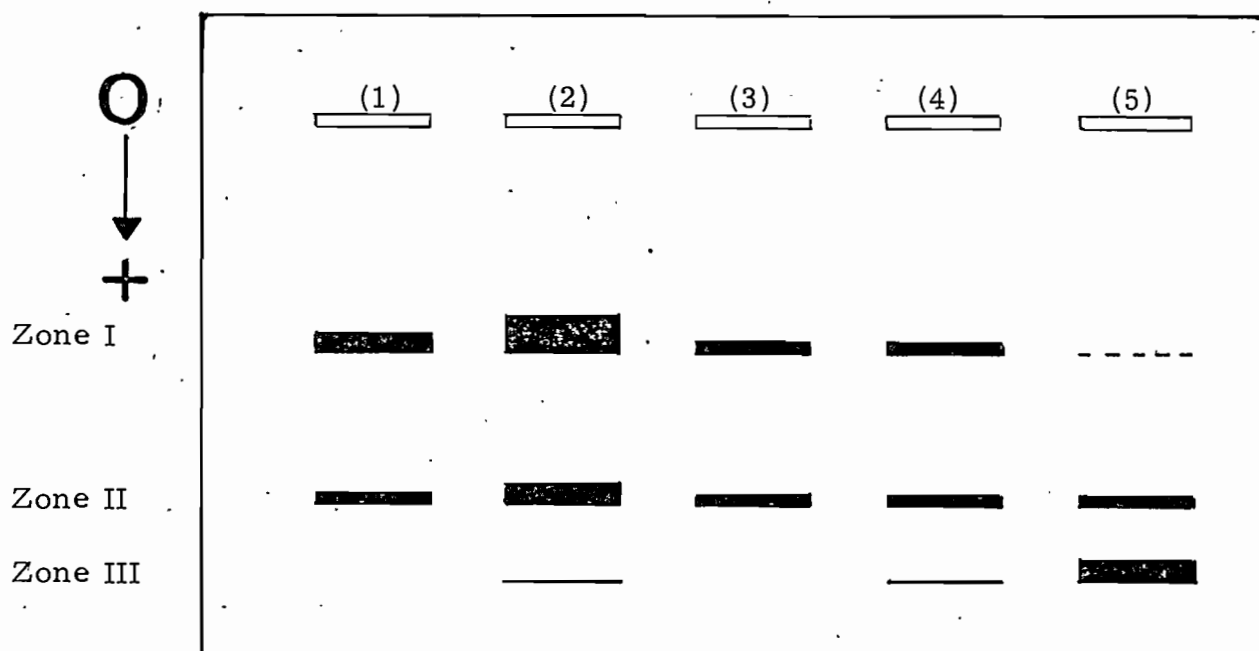


Figure G(1)

	ZONE I	ZONE III
(1)- Graines sèches.	+	O
(2)-Imbibition dans N <sup>2</sup>	+	+
(3)-Germination dans l'air	+	O
(4)-Germination en confiné	+	+
(5)-Callogenèse.	O	+

Figure G(2)

Figure G - Indépendance d'expression des zones I et III

La figure G(1) montre les zymogrammes obtenus à partir d'extraits effectués sur le matériel (1), (2), (3), (4), (5). La figure G(2) récapitule les différences d'expression observées dans les zones I et III.

## B. ETUDE DES PROTEINES HOMODIMERES DES ZONES I ET III

Nous avons cherché à étudier s'il existait des différences de fonctionnement de ADH de la zone I et III qui les différencieraient puisque leur activation est au moins partiellement indépendante .

### . Matériel et méthodes

Des graines de 23 DB (génotypes  $A^1_F A^1_{F'}$ ,  $A^2_X A^2_X$ ) imbibées dans un récipient clos, contenant de l'azote pur, sont broyées après trois jours, de façon à obtenir un extrait possédant une activité enzymatique forte et dans lequel se trouve les protéines FF, FX et XX liées à l'activation des deux gènes. On compare les cinétiques enzymatiques en fonction du pH dans une gamme de pH (6 → 10,5) dans un tampon Tris-HCl 0.2 M. Afin d'éviter un effet tampon dans les réactions, l'emploi d'un tampon unique nécessite un contrôle postcinétique des pH .

### . Résultats en fonction du pH (Fig. H)

Dans ces conditions d'extraction, la courbe d'activité globale est bimodale, quel que soit le sens de la réaction étudiée. Ceci montre qu'il existe dans l'extrait brut deux familles enzymatiques distinctes . Un extrait fait sur des semences sèches ne montrant qu'un optimum décelable de réaction, comme dans les travaux de LEBLOVA (1976), on peut penser que le traitement qu'ont subi les graines fait ressortir l'activité d'une deuxième protéine .

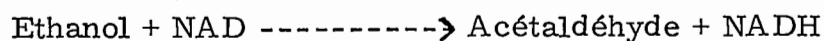
On peut remarquer également les vitesses de réaction plus fortes dans le sens acétaldéhyde → éthanol que dans le sens éthanol → acétaldéhyde . Les concentrations initiales de substrats (éthanol, acétaldéhyde) et de coenzyme (NAD, NADH), étant égales, cette différence reflète une meilleure affinité pour l'acétaldéhyde, confirmant le sens préférentiel de la réaction vers la formation d'éthanol .

Une élution après électrophorèse des zones I et III montre que les deux optima observés correspondent à la présence des deux homodimères hétérogéniques. L'élution de la zone II offre un profil de cinétiques en fonction du pH analogue à celui obtenu sur

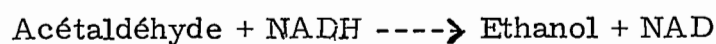
Figure H : Effet du pH sur l'activité enzymatique de l'alcooldéshydrogénase

H(1)- Effet du pH sur l'activité enzymatique d'un extrait brut de 23 DB

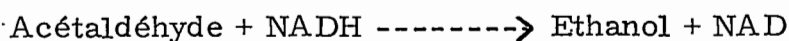
(□)- Réaction étudiée:



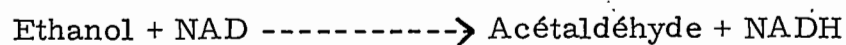
(■)- Réaction étudiée:



H(2)- Etude de l'activité correspondant aux zones I (●) et III (○)  
en fonction du pH pour la réaction :

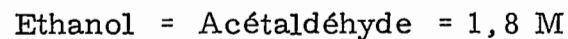


H(3)- Etude de l'activité correspondant aux zones I (●) et III (○)  
en fonction du pH pour la réaction :



-----

Les concentrations de substrats dans ces trois expériences sont  
égales :



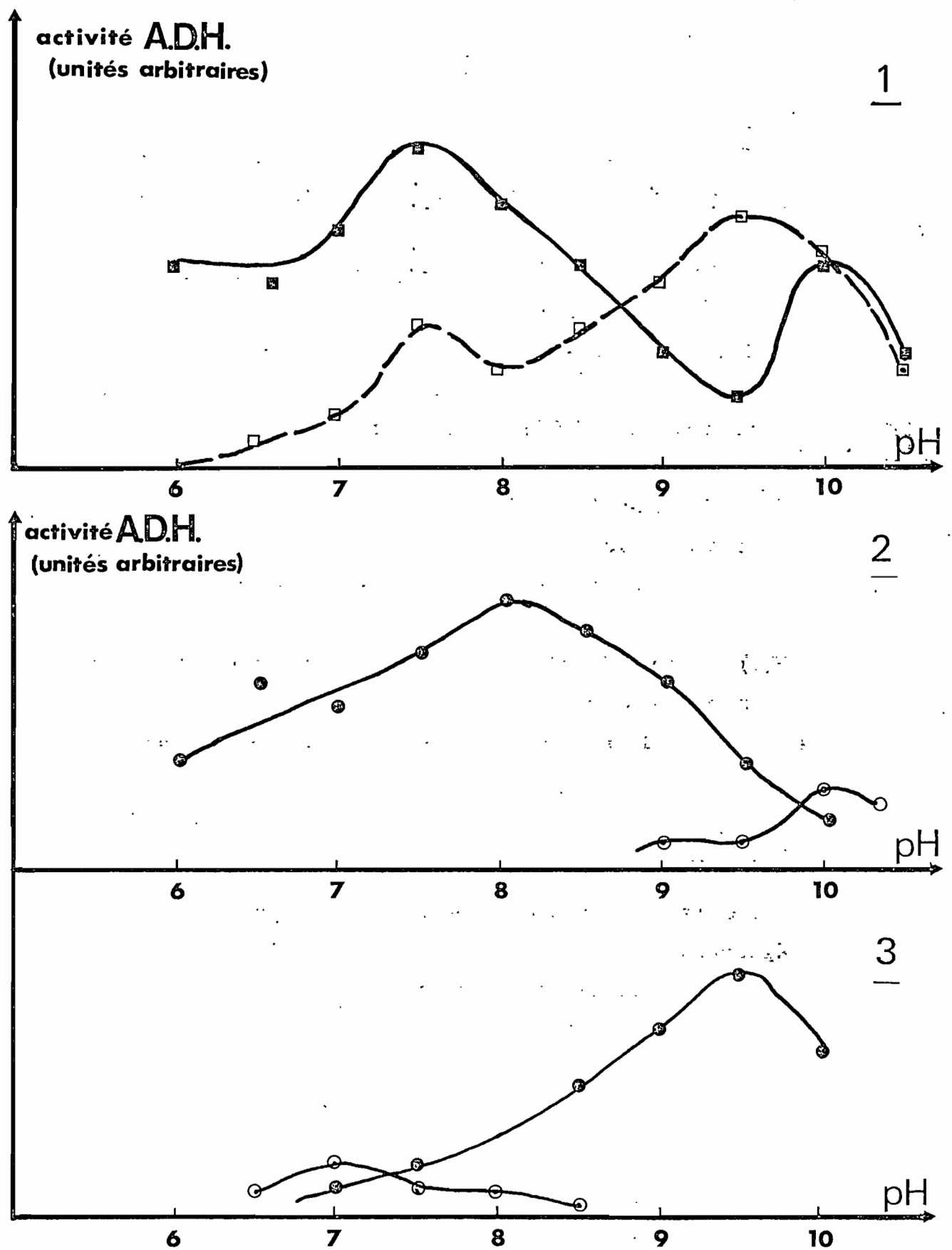


Figure II : Effet du pH sur l'activité enzymatique de l'alcooldéshydrogénase.



sur l'extrait brut .

Cette particularité du système des alcooldéshydrogénases donne une grande plasticité à la fonction physiologique, bien adaptée aux modifications de pH intracellulaire qui semblent intervenir lors des phénomènes asphyxiques (DAVID, 1974) par accumulation de produits terminaux (acide lactique et malique) .

#### Coefficient d'affinité

Les méthodes utilisées pour l'extraction de l'alcooldéshydrogénase ne peuvent permettre la détermination précise de la constante de MICHAELIS ( $K_m$ ) de l'enzyme pour son substrat. Une étude faite sur l'extrait brut montre la présence une nouvelle fois de plusieurs familles (non linéarité de la fonction  $\frac{1}{S} = f(\frac{1}{V})$  ) .

On peut noter dans les travaux qui concernent la liaison anaérobie-alcooldéshydrogénase (MC MANMON et CRAWFORD, 1971) une variation des coefficients d'affinité sur les plantes soumises à l'inondation, ce qui ici pourrait s'expliquer par l'activation du gène  $A^2$  .

Une autre différence entre les protéines XX et FF pouvait concerner leur stabilité ou leur labilité. En effet l'étude de la courbe des activités en fonction du pH, montre la diminution relative de l'activité de la zone III après élution par référence à sa valeur dans l'extrait brut, par rapport à l'activité de la zone II. De même lors de la dissociation-réassociation, on note une absence d'activité en zone III alors qu'il existe une bande en zone I. Ces particularités pourraient être liées à une détérioration de la structure protéique par l'électrophorèse. La comparaison des activités de l'extrait brut et des éluats pourrait donner une bonne mesure de cette labilité plus ou moins incontrôlée lors des électrophorèses .

### III. MODIFICATIONS LIÉES AU TYPE ALLÉLIQUE DU LOCUS 1

#### A. EN ABSENCE D'ACTIVATION .

Nous avons cherché à calculer les activités enzymatiques suivant les types alléliques, dans un stade où il n'y a pas d'induction. Pour cela, des extraits de graines en germination à l'air libre issus d'individus  $A^1_S A^1_S$ ,  $A^1_F A^1_S$  et  $A^1_F A^1_F$  ont été utilisés . Pour éviter tout effet de l'environnement génétique on utilise des graines ( $F_3$ ) de 90 plantes ségrégeant en  $F_2$  à partir d'un croisement  $A^1_S A^1_S \times A^1_F A^1_F$ . Ceci n'est bien entendu qu'une approche de ce que pourrait donner une analyse sur des lignées isogéniques FF,SS. Mais ici la variabilité génétique du background  $F_2$  n'intervient que comme un "bruit de fond"  $F_2$  et ne peut être attribuée a priori à l'ensemble de la structure génotypique associée à F ou S .

Les résultats montrent des activités enzymatiques semblables et une analyse de variance fait ressortir une activité des types SS légèrement supérieure (Tableau XI) .

**TABLEAU XI** : Résultats de l'analyse de variance sur l'effet du génotype sur l'activité ADH de semences après 12 h de germination à l'air libre. Tableau des données en Annexe 4.

Effets	S C E		ddl	$\frac{SCE}{ddl}$	F
Génotypes	$\sum_i (\bar{x}_{i.} - \bar{x}_{..})^2$	18,24	2	9,12	8,23
Résiduelle		96,323	87	1,107	(S)
Totale	$\sum_{ij} (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_{..})^2$	114,563	89	1,287	

#### B. CONDITIONS PARTICULIERES (Fig. I)

##### 1. Observation électrophorétique.

##### . Pollen

Le zymogramme du pollen issu d'une plante hybride est bien particulier. En zone I, il n'y a pas de bande correspondant aux protéines SF, montrant que le locus  $A^1$  n'est transcrit qu'après la

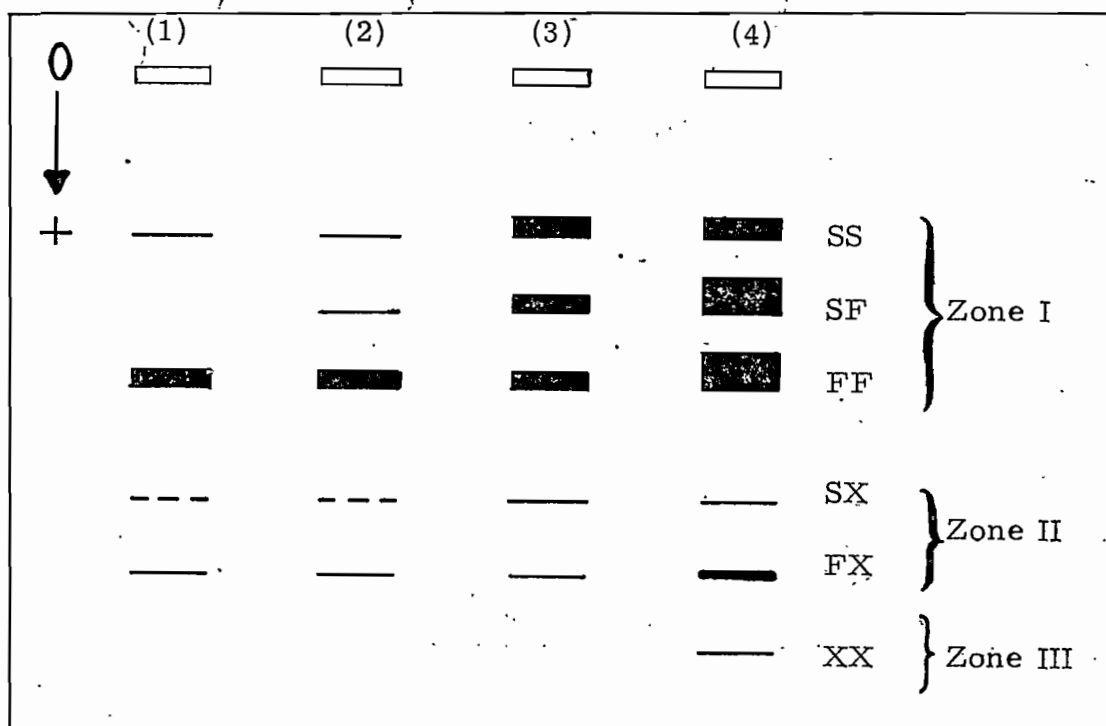


Figure I(1) - Zymogramme obtenu après électrophorèse d'extraits effectués à partir de : (1) Pollen, (2) Graines 15 jours après fécondation, (3) Graines sèches, (4) Graines imbibées exposées à une atmosphère d'azote, obtenus à partir d'un individu  $A_{S_F}^{1A_1^1}$ ,  $A_{X_X}^{2A_2^2}$

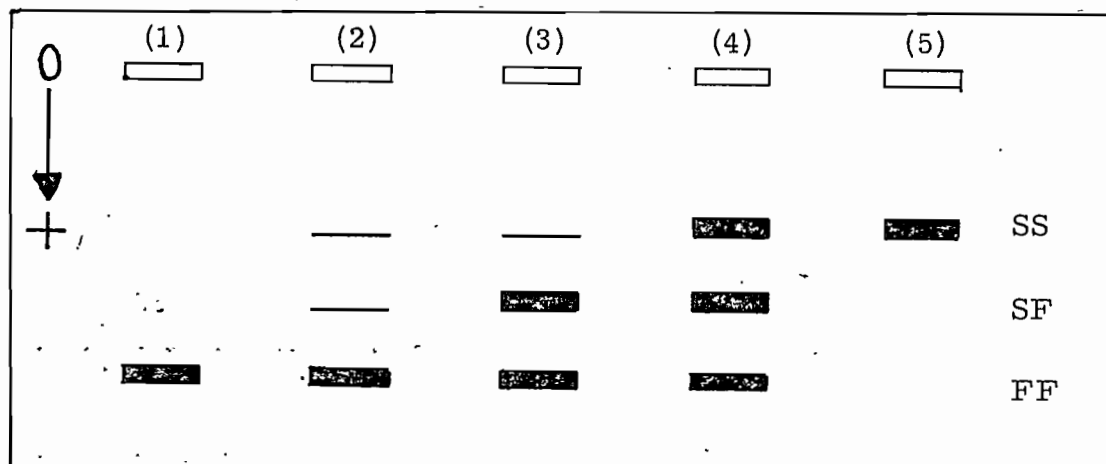


Figure I(2) - Zymogramme obtenu après électrophorèse d'extraits effectués à partir de graines issues d'un individu : (1)  $A_{F_F}^{1A_1^1}$  (graine sèche), (2)  $A_{S_F}^{1A_1^1}$  15 jours après fécondation, (3)  $A_{S_F}^{1A_1^1}$  1 mois après fécondation, (4)  $A_{S_F}^{1A_1^1}$  2 mois après fécondation (graine sèche), (5)  $A_{S_S}^{1A_1^1}$  (graine sèche), au niveau de la zone I

FIGURE I - Expression relative des isozyms SS et FF

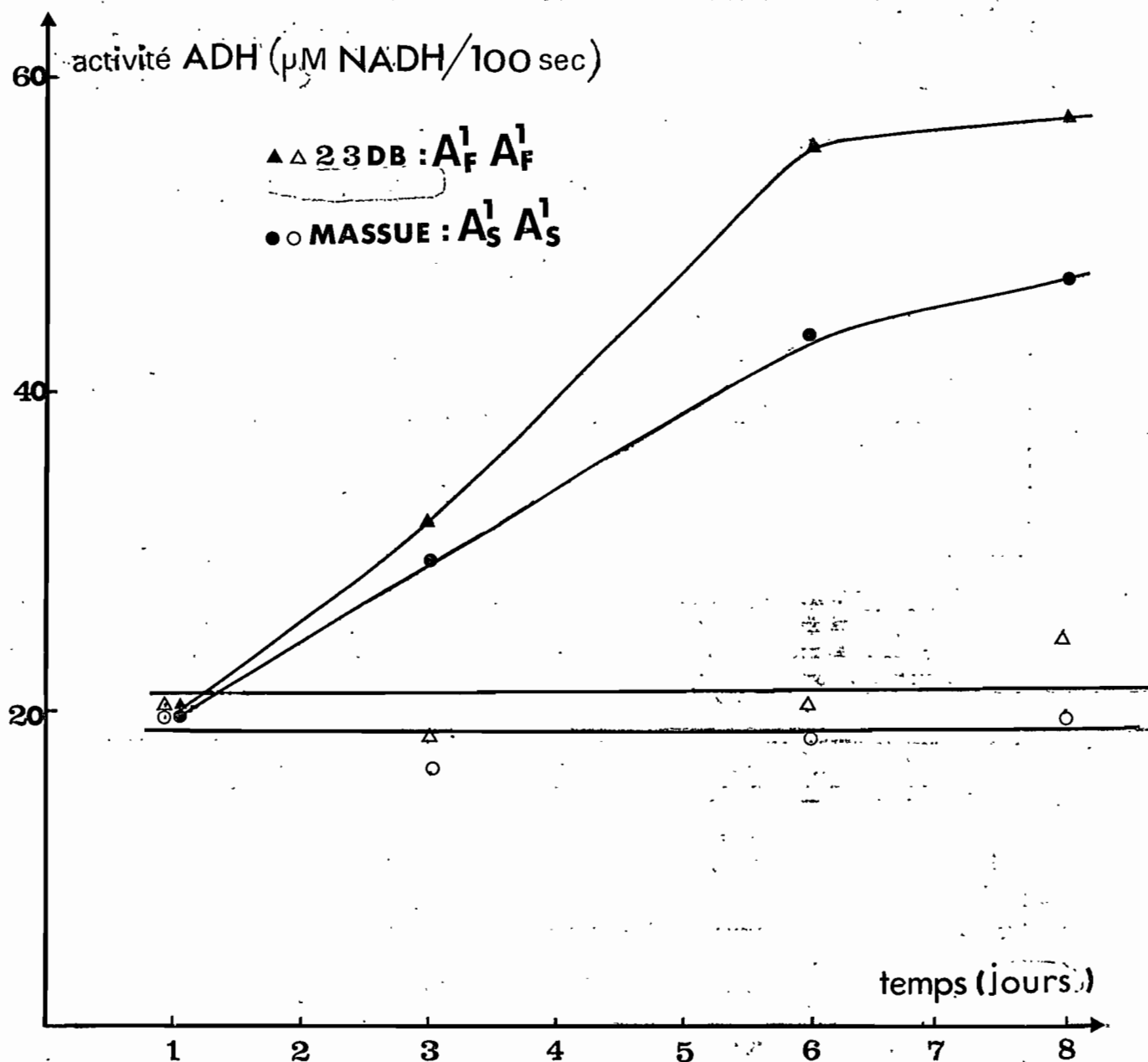


Figure J : Activité alcooldéshydrogénase en fonction du nombre de jours d'imbibition en atmosphère d'azote (▲,●) par rapport à l'activité des graines sèches (Δ,O).

méiose. Les génomes haploïdes ne produisent que des monomères S ou F, et c'est un mélange de structure SS et FF que l'on trouve dans la population pollinique.

L'activité de SS dans ces zymogrammes est nettement moins marquée que celle de FF. Ce phénomène semble être propre au pollen issu de l'hybride, car les populations de pollen issues des génotypes  $A_F^1 A_F^1$  et  $A_S^1 A_S^1$  ont la même activité globale.

#### . Graine immature .

De même, il y a un déséquilibre d'activité enzymatique dans les zymogrammes de graines immatures d'hybride  $A_S^1 A_F^1$ . Les bandes correspondant aux protéines SS et SF y sont moins intenses. Cette différence de coloration disparaît au cours de la maturation de la graine, et l'on observe des activités enzymatiques semblables quand la graine est bien sèche, et lors de sa germination (comme nous l'avons montré plus haut).

#### ... Graine dans l'azote .

C'est par la structure observée sur la zone I lors de la mise en imbibition dans l'azote des individus hybrides que l'on peut saisir le type de phénomène observé. Lors de l'activation de l'alcooldéshydrogénase, on retrouve chez les individus  $A_S^1 A_F^1$  les différences observées sur les graines immatures.

La plus faible coloration des bandes SS pourrait être le signe d'une "synthèse retardée" des monomères. S'il s'agissait d'un fait attribuable à des dégradations différentielles, cela serait ressorti de l'analyse de variance des graines en germination.

#### 2. Activation globale .

Pour éprouver cette hypothèse, nous avons suivi au cours du temps l'augmentation de l'activité globale de l'alcooldéshydrogénase lors d'une imbibition prolongée en atmosphère d'azote (Fig. J) des lignées Massue ( $A_S^1 A_S^1$ ) et 23 DB ( $A_F^1 A_F^1$ ).

L'augmentation faible de l'activité alcooldéshydrogénase par rapport à l'activité que l'on trouve dans les graines sèches

et la non-diminution constatée du taux de germination des semences après huit jours dans l'azote permet de distinguer le Mil pour sa tolérance à l'inondation (CRAWFORD, 1977).

On peut noter aussi la plus faible activation des semences de la lignée Massue ( $A^1_S A^1_S$ ). Cette expérience confirme l'hypothèse de la "synthèse retardée" des monomères  $A^1_S$ , dans la mesure où il n'y a pas d'effet du back-ground génétique. Seules des lignées isogéniques pourront permettre de définir réellement les différences d'activation des deux types alléliques.

### 3. Discussion

Une situation analogue a été étudiée sur d'autres plantes. Sur le brome (BROWN, MARSHALL, 1976) on a pu montrer une différence d'activité liée au type allélique, après immersion des semences. Sur le Maïs, ce phénomène a été mis en évidence au niveau de l'activité enzymatique globale (MARSHALL et BROUE, 1973) et sur les zymogrammes (SCHWARTZ, 1969). L'hypothèse formulée par SCHWARTZ à ce sujet suppose une compétition des deux types alléliques pour un facteur de régulation limité. Mis en évidence par l'étude de mutant de l'ADH (SCHWARTZ, 1976), ce type de mécanisme nécessite l'intervention d'un gène activateur. Ceci a été montré chez *Drosophila melanogaster*, où il existe des types alléliques de même mobilité électrophorétique, avec des activités distinctes (WARD, 1974), par l'étude de recombinants (MC DONNALD et AYALA, 1978) qui place ce gène sur un autre chromosome. Les travaux actuels (FREELING, 1976, 1978) semblent indiquer la proximité de ce site chez le Maïs.

Ce phénomène de régulation justifierait le zymogramme obtenu sur le pollen issu des plantes hybrides, en considérant que cette compétition n'a lieu que lors de la confrontation des deux génomes, bien que l'expression dans la transcription ne se réalise qu'après le stade microspore (confirmé par l'absence de bande SF dans le zymogramme). Si un tel système est applicable au Mil, nous devrions trouver dans l'avenir des recombinants ( $A^1_S$  fort,  $A^1_S$  faible), tels que ceux observés chez la *Drosophila*, par l'étude systématique des mils traditionnels, dont le polymorphisme est élevé.

C. EFFET SUR LES HETERODIMERES DE LA ZONE II .

La zone II est composée de dimères hétérogéniques issus des gènes  $A^1$  et  $A^2$ . L'étude particulière de cette zone nous paraît importante dans le cadre du fonctionnement de l'alcooldéshydrogénase pour les raisons suivantes :

- En premier lieu, on y retrouve chez les individus  $A^1_S A^1_F$ ,  $A^2_X A^2_X$  le déséquilibre précédemment décrit (SX plus faible que FX). Cette remarque confirme l'hypothèse d'une régulation d'expression différente des types alléliques et non celle d'une faiblesse de coloration de la bande SS propre à ces dimères .

- En deuxième lieu, ce peut être le moyen de comparer les propriétés d'association des monomères dans les protéines homogéniques relativement aux protéines hétérogéniques . En effet si on dénombre les proportions des différents couples formables entre deux monomères A et B, une recombinaison au hasard donnera les fréquences  $p^2$ ,  $2pq$  et  $q^2$  respectivement pour AA, AB et BB, p et q étant les fréquences des monomères A et B .

Cette recombinaison au hasard sous-entend que A peut aussi facilement s'associer à B qu'à lui-même. Dans le cas de deux protéines issues de deux loci distincts, on peut s'attendre à ce que la dissemblance des monomères fasse qu'ils s'associent plus facilement avec eux-mêmes qu'avec d'autres. Il faut donc introduire un paramètre ( $\alpha$ ) d'affinité tel que A s'associant avec lui-même avec une fréquence 1, il s'associe avec B avec une fréquence  $1-\alpha$ . Dans un tel modèle, la proportion des homodimères sera plus élevée que dans le cas d'une combinaison aléatoire .

Pour répondre à ce modèle, nous avons calculé les activités des zones I, II et III chez les individus  $A^1_S A^1_S$  et  $A^1_F A^1_F$ , après élution. Les activités relatives observées sont données dans la Tableau XII .

TABLEAU XII

Activité relative				
	Zone I	Zone II	Zone III	Total
$A^1_F A^1_F$	115	30	13	158
$A^1_S A^1_S$	175	48	13	236

Les calculs (Cf. Annexe 5) montrent que l'activité de la Zone II est trop faible par rapport à ce qu' on pourrait attendre au vu des activités des deux dimères homogéniques. Ainsi il peut exister une affinité préférentielle pour un monomère homologue dans la formation des différents dimères . Le type S ou F pourrait entraîner une variation dans cette affinité qui modifierait les proportions relatives des trois groupes de dimères enzymatiques. Cependant, la confirmation de cette hypothèse demandera un travail que nous n'avons pu réaliser.

Pour démontrer l'existence d'une affinité dans la formation des dimères, nous nous sommes servis des activités tirés de l'élution. Ceci ne permet pas de se faire une idée de la quantité de protéines qui existent dans chaque zone, même s'il n'y a pas de dégradation au cours de l'électrophorèse des activités enzymatiques .

Il nous semble donc important pour confirmer cette hypothèse de faire appel à des techniques plus précises telle que l'immunoélectrophorèse, qui par le principe même donne une valeur directe de la quantité de protéines .

#### D. CONCLUSION .

L'alcooldéshydrogénase, activée aux basses pressions partielles d'oxygène présente une structure digénique chez le Mil . Le système possède une plasticité remarquable, lui permettant de fonctionner dans des conditions optima lors des modifications intra-



cellulaires liées aux phénomènes asphyxiques. Cette particularité est à rapprocher des propriétés physicochimiques distinctes des différents dimères, issus de monomères codés par des gènes distincts  $A^1$  et  $A^2$ , dont la régulation est au moins dans certaines situations indépendante .

On a pu noter une différence dans le fonctionnement des types alléliques  $A^1_S A^1_F$ , le type  $A^1_S$  étant plus lentement ou plus difficilement mis en service (dans les phases d'inhibition ou dans les phases compétition ) .

Ces corrélations fonctionnelles différentielles entre gènes et allèles étant établies, il nous faut maintenant revenir à la plante pour retrouver les situations d'anaérobiose qui donneraient l'occasion de traduire au niveau écologique les différences lues au niveau enzymatique .

### CHAPITRE III : LE MIL DANS DES CONDITIONS D'ANAEROBIOSE

#### I. DÉFINITION DE L'ANAÉROBIOSE

Quand elle est limitée en oxygène, la cellule vivante tire son énergie de la glycolyse anaérobie. Cette dernière entraîne l'accumulation de pyruvate et une activation d'alcooldéshydrogénase . Il est important pour notre problème de définir les conditions écologiques de cette activation, seuls instants où peut s'exprimer l'avantage génotypique nécessaire à l'équilibre des formes alléliques  $A_S^1$  et  $A_F^1$  .

On conçoit aisément que cette limitation du cycle de Krebs dépend du besoin énergétique du tissu considéré, tel qu'on peut le constater dans les tissus musculaires . Ainsi, deux tissus aux besoins identiques ne seront pas limités par les mêmes pressions partielles externes du fait :

- Soit que leur gestion énergétique soit différente,
- soit que leur approvisionnement en oxygène se fasse différemment . Les végétaux peuvent améliorer l'apport d'oxygène aux cellules par des espaces intracellulaires plus importants .

N'ayant pas la possibilité de connaître la concentration d'oxygène intracellulaire, on ne peut définir l'anaérobiose qu'en se référant aux concentrations externes d'oxygène pour un tissu considéré. Les pressions partielles d'oxygène limitantes dépendront donc de chaque matériel .

La respiration est un phénomène maintenant bien étudié (BEEVERS, 1960 ; JAMES, 1953 ; DUCET, 1962). De nombreux auteurs ont pu montrer que la consommation d'oxygène augmente en fonction de la pression partielle d'oxygène, jusqu'à une valeur où la respiration devient constante. Cette valeur est atteinte pour une pression dite "pression critique d'oxygène" (BERRY et NORRIS, 1949) . Il est courant de calculer la pression partielle d'oxygène pour laquelle la vitesse de respiration est diminuée de 50% ; cette pression est appelée  $P_{50}$  par analogie avec les réactions enzymatiques . Cependant, comme il n'existe pas de relation simple entre la concentration d'oxygène extérieure et la vitesse de respiration intracellulaire, de nombreux auteurs préfèrent parler de  $P_{50}$ . Ces valeurs de  $P_{50}$  varient suivant les organismes considérés. Egale à  $10^{-7}$  M pour la levure (LONGMUIR, 1960) la  $P_{50}$  a des valeurs comprises entre  $10^{-6}$  M à  $10^{-3}$  M suivant les tissus végétaux considérés .

C'est à travers ces valeurs que l'on peut définir la normoxie (situations où la pression partielle d'oxygène est supérieure à la pression critique), et l'hypoxie (pression partielle inférieure à la pression critique) .

On ne parlera d'anoxie qu'à des pressions partielles d'oxygène telles que le bilan énergétique du cycle de Krebs soit devenu négligeable face au bilan de la glycolyse anaérobie .

## II. RESPIRATION DE LA SEMENCE DE MIL .

### Méthodes de mesure

On mesure la décroissance de la concentration d'oxygène dans une cellule polarographique étanche contenant les semences étudiées. Il peut être nécessaire d'étudier la respiration de ces semences au Warbourg. En évaluant la consommation d'oxygène par unité de temps, il est ainsi possible de définir le temps nécessaire à la diffusion de l'oxygène dans la semence. La consommation devient stationnaire, jusqu'à la percée du tégument par la radicule qui permet une diffusion plus grande de l'oxygène, et modifie les conditions physiques du phénomène .

Aux conditions de consommation optimum, pour mesurer l'activité respiratoire on suit la décroissance de la concentration d'oxygène dans la cellule contenant les semences. Tant que la pression partielle d'oxygène est supérieure à la pression critique, la diminution de l'oxygène est linéaire par rapport au temps. En dessous de cette valeur, la consommation d'oxygène décroît en fonction hyperbolique du temps. Les valeurs de la pression critique et de la pression  $P_{O_2 50}$  sont mesurées à partir de ces évolutions.

#### Résultats (Figure K)

Pour le Mil la pression critique des semences de Massue et 23 DB se situe à 40%. Celle des semences hybrides Massue x 23 DB se situant à 65% d'oxygène (expression d'une vigueur hybride potentielle révélant des possibilités énergétiques sans doute supérieures) (Tableau XIII<sub>1</sub>).

La teneur en oxygène dans l'air étant de 21%, la semence de Mil est donc toujours en hypoxie, on comprend alors la présence d'une activité alcooldéshydrogénase dans les semences sèches.

La diffusion de l'oxygène étant beaucoup plus faible dans l'eau que dans l'air, les concentrations très basses en sol inondés font que la semence en terrain humide est largement hypoxique. Dans ces conditions la glycolyse anaérobie doit avoir lieu et la régulation de l'alcooldéshydrogénase peut y jouer un rôle important. Les racines pourraient se trouver également en hypoxie bien qu'on ne connaisse pas leurs paramètres respiratoires.

### III . COMPORTEMENT DE LA SEMENCE DE MIL EN HYPOXIE .

Du fait de cette pression critique élevée, on s'attend à observer un effet important de la concentration d'oxygène sur le taux de germination. Aux basses pressions d'oxygène, on sera déjà dans la zone d'activation de l'alcooldéshydrogénase.

Pour cette expérience, nous avons utilisé les semences des lignées Massue et 23 DB et leur hybride. On mesure le développement de la graine dans des conditions variables de  $P_{O_2}$ .

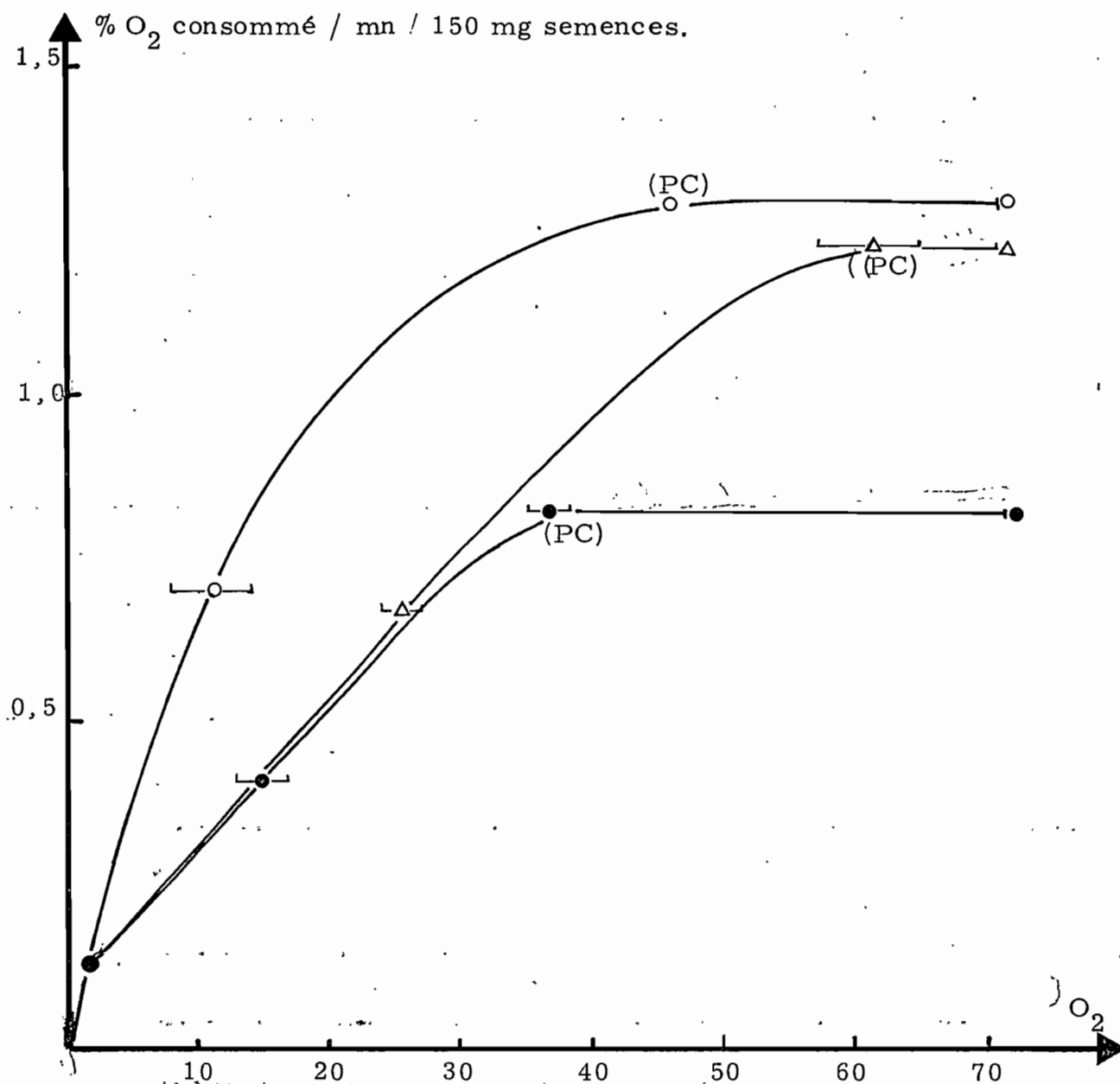


Figure K : Courbe de respiration des semences de 23 DB (○), Massue (●) et leur F 1 (△) après 3 heures d'imbibition à 32°C

On remarquera les concentrations limitantes de la respiration largement supérieures à la pression partielle de l'oxygène dans l'air = 21 %

Génotypes	Massue	23 DB	F 1
Intensité Respiratoire			
Pression critique ( $P_{O_2}$ )100	37,5% $\pm$ 1,04	46,5% $\pm$ 0,35	61,8% $\pm$ 4,4
( $P_{O_2}$ )50	13,7% $\pm$ 1,9	11% $\pm$ 3	24,4% $\pm$ 1,5
( $P_{O_2}$ )10	1% $\pm$ 0,4	1% $\pm$ 0,4	0,85% $\pm$ 0,15
( $P_{O_2}$ )5	0,5% $\pm$ 0,3	0,5% $\pm$ 0,3	0,3% $\pm$ 0,2
( $P_{O_2}$ )1	—	0,2% $\pm$ 0,1	0,05% $\pm$ 0,02
Nombre d'expériences	3	2	2

Tableau XIII-1 : Activité respiratoire chez Massue ( $A_S^1 A_S^1$ ), 23 DB ( $A_F^1 A_F^1$ ), et leur F 1 ( $A_S^1 A_F^1$ ) après 3 heures d'imbibition à 32°C

$P_{O_2}$	0	1	3	5	10	20
Génotypes						
Massue	0	++	++	++	+++	+++
F 1	0	0	0	+	+++	++++
23 DB	0	+	+	++	++	+++

Tableau XIII-2 : Germination après 12 heures en fonction de la  $P_{O_2}$  chez Massue, 23 DB, et leur F 1.

- 0 - Aucune germination
- +
- ++
- +++
- ++++

L'expérience se déroule pendant 24 h à 25°C . Les données sont rapportées dans le Tableau XIII<sub>2</sub>.

Entre ces deux lignées, la seule différence concerne la précocité de germination (ce résultat a été confirmé par la vitesse moyenne de germination de ces deux lignées à 32°C dans une solution  $\text{MgCl}^2$   $10^{-3}\text{M}$  aérée. Dans ces conditions la racine apparaît en trois heures pour le Massue, et en huit heures pour 23 DB)

La germination des hybrides est par contre limitée, fait qu'il est possible de relier à la plus forte valeur de la  $\text{Po}_2$  50 . Après 48 h l'hybride parvient tout de même à germer jusqu'à 1% d'oxygène.

Le Mil germe donc à des concentrations très faibles d'oxygène, nous avons même pu observer des germinations à 0,5% après trois jours .

Puisque la pression critique est très élevée, la germination se déroule en conditions telles que le bilan de la glycolyse anaérobie n'est pas négligeable par rapport à la respiration : ceci pourrait signifier une grande adaptation aux phénomènes d'asphyxie (Tableau XIV) .

Le dégagement de  $\text{CO}_2$  après 72 heures en atmosphère d'azote ( $0,16 \pm 0,02 \mu\text{l}/\text{mn}/\text{mg}$  poids sec) place le Massue dans la catégorie des plantes "flood-tolerant" décrites par CRAWFORD (1977).

On ne peut comparer le dégagement du Mil à ceux du Riz ( $0,10\mu\text{l}$ ) ou de la Laitue ( $0,20\mu\text{l}$ ) si ce n'est à titre indicatif . Les expériences de CRAWFORD ayant été réalisées après 72 heures d'immersion, l'oxygène dissout dans l'eau ne permet pas de considérer les semences en hypoxie, et la germination a pu être induite. D'autre part il est difficile de comparer ces deux types de semences comme le fait l'auteur, car elles n'ont pas la même gestion de leur glycolyse .

Cependant, par son faible dégagement de  $\text{CO}_2$  après 72 heures dans l'azote (conditions pratiquement plus inductrices de la glycolyse), par sa pression critique élevée et sa germination à des pressions partielles d'oxygène basses, le Mil est une plante adaptée aux phénomènes d'asphyxie et on comprend dans ce cadre que la plus faible variation des propriétés enzymatiques de la voie anaérobie puisse se traduire par des différences adaptatives non négligeables .

TABLEAU XIV : Tableau comparatif de la semence de Mil et la semence de Laitue qui ne fait pas fonctionner sa voie de glycolyse anaérobie .

	$\text{PO}_2$ seuil de germination	$\text{PO}_2$ critique
Semence de Laitue	2,2 - 2,5 %	30 %
Semence de Mil	< 0,5 %	40 %

#### IV . DISCUSSION

Revenons sur cette place du Mil parmi les plantes tolérantes à l'asphyxie dans la classification de CRAWFORD. Cela le met à proximité du Riz, ce qui peut paraître étonnant pour une des céréales les plus adaptées aux zones semi arides .

Les conditions climatiques des zones de culture de Mil peuvent aider à comprendre l'importance pour cette plante sahélienne d'un système adapté à l'asphyxie. S'il est vrai qu'il ne pleut que 500-1000 mm dans les zones de culture, la période des pluies peu étendue provoque un véritable détrempeage des sols, fait bien connu par l'impraticabilité des pistes lors de la saison des pluies . Le Mil connaît donc une période d'inondation sévère, même quand il est cultivé en billon (ce qui n'est pas la situation la plus fréquente) . Ces périodes d'inondation entraînant un abaissement de la concentration en oxygène des sols, le Mil connaît alors temporairement, de façon plus ou moins prolongée, une phase d'hypoxie, d'où l'importance de la glycolyse anaérobie .



En citant le cas de certains pâturages écossais, CRAWFORD nous suggère une source de l'avantage adaptatif du type  $A_S^1$  que l'on attend chez le Mil (communication personnelle) . Partiellement inondés au printemps, les champs présentent lors des sécheresses estivales un aspect clairsemé. On a pu constater dans ces zones qu'il s'était opéré un criblage des variétés herbacées vis à vis de la tolérance à l'asphyxie. Les variétés de type "intolérantes" sont des variétés à forte production d'éthanol. Du fait de la toxicité de ce produit terminal, la croissance racinaire est limitée et même arrêtée pendant l'inondation .Lors de la sécheresse estivale, seules résisteront les plantes au système racinaire bien développé. Même si la sécheresse n'est pas le facteur létal, un système racinaire étendu conduit à une meilleure exploitation du sol de la plante .

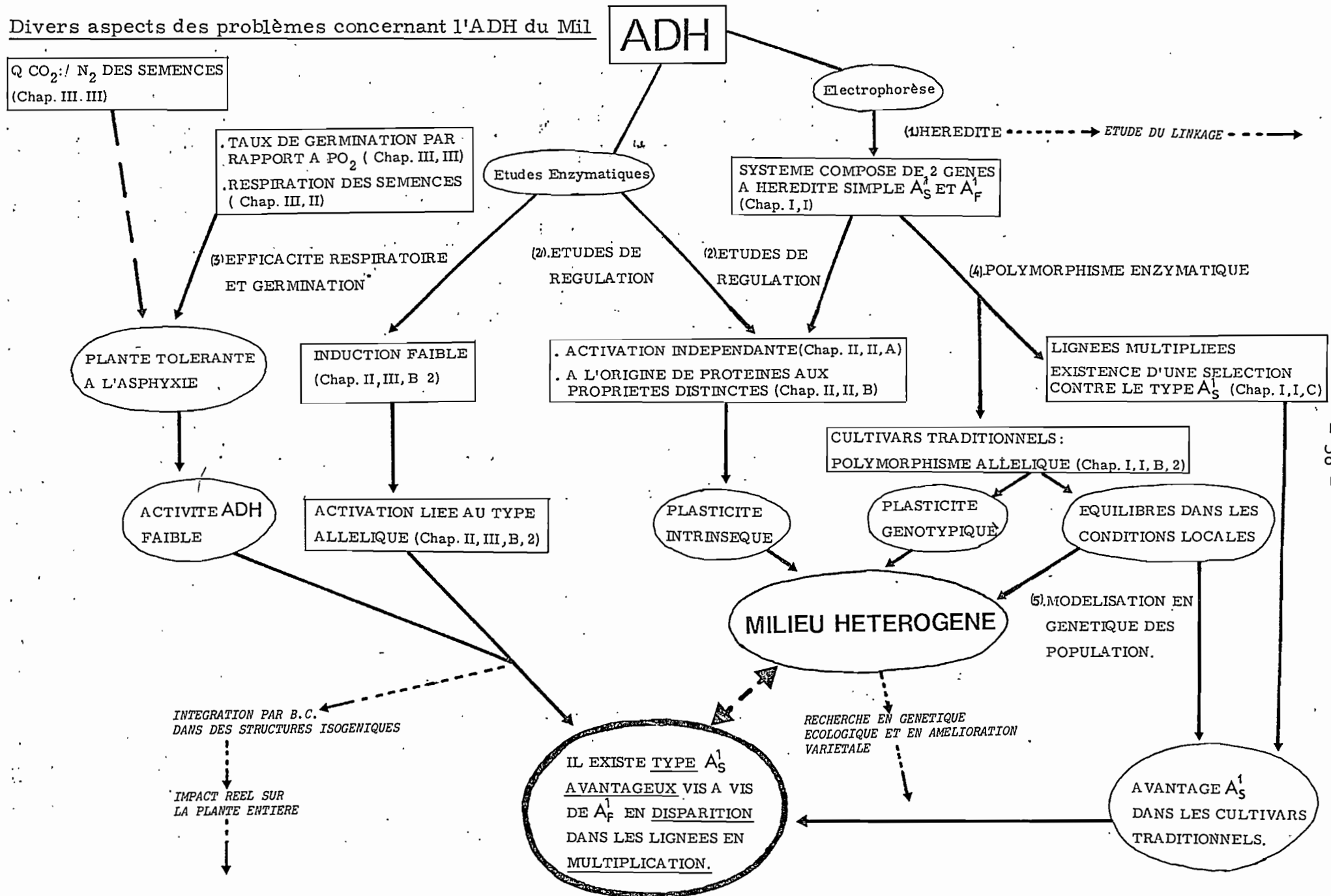
Si un mécanisme analogue était en jeu pour le Mil, les variétés qui n'activent que modérément l'alcooldéshydrogénase et peut être toute la glycolyse anaérobie lors des inondations de la saison des pluies, seraient les plus avantageées au cours des périodes de sécheresse qu'elles subissent en cours de cycle (par le biais des racines recherchant les profondeurs humides et une meilleure gestion du sol). Cette hypothèse nécessite une régulation en bloc des enzymes de la glycolyse anaérobie, afin que la diminution d'activité d'alcooldéshydrogénase ne conduise pas à une accumulation d'acétaldéhyde également toxique. La plus lente mise en service de  $A_S^1$  serait le témoin et une composante importante de l'activation globale plus ménagée de la glycolyse anaérobie .

Nous avons pu vérifier qu'après trois jours dans l'azote, les semences du type  $A_S^1$  semblent produire moins de  $CO_2$ , signe d'un catabolisme moins important de pyruvate .

En résumé, si l'activation de l'alcooldéshydrogénase peut conduire à un bilan énergétique plus élevé, il doit être à long terme plus payant de ne pas trop produire d'éthanol et de ralentir le métabolisme en période prolongée d'asphyxie. L'augmentation modérée de l'ADH semble être un fait général des plantes résistantes à l'inondation (CRAWFORD, 1970 ; BROWN, 1976 ; MARSHALL, 1973) mais il est difficile d'étudier précisément toutes les connexions entre les

bilans énergétiques et les concentrations des composés toxiques. Il peut exister des voies métaboliques parallèles, telles que les décrit CRAWFORD (1978) différenciant deux variétés mais la régulation intravariétale de l'alcooldéshydrogénase paraît probablement avoir plus d'impact sur le bilan énergétique global. La situation observée sur la sélection gamétique pourrait découler d'un tel paradoxe. Le pollen, qui connaît probablement l'asphyxie par l'imperméabilité de l'exine, pourrait être, lui, avantage par un bilan énergétique élevé s'il n'a pas à payer sa dette par l'intoxication alcoolique au cours de sa vie, relativement courte .

# Divers aspects des problèmes concernant l'ADH du Mil



## CONCLUSION GENERALE

Les grandes lignes de notre travail sont résumées dans le tableau intitulé : Divers aspects des problèmes concernant l'alcooldéshydrogénase du Mil. Nous verrons au cours des différentes étapes comment il est possible d'intégrer le gène dans la population .

Une étude sur l'hérédité (1) du système a mis en évidence deux gènes :  $A^1$  et  $A^2$  . On a pu montrer par des études de régulation (2) une activation différente de ces deux gènes, qui par leur production de protéines aux propriétés distinctes confère à la plante une grande plasticité lors des phénomènes d'anaérobiose .

Les études portant sur l'efficacité respiratoire et la germination (3) placent cette plante dans le groupe des plantes "flood-tolerant", fait remarquable pour une espèce adaptée aux régions semi-arides. Ces plantes possédant toutes une faible activité alcooldéshydrogénase lors des phases anaérobies, des études de "régulation" (2) montre qu'il existe un type allélique (S) du gène  $A^1$  particulièrement adapté à ces conditions par la faible activation qui le caractérise .

Pourtant, l'absence de ce type avantageux pour la plante dans les lignées multipliées est particulièrement remarquable. Le coefficient de contre sélection gamétique qui lui est lié, prouvé par une étude mendélienne, explique ce résultat .

Pourtant, l'étude du polymorphisme enzymatique (4) pour  $A^1$  dans des cultivars togolais, atteste de sa présence dans les populations traditionnelles. Un modèle de génétique de populations (5)

permet d'expliquer le polymorphisme stable des cultivars par l'effet avantageux du génotype  $A^1_S$  dans le développement de la plante. Ceci donc conduit à une variabilité importante des cultivars traditionnels, liée aux conditions mouvantes que rencontre ces milieux hétérogènes .

Les propriétés de l'ADH sont tout à fait remarquable chez le Mil :

- Un système à hérédité simple composé de deux gènes, indépendamment activés,

- Une composition oligomérique qui confère à l'enzyme des propriétés physicochimiques susceptibles de s'adapter au changement de milieu intracellulaire qu'il rencontre lors de la glycolyse anaérobie .

- Une activation globale faible de l'expression enzymatique en période d'asphyxie (faible production de produit toxique terminal de l'anaérobiose [éthanol]).

Ceci crée une situation qui semble pouvoir conférer une bonne tolérance à l'inondation. Ce phénomène peut être inattendu pour une plante de région semi aride .

C'est l'analyse du polymorphisme enzymatique comparé dans les collections de lignées et de cultivars traditionnels qui nous a conduit cependant à considérer que cette organisation n'est pas fortuite .

La présence du type  $A^1_S$  dans les cultivars, malgré la contre-sélection gamétique qu'il subit (entraînant sa disparition des lignées en multiplication), indique que la plante doit rencontrer sur le terrain des conditions qui le rende avantageux pendant le développement de la plante .

Caractéristique des plantes tolérantes à l'inondation, la faible induction du type  $A^1_S$  pourrait être la source de l'avantage nécessaire à son maintien dans les cultivars traditionnels. En étudiant la diversité des conditions de culture des cultivars et en parallèle, leur composition pour les types alléliques de  $A^1$ , il devrait

être possible de montrer l'incidence pratique des variations génétiques pour ce système .

En effet, si l'on a pu montrer une différence significative du fonctionnement enzymatique lié au type allélique, seule une étude sur le terrain peut nous permettre de réaliser pleinement l'importance d'une telle différence de comportement en faisant ressortir une corrélation entre les fréquences alléliques et les conditions de culture observables . L'expérimentation sur des lignées isogéniques ne différant que pour l'état allélique du gène  $ADH_1$  permettra en outre de déceler l'incidence de cette structure sur la plante elle-même .

Ainsi complétée cette étude permettra de montrer l'importance particulière des voies anaérobies chez une plante de zone semi aride, où les alternances de régime hydrique sont très marquées .

Si de tels effets sont mis en évidence, cela peut avoir des répercussions importantes sur les programmes de sélection, quand on cherchera à fabriquer des variétés modernes améliorées, ayant la même tolérance que les cultivars traditionnels aux alternances de dessèchement et de saturation en eau du sol, caractéristiques de ces régions . Cette étude nous paraît d'autant plus importante que la gestion habituelle des collections par les sélectionneurs, qui devrait conserver globalement une diversité allélique reflétant le polymorphisme des variétés locales, tend quasiment à faire disparaître un des types alléliques indispensables à la réalisation de ces structures enzymatiques équilibrées. Si celles-ci ont un réel impact pour l'adaptation des variétés, il faudra à l'avenir spécialement se prémunir contre la perte quasi-automatique de son constituant moyen dans les collections de travail .

## A N N E X E 1

### ESTIMATION DES COEFFICIENTS (S) DE SÉLECTION GAMÉTIQUES (SUR L'ANALYSE DES 434 INDIVIDUS)

#### -A Sélection sur gamète mâle uniquement.

La sélection ne modifiant que la fréquence du type  $A_S^1$ , nous aurons les fréquences  $p$  et  $q$  respectivement pour  $A_S^1$  et  $A_F^1$  après sélection:

$$p' = \frac{p(1-s)}{1-ps}$$

$$q' = \frac{q}{1-ps}$$

soit les fréquences génotypiques :

$$SS = pp'$$

$$SF = pq' + p'q$$

$$FF = qq'$$

Nous pouvons tester cette hypothèse en remarquant que:

$$pq' + p'q = \frac{1}{2} \quad \text{avec } p = q = \frac{1}{2}$$

On est donc amené à tester cette hypothèse par un  $\chi^2$  sur les valeurs observées :

$$A_S^1 A_S^1 + A_F^1 A_F^1 = 200$$

$$A_S^1 A_F^1 = 234$$

par rapport à la valeur moyenne égale à la moitié du nombre total d'individus observés : 217

La valeur calculée (  $\chi^2 = 2,66$  ) ne permet pas de rejeter cette hypothèse (  $\chi^2$  seuil 5% = 3,84 )

- 1a -

$$\text{avec } p = q = \frac{1}{2}$$

$$\text{On pose : } \frac{1}{2}p' + \frac{1}{4} = 0,44 \Rightarrow p' = 0,39$$

$$\frac{1}{2}q' + \frac{1}{4} = 0,56 \Rightarrow q' = 0,61$$

Dans ces conditions :

$$\frac{q}{1 - ps} = 0,61 \quad \text{soit } s = 0,36$$

### - B Sélection égale sur les gamètes mâle et femelle.

Dans ce cas, à partir des fréquences observées, on peut calculer:

$$p' = 0,44$$

$$q' = 0,56$$

En considérant les populations en panmixie, on aura:

Génotypes	$A_S^1 A_S^1$	$A_S^1 A_F^1$	$A_F^1 A_F^1$
Fréquence	$p'^2$	$2 p' q'$	$q'^2$
Fréquences calculées	0,1936	0,4928	0,3136
Effectifs calculés	84,02	213,87	136,11
Effectifs observés	76	234	124

Le test de  $X^2$  ( $= 3,72$ ) ne permet pas de rejeter l'hypothèse d'une sélection gamétique égale sur les deux gamètes.

Dans le cas de cette hypothèse, avec

$$q' = 0,56 = \frac{q}{1 - ps}$$

$$\text{On aura : } s = 0,214$$



## A N N E X E 2

### SÉLECTION SUR GAMÈTE MÂLE ET FEMELLE (MÉTHODES DE CALCULS)

La sélection gamétique donne pour les allèles S et F les valeurs suivantes :

$$\begin{array}{lcl} S & \rightarrow & 1 - 1 \\ F & \rightarrow & 1 \end{array}$$

D'où les fréquences zygotiques calculées après pollinisation-fécondation :

$$\begin{array}{lcl} SS & = & p'^2 \\ SF & = & 2p'q' \\ FF & = & q'^2 \end{array}$$

avec

$$p' = \frac{p(1-s)}{1-ps} \quad \text{et} \quad q' = \frac{q}{1-ps} \quad \Rightarrow \quad p' + q' = 1$$

La valeur des désavantages zygotiques mâles donne les fréquences génotypiques suivantes après sélection :

$$\begin{array}{lcl} SS & = & \frac{p'^2}{1-2q'\sigma} \\ SF & = & \frac{2p'q'(1-\sigma)}{1-2q'\sigma} \\ FF & = & \frac{q'^2(1-2\sigma)}{1-2q'\sigma} \end{array}$$

On en déduit  $p''$ , fréquence de l'allèle S dans la descendance :

$$p'' = \frac{p'^2 + p'q'(1-\sigma)}{1-2q'\sigma} = \frac{p'^2 + p'(1-p')(1-\sigma)}{1-2q'\sigma} = \frac{p'(1-q'\sigma)}{1-2q'\sigma}$$

Pour qu'il y ait équilibre des fréquences d'une génération à l'autre il faut que  $sp = p'' - p = 0$

$$\text{On a montré } p' = \frac{p(1+s)}{1-ps} \Rightarrow p = \frac{p'}{1-q's}$$

d'où

$$\Delta p = \frac{p'(1-q'\sigma)}{1-2q'\sigma} - \frac{p'}{1-q's}$$

Pour avoir  $\Delta p = 0 \Rightarrow p'(1-q'\sigma)(1-q's) - p'(1-2q'\sigma) = 0$

1°/  $p' = 0 \Rightarrow \Delta p = 0$  soit  $p' = \frac{p(1-s)}{1-ps} \Rightarrow p = 0$  où  $1 = 1$

2°/  $(1-q'\sigma)(1-q's) - (1-2q'\sigma) = 0 \Rightarrow q' \cdot (q's\sigma - s + \sigma) = 0$

a)  $q' = 0 \Rightarrow q = 0$

b)  $(q's\sigma - s + \sigma) = 0$

avec  $q' = \frac{q}{1-ps}$ , ou a  $\Delta p = 0$  pour  $\frac{ps\sigma}{1-ps} - (s + \sigma) = 0$

soit  $\sigma [1 + s(q-p)] - s(1-ps) = 0$

$\Delta p = [(\sigma - s) + s\sigma] + p(s - 2\sigma) = 0$
avec $\hat{p} = \frac{(\sigma - s) + s\sigma}{2\sigma - s}$

Pour que l'équilibre existe avec des fréquences génétique,  
 $0 < \hat{p} < 1$

avec  $\hat{p} > 0$

. avec  $(\sigma - s) + s\sigma > 0 \Rightarrow \sigma > \frac{s}{1+s}$   
 $2\sigma - s > 0 \Rightarrow \sigma > \frac{s}{2}$

. avec  $(\sigma - s) + s\sigma < 0 \Rightarrow \sigma < \frac{s}{1+s}$   
 $2\sigma - s < 0 \Rightarrow \sigma < \frac{s}{2}$

Par définition  $0 < s < 1$

$$\Rightarrow \frac{s}{2} < \frac{s}{1+s}$$

$\hat{p} < 1$

$\Rightarrow (\sigma - s) + s\sigma < 2\sigma - s$

$\Rightarrow \sigma(s-1) < 0$

Par définition  $s < 1 \Rightarrow \forall \sigma, \forall s > 0 \quad p < 1$

. Dans l'intervalle  $\left[ \frac{s}{2}, \frac{s}{1+s} \right]$ , il n'y a pas de solution génétiquement acceptable pour  $\Delta p = 0$

. si  $\sigma < \frac{s}{2}$  quand  $p_n \nearrow \Rightarrow \Delta p > 0 \Rightarrow p_{n+1} \nearrow$

. si  $\sigma > \frac{s}{1+s}$   $p_n \nearrow \Rightarrow \Delta p < 0 \Rightarrow p_{n+1} \searrow$

### SÉLECTION SUR GAMÈTE MÂLE UNIQUEMENT (METHODES DE CALCULS)

La population pollinique se compose comme suit :

$$S \rightarrow p' = \frac{p(1-s)}{(1-qs)}$$

$$F \rightarrow q' = \frac{q}{1-ps}$$

Les fréquences génotypiques deviennent dans ce cas après pollinisation :

$$SS \rightarrow pp' = \frac{p^2(1-l)}{1-ps}$$

$$SF \rightarrow pq' + qp' = \frac{pq(2-s)}{1-ps}$$

$$FF \rightarrow qq' = \frac{q^2}{1-ps}$$

On aura après germination :

$$SS = pp' \times \frac{1}{D}$$

$$SF = (pq' + qp') (1-\sigma) \times \frac{1}{D}$$

$$FF = qq' (1-2\sigma) \times \frac{1}{D}$$

$$D = SS + SF + FF = pp' + (1-\sigma)(pq' + qp') + qq' (1-2\sigma) = 1 - \sigma(q' + q)$$

On peut calculer  $p''$ , fréquence de S dans la population :

$$p'' = \frac{pp' + \frac{1}{2} (pq' + qp') (1-\sigma)}{1 - \sigma(q' + q)} = \frac{1}{2} \frac{p' + p + \sigma(pq' + qp')}{1 - \sigma(q' + q)}$$

Pour avoir équilibre des fréquences il faut  $\Delta p = p'' - p = 0$

$$\Rightarrow \Delta p = \frac{p' + p - \sigma(pq' + qp') - 2p [1 - \sigma(q' + q)]}{2 [1 - \sigma(q' + q)]} = 0$$

$$\text{soit : } \frac{p' - p - \sigma [p' - p (1 + 2q)]}{2(1 - (q' + q))} = 0 = \frac{N}{D}$$

$\Delta p$  s'annulant pour  $N = 0$ , en remplaçant  $p'$  par  $\frac{p(1-s)}{1-ps}$

$$\Rightarrow \Delta p = 0 \text{ pour } \frac{p(1-s)}{1-ps} - p - \sigma \left[ \frac{p(1-s)}{1-ps} - p(1 + 2q) \right] = 0$$

$$\frac{N}{D} = \frac{pq [(2\sigma - s) + s\sigma(p-q)]}{2(1-ps) [1 - \sigma(q + \frac{q}{1-ps})]} = \boxed{\frac{pq [(2\sigma - s) + s\sigma(q-p)]}{2(1-ps)(1-q\sigma) - q\sigma}}$$

On remarque que  $\Delta p = 0$  pour :

$$. p \text{ ou } q = 0$$

$$. 2\sigma - s + s\sigma - 2ps\sigma = 0$$

$$\text{soit } \hat{p} = \frac{2\sigma - s + s\sigma}{2s\sigma}$$

Conditions pour  $0 < \hat{p} < 1$

Avec  $s$  et  $\sigma > 0$  par définition

$$\hat{p} > 0 \quad 2\sigma - s + s\sigma > 0 \Rightarrow \sigma > \frac{s}{2+s}$$

$$\hat{p} < 1 \quad (2\sigma - s) + s\sigma < 2s\sigma \Rightarrow \sigma < \frac{s}{2-s}$$

$$\text{Pour } s < 2 \text{ (par définition } s < 1) \quad \frac{s}{2-s} > \frac{s}{2+s}$$

$\exists$  Donc une valeur de  $p$  pour  $\Delta p = 0$

$$\text{si } \boxed{\frac{s}{2+s} < \sigma < \frac{s}{2-s}}$$

Auquel cas dans cet intervalle

$$\text{Quand } p_n \times \Rightarrow \Delta p < 0 \Rightarrow p_{n+1} \times$$

## A N N E X E 3

### ÉTUDE DES LIAISONS GÉNÉTIQUES À L'ADH

Dans un programme cherchant à définir de nouveaux marqueurs, le gène  $A^1$ , de par son système génique simple et la facilité de lecture des gels, méritait une attention particulière. Le nombre de chromosome du Mil étant faible ( $2n=14$ ), nous espérons trouver une liaison génétique qui aurait allégée le travail de criblage.

Nous avons étudié 7 caractères sur une F<sub>2</sub> d'un croisement Ligui x Massue, plus commode que le croisement 23 DB x Massue pour l'observation des types alléliques de l'estérase. L'observation des autofécondations des plantes criblées a permis de différencier certaines classes où existe de la dominance.

Les criblages réalisés sont résumés dans les tableaux suivants:

Caractères	Ligui	Ligui x Massue	Massue
$A^1$ (ADH)	FF	SF	SS
Couleur des graines (Co. Gr.)	Grises (G)	Grises (G)	Brunes (B)
Couleur du collet (Cou. Coll.)	Rouge (RR)	Rouge (RV)	Vert (VV)
Peroxydases rapides	2 bandes (2b)	3 bandes (3b)	3 bandes (3b)
Peroxydase	Présence ( $P_2$ )	Abscence ( $P_2$ )	Abscence ( $P_2$ )
Estérase	$E_3E_3$ (33)	$E_3E_5$ (35)	$E_5E_5$ (55)
Germination des semences après 12hrs à 37°C	Bonne (+)	Bonne (+)	Nulle ou Insignifiante (-)

Caractère	Co. Gr.		Ger.		Estérase			ADH			Cou. Coll.			Peroxydase		
Géotype	G	B	+	-	33	35	55	SS	SF	FF	RR	RV	VV	3b	2b	P <sub>2</sub> R <sub>2</sub>
01	1		1		1			1			1			1		1
02	1			1	1			1			1			1	1	
03	1		1			1		1			1			1	1	
04	1			1	1			1			1			1	1	
05	1		1		1			1			1			1	1	
06	1		1		1			1			1			1	1	
07	1		1		1			1			1			1	1	
08	1			1	1			1			1			1	1	
09	1		1		1			1			1			1	1	
10	1		1		1			1			1			1	1	
11		1	1		1			1			1			1	1	
12	1		1			1		1			1			1	1	
13	1		1		1			1			1			1	1	
14	1		1		1			1			1			1	1	
15		1	1		1			1			1			1	1	
16	1		1		1			1			1			1	1	
17	1		1		1			1			1			1	1	
18	1			1	1			1			1			1	1	
19	1		1		1			1			1			1	1	
20		1	1		1			1			1			1	1	
21		1	1		1			1			1			1	1	
22	1		1		1			1			1			1	1	
23	1		1		1			1			1			1	1	
24	1		1		1			1			1			1	1	
25	1		1		1			1			1			1	1	
26	1		1		1			1			1			1	1	
27	1		1		1			1			1			1	1	
28	1		1		1			1			1			1	1	
29		1	1		1			1			1			1	1	
30	1		1		1			1			1			1	1	
31	1		1		1			1			1			1	1	
32	1		1		1			1			1			1	1	
33		1	1		1			1			1			1	1	
34	1		1		1			1			1			1	1	
35	1		1		1			1			1			1	1	
36	1		1		1			1			1			1	1	
37	1		1		1			1			1			1	1	
38	1		1		1			1			1			1	1	
39	1		1		1			1			1			1	1	
40		1	1		1			1			1			1	1	
41	1		1		1			1			1			1	1	
42	1		1		1			1			1			1	1	
43	1		1		1			1			1			1	1	
44	1		1		1			1			1			1	1	
45	1		1		1			1			1			1	1	
46	1		1		1			1			1			1	1	
47	1		1		1			1			1			1	1	
48	1		1		1			1			1			1	1	
Elim. 49	1		1		1			1			1			1	1	
50	1		1		1			1			1			1	1	
51	1		1		1			1			1			1	1	
52	1		1		1			1			1			1	1	
53		1	1		1			1			1			1	1	
54	1		1		1			1			1			1	1	
55	1		1		1			1			1			1	1	
56	1		1		1			1			1			1	1	
57	1		1		1			1			1			1	1	
58	1		1		1			1			1			1	1	
59	1		1		1			1			1			1	1	
60		1	1		1			1			1			1	1	
61		1	1		1			1			1			1	1	
62	1		1		1			1			1			1	1	
63	1		1		1			1			1			1	1	
64		1	1		1			1			1			1	1	
65	1		1		1			1			1			1	1	
66		1	1		1			1			1			1	1	
67	1		1		1			1			1			1	1	
68	1		1		1			1			1			1	1	
69	1		1		1			1			1			1	1	
70	1		1		1			1			1			1	1	
71	1		1		1			1			1			1	1	
72	1		1		1			1			1			1	1	
73	1		1		1			1			1			1	1	
Elim. 74	1		1		1			1			1			1	1	
75	1		1		1			1			1			1	1	
76		1	1		1			1			1			1	1	
77	1		1		1			1			1			1	1	
78	1		1		1			1			1			1	1	
79	1		1		1			1			1			1	1	
80	1		1		1			1			1			1	1	
81		1	1		1			1			1			1	1	
82	1		1		1			1			1			1	1	
83	1		1		1			1			1			1	1	
84		1	1		1			1			1			1	1	
85	1		1		1			1			1			1	1	
86	1		1		1			1			1			1	1	
87	1		1		1			1			1			1	1	
88		1	1		1			1			1			1	1	
89		1	1		1			1			1			1	1	
90	1		1		1			1			1			1	1	

GENOTYPE DE 90 PLANTES EN SEGREGATION DU CROISEMENT LIGUI x MASSUE POUR QUELQUES MARQUEURS SIMPLES.

Résultats :

Caractères	Co. Gr.		Germ.		Estérase			ADH			Coul. Coll.			Peroxydases			
Types	G	B	+	-	33	35	55	SS	SF	FF	RR	RV	VV	3b	2b	P <sub>2</sub>	P <sub>2</sub>
Totaux	72	18	63	25	17	40	31	15	51	24	19	48	21	61	27	64	24
Test	3:1		3:1		1:2:1			1:2:1			1:2:1			3:1		3:1	
X <sup>2</sup>	0,73		0,72		5,97			3,4			0,81			1,52		0,24	
	NS		NS		NS			NS			NS			NS		NS	

De ces premiers résultats, aucune répartition ne s'écarte significativement d'une répartition au hasard. On remarque une nouvelle fois la fréquence du type SS inférieure à celle du type FF dans la répartition des différents types alléliques d' A<sup>1</sup> (ADH)

Dans la série des plantes deux autofécondations n'ont jamais germées 48 et 74. Par ailleurs la plante 74 présentait une nette modification de son zymogramme pour les peroxydases rapides.

Modalité de calcul de X<sup>2</sup><sub>1</sub> et X<sup>2</sup><sub>2</sub>

X<sup>2</sup><sub>1</sub>

Appelé tableau de contingence. On compare par un X<sup>2</sup> les valeurs observées x<sub>ij</sub> aux valeurs théoriques calculées:

$$\hat{x} = \frac{\sum_i x_{ij} \cdot \sum_j x_{ij}}{\sum_{ij} x_{ij}}$$

i et j étant les indices de lignes et de colonnes

Le nombre de degré de liberté est alors: ( i-1 )( j-1 )

X<sup>2</sup><sub>2</sub>

Les valeurs x<sub>ij</sub> étant lié aux valeurs théoriques des classes i et j on compare par un X<sup>2</sup> les valeurs observées aux valeurs théoriques obtenues par le produit des fréquences de chaque classe. Le nombre de degré de liberté est dans ce cas égal à ( n-1 ).

Valeurs seuil du X<sup>2</sup> au risque de 5%

Nombre de ddl	1	2	4	5	8
Valeur du X <sup>2</sup>	3,84	5,99	9,48	11,07	15,507

Calcul des liaisons à l'alcooldéshydrogénase:

Caractère	Type	SS	SF	FF	Total	ddl	$X^2_1$	ddl	$X^2_2$
Coul. Gr.	Gris	9	40	20	69	2	2,61	5	6,82
	Brun	5	11	3	19				
Germination après 12 hrs	+	12	34	17	63	2	0,90	5	4,72
	-	3	16	6	25				
Peroxydase rapide	3b	12	33	16	61	2	1,06	5	6,06
	2b.	3	17	7	27				
Peroxydase lente	P <sub>2</sub>	13	36	15	64	2	2,66	5	5,33
	<del>P<sub>2</sub></del>	2	14	8	24				
Estérase	E <sub>3</sub> E <sub>3</sub>	3	10	4	17	4	1,61	8	10,68
	E <sub>3</sub> E <sub>5</sub>	6	21	8	40				
	E <sub>5</sub> E <sub>5</sub>	6	19	6	31				
Couleur du collet	R/R	2	11	6	19	4	1,15	8	4,72
	R/V	9	28	11	48				
	V/V	4	11	6	21				

Conclusion

Il n'existe pas de liaison génétique décelable entre l'alcooldéshydrogénase et les marqueurs testés;.



De la même façon, il est possible de faire l'étude des liaisons deux à deux des divers marqueurs utilisés précédemment.

	ADH	Couleur graine	Germinat.	Perox rapide	P <sub>2</sub>	Estérase
Couleur du collet	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Estérase	NS	NS	NS	NS	NS	
P <sub>2</sub>	NS	NS	NS	NS		
Perox. rapide	NS	NS	HS			
Germination	NS	NS				
Couleur de la graine	NS					

$\chi^2 = 18,23$

Il existe une distorsion entre les peroxydases - et la germination

	3 bandes	2 bandes
Germination (+)	52 ( 43,67 )	11 (Par.) ( 19,33 )
Germination (-)	9 (Par.) ( 17,33 )	16 ( 7,67 )

(Par.) = Classes parentales

( 43,67 ) = Valeur théorique dans un tableau de contingence.

La distorsion observée n'est pas le signe d

La distorsion observée n'est pas le signe d'une liaison génétique puisque

les deux classes parentales ne sont pas systématiquement les plus fortes.

Il s'agit plutôt d'une corrélation.

La présence de deux bandes de peroxydases rapides pourrait entrainer une mauvaise germination. Ceci pourrait être confirmé par la plante "74" qui ne présentait qu'une bande repérable et dont l'AF n'a pas germé.

Ce travail n'a cependant pas pu être poursuivi.

## A N N E X E 4

### LISTE DE L'ANALYSE DE VARIANCE DU TABLEAU XI

Activité ADH exprimé en  $\mu\text{M NADH} \cdot 10^{-1} / \text{mn} / \text{mg}$  de protéines en fonction du type allélique , en condition de non-activation ( germination à l'air libre )

Génotypes	$A^1 A^1_{S S}$	$A^1 A^1_{S F} *$	$A^1 A^1_{F F}$
Activité enzymatique	1,26 0,71 0,59 0,66 1,23 1,53 1,28 1,42 0,80 1,00 1,00 1,09 0,60 0,80 1,05	1,24 0,58 0,49 0,45 0,81 0,54 0,75 1,46 0,95 0,58 1,09 1,11 1,02 1,48 0,96 0,53 0,91 0,94 0,78 1,40 1,62 2,09 0,48 0,67 0,63 0,59 0,53	0,76 0,92 0,52 0,56 1,02 0,84 0,65 0,91 0,81 0,94 1,35 0,92 1,48 0,96 1,11 0,81 1,09 0,70 1,36 1,22 0,63 1,27 1,26 1,20 0,74 0,65
			0,59 0,56 0,84 0,58 0,39 0,23 1,56 0,87 0,55 0,39 1,02 1,28 1,76 0,92 0,86 1,38 1,26 0,40 1,48 1,19 0,52 0,67 0,78 0,65
Activité moyenne par génotypes	<u>1,001</u>	<u>0,92</u>	<u>0,918</u>

\* Le calcul de l'activité enzymatique de cette classe ayant été effectué sur les graines en autofécondations des individus hybrides, les valeurs observées sont plus précisément des activités moyennes des trois génotypes en ségrégation .

## A N N E X E 5

### MISE EN ÉVIDENCE D'AFFINITÉS PARTICULIÈRES DANS LES DIFFÉRENTS DIMÈRES .

Pour ce calcul les fréquences observées ( f ) sont calculées par la part relative des activités des différentes zones dans la somme de leurs activités

Les activités ( a ) sont exprimées en : D. O.  $10^2$  / mn / 100 ul d'extraits

Zones Génotypes	I		II		III		Total
	(a)	(f)	(a)	(f)	(a)	(f)	
$A_{F'}^1 A_F^1$	115	0,73	30	0,19	13	0,08	158
$A_S^1 A_F^1$	175	0,74	48	0,20	13	0,06	236

Si la répartition se fait au hasard, on observera les répartitions  $p^2$ ,  $2pq$ ,  $q^2$  pour les zones I, II, III.

Soit pour le génotype  $A_{F'}^1 A_F^1$  :

$$p = 0,73 + 0,095 = 0,825$$

$$q = 0,08 + 0,095 = 0,175$$

D'où les répartitions calculées :

$$(f) \text{ zone I} = 0,68$$

$$(f) \text{ zone II} = 0,29$$

$$(f) \text{ zone III} = 0,03$$

Ces répartitions diffèrent significativement des valeurs observées par des valeurs plus faibles pour les homodimères et plus forte pour l'hétérodimère II faut donc concevoir une affinité moindre des monomères hétérologues pour expliquer la valeur moindre de l'activité observée en zone II

Cette hypothèse ne se justifie que si l'activité spécifique de la zone II est égale à l'activité spécifique moyenne des zones I et III

On pose alors :

$$\text{Zone I} = (f) = p'^2 + p'q'\alpha$$

$$\text{Zone II} = (f) = 2 p'q' (1-\alpha)$$

$$\text{Zone III} = (f) = q'^2 + p'q'\alpha$$

On obtient pour les deux génotypes:

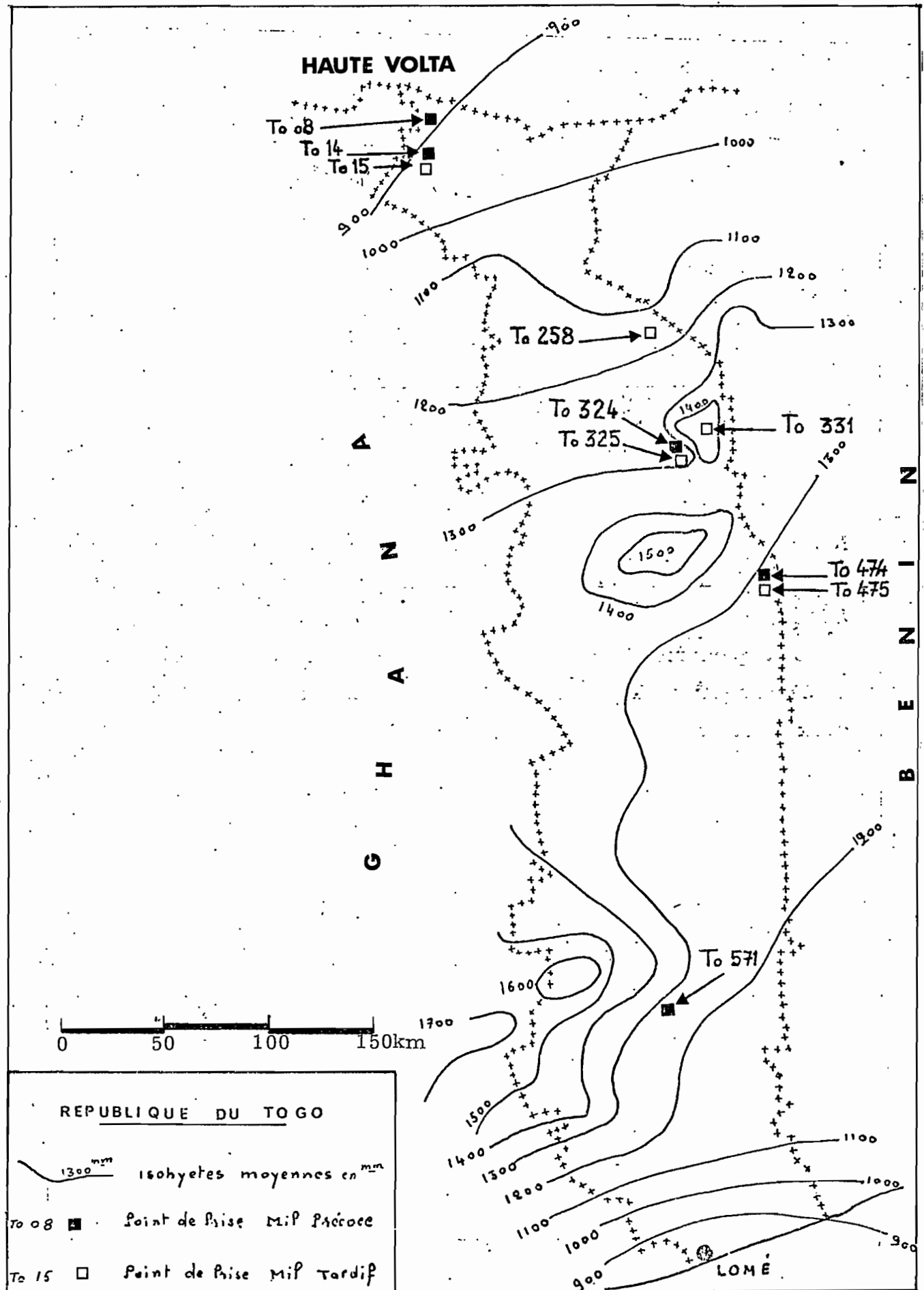
	$A_S^1 A_S^1$	$A_F^1 A_F^1$
$p'$	0,84	0,825
$q'$	0,16	0,175
$\alpha$	0,26	0,34

La valeur ( $\alpha$ ) supérieure pour le génotype  $A_F^1 A_F^1$  entrainerait pour les mêmes taux de synthèse des deux monomères hétérogéniques, une quantité relative plus importante d'homodimères que pour le génotype  $A_S^1 A_S^1$ .

Cette particularité ayant un impact sur la plasticité intrinsèque du système des alcooldéshydrogénase, elle pourrait ainsi différencier les deux génotypes

# ANNEXE 6

## ÉCHANTILLONNAGE DES 10 CULTIVARS TOGOLAIS CRIBLÉS



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

- ALEXANDER H. P. - (1969) - Differential staining of aborted and non-aborted pollen - Stain Technology Vol. 44 n° 3
- APP A. A. , MEISS A. N. - (1958) - Effect of aeration on rice ADH  
- Arch. Biochem. Biophys. 77 : 181
- BARKER J. , EL SAIFI A. F. - (1958) - Studies in the respiratory and carbohydrate mechanisms of plant tissues - I. Experimental studies of the formation of carbondioxide, lactic acid and other products in potato tubers under anaerobic conditions  
- Proc. Roy. Soc. London , Ser. B, 140 n°899:362
- BARNES B. W. , BIRLEY A. J. - (1975) - Genetical variation for enzyme activity in a population of Drosophila melanogaster  
- Heredity 35(1) : 115-119, 121-126
- BEEVERS H. - (1960) - Respiratory metabolism in plants ( New York, Row-Peterson and Co. , While Plains )
- BELLIARD J. , PERNES J. - (1977) - Etude de l'organisation génétique et physiologique d'une barrière reproductive particulière chez le Mil : Contrôle photopériodique de la floraison.  
- Physiologie Végétale - 15(3) , 551-565
- BERRY L. J. , NORRIS W. E. - (1949) - Studies of onions root respiration  
- I. Velocity consumption in different segments of root at different temperatures as a fonction of partial pressure of oxygen.  
- Biochim. Biophys. Acta 3, n°4 :593

- BROWN A. H. D. MARSHALL D. R. , ALBRECH J. - (1974) - The maintenance of ADH polymorphism in Bromus mollis L.  
- Austr. J. Biol. Sci. 27 : 545-549
- BROWN A. H. D. MARSHALL D. R. MUNDAY J. - (1976) - Adaptness of variants at an ADH locus in Bromus mollis L.  
- Austr. J. Biol. Sci. 29: 389-396.
- CAMPIRANON SAMPUN, WILLARD L. KOUKKARI - (1977) - Germination of wild rice, Ziziana aquatica ; seeds and the activity of ADH in young seedlings  
- Physiol. Plant. 41 : 293-297
- CHIRKOVA T. V. , GUTMAN T. S. - (1972) - Physiological role of branch lenticels of willow and poplar under conditions of root anaerobiosis.  
- Fiziol. Rast. 19 n°2 : 352
- CRAWFORD R. M. M. - (1967) - Alcohol deshydrogenase in relation to flooding tolerance in roots  
- J. Exp. Bot 18 n° 56 : 548
- \_\_\_\_\_ - (1977) - Tolerance of anoxia and ethanol metabolism in germinating seeds.  
- New Phytol. 79: 511-517
- \_\_\_\_\_ - (1978) - Biochemical and ecological similarities in marsh plants and diving animals  
- Naturwissenschaften 65: 194-201
- CROW J. F. , KIMURA M. - (1970) - An introduction to population genetics theory - ( HARPER and ROW, Publishers)
- DAVID J. - (1977) - Signification d'un polymorphisme enzymatique: la déshydrogénase alcoolique chez Drosophila melanogaster  
- Ann. Biol. 16 n°9-10
- DAVIES D. D. , GREGO S. , KENWORTH P. - (1974) - The control of the production of lactate and ethanol in higher plants.  
- Planta 118 n°4: 297
- DOIREAU P. - (1972) - Exhalation d'alcool et d'autres substances volatiles en rapport avec le catabolisme fermentaire au court de la germination du haricot.  
- C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D 273 n°8: 741

- DOIREAU P. - (1976) - Fermentation alcoolique au cours de la germination  
- *Physiol. Végét.* 14 n°3: 467-486
- DUCET G., ROSENBERG A.J. - (1962) - Leaf respiration  
- *Ann. Rev. Plant Physiol.* 13: 171
- EFFRON Y., PELEG M., ASHRI A. - (1973) - Alcohol deshydrogenase  
allozymes in the sunflower genus Carthamus L.  
*Biochem. Genet* 9: 299-308
- FREELING M. - (1973 a) - Simultaneous induction by anaerobiosis or 2,4 D  
of multiple enzymes specified by two unlinked genes: Differential  
Adh<sub>1</sub>-Adh<sub>2</sub> expression in maize  
- *Mol. Gen.* 127: 215
- FREELING M, SCHWARTZ D. - (1973 b) - Genetic relation ships  
between the multiple ADH of maize  
- *Biochem. Genet.* 8: 27
- FREELING M. - (1974) - Dimerization of multiple maize ADH studied  
in vivo and in vitro  
- *Biochem. Genet.* 12 n°5: 407-417
- - (1975) - Further studies on the balance between Adh<sub>1</sub>  
and Adh<sub>2</sub> in maize: Gene competitive programs.  
- *Genetics* 81: 641 -654
- - (1976) - Intragenic recombination in maize : pollen  
analysis methods and the effect of parental Adh<sub>1</sub> isoalleles.  
- *Genetics* 83: 701-717
- GOTTLIEB L. D - (1974) - Gene duplication and fixed heterozygosity for  
ADH in the diploid plant Clarkia franciscana.  
- *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71 n°5: 1816
- HAGEMAN R. H., FLESHER D. - (1960) - The effect of an anaerobic  
environnement on the activity of ADH and other enzymes of corn seedlings  
- *Arch. Biochem. Biophys.* 87: 203
- HART G. E. - (1970) - Evidence for triplicate genes of ADH in hexaploid  
wheat  
- *Proc. of the Nat. Acad. of Sci.* 66 n°4: 1136-1141
- HART G. E. - (1971) - ALcohol dehydrogenase isozymes of Triticum:  
dissociation and recombination of subunits.  
- *Molec. Gen. Genetics* 111: 61-65
- HOCHACHKA P.W., SOMERO G.N. - (1973) - Strategies of biochemical  
adaptation - W. B. SAUNDERS Company.



- JAMES W. O. - (1953) - Plant respiration -  
Oxford, the Clarendon Press
- LEBLOVA S., STIBOROVA M. - (1976) - Purification and properties  
of rape ADH  
- Physiol. Plant 38: 176-180
- LEBLOVA S., PERGLEROVA E., HLOCHOVA J. - (1977) - Comparative  
study of plant ADH.  
- Biol. Plantar. 19 n°2: 88-95
- LONGMUIR I. S., BOURKE A. - (1960) - The measurement of the diffusion  
of oxygen through respiring tissue.  
- Biochem. J. 76 n°2: 225
- LOOMIS W. D., BATAILLE J. - (1966) - Plant phenolic compounds and the  
isolation of plant enzymes.  
- Phytochemistry 5: 423
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J. - (1951) -  
Protein measurement with the folin phenol reagent.  
- J. Biol. Chem. 193: 265-275
- MC MANNON M., CRAWFORD R. M. M. - (1971) - A metabolic theory of  
flooding tolerance- the significance of enzyme distribution and behavior.  
- New Phytol. 70: 299-306
- MC DONALD J. F., AYALA F. J. - (1978) - Genetic and Biochemical basis  
of enzyme activity variation in natural populations: I- ADH in Droso-  
-phila melanogaster.  
- Genetics 89: 371-388
- MARSHALL D. R., BROUE P. - (1973) - Adaptative significance of ADH  
isozymes in maize  
- Nat. New Biol. 244: 16-17
- 
- (1974) - Genetic control of ADH isozymes  
in narrow-leafed lupins.  
- the J. of Heredity 65: 198-203
- PRADET A., BOMSEL J. - (1978) - Energy metabolism in plants under  
hypoxia and anoxia. ( in Plant life without oxygen - Hook and Crawford  
editors) ( à paraitre )
- RACKER E. - (1950) - Crystalline ADH from baker's yeast.  
J. Biol Chem. 184: 313-319
- RANGAN T. S. - (1976) - Growth and plantlet regeneration in tissue  
cultures of some indian millets.  
Z. Pflanzenphysiol. 78: 208-205

SCANDALIOS J. G. - (1969 a) - Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants.

- Biochem. Genetics 3: 37-39

\_\_\_\_\_ - (1969 b) - ADH in maize: Genetic basis of isozymes  
- Science 166: 623-624

SCANDALIOS J. G., FELDER M. R. - (1971) - Developmental expression of ADH in maize

- Develop. Biol. 24:641-654

SCHWARTZ D., TORU ENDO - (1966) - ADH polymorphism in maize: simple and compound loci.

- Genetics 53: 709-715

SCHWARTZ D., - (1969) - ADH in maize: Genetic basis for multiple isozymes  
- Science 164: 585-586

\_\_\_\_\_ - (1971 a) - Genetic control of ADH - A competitive model for regulation of gene action.  
- Genetics 67: 411-425

\_\_\_\_\_ - (1971 b) - Subunit interaction of a temperature-sensitive ADH mutant in maize.  
- Genetics 67: 515-519

\_\_\_\_\_ - (1976) - Regulation of ADH genes in maize  
- Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73 n° 2: 582-584

SMITHIES - (1955) - Zone electrophoresis in starch gels - Group variation in the serum proteins of normal human adults.

- Biochem. J. 61: 629-641

TORRES A. M. - (1974 a) - An intergenic ADH isozyme in sunflowers.

- Biochem. Genet. 11: 301

\_\_\_\_\_ - (1974 b) - Genetics of sunflower ADH: Adh<sub>2</sub> non-linkage to Adh<sub>1</sub> and Adh<sub>1</sub> early alleles.

- Biochem. Genet. 12: 385

\_\_\_\_\_ - (1976) - Dissociation - Recombination of intergenic sunflower ADH isozymes and relative isozyme activities.

- Biochem. Genet. 14: 87-98

\_\_\_\_\_ - (1977) - The early allele of ADH in sunflower population

- J. Heredity 68: 11-16

WARBOURG O. - (1926) - Über die Wirkung von blausäureäthylester auf die Pasteurische Reaktion  
- Biochem. Z. n°3: 432

WARD R. D. - (1974) ADH in Drosophila melanogaster - Activity variation in natural populations  
- Biochem. Genet. 12: 449

WIGNARAJAH K. , GREENWAY H. - (1976) - Effect of anaerobiosis on activities of ADH and pyruvate decarboxylase in roots of Zea mays  
- New Phytol. 77: 574-584

---

- (1976) - Effect of waterlogging on growth and activity of ADH in barley and rice.  
- New Phytol. 77: 585-592

Dauzat: Extraction

Tolérance forte  $\rightarrow$  Dimer peut ne pas être stable.  
d'une tolérance faible chérie. Mais 10 mM est-il suffisant  
pour donner  $pH > 8$  -

Réducteur : (l'acide et Biotin) peut être aussi activé  
pour ADH ? - Activité maximale à bon pH ou milieu

- mod. Migration électrophorétique <sup>réducteur</sup>

+ Zone