

50376
1987
101

50376
1987
101

T H E S E

N° d'ordre 1399

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3^e CYCLE

Mention : Biologie et génétique des populations

par

Ahmed AIT LHAJ LOUTFI

VARIABILITE DU REGIME DE LA REPRODUCTION
AU SEIN DES POPULATIONS D'ARRHENATHERUM
ELATIUS DE MILIEUX CONTRASTES



SOUTENUE LE 29 JUIN 1987 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :

Président: Professeur Ph. VERNET (Université de Lille)
Rapporteur: Docteur D. PETIT Maître de conférence (Lille I)
Examineur: Docteur R. LUMARET C.N.R.S (Montpellier)
Examineur: Professeur C. LEFEBVRE (Université Libre de Bruxelles)

SOMMAIRE

INTRODUCTION

Chapitre I : LE MATERIEL D'ETUDE

- 1.- L'espèce Arrhenatherum elatius
- 2.- Les populations étudiées, les traits principaux de leur environnement.
Références bibliographiques.

Chapitre II : ETUDES DES ALLOZYMES CHEZ Arrhenatherum elatius.

- A.- Méthode d'analyse du déterminisme génétique
 - 1.- Les croisements
 - 2.- Technique d'analyse enzymatique par électrophorèse.
 - a) Extraction des protéines solubles.
 - b) Préparation des gels.
 - c) Migration.
- B.- Déterminisme génétique.
 - 1.- Les glutamates oxaloacetates transaminases (GOT)
 - a) GOT1
 - b) GOT2
 - 2.- Les alcools deshydrogenases (ADH)
 - 3.- Les phosphoglucoses isomerase (PGI)
 - 4.- Etude de la liaison entre loci.
- C.- Conclusion.

Références bibliographiques.

Chapitre III : DIFFERENCIATION DU REGIME DE REPRODUCTION DANS LES POPULATIONS D'Arrhenatherum elatius : UNE EVOLUTION VERS L'AUTOGAMIE?.

Introduction

Matériel et méthode

- 1.- Populations étudiées.
- 2.- Estimation de la fertilité
- 3.- Stabilité de l'aptitude à l'autofertilité.
- 4.- Dépression de consanguinité.

Résultats

- A.- Variation du mode de reproduction.
 - 1.- Estimation de l'autofertilité.
 - 2.- Fertilité en croisement.
 - 3.- Rapport autofertilité/fertilité en croisement.
- B.- Stabilité de l'aptitude à l'autofertilité.
 - 1.- D'une année à l'autre.
 - 2.- D'une génération à l'autre.

- C.- Dépression de consanguinité.
 - 1.- Germination et croissance.
 - 2.- Phénologie de la floraison.
 - 3.- Fertilité en pollinisation libre.

Discussion et conclusions.
Références bibliographiques.

Chapitre IV : COMPATIBILITE DES CROISEMENTS INTER ET INTRA
POPULATIONNELS CHEZ Arrhenatherum elatius.

- A.- Introduction
- B.- Matériel et méthode.
- C.- Résultats.
 - 1.- Germination du pollen in vitro.
 - 2.- Fertilité en croisements
- D.- Discussion et conclusions.

Références bibliographiques.

Chapitre V : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Références bibliographiques.

ANNEXES

INTRODUCTION

L'étude comparée de populations d'Arrhenatherum elatius de sols normaux et toxiques du Nord de la France (Ducouso, 1985) a permis de préciser cette constatation, rarement effectuée (Wu et al, 1975): la variabilité interne aux populations est nettement plus importante dans les milieux contaminés.

D'autre part, le régime de la reproduction, estimé indirectement par l'analyse du polymorphisme enzymatique, révèle en milieu toxique un taux d'hétérozygotes en accord avec un mode de reproduction panmictique, alors qu'il est très réduit en milieux normal (Ducouso, 1985). En fait, cet auteur met en évidence une corrélation négative entre hétérozygotie et densité des individus. Tout se passe comme si l'endogamie était plus forte et plus généralisée dans les populations occupant les milieux non toxiques, plus homogènes, plus denses, plus anciennement occupés, peut être aussi moins favorables à la promotion de l'hétérozygotie.

La relation entre la densité et la structure génétique peut être expliquée de deux manières (DUCOUSSO, 1985) :

- par une augmentation du taux d'autofécondation ou d'individus autoféconds dans les zones à haute densité ;

- par une réduction de taille du voisinage génétique résultat d'une faible dispersion du pollen et des graines dans les zones de haute densité. En moyenne un individu de population dense serait préférentiellement pollinisé par ses voisins immédiats. La descendance se développe au voisinage et, après plusieurs générations, un taux élevé de consanguinité apparaît.

Compte tenu des données classiques (Antonovics, 1968 ; Lefebvre, 1970), le résultat obtenu par DUCOUSSO peut paraître, assez étonnant. En effet, l'augmentation de fréquence d'individus autoféconds a été observée par ces auteurs dans les zones des milieux toxiques situées au voisinage des populations de milieux normaux et donc soumises au flux génique en provenance de ces populations. L'autogamie constatée est interprétée comme un dispositif de protection contre l'allopollen, et l'"outbreeding depression" qui en résulte ; cela devrait donc se traduire par un déficit d'hétérozygote en milieu toxique, et non en milieu normal; ce n'est pas le cas pour les populations d'Arrhenatherum étudiées.

Le choix entre ces deux mécanismes imposait donc une étude directe du régime de la reproduction. Dès lors, l'objectif fixé à notre recherche a été son estimation par la réalisation d'autofécondations et de croisements contrôlés. L'obtention préalable de marqueurs génétiques biochimiques à déterminisme génétique vérifié était donc nécessaire à l'estimation de l'origine des descendants (allofécondation sûre, ou non); d'où le plan de notre mémoire. Après la présentation dans une première partie, du matériel étudié et des stations dans lesquelles il a été prélevé, le 2^e chapitre est consacré à l'étude d'allozymes chez

Arrhenatherum elatius.

La variabilité du régime de la reproduction entre populations de milieux toxiques et non toxiques et en fonction de la densité dans l'une des trois stations étudiées par DUCOUSSO (station d'Auby) fait l'objet du 3^e chapitre. Enfin, le 4^e chapitre est une approche plus précise du régime de la reproduction par l'analyse de l'outbreeding depression.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANTONOVICS, J., 1968. Evolution in closely adjacent plant population. V. Evolution of Self fertility. *Heredity*, 23, 219-228.
- DUCOUSSO, A., 1985. Comparaison de populations adjacentes d'Arrhenatherum elatius sur des sols normaux et toxiques. Analyse de la diversité génétique et du régime de la reproduction. Thèse d'Université U. S. T. Lille, 98p.
- LEFEBVRE, C., 1970. Self-fertility in maritime and Zinc mine populations of Armeria maritima (Mill.) Willd. *Evolution*, 24, 571-577.
- HU, L., BRADSHAW, A. D. and D. A. THURMAN., 1975. The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants. III. The rapid evolution of copper tolerance in Agrostis stolonifera. *Heredity*, 34, 165-185.

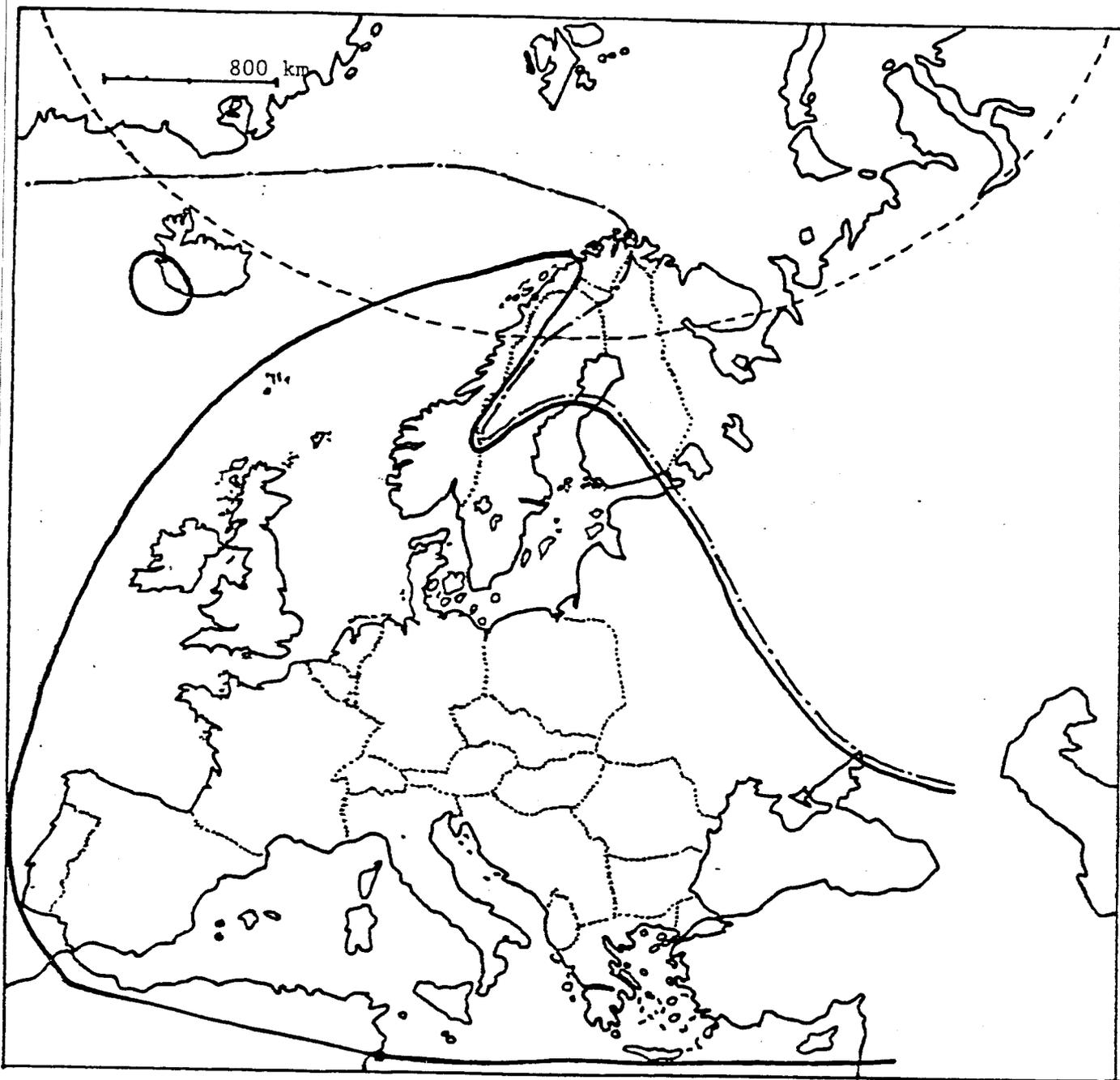
CHAPITRE I

LE MATERIEL D'ETUDE

1. - L'ESPECE ARRHENATHERUM ELATIUS

Dans la région du Nord de la France, Arrhenatherum elatius est une espèce très répandue ; elle montre une grande vigueur dans des habitats variés. En effet, cette espèce est présente dans presque toutes les zones non cultivées et notamment dans les milieux perturbés qui résultent des activités industrielles. Ils s'agit surtout de terrils du charbonnage (milieu difficile pour la végétation) et de milieux calaminaires au voisinage d'usines de traitement des métaux lourds (toxiques par leurs teneurs élevées de ces métaux). Sur ces nouveaux milieux ainsi créés, A. elatius a réussi à constituer des populations parfois importantes.

A. elatius, encore appelée fromental ou avoine élevée, est une poacée (Graminée) prairiale de vaste répartition géographique (fig. 1). Son aire s'étend de l'Afrique du Nord à la Scandinavie, de l'Europe occidentale au Sud-Ouest de l'Asie. Cette espèce est tétraploïde ($2n=4x=28$) sur l'essentiel de son aire de répartition. On connaît cependant des populations diploïdes ($2n=2x=14$) dans le bassin méditerranéen (FAVARGER, 1973). Le niveau



— limite de l'aire de répartition de l'*Arrhenatherum elatius* en Europe.
- - - Isotherme 6,7 ° de janvier



Figure 1 : aire de répartition de l'*Arrhenatherum elatius*. (Pfizenmeyer, 1959)

hexaploïde ($2n=6x=42$) est également signalé aux Etats Unis (DAVIES, 1927 ; BORDEN et SEEN, 1962). A. elatius est une espèce anémophile et essentiellement allogame, mais il existe dans certaines populations des individus à autofertilité élevée. SOLINOWSKI (1965) et PFIZENMEYER (1962) estiment respectivement à 3.71% et 4.5% le taux moyen d'autofertilité (graines/épillets).

2. - LES POPULATIONS ETUDIEES, LES TRAITS PRINCIPAUX DE LEUR ENVIRONNEMENT

Notre étude a été menée sur des populations d'A. elatius, échantillonnées dans deux types d'habitats :

- des habitats qualifiés de "normaux", ce sont les milieux anciennement cultivés et occupés actuellement par une friche fermée ;
- des habitats toxiques : ce sont les milieux abandonnés par l'industrie (terrils et milieux calaminaires) colonisés par des friches généralement très ouvertes.

2.1 Populations de milieu normal

Deux populations d'A. elatius de milieu normal ont été étudiées pour le régime de la reproduction. Celles-ci sont situées à proximité du Campus Universitaire de Villeneuve d'Ascq:

- la population du terrain pariselle (N1D)
- la population des Quatre Cantons (N2D)

Tableau 1 : Teneurs comparées en Zn et en Pb extracibles des sols de milieux normal et toxique (Auby).D'après Ducouso (1985)

MILIEUX D' ORIGINE	POPULATIONS	Zin (ppm)	Plomb (ppm)
NORMAL	Auchy (friche)	trace à 15.6	1 à 1.44
	Henin- Beaumont (friche)	4.8	4.6
TOXIQUE	Pelouse calaminaire (CA)	2155 à 4503	55.80 à 316
	Voie des express (VE)	2437 à 5865	120 à 463

Les teneurs en Zn et en Pb extractibles des sol des stations N1D et N2D n'étant pas disponibles , nous utilisons ici, à titre comparatif, les valeurs données par Ducouso (1985) pour des sols normaux des stations d 'Auchy et Henin-Beaumont.



Ces deux populations sont distantes d'au moins 1km et isolées l'une de l'autre par des espaces aménagés.

Elles présentent des caractéristiques comparables au niveau du sol et au niveau de la végétation. Dans ces deux sites l'A. elatius y est bien développé et très dense (tableau 1).

2.2 Populations de milieux toxiques

Le traitement industriel de la Calamine ou de la blende (minerais de zinc) s'accompagne de rejets importants de métaux lourds, surtout de zinc qui n'est pas extrait en totalité, mais également de plomb, de cadmiun et de nombreux autres éléments qui participent à la composition des minerais. Cette pollution qui se retrouve dans les sols autour de l'usine de la Compagnie Royale Asturienne des Mines installée à Auby (Nord) depuis une centaine d'années, a permis la création de milieux forts singuliers. Ceux-ci sont occupés par une végétation qui reflète la présence de teneurs métalliques élevées (Zn, Pb...) dans le sol, aussi la qualifie-t-on de végétation calaminaire. Le tableau 1 permet de comparer les teneurs en Zinc et Plomb extractibles à l'acétate d'ammonium (N ; pH=5,2) de ces sols pollués, à celles de sols normaux pris en référence (DUCOUSSO, 1985).

C'est dans ce site (figure 2) qu'ont été référencées deux populations.

L'une d'entre elles (CA) participe à la constitution d'une

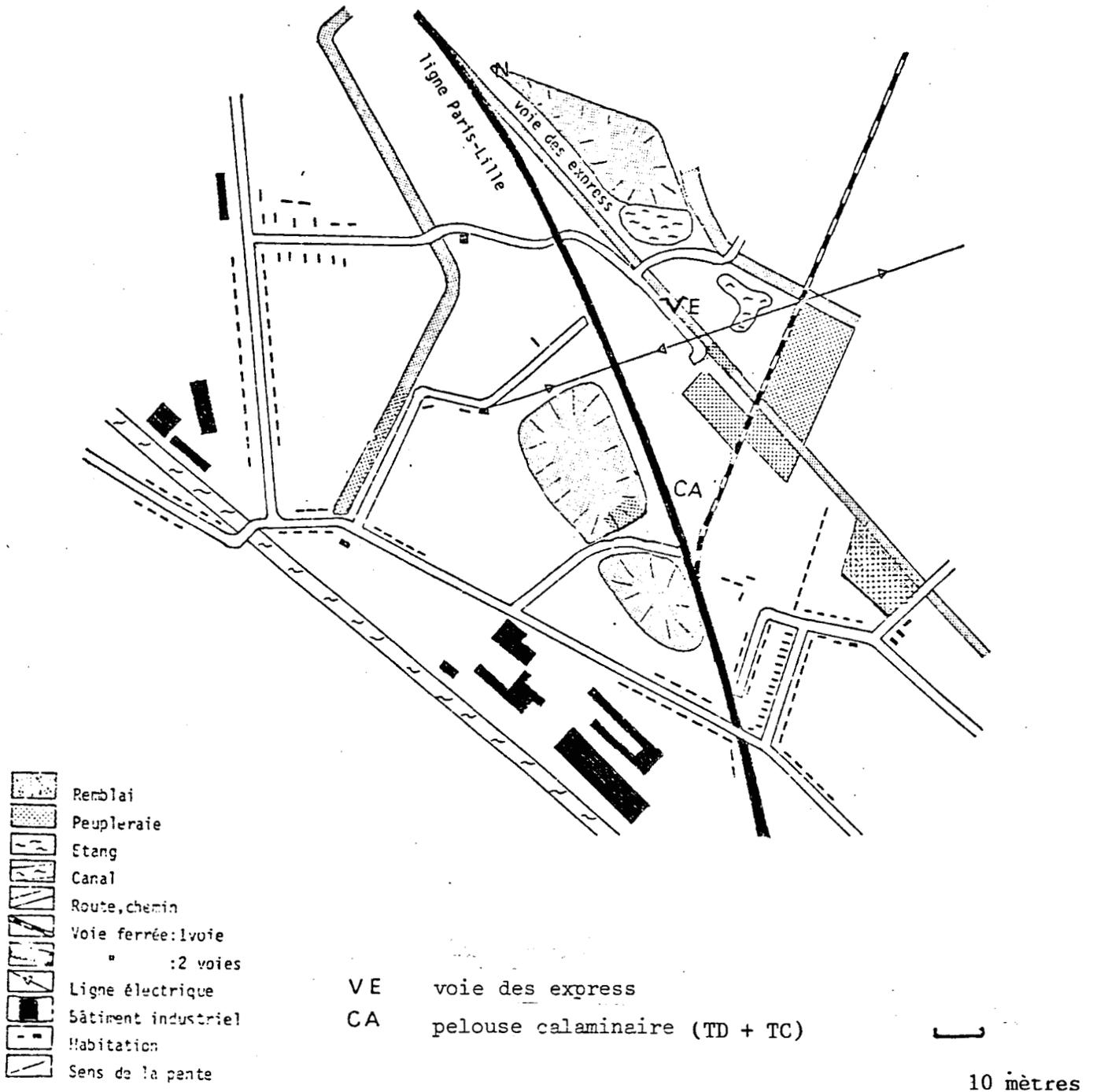


Fig. 2 : Plan du site d'Auby et situation des lieux des prélèvements

pelouse calaminaire dominée par Armeria maritima (tableau 2). Dans cette pelouse qui couvre une surface de plusieurs hectares on peut distinguer :

- des zones dans lesquelles Arrhenatherum elatius est fortement dominant (178 panicules/m²) (zone dense = TD)

- des zones dans lesquelles A. elatius est au contraire très dispersé et réduit à des petites touffes isolées (2 panicules/m²) (zone clairsemée = TC).

Cette dualité de répartition de cette espèce au sein de la pelouse calaminaire a été prise en compte lors de l'échantillonnage.

L'autre population colonise un remblai de schistes houillers (Voie des express = VE), également riche en métaux lourds, mais où le tapis végétal est plus ouvert (tableau 2).

Dans chacune des stations retenues, des individus d'A. elatius ont été récoltés, transplantés en pots sur terreau et disposés en champ d'expérience en vue d'une campagne d'autofécondations et de croisements.

Tableau 2 : Relevé phytosociologique dans les stations d'Auby
et de Villeneuve d'Ascq

STATIONS	N1D	N2D	VE	CA
SURFACE EN m2	100	100	150	200
pente en °	0	0	35	0
EXPOSITION	-	-	NE	-
% RECOUVREMENT				
% herbacé (h)	80	80	60	100
bryo-lichénique(m)	5	5	50	60
h				
Arrhenatherum elatius (L.) beauv. ex J. et C. Presl	55	3.2	2.3	2.3
Armeria maritima var. halleri (Wallr.) Mansf.			3.4	5.5
Cardaminopsis halleri(L.) Hayck			12	22
Convolvulus arvensis (L.)			12	12
Deschampsia cespitosa (L.) Beauv.			+4	
Clamagrostis epigejos (L.) Roth			1.3	
Silene vulgaris (Moench) Garcke				1.2
Tusilago farfara (L.)	+2	12	1.1	
Equisetum arvensis (L.)				+1
Agropyrum repens (L.) Beauv.				+1
Dactylis glomerata L.	12	+2		
Cirsium arvensis (L.)	12	+		
Vicia hirsuta (L.) S.F. Gray.		+2		
Daucus carota (L.)	+	2.3		
Rumex crispus (L.)	+			
Festuca rubra (L.)	+			
Melandrium album (M.l.l.) Grackc		+		
Epilobium augustifolium (L.)		+2		
Vicia sativa (L.)		+		
Artemisia vulgaris (L.)		+		
Galium aparine (L.)		+		
Poa pratensis (L.)		+2		
Pinis hieracioides (L.)		+		
m				
Pohlia nutans (Hedw) Lindl			2.4	+1
Cladonia coniocaea (Flke) Vain.			+2	+2
Dicranum scoparium Hedw.				3.4
Brachythecium rutabulum Hedw. B.e	+2	+2		

N1D: Campus Villeneuve d'Ascq Pariselle

N2D: Campus Villeneuve d'Ascq quatre cantons

VE : Voie des express Auby.

CA : Pelouse calaminaire (TD + TC) Auby.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BONDEN, W.M. and H. A., SEEN., 1962. Chromosome numbers in grass from south América. *Canad. J. Bot.*, 40, 8 : 1115-1124.
- DAVIES, J.G., 1927. The chromosome number in Dactylis glomerata L. (Cocksfoot). *Nature*, London, 119, 2989 : 236-237.
- DUCOUSSO, A., 1985. Comparaison de populations adjacentes d'Arrhenatherum elatius L. sur des sols normaux et toxiques. Analyse de la diversité génétique et du régime de la reproduction. Thèse d'Université U. S. T. Lille, 98p.
- FAVARGER, C., GALLAND N. and Ph. KUPFER., 1979. Recherches cytotaxonomiques sur la flore orophile du Maroc. *Naturalia Monspeliensia Sér. Bot.* : 29 : 1-164.
- PFIZENMEYER, C.D., 1962. Biological flora of British Isles. Arrhenatherum elatius L. J. et C. Peresl. *J. Ecology*. 50 : 235-45.
- SULINOWSKI, S., 1965. Variation of forms and biology of flowering in Arrhenatherum elatius L.. P.B. Part II. Effects of Self and Cross pollinisation as seed setting in Arrhenatherum elatius L.

CHAPITRE II

ETUDES DES ALLOZYMES

CHEZ ARRHENATHERUM ELATIUS

L'important développement pris par les techniques d'électrophorèse a permis d'étudier le déterminisme génétique de certaines enzymes pour lesquelles il y a souvent codominance, ce qui permet de faire correspondre généralement un génotype à chaque phénotype observé.

Ces techniques d'électrophorèses, associées à la méthode génétique (test sur la descendance), permettent de déduire de la variabilité protéique la variabilité des gènes qui la contrôlent; on peut alors estimer, d'une part la proportion de loci polymorphes et, d'autre part le nombre et la fréquence des allèles présents à chacun de ces loci polymorphes.

L'analyse génétique des autotétraploïdes est compliquée par la situation particulière à la méiose des loci soumis à l'hérédité tétrasomique (MATHIEU et BIENNE, 1977). En effet, les proportions génotypiques attendues pour un locus à hérédité tétrasomique ou pour deux loci à hérédité de type disomique, sont parfois très proches : il est donc nécessaire d'étudier des descendance d'effectifs importants pour trancher entre les deux modes de disjonctions.

Pour l'étude de l'hérédité tétrasomique, nous faisons référence aux travaux de MATHER (1936), complétés par ceux de DEMARLY (1963), (voir annexe cytologie), pour rappeler que l'ensemble des cas des fréquences de génotypes attendus peut être exprimé par la variation de l'indice de séparation α entre zéro et $2/7$:

* $\alpha = 0$ s'il n'y a pas de tétravalents ou pas de crossing-over entre le centromère et le locus (locus près du centromère).

* $\alpha = 2/7$ pour un locus, la ségrégation de ce locus se fait indépendamment de centromère (locus loin de centromère). Donc, pour chaque valeur de α il existe une disjonction gamétique (annexe 1 et 2).

De même, pour un génotype, il existe différents phénotypes suivant le type d'enzyme :

- Cas d'une enzyme monomère présentant 2 allèles (figure 1)

Les homozygotes sont représentés par une bande et les hétérozygotes par deux bandes de même intensité (génotype AABB) et d'intensité différente (génotype AAAB ou ABBB).

- Cas d'une enzyme monomère présentant 3 allèles

Ceci est illustré par la figure 2.

- Cas d'enzyme dimère avec 2 allèles (figure 3)

Fig.1 : Ensemble des phénotypes et des génotypes attendus pour une espèce tétraploïde, en considérant 2 allèles présents spécifiant une enzyme monomère.

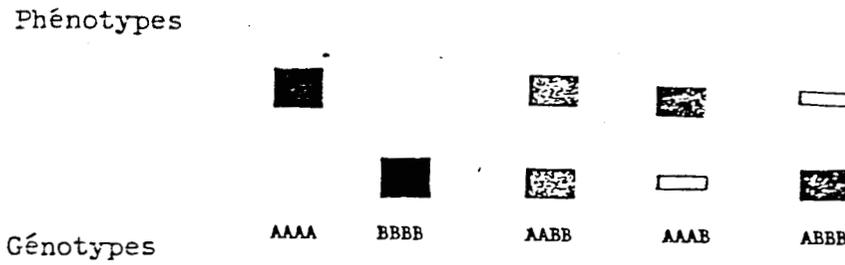
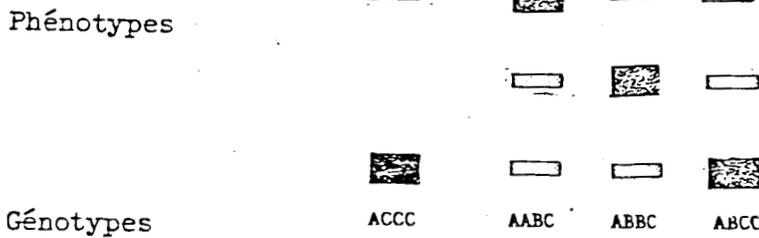
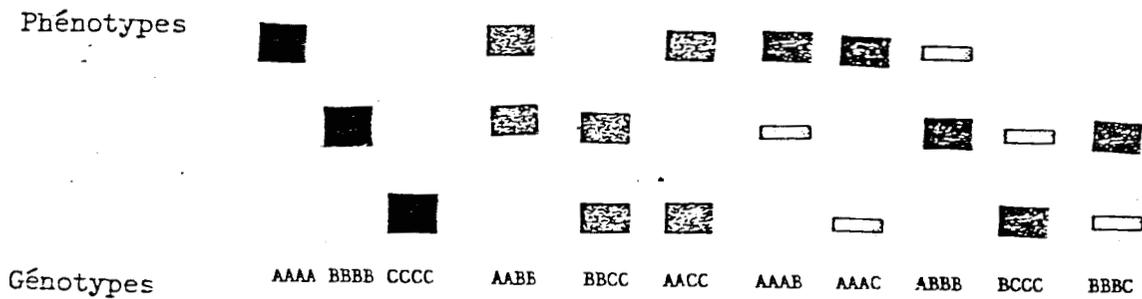
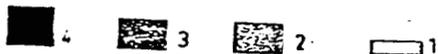


Fig 2 : Ensemble des phénotypes et des génotypes attendus pour une espèce tétraploïde, en considérant 3 allèles présents spécifiant une enzyme monomère.



Intensités relatives des bandes ($\times 1/4$) :



Une enzyme dimère est caractérisée par l'absence de phénotype à 2 bandes, en effet cette enzyme étant formée de 2 chaînes polypeptidiques, celles-ci s'associent au hasard chez les hétérozygotes ce qui donne naissance à 3 sortes de molécules :

- 2 molécules homodimères où les chaînes polypeptidiques sont identiques ;

- une molécule hétérodimère où les deux chaînes polypeptidiques sont différentes et sont déterminées par chacun des allèles. Cet hétérodimère a une charge égale à la moyenne des charges des homodimères et la bande qui lui correspond se trouve en position intermédiaire par rapport à celle des deux homodimères.

- Cas d'une enzyme dimère présentant 3 allèles

Les phénotypes et les génotypes qui leur correspondent sont représentés dans la figure 4.

A. - METHODE D'ANALYSE DU DETERMINISME GENETIQUE

1. Les croisements

Les populations utilisées pour la campagne de croisements ont été décrites au chapitre I.

Fig. 3 : Ensemble des phénotypes et des génotypes attendus pour une espèce tétraploïde, en considérant 2 allèles spécifiant une enzyme dimère.

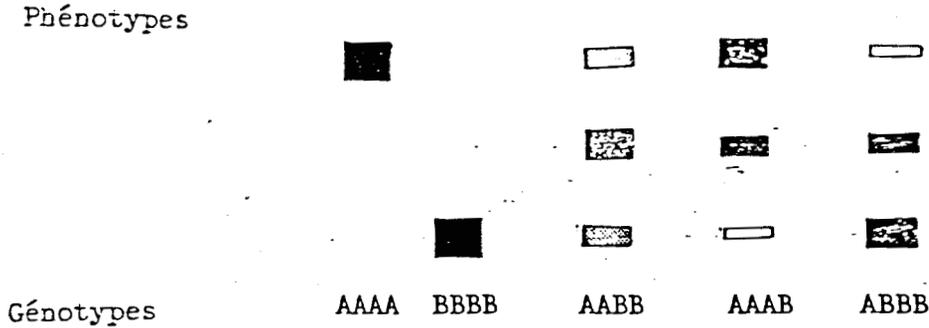
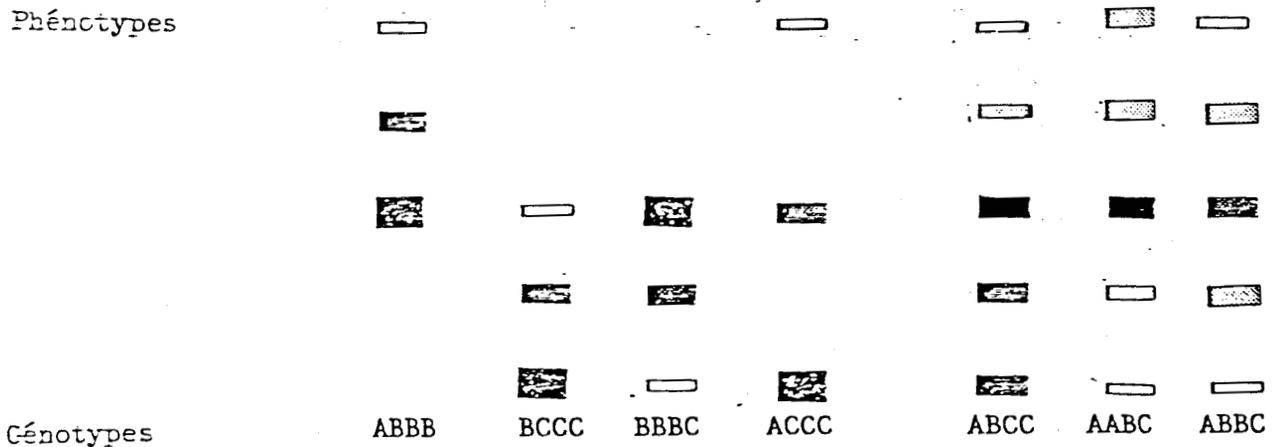
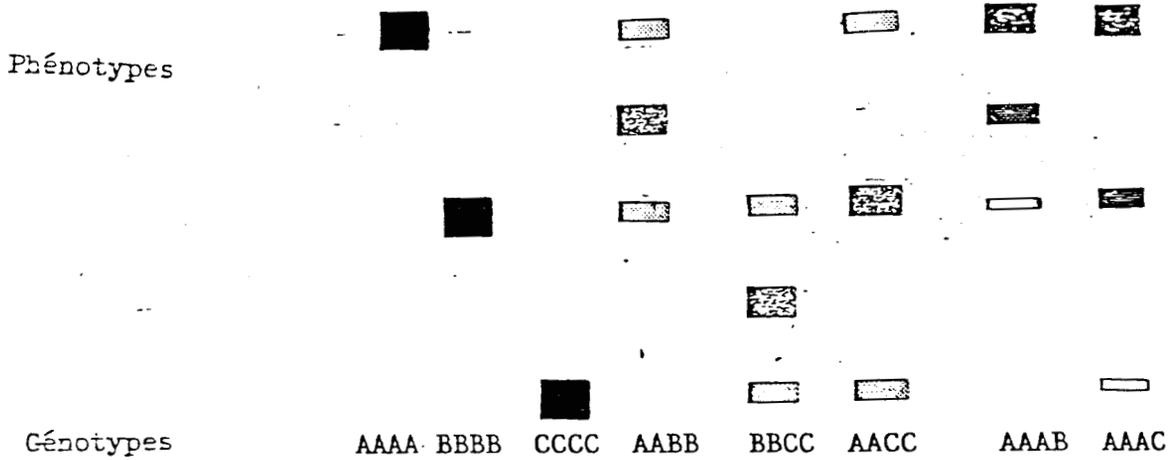


Fig. 4 : Ensemble des phénotypes et des génotypes attendus pour une espèce tétraploïde, en considérant 3 allèles spécifiant une enzyme dimère.



Intensités relatives des bandes (•1/16) :



La castration chez Arrhenatherum est une opération difficile à réaliser, voir impossible, car les fleurs sont de petite taille (elles ne mesurent que 7mm). De même, on note l'absence d'individus mâles stériles dans les populations. C'est pourquoi, en croisements, nous avons utilisé des individus essentiellement allogames dont la fertilité, en autofécondation, est extrêmement réduite ou nulle. Dès le début de la floraison les panicules d'un couple de deux plantes au même stade phénologique ont été groupés à la même hauteur et enfermés dans un sac en papyron entièrement clos et solidaire d'un piquet métallique. Le sac est agité régulièrement pour polliniser les fleurs.

2. Technique d'analyse enzymatique par électrophorèse

(BONDUELLE, 1984).

a) Extraction des protéines solubles :

Un échantillon de 0.5g de jeunes feuilles prélevées sur des plantes cultivées en serre est broyé dans un mortier avec du sable de Fontainebleau et 0.5ml de tampon Tris-HCl de pH 7.6.

A l'issue de la centrifugation (29000 x g pendant 20 minutes) le surnageant contenant les protéines est prélevé et conservé à -80°C. Toutes les opérations sont effectuées sur une table réfrigérée au voisinage de 0°C, pour éviter le phénomène d'oxydation.

b) Préparation des gels

Le système électrophorétique utilisé est celui d'ORNSTEIN et DAVIS (1964), adapté par GASQUEZ et COMPOINT (1976) sur gel de polyacrylamide en courant pulsé.

Les gels sont préparés à partir d'un constituant principal, l'acrylamide et le bis-acrylamide. La réaction de polymérisation se fait à l'aide d'un système catalyseur-réducteur. Le gel est préparé suivant la technique d'ORNSTEIN et DAVIS (1964) dans une cellule permettant la migration simultanée de 24 échantillons (GASQUEZ et COMPOINT, 1976).

c) Migration

Après la polymérisation complète du gel et la mise en place des échantillons, le gel est installé verticalement dans une cuve à électrolyse, entre deux compartiments (GASQUEZ et COMPOINT, 1976) contenant le tampon de migration qui recouvre le gel.

Les 24 extraits protéiques sont placés à la surface du gel. La migration s'effectue de haut en bas par courant pulsé. Le front migration est matérialisé par le bleu de bromophénol.

Les autres détails concernant les tampons, les solutions de gel, le courant utilisé et les révélateurs, sont indiqués en annexe 3 et 4.

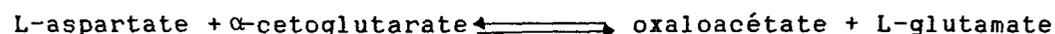
B. - DETERMINISME GENETIQUE

Pour pouvoir faire correspondre un phénotype à un génotype et vérifier son contrôle génétique, il faut passer, obligatoirement, par la réalisation de croisements contrôlés ou d'autofécondations et l'analyse de la descendance. Les études électrophorétiques sur gels d'amidon ou de polyacrylamide ont permis de mettre en évidence, jusqu'à présent, chez Arrhenatherum elatius, une dizaine de systèmes enzymatiques polymorphes (DUCOUSSO, 1985).

Les systèmes enzymatiques pris en compte dans cette étude sont les glutamates oxaloacétates transaminases (GOT1 et GOT2), les alcools déshydrogénases (ADH) et les phosphoglucoses-isomérases (PGI).

1. Les glutamates Oxaloacétates transaminases (GOT)

Les GOT sont des enzymes qui jouent un rôle important dans les réactions d'éliminations de l'azote des acides aminés et dans le processus d'accumulation d' α -céto-acides qui alimentent le cycle de Krebs et interviennent dans la néoglucogenèse (SCANDALIOS et al., 1975). Elles catalysent la réaction réversible :



Le substrat utilisé pour la révélation est l'acide α -ceto-

glutarique et l'acide aspartique. Les zymogrammes des GOT montrent deux zones de bandes très nettement séparées, la première zone de migration lente appelée GOT1 et la deuxième de migration rapide appelée GOT2 (fig. 5, photo 1).

a) GOT1 :

L'analyse des zymogrammes des descendants obtenus dans le croisement n°4 (tableau 1), montre que tous les individus présentent trois bandes. La bande intermédiaire a une intensité forte, elle correspond à la molécule hétérodimère décrite précédemment. Ceci permet de retenir l'hypothèse d'une enzyme dimère. Cette enzyme comprenant 5 allèles différents codominants et pouvant s'exprimer ensemble. Ces allèles sont GOT1^{1.08}, GOT1^{1.04}, GOT1^{1.00}, GOT1^{0.92} et GOT1^{0.88}. Seuls les allèles GOT1^{1.00} et GOT1^{0.88} sont fréquents.

Les croisements (2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 et 10) prouvent que cette enzyme dimère est spécifiée par un seul locus.

Les résultats obtenus à partir des croisements semblent favoriser l'hypothèse formulée selon laquelle le locus serait près de centromère, où il n'y aurait pas de formation de tétravalent ($\alpha=0$), par rapport à l'autre hypothèse où il y aurait une ségrégation chromatidique au hasard pour un locus loin du centromère.

b) GOT2

Fig. 5 : Représentation schématique de zymogrammes observés des glutamates oxaloacetates transaminases (GOT1 et GOT2)

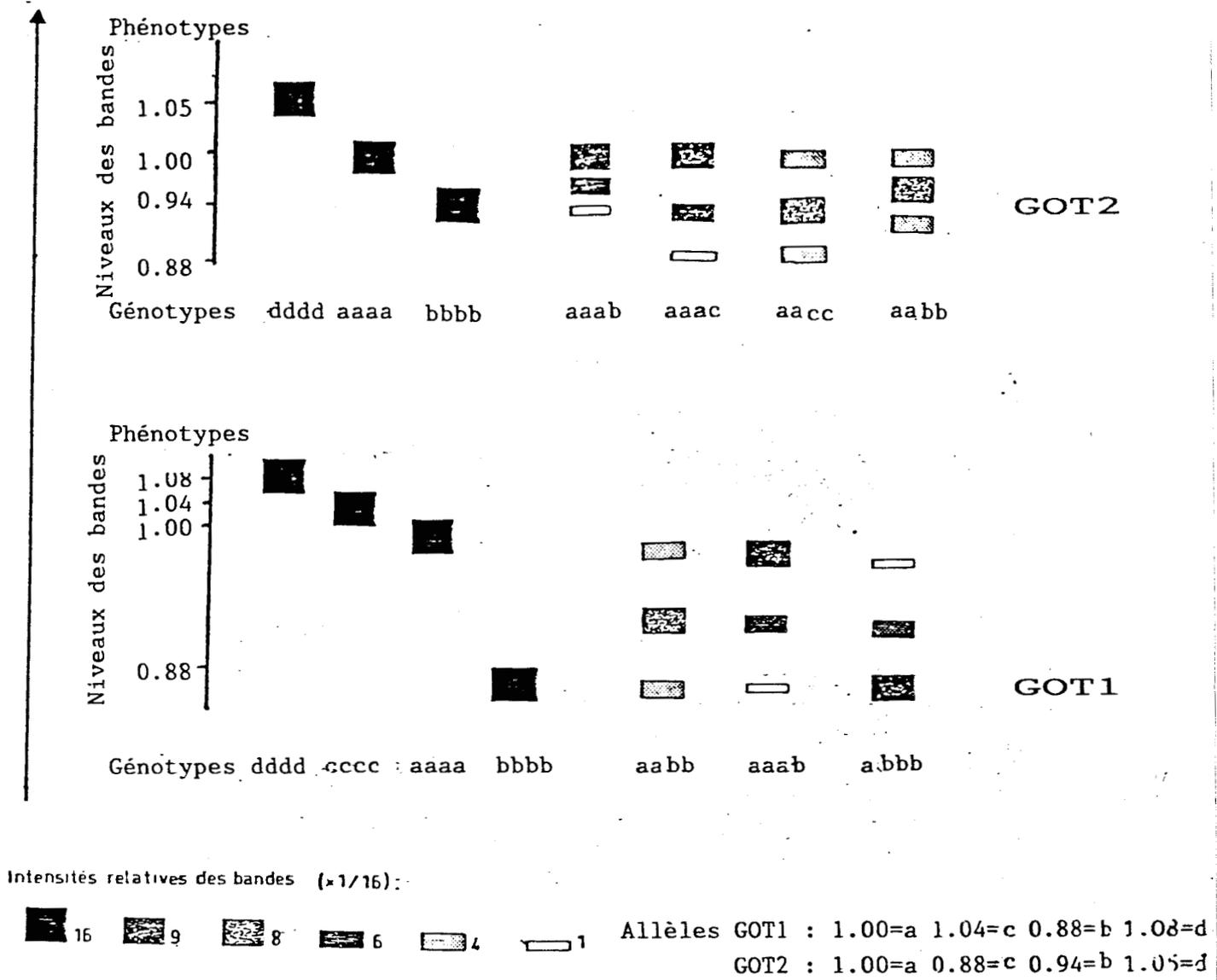
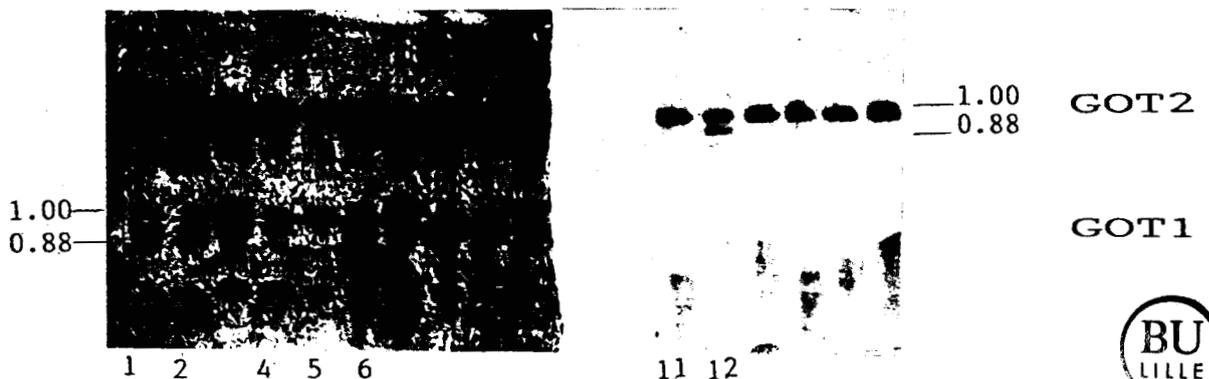


Photo 1 : Zymogramme des GOT



Génotypes:

GOT1 n°2 : abbb
 n°4 : aaab
 n°5 : aaaa
 n°6 : aabb

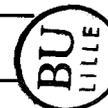
GOT2 n°11 : aaaa
 n°12 : aaac



Tableau 1 : Fréquences des géotypes des descendants en hérédité du gène GOT1

Croisements		Genotype parentale	GENOTYPES DES DESCENDANTS					N	χ^2		
Type N°	Nb		aaaa	aaab	aabb	abbb	bbbb		$\alpha = 0$	$\alpha = 2/7$	
1	5	aaaa x aaaa	ob	202							
2	6	aaaa x aabb	ob	21	64	17		102	1.17 (5.99)	1.53 (5.99)	
			a1	17	68	17					
			a2	21.28	58.85	21.85					
3	4	aaaa x abbb	ob	0	116	106		222	0.44 (3.84)	13.89 (5.99)	
			a1	-	111	111					
			a2	7.92	95.14	118.92					
4	1	aaaa x bbbb	ob			9				9	
5	2	aaab x bbbb	ob			9	12	0	21	0.42 (3.84)	2.20 (5.99)
			a1			10.50	10.50	-			
			a2			11.25	9	0.75			
6	3	aaab x abbb	ob	0	19	38	16	0	73	0.36 (3.84)	3.42 (7.82)
			a1	-	18.25	36.50	18.25	-			
			a2	1.40	17.87	34.46	17.87	1.40			
7	4	aaab x aaab	ob	25	66	30	0		121	1.42 (7.82)	8.90 (7.82)
			a1	30.25	60.50	30.25	-				
			a2	34.74	55.56	26.85	3.70				
8	3	aaab x aabb	ob	8	44	40	2	0	94	4.94 (7.82)	10.36 (9.49)
			a1	7.84	39.16	39.16	7.83	-			
			a2	10.79	37.40	34.55	10.55	0.71			
9	2	aabb x abbb	ob	0	5	24	22	3	54	0.66 (7.82)	3.13 (9.49)
			a1	-	4.50	22.50	22.50	4.50			
			a2	0.42	6.06	19.84	21.48	6.20			
10	2	abbb x abbb	ob	0	0	12	22	9	43	0.43 (5.99)	3.10 (9.49)
			a1	-	-	10.75	21.50	10.75			
			a2	0.06	1.32	9.54	19.74	12.34			

- allèles GOT1^{1.00}= a GOT2^{0.88}= b . les valeurs de χ^2 entre parenthèses sont les valeurs seuil au risque 5%.
- ob : effectif observé a1 : effectif attendu $\alpha = 0$ a2 : effectif attendu $\alpha = 2/7$

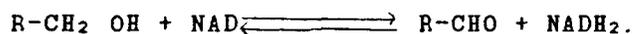


Les GOT2 de migration rapide se révèlent sur le même gel que les GOT1. L'étude des zymogrammes nous laisse penser qu'il s'agit d'une enzyme dimère. Les fréquences obtenues par l'analyse de la descendance de croisements confirment cette hypothèse (tableau 2). Il s'agit donc d'un seul locus avec 7 allèles codominants : GOT2^{1.85}, GOT2^{1.88}, GOT2^{0.94}, GOT2^{0.88}, GOT2^{0.82}, GOT2^{0.80} et GOT2^{0.70}.

Les allèles GOT2^{0.88}, GOT2^{0.94} et GOT2^{0.70} se trouvent toujours à l'état hétérozygote car ce sont des allèles peu fréquents (DUCOUSSO, 1985). Comme dans le cas de GOT1, le test du χ^2 montre que l'hypothèse ($\alpha=0$) est la plus probable. La nature dimère des GOT a déjà été signalée chez d'autres espèces de la famille des Graminées : Maïs (McDONALD), Blé (HART et MARKET, 1975) et le Dactyle (LUMARET, 1978), ou encore chez d'autres espèces Stephanemeria (GOTTLIEB, 1973), Tragopagon (ROOSE et GOTTLIEB, 1976), Medicago sativa (BRUNEL, 1979) et Solanum tuberosum (MARTINEZ-ZAPATER et OLIVER, 1984).

2. Les alcools déshydrogénases (ADH)

Les ADH catalysent la réaction d'oxydo-réduction :



En glycolyse anaérobie, elles catalysent la transformation réversible acétaldéhyde-éthanol. Avec l'éthanol et un facteur nicotinamide adémine dinculéotide (NAD), elles forment un produit coloré par le nitrobleu tetrazolium (NBT) qui précipite sous

Tableau 2 : Fréquences des génotypes des descendants en hérédité du gène GOT2



Croisement		Génotype parental	GENOTYPES DES DESCENDANTS					nombre d'individus	χ^2			
Type	Nb		aaaa	aaab	aabb	abbbb	bbbb		$\alpha=0$	$\alpha=2/7$		
1	9	aaaa x aaaa	ob	591								
2	6	aaaa x aaab	ob	104	133	0			237	3.54	22.32	
			a1	118.50	118.50	-						(3.84)(5.99)
			a2	126.96	101.58	8.46						
3	2	aaab x aaab	ob	22	28	14	0	0	64	3.00	2.81	
			a1	16	32	16	-	-				(5.99) (9.49)
			a2	18.36	29.38	14.20	1.95	0.08				
4	6	aaaa x aaac		aaaa	aaac	aacc	accc	cccc	133	0.9	10.16	
			ob	61	72	0						(3.84) (5.99)
			a1	66.50	66.50	-						
5	4	aaab x aaac	ob	39	80	36	0	0	155	0.27	6.78	
			a1	38.75	77.50	38.75	-	-				(5.99) (7.49)
			a2	44.48	71.17	34.40	4.75	0.20				

- allèles : GOT2 : GOT2^{1.00}=a GOT2^{0.94}=b GOT2^{0.88}=c

- ob : effectif observé
 a1 : " attendu pour $\alpha = 0$
 a2 : " attendu pour $\alpha = 2/7$

- les valeurs de χ^2 entre parenthèses sont les valeurs seuil au risque 5%

forme de formazan insoluble et très coloré (SCANDALIOS et al, 1971). Chez Arrhenatherum, les zymogrammes des ADH présentent une seule zone de bande (fig. 6, photo 2).

L'étude de la descendance permet de retenir l'hypothèse d'une enzyme dimère à un seul locus. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 3. Cinq allèles différents ont été trouvés à ce locus ; ce sont $ADH^{1.12}$, $ADH^{1.86}$, $ADH^{1.88}$, $ADH^{0.94}$ et $ADH^{0.88}$.

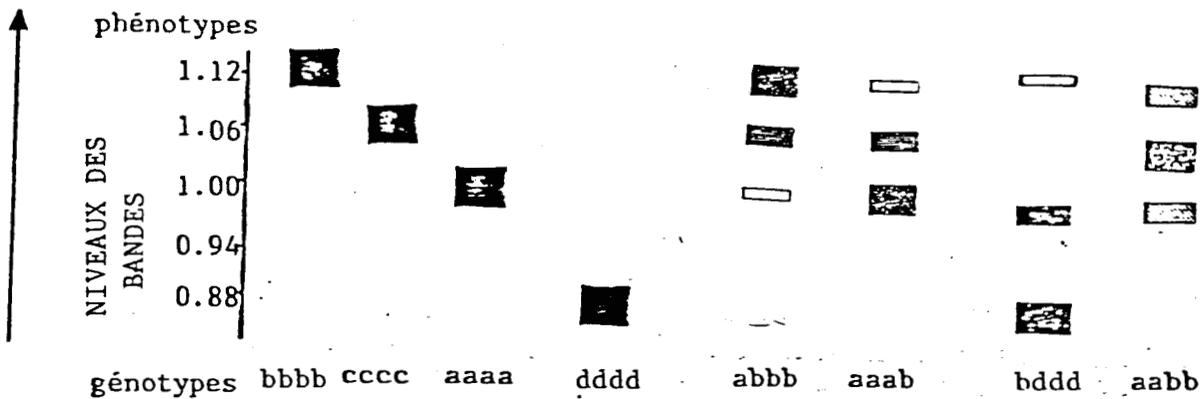
Les ségrégations obtenues pour ce locus dans les croisements 3, 4 et 5 ont permis d'estimer la valeur de α qui pourrait être égale à zéro comme pour les autres loci. Les ADH ont été décrites comme des enzymes dimères chez d'autres espèces telles que le Dactyle (VALERO, 1980), le Blé (LEIBENGUTH, 1977 ; JAASKA, 1980 ; HART, 1970), le Palmier dattier (TORRES et TISSERAT, 1980), Tragopagon (ROOSE et GOTTLIEB, 1976), Solanum tuberosum (MARTINEZ-ZAPATER, OLIVER, 1984).

3. Les phosphogluco-somérases (PGI)

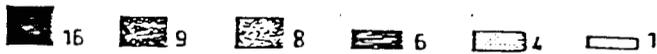
Les PGI interviennent dans la glycolyse, leur déterminisme génétique a été étudié chez plusieurs espèces végétales. Elles sont décrites comme étant des enzymes dimériques.

Elles présentent un locus de 2 à 4 allèles, par exemple, chez Stephanomeria exiqua (GOTTLIEB, 1975), Citrus (TORRES et al, 1978) et Lycopersicon exulentum (TANKSELY, 1980) ou deux loci comme le Dactyle (LUMARET, 1981). Une situation particulière a

Fig. 6: représentation schématique de zymogrammes observés des alcools deshydrogénases(ADH)

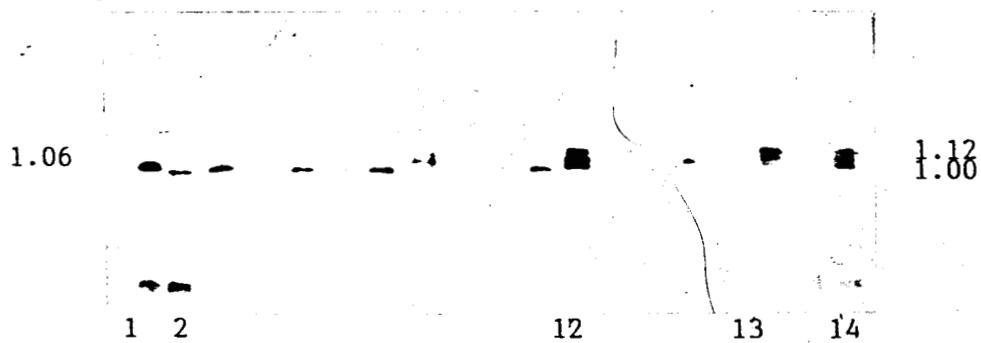


Intensités relatives des bandes (=1/16):



Les allèles ADH : 1.00=a 1.12=b 1.06=c 0.88=d

Photo 2 : zymogramme des ADH



Génotypes :

n°1 : cccc

n°2 : aaaa

n°12: aabb

n°13: aaab



Tableau 3 : Fréquences des génotypes des descendants en hérédité du gène ADH



Croisements		Génotype parental	GENOTYPES DES DESCENDANTS					Nombre d'individus	χ^2		
Type n°	Nb		aaaa	aaab	aabb	abbbb	bbbb		$\alpha=0$	$\alpha=2/7$	
1	3	aaaa x aaaa	ob	70							
2	1	aaaa x bbbb	ob		16						
3	4	aaaa x abbb	ob	0	136	122		258	0.75 (3.84)	16.92 (5.99)	
			a1	-	129	129					
			a2	9.20	110.60	138.20					
4	5	aaaa x aaab	ob	87	82	0		169	0.14 (3.84)	8.37 (5.99)	
			a1	84.50	84.50	-					
			a2	90.50	72.50	6.00					
5	3	aaab x aabb	ob	15	56	43	7	0	121	5.04 (7.82)	5.49 (9.49)
			a1	10.08	50.42	50.42	10.08	-			
			a2	13.90	48.15	44.45	13.58	0.92			

- les allèles ADH : $ADH^{1.00}=a$ $ADH^{1.12}=b$
- les fréquences génotypiques : ob : effectifs observés
 a1 : " attendu pour $\alpha=0$
 a2 : " attendu pour $\alpha=2/7$
- les valeurs de χ^2 entre parenthèses sont les valeurs seuil au risque 5%

été trouvée chez Clarkia (GOTTLIER, 1977) et Dactylis (LUMARET, 1981) pour laquelle les PGI sont spécifiés par des loci dupliqués. Qu'en est-il pour Arrhenatherum ?

Les zymogrammes de PGI, obtenus sur gel d'acrylamide chez Arrhenatherum montrent une seule zone de bande (fig. 7 photo 3).

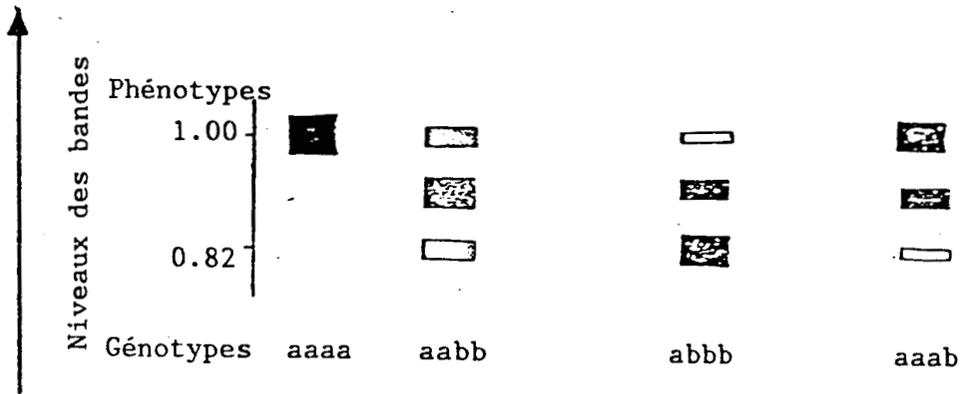
Les observations des phénotypes des différents individus nous permettent de penser qu'il peut s'agir d'enzyme dimère. L'analyse des descendants de croisements confirme cette hypothèse. L'ensemble des résultats est reporté dans le tableau 6. Les génotypes obtenus dans la descendance, ainsi que leur fréquence, prouvent qu'il s'agit bien d'un locus avec deux allèles codominants ($PGI^{1 \cdot 00}$ et $PGI^{0 \cdot 82}$). L'allèle $PGI^{0 \cdot 82}$ est toujours présent, soit à l'état homozygote ou à l'état hétérozygote, alors que $PGI^{0 \cdot 82}$, quand il est présent, n'est jamais observé à l'état homozygote. Dans les différents croisements (2, 3, 4, 5, 6) les tests de χ^2 font apparaître que l'hypothèse $\alpha=0$ est la plus plausible.

4. Etude de la liaison entre loci

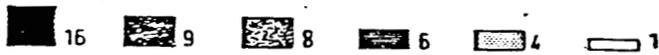
Des études théoriques ont été réalisées par Mather (1936) sur des liaisons géniques chez les autotétraploïdes en prenant en compte deux allèles dont l'un était dominant.

GALLAIS (1977) a considéré le cas plus général (pour $\alpha=0$) de tétragéniques pour les deux loci, qui permet de distinguer la situation de leur liaison (le taux de recombinaison est alors

Fig. 7 : Représentation schématique de zymogrammes observés des phosphoglucoses isomérases (PGI)

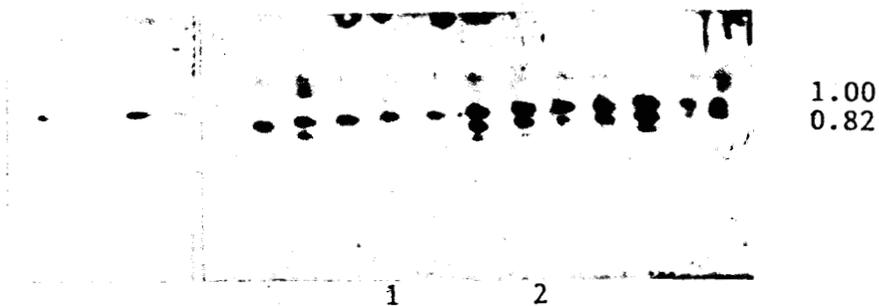


Intensités relatives des bandes ($\times 1/16$):



Les allèles PGI : 1.00=a 0.82=b

Photo 3 : Zymogramme des PGI



Génotypes :

n°1 : aaaa

n°2 : aaab



Tableau 4 : Fréquence des génotypes des descendants en hérédité du gène PGI

Croisements		Génotype parental	GENOTYPES DES DESCENDANTS					Nombre d'individus	χ^2		
Type n°	Nb		aaaa	aaab	aabb	abbb	bbbb		$\alpha=0$	$\alpha=2/7$	
1	4	aaaa x aaaa	ob	108							
2	6	aaaa x aaab	ob	87	92	0			179	0.12	10.27
			a1	89.50	89.50	-					
			a2	95.90	76.70	6.40					
3	6	aaaa x abbb	ob	0	122	136			258	0.74	10.40
			a1	-	129	129					
			a2	9.20	110.60	138.20					
4	3	aaab x aabb	ob	4	19	15	2	0	40	1.14	2.50
			a1	3.34	16.66	16.66	3.34	-			
			a2	4.63	15.67	14.84	4.53	0.30			
5	2	aaab x aaab	ob	19	35	14	0	0	68	0.78	2.70
			a1	17	34	17	-	-			
			a2	19.50	31.24	15.10	2.08	0.08			
6	1	aabb x aabb	ob	2	7	21	3	0	33	6.00	8.65
			a1	0.91	7.34	16.50	7.34	0.91			
			a2	1.50	8.00	13.80	8.00	1.50			

- allèles PGI : $PGI^{1.00} = a$ $PGI^{0.82} = b$
- ob : effectif observé
- a1 : effectif attendu pour $\alpha = 0$
- a2 : effectif attendu pour $\alpha = 2/7$
- les valeurs de χ^2 entre parenthèses sont les valeurs seuil au risque 5%



compris entre 0 et 1/2) par rapport à leur indépendance ($r=1/2$) ; dans ce dernier cas, il est possible de savoir si les locus sont ou non situés sur le même chromosome.

Des individus doubles tétragéniques sont assez rares, c'est pourquoi nous avons tenté de définir les relations existant entre deux loci GOT1/ADH d'une part et GOT1/PGI d'autre part. Ceci à l'aide de croisements faisant intervenir un digénique duplex (GOT1)/digénique simplex (ADH ou PGI), (Tableau 5).

Mais malheureusement, il n'y a aucun croisement qui permet d'étudier les autres possibilités de liaison entre différents loci.

Le test de χ^2 (au risque 5%) montre qu'il n'y a pas de liaison entre GOT1 et ADH et qu'ils sont probablement situés sur des chromosomes différents.

Pour le cas GOT1/PGI, le nombre de descendants dans ce croisement est faible pour pouvoir calculer χ^2 , même en groupant les types parentaux les moins représentés d'une part et les types recombinés d'autre part ; on retient seulement de ce croisement la présence de types recombinés. Cependant, l'utilisation d'individus doubles digéniques pouvait être tout à fait adéquate pour étudier les liaisons entre loci chez des autotétraploïdes, car le nombre de classes dans la descendance est suffisamment restreint.

Enfin, nous indiquons par représentation schématique les

Tableau 5 : Liaison entre loci GOT1/ADH
GOT1/PGI



nombre d'indi- vidus	Génotype PARENTAL	Types de gamètes produits par le parent double hétérozygote						χ^2	
		Fréquences	ab/aa	ab/ab	aa/aa	bb/ab	aa/ab		bb/aa
		ob	12	13	3	1	4	4	
37	aabb/aaab	$r=0$	12.34	12.34	6.16	6.16	0	0	13.98(9.49)
	aaaa/aaaa	$r=\frac{1}{2}$	12.34	12.34	6.16		6.16		1.35(9.49)
	GOT1/PGI	Fréquences	ab/ab	ab/aa	aa/aa	bb/ab	aa/ab	bb/bb	
		ob	6	9	2	5	0	3	
25	aabb/abbb	$r=0$	8.34	8.34	4.16	4.16	0	0	
	aaaa/aaaa	$r=\frac{1}{2}$	8.34	8.34	2.08	2.08	2.08	2.08	

- les allèles GOT1 : GOT1^{1.00} = a GOT1^{0.88} = b (r=Taux de recombinaison)
 ADH : ADH^{1.00} = a ADH^{1.12} = b
 PGI : PGI^{1.00} = a PGI^{0.82} = b

- les accolades indiquent les regroupements de classes gamétiques pour les tests
 - les valeurs de χ^2 entre parenthèses sont les valeurs seuil au risque 5%

classes et les probabilités des génotypes obtenus dans les descendance dans le cas d'un digénique duplex/digénique simple et d'un digénique duplex double (annexe 5 et 6).

C. CONCLUSION

L'étude du déterminisme génétique effectué pour les trois systèmes enzymatiques (GOT, ADH, PGI), différents par leur rôle métabolique, a permis de mettre en évidence 4 loci polymorphes.

D'ores et déjà, les marqueurs enzymatiques révélés chez des espèces très étudiées telles que le blé, le maïs, le riz, le dactyle, la luzerne et la tomate ont fait progresser la connaissance et l'organisation génotypique au sein de la population ou de la plante. Chez l'Arrhenatherum, les enzymes spécifiées par les loci, GOT1, GOT2, ADH et PGI sont toutes dimères. L'hypothèse d'une ségrégation chromosomique est la plus probable, par rapport à l'autre hypothèse (ségrégation chromatidique). En effet, dans la descendance obtenue, aucune figure ne pouvant provenir que de la réduction chromatidique n'a été observé. Nous pouvons penser que le phénomène de la réduction chromatidique intervient à une fréquence très faible pour les loci étudiés (dans ce cas est proche de zéro).

Cependant, la ségrégation chromatidique est possible, elle est observée chez d'autres espèces telles que le Dactyle (LUMARET, 1978), Solanum tuberosum (MARTING-ZAPATER et OLIVER, 1984). De même, il faut signaler que le taux d'autofécondation n'est pas toujours nul et ce taux, quand il existe, fait dévier

les fréquences des génotypes de la descendance dans le sens d'une diminution de l'hétérozygotie.

Le polymorphisme allélique n'est pas étudié sur une vaste aire géographique. Le nombre total d'allèles observé pour les 4 loci est de 19 allèles. Il est à remarquer cependant que le nombre d'allèles au locus PGI est uniquement deux alors qu'aux autres loci il est au moins cinq, en effet l'étude de la diversité allélique au loci ADH et GOT1 et GOT2 sur des populations différentes a permis d'obtenir un nombre élevé d'allèles à ces trois loci (DUCOUSSO, 1985).

Enfin, pour une même plante les résultats se sont montrés parfaitement reproductibles pour les 4 loci, quel que soit l'âge de la plante et la position des feuilles prélevées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BONDUELLE, S., 1984. Contribution à l'étude des populations d'Arrhenatherum elatius (L.). Estimation du régime de la reproduction et recherche de marqueurs génétiques. Mémoire de D. E. A. U. S. T. Lille, 29p.
- BRUNEL, D., 1979. Recherche du déterminisme génétique de quelques systèmes enzymatiques chez la luzerne (Médicago Sativa L.) di et tétraploïde. Thèse doctorat de 3^e cycle, Université Paris XI, ORSAY, spéc. génétique, mention Amélioration des plantes.
- DEMARLY, Y., 1963. Génétique des tétraploïdes et amélioration des plantes. Ann. Amélior. Plantes, 13, 4 : 307-400.
- DUCOUSSO, A., 1985. Comparaison de populations adjacentes d'Arrhenatherum elatius sur des sols normaux et toxiques. Analyse de la diversité génétique et du régime de la reproduction. Thèse d'Université U. S. T. Lille, 98p.
- GALLAIS, A., 1977. Contribution à l'étude théorique et expérimentale de l'hétérosis chez une plante allogame autotétraploïde. Thèse doct. Sci. Nat. Univ. Paris Sud.
- GASQUEZ, J. et J.P. COMPOINT., 1976. Apport de l'électrophorèse en courant pulsé à la taxinomie d'Echinochloa crus galli L.. Ann. Amélior., 26, 2 : 345-355.
- GOTTLIEB, L. D., 1975. Allelic diversity in the outcrossing annual plant stephanomeria exigua ssp. carotifera (Compositae). Evolution, 29 : 213-225.
- HART, G. E., 1970. Evidence for triplicate genes for alcohol dehydrogenase in hexaploid wheat. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 66 : 1136-1141.
- HART, G. E., 1975. Glutamate oxaloacetate transaminase isozyme of triticum : evidence for multiple systems of triplicate structural genes in hexaploid wheat in ; Isozymes. III. Developmental biology (ed. Market), 637-657. N. Y. Academic Press.
- JAASKA, V. and V. JAASKA., 1980. Anaerobic induction of alcohol dehydrogenase isoenzymes in tetraploid wheats and their diploid relatives. Biochem. Physiol. Pflanzen, 175 : 570-577.
- LEIBENGUTH, F., 1977. Activity tests of alcohol dehydrogenases of wheat, rye and triticale. Experientia, 33 : 1434-1435.
- LUMARET, R., 1981. Structure génétique d'un complexe polyploïde : Dactylis glomerata. Relation entre le polymorphisme enzymatique et certains aspects de la biologie, de l'écologie et de l'évolution de l'espèce. Thèse d'Etat es Sci. U. S. R. L Montpellier. 168p.

- LUMARET, R. et G. VALDEYRON., 1980. Les dactyles de la Crau : mise en évidence de relations entre les différents écotypes par le polymorphisme enzymatique. C. R. Acad. Agric. Fr., 229-238.
- LUMARET, R. et G. VALDEYRON., 1978. Les glutamates oxaloacétates transaminases du Dactyle (Dactylis glomerata L.) : génétique formelle d'un locus. C. R. Acad. Sci. Paris, 287 : D, : 705-708.
- MARTINEZ-ZAPORTER, J. M. and J. L. OLIVER., 1984. Genetic analysis of isozyme loci in tetraploid potatoes (Solanum tuberosum). Genetics 108 : 669-679.
- MATHER, K., 1936. Segregation and linkage in autotetraploids. J. Genet., 32 : 287-314.
- MCDONALD T. and J. L. BREWBAKER., 1972. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. VIII. Genetic control and dimeric nature of transaminase hybrid maize isoenzymes. J. Heredity, 63 : 11-14.
- ORNSTEIN, B. J., 1964. Disc electrophoresis. I. Background and theory. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121 : 321-347.
- ROOSE, M. L. and L. D. GOTTLIEB., 1976. Genetic and biochemical consequences of polyploidy in tragopagon. Evolution, 30 : 818-830.
- SCANDALIOS, J. G. and M. R. FLEDER., 1971. Developmental expression of alcohol dehydrogenase in maize. Develop. Biol., 25 : 641-654.
- SCANDALIOS, J. G., SORENSON, J. C. and L. A. OTT., 1975. Genetic control and intracellular localization of glutamate oxaloacetic transaminase in maize. Biochem. Genet., 13, 11-12 : 759-769.
- TANKSLEY, S. D., 1980. PGI, a single gene in tomato responsible for a variable number of isozymes. Can. J. Genet. Cytol., 22 : 271-278.
- TORRES, A. M., SOOST, R. K. and S. V. DIEDENHOFEN., 1978. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. Amer. J. Bot., 65, 8 : 869-881.
- TORRES, A. M. and B. TISSERAT., 1980. Leaf isoenzymes as genetic markers in date palms. Amer. J. Bot., 67, 2 : 162-167.
- VALERO, M., 1980. Contribution à l'étude du polymorphisme enzymatique chez Dactylis glomerata L.. Recherche de nouveaux marqueurs et leur utilisation dans les populations naturelles. D. E. A. Ecologie générale et appliquée, Univ. Sci. Tech. Languedoc, Montpellier.

CHAPITRE III

Différenciation du régime de reproduction dans les populations
d'Arrhenatherum elatius: une évolution vers l'autogamie?

A. - Introduction

La compréhension de la signification évolutive des systèmes de reproduction reste un des problèmes les plus difficiles en biologie.

Beaucoup d'espèces de plantes pratiquent des régimes de reproduction mixtes, alliant l'autofécondation à l'allofécondation, et ce fait suggère l'existence de pressions sélectives importantes sur l'évolution et le maintien de la balance allogamie/autogamie.

Les hypothèses avancées quant à l'évolution de l'autogamie se rangent globalement dans deux catégories selon qu'elles considèrent l'aspect négatif ou positif de cette évolution (Stebbins 1957):

- Les hypothèses négatives, regroupées dans l'hypothèse de l'assurance reproductive (Jain 1976, Charlesworth et Charlesworth 1979, Piper et al. 1986), suggèrent que l'autofécondation est favorisée lorsque les partenaires font défaut, par exemple lors de processus de colonisation, ou en situation de manque de pollinisateurs.

- Les hypothèses positives font référence au coût de la méiose (Williams 1975, Maynard-Smith 1978). Par suite du coût génétique de l'allogamie (Bulmer 1982, Uyenoyama 1984), et ainsi que l'a tout d'abord montré Fisher (1941) puis ensuite l'ont généralisé Nagylaki (1976) et Wells (1979), en l'absence de dépression de consanguinité, un gène qui entraîne l'autofécondation sans réduire la production de pollen devrait avoir un avantage de 50% dans une population initialement allogame, devrait l'envahir rapidement et la conduire vers l'autogamie.

Dans le contexte d'une sélection à court terme, agissant sur l'individu, la dépression de consanguinité due à la mise à l'état homozygote d'allèles récessifs délétères ou létaux est la force sélective principale qui peut maintenir l'allogamie dans les populations naturelles (Charlesworth and Charlesworth 1979). Tout facteur qui diminue cette dépression favorise par conséquent la transition vers l'autogamie qui est latente.

Lande et Schemske (1985) ont élaboré un modèle qui retrace l'évolution conjointe de la dépression de consanguinité et de l'autofécondation dans les populations. Ils montrent que dans de nombreuses situations, les seuls états d'équilibre stable sont soit une autogamie soit une allogamie prépondérante.

L'appartenance d'une espèce à un de ces deux états est le résultat de l'histoire de ses populations. Lorsqu'elles sont soumises à des bouleversements fréquents, des réductions drastiques d'effectif, les quelques individus qui arrivent à survivre sont contraints à se reproduire en régime fermé. La proportion d'allèles délétères décroît et la dépression de consanguinité diminue. Les conditions deviennent alors propices à

la sélection de l'autogamie. Par contre les espèces où les populations sont d'effectif importants, "stables", ont accumulé au fil des générations de nombreux allèles délétères, protégés par l'hétérozygotie. La dépression de consanguinité y est forte et maintient l'allogamie.

Il apparait donc que la transition vers l'autogamie peut se réaliser à la faveur de situations où une sélection intense réduit l'effectif des populations. C'est ce qui se produit lors de la colonisation des sols toxiques des terrils de mines. Peu d'individus peuvent s'installer et le contexte est propice à une évolution du mode de reproduction vers un régime fermé (Antonovics 1968, Lefebvre 1970).

Dans une étude portant sur les variations de la diversité génétique et de la structure génotypique d'Arrhenatherum elatius entre populations de terrils et populations de milieu "normal", Ducouso (1985) a mis en évidence une forte variabilité du déficit en hétérozygotes, corrélé positivement à la densité des individus et indépendant de la toxicité du milieu. Parmi les causes possibles, l'autofécondation et une reproduction en voisinages sont les plus probables.

De plus, Sulinowski (1965) travaillant à partir de populations polonaises a montré que l'autofertilité pouvait varier de manière importante à l'intérieur et entre les populations.

Ces résultats montrent une forte variabilité du régime de reproduction chez cette espèce, ce qui en fait un bon modèle biologique pour l'étude de l'évolution de l'autogamie.

Nous nous proposons donc d'explorer la variabilité de l'aptitude à l'autofécondation dans les populations de cette

espèce en relation avec la densité des individus et le milieu d'origine, sols toxique et normal.

L'objectif de cette étude est centré sur la question suivante:

Y a-t-il une différenciation génétique du mode de reproduction dans les populations d'Arrhenatherum elatius, et si oui dans quels types de populations cela se produit-il?

Cette question est abordée dans cet article sous trois aspects:

- L'autofécondation est-elle plus répandue parmi les individus issus de populations denses ou bien est-elle plus pratiquée dans les populations soumises à un stress majeur et violent comme celles situées sur les terrils miniers?

- Les caractéristiques reproductives des individus sont-elles stables d'une année à l'autre et se transmettent-elles à leurs descendants, ce qui suggérerait une composante génétique à cette aptitude?

- Enfin, la dépression de consanguinité étant un facteur essentiel dans le maintien d'une espèce en régime allogame, qu'en est-il chez les descendants issus d'autofécondation?

B. - Matériel et méthodes

1 - Populations étudiées

L'échantillonnage a été conduit en milieu toxique sur le site d'Auby (pelouse calaminaire), et en milieu normal dans les abords du campus de l'Université de Lille 1, à Villeneuve d'Ascq.

Dans le premier cas, deux zones ont été distinguées en fonction de la densité des individus. Cette densité peut être appréciée lors de la floraison par le nombre de panicules par mètre carré. Dans la zone dense le nombre de panicules atteint

180 par m², alors que dans la zone clairsemée, elle varie entre 2 et 15 par m².

En milieu normal deux localités ont été échantillonnées. La première, Pariselle, se présente comme une "pelouse", où l'*Arrhenatherum* est dominant. La seconde, "Quatre cantons", distante de 1 km. de la précédente, est située sous une peupleraie et en lisière de celle-ci. Dans ces deux populations la densité des individus est élevée et le nombre de panicules varie entre 100 et 200 par m².

Les effectifs prélevés sont les suivants:

- 250 individus sur milieu toxique, dont 100 sont originaires de la zone dense (TD) et 150 de la zone clairsemée (TC).

- 100 individus en milieu normal, 50 à Pariselle (N1D) et 50 à Quatre Cantons (N2D).

Les plantes ont ensuite été transportées en terrain expérimental et cultivées en pots.

2 - Estimation de la fertilité

L'aptitude à s'autoféconder a été estimée durant l'été 1985 pour chaque individu en isolant des inflorescences dans des sacs de papyon. Par ailleurs, afin de constituer des témoins sous sac dans des conditions expérimentales similaires, des croisements ont été réalisés pour 60 plantes de chacune des deux densités en milieu toxique, 30 plantes de la population ND1 et 50 plantes de la population ND2.

Après la fructification, les panicules ont été récoltées et l'estimation de la fertilité a été réalisée en comptant le nombre de graines produites, rapporté au nombre total d'épillets présents.

3 - Stabilité de l'aptitude à l'autofertilité

Afin de vérifier si les caractéristiques reproductives des individus restent les mêmes d'une année à l'autre, des plantes ont été retestées durant l'été 1986. Les effectifs sont les suivants: 37 et 42 individus provenant respectivement de la zone clairsemée et dense du milieu calaminaire et 33 plantes originaires du milieu normal.

De même, dans le but d'estimer la transmission entre les générations de l'aptitude à s'autoféconder, les descendants issus d'autofécondation ont été eux mêmes testés. D'une part 43 familles de milieu toxique totalisant 130 descendants et d'autre part 13 familles de milieu normal avec 32 descendants ont été utilisées.

4 - Dépression de consanguinité

Afin de mesurer cette dernière, les descendants issus de l'autofécondation de 14 parents en 1985 ont été semés au printemps 1986. Un témoin en pollinisation ouverte a été constitué avec des descendants des mêmes parents. Pour la provenance de milieu toxique, 4 familles dans chacune des deux densités et 6 familles de milieu normal ont été retenues.

Après la germination, les plantes ont été élevées en serre en pots individuels et la croissance a été mesurée à la dixième et à la treizième semaines.

Les caractères pris en compte furent les suivants:

- la longueur de la tige la plus grande, depuis la base jusqu'au dernier noeud,
- la longueur de l'avant dernière feuille de cette tige,
- le nombre de feuilles de cette tige,
- le nombre total de talles d'une longueur supérieure à 2

cm.

Après ces mesures, les plantes ont été transportées en terrain d'expérience et la phénologie de la floraison a été suivie. Chaque semaine, le nombre d'individus possédant au moins une panicule complètement dégagée de la gaine foliaire a été noté, et la mesure conduite durant 5 semaines.

Enfin, la fertilité en pollinisation libre a été mesurée pour ces divers individus.

C. - Résultats

1 - Variations du mode de reproduction

a - Estimation de l'autofertilité

L'examen des distributions de l'autofertilité dans les populations (fig. 1 et tab. 1) montre une indépendance entre la proportion de graines produites et la densité des individus.

Par contre, une nette différence apparaît selon le type de milieu d'origine, entre les plantes provenant de milieu toxique et celles de milieu normal. En effet, dans les deux populations de milieu normal, denses, tous les individus présentent une faible autofertilité. En milieu toxique, quelle que soit la densité, on observe une variabilité importante entre les individus. Bien qu'il existe aussi des plantes avec une faible autofertilité, la distribution est beaucoup plus étalée, avec des plantes dont l'autofertilité atteint 56%.

Après transformation arcsinus des données, une analyse de variance hiérarchisée à deux niveaux (tab. 2), confirme qu'il existe une différence au niveau milieu d'origine, alors que les deux populations de chaque type de milieu ne présentent pas de différences entre elles

b - Fertilité en croisement

Tableau 1 : Fertilités moyennes en autopollinisation et en croisement mesurées chez des plantes de milieux normal et toxique.



MILIEUX D' ORIGINE	POP.	AUTOPLINISATION		CROISEMENTS CONTROLLES		AUTOFERTILITE ----- FERTILITE EN CROISEMENT	
		N	Nb graines -----x100 (I) Nb épillets	N	Nb graines -----x100 (I) Nb épillets		
NORMAL	N1D	36	4.11 (1.46)	28	28.20 (7.73)	0.146	
	N2D	47	3.05 (1.10)	46	27.54 (5.93)	0.111	0.129
TOXIQUE	TD	82	11.20 (2.28)	57	15.32 (4.82)	0.731	
	TC	89	10.95 (2.49)	52	17.08 (4.61)	0.641	0.683

(I) : Intervalle de confiance au risque 5%

46

Tableau 2 : Analyse de variance hiérarchisée sur l'aptitude à l'autofertilité chez des plantes de milieux normal et toxique .

SOURCE DE VARIATION	DEGRES DE LIBERTE	F	COMPOSANTES DE VARIANCE
type de milieux	1	77.919*	22.655
inter-population	2	0.426NS	0
erreur	250		77.344

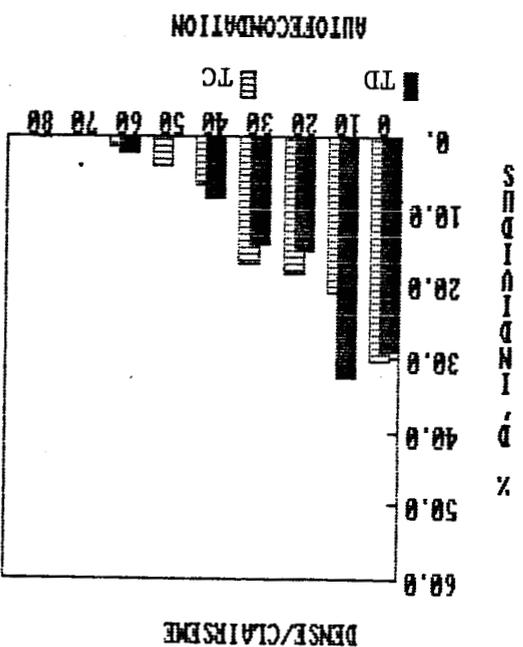
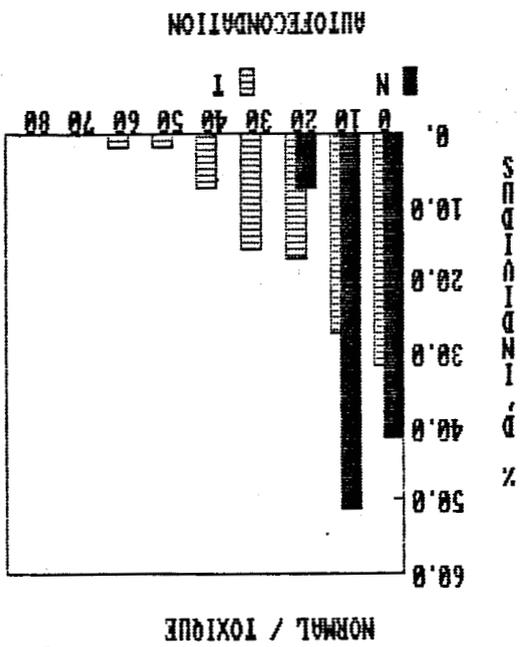
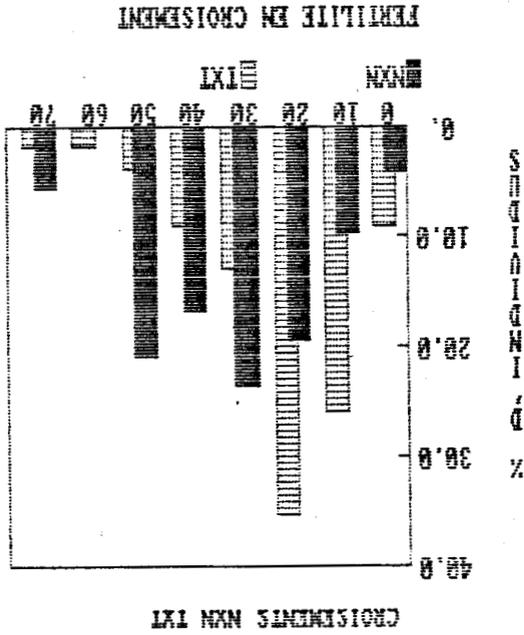
* : significatif à P < 0.05
NS : non significatif .

Tableau 3 : Analyse de variance hiérarchisée sur la fertilité en croisement des plantes de milieux normal et toxique .

SOURCE DE VARIATION	DEGRES DE LIBERTE	F	COMPOSANTES DE VARIANCE
type de milieux	1	129.049**	18.770
inter-population	2	0.159NS	0
erreur	179		81.229

** : significatif à P < 0.01
NS : non significatif.

Fig. 1 : Distribution des taux de fertilité en autopolinisation et en croisement contrôle chez des plantes de milieux normal et toxique.



En croisement, les individus de milieu toxique ont une production de graines plus faible que ceux de milieu normal (tab. 1 et fig. 1). Les deux populations de chaque origine sont homogènes entre elles ainsi que le montre une analyse de variance hiérarchisée de la même manière que précédemment (tab. 3).

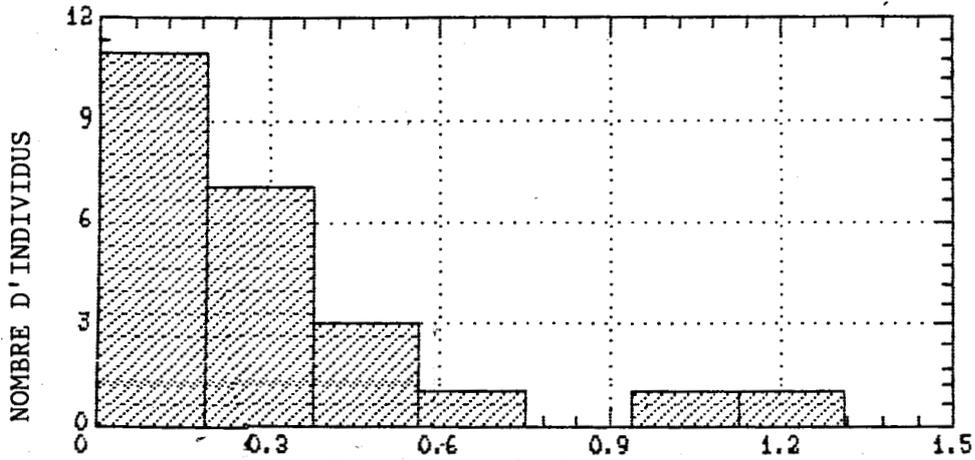
c - Rapport autofertilité/fertilité en croisement.

Afin de comparer l'autofertilité et la fertilité en croisement, le rapport entre ces deux variables a été effectué.

Au niveau de chaque population prise globalement (tab. 1), ce rapport accentue encore les résultats précédents. La proportion d'autofertilité dans la fertilité totale est beaucoup plus élevée, jusqu'à cinq fois plus, chez les plantes originaires de milieu toxique que chez les plantes de milieu normal et elle est indépendante de la densité des individus dans le milieu d'origine.

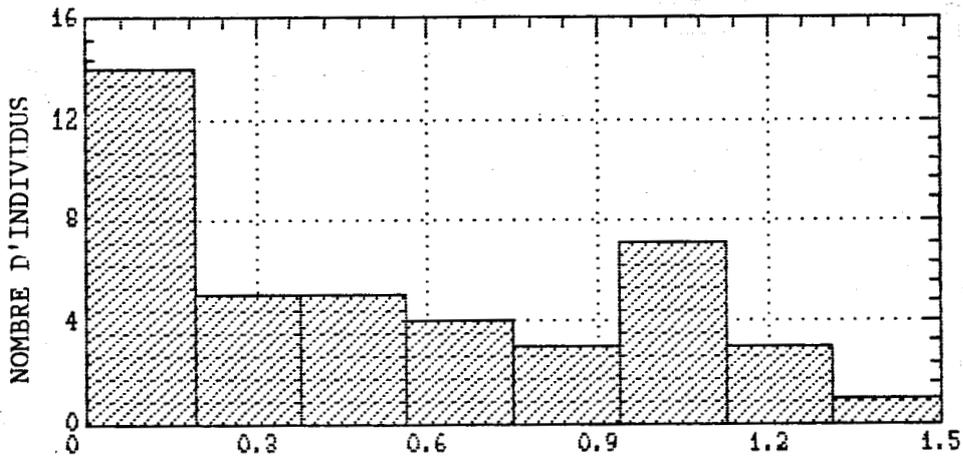
Cet indice a aussi été calculé pour chaque individu dont la fertilité avait été testée en autopollinisation et en croisement (fig. 2). En milieu toxique, la distribution est plus étalée qu'en milieu normal, où la plupart des individus sont regroupés autour de valeurs faibles. De plus on observe en milieu toxique une tendance à la bimodalité, avec des individus dont le rapport autofertilité/fertilité en croisement tend vers un. Sur la figure 3, les plantes sont représentées selon leur autofertilité et leur fertilité en croisement. En milieu toxique, on retrouve les deux catégories définies précédemment, avec des individus qui se regroupent près de l'ordonnée (T1) dont l'essentiel de la fertilité est due vraisemblablement à de l'allofécondation, et d'autres individus qui se situent sur la diagonale et qui ont la même fertilité en autopollinisation et en

NORMAL



AUTOFERTILITE/FERTILITE EN CROISEMENT

TOXIQUE

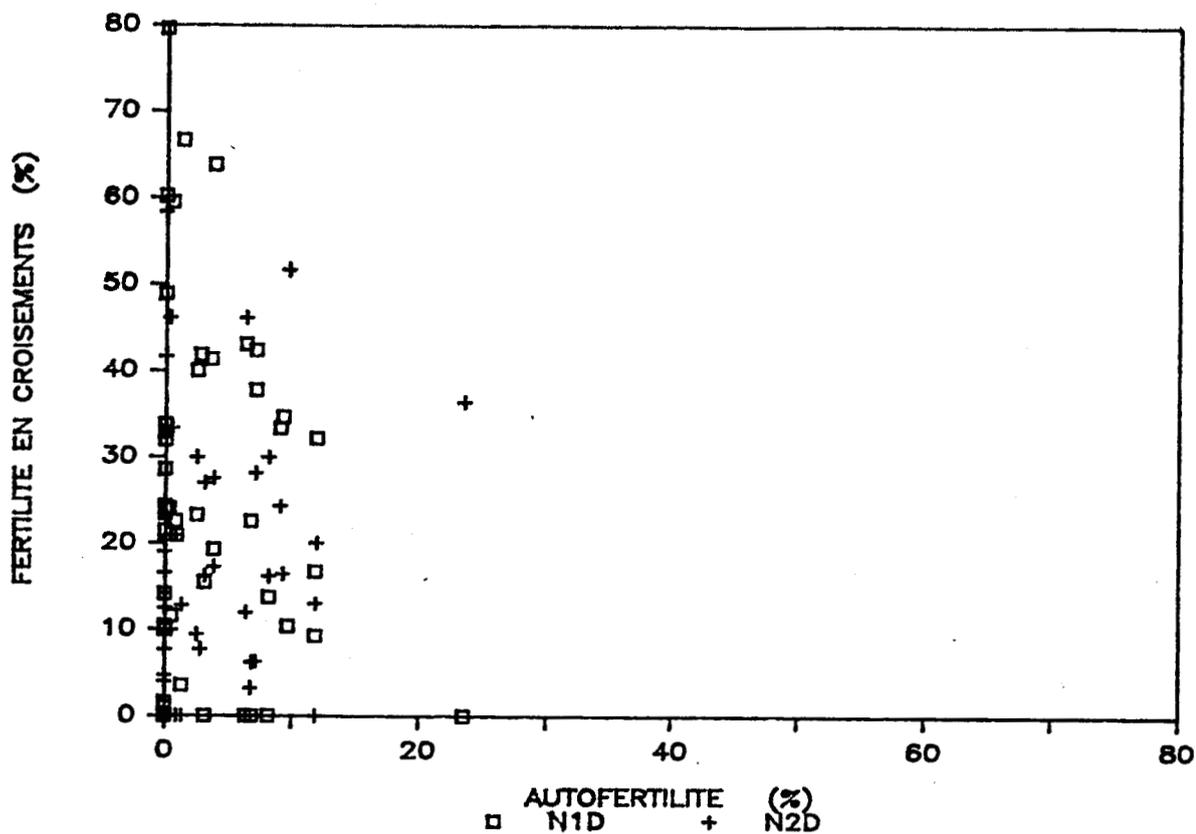


AUTOFERTILITE/FERTILITE EN CROISEMENT



Fig. 2 : distribution du rapport de fertilité en autopollinisation sur la fertilité en croisement chez des plantes de milieux normal et toxique.

NORMAL



TOXIQUE

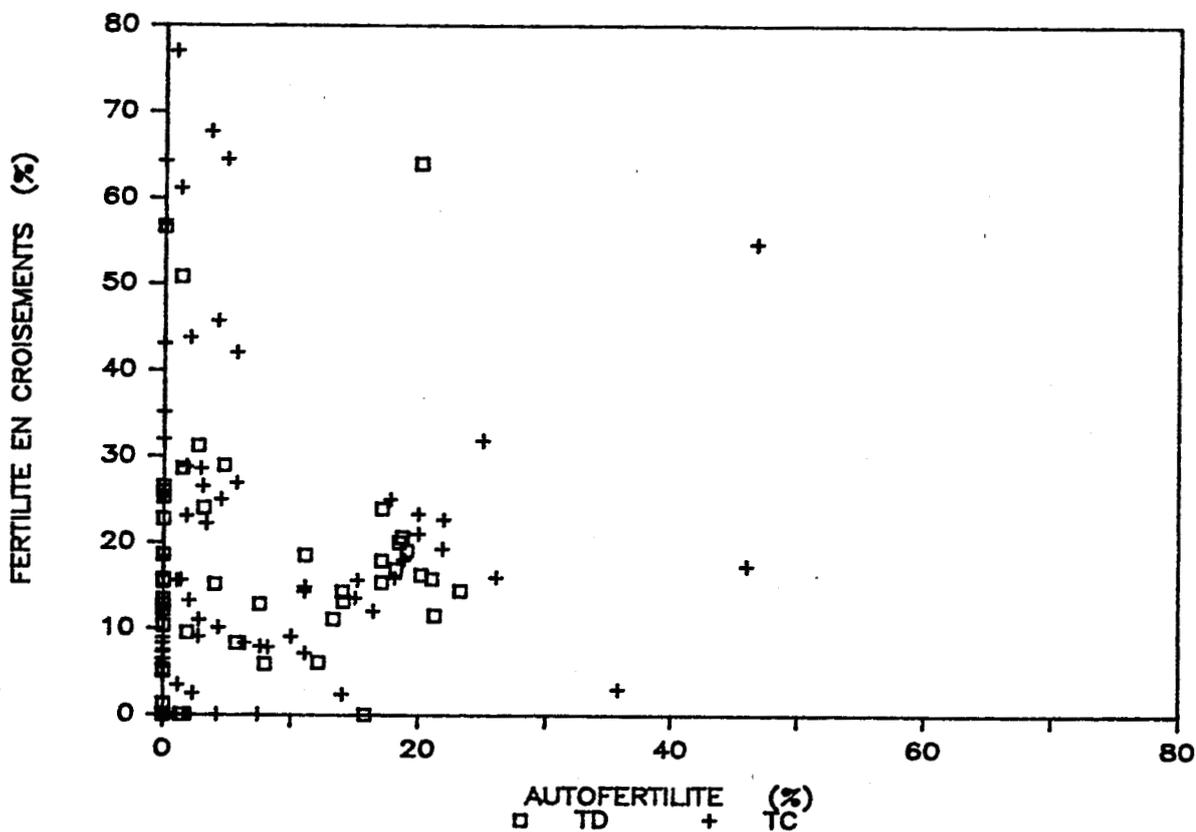


Fig. 3 : Fertilité en autopollinisation et en croisement chez des plantes de milieux normal et toxique.

croisement (T2). Par contre, parmi les plantes originaires de milieu normal, seul le premier cas de figure est présent.

Une vérification à l'aide de marqueurs alloenzymatiques révélés par électrophorèse a été effectuée dans la descendance en croisement des individus appartenant aux deux catégories précédentes afin de préciser l'origine des descendants (Annexe 7). Les résultats montrent que même en croisement, la plupart des descendants des individus du type T2 proviennent d'autofécondation.

2 - Stabilité de l'aptitude à l'autofertilité

a - D'une année à l'autre

L'autofertilité moyenne en 1986 est inférieure à celle mesurée en 1985, vraisemblablement à cause de variations environnementales (tab. 4). En effet pendant la maturation des graines, une certaine sécheresse a régné durant l'été 1986.

Malgré cela, les distributions de l'autofertilité dans les populations sont comparables à celles de l'année précédente (fig. 4). En particulier on note toujours la présence d'individus fortement autoféconds parmi les plantes originaires de milieu toxique.

La corrélation entre l'autofertilité mesurée ces deux années chez les mêmes individus est significative, aussi bien chez les plantes originaires de milieu toxique que celles de milieu normal (fig. 5). La pente de la régression, relativement faible, traduit la diminution de la fertilité due aux effets environnementaux. Malgré des variations environnementales, les individus les plus autofertiles une année le sont toujours l'année suivante.

Une analyse de variance permet d'extraire la composante

Tableau 4 : Comparaison de l'autofertilité moyenne pour deux années successives sur des plantes de milieux normal et toxique.

MILIEUX D' ORIGINE	POP.	1985		1986	
		N	Nb graines -----x100 (I) Nb épillets	N	Nb graines -----x100 (I) Nb épillets
NORMAL	N1D	36	4.11 (1.46)		
	N2D	47	3.05 (1.10)	33	1.92 (1.23)
TOXIQUE	TD	82	11.20 (2.28)	42	6.56 (2.83)
	TC	89	10.95 (2.49)	37	6.26 (2.91)

(I) : Intervalle de confiance au risque 5%

Tableau 5 : Analyse de variance sur l' autofertilité mesurée deux années successives. Décomposition de la variance totale en une composante génétique et une composante de plasticité phénotypique.

SOURCE DE VARIATION	DEGRES DE LIBERTE	F	COMPOSANTES DE VARIANCE
génotype	78	1.610*	23.370
erreur	79		76.629

* : significatif à P < 0.05

Tableau 6 : Taux moyen d'autofertilité des descendants issus d'autofécondation (S1) des plantes de milieux normal et toxique.

MILIEUX D' ORIGINE	POP.	N	Nb graines -----x100 (I) Nb épillets
NORMAL	ND	32	0.92 (0.69)
	TD	54	2.66 (1.22)
TOXIQUE			3.44 (1.56)
	TC	77	4.22 (1.90)

(I) : Intervalle de confiance au risque 5%



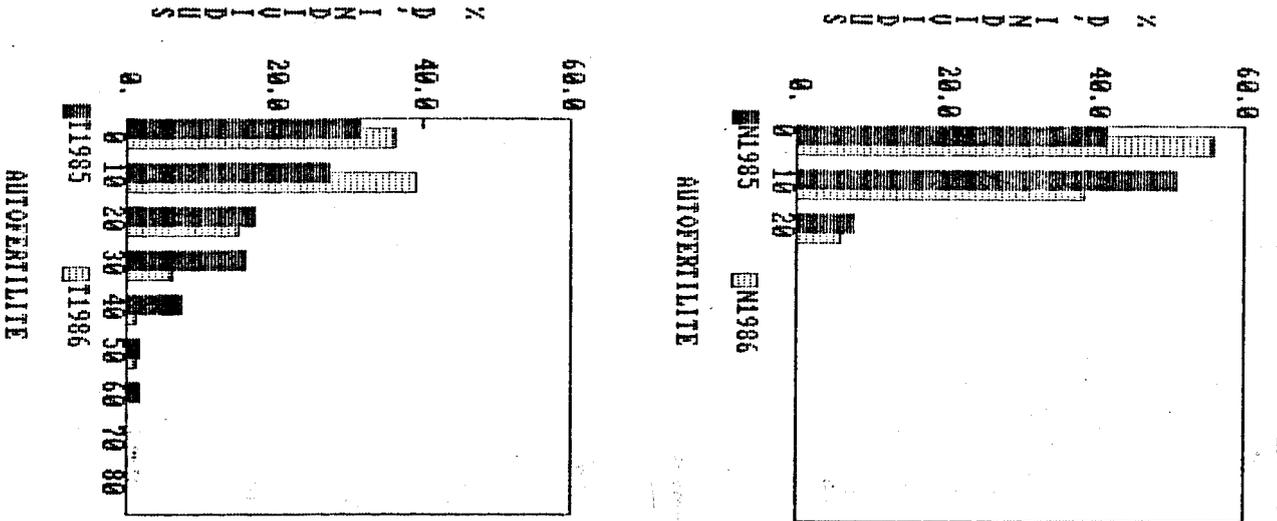


Fig. 4 : Distribution des taux de fertilité en autopollinisation mesurés en 1985 et 1986 chez

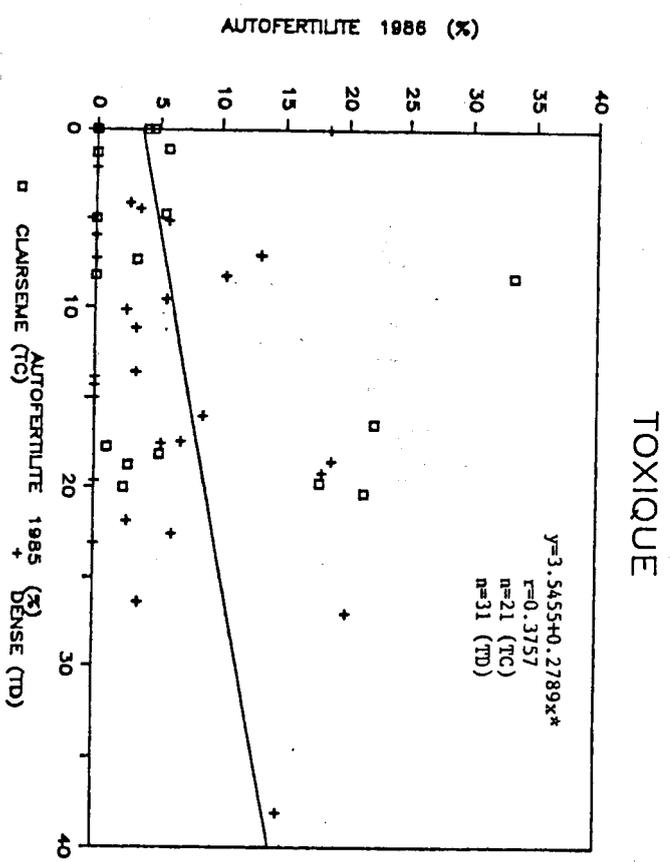
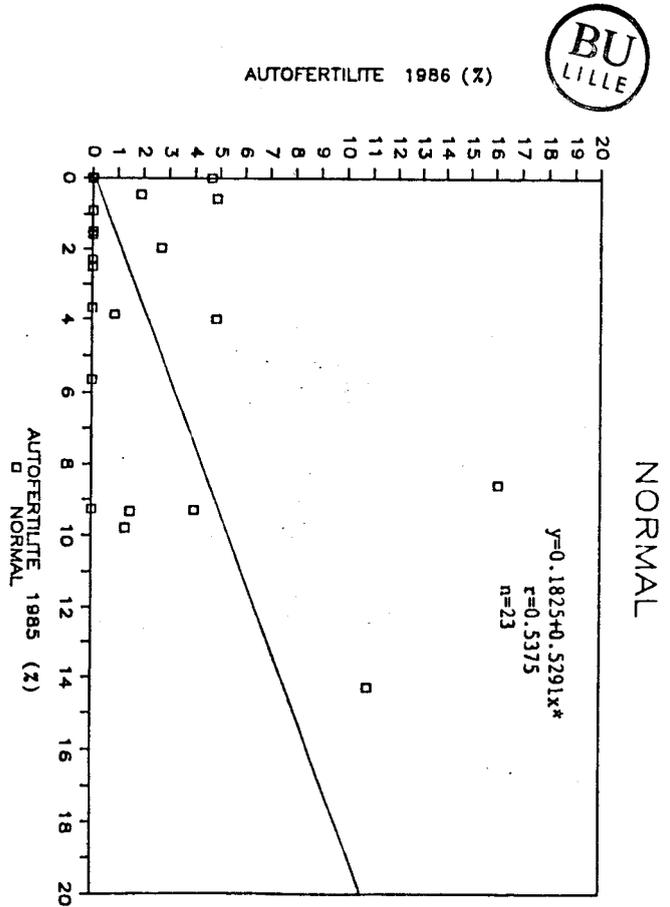


Fig. 5 : Taux de fertilités en autopollinisation mesurés en 1985 et en 1986 chez des plantes de milieux normal

due aux génotypes qui correspond à l'héritabilité au sens large incluant additivité, dominance et épistasie et la composante environnementale soit la plasticité phénotypique (Falconer 1981). Les résultats sont présentés sur le tableau 5. L'effet du génotype est significatif et la proportion de variance génétique dans la variance totale s'élève à 23%.

b - d'une génération à la suivante

L'autofertilité moyenne des descendants issus d'autofécondation est plus faible que celles des parents mesurée la même année, qu'ils proviennent de milieu toxique ou non (tab. 6). Les distributions de l'autofertilité des parents (fig. 1) et des descendants (fig. 6) sont semblables, avec en particulier des variations interindividuelles plus grandes dans les provenances de milieu toxique.

Les régressions effectuées entre les parents et leurs descendants issus d'autofécondation sont positives et significatives, aussi bien pour les plantes de milieu toxique que celles de milieu normal (fig. 7). Les pentes de ces régressions sont plus faibles que celles obtenues deux années successives pour les parents. Il existe donc une transmissibilité de l'aptitude à l'autofertilité, bien que l'autofertilité moyenne tende à diminuer d'une génération à l'autre.

3 - Dépression de consanguinité

a - Germination et croissance

Les taux de germination sont élevés et ne diffèrent pas (tab. 7), ni entre les individus issus d'autofécondation ou de pollinisation ouverte, ni entre les provenances ainsi que le montre un test d'homogénéité ($X^2 = 5.38$, $P5 = 0.37$).

Entre la germination et les mesures à 10 et 13 semaines,

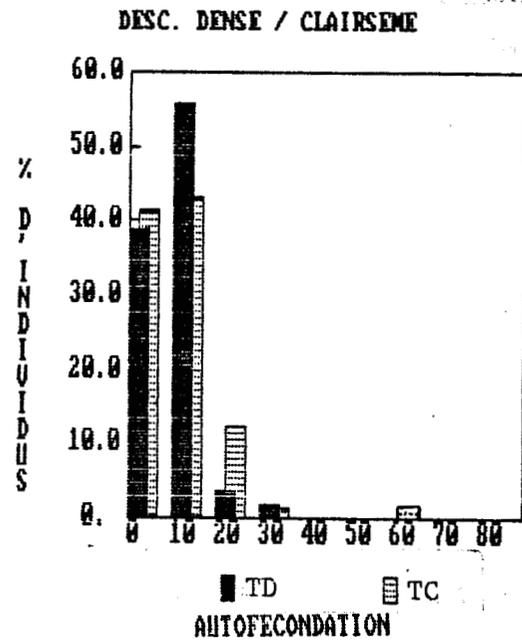
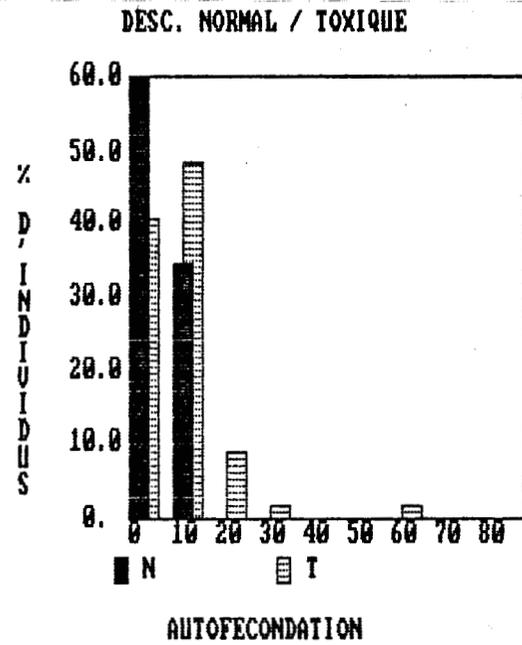
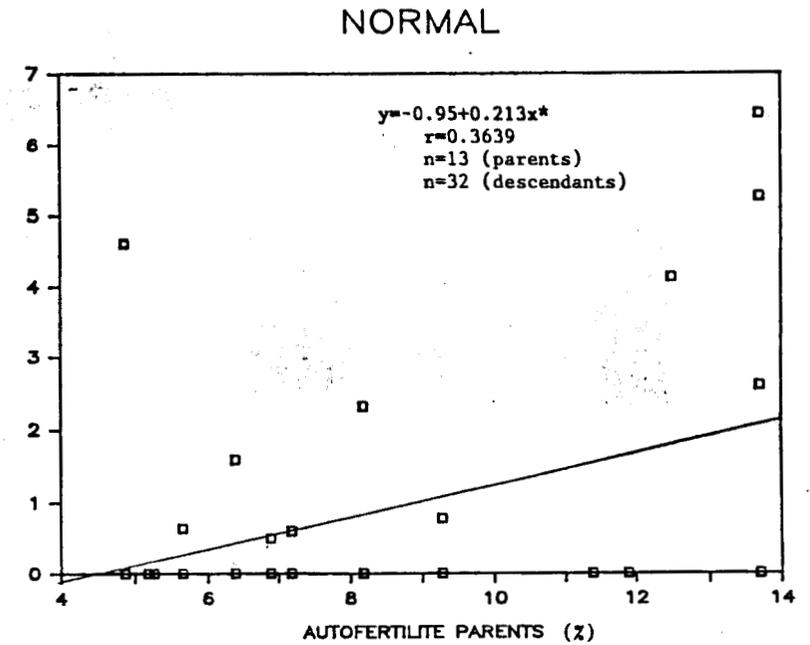


Fig. 6 : Distribution des taux de fertilité en autopollinisation chez des descendants issus d'autofecondation de plantes de milieux normal et toxique .



AUTOFERTILITE DESCENDANTS (z)



AUTOFERTILITE DESCENDANTS (z)

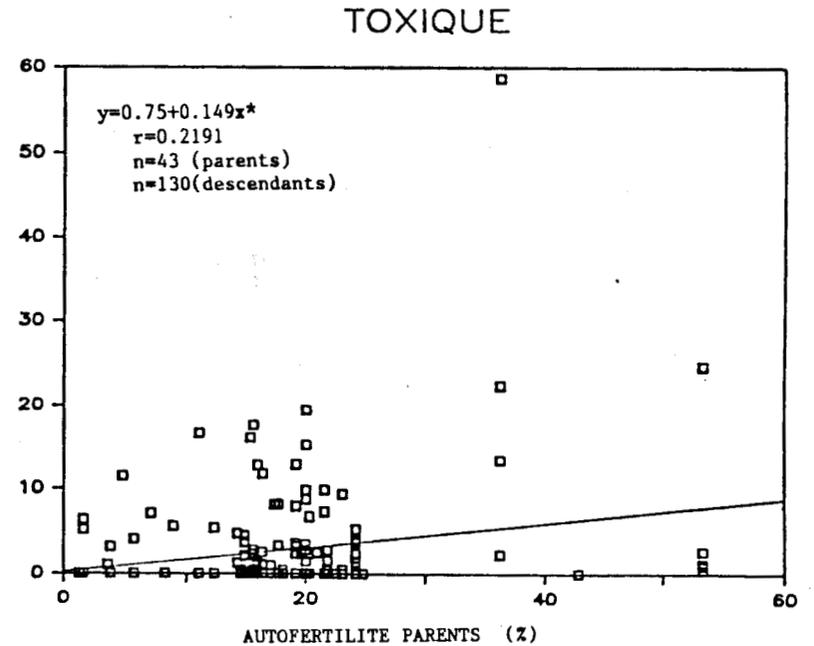


Fig. 7 : Taux de fertilité en autopollinisation mesurés sur des plantes de milieux normal et toxique et chez leurs descendants issus d'autofecondation.

une faible mortalité a été constatée, due à la présence de quelques individus albinos.

Dix semaines après le semis, il n'y a pas de différences entre les descendants issus d'autofécondation et ceux issus de pollinisation ouverte, quelle que soit la provenance des parents, pour la longueur de la plus longue tige, la longueur de l'avant dernière feuille, et le nombre de feuilles de cette tige (tab. 8). Seul, le nombre de talles diffère, plus nombreux chez les plantes de milieu normal, issues de pollinisation ouverte. Par contre l'essentiel des différences se répartit entre provenances différentes. En particulier les descendants de plantes de milieu toxique présentent une longueur de tige et une longueur de feuille plus faibles que leurs homologues de milieu normal.

Treize semaines après le semis (tab. 9), il n'existe plus aucune différence entre les plantes issues d'autofécondation et celles issues de pollinisation libre à l'intérieur de chaque provenance. Par contre la différence interprovenances persiste toujours, surtout marquée en ce qui concerne la longueur de la tige la plus longue et celle de l'avant dernière feuille de cette tige.

Ces résultats montrent une absence de dépression de consanguinité, quelle que soit l'origine des parents et quel que soit leur niveau d'autofertilité.

b - Phénologie de la floraison

Dès la deuxième semaine de floraison (fig. 8), la proportion d'individus ayant fleuri est plus élevée parmi les plantes issues de pollinisation libre. A la cinquième semaine, une analyse de la variance montre une différence hautement significative entre les plantes issues d'autofécondation et

Tableau 7 : Taux de germination de graines issus d'autofécondation ou de pollinisation libre de parents de milieux normal et toxique.

MILIEUX D' ORIGINE	POP.	AUTOFECONDATION			POLLINISATION LIBRE		
		Nb de plantes mères	Nb de graines semées	Taux de germination	Nb de graines semées	Taux de germination	
NORMAL	ND	6	65	83.50%	168	82.78%	
	TD	4	93	83.31%	144	82.25%	
TOXIQUE	TC	4	104	92.77%	158	79.68%	

Tableau 8 : Croissance des plantes issues d'autofécondation ou de pollinisation libre 10 semaines après le semis.

CARACTERES POP.	POP.	AUTOFECONDATION			POLLINISATION LIBRE		
		N	X	(I)	N	X	(I)
Longueur de tige (cm)	ND	55		11.43 (0.44)	168		11.59 (0.28)
	TD	79	6.55 (0.29)	7.03 (0.25)	97	7.07 (0.22)	7.11 (0.20)
	TC	93	7.44 (0.38)		138	7.15 (0.22)	
Longueur de feuille (cm)	ND	55		30.47 (1.39)	168		29.82 (0.90)
	TD	79	21.44 (0.97)	20.70 (0.70)	97	19.15 (1.14)	20.11 (0.64)
	TC	93	20.00 (1.00)		138	19.43 (0.73)	
Nombre de feuilles	ND	55		3.60 (0.07)	168		3.47 (0.09)
	TD	79	3.25 (0.10)	3.16 (0.07)	97	3.24 (1.13)	3.2 (0.09)
	TC	93	3.08 (0.10)		138	3.24 (0.12)	
Nombre de talles	ND	55		3.89 (0.89)	168		5.77 (0.35)
	TD	79	2.81 (0.15)	2.91 (0.14)	97	3.90 (0.30)	4.29 (0.20)
	TC	93	2.37 (0.22)		138	4.10 (0.26)	

X (I) : Moyenne et Intervalle de confiance au risque 5%



Tableau 9 : Croissance des plantes issues d'autofécondation ou de pollinisation libre 13 semaines après le semis.

CARACTERES	AUTOFECONDATION				POLLINISATION LIBRE			
	POP.	N	X	(I)	N	X	(I)	
Longueur de tige (cm)	ND	55		17.81 (1.31)	168		16.17 (0.63)	
	TD	79	10.31 (0.31)		97	10.24 (0.21)		
	TC	93	11.71 (0.21)	11.18 (0.46)	138	11.28 (0.25)	10.98 (0.40)	
Longueur de feuille (cm)	ND	55		37.57 (1.47)	168		33.06 (0.81)	
	TD	79	25.82 (0.81)		97	28.10 (1.02)		
	TC	93	26.17 (0.49)	26.61 (0.68)	138	23.89 (0.85)	26.42 (0.60)	
Nombre de feuilles	ND	55		5.32 (0.25)	168		5.16 (0.11)	
	TD	79	4.61 (0.13)		97	4.75 (0.10)		
	TC	93	4.47 (0.15)	4.56 (0.11)	138	4.59 (0.14)	4.67 (0.11)	
Nombre de talles	ND	55		12.32 (1.23)	168		12.11 (0.66)	
	TD	79	12.48 (0.92)		97	11.13 (0.75)		
	TC	93	12.12 (0.80)	12.50 (0.70)	138	10.84 (0.71)	12.19 (0.65)	

X (I) : Moyenne et intervalle de confiance au risque 5%



Tableau 11 : fertilité moyenne en pollinisation libre des descendants de même plantes mere en autofécondation et en pollinisation libre

MILIEUX D'ORIGINE	FERTILITE DES DESCENDANTS ISSUS D'AUTOFECONDATION				FERTILITE DES DESCENDANTS ISSUS DE POLLINISATION LIBRE			
	POP.	N	Nb graines -----x100 (I)	Nb épillets	N	Nb graines -----x100 (I)	Nb épillets	
NORMAL	ND	20		56.97 (5.23)	12		58.26 (7.49)	
	TD	11	45.55 (7.88)		17	46.94 (6.11)		
TOXIQUE	TC	11	49.32 (9.13)	47.72 (8.55)	20	51.42 (8.42)	49.50 (7.36)	

(I) : Intervalle de confiance au risque 5%

celles issues de pollinisation libre (tab. 10) dont la floraison est la plus avancée. Malgré cela, la proportion de plantes ayant fleuri durant la saison, bien que n'ayant pu être évaluée, paraît avoir été la même dans les deux cas. La seule différence semble donc être un retard dans la floraison des plantes issues d'autofécondation.

c - Fertilité en pollinisation libre

Il n'y a pas de différences significatives entre les plantes, qu'elles soient issues d'autofécondation ou de pollinisation ouverte, que leurs parents proviennent de milieu toxique ou normal (tab. 11). Malgré cela, la fertilité est plus élevée parmi les plantes qui proviennent de milieu normal.

D. - Discussion et conclusions

L'autopollinisation pratiquée sur des plantes de milieu toxique et normal montre que les plantes de milieu toxique ont une potentialité d'autofécondation plus élevée que celles de milieu normal. En milieu toxique, ce taux atteint en moyenne 10 % alors qu'il n'est que de 3.5 % en milieu normal.

Par contre la fertilité en croisement est plus grande parmi les plantes de milieu normal et la proportion d'autofertilité dans la fertilité totale est en moyenne cinq fois plus élevée chez les individus originaires de milieu minier. Parmi ceux ci un polymorphisme se dégage, car la distribution de ce rapport tends vers une bimodalité. Certains individus sont plutôt allogames alors que pour d'autres l'essentiel de la fertilité provient de l'autofécondation.

Les différences observées au niveau de l'autofertilité des individus permettent d'interpréter plus précisément les

FLORAISON

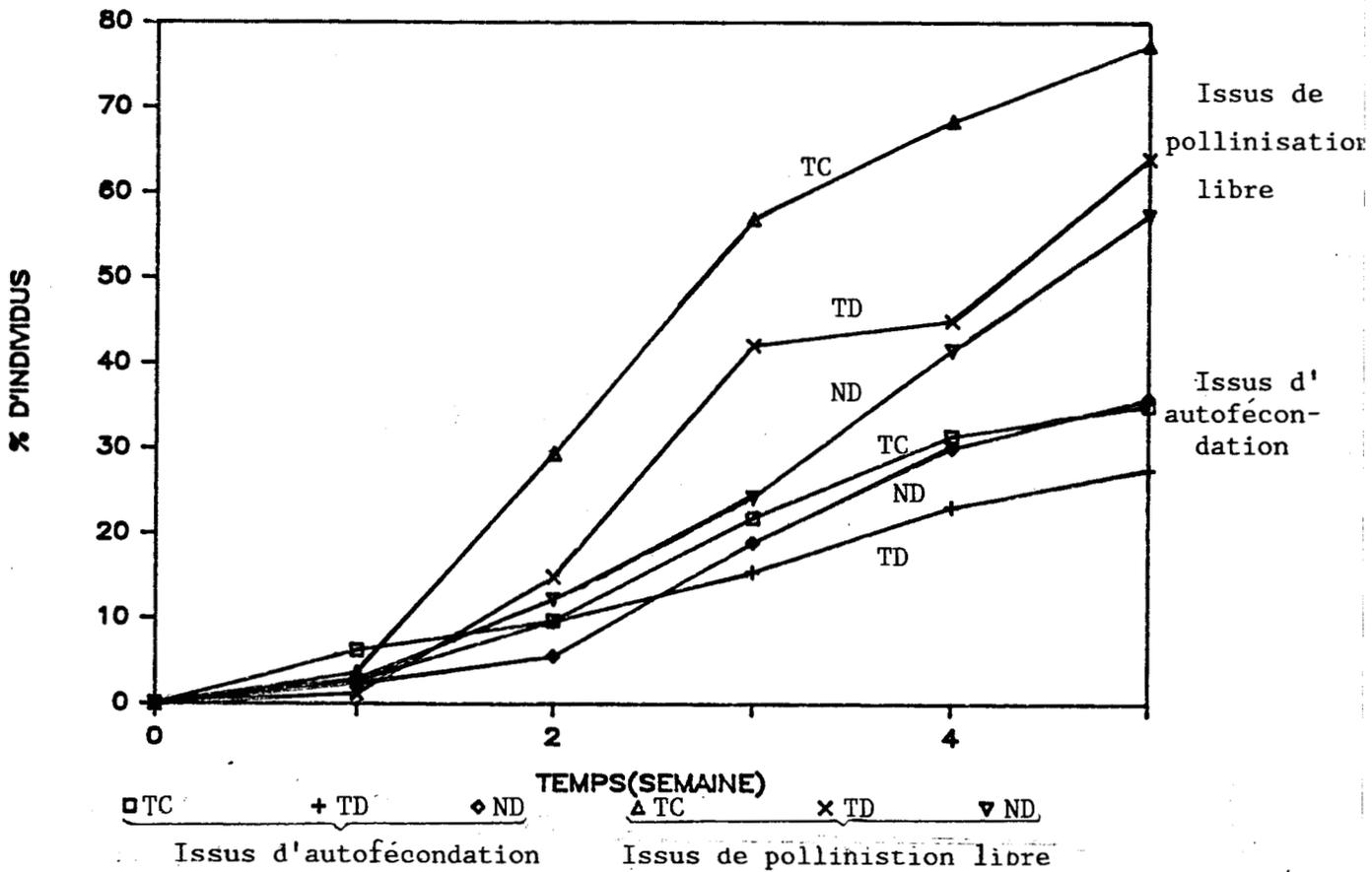


Fig. 8 : Evolution au cours du temps de la proportion d'individus ayant commencé à fleurir parmi les descendants issus d'autofécondation et ceux issus de pollinisation libre.

Tableau 10 : Analyse de variance sur des individus ayant fleuri à la 5^e semaine depuis le début de la floraison chez les issus d'autofécondation ou de pollinisation libre.

SOURCE DE VARIATION	DEGRES DE LIBERTE	F	COMPOSANTES DE VARIANCE
individus issus d'autofécondation ou de pollinisation libre	1	30.689***	65.920
erreur	41		34.079

*** : significatif à $P < 0.001$



observations faites par Ducouso (1985) sur la structure génotypique des populations naturelles d'Arrhenatherum elatius. En effet, la corrélation positive mise en évidence par cet auteur entre déficit en hétérozygotes et densité des individus ne peut pas être expliquée par une aptitude plus grande à l'autofécondation dans les zones denses. Les résultats développés ici montrent que l'autofertilité est plus élevée dans les populations originaires de milieu toxique, qu'elles soient denses ou clairsemées.

Par conséquent, ainsi que le propose Ducouso, le déficit en hétérozygotes important enregistré dans les zones denses a probablement une autre origine: des flux géniques limités qui introduisent une composante de consanguinité supplémentaire à celle déjà produite par l'autofécondation. Mais, pour que cette composante puisse atteindre des valeurs élevées, la densité des individus et le nombre de générations écoulées depuis la fondation de la population doivent être positivement corrélés. Ces deux conditions ne sont pas forcément liées dans la nature. Une étude complémentaire effectuée à l'aide de marqueurs alloenzymatiques a pu montrer que les deux populations de milieu normal, Pariselle et Quatre Cantons, bien que denses, ne présentaient pas de fort déficits en hétérozygotes (tab. 12). Il est donc probable que ces deux sites ont été récemment colonisés par l'Arrhenatherum. Par contre, sur le site d'Auby, la bonne corrélation densité/âge de la population a permis l'apparition d'un fort déficit en hétérozygotes dans la zone dense.

La fertilité en croisement est plus faible chez les plantes de milieu toxique, même lorsqu'elles sont cultivées en terrain expérimental, sur un sol dépourvu de toxicité. De plus,

Tableau 12 : Structure génétique des populations de milieux normal et toxique

MILIEUX D' ORIGINE	POPULATIONS	F				MOYENNE
		GOT1	GOT2	ADH	PGI	
NORMAL	Pariselle (v.Ascq) dense	-0.029 (27)	-0.043 (54)	0.266 (49)	-0.076 (57)	0.029
	4 cantons (v.Ascq) dense	-	-0.019 (55)	0.151 (50)	-0.086 (55)	0.001
TOXIQUE	Pelouse calamin. (Auby) dense	-	0.5 (152)	-	-	
	Pelouse calamin. (Auby) clairsemée	-	-	0.21 (41)	-	
		-	0.05 (80)	-	-	

L'effectif des échantillons est indiqué entre parenthèse

$$F = 1 - \frac{H_o}{H_e} \quad (\text{Coefficient de Wright})$$

$$H_o = \frac{1/2 X(iij) + 2/3Y(iij) + 5/6Z(ijk) + W(ijkl)}{N}$$

X, Y, Z, W : Effectifs observés des 4 classes d'hétérozygotes

N : Nombre d'individus

$$H_e = 1 - \sum X_i^2$$

X : Fréquences alleliques



leurs descendants ont des performances inférieures à celles des individus dont les parents proviennent de milieu normal. Ces différences concernent aussi bien la croissance que la fertilité en pollinisation libre, que les descendants proviennent d'autofécondation ou eux mêmes de pollinisation libre. Ces résultats rejoignent les observations effectuées par d'autres auteurs concernant le coût de la résistance à une pression sélective intense et monofactorielle. Mais d'après nos résultats, ce coût semble persister d'une génération à l'autre et ce, quelle que soit l'origine des plantes (autofécondation ou pollinisation libre), ce qui à priori semble assez paradoxal. Néanmoins, bien que les parents aient été disposés aléatoirement en terrain expérimental, il n'est pas exclu qu'une certaine homogamie positive ait régné lors de la pollinisation libre. En effet, des croisements contrôlés et des pollinisations in vitro ont montré l'existence de barrières reproductives entre les individus de populations différentes (chap. 4). Il est donc possible que les individus issus de pollinisation libre soient préférentiellement issus de croisements entre plantes de même origine.

D'une année à l'autre, ainsi que d'une génération à la suivante, les caractéristiques reproductives se maintiennent et se transmettent, bien que l'autofertilité diminue entre les deux générations. Bien qu'il soit difficile de parler d'héritabilité au sens strict, ces résultats suggèrent l'existence d'une composante génétique dans l'aptitude à l'autofertilité.

Les mesures de viabilité et de croissance effectuées sur les individus issus d'autofécondation donnent des résultats similaires à celles réalisées sur des plantes issues de pollinisation libre. De plus la fertilité en pollinisation libre

n'est pas non plus différente. Après une première génération d'autofécondation, aucune dépression de consanguinité n'est visible. Cependant, un paradoxe apparaît: il n'y a pas de relation entre les performances des descendants et le degré d'autofertilité des parents ce qui suggère les remarques suivantes:

La régulation de l'autofertilité pourrait être essentiellement due:

- à des mécanismes pré-zygotiques de type incompatibilité qui seraient rompus dans les populations originaires de milieu toxique.

- et/ou à des mécanismes post-zygotiques. La dépression de consanguinité s'exprimerait entre la fécondation et la formation de la graine, en éliminant les individus consanguins les plus chargés en allèles déletères. Ils seraient plus particulièrement présents dans la descendance de parents de milieu normal avec pour conséquence une faible autofertilité de ces individus. La dépression de consanguinité pourrait ne pas s'être encore exprimée à cette première génération d'autofécondation. En effet, ainsi que le souligne Maynard-Smith (1978), si elle n'est pas linéairement corrélée au coefficient de consanguinité, elle s'exprimera quand même, mais avec quelques générations de retard.

La tétraploïdie de l'*Arrhenatherum* est aussi à prendre en compte. Lande et Schemske (1985) montrent que les espèces tétraploïdes allogames manifestent une plus faible dépression à la consanguinité que les diploïdes, à quelque génération d'autofécondation que ce soit, et de ce fait sont susceptibles d'évoluer plus facilement vers une autogamie élevée.

La présence d'un polymorphisme de l'autofertilité dans les

populations originaires de milieu toxique et l'absence de dépression de consanguinité chez les individus issus d'autofécondation suggère la possibilité d'une évolution de la population vers une autogamie croissante. Mais le devenir de ces populations est difficile à prévoir. D'une part l'absence de dépression de consanguinité permet de penser que l'autogamie peut augmenter. Cependant la diminution de l'autofertilité d'une génération à l'autre paraît limiter cette tendance.

Les hypothèses concernant l'évolution des régimes de reproduction mixte se rangent principalement dans deux catégories:

Soit ainsi que Lande et Schmske (1985) le proposent, ce sont des états transitoires qui reflètent les antécédents historiques des populations.

Soit ils représentent des situations en équilibre maintenues par la sélection naturelle qu'Uyenoyama (1986) classe en deux groupes selon que l'on a affaire à un polymorphisme pour l'autofécondation dans les populations ou à un monomorphisme avec un régime mixte pour chaque individu.

Nos résultats qui font état d'un polymorphisme vont à l'encontre de l'hypothèse de l'état monomorphe, mais ne permettent pas de trancher en faveur de l'équilibre ou du non équilibre. Les études suivantes s'avèrent donc nécessaires:

- 1 - Estimer l'héritabilité de l'autofertilité des descendants issus d'autofécondation durant plusieurs générations afin de suivre l'évolution de la variance génétique susceptible de donner prise à la sélection naturelle.

- 2 - Mesurer les performances des individus issus d'autofécondation durant plusieurs générations dans le cas où

dépression et consanguinité ne seraient pas linéairement corrélées, en différenciant les individus en fonction de l'autofertilité de leurs parents. De plus les performances en compétition intraspécifique sont à considérer (Acheroy et Cuguen en prep.).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANTONOVICS, J., 1968. Evolution in closely adjacent plant population. V. Evolution of self fertility. *Heredity* 23, 219-228.
- BULMER, M. G., 1982. Cyclical parthenogenesis and the cost of sex. *J. Theoret. Biol.*, 94, 197-207.
- CHARLESWORTH, D., CHARLESWORTH, B., 1979. The evolutionary genetics of sexual systems in flowering plants. *Proc. R. Soc. Lond.*, B205, 513-530.
- FALCONER, D. S., 1981, Introduction to quantitative genetics. Oliver and Boyd.
- DUCOUSSO, A., 1985. Comparaison de populations adjacentes d'Arrhenatherum elatius des sols normaux et toxiques. Analyse de la diversité génétique et du régime de la reproduction. Thèse d'Université U. S. T. Lille, 98 p.
- FISHER, R. A., 1941. Average excess and average effect of a gene substitution. *Ann. Eugen.* 11, 53-63.
- JAIN, S. K., 1976. The evolution of inbreeding in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 7, 469-495.
- LANDE, R., SCHEMSKE, D. W., 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution*, 39, 24-40.
- LEFEBVRE, C., 1970. Self-fertility in maritime and zinc mine populations of Armeria maritima (Mill.) Willd. *Evolution*, 24, 571-577.
- MAYNARD-SMITH, J., 1978. The evolution of sex. Cambridge University Press.
- NAGYLAKI, T., 1976. A model for the evolution of self-fertilization and vegetative reproduction. *J. Theoret. Biol.*, 58, 55-58.
- PIPER, J. G., CHARLESWORTH, B., CHARLESWORTH D., 1986. Breeding system evolution in Primula vulgaris and the role of reproductive assurance. *Heredity*, 56, 207-217.
- STEBBINS, G. L., 1957. Self-fertilization and population variability in the higher plants. *Amer. Natur.*, 91, 337-354.
- SULINOWSKI, S., 1965. Variation of forms and biology of flowering in Arrhenatherum elatius (L.) P. B.. Part II. Effects of self and cross pollination on seed setting in Arrhenatherum elatius. *Genetica Polonica*, 6, 105-118.
- UYENOYAMA, M. K., 1984. On the evolution of parthenogenesis: A genetic representation of the "cost of meiosis". *Evolution*, 38, 87-102.

UYENYAMA, M. K., 1986. Inbreeding and the cost of meiosis: The evolution of selfing in populations practicing biparental inbreeding. *Evolution*, 40, 388-404.

WELLS, H., 1979. Self-fertilization: Advantageous or deleterious? *Evolution*, 33, 252-255.

WILLIAMS, G. C., 1975. *Sex and Evolution*. Princeton University Press.

CHAPITRE IV

COMPATIBILITE DES CROISEMENTS INTER ET INTRA POPULATIONNELS
CHEZ *ARRHENATHERUM ELATIUS*: OUTBREEDING DEPRESSION?A. Introduction.

Arrhenatherum elatius est une graminée généralement considérée comme allogame. Cependant, Sulinowski (1965) a montré qu'il existe dans certaines populations un taux relativement élevé d'autogamie potentielle. Dans un chapitre précédent, nous avons mis en évidence un polymorphisme intrapopulationnel du régime de la reproduction dans une population d'origine toxique. Les individus issus d'autofécondation présentent une croissance similaire à celle d'individus issus de fécondation croisées. Seule, la diminution de graines produites en autopollinisation par rapport à l'allopollinisation laisse supposer l'existence d'une dépression de consanguinité. Cette dernière pourrait être l'expression de mécanismes d'isolement post-zygotique (avortement des graines à faible valeur sélective) ou pré-zygotique (germination plus faible de l'autopollen).

Des barrières pré-zygotiques semblent également présentes au niveau des croisements. En effet, des individus d'origine

toxique ont donné une descendance morphologiquement semblable et caractéristique du milieu toxique en autopollinisation mais également en pollinisation ouverte en présence d'individus de prairie normale. Ce deuxième résultat est surprenant : on se serait attendu à observer une "dilution" de la morphologie "toxique" en pollinisation libre. Des phénomènes de dominance ou des barrières pré ou post zygotiques pourraient l'expliquer.

Des barrières pré-zygotiques semblent donc apparaître à plusieurs niveaux. Nous avons tenté d'étudier la relation entre fertilité et barrières pré-zygotiques pour différents types de croisements (inter et intrapopulations).

B. - Matériel et méthodes.

Arrhenatherum elatius (L.) Beauv. ex J. et C. Presl est une graminée hermaphrodite, anémophile et tétraploïde. Les plantes étudiées ont été prélevées dans trois stations: deux prairies normales (ND1 et ND2) et une pelouse calaminaire montrant de fortes teneurs en Plomb et en Zinc (T). Cette dernière est elle même décomposée en deux groupes suivant la densité des individus (clairsemé: TC; dense: TD). Les trois stations sont géographiquement éloignées les unes des autres et n'échangent pas de gènes entre elles.

Des échantillons représentatifs des populations ont été prélevés et conservés en pots au jardin expérimental.

Dans une première expérience, les taux de germination du pollen ont été estimés pour divers types de croisements. La

pollinisation a été réalisée in vitro selon la technique de Lundqvist (1961). Peu avant l'anthèse, les ovaires sont prélevés et transférés sur un milieu d'agar (2% d'agar, 10% de sucrose, 100ppm d'acide borique) en boîte de Petri, leur position étant notée. Dès l'ouverture des anthères, le pollen est prélevé à l'aide d'un pinceau et déposé délicatement sur les stigmates. Les ovaires sont alors incubés à température ambiante, dans une atmosphère humide pendant 24 heures. Ensuite, ils sont colorés au bleu d'aniline (mélange d'une goutte de bleu d'aniline à 2% et d'une goutte de $K_3PO_4 \cdot 3H_2O$ à 20%) et montés sous lamelle en vue de l'observation au microscope sous lumière fluorescente (Martin, 1959). Ce type de coloration associé à la fluorescence met en évidence les grains de pollen viables, qu'ils soient compatibles ou non avec le stigmate. Les premiers présentent un long tube pollinique bien développé, les seconds se caractérisent par un petit tube dont la croissance a été stoppée très rapidement (Cornish et al., 1979). Les résultats sont présentés sous forme de rapport entre le nombre de grains de pollen germés et le nombre de grains de pollen viables. L'observation ne teste donc que la compatibilité entre le grain de pollen et le stigmate et élimine toute variation résultant de différences de viabilité pollinique ou de problèmes de contact avec le stigmate dûs à un excès de pollen.

Le schéma expérimental mis en place suit un plan de croisement diallèle. Neuf individus d'origine prairiale et onze individus d'origine toxique clairsemée ou dense ont été croisés entre eux. Le matériel végétal disponible étant limité (l'anthèse doit se produire simultanément pour tous les individus), tous les

croisements n'ont pu être réalisés. Dans la mesure du possible, les données sont basées sur deux comptages (2 ovaires/traitement).

Une deuxième estimation du taux de réussite de croisements entre individus d'origines diverses est basée sur la production de graines. Après un an de croissance au jardin expérimental, des croisements contrôlés ont été réalisés par ensachage des panicules dans un sac en papyrus. La pollinisation des fleurs est assurée par une agitation fréquente du sac.

Quatre types de croisements ont été effectués: NXN, NXT, TXN, TXT. Dans la suite du texte, les croisements indiqueront toujours la femelle en premier lieu et le mâle en second lieu. Les résultats sont exprimés en taux de fertilité c'est à dire en nombre de graines produites/nombre de fleurs. Les fleurs d'*Arrhenatherum* étant très petites, il est difficile d'effectuer des castrations. Par conséquent, les résultats obtenus en croisements contrôlés comprennent non seulement des descendants issus d'allofécondation mais également ceux issus d'autofécondation.

C. Résultats.

1. Germination du pollen in vitro.

Les taux de germination du pollen sont présentés au tableau 1 pour les différents traitements.

L'analyse factorielle classiquement utilisée dans les cas

Tableau 1 : Taux moyens de germination du pollen (x) in vitro pour différents types de croisements. Les effectifs parentaux s'élèvent à 3 individus ND1, 6 ND2 (populations normales) 7 individus TC et 4 TD (population toxique).

		MALE			
		ND1(3)	ND2(6)	TC(7)	TD(4)
FEMELLE					
ND1(3)	x	0.706	0.674	0.451	0.514
	Ni	6	15	17	12
	s2	0.0027	0.0519	0.0327	0.0360
ND2(6)	x	0.569	0.680	0.478	0.415
	Ni	14	24	28	28
	s2	0.0456	0.0308	0.0487	0.0431
TC(7)	x	0.300	0.340	0.527	0.593
	Ni	15	35	10	18
	s2	0.0299	0.0413	0.0255	0.0213
TD(4)	x	0.304	0.339	0.491	0.563
	Ni	12	23	19	9
	s2	0.0293	0.0223	0.0331	0.0146

Ni : Nombre de croisements effectivement réalisés

L'effectif est indiqué entre parenthèse

ND1 : population normal dense (pariselle)

ND2 : population normal dense (4 cantons)

TC : population toxique clairsemé(Auby)

TD : population toxique dense (Auby)

Tableau 2 : Analyse de variance hiérarchisée sur la germination de pollen des plantes de milieux normal et toxique .

SOURCE DE VARIATION	DEGRES DE LIBERTE	F	COMPOSANTES DE VARIANCE
type de croisements	3	16.527***	33.874
famille d'ovaires	36	2.928*	14.513
erreur	237		51.611

*** : significatif à P < 0.001

* : significatif à p < 0.05

Tableau 3 : Analyse de variance hiérarchisée sur les taux de germination de pollen des plantes de milieux normal et toxique

SOURCE DE VARIATION	DEGRES DE LIBERTE	F	COMPOSANTES DE VARIANCE
type de croisements	3	35.301***	34.107
famille de pollen	33	1.071NS	0.612
erreur	247		65.279

*** : significatif à P < 0.001

NS : non significatif



de croisements di-allèles n'a pu être appliquée à cause de la présence de nombreuses données manquantes, notamment au niveau des autofécondations qui présentent une réponse particulière, *Arrhenatherum* étant allogame. Les résultats ont dès lors été traités au moyen d'analyses de la variance hiérarchisées.

Dans un premier temps, deux analyses de la variance à deux critères de classification (tableau 2 et 3) ont testé l'existence éventuelle

- a) d'une différence entre les quatre types de croisements: NXN, NXT, TXN, TXT (critère principal commun aux deux analyses).
- b) d'un effet maternel et d'un effet paternel agissant au niveau de la germination du pollen (critères subordonnés étudiés successivement).

Il apparaît qu'il existe des différences significatives ($p < 0,001$) entre les différents types de croisements (NXN, NXT, TXN, TXT). A l'intérieur de ces quatre traitements, les taux de germination sont relativement homogènes et ne diffèrent pas significativement. Ce sont les croisements entre individus d'origines semblables (NXN et TXT) qui réussissent le mieux, les croisements entre individus d'origines contrastées se caractérisant par une germination plus faible (NXT et TXN). La diminution du taux de germination apparaissant en croisement inter provenance est cependant proportionnellement plus prononcée dans le cas d'un pollen "normal" germant sur un pistil "toxique" que dans le cas d'un pollen "toxique" germant sur un pistil "normal". En situation favorable -croisements entre individus de même origine- le pollen "normal" germe mieux que le pollen "toxique" (respectivement 65.5% et 54.2%). En croisement

mixte, c'est lui qui germe le moins bien. Il perd 50% du potentiel germinatif exprimé par rapport au croisement NXN alors que le pollen "toxique" germant sur pistil "normal" ne montre qu'une diminution relative de 15% par rapport au croisement TXT. Quant aux deux critères subordonnés des analyses de la variance, familles d'ovaires et de pollens issues d'un seul individu, ils indiquent une différenciation significative ($p < 0.05$) du taux de germination du pollen en fonction des lignées femelles; par contre, il n'y a pas de différence de comportement liée à l'origine individuelle des pollens.

Des analyses de la variance à un critère de classification testant les différences entre familles d'ovaires et familles de pollens pour chaque type de croisements confirment l'existence d'un effet femelle et l'absence d'effet mâle. Cependant, cet effet femelle semble plus prononcé pour les familles d'origine normale que pour les familles d'origine toxique, comme l'indique une analyse plus détaillée des composantes de la variance non présentée ici et résumée ci-après.

Pour les croisements NXN et NXT, les différences entre familles d'ovaires expliquent respectivement 26% ($p < 0.01$) et 33% ($p < 0.001$) de la variation. La proportion de la variance expliquée par l'effet femelle ne s'élève plus qu'à 17% ($p < 0.05$) et 2% (N.S.) respectivement pour les croisements TXN et TXT.

Les mécanismes empêchant la germination du pollen dans certains cas étant a priori inconnus, se pose la question de la réciprocité de l'incompatibilité. Un croisement réussi dans un sens le sera-t-il automatiquement dans l'autre? Trois cas ont été

envisagés: croisements entre individus normaux, entre individus toxiques et croisements mixtes.

Les croisements ont été répartis en deux catégories: croisements réussis (+) pour une germination pollinique $\geq 50\%$ et croisements peu fertiles (-) pour une germination pollinique $< 50\%$. On obtient donc quatre combinaisons possibles, ++, +-, -+, --, pour les couples de croisements réciproques. Si les taux de germination des croisements réciproques sont indépendents, la fréquence de chaque combinaison découle directement des fréquences de germination des deux catégories initiales. Au contraire, si une des associations est favorisée, sa fréquence sera supérieure à la fréquence théorique dépendant des fréquences initiales de chaque type de croisement. Un test G (Sokal et Rohlf 1981) permet aisément de mettre en évidence tout écart à une association aléatoire.

Le tableau 4 montre que pour les trois types de croisements testés, aucune association préférentielle n'a pu être mise en évidence. L'interaction pollen A X ovule B n'est donc pas la même que l'interaction pollen B X ovule A.

2. Fertilité en croisements.

Les résultats présentés au tableau 5 indiquent la fertilité moyenne obtenue pour chaque type de croisement. Une analyse de la variance à 2 critères de classification a été réalisée afin de tester les différences entre les quatre principaux types de croisement (critère principal), et à l'intérieur de ceux-ci (ND1XND1, ND1XND2, ND2XND1, ND2XND2 pour NXN; ND1XT et ND2XT pour NXT; TXND1 et TXND2 pour TXN; TDXT et

Tableau 4 : Test de l'association aléatoire des échecs et réussites de la germination pollinique entre croisements réciproques. Un échec (-) traduit un taux de germination = ou < à 50%, la réussite (+) marquant tous les taux > à 50%. Les effectifs observés dans chaque catégorie d'association sont donnés pour trois types de croisements.

CROISEMENT	++	+-	-+	--	G	
N X T	4	6	28	23	2.77	N.S.
N X N	28	10	10	0	5.38	N.S.
T X T	18	8	8	2	0.46	N.S.

N.S. : Non significatif



TCXTD pour TXT) tableau 6.

L'analyse de la variance montre qu'il existe des différences significatives au niveau du critère principal qui différencie selon l'origine normale ou toxique des parents ($F=13.6209$, $p<0.01$) mais aucune différence ne se marque à l'intérieur des quatre groupes.

Les résultats sont globalement semblables à ceux obtenus pour la germination du pollen. A nouveau, les croisements entre individus de même origine sont plus fertiles que ceux impliquant des origines contrastées et la diminution de fertilité en croisement mixte est légèrement plus marquée pour les femelles "toxique" que les femelles "normale" (29% contre 25%). Les femelles d'origine normale montrent également un taux de réussite plus élevé que les femelles d'origine toxique, tant en croisement mixte qu'en croisement entre homologues.

Un coefficient de corrélation positif et significatif ($r=0.854$, $p<0.01$) entre le taux de germination du pollen et la fertilité pour les 10 traitements communs aux deux expériences confirme la similitude des variations des deux caractères.

D. - Discussion et conclusion.

L'échec relatif des croisements entre populations normales et toxiques confirme les résultats obtenus par de nombreux auteurs ayant étudié des populations métalicolles. Les populations métal-tolérantes présentent généralement des barrières aux flux géniques. Différents types de barrières peuvent exister: décalage phénologique, augmentation du taux d'autofécondation dans les populations tolérantes... (McNeilly et

Tableau 5 : Fertilité (nombre de graines/nombre de fleurs) de différents types de croisements (femelle X male), en fonction de l'origine des individus.

Croisements	Fertilité	Variance	Effectif
N X N	0.2562	0.0264	115
ND1 X ND1	0.2820	0.0385	28
ND1 X ND2	0.2022	0.0206	20
ND2 X ND1	0.2313	0.0250	21
ND2 X ND2	0.2755	0.0198	46
N X T	0.1930	0.0294	42
ND1 X T	0.1915	0.0229	18
ND2 X T	0.1942	0.0343	24
T X N	0.1150	0.0217	40
T X ND1	0.1215	0.0142	19
T X ND2	0.1091	0.0284	21
T X T	0.1627	0.0288	109
TD X TC	0.1532	0.0261	52
TC X TD	0.1714	0.0311	57

N : Normal(N1D:normal 1 dense et ND2 : normal 2 dense)

T : toxiquir(TC:toque clairsemé et TD : toxique dense)

Tableau 6 : Analyse de variance hiérarchisée sur la fertilité en croisement entre plantes de milieux normal et toxique.

SOURCE DE VARIATION	DEGRES DE LIBERTE	F	COMPOSANTES DE VARIANCE
type de croisements	3	13.620***	11.221
inter-croisements	6	0.710NS	0
erreur	296		88.778

*** : significatif à $P < 0.001$

NS : non significatif



Antonovics 1968, Antonovics 1968, MacNair et Christie 1983). La population toxique étudiée montre effectivement une autofécondation potentielle plus élevée que les populations normales (Ducouso et al. 1986 et chapitre précédent). Mais, en outre, il existe une diminution très importante de la fertilité lorsque des plantes toxiques sont pollinisées par du pollen d'origine "normale". Des mécanismes favorisant la conservation de l'adaptation au milieu toxique semblent donc présents. Cependant, il apparaît également une barrière de stérilité, plus faible, lors de croisements réciproques, à savoir lorsqu'une femelle "normale" est pollinisée par un individu "toxique". L'hypothèse liée à la conservation du caractère métal-tolérant n'est plus d'application. La protection de la métal-tolérance ne serait donc qu'un cas particulier d'un phénomène plus général.

L'existence d'une co-évolution des gènes dans une population ou un environnement donné semble pouvoir expliquer ces résultats. Pour de nombreux auteurs (Wallace 1968; Mayr 1970, 1975; Dobzhansky 1970, Endler 1977) l'unité de sélection n'est pas le gène isolé mais le génome dans sa globalité et il existe de nombreuses interactions entre loci, notamment de nature épistatique. A une pression sélective donnée correspondent une ou quelques combinaisons géniques adaptées. Dans cette hypothèse, les individus d'une population ont une histoire sélective commune et vont présenter une proportion élevée de combinaisons géniques adaptées à leur environnement. Tout croisement entraînant la séparation des allèles co-adaptés entraînera une diminution de la valeur sélective et l'apparition d'une "outbreeding depression". Les individus de populations différentes ayant généralement subi des pressions sélectives divergentes, les croisements qui en

résulteront offriront une probabilité élevée de rupture des combinaisons géniques favorables (Shields 1982). Cette "outbreeding dépression" apparaît nettement entre populations toxiques et normales. Elle semble également présente, mais à un degré moindre, entre populations d'origines semblables (N1XN2). En effet, des croisements inter-populations mettent en jeu des individus génétiquement plus éloignés que des croisements intra-populations. Price et Waser (1979) ont montré que l'outbreeding depression apparaît même à l'intérieur des populations: dans un environnement donné, il existe une distance de croisement optimale au delà et en deça de laquelle apparaît une diminution de la valeur sélective.

L'hypothèse émise pour expliquer la présence de barrières de stérilité postule l'existence d'une diminution de la valeur sélective résultant de la dissociation des combinaisons géniques favorables au cours de la reproduction sexuée. Il s'agit donc d'une barrière de type post-zygotique. Or, on constate que les taux de germination pollinique reflètent étroitement les taux de fertilité. Ces derniers seraient donc la conséquence au moins partielle d'un contrôle pré-zygotique et non directement de la diminution de la "fitness". Ces résultats s'accordent très bien avec les prédictions de Shields (1982). D'après lui, l'isolement post-zygotique dû à l'outbreeding depression est une force sélective suffisamment forte pour provoquer l'apparition de mécanismes d'isolement pré-zygotiques. Ceux-ci vont favoriser les croisements entre individus proches génétiquement et diminuer les coûts de l'outbreeding depression.

En quoi consistent ces mécanismes d'isolement pré-zygotique? Théoriquement, on s'attend à observer un arrêt de

la croissance des tubes polliniques lorsque le pollen et le style qui interagissent sont trop dissemblables génétiquement, entraînant un risque élevé de dissociation d'allèles co-adaptés. Comme les combinaisons de gènes co-adaptés vont varier d'un micro-environnement à l'autre, en fonction des forces sélectives, il peut exister une très large gamme de génomes co-adaptés et surtout, la co-adaptation n'impliquera même pas forcément les mêmes gènes. Il en résulte un nombre potentiel de croisements entre génomes différents quasi illimité. Dans ce contexte de diversité élevée, l'existence d'un "signal" de compatibilité associé aux gènes co-adaptés et indiquant "j'ai telle combinaison favorable à conserver, si vous n'avez pas la même, le croisement est impossible" semble peu probable. La compatibilité paraît plus vraisemblablement basée sur une complémentarité génomique globale et plus précisément sur l'expression métabolique qui en résultera; le tube pollinique se développera uniquement si les interactions entre le métabolisme du grain de pollen et celui du style sont positives.

Nos résultats peuvent-ils s'expliquer par cette hypothèse?

Les taux de germination pollinique ont montré 1) qu'il y a un effet femelle mais pas d'effet mâle

2) que les taux de germination entre croisements réciproques sont indépendants

3) que les barrières sont plus importantes dans le sens F toxique X M normal que dans le sens inverse.

L'effet femelle et l'absence d'effet mâle peuvent s'expliquer par la différence de niveau de ploïdie du style et du grain de pollen. Le style femelle étant à l'état tétraploïde, il sera

identique pour tous les croisements et aura un comportement homogène alors que les grains de pollen sont diploïdes. Etant issus de la méiose, ils ne sont pas forcément semblables, la tétraploïdie ne faisant qu'augmenter le nombre de combinaisons possibles. Les réponses à l'intérieur d'une famille mâle seront donc beaucoup plus diversifiées. De plus, la croissance des tubes polliniques dépend fortement du métabolisme de la femelle dont la spécificité peut apparaître à ce niveau.

L'absence de réciprocité entre croisements peut également faire appel à des arguments semblables. Encore une fois, les niveaux de ploïdie différents du style et du grain de pollen font que des croisements réciproques ne sont pas strictement comparables. De plus, les ensembles de gènes co-adaptés n'étant pas forcément les mêmes pour les deux parents, leurs implications au niveau du style et du grain de pollen ne sont pas toujours identiques.

Enfin, l'observation d'une outbreeding depression plus importante dans le sens TXN que NXT peut être reliée à une différence des pressions sélectives. Dans les milieux toxiques pollués par les métaux lourds et très souvent caractérisés par une sécheresse importante, il existe une pression sélective drastique et unidirectionnelle alors que dans les milieux moins perturbés, la sélection est plus diversifiée et varie fréquemment dans le temps et l'espace. Une sélection dirigée devrait favoriser l'apparition de génomes co-adaptés pour résister aux conditions particulières du milieu. Plus la co-adaptation sera importante, plus l'outbreeding depression sera marquée et par conséquent plus fortes seront les barrières pré-zygotiques. Le taux de germination pollinique plus faible pour les croisements

TYT que pour les croisements NXN pourrait résulter d'une co-adaptation plus importante dans la population toxique. Cette diminution révèle probablement l'existence d'une outbreeding depression intrapopulationnelle (Price et Maser 1979).

Il n'existe apparemment aucune analogie entre les mécanismes pré-zygotiques associés à l'outbreeding depression et l'autoincompatibilité gamétophytique fréquente chez les graminées. Cette dernière mettrait en jeu deux loci multialléliques (S et Z), la présence de deux allèles identiques chez le mâle et la femelle déterminant l'incompatibilité. L'incompatibilité apparaît donc pour une seule combinaison, lors de l'union de deux génomes semblables, deux loci servant de révélateur. Inversement, dans le cas de l'outbreeding depression, c'est l'union des génomes relativement semblables qui doit être favorisée et de multiples combinaisons trop différentes doivent être évitées (Heslop-Harrison 1982).

Ces différences bien marquées entre les deux types d'incompatibilité pourraient cependant n'être qu'apparentes. En effet, à une réponse phénotypique semblable (arrêt ou non de la croissance des tubes polliniques) correspond une cause initiale de même nature, à savoir l'échec ou la réussite de l'union de deux génomes et des activités métaboliques qui en découlent en fonction de leur complémentarité. Dans le cas de l'auto-incompatibilité, l'inbreeding depression à éviter résulterait essentiellement de l'expression d'allèles récessifs délétères apparaissant à l'état homozygote (génomes trop semblables). Dans le cas de barrières de stérilités entre individus différents, l'outbreeding depression proviendrait de la rupture de combinaisons géniques adaptées (génomes trop

différents).

Il ne serait pas exclu que le déterminisme génétique des deux types d'incompatibilité soit semblable. Les données de la littérature concernant le déterminisme de l'auto-incompatibilité sont loin d'être homogènes. Il existe des divergences quant au nombre de loci impliqués (Lawrence et al. 1983) et les mécanismes physiologiques sont également imparfaitement connus. Ces lacunes ont poussé certains chercheurs à émettre des hypothèses alternatives (voir Heslop-Harrison 1975 et Richard 1986). Mulcahy et Mulcahy (1983) ont notamment proposé un modèle d'auto-incompatibilité basé sur la complémentarité des génomes (voir également Lawrence et al. (1985) et Mulcahy et Mulcahy (1985)). Selon eux, l'incompatibilité est une expression pré-zygotique d'un fardeau génétique. Elle est causée par des interactions entre le style et le grain de pollen et déterminée par la somme des interactions génomiques. Lorsqu'il y a une hétérozygotie importante, il y a hétérosis et croissance rapide du tube pollinique. En cas d'autopollinisation, l'absence d'hétérosis entraîne une croissance nulle ou trop lente pour permettre la fécondation.

Ce modèle est fort proche de celui que nous proposons pour l'allo-incompatibilité. Seule, la cause première (génomes trop proches ou trop éloignés) diffère mais la conséquence (complémentarité ou non des génomes) qui va déterminer le niveau de compatibilité est semblable. Il existerait un continuum de compatibilité, fonction de la distance entre les génomes. A un extrême, se situerait l'auto-incompatibilité, ensuite apparaîtrait la dépression de consanguinité associée à des croisements entre apparentés puis un optimum au delà duquel une

outbreeding depression de plus en plus forte se marquerait.

En conclusion, les résultats expérimentaux ont montré l'existence de barrières d'incompatibilité, notamment lors de croisements entre individus appartenant à des populations différentes. Les barrières résultent vraisemblablement de la présence d'une outbreeding depression, cette dernière se marquant déjà au stade pré-zygotique. L'arrêt de la croissance des tubes polliniques étant un corollaire commun à l'inbreeding et l'outbreeding depression, nous proposons un modèle synthétique de l'incompatibilité. Cette hypothèse a pour base la compatibilité des génomes parentaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANTONOVICS, J., 1968. Evolution in closely adjacent plant population. V. Evolution of self-fertility. *Heredity*, 23, 213-238.
- CORNISH, M.A., HAYWARD, M.D. and M.J. LAWRENCE., 1979. Self-incompatibility in ryegrass. I. Genetic control in diploid Lolium perenne L. *Heredity*, 43, 1 : 95-106.
- DOBZHANSKY, T., 1970. Genetics of the evolutionary process. Columbia Univ. Press, New-York.
- DUCOUSSO, A., LOUTFI, A., PETIT, D., ACHEROY, M., VALERO, M. et Ph. VERNET., 1986. Structure genetique et régime de la reproduction chez Arrhenatherum elatius L. Actes du Colloque, Biologie des Populations. Lyon, 1986.
- ENDLER, J.A., 1977. Geographic variation, speciation and clines. Princeton Univ. Press, New-York.
- HESLOP-HARRISON, J., 1975. Incompatibility and the pollen-stigma interaction. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26 : 403-25.
- HESLOP-HARRISON, J., 1982. Pollen-Stigma interaction and cross-incompatibility in the Grasses. *Science*, 215 : 1358-1364.
- LAWRENCE, M.J., FEARON, C.H., CORNISH, M.A. and D. HAYWARD., 1983. The genetical control of self-incompatibility in ryegrasses. *Heredity*, 51, 2 : 461-466.
- LAWRENCE, M.J., MARSHALL, D.F., CURTIS, V.E. and C.H. FEARON., 1985. Gametophytic self-incompatibility re-examined : a reply. *Heredity*, 54 : 131-138.
- LUNDQVIST, A., 1961. A rapid method for the analysis of incompatibility in grasses. *Hereditas*, 47 : 705-707.
- MARTIN, F.W., 1959. staining and deservng pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology*, 34 : 125-128.
- MAYR, E., 1970. Populations, species and evolution. Belknops Press of Harvard Univ. Press, Cambridge.
- MAYR, E., 1975. The unity of genotype. *Biol. Zbl.* 94 : 377-388.
- Mc NAIR, N.K. and P. CHRISTIE., 1983. Reproductive isolation as a pleiotropic effect of copper tolerance in Mimulus guttatus. *Heredity*, 50, 3 : 295-302.
- Mc NEILLY, T. and J. ANTONOVICS., 1968. Evolution in closely adjacent plant populations. IV. Barriers to gene flow. *Heredity*, 23 : 205-218.

- MULCAHY D. L. and G. B. MULCAHY., 1983. Gametophytic Self-incompatibility reexamined. *Science*, 220 : 1247-1251.
- MULCAHY D. L. and G. B. MULCAHY., 1985. Gametophytic self-incompatibility or the more things change. *Heredity*, 54 : 139-144.
- PRICE, M. V. and N. M. WASER., 1979. Pollen dispersed and optimal outcrossing in Delphinium nelsoni. *Nature*, 277 : 294-297.
- RICHARDS, A. J., 1986. Plant breeding systems. George Allen and Univ. London.
- SHIELDS, W. M., 1982. Philopatry, inbreeding and the evolution of sex. State University of New-York Press, N. Y.
- SOKAL, R. R. and F. J. ROHLF., 1981. Biometry 2nd ed., W. H. Freeman, San Francisco.
- SULINOWSKI, S., 1965. Variation of forms and biology of flowering in Arrhenatherum elatius (L.) P. B. Part. II. Effects of self- and cross-pollination on seed setting in Arrhenatherum elatius. *Genetica polonica*, vol. 6, n°3-4
- WALLACE, B., 1968. Topics in population genetics. W. H. Norton, New-York.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Cette étude de la variabilité du régime de reproduction chez Arrhenatherum elatius a nécessité une recherche préalable de marqueurs génétiques fiables. Après une première phase de prospection de la variabilité enzymatique chez cette espèce, à l'aide des techniques électrophorétiques, une seconde étape a consisté, par des croisements contrôlés, à établir le déterminisme génétique des variants enzymatiques observés.

C'est ainsi que trois systèmes enzymatiques polymorphes ont été définis avec précision dans nos populations :

- le système GOT codé par deux loci avec au total 12 allèles ;
- le système ADH codé par un locus avec 5 allèles;
- le système PGI codé par un locus avec 2 allèles.

Ces enzymes sont toutes dimériques. D'autre part, l'étude des descendance montre :

- une ségrégation chromosomique des différents allèles, le phénomène de réduction chromatidique propre aux tétraploïdes n'a pas été observé, ce qui laisse supposer la proximité de ces loci et du centromère ;

- une indépendance de GOT1 et ADH et probablement de GOT1 et PGI, ce qui permettrait de situer ces loci distants les uns des autres.

La réalisation d'autopollinisation en situation contrôlée, d'individus de populations de milieu normal et de milieu toxique (dense et clairsemé) a permis de répondre à la question posée par

DUCOUSSO (1985) : l'autogamie intervient-elle dans la corrélation positive observée entre le déficit d'hétérozygotes et la densité des populations d'Arrhenatherum elatius ?

Une augmentation de l'autofertilité moyenne a en effet été mise en évidence. Mais celle-ci ne se manifeste uniquement que dans les populations de milieu toxique et quelque soit la densité des individus. La seconde hypothèse avancée par cet auteur paraît donc la plus probable : en population dense le voisinage est très réduit, les pollinisations se réalisent entre individus apparentés et au fil des générations une consanguinité apparaît. L'étude de la structure génétique de nos populations normales, qui sont denses mais vraisemblablement récentes, ne montre pas de forts déficits en hétérozygotes. Ceci permet de donner toute l'importance au facteur ancienneté des populations dans l'expression de ce phénomène.

A l'intérieur de la population du milieu toxique, certains individus présentent des taux d'autofertilité élevés (T2), d'autres des taux d'autofertilité faibles (T1) et comparables à ceux des individus des milieux normaux. Le régime de la reproduction des populations de milieu toxique se présente donc comme un élément supplémentaire de la variabilité déjà notée pour de nombreux traits des individus colonisant ces milieux (DUCOUSSO, 1985). Contrairement aux observations faites par ANTONOVICS (1968), cette augmentation d'autofertilité n'est pas limitée aux seuls individus situés aux limites des zones toxiques et normales, mais intéresse des individus répartis sur l'ensemble du site. Les individus étudiés dans la zone toxique ont été récoltés au centre du secteur toxique de la région d'Auby. Le processus d'apparition de cette autogamie sous la dépendance d'un

flux génique important depuis les zones non toxiques (CAISSE et ANTONOVICS 1978) n'est probablement pas le seul en cause ici. La comparaison de la descendance issue d'autofécondations ou de pollinisations libres ne montre, en première génération d'autofécondation, aucune dépression de consanguinité quelque soit l'origine de la population.

D'autre part, les croisements effectués entre plantes de milieux contrastés montrent clairement l'existence d'une "outbreeding depression". De plus, l'étude de l'aptitude à la germination du pollen disposé directement sur les stigmates d'une plante d'une autre origine met en évidence l'existence d'un contrôle pré-zygotique net de cet effet d'"outbreeding depression". Si l'on ajoute à ces observations le fait que l'Arrhenatherum elatius est tétraploïde, les conditions semblent réunies pour que les populations de cette espèce évoluent vers l'autogamie. Cependant cette tendance ne s'observe que dans les milieux toxiques ; la diminution de l'autofertilité moyenne notée d'une génération à la suivante est également limitative.

Se pose ici la question du devenir des populations de milieu toxique : vont-elles évoluer vers une d'autogamie plus complète ou le polymorphisme observé va-t-il atteindre un état d'équilibre?

Aussi ce travail demande un suivi plus prolongé des descendants issus d'autofécondation afin d'estimer l'héritabilité de l'autofertilité et une éventuelle dépression de consanguinité qui pourrait apparaître plus tardivement.

Le fait que les individus autofertiles ne se rencontrent qu'en milieu toxique, pose la question de la corrélation entre cette aptitude à l'autofertilité et la tolérance des plantes vis à vis

les conditions de milieu.

Nous avons vu aussi que les issus d'autofécondation sont plus tardifs, existe-t-il un lien entre les différents traits polymorphes des populations de milieu toxique et en particulier entre les différents moyens permettant un isolement reproductif (décalage phénologique, autofertilité, incompatibilité)?

Arrhenatherum elatius, fondamentalement allogame se révèle donc posséder des potentialités importantes d'évoluer vers l'autogamie, sans que celle-ci soit immédiatement contre sélectionnée. Aussi cette espèce est capable d'allier dans des populations très proches les avantages de l'allogamie (créatrice de combinaisons génétiques nouvelles) à ceux de l'autogamie (conservatrice des combinaisons génétiques favorables). Le modèle Arrhenatherum elatius est donc particulièrement intéressant pour l'étude fondamentale de l'évolution du régime de la reproduction chez les végétaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANTONOVICS, J., 1968. Evolution in closely adjacent plant population. V. Evolution of Self fertility. *Heredity*, 23, 219-228.
- CAISSE, M., ANTONOVICS, J., 1978. Evolution in closely adjacent plant population. IX. Evolution of reproductive isolation in clinal populations. *Heredity*, 40, 371-384.
- DUCOUSSO, A., 1985. Comparaison de populations adjacentes d'Arrhenatherum elatius sur des sols normaux et toxiques. Analyse de la diversité génétique et du régime de la reproduction. Thèse d'Université U. S. T. Lille, 98p.

A N N E X E S

A N N E X E 1

Trois types de configurations sont observées (fig. 1) au cours de la méiose (DEMARLY, 1963).

Type I : méiose réductionnelle

Il n'y a pas de recombinaison. Les allèles homologues des chromatides soeurs (c'est-à-dire issue de la duplication du même chromosome) montent au même pôle d'anaphase I et se séparent en anaphase II. Les gamètes renferment donc des chromatides non soeurs.

Type II : méiose équationnelle

Il existe au moins un crossing-over. Les chromatides soeurs sont alors liées à deux centromères différents mais ceux-ci se dirigent vers deux pôles différents lors de l'anaphase I. Les gamètes sont donc formés par des chromatides non soeurs.

Type III : méiose pseudoéquationnelle

Il existe au moins un crossing-over et au cours de l'ascension, en anaphase I, les centromères portant des chromatides soeurs montent au même pôle. Les gamètes ont donc une probabilité 1/2 d'être homogènes, c'est-à-dire de contenir les deux chromatides soeurs. Ceci entraîne un taux de consanguinité non nul même si la population est panmictique.

α étant l'indice de séparation qui représente la fréquence des anaphases de la première division où les chromatides soeurs remaniées se retrouvent au même pôle.

$\alpha = 2qes$

avec :

- q: probabilité de formation de tétravalents
- e: probabilité d'avoir une 1ère division équationnelle (6/7)
- a: probabilité de non disjonction, pour une ségrégation au hasard (1/3)
- s: probabilité dans le cas d'une méiose pseudo-équationnelle d'avoir les chromatides soeurs dans un même gamète (1/2)

Dans le cas où des tétravalents sont effectivement formés (q=1), les valeurs de l'indice de séparation varient entre 0 et 2/7.

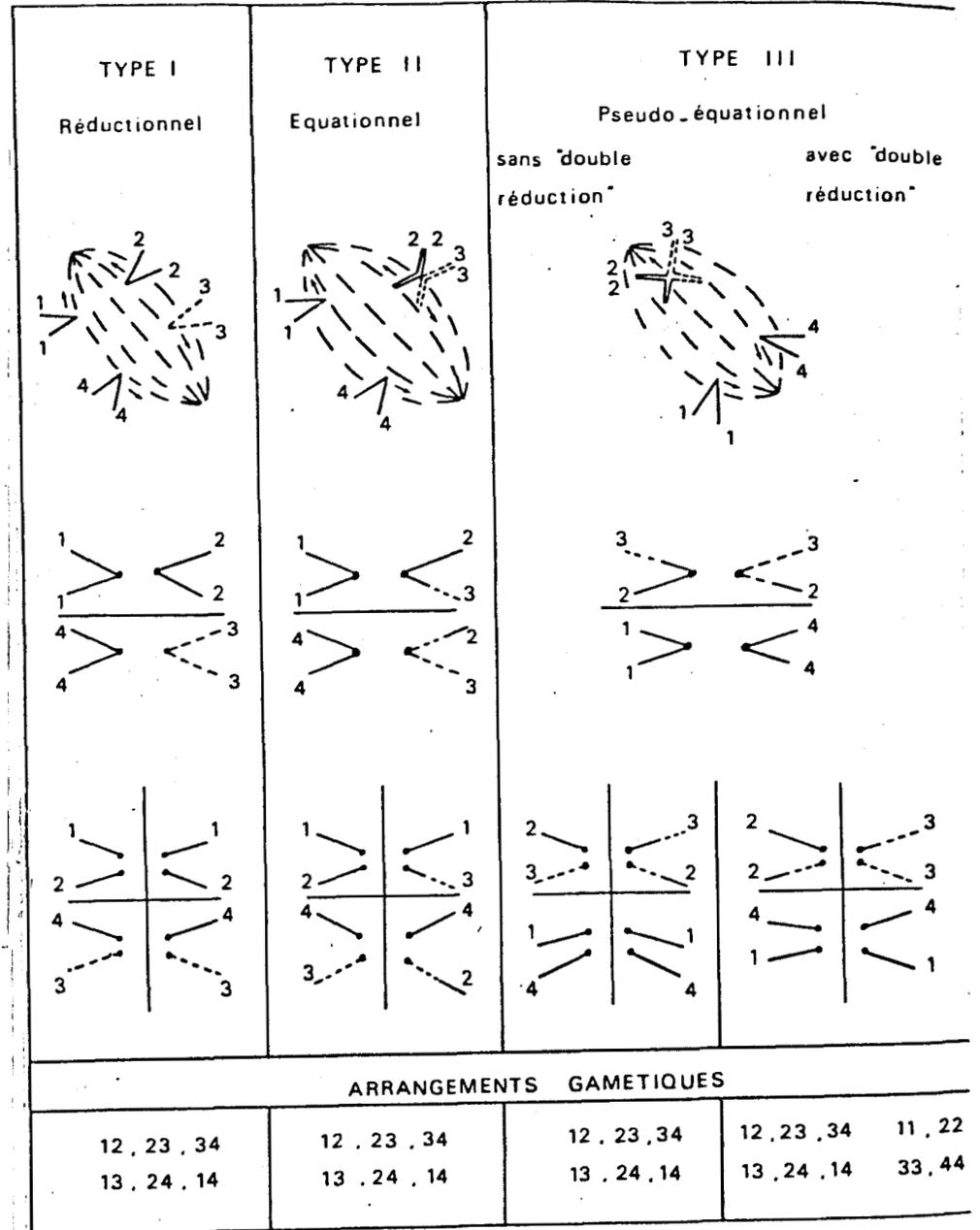


Figure 1 : Types de méiose et arrangements gamétiques correspondants chez les autotétraploïdes.

ANNEXE 2



Disjonctions gamétiques chez les autotétraploïdes à partir des 5 classes de génotypes parentaux pour des valeurs de α quelconques

Gamètes Génotypes parentaux	ab	bc	cd	ac	bd	ad	aa	bb	cc	dd
abcd	$\frac{2-\alpha}{12}$	$\frac{2-\alpha}{12}$	$\frac{2-\alpha}{12}$	$\frac{2-\alpha}{12}$	$\frac{2-\alpha}{12}$	$\frac{2-\alpha}{12}$	$\frac{\alpha}{8}$	$\frac{\alpha}{8}$	$\frac{\alpha}{8}$	$\frac{\alpha}{8}$
aabc	$\frac{2-\alpha}{6}$	$\frac{2-\alpha}{12}$	0	$\frac{2-\alpha}{6}$	0	0	$\frac{1+\alpha}{6}$	$\frac{\alpha}{8}$	$\frac{\alpha}{8}$	0
aabb	$\frac{2-\alpha}{3}$	0	0	0	0	0	$\frac{1+\alpha}{6}$	$\frac{1+\alpha}{6}$	0	0
aaab	$\frac{2-\alpha}{4}$	0	0	0	0	0	$\frac{2+\alpha}{4}$	$\frac{\alpha}{8}$	0	0
aaaa	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

ANNEXE 3

Tampon d'extraction Tris. HCl pH 7,6

- 0,68 g Tris
- 500 mg de polyéthylène glycol
- 50 ml H₂O désionisée
ajustée à pH 7,6 par de l'HCl fumant.

Tampon de migration pour gel de polyacrylamide

- glycine 144 g
 - Tris 30 g
 - H₂O bip. 1 l
pH 8,3 à 8,7
- On dilue 100 ml dans 3,5 l d'eau.

Tampon Tris HCl pH 8

- 24,2 g Tris
- 1 l eau bipermutée
pH 8 avec HCl concentré

Préparation du gel de polyacrylamide

Solution A	Tris 36,6 g Temed 0,4 ml HCl 1N 48 ml H ₂ O bidistillée qsp 100 ml pH 8,9
Solution B	Tris 5,98 g Temed 0,5 ml HCl 1N 48 ml H ₂ O bidistillée qsp 100 ml pH 6,7
Solution C	Acrylamide 40 g bis-acrylamide 0,735 g H ₂ O bidistillée qsp 100 ml
Solution D	Acrylamide 10 g bis-acrylamide 2,5 g H ₂ O bidistillée qsp 100 ml
Solution E	Riboflavine 4 mg H ₂ O bidistillée qsp 100 ml
Solution F	Saccharose 40 g H ₂ O bidistillée qsp 100 ml
Solution PS	Persulfate d'ammonium 92,5 g H ₂ O bidistillée qsp 100 ml

Toutes les solutions sont stockées à l'abri de la lumière à + 5°C. La solution PS se fait le jour-même. Le mélange pour la préparation des gels se fait au dernier moment.

Gel de séparation (gel fin) à 8% d'acrylamide

Solution A	6,5 ml
Solution C	11,7 ml
Solution PS	33,8 ml

Gel de concentration (gel large) à 2,5 % d'acrylamide

Solution B	1 ml
Solution D	2 ml
Solution E	1 ml
Solution F	4 ml

Gel de paroi à 8 % d'acrylamide

Solution A	1,25 ml
Solution C	2,25 ml

TECHNIQUES DE RÉVÉLATION

G.O.T.

La tranche de gel est incubée pendant 10 mn à 38°C dans 50 ml de tampon Tris HCl pH 8 (annexe 1), contenant :

- 300 mg d'acide α -cétoglutarate
- 600 mg d'acide aspartique
- 0,20 mg de pyridoxal 5' phosphate

ajusté à pH 8.

Les bandes sont ensuite révélées par l'addition de 200 mg de Fast Blue BB dans 50 ml tampon Tris HCl pH 8 (24,2 g Tris ; 1 l d'eau bipermutée - pH 8 avec HCl concentré).

A D H

La tranche du gel est incubée pendant 30 mn à 38°C dans 50 ml de tampon Tris HCl pH 8 (24,2 g Tris ; 1 l H₂O bipermutée - pH 8 avec HCl concentré), contenant :

- 20 mg de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD)
- et 3 ml d'éthanol.

Une solution contenant 50 ml de tampon Tris HCl pH 8, additionnée de 10 mg de nitrobleu Tetrazolium (NBT) et 10 mg de MTT, est ajoutée.

L'ensemble est remis à incuber pendant 15 mn. Puis 5 mg de phénazine méthosulfate (PMS) sont dissous dans la solution et les bandes apparaissent alors rapidement.

PGI

La tranche de gel est incubée pendant quelque minutes à 38°C dans un tampon tris HCl pH:8 CONTENANT :

- 10 mg fructose 6-phosphate
- 10 mg NAD
- 0.3 ml de NADP (solution 1%)
- 1 ml MgCl₂ (solution 10%)
- 5 μ de solution glucose 6-phosphate
- 5 mg NBT
- 5 mg MTT
- 5 mg PMS

A N N E X E 5

Combinaisons parentales possibles	Combinaisons gamétiques de I	Probabilités		
		r quelconque	r = 0	r = 1/2 ou loci sur chr. différents
<div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="margin-bottom: 20px;"> <p>I</p> </div> <div style="margin-bottom: 20px;"> <p>I'</p> </div> </div>		1/3	1/3	1/3
		1/3	1/3	1/3
		$\frac{1-r}{6}$	1/6	1/12
		$\frac{1-r}{6}$	1/6	1/12
		$\frac{r}{6}$	0	1/12
		$\frac{r}{6}$	0	1/12



Combinaisons gamétiques obtenues pour 2 loci à partir d'un génotype parental I digénique duplex/digénique simple (1a 1a 2a 1b/ 2a 2a 2b 2b) et probabilités d'obtenir ces combinaisons pour plusieurs valeurs de r (probabilité de recombinaison). P indique les combinaisons parentales et R les recombinées.



I' est l'autre combinaison parentale possible.



Combinaisons parentales possibles		Combinaisons gamétiques									
I ou II 	quelconque	$\frac{(1-r)^2+r^2+1}{3}$	$\frac{r(1-r)}{3}$	$\frac{r(1-r)}{3}$	$\frac{r(1-r)}{3}$	$\frac{r(1-r)}{3}$	$\frac{(1-r)^2}{6}$	$\frac{(1-r)^2}{6}$	$\frac{r^2}{6}$	$\frac{r^2}{6}$	
	$r=0$	4/6	0	0	0	0	1/6	1/6	0	0	0
	$r=1/2$	12/24	2/24	2/24	2/24	2/24	1/24	1/24	1/24	1/24	1/24
I ou II 	quelconque	$\frac{1+r-r^2}{3}$	$\frac{1-r+r^2}{6}$	$\frac{1-r+r^2}{6}$	$\frac{1-r+r^2}{6}$	$\frac{1-r+r^2}{6}$	$\frac{r(1-r)}{12}$	$\frac{r(1-r)}{12}$	$\frac{r(1-r)}{12}$	$\frac{r(1-r)}{12}$	
	$r=0$	2/6	1/6	1/6	1/6	1/6	0	0	0	0	0
	$r=1/2$	20/48	6/48	6/48	6/48	6/48	1/48	1/48	1/48	1/48	1/48
Loci sur chromosomes différents		16/36	4/36	4/36	4/36	4/36	1/36	1/36	1/36	1/36	1/36

Combinaisons gamétiques obtenues pour 2 loci à partir d'un génotype parental digénique duplex double (1a 1b 1h/ 2a 2a 2h 2h) et probabilités d'obtenir ces combinaisons pour plusieurs valeurs de r (probabilité de recombinaison).

locus 1 allèles \circ a \bullet b
 locus 2 allèles \square a \blacksquare b

ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES DESCENDANTS DE CROISEMENT
DE PLANTES DE MILIEU TOXIQUE

A l'aide de marqueurs enzymatiques (GOT1, GOT2, ADH et PGI), l'analyse de la descendance de certains croisements permet d'identifier de manière sûre les descendants issus d'autofécondation ou d'allofécondation.

A partir de ces individus identifiés de manière certaine les pourcentages d'individus issus d'autofécondation ou d'allofécondation sont calculés pour chaque descendance de même plante. Ces pourcentages sont présentés (tableau 1, figure 1) suivant les fertilités obtenues en autofécondation et en croisement.

Ces résultats montrent que les individus qui ne s'autofécondent pas ou très peu ne présentent pas dans leurs descendance des issus d'autofécondation. Par contre les individus qui s'autofécondent présentent dans leurs descendance en croisement des individus issus d'autofécondation

Ceci confirme donc que le groupe d'individus appelé T1 est constitué de plantes essentiellement allogames et les individus du groupe appelé T2 (chapitre III) de plantes autogames.

Des plantes de milieu toxique ont également été croisées avec des plantes de milieu normal. L'analyse électrophorétique de leur descendance montre un résultat similaire à celui observé dans le cas du croisement entre les plantes toxiques (tableau 2, figure 2).

Tableau 1 : Fertilités en autofécondation, en croisement des plantes de milieu toxique et taux d'individus issus d'autofécondation et d'allofécondation identifiés par des marqueurs enzymatiques

N° Fig.	FERTLITE		TAUX D'INDIVIDUS	
	autof.	croisement	autofécondation	allofécondation
1	5.21%	67.74%	0%	85.00%
2	5.71%	50.84%	0%	38.77%
3	1.30%	42.24%	0%	57.14%
4	3.54%	28.57%	0%	54.45%
5	1.96%	24.00%	0%	76.47%
6	0%	22.70%	0%	48.87%
7	0%	18.57%	0%	36.36%
8	0%	17.89%	0%	28.57%
9	2.50%	17.50%	0%	100%
10	4.17%	15.26%	0%	55.55%
11	0%	15.74%	0%	53.84%
12	0%	12.80%	0%	30.00%
13	0%	8.27%	0%	100%
	0%	8.33%	0%	80.00%
14	11.51%	18.51%	11.11%	0%
15	12.31%	6.08%	0%	85.71%
16	15.38%	15.62%	10.00%	20.00%
17	17.30%	15.70%	10.00%	10.00%
18	20.45%	17.30%	11.11%	0%
19	24.66%	16.14%	14.28%	0%
20	46.77%	54.68%	14.81%	11.11%



CROISEMENT TXT

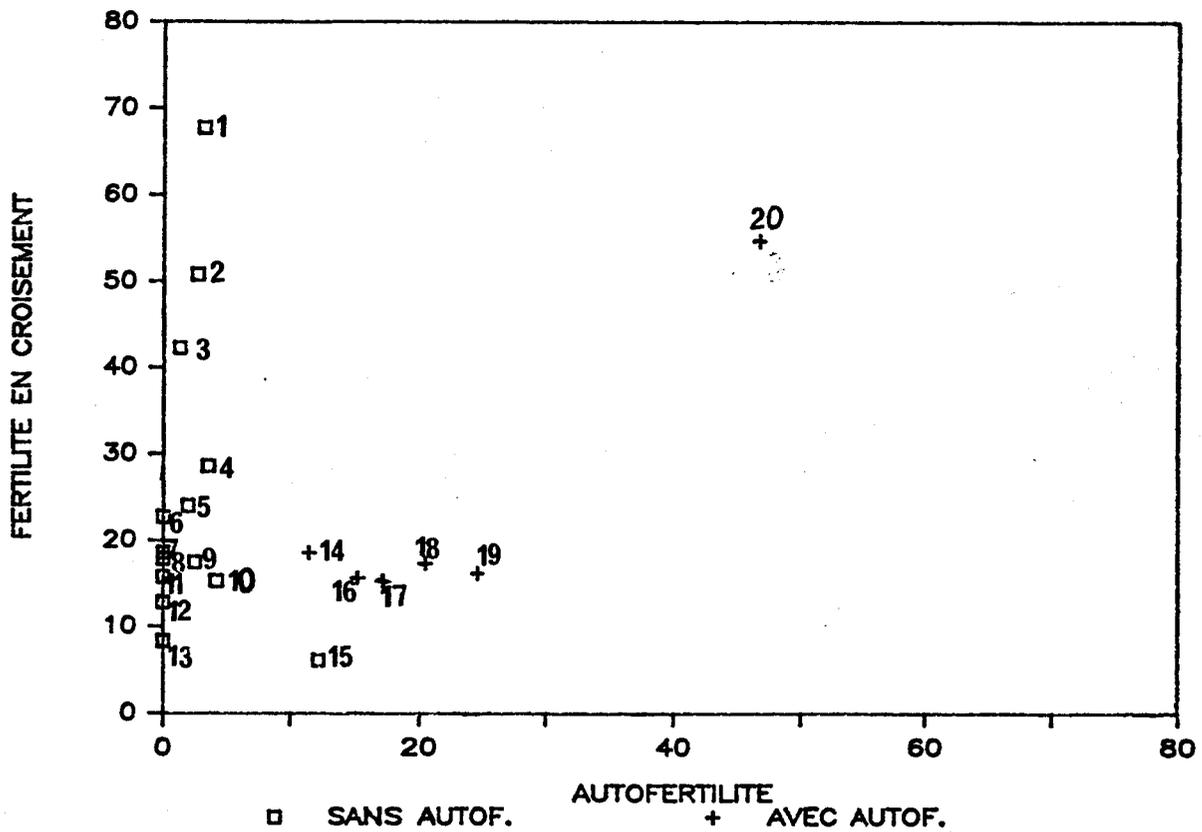


Figure 1 : Fertilité en autofécondation et en croisement chez des plantes de milieux toxiques.



Tableau 2 : Fertilités en autofécondation, en croisement des plantes T (croisées avec celles de milieu normal) et les taux d'individus issus d'autofécondation identifiés par des marqueurs enzymatiques

N° Fig.	FERTILITE		TAUX D'INDIVIDUS	
	autofecon.	croisement	autofécondation	allofécondation
1	11.11%	43.33%	0%	38.46%
2	24.00%	43.75%	0%	14.28%
3	0%	32.00%	0%	100%
4	7.87%	28.80%	9.37%	28.12%
5	1.00%	15.55%	0%	42.85%
6	0%	5.53%	0%	46.15%
7	20.00%	23.30%	7.69%	7.69%
8	23.52%	23.68%	11.11%	11.11%
9	42.85%	10.00%	20.00%	0%



CROISEMENT NXT

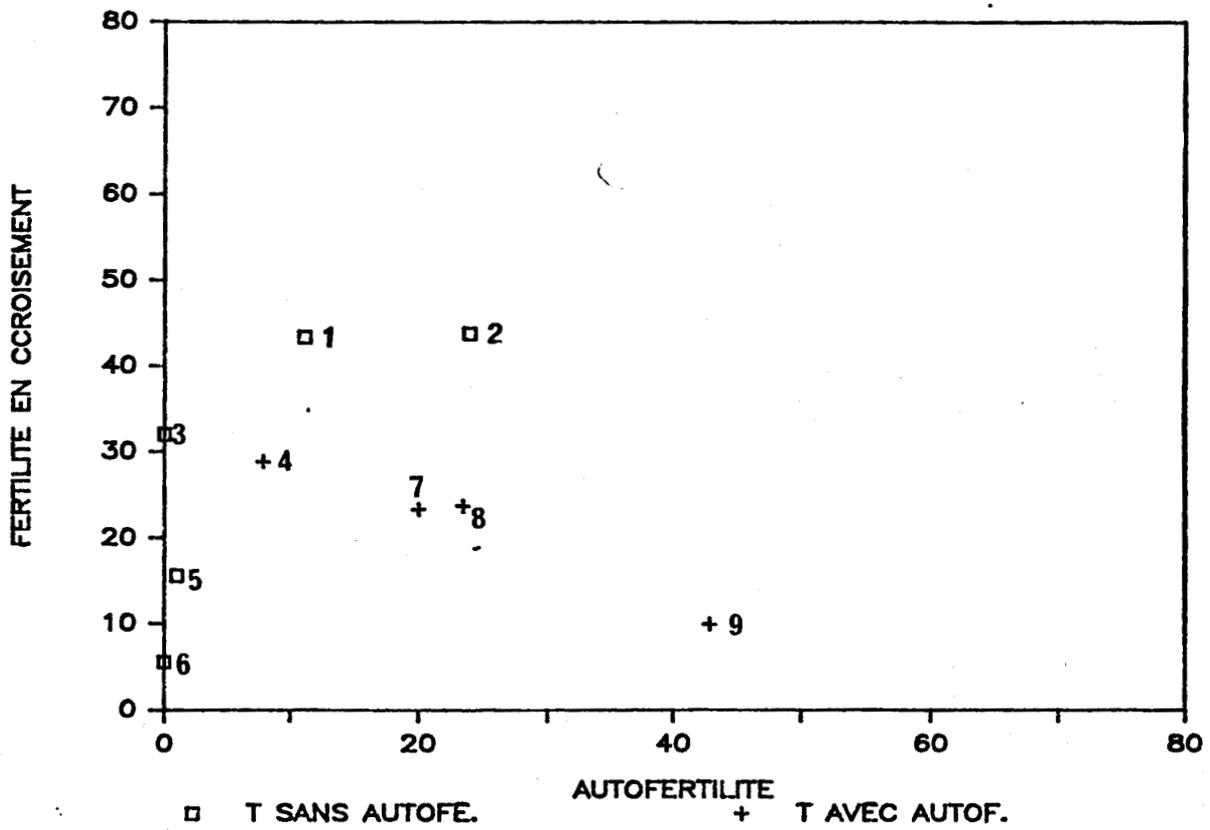


Figure 2 : Fertilité en autofécondation et en croisement chez des plantes de milieux toxiques.