

SECTION E

**Autres aspects récents des recherches en
biotechnologies**

Communications orales E1 à E6

E1 : Amélioration de la teneur en acides aminés essentiels par manipulation génétique de leur biosynthèse

FRANKARD V., VAUTERIN M., JACOBS M.

Laboratoire de Génétique des Plantes, Vrije Universiteit Brussel, Paardenstraat 65, B-1640 Sint-Genesius Rode, Belgique. ☎ 32.2.359 0302, fax 32.2.359 0399,
✉ vfrankar@vub.ac.be.

INTRODUCTION

En considérant la valeur nutritive des plantes, les acides aminés essentiels lysine et thréonine sont sous-représentés chez les céréales (contenu total en lysine de 1,5 à 4,5 %, alors que l'OMS recommande 5,5 % ; contenu total en thréonine de 2,7 à 3,9 %, alors que l'OMS recommande 4,0 %), alors que la méthionine et la cystéine sont déficientes chez les légumineuses (contenu total en méthionine et cystéine de 1 à 2 %, alors que l'OMS recommande 3,5 %). Les rations alimentaires destinées aux animaux monogastriques sont donc complémentées pour combler ces déficiences. Une des voies de l'amélioration de la valeur nutritive des plantes cultivées consiste à manipuler génétiquement la biosynthèse de ces acides aminés en vue d'augmenter leurs teneurs respectives.

RÉGULATION BIOCHIMIQUE DE LA BIOSYNTHÈSE DE LYSINE ET DE THRÉONINE

Chez les plantes supérieures, la biosynthèse de l'aspartate, duquel sont dérivés la lysine, la thréonine, l'isoleucine et la méthionine, est régulée par plusieurs boucles de rétro-inhibition (Bryan, 1990). L'activité de l'aspartate kinase (AK), première enzyme de cette voie et nécessaire à la synthèse de tous ces acides aminés, est rétro-inhibée par la lysine et la thréonine. La présence de plusieurs isozymes sensibles à des effecteurs différents a pu être mise en évidence. En outre la lysine rétro-inhibe sévèrement (Ki entre 5 et 20 μ M) l'activité de la dihydrodipicolinate synthase (DHDPS), première enzyme propre à sa branche biosynthèse.

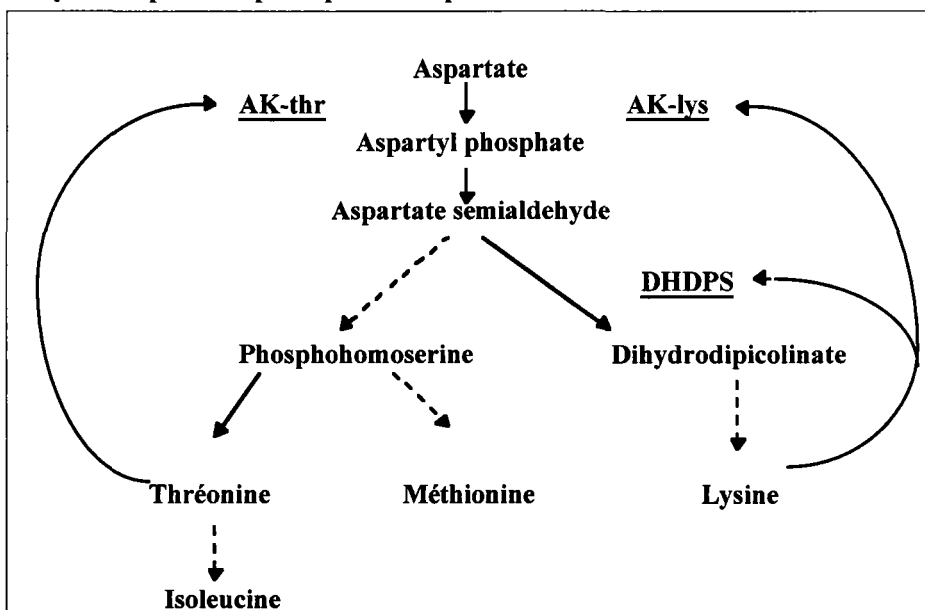
MUTANTS SURPRODUCTEURS D'ACIDES AMINÉS LIBRES

Chez différentes espèces, un certain nombre de mutants accumulant de la lysine ou de la thréonine dans la fraction libre des acides aminés ont pu être isolés après une sélection basée sur la présence d'analogues d'acides aminés ou de combinaisons toxiques d'acides aminés dans le milieu de culture. Alors que l'accumulation de thréonine libre est détectée dans tous les tissus analysés, et en particulier dans les graines, l'augmentation du contenu en lysine libre ne se présente que dans les feuilles et les cals. De plus, un phénotype aberrant caractérisé par une réduction extrême de la surface foliaire, une absence d'élongation et une stérilité complète, est corrélé à la présence d'importantes quantités de lysine libre (25 % et au-delà) (Frankard *et al.* 1992). Chez le tabac, un catabolisme rapide semble être à l'origine de l'absence de lysine libre dans les graines. L'accumulation de ces deux acides aminés au niveau

foliaire est en outre dépendante du stade de développement de la plante, avec un maximum lors de l'élongation de la tige.

La caractérisation biochimique de ces mutants a mis en évidence une dérégulation au niveau de deux enzymes-clés normalement rétro-inhibées par ces acides aminés : la DHDPS chez le mutant surproducteur de lysine, et l'AK lysine-sensible chez le mutant surproducteur de thréonine. Le clonage et la caractérisation des gènes codant pour ces enzymes ont permis de mieux comprendre la biosynthèse de ces acides aminés et sa régulation.

Figure 1. Diagramme simplifié de la famille biosynthétique de l'aspartate. Les enzymes et produits principaux sont présentés.



CLONAGE ET CARACTÉRISATION DU GÈNE CODANT POUR DHDPS

Chez le mutant surproducteur de lysine (RAEC-1 chez *Nicotiana glauca*), le gène codant pour la DHDPS complètement désensibilisée au rétrocontrôle strict normalement exercé par lysine, a pu être isolé par hybridation hétérologue. La mutation a pu être identifiée : il s'agit d'une substitution de deux nucléotides changeant une asparagine en isoleucine dans une région très conservée de la protéine (Ghislain *et al.* 1995). Des construits chimères impliquant ce gène sous le contrôle d'un promoteur fort d'une part, et d'un promoteur spécifique aux graines d'autre part, ont été transférées via *Agrobacterium* respectivement dans le tabac et le colza. Les tabacs transgéniques exprimant le gène *dhdps-r1* de façon constitutive reproduisent le phénotype aberrant décrit chez le mutant surproducteur, et associé à une forte surproduction de lysine. Le colza transgénique ne présente aucune différence avec le type sauvage, en particulier au niveau de la production de graines. L'analyse du contenu en acides aminés chez ces graines permettra d'évaluer l'impact de l'accumulation de lysine libre sur le contenu total. Un certain nombre de plantes parmi lesquelles *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana sp.*, *Hordeum vulgare* et le soja, ont pu être transformées par le gène *dapA* de *E. coli*, naturellement beaucoup moins sensible au

rétrocontrôle exercé par la lysine. Une certaine variation dans l'accumulation de lysine, en particulier dans les graines, a pu être montrée, essentiellement liée au catabolisme plus ou moins actif de cet acide aminé.

D'autre part, le promoteur de *dhdps* chez *Arabidopsis thaliana* a été isolé (Vauterin et al, 1994) et fusionné avec le gène rapporteur GUS, et transféré dans le tabac et dans *A. thaliana*. La détection colorimétrique de cette activité enzymatique chez ces plantes transgéniques a permis d'identifier les tissus exprimant ce gène, en particulier:

- les tissus conducteurs, impliquant un transport de la lysine dans la plante ;
- les méristèmes apicaux (foliaires et racinaires), suggérant la nécessité de produire de la lysine pour la synthèse protéique au sein de tissus à développement rapide ;
- certains tissus floraux, tels que les grains de pollen, les graines immatures, et l'embryon (mais pas l'albumen) des graines matures.

Outre cette régulation liée au développement de la plante, une régulation environnementale liée au régime de lumière a pu être mise en évidence. Ceci peut être corrélé au fait que la voie de biosynthèse dérivée de l'aspartate est presque dans sa totalité localisée dans le chloroplaste. Ainsi, des plantules de *Nicotiana* germées à l'obscurité présentent une coloration GUS plus intense dans les cotylédons et nouvelle dans l'hypocotyle, par rapport à celles germées à la lumière. D'autre part, une illumination de 6 heures après une germination à l'obscurité suffit pour rétablir la coloration du contrôle. L'absence de photosynthèse à l'obscurité entraîne une diminution de sucrose et donc d'oxaloacétate disponible pour la biosynthèse d'aspartate dans les tissus photosynthétiques. L'expression du gène dans le phloème suggère un transport de la lysine qui y serait biosynthétisée, pour tenter de maintenir la synthèse protéique dans ces tissus.

L'expression fonctionnelle du gène *dhdps* sauvage d'*A. thaliana* dans une souche d'*E. coli* déficiente pour cette activité enzymatique a permis de réaliser des expériences de mutagenèse *in vitro*. Un certain nombre de mutations ponctuelles a pu être identifié, rendant la protéine insensible au rétrocontrôle par la lysine, mais réparti sur l'ensemble de la séquence codant pour la protéine mature. En effet, même si une proportion relative des mutations se trouve dans une partie très conservée de la protéine, des substitutions significatives se localisent aussi bien en amont qu'en aval de cette région.

CLONAGE ET CARACTÉRISATION DES GÈNES CODANT POUR AK

En ce qui concerne la deuxième enzyme clé, AK, plusieurs formes ont pu être identifiées sur base de l'effecteur rétro-inhibant leur activité enzymatique. Le gène codant pour une forme sensible au rétrocontrôle par la thréonine (*ak-hsdh*) a pu être isolé par hybridation hétérologue chez *A. thaliana* : la séquence correspondante d'acides aminés révèle la présence d'une seconde région correspondant à l'activité enzymatique homoserine deshydrogénase (HSDH), soit la troisième réaction du tronc commun. Il s'agit donc d'une protéine bifonctionnelle AK-HSDH présentant une activité AK côté NH₂ et une activité HSDH côté COOH (Ghislain *et al.* 1994). Cependant, la majeure partie de l'activité AK est sensible au rétrocontrôle par la lysine. Afin d'isoler le gène codant pour cette protéine, une approche RCP a été développée. Des amorces dégénérées correspondant à des régions conservées entre AK bactériennes sensibles à la lysine, ont été synthétisées. De la sorte, deux gènes (*ak-lys1* et *ak-lys2*) codant pour des AK monofonctionnelles ont pu être identifiés et caractérisés pour la première fois chez une plante supérieure, en l'occurrence

A. thaliana (Frankard *et al.* 1997, et Tang *et al.*, 1997). Ces deux gènes présentent environ 70 % d'identité au niveau des acides aminés déduits. Comme pour le gène *ak-hsdh*, un grand nombre de petits introns interrompent les deux séquences codantes : leur position est conservée entre celles-ci, mais pas leur taille ni leur séquence. La présence d'un transit peptide du côté NH₂ des deux protéines AK-Lys implique un ciblage chloroplastique pour toutes deux. La présence de deux protéines ayant la même fonction ne peut donc pas se justifier par leur localisation subcellulaire différente.

Afin de distinguer les rôles de ces deux AK-Lys, leurs promoteurs ont été fusionnés au gène rapporteur GUS. Le tabac et *A. thaliana* ont été transformés par ces deux construits, et l'essai colorimétrique a été pratiqué sur différents tissus des deux plantes. De façon générale, une certaine complémentarité dans l'expression des deux gènes a pu être déterminée, bien que l'expression de ceux-ci chez les deux plantes ne soit pas identique. Chez *A. thaliana*, *ak-lys2* est fortement exprimée dans l'ensemble de la plante (une à deux heures en présence du substrat, X-Gluc), depuis les feuilles cotylédonaire jusqu'aux organes floraux et aux racines. Dans l'ensemble l'expression reste malgré tout plus forte dans les tissus jeunes et dans les méristèmes, ce qui a déjà été rapporté pour l'expression de *dhcps*. Au niveau des organes floraux, l'expression reste limitée au niveau de l'enveloppe des anthères ainsi que du tapetum, et de la base du fruit. Cependant, les grains de pollen, les graines immatures et matures ne sont pas colorées, et la tige comme les racines, est colorée selon un gradient augmentant de la base à la pointe. L'expression de *ak-lys1* est beaucoup plus faible, et se retrouve essentiellement dans la tige selon un gradient inverse que *ak-lys2*, ainsi que dans les méristèmes racinaires et foliaires. Les grains de pollen sont colorés, de même que les graines immatures et matures. Chez *N. tabacum*, l'expression des deux gènes se retrouve principalement selon le même schéma dans les organes floraux, alors que le reste des tissus ne se colore pas. Au niveau de la fleur, *ak-lys1* s'exprime également fortement dans le stigmate et le tissu vasculaire central de l'ovaire, et plus faiblement dans la partie extrême de la corolle et dans le carpelle. En conclusion, le gène *ak-lys2* s'exprime globalement plus dans tous les tissus végétatifs, alors que *ak-lys1* semble plus impliqué dans la floraison proprement dite.

L'isolement et la caractérisation d'un certain nombre de mutants d'*A. thaliana* présentant une des isozymes d'AK moins sensible au rétrocontrôle exercé soit par la thréonine (mutant RL4, isozyme AK-HSDH), soit par la lysine (mutants RLT4 et RLT 40, une des AK-Lys), a permis d'établir l'accumulation généralisée (plus ou moins importante) de thréonine chez ceux-ci (Heremans and Jacobs, 1994 and 1995). La surproduction de thréonine se retrouve aussi dans les graines, sans conséquences apparentes pour la germination. L'identification de ces mutations au niveau nucléotidique est actuellement en cours, avec une priorité donnée à la séquence d'*ak-lys2*. Une fois cette mutation incorporée au cDNA correspondant, ce gène muté pourra être utilisé dans des construits chimères, en vue de moduler son expression, et donc l'accumulation de thréonine à des tissus spécifiques. Ces plantes transgéniques pourront être croisées avec celles exprimant le gène *dhcps* muté, ou alternativement retransformées avec ce gène via *Agrobacterium*. Ainsi une certaine flexibilité dans le niveau d'accumulation, le tissu cible et l'acide aminé choisi peuvent être envisagés. L'expression simultanée d'une protéine riche en lysine (et/ou thréonine) sera également envisagée, en vue de stabiliser et de rendre plus digestible l'acide aminé produit dans le tissu cible.

Une seconde application consiste en l'utilisation de ces gènes mutés en tant que marqueurs de sélection. En effet, en choisissant un promoteur à expression précoce, la

protéine mutée produite, DHDPS ou AK-Lys, permet de résister à la présence respectivement d'un analogue de la lysine (L-amino-ethyl-cystéine, ou AEC), ou de concentrations toxiques de lysine plus thréonine dans le milieu de culture. Une fois la sélection effectuée, le gène ne doit plus s'exprimer, et n'aura pas d'autres conséquences sur le développement de la plante transgénique. Il s'agit d'autre part de gènes plus adéquats que les gènes de résistance aux antibiotiques, dans la mesure où cette voie de biosynthèse n'existe pas chez l'homme et les animaux monogastriques, et qu'ils ne pourraient donc pas interférer en cas de transfert horizontal.

En conclusion, la disponibilité des gènes codant pour les enzymes DHDPS, AK-HSDH et AK-Lys insensibles au rétrocontrôle, permet la manipulation génétique de ces voies de biosynthèse en vue d'augmenter la teneur en acides aminés essentiels libres chez les plantes cultivées.

Remerciements

VF est titulaire d'une bourse post-doctorale du FWO-Vlaanderen (Fonds voor Wetenschappelijke Onderzoek).

Bibliographie

1. BRYAN J.K. (1990) Advances in the biochemistry of amino acids. In *The Biochemistry of Plants: Intermediary Nitrogen Metabolism*, Volume 16 (Miflin, B.J., and Lea P.J., eds.). New York : Academic Press, pp.161-195.
2. FRANKARD V., GHISLAIN M., JACOBS M. (1992). Two feedback insensitive enzymes of the aspartate pathway in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol* 99, 1285-93.
3. FRANKARD V., VAUTERIN M., JACOBS M. (1997) Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for a monofunctional aspartate kinase. *Plant Molec Biol*, 34: 233-242.
4. GHISLAIN M., FRANKARD V., VANDENBOSCHE D., MATTHEWS B.F., JACOBS M. (1994) Molecular analysis of the aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molec Biol* 24, 835-851.
5. GHISLAIN M., FRANKARD V., JACOBS M. (1995) A dinucleotide mutation in dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* leads to lysine overproduction. *Plant J* 8(5): 101-111.
6. HEREMANS B., JACOBS M. (1994) Selection of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh mutants resistant to aspartate-derived amino acids and analogues. *Plant Sci* 101, 151-162.
7. HEREMANS B., JACOBS M. (1995) Threonine accumulation in a mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. with an altered aspartate kinase. *J Plant Physiol* 146, 249-257.
8. TANG G., ZHU-SHIMONI J., AMIR R., BEN-TZVI ZCHORI I., GALILI G. (1997) Cloning and expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a monofunctional aspartate kinase homologous to the lysine-sensitive enzyme of *Escherichia coli*. *Plant Molec Biol*. 34: 287-294.
9. VAUTERIN M., JACOBS M. (1994) Isolation of a poplar and an *Arabidopsis thaliana* dihydrodipicolinate synthase cDNA clone. *Plant Molec Biol* 25:545-550.

E2 : Étude d'éléments de voies des MAP kinases impliquées dans l'embryogenèse précoce du colza

HAMAL A., LEPRINCE A.-S., JOUANNIC S., KREIS M., HENRY Y.

Laboratoire de Biologie du Développement des Plantes, IBP, ERS 569, UPS, 91405 Orsay

La mise en évidence et l'étude moléculaire de gènes contrôlant la morphogenèse constituent l'un des points centraux de la Biologie du Développement des Plantes. Chez les végétaux, des événements de morphogenèse se produisent tout au long de la vie de la plante, durant *le développement embryonnaire* avec la mise en place des premiers méristèmes, durant *le développement de la plante* pendant lequel les méristèmes vont fonctionner et lors du *développement du gamétophyte*.

Il est désormais clairement établi que la plupart des cellules végétales conservent une remarquable totipotence. Ainsi, que ce soit *in situ* en dehors de la reproduction sexuée, ou en culture *in vitro*, des cellules du sporophyte ou des cellules gamétophytiques peuvent être à l'origine d'une embryogenèse. Le développement embryonnaire à partir de microspores cultivées *in vitro* est dénommé *androgenèse*.

Chez les Eucaryotes, un grand nombre de gènes contrôlant le développement codent pour des facteurs de transcription ou des molécules jouant un rôle dans des cascades de signalisation. Les protéines kinases sont des éléments essentiels des diverses voies de communication impliquées notamment dans le développement. Les données actuelles indiquent que les éléments des cascades de signalisation ont été conservés en bloc durant l'évolution, en tant que « modules de signalisation ». De tels modules, constitués par les Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) permettent aux organismes de répondre à différents stimuli (hormone, stress...), en établissant un lien entre des récepteurs membranaires et des facteurs nucléaires de régulation de la transcription ou des effecteurs cytoplasmiques.

MATÉRIEL VÉGÉTAL

Le colza (*Brassica napus*) est un excellent modèle pour l'analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlant les événements associés au déclenchement et aux premières étapes de l'embryogenèse. En effet, chez cette espèce l'enclenchement du développement embryonnaire à partir de microspores est contrôlé par la simple action d'un stress thermique. Ainsi, alors que le passage à 17°C conduit à la production de pollen mûr trinuécléé, un traitement des microspores à 32°C durant 10 à 48 heures stoppe le développement gamétophytique et permet la réactivation des mitoses, avec la poursuite de cycles mitotiques dans les noyaux des microspores en phase G2 du cycle cellulaire et la réentrée dans le cycle cellulaire des noyaux végétatifs en phase G1 des grains de pollen. Ces mitoses sont suivies de différenciations cellulaires, d'une organogenèse et conduisent à la formation d'embryons. L'utilisation du colza est également justifiée à la fois par le rendement de la culture susceptible de produire dans de bonnes conditions de 20 à 30 embryons pour 100 microspores cultivées, et par la proximité des génomes d'*Arabidopsis* et de colza.

PROBLÉMATIQUE

Chez la Levure, les Mammifères, la Drosophile, *C. elegans*, le Xénope, différentes voies des MAP kinases ont été identifiées. Les éléments des voies des MAP kinases ont été très bien conservés durant l'évolution des Eucaryotes, en tant que modules de signalisation. Ces modules assurent la transduction de signaux, au travers d'une cascade de phosphorylations. Chaque MAP kinase est activée par phosphorylation par une kinase à double spécificité appelée MAP kinase kinase (MAP2K), qui est elle-même activée par une MAP3K, qui interagit soit avec une protéine G monomérique soit avec une MAP4K, elle-même activée par une protéine G hétérotrimérique ou monomérique. Ces cascades de phosphorylation se produisent en réponse à des stimuli variés résultant de la fécondation, de divers stress et d'autres signaux impliqués dans de nombreux processus jouant un rôle dans le développement (réponse aux agents mitogènes : facteurs de croissance, cytokinines). Les modules de signalisation ainsi activés participent à la survie cellulaire, la croissance et la différenciation.

Les données disponibles actuellement dans le règne végétal, montrent que des cascades de MAP kinases sont impliquées dans la réponse à l'éthylène, à l'auxine, à l'acide abscissique. De tels modules pourraient également participer à la réponse aux stress, à l'activation du cycle cellulaire et probablement à la différenciation et à l'embryogenèse. Il est donc envisageable, chez les végétaux, d'aborder l'étude du module des MAP kinases d'une part lors de la réponse au stress, d'autre part durant les premières divisions de la microspore, et enfin durant l'embryogenèse précoce. Notre expérimentation vise à tester l'hypothèse selon laquelle une ou des voies des MAP kinases sont impliquées dans ces mécanismes.

STRATÉGIE

Afin d'identifier des voies de signalisation faisant intervenir des voies des MAP kinases, nous nous sommes attachés, dans une première étape, à en rechercher les éléments clés. Chez les Eucaryotes, les éléments des cascade des MAP kinases sont codés par des membres de familles multigéniques. L'approche utilisée a consisté à identifier et caractériser chez *Arabidopsis* et le colza des ADNc ou des gènes codant pour des éléments de voies des MAP kinases, afin d'étudier les modulations de leur expression au cours du développement végétatif et floral de la plante, ainsi que durant les différentes étapes de l'embryogenèse. Nous avons utilisé deux stratégies complémentaires pour identifier ces ADNc :

- la première repose sur l'utilisation des ADNc étiquetés ou EST (Expressed Sequence Tags) disponibles chez *Arabidopsis* ou le riz notamment ;
- la seconde est basée sur l'utilisation comme sondes d'amplifiats PCR obtenus à l'aide d'oligonucléotides dégénérés reconnaissant des motifs hautement conservés des sous-domaines VI et VIII de ce type de protéines sérine/thréonine kinases d'autres eucaryotes.

Nous disposons au laboratoire, de plusieurs banques d'ADNc susceptibles de présenter un intérêt pour notre thématique. Il s'agit de deux banques d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana*, l'une de jeunes plantes et l'autre de pollen, et une banque d'ADNc de colza, réalisée à partir d'embryons androgénétiques aux stades globulaire et cordiforme.

RÉSULTATS

Le travail de criblage et d'analyse des EST nous a permis de caractériser un grand nombre d'ADNc différents, codant de potentielles MAP2K, MAP3K et MAP4K.

Les amplifiats PCR nous ont permis d'obtenir un ADNc complet de colza, bnMAP3K ϵ , de 4500 paires de bases, codant pour un homologue potentiel du gène *CDC7* de *S. pombe*, impliqué dans la cytokinèse, ainsi que trois ADNc MAP3K α , un d'*Arabidopsis* et deux (orthologues) de colza. Une première donnée d'hybridation *in situ* indique que le gène MAP3K ϵ est exprimé au stade cœur durant l'embryogenèse zygotique d'*Arabidopsis*.

La seconde stratégie de clonage a tiré bénéfice des très nombreuses EST disponibles, qui nous ont permis d'isoler une quinzaine d'ADNc :

- l'ADNc atMAP2K d'*Arabidopsis* est la première MAP kinase kinase identifiée chez cette espèce (Jouannic *et al.* 1996) et la seconde décrite chez les végétaux ;

- un deuxième groupe d'ADNc, nommés MAP3K β , γ , δ , et ϵ code pour des homologues de MAP kinase kinase kinases des sous-familles MEKK, Raf et CDC7, suggérant ainsi l'existence de différentes voies des MAP kinases chez les plantes. Il s'agit de 3 ADNc atMAP3K β d'*Arabidopsis* et d'1 de colza, 1 ADNc atMAP3K γ d'*Arabidopsis* et de 4 ADNc atMAP3K δ d'*Arabidopsis* très proches de CTR1.

- un troisième groupe d'ADNc, nommés MAP4K α , code pour de potentielles MAP kinase kinase kinases, les premières identifiées chez des végétaux. Ces ADNc MAP4K α présentent des homologues avec la kinase humaine SOK1, membre de la sous-famille des MAP4K, activée par un stress oxydatif.

Il est important de noter que parmi ces ADNc, plusieurs ont été isolés à partir de la banque d'ADNc d'embryons de colza, indiquant ainsi que les gènes correspondant sont exprimés au cours de l'embryogenèse précoce (stades globulaire et cœur). Par contre, les ADNc atMAP2K α et at MAP3K γ n'ont pu être isolés à partir de cette banque. Les données des hybridations entre ADNc et ADN génomique de colza et d'*Arabidopsis*, indiquent que la plupart des ADNc identifiés correspondent à de petites sous-familles multigéniques (MAP4K α , MAP3K δ , etc...). Certains gènes seraient présents seulement en une ou deux copies dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (atMAP2K α , atMAP3K ϵ).

L'isolement de nombreux ADNc va permettre une étude phylogénétique regroupant les MAP2K, MAP3K et MAP4K végétales avec l'ensemble de celles précédemment caractérisées. Nous pensons en particulier que ces données devraient permettre une étude fine de la proximité entre MAP3K et MAP4K. Par ailleurs, le fait que nous disposions des séquences de différents ADNc issus de la même sous-famille multigénique MAP3K δ chez des espèces aussi diverses qu'*Arabidopsis*, le ricin, le maïs et le riz, va nous permettre une description de l'histoire de cette sous-famille.

Les différentes EST d'*A. thaliana* déjà caractérisées ont fait l'objet d'une cartographie physique par une approche PCR sur une banque de YAC, dans un travail en collaboration avec le Laboratoire de Phytopathologie Moléculaire de l'IBP. Les analyses des séquences, des phylogénies et de la cartographie nous apportent de nombreux renseignements relatifs à l'histoire de ces gènes et à leur dynamique dans le génome d'*Arabidopsis*.

TRAVAUX ACTUELS

À la suite de ces premiers résultats, les expérimentations actuelles et celles à venir vont nous amener à développer plusieurs types d'analyses :

- la caractérisation des gènes par criblage de banques génomiques. Nous disposons par exemple d'un fragment contenant l'intégralité du gène *atMAP3Kε*, dont le séquençage est en cours.
- l'étude de l'expression des gènes est réalisée par les approches classiques de type Northern-blot et RT-PCR. Une première étude porte sur l'analyse de l'expression selon les organes (végétatifs et floraux) en fonction du développement de la plante, ainsi qu'à divers stades du développement embryonnaire. Les premiers résultats indiquent que des gènes étudiés sont exprimés durant l'embryogenèse ou dans les cellules en division. Une seconde étude, basée sur des suspensions cellulaires d'*A. thaliana* synchronisées, porte sur l'analyse de l'expression au cours du cycle cellulaire. Enfin, une troisième étude concerne l'expression de ces gènes à la suite de différents stress appliqués soit sur des plantes entières d'*Arabidopsis* aux stades rosette et floral, soit sur des microspores.
- l'étude de certains promoteurs, fusionnés avec le gène rapporteur *GUS*, sera réalisée.

PERSPECTIVES

À l'heure actuelle, nous disposons au laboratoire de nombreux ADNc codant des éléments potentiels de la voie des MAP kinases, dont certains paraissent être impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires. Les travaux ultérieurs vont tirer bénéfice de nombreuses collaborations, internes à l'IBP avec les équipes de C. Bergounioux (cycle cellulaire) et B. Lejeune (phylogénie), internes à l'Université Paris-Sud dans le cadre de l'IFR Signalisation avec le Laboratoire de M. Jacquet (mutants de levure), avec l'équipe suisse de V. Simanis (mutants de levure). Par ailleurs, le soutien CEE dans le cadre du programme SIME (BIOTEC-RTD) a permis d'initier des collaborations avec les laboratoires de K. Palme (interactions protéines G-MAP4K ou MAP3K), d'E. Heberle-Bors (interactions MAP2K - MAPK), de M.C. Risueno (cytologie, immunolocalisation et hybridation *in situ*), et probablement de M. van Lockeren-Campagne (interactions kinases - phosphatases).

Nous cherchons à élucider la fonction des protéines correspondant aux ADNc identifiés et caractérisés. L'étude fonctionnelle des gènes retenus sera abordée selon deux approches : des tests de complémentation de mutants de levure qui nous apporteront des indications sur la fonction biochimique et la nature des partenaires potentiels des protéines, et des analyses de plantes transgéniques portant des constructions antisens. Nous avons donc la double ambition de confirmer la fonction biochimique de ces kinases et d'identifier la fonction biologique des cascades de MAP kinases.

Bibliographie

1. KREIS M., DECROOCQ-FERRANT V., TREGAR J., JOUANNIC S. 1995. Protein kinase genes expression during late flower bud development of higher plants. *J of Exper Bot* 46: 18.
2. TREGAR J., JOUANNIC S., SCHWEBEL-DUGUÉ N., KREIS M., 1996. An unusual protein kinase displaying characteristics of both the serine/threonine and tyrosine families is encoded by the *Arabidopsis thaliana* gene *ATN1*. *Plant Science* 117: 107-119.
3. TREGAR J., DECROOCQ-FERRANT V., JOUANNIC S., KREIS M. 1996. Protein kinase genes expressed during reproductive plant development. In : "Embryogenesis, The generation of a plant", eds TL Wang and AC Cuming, BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, 77-88.
4. JOUANNIC S., HAMAL A., KREIS M., HENRY Y. 1996. Molecular cloning of an *Arabidopsis thaliana* MAP kinase kinase-related cDNA (accession n° Y07694). *Plant Physiol* (PGR96-098) 112: 1397.
5. JOUANNIC S., HAMAL A., KREIS M., HENRY Y. 1996. Studies of MAP4K, MAP3K and MAP2K genes during microspore embryogenesis of *Brassica napus*, Plant Embryogenesis Workshop, September 12-14, 1996, University of Hamburg, Germany.
6. JOUANNIC S., HAMAL A., TREGAR J., KREIS M., HENRY Y. 1996. MAP kinase signaling pathways during *Brassica napus* microspore embryogenesis. Plant Tissue Culture Symposium, Séminaire Franco-Chinois sur les Biotechnologies, 7-9 Octobre 1996, Montpellier.
7. JOUANNIC S., HAMAL A., LEPRINCE A.-S., KREIS M., HENRY Y. 1997. New plant MAP kinase signaling pathways elements. Développement et évolution, Coll. Sté Franç Biol du Dév., 29-31 Mai 1997, Dourdan, France.
8. TREGAR J., HAMAL S., JOUANNIC S., LECHARNY A., HENRY Y., KREIS M. Characterization of MAP3K α , a novel MEK kinase gene from *Arabidopsis thaliana* and identification of three distinct plant MEK kinase subgroups. (en préparation).
9. JOUANNIC S., HAMAL A., LEPRINCE A.-S., TREGAR J., KREIS M., HENRY Y. New plant MAP kinase signaling pathways elements. (en préparation).

E3 : Introgression du retard à la morphogenèse des glandes à gossypol de la graine de *Gossypium sturtianum* Willis chez la principale espèce de cotonnier cultivé (*G. hirsutum* L.).

MERGEAI G.¹, BAUDOIN J.-P.¹, DU JARDIN P.², VROH BI I.^{1,2}

¹ Unité de Phytotechnie des Régions intertropicales, ² Unité de Biologie végétale, Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, B-5030 Gembloux, tél. : +32-81-622144, fax : +32-81-614544, courrier électronique : mergeai.g@fsagx.ac.be

INTRODUCTION

Chez toutes les espèces de cotonnier, les glandes à gossypol ou glandes à pigments sont des petites cavités où s'accumulent des déchets du métabolisme de la plante. On y trouve essentiellement du gossypol et différents autres terpénoïdes. Ces glandes sont toxiques pour les insectes et constituent un moyen de défense naturel du cotonnier contre ses ravageurs (Altman *et al.*, 1990). Le contenu de ces glandes est également très toxique pour tous les animaux monogastriques, y compris pour l'homme. La présence de gossypol dans la graine limite l'exploitation du haut potentiel alimentaire du cotonnier. Les amandes des graines de cotonnier contiennent en moyenne 20 % d'huile comestible et plus de 40 % de protéines dont la qualité nutritive est équivalente à celle des protéines du soja. L'huile et les tourteaux, produits par pression des amandes, contiennent des quantités importantes de gossypol dont l'élimination exige la mise en œuvre de procédés industriels qui altèrent la qualité des protéines et augmentent les coûts de production.

Dans la nature, seuls certains cotonniers diploïdes sauvages australiens présentent des glandes à gossypol partout sauf dans leurs graines (Fryxell, 1965; Brubacker *et al.*, 1996). Chez ces cotonniers, l'apparition des glandes à gossypol se produit après la germination. L'introgression de ce retard à la morphogenèse des glandes à gossypol de la graine chez le cotonnier cultivé permettrait de le transformer en une véritable plante vivrière tout en préservant un de ses moyens de défense naturels contre les insectes. Cette introgression constitue l'objectif majeur de nos recherches.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Deux hybrides trispécifiques incluant *Gossypium sturtianum* Willis ($2n = 2x = 26$, génome C_1) et *G. hirsutum* L. ($2n = 4x = 52$, génome $(AD)_1$) ont été créés en utilisant respectivement *G. thurberi* Torado ($2n = 2x = 26$, génome D_1) et *G. raimondii* Ulbrich ($2n = 2x = 26$, génome D_3) comme espèces pont (Mergeai *et al.*, 1995). Ces deux hybrides trispécifiques sont identifiés par les initiales TSH (*G. thurberi* x *G. sturtianum* x *G. hirsutum*) et HRS (*G. hirsutum* x *G. raimondii* x *G. sturtianum*). Environ deux cents rétrocroisements ont été réalisés pour chaque hybride trispécifique au moyen de deux variétés de *G. hirsutum* originaires du Congo-Kinshasa (C2, NC8). Les 100 premiers croisements ont été effectués sans application de régulateurs de croissance et les 100 croisements suivants ont été réalisés en utilisant le mélange

d'hormones proposé par Altman (1988) : 100 mg/l d'acide Naphtoxyacétique + 50 mg/l d'acide gibberellique. La majorité des embryons hybrides ont été cultivés sur le milieu de Stewart et Hsu (1977) de manière à garantir leur bonne germination et un bon démarrage des plantules. La densité de glandes à gossypol sur les graines produites par rétrocroisement a été évaluée en utilisant une échelle variant de 0 pour les graines totalement dépourvues de glande à 10 pour les graines dont la densité de glandes était semblable à celle de l'espèce cultivée. L'évaluation de la densité en glandes à gossypol a été réalisée après élimination des téguments et trempage de l'amande pendant une heure dans de l'eau stérile. Les analyses méiotiques des matériels produits ont été réalisées sur des boutons floraux fixés pendant 72 heures dans la solution de Carnoy (éthanol 95 % : chloroforme : acide acétique glacial, 6:3:1 v:v:v). Au moins 26 cellules mère du pollen ont été analysées pour chaque génotype.

Parallèlement aux travaux d'hybridation interspécifique, une technique de sélection du cotonnier assistée par marqueurs moléculaires de l'ADN nucléaire (RAPD) a été développée afin de faciliter la restauration de l'équilibre génétique des matériels introgressés. Ces travaux ont porté sur l'amélioration de la technique CTAB d'extraction de l'ADN du cotonnier (Vroh Bi *et al.*, 1996), sur l'optimisation des réactions RAPD (Vroh bi *et al.*, 1997) et sur l'identification de marqueurs spécifiques des parents de chaque hybride trispécifique (Mergeai *et al.* 1998).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les deux hybrides trispécifiques sont totalement autostériles et les premières tentatives de rétrocroisements n'ont pratiquement donné aucun résultat. Sans application de régulateurs de croissance, aucune graine n'a pu être produite par l'hybride TSH et il a fallu réaliser environ 100 croisements pour obtenir une graine à partir de l'hybride HRS. Grâce à l'application de régulateurs de croissance, le taux de réussite moyen est passé de 0 à 15 graines pour 100 croisements pour l'hybride TSH et de 1 à 20 graines pour 100 croisements pour l'hybride HRS.

L'application de régulateurs de croissance a permis de produire 41 graines BC₁ (17 à partir de HRS et 24 à partir de TSH). Parmi ces 41 graines, 6 étaient totalement démunies de glandes tandis que la distribution de fréquences des densités de glandes observées chez le reste des graines présentait un aspect de cloche asymétrique : les classes de densité de glandes intermédiaires étant les plus représentées.

Sur les six graines totalement démunies de glandes que nous avons produites, une seule a donné une plante adulte dont la densité de glandes était totalement normale. Pour obtenir cette dernière, il a été nécessaire de cultiver la graine *in vitro* pendant 2 semaines et de greffer la plantule obtenue sur un porte-greffe de l'espèce *G. hirsutum*. Toutes les autres graines sans glandes produites par rétrocroisement des hybrides trispécifiques n'ont pas germé ou ont dégénéré après quelques jours de culture *in vitro*. La seule plante que nous avons obtenue à partir d'une graine totalement démunie de glandes (TSH x NC8/5) fleurit abondamment mais est tout à fait autostérile.

L'analyse de la méiose des hybrides trispécifiques et de leur descendance confirme le bien-fondé de la stratégie d'introgession suivie. Les deux hybrides trispécifiques sont euploïdes $2n = 4x = 52$) et les nombres d'associations bi- et multivalentes chez TSH (15.34 ± 0.49 II + 0.93 ± 0.17 III + 0.69 ± 0.14 IV + 0.26 ± 0.1 VI) et chez HRS (17.03 ± 0.49 II + 0.82 ± 0.19 III + 0.15 ± 0.07 IV + 0.07 ± 0.05 VI) sont nettement plus hauts que ce qui avait été observé par Shujing et Biling (1993) chez l'hybride trispécifique *G. aroreum* L.x *G. bickii* Prokh x *G. hirsutum* (4,54 II + 0,57 III + 0,41 IV). Dans ce

dernier hybride, *G. bickii* ($2n = 2x = 26$, génome G_1) constituait l'espèce donneuse du caractère recherché et *G. aboreum* ($2n = 2x = 26$, génome A_2), espèce diploïde asiatique, était utilisée comme pont.

Le génotype introgressé est également euploïde ($2n = 4x = 52$). L'expression du caractère recherché chez ce cotonnier tétraploïde peut être due aux chromosomes de *G. sturtianum* encore présents chez celui-ci ou à des recombinaisons entre les chromosomes du génome C porteurs des facteurs de répression et ceux des sous-génomes A_h et D_h du cotonnier cultivé.

Les hauts taux d'appariement (20.61 ± 0.57 II + 0.69 ± 0.17 III + 0.77 ± 0.15 IV) et de formation de chiasmats (50.38 ± 0.63) observés chez le génotype TSHxNC8/5 permettent d'espérer le passage du caractère recherché aux générations suivantes et un retour assez rapide vers une forme de cotonnier génétiquement équilibrée dont les graines seront dépourvues de glandes à gossypol alors que sa partie aérienne conservera cet important moyen de défense naturel contre les insectes.

Afin de faciliter la restauration de l'équilibre génétique des matériels introgressés, nous avons développé, parallèlement aux travaux d'hybridation interspécifiques, une technique de sélection du cotonnier assistée par marqueurs moléculaires de l'ADN nucléaire. Cette technique se base sur l'amélioration de la méthode classique d'extraction de l'ADN au CTAB de Murray et Thompson (1980). La principale modification apportée à la méthode standard concerne l'ajout de charbon de bois activé pendant l'incubation des extraits de tissus végétaux. Cette modification originale a permis une amélioration significative de l'amplification PCR de l'ADN extrait chez le cotonnier et chez d'autres plantes récalcitrantes comme le caféier, le bananier, l'hévéa et le manioc (Vroh bi *et al.*, 1996).

À partir d'ADN extrait des différentes espèces de cotonnier intervenant dans la création des hybrides TSH et HRS nous avons optimisé les paramètres intervenant dans les réactions RAPD (Vroh bi *et al.*, 1997). Tous les facteurs testés ont influencé le résultat final mais la concentration d'ADN, du chlorure de magnésium, des désoxynucléotides triphosphates et la température de dénaturation se sont avérés être les paramètres les plus importants. Les différents facteurs envisagés ont été optimisés par réajustements successifs en partant des conditions RAPD standards et en considérant les recommandations des fournisseurs des différents constituants de la réaction.

Au total, 375 bandes RAPD ont été générées par 30 amorces décimères (Mergeai *et al.*, 1998). Parmi ces bandes, seulement 36 (9,6 %) se retrouvent chez tous les parents des hybrides trispécifiques. Les 339 (90,4 %) autres fragments sont polymorphes. Le tableau 1 résume les résultats obtenus concernant l'identification de marqueurs RAPD spécifiques des espèces diploïdes sauvages constitutives des hybrides TSH et HRS et leur transmission dans ces hybrides.

Tableau 1 : Transmission des marqueurs RAPD spécifiques des cotonniers diploïdes chez les hybrides trispécifiques

Génotypes testés	Nombre de marqueurs RAPD spécifiques chez le génotype parental	Nombre de marqueurs RAPD spécifiques chez TSH	Nombre de marqueurs RAPD spécifiques chez HRS
<i>G. sturtianum</i>	49	18*	22*
<i>G. raimondii</i>	12	0	4
<i>G. thurberi</i>	13	4	0

* Les deux hybrides trispécifiques partagent 18 bandes caractéristiques de *G. sturtianum*

L'absence systématique de certains marqueurs spécifiques des espèces sauvages chez les hybrides trispécifiques peut s'expliquer par la présence d'un seul complément de chacune des 13 paires de chromosomes des espèces diploïdes sauvages et par l'existence d'interférences entre certains fragments d'ADN au moment de l'amplification (Heun et Helentjaris, 1993). Pour limiter ce risque de « compétition » entre fragments lors de l'amplification, nous n'avons pris en considération que des bandes bien nettes qui étaient à la fois présentes chez l'espèce parentale et chez les hybrides trispécifiques. Au total, 22 marqueurs de ce type ont été identifiés chez *G. sturtianum* contre 4 marqueurs pour *G. raimondii* et *G. thurberi*. Étant donné la grande proximité phylétique qui existe entre les espèces sauvages diploïdes du génome D (*G. thurberi* et *G. raimondii*) et le sous-génome D_h de *G. hirsutum*, il n'est pas surprenant d'observer pour elles un plus faible nombre de marqueurs RAPD spécifiques que pour *G. sturtianum* qui appartient à un génome nettement plus distant.

Ces marqueurs RAPD spécifiques ont été utilisés pour évaluer l'introgession de segments d'ADN des espèces diploïdes sauvages chez les plantes obtenues en rétrocroisant les hybrides trispécifiques par des variétés de *G. hirsutum*. Tous les marqueurs RAPD spécifiques de *G. sturtianum* ont été retrouvés parmi les BC₁ obtenus à partir de TSH et HRS et le nombre de marqueurs spécifiques observés par plante variait de 7 à 20 (avec une moyenne de 13). Ces marqueurs spécifiques de *G. sturtianum* seront utilisés pour sélectionner, à chaque génération de rétrocroisement, les plantes introgressées génétiquement les plus proches du parent récurrent, c'est-à-dire celles qui présenteront le moins de marqueurs spécifiques de l'espèce sauvage donneuse du caractère, de manière à accélérer le retour vers une forme bien équilibrée.

Remerciements

Ce travail a été financé par la convention 2.4565.95 du « Fonds de la recherche fondamentale collective » de Belgique.

Bibliographie

1. ALTMAN D.W. (1988). Exogenous hormone applications at pollination for in vitro and *in vivo* production of cotton interspecific hybrids. *Plant Cell Rep.* 7, 257-261.
2. ALTMAN D.W., STIPANOVIC R.D., BELL A.A. (1990). Terpenoids in foliar pigment glands of A, D, and AD genome cottons: Introgression potential for pest resistance. *J. Hered.* 81, 447-454.
3. BRUBAKER C.L., BENSON C.G., MILLER C., LEACH D.N. (1996). Occurrence of terpenoid aldehydes and lysigenous cavities in the glandless seeds of Australian *Gossypium* species. *Austr. J. Bot.* 44, 601-612.
4. FRYXELL, P.A. (1965). A revision of the Australian species of *Gossypium* with observation on the occurrence of *Thespesia* in Australia. *Austr. J. Bot.* 13, 71-102.
5. HEUN M., HELENTJARIS T. (1993) Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of cotton. *Theor Appl Genet* 85 : 961-968.
6. MERGEAI G., VROH B.I., DU JARDIN P., BAUDOIN J.-P. (199). Introgression of glanded-plant and glandless-seed trait from *G. sturtianum* Willis into tetraploid cotton plants. Proc. Beltwide cotton improvement conference. Ed. National cotton council. San Antonio, USA, 6-7 January 1995, 513-514.

7. MERGEAI G., VROH BI I., BAUDOUIN J.-P., DU JARDIN P. (1998). Use of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to assist wide hybridization in cotton. In : Cotton Biotechnology. YPS Bajaj (Ed). Springer verlag, 121-139.
8. MURRAY M., THOMSON W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8 : 4321-4325.
9. SHUIJIN Z., BILING L. (1993). Studies of the «glandless seeds-glanded plant» trait from *Gossypium bickii* into cultivated upland cotton (*G. hirsutum*). *Coton Fibres Trop.* 48, 195-199.
10. STEWART JMCD, HSU C.L. (1977). In-ovulo embryo culture and seedling development of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta* 137: 113-117.
11. VROH BI I., HARVENGT L., CHANDELIER A., MERGEAI G., DU JARDIN P. (1996). Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding* 115, 205 - 206.
12. VROH BI I., DU JARDIN P., MERGEAI G., BAUDOUIN J.-P. (1997). Optimisation et application de la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) dans un programme de sélection récurrente chez le cotonnier (*Gossypium* spp.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 1, 142-150.

E4 : Hybridation interspécifique chez le blé : progrès récents et perspectives d'avenir

COMEAU A.¹, ST-PIERRE C.A.², MAËS O.^{2,3}, COLLIN J.²

¹ Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sainte-Foy G1V 2J3

² Université Laval, Département de Phytologie, Sainte-Foy, Québec G1K 7P4

³ présentement à : IRBV, Université de Montréal, Montréal H1X 2B2

Lors d'un séminaire présenté à Québec en 1980, madame Yvonne Cauderon se demandait quelles espèces pouvaient être croisées au blé, et par quels moyens? Aujourd'hui, il faut plutôt se demander quelles sont les dernières barrières qui subsistent en hybridation interspécifique du blé. Avant de présenter quelques exemples de résultats de croisements interspécifiques, nous voulons d'abord redéfinir les fondements scientifiques des tentatives de transfert de gènes étrangers, et signaler certains liens avec les techniques d'haploïdie. Nous indiquerons comment ces recherches contraignent et orientent l'avenir de l'hybridation interspécifique du blé et d'autres céréales.

PROGRÈS RÉCENTS

La pollinisation

Lors de la double fécondation des angiospermes, le tube pollinique pénètre la synergide, en libère les réserves de calcium au moment même où les noyaux spermatiques s'orientent vers la paroi de l'œuf (Chaubal et Reger 1995). Un grain de pollen étranger semble germer et réagir à peu près comme celui du blé, sans doute attiré par un signal provenant des synergides. Un grain de pollen d'une espèce très distante est souvent incapable de germer sur le pistil de blé. Toutefois, le pollen d'espèces aussi distantes que *Brassica campestris* et *Narcissus poeticus* peuvent germer et développer un tube pollinique vers le micropyle du blé (Ahmad et Comeau, non publié) ; cette barrière semble donc beaucoup plus faible que prévu. Quant aux espèces moins distantes, le pollen de presque n'importe quelle espèce de graminée peut sans doute féconder un ovule de blé. Les noyaux spermatiques sont alors attirés par l'œuf et par les noyaux polaires et ainsi le processus de fécondation donne naissance au zygote et à l'endosperme. Un pollen de *Carex* peut féconder l'œuf de blé, même si le pollen de blé franchit ces étapes plus rapidement que le pollen étranger (Mol & Zenkteler 1982).

La pollinisation pose par contre un certain problème au rétrocroisement, mais ceci est sans doute relié à la fréquence d'œufs très déséquilibrés au niveau chromosomique, incapables de maintenir un développement normal en pré-fécondation. Les gènes d'aptitude au rétrocroisement jouent probablement à ce niveau, de même que les gènes qui augmentent la fréquence de gamètes non réduits.

Sauvetage d'embryons et de proembryons : hypothèses nouvelles

C'est seulement après la fécondation qu'interviennent plusieurs mécanismes destinés à empêcher le transfert de gènes entre espèces distantes. Les noyaux étrangers se

fusionnent de manière anormale dans le cas de blé x *Carex*, et les premières divisions sont mortelles. Par contre, dans les croisements blé x maïs, blé x mil à chandelle, blé x chiendent, les mécanismes de mortalité sont moins rapides et moins absolus, de sorte que le sauvetage des embryons, parfois combiné à l'usage *in vivo* d'hormones en post-fécondation, suffit pour récupérer des plantules viables. Dans notre laboratoire, nous avons travaillé à améliorer l'étape du sauvetage des embryons. Nous avons déployé de grands efforts pour dépasser l'approche empirique en accord avec un petit groupe de chercheurs qui estiment que les milieux de culture *in vitro* devraient refléter les vraies conditions *in vivo* (Murray 1988, Monnier 1995, Carman *et al.* 1996). Ainsi, Maës (1990) a défini assez exactement les conditions biochimiques qui prévalent dans l'ovule au cours des 12 à 15 premiers jours après la fécondation. Ses travaux démontrent des fluctuations majeures du niveau d'un grand nombre de composantes minérales et organiques au cours de la première division cellulaire après la fécondation. On parle ici de teneurs de 4 à 20 fois supérieures à la normale pour plusieurs substances.

Chaubal et Reger (1995) ont prouvé que les cations sont distribués de manière très inégale dans le sac embryonnaire avant la fécondation, et ils ont décrit comment l'entrée du tube pollinique dans une synergide libère les noyaux spermatiques, lesquels seront ensuite attirés vers l'œuf. Cet événement tue la synergide et il est suivi d'une redistribution des cations. On pourrait soupçonner que le calcium joue chez les plantes un rôle semblable à celui qu'il joue dans les fécondations animales, en prenant part à une onde de dépolarisation qui empêcherait une pollinisation surnuméraire. Cette hypothèse reste à démontrer, mais une telle onde se produirait probablement en quelques minutes tout au plus. De son côté, Maës (1990) a observé en post-fécondation une fluctuation lente et complexe touchant plusieurs composantes chimiques. Le pic de cette fluctuation aurait une durée d'environ 24 heures, centrée sur la première division cellulaire. Il y aurait, durant cette période, une augmentation des cations, anions, acides aminés, sucres et peut-être aussi des polyamines.

Si on cherche les avantages possibles de cette vague chimique, il y a bien sûr la possibilité qu'il y ait rapport avec les besoins nutritionnels et l'état très hétérotrophe du zygote et du proembryon. Il s'agirait donc d'une entrée rapide de matériel nécessaire aux synthèses cellulaires. Le proembryon ne s'embarasserait pas de synthétiser des précurseurs, des sucres simples, des acides aminés, etc. nécessaire à la construction de macromolécules ; il les recevrait massivement avant la première division. Chez certains proembryons animaux, la synthèse des ARN est d'ailleurs inactive pendant une ou deux divisions cellulaires et le proembryon dépend des ARN d'origine maternelle pour diriger sa synthèse protéique. La présence d'un tel stratagème serait à vérifier chez les plantes. Toutefois l'hypothèse nutritionnelle semble insuffisante. Rappelons que cette vague étudiée par Maës ne touche pas spécifiquement l'œuf, mais l'ovule dans son ensemble, et affecte probablement plusieurs compartiments de la cellule.

À la lecture de nombreuses publications sur la structure et le fonctionnement du chromosome et de la chromatine, on peut concevoir que les fortes concentrations d'ions et de substances organiques auraient un effet sur un grand nombre de molécules qui interagissent avec l'ADN. Plusieurs protéines modifient la structure et le fonctionnement de la chromatine ; on parle ici d'histones, de « trans-acting factors », de protéines HMG (High-Mobility Group), topoïsomérases et une kyrielle d'autres. Ceci nous intéresse en particulier dans le cadre de la transcription et de la réplication. Plusieurs de ces protéines possèdent des régions d'homologie avec les histones et autres protéines structurantes qui enroulent l'ADN ou attachent l'ADN au cytosquelette

nucléaire et qui sont responsables de la stabilité structurale de la chromatine. Or on sait que la force du lien entre histones et ADN varie en fonction de la concentration en cations monovalents et divalents et en fonction de certaines autres molécules. Wolffe (1995) se pose la question du rôle possible de ces protéines, incluant les histones, qui pourraient même réguler massivement tout un génome et spécialement peut-être dans le cadre des premières étapes de la différenciation. Dans les proembryons de certains animaux marins, on a d'ailleurs noté des histones modifiées, spécifiques aux toutes premières divisions.

On peut donc poser plusieurs questions légitimes, qui permettraient peut-être de formuler des hypothèses de recherche valables.

Le rôle des cations, des acides aminés, polyamines, sucres et autres molécules pourrait-il être largement des rôles de messagers ou de régulateurs, capables de modifier l'interaction ADN-protéines de manière à rendre actifs ou silencieux plusieurs batteries de gènes spécialisés dans les diverses étapes du début de la morphogenèse ? Diverses molécules agiraient-elles sur divers groupes de gènes, ou à des moments différents, au fur et à mesure que la vague chimique croît et se résorbe ?

L'osmolarité globale joue-t-elle un rôle, ou les effets observés sont-ils spécifiques à des ions ou molécules précises ?

Par exemple, selon Maës (1990) l'ovule peut atteindre brièvement des teneurs en sodium de 35 mM, alors que 50 mM suffisent à extraire complètement du noyau la topoisomérase II, protéine qui représente un constituant important du chromosome. Si on se rappelle que Coumans (1998) a déjà détecté des effets morphogénétiques induits par le sodium, soit une formation d'embryoïdes à partir de scutellums de blé dur, on peut donc se demander si le sodium pourrait être un cation qui joue un rôle réellement important en début de morphogenèse. De plus, dans le même laps de temps, le potassium atteint jusqu'à 160 mM, et on peut facilement imaginer qu'à une telle dose il pourrait affecter indirectement, de plusieurs manières, la structure et le fonctionnement de l'ADN. Plusieurs autres ions et molécules organiques atteignent simultanément des doses très fortes. Puisque nous jouons ici dans le domaine des questions et hypothèses nouvelles, ajoutons cette corollaire : le tout premier rôle de ce choc chimique multiple serait-il de conformer la chromatine dans un état qui remet à zéro le programme de développement de la cellule, donc de la dédifférencier totalement et de la rendre compétente pour une différenciation normale subséquente ?

Les résultats de Maës (1990), et les hypothèses formulées à partir de la littérature récente peuvent donc inspirer des recherches académiques, mais aussi des améliorations pratiques aux protocoles de travail, tant en hybridation interspécifique qu'en culture d'anthères ou de microspores. Par exemple, nous avons cultivé *in vitro* les proembryons de blé sur le milieu U2.5 riche en acides aminées, inspiré de l'environnement *in vivo* (Comeau et al. 1992). Mais à la lumière de ces mêmes résultats, on constate *a posteriori* que les approches empiriques ont quelquefois produit des milieux *in vitro* qui imitent un peu mieux les conditions naturelles. Par exemple, les milieux à 2 compartiments, originalement préconisés par Michel Monnier, reproduisent la fin de cycle de l'onde observée par Maës. De plus, l'usage de suppléments en acides aminés, comme la glutamine et l'hydrolysate de caséine, représente une autre action orientée accidentellement vers l'imitation de la nature. Une imitation encore mieux réussie des conditions de la morphogenèse *in vivo* pourrait-elle nous permettre de diminuer encore davantage les barrières à l'hybridation interspécifique ?

On a également essayé de modifier la concentration des ions, des sucres, des acides aminés dans le but d'augmenter le succès de la culture d'anthères chez l'orge. L'affiche

de Laroche et al. (1997) présente quelques-uns des résultats récents qui nous incitent à continuer dans notre tentative d'imitation des conditions naturelles. En nous basant sur les mêmes principes, nous essayons aussi de mettre au point un milieu de culture permettant la croissance du proembryon non disséqué, dans un ovaire fécondé simplement stérilisé à l'hypochlorite de calcium, ce qui pourrait être utile pour les croisements blé x maïs.

Le transfert de gènes

Il est désormais assez facile de croiser les espèces entre elles ; nous avons d'ailleurs croisé le blé à 24 espèces de graminées. Nous ne discuterons pas ici des cas où le génome étranger est éliminé, et où l'objectif pratique se limiterait à la production de haploïdes. Pour le transfert de gènes, si on s'éloigne des génomes A, B et D, le succès est encore aujourd'hui difficile à obtenir, et surtout difficile à prouver. Parmi les obstacles, il faut souligner que plusieurs séries de gènes amènent des incompatibilités et des dysfonctionnements biochimiques ou génétiques chez les hybrides, souvent létales dans le cas des allèles Kr et des gènes de nécrose hybride (Ne₁ et Ne₂), et débilantes dans le cas des gènes de chlorose et autres (Bizimungu 1994). Certains gènes qui modifient l'aptitude au rétrocroisement revêtent une importance pratique considérable, car il se dépense dix fois plus de temps pour cette étape que pour l'obtention des F₁ (Comeau *et al.* 1993). Les aspects les plus coûteux du travail demeurent donc : 1) l'art de provoquer les transferts de gènes entre génomes différents, et 2) l'identification rapide des perles rares qui incorporent les gènes étrangers dans un chromosome de blé à comportement mendélien. Divers auteurs ont proposé une série de méthodes comme l'irradiation, la régénération à partir de cals, l'usage de gènes inducteurs de cassures et recombinaisons incluant le célèbre gène *ph1b*, dans le but d'accélérer les transferts. L'efficacité de toutes ces méthodes n'a pas été suffisamment évaluée, et leur efficacité relative pour introduire des gènes étrangers, en fonction des diverses sources de gènes possibles, reste appuyée sur une base scientifique incomplète.

Après observation de la méiose des hybrides interspécifiques à l'espèce cultivée, on a depuis longtemps classé plusieurs espèces distantes comme moins désirables au point de vue pratique. La faiblesse de cette conclusion est mise en lumière par les travaux suivants. On a croisé le riz à des espèces très distantes, jugées non utilisables par les cytogénéticiens à cause de l'absence d'appariement méiotique. Un croisement de riz *Oryza sativa* (génome AA) x *Oryza officinalis* (génome CC) donne donc des plants totalement stériles et dont la méiose ne contient que des univalents. Conclusion classique : voilà un parent sauvage à éviter. Malgré le pessimisme de cette règle de base, l'étude approfondie avec les marqueurs RFLP révèle de multiples micro-introgressions, présentes sur 11 des 12 chromosomes du génome A (Jena *et al.* 1992). Parmi ces micro-introgressions se trouve un gène nouveau et très utile, la résistance à un insecte suceur appelé « fulgoride brun » (brown planthopper), *Nilaparvata lugens*. On parle ici de micro-introgressions parce que la plupart de ces introgressions sont identifiées par un seul et unique marqueur RFLP. Ceci contredit donc de plein fouet tout le courant de pensée depuis les débuts de la science cytogénétique. Jena *et al.* cherchent à expliquer le phénomène en invoquant l'existence d'un mécanisme non conventionnel responsable introgressions ; mais une telle hypothèse est peut-être superflue car Mujeeb-Kazi a noté des cas semblables chez le blé (Mujeeb-Kazi & Hettel 1995).

En fait, les micro-introgressions ne sont détectables que depuis l'avènement des RFLP, et la recherche de ce phénomène n'est pas encore entrée dans les habitudes des

chercheurs. Les cas possibles de micro-introgression ne sont pas rares dans nos propres populations de blé interspécifiques. Plusieurs lignées de blés interspécifiques ont été étudiées par la méthode GISH (genomic in situ hybridization), et dans la majorité des cas, la résistance n'est pas associée à un fragment de chromosome assez gros pour être détectable par le GISH. Il resterait donc à appliquer le test des RFLP, si les croisements avaient été planifiés en fonction de cette méthode ; nous pouvons difficilement le faire avec notre matériel actuel, ayant utilisé plusieurs parents blé dans chaque croisement. Un hybride [(blé #1 x élyme)/blé #2//blé #3] est plus difficile à étudier par RFLP.

PERSPECTIVES D'AVENIR

La méthodologie de croisement et de rétrocroisement sera donc à redéfinir en fonction des progrès possibles dans l'étude des micro-introgressions chez plusieurs espèces. Il est peut-être logique d'adopter une approche bien différente si de telles micro-introgressions peuvent être obtenues, et ce même si la fréquence est très faible. Tant qu'on cherche les grosses translocations, on obtient avec les introgressions une foule de gènes délétères ou indésirables. Avec les micro-introgressions, les changements sont très subtils sauf pour le caractère recherché, et au niveau cytogénétique classique la détection est impossible. Par contre, on peut arriver très vite à un produit commercialisable, et ce détail est très important.

L'optimisation des méthodes de criblage

Si on planifiait le travail en fonction d'une possibilité de micro-introgressions, la clé du succès serait d'obtenir de grosses populations et de sélectionner avec un système très efficace pour la résistance à un stress ou à une maladie. Le fait que la micro-introgression se produise une fois sur un million n'est pas un obstacle si le système de criblage séquentiel permet d'identifier la plante individuelle dans la grande population. Un système de cycles de sélection successifs serait en effet idéal pour cet objectif. Si on conserve à chaque cycle les meilleurs individus représentant 1 % de la population, en 3 ou 4 générations on pourrait identifier l'individu recherché. Nous avons développé un excellent crible pour la résistance au virus de la jaunisse nanisante de l'orge (VJNO, ou BYDV), virus qui attaque plusieurs céréales ou graminées (Comeau *et al.* 1993, 1994 ; Makkouk *et al.* 1994). Les lignées interspécifiques créées dans notre projet ont atteint le niveau d'avancement où elles attirent l'attention des phytogénéticiens. Par exemple un hybride trispécifique à $2n=28$ semble avoir une tolérance ou une résistance quasi complète au VJNO, avec en surplus une résistance à plusieurs autres maladies, ce qui nécessite évidemment une confirmation en 1997. Nous essayons maintenant de mettre au point un crible aussi efficace pour étudier la résistance à la sécheresse *stricto sensu*, ou capacité de rendement agronomique en état de déficit hydrique (Nodichao, 1997), dans le but de mieux rentabiliser les croisements interspécifiques impliquant des parents résistants à la sécheresse.

Méthodes moléculaires et cytogénétique

Les RFLP, RAPD, et la panoplie de plus en plus large de nouvelles méthodes performantes capables de remplacer ces premiers outils moléculaires (marqueurs dérivés par PCR : SCAR, microsatellites, EST, etc.) deviennent désormais les instruments disponibles pour étudier la fréquence des micro-introgressions. La cytogénétique conventionnelle est impuissante dans l'étude de ce phénomène, mais elle rend toujours de grands services pour la caractérisation des translocations classiques. Les techniques de cytométrie de flux seraient intéressantes mais sont

réservées aux laboratoires les plus riches. Le GISH pourrait remplacer avantageusement le Giemsa si le protocole était simplifié ; c'est une technique impressionnante mais onéreuse. Nous essayons présentement de micro-disséquer un petit télomère de chromosome de chiendent, porteur de résistance au virus (Comeau *et al.* 1994), pour en développer des sondes utilisables pour le criblage de populations de blé interspécifique.

La biodiversité valorisée par l'hybridation interspécifique

Celui qui possède l'art des croisements interspécifiques sait apprécier la biodiversité à sa juste valeur. Parmi les espèces apparentées au blé, on trouve une abondance de gènes de résistance aux virus, à la fusariose, à la sécheresse et aux maladies foliaires et racinaires. Ces gènes pourraient résoudre des problèmes d'échecs culturels dans les pays du Sud et diminuer la pollution dans les pays plus fortunés, en réduisant les besoins de pesticides et d'engrais conventionnels. Au Québec, plusieurs espèces apparentées au blé sont des mauvaises herbes parfaitement vivaces et adaptées à notre environnement ; les gènes pour créer le blé rustique et même le blé vivace existent dans la nature. On accorde présentement trop peu d'intérêt à l'introgession des gènes étrangers parce qu'on a adopté une perspective à court terme de cette recherche (St-Pierre *et al.* 1997). L'attention insuffisante accordée aux croisements interspécifiques compte parmi les raisons qui font que la biodiversité devient un passe-temps de philosophes de salon, une sorte de ballon politique avec lequel les politiciens jouent un peu au besoin pour polir leur image, seulement pour ensuite mettre le ballon de côté. Les semenciers, souvent traditionnalistes, n'ont généralement pas encore compris qu'il s'agit d'un enjeu socio-économique très important. C'est ainsi que si on met sur un plateau de la balance les argents qui vont vers les croisements interspécifiques, et sur l'autre les argents qui vont vers la génétique moléculaire et la transformation génétique chez les graminées, on a un rapport de quelque 10 à 15 millions de dollars sur au-delà d'un milliard. Or si on s'attachait à mieux étudier le rapport coût-bénéfice, on constaterait que la biodiversité a énormément à offrir, autant pour les obtenteurs privés et publics que pour l'ensemble des pays producteurs céréaliers, qu'ils soient riches ou pauvres, et que l'exploitation de la biodiversité devient plus facile avec les méthodes moléculaires. Les gènes des espèces sauvages ont fait leurs preuves dans les régions soumises aux stress pendant des millions d'années ; il n'y a qu'à apprendre à mieux exploiter ce trésor négligé.

Bibliographie

1. BIZIMUNGU B. 1994. Hybridation interspécifique pour l'introgession de la tolérance au virus de la jaunisse nanisante de l'orge et à la moisissure nivéale tachetée, du triticale au blé. Ph. D. 107 pp.
2. CARMAN J., BISHOP D., HESS J. 1996. Carbohydrates, minerals and free amino acids in *Triticum aestivum* L. kernels during early embryony. *J. Plant Physiol.* 149:714-720.
3. CAUDERON Y. 1980. Hybridation interspécifique chez le blé: réalisations et potentiel. Conférence présentée à Ste-Foy, Québec.
4. CHAUBAL R., REGER B.J. 1995. Calcium uptake, release, and programmed death in synergid cells of pearl millet. *Plant Physiol.* 108:29.

5. COMEAU A., ST-PIERRE C.A., COLLIN J. 1993. Interspecific hybrids of wheat as sources of barley yellow dwarf virus resistance. in: A. Damania, ed. Biodiversity and Wheat Improvement. J. Wiley & Sons, N.Y. pp. 83-94.
6. COMEAU A., MAKKOUK K.M., AHMAD F., ST-PIERRE C.A. 1994. Bread wheat x *Agroticum* crosses as a source of immunity and resistance to the PAV strain of barley yellow dwarf luteovirus. *Agronomie*. 2: 153-160.
7. COMEAU A., NADEAU P., PLOURDE A., SIMARD R., MAES O., et al. 1992. Media for the *in ovulo* culture of proembryos of wheat and wheat-derived interspecific hybrids or haploids. *Plant Science* 81:117-125.
8. JENA K., KHUSH G., KOCHERT G. 1992. RFLP analysis of rice (*Oryza sativa* L.) introgression lines. *Theor. Appl. Genet.* 84: 608-616.
9. LAROCHE L., ST-PIERRE C.A., COLLIN J., COMEAU A. 1997. Stimulation de l'androgénèse *in vitro* par un prétraitement des anthères au début de la phase d'induction. in : Biotechnologies, amélioration des plantes et sécurité alimentaire. Orsay. (Affiche).
10. MAES O. 1990. Études biochimiques et physiologiques sur les conditions de l'embryogenèse chez *Triticum aestivum*.. pp. 127 Université Laval, Québec, Canada
11. MAKKOUK K.M., COMEAU A., GHULAM W. 1994. Resistance to barley yellow dwarf luteovirus in *Aegilops* species. *Can. J. Plant Sci.* 74: (3): 631-634.
12. MOL R., ZENKTELER M.. 1982. Cytoembryological studies on some wild species as pollinators of wheat and barley. *Z. Pflanzenzüchtg.* 89: 31-38.
13. MONNIER M. 1995. Culture of zygotic embryos. In *In vitro embryogenesis in plants*, ed. T. A. Thorpe. pp. 117-153 Kluwer Acad. Publ.
14. MUJEEB-KAZI A., HETTEL G.P. 1995. Utilizing wild grass biodiversity in wheat improvement : 15 years of wide cross research at CIMMYT. Research Report No. 2. CIMMYT. Mexico.
15. MURRAY D. 1988. *Nutrition of the angiosperm embryo* NY: J Wiley Sons. 246 pp.
16. NODICHAO L. 1997. Biodiversité racinaire et résistance à la sécheresse. Mémoire, M. S. Univ. Laval. 168 pp.
17. ST-PIERRE C., COMEAU A., GAUTHIER B. 1997. L'aspect public de la privatisation des semences. *Biodiversité mondiale*. 7: 9-16.
18. ST-PIERRE C., COMEAU A., GAUTHIER B. 1997. Privatization of crop seeds : the public aspect (adapted from French). *Global biodiversity*. 7: 9-16.
19. WOLFFE A. 1995. *Chromatin structure and function*. Acad. Press. N. Y. 299 pp.

E5 : Divers systèmes de régénération nécessaires à l'application des biotechnologies pour l'amélioration de la Patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)

**SIHACHAKR D.¹, NZOGHÉ D.², UMBOH I.³, CAVALCANTE J.-M.¹,
MUSSIO I.¹, SERVAES A.¹, LAVERGNE D.¹, DUCREUX G.¹**

¹ Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât. 360, Université Paris Sud, 91405 Orsay
Cedex - France, Télécopie : 33 (0)1 69 85 54 90, e.mail : dara.sihachakr@mve.u-
psud.fr.

² Laboratoire de Culture *in vitro*, CIAM - BP 2183 Libreville - Gabon.

³ Seameo - Biotrop, JL Raya Tajur, Km 6, PO Box 116 - Bogor - Indonésie.

INTRODUCTION

La Patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Convolvulacées) est une plante économiquement importante dans les zones tropicales et même dans certaines zones tempérées d'Europe du sud et des États-Unis d'Amérique (Sihachakr et Ducreux 1993). Elle produit des racines tubéreuses très riches en calories et vitamines, ainsi qu'en protéines dont la teneur varie entre 2 et 10 % de matière sèche selon les cultivars (Yang et al. 1975 ; Hattori et al. 1985). Ses tubercules sont utilisés dans l'industrie féculière ou destinés aux distilleries, mais sa culture reste surtout dans un cadre familial pour la production d'un complément alimentaire riche en calories. Son feuillage est également utilisé comme fourrage.

La Patate douce est originaire d'Amérique du sud (Colombie, Équateur et Nord Pérou) où il existe encore une grande diversité d'*Ipomoea batatas*. Elle a été introduite en Europe par Christophe Colomb au 15^e siècle. La Patate douce ou *Ipomoea batatas* (L.) Lam. est une dicotylédone gamopétale, de l'ordre des Polémoniales et de la famille des Convolvulacées. Les études cytologiques et d'hybridation interspécifique ainsi que l'analyse génomique (Jones et Deonier 1965) ont permis de classer la Patate douce et les espèces sauvages apparentées en 3 groupes (Nishiyama et al. 1975). Les espèces du 1^{er} groupe, apparemment autopolyploïdes comprennent : *Ipomoea batatas* (2n = 6x = 90 chromosomes) et 3 autres espèces, *I. trifida* (2n = 2x = 30, 4x = 60 et 6x = 90, *I. littoralis* (2n = 4x = 60) et *I. leucantha* (2n = 2x = 30). Quatre espèces diploïdes (2n = 2x = 30) forment le 2^e groupe : *I. triloba*, *I. lacunosa*, *I. trichocarpa* et *I. ramosa*. Le 3^e groupe comprend 2 espèces tétraploïdes, *I. gracillia* et *I. tiliacea*, dont la composition génomique reste indéterminée. Les espèces sont sexuellement incompatibles entre les groupes.

Le complexe *I. trifida*, constitué notamment d'*Ipomoea trifida* et aussi d'autres espèces sauvages du 1^{er} groupe, a fait l'objet d'études particulières pour l'identification de ressources génétiques susceptibles d'être utilisées dans un programme de sélection de Patate douce (Kobayashi 1984). *I. trifida* serait l'ancêtre direct de la Patate douce cultivée. C'est aussi la seule espèce sauvage qui peut donner une descendance fertile lors des croisements avec la Patate douce (Orjeda et al. 1991). Certaines de ses

accessions portent de nombreux caractères intéressants, en particulier la résistance aux nématodes et la capacité élevée d'accumulation des réserves (Sakamoto 1976).

Des progrès ont été réalisés par les méthodes de sélection classiques pour l'introduction des caractères de résistance aux maladies, aux nématodes et aux insectes, ainsi que pour l'amélioration de la qualité du tubercule notamment à la suite d'hybridation avec *I. trifida* (Iwanaga et al. 1991). Cependant, le processus de sélection est un travail laborieux et de longue haleine. Il nécessite des techniques améliorées de croisements et aussi la manipulation d'un très grand nombre d'individus, étant donné la structure hexaploïde ($2n = 6x = 90$) de la Patate douce. De plus, l'incompatibilité sexuelle et la faible fertilité de certains génotypes et des hybrides dues à la différence de niveau de ploïdie des parents (Freyre et al. 1991; Orjeda et al. 1991) rendent encore plus difficiles l'exploitation des méthodes de sélection classiques (Sihachakr et Ducreux 1993).

Afin de mener les programmes de sélection de la Patate douce avec efficacité, il est nécessaire d'y inclure des techniques nouvelles, comprenant notamment l'utilisation de la variation somaclonale, la fusion de protoplastes et la transformation génétique, pour élargir la variabilité génétique et transférer des gènes d'intérêt. Ces nouvelles méthodes peuvent être utilisées en conjonction avec les méthodes de sélection classiques. Cependant, l'accès à ces nouvelles techniques nécessite la maîtrise des protocoles reproductibles et performants de régénération à partir de culture de tissus de Patate douce. Cette plante est considérée comme une espèce récalcitrante en ce qui concerne la régénération. Dans ce travail nous allons examiner chez cette plante, divers systèmes de régénération à travers la culture d'explants et de protoplastes, ainsi que l'embryogenèse somatique.

LES DIVERS SYSTÈMES DE RÉGÉNÉRATION *IN VITRO* CHEZ LA PATATE DOUCE

La culture d'explants

Parmi les divers systèmes de régénération *in vitro*, l'embryogenèse somatique est sans doute la voie la plus recherchée, car elle offre la possibilité de multiplication à un taux élevé et inégalable. Néanmoins, chez la Patate douce, la réponse embryogène dépend fortement du génotype, et peut être absente chez certains cultivars (Cavalcante Alves et al. 1994 ; Desamero et al. 1994 ; Pido et al. 1995). Par conséquent, la régénération par l'organogenèse à partir de culture d'explants paraît la seule méthode disponible pour ces génotypes. Ainsi des fragments de tiges repiqués sur du milieu MS additionné de 1 mg/l d'acide 3-indole acétique (AIA) peuvent donner naissance à des bourgeons (Sihachakr 1982 b). Des études comparatives plus détaillées de milieux de culture ont permis de montrer que les meilleures réponses concernant la précocité (2 semaines de culture) et la fréquence de régénération (22 %) à partir de culture de fragments d'entre-nœuds de patate douce, ont été obtenues avec la combinaison de 0,01 mg/l d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et de 0,01 mg/l de kinétine. De plus, la réponse organogène dépend de la position et de la taille des fragments mis en culture (Bouhassan 1984).

Des fragments de racines néoformées sur des cultures de tiges ou de feuilles de patate douce peuvent être induites à régénérer des bourgeons sur le milieu MS contenant 0,2 mg/l d'acide α -naphthalèneacétique (ANA), utilisé seul ou combiné avec 0,1 mg/l de benzyladénine (BA) (Pido et al. 1995).

Les réponses concernant la régénération varient, généralement, selon les différents génotypes étudiés (Hwang et al. 1983 ; Carswell et Locy 1984 ; Alkalifa et Chambliss 1985 ; Templeton-Somers et Collins 1985, 1986).

La comparaison de la capacité organogène des différents organes mis en culture a montré que les explants de tiges sont les plus aptes à régénérer par rapport aux explants foliaires (Sihachakr 1982 b ; Bouhassan 1984). Par ailleurs les meilleures réponses organogènes sont obtenues à partir des explants prélevés sur des plantes *in vitro*.

Il est intéressant de noter que le repiquage des fragments de cals non-organogènes ou amorphes sur un milieu favorable à l'organogenèse a entraîné souvent leur nécrose. Néanmoins, certains d'entre eux sont capables de reprendre la croissance et de produire parfois des racines, mais ce traitement n'a jamais abouti à la formation de bourgeons.

L'embryogenèse somatique

• Les réponses embryogènes

Les premiers travaux sur l'induction de l'embryogenèse somatique chez la Patate douce ont abouti à l'obtention des structures embryoïdes à partir de cals issus de culture d'anthers (Tsai et Tseng 1979). Par la suite, des investigations ont été entreprises par plusieurs chercheurs, utilisant principalement le cultivar White Star. Des cals embryogènes d'un aspect compact et d'une couleur jaunâtre ont été induits à partir de culture de fragments d'organes sur du milieu MS additionné de 1 mg/l de 2,4-D (Liu et Cantliffe 1984 a, b). La comparaison de capacité embryogène de différents organes a montré que les jeunes feuilles sont les plus aptes à l'embryogenèse somatique par rapport aux fragments de tiges et de racines, et aux apex. Le transfert des cals embryogènes sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance a conduit au développement des structures embryonnaires, à savoir des embryons aux stades globulaires et cœurs, dont certains évoluent en plantes feuillées. Transplantées en conditions de serre, les plantes ainsi obtenues sont capables de fleurir et de former des tubercules.

Les travaux ultérieurs ont montré que les bourgeons axillaires prélevés sur des plantes *in vitro* semblent constituer le matériel végétal le plus approprié à l'induction de l'embryogenèse somatique chez la Patate douce, car ils donnent les meilleures réponses embryogènes (Chée et Cantliffe 1988 a, b, 1989 a ; Shultheis et al. 1990 ; Desamero et al. 1994 ; Cavalcante-Alves et al. 1994).

Des études comparatives de milieux, réalisées notamment sur le cultivar White Star, ont montré que l'induction de l'embryogenèse somatique chez la Patate douce est optimale avec l'utilisation de 10 μM de 2,4-D, et que la combinaison de 10 μM de 2,4-D et de 1 μM de BAP assure le maintien et la multiplication des cals embryogènes induits en milieu solide, et seulement 5 μM de 2,4-D en milieu liquide (Chée et Cantliffe 1988 a). On a également constaté que l'acide picolinique (2–3 mg/l) combiné avec de la kinétine (0,25–1 mg/l) est capable d'induire une embryogenèse somatique directe à partir de culture de méristème apical du cultivar Regal, mais il reste sans effet sur le cultivar Jewel (Desamero et al. 1994). La germination des embryons semblent être conditionnée par leur état de maturation. En effet, si le transfert des cals embryogènes sur un milieu sans régulateur de croissance conduit à la différenciation des embryons à différents stades, très peu d'entre eux arrivent à maturation et encore moins à la conversion en plantes. Beaucoup de structures embryonnaires présentent des anomalies de développement (absence de pôles ou méristèmes apical et racinaire.

arrêt de développement aux stades globulaires et torpilles...). Seuls les embryons qui ont atteint les stades torpilles avancés ou cotylédonnaires sont capables de germer et de se développer en plantes (Chée et Cantliffe 1988 b).

Tableau 1 : Réponse embryogène de 10 cultivars de Patate douce.

Génotype	D11	Qu	Yul	Zho	90	132	209	530	865	953
A) Réponse										
Embryogène (%)	0,0	1,3	1,5	15,0	10,0	5,0	8,0	3,6	17,0	7,0
B) Réversion										
De cals (%)	-	1,0	1,0	3,0	12,0	2,5	7,0	1,5	10,5	0,5

A) Pourcentage de cals embryogènes obtenus après 6-8 semaines d'incubation de bourgeons axillaires dans du milieu MS contenant 10 μ M de 2,4-D, effectif : 120-160 bourgeons axillaires/génotype. L'effet "génotype" est très hautement significatif pour $P = 0,001$; B) Pourcentage de réversion de cals embryogènes en cals friables et non-embryogènes après repiquage sur du milieu MS contenant 10 μ M de 2,4-D ; effectif : 200 cals génotypes. L'effet "génotype" est très hautement significatif pour $P = 0,001$.

L'évaluation du potentiel embryogène à partir de culture de bourgeons axillaires chez 10 cultivars de Patate douce a montré l'existence d'un effet "génotype" très hautement significatif (Tab. 1A) (Cavalcante et al. 1994 ; Sihachakr et al. 1995). Parmi les génotypes testés, les cultivars 90, Zho et 865 ont donné les meilleures réponses embryogènes avec respectivement 10, 15 et 17 % de cals embryogènes (Tableau 1A). Il est intéressant de noter que le cultivar Duclos XI n'a donné aucune réponse embryogène quelle que soit la concentration en 2,4-D utilisée (2,5 à 15 μ M), alors que ce même génotype a produit quelques régénérations de bourgeons à partir de culture de protoplastes (Sihachakr et Ducreux 1987 b, 1993 ; Sihachakr et al. 1997).

Les cals embryogènes sont multipliés par repiquages successifs sur du milieu MS contenant 10 μ M de 2,4-D et 1 μ M de BAP et maintenus à l'obscurité. Cependant, après plusieurs repiquages, certains secteurs du cal deviennent friables et non embryogènes. Ils ont tendance à envahir complètement la culture car leur croissance est 5 à 8 fois plus rapide que celle des cals embryogènes. De plus, la réversion des cals embryogènes vers un état friable non embryogène est irréversible, et s'accompagne d'une perte définitive de la capacité à régénérer des bourgeons (Cavalcante et al. 1994 ; Sihachakr et al. 1997). La comparaison des fréquences de réversion a montré un effet "génotype" très hautement significatif (Tab ; 1B). En effet, les cultivars Quangshu, Yulciboï et 953 sont parmi les génotypes qui ont le taux de réversion le plus faible (0,5 à 1 %), alors que le cultivar 90 présente le taux le plus élevé (12 %) (Tableau 1B).

• La différenciation des embryons somatiques et la régénération de plantes

Il est intéressant de noter que l'induction et la différenciation d'embryons somatiques chez la Patate douce, ainsi que leur maturation nécessite la présence d'un niveau élevé d'auxine, du 2,4-D en particulier. En effet, la différenciation d'embryons somatiques de Patate douce est obtenue en transférant les cals embryogènes dans le même milieu (MS + 10 μ M de 2,4-D + 1 μ M de BAP) que celui utilisé pour leur multiplication. La culture est alors maintenue à l'obscurité pendant une semaine après le repiquage, puis exposée à la lumière. Dans ces conditions, plus de 90 % des cals embryogènes traités développent des embryons globulaires après 4 semaines de culture. Cependant, seulement 5 % des embryons globulaires différenciés pour tous génotypes confondus de Patate douce sont capables d'évoluer vers le stade cotylédonnaire et de se développer en plantules à la suite de leur transfert dans un milieu dépourvu de

régulateurs de croissance. La majorité des embryons restent stationnaires tout en gardant la capacité de redonner des cals embryogènes lorsqu'ils sont transférés sur les milieux d'induction ou de multiplication. Le repiquage des embryons globulaires sur un milieu contenant 1 μM de 2,4-D et 1 μM de kinétine pendant 3 semaines, suivi d'un transfert dans un milieu MS dépourvu de régulateurs de croissance améliore sensiblement leur développement en embryons au stade cotylédonnaire, plus aptes à germer, mais avec une fréquence variant de 24 à 90 % selon le génotype.

Les embryons somatiques de Patate douce au stade cotylédonnaire verdissent à la lumière. Ils sont plus aptes à se développer en plantes à raison de 3-5 plantes par cal. On remarque, cependant, que les vieilles cultures (plus de 6 mois), maintenues à l'obscurité dans un milieu initialement riche en 2,4-D, parviennent, parfois, à différencier des embryons qui peuvent atteindre le stade cotylédonnaire.

Il est important de noter que les cals embryogènes ainsi obtenus chez plusieurs génotypes de Patate douce et leur capacité de conversion en plantes sont constamment maintenus depuis plus de 5 ans de culture.

• *Caractérisation biochimique*

Afin d'évaluer les potentialités embryogènes de différents types de structures obtenues, des cals embryogènes et non embryogènes de patate douce ont été caractérisés par l'analyse des isoenzymes et du comportement d'une kinase, la nucléoside diphosphate kinase, impliquée dans le phénomène de différenciation cellulaire.

• *L'analyse des isoenzymes*

Les isoenzymes sont facilement détectables et la variation de leurs activités est souvent associée à des différences génétiques et des modifications morphogénétiques, alors que l'évaluation du potentiel embryogène par observations morphologiques est toujours subjective. Dans cette étude, 4 systèmes d'isoenzymes ont été analysés pour caractériser les différents événements morphogénétiques survenus au cours de l'embryogenèse somatique chez la Patate douce. Ce sont les estérases (Est, E.C.3.1.1.2), les peroxydases (Prx, E.C.1.11.1.7), les phosphatases acides (Acp, E.C.3.1.3.2) et les glutamates axaloacétates transaminases (Got, E.C.2.6.1.1).

Les feuilles, les cals embryogènes et non embryogènes et les embryons somatiques au stade globulaire issus de 3 génotypes (cv 90, 953 et Quangshu) ont été utilisés. Chacun des 4 systèmes d'isoenzymes analysés ont permis de distinguer les 3 génotypes étudiés. De plus, ils montrent des variations dans leurs activités entre les différents types d'organisation, et en particulier entre les cals embryogènes et non embryogènes (Calvacante et al. 1994).

Le profil des bandes des estérases est complexe. Il comprend un très grand nombre de bandes, sans doute lié à l'état hexaploïde de la patate douce. La feuille est caractérisée essentiellement par des bandes situées dans la zone de migration lente. Les cals friables non embryogènes, à croissance rapide se distinguent des cals embryogènes par l'absence d'activité des estérases, sauf au niveau de la migration rapide pour le cultivar 953. Peu de différences existent entre les cals embryogènes et les embryons globulaires, sauf pour le cultivar Quangshu, qui montre de nombreuses bandes dans la zone de migration rapide des estérases (Cavalcante et al. 1994).

Pour les peroxydases, les cals friables non embryogènes se distinguent des cals embryogènes essentiellement par la présence d'activités au niveau de la zone de migration lente. Il y a peu de différences entre les cals embryogènes et les embryons

globulaires. Ils sont essentiellement caractérisés par des bandes de migration rapide (Cavalcante et al. 1994).

Pour les glutamates oxaloacétates transaminases (Got), la feuille est caractérisée par des bandes situées dans la zone de migration rapide. Les cals friables non embryogènes des géotypes 90 et 953 ont respectivement des activités faibles et intenses dans la zone de migration lente.

En ce qui concerne les phosphatases acides, les cals non embryogènes sont caractérisés par l'absence d'activités notamment chez les cultivars 90 et Quangshu, ou par une très faible activité pour le géotype 953. Peu de différence a été observée pour les cals embryogènes et les embryons globulaires. Les feuilles ont des activités intenses dans la zone de migration lente (Cavalcante et al. 1994).

Dans cette étude, les cals embryogènes et non embryogènes montrent de grandes différences dans les activités des isoenzymes. En revanche, peu de changements ou aucune modification spécifique n'ont été observés entre les cals embryogènes et les embryons globulaires. Cela semble indiquer que les isoenzymes étudiées sont probablement impliquées dans l'organisation de cals plutôt que dans le processus de différenciation des embryons somatiques.

Il est également intéressant de noter que les activités des isoenzymes sont plus faibles ou absentes chez les cals friables non embryogènes, comparées à celles des cals embryogènes. Cette situation est non seulement due à la différence de quantité de protéines, qui est de 20 à 30 % plus faible dans les cals friables non embryogènes, mais elle peut être aussi liée à une activité faible ou nulle des isoenzymes dans les cals non embryogènes. Des résultats similaires ont été constatés chez les cals embryogènes et non embryogènes de maïs (6).

• *Les marqueurs protéiques*

Les nucléosides diphosphates kinases (NDPK, E.C.2.7.4.6) sont des enzymes ubiquistes responsables de la synthèse des nucléosides triphosphates à partir des nucléosides diphosphates. Elles sont impliquées dans le contrôle du flux métabolique des groupes phosphates et dans la conversion de leur niveau de fonction. Les NDPK ont un rôle très important pour le maintien du niveau de GTP nécessaire aux synthèses protéiques. La protéine native est un hexamère (100 kDa) constituée de sous-unités identiques (17-20 kDa), chaque sous-unité possède un site actif et peut être phosphohorylée. L'étroite analogie existant entre la NDPK d'épinard, le produit du gène humain Nm23 (impliqué dans les tumeurs malignes) et celui de la drosophile Awd (décisif pour le développement) nous a conduit à émettre l'hypothèse de la contribution de la NDPK au niveau des processus de prolifération et de différenciation des cals de patate douce.

La NDPK est analysée d'une part en tant qu'élément de la chaîne de signalisation des processus précoces de différenciation cellulaire, et d'autre part comme enzyme clé de la gestion énergétique cellulaire au cours des processus de divisions intenses des cellules.

Au cours de la phase exponentielle de croissance des cellules en prolifération, l'activité NDPK est fortement augmentée, comparée à celle exprimée par les cellules en phase stationnaire. Cette augmentation du niveau de l'activité NDPK au cours de la croissance peut traduire l'intensité des divisions cellulaires et par voie de conséquence l'intensité des échanges nucléotidiques et énergétiques qui y sont associés. De plus, l'activité NDPK mesurée sur les extraits protéiques des cultures embryogènes est 4 fois plus forte que sur les cultures non embryogènes. Les résultats des immunotransferts permettent de montrer la distribution générale du polypeptide 15-17

kDa, caractéristique de la NDPK décrite chez les systèmes animaux. L'existence d'une forme plus lourde (28-31 kDa) est spécifiquement observée sur les extraits de cultures embryogènes. Des résultats complémentaires nous permettent de relier ce polypeptide (28-31 kDa) aux organites impliqués dans la gestion du pouvoir énergétique tel que les mitochondries et les chloroplastes. La surexpression de l'activité enzymatique de la NDPK dans les cals embryogènes et la présence d'une bande correspondant à un polypeptide de poids moléculaire élevé, permettent de supposer une participation active de la NDPK au cours des processus de la différenciation cellulaire et de la considérer comme un marqueur potentiel lors de la mise en place des événements de l'embryogenèse somatique.

L'induction de la production et du développement des embryons est sous la dépendance des stimuli hormonaux. La transduction de ces signaux lors des processus du développement chez la patate douce est encore mal connue. Les mécanismes par lesquels les cellules végétales reçoivent les signaux physiologiques et assurent leur traduction jusqu'aux cellules cibles doivent être élucidés via le fonctionnement corrélié des NDPK et des protéines G.

La culture des protoplastes

L'isolement et la culture des protoplastes ainsi que la régénération de plantes constituent des étapes essentielles pour réaliser le transfert de gènes par transformation génétique ou par fusion somatique. De plus, il est bien établi que les cellules végétales cultivées subissent des changements génétiques, appelés variations somaclonales (Larkin et Scrowcroft 1981). L'hétérogénéité cellulaire d'une population de protoplastes est particulièrement appropriée pour l'isolement et l'identification de somaclones comportant des caractères agronomiques intéressants, tels que l'accroissement du rendement et de la qualité des tubercules, et des tolérances.

Chez la patate douce, des protoplastes peuvent être isolés à partir de fragments de tiges, de pétioles ou de cals, alors que le mésophylle se montre très récalcitrant à la digestion enzymatique. Le matériel frais est en incubation, pour la nuit à 27°C et à l'obscurité, dans une solution enzymatique constituée de 0,5 M de mannitol, de sels minéraux (Frearson et al ; 1973), de Cellulase RS et de Pectolyase Y23 utilisées à 0,5 % (m/v) (Sihachakr et al ; 1997). Dans ce cas, le rendement en protoplastes est estimé à $0,2 - 1,3 \times 10^6$ protoplastes/g de masse fraîche. Les protoplastes sont généralement cultivés en milieu liquide. Ils évoluent, le plus souvent, vers la formation de cals qui ne manifestent aucune organogenèse (Bidney et Shepard 1980 ; Otani et al. 1987 ; Kokubu et Sato 1988), ou qui produisent seulement des racines (Sihachakr et Ducreux 1987 a). Cependant, des néoformations sporadiques de bourgeons à partir de culture de protoplastes de patate douce ont été signalées pour le cultivar Chugoku N°25 (Murata et al 1986).

Des résultats intéressants concernant la régénération de bourgeons à partir de culture de protoplastes ont été obtenus chez la patate douce, grâce à des efforts qui ont porté sur la recherche de combinaisons de régulateurs de croissance, de séquences de milieux de culture et en particulier sur le choix du matériel végétal utilisé comme source de protoplastes (Sihachakr et Ducreux 1987 b). En effet, la comparaison entre le matériel végétal prélevé en serre et *in vitro* montre la nette supériorité de ce dernier concernant la viabilité et le taux de division de protoplastes qui en sont issus, ainsi que la capacité ultérieure à régénérer des bourgeons. Ces performances sont sans doute dues à l'état physiologiquement juvénile et homogène du matériel végétal qui caractérise les plantes *in vitro*. De plus, la grande dilution de la culture, combinée avec le passage sur des milieux successifs riches en cytokinine, de la zéatine en particulier,

stimule la croissance des cals et favorise la régénération de bourgeons (Sihachakr et Ducreux 1987 b). Ainsi, des plantes ont été régénérées à partir de cals de protoplastes, mais la régénération est limitée à deux cultivars de patate douce, cv. Duclos 11 et Ira. Par ailleurs, l'utilisation de matériel végétal hautement organogène, tels que les cals embryogènes de patate douce, comme source de protoplastes a abouti à l'obtention de cals friables non embryogènes et incapables de régénérer (Sihachakr et al. 1997).

Le contrôle de régénération chez d'autres génotypes de patate douce nécessite donc le développement d'un protocole alternatif. Il est intéressant de rappeler que les racines tubéreuses de Patate douce portent de nombreux bourgeons adventifs qui peuvent se développer en plantes feuillées (Sihachakr 1982 a). Nous avons alors mis à profit cette propriété rhizogène pour tenter d'obtenir des régénérations de bourgeons sur les cals de protoplastes à travers la rhizogenèse. Des cals de protoplastes ont été d'abord repiqués sur du milieu MS contenant 2 mg/l de zéatine pendant un mois, avant d'être transférés sur du milieu contenant 0,01 mg/l de 2,4-D et 0,01 mg/l de kinétine. Environ 2-5 % des cals ainsi traités produisent des racines 20-30 jours après le transfert. La rhizogenèse peut être améliorée, la fréquence pouvant atteindre 10 % dans du milieu contenant 0,2 mg/l d'ANA, avec en moyenne une à 5 racines par cal. Les racines néoformées sont ensuite coupées en fragments de 10 mm de long puis repiqués dans du milieu contenant 0,5 mg/l de zéatine. Un à deux mois plus tard, des bourgeons apparaissent soit directement sur les racines cultivées, ou soit à travers un cal formé au niveau des sections avec une fréquence variant de 3 à 6 % (Sihachakr et al. 1997). Finalement, à travers ce protocole, la régénération de plantes a été obtenue chez les cultivars Ira, Quangshu et *I. trifida*. Des travaux sont en cours pour appliquer ce protocole de régénération à d'autres génotypes de patate douce et des espèces sauvages apparentées.

Les plantes régénérées présentent une grande variabilité affectant la morphologie générale de la plante, celle des feuilles, la ramification ainsi que le système racinaire. L'analyse du contenu en ADN de 15 protoclonés d'apparence morphologique normale, par cytométrie en flux, a montré des valeurs similaires ou très proches de celles du clone témoin (Sihachakr et Ducreux 1993).

Dix protoclonés choisis ont été transplantés en conditions de champ au Gabon pour une évaluation préliminaire. Deux types de matériel ont été testés : des boutures issues directement de culture *in vitro*, et celles issues de pépinière. Malgré une apparence de morphologie similaire, les protoclonés montrent une certaine variabilité dans la croissance et la formation des tubercules. Certaines boutures de protoclonés issues de culture *in vitro* n'ont pas tubérisé, alors que d'autres (clones R8, R22, R35, R39, R52 et R56), notamment celles issues de pépinière, ont donné un rendement en tubercules deux fois supérieur à celui du clone témoin D11 (Sihachakr et al. 1997). Des essais au champ sont en cours à Bogor (Indonésie) pour confirmer le comportement des protoclonés.

Tableau 2 : Évaluation préliminaire de 10 protoclonés de patate douce (R8 – R56) et du témoin (D11) réalisée en conditions de champ au Gabon à partir de boutures issues de plantes *in vitro* et de pépinière ; rendement en tubercules : g/plante.

Génotype	R8	R22	R35	R39	R40	R41	R42	R43	R52	R56	D11
Boutures <i>in vitro</i>	406	197	162	121	122	12	10	0	225	67	2
Boutures de pépinière	809	729	738	733	589	236	71	174	860	772	332

CONCLUSION

Dans cette étude, divers systèmes de régénération chez la patate douce ont été présentés. Bien que la micropropagation soit bien maîtrisée, la régénération chez cette plante montre encore des difficultés affectant notamment la culture de cal secondaires ou de protoplastes. La voie de l'embryogenèse somatique paraît alors la plus prometteuse et reproductible pour la régénération chez cette plante. Elle permet d'assurer un taux élevé et inégalable de multiplication d'individus sains, homogènes et juvéniles. Cependant, bien que les cals embryogènes constituent sans doute un matériel compétent et hautement organogène, le potentiel embryogène n'a pu être conservé à travers la culture de protoplastes. En effet, les protoplastes isolés à partir de cals embryogènes évoluent en culture vers la formation d'un cal friable non embryogène et incapable de régénérer des bourgeons. En conséquence, un protocole alternatif a été développé aboutissant à la néoformation de bourgeons. Ce protocole s'inspire des propriétés organogènes des racines de patate douce. Il consiste à initier d'abord la production de racines sur les cals de protoplastes, puis à induire la régénération de bourgeons à partir des racines néoformées.

Les plantes régénérées à partir de culture de protoplastes montrent une très grande variabilité affectant notamment la croissance et la tubérisation. Certains protoclonés présentent un rendement en tubercules deux à trois fois supérieur à celui du témoin. Ces résultats montrent bien que la culture de tissus, et en particulier à travers le passage par cal de protoplastes, peut induire la variabilité génétique. Des somaclones stables et intéressants peuvent être rapidement régénérés. Cette technique constitue, donc, un moyen efficace d'élargir la variabilité génétique chez des plantes, telles que la patate douce, présentant des difficultés dans la reproduction sexuée.

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de la Communauté Européenne et de l'AUFELF.

Bibliographie

1. ALKALIFA M.A., CHAMBLISS O.L. (1985) Feasibility of tissue culture propagation of sweet potatoes for foundation and stock-evaluation of different propagation procedures HortScience, 20(4): 665 (Conference abstract).
2. BIDNEY D.L., SHEPARD J.F. (1980) Colony development from sweet potato petiole protoplasts and mesophyll cells. Plant Sci. Lett., 18: 335-342.
3. BOUHASSAN A. (1984) Analyse du polymorphisme des néoformations obtenues *in vitro* à partir de divers tissus de Patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Convolvulacées). Thèse 3^e Cycle, Univ. Paris Sud, Orsay, 167 pp.
4. CARSWELL G.K., LOCY R.D. (1984) Root and shoot initiation by leaf, stem, and storage roots explants of sweet potato. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 3: 229-336.
5. CAVALCANTE ALVES J.M., SIHACHAKR D., ALLOT M., TIZROUTINE S., MUSSIO I., SERVAES A., DUCREUX G. (1994) Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Plant Cell Reports, 13: 437-441.
6. CHÉE R.P., CANTLIFFE D.J. (1988 a) Somatic embryony patterns and plant regeneration in *Ipomoea batatas* Poir. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 24:955-958.
7. CHÉE R.P., CANTLIFFE D.J. (1988 b) Selective enhancement of *Ipomoea batatas* Poir embryogenic and non-embryogenic callus growth and production of embryos in liquid culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 15: 149-159.
8. CHÉE R.P., CANTLIFFE D.J. (1989 a) Composition of embryogenic suspension cultures of *Ipomoea batatas* Poir. and production of individualized embryos. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 17: 39-52.

9. CHÉE R.P., CANTLIFFE D.J. (1989 b) Inhibition of somatic embryogenesis in response to 2,3,5-triiodobenzoic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Ipomoea batatas* (L.) Lam cultured *in vitro*. J. Plant Physiol., 135: 398-403.
10. DESAMERO N.V., RHODES B.B., DECOTEAU D.R., BRIDGES W.C. (1994) Picolinic acid-induced direct somatic embryogenesis in sweet potato. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 37: 103-111.
11. FREARSON E.M., POWER J.B., COCKING E.C. (1973) The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. Dev. Biol., 33: 130-137.
12. FREYRE R., IWANAGA M., ORJEDA G. (1991) Use of *Ipomoea trifida* (HBK.) G. Don. plasm germ for sweet potato improvement. 2. Fertility of synthetic hexaploids and triploids with 2n gametes of *I. trifida*, and their interspecific crossability with sweet potato. Genome, 34: 209-214.
13. HATTORI T., NAKAGAWA T., MAESHIMA M., NAKAMURA K., ASAHI T. (1985) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for sporamin, the major soluble protein of sweet potato tuberous roots. Plant Molecular Biology, 5: 313-320.
14. HWANG L.S., SKIRVIN R.M., CASYAO J., BOUKAMP J. (1983) Adventitious shoot formation from sections of sweet potato grown *in vitro*. Scientia Horticulturae, 20: 119-129.
15. IWANAGA M., FREYRE R., ORJEDA G. (1991) Use of *Ipomoea trifida* (HBK.) G. Don. germ plasm for sweet potato improvement. 1. Development of synthetic hexaploids of *I. trifida* by ploidy-level manipulations. Genome, 34: 201-208.
16. JONES A., DEONIER M.T. (1965) Interspecific crosses among *Ipomoea lacunosa*, *I. ramoni*, *I. trichocarpa* and *I. triloba*. Bot. Gaz. 126: 226-232.
17. KOBAYASHI M. (1984) The *Ipomoea trifida* complex closely related to sweet potato. Proc 6th Symp. Int. Soc. Trop. Root Crops, CIP, 1983, Lima, Peru, pp 561-568.
18. KOBUKU T., SATO M. (1988) Isolation and culture of petiole protoplasts of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. and its related species. Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ., 24: 83-89.
19. LARKING P., SCROWCROFT W. (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet., 60: 197-214.
20. LIU J.R., CANTLIFFE D.J. (1984 a) Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) leaf, shoot tip, stem and root explants culture. Plant Cell Reports, 3: 112-115.
21. LIU J.R., CANTLIFFE D.J. (1984 b) Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.). HortScience, 19(3): 113 (abstract 501).
22. MURATA T., HOSHINO K., MIYAZI Y. (1986) Plant regeneration from protoplasts of sweet potato. Japan Breed., 36: 236-237.
23. NISHIYAMA I., MIYAZI T., SAKAMOTO S. (1975) Evolutionary autopolyploidy in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its progenitors. Euphytica, 24: 197-208.
24. ORJEDA G., FREYRE R., IWANAGA M. (1991) Use of *Ipomoea trifida* germ plasm for sweet potato improvement. 3. Development of 4x interspecific hybrids between *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (2n = 6x = 90) and *I. trifida* (H.B.K.) G. Don. (2n = 2x = 30) as storage-root initiators for wild species. Theor. Appl. Genet., 83: 159-163.
25. OTANI M., SHIMADA T., NIIZEKI H. (1987) Mesophyll protoplast culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Plant Science, 53: 157-160.
26. PIDO N., KOWYAMA Y., SHIMONISH K., KARUBE M. (1995) Plant regeneration from adventitious root segments derived from leaf discs of sweet potato cultivar Jewel. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 2: 81-84.
27. SAKAMOTO S. (1976) Breeding of a new sweet potato variety, Minamiyutaka, by the-use of wild relatives. Jpn Agric. Res. Q., 10: 183-186.
28. SHULTHEIS J.R., CANTLIFFE D.J., CHÉE R.P. (1990) Optimizing sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) root and plantlet formation by selection of proper embryo development stage and size, and gel type for fluidized sowing. Plant Cell Reports, 9: 356-359.
29. SIHACHAKR D. (1982 a) Utilisation de boutures de feuilles isolées de Patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) pour l'analyse de la tubérisation. Thèse Doc Etat, Université Paris Sud, Centre d'Orsay, 68 pp.
30. SIHACHAKR D. (1982 b) Premiers résultats concernant la multiplication végétative *in vitro* de la Patate douce (*Ipomoea batatas* Lam., Convolvulacées). Agronomie Tropicale 37:142-151.
31. SIHACHAKR D., DUCREUX G. (1987 a) Isolement et culture de protoplastes de deux variétés de Patate douce (*Ipomoea batatas* Lam.). Can. J. Bot., 65:192-197.

32. SIHACHAKR D., DUCREUX G. (1987 b) Plant regeneration from protoplast culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). Plant Cell Reports, 6: 326-328.
33. SIHACHAKR D., DUCREUX G. (1993) Regeneration of plants from protoplasts of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 23, Plant protoplast and genetic engineering IV, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 43-59.
34. SIHACHAKR D., CAVALCANTE-ALVES J.M., TIZROUTINE S., ALLOT M., MUSSIO I., SERVAES A., NOZHGE D., DUCREUX G. (1995) Embryogenèse somatique chez la Patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.): caractérisation et régénération des plantes. In: Dubois J, Demarly Y - AUPELF-UREF (eds) Quel avenir pour l'amélioration des plantes, John Libbey EUROTEXT, pp. 251-261.
35. SIHACHAKR D., HAICOUR R., CAVALCANTE ALVES J.M., UMBOH I., NZOGHE D., SERVAES A., DUCREUX G. (1997) Plant regeneration in sweet potato (*Ipomoea batatas* L., Convolvulaceae). Euphytica 96 : 143-152.
36. TEMPLETON-SOMERS K.M., COLLINS W.W. (1985) Genetic variation in sweet potato tissue cultures. HortScience, 20(4): 664 (abstract).
37. TEMPLETON-SOMERS K.M., COLLINS W.W. (1986) Heritability of regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Theor. Appl. Genet., 71: 835-841.
38. TSAI H.S., TSENG M.T. (1979) Embryoid formation and plantlet regeneration from anther callus of sweet potato. Bot. Bull. Acad. Sinica, 20: 117-122.
39. YANG T.H., TSAI Y.C., HSEU C.T., KO H.S., CHEN S.W., BLACKWELL R.Q. (1975) Protein content and its amino acid distribution of locally produced rice and sweet potato in Taiwan. J. Chinese Agric. Chem. Soc., 13:132-138.

E6 : Un modèle d'étude pour la régulation de l'accumulation d'un groupe ubiquitaire de protéines allergènes dans les plantes alimentaires

**CARPIN S., HAMDI S., VALENTA R., SCHOENTGEN F., CHÉNIEUX J.-C.,
RIDEAU M.**

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Biochimie Végétale, EA 2106, Faculté de
Pharmacie, 31 avenue Monge, 37200 Tours. Tel : 02 47 36 72 10, E-mail :
Chenieux@balzac.univ-tours.fr.

INTRODUCTION

La Pervenche de Madagascar, *Catharanthus roseus* (L) G. Don, Apocynacée tropicale accumule plusieurs alcaloïdes indoliques d'intérêt pharmacologique (ajmalicine, vinblastine, vincristine). Elle est également cultivée en Europe comme plante ornementale.

Au cours d'études sur la régulation des biosynthèses alcaloïdiques dans des cultures *in vitro* de cette espèce, nous avons observé, après électrophorèse bidimensionnelle, l'accumulation d'une protéine de 17 kDa (pHi : 6,5) stimulée par la présence de cytokinines dans le milieu de culture, et au contraire inhibée par l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), une auxine de synthèse (Carpin *et al.*, 1997). Nous avons souhaité identifier cette protéine cytokinine-dépendante et caractériser le gène correspondant.

RÉSULTATS

Dans une première étape, la partie N-terminale de cette protéine a été microséquencée sur 30 acides aminés qui sont donnés dans la figure 1 suivante :

NH2 - GVISYDMEIKSSLSAAKLFKAFVLDVGTLI

Figure 1.

À partir de cette séquence, nous avons sélectionné 2 amorces (soulignées dans la figure 1) qui ont été utilisées en combinaison avec un primer poly T pour rechercher le clone ADNc correspondant, par la technique de RT-PCR. Nous avons ainsi obtenu et séquencé un clone ADNc partiel codant la protéine T1. L'utilisation d'amorces internes nous a permis d'obtenir grâce à la technique de RACE-PCR la séquence complète en acides nucléiques, codant la protéine T1. Cette séquence est donnée en figure 2.

```

ccaaaacatcttctcaccactaaatatatatactctctcttttgccctccttaaattactttA
ataatttcttttcttctcattttgcataaaaaaaaaaaaaaATGGGTGTTATTTCTTATGAT
                                M G V I S Y D

ATGGAGATCAAATCCTCACTCTCAGCAGCTAAGTTATTCAAGGCTTTTGTCTCGATGTT
M E I K S S L S A A K L F K A F V L D V

GGTACCCTCATCAACAAAGCATTGCCTAATGTCATTAAGAGTGTGAGATCCTCCAAGGA
G T L I N K A L P N V I K S V E I L Q G

GATGGAGGTGCTGGTACTATCAAGTTGGTCCATTTCCGGTGAAGGTGGGCCAGTACCGAGT
D G G A G T I K L V H F G E G G P V P S

GTGAAGCACCATGTGGAGGAGTTGGACAAGGATAACATGAGTACAAATACAGTATTGTG
V K H H V E E L D K D N M S Y K Y S I V

GACGGAGAAGCTTTGATGCCCGGCTCCAGTCAATCTCTTACGTTATCAAAATCGAACCA
D G E A L M P G L Q S I S Y V I K I E P

TCCGGCCACGGTTCCGTCTGCAAGCACAACTACATTCCATTTCAAGGCTGGTTCCAAT
S G H G S V C K H N T T F H F K A G S N

ATTAACGAAGATGAAATTAAGGCTGGTAAAGAAAGGGCTGCCGAAATGATCAAAGCCGTT
I N E D E I K A G K E R A A E M I K A V

GAAGCTTACGTTCAAGCCAATCCAGATTATTAATAACAAAATCTGATTCTCTATTTCAA
E A Y V Q A N P D Y * *

ATAAATATATTGTATTTCTGTTTCAAGTGTGAGTTTTTTCTTCTAGAATAAATGCTAC
TGTGTTCTTCAGCAGTGGTGAGATTGATCAGTGATCATCTAAACAGGTTCTGAAGAAAT
TTTAATGGAATTAACGTTACTTACAAAAA

```

Figure 2. Séquence en acides nucléiques et en acides aminés du clone ADNc codant la protéine T1 (code d'accès dans la banque EMBL : Y10612).

Ce clone a été utilisé comme sonde radiomarquée dans des tests de Northern blot afin d'étudier l'expression des ARN messagers, codant la protéine T1, extraits de cals de *Pervenche* soumis à différentes conditions hormonales. Nous avons ainsi vérifié que l'accumulation des transcrits codant la protéine T1 est, comme cette dernière, stimulée par les cytokinines et inhibée par le 2,4-D.

<i>C. roseus</i>	-GVISYDMEI	KSSLSAAKLF	KAFVLDVGT	INKALPNVIK	SVEILQDGG	AGTIKLVHFG
Bet v1	MGVFNYES	TSVIPAA	KAFILDG	FPKVAPQ	SVENIEG	PGTIKKISFP
Mal d1	MGVYTFENE	TSEIPPS	KAFVLDAD	IPKIAPQ	QAEILEG	PGTIKKITFG
Api g1	MGVQTHVLE	TSSVSAEK	QGFVIDV	LPKAAPG	SVEI-KGD	PGTIKKITLP
Aopr1	MSSGSWSHEV	AVNVAAGR	KAAML	DWHNL	GPKIVP	DGSGS VGTIREIKIN

<i>C. roseus</i>	EGGPVPSVKH	HVEELDKDNM	SYKYSIVDGE	ALMPGLQ	SIS	YVIEKIEPSGH	-GSVCKHN
Bet v1a	EGFPFKYVKD	RVDEV	DHTNF	KYNYSVIEGG	PIGDTLEKIS	NEIKIVATPD	GGSIKISNK
Mal d1	EGSQYGVVKH	RID	SIDEASY	SYSYTLIEGD	ALTD	TIEKIS	YETKLVACGS
Api g1	DGGPITMTL	RIDG	VNKEAL	TFDYSVIDGD	ILLGFIESIE	NHVVLVPTAD	GGSIKTTAI
Aopr1	NPAIPFSYVK	ERLDFV	DHDK	FEVKQTLVEG	GGLGMFECAT	THFKFEPSSN	GGCNVKTAS

<i>C. roseus</i>	FHFKAGSNIN	EDEIKAGKER	AAEMIKAVEA	YVQANPD-Y
Bet v1	YHTKGDHEVK	AEQVKASKEM	GETLLRAVES	YLLAHS
Mal d1	-HTKGNIEIK	EEHVKGKKEK	AHGLFKLIES	YLKDH
Api g1	FHTKGDVAVP	EENIKYANEQ	NALFKALEA	YLIAN
Aopr1	YKILPGVADE	SAKAKEGITN	HM---	KATEA YLLANPTAY

Figure 3. Comparaison avec les séquences en acides aminés des protéines allergènes de Bouleau (Bet v 1), de Pommier (Mal d 1), de Céleri (Api g 1) et de l'Asperge (Aopr 1).

La comparaison de la séquence en acides aminés de la protéine avec celles de la banque de données EMBL a montré une très forte homologie entre notre protéine et plusieurs autres actuellement regroupées sous le terme de « protéines de pathogenèse intracellulaires » (IPR : Intracellular pathogenesis-related proteins) : figure 3 ci-dessus.

Parmi celles-ci figurent l'allergène principal des grains de pollen du Bouleau (Bet v1, Breiteneder et al., 1989), mais aussi des protéines caractérisées dans de nombreuses espèces alimentaires (Pomme de Terre, Haricot, Pois, Soja, Céleri, Persil, Pommier, Asperge), ou non (Tabac, Ginseng). Le caractère allergène a été clairement démontré pour certaines de ces protéines (AoPR 1 de l'Asperge, Mal d 1 de la Pomme, Api g 1 du Céleri dont les codes d'accès sont respectivement les suivants : X62103, Z48969, Z48967 ...), mais n'a pas été systématiquement recherché.

En ce qui concerne la protéine T1, nous avons souhaité rechercher un éventuel caractère allergène de celle-ci. Pour cela, nous avons réalisé des western blot qui ont été hybridés avec du sérum de patients allergiques à l'allergène Bet v 1, et avec des anticorps monoclonaux dirigés contre Bet v 1. Les résultats obtenus nous ont ainsi permis de démontrer que cette protéine de Pervenche était immunologiquement différente de Bet v 1 (données non montrées).

CONCLUSIONS

La protéine T1 caractérisée appartient donc à un groupe de protéines ubiquitaires, appelées IPR, et dont on connaît mal actuellement le rôle biologique. Selon certains travaux (Breiteneder et al., 1995 ; Ebner et al., 1995), la consommation des plantes alimentaires pré-citées pourraient représenter un danger pour les patients allergiques au pollen de Bouleau.

Ces cultures *in vitro* de Pervenche de Madagascar constituent un bon modèle pour étudier les facteurs environnementaux (hormones ou autres...) capables de réguler l'accumulation de telles protéines chez les végétaux. Ces études pourraient permettre de mieux comprendre le rôle de ces protéines au sein des végétaux et pourraient permettre de contrôler leur biosynthèse dans les espèces végétales alimentaires.

Bibliographie

1. CARPIN S., GARNIER F., ANDREU F., CHÉNIEUX J.C., RIDEAU M., HAMDI S. 1997, *Plant Physiol. Biochem.* 35 (8) : 603-608.
2. BREITENEDER H., PETTENBURGER K., BITO A., VALENTA R., KRAFT D., RUMPOLD H., SCHEINER O., BREITENBACH M. 1989, *EMBO* 8 : 1935-1938.
3. BREITENEDER H., HOFFMANN-SOMMERGRUBER K., O'RIORDAIN G., SUSANI M., AHORN H., EBNER C., KRAFT D., SCHEINER O. 1995, *Eur. J. Biochem.* 233 : 484-489.
4. EBNER C., HIRSCHWEHR R., BAUER L., BREITENEDER H., VALENTA R., EBNER H., KRAFT D., SCHEINER O. 1995, *J. Allergy Clin. Immunol.* 95 : 962-969.

SECTION E

**Textes et résumés des Affiches
de E7 à E45**

E7 : Relation entre l'activité spécifique des enzymes et la digestion de la paroi pour l'obtention de protoplastes de *Prunus cerasus* L. « Montmorency »

MEHRI-KAMOUN R.¹, LEPOIVRE Ph.², BOXUS Ph.³

¹ Laboratoire de Phytopathologie. FSAGx. 5030 Gembloux. Belgique.

Actuellement à l'École Supérieure d'horticulture de Chott-Meriem.4042 Sousse. Tunisie.

² Laboratoire de Phytopathologie. FSAGx. 5030 Gembloux. Belgique.

³ Station des cultures fruitières et maraîchères. CRAGx. 5030 Gembloux. Belgique.

INTRODUCTION

L'obtention de protoplastes nécessite l'élimination des parois pectocellulosiques tout en préservant l'intégrité de la cellule. Cet objectif ne sera atteint qu'en ajustant les types d'enzymes à utiliser. La complexité de la structure de la paroi végétale et la multiplicité des liaisons covalentes, qu'il faut rompre pour libérer le protoplaste, rendent souvent difficile l'optimisation des combinaisons d'enzymes aptes à la dégrader. En général, ces enzymes sont produites par des micro-organismes (*Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*...) et agissent sur les différents composés de la paroi végétale (Noat *et al.*, 1991). Outre leurs activités principales (cellulases, pectinases), ces préparations commerciales possèdent également des activités secondaires (a-amylase, endo β -glucanase et protéase) permettant la lyse complète de la paroi cellulaire.

La plupart des préparations commerciales d'enzymes contiennent des impuretés parfois toxiques (Chupeau & Bourgin, 1980), notamment d'autres enzymes (ribonucléases, protéases, lipases), des phénols et les sels résiduels aux milieux de culture de l'organisme producteur.

La pureté des enzymes représente un facteur important, à prendre en compte dans l'isolement des protoplastes pour éviter d'altérer la cellule particulièrement le plasmalemme (Pilet, 1972 ; Patnaik *et al.*, 1982 ; Bengochea & Dodds, 1980) afin de maintenir la viabilité des protoplastes, leur capacité à synthétiser une paroi et à entrer en division, une fois mis sur milieu de culture approprié (Imbrie-Milligan & Hodges, 1986 ; Dugas *et al.*, 1989 ; Shea *et al.*, 1989). Cette observation explique la nécessité parfois de purifier et/ou de dessaler les préparations enzymatiques commerciales pour augmenter le rendement et la viabilité des protoplastes. Ainsi une purification par un passage sur colonne de chromatographe, Gonzales-Rio & Revilla (1991), a amélioré le taux de viabilité des protoplastes d'*Actinidia* de 20-40 %.

Les enzymes pectolytiques se divisent en 2 groupes : les enzymes déestérifiantes et les enzymes dépolymérisantes. Le premier groupe hydrolyse les liaisons ester méthyliques, il s'agit de la pectine-méthyl estérase (PME) qui libère du méthanol et forme des pectates. Le deuxième groupe agit par hydrolyse (acide ou enzymatique) des liaisons α [1, 4] ou par des réactions de β -élimination propres aux polyuronides méthylés. Cette déestérification et dépolymérisation sont des réactions qui dépendent du pH et de la température (Thibault, 1980).

Dans ce présent travail, et dans le but d'isoler des protoplastes à partir de mésophylle foliaire et de cals (de racines et de feuilles) de *Prunus cerasus* L. « Montmorency », nous avons déterminé les solutions optimales d'enzymes en fonction des tissus sources et caractérisé ces solutions en terme d'activité spécifique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Isolement des protoplastes

Différentes combinaisons d'enzymes (cellulases et pectinases) ont été testées pour l'obtention de protoplastes à partir de mésophylle foliaire de vitroplants âgés de 2 semaines et de cals issus de feuilles et de racines de *Prunus cerasus* L. "Montmorency". Toutes les enzymes sont dissoutes dans la solution enzymatique CPW 13% mannitol additionnée de 5 mM MES (pH= 5,6).

Mesure de l'activité spécifique des cellulases et des pectinases utilisées pour l'isolement des protoplastes

Une étude de l'activité des préparations enzymatiques utilisées (cellulases et pectinases) pour l'obtention de protoplastes de mésophylle foliaire ou de cals a été effectuée. L'activité cellulasique des cellulases Onozuka R-10 et RS (Yakult Pharmaceutical, Japon) ont été mesurées en utilisant comme substrat du papier filtre (FPase) ou de la carboxyméthylcellulose tandis que les activités spécifiques polygalacturonase (PG), pectate lyase (PL) et pectine méthylestérase (PME) ont été mesurées pour la Macérozyme R-10 (Yakult Pharmaceutical, Japon) et Pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceutical).

Les dosages des protéines existant dans les préparations enzymatiques commerciales ont été réalisés suivant la méthode de Bradford (1976) afin de déterminer les quantités d'enzymes à mettre en jeu pour la détermination des activités spécifiques.

• Les cellulases

L'activité du complexe cellulasique total est mesurée par l'activité (FPase) sur papier filtre et par l'activité carboxyméthylcellulase (CMCase) en utilisant comme substrat le carboxyméthylcellulose (Hoechst). L'échantillon contenant 500 µl de la solution cellulase R-10 ou RS à 1 % est déposé soit sur 40 mg papier filtre (Whatman chromatography paper, N° 3001-653) pour la FPase, soit sur 40 mg de carboxyméthylcellulose (pour la CMCase). On ajoute ensuite 1 ml de tampon citrate 0,05 N (pH= 4,85). Ce mélange est incubé à 48°C pendant 1 h. La réaction est stoppée par incubation à 100°C pendant 20 min. L'activité FPase et CMCase est évaluée en dosant les sucres réducteurs libérés à partir des substrats. Une unité d'activité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme libérant 1 mg d'équivalent de glucose par mg d'enzyme et par heure.

• Les pectinases

- Analyse de l'activité pectate lyase (PL) contenue dans la Macérozyme R-10 et la Pectolyase Y-23

La technique de dosage de l'activité pectate lyase est basée sur le principe suivant : la pectine est dégradée sous l'action des pectate lyases par β -élimination. Cette réaction libère des composés contenant une double liaison entre C₄ et C₅ ; cette double liaison et le groupe carboxyle en C₅ entraînent une absorption maximale à 235 nm.

Le mélange réactionnel est constitué de 750 µl de la solution du substrat et le même volume de la solution des enzymes. La solution du substrat est préparée à partir de 0,5 % de polypectate de sodium (Sigma P 1879) dissous dans un tampon Tris-HCl 0,1 M à pH= 8,5. La solution des enzymes est obtenue en ajoutant un volume des échantillons (variant de 50 à 200 µl selon la teneur en protéines totales) à 37,5 µl de CaCl₂·2H₂O ($5 \cdot 10^{-4}$ mM) ; le tout est ensuite porté à un volume de 750 µl à l'aide du tampon Tris-HCl 0,1 M (22,4 g/l, pH= 8,5).

Ce mélange réactionnel est ensuite incubé pendant 1 h dans un bain thermostaté à 30°C. On arrête la réaction en plongeant les échantillons dans un bain à 100°C pendant 20 min. Après refroidissement, l'absorbance est mesurée dans des cuvettes en quartz à 235 nm. Le témoin est constitué de l'échantillon ayant subi une dénaturation (100 °C pendant 10 min). L'activité est exprimée en unité/µg de protéines. Une unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à l'augmentation d'absorbance de 0,01 U/min.

- Analyse de l'activité polygalacturonase (PG) contenue dans la Macérozyme R-10 et la Pectolyase Y-23

Les polygalacturonases catalysent l'hydrolyse des liaisons glucosidiques α -1,4 glycosidiques internes dans les polymères pectiques générant des oligomères d'acide galacturonique.

Le mélange réactionnel est constitué d'un mélange de 1 ml de la solution des enzymes à analyser et de 1 ml de la solution substrat. La solution servant de substrat à l'enzyme est préparée à partir de pectine NaPP (Sigma) dilué à 0,5 % dans de l'acétate de sodium (0,1 M ;

pH=5). Ces échantillons ont été incubés dans un bain-marie à 30°C et pendant 1 h. On ajoute à l'ensemble de ces échantillons 1 ml du réactif alcalin de sulfate de cuivre puis on dénature les protéines à 100°C pendant 20 min. Une fois les tubes refroidis, on ajoute alors 1 ml de réactif de molybdate d'arsenic. On agite le mélange et on centrifuge à 8000 tours/min pendant 10 min pour éliminer les éléments insolubles. On attend au moins 10 min afin que la réaction soit terminée. L'absorbance est alors mesurée au spectrophotomètre à 515 nm.

Le témoin est constitué d'un échantillon identique pour lequel l'enzyme a été préalablement dénaturée à 100°C pendant 10 min avant d'ajouter la solution substrat. Une unité (U) d'activité polygalacturonase est définie comme la libération de 1 µg d'acide galacturonique par min et par ml.

- Analyse de l'activité pectine méthylestérase (PME) contenue dans la Macérozyme R-10 et la Pectolyase Y-23

La pectine méthylestérase (PME) enlève spécifiquement les groupement méthoxyles qui sont substitués sur le C₆ de certains galacturonosyls. La mesure de son activité repose sur la variation du pH engendrée lors de la libération des groupements carboxyles, qui provoquent une acidification du milieu révélée par un indicateur et quantifiée par spectrophotométrie. Le substrat utilisé est la pectine estérifiée à 73 % (Fluka 76282) diluée à 1 % dans une solution NaCl à 0,15 % (pH= 7). L'indicateur de pH est le rouge de méthyle ajouté au substrat à la concentration de 5 %. On ajuste le pH de la solution à 7.

Le mélange réactionnel contient 750 µl de substrat et 750 µl de solution enzymatique (macérozyme ou pectolyase) et est incubé à 35°C dans un bain-marie pendant au moins 2 h. La lecture de l'absorbance se fait au spectrophotomètre à 520 nm. Une unité d'activité PME correspond à 10x le nombre de µl de NaOH 0,01M ajouté à pH=7 et à 35°C.

RÉSULTATS

Isolement de protoplastes

Dans le but d'isoler des protoplastes de mésophylle foliaire ou de cals (de feuilles ou de racines), nous avons optimisé la solution enzymatique nécessaire à chaque source de tissus et caractérisé la solution optimale par l'analyse des activités spécifiques des enzymes qu'elle contient.

À partir de feuilles, seule la solution contenant 1 % de Cellulase Onozuka R-10 et 0,1 % de Pectolyase Y-23 (comme pectinase) a permis d'isoler 6×10^6 protoplastes/g de feuilles présentant une viabilité de l'ordre de 59 %.

L'augmentation ou la diminution de la concentration en Cellulase R-10 ou en Pectolyase Y-23 n'a pas amélioré le rendement en protoplastes ni leur viabilité. Par contre, le remplacement de la cellulase Onozuka R-10 par la cellulase Onozuka RS a permis de doubler le rendement de protoplastes à partir de mésophylle foliaire de la « Montmorency » (de 6 à 14×10^6 protoplastes) et d'augmenter leur viabilité de 59 à 79 %.

L'isolement de protoplastes à partir de cals de feuilles et de cals de racines a nécessité l'utilisation 2 % de Cellulase R-10 et 0,03 % Macérozyme R-10 (comme pectinase). Les rendements respectifs obtenus sont $3,5$ et 8×10^6 protoplastes/g de poids frais avec un taux de viabilité respectif de 86 et 91 %.

Détermination des activités spécifiques des cellulases et pectinases commerciales utilisées pour l'isolement des protoplastes

Une fois la solution enzymatique optimum définie avec différentes préparations commerciales de cellulases et pectinases, nous avons entrepris l'analyse des activités enzymatiques FPase et CMCase et des activités enzymatiques PME (pectinéméthylestérase), PL (pectatélyase) et PG (polygalacturonase) qui sont présentes. Les tableaux 1 A & B regroupent les résultats relatifs à ces expériences.

- Activités Spécifiques PME, PL et PG contenues dans les pectinases : Macérozyme R-10 et Pectolyase Y-23

Le dosage de l'activité de la PME réalisé par la méthode spectrophotométrique (Cabra, 1994) a permis de détecter une faible activité PME dans la pectolyase Y-23 (inférieure à 1) et 10 fois plus forte dans la macérozyme R-10. L'activité pectate-lyase (PL) est très faible dans la pectolyase Y-23 ($0,32 \pm 0,06$), et inexistante dans la macérozyme R-10. Par contre, l'activité spécifique polygalacturonase (PG) observée, est approximativement 2 fois plus élevée dans la pectolyase Y-23 que dans la macérozyme R-10. Elle est de $10,60 \pm 1,13$ pour la pectolyase Y-23 et de $5,32 \pm 0,84$ pour la macérozyme R-10 (tableau 1-A).

- Activités Spécifiques FPase et CMCase contenues dans les cellulases Onozuka R-10 et RS

L'activité cellulasique a été définie par la capacité de dégrader le papier filtre (FPase) et le carboxyméthylcellulose (CMCase) (tableau 1-B). Il n'y a pas de différences significatives dans l'activité FPase entre la Cellulase Onozuka R-10 dérivant de *Trichoderma viride* et la Cellulase Onozuka RS dérivant du mutant de *Trichoderma viride*; par contre, l'activité CMCase de la Cellulase RS est près de 2 fois plus élevée que celle de la Cellulase R-10. Le fait que l'activité de dégradation du papier filtre (FPase) de la cellulase R-10 est la même que celle de la cellulase RS, laisse supposer que la première contient d'autres enzymes exprimant une activité FPase et n'existant pas dans la Cellulase RS.

Tableau 1-A : Activités spécifiques polygalacturonase (PG), pectate-lyase (PL) et pectinéméthylestérase (PME) contenues dans le Macérozyme R-10 et la Pectolyase Y-23.

Quantité d'enzymes	PG	PL	PME
Pectolyase Y-23	$10,60 \pm 1,13$	$0,32 \pm 0,06$	$0,93 \pm 0,01$
Macérozyme R10	$5,32 \pm 0,84$	0	$9,70 \pm 0,58$

La mesure de l'activité PL est effectuée par mesure de la densité optique à 235 nm. Une unité d'activité correspond à la variation de 0,18 d'absorbance par min à pH= 8,5 et à 30°C.

L'activité PME est quantifiée par mesure de la densité optique à 520 nm. Une unité d'activité PME correspond à $10 \times$ le nombre de μ l de NaOH 0,01 M par h, à pH=7 et à 35°.

L'activité PG est définie comme la libération de 1 μ g d'acide galacturonique par min et par ml.

L'activité enzymatique est exprimée en unités/mg protéine.

Les valeurs entre parenthèses représentent l'erreur standard (3 répétitions).

Tableau 1-B : Activités spécifiques FPase et CMCase contenues dans les cellulases Onozuka R-10 et RS.

Enzymes	FPase (mg équivalent de glucose / mg protéine)	CMCase (mg équivalent de glucose / mg protéine)
Cellulase RS	$2,37 \pm 0,3$	$0,98 \pm 0,2$
Cellulase R-10	$2,34 \pm 0,82$	$0,53 \pm 0,09$

FPase : Activité de décomposition du papier filtre. CMCase : Activité de décomposition de la carboxyméthylcellulose.

Une unité d'activité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme libérant 1 mg d'équivalent de glucose par h à partir d'un substrat (papier filtre ou carboxyméthylcellulose).

Les valeurs entre parenthèses représentent l'erreur standard (3 répétitions).

DISCUSSION

Il ressort de nos résultats que la digestion des tissus foliaires de la « Montmorency » nécessite l'utilisation en combinaison de la Cellulase RS et la Pectolyase Y-23 alors que les protoplastes

de cals (de feuilles ou de racines) peuvent être isolés avec la Cellulase R-10 et la Macérozyme R-10. D'autre part, l'utilisation de la Cellulase Onozuka RS et de la Pectolyase Y-23 (comme pectinase) a augmenté significativement le nombre et la viabilité des protoplastes de mésophylle foliaire par rapport à l'utilisation de la Cellulase Onozuka R-10 et de la Macérozyme R-10. Ces résultats sont corrélés avec l'activité spécifique de ces enzymes.

L'analyse de ces activités a permis d'établir une comparaison entre les différentes cellulases et pectinases employées en fonction des tissus sources de protoplastes. La caractérisation de la solution optimale a été effectuée en terme d'activités spécifiques PL, PG et PME des 2 pectinases (Macérozyme R-10 et Pectolyase Y-23) et d'activités FPase et CMCase des 2 cellulases (R-10 et RS) contenues dans les solutions. Ces enzymes clivent les parois végétales en libérant des oligomères par β -élimination (PL), par hydrolyse (PG) sur des pectines faiblement méthylées ou sur des pectines estérifiées par clivage de la liaison ester du groupement méthoxyl (PME). Les préparations de cellulases contiennent divers composés agissant en synergie pour transformer la cellulose en sucres solubles et ce, par hydrolyse des liaisons β , 1-4 glycosidiques.

Des différences significatives sont enregistrées entre les 2 pectinases étudiées concernant les activités PME, PG et PL et entre les 2 cellulases concernant l'activité CMCase. La différence la plus marquée entre les 2 pectinases concerne l'activité PG, et entre les 2 cellulases l'activité CMCase. L'utilisation de la Cellulase RS (forte activité CMCase) et de la Pectolyase Y-23 (forte activité PG), a augmenté la macération et la digestion des cellules, permettant l'obtention d'un grand nombre de protoplastes viables de mésophylle foliaire avec très peu de débris cellulaires et de cellules intactes alors qu'à partir de cals, le maximum de protoplastes viables a été obtenu avec la Cellulase R-10 (faible activité CMCase) et Macérozyme R-10 (faible activité PG). Ce qui souligne que la différence de sensibilité des parois de mésophylle foliaire ou de cals (de feuilles ou de racines) à l'action d'une enzyme peut rendre compte de la composition de la paroi comme l'ont évoqué Ochatt & Power (1990).

L'activité des enzymes a été rapportée par plusieurs auteurs comme étant un des facteurs déterminant de l'obtention des protoplastes mais jusqu'à présent, aucune recherche ne s'est intéressée à la relation entre le nombre et la viabilité de protoplastes obtenus d'une part, et l'activité spécifique des enzymes de digestion de la paroi d'autre part. Les auteurs se limitent à citer l'origine (micro-organismes de purification) (Beldman *et al.*, 1985; Grèzes *et al.*, 1994; Mills & Hammerschlag, 1994) ou les valeurs théoriques indiquées par les fournisseurs (Johnson *et al.*, 1982). Le composé de macération de la Macérozyme R-10 isolée de *Rhizopus sp.* (Yakult Pharmaceutical, Japan) est une endopolygalacturonase alors que la Pectolyase Y-23, qui est une enzyme hautement purifiée d'*Aspergillus japonicus* et contient 2 types de pectinases : une endopolygalacturonase et une endopectine lyase qui sont capables de l'hydrolyse des liaisons.

Nous avons caractérisé la solution optimale d'enzymes en terme d'activité spécifique bien que ces seules activités ne permettent pas d'expliquer entièrement, leur action sur la macération et la digestion des parois pectocellulosiques des tissus. Les activités secondaires (a-amylase, protéases...) et les impuretés que contiennent les enzymes commerciales (phénols, sels résiduels) peuvent également influencer l'obtention des protoplastes. D'où la nécessité de parfois purifier ou de dessaler ces préparations en vue d'augmenter le rendement et surtout la viabilité des protoplastes isolés comme le suggèrent Gonzales-Rio & Revilla (1991) sur l'*Actinidia*.

La différence de sensibilité des parois de mésophylle foliaire ou de cals de feuilles ou de racines peut rendre compte de la composition de la paroi. Cette étude préliminaire mérite d'être approfondie et élargie à d'autres enzymes existant dans les préparations commerciales intervenant dans la digestion de la paroi et d'établir les rôles de ces enzymes sur la dégradation de la paroi cellulaire des tissus sources de protoplastes.

Bibliographie

1. BENGOCHEA T., DODDS J.H. [1986]. Isolation, culture and regeneration of plants. In Plant protoplasts : A biotechnological tool for plant improvement. (Eds) Brammar W.J. & Edidin M. Chapman & Hall. London -New York: 1-43.
2. BRADFORD M.M. [1976]. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 : 248-254.
3. CABRA G. [1994]. Sélection et caractérisation d'un variant somaclonal de pomme de terre résistant à *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Van Hall). Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. 121p.
4. CHUPEAU Y., BOURGIN J.P. [1980]. Les protoplastes des cellules végétales. In : Multiplication végétative des plantes supérieures. (Eds) CHAUSSAT R. & BIGOT R. Gauthiers- Villars. Paris
5. DUGAS C.M., LI Q., KHAN I.A., NOTHNAGEL E.A. [1989]. Lateral diffusion in plasma membrane of maize protoplasts with implications for cell culture. *Planta*. 179: 387-396.
6. GONZALES-RIO T., REVILLA M.A. [1991]. Evaluation of parameters affecting yield viability and cell division of *Actinidiaceae* protoplasts. 8th International protoplast symposium. *Physiologia Plantarum*. 82 (1) A 85.
7. GREZES J., THOMAS D., THOMASSET B. [1994]. Factors influencing protoplast isolation from *Coffea arabica* cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 36: 91-97.
8. IMBRIE-MILLIGAN C. HODGES T.K. [1986]. Microcallus formation from Maize protoplasts prepared from embryogenic callus. *Planta* 168: 395-401.
9. JOHNSON L.B., STUTEVILLE D.L., HIGGINS R.K., DOUGLAS H.L. [1982]. Pectolyase Y-23 for isolating mesophyll protoplasts from several *Medicago* species. *Plant Science Letters*. 26 133-137.
10. KAMOUN R. [1996]. Culture de protoplastes et contaminants procaryotiques de *Prunus cerasus* L. « Montmorency ». Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. 150p.
11. MILLS D., HAMMERSCHLAG F.A. [1994]. Isolation of cells and protoplasts from leaves of *in vitro* propagated peach (*Prunus persica*) plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 36: 99-105.
12. NOAT G., NARI J., MOUSTACAS A-M., BOREL M. [1991]. Propriétés des parois cellulaires végétales et interaction matrice-enzymes. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 138, Actualités botaniques (3/4): 263-277.
13. OCHATS J., POWER J.B. [1990]. Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. In: Comprehensive Biotechnology. (Ed) Moo-Young M., Warren G.S., Fowler M.W. Pergamon Press. New York : 100-127.
14. PATNAIK G., WILSON D., COCKING E.C. [1982]. Importance of enzyme purification for increasing plating efficiency and plant regeneration from single protoplasts of *Petunia purouinii*. *Z Pflanzenphysiol*. 102: 199-205.
15. PILET P.E. [1972]. Transaminase activities of root protoplasts. *Experientia* 28: 638- 639.
16. SHEA E.M., GIBEAUT D.M., CARPITA N.C. [1989]. Structural analysis of the cell walls regenerated by carrot protoplasts. *Planta* 179: 293-308.
17. THIBAUT J.F. [1980]. Les substances pectiques, In : Les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés. (Eds) MONTIES B. Gauthier-Villars. 233-251.

E8 : Utilisation de l'électrofusion de protoplastes pour l'amélioration de la Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.)

**ELLOUZ O.¹, LAKHOVA L.¹, JADARI R.², MUSSIO I.³, SERVAES A.³, AMBROISE A.³,
DUCREUX G.³, SIHACHAKR D.³**

¹ Laboratoire de Culture *in vitro*, École Nationale d'Ingénieurs de Sfax (ENIS), BP " W ", 3038 Sfax, Tunisie ;

² Laboratoire de Culture *in vitro*, Dept d'Horticulture, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II (IAVH), Rabat Institut, BP 6202, Rabat, Maroc ;

³ Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât. 360, Université Paris Sud, 91405 Orsay Cedex, France :
télécopie : +33 (0)1 69 85 54 90, e.mail : dara.sihachakr@mve.u-psud.fr

INTRODUCTION

Les variétés de pomme de terre cultivée sont toutes tétraploïdes ($2n = 4x = 48$ chromosomes) (Rossignol et al. 1996). L'état tétraploïde améliore la vigueur, le rendement et la qualité des tubercules ; mais la sélection au niveau tétraploïde est longue et laborieuse. La sélection au niveau diploïde est possible grâce à l'obtention des génotypes diploïdes à partir des variétés tétraploïdes par parthénogenèse (Hougas et Peloquin 1957). De plus, elle permet aussi, par croisements sexués, l'accès à l'importante source de variabilité génétique et de résistance constituée par des espèces sauvages ou primitives apparentées à la pomme de terre et diploïdes pour la plupart. Toutefois, ces diploïdes améliorés ne peuvent constituer, en aucun cas, des variétés, et il est nécessaire de revenir au niveau tétraploïde. Ainsi, dans les programmes d'amélioration de la Pomme de terre, l'hybridation somatique, notamment intraspécifique, peut se situer en aval de la sélection pour combiner ensemble des génotypes dihaploïdes sélectionnés ($2n = 2x = 24$) afin de les remonter au niveau tétraploïde ($2n = 4x = 48$) tout en maintenant l'état hétérozygote indispensable à une bonne vigueur, et indépendamment de la reproduction sexuée. Les hybrides ainsi obtenus peuvent constituer de nouvelles variétés immédiatement utilisables, s'ils répondent aux critères agronomiques et commerciaux exigés (Debnath et Wenzel 1987 ; Chaput et al. 1990 ; Millam et al. 1995 ; Pehu 1996).

Dans ce travail, nous avons combiné ensemble trois génotypes dihaploïdes (Aminca, Cardinal et Nicola) de pomme de terre par électrofusion de protoplastes, afin d'étudier le comportement des hybrides somatiques obtenus et d'isoler les meilleures combinaisons génomiques de pomme de terre.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Trois clones dihaploïdes de Pomme de terre ($2n = 2x = 24$), gracieusement fournis par l'INRA de Landerneau – France, sont utilisés pour réaliser des fusions intraspécifiques : Nicola H1, Aminca H6 et Cardinal H14. Les génotypes dihaploïdes sélectionnés présentent certaines caractéristiques intéressantes, telles qu'une très grande productivité en Tunisie pour la variété Nicola, une maturation très précoce et une dormance de courte durée du tubercule pour Aminca, et une bonne qualité de tubercules à peau rouge pour Cardinal. De plus, Aminca et Cardinal sont résistantes au pathotype A du nématode doré et à certains virus.

La micropropagation des clones est réalisée par microbouturage sur le milieu de MS (Murashige et Skoog 1962) additionné de vitamines (Morel et Wetmore 1951), de 20 g/l de saccharose et solidifié par l'ajout de 8 g/l d'agar. Les cultures sont exposées à une photopériode de 12 h/j de lumière d'une intensité de 62 $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$ et à une température 20° C.

Isolement et culture des protoplastes, et régénération de plantes

Le protocole d'isolement de protoplastes et de régénération de plantes a été précédemment décrit (Chaput et al. 1990). Brièvement, des mésophylles prélevés sur des plantes *in vitro* âgées de 3-4 semaines ont été scarifiés et mis en incubation dans une solution enzymatique composée de sels minéraux (Frearson et al. 1973), de 0,5 % (m/v) de Cellulase RS, de 0,05 % (m/v) de Pectolyase Y23 et de 0,5 M de mannitol, le pH étant ajusté à 5,5. Après une période de digestion de 16 h à 27°C et à l'obscurité, les protoplastes ont été purifiés et rincés respectivement dans une solution de saccharose à 21 % (m/v), et une solution de rinçage contenant 0,5 M de mannitol et 0,5 mM de CaCl_2 .

Les protoplastes fusionnés sont cultivés dans le milieu liquide V-KM (Binding et al. 1978) additionné de 250 mg/l de polyéthylène glycol (PEG), de 0,2 mg/l d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), de 0,5 mg/l de zéatine et de 1 mg/l d'acide α -naphthalèneacétique (ANA). La pression osmotique est assurée par l'ajout de 0,18 M de glucose et de 0,18 M de mannitol.

Les cals suffisamment développés ont été repiqués dans le milieu de régénération MS (Murashige et Skoog 1962) contenant notamment 2 mg/l de zéatine et 0,1 mg/l d'acide indole-3-acétique (AIA).

Protocole d'électrofusion

L'appareillage d'électrofusion et le protocole de fusion ont été précédemment décrits (Sihachakr et al. 1988). Brièvement, la chambre de fusion, constituée d'électrodes parallèles, est placée au fond d'une boîte de pétri (15 x 50 mm) contenant environ 600-700 μl d'un mélange, à parties égales, de protoplastes des deux parents. La densité des suspensions de protoplastes est ajustée à 4×10^5 protoplastes/ml. L'application d'un courant sinusoïdal de haute fréquence (1 MHz) pendant 15 s provoque l'alignement des protoplastes, assurant ainsi le contact membranaire nécessaire à la fusion cellulaire. La fusion est réalisée à la suite de l'application de 1-2 impulsions d'un champ électrique d'une amplitude de 1,2 KV/cm, pendant 40 μs chacune.

Analyse morphologique en serre

Les plantes sélectionnées, qui sont des hybrides putatifs, et les clones parentaux sont transférées en serre pour une étude morphologique des parties aérienne et souterraine.

Analyse des isoenzymes

Les extraits bruts ont été préparés à partir de plantes obtenues *in vitro* âgées de six à huit semaines. Les systèmes de phosphoglucomutase (Pgm), d'isocitrate déshydrogénase (Idh) et de malate déshydrogénase (Mdh) sont analysés par électrophorèse sur gel d'amidon à 13 % selon le protocole décrit par Chaput et al. (1990). Les systèmes des peroxydases (Prx) et des estérases (Est) sont révélés sur gel de polyacrylamide selon le protocole de Cavalcante et al. (1994).

Étude cytologique

Les comptages chromosomiques ont été réalisés sur l'apex racinaire prélevé sur des plantes, après une semaine de repiquage sur le milieu MS additionné de 0,02 mg/l d'ANA afin de favoriser l'apparition de racines adventives. La coloration a été faite au carmin acétique (Sihachakr et al. 1988).

Étude de la microtubérisation

Pour cette étude, le protocole de microtubérisation mis au point par Lakhoua et Ellouz (1990) a été utilisé. Brièvement, des boutures nodales munies de la feuille axillaire ont été repiquées sur du milieu MS, contenant une quantité double des macroéléments, 80 g/l de saccharose, 5 mg/l de benzylaminopurine (BAP) et solidifié par 8 g/l d'agar. Les cultures sont exposées à la lumière pendant 2 semaines avant d'être transférées à l'obscurité à 20°C. Nous avons suivi le phénomène de tubérisation *in vitro* et estimé le taux de tubérisation [(nombre de boutures tubérisées/nombre de boutures ayant démarrées) x 100] pendant 55 jours.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Afin d'optimiser le taux de fusion, deux paramètres ont été testés sur des protoplastes isolés : la concentration en ions Ca^{2+} et l'amplitude du courant continu. Le taux de fusion est optimal pour une concentration de 0,5 mM d'ions calcium sous une amplitude de 1250V/cm ; tandis qu'à 1 mM ou en absence de Ca^{2+} , le taux de fusion se trouve à un niveau très faible pour tous voltages confondus. Ces observations sont en accord avec des travaux antérieurs concernant l'amélioration du taux de fusion, notamment binaire, par la présence d'ions Ca^{2+} (Tempelaar et al. 1987 ; Sihachakr et al. 1994). Par ailleurs, on a constaté que le taux de fusion reste à un niveau très bas pour un faible voltage (1000 V/cm) quelle que soit la concentration en ions calcium utilisée. Pour des voltages élevés, supérieurs à 1250 V/cm, on assiste à l'éclatement des protoplastes et aussi à la formation de fusions multiples.

Dans le milieu VKM (Binding et al. 1978), la plupart des protoplastes issus du traitement électrique synthétisent une paroi cellulaire en 48 h. Après 10 j de culture, 75 % des protoplastes traités survivent, mais seulement 6,5 % d'entre eux ont subi des divisions soutenues aboutissant à la formation de microcals visibles à l'œil nu après 2 semaines de culture. Un début de brunissement des microcals apparaît deux semaines plus tard, nécessitant l'apport du milieu frais pour renouveler les constituants nutritifs favorables au développement cellulaire (Sihachakr et al. 1994). Les cultures sont alors diluées 10 fois dans le milieu VKM dont les régulateurs de croissance ont été remplacés par 0,2 mg/l de 2,4-D et 2 mg/l de BAP. Cependant, un séjour trop prolongé (au-delà de 6-8 semaines) dans ce milieu de dilution conduit à l'arrêt de croissance des cals dont certains brunissent et meurent quelques semaines plus tard. Le maintien d'une croissance rapide et soutenue de cals nécessite leur transfert, à l'aide d'une pipette de 5 ml, sur du milieu MS (Murashige et Skoog 1962) solide contenant des vitamines (Morel et Wetmore 1951), 20 g/l de saccharose, 7 g/l d'agar et une combinaison de 0,5 mg/l de zéatine et de 0,5 mg/l d'ANA. Après 2 à 3 semaines sur le milieu de croissance, les cals suffisamment développés sont transférés sur le milieu de régénération contenant notamment 2 mg/l de zéatine et 0,1 mg/l d'AIA. Les premières régénérations apparaissent au bout de 4-5 semaines de culture. En moyenne, le taux de régénération est estimé à 6-7 % après 6 à 8 semaines de culture. Les jeunes pousses développées d'environ 2 cm sont séparées de leur cal et transférées sur le milieu de multiplication pour des analyses ultérieures.

La sélection préliminaire des structures hybrides est basée sur la vigueur et le comportement des plantes *in vitro*. Ainsi, parmi les 75 plantes régénérées à partir du couple de fusion (Am. Car), nous avons sélectionné 3 plantes hybrides putatives, et 2 autres parmi les 54 régénérées du couple de fusion (Car, Ni). Les 5 plantes sélectionnées sont toutes tétraploïdes. Transplantées en serre, elles sont très vigoureuses et dépassent en hauteur les clones parentaux. Elles présentent une morphologie intermédiaire et sont capables de tubériser. Les tubercules issus de plantes sélectionnées ont une peau rose intermédiaire entre la peau rouge des tubercules de la variété Cardinal et jaune des variétés Aminca et Nicola. La nature hybride des plantes sélectionnées a été confirmée par l'analyse des isoenzymes dont le profil présente les bandes complémentaires des clones parentaux et aussi une bande supplémentaire spécifique de l'état hybride notamment pour les systèmes Mdh et Idh.

La stabilité et la morphologie normale des plantes hybrides somatiques obtenues dans cette étude sont sans doute liées à leur état tétraploïde stable. Ceci est probablement dû à l'utilisation de tissus différenciés tels que le mésophylle comme source de protoplastes (Guri et Sink 1988 ; Sihachakr et al. 1988, 1994 ; Jadari et al. 1992 ; Serraf et al. 1994). Les résultats obtenus dans ce travail sont en accord avec d'autres auteurs concernant la régénération des hybrides somatiques tétraploïdes à partir de fusions somatiques intraspécifiques (Debnath et Wenzel 1987 ; Chaput et al. 1990) et interspécifiques chez la pomme de terre (Fish et al. 1988 ; Serraf et al. 1991 ; Jadari et al. 1992). Par contre, d'autres travaux ont abouti à l'obtention de structures hybrides somatiques hexaploïdes et mixoploïdes (Waara et al. 1991) ou même octoploïdes de pomme de terre (Puite et al. 1986).

L'évaluation préliminaire de la capacité à tubériser *in vitro* a montré que les clones hybrides forment les tubercules très tôt. Après 55 j de culture, tous les clones hybrides ont tubérisé à 100 %, alors que seulement la moitié des clones parentaux a initié à peine la tubérisation. Les

différentes caractéristiques des tubercules obtenus *in vitro* sont résumées dans le tableau 1. La masse moyenne des microtubercules hybrides et leur calibre sont nettement supérieurs à ceux des clones parentaux. De plus, ils ont une peau de couleur rose, confirmant ainsi la nature hybride des clones sélectionnés.

Tableau 1. Caractéristiques des microtubercules formés par des hybrides somatiques et des clones parentaux (Ellouz 1995)

Génotype	Masse moyenne (mg/tubercule)	Long. moy. (mm)	Larg. Moy. (mm)	Couleur
Cardinal (2x)	19,2±5,1	2,9±0,4	2,4±0,3	Rouge
Nicola (2x)	8,1±4,9	2,5±0,7	1,6±0,3	Jaune
Nicola (4x)	7,7±2,7	2,5±0,5	1,8±0,3	Jaune
Car-Ni 1	114,3±16,5	6,5±0,4	5,3±0,3	Rose
Car-Ni 2	87,3±10,7	5,9±0,4	4,6±0,3	Rose
Aminca (2x)	22,2±3,2	3,2±0,3	2,8±0,3	Jaune
Am-Car 2'	56,6±6,3	5,4±0,5	4,0±0,2	Rose
Am-Car 31	80,0±14,8	5,8±0,6	4,8±0,3	Rose
Am-Car 33	76,9	5,9	4,3	Rose

Les hybrides somatiques intraspécifiques de pomme de terre obtenus dans cette étude présentent une vigueur importante qui se traduit au niveau de la morphologie générale des plantes, de la croissance en hauteur et de la taille des feuilles, ainsi qu'au niveau de la tubérisation *in vitro*. Cette vigueur est certainement due à l'état tétraploïde hétérozygote obtenu à la suite de fusion entre deux protoplastes différents. Des résultats similaires concernant la vigueur des hybrides somatiques intraspécifiques de pomme de terre ont été obtenus par d'autres chercheurs (Austin et al. 1985 ; Debnath et Wenzel 1987 ; Chaput et al. 1990 ; Rasmussen et al. 1996).

CONCLUSION

L'efficacité de la méthode de fusion et de régénération de protoplastes utilisée pour l'obtention des structures hybrides somatiques, associée à la maîtrise de la technique de multiplication notamment à travers les microtubercules, ouvre sans doute de nouvelles perspectives pour l'intégration de ces techniques nouvelles dans les programmes de sélection de la pomme de terre en complément des méthodes conventionnelles. Dans ce cas, il est possible d'étendre le processus de production et de diffusion rapide à d'autres génotypes intéressants, dont le choix se fera en fonction de la complémentarité de leurs caractères, des contraintes environnementales et aussi des exigences des consommateurs.

Remerciements

Nous remercions le Comité Mixte de Coopération Universitaire (CMCU) (Coopération Franco-Tunisienne) et le Fonds International de Coopération Universitaire (FICU) (AUPELF.UREF) pour leur soutien financier.

Bibliographie

1. AUSTIN S., BAER M.A., HELGESON J.P. (1985) Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *Solanum brevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion. *Plant Sci* 39:75-82.
2. BINDING H., NEHLS R., SCHIEDER O., SOPORY S.K., WENZEL G. (1978) Regeneration of mesophyll protoplasts isolated from dihaploid clones of *Solanum tuberosum*. *Physiol Plant* 43 :52-54.
3. CAVALCANTE ALVES J.M., SIHACHAKR D., ALLOT M., TIZROUTINE S., MUSSIO I., SERVAES A., DUCREUX G. (1994) Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) *Plant Cell Rep* 13. 437-441
4. CHAPUT M.H., SIHACHAKR D., DUCREUX G., MARIE D., BARGHI N. (1990) Somatic hybrid plants produced by electrofusion between dihaploid potatoes : BF15 (H1), Aminca (H6) and Cardinal (H3). *Plant Cell Rep* 9 :411-414.
5. DEBNATH S.C., WENZEL G. (1987) Selection of somatic fusion products in potato by hybrid vigour. *Potato Res* 30 :371-380.
6. ELLOUZ O. (1995) Amélioration de la pomme de terre par hybridation somatique Thèse spécialité Ecole Nationale des Ingénieurs Sfax, Tunisie.
7. FISH N., KARP A., JONES M.J.K. (1988) Production of somatic hybrids by electrofusion in *Solanum*. *Theor Appl Genet* 76 : 260-266.
8. FREARSON E.M., POWER J.B., COCKING E.C. (1973) the isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev Biol* 33 :130-137.
9. GURI A., SINK K.C. (1988) Interspecific somatic hybrid plants between eggplant (*Solanum melongena*) and *Solanum torvum*. *Theor Appl Genet* 76 : 490-496.
10. HOUGAS R.W., PELOQUIN S.J. (1957) A haploid plant of potato variety Katadin. *Nature* 180 : 1209-1210.
11. JADARI R., SIHACHAKR D., ROSSIGNOL L., DUCREUX G. (1992) Transfer of resistance to *Verticillium dahliae* Kleb. from *Solanum torvum* SW into potato (*Solanum tuberosum* L.) by protoplast electrofusion. *Euphytica* 64 :39-47.
12. LAKHOUA L., ELLOUZ O. (1990) Induction de la microtubérisation chez *Solanum tuberosum* L. var Spunta. In : 'Cinquantiennaire de la culture *in vitro* chez les végétaux'. Les colloques de l'INRA (N°51) (DORE C., ed). pp: 279-281.
13. MILLAM S., PAYNE L.A., MACKAY G.R. (1995) The integration of protoplast-derived material into a potato breeding program. A review of progress and problems. *Euphytica* 85 : 451-455.
14. MOREL G. WETMORE R.H. (1951) Fern callus tissue culture. *Am. J. Bot.* 38.141-143.
15. MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
16. PEHU E. (1996) The current status of knowledge on the cellular biology of potato. *Potato Res* 39 . 429-435.
17. PUITE K.J.S., ROEST S., PIJNACKER L.P. (1986) Somatic hybrid potato plants after electrofusion of dihaploid *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Cell Rep* 5 : 262-265.
18. RASMUSSEN J.O., NEPPER J.P., RASMUSSEN O.S (1996) Analysis of somatic hybrids between 2 sterile dihaploid *Solanum tuberosum* L. breeding lines ; restoration of fertility and complementation of Globodera pallida Pa2 and Pa3 resistance. *Theor Appl Genet* 92 : 403-410
19. ROSSIGNOL L., ROUSSELLE-BOURGEOISE F. (1996) Botanique, morphologie et taxinomie. In : P Rousselle, Y Robert, PC Crosnier (eds) La pomme de terre, INRA Editions, Paris, pp49-69
20. SERRAF I., SIHACHAKR D., BROWN S., BARGHI N., DUCREUX G., ROSSIGNOL L. (1991) Interspecific somatic hybridization in potato by electrofusion. *Plant Sci* 76 . 115-126.
21. SERRAF I., TIZROUTINE S., CHAPUT M.H., ALLOT M., MUSSIO I., SIHACHAKR D., ROSSIGNOL L., DUCREUX G. (1994) Production and characterization of intergeneric somatic hybrids through protoplast electrofusion between potato (*Solanum tuberosum* L.) and *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Cell Tissue Org Cult* 37: 137-144.
22. SIHACHAKR D., DAUNAY M.C., SERRAF I., CHAPUT M.H., MUSSIO I., HAICOUR R., ROSSIGNOL L., DUCREUX G. (1994) Somatic hybridization of eggplant (*Solanum melongena* L.) with its close and wild relatives. In : Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, Vol 27, Somatic hybridization in crop improvement I. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp255-278
23. SIHACHAKR D., HAICOUR R., SERRAF I., BARRIENTOS E., HERBRETEAU C., DUCREUX G., ROSSIGNOL L., SOUVANNAVONG V. (1988) Electrofusion for the production of somatic hybrid plants of *Solanum melongena* L. and *Solanum khasianum* CV Clark. *Plant Sci* 57 :215-223.
24. TEMPELAAR M.J., DUYST A., DE VLAS S.Y., KROL G., SYMMONDS C., JONES M J K. (1987) Modulation and direction of the electrofusion response in plant protoplasts. *Plant Sci.* 48 : 99-105.
25. WAARA S., WALLIN A., ERIKSSON T. (1991) Production and analysis of intraspecific somatic hybrids of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Sci* 75 : 107-115.

E9 : Production de fruits et d'embryons diploïdes par traitement à l'acide gibbérellique des inflorescences non pollinisées du palmier dattier (*Phoenix dactylofera* L.).

BEN ABDALLAH A.¹, LEPOIVRE P.², DU JARDIN P.³

¹ : Laboratoire de culture de tissus et d'amélioration du palmier dattier, Centre de Recherches Phoenicicoles, INRAT, 2260 Degache, Tunisie.

² : Unité de Phytopathologie et ³ : Unité de Biologie végétale, Faculté universitaire des Sciences agronomiques, Gembloux, Belgique.

INTRODUCTION

L'acide gibbérellique (AG) est une hormone dont les effets sur la croissance et le développement des plantes sont très nombreux. Au moment de la floraison, l'application d'AG améliore la nouaison et la fructification de nombreuses espèces fruitières comme le poirier, le pommier ou les *Citrus* (Gianfagna, 1995).

Chez le palmier dattier, on sait que le traitement à l'acide gibbérellique des inflorescences femelles lors de l'éclatement des spathes permet d'améliorer le taux de nouaison, le taux de fructification et augmente le poids des fruits (Abbas et Seif, 1993).

Ce travail tente de préciser l'action de l'acide gibbérellique sur la fructification du palmier dattier en appliquant les traitements d'AG3 en conditions contrôlées de pollinisation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Quatre cultivars femelles ont fait l'objet de nos travaux menés au cours de 2 années successives : Deglet nour, Allig et Menakher (3 cultivars à dattes demi molles) et Kentichi (cultivar à dattes sèche). Pour chaque cultivar, nous avons utilisé un plant sur lequel huit inflorescences ont été sélectionnées (permettant six traitements différents à l'acide gibbérellique et les 2 témoins). Différentes solutions aqueuses d'acide gibbérellique (AG3-Sigma lot 126F-O116) ont été appliquées par pulvérisation au niveau d'une inflorescence sur chaque plant des 4 cultivars. Au niveau de chaque plant, deux inflorescences ont été retenues comme témoins. La première de ces inflorescences (témoin T1) est restée non pollinisée et non traitée à l'acide gibbérellique tandis que la seconde (témoin T2) a été pollinisée normalement avec le pollen récolté du génotype T23 (identifié comme étant un bon pollinisateur de ces cultivars femelles).

Avant l'éclatement des spathes, les inflorescences ont été ensachées avec du papier kraft. Une première pulvérisation d'acide gibbérellique a été réalisée lors de leur éclatement, suivie d'une pulvérisation avec la même concentration, sept jours plus tard. L'ensachage a été maintenu pendant un mois jusqu'à la nouaison afin d'éviter toute pollinisation non contrôlée. Le témoin T1 a été maintenu ensaché jusqu'à la nouaison.

À l'enlèvement des sacs, un mois après le dernier traitement, le nombre de fruits noués et de cupules de fleurs chutées ont été dénombrés par épillets et le pourcentage de nouaison (rapport entre les fruits noués et le nombre total des fleurs) est alors calculé. À la maturité des fruits, les noyaux ont été récoltés, mis à germer et le niveaux de ploïdie des plantules a été déterminé par cytométrie de flux.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les traitements à l'AG des inflorescences non pollinisées des quatre cultivars femelles étudiés (Deglet nour, Allig, Kentichi et Menakher) a permis d'obtenir une nouaison et la formation de

fruits (contenant des noyaux d'aspect normaux) avec des taux variables selon les cultivars mais avoisinant les taux de nouaison observés chez les témoins pollinisés normalement (30 à 45 %) alors que les inflorescences non pollinisées et non traitées avec AG n'ont donné que peu de fruits noués (0,9 à 9%) et aucun embryon (tableau 1).

Tableau 1 : % de fruits noués sur les inflorescences traitées avec AG3.

Cultivars	Concentration en AG3 (mg/ml)								T1	T2
	1	3	5	10	30	60	100	200		
Deglet Nour			35,4	31,1	20,6	29	20,8	31,3	0,9	45,4
Allig			26,8	28,9	32,8	28,9	33,0	26,0	4,0	35,6
Menakher	14,6	39,3	24,5	20,7	13	17,6			1,0	34,0
Kentichi	64,4	36,2	41,2	41,6	38,6	41,0			9,4	38

Les différents paramètres ont été mesurés en utilisant 20 fruits par traitement. Des différences significatives (test de Newman et Keuls au seuil de 5 %) ont été observées au niveau du poids frais des fruits (tableau 2).

Tableau 2 : Effet des traitements des inflorescences à l'AG3 sur le poids frais.

Cultivars	Concentration en AG3 (mg/ml)								T2
	1	3	5	10	30	60	100	200	
Deglet Nour			17,1	16,6	15,0	13,4	16,1	12,8	12,4
Allig			12,0	11,5	10,8	10,4	12,2	11,3	10,3
Menakher	22,5	19,4	17,8	18,4	17,5	18,6			19,3
Kentichi	8,5	7,8	8,1	7,5	8,0	8,2			7,4

Par rapport aux fruits obtenus par pollinisation, le traitement à l'AG3 a entraîné une augmentation du poids moyen des fruits mais l'AG3 n'a eu aucun effet significatif sur le poids moyen des noyaux ainsi que sur la dimension des fruits (longueur et diamètre). Les dattes récoltées après traitement à l'AG3 contiennent moins de sucre totaux (25 à 30 % au lieu des 50 % chez T2), mais leur contenu en glucose et fructose reste inchangé (résultats non publiés).

Les noyaux obtenus à partir des fruits récoltés des inflorescences traitées à l'AG montrent, toutes concentrations d'AG3 confondues, un % de germination identique à celui des noyaux obtenus par fécondation normale. Cinquante plantules issues de ces noyaux présentent toutes un niveau de ploïdie identique aux plantes récoltées sur T2 et obtenues par hybridation classique (tableau 3).

Tableau 3 : % de germination et niveau de ploïdie des cultivars.

Cultivars	% de germination	
	Traitement à l'AG3	T2
Deglet Nour	96/120 (2n)	18/20 (2n)
Kentichi	72/120 (2n)	16/20 (2n)

Les plantes obtenues par traitement à l'AG3 des inflorescences non pollinisées pourraient provenir (1) d'une pseudogamie et d'une parthénogenèse induite *in situ*, résultant en la formation des haploïdes doublés ou plus probablement (2) une apomixie gamétophytique qui donne des diploïdes sans qu'il y ait méiose. Les haploïdes doublés permettraient d'accélérer les programmes d'amélioration du palmier dattier. Par contre, l'apomixie permettrait d'obtenir des plantes conformes aux plantes mères, par simple traitement à l'acide gibbéréllique et germination directe, sans passage par la culture *in vitro*.

Nos plantes obtenues à partir d'embryons non fécondés sont en cours d'analyse (origine et statut génétique par rapport aux parents) par observation sur le terrain et l'utilisation de marqueurs moléculaires de type RAPD et AFLP.

Bibliographie

1. GIANFAGNA T. 1995. In : Davies P.J. (éd.) Plant hormones. New York Kluwer Academic Publishers, pp 751-773.
2. ABBAS M.A., SEIF A.S. 1993. In : Al-Hosieny M.P. (éd.) Abstract of the third symposium on date palm Al-Ahsa Press, pp 100.

E10 : Caractérisation de la capacité androgénétique de quelques variétés de blé dur d'origine tunisienne

SLIM AMARA H.¹, DAALOUL A.¹, BENZAGHOU S.², LEPOIVRE P.²

¹ Laboratoire de Génétique et Amélioration des Plantes, Département des Sciences de la Production Végétale, Institut National Agronomique Tunis, Tunisie.

² Unité de Phytopathologie, Faculté Universitaire des Sciences agronomiques, Gembloux, Belgique.

INTRODUCTION

La maîtrise des techniques conduisant à l'obtention et à l'utilisation de plantes haploïdes chez les espèces de grande culture est un objectif prioritaire pour les programmes d'amélioration. Parmi les techniques d'obtention d'haploïdes, les cultures d'anthers constituent l'approche la plus aisée sur le plan pratique et consiste à dévier le développement normal du gamétophyte mâle vers la voie sporophytique. Il existe cependant des espèces cultivées, comme le blé dur, qui demeurent récalcitrantes à l'androgenèse ou pour lesquelles les faibles taux de réussite rendent cette approche inutilisable en pratique (induction médiocre de cals ou embryons haploïdes, régénération difficile des plantes à partir des structures multicellulaires induites, obtention de plantes albinos, ...).

Notre travail a consisté à caractériser le comportement androgénétique de quelques variétés de blé dur, sur le plan de leur capacité à régénérer des plantes et sur le plan du développement cytologique des microspores.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel végétal est constitué de 6 variétés de blé dur dont trois variétés tunisiennes traditionnelles [Azizi AP9, Jenah Khotifa AP4 et Khiair] travaillées à la fois à Tunis et à Gembloux] et deux variétés améliorées [Cham 1 et Om rabiya 5 (travaillées uniquement à Tunis)].

Les plantes donneuses ont été cultivées au champ (Tunis) ou en serre (Gembloux). Les épis, prélevés lorsque les microspores se trouvaient au stade uninucléé moyen à tardif, ont ensuite été soumis à un prétraitement au froid [5°C pendant 7 jours (Gembloux) ou 4°C pendant 2 jours (Tunis)] avant d'être désinfectés à l'hypochlorite. Les anthers ont ensuite été mises en culture à raison de 60 (Tunis) à 100 (Gembloux) par boîte de Petri.

Dans un premier temps, nous avons comparé le milieu d'induction I2 proposé par l'ICARDA et caractérisé par 5 mg/l de AgNO₃ et 2 mg/l de 2,4 D (Lashermes *et al.*, 1991) (= milieu 1) avec le même milieu de base contenant 0,5 mg/l de kinétine et 100 mg/l de PAA (acide phényl acétique) (= milieu 2). Les embryoïdes induits à partir des microspores ont été successivement transférés sur le milieu de régénération RW et MP (Lashermes *et al.*, 1991).

Une analyse cytologique du développement des microspores durant la phase d'induction *in vitro* a été menée par des observations réalisées tous les 7 jours.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

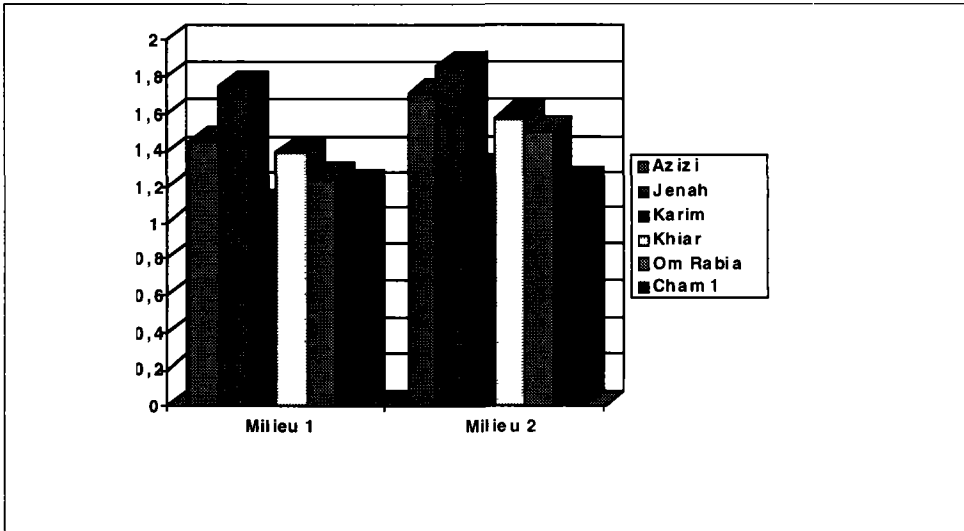
Réactivité des différentes variétés et effet du milieu d'induction

L'analyse des paramètres androgénétiques (% d'anthers embryogènes ou callogènes et proportion de plantes régénérées à partir de ces structures) a montré un effet du génotype hautement significatif. Pour l'ensemble des 2 milieux, ce sont les variétés Jenah Khotifa AP4, Azizi AP9 et Khiair qui se sont montrées les plus réactives (avec une proportion maximale

d'anthères réactives de 2 % chez la variété Jenah Khotifa) que les plantes donneuses aient été cultivées en serre (Gembloux) ou au champ (Tunis) (Figure 1).

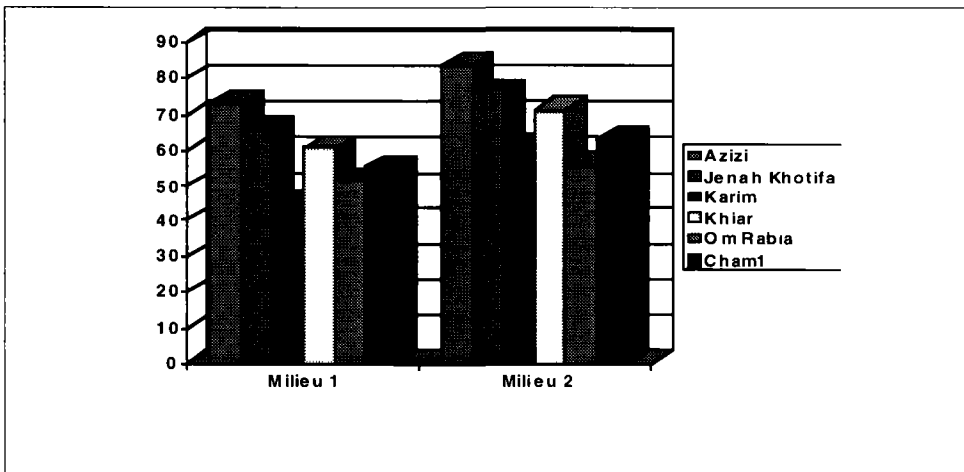
Alors que le pourcentage d'anthères réactives sur ce milieu d'induction reste faible, la proportion des structures multicellulaires ainsi induites qui ont abouti ultérieurement à la régénération de plantules a atteint près de 60 à 70 % avec une proportion élevée de plantes vertes (jusqu'à près de 85 % pour la variété Azizi) à Tunis alors que seules des plantes albinos se retrouvaient parmi les régénérats à Gembloux.

Figure 1. % d'anthères réactives sur les milieux d'induction 1 (résultats obtenus avec les plantes donneuses cultivées aux champs en Tunisie.



L'apport de PAA et de kinétine a montré un effet favorable pour le % d'anthères réactives sur le milieu 1 d'induction mais a également eu un effet positif sur la régénération ultérieure de plantes vertes (Figure 2) notamment en diminuant le taux d'albinisme. Les concentrations de PAA comprises entre 100 et 150 mg/l et de kinétine entre 0,5 et 1 mg/l se sont avérées les plus performantes pour les variétés Azizi et Cham1.

Figure 2. Effets des milieux d'induction sur la proportion de plantes vertes régénérées (résultats obtenus avec les plantes donneuses cultivées aux champs en Tunisie).



L'analyse cytologique du développement des microspores

L'analyse du développement des microspores a montré que les étapes de l'androgenèse chez le blé dur étaient qualitativement identiques à celles observées chez le triticale (Schumann, 1990) tout en présentant une évolution plus lente. Dans nos conditions de culture, les premières divisions de microspores ont commencé à être observées à partir du 15ème jour de mise en incubation. La première division observée dans le milieu d'induction était généralement de type symétrique, une division asymétrique étant parfois observée avec une fréquence moindre.

En cas de division équationnelle, la microspore uninucléée donnait deux noyaux fils identiques possédant chacun une grande taille et une chromatine diffuse. Ce type de division se poursuivait pour donner des structures possédant six, huit, dix, douze noyaux voir même plus. Dans le cas de division asymétrique, le noyau de la microspore se divisait en formant un noyau de type végétatif et un noyau de type génératif. Le noyau génératif restait latent (une division a parfois été observée) alors que le noyau végétatif continuait à se diviser pour donner une structure multicellulaire. Ces divisions se sont traduites par la formation de microstructures possédant un caractère callogène (cellules larges, disposées de manière lâche et possédant de grandes vacuoles) ou plus fréquemment un caractère embryoïde (cellules à cytoplasme dense et peu vacuolisées).

Bibliographie

1. LASHERMES P., ENGIN G. ORTIZ-FERRARA G. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) adapted to dry areas of West Asia and North Africa. J. Genet. Breed. 45, 33-38, 1991
2. SCHUMANN G. *In vitro* production of haploids in Triticale. In : Bajaj Y. P. S. (Ed). Biotechnology in Agriculture and forestry. Vol 13 : Wheat. Springer Verlag, Berlin, pp 382-402, 1990

E11 : Les capacités de régénération par voie végétative de l'*Albizzia julibrissin*. Influence de la nutrition carbonée sur les phénomènes de callogenèse et d'organogenèse

ALONSO LOPEZ A., EL MAATAOUI M., ESPAGANAC H.

Laboratoire de Biologie Végétale Expérimentale, Faculté des Sciences, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 33, rue Louis Pasteur - 84000 AVIGNON.

Albizzia julibrissin, légumineuse arborescente déjà amplement utilisée en horticulture, manifeste de bonnes capacités de régénération en culture *in vitro*. Indépendamment de l'intérêt que cela peut présenter dans le domaine de l'application, cette espèce a pu être utilisée pour étudier certains aspects de l'influence de la nutrition carbonée sur deux phénomènes de morphogenèse : production de cals d'une part et mise en place de bourgeons et de pousses feuillées d'autre part.

Dans une première partie, l'auteur montre, en cultivant des portions de l'appareil végétatif de jeunes plants issus de semis, que les fragments de nature foliaires sont peu réactifs. Les fragments d'épicotyle ou d'hypocotyle par contre, produisent des cals volumineux sur lesquels se forment de petits nombres de bourgeons. Les explants racinaires, quant à eux, fournissent

des cals importants portant un grand nombre de bourgeons néoformés. Une embryogenèse somatique a aussi été induite à partir de cals âgés et à partir d'embryons zygotiques immatures excisés au stade cotylédonaire. Ces phénomènes peuvent être obtenus en absence de toute phytohormone à condition que le milieu soit complété par un sucre à la concentration de 30 g.l⁻¹. Dans une deuxième partie, en se limitant à la culture de fragments de racines, il est montré que la réponse morphogène peut être modulée en modifiant la nature de l'hydrate de carbone ajouté au milieu. Certains sucres (tels que le saccharose, fructose, glucose) déclenchent une callogenèse excessivement importante, au point qu'elle gêne et même anéantit le développement des bourgeons se formant sur les cals. En présence de xylose ou de lactose par contre la callogenèse est très discrète, ce qui permet le développement en plante entière de tous les bourgeons organisés sur les cals. Si maintenant on utilise un sucre tel que le maltose, on obtient une réponse intermédiaire. L'auteur démontre enfin qu'en associant dans le milieu de culture un sucre fortement callogène (fructose) à un autre (xylose) très faiblement callogène, on optimise et on obtient une bonne maîtrise de la production de pousses feuillées. Chacune de ces deux parties a été complétée par une étude histocytologique en microscopie photonique, qui a montré que des variations dans la mise en place de réserves amylacées, témoignant de systèmes métaboliques vraisemblablement différents, pouvaient jouer un rôle important dans ces phénomènes. En présence de sucres tels que saccharose, fructose, glucose, il semble que les cellules des cals mis en place soient capables de produire de l'amidon, mais incapables de l'utiliser. Dans une troisième partie enfin, en utilisant des techniques de CIHP, des identifications et des dosages de divers glucides ont été réalisées d'une part dans les explants mis en culture d'autre part dans les milieux sur lesquels ils étaient cultivés. On a pu ainsi montrer que quel que soit le sucre ajouté au milieu de culture, il est prélevé par le fragment de racine : toutefois ce prélèvement ne s'opère pas toujours de la même manière. Le nombre de sucres que l'on peut identifier et doser dans un fragment de racine, indépendamment de celui ou de ceux qui ont été incorporés au milieu, est plus important si la culture a été réalisée sur un mélange de sucres. Ceci témoigne sans aucun doute d'une diversification des métabolismes se déroulant dans les fragments cultivés dans de telles conditions.

L'ensemble des résultats et observations est discuté en fonction de travaux antérieurs réalisés par d'autres chercheurs utilisant d'autres espèces essentiellement ligneuses.

Mots-clés : *Albizia julibrissin* ; morphogenèse *in vitro* ; nutrition carbonée ; cyto-histologie, régénération, chromatographie ionique.

E12 : Exploitation de la transgénèse végétale chez *Arabidopsis thaliana*, une plante modèle, afin d'isoler des gènes d'intérêt pour améliorer les plantes cultivées.

AUBANELLE L., CATTEROU M., DUBOIS F., CARON D., SANGWAN R.S., SANDWAN B.S.

Laboratoire Androgenèse et Biotechnologie, UPJV, Ilot des Poulies,
33 rue Saint-Leu 80039 AMIENS France

L'amélioration des plantes agronomiquement intéressantes est soumise à la compréhension du développement végétal. La recherche de nouvelles corrélations entre gènes impliqués dans le développement et leur fonction devrait contribuer à une meilleure connaissance de la morphogenèse végétale. La stratégie consiste à isoler des mutants affectés dans leur croissance (1)

La transformation génétique utilisée en tant qu'outil d'étude fondamentale chez *Arabidopsis thaliana* a permis d'établir une collection de mutants liés à l'insertion du T-DNA d'*Agrobacterium tumefaciens* (2). Trois d'entre eux présentent un phénotype altéré :

deux sont principalement affectés dans leur processus d'élongation, le troisième se distingue par une perte de la dominance apicale (3).

La caractérisation de ces mutants s'oriente selon deux axes principaux :

- une approche physiologique permet de cerner la fonction du gène sur les différentes étapes contrôlant le développement que sont la division, la différenciation et l'élongation cellulaires.

- une approche moléculaire est envisagée afin de localiser le gène sur la carte génétique en vue d'un éventuel séquençage.

Les perspectives de ce travail dans le transfert de ces connaissances vers des espèces végétales cultivées.

Bibliographie

1. DUBOIS F., BUIDAND HA D., SANGWAN R.S. and DURAND J. 1996. The *Petunia* Tra1 gene controls cell elongation, plant development and mediates responses to cytokinins. *Plant Journal* 1 : 47-59.
2. SANGWAN R.S., BOURGEOIS Y., SANGWAN-NORREEL B.S. 1991. Genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* zygotic embryos and identification of critical parameters influencing transformation efficiency. *Mol. Gen. Genet.*, 230 : 475-485.
3. PAWLICKI N., VILCOT B., BOURGEOIS Y., AUBANELLE L., CATTEROU M., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S. 1996. Morphological, anatomical and molecular studies of some T-DNA mutants in *Arabidopsis thaliana*. VIIth Inter. Conf. on Arabidopsis Research, 23-27 June 1996, Norwich, U.K.

E13 : Modifications des niveaux endogènes de cytokinines et régénération de bourgeons chez *Eucalyptus globulus* par l'utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* souche 82.139

AZMI A.¹, DEWITTE W.², LANDRÉ P.¹, JOUANIN L.³, VAN ONCKELEN H.², CHRIQUI D.¹

¹ UPMC, Lab. CEMV, Bât. N2, case courrier 150, 4, place Jussieu, F-75252 Paris cedex 05. ² University of Antwerp, UIA, Department of Biology, B-2610 Antwerp, Belgique. ³ INRA, Laboratoire de Biologie Cellulaire, route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles Cedex

L'importance des eucalyptus en foresterie justifie que des approches biotechnologiques visant la production en masse et la transformation génétique soient développées. Le genre *Eucalyptus* regroupe cependant des espèces d'intérêt majeur mais considérées comme récalcitrantes à l'ensemble de ces approches⁽¹⁾. Une stratégie alternative utilisant la souche 82.139 d'*Agrobacterium tumefaciens*⁽²⁾ s'est avérée efficace pour régénérer des bourgeons sur des tumeurs induites par inoculation de *vitroplants* clonés et sur de jeunes germinations⁽³⁾. Les bourgeons ainsi régénérés, tous diploïdes, ont ensuite été enracinés et acclimatés. Comparées à des tumeurs non caulogènes induites par la souche à nopaline C58, les tumeurs caulogènes induites par la souche 82.139 sont caractérisées par des teneurs élevées en zéatine et en riboside de zéatine endogènes⁽³⁾. Une analyse histologique a permis d'identifier les cellules compétentes pour la régénération et les cellules cibles de la transformation par la souche 82.139 ont été visualisées au moyen d'une construction comportant le gène *gus* sur le fragment *XbaI* de son T-DNA. En parallèle, l'immunolocalisation *in situ* des cytokinines bases⁽⁴⁾ a été réalisée montrant une correspondance entre les sites transformés et les sites d'accumulation des cytokinines tandis que les bourgeons régénérés sont non transformés et toujours situés assez

loin des sites transformés. L'utilisation de la souche 82.139, grâce à la surcharge hormonale qu'elle produit, permet donc de résoudre, comme chez d'autres espèces déjà traitées par cette méthode telles que le peuplier⁽²⁾ et le chou⁽³⁾, les problèmes de la récalcitrance chez l'eucalyptus. Ces résultats devraient également aider à l'amélioration des protocoles de transformation génétique chez cette espèce.

Bibliographie

1. AZMI A., NOIN M., LANDRÉP., PROUTEAU M., BOUDET A.M., CHRIQUI D.. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. hypocotyls : ontogenesis and ploidy level of the regenerants. Plant Cell Tissue and Organ Culture, (1997) in press.
2. BRASILEIRO A.C.M., LEPLÉ J.C., MUZZIN J., OUNNOUGH D., MICHEL M.F., JOUANIN L. An alternative approach for gene transfer in trees using wild-type *Agrobacterium* strains Plant Mol Biol., 17 (1991) 441-452.
3. AZMI A., DEWITTE W., DREVET C., VAN ONCKELEN H., LANDRÉ P., BOUDET A.M., JOUANIN L., CHRIQUI D. Bud regeneration from *Eucalyptus globulus* clones and seedlings through hormonal imbalances induced by *Agrobacterium tumefaciens* strain 82.139. Plant Sci (1997) sous presse
4. DEWITTE W., CHIAPPETTA A., AZMI A., ŠRNAD M., CHRIQUI D., VAN ONCKELEN H. Functional aspects of *in situ* localization of bound cytokinins in vegetative and reproductive shoot meristems of *Nicotiana tabacum* cv "Petit Havana" SR1 (Plant Journal, soumis).
5. BERTHOMIEU P., BÉCLIN C., CHARLOT F., DORÉ C., JOUANIN L. Routine transformation of rapid cycling cabbage (*Brassica oleracea*) - Molecular evidence for regeneration of chimeras. Plant Sci , 96 (1994) 223-235.

E14 : Analyse des potentialités androgénétiques du pollen de palmier dattier

BEN ABDALLAH A.¹, LEPOIVRE Ph.²

¹ Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, Rue Hédi Karray 2049 Ariana (Centre de Recherches Phoenicicoles, 2260 Degache) - TUNISIE.

² Unité de Phytopathologie - Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques. Passage de Déportés. 2 B-5030 Gembloux - BELGIQUE.

Dans les pays phoenicicoles, un besoin de plus en plus pressant de variétés améliorées et/ou résistantes à des maladies existent chez le palmier dattier. À ce jour, l'amélioration du palmier dattier, espèce allogame et dioïque, par les techniques de la génétique classique n'a pas réussi à créer et à fournir aux agriculteurs des variétés commerciales intéressantes, étant donné la lenteur de croissance de cette plante et le temps qui s'écoule entre chaque génération. Une sélection plus rapide basée sur l'emploi des haplométhodes permettraient d'obtenir des génotypes homozygote chez lesquels des caractères récessifs éventuels pourraient être recherchés. L'obtention des plantes haploïdes chez le palmier dattier n'a été que très peu étudiée. Dans l'objectif d'analyser les potentialités androgénétiques des génotypes mâles cultivés dans le sud tunisien, différents paramètres intervenant dans la culture *in vitro* des anthères ont été étudiés (génotype, stade des microspores mises en culture, conditions de culture *in vitro*). Ce travail a d'abord porté sur 15 génotypes mâles de palmier dattier. Seuls 4 génotypes ont montré une réponse favorable lors de l'induction en androgènes (T106, T167,

P6, T23) parmi lesquels T106 et T23 ont été retenus pour les travaux ultérieurs. Le stade optimum de développement des microspores pour la mise en culture des anthères a été le stade uninucléé moyen. La recherche d'une éventuelle relation entre les différents stades cytologiques de la microspore et la morphologie de l'inflorescence n'a pas permis de dégager des résultats probants. Deux facteurs ont été étudié : (1) l'effet d'une gamme de concentrations de 2,4D (avec ou sans charbon actif) dans un milieu de callogenèse à base des éléments minéraux de Murashige et Skoog ainsi que (2) la nature et la concentration du sucre (maltose ou saccharose). Le pourcentage de cals formés et le pourcentage de microspores en division ont été comptabilisés parés 6,10,15,20,25 et 35 jours de culture des anthères. Les meilleurs résultats ont permis d'obtenir 70 % de microspores en division et 18 % anthères donnant naissance à des cals embryogènes. Ces résultats ont été obtenus sur un milieu contenant du maltose (40 g/l), du 2,4D (10 mg/l) et du charbon actif (1 g/l) et ont été confirmés pendant deux campagnes. La régénération des cals embryogènes obtenus a été étudiée sur des milieux à base des éléments du milieu Murashige et Skoog mis au point pour l'embryogenèse somatique chez le palmier dattier et contenant peu ou pas de régulateurs de croissance. Les résultats n'ont permis, jusqu'à présent, aucune régénération. Les cals embryogènes obtenus se maintiennent longtemps en vie mais un blocage semble avoir lieu pour la régénération.

E15 : Un exemple de production de molécules à haute valeur ajoutée par des cultures *in vitro* d'organes végétaux : synthèse d'hyoscyamine et de scopolamine chez *Datura innoxia* Mill

BOITEL-CONTI M., LABERCHE J.-C., DUCROCQ C., DARIA P., SANGWAN-NORREEL B.
Laboratoire d'Androgenèse et Biotechnologie, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu,
F.80039 Amiens Cedex, France

Le poster présente les travaux concernant l'amélioration des connaissances fondamentales relatives aux voies de biosynthèse de métabolites secondaires chez *Datura innoxia* Mill pour la synthèse d'alcaloïdes tropaniques en vue d'augmenter la production de ces molécules d'intérêt thérapeutiques, à très haute valeur ajoutée. Les connaissances fondamentales acquises sont exploitées pour l'élaboration d'un procédé de production en bioréacteur par des cultures *in vitro* de racines transgéniques hyperproductrices.

E16 : Callogenèse et régénération chez le Pois chiche (*Cicer arietinum*)

BOUABDALLAH L.
Institut des Sciences de la Nature, Université d'Oran (Es-Sénia), Oran, Algérie

Le Pois chiche est une légumineuse cultivée en Algérie pour sa richesse en protéines destinées à la consommation humaine. La culture de tissu *in vitro* de cette plante offre de nombreuses perspectives (amélioration de la qualité, augmentation de la production et résistance aux maladies, à la sécheresse et à la salinité,...)

La callogenèse a été initiée à partir des différents organes végétatifs (racines, tiges, folioles) et embryons mis en culture sur le milieu Murashige et Skoog additionné de deux hormones

(auxine et cytokinine) à différentes concentrations, à une photopériode de 16 heures et une température de 26°C.

Les résultats obtenus varient selon l'organe et la composition hormonale. La culture d'embryons en présence d'une faible auxine (acide indole-3 acétique ou AIA) et d'une kinétine (à faible concentration) a donné des taux élevés de cals fiables et blanchâtres. Cette callogenèse, a été suivie d'une régénération assez importante de plantules d'apparence normale dont le nombre varie de 2 à 3 par cal.

Parmi les autres explants, seules les tiges donnent des cals, sur le même milieu sans régénération directe.

Le remplacement de l'AIA par une forte auxine (2,4 D à faible concentration) a permis d'obtenir à partir des tiges, racines et embryons une callogenèse abondante.

Ces résultats préliminaires ouvrent la voie à la recherche de variants résistants à l'Anthracnose et à la Fusariose, principales maladies du Pois chiche pour lesquelles les moyens de lutte utilisés jusqu'à présent restent inefficaces.

E17 : Effet du génotype et du milieu de culture dans la culture d'embryons immatures de blé dur (*Triticum durum* Desf.) et de blé tendre (*Triticum aestivum* L.)

BOUIAMRINE E., MZOURI K., AMSSA M.

Université Moulay Ismail, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Laboratoire des Biotechnologies Végétales, B.P. 4010 B'ni M'hamed, Meknès, Maroc.

Dans un programme de sélection au niveau cellulaire, le choix des génotypes qui pourront être ultérieurement améliorés dépendra principalement de leur aptitude à la culture *in vitro*. Celle-ci réside dans leur capacité de produire des cals et de régénérer par la suite des plantes. Dans ce présent travail, 14 variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) et 16 variétés du blé tendre (*Triticum aestivum* L.) ont été évaluées pour leur aptitude à la culture *in vitro*. Pour chacune d'elles, quatre paramètres ont été pris en considération : le taux de callogenèse, de cals embryogènes, de régénération et le nombre moyen de plantules par cals régénérant. Le milieu de base utilisé est celui de Murashige et Skoog (1962) additionné de 2 mg/l de 2,4-D. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence un effet génotype très marqué dans la production de cals embryogènes, le pourcentage de régénération et le nombre moyen de plantules par cals régénérants. Dans l'objectif d'améliorer la régénération de certains génotypes, 4 variétés des deux espèces (2 présentent une mauvaise aptitude à la culture *in vitro* et deux autres prises comme témoins) ont été choisies. Nous avons ainsi testé l'effet de la concentration en BAP (10^{-7} à 10^{-4} M) combiné au 2,4-D (2mg/l) en présence ou en absence de l'ANA (5.10^{-6} M). Une interaction génotype-milieu de culture a été observée. L'ajout de la BAP (10^{-6} M) en présence de l'ANA a amélioré significativement le pourcentage de régénération des 4 variétés du blé tendre. Par contre chez le blé dur, cette amélioration n'a concerné que les variétés à faible taux de régénération. Cependant, l'augmentation de la concentration en BAP ($> 10^{-6}$ M) a tendance à inhiber la callogenèse et à provoquer la nécrose des cals. Cette nécrose est plus forte chez le blé dur que chez le blé tendre. L'albinisme apparaît uniquement chez le blé dur, mais à des faibles fréquences (0 à 6 %) selon les variétés.

E18 : Intérêt du traçage isotopique pour l'étude, chez l'homme du devenir métabolique des productions végétales : l'exemple du blé dur enrichi en ^{13}C et des pâtes alimentaires

CHARGVARDIEFF P.¹, PEAN M.¹, LE BRAS S.¹, GAULTIER S.¹, ANTOINE J.-M.¹, MASSICOTTE D.², PERONNET F.³

¹ Groupe Danone, 7 rue de Téhéran, 75381 Paris Cedex 08, France. ² Département d'Éducation Physique. Université de Montréal, CP6218 Centre Ville, Montréal P.Q. Canada H3C3J7. ³ Laboratoire de Bioénergétique fondamentale et appliquée, Université Joseph Fourier, BP 53X, 38041 Grenoble, France.

Les végétaux constituent une grande part de l'alimentation humaine. Les études portant sur leurs propriétés nutritionnelles répondent à des préoccupations touchant la diététique et la santé publique. Les études cliniques chez l'homme, utilisant le traçage isotopique avec des isotopes stables tel le carbone 13, se sont particulièrement développées depuis une quinzaine d'années. Elles font appel à des techniques sans risques (isotope non-radioactif), atraumatiques (tests respiratoires par exemple) et puissantes (spectrométrie de masse, GCMS, RMN) et ont porté sur le devenir de molécules simples (glucose, acide aminé, par exemple). Les études concernant les aliments, produits de composition complexe, nécessitent de disposer de produits marqués de façon homogène pour pouvoir servir de traceurs ; de tels produits marqués aux isotopes stables n'étaient pas disponibles jusqu'à présent.

Pouvoir connaître l'intérêt alimentaire des produits issus de différents systèmes de culture : cueillette, traditionnel, intensif, hors-sol..., dans différentes zones de production : pays tempérés, tropicaux ..., pour différents types de végétaux : amylacés, oléoprotéagineux... est un enjeu majeur pour l'avenir de l'agriculture, et en particulier pour l'amélioration des plantes.

Nous présentons ici un procédé biotechnologique d'enrichissement isotopique applicable aux végétaux supérieurs, qui entreront dans notre alimentation après des étapes de transformation technologique plus ou moins poussées. Les résultats présentés concernent la production de blé dur (*Triticum durum*), marqué au ^{13}C destiné à des études sur les pâtes alimentaires.

Le principe consiste à faire assimiler au végétal, pendant tout son cycle cultural, des substrats marqués : les formes isotopiques sont apportées, pour le carbone, sous forme de carbone inorganique ($^{13}\text{CO}_2$) assimilé par le processus photosynthétique. Pour cela, il est nécessaire de maîtriser la gestion des systèmes de cultures en milieu artificiel (contrôle et régulation des paramètres climatiques, confinement des atmosphères) ainsi que l'analyse isotopique (spectrométrie de masse).

Dans ces conditions, la fourniture permanente pendant tout le cycle cultural de la plante, de l'espèce isotopique mentionnée permet d'obtenir un marquage homogène de la biomasse, à un niveau d'enrichissement fixé par l'expérimentateur (dans notre cas aux alentours de 10 % ^{13}C). Nous présenterons, sur la culture de la variété Ardente, les résultats obtenus sur la productivité et l'enrichissement isotopique.

La semoule obtenue a été mélangée à de la semoule non marquée pour fabriquer des pâtes alimentaires ayant un enrichissement d'environ 1,16 %, largement suffisant pour suivre le devenir métabolique de l'amidon marqué au ^{13}C . Les pâtes ont été utilisées dans une étude sur l'équilibre énergétique et pondéral, et l'utilisation des substrats énergétiques endogènes et exogènes chez l'homme au repos, à la suite d'un exercice préalable de puissance et de durée variables. Les résultats obtenus, en terme de quantité de glucides endogènes et exogènes oxydés, ainsi que de lipides oxydés illustreront la faisabilité et l'intérêt du marquage biologique de molécules complexes comme l'amidon, dans les études nutritionnelles chez l'homme.

E19 : Haplodiploïdisation chez le blé dur (*Triticum turgidum* var *durum*)

**CHLYAH H., SAIDI N., CHERKAOUI S., LAMSAOURI O., CHLYAH O., MDARHRI-
ALAOUI M., AMAIL O., CHLYAH A.**

Université Mohammed V, Faculté des Sciences, Département de Biologie, B.P. 1014 Rabat. Maroc

Plusieurs voies d'haplodiploïdisation ont été testées dans le but d'obtenir des plantes vertes haploïdes doublées (HD). La méthode d'androgenèse (culture d'anthères ou microspores) a été parfaitement mise au point, en milieu gélosé, entre 1991 et 1993, avec des pourcentages de régénération élevés mais avec des taux d'albinisme proche de 100 %. L'utilisation par la suite de milieux liquides et de nombreux nouveaux génotypes n'a pas permis de résoudre le problème d'albinisme.

Dans le but de bénéficier de la capacité génétique supérieure - cytoplasmique ou nucléaire - du blé tendre pour l'androgenèse avec régénérations vertes, des croisements blé tendre x blé dur ont été effectués suivis d'un ou plusieurs rétrocroisements avec le blé dur. À partir des plantes R1, seules celles issues d'un croisement originel avec un parent blé tendre portant la translocation 1BL/1RS ont pu former des plantules vertes par androgenèse.

Une troisième voie - celle des hybridations intergénériques - a été testée pour un grand nombre de génotypes de blé dur et de maïs (ou orge). Cette voie permet la formation de plantes vertes HD pour presque tous les génotypes de blé dur testés. Cette méthode - comportant le sauvetage par culture d'embryons haploïdes - est comparée à la culture simple d'ovules non fécondés : cette dernière technique a également donné des résultats positifs.

E20 : Effet à long terme du saccharose exogène sur l'interaction C/N chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) cultivée *in vitro*

SIMA B.D., LE V.Q., DESJARDINS Y.

Dans le but d'évaluer l'impact du saccharose sur l'interaction C/N dans des conditions *in vitro*, des plants de pomme de terre sont cultivés sous une intensité lumineuse de $80 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, dans 3 différents milieux de Murashige et Skoog (MS) : MS de base sans saccharose, MS avec 2 % de saccharose, MS avec 2 % de saccharose et sans source d'azote. Des mesures d'activité PEPCase et pyruvate kinase effectuées à 13, 26 et 39 jours de croissance montrent que les plants cultivés sur MS de base avec 2 % de saccharose présentent les activités enzymatiques et les teneurs en protéines totales les plus élevées tandis que les plus importantes teneurs en amidon et en saccharose sont observées chez les plants cultivés sans source d'azote. Ceci est une indication de la compétition en chaînes carbonées entre les métabolisme carboné et azoté. L'accumulation de sucres chez les plants cultivés sans source d'azote s'explique par une vitesse d'assimilation d'azote plus faible et une demande réduite d' α -cetoglutarate provenant du cycle de Krebs.

La comparaison des bandes de 97,4 kD de PEPCase dans des analyses d'immunodétection (western blots) entre les 3 conditions de culture liée à l'activité PEPCase indique clairement que le saccharose exogène participe à la régulation de la PEPCase au niveau de la synthèse de la protéine.

E21 : Obtention de plantes chlorophylliennes haploïdes de Blé dur et de Blé tendre par culture de microspores isolées

DE BUYSER J., PICARD E.

Laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale. Université de Paris Sud XI -Bât 360 - 91405 Orsay - France

Au cours de cette décennie, la technique de culture de microspores isolées a progressé et s'est largement développée chez plusieurs espèces (Colza, Tabac, Riz, Orge...). Quelques articles ont fait part de résultats positifs chez le Blé tendre (*T. aestivum*). L'utilisation de cette technique a donc été envisagée pour le Blé tendre mais également pour le Blé dur (*T. durum*) en vue d'études fondamentales et appliquées. Obtenues par broyage des épillets, filtration et centrifugation, les microspores isolées sont cultivées en boîte de Pétri (35 mm.) contenant le milieu liquide de CHU modifié avec 0,26M de glucose ou de maltose et 4 à 5 ovaires d'épis plus âgés.

Chez le Blé tendre, les résultats obtenus concernant la formation des embryons montrent :

- qu'en l'absence d'ovaires, aucun embryon n'est formé quel que soit le génotype utilisé.
- que le maltose est toujours plus favorable (facteur 10) que le glucose.
- que l'absence de pré-traitement donne des taux d'embryons plus élevés qu'un traitement au froid (4°C 1 à 3 semaines) ou qu'un traitement de pré-culture avec mannitol (0,3M pendant 4 à 5 jours).
- que l'isolement des microspores après 4 à 5 jours de culture des anthères en milieu liquide fait baisser le rendement.
- que l'agitation des microspores (40 t/m.) pendant la phase de culture retarde le développement des embryons et baisse leur fréquence.
- que cependant la culture anthères en milieu liquide reste toujours supérieure à la cultures de microspores isolées.

Pour les génotypes 107 et HJA, il est possible d'obtenir respectivement 120 et 80 embryons par épi en culture de microspores isolées et régulièrement plus de 500 embryons par épi en culture anthères. L'utilisation des mêmes protocoles pour le Blé dur a permis d'obtenir plus de 50 embryons par épi en culture de microspores (pré-traitement des épis à 4 °C, 2 à 3 semaines et milieu avec maltose). La régénération est obtenue par transfert des embryons. Chez le Blé tendre, il n'y a pas de différence entre embryons issus de microspores isolées et de culture anthères. Les deux milieux testés (MS0 et R-190-2) donnent des résultats similaires. Pour le génotype 107 le taux de régénération des embryons est de 80 % (15 à 20 % de plantes vertes et 60 à 65 % de plantes albina). La régénération est également possible après changement du milieu dans les boîtes de cultures des microspores lorsque les embryons sont bien développés. En ce qui concerne le Blé dur, 7 plantes chlorophylliennes ont été régénérées soit après culture de microspore isolées soit après culture anthères. Ces résultats nous permettent d'envisager l'utilisation de ces espèces pour des expériences de transformation et l'étude des protéines des voies de signalisation.

E22 : Initiation de suspensions cellulaires embryogènes à partir d'explants de bourgeons méristématiques en prolifération chez les bananiers

DHED'A D.¹, HAICOUR R.²

¹ Université de Kisangani, Faculté des Sciences, c/o Ridja D. Buma, Sotexki, B.P. 14897 Kinshasa I. ZAIRE. ² Université Paris Sud, MVE, Bât 360, 91405 Orsay cedex, France

Des suspensions cellulaires embryogènes ont été établies chez deux cultivars (Métavia, ABB et Ihtisim, AAB) en utilisant les explants de bourgeons méristématiques en prolifération (scalps) en milieu liquide enrichi en 2,4-D et zéatine. La Grande Naine (AAA) n'a pas pu produire des suspensions embryogènes par cette méthode.

L'étude de l'induction de cals sur les scalps a montré qu'il est relativement aisé d'obtenir un cal globulaire jaune non embryogène sur un milieu contenant 5 à 36,2 uM 2,4-D. Dans quelques cas (4,8-14,8 %), on a pu observer la formation de cals blancs chez la Grande Naine après 8 à 16 semaines sans subculture.

Chez Matavia, dans 18,1 % de cas, des cals globulaires jaunes se sont transformés en cals blancs embryogènes capables de produire des suspensions embryogènes.

L'ensemble des résultats obtenus peut permettre de conclure qu'il est possible d'établir des suspensions embryogènes chez un grand nombre de cultivars présentant une prolifération plus ou moins semblable à celle de Matavia. On peut en outre insister sur le rôle joué essentiellement par le 2,4-D dans l'induction de cellules embryogènes et celle de différents types de cals obtenus.

La connaissance des facteurs et conditions particulières dans lesquelles s'effectuent ces processus et ceux de la transformation du cal jaune en cal blanc embryogène observée chez Matavia pourrait permettre l'initiation des suspensions cellulaires embryogènes à partir de différents explants somatiques dont les feuilles du bananier.

E23 : Étude comparative d'hybrides interspécifiques issus de croisements entre quatre espèces d'*Aegilops* et de blés cultivés (*Triticum aestivum*, *Triticum durum*)

EL KHILIFI O.K.¹, BENLHABIB O.², MALKI M.¹

¹ Faculté des Sciences Casablanca Ain Chock, Casablanca, Maroc. ² I.A.V. Hassan II, Rabat, Maroc.

Des croisements interspécifiques entre le blé tendre (*Triticum aestivum*) ou dur (*T. durum*), et différentes espèces d'*Aegilops* (*Ae. ovata*, *Ae. triaristata*, *Ae. squarrosa* et *Ae. ventricosa*), ont été entrepris. Seules les accessions résistantes à la mouche de Hesse ou Cécidomyie (*Mayetiola destructor* say) ont été employées afin de transférer cette résistance au blé. Le sauvetage des embryons hybrides immatures a été utilisé.

Une étude comparative de l'aptitude au croisement des quatre espèces d'*Aegilops* avec les blés cultivés, rend compte que le taux de nouaison n'est pas le meilleur critère pour juger la réussite d'un croisement. La viabilité et la fertilité des F₁ et de leurs descendants sont plus discriminants. Les taux élevés de plantes hybrides ont été obtenues chez *Ae. ovata* croisé au blé

tendre, soit 12 %. Cependant, toutes les plantes sont létales, et ne conduisent à aucune descendance. Les taux de plantes hybrides ont été au contraire de 0,5 % seulement, chez *Ae squarrosa*, mais ont conduit à la formation de plantes viables et fertiles en F₁, F₂ et BC₁. Les causes de ces différences sont discutées.

La fertilité des hybrides a été très variable, aussi bien en autofécondation qu'en rétrocroisement. Cette variabilité a été observée entre les familles, mais aussi à l'intérieur des familles, surtout celle issue du croisement entre *Ae. triaristata* et le blé dur. La fertilité du pollen des hybrides F₁ de ce croisement, a varié de 0 à 89 %.

Les descendants BC₁ ont présenté des taux de germination souvent faibles et des taux de mortalité importants. Les descendants F₂ ont présenté moins de problèmes de variabilité.

L'aptitude au croisement interspécifique du blé dur a été généralement plus faible que celle du blé tendre. Mais en croisement réciproque, le blé tendre s'est montré souvent, plus récalcitrant. Il n'a formé des plantes hybrides qu'avec *Ae. ovata*.

Trente-sept hybrides interspécifiques ont été installés au champ pour leur caractérisation morphologique. Le comptage du nombre de chromosomes et une analyse méiotique ont été également réalisés.

La plupart des critères d'évaluations utilisés dans l'analyse morphologique et de résistance aux maladies, ont souvent permis de caractériser les différents hybrides. La résistance à la rouille noire et au mildiou, le port de la plante et la forme de l'épi, sont des caractères transmis à la majorité des hybrides, du parent sauvage.

Le nombre de chromosomes a été souvent celui attendu chez les hybrides interspécifiques, soit 28 quand l'espèce sauvage tétraploïde est croisée au blé dur, et 35 quand celle-ci est croisée au blé tendre. Un doublement spontané des chromosomes a été noté chez les hybrides viables issus d'*Ae. squarrosa*.

L'analyse des cellules mères de pollen a montré de faibles taux d'appariements chromosomiques, particulièrement, chez les hybrides issus d'*Ae. ventricosa* croisé au blé dur. Certains de ces derniers sont présentés jusqu'à 25,55 univalents. Mais pour ceux issus d'*Ae. Squarrosa*, les appartements ont été relativement importants, soit jusqu'à 19,6 bivalents.

E24 : Stratégie de sélection par haplodiploïdisation. Cas d'une plante autogame, le piment

HARZALLAH H.

École Nationale de Médecine Vétérinaire 2020 Sidi thabet, Tunisie.

L'amélioration génétique des caractères agronomiques, polygéniques, ne peut se faire classiquement qu'à long terme au bout de plusieurs cycles de sélection. Cependant, l'introduction de l'haplodiploïdisation dans la sélection sur descendance, soit une sélection selon les aptitudes à la combinaison, permettra de détecter et de produire directement de bonnes combinaisons hybrides, ce qui n'est pas possible par autofécondation. Chez le piment, nous avons appliqué un schéma de sélection utilisant le prédicteur de la valeur en lignées puis l'haplodiploïdisation. Des croisements diallèles ont été réalisés entre des variétés locales commercialisées et deux variétés mexicaines spontanées à petits fruits mais intéressantes pour la tolérance aux sels et à certaines maladies virales.

Une étude quantitative fondée sur les méthodes d'approches génétiques, tirées des tableaux diallèles, nous a permis d'étudier les effets des gènes et à partir du tableau diallèle constitué par les quantités [2 F₂-F₁], on a pu quantifier les effets d'épistasie. Cette étude de l'expression des gènes apportés par les parents en croisements, permet d'orienter la sélection et de faire un tri parmi les croisements à haplodiploïdiser. La culture d'anthers *in vitro* a été ainsi menée à

partir des croisements diallèles sélectionnés. Des différences génotypiques significatives ont été constatées pour l'aptitude à produire des anthères embryogènes et des embryons.

Cet effet génotypique a été décomposé en aptitudes générales et spécifiques à la combinaison.

Les plantes haploïdes doublées issues de certains croisements ont été testées pendant plusieurs années du point de vue leurs performances agronomiques et biochimiques (taux de β carotènes et de capsaïcine). Des expériences ont été également menées pour la tolérance au stress salin et nous avons repéré une lignée HD plus tolérante que le parent spontané.

Ces résultats permettent de montrer l'importance du choix des parents à introduire en sélection, les différences génétiques existantes chez les variétés entraînent des transgressions intéressantes chez certaines lignées haploïdes doublées.

E25 : Régénération des plantes à partir des couches cellulaires minces de riz

HOANG K.O.¹, LE T.B.¹, TRAN THANH VAN K.²

¹ Institut de Biotechnologie, CNRST, Hanoï, Vietnam.

² Institut de Biotechnologie des Plantes, Université de Paris-Sud, 91405 ORSAY Cedex, France.

Le riz (*Oryza sativa*) constitue un élément important dans l'alimentation chez la moitié de la population mondiale. Les estimations de production sont de 460 millions de tonnes en 1997, 560 millions en l'an 2000 et 766 millions en 2020.

La croissance inévitable de la population mondiale requiert des programmes d'amélioration adaptés aux caractéristiques climatiques, pédologiques et culturelles des différentes parties du globe. Les techniques de biotechnologies relatives au transfert des gènes d'intérêt connaissent des limitations liées en partie à celles de méthodes de régénération des plantes. Si la régénération à partir de protoplastes donne des résultats satisfaisants quant à l'obtention de plantes *in vitro*, les risques de variations somaclonales peuvent rendre difficile l'étude de l'expression des gènes transférés.

Dans nos expériences de transformation (par biolistique ou via *Agrobactérie*) à l'Institut de Biotechnologie à Hanoï, nous avons cherché à obtenir des embryons de riz à partir des cals issus d'anthères, d'embryons zygotiques immatures et matures. Par ces méthodes, surtout quand les embryons matures sont utilisés, les embryons somatiques sont différenciés sur un cal volumineux et après un délai relativement long.

Il est primordial, en particulier si l'objectif visé est la transformation, de mettre au point des méthodes permettant d'obtenir l'embryogenèse directe ou tout du moins sans une longue phase callogène intermédiaire et la régénération des plantes dans un délai le plus court possible. Ainsi, la méthode des couches cellulaires minces a permis d'obtenir chez le riz, des embryons soit directement, soit à partir des nodules embryogènes différenciés à partir des couches minces (0,3 - 0,5 mm) pratiquées transversalement sur des jeunes plantes, cultivées sur les milieux de Murashige et Skoog contenant de l'agar (0,8 %), du saccharose (3 %), du 2,4-D (10mM), NAA (5mM) et de la BAP (10mM).

Cette méthode de régénération ouvre la voie à l'obtention rapide des plantes transgéniques de riz minimisant les variations somaclonales.

E26 : Stimulation de l'androgénèse *in vitro* par un prétraitement des anthères au début de la phase d'induction

LAROCHE L., ST-PIERRE C.A.¹, COLLIN J.¹, COMEAU A.²

¹ Département de Phytologie, Université Laval, Ste-Foy (Québec, Canada) G1K 7P4. ² Centre de recherche Agriculture et Agro-alimentaire Canada, Ste-Foy (Québec, Canada) G1V 2J3

La culture d'anthères est une technique d'haplodiploïdisation permettant de simplifier et de raccourcir les délais nécessaires à la production de nouveaux cultivars d'orge. Cependant, un faible taux d'embryogenèse et de régénération de plantes vertes limitent encore l'utilisation de cette technique dans le secteur privé de l'amélioration des céréales. L'embryogenèse peut être stimulée par la culture *in vitro* d'anthères d'orge sur un milieu FHG semi-liquide très visqueux pendant les premiers jours de la phase d'induction. Une partie du contenu en eau du milieu FHG semi-liquide s'évapore lorsque le milieu est entreposé dans des boîtes de pétri pendant une longue période avant son utilisation. La mise en culture d'anthères sur ces milieux plus visqueux et l'ajout, quatre jours plus tard, de milieu FHG liquide pour diminuer la viscosité du milieu, stimule l'embryogenèse. Des travaux de recherche visant à reproduire de façon contrôlée les résultats de ces essais ont été réalisés. Différents groupes d'ingrédients (l'ensemble de tous les ingrédients, le maltose ou les sels) ont été concentrés deux ou trois fois, ou complètement enlevés de la composition du milieu d'induction FHG semi-liquide pendant une période de quatre ou de six jours au début de la phase d'induction. Après la période de prétraitement, un certain volume de milieu FHG semi-liquide complémentaire a été rajouté pour ramener la composition du milieu de prétraitement à celle du milieu d'induction FHG semi-liquide de base. Ces travaux de recherche ont permis de démontrer qu'en culture d'anthères d'orge, les microspores sont sensibles à la composition du milieu nutritif pendant les premiers jours de la phase d'induction. La réponse androgénique peut être stimulée par un prétraitement de quatre ou de six jours des anthères avec le milieu d'induction FHG semi-liquide dont la concentration des ingrédients de base, à l'exception du ficoll 400, est deux fois plus élevée. Le prétraitement permet de multiplier par un facteur de 10 le nombre de plantes vertes régénérées, par rapport à la méthode sans prétraitement, pour un génotype présentant déjà une bonne réponse androgénique. Chez un génotype présentant une réponse androgénique plus faible, le prétraitement permet de stimuler le nombre de plantes vertes régénérées par un facteur moins élevé. Le prétraitement permet également de diminuer la variabilité de la réponse androgénique à l'intérieur d'un même génotype d'orge

E27 : Influence du chlorure de sodium sur le développement *Retama retam* Forssk (Webb.)

IGHILHARIZ Z.

Institut des Sciences de la Nature, Université d'Oran (Es-Senia), Oran 31000, Algérie

Retama retam Forssk (Webb.) est une légumineuse qui croît dans les zones arides et semi-arides algériennes. Cette plante a la particularité par son système racinaire très développé de fixer les sables dunaires. Cette espèce fait partie de l'association *Helianthemum stipulatum-Retama retam*. En Algérie, le genre *Retama* compte trois espèces ; les sols sur lesquels pousse ce genre sont proches de la Méditerranée ou près du Sahara. Ces différentes stations sont riches en sels de nature variée.

Peu de travaux ont été réalisés sur ce végétal. Notre travail porte sur l'étude de la germination et des premiers stades de la croissance de cette plante. L'étude de l'influence du NaCl sur la germination, la croissance, les caractéristiques hydriques et ioniques ainsi que sur les modifications biochimiques a été entreprise dans le cadre de ce travail.

Les graines de *Retama retam* nécessitent pour germer un prétraitement à l'acide sulfurique concentré. La température optimale de germination se situe à 25°C°.

La présence de NaCl inhibe la germination. Néanmoins les graines peuvent germer en présence de NaCl (5 % de germination à 200 mM).

La croissance des plantes en présence ou non de NaCl est appréciée par la hauteur de la tige, la longueur de la racine principale ainsi que la masse fraîche et sèche de ceux-ci. Le sel lorsqu'il est présent à fortes concentrations (100 à 150 mM), réduit la croissance en hauteur des tiges et diminue la production de la matière végétale fraîche ou sèche. La longueur des racines n'est pas modifiée, leur masse fraîche et sèche diminue sous l'effet du sel.

Retama retam se comporte comme une glycophyte tolérante au sel car elle présente à 150 mM de NaCl une croissance pondérale de 80 % comparée au témoin.

Sous l'action du chlorure de sodium, les plantes accumulent du Na^+Cl^- beaucoup plus dans les tiges que les racines. Leur métabolisme est modifié, il y a accumulation de saccharose, de glucose et de proline. Ces différents éléments sont à l'origine de l'ajustement osmotique du *retam* en milieu salin. En effet, les potentiels hydriques et osmotiques baissent sous l'action du sel. La teneur en eau augmente.

L'étude du métabolisme lipidique montre des modifications sous l'effet du sel. Il y a diminution du pourcentage du C.18-3 et celui du C.16-0. La phosphatidylcholine (PC) augmente sous l'action du sel ; le DGDG ou digalactosyldiacylglycérol diminue.

Les différents résultats obtenus nous permettent de conclure que *Retama retam* se comporte comme une glycophyte tolérante d'osmorégulation qui lui permet de "s'adapter" aux conditions salines. Il faut remarquer que si morphologiquement la plante n'est apparemment pas sensible à une faible dose de NaCl, de l'ordre de 50 mM, elle présente déjà des modifications physiologiques en particulier dans le statut de l'eau.

Par ses caractères d'adaptation à la sécheresse et sa tolérance au NaCl, cette plante peut être considérée comme une espèce à développer en zones arides et semi-arides pour freiner la désertification.

E28 : Régulation du métabolisme énergétique et de la signalisation au cours de l'embryogenèse somatique de la patate douce *Ipomea batatas* (L.) : rôle de la NDPK

LAVERGNE D.¹, NATO A.¹, CAVALCANTE ALVES J.-M.¹, SIHACHAKR D.¹, VERON M.²,
TRAINCART F.², DUCREUX G.¹

¹ Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, Université Paris XI, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE.

² CNRS, URA 1129, Unité de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur, 75724 PARIS, FRANCE

Les nucléosides diphosphate kinases (NDPK, EC.2.7.4.6.) jouent un rôle clé dans le contrôle du flux métabolique des groupes phosphate entre nucléosides di et triphosphate et dans le maintien de leurs niveaux de fonction (Pestel, 1992). La protéine native est un hexamère (100 kDa) constituée de sous-unités identiques (17-20 kDa) chaque sous-unité possède un site actif et peut être phosphorylé (Dumas et al., 1992). L'étroite analogie existant entre la NDPK d'épinard, le produit du gène humain Nm23 et celui de la drosophile Awd (Rosengard et al., 1989), nous a conduit à émettre l'hypothèse de la contribution de la NDPK au niveau du déclenchement et de la mise en œuvre du développement des plantes.

MODÈLE EXPÉRIMENTAL

Au cours de ce travail des cellules de Patate douce [*Ipomea batatas* (L.)] en phase de prolifération active (cals non embryogènes) et des cellules en phase de différenciation (cals embryogènes) sont comparativement étudiées.

MÉTHODES D'INVESTIGATION

Les activités enzymatiques de la NDPK ont été mesurées par spectrophotométrie et l'analyse des polypeptides spécifiques à la NDPK a été effectuée par la technique de Western Blot. Des anticorps poly et monoclonaux dirigés contre la NDPK de *Dictyostélium discoideum* et contre la NDPK d'érythrocytes humains ont été utilisés dans les expérimentations immunologiques.

RÉSULTATS

1) Au cours de la phase exponentielle de croissance de cellules en prolifération l'activité NDPK est fortement augmentée comparée à celle exprimée par les cellules en phase stationnaire. Cette augmentation du niveau de l'activité NDPK au cours de la courbe de croissance peut traduire l'intensité des divisions cellulaires et par voie de conséquence l'intensité des échanges nucléotidiques et énergétiques qui y sont associés.

2) De plus, l'activité NDPK mesurée sur les extraits protéiques des cultures embryogènes est quatre fois plus forte que sur les cultures non embryogènes. Les résultats des immunotransferts permettent de montrer la distribution générale du polypeptide 13-17 kDa, caractéristique de la NDPK décrite chez les systèmes animaux.

L'existence d'une forme plus lourde 28-31 kDa est spécifiquement observée sur les extraits de cultures embryogènes. Sa présence est aussi démontrée dans les extraits solubles des organes végétatifs (tissus différenciés tels que les feuilles, tiges, racines, bourgeons axillaires) de plantes cultivées *in vitro*. Des résultats complémentaires obtenus au laboratoire suggérant que le polypeptide 28-31 kDa pourrait être associé aux organites impliqués dans la gestion du pouvoir énergétique tels que les mitochondries et les chloroplastes. Des isoformes localisées au cytoplasme et aux mitochondries ont déjà été décrites chez les cellules de *Dictyostelium* (Troll et al., 1993). La surexpression de l'activité enzymatique de la NDPK dans les cals embryogènes et la présence d'une bande correspondant à un polypeptide de poids moléculaire élevé, permettent de supposer une participation active de la NDPK au processus de la différenciation cellulaire et de la considérer comme un marqueur potentiel de l'embryogenèse somatique (Cavalcante, 1996). Elle pourrait être impliquée à la fois au niveau du déclenchement de la prolifération cellulaire et du contrôle du métabolisme, par la gestion du pouvoir énergétique et par la maîtrise de voies de signalisation faisant appel aux protéines G.

PERSPECTIVES

Des investigations pour démontrer le rôle de la NDPK dans le déclenchement et la régulation des étapes moléculaires et biochimiques de l'embryogenèse somatique de la Patate douce sont envisagées. Dans ce but la protéine NDPK sera purifiée à homogénéité pour être séquencée. Elle servira à la préparation d'anticorps monoclonaux, sondes spécifiques indispensables pour approfondir la surexpression des NDPK lors des processus d'embryogenèse somatique.

Bibliographie

1. CAVALCANTE ALVES J.M. (1996) - Thèse Doctorat Université de Paris Sud, UFR Scientifique d'Orsay, France.
2. DUMAS C., LASCU I., MORERA S., GLASER P., FOURME R., WALLET V., LACOMBE M.L., VERON M., JANIN J. (1992) - The EMBO Journal, 11, 3203-3208.
3. PESTEL M. (1992) - Thèse Doctorat, Université de Rouen, Haute-Normandie, France.
4. ROSENGARD A.M., KRUTZSCH H.C., SHEARN A., BIGGS J.R., BAKER E., MARGULIS I.M.K., KING C.R., LIOTTA L.A., STEEG P.S. (1989) - Nature, 342, 177-180.
5. TROLL H., WINCKLER T., LASCU I., MÜLLER N., SAURIN W., VERON M., MUTZEL R. (1993) - J. Biol. Chem., 268, 25469-25475.

E29 : Multiplication végétative *in vitro* du sapin de Numidie *Abies numidica*

LEBTAHI F., BOUGHEDOURA N.

Institut National de la Recherche Forestière, INRF B.P. 37 Chargea, Alger, Algérie

Dans la perspective de conserver les ressources génétiques et de procéder à l'amélioration de diverses espèces forestières rares et menacées de dépérissement et de disparition, notre laboratoire a jugé utile et important de lancer un programme de recherche en matière de multiplication végétative *in vitro*.

Le Sapin de Numidie (*Abies numidica*) est une espèce endémique des monts Babors. Elle couvre actuellement une superficie de 300 hectares seulement.

Cette espèce forestière qui figure dans la liste des plantes rares et vulnérables a été peu étudiée et peu utilisée dans les projets de reforestation et ce malgré son importance sylvicole et esthétique. En effet, elle peut contribuer d'une façon notable à l'équilibre écologique par des reboisements dans des zones à hautes montagnes, à la colonisation des terrains à sols calcaires les plus pauvres et à la protection et à l'embellissement de l'environnement.

Actuellement, l'extension et la sauvegarde de cette essence, devient l'une de préoccupations majeures du secteur forestier. À cet effet, nos travaux sont menés dans ce but pour mettre des méthodes de multiplication rapides d'arbres sélectionnés comme élites et destinés à la création de parcs à clones.

Les travaux que nous menons au laboratoire concernent essentiellement la micropropagation du Sapin selon deux voies :

- la voie de l'organogenèse qui permet d'obtenir des bourgeons par stimulation directe de l'explant ;
- la voie de l'embryogenèse somatique.

L'ensemble de nos expérimentations portent sur des séries de tests à la recherche des milieux de culture favorables à la multiplication cellulaire et au bourgeonnement et de balances hormonales favorisant davantage cette prolifération cellulaire et ce bourgeonnement.

La mise au point de cette technique nécessite l'expérimentation de plusieurs types d'explants issus de sujets juvéniles et âgés.

E30 : Amplification du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par les voies de l'organogenèse, de l'embryogenèse somatique et de la réversion florale

MASMOUDI R., MEZIOU B., KRICHEN W., FEKI L., OTHMANI A., DRIRA N.

Laboratoire de Physiologie Végétale Faculté des Sciences de Sfax - 3038 Sfax - TUNISIE

La phœniciculture, élément principal de l'écosystème oasien, occupe une place stratégique dans l'économie des régions arides et chaudes du globe. Les recherches que nous avons menées sur le palmier dattier, depuis plusieurs années, en vue de sa multiplication clonale rapide, nous ont permis de définir de nombreuses modalités de propagation de cette espèce. Nous avons exploré les possibilités que peuvent offrir les tissus et organes de la phase adulte : bourgeons végétatifs

axillaires de rejets et feuilles qui en dérivent, fragments de folioles et jeunes palmes de rejets, ébauches florales et explants inflorescentiels de pieds femelles adultes. Les conditions de culture artificielle nous ont permis de révéler et de faire exprimer de nombreuses modalités de développement toutes étroitement liées tant aux conditions de l'environnement physico-chimique, qu'à la nature et au stade de développement des explants expérimentés.

Les principaux types de morphogenèse obtenus *in vitro* sont les suivants :

- Évolution des bourgeons végétatifs axillaires en plantules structurées par initiation de racines adventives à leur base.
- Néoformation directe de bourgeons sur les jeunes palmes sans aucune manifestation apparente de cals.
- Prolifération de cals organogènes conduisant à des plantes entières et viables.
- Réversion vers l'état végétatif des ébauches florales des pieds femelles engagées normalement dans la voie reproductrice.
- Réversion affectant les potentialités organogénétiques des tissus inflorescentiels.
- Apparition de structure simulant l'évolution du zygote et conduisant à la formation d'embryons puis de plantules.
- Déviation des apex floraux vers la voie inflorescentielle.

Ainsi, la culture *in vitro* des organes de la phase adulte du palmier dattier permet, d'une part, d'accéder à une meilleure compréhension des diverses modalités de développement chez cette espèce, d'autre part, d'obtenir des plantes selon de nombreuses voies de néoformation dont certaines présentent la garantie de conformité de la descendance. Celle-ci a pu être vérifiée à l'aide notamment des premières productions fruitières des plantes transférées en plein champ dont la vigueur semble avoir contribué à la précocité de l'entrée en floraison.

E31 : Culture *in vitro* et qualité de l'arôme de la ciboulette (*Allium schænoprasum* L.)

MELLOUKI F.^{1,2}, VANNEREAU A.¹, COSSON L.¹

¹ Laboratoire de Botanique et Phytochimie, Faculté de Pharmacie, Rue J.B. Clément, F- 92296 CHATENAY-MALABRY

² Département de Biologie, Faculté des Sciences et Techniques, MOHAMMEDIA, Maroc

L'utilisation des techniques de culture *in vitro* dans l'étude de métabolites à intérêt agro-alimentaire ou pharmaceutique est actuellement largement exploitée. De telles techniques présentent un certain nombre d'avantages :

- Les cellules cultivées *in vitro* se multiplient sur un milieu défini, dans des conditions de culture strictes, indépendamment des conditions saisonnières ou climatiques. Ceci permet une meilleure reproductibilité des résultats.
- Quand les cellules sont cultivées *in vitro*, sous forme de cals ou de suspensions, les corrélations qui existent dans la plante entière sont abolies. La caractérisation à l'échelle cellulaire de voies métaboliques comme celle de la production de substances aromatiques est rendue plus objective.

Nous avons choisi d'étudier la production de l'arôme de ciboulette par des cultures *in vitro*, en comparaison avec celle de feuilles fraîches. Nous disposons pour ce fait d'une souche non-organogène entretenue en milieu liquide. Les espèces du genre *Allium* émettent une forte odeur caractéristique des composés soufrés, obtenue après action d'une enzyme, l'alliinase (C-S lyase) vacuolaire sur des substrats cytosoliques, les S-Alk(en)yl-L-Cysteine Sulfoxides (ACSO). L'émission de l'arôme nécessite donc une lyse cellulaire. La qualité de l'arôme est ainsi directement liée à :

- l'activité de l'alliinase ;
- la proportion relative des différents précurseurs ACSO.

L'ALLIINASE : C-S LYASE (EC 4.4.1.4.)

L'enzyme a été extraite et purifiée à partir de la souche cultivée *in vitro* et à partir des feuilles. Il s'agit d'une glycoprotéine. L'homogénéité de l'enzyme a été obtenue par cinq étapes successives de purification. Son degré de pureté a été analysé à chaque étape par électrophorèse SDS-PAGE. Ses caractéristiques physicochimiques et cinétiques ont été déterminées : masse moléculaire, nombre de sous-unités et point isoélectrique, Km, température et pH d'action optima. Ces caractéristiques semblent être identiques, quelle que soit l'origine de l'enzyme, ce qui conforte l'intérêt de la culture *in vitro*.

LES PRÉCURSEURS (ACSO)

L'étude des précurseurs de l'arôme a été effectuée par C.L.H.P. après dérivation. Le S-méthyle-L-cystéine sulfoxide (MCSO), le S-propyle-L-cystéine sulfoxide (PCSO) et le *trans*-1-S-propényle-L-cystéine sulfoxide (PeCSO) ont été identifiés. Les proportions relatives de ces trois précurseurs sont très similaires entre les feuilles et les cultures. Le profil des précurseurs a été étudié après ajout dans le milieu de culture de divers composés exogènes. Les résultats obtenus montrent que les proportions des précurseurs les uns par rapport aux autres changent significativement. Il en résulte donc qu'il est possible de modifier « à volonté » la qualité de l'arôme émis par des cellules de ciboulette cultivées *in vitro*.

E32 : Déterminisme génétique de quelques molécules caractéristiques du pattern phénolique et leur relation avec la couleur des téguments chez la féverole (*Vicia faba L*) : Leguminosae.

MERGHEM R.¹, DUC G.², JAY M.³

¹ Université de Constantine, Institut des Sciences de la Nature, 25000 Constantine. Algérie. ² INRA Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, BP 1540, F-21034 Dijon Cédex France. ³ Université Claude Bernard Lyon 1, Biologie micromoléculaire et Phytochimie, 43, Bd du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne France.

La haute teneur protidique des légumineuses justifie en partie le caractère vital que revêtent ces plantes en alimentation animale et humaine. Leurs protéines fournissent les acides aminés indispensables à la vie avec des teneurs en lysine avoisinant 18 g/kg de matière sèche, constituant ainsi un bon complément pour les céréales qui en sont déficientes. Cependant, lorsque des sources de protéines, comme le pois (*Pisum sativum*) et la féverole (*Vicia faba*), sont utilisées dans l'alimentation des monogastriques, les performances des animaux restent le plus souvent en deçà de celles obtenues avec les rations traditionnelles à base de larges proportions de soja (Eggum 1980 ; Huisman 1989). Des expérimentations *in vivo* effectuées avec *Vicia faba* (Marquard, 1989 et Jansman, 1991) ont démontré que la disponibilité en protéines et dans une moindre mesure en énergie est réduite par la présence de tannins condensés localisés dans les téguments des graines. Deux gènes récessifs, éliminant les tannins condensés des téguments et déterminant la couleur blanche des fleurs ont été mis en évidence chez *Vicia faba* par Picard 1976. Après cette découverte plusieurs programmes de sélection en

Europe ont inclus le caractère Zéro tannin et des cultivars sont actuellement enregistrés. Le gène Zéro-tannin entraîne une grande sensibilité aux micro-organismes pathogènes du sol (Villalobos and Jellis 1990), ce phénomène pourrait être surmonté par le croisement génétique entre génotypes dépourvus de tannins et des génotypes ayant un pouvoir tannant (Bond et Duc 1993). En effet, les tannins condensés jouent un rôle de défense pour le végétal lui-même, en particulier vis-à-vis des attaques des micro-organismes et prédateurs (Salunke et al., 1990). Pour pallier ce problème, la sélection devra s'orienter vers la recherche de nouveaux génotypes dont la teneur en tannins condensés autoriserait une bonne tenue au champ et serait sans effet néfaste pour l'alimentation. Des génotypes à fleur ponctuée jaune et à faible teneur en tannins condensés ont été reporté par Cabrera et Martin (1986), Bond *et al.* (1991) et des génotypes à téguments rouges par Cabrera et Martin (1989). Une collection de génotypes de féverole (*Vicia faba*) est analysée pour son contenu en tannins condensés et son pouvoir tannant ; l'héritabilité du pattern phénolique est également évaluée à travers l'analyse des descendants F₃ issus d'un croisement diallèle entre un génotype à fleur ponctuée noir et tégument beige très tannant, un génotype à fleur ponctuée noir et tégument vert à pouvoir tannant intermédiaire et enfin un génotype à fleur ponctuée noir et tégument noir très peu tannant. Les résultats montrent l'existence, dans le cas de la féverole, de génotypes à fleur ponctuée noir présentant des teneurs intermédiaires en tannins condensés. L'analyse de la descendance F₃ issue du croisement diallèle confirme bien le lien entre couleur des téguments, activité tannique et pouvoir tannant.

Mots clés : *Vicia faba* - légumineuses à graines - croisements - analyse génétique - valeur nutritionnelle - couleur des téguments - tannins condensés.

E33 : Essai de reproduction asexuée (marcottage) des feuilles de *Bryophyllum pinnatum* (Lam) Oken Crassulaceae

NANCY L.

Laboratoire de Pharmacognosie, 27, Bd Jean Moulin, 13885 Marseille cedex 5

Dans le but de justifier l'usage populaire de *Bryophyllum pinnatum* (Lam) Oken Crassulaceae et d'envisager sa culture, une enquête a été effectuée dans les provinces du Cameroun de juillet 1994 à octobre 1995. Dans les 10 provinces enquêtées, cette plante herbacée est doublement utilisée, à la fois comme végétal comestible (feuille = légume) et comme médicament (dans le traitement des otites, de la toux et des affections dermatologiques). Une revue de la littérature confirme ces deux utilisations dans une vingtaine de pays africains. Il nous a donc semblé intéressant de mener des investigations sur cette plante dont les usages alimentaires et médicaux sont si largement répandus. Pour ce faire, une récolte quantitative de feuilles de cette plante s'imposait. Le premier plant sur lequel nous avons récolté les feuilles, nous a frappé par un fait inhabituel. Au point de contact de la feuille et du sol (au niveau de l'une des dents du lime) s'élevait une jeune pousse. Comme les quantités récoltées étaient insuffisantes pour nos investigations, nous avons pensé que produire par marcottage à partir de feuilles, de jeunes pousses, et plus tard de jeunes plants, était possible. Un premier essai sur des feuilles récoltées l'après-midi était négatif. Le second, effectué sur des feuilles récoltées tôt le matin selon les indications des personnes enquêtées et des tradipraticiens, nous permettait d'obtenir une feuille mature (30 à 35 dents), 30 à 35 nouvelles pousses. Comme une plante adulte porte en moyenne 30 folioles matures, à partir de cette dernière, par marcottage, sous des conditions particulières, 900 à 1050 jeunes plantes destinées, soit à l'alimentation (source de vitamine C, d'acide

citrique et surtout de calcium et de mucilage), soit comme phytomédicaments. Par ailleurs, la toxicité aiguë de l'extrait aqueux (DL50 = 6,4 g/Kg poids corporel) atteste de l'innocuité des ces feuilles largement consommées par les enfants dénutris en phase de croissance au Cameroun et dans les pays en voie de développement.

E34 : Contribution a l'étude d'un module de signalisation associé au processus de l'embryogenèse somatique du blé

NATO A., MOURSALIMOVA A., FRESNEAU C., MIRSHAHI M., LAVERGNE D., HENRY Y.,
DUCREUX G., DE BUYSER J.

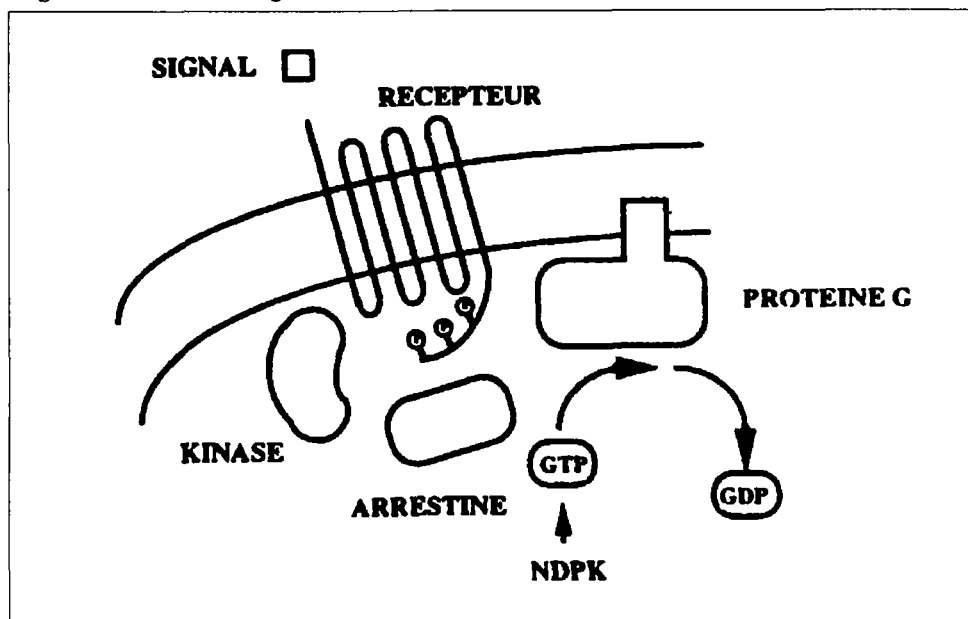
Université Paris-XI, INSERM 86, URA CNRS 1128 et 1116

Les processus complexes de la croissance et du développement des Plantes Supérieures dépendent notamment de facteurs environnementaux et de médiateurs chimiques. L'ensemble de ces signaux nécessitent que les cellules végétales mettent en œuvre des systèmes de perception et de génération de messagers intra- et intercellulaires conduisant à des modifications de la physiologie ou du métabolisme. À l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires des voies de transduction de signaux et de la communication cellulaire constituent un vaste champ d'investigation pour la biologie végétale. La complexité du réseau des voies de signalisation commence à être perçue du fait de l'identification de nombreuses familles de gènes. Il semble que certains modules de signalisation aient été parfaitement conservés durant l'évolution (levures, mammifères, plantes). Par analogie avec ce qui est connu des voies de signalisation dans les systèmes animaux et la levure, les récepteurs potentiels des hormones et des photons lumineux dans les cellules végétales, paraissent être couplés à des protéines G. Cependant on dispose de très peu de données sur les protéines régulatrices impliquées dans les différents systèmes de transduction chez les plantes.

Objectifs : C'est dans cette perspective que nous avons entrepris de rechercher chez les végétaux une protéine analogue à l'arrestine, molécule jouant un rôle fondamental dans la régulation de la phototransduction visuelle chez les mammifères. Nous avons élargi notre étude à l'analyse d'un module de signalisation comprenant des arrestine-like, des protéines G et la nucléoside diphosphate kinase (NDPK). Ces éléments sont susceptibles de contrôler les phases de prolifération cellulaire et de différenciation lors de l'induction hormonale du processus de l'embryogenèse somatique (figure 1). Les **arrestines** constituent une famille de protéines monomériques de 39 à 49 kD, dont la structure est très conservée durant l'évolution. L'arrestine rétinienne bovine ou antigène S est une protéine soluble de 48 kD. Elle se lie dans les bâtonnets à la rhodopsine photoactivée et phosphorylée, et inhibe les effets amplificateurs de la transducine (protéine G), assurant ainsi la désensibilisation des récepteurs. Considérée comme n'étant pas spécifique des cellules photoréceptrices, l'arrestine apparaît aujourd'hui comme le premier membre identifié d'une famille de protéines homologues possédant un rôle régulateur dans des systèmes de transduction médiés par les protéines G. Les **protéines G** lient et hydrolysent le GTP. Elles appartiennent à une large famille. La première sous-famille est celle des protéines G hétérotrimériques (sous-unités α , β et γ), autour de 45 kD, couplées à des récepteurs à sept segments transmembranaires. Des protéines de cette sous-famille sont surexprimées durant l'embryogenèse (Xénopie, algue, *Arabidopsis*). La seconde sous-famille, très large, rassemble des protéines G monomériques, de 20 à 35 kD, contrôlant le cycle cellulaire, la croissance, la différenciation, la sécrétion. Chez les végétaux, des protéines G sont impliquées dans la signalisation de la lumière et des hormones, les mécanismes de défense et la régulation de l'activité des canaux ioniques. La **NDPK**, protéine native hexamère de 100 kD (sous-unités de 17-20 kD), joue un rôle central dans le contrôle du flux métabolique des

groupements phosphates. Cette enzyme est actuellement considérée comme un marqueur potentiel de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Ainsi, chez la *Drosophile*, le gène *awd* est impliqué dans le développement et présente une forte homologie avec le gène humain *Nm23*. Récemment, la forte analogie des séquences de la NDPK d'Épinard et les produits des gènes *awd* et *Nm23*, nous a conduit à émettre l'hypothèse d'une contribution de cette enzyme aux processus de prolifération et de différenciation des cellules végétales.

Figure 1. Éléments de signalisation.



Modèle biologique : Nous avons choisi la variété de blé (*Triticum aestivum* L.) Chinese Spring comme modèle expérimental. Les embryons zygotiques immatures (14 jours après la pollinisation) ont été utilisés pour initier l'embryogenèse somatique induite par le 2,4-D, lors de la culture à la lumière ou à l'obscurité. Nous disposons de souches embryogènes et non embryogènes de cette variété, ainsi que de ses lignées aneuploïdes : 36 lignées ditélosomiques (DT) et 6 lignées nullisomiques-tétrasoniques (NT). Deux lignées DT, CSDT3DS et CSDT3DL (S pour court et L pour long, 3 pour le chromosome et D pour le génome) ont été particulièrement analysées, du fait de leur capacité non embryogène (DT3DS) et embryogène (DT3DL) en culture *in vitro* (Henry *et al* 1994).

Approches expérimentales : Les techniques d'immuno-empreintes (Western blot) ont été développées grâce à l'apport des anticorps monoclonaux de l'arrestine bovine, de la NDPK humaine et d'un anticorps polyclonal dirigé contre un peptide synthétique de la séquence conservée de la sous unité α de la protéine G. Les protéines possédant un site de fixation pour le GTP ont également été recherchées par les techniques des overlays avec l'(α - 32 P) GTP.

Résultats

1 - Une première forme soluble d'arrestine-like de 40 kD est détectée par les anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes N-terminaux et centraux de l'arrestine bovine. Sa présence est générale dans les organes des germinations de blé (racine, coléoptile, feuille). Cette protéine se retrouve également dans l'embryon immature de blé. La synthèse de cette forme n'est pas sensible à la lumière de croissance, mais est fortement surexprimée dans les cultures *in vitro* initiées à partir d'embryons immatures, en présence de 2,4-D. Une seconde forme soluble et membranaire d'arrestine-like de 29 kD est décelée par plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes C-terminaux de l'arrestine bovine. Cette seconde forme qui apparaît dans les organes chlorophylliens lors de la culture à la lumière est spécifique

des tissus embryogènes. L'analyse de 42 lignées aneuploïdes a montré que le bras chromosomique 3DL, essentiel pour l'embryogenèse somatique possède un gène qui code pour la forme arrestine-like de 29 kD ou contrôle son expression (Nato *et al* 1997). De plus, des résultats récents obtenus dans notre laboratoire ont montré que la forme membranaire de cette arrestine-like semble être intégrée dans les structures thylakoïdales des chloroplastes.

2 - L'anticorps polyclonal dirigé contre la sous-unité a de la protéine G reconnaît un polypeptide soluble et membranaire de 58 kD dans les embryons immatures. La culture *in vitro* de ces embryons en présence de 2,4-D provoque l'apparition d'une nouvelle forme de 32 kD. Cette seconde forme pourrait être liée à la prolifération cellulaire résultant de la présence d'une auxine dans les cultures. Les expériences de marquage avec l'(a-³²P) GTP ont confirmé la stimulation des formes protéiques liant le GTP en relation avec la prolifération et la différenciation cellulaires induites lors de l'embryogenèse somatique du blé.

3 - L'analyse par Western blot montre que la forme soluble de 16 kD de la NDPK du blé, présente dans l'embryon immature, est plus fortement exprimée durant la culture *in vitro*. Les extraits solubles des cultures embryogènes montrent en outre la présence d'une forme de 32 kD, qui pourrait jouer un rôle dans la différenciation. Malgré l'apparition de cette nouvelle forme, le niveau de l'activité enzymatique de la NDPK ne varie pas lors de la mise en culture *in vitro* des embryons immatures.

Perspectives :

Les anticorps utilisés nous ont permis de déceler des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire et la différenciation. L'analyse de l'expression de plusieurs molécules (protéine G, arrestine, NDPK), sous l'influence de la lumière et des hormones, confirme qu'elles jouent un rôle important dans les cascades de signalisation participant au métabolisme et au développement (Nato *et al* 1996). Des avancées dans la connaissance de leur mode d'action pourront être obtenues par le clonage des ADNc (en cours de réalisation pour la NDPK), l'analyse des séquences et l'étude de la structure des gènes. Les travaux ultérieurs devraient permettre d'affiner notre connaissance des mécanismes participant au développement des plantes.

Bibliographie

1. HENRY Y., MARCOTTE J.-L., DE BUYSER J. 1994. Chromosomal location of genes controlling short-term and long-term somatic embryogenesis in wheat revealed by immature embryo culture of aneuploid lines. *Theor Appl Genet* 89 : 344-350.
2. NATO A., DE BUYSER J., MIRSHAHI A., LAVERGNE D., JEAN C., CAVALCANTE A.J.M., DUCREUX G., TICHITSKY G., JOUANNIC S., HAMAL A., KREIS M., HENRY Y. 1996. Expression of signalling molecules during plant development and embryogenesis. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4 : 212-214.
3. NATO A., MIRSHAHI A., TICHITSKY G., MIRSHAHI M., FAURE J.-P., LAVERGNE D., DE BUYSER J., DUCREUX G., HENRY Y. 1997. Immunological detection of potential signal transduction proteins expressed during wheat somatic tissue culture. *Plant Physiol* 113 (sous presse)

E35 : Effets à long-terme du saccharose exogène sur la croissance, la photosynthèse et le métabolisme du carbone des plantes de tomate *in vitro*

LE V.Q., SAMSON G., DESJARDINS Y.

Les effets à long-terme du saccharose exogène sur la croissance, la photosynthèse et le métabolisme du carbone ont été étudié sur des plants de tomate cultivés sous deux conditions différentes. Sous une faible intensité lumineuse (50 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) et une concentration en CO_2 de 400 ppm, la présence du saccharose augmente la croissance, la photosynthèse, la teneur en

chlorophylle, la teneur en sucres solubles (hexoses et saccharose) et en amidon dans les racines, les feuilles jeunes et matures par rapport aux plantes photo-autotrophique. L'apport du saccharose augmente fortement l'activité de la saccharose synthase (SS) (EC 2.4.1.13) dans les racines et les jeunes feuilles tant dit que l'activité de la saccharose phosphate synthase (SPS) (EC 2.4.1.14), de l'invertase (INV) (EC 3.2.1.26) et de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (ADPGppase) (EC 2.7.7.27) augmente dans les racines et les feuilles matures. Au contraire, les activités de la SS dans les racines et de l'ADPGppase dans les feuilles matures sont bien moins stimulées par le saccharose exogène dans des conditions de forte intensité lumineuse ($500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et de forte concentration en CO_2 (4 000 ppm). On observe une diminution de la croissance, de l'activité de la SPS ainsi que de la photosynthèse et une forte accumulation d'hexoses et d'amidon. Nous n'avons pas observé d'effet du saccharose exogène sur le rendement du photosystème II estimé par le rapport Fv/Fm dans les deux cas *In vitro*, dans des conditions limites de culture (lumière et CO_2 faible) la plante a besoin de saccharose exogène pour augmenter la photosynthèse et la croissance alors que dans des conditions très favorables pour la photo-autotrophie (lumière et CO_2 élevé) la présence du saccharose diminue non seulement la photosynthèse mais aussi la croissance par la perturbation dans la plante entière des relations source-puit.

E36 : Interaction cytosquelette cortical, paroi cellulaire chez les plantes. Contrôle de la division asymétrique de la cellule apicale de *Sphacelaria* (Fucophycée)

OUICHOU A., DUCREUX G.

Laboratoire de Morphogenèse Expérimentale Végétale, Bât 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

La cellule apicale de *Sphacelaria* montre une organisation polarisée permanente, produit par des divisions asymétriques et successives des cellules sous apicales, qui contribuent à la construction du thalle.

Durant l'interphase de la cellule apicale, les deux centrosomes diamétralement opposés, coïncident avec l'axe de croissance et organisent un réseau de microtubules polarisé. Le marquage des filaments d'actine et vitronectine amènent des preuves sur les connexions entre le cytosquelette cortical et la paroi à travers la membrane plasmique. Une confirmation indirecte est apportée par la désorganisation du cytosquelette et l'altération dramatique de la polarité chez les protoplastes de la cellule apicale.

Durant la mitose, la polarité du fuseau mitotique et la polarité cellulaire est conservée en permanence. A la fin de la mitose, les centrosomes de dédoublent immédiatement et migrent à égale distance du site originel du pôle distale. Un réseau de microtubules se forme à partir de chaque centrosome, une orientation du noyau rend ce réseau parallèle à l'axe de la cellule et s'allonge jusqu'à l'extrémité proximale, des connexions s'établissent probablement avec la paroi cellulaire par l'intermédiaire de l'actine. En conséquence, la polarité du fuseau mitotique coïncide de nouveau avec la polarité cellulaire. Ces événements sont caractéristiques de la cellule apicale et sont reliés à son organisation structurale. L'identification des protéines impliquées dans les connexions entre le cytosquelette cortical et la paroi cellulaire est en cours, en prenant comme modèle les interactions cortex cellulaire-matrice extracellulaire chez les cellules animales.

E37 : Régénération intensive du pois (*Pisum sativum* L.) en présence de thidiazuron, *in vitro*

POPIERS D., SANGWAN-NORREEL B.S.

Laboratoire Androgénèse et Biotechnologie, Université de Picardie Jules Verne, Faculté des Sciences 33.
rue Saint Leu, F-80039 AMIENS Cedex 01

La régénération *in vitro* du Pois, *Pisum sativum* L. a été améliorée grâce à l'utilisation de Thidiazuron. Des bourgeons sont initiés à partir de nœuds cotylédonaire de l'axe embryonnaire, isolé à partir de graines matures, et cultivés sur un milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) additionné de 13,3 µM de 6-benzylaminopurine (BA), de 16,1 µM d'acide α-naphtalène acétique et de 0,2 µM d'acide-2,3,5-triiodobenzoïque (TIBA) (Tétu *et al.*). Les structures obtenues sont par la suite excisées en fines tranches et cultivées sur le même milieu ; ou en présence de Thidiazuron, ces tranches produisent une deuxième vague de bourgeonnement. Les meilleurs résultats (90-110 bourgeons par explant) sont obtenus avec 10 µM de Thidiazuron (Popiers *et al.*). La production de massifs organogènes primaires et secondaires est indépendante du génotype et est reproductible. Les bourgeons s'allongent sur le milieu initial, puis s'enracinent en présence de 5,37 µM d'acide α-naphtalène acétique et se développent en plantes viables.

Bibliographie

1. POPIERS D., FLANDRE F., SANGWAN-NORREEL B.S. 1997. Intensification de la régénération du Pois, (*Pisum sativum* L.), par le thidiazuron, *via* la formation de structures caulinaires organogènes. J. Can. Bot. (sous presse).
2. MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15 : 473-497.
3. TETU T., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S. 1990 Direct somatic embryogenesis and organogenesis in cultured immature zygotic embryos of *Pisum sativum* L. J Plant Physiol , 137 102-109.

E38 : Micropropagation de la patate douce (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) à partir du développement de bourgeons axillaires

ROBÉNE-SOUSTRADE I., KODJA H., FIGIER J.

Laboratoire de Biologie et Physiologie végétales, Université de La Réunion, 15 Av. René Cassin. BP
7151 97715 ST Denis Messag 9.

La patate douce (*Ipomea batatas*) est une plante d'intérêt économique considérable dans les zones tropicales humides. Tel est le cas à la Réunion où elle est utilisée à la fois dans la nutrition humaine mais aussi dans l'alimentation bovine. En effet, l'introduction de la patate douce (ses tubercules racinaires et ses feuilles) dans la nutrition des vaches, augmente de manière sensible la production laitière, et ceci, sans apport supplémentaire de concentré de

fourrage. Malheureusement, les zones de culture de la patate douce à la Réunion sont situées à une altitude largement inférieure à celle des zones d'élevage des bovins où règnent des températures relativement basses en saison hivernale.

Des expérimentations au champ ont montré que des variétés de patate douce importées de pays de hauts plateaux (Madagascar et Pérou) pouvaient s'adapter aux zones d'altitude élevées à la Réunion. Cependant, la productivité de ces variétés importées est largement inférieure à celle des espèces locales en basse et moyenne altitudes. Les méthodes de culture *in vitro* et de manipulations génétiques, notamment l'exploitation de la variation somaclonale, l'hybridation somatique et la transformation génétique, permettent d'envisager, à cours terme, l'amélioration génétique de ces variétés notamment au niveau de leur rendement et de leur adaptabilité. Cependant, l'application de ces techniques nouvelles nécessite la maîtrise des systèmes de régénération *in vitro* chez la patate douce. La méthode classique de multiplication végétative *in vitro* est l'embryogenèse somatique. Cependant, outre que cette technique ne garantit pas une multiplication conforme des génotypes, il existe chez la patate douce certains clones pour lesquels il est difficile, voire impossible, d'obtenir des embryons somatiques. Pour ces clones, il est préconisé une autre méthode de micropropagation : l'organogenèse. Notre travail a été de démontrer que la micropropagation de la patate douce peut se réaliser facilement à partir de bourgeons axillaires. Pour cela, des explants (d'environ 3 mm), formés du dôme apical et des deux dernières feuilles récemment formées, ont été prélevés sur des tiges feuillées juvéniles de deux variétés locales (les variétés RP40 et RP90) cultivées en serre. Après désinfection, ces explants ont été déposés sur différents milieux d'induction. Le milieu de base (MS30) est celui de Murashige et Skoog gélosé, additionné de saccharose (30 g/l). Différentes combinaisons hormonales composent ces milieux d'inductions. En effet, deux phytohormones sont utilisées : l'ANA, acide α -naphtalène acétique (0 et 0,5 mg/l) ainsi que le TDZ, thidiazuron (0, 0,5, 1, 2 et 3 mg/l). Après quatre semaines de culture à la lumière à 25°C, les explants induits sont transférés sur le milieu de régénération : milieu MS30 dépourvu d'hormone. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les milieux inducteurs ne contenant pas d'ANA et pourvus de TDZ à 0,5 et 1 mg/l. En effet, ces milieux induisent vers la troisième ou quatrième semaine, le développement d'un bourgeon axillaire secondaire (visible à l'œil nu). La transformation de ce bourgeon en une tige feuillée est accélérée lors du transfert sur le milieu de régénération. Après quatre semaines de croissance sur ce dernier milieu, les tiges feuillées isolées sont transférées sur un milieu d'enracinement (milieu MS30 pour lequel les macroéléments sont dilués de moitié). Le pourcentage d'enracinement des tiges feuillées est de 100 % et débute dès la première semaine après le repiquage. Les plants ainsi obtenus sont transférés dans une miniserre (480X330X200 mm) contenant un mélange de vermiculite et de sable (2:1). Ces plants se développent facilement après une ouverture progressive du couvercle de la miniserre. En conclusion, nous disposons maintenant d'une technique de micropropagation de la patate douce, basée sur le bourgeonnement axillaire. Il s'agit d'une "vitro-méthode" relativement simple, avec une régénération des tiges feuillées à partir de zones méristématiques préexistantes, qui d'ordinaire, garantit la conformité génotypique. L'utilisation de cette technique sur les différentes variétés de Patate douce locales ou importées à des fins agronomiques à la Réunion, permettra d'une part la constitution d'une « banque de gènes ou vitrothèque » et d'autre part, d'avoir un matériel végétal « sain » et disponible susceptible de servir pour des tests de sélection ou de manipulation dans le domaine du génie génétique.

La présentation de ce poster aux 6^{es} journées scientifiques des Biotechnologies végétales a été faite avec l'aide de l'AUPELF/FICU.

E39 : Effet de l'apport exogène in planta d'acide 2,3,5 triiodobenzoïque ou TIBA sur la régénération *in vitro* de Betterave sucrière (*Beta vulgaris* L.).

ROUSSY I., DUBOIS F., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S.

Laboratoire Androgénèse et Biotechnologie, Université de Picardie Jules Verne, 33, rue Saint-Leu, 80 039 Amiens, Cedex 01, France

Nous avons développé un protocole de régénération indirecte chez la Betterave sucrière, à partir de fragments de limbes de plantes adultes entretenues en serre. Un apport exogène (2 fois par semaine) d'un inhibiteur du transport auxinique, tel que le TIBA ou acide 2,3,5 triiodobenzoïque, à la concentration de 3 mg/l, à des plantes âgées de 6 mois, est essentiel pour l'obtention de cals organogènes (Roussy *et al.*, 1996). L'effet bénéfique, de l'apport en culture *in vitro* du TIBA, sur la régénération directe et indirecte a déjà été rapporté chez cette espèce (Detrez *et al.*, 1988 ; Jacq *et al.*, 1992). De plus, seuls les cals produits sur un milieu d'induction, contenant du thidiazuron ou TDZ à la concentration de 2,2 mg/l ou 10 µM, ont donné des pousses. Le nombre de bourgeons régénérés augmente au cours des repiquages. Nous avons noté en parallèle que, par rapport aux plantes témoins, l'activité des peroxydases était supérieure chez les plantes traitées par du TIBA à 3 mg/l. Dans un contexte biotechnologique, visant à la transformation génétique de cette espèce, via *Agrobacterium tumefaciens*, ce protocole pourrait s'avérer être un outil très intéressant pour la régénération de plantes transgéniques.

Bibliographie

1. DETREZ C., TÉTU T., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S. (1988) J Exp Bot 39 : 917-926.
2. JACQ B., TÉTU T., SANGWAN R.S., DE LAAT A., SANGWAN-NORREEL B.S. (1992) Plant Cell Reports 11 : 329-333.
3. ROUSSY I., DUBOIS F., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S. (1996) Plant Cell Reports 16 : 142-146.

E40 : Rôle du 3F-ip (4,4,4 trifluoroisopentenyladenine) et du CPPU (N-(2, chloropyridyl) 4-N' phénylurée), molécules de synthèse à activité cytokinine, sur l'initiation et la multiplication de protocormes de régénération de *Phalaenopsis*

SAMSON I., HAMAMA L., LETOUZE R.

Laboratoire de Recherche en Physiologie Végétale des Pays de la Loire (L.R.P.V). 16, Boulevard Lavoisier - 49045 Angers Cedex 01 - France

Le *Phalaenopsis* (fam. Orchidaceae), qui tient son nom du grec "Phalaina" = papillon et "opsis" = ressemblance, est une orchidée épiphyte à croissance monopodiale.

Actuellement, la propagation industrielle du *Phalaenopsis*, qui passe par la multiplication sexuée entre deux parents issus le plus souvent d'hybridations dirigées, est parfaitement maîtrisée mais pose le problème de variabilité et d'hétérogénéité du semis.

La multiplication végétative (protocormes de régénération) est la seule alternative pour résoudre les problèmes liés à la multiplication sexuée ; elle permet d'obtenir un matériel génétiquement homogène, conforme à un pied-mère sélectionné.

Si la formation de protocormes de régénération est possible à partir d'explants de *Phalaenopsis* (1), la méthodologie reste délicate et les résultats obtenus permettent rarement une application industrielle programmable.

L'objectif de ce travail a été de tester à trois niveaux différents et comparativement avec les hormones classiquement utilisées, des molécules nouvelles (2)¹ à activité cytokinique (3F-ip ; CPPU) sur les différentes étapes du processus de régénération par embryogenèse somatique.

CLONAGE DE VARIÉTÉS HYBRIDES À HAUT INTÉRÊT ÉCONOMIQUE

Des boutures gemmées de hampes florales de *Phalaenopsis*, préalablement désinfectées sont mises en culture sur le milieu Vacin-Went additionné d'ANA (0,1 à 5 mg/l), de BAP (0,5 à 5 mg/l), de 20 % de lait de coco et solidifié avec 2 g/l de gelrite. Au bout de deux mois de culture, selon la position du bourgeon sur la hampe florale, ce milieu permet la formation de pousses végétatives ou de hampes florales qui après isolement, sont cultivées sur le même milieu et repiquées tous les mois. Ce matériel végétal conduit à l'obtention de clones génétiquement homogènes.

INITIATION DES PROTOCORMES DE RÉGÉNÉRATION

Les plateaux racinaires des pousses végétatives obtenues *in vitro* âgées de 8 à 12 mois sont mis en culture sur le milieu NDM additionné de saccharose 10 g/l, d'ANA (0,1-3 mg/l), de 3 F-ip (0,1-5 mg/l), de 15 % de lait de coco et solidifié avec 2 g/l de gelrite.

Au bout d'un mois, les explants non nécrosés demeurent verts et 1 à 2 mois plus tard donnent naissance aux premiers protocormes de régénération.

Cette étape d'initiation des embryons somatiques est particulièrement délicate. Le prélèvement de l'explant, la balance hormonale et le choix de la cytokinine sont les clefs de la réussite. Les plateaux racinaires de vitroplants se sont révélés les explants les plus performants pour l'initiation des protocormes. La nature de l'explant le plus favorable étant définie, le travail en cours tend à améliorer la balance hormonale.

MULTIPLICATION DES PROTOCORMES DE RÉGÉNÉRATION

Les protocormes de régénération obtenus précédemment sont sectionnés et mis en culture sur le milieu NDM additionné d'ANA (0,1-2 mg/l), de CPPU (hormone de synthèse à activité cytokinique - 0,5 à 5 mg/l), de 15 % de lait de coco, de saccharose 10 g/l et solidifié avec 2 g/l de gelrite. Au bout d'un mois chaque fragment de protocormes présente de nombreux protocormes néoformés, d'aspect globuleux. L'utilisation du CPPU permet un taux de multiplication supérieur de 28 % à celui obtenu sur le même milieu avec ANA et BAP. Les protocormes obtenus via l'hormone de synthèse présentent un aspect satisfaisant, alors que ceux multipliés via les hormones traditionnelles présentent fréquemment un aspect vitreux.

ÉVOLUTION DES PROTOCORMES DE RÉGÉNÉRATION

Les protocormes sont isolés et mis sur le milieu NDM additionné d'ANA (0,1-5 mg/l), de BAP (0,5-6 mg/l), de 15 % de lait de coco et solidifié avec de la gelrite à 2 g/l.

La première feuille se forme très rapidement, au bout d'un à deux mois l'ensemble présente l'aspect d'une plantule non enracinée. À partir de cet instant, 45 jours plus tard, les racines commencent à se former d'une façon asynchrone.

¹ Don du Professeur Mornet, Université d'Angers.

L'utilisation de molécules de synthèse à activité cytokinique (3F-ip ; CPPU) s'avère prometteuse pour une application industrielle de l'embryogenèse somatique du *Phalaenopsis*

Bibliographie

1. TANAKA M., SAKANISHI Y., 1977. - Clonal propagation of *Phalaenopsis* by leaf tissue culture. American Orchid Society Bulletin, 733-737.
2. CLEMENCEAU D., COUSSEAU J., MARTIN V., MOLINES H., WAKSELMAN C., MORNET R., NOGUE F., LALOUE M., 1996. - Synthesis and cytokinin activity of two fluoro derivatives of N⁶-Isopentenyladenine. Am. Chem. Soc., 320-323.

E41 : L'augmentation du taux de CO₂ atmosphérique permet d'atténuer les effets du déficit hydrique sur la croissance et la fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses

SERRAJ R.^{1,2}, SINCLAIR T.R.²

¹ Laboratoire de Physiologie Végétale, Université Cadi Ayyad, Marrakech Maroc ² USDA-ARS, Université de Florida, États Unis d'Amérique.

L'augmentation globale du taux de gaz carbonique [CO₂] dans l'atmosphère et son impact sur les changements climatiques ont été récemment bien documentés¹. Certains modèles climatiques² prédisent une sécheresse accrue dans certaines régions du Monde liée à l'augmentation de [CO₂]. De nombreuses études ont été menées sur les réponses des légumineuses à l'augmentation de [CO₂]¹. Cependant la quasi-totalité de ces recherches a été consacrée à des plantes cultivées dans des conditions optimales : alimentation hydrique et nutrition azotée minérale adéquates. La fixation symbiotique de l'azote (FSA) et le déficit hydrique seraient pourtant des processus extrêmement importants dans un scénario de changement climatique global, puisqu'une large proportion de la croissance des plantes devrait alors, avoir lieu sur des sols déficients en eau et en azote. Nous avons montré précédemment que la FSA chez le soja était extrêmement sensible au déficit hydrique^{3,4}, et que par conséquent, l'accumulation de l'azote était plus inhibée que celle du carbone⁵. La présente étude a été consacrée à l'analyse physiologique de l'interaction du déficit hydrique et de l'enrichissement en [CO₂] sur la FSA et la croissance chez le soja. Les plantes [*Glycine max* (L.) Merr.] ont été inoculées avec une préparation commerciale de *Bradyrhizobium japonicum* et cultivées pendant 6 semaines, en milieu contrôlé en conditions hydriques et [CO₂] normales, sans apport d'azote minéral. Les plantes ont été ensuite exposées à 2 traitements hydriques : irrigué, non irrigué, combinés avec 2 traitements de CO₂ : ambiant, élevé (approx. 700 uL L⁻¹). Différents paramètres physiologiques (croissance foliaire, transpiration, photosynthèse, activité nitrogènes, production de biomasse, teneurs en glucides et uréides) ont été mesurés durant les deux semaines qui ont suivi le début des traitements. Pour les 2 concentrations en CO₂, le déficit hydrique a provoqué une inhibition très marquée du développement de la surface

foliaire, des échanges gazeux, de l'activité fixatrice d'azote et de l'accumulation de biomasse dans les différents tissus de la plante. L'augmentation de $[CO_2]$ s'est traduite par une diminution des pertes en eau et une stimulation de la croissance foliaire, pour les 2 traitements hydriques. Il n'y a eu néanmoins aucun effet significatif de $[CO_2]$ sur les réponses relatives de la croissance et des échanges gazeux foliaires au déficit hydrique. Par contre, en conditions de déficit hydrique, l'augmentation de $[CO_2]$ a eu pour conséquence de retarder significativement la diminution de l'activité fixatrice d'azote en réponse au dessèchement du sol. L'augmentation de $[CO_2]$ a permis en outre, le maintien du développement et de la croissance des nodosités en conditions de déficit hydrique, relativement au $[CO_2]$ ambiant. Nous avons conclu que l'un des effets importants de l'enrichissement en CO_2 en conditions de déficit hydrique, réside dans la stimulation de l'assimilation du C et l'augmentation de l'allocation de substrats carbonés aux nodosités, ce qui se traduit par le maintien de la fixation symbiotique de l'azote en conditions d'eau limitante. À partir de l'interaction des effets de $[CO_2]$ et du déficit hydrique, nous proposons une discussion concernant les éventuels effets bénéfiques de l'augmentation de $[CO_2]$ sur la production des légumineuses en améliorant la tolérance à la sécheresse de la fixation symbiotique, l'assimilation du C et la réduction des demandes en eau et en azote.

Bibliographie

1. ALLEN A.H.1994.2. Manabe and Wetherald. 1980. 3. Sinclair T.R., Serraj R. 1995 Nature 378 (6555): 344. 4. Serraj R., Sinclair T.R. 1996. Crop Sci. 36:961-968. 5. Serraj R., Purcell L.C., Bona S., Sinclair T.R. 1997. Field Crops Res. (Sous presse).

E42 : Gynogenèse *in vitro* du blé dur *Triticum durum* dans le cadre d'une création de tolérance à l'aridité : souches régénérantes des plantes vertes

SIBI M.L., SHEKAFANDEH A.

ENSAIA, 2 ave. de la forêt de Haye, 54505 Vandœuvre, France

Dans le cadre de la création de tolérance à l'aridité, afin d'obtenir des souches régénérantes de blé dur qui pourront être soumises *in vitro* à des pressions sélectives, nous nous sommes attachés à élaborer une technique de gynogenèse.

Gynogenèse du blé dur : Le matériel végétal est constitué de 6 variétés marocaines (Cocorit, Isly, Jori, Oued-Zénati, Sarif) et de Cham1, variété « témoin » pour l'ensemble des laboratoires du réseau. Toutes ces variétés sont des blés barbus et atteignent une hauteur d'environ 80 cm. Le prélèvement des épis est effectué lorsque le pollen contenu dans les anthères est déjà bi- ou trinuéclé. À la suite d'un prétraitement au froid adéquat, les épis nus sont stérilisés et disséqués. Une quinzaine d'ovaires est alors déposée sur le milieu contenu dans chacune des boîtes de 6 cm de diamètre. Dans une première série d'expérimentations, pour l'ensemble des variétés présentées ci-dessus, un total de près de 10 500 ovaires a été mis en culture. Chez Isly, après les premiers résultats positifs qui ont amené à 15 plantes pour 105 ovaires (14,3 %), le peaufinage de la technique a permis d'obtenir, sur ce génotype, 32 plantes pour 102 ovaires (31,4 %). Les autres meilleures valeurs observées sont de 37 plantes pour 120 ovaires (30,8 %) pour Jori, et de 14 plantes pour 60 ovaires (23,3 %) chez Cocorit. Toute expérimentation confondue, un total de 147 plantes a été obtenu lors de cette première phase de régénération (phase I), avec 50 plantes pour Isly, 61 pour Jori, et 36 pour Cocorit. Étant donné le cadre du programme dans lequel s'intègre ces travaux, une phase d'entretien de l'activité régénératrice,

associée à la prolifération des cals a été recherchée pour obtenir des souches utilisables en condition de stress. Les souches régénérantes issues des génotypes Cocorit et Isly, ont été difficiles à maintenir et n'ont donné que peu de plantes complémentaires. Pour Cocorit, à partir des 144 souches suivies, un seul repiquage d'entretien a pu être effectué, donnant une unique plante. Quant à Isly, quatre repiquages des 186 souches succédant la phase I, ont donné : 16, puis 7, 0, et enfin 5 plantes. Cependant, pour Jori, lors des 4 repiquages ultérieurs des 165 souches de départ : 132, puis 27, 35, et enfin 52 plantes ont été générées par une dizaine de ces souches, constituées d'un total de 18 à 22 cals. L'ensemble amène, en comptabilisant les régénérants primaires, à un global de 307 plantes. Ainsi, après cette première campagne d'expérimentations, près de 422 plantes ont été obtenues, et le processus de régénération continue actuellement sur les souches toujours viables de Jori et Isly, laissant prévoir à nouveau une quarantaine de plantes. Une nouvelle série de mises en culture est en cours, afin d'optimiser la technique et d'étendre les résultats aux autres génotypes. Il est à souligner qu'aucun albinisme n'a jamais été observé et que par ailleurs, il y a peu de doublements spontanés des chromosomes.

E43 : Obtention et électrofusion des protoplastes de la canne à sucre

SIHACHAKR D.¹, GONZALES S.², DUCREUX G.¹

¹ Université Paris-Sud, Lab. de Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, France. ² Lab. De Biotechnologia Vegetal, Dpto. De Biologia Vegetal, Fac de Biologia, Universidad de la Habana, 10400 Cuba

Dans le présent travail nous proposons une nouvelle méthode simple et rapide pour obtenir des protoplastes des cals de la canne à sucre. Les protoplastes des deux variétés étudiées : Jaronu-605 et Cuba-8751 qui ont des réponses différentes au stress hydrique ont été électrofusionnées. Cette méthode sert de point de départ dans le travail d'hybridation somatique chez la canne à sucre pour obtenir de nouvelles variétés résistantes à la sécheresse.

E44 : Régénération et caractéristiques agronomiques de vitroplants de tritcale (*X-Triticosecale* Wittmack)

YACoubi-TEJ M., ZID E.

Laboratoire de Physiologie/Écophysiologie végétale. Faculté des Sciences de Tunis. Campus Universitaire. 1060 Tunis. Tunisie.

Des embryons de tritcale (*X-Triticosecale* Wittmack, variété INRAT 109, récolte 1994), prélevés sur des grains matures imbibés pendant 24 h dans l'eau distillée, sont mis en culture sur le milieu de Murashige et Skoog solidifié par de l'agar-agar purifié (Sigma Cell Culture) à 7 g.l⁻¹ et additionné de saccharose à 20 g.l⁻¹ et de 2,4-D à différentes concentrations (1 à 3 mg.l⁻¹). Les cultures sont conduites en boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre, à une température de 25°C, et sous éclairage artificiel de 6000 lux avec une photopériode de 16 h.

Dans ces conditions, la plupart des embryons germent et forment des cals 3 à 4 jours après l'ensemencement. Les fortes doses de 2,4-D (2.5 à 3 mg.l⁻¹) engendrent des cals mous, verdâtres et vitrifiés présentant une forte aptitude à la rhizogenèse. D'autres cals blanchâtres,

d'aspect mucilagineux, ont tendance à s'hypertrophier. Ces deux types de cals ne sont pas régénérables.

Aux doses plus faibles de 2,4-D ($1 \text{ à } 2 \text{ mg.l}^{-1}$), les cals sont friables, jaunâtres, et organogènes. Les cals initiés sont transférés tous les mois sur des milieux frais. Au premier transfert, les coléoptiles issus de la germination des embryons sont éliminés. La concentration de 2,4-D est diminuée progressivement au cours des transferts successifs, jusqu'à suppression totale. Après 5 transferts en général, chaque cal permet de régénérer 4 ou 5 plantules.

L'acclimatation des vitroplants se fait, sous atmosphère saturée en humidité, par transplantation en pots de végétation sur un substrat formé par un mélange de tourbe, de sable grossier et de feuilles de chêne. Après séjour d'une semaine sous serre vitrée, les pots sont transférés en conditions naturelles et arrosés jusqu'à la fin du cycle de développement.

Chez les 20 vitroplants régénérés, constituant la génération R_0 , le tallage est important et les épis sont fertiles. Des variations phénotypiques ont été observées. En particulier, un vitroplant a formé des épis à 6 rangs (4 rangs chez les autres vitroplants). Le nombre d'épis par plante, de grains par épi et le poids moyen du grain ont été déterminés. Le grain est moins ridé que celui issu des plantes mères et possède un très bon pouvoir germinatif. Les plants de deuxième génération (R_1), cultivés en plein champ, en comparaison avec les parents, présentent un tallage important et sont actuellement au stade montaison.

E45 : Recherches sur les méthodes de sélection *in vitro* pour la tolérance au NaCl chez *Triticum durum*

ZAIR I.

Université Mohammed V, Faculté des Sciences, Département de Biologie. B.P. 1014 Rabat, Maroc

Les capacités embryogènes des cultures de cals de blé ont été améliorées par la fragmentation longitudinale de l'embryon immature. L'initiation du cal à partir de moitiés d'embryons immatures sur des milieux contenant NaCl, l'extrait de pomme de terre ou un mélange des deux, a significativement amélioré la croissance en matières fraîche et sèche des cals, le pourcentage de régénération ainsi que la tolérance à la salinité des plantes régénérées.

L'application du stress aux cals déjà initiés en absence de NaCl ne s'avère pas une méthode de sélection recommandable chez les cals de blé; les cultures perdent leur capacité de régénération avant de s'adapter à l'agent stressant. En effet la réduction due à l'allongement de la durée de culture est relativement plus importante que celle provoquée par le stress salin. Ainsi, chez les cals de la variété Kypérounda, initiés à partir de moitiés d'embryons immatures, le pouvoir de régénération après dix semaines de culture baisse de 46 % sur le milieu sans NaCl, et de 41, 60, 70, et 81 % respectivement sur 2,5, 5, 10 et 15 g/l de NaCl. Le même comportement a été enregistré chez les variétés Oum Rabiâ, Sebou et Acsad₆₅.

Par contre, l'apport simultané de NaCl dans le milieu d'initiation du cal a été adopté comme méthode plus efficace pour l'amélioration de la tolérance des cultures. Le nombre de plantes régénérées en présence du stress salin dépend étroitement du génotype et particulièrement sur les fortes concentrations de NaCl. En effet, les génotypes Kypérounda, Oum Rabiâ, Tassaout et Sarif régénèrent un nombre de plantules relativement élevé (23 à 30 %) sur 10 et (5 à 17 %) sur 15 g de NaCl, alors que Jori, Cocorit, Acsad₆₅ et Marzak n'ont formé que très peu de plantes (5 à 17 %) sur 10 g et aucune sur 15 g/l de sel. Le test de la fluorescence de la chlorophylle a montré que la tolérance de ses plantes a été significativement améliorée.

L'addition de NaCl dans le milieu contenant l'extrait de pomme de terre, reconnu par ses capacités stimulatrices de l'embryogenèse somatique a permis d'améliorer les compétences embryogènes des cals initiés en présence du stress salin. Des plantes normales ont été régénérées à partir des cals initiés sur un milieu contenant 10 g/l de sel chez plusieurs variétés de blé.

Plusieurs explants ont été aussi cultivés afin de déterminer les meilleures conditions d'embryogenèse somatique pour une application ultérieure des conditions de stress salin. Les cultures d'inflorescences immatures, de coléoptiles, de feuilles et de racines pour 10 génotypes de *Triticum durum* dans différentes conditions de culture ont montré une variation des pourcentages d'induction de cals et de régénération de plantules en fonction du génotype, de la concentration en 2,4D du milieu de culture et de la nature solide ou liquide de ce dernier. De même les meilleures capacités à l'embryogenèse somatique et à la régénération ont été observées pour les inflorescences immatures, à des tailles ne dépassant pas 0.5 cm, cultivées sur un milieu d'induction MS contenant 2mg/l de 2,4D. Cependant la nature du milieu d'initiation n'influe pas sur les pourcentages d'induction et de régénération. Aussi le facteur génotype ne devient-il significatif que pour les inflorescences de tailles supérieures à 1 cm.

L'effet du génotype et du 2,4D sont très marquants pour la culture de fragments de coléoptile. En effet, les meilleurs pourcentages d'induction de cals sont observés pour les variétés Sebou et Massa cultivées sur milieu d'initiation additionné de 1,5 mg/l de 2,4D, alors que les meilleurs pourcentages de régénération sont obtenus pour les variétés Massa et Isly cultivées sur des milieux contenant respectivement 2 mg/l et 2,5 mg/l de 2,4D.

Aucune induction de cals n'a été observée pour les cultures de racines et de feuilles sur différents types de milieux avec plusieurs combinaisons d'hormones.

Liste des auteurs

ABDELGUERFI Aïssa Enseignant chercheur INA
Alger Labo Amélioration des Plantes El Harrach 16200
ALGER ALGERIE

ABDELKEFI Abbès Maître assistant Faculté des
Sciences Dept des Sciences Biologiques 1060 Campus
Universitaire Le Belvédère - TUNIS TUNISIE

AIT-KAKI Yasmina Maître-Assistante Université
d'Annaba INESSM Labo Botanique Médicale 23000
ANNABA ALGERIE

ALMANSOURI Malika Doctorante Univ Cathol
Louvain la Neuve Labo de Cytogénétique Bât Carnoy,
b 13, La Croix du Sud 5 B 1348 LOUVAIN la NEUVE
BELGIQUE

ALONSO Alejandro Etudiant Faculté Sciences
d'Avignon Dpt Biologie Végétale Expérimentale 33, rue
Louis Pasteur 84000 AVIGNON FRANCE

AMSSA Mohamed Docteur es sciences, Professeur
Faculté Sciences de Meknès Labo des Biotechnologies
Végétales B P 4010 MEKNES MAROC

AOUAD Abdelghafour Thésard Université Cadi Ayyad
Labo de Biochimie Biol Moléc Plantes Fac Sciences-
Sémalia B P S 15 MARRAKECH MAROC

ASSALI Nour-Eddine Responsable Labo Marquage
IAV Hassan II Dpt Ecologie Végétale B P 6202
RABAT MAROC

AUBANELLE Laurent Faculté des Sciences Université
de Picardie Androgenèse & Biotechnologie Ilot des
Poules 33 rue St Leu 80039 AMIENS Cedex FRANCE

AUBOIRON Erik Responsable biotechnologie et
Amélioration C. de Recherches Régionales Bananiers et
Plantain Labo de Biotechnologie Njombé, B P 832
DOUALA CAMEROUN

AZMEH Mohamad Fawaz Professeur Université de
Damas Fac d'Agronomie, Dept Protection des Plantes
B P 30621 DAMAS SYRIE

AZOULAY Gérard Maître de Conférences Université
de Paris Sud Faculté Jean Monnet 92231 SCEAUX
CEDEX FRANCE

BAAZIZ M Professeur Université Cadi Ayyad Labo
Biochimie et Biologie Molec Plantes Fac Sciences-
Sémalia B P S 15 MARRAKECH MAROC

BAJJI Mohammed (1) Doctorant Univ Cathol Louvain
la Neuve Labo de Cytogénétique Bât Carnoy, Pl Croix
du Sud, 5, b 13 B 1348 LOUVAIN la NEUVE
BELGIQUE

BANI-AAMEUR Fouzia (1) Professeur Université
Ibnou Zohr, Fac des Sciences Labo Recherches Var
Génétique BP 28/S 80 000 AGADIR MAROC

BEAUJEAN Antony Faculté des Sciences Université
de Picardie Androgenèse & Biotechnologies Ilot des
Poules 33 rue St Leu 80039 AMIENS Cedex FRANCE

BELABED Abdelmajid Directeur de laboratoire Faculté
Sciences d'Oujda Groupe Génétique 60000 OUJDA
MAROC

BELKOURA Mouhssine Directeur de Recherche Fac
Sciences SEMLALIA av Prince My Abdellah BP S15
MARRAKECH MAROC

BEN ABDALLAH Abdallah (1) Chercheur INRA
Tunisie Labo Biotechnologies Rue Hedi Karray - Tunis
2049 ARIANA TUNISIE

BEN SALEM Moncef Directeur Labo BTV INRA
Tunis Dpt Physiologie et Biotechnologie Rue Hedi
Karray 2049 ARIANA TUNIS TUNISIE

BENCHABANE Abderrazzak Maître de Conférences
Fac Sciences SEMLALIA Labo Ecologie Vegetale BP S
15 40000 MARRAKECH MAROC

BENCHEIKH Mohamed Responsable equipe Centre
Universitaire de CHLEF Institut d'Agronomie B P 151
2000 CHLEF ALGERIE

BENDIAB Khadija Enseignante chercheur Université
Cadi Ayyad Dpt Biologie BP 618 MARRAKECH
MAROC

BENLARIBI Mostefa Maître de Conférences
Enseignant ISN Université de Constantine Biologie
Végétale et Amélioration des Plantes Route de Ain El
Bey 25000 CONSTANTINE ALGERIE

BENLHABIB Ouafae Professeur Inst Agron et Vet
Hassan II Dept Agron et Amélior Plantes BP 6202
RABAT 10101 MAROC

BENNACEUR-HERMOUCHE M Enseignante
chercheur Université d'Es-Senia Inst Sciences de la
Nature - Labo Biochimie B P 1524 ORAN ALGERIE

BENSALAH Boukber Assistant SCSP DPVCTRF B P
6520 10101 Rabat Instituts RABAT MAROC

BENSARI Morad Recteur Université de Constantine
Route Ain El-Bey 25000 CONSTANTINE ALGERIE

BERTIN Pierre Ingenieur agronome, Station
d'Amélioration des Plantes, rue du Bordia 4, B-5030
Gembloux, BELGIQUE

BERVILLE André INRA ENSAM Montpellier DGAP
2, place Viala 34060 MONTPELLIER Cedex 1
FRANCE

BILOA ADZEGUE Pierre Conseiller en environnement
"SOS ENVIRONNEMENT" ICS SENCHIM B P 26
257 DAKAR SENEGAL

BOITEL Michèle Faculté des Sciences Université de
Picardie Androgenèse & Biotechnologie Ilot des Poules
33 rue St Leu 80039 AMIENS Cedex FRANCE

BONNY Sylvie Chercheur INRA INRA-E-SR 78850
GRIGNON FRANCE

BOUABDALLAH Louiza Enseignante Université d'Es-
Sénia Labo de Phytopathologie 31000 ORAN
ALGERIE

BOUGHEDIRI Larbi Docteur Enseignant Université
d'Annaba INESSM Labo Physiologie Vegetale B P 12
23000 ANNABA ALGERIE

BOUIAMRINE El Houssine Thésard Université Moulay
Ismail, Fac des Sciences Biotechnologies Vegetales B P
4010 50000 MEKNES MAROC

BRANCHARD Michel Directeur de l'Institut Université
de Bretagne Occidentale ISAMOR Technopôle de
Brest-Iroise 29280 PLOUZANE-BREST FRANCE

BRINIS Louichi Enseignant chercheur Université
d'Annaba INESSM Labo Physiologie Vegetale B P 12
23000 ANNABA ALGERIE

BUI VAN LE Docteur chercheur Université Paris Sud
Institut de Biotechnologie des Plantes 91405 ORSAY
Cedex FRANCE

CARPIN Sabine Thésarde Faculté de Pharmacie EA
2106 "Biologie Végétale" 31 ave Monge 37200
TOURS FRANCE

CHAGVARDIEFF Pierre Dr. Chef de laboratoire CEA
Labo Phytotechnologie Centre d'Etudes de Caradache,
DPVE 13108 ST PAUL LES DURANCE Cedex
FRANCE

CHARRIER André Professeur, Directeur du labo GAP
INRA ENSAM Montpellier UFR Génét et Amélior
Plantes 2, place Viala 34060 MONTPELLIER Cedex 1
FRANCE

CHLYAH Hassane Professeur Univ. Mohamed V Fac
Sciences Labo Physiologie Végétale BP 1014 RABAT
MAROC

CHRIQUI Dominique Professeur CEMV U P M C
(Paris VI) Labo CEMV Bât N2-case courrier 150 - 4, pl
Jussieu 75252 PARIS Cedex 05 FRANCE

COMEAU André Chercheur Université LAVAL Centre
de Recherche Agriculture et Agroalimentaire 250
Boulevard Hochelaga, Ste-Foy QUEBEC G1V 2J3
CANADA

DA Sié Eric Ingénieur des Eaux et Forêts Centre
National de Semences Forestières Labo Physiologie 01
B P 2682 Ouaga 01 OUAGADOUGOU 01 BURKINA
FASO

DE BUYSER Jacques Maître de Conférences Université
Paris Sud Labo Morphogenèse Vég Exptale Bât 360
91405 ORSAY Cedex FRANCE

DELPORTE Fabienne Assistante CRA Gbx Stat
Amélior Plantes Labo Biologie moléculaire rue du
Bordia, 4 B 5030 GEMBLoux BELGIQUE

DELSÉNY Michel Directeur de Recherche 1 Université
de Perpignan Labo de Phys et biol molé vég URA
565 52, ave de Villeneuve 66860 PERPIGNAN Cedex
FRANCE

DHED'A Djailo Professeur Associé, Dr, Université de
Kisangani Faculté des Sciences C/o Ridja D Buma,
SOTEXKI B P 14897 KINSHASA 1 ZAIRE

DIENG Hamidou Enseignant chercheur Institut
Supérieur Scientifique Labo Biologie Végétale B P
5026 NOUAKCHOTT RI MAURITANIE

DJEKOUN Abdelhamid Maître de Conférences
Université de Constantine UFR Genet et Amélioration
des Plantes Route Ain El Bey 25000 CONSTANTINE
ALGERIE

DOUIMI Rajae Chercheur Faculté des Sciences
Université Moulay Ismail B P 4010 Beni M'hamed
50000 MEKNES MAROC

DUCREUX Georges Professeur Université Paris Sud
Labo Morphogenèse Vég Exptale Bât 360 91405
ORSAY Cedex FRANCE

DUTUIT Pierre Responsable Labo Université Paris Sud
Centre Chatenay Eq d'Ecotechnologie Tour E1 2ème
92296 CHATENAY-MALABRY FRANCE

EL HADRAMI Ismail Enseignant chercheur Université
Cadi Ayyad Labo Physiologie Végétale Fac Sciences
Sémialia BP S15 40000 MARRAKECH MAROC

EL JAAFARI Samir Professeur Univ My Ismail,
Faculté des Sciences Labo Biotech. et Amélior. des plantes
B P. 4010 - Beni M'hamed 50000 MEKNES MAROC

EL KHLIFI Oum Keltoum Maître-Assistante Faculté
des Sciences Casa Labo de Cytogénétique IAV Rabat
BP 6202 10100 RABAT MAROC

EL MOUSADIK Abdelhamid Enseignant chercheur
Université Ibnou Zohr Faculté des Sciences Ressources
phytogénétiques B P 28/S 80000 AGADIR MAROC

ELLOUZ Oumema Enseignant Inst préparatoire aux
Ingénieurs ENIS Route Sarka km 3 SFAX 3038
TUNISIE

ENGELMANN Florent Docteur IPGRI In vitro
conservation Via delle Sette Chiese 142 00145 ROMA
ITALIE

EUDES François Doctorant Université LAVAL
Département de Phytologie Pavillon Paul-Comtois, St-
Foy GIK 7P4 QUEBEC CANADA

FAGROUD Mustapha Enseignant chercheur Ecole
Nationale d'Agriculture Centre Biometrie et
Informatique B P S/40 50000 MEKNES MAROC

FARES Khalid Enseignant chercheur Faculté des
Sciences Sciences des Aliments MARRAKCHI
MAROC

FERNANDEZ Sophie Thésarde Université Montpellier
II Labo Physiologie Végétale Bât 15 Case 00 34095
MONTPELLIER Cedex 5 FRANCE

FERRY Michel Directeur Scientifique ESTACION
PHOENIX Apartada 996 03201 ELCHE ESPAGNE

FOURRÉ Jean-Luc Docteur Université Catholique de
Louvain Unité des Eaux et Forêts Place croix du Sud, 2
1348 - LOUVAIN la NEUVE BELGIQUE

FRANCHE Claudine Docteur Laboratoire Gene Trop-
ORSTOM Physiologie Cellulaire et Moléculaire des
Arbres 911 avenue Agropolis 34032 MONTPELLIER
Cedex 1 FRANCE

FRANKARD Valérie Post-Doc VRIJE UNIVERSITEIT
BRUSSEL Plantengenetica Paardenstraat 65 1640 -
SINT GENESIUS RODE BELGIQUE

GARGOURI-BOUZID Radhia Maître-Assistant Centre
de Biotechnologie B P W 3038 SFAX TUNISIE

GONZALEZ Sergio (I) Chercheur Universidad de la
Habana Lab de Biocnologia vegetal 10400 CUBA
CUBA

GRAPIN Agnès Chercheur détachée du CIRAD au
CATIE CATIE Labo Biotechnologies Apdo 104 7170
TURIALBA COSTA RICA

GROS François Secrétaire Perpetuel Institut de France
Académie des Sciences 23 Quai Conti 75006 PARIS
FRANCE

GUERROUCHA Hocine Enseignant chercheur
Université de Constantine Labo Biologie Végétale
Route de Ain El bey 25000 CONSTANTINE
ALGERIE

GUMEDZOE Yawovi Mawkena Directeur adjoint,
Maître-Assistant Université du Bénin Ecole Supérieure
d'Agronomie Labo Virologie B P 1515 LOME TOGO

HAICOUR Robert Maître de Conférences Université
Paris Sud Labo Morphogenèse Végétale Experimentale
Bât 360 91405 ORSAY Cedex FRANCE

HAJJI Mokhtar Professeur Université Tunis II Labo
Physiologie Végétale Campus universitaire 1060 TUNIS
TUNISIE

HAMON Serge Responsable de laboratoire ORSTOM
Labo Ressources Génétiques Végétales 911 Av
Agropolis 34032 MONTPELLIER Cedex 1 FRANCE

HAMZA Sonia Assistant Professeur INAT, Inst Nat
Agronomique de Tunis Labo Génétique 43 ave Charles
Nicole 1082 TUNIS TUNISIE

HARZALLAH Hanène (I) Responsable Labo Ecole
Nat Médecine Vétérinaire Dpt Production Animale Sidi
Thabet 2020 TUNIS TUNISIE

HENRY Yves Chargé de Recherche CNRS IBP
Université Paris Sud Biologie du développement des
plantes Bât 630 91405 ORSAY Cedex FRANCE

HOANG Kim Oanh Docteur chercheur Institut de
Biotechnologie CNSHT NGHIADO, TULIEM HANOI
VIETNAM

HOCHER Valérie Chercheur ORSTOM IRGAPT B P.
5045 34032 MONTPELLIER Cedex 1 FRANCE

HOUNKPEVI G Alphonse Enseignant chercheur
Université Nationale du Bénin, Faculté des Science
Labo Biologie Végétale B P 2748 COTONOU BENIN

IGHILHARIZ Zohra Enseignante Université d'Oran Es
Senia Labo Biologie Végétale 31000 ORAN ALGERIE

J'AITI Fatima Docteur Université Cadi Ayyad Dpt
Biologie labo de physiologie végétale MARRAKECH
MAROC

JADARI Rachida Maître-Assistante I A V Hassan II
Labo Cultures in vitro RABAT 10101 MAROC

JEMMALI Ahmed Chercheur INRAT Rue Hédi Karray
2049 ARIANA TUNISIE

JLIBENE Mohammed Chercheur INRA Meknes CRRA
Saiz Moyen Atlas B.P. 578 50000 MEKNES MAROC

JOUANIN Lise INRA Stat Amel PI VERSAILLES
Labo de Biologie Cellulaire Route de St Cyr 78026
VERSAILLES Cedex FRANCE

KAAN François Directeur de Recherche INRA ENSAM
Montpellier, UFR Amélioration des Plantes, 2 place
Viala, 34060 MONTPELLIER Cedex 1 FRANCE

KHALFALLAH Nadra Enseignante Université de
Constantine Labo de Cytogénétique Route de Ain El
Bey 25000 CONSTANTINE ALGERIE

KHELIFI Douadi Enseignant Université de Constantine
Institut des Sciences de la Nature 25000
CONSTANTINE ALGERIE

KINET Jean-Marie Directeur du Laboratoire Université
Catholique de Louvain Labo de Cytogénétique 5, place
Croix du Sud Boite 13 B-1348 LOUVAIN la NEUVE
BELGIQUE

KODJA Hippolyte Maître de Conférences Université de
la Réunion Labo Biologie et Physiologie Végétale 15,
ave René Cassin 97715 St-DENIS Messag Cedex 9
REUNION (La)

KONAN Kouakou Eugène Ingénieur Agronome,
chargé de recherches IDEFOR DPO Labo Cultures in
vitro 13 BP n° 989 ABIDJAN 13 COTE D'IVOIRE

KOULLA Latifa Maître-Assistante Université Cadi
Ayyad Labo Physiologie Végétale Fac de Sciences Rue
Moullay Abdellah 40000 MARRAKECH MAROC

LABHILILI Mustapha Chercheur ICARDA Germplasm
Improvement PO BOX 5466 ALEPPO SYRIE

LAINÉ Eric Maître de Conférences Université de
Picardie Jules V Labo Biotechnologies Végétales 33,
rue St Leu 80039 AMIENS Cedex FRANCE

LAMINI Hachouma Chercheur Ecole Natle Super -
Meknes B.P S/40 50000 MEKNES MAROC

LAOUAR Meriem Post-Doc Institut National
Agronomique d'Alger Labo Phytotechnie 16200
ALGER ALGERIE

LARHISSI Zakia Enseignante chercheur Institut de
formation de l'industrie meunière km 115 Ancienne
route de Rabat Sidi Bernoussi CASABLANCA
MAROC

LAROCHE Liette Etudiante Université LAVAL
Département de Phytologie Pavillon Paul-Comtois, St-
Foy G1K 7P4 QUEBEC CANADA

LAVERGNE Danièle Maître de Conférences Enseign
Chercheur Université Paris Sud Labo Morphogenese
Vég Exptale Bât 360 91405 ORSAY Cedex FRANCE

LE THI Anh Hong Stagiaire (Vietnamienne) Fac Sc
Agronomiques Gbx Labo de Phytopathologie Passage
des Déportés 2 B 5030 GEMBLOUX BELGIQUE

LE THIERRY D'ENNEQUIN Maud Thesarde
Université Paris Sud Labo Evolution et Systematique
Bât 362 91405 ORSAY Cedex FRANCE

LE Van Quy Chercheur Univ Laval Fac Sc Agr Alim
Pavillon de l'Environnement Ste FOY GIV 4G6
QUÉBEC CANADA

LEBTAHI Fatima Assistante de Recherche Inst Nat
Rech Forestières Labo Cultures in vitro INRF BP 35
Cheraga ALGER ALGERIE

LOPEZ-BAEZ Orlando Enseignant chercheur INIFAP
Campo experimental "rosario izapa" Km 18 Carretera a
Cacahoatan Apartado postal 96 Tapachula 30700
CHIAPAS MEXIQUE

MAKNI Mohamed Maître de Conférences Faculté
Sciences de Tunis Labo Génétique et Biologie
Moléculaire Campus Universitaire 1060 TUNIS
TUNISIE

MANDIMBA Georges Raphael Maître-Assistant
Institut de Développement Rural Labo Biotechnologies
B P 13346 BRAZZAVILLE CONGO

MARS Mohamed Chercheur Institut National de
Recherche Scien et Technique B P 95 2050
HAMMAN-LIF TUNISIE

MASMOUDI R Fac de Sciences de Sfax Labo
Biotechnologies végétales 3038 SFAX TUNISIE

MAZOUZ Hamid Enseignant chercheur Faculté des
Sciences et Technique d'Errachidia Labo Biologie
ERRACHIDIA MAROC

MBODJI Ousmane Stagiaire en DEA Univ Cheikh Anta
Diop, Fac des Sciences Dpt Biologie Végétale, Labo de
CIV URCI ISRA / ORSTOM BP 1386 DAKAR-FANN
SENEGAL

MEHRI-KAMOUN Raoudha Enseignante Ecole
Supérieure d'Horticulture Biotechnologies Vegetales
Chott-Mariem 4042 SOUSSE TUNISIE

MELLOUKI Fouad Doctorant Université Paris Sud,
UFR de Pharmacie Labo Biologie Cellulaire Rue J -B
Clément 92196 CHATENAY MALABRY Cedex
FRANCE

MERGEAI Guy 1er Assistant Fac Sc Agronomiques
Gbx Phytotechnie des regions intertropicales 2 passage
des Déportés B 5030 GEMBLOUX BELGIQUE

MERGHEM Rachid Docteur es-sciences Université de
Constantine I S N Labo de Phytchimie Route Am el
bey 25000 CONSTANTINE ALGERIE

MIHAMOU-ZIYYAT Aatika (1) Maître-Assistante
Faculté Sciences d'Oujda Labo Biologie 60000 OUJDA
MAROC

MOKHTARI Faouzia Maître-Assistante Faculté
Sciences de Meknes Biotechnologie et Amélioration des
Plantes B P 4010 MEKNES MAROC

MOLINIER Jean Doctorant I B P M Dr Gunther
HAHNE 12 rue du Gl Zimmer 67084 STRASBOURG
Cedex FRANCE

MONNEVEUX Philippe Professeur INRA ENSAM
Montpellier UFR Génétique et Amélioration des Plantes
2, place Viala 34060 MONTPELLIER Cedex 1
FRANCE

MORAES-FERNANDES Maria Irene Directeur de
Recherche EMBRAPA Labo Cytologia PASSO
FUNDO (RS) BRÉSIL

MORARU Irina Constanta Chercheur IRCPT Labo Biotechnologies Nicolae Balcescu 1 8264 FUNDULEA, CALARAS ROUMANIE

MOURAS Armand Professeur Université de Bordeaux II Labo de Biologie Cellulaire Ave des Facultés 33405 TALENCE Cedex FRANCE

NACHIT Miloudi Généticien Principal ICARDA/CIMMYT Germplasm Improvement PO Box 5466 ALEP SYRIE

NAJIMI Bouchra Maître-Assistante Université Moulay Ismail Labo Biotechnologies et Amiol. Plantes B.P 4010 Beni M'hamed 50000 MEKNES MAROC

NATO Aimé Maître de Conférences Université Paris Sud Labo Morphogenèse Expérimentale Vég Bât 360 91405 ORSAY Cedex FRANCE

NSIKA-MIKOKO Elie Professeur Université Marien NGOUABI Labo de Phytopathologie Faculté des Sciences, B.P 69 BRAZZAVILLE CONGO

OMOKOLO Ndoussou Denis Enseignant chercheur Ecole Normale Supérieure Labo Physiologie Végétale B.P 47 YAOUNDE CAMEROUN

OUAHBI Abdelilah Enseignant chercheur Faculté des Sciences Université Moulay Ismail Labo Biotechnologies et Environnement B.P 4010 BENI M'hamed 50000 MEKNES MAROC

OUAZZANI Nouredine Directeur de laboratoire Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès Département d'Arboriculture BP 540 MEKNES MAROC

OUICHOU Aicha Thésarde Université Paris Sud Labo Morphogenèse Vég. Exptale Bât 360 91405 ORSAY Cedex FRANCE

PAUL Roger Maître de Conférences Fac Sc Agronomiques Gbx UER Biologie Végétale Passage des Déportés, 2 5030 GEMBLOUX BELGIQUE

PESSSEL Fabrice Thésard Université Paris Sud Labo Évolution et Systématique Bât 362 91405 ORSAY Cedex FRANCE

PONCET Valérie Thésarde Université Paris Sud Labo Evolution et Systématique des végétaux Bât 362 91405 ORSAY Cedex FRANCE

POPIERS Delphine Faculté des Sciences Université de Picardie Androgenèse & Biotechnologie Ilot des Poulies 33 rue St Leu 80039 AMIENS Cedex FRANCE

PRIOUL Jean-Louis Professeur Université Paris Sud I B.P Bât 630 91405 ORSAY Cedex FRANCE

QARIANI Latifa Chercheur Doctorante Université Moulay Ismail Labo Biotechnologies BP 4010 Beni M'hamed 50000 MEKNES MAROC

RAÏES Aly Professeur Enseignement Supérieur Fac Sciences Tunis Laboratoire de Biochimie Campus Universitaire 1060 Le Belvédère - TUNIS TUNISIE

RENARD Michel Responsable Labo Colza INRA Stat Amel PI RENNES Labo Colza BP 29 35650 Le RHEU FRANCE

RIVAL Alain Docteur Chercheur CIRAD ORSTOM LRGAFT Av Val de Montferrand BP 5045 34032 MONTPELLIER Cedex 1 FRANCE

RIZQI Abdelhak Ingénieur agronome responsable labo Direction des domaines agricoles Unité de controle des plants Ave Imam Malik km 7,5 Dome Dar Es-Salam 10000 RABAT MAROC

ROUSSY Isabelle Faculté des Sciences Université de Picardie Androgenèse & Biotechnologie Ilot des Poulies 33 rue St Leu 80039 AMIENS Cedex FRANCE

ROUSTAN Jean-Paul Maître de Conférences ENSAT INP Lab des Industries Alimentaires 145, ave. du Muret 31076 TOULOUSE FRANCE

SABOUNJI Karima Thésard Faculté des Sciences Ave Ibn Batouta B.P. 1014 RABAT MAROC

SABOUR Ilham Chercheur Doctorante Université Moulay Ismail Labo Biotechnologies BP 4010 Beni M'hamed 50000 MEKNES MAROC

SAKA Hayett Responsable Labo C I V INRA ALGÈRIE Labo Physiologie Végétale 2 rue des Freres Ouaddek-Hassène Badi-Belfort EL-HARRACH ALGERIE

SAMSON Isabelle Thésarde Université d'Anvers (UIA) Labo Rech Physio Veg (L R P V) 16 bd Lavoisier 49045 ANGERS Cedex 01 FRANCE

SARRAFI Ahmad Responsable d'équipe ENSAT INP Labo BAP Eq Ass INRA 145, avenue de Muret 31076 TOULOUSE Cedex FRANCE

SEMADI Ammar Professeur en Sciences Biologiques Université d'Annaba INESSM Dept d'Ecologie B.P 12 23000 ANNABA ALGERIE

SENE Mouhamadou Docteur ORSTOM Bel Air BP 3972 DAKAR COTE d'IVOIRE

SERRAJ Rachid Enseignant chercheur Université Cadi Ayyad Labo Physiologie Végétale BP S 15 Bld My Abdallah 4000 MARRAKECH MAROC

SIBI Monique Professeur ENSAIA Labo Genetique et Biotechnologies 2, av de la forêt de Haye 54505 VANDOEUVRE FRANCE

SIDIKOU Ramatou Enseignant chercheur COMITE NORD - LA PIGACHE Ave François Mitterand 62217 BEAURAINS FRANCE

SIHACHAKR Darasinh Maître de Conférences Université Paris Sud Labo Morphogenese Veg Exptale Bât 360 91405 ORSAY Cedex FRANCE

SILJAK-YAKOVLEV Sonya Chercheur CNRS Labo Évolution et Systématique Bât 360 91405 ORSAY Cedex FRANCE

SLIM AMARA Hajer Resp Labo Culture in vitro INAT Labo Biotechnologies 1082 Cité Mahragène TUNIS TUNISIE

ST PIERRE Claude André Professeur Université Laval-FSAA Dpt Génétique des Céréales 3234-D Pavillon Comtois Ste FOY - QUEBEC G1K 7P4 CANADA

TAHRI El Houssine Maître-Assistant Faculté Sciences d'Oujda Amélioration et production vegetales Rue Sidi Maâfa 60000 OUJDA MAROC

TRIFI Mokhtar Maître-Assistant Faculté des Sciences de Tunis Campus Universitaire 1060 TUNIS Le Belvedere TUNISIE

TSALA NDZOMO Guy Enseignant chercheur Ecole Normale Supérieure Département des Sciences Biologiques B.P 47 YAOUNDE CAMEROUN

UMBOH Magdalena Irène Dr Professeur SEAMEO BIOTROP Forest Biotechnology Laboratory Jl Raya Tajur Kmb PO Box 116 BOGOR INDONESIE

VANNEREAU Agnès Maître de Conférences Université Paris Sud, UFR de Pharmacie Labo Biologie Cellulaire Rue J-B Clément 92196 CHATENAY MALABRY Cedex FRANCE

YACoubi-TEJ M'barka Chercheur Faculté Sciences de Tunis Labo Physiologie Végétale 1060 TUNIS TUNISIE

ZAHIDI Abdelaziz Etudiant en 3ème cycle Université Ibnou Zohr, Faculté des Sciences Labo de Recherche sur la Variabilité Génétique BP 28/S 80 000 AGADIR MAROC

ZAIR Itto Enseignante Université Mohamed V Fac des Sciences Labo Physiologie Végétale BP 1014, Ave Ibn Battouta RABAT MAROC

ZOUNDJIHEKPON Jeanne Maître de Conférences WWF-08 BP1776 - Abidjan 08 Côte d'Ivoire

Liste des autres co-auteurs et des inscrits ayant participé ou non aux Journées

ABERLENC Frédérique ORSTOM FRANCE

AIZAC Bernard GEVES, Domaine de Lavalette, 711 rue Jean François Breton, 34030 MONTPELLIER, FRANCE

AL ZUBI Hussein Doctorant Université d'Avignon, Laboratoire de Biologie Végétale Expérimentale, 33 rue Louis Pasteur, 84000 AVIGNON, FRANCE

ALATOU Djamel Maître de Conférences Institut des Sciences de la Nature, Biologie et physiologie végétales, Université de Constantine, 35000 CONSTANTINE, ALGERIE

ALEMANNO LAURENCE Chercheur CIRAD CP, B.P. 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

ALIBERT G Professeur, BAP INP ENSAT, Laboratoire BAP, 145 Avenue nue de Muret, 31076 TOULOUSE Cedex, FRANCE

AMBROISE Annick Technicienne Université Paris Sud, Laboratoire Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

AMMAR Saida Maître de Conférences Faculté Sciences de Tunis, Laboratoire Physiologie Végétale, Campus Universitaire, 1060 TUNIS, TUNISIE

AMOUKOU ADAMOU Ibrahim Maître-Assistant Université Abdou Moumouni de Niamey, Faculté d'Agronomie, Département des Productions Végétales, B.P. 10960, NIAMEY, NIGER

ASSAF-DUCROQ Corinne Faculté des Sciences, Université de Picardie, Androgenèse et Biotechnologie, Ilot des Pouliés, 33 rue St Leu, 80039 AMIENS Cedex, FRANCE

ASSANI Akym Ingénieur Agronome BAZ Grünbach, Graf Seinsheim Str 23, BOCHHORN, ALLEMAGNE

AYADI Abdelkader Enseignant Faculté Sciences de Tunis, Campus Universitaire, 1060 TUNIS, TUNISIE

BAKRY Frédéric Maître de Recherche CIRAD-GERDAT, Laboratoire BIOTROP, Avenue Val de Montferrand, BP 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

BALANGÉ Pierre Professeur Université de Rouen, Parai et Plymre Pariétaux, 76821 Mt St Aignan, FRANCE

BALLANGE P.A Professeur Faculté des Sciences et Techniques de Rouen, Laboratoire 3P SCUEOR, B P 118, 76134 MONT-SAINT-AIGNAN Cedex, FRANCE

BEN ABDALLAH Ferjani Assistant I.N.R.S.T., Laboratoire Cultures in vitro, B.P. 95, 2050 HAMMAN-LIF, TUNISIE

BENBELKACEM Abdelkader Directeur Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC), Station Expérimentale EL-KHROUB, B.P. 35, EL-KHROUB 25100, ALGERIE

BENNACEUR Mbarek Dr, Chargé de Recherche INRA Tunis, Laboratoire Physiologie Végétale, Rue Hédi Karray, 2049 ARIANA TUNIS, TUNISIE

BENZAGHOU Selim Doctorant Faculté des sciences agronomiques de Gembloux, Laboratoire Physiologie Végétale, Passage des Déportés 2, B 5030 GEMBLoux, BELGIQUE

BERTHOULY Marc Biotechnologiste café cacao CIRAD CP, BIOTROP, Avenue du Val de Montferrand, B P. 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

BESSE Antoine Etudiant U P M C Paris VI, 180 rue Jeanne d'Arc, 75013 PARIS CEDEX, FRANCE

BETHMONT Michel Technicien Université de Paris Sud FRANCE

BIGOT Claude 3, rue de Mercantour, 78310 MAUREPAS, FRANCE

BIROUK Ahmed Professeur I A V Hassan II, B P 6202, RABAT 100 101, MAROC

BOCCON-GIBOD Jacques, Professeur, Institut National de l'Horticulture, 2 rue Le Nôtre, F 49045 Angers Cedex 01 France

BOSSOUTROT Dominique Responsable Biosécurité SPG, Semences Production, Domaine du Moulin .84260 SARRIANS, FRANCE

BOUGUEDOURA Nadia Maître de Conférences et de Recherche Université des Sciences et Techniques H Boumedienne, URZA USTHB, B P 44, ALGER-Gare 16000, ALGERIE

BOUHOUCHE Naima Thésarde Faculté de Pharmacie Laboratoire de Botanique et Phytochimie, Rue J.-B Clément, 92295 CHATENAY MALABRY, FRANCE

BOULAY Michel Docteur IIIème cycle LVMH Recherche, Département Végétal, 25 rue des Peupliers, 92752 NANTERRE, FRANCE

BOURGOIN Mireille GEVES, Laboratoire Biochimie, Domaine du Magneraud, 17700 SURGERES, FRANCE

BOUSALEM Mustapha Chercheur LPRC-CIRAD-ORSTOM, B.P. 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

BOUSLAMA Mohamed Professeur Ecole Supérieure Horticulture de Chott-Mariem, Laboratoire Génétique et Amélioration Plantes, 4042 SOUSSE, TUNISIE

BOUSSAID Mohamed Enseignant INSAT, B P 676, 1080 TUNIS, TUNISIE

BOUSSEN Hamida Attachée de Recherche INRA Tunis, Laboratoire Physiologie Végétale, Rue Hédi Karray, 2049 ARIANA TUNIS, TUNISIE

BRUNNER Alain Expert près la Cour d'Appel CABINET, 93 rue de Calais, 59200 TOURCOING, FRANCE

CADET Frédéric Professeur Dr Université de la Réunion, Laboratoire Biochimie, 15 Avenue René Cassin, B.P. 7151, 97715 St-DENIS Messag Cedex 9, FRANCE

CALLEN Jean Claude Maître de Conférences Université Paris Sud, Laboratoire Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

CARON Delphine Faculté des Sciences, Université de Picardie, Androgenèse et Biotechnologie, Ilot des Poulies, 33 rue St Leu, 80039 AMIENS Cedex, FRANCE

CATTEROU Manuella Faculté des Sciences, Université de Picardie, Androgenèse et Biotechnologie, Ilot des Poulies, 33 rue St Leu, 80039 AMIENS Cedex, FRANCE

CAUDERON André Chercheur 15 Avenue nue Mirabeau, 78000 VERSAILLES, FRANCE

CERBAH Malika Université Paris Sud, Laboratoire Évolution et Systématique, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

CHAARI-RKHIS Anissa Chercheur Faculté de Sciences de Sfax, Institut de l'Olivier, 3038 SFAX, TUNISIE

CHABANE Djamilia Chercheur URZA, ALGER, ALGERIE

CHAIBI Wided Maître-Assistante Faculté Sciences de Tunis, Laboratoire Physiologie Végétale Campus Universitaire, 1060 TUNIS, TUNISIE

CHAPON Michel Sélectionneur Blé tendre PROCOSEM SA, Domaine du Chaumoy, 18570 LE SUBRAY, FRANCE

CHAPUT Marie-Hélène Enseignante LPH Montravel, 42000 VILLARS, FRANCE

CHERIF Mejda Maître-Assistante Institut National Agronomique de Tunis, Laboratoire Génétique, 43 Avenue Charles Nicolle, 1082 TUNIS, TUNISIE

CHLYAH Averil Bouchra Professeur Faculté des Sciences de Rabat Laboratoire de Physiologie Végétale B P 1014 RABAT MAROC

CHOKAIRI Mustapha Professeur Chef département biologie Faculté des Sciences de Rabat Département de Biologie B P 1014 RABAT MAROC

CLAUCE Hélène Faculté des Sciences Université de Picardie Androgenèse et Biotechnologie Ilot des Poulies 33 rue St Leu 80039 AMIENS Cedex FRANCE

COLLIN Jean Professeur Agrégé Université Laval-FSAA Département Phytologie Pavillon Comtois QUÉBEC - G1K 7P4 CANADA

COSSON Louis Professeur Université Paris Sud, UFR de Pharmacie Botanique et Phytochimie rue J-B Clément 92296 CHATENAY-MALABRY Cedex FRANCE

COUMANS Marc Maître de Conférences Université Montpellier II Laboratoire Physiologie Végétale Appliquée Bât 15 Case 002 34095 MONTPELLIER Cedex 5 FRANCE

CZARYSKI Sylvain Juriste 4 rue Pierre et Marie Curie 87800 NEXON FRANCE

DAALOUL Abderrazak Professeur Directeur Général INAT Laboratoire Génétique et Amélioration Plantes 43, Avenue Charles Nicolle 1002 Le Belvédère TUNIS TUNISIE

DAGUIN Florence Ingénieur Recherche Université d'Anvers (UIA) Laboratoire Recherche Physiologie Végétale (L R P V.) 16, bd Lavoisier 49045 ANGERS Cedex 01 FRANCE

DAHMANI Yahya Thésard Faculté des Sciences d'Oujda, Université Mohamed I Département Biologie Route Sidi Maâfa 60000 OUJDA MAROC

DALLOT Sylvie ENSAM INRA Laboratoire Pathologie Végétale 2, place Viala 34060 MONTPELLIER Cedex 1 FRANCE

DALOUMAN Richard Enseignant chercheur Université de Cocody Abidjan Département de Biochimie 22 BP 582 ABIDJAN 22 COTE d'IVOIRE

DAUCHEL Hélène Maître de Conférences Université de Rouen CNRS UPRES A 6037 76821 MONT SAINT AIGNAN FRANCE

DAUCHELLE Hélène Enseignant chercheur Faculté des Sciences et Techniques de Rouen Laboratoire 3P SCUEOR B P 118 76134 MONT-SAINT-AIGNAN Cedex FRANCE

De NUCE de LAMOTHE Michel President AGROPOLIS Avenue Agropolis 34394 MONTPELLIER Cedex 5 FRANCE

De VIENNE Dominique Resp Laboratoire G S V Université Paris Sud Station de Genetique Vegetale La Ferme du Moulon 91190 GIF sur Yvette FRANCE

DECLERCK Véronique Docteur, Enseignant chercheur I S A B Laboratoire Biotechnologies Vegetales 32. bd du Port 95094 CERGY PONTOISE FRANCE

DELBREIL Bruno Maître de Conférences Université de Lille 1 59655 VILLENEUVE D'ASCQ FRANCE

DEMARLY Yves Professeur des 14. allée des Gardes Royales 78000 VERSAILLES FRANCE

DRIRA Nourredine Professeur des Universités Faculté de Sciences de Sfax Institut de l'Olivier 3038 SFAX TUNISIE

Du JARDIN Patrick Professeur Faculté Sciences Agronomiques Gembloux Département Biologie Végétale Bât 48 Avenue Maréchal Juin B 5030 GEMBLOUX BELGIQUE

DUBLIN Pierre 15 rue des Fayvettes 21121 FONTAINE LES DIJON FRANCE

DUBOIS Frédéric Faculté des Sciences Université de Picardie Androgenèse et Biotechnologie Ilot des Poulies 33 rue St Leu 80039 AMIENS Cedex FRANCE

DUBOIS Joseph Directeur Général CRA Gembloux Station d'amélioration des plantes 4. rue du Bordia B 5030 GEMBLOUX BELGIQUE

EL BELLAJ Mounir Thésard Faculté Sciences SEMLALIA Laboratoire Physiologie Végétale 40001 MARRAKECH MAROC

EL BOUAMI Fouad Maître de Conférences Docteur Université Moulay Ismail Laboratoire Biotechnologies BP 4010 Béni N'hamed 50000 MEKNES MAROC

ELMESBAHI L Laboratoire de Phytogénétique et de Biotechnologies, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II (IAVH), Rabat Institut, BP 6202, Rabat, Maroc

EL MTILI Nourredine Professeur Faculté Sciences d'Oujda Groupe Génétique 60000 OUJDA MAROC

ESPAGNAC Henri Professeur Université d'Avignon Faculté des Sciences, Laboratoire Biologie Végétale 33, rue Louis Pasteur 84000 AVIGNON FRANCE

FOLLIN Jean-Claude CIRAD-CA, B P 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

FONTANEL Annie Chercheur CRN, Tours 101, Avenue Gustave Eiffel, 37390 NOTRE DAME d'OE, FRANCE

FOUILLARD Philippe Sélectionneur HILLESOG NK 408, rue George Lapatie, 60490 RESSONS sur MATZ, FRANCE

GAISNE Colette, Secrétaire, Laboratoire MVE, bât 360 UPS Orsay 91405

GHRIR Rachid Professeur Institut National de la Recherche des Sciences et Technique, Laboratoire de biochimie végétale et microbiologie des sols, BP 95, HAMAMM-LIF 2050, TUNISIE

GIGI Nicolas Ingénieur Agronome Université Catholique Louvain la Neuve, Laboratoire de Cytogénétique, Département Biologie, Place croix du Sud, Bte 13, B 1348 LOUVAIN la NEUVE, BELGIQUE

GLASZMANN Jean-Christophe Chercheur CIRAD, Département CA, Avenue du Val de Montferrand, B.P 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

GRANIER Christel Chercheur Semences CARGILL, Centre de Recherche de Boissay, BP 17, BOISSAY, 28310 TOURY, FRANCE

GREGOIRE Serge Ingénieur INRA, Station Amélioration des Plantes, Route de Saint-Cyr, 78026 VERSAILLES Cedex, FRANCE

GRENIER Docteur, Enseignant chercheur I.S.A.B., Laboratoire Biotechnologies Végétales, 32 boulevard du Port, 95094 CERGY PONTOISE, FRANCE

GRENIER DE MARCH Ghislaine Res. labo Amel pl Enseignante Chercheur I.S.A.B., Laboratoire Biotechnologies Végétales, Rue Pierre Waguët, B.P 313, 60026 BEAUVAIS, FRANCE

GUEDIRA Abdelkarim Enseignant chercheur Université Paris Sud, Laboratoire Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

GUEYE Mathieu Stagiaire Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Laboratoire de Phytopathologie, Passage des Déportés 2, B 5030 GEMBLoux, BELGIQUE

HALLARD Jacques Gérard EURL HORTISEM, 2240 Chemin du Tilleul, 13160 CHATEAURENARD, FRANCE

HARRABI Moncef Professeur INAT, Institut Agronomique de Tunis Génétique, Amélioration des Plantes, 43 Avenue Charles Nicolle, 1082 TUNIS, TUNISIE

HARRAG Abdelmalek Enseignant chercheur Institut des Sciences Biologiques, Université Ferhaye Abbas, 19000 SETIF, ALGERIE

HASSINI Fatma Chercheur INRA (BAINEM), BP 37, CHERAGA ALGER, ALGERIE

HATIMI Saadia Doctorant Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Service de technologie microbienne, Passage des Déportés 2, B 5030 GEMBLoux, BELGIQUE

HERVE Yves Professeur ENSAR, Science du Végétal, 65 Route de St Brieuc, 35042 RENNES Cedex, FRANCE

HINAS Nora Stagiaire Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Laboratoire de Phytopathologie, Passage des Déportés 2, B 5030 GEMBLoux, BELGIQUE

HOUBA-HERIN Nicole Chargée de Recherche INRA VERSAILLES, Laboratoire Biologie Cellulaire, Route de St Cyr, 78026 VERSAILLES Cedex, FRANCE

JACQMIN Sophie Assistante de Recherche Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Amélioration des Plantes, Rue Bordia 4, B 5030 GEMBLoux, BELGIQUE

JACQUEMIN Jean-Marie Chef de travaux Centre Recherche Agronomique, Biologie moléculaire SAP, rue du Bordia 4, B 5030 GEMBLoux, BELGIQUE

KASSEM My Abdelmajid Doctorant U.P.M.C (Paris VI) CEMV, Bât N2 Boite 150, 75252 PARIS Cedex, FRANCE

KENNY Lahcen Maître de Conférences I.A.V Hassan II, Laboratoire Biotechnologie et Physiologie Végétale, B.P 18/S, AGADIR, MAROC

KHELIFI Mohamed Enseignant Université de Constantine, Institut des Sciences de la Nature, 25000 CONSTANTINE, ALGERIE

KONARE Damien Journaliste Afrique Agricultures, 3 Avenue des Béguines, 95807 CERGY PONTOISE Cedex, FRANCE

KOUAME Brou Directeur adjoint IDEFOR, Département Plantes Oléagineuses, 01 BP 1001, ABIDJAN 01, COTE D'IVOIRE

KOUAME N'zue Stagiaire Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Laboratoire de Phytopathologie, Passage des Déportés 2, B 1348 LOUVAIN LA NEUVE, BELGIQUE

LABERCHE Jean-Claude Faculté des Sciences Université de Picardie, Androgenèse et Biotechnologies, Ilot des Poules, 33 rue St Leu, 80039 AMIENS Cedex, FRANCE

LAGODA Pierre Jean Laurent Docteur, Chercheur CIRAD BIOTROP AGETROP, Avenue Val de Montferrand, BP 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

LAKHOUA Lilia Maître-Assistante, Responsable

Ecole Nationale des Ingénieurs E.N.I.S., Route de la Soukra km 3,5, BPW 30, 38 SFAX, TUNISIE

LAMIDI Maroufath Chercheur Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Pharmacognosie, 27 Bd Jean Moulin, 13005 MARSEILLE, FRANCE

LAMY-MAHMOUD Françoise Maître de Conférences Université Paris Sud, Laboratoire Evolution et Systématique des Végétaux, Bât 362, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

LARGITTE Lydia Secrétaire Université de Paris Sud, Laboratoire Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

LASCAUX Bruno Technicien Enseignement Université Paris Sud, Laboratoire Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

LE THI Anh Hong Docteur, directeur du labo Institut de Génétique Agronomique, Laboratoire Pathologie Végétale, Conhue-Tuilem, HANOI, VIETNAM

LEFORT Marianne Directrice Bureau Ressources Génétiques 57 rue Cuvier, 75231 PARIS Cedex 05, FRANCE

LEGALL Chantal Technicienne Université de Paris Sud, Laboratoire Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

LEMONNIER Catherine Cadre Scientifique GAE, 91000 MAISSE, FRANCE

LEPOIVRE Philippe Professeur Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Laboratoire Pathologie Végétale, Passage des Déportés 2, B 5300 GEMBLoux, BELGIQUE

LEROY Thierry Cadre Scientifique CIRAD CP, Amélioration des Plantes, B.P 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

LETOUZE Robert Professeur Laboratoire Recherche en Physiologie Végétale, Laboratoire Biotechnologies, 16 boulevard Lavoisier, 49045 ANGERS Cedex 01, FRANCE

LOUKILI Azeddine Thesard Faculté Sciences de Tunis, Laboratoire Physiologie Végétale, Campus Universitaire, 1060 TUNIS, TUNISIE

MAALEJ Mohamed Doctorant Faculté de Sciences de Sfax, Institut de l'Olivier, 3038 SFAX, TUNISIE

MAKAMBILA Casimir Enseignant chercheur Université Marien NGOUABI, Faculté Sciences, Laboratoire Phytopathologie, B.P 3011, BACONGO BRAZZAVILLE, CONGO

MAROYA Norbert Ingénieur Agronome SRCV, N'iaouli, BP 03, ATTOGON, BENIN

MEMBRE Nathalie CNRS I B M P, Institut de Botanique, 28 rue Goethe, 67083 STRASBOURG, FRANCE

MEZIOU Basma Doctorant Faculté de Sciences de Sfax, Laboratoire Biotechnologies, Route de Souk, 3038 SFAX, TUNISIE

MICHAUX-FERRIERE Nicole Chercheur Responsable Laboratoire Histologie CIRAD BIOTROP, Laboratoire Histologie, B P 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

MITTEAU Martine Chargé de Mission Bureau des Ressources Génétiques (BGR), 51 rue Cuvier, 75231 PARIS Cedex 05, FRANCE

MOKHLISSE-DUNAND Noelle Enseignant chercheur Faculté Sciences Sémala, Laboratoire BBMP Biochimie, BPS 15, 40000 MARRAKECH, MAROC

MONDEIL Fanja Responsable laboratoire de Génétique Université Nationale de Cote d'Ivoire de Cocody Laboratoire Génétique Faculté Sciences et Technique BP V316 ABIDJAN 01 COTE D'IVOIRE

MORCILLO Fabienne Allocataire de Recherche ORSTOM-CIRAD, Laboratoire Génétique des Plantes Tropicales, 911 Avenue Agropolis, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

MOSTEFAOUI Hafida Stagiaire Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Laboratoire de Phytopathologie, Passage des Déportés 2, B 5030 GEMBLOUX, BELGIQUE

MOUNOLOU Jean-Claude Enseignant Université Paris Sud, Bât 336, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

MOURAD ABDENNADHER Maître de Recherche INRA Tunis, Laboratoire Biotechnologies, Rue Hédi Karray, 2049 ARIANA, TUNIS TUNISIE

MUSSIO Isabelle Docteur 32 Avenue Paul Sumien, 91600 SAVIGNY s/ORGE, FRANCE

MVILA Armand Claude Stagiaire Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Laboratoire de Phytopathologie, Passage des Déportés 2, B 5030 GEMBLOUX, BELGIQUE

MZOURI Karina Thésarde Université Moulay Ismail, Département Biotechnologies Végétales, 50000 MEKNES, MAROC

NANCY WOURDJIWOUA T. L. Doctorant Faculté de médecine et de pharmacie, Laboratoire de Pharmacognosie, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 MARSEILLE, FRANCE

NZE-EKEKANG Lucienne Chercheur IPHAMETRA, B.P. 1935, LIBREVILLE, GABON

OBAME GABON

OUHMIDOU Bouchra Stagiaire Faculté Sciences Agronomiques Gembloux, Laboratoire de Phytopathologie, Passage des Déportés 2, B 5030 GEMBLOUX, BELGIQUE

PHAM-DELEGUE Minhtha Docteur INRA, Laboratoire Neurobiologie des Invertébrés, B.P. 23, 91440 BURES-sur-YVETTE, FRANCE

PHAN Thi Hai Chercheur Université Paris Sud, I B.P., Bât 630, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

PICARD Emmanuel Maître de Conférences Université Paris Sud, Laboratoire Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

POISSON Charles Directeur de Recherche INRA, S A P F LUSIGNAN, Laboratoire Graminées Fourragères, 86600 LUSIGNAN, FRANCE

RADUCANU Florentina Chercheur IRCPT, Laboratoire Biotechnologies, Nicolae Balcescu 1, 8264 FUNDULEA, CALARAS ROUMANIE

RAHMOUNE Chaabane Professeur Université de Constantine, Environnement I S N, route Ain et Bey, 25000 CONSTANTINE, ALGERIE

RAMDANI Nour-eddine Etudiant CNED RENNES, Boulevard Sabra 18 EL QUOD S, 60000 OUJDA, MAROC

RAVENEAU Marie-Paule Enseignant chercheur Ecole Supérieure d'Agriculture, Biotechnologie des Sols et Agronomie, 55 rue Rabelais, B P 748, 49007 ANGERS Cedex 01, FRANCE

ROBÈNE-SOUSTRADE I Université de la Réunion, Laboratoire de Physiologie Végétale, 15 Avenue Rene Cassin, B P 7151, 97715 St Denis Message, REUNION (La)

SAGHI Mohammed Doyen Faculté des Sciences, Dhar El Mahraz, B P 1796, Atlas FES, MAROC

SANGWAN Brigitte Professeur Faculté des Sciences, Université de Picardie, Androgenèse et Biotechnologies, Ilot des Poules, 33 rue St Leu, 80039 AMIENS Cedex, FRANCE

SANGWAN Rajbir Directeur de Recherche Faculté des Sciences, Université de Picardie Androgenèse et Biotechnologies, Ilot des Poules, 33 rue St Leu, 80039 AMIENS Cedex, FRANCE

SARR Aboubakry Professeur Université Paris Sud, Laboratoire Évolution et Systématique, Bât 362, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

SAUTON Annie Responsable Laboratoire Biotech SEMINIS VEGETABLE SEEDS, Laboratoire Biotechnologies, Mas de Rouzel, chemin des canaux, 30900 NIMES, FRANCE

SAVADOGO Issa Ingénieur Eaux et Forêts Direction des Embellissement Urbains 03 BP 7044, OUAGADOUGOU 03, BURKINA FASO

SAYAH Lamia Chercheur Faculté Sciences de Tunis, Laboratoire Biologie Morphogénèse, Campus Universitaire, 1060 TUNIS, TUNISIE

SCHMITT Paulette Chercheur CNRS I B M P, Institut de Botanique, 28 rue Goethe, 67083 STRASBOURG, FRANCE

SCHWENDIMAN Jacques Directeur de BIOTROP CIRAD BIOTROP, BP 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

SENE Djibril Président Commission des Affaires Étrangères, Assemblée Nationale, DAKAR, SENEGAL

SERRAF-BATTERIA Isabelle Docteur Université Paris Sud, Laboratoire Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

SERVAES Aline Technicienne Université de Paris, Sud Laboratoire Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bât 360, 91405 ORSAY Cedex, FRANCE

SIDIKOU DJERMAKOYE SEYNI R Maître-Assistante Université de Niamey, Faculté des Sciences, Département Biologie, B P 12 022, NIAMEY, NIGER

SMETS Bernard Directeur de Recherche SPG Semences Production, Domaine du Moulin, 84260 SARRIANS, FRANCE

TALAMALI Amel Etudiante Résidence Universitaire Bures Nord, Chambre 4031, 91440 BURES-sur-YVETTE, FRANCE

TARCHOUN Néjib Enseignant chercheur IRESA, Ministère de l'Agriculture, El Manzeh, TUNIS, TUNISIE

TEISSON Claude Resp Cultures in vitro CIRAD-GERDAT, Laboratoire BIOTROP, Avenue Val de Montferland, BP 5035, 34032 MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

TRAN THANH VAN Kiêm Directeur de Recherche
I B P., Laboratoire Physiologie Moléculaire, 91405
ORSAY Cedex, FRANCE

TRIGUI Hamed Directeur de Recherche Faculté de
Sciences de Sfax, Institut de l'Olivier 3038 SFAX
TUNISIE

VAN HERCK Jean-Claude Directeur de Recherche
WARCOING Research and plant breeding
Département, 1 rue de la Sucrierie, 7740 PECQ-
WARCOING, BELGIQUE

VROH BI IRIE Doctorant Faculté Sciences
Agronomiques Gembloux, Phytotechnie des régions
intertropicales, Passage des Déportés 2, 5030
GEMBOUX, BELGIQUE

WAN CHOW WAH YF Enseignante Faculty of
Agriculture, University of Mauritius. Reduit,
MAURITIUS, MAURICE

ZACCOMER Bruno Biologiste cellulaire Semences
CARGILL, B P 17, BOISSAY, 28313 TOURY,
FRANCE

ZAHARIEVA Maria Chercheur INRA ENSAM
Montpellier, DGAP, 2 place Viala. 34060
MONTPELLIER Cedex 1, FRANCE

ZID Ezzedine Professeur Université Tunis II.
Laboratoire de Physiologie/Ecophysiologie Végétale.
Campus universitaire, 1060 TUNIS, TUNISIE

Créée à l'initiative de l'**Université des Réseaux d'Expression Française**, la collection *Universités Francophones* s'insère, depuis 1988, dans le paysage éditorial international. L'UREF met ainsi à la disposition des étudiants et des chercheurs des ouvrages de haute qualité scientifique.

Rédigés par des équipes à caractère multilatéral, manuels, monographies et actes de colloques abordent des problématiques intéressant l'ensemble du monde francophone. En outre, ils s'adaptent, grâce à une politique de prix particulière, à ses différentes réalités économiques : autant de conditions contribuant à la reconnaissance et au succès de la collection.

280 FF

60 FF – UREF/Prix préférentiel : Afrique, Asie, Amérique du Sud, Haïti

ISBN 2 84371 030 8



9 782843 710308