

50376
1989
47

N° d'ordre : 341

50376
1989
47

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

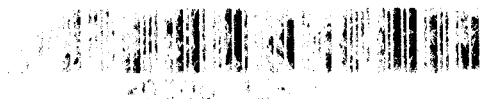
DOCTEUR EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES

par

Jean-Luc MILLECAMPS



SELECTION DE CHICOREES
Cichorium intybus L. var. Witloof
RESISTANTES AUX SULFONYLUREES PAR
CULTURES CELLULAIRES



Soutenue le 22 Mai 1989 devant la Commission d'Examen

M. R. BOURIQUET	Professeur, Université de Lille I	Président
M. J. VASSEUR	Professeur, Université de Lille I	Rapporteurs
M. J. GASQUEZ	Directeur de Recherche, Laboratoire de Malherbologie I.N.R.A. 21000 Dijon	
M. H. BANNEROT	Directeur de Recherche, Station d'Amélioration des Plantes I.N.R.A. 78000 VERSAILLES	Examineurs
M. J. DUBOIS	Maîtres de Conférences, Université de Lille I	

A ma famille et à ceux qui
m'entourent:

Merci.

AVANT PROPOS

Cette étude a été réalisée grâce à la collaboration entre un laboratoire universitaire de recherche et une entreprise de sélection de semences; c'est pourquoi je remercie en premier lieu les investigateurs de cette collaboration: le Président de ce jury, Monsieur le Professeur Robert BOURIQUET, responsable du laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois et Monsieur Michel HOQUET directeur des Etablissements HOQUET-GRAINES à Raillencourt.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur Jacques GASQUEZ (I.N.R.A. Dijon) qui a accepté de lire ce mémoire en qualité de rapporteur et à Monsieur Hubert BANNEROT (I.N.R.A. Versailles) qui me fait l'honneur d'être parmi les membres du jury de ma thèse.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur Jacques VASSEUR qui, en qualité de rapporteur, corrigea "Ad usum Delphini" ce manuscrit et à Monsieur Jean DUBOIS d'avoir suivi avec attention l'évolution de ce travail, je leur suis gré de m'avoir laissé une grande liberté dans mes activités de recherche.

En dehors des membres du jury, je voudrai exprimer ma reconnaissance à tout ceux qui m'ont aidé au cours de la réalisation de ce travail.

Je suis redevable à Monsieur Bernard LEGRAND et Monsieur le Professeur Serge RAMBOUR pour l'attention qu'ils ont bien voulu porter lors de nombreuses discussions.

J'adresse enfin mes remerciements aux étudiants et au personnel technique du laboratoire qui par leur enthousiasme rendirent ce travail très agréable.

SOMMAIRE

	Pages :	
<u>SOMMAIRE</u>		1
<u>PREFACE</u>		3
1.) <u>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>		5
1.1) <u>INTRODUCTION</u>		
1.1.1) SPECIFICITE ET SELECTIVITE DES HERBICIDES		
1.1.2) HERBICIDES SUSCEPTIBLES D'ETRE UTILISES <i>IN-VITRO</i>		6
1.2) <u>CHOIX DE L'HERBICIDE A UTILISER</u>		7
1.2.1) INTRODUCTION		
1.2.2) LE GLYPHOSATE		8
1.2.3) LE GLUFOSINATE		9
1.2.4) LES IMIDAZOLINONES		10
1.2.5) LES SULFONYLUREES		
1.2.6) CONCLUSION		11
1.3) <u>ETUDE DES SULFONYLUREES</u>		12
1.3.1) BIOSYNTHESE DE LA VALINE DE LA LEUCINE ET DE L'ISOLEUCINE		
1.3.2) STRUCTURE ET REGULATION DE L'AHAS		
1.3.3) METABOLISATION DU CHLORSULFURON		14
1.3.4) CIBLE BIOCHIMIQUE ET REVERSION DES EFFETS		15
1.4) <u>LES PLANTES RESISTANTES AUX SULFONYLUREES</u>		16
1.4.1) OBTENUES PAR TRANSFORMATION ET PAR SELECTION DE MUTANTS SOMACLONAUX		17
1.4.2) OBTENUES PAR SELECTION TRADITIONNELLE		19
1.5) <u>CULTURES CELLULAIRES ET SELECTION DE MUTANTS SOMACLONAUX</u>		
2) <u>MATERIELS ET METHODES</u>		20
2.1) <u>LE MATERIEL VEGETAL</u>		
2.1.1) ORIGINE		
2.1.2) MISE EN PLACE DE SUSPENSIONS CELLULAIRES ORGANOGENES		
2.1.2.1) <u>Aseptisation des akènes</u>		
2.1.2.2) <u>Mise en germination</u>		
2.1.2.3) <u>Création de suspensions cellulaires</u>		21

2.2)	<u>UTILISATION DES HERBICIDES.</u>	
2.2.1)	DISSOLUTION ET STOCKAGE DES HERBICIDES	22
2.2.2)	INCORPORATION AU MILIEU DE CULTURE	
2.3)	<u>LA SELECTION <i>IN-VITRO</i></u>	
2.4)	<u>PRODUCTION DE "<i>VITRO</i>-PLANTS"</u>	23
2.4.1)	NEOFORMATION DE BOURGEONS	
2.4.2)	ENRACINEMENT DES BOURGEONS	
2.4.3)	ACCLIMATATION DES " <i>VITRO</i> -PLANTS"	
2.5)	<u>CROISEMENTS ET AUTOFECONDATIONS</u>	24
2.6)	<u>APPLICATION DE L'HERBICIDE SUR DU MATERIEL VEGETAL EN SERRE</u>	25
2.6.1)	DISSOLUTION DES PRODUITS	
2.6.2)	TRAITEMENTS	
2.7)	<u>COMPARAISON DE L'ACTION DE L'HERBICIDE ENTRE SOUCHES CELLULAIRES DIFFERENTES</u>	
2.8)	<u>ANALYSES STATISTIQUES DES RESULTATS</u>	26
3)	<u>RESULTATS</u>	27
3.1)	<u>ETUDE DE LA COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE</u>	
3.1.1)	OPTIMISATION DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE D'EXPLANTS COTYLEDONNAIRES	
3.1.2)	OPTIMISATION DE LA PROLIFERATION DE MASSIFS CELLULAIRES.	28
3.1.3)	RECAPITULATIF DES MILIEUX DE CULTURE	29
3.2)	<u>HERBICIDES ET CROISSANCE CELLULAIRE</u>	30
3.2.1)	RECHERCHE DES DOSES UTILISABLES POUR LA SELECTION	
3.2.2)	REVERSION DE L'EFFET DU CHLORSULFURON	31

	Pages :	
3.3) <u>ISOLEMENT DE SOUCHES CELLULAIRES PROLIFERANT SUR UN MILIEU DE SELECTION</u>		32
3.3.1) EVALUATION DE LA CROISSANCE RELATIVE DES SOUCHES SELECTIONNEES		33
3.3.1.1) <u>Souches R8, R6, et R11</u>		
3.3.1.2) <u>Souche R1 OK</u>		
3.3.2) VERIFICATION DU "PASSAGE" DE L'APTITUDE A LA PROLIFERATION EN PRESENCE D'HERBICIDE, DE CELLULES INDIFFERENCIEES AUX BOURGEONS NEOFORMES ET INVERSEMENT		34
3.4) <u>VERIFICATION AUX CHAMPS DE LA TRANSMISSION DE CETTE PROPRIETE PAR VOIE SEXUEE</u>		35
3.4.1) CRITERES DES TRAITEMENTS		
3.4.1.1) <u>Introduction</u>		
3.4.1.2) <u>Définition du stade de traitement</u>		
3.4.1.3) <u>Recherche de la dose d'herbicide optimale à utiliser</u>		36
3.4.2) TRAITEMENTS REALISES SUR DES PLANTULES ISSUES D'AUTOFECONDATIONS DE PLANTES PROVENANT DE CELLULES SELECTIONNEES		37
3.4.2.1) <u>Introduction</u>		
3.4.2.2) <u>Résultats</u>		
3.4.2.2.1) Autofécondations réalisées sur une plante R8 à U.S.T.L.		38
3.4.2.2.2) Autofécondations réalisées sur les plantes "R8", "R6" et "R11" aux Etablissements HOQUET		39
3.4.2.3) <u>Conclusion</u>		
4) <u>DISCUSSION</u>		40
4.1) <u>INTRODUCTION</u>		
4.2) <u>INFLUENCE DE L'HERBICIDE CHOISI SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE</u>		41
4.3) <u>LES CULTURES CELLULAIRES</u>		42
4.4) <u>ISOLEMENT DE SOUCHES ORGANOGENES</u>		44
4.4.1) SOUCHES R6, R8 ET R11		
4.4.2) SOUCHE R1 OK		46
4.5) <u>CONCLUSION</u>		47
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>		52
<u>RESUME</u>		57
<u>ABSTRACT</u>		

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- INTRODUCTION
- CHOIX DE L'HERBICIDE A UTILISER
- ETUDE DES SULFONYLUREES
- LES PLANTES RESISTANTES AUX SULFONYLUREES
- CULTURES CELLULAIRES ET SELECTION DE MUTANTS
SOMACLONAUX

PREFACE

Le contrôle des adventices dans la culture de plantes appartenant au genre *Cichorium* est malaisé. L'absence de désherbants sélectifs et la trop grande sensibilité de ces plantes aux herbicides commercialisés pour d'autres cultures, justifie la destruction manuelle des mauvaises herbes. Ce procédé représente, dans un contexte économique défavorable, une augmentation du coût de production ainsi qu'une contrainte liée à l'emploi de main d'oeuvre. Les faibles emblavements de cette culture ne peuvent rentabiliser les frais inhérents à la recherche d'un désherbant sélectif, c'est pourquoi il semble qu'aucune entreprise phytosanitaire ne soit susceptible d'effectuer cette démarche.

La seule solution envisageable, était la recherche de Chicorées résistantes à un herbicide déjà commercialisé. Nous avons choisi pour cela d'exploiter la variabilité qui affecte les cultures cellulaires *in-vitro*.

Ce travail qui concerne une plante de nos régions, *Cichorium intybus* L. var. Witloof a fait l'objet, avec la collaboration de la F.N.P.E., d'un contrat C.I.F.R.E. financé par l'A.N.R.T. et les Etablissements HOQUET.

1.) ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1) INTRODUCTION

Une adventice se définit comme une plante présente dans un contexte soulignant son caractère indésirable. Ce qui englobe à la fois des espèces sauvages non cultivées, mais aussi des reliquats issus de cultures précédentes qui entrent en compétition directe avec la couverture végétale en place.

Les pertes culturales quantitatives et qualitatives qui résultent de cette compétition, doivent être replacées dans le cadre d'une agriculture mondiale en pleine évolution. Le contrôle de ces adventices, effectué traditionnellement par des méthodes culturales tel que le binage et le sarclage manuel, nécessite l'utilisation d'une main d'oeuvre importante et onéreuse. Critère incompatible avec les transformations des unités de production agricoles liées à une mécanisation optimale, visant justement à diminuer les charges d'exploitation propres à l'emploi de personnel.

Les agriculteurs se replient donc vers l'utilisation croissante d'herbicides. C'est pourquoi le chiffre d'affaire propre aux désherbants, représentant 43% des ventes mondiales de pesticides (soit 13.75 milliards USD en 1984), ne cesse d'augmenter depuis les années soixantes (ANDING et GORE, 1986).

1.1.1) SPECIFICITE ET SELECTIVITE DES HERBICIDES

Si la **sélectivité** d'un herbicide par rapport à une plante se traduit par sa non toxicité (au moins pour la dose utilisée) envers cette dernière, la **spécificité** désigne, elle, les catégories de plantes susceptibles d'être détruites par ce produit, en un mot son **spectre d'activité**.

Un herbicide est donc d'autant plus efficace qu'il affiche une sélectivité restreinte (au mieux la plante cultivée), une spécificité large et une persistance faible, non pénalisante pour les cultures ultérieures.

Il est important de présenter ce qui définit la sélectivité ou la spécificité d'un herbicide par rapport à une plante. Nous tiendrons compte à la fois des différentes possibilités offertes aux molécules d'herbicide d'atteindre et d'inhiber une cible biochimique vitale, mais aussi des mécanismes de protection dont dispose le végétal.

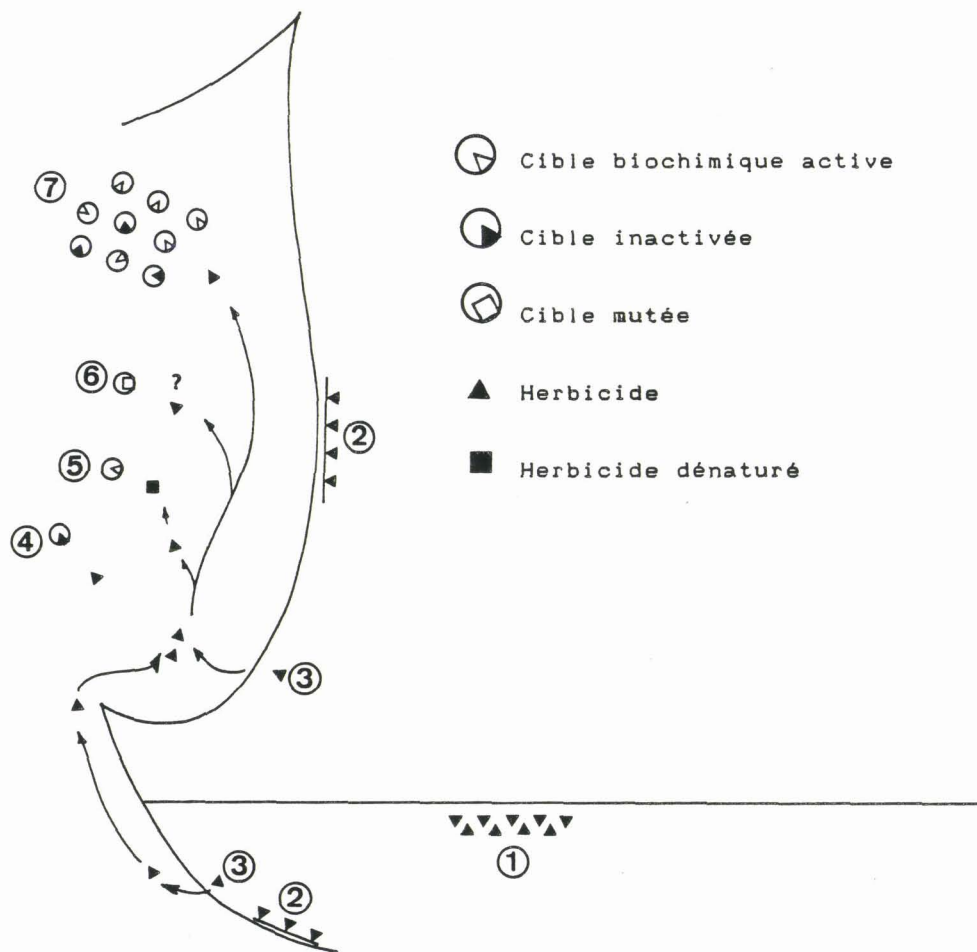


Figure 1: Modélisation des principales voies d'action des herbicides chez une plante supérieure (selon GASQUEZ INRA DIJON), communication personnelle.

- (1) Localisation du traitement herbicide
- (2) Barrières physiques évitant la pénétration du produit
- (3) Pénétrations racinaire et foliaire de l'herbicide
- (4) Inhibition d'une cible biochimique
- (5) perte, par dénaturation, des capacités d'inhibition de l'herbicide
- (6) Cible biochimique mutée non "reconnaissable" par l'herbicide
- (7) Surproduction de la cible biochimique l'herbicide est sans effet

En fait, plusieurs possibilités existent (figure: 1):

- (1) un traitement localisé peut ne pas atteindre la plante
- (2) la présence d'une barrière physique (cuticule épaisse) peut empêcher la pénétration du produit.

Néanmoins si la pénétration racinaire ou foliaire (3) n'est pas supprimée, d'autres éventualités peuvent se produire:

- (4) la cible est atteinte, la plante se nécrose
- (5) le végétal détoxifie la molécule, donc l'inactive
- (6) la cible peut avoir muté et de ce fait ne plus être reconnue
- (7) la cible est en quantité telle qu'il est impossible à une dose d'herbicide normale de l'inhiber en totalité.

Si l'on ajoute à cela le choix de l'herbicide, la dose employée, la localisation et le moment du traitement, il est alors aisé de comprendre qu'il convient avant de lancer un programme de désherbage de choisir judicieusement le type de produit et de veiller à ce qu'il soit correctement appliqué.

1.1.2) HERBICIDES SUSCEPTIBLES D'ETRE UTILISES *IN-VITRO*

L'herbicide qui allait devenir notre outil de sélection se devait de répondre à un ensemble de caractéristiques précises. La sélectivité pouvait être nulle, toutefois il était primordial que sa spécificité soit la plus large possible.

De même ses propriétés devaient s'exprimer *in-vitro*, ce qui éliminait d'emblée les molécules intervenant par exemple sur la photosynthèse ou tout autres fonctions vitales pour une plante *in-situ* mais secondaires *in-vitro*.

L'objectif visé étant la sélection de plantes issues de cellules mutées, la cible inhibée par l'herbicide (une fonction biochimique précise aux principes de régulation connus) se devait d'être unique. Il est généralement admis que si une résistance est liée à la mutation d'un gène "sauvage", celle ci se réalise avec une probabilité de 10^{-7} (à une puissance de 10 près), les culture *in-vitro* de cellules, autorisent en effet l'isolement de mutants dont la fréquence d'apparition est pourtant aussi faible (BOURGAIN, 1978).

Farmi les produits commercialisés avec un degré de pureté suffisant seuls quelques uns répondaient à ces critères:

- LE GLYPHOSATE
- LE GLUFOSINATE
- LES IMIDAZOLINONES
- LES SULFONYLUREES

Avec l'objectif de ne retenir qu'un seul de ces herbicides, il était alors nécessaire d'effectuer un bilan des études biochimiques et des travaux de sélections réalisés à partir de ces différentes molécules.

1.2) CHOIX DE L'HERBICIDE A UTILISER

1.2.1) INTRODUCTION

Avant de décrire l'état des connaissances sur les différents produits susceptibles d'être retenus, il convient de préciser que ces herbicides ont la particularité d'avoir une analogie d'effet sur les plantes supérieures et certains micro-organismes. Les critères de spécificité ou de sélectivité sont identiques à ceux des végétaux supérieurs, puisqu'ils présentent les mêmes types de résistances qui sont:

- la **mutation d'un gène** codant pour la synthèse d'une cible, qui de ce fait, n'est plus reconnue par l'herbicide.

- la **surproduction de cette cible par amplification de gènes**, il faut donc pour obtenir un même effet d'inhibition augmenter les doses d'herbicide. Ce n'est pas une résistance au sens strict du terme puisque, au niveau biochimique, la sensibilité existe toujours.

- la **possibilité de détruire l'inhibiteur, en le détoxifiant** ce qui nécessite la présence d'un système enzymatique propre à la dénaturation de l'herbicide.

La souplesse d'utilisation des micro-organismes a servi de support à des études biochimiques préliminaires. Les résultats obtenus autorisèrent une extension des recherches à des systèmes cellulaires plus complexes, tels ceux issus des cultures *in-vitro* de plantes supérieures.

C'est ainsi que les micro-organismes sont devenus par excellence le matériel de base lié aux techniques de "genetic engineering", actuellement développées pour la recherche de gènes de résistance ou de détoxification afin d'en effectuer un possible transfert dans le génome de végétaux supérieurs.

1.2.2) LE GLYPHOSATE

Vendu par Monsanto sous le nom commercial de "Round-up" il est utilisé comme désherbant total. La 5-enolpyruvyl-shikimate 3-phosphoric acid synthase (EPSPS), enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques, s'est révélée être la cible de cet herbicide chez les bactéries (STEINRUCKEN et AMRHEIN, 1980). Un ensemble d'expérimentations réalisées sur *Spirodela polyrriza* et *Rhizobium japonicum* prouvèrent qu'il inhibait la synthèse du tryptophane, de la tyrosine et de la phénylalanine. En effet l'adjonction de ces trois acides aminés aromatiques dans les milieux de culture en présence de l'herbicide, annulait son effet inhibiteur. Ceci fut confirmé grâce à de nouvelles expériences de réversion effectuées avec *Chlamydomonas*, *Escherichia coli* et plusieurs cultures cellulaires issues de végétaux supérieurs; mais n'a pu être vérifié expérimentalement sur des plantes entières.

Il convient toutefois de noter que HOAGLAND et DUKE (1982), RUBIN et al. (1984) et JENSEN (1986) démontrèrent que suivant l'espèce végétale considérée, la réversion par l'adjonction de ces trois acides aminés dans les cultures cellulaires, pouvait être totale, partielle ou nulle.

Existerait-il chez certaines plantes, plusieurs cibles biochimiques ou des effets secondaires toxiques non directement liés à une action purement herbicide ?

Les premiers essais de transfert de résistance furent ceux réalisés avec un gène bactérien codant pour une EPSPS mutée (FRADLEY et al., 1987). Isolé chez *Salmonella typhimurium* ce gène se distinguait par la substitution d'une base entraînant le remplacement d'une proline par une sérine au niveau de l'acide aminé N° 101 de l'EPSPS (COMAI et al., 1983 ; STALKER et al., 1985).

La construction de gènes "chimères" dans lesquels l'EPSPS mutante était précédée du promoteur octopine ou nopaline synthase (COMAI et al., 1985) conduisit à leur introduction dans des cellules de *Nicotiana glauca* grâce à l'*Agrobacterium tumefaciens*. Comme pour la Tomate (FILLATI et al., 1987), les plantes ainsi transformées montraient une résistance aux champs deux à trois fois supérieure à celle des témoins.

Une autre approche tentée chez Monsanto utilisant une EPSPS mutante de *Petunia hybrida* conduisit à la construction de nouveaux gènes "chimères" réintroduits ensuite dans des cellules de Pétunia (SHAH et al., 1987). Cette fois, le virus 35S de la mosaïque du Chou-fleur fut utilisé comme vecteur.

Dans les deux cas, des essais aux champs démontrèrent que les plantes ainsi transformées présentaient, après traitement et par rapport à un témoin non traité, un retard de croissance, qu'elles n'arrivaient jamais à récupérer.

Un nouveau gène mutant EPSPS isolé lui aussi chez *Petunia hybrida*, 1000 fois plus résistant que celui codant pour une enzyme normale, aurait été transféré chez un Tabac qui n'exprimerait pas ce retard de croissance après traitement (FRALEY et al., 1987). De même, puisqu'un gène de détoxification du glyphosate (une phosphonatase) a été isolé chez *Pseudomonas* (MOORE et al., 1983 ; JACOB et al., 1985), il devrait être possible de le transférer dans le génome d'une plante supérieure .

Bien qu'elle soit commercialisée depuis plus de 10 ans, cette molécule suscite toujours de nombreuses recherches appliquées.

1.2.3) LE GLUFOSINATE OU PHOSPHINOTRICINE

Actuellement développée par la compagnie Hoescht, il est dérivé de la production d'un antibiotique tripeptidique issu de *Streptomyces viridochromogenes*, son analogie avec le glutamate et la glutamine en fait un inhibiteur compétitif de la glutamine synthétase (GS) entraînant une accumulation de NH_4^+ , toxique pour la plante (LEASON et al., 1981 ; COLANDUONI et VILLAFRANCA, 1986).

DONN et al., (1984) axèrent leurs travaux sur l'isolement de souches cellulaires de Luzerne résistantes où l'activité GS était de 3 à 7 fois plus élevée que celles des témoins. La surproduction d'enzyme semblait suffisante pour pallier l'inhibition causée par l'herbicide. Néanmoins selon ces chercheurs, les plantes obtenues n'ont que de faibles potentialités de résistance. La complémentation chez *Escherichia coli* du gène *glnA* défectueux codant pour la GS par celui d'une plante, laisse penser qu'il serait possible de sélectionner une souche résistante et donc un nouveau gène *glnA* transférable chez des plantes supérieures (DAS SARMAS et al., 1986).

Une seconde approche (DE BLOCK et al., 1987 ; THOMPSON et al., 1987) résidait en la sélection chez *Streptomyces hygroscopicus* d'un gène codant pour la synthèse d'une phosphotricine acetyl transferase. Cette enzyme acétyle la molécule d'herbicide et protège la bactérie de la toxine qu'il produit. Ce gène introduit chez le Tabac, la Pomme de terre, la Betterave, le Colza et la Luzerne, via le virus 35S du Chou-fleur a donné naissance à des plantes supportant des doses d'herbicide de quatre à dix fois supérieures à celles entraînant la mort de plantes témoins (non transformées).

1.2.5) LES IMIDAZOLINONES

Produites par "American cyanamid", elles possèdent un mode d'action similaire à celui des Sulfonylurées. En effet elles interfèrent sur la synthèse des acides aminés à chaîne ramifiée en inhibant l'acétohydroxyacide synthétase (AHAS ou ALS) (SHANER et al., 1984 ; MUHITCH et al., 1987).

Des cultures cellulaires de *Zea mays* supportant les imidazolinones ont donné naissance à des cals mutants 100 fois plus résistants que des témoins (ANDERSON et GEORGESON, 1986). Des plantes (issues de ces cals) exprimant cette aptitude firent l'objet de nombreux essais et permirent de conclure à la mutation d'un gène nucléaire dominant.

Il est à souligner que les plantes homozygotes sont 300 fois plus résistantes que les témoins, que la mutation de ce gène n'induit aucune perte de rendement et qu'il y a résistance croisée avec les Sulfonylurées.

Des programmes de back-cross actuellement mis en place chez PIONEER (FRALEY et al., 1987) ont pour but d'introduire ce gène dans des lignées commercialisables.

1.2.6) LES SULFONYLUREES

Elaborées chez "DU PONT DE NEMOURS" elles regroupent un grand nombre de molécules, se distinguant par une efficacité importante (quelques grammes de matière active à l'hectare suffisent), ainsi que par une faible toxicité vis à vis des autres organismes vivants. Elles présentent en plus, un site d'action biochimique maintenant parfaitement connu (La ROSSA et FALCO, 1984).

En effet l'inhibition qu'elles provoquent chez *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli* peut être réversée grâce à l'ajout d'acides aminés à chaîne ramifiée dans les milieux de culture. Il en est de même à la fois chez des levures, ainsi qu'avec des cultures cellulaires de Pois et de Tabac (la ROSSA et SCHLOSS, 1984 ; RAY, 1984 ; SCHEEL et CASSIDA, 1985).

Une étude physiologique plus poussée chez *Salmonella typhimurium* souligna que la cible biochimique de cette nouvelle famille d'herbicides était l'acétolactate syntase (ALS) (SCHEEL et CASSIDA, 1984). Cette enzyme, commune à un ensemble de réactions biochimiques, conduit à la synthèse des trois acides aminés à chaîne ramifiée suivants:

LA VALINE, LA LEUCINE ET L'ISOLEUCINE .

Il existe de multiples isozymes de l'ALS (FELICE et al., 1982 ; WEEK et al., 1985), il fut démontré que chez les entéro-bactéries, la sensibilité aux Sulfonilurées variait selon les isozymes (EOYANG et SILVERMAN, 1983 ; La ROSSA et SMULKY, 1984 ; SCHLOSS et al., 1985). Dans un même temps, des essais *in-vitro* d'activité de l'ALS provenant de levures, de cultures cellulaires de Pois et de Tabac soulignèrent que les enzymes d'origine eucaryotique étaient sensibles, elles aussi, à ces nouvelles molécules.

La sélection de mutants (tant chez les eucaryotes que chez les procaryotes) révéla l'existence d'une forme d'ALS insensible aux Sulfonilurées, résultant de la substitution d'un acide aminé dans la structure primaire de cette enzyme (YADAV et al., 1986). Le point crucial de ces mutations résidait en leur héréditabilité c'est à dire en l'expression et la transmission par voie sexuée d'un caractère de type monogénique dominant dans la descendance, tant chez les entéro-bactéries que chez les eucaryotes tels des levures (FALCO et DUMAS, 1984) ou des plantes supérieures comme le Tabac (CHALEFF et RAY, 1984 ; CHALEFF et MAUVAIS, 1984).

1.2.7) CONCLUSION

Les imidazolinones, les Sulfonilurées ou la phosphinotricine réunissaient l'ensemble des caractères recherchés: à la fois, une spécificité large, une cible unique, un principe d'action bien connu et de surcroît un dossier toxicologique complet puisque ces produits étaient déjà commercialisés. Cependant, la présence d'une bibliographie suffisante, la possibilité de sélectionner des mutants à partir de cultures cellulaires, une faible toxicité, la préservation de l'environnement (quelques grammes par hectare suffisent), ainsi que la disponibilité des molécules pures sur le marché nous ont incité à choisir les Sulfonilurées.

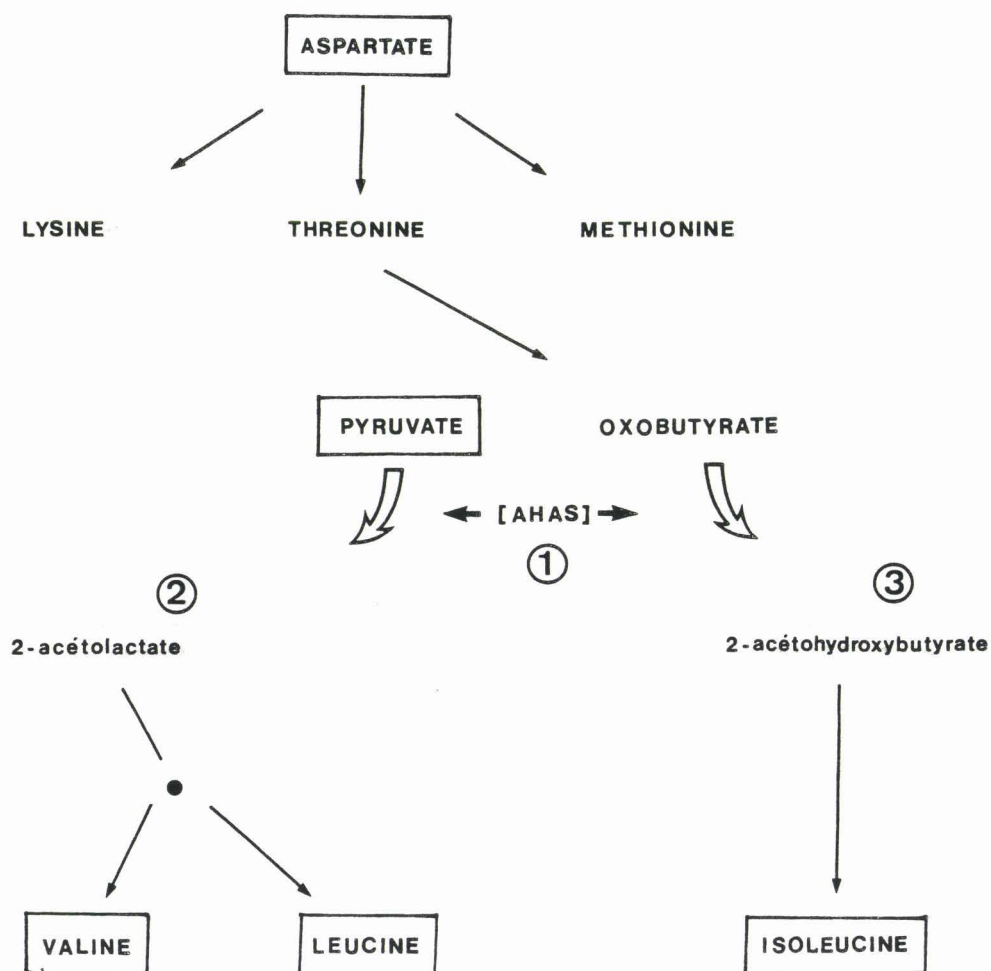


Figure 2: Voies métaboliques menant à la synthèse de la valine, de la leucine et de l'isoleucine.

- (1) Acetohydroxyacide synthétase (AHAS) enzyme commune aux chaînes de biosynthèse des trois acides aminés
- (2) 1^{er} produit de transformation du pyruvate, promoteur de la valine et de la leucine
- (3) Produit de transformation de l'oxobutyrate (provenant de l'aspartate), promoteur de l'isoleucine

1.3) ETUDE DES SULFONYLUREES

1.3.1) BIOSYNTHESE DE LA VALINE DE LA LEUCINE ET DE L'ISOLEUCINE

Leur synthèse est liée à deux chaînes de réactions parallèles (figure: 2):

- une première, dont la molécule de départ est l'aspartate donne naissance à l'isoleucine
- une seconde, utilisant le pyruvate génère valine et leucine.

Ces deux chaînes possèdent un premier point de jonction (1) représenté par l'utilisation commune d'une même enzyme l'acétohydroxyacide synthétase (AHAS) ou acétolactate synthase (ALS). Cette dernière permet à la fois dans la voie de la valine-leucine ou dans celle de l'isoleucine la synthèse respective du 2-acétolactate ou du 2-acétohydroxybutirate (BRYAN,1980). Cette enzyme commune aux plantes, levures et bactéries est la cible de cette famille d'herbicides.

1.3.2) STRUCTURE ET REGULATION DE L'AHAS

Elle fut tout d'abord étudiée chez *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*. On découvrit trois isozymes: I, II et III composées chacune de deux sous-unités polypeptidiques, une première de 60.000 daltons et une seconde plus petite de 9000 à 17000 daltons (De FELICE et al.,1982 ; WEK et al.,1985). Ces deux sous-unités ainsi assemblées peuvent se présenter, selon les isozymes concernées, sous forme de monomères, de dimères ou de trimères (EOYANG et SILVERMAN,1985 ; SCHLOSS et al.,1985).

Tout comme l'EPSPS, affectée par le glyphosate, elle est codée par un gène nucléaire et se localise dans les chloroplastes (CHALEFF et RAY,1984 ; JONES et al.,1985). En effet la séquence des acides aminés déduite à partir des nucléotides souligne la présence, à la dernière fonction amine des deux sous unités formant l'AHAS, d'un peptide de transit. Peptide, qui favoriserait l'intégration de l'enzyme dans le chloroplaste (MAZUR cité par FRALEY et al.,1987).

Bacteries	Gènes	AHAS Iso	Expression	Retroinhibé par	Besoin FAD	PH optimal
E coli K12	Ilv B	I	exprimé	valine, leucine	oui	7
	Ilv G	II	non exprimé	aucun	oui	8
	Ilv III	III	exprimé	valine, leucine	non	9
S. Typhim.	Ilv B	I	exprimé	val., leuc., isol.	?	7
	Ilv G	II	exprimé	aucun	?	8
	Ilv III	III	non exprimé	valine	partiel	9

Tableau I: Présentation des caractéristiques de quelques iso-enzymes chez:

- *E. coli K12*
- *S. thyphimurium*

Selon (De FELICE et al.,1982)

Il apparaît (figure: 2) que la synthèse de la valine et de l'isoleucine implique deux séries de réactions parallèles dont les premières étapes consistent en la formation de deux acétohydroxy-acides distincts résultant:

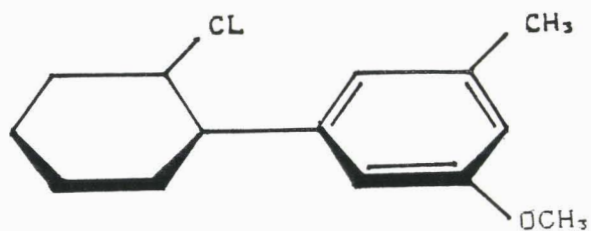
- soit de l'adjonction d'un radical en C₂ sur le pyruvate (2), formant alors le 2-acétolactate (précurseur de la valine et de la leucine).

- soit d'une même réaction portant alors sur le 2-oxobutirate (3) (issu d'une chaîne de biosynthèse liée à l'aspartate), donnant alors naissance au 2-acétohydroxybutirate (précurseur de l'isoleucine).

Il est possible de supposer qu'il existe chez les procaryotes une spécificité des isozymes en vue de la synthèse d'un acide aminé particulier (valine, leucine ou isoleucine). Néanmoins il n'en est rien, contrairement à ce qui se passe pour les chaînes de biosynthèse des acides aminés aromatiques, il n'existe pas pour chaque iso-enzyme de régulations type "feed-back" par l'acide aminé synthétisé qui leur serait spécifique (tableau: 1) selon (De Felice et al., 1982). Cette hypothèse n'est donc pas à retenir.

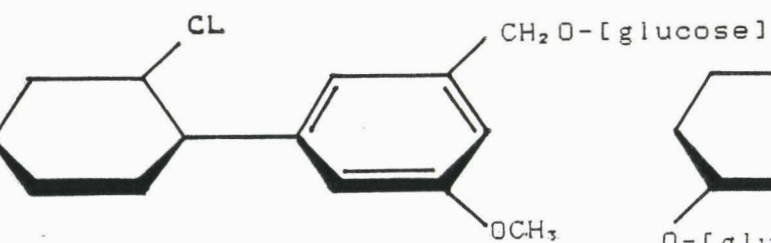
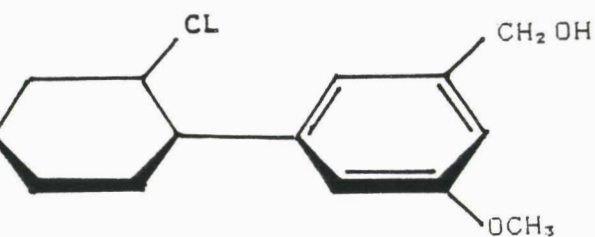
On pense que leur multiplicité serait due au fait que certaines isozymes aient de nombreuses fonctions (De FELICE et al., 1982) tel l'AHAS I qui prendra part à la formation de l'adénosine monophosphate cyclique.

Néanmoins comme le soulignent HAUGHN et SOMERVILLE (1986) s'il est vrai que l'on commence à connaître chez les procaryotes et les levures le fonctionnement de l'AHAS, rien n'indique que l'on puisse pour les plantes supérieures (qui d'ailleurs ne semblent pas posséder ce système iso-enzymatique) extrapoler les résultats obtenus avec les micro-organismes.



CHLORSULFURON

A



B

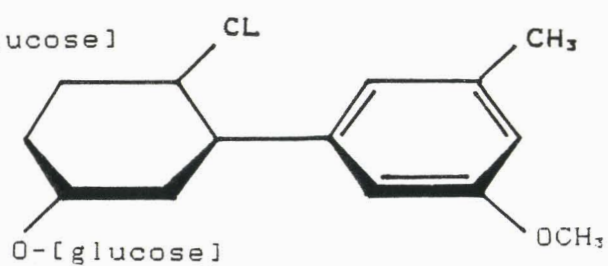
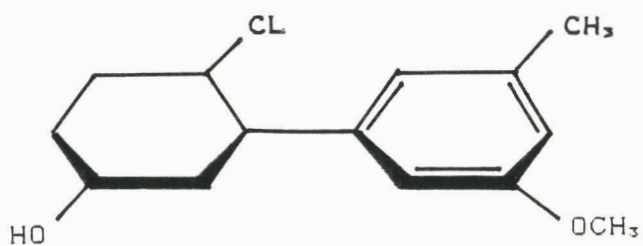


Figure 3: Voies de métabolisation du Chlorsulfuron par ajout d'un radical Glucose chez:

(A): *Linum usitatissimum*, *Solanum nigrum*

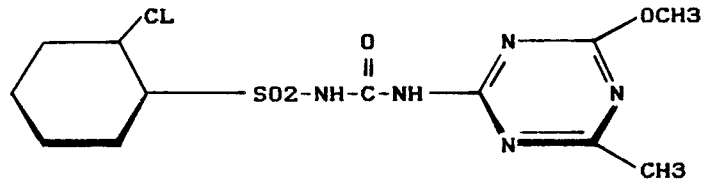
(B): Céréales

Selon (SWEETSER (1981) ; HUTCHINSON (1984))

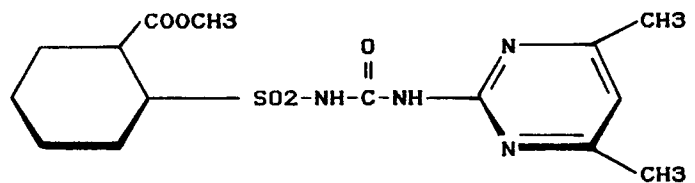
1.3.3) METABOLISATION DU CHLORSULFURON

Commercialisée depuis peu en France par DU PONT DE NEMOURS la famille des Sulfonylurées regroupe un nombre appréciable de molécules distinctes mais structurellement voisines. Il fut possible de réunir une documentation bibliographique suffisante pour deux d'entre elles:

- Le chlorsulfuron



- Le sulfometuron



Inhibiteurs d'une voie de biosynthèse commune aux plantes supérieures, leur spécificité pour le Blé, l'Avoine, l'Orge et le Seigle réside dans le fait que ces monocotylédones possèdent le système enzymatique nécessaire à leur dénaturation. Ces plantes métabolisent rapidement le chlorsulfuron en un produit polaire inactif:

- le O-glucoside chlorsulfuron (SWEETSER et al., 1982).

de même, des dicotylédones telles que *Solanum nigrum* et *Linum usitatissimum* sont également capables d'inactiver cette molécule (HUTCHINSON et al., 1984).

La voie de métabolisation du chlorsulfuron n'est pas unique, puisqu'il semble exister de multiples possibilités enzymatiques d'inactivation (figure: 3). Dénaturations pouvant être réalisées grâce à l'adjonction (après hydroxylation) d'un radical glucose sur:

- le noyau en C₆ de cette molécule (voie A spécifique des Céréales) .

- la fonction alcool du deuxième cycle (voie B chez :

- *L. usitatissimum*
- *S. nigrum*)

donnant naissance à deux O-glucosides stables et qui, contrairement aux molécules de départ (même hydroxylées), n'ont plus aucune propriété herbicide.

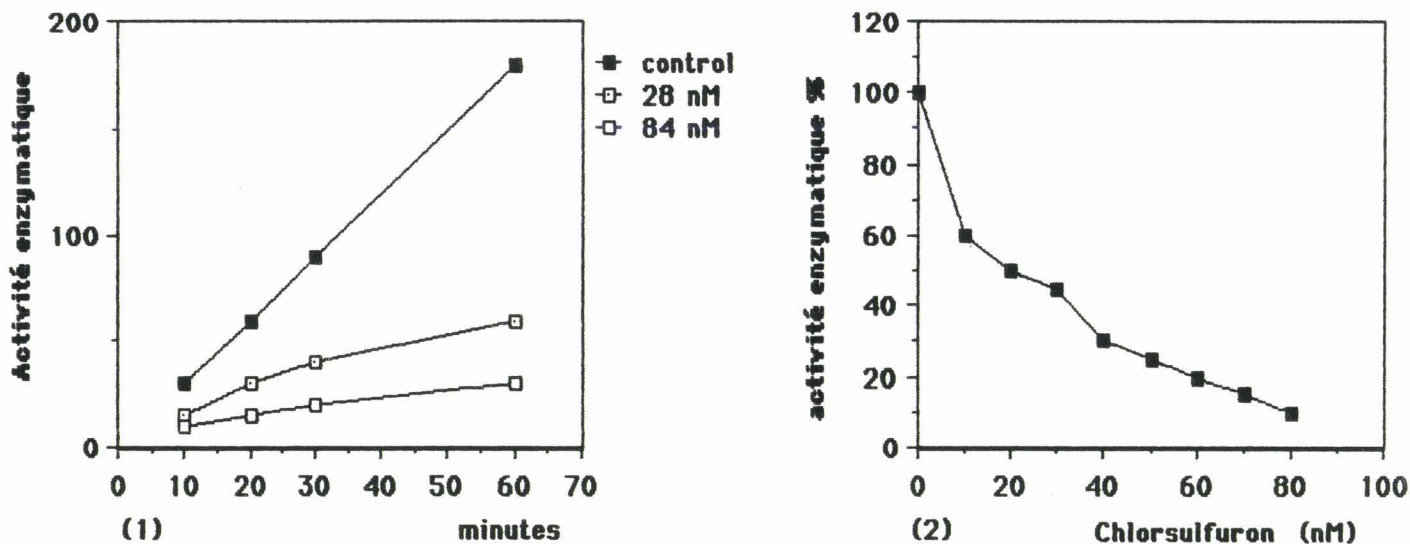


Figure 4: Activité *in-vitro* de l'AHAS (RAY, 1981)

(1) Formation d'acétolactate en fonction de la concentration en Chlorsulfuron dans le substrat d'incubation (0, 28, 84 nM).

(2) Evolution de l'activité de l'AHAS en fonction de la concentration en Chlorsulfuron dans le substrat d'incubation.

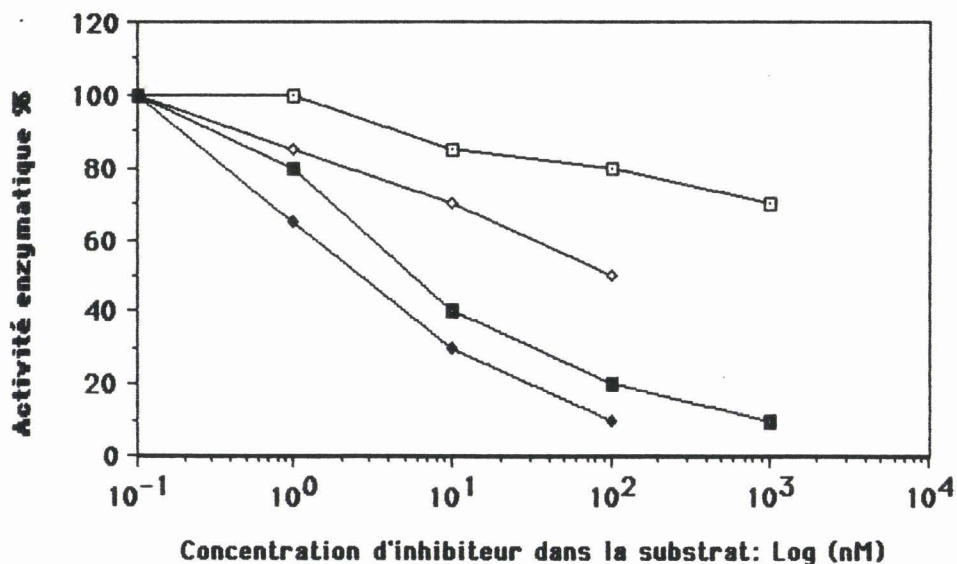


Figure 5: Effet du Chlorsulfuron et du Sulfometuron methyl sur l'activité de l'AHAS dans des extraits de plantes témoins et résistantes.

♦ ♦ Sulfometuron ♦ ■ Extraits de plantes témoins
 □ ■ Chlorsulfuron ♦ □ Extraits de plantes résistantes

(CHALEFF et MAUVAIS, 1984)

En tous cas, chez les plantes dont la résistance est due à une détoxification de l'herbicide, l'apparition de métabolites inactifs est rapide, ce qui évite tout contact entre la cible et l'inhibiteur.

1.3.4) CIBLE BIOCHIMIQUE ET REVERSION DES EFFETS

Les premiers travaux (KRITON et al., 1982) sur le mode d'action des Sulfonilurées, conduisirent à penser qu'elles agissent au niveau de la synthèse lipidique. Il fallut attendre l'ensemble des travaux de RAY en (1981, 1982, 1984 et 1986) pour que l'on remarque deux points essentiels:

— l'activité *in vitro* de l'AHAS chez *Pisum sativum* est inhibée par la présence de chlorsulfuron, et ce proportionnellement à la concentration de l'herbicide dans le mélange d'incubation (figure: 4).

- il est possible de réverser l'effet de l'herbicide *in-vitro* (28nM de chlorsulfuron dans le milieu de culture) par un ajout de L-valine et d'isoleucine. Les plantes, puisant alors dans le milieu les acides aminés qu'elles ne pouvaient plus synthétiser, se développent aussi bien qu'un témoin non traité (RAY, 1984).

C'est après avoir extrait l'AHAS de plants de Tabac homozygotes résistants aux Sulfonilurées, que l'on remarqua *in-vitro* que cet état est dû à la présence d'une enzyme devenue insensible aux Sulfonilurées (CHALEFF et MAUVAIS, 1984), l'AHAS (figure: 5) est bien la cible biochimique de ces molécules.

LA ROSSA et SCHLOSS en 1984 démontrent que la forme isoenzymatique I, contrairement aux formes II et III, chez un procaryote comme *Salmonella thyphimurium* est insensible aux Sulfonilurées. Ils mettent de même en évidence qu'il existe une liaison enzyme-inhibiteur qui se réalise lentement et empêche alors la reconnaissance du substrat par le complexe enzymatique, liaison qu'il est possible de réverser.

SCHELL et CASSIDA (1985) signalent également des difficultés liées à l'étude du mode d'action de ces herbicides. Par exemple chez *Glycine max* la valine suffit à la réversion, pour *Pisum sativum* valine et isoleucine sont nécessaires, par contre chez les micro-organismes tel *Escherichia coli* l'isoleucine seule convient.

La présence de plusieurs isozymes procaryotiques plurifonctionnels, explique surement les difficultés rencontrées lors de l'étude du mode d'action de cette famille d'herbicides sur l'AHAS. Il semble toutefois qu'il n'existe chez les végétaux supérieurs, qu'une seule forme enzymatique dont la régulation et le fonctionnement différeraient néanmoins selon les espèces étudiées.

1.4) LES PLANTES RESISTANTES AUX SULFONYLUREES

Avant de présenter ces différentes plantes, il convient d'essayer de définir, arbitrairement peut être, les termes de "résistant" ou "sensible" aux herbicides à la fois pour des tissus cultivés *in-vitro* mais aussi pour des plantes entières. Il est en effet difficile de jongler avec des mots auxquels un bon nombre d'auteurs donnent des définitions différentes.

- une cellule pourrait être considérée comme **sensible**, lorsque sa croissance serait totalement inhibée au contact d'une dose d'herbicide préalablement définie et considérée comme létale pour des cellules de type sauvage.
- une cellule serait **résistante** à cette même dose, lorsqu'elle ne présenterait pas de différence de croissance avec des cellules sensibles non traitées.

Ces notions définies *in-vitro* sont aussi exploitables pour des plantes aux champs, c'est pourquoi nous dirons qu'une plante est:

- **sensible**, lorsqu'elle ne se développe pas ou se nécrose (selon l'herbicide utilisé) en présence de la dose à laquelle l'herbicide est couramment employé.
- **résistante**, quand la plante se développe normalement en présence de cette dose.

Ces définitions s'emploieront indépendamment du fait que cette résistance soit ou non transmissible sexuellement, elles traduisent en effet un comportement dans une situation donnée. L'effet dépressif d'un traitement s'expliquant alors par le fait que nous ayons appliqué une dose d'herbicide supérieure à celle pour laquelle plantes et cellules seraient résistantes.

1.4.1) OBTENUES PAR TRANSFORMATION ET PAR SELECTION DE MUTANTS SOMACLONAUX

Nicotiana tabacum

En 1984 plusieurs mutants, présentant une résistance croisée aux sulfometuron méthyl et au chlorsulfuron, furent isolés après mutagenèse de cellules haploïdes de *Nicotiana tabacum* cultivées *in-vitro* (CHALEFF et RAY, 1984). La résistance transmissible en tant que mutation unique de type dominant ou semi-dominant, avait toutefois une particularité liée au fait que cette dernière pouvait apparaître sur deux gènes distincts non liés. En effet les mutations C3 et S4 se situaient sur deux gènes différents codant pour l'AHAS, qui provenaient chacun des lots chromosomiques des individus d'origine ayant été utilisés pour créer l'allotétraploïde qu'est *Nicotiana tabacum*. La mutation C3 se situant sur le gène de classe I au locus SuRA et la mutation S3 sur le gène de classe II au locus SuRB (LEE et al., 1988).

Ces deux mutations furent jugées intéressantes et plus particulièrement celle de type S4. Elle était associée à une résistance qui s'exprimait au niveau cellulaire et selon le type d'individu concerné, on pouvait observer:

[+ / +] 100% d'inhibition pour une concentration de 2.8 à 9 nM de chlorsulfuron

[S4 / +] 50% d'inhibition pour une concentration de 86 nM

[S4 / S4] aucune inhibition pour une concentration de 86 nM

Il fut ensuite démontré que cet homozygote résistant n'était totalement inhibé que pour une concentration en chlorsulfuron de 280 nM. Ces auteurs mirent en évidence que les plantes homozygotes ainsi sélectionnées étaient susceptibles de résister à des doses de chlorsulfuron 100 fois plus élevées que celles produisant les premiers symptômes de phytotoxicité chez des plantes sensibles.

Un deuxième processus de sélection fut réalisé en déposant des cultures cellulaires issues de mutants [S4/S4] sur un milieu contenant 560 nM de chlorsulfuron. Ce deuxième screening a permis d'isoler une autre mutation Hra liée au locus S4. L'obtention d'individus de types [S4Hra/S4] et [S4Hra/S4Hra] démontra que des cellules, homozygotes pour ce nouveau gène, supportaient des doses 500 fois supérieures à celles provoquant la mort de cellules type [S4/S4] (CREASON et CHALEFF, 1988).

Une approche moléculaire des mutations S4Hra et C3 (LEE et al., 1988), permet de déterminer la séquence des gènes mutés et l'origine des mutations. C'est ainsi que la mutation de type C3 est due à la simple substitution d'une proline par une glycine sur l'acide aminé N°196 de l'ALS sur le locus SuRA. Par contre la double mutation de type S4Hra résulte des substitutions: d'une proline par une alanine sur l'acide aminé N°196 et du tryptophane par la leucine sur l'acide aminé N° 573 sur l'autre locus SuRB.

L'isolement du gène muté S4Hra, puis son introduction dans un autre Tabac où cette résistance s'est parfaitement exprimée (LEE et al., 1988), permet d'envisager la transformation de végétaux supérieurs pour une résistance aux Sulfonylurées.

Brassica napus L. cv. Topas

Chez cette plante, des mutants résistants aux Sulfonylurées furent isolés grâce à une sélection réalisée après mutagenèse sur des cultures de microspores et de protoplastes haploïdes (SWANSON et al., 1988). Le doublement à la colchicine révéla que ces individus, quoique faiblement fertiles, transmettaient à leurs descendances, après autofécondation une résistance de type monogénique semi-dominant. Les plantes obtenues par ce biais supportent aux champs, de 10 à 100 fois la dose létale d'herbicide pour le cultivar sauvage (cv. Topas).

Datura innoxia

Un screening au chlorsulfuron, après mutagenèse de suspensions cellulaires haploïdes, a conduit à la sélection de cellules résistantes (SAXENA et KING, 1988). Ces dernières supportent de 100 à 1000 fois la dose létale du milieu de screening et possèdent, pour certaines d'entre elles, une résistance croisée Sulfonylurées/Imidazolinones. La cible de ces deux herbicides étant la même, il est concevable que si le site d'action est assez proche la probabilité d'observation de tels phénomènes n'est pas nulle.

Cependant, les lignées cellulaires ainsi sélectionnées, avaient perdu la propriété de se différencier. Il n'a donc pas été possible d'étudier le comportement de la descendance de telles plantes.

1.4.2) OBTENUES PAR SELECTION TRADITIONNELLE

Arabidopsis thaliana

Un screening effectué après mutagenèse de semences d'*Arabidopsis thaliana* a permis d'isoler des mutants à partir de semis réalisés *in-vitro* en présence d'herbicide (HAUGHN et SOMERVILLE, 1986). Les homozygotes issus des croisements appropriés supportent, tant aux champs qu'*in-vitro*, des concentrations 300 fois supérieures à celles jugées toxiques pour des plantes normales. Située sur un locus déterminé du chromosome 3 cette mutation transmissible, comme pour *Nicotiana tabacum*, est de type dominant.

Glycine max

Une approche identique à celle effectuée par HAUGHN et SOMERVILLE en 1986 fut tentée par SEBASTIAN et CHALEFF en 1987 sur du Soja. Elle n'a abouti qu'à la sélection de gènes récessifs ne présentant que peu d'intérêt agronomique.

1.5) CULTURES CELLULAIRES ET SELECTION DE MUTANTS SOMACLONAUX.

La transposition de techniques de microbiologie aux cultures de cellules végétales est réalisable, c'est pourquoi un grand nombre de mutants ont été sélectionnés ces dernières décennies (BOURGAIN, 1978). L'adaptation de ces méthodes aux conditions de culture de cellules diploïdes et organogènes de *Cichorium intybus* L. var. Witloof (DUBOIS et al., 1989), devrait permettre d'isoler des résistants aux Sulfonylurées.

N'oublions pas que contrairement aux travaux réalisés par d'autres équipes il n'existe pas, à notre connaissance, de cultures haploïdes chez *Cichorium intybus* L. var. Witloof. Dans ce cas, la sélection de cellules hétérozygotes où les gènes de résistances sont généralement semi-dominants, n'en sera que plus délicate.

MATERIEL ET METHODES

- MATERIEL VEGETAL
- UTILISATION DES HERBICIDES
- LA SELECTION *IN VITRO*
- PRODUCTION DE " *VITRO*-PLANTS"
- CROISEMENTS ET AUTOFECONDATIONS
- APPLICATION DE L'HERBICIDE SUR DU MATERIEL VEGETAL EN SERRE
- EVALUATION DE LA TOLERANCE A L'HERBICIDE
- ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

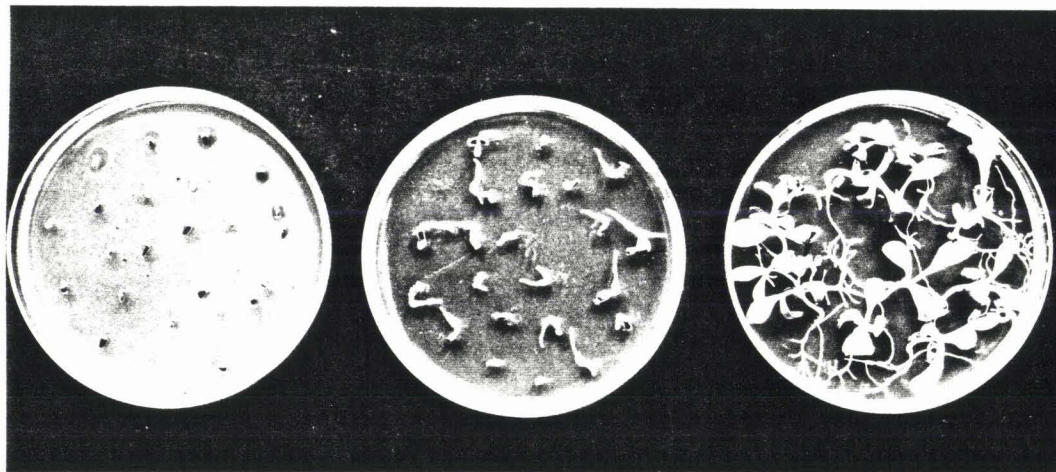


Figure 6: Semi en condition aseptique au moment de l'ensemencement et jeunes plantules obtenues après 2 et 6 jours de culture.

2) MATERIELS ET METHODES

2.1) LE MATERIEL VEGETAL

2.1.1) ORIGINE

Cette étude implique l'utilisation d'un matériel végétal pratique, peu volumineux, disponible à tout moment et physiologiquement stable. C'est pourquoi nous avons utilisé des jeunes plantules issues de germinations aseptiques d'akènes (figure: 6).

En fonction de nos besoins, les akènes seront prélevés dans un lot (population de Chicorées des Etablissements HOQUET) conservé à -20°C.

2.1.2) MISE EN PLACE DE SUSPENSIONS CELLULAIRES ORGANOGENES

2.1.2.1) Aseptisation des akènes

En conditions aseptiques les akènes subissent le traitement suivant:

- Désinfection pendant 20 minutes dans une solution de HgCl_2 (1 g l^{-1}) additionnée de 0.2% de tween 80 .
- Rinçages à trois reprises de 5, 10 et 15 minutes dans de l'eau distillée stérile; puis imbibition d'une heure environ dans un quatrième bain.

2.1.2.2) Mise en germination

Les akènes sont alors mis à germer à raison d'une vingtaine par boîte de Petri plastique stérile (Diamètre 90 mm) sur un milieu simple type germination (réf. § 3.1.3).

Après avoir été scellées avec du parafilm les boîtes sont placées en chambre de culture dans des conditions non spécifiques à la germination:

- 24°C jour et 20°C nuit
- 16 heures de lumière par jour (Lumière type Cool White DELUXE) 1.5 W.m^{-2}

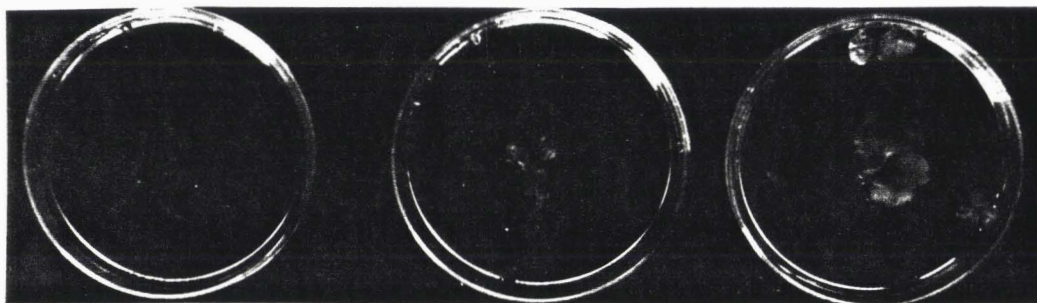


Figure 7: Prolifération cellulaire manifestée par des explants cotylédonnaires au 1^{er}, 15^{es} et 30^{es} jour de culture.

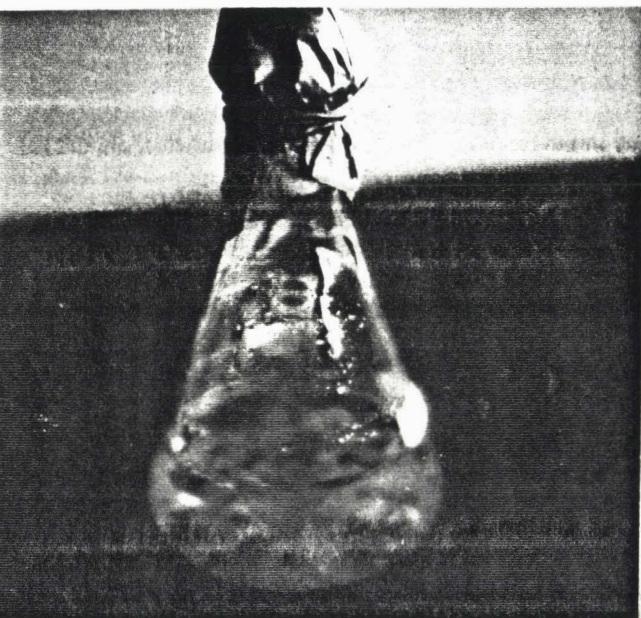


Figure 8: Explants au 30^{es} jour de culture, repiqués dans 50 ml de milieu.

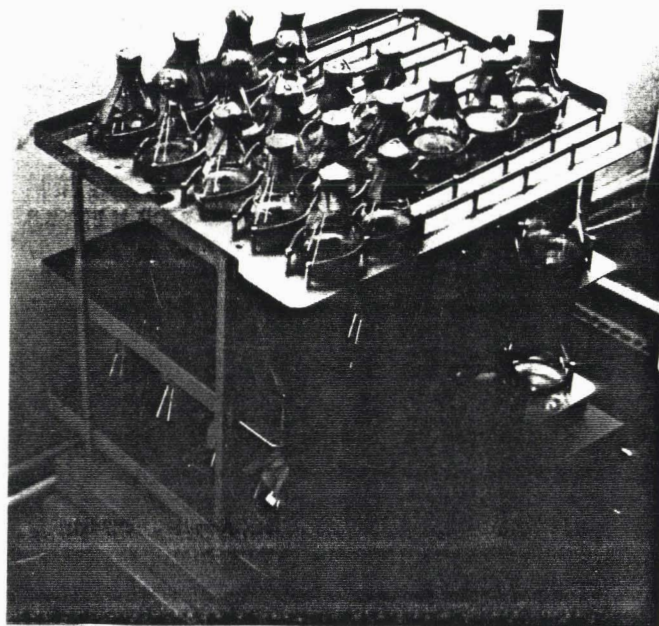


Figure 9: ensemble de cultures cellulaires placées sur un agitateur horizontal.



Figure 10: Réalisation d'une suspension cellulaire.

— A gauche, début d'isolement, la présence d'explants primaires est encore visible.

— A droite, culture stabilisée.

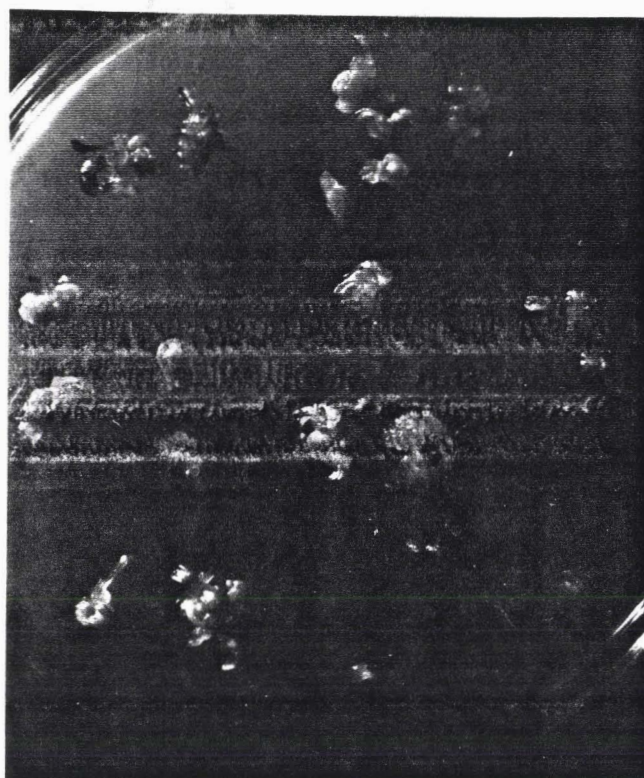


Figure 11: Vérification du pouvoir organogène de cellules provenant de suspensions cellulaires.

2.1.2.3) Création de suspensions cellulaires

Au 6^{ème} jour de culture sur milieu de germination (figure:6), les cotylédons sont prélevés et lacérés de façon à augmenter la surface des zones réactionnelles. Ils sont déposés ensuite dans 15 ml de milieu liquide statique à raison d'une dizaine par boîte de Petri (figure:7).

Après environ 30 jours de culture, une quinzaine d'explants callogènes sont placés dans un Erlenmeyer contenant 50 ml de milieu (figure:8) et sont soumis à agitation (figure:9).

Ces explants seront retirés au fur et à mesure des repiquages jusqu'à ce qu'il ne reste qu'une suspension hétérogène (cellules + minicals).

Ce n'est que lorsque les cultures sont stabilisées, avec un délai de 10 à 15 jours entre les repiquages (figure:10) et que l'on ait vérifié que ces suspensions conservent des potentialités organogènes (figure:11) que la sélection peut commencer.

2.2) UTILISATION DES HERBICIDES

Les deux molécules utilisées dans le cadre de cette étude sont:

- le 2-Chloro-N-[[[4 methoxy-6-methyl-1,3,5-Trazin-2-yl)amino]carbonyl]Benzenesulfonamide ou chlorsulfuron

- le Methyl-2((((4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl)amino)carbonyl)amino)sulfonyl)benzoate ou sulfometuron methyl.

Elles présentent toutes deux une pureté de 98% (société HEXALAB BP n°7 69 120 Saint Fons) .

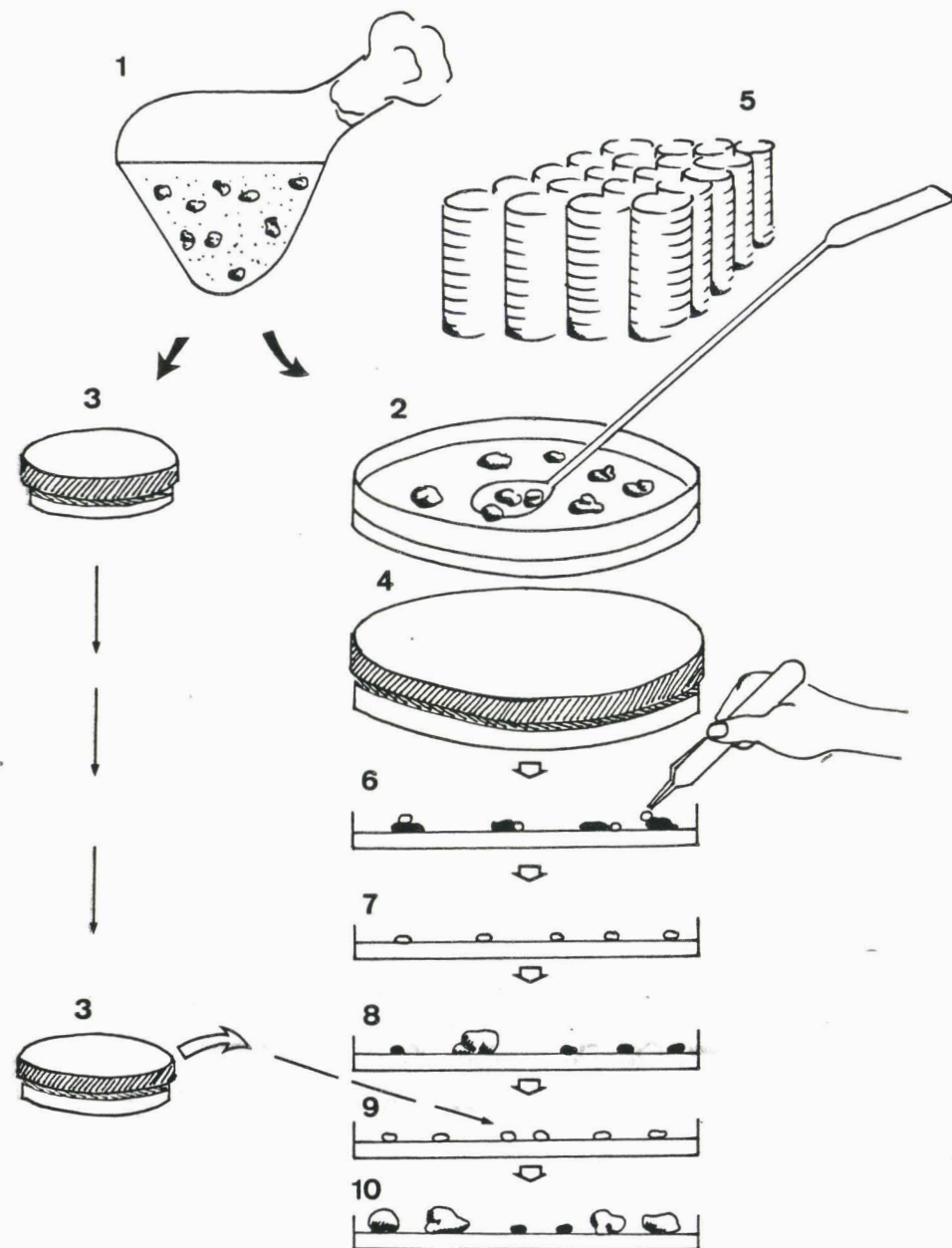


Figure 12: Présentation des principales étapes de la sélection.

- (1) suspension cellulaire
- (2) étalement sur milieux:
 - (3) sans herbicide
 - (4) de sélection
- (5) passage de 4 semaines en chambre de culture
- (6) récupération de masses cellulaires non nécrosées
- (7)-(8) répétitions des passages sur milieux de sélection jusqu'à l'isolement d'un cal résistant
- (9)-(10) ensemencement sur milieu de sélection du cal sélectionné en présence de cellules sensibles et vérification de la résistance

2.2.1) DISSOLUTION ET STOCKAGE DES HERBICIDES

Sous une hotte à flux laminaire, 1 à 2 mg d'herbicide placés dans une boîte de Pétri sont stérilisés en présence d'un coton imbibé d'éther pendant 10 à 15 minutes, puis sont dissout à l'aide de Dymethyl sulfoxide (DMSO) à raison de 1 mg ml^{-1} soit 2800 nM ml^{-1} . Cette solution stérile est alors injectée dans un flacon à pénicilline (5 cm^3) serti de telle sorte qu'il soit possible d'en prélever des parties aliquotes avec une seringue. On introduit alors ce flacon dans un tube bouché par un coton imbibé d'éther que l'on place à -20°C .

2.2.2) INCORPORATION AU MILIEU DE CULTURE.

Elle se réalise en prélevant 0.2 ml de la solution d'herbicide à 2800 nM ml^{-1} que l'on injecte dans un flacon à pénicilline (25 cm^3) contenant 19.8 ml d'eau distillée stérile. La solution titre alors 28 nM d'herbicide par ml, qu'il suffit d'introduire à la dose requise dans un milieu gélosé maintenu au bain-marie entre 40 et 45°C. Le milieu est ensuite réparti dans des boîtes de Petri à raison de 20 ml par boîte.

2.3) LA SELECTION IN-VITRO

Parallèlement à un entretien normal, des suspensions subissent le protocole de sélection suivant:

- Cals et cellules (figure:12) cultivés en milieu liquide agité (1) sont prélevés après 15 jours de culture et étalés sur un milieu gélosé contenant l'herbicide à la dose appropriée (2) ainsi que sur un milieu non sélectif (3).
- Les boîtes de Petri (4) sont alors placées dans une pièce de culture dans des conditions identiques à celles précisées pour la germination des akènes (5).
- Après 30 à 40 jours de culture les amas cellulaires non nécrosés en présence de l'herbicide (6) sont repiquées sur un milieu de sélection (7) de même composition. Cette opération est répétée jusqu'à ce qu'il soit possible de sélectionner des cellules capables de se multiplier normalement en présence d'herbicide (8).
- Ces cultures sont alors déposées sur un milieu sélectif avec des cellules témoins n'ayant jamais subi de pression de sélection, de façon à comparer le comportement de souches sensibles ou supportant l'herbicide (9,10).

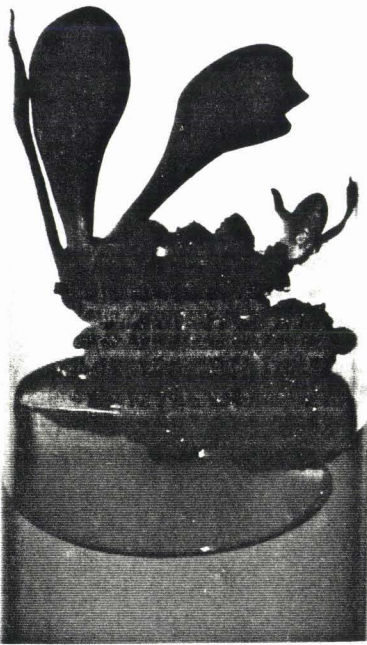


Figure 13: Néoformation de bourgeons.

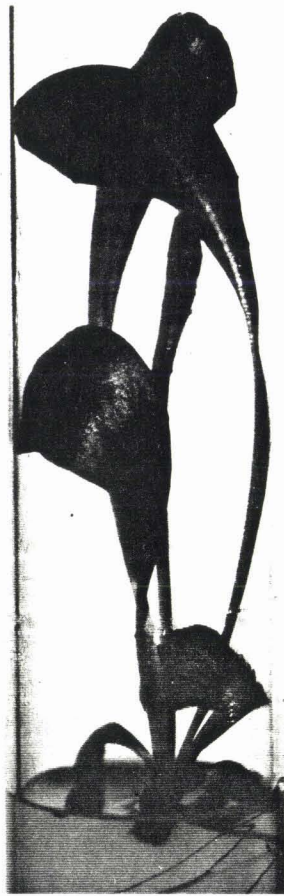


Figure 14: Bourgeon néoformé sur milieu d'enracinement.

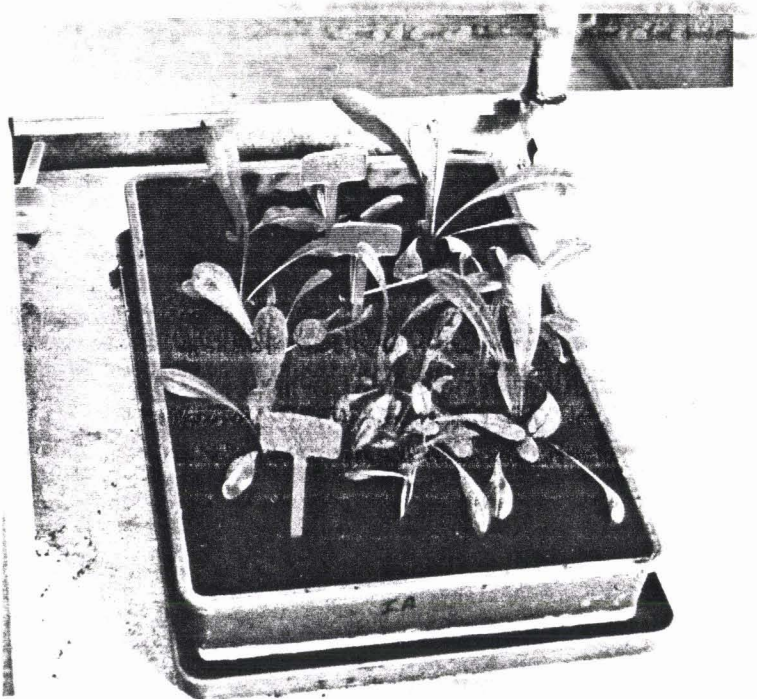


Figure 15: *Vitro-plants* en phase d'acclimatation dans une miniserre permettant de maintenir un taux d'humidité suffisant pour la reprise des boutures, dans un terreau non stérilisé.

2.4) PRODUCTION DE "VITRO-PLANTS"

2.4.1) NEOFORMATION DE BOURGEONS.

Dans la mesure où l'on a isolé des souches intéressantes, l'induction est réalisable indifféremment:

- en milieu liquide dans des Erlenmeyers (éclairage $1,5-3 \text{ W.m}^{-2}$ 16 heures de lumière par jour)
- sur milieu gélosé dans des boîtes de Petri ($0,75-1,5 \text{ W.m}^{-2}$) et tubes ($3-6 \text{ W.m}^{-2}$ 16 heures de lumière par jour)

Les cals sont maintenus sur les milieux d'induction de bourgeons (réf § 3.1.3) jusqu'à ce qu'ils forment des nodules méristématiques. Cals et nodules sont alors repiqués en tubes fermés par des bouchons de cellulose, sur un milieu de développement de bourgeons (réf § 3.1.3). Dans ces conditions, (éclairage $3-6 \text{ Watt/m}^2$ 16 heures de lumière par jour), le délai d'apparition des bourgeons varie entre 15 et 45 jours.

2.4.2) ENRACINEMENT DES BOURGEONS.

Les bourgeons néoformés sont prélevés puis déposés sur un milieu de développement (réf § 3.1.3); en prenant soin de diminuer la durée journalière d'éclairement de 16 à 12 heures par jour (figure:13), de façon à éviter toute floraison *in-vitro*.

L'enracinement s'opère dans une période comprise entre 15 et 60 jours de culture (figure:14), avec ou sans repiquages intermédiaires au cours desquels les tissus nécrosés de la base des bourgeons sont éliminés.

2.4.3) ACCLIMATATION DES "VITRO-PLANTS"

Les jeunes "vitro-plants" enracinés sont prélevés du milieu gélosé avec précaution, pour cela nous remplissons les tubes avec de l'eau; ce qui évite aux feuilles fragilisées par la culture *in-vitro*, de coller sur le verre et de se casser.

Les jeunes plantules sont lavées avant d'être repiquées en miniserre dans un terreau non stérile (figure:15); une solution de fongicide (Iprodione 0.5 g.l^{-1}) est pulvérisée sur leur feuillage à titre préventif.

Les plantules passeront progressivement, après 4 à 8 jours d'une atmosphère saturée en humidité, à des conditions d'humidité relative de plus en plus faibles jusqu'à leur complète acclimatation. Lorsqu'elles auront atteint un développement suffisant, les plantes pourront être clonées puis vernalisées.

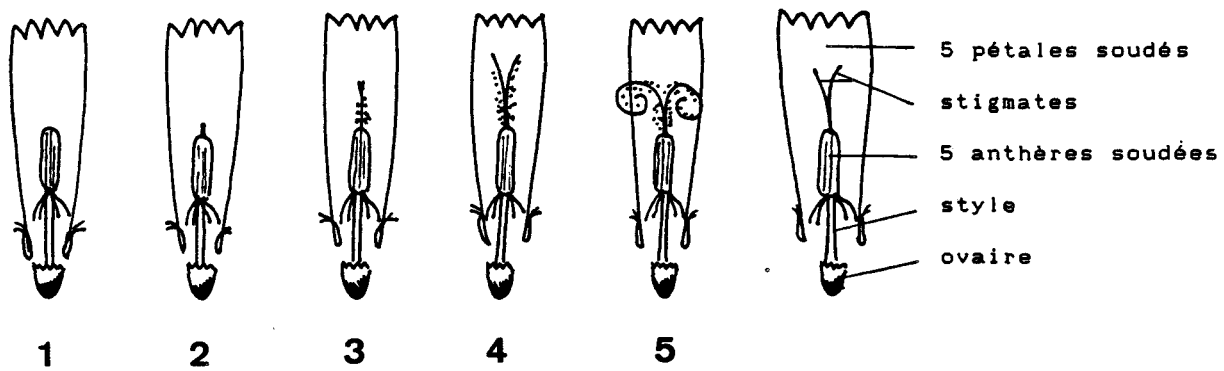


Figure 16: Déroulement de l'anthèse chez *Cichorium intybus* L.
 var. Witloof.

- (1) fleur non pollinisable
- (2) apparition des stigmates soudés
- (3) présence de grains de pollen arrachés par le style
- (4) stigmates écartés prêts à la réception du pollen
- (5) fleur en voie de dessèchement

2.5) CROISEMENTS ET AUTOFECONDATIONS

Selon BANNEROT et DE CONINCK (1984), COPPENS D'EECKENBRUGGE et al. (1987), l'allogamie chez *Cichorium intybus* peut être attribuée à la conjonction des facteurs suivants:

- La morphologie de la fleur et le déroulement de l'anthèse. Lorsque le style s'allonge (figure: 7) le pollen est extrait du cylindre staminal et les deux stigmates sont appliqués l'un contre l'autre de telle manière que les papilles réceptives soient inaccessibles au pollen. Seul un insecte peut alors mettre en contact auto-pollen et papilles.

- Le système de pseudo-auto-incompatibilité (peut être polyallélique) de la Chicorée pouvant, empêcher la germination, inhiber ou ralentir, la croissance du tube pollinique de l'autopollen mis en compétition avec un pollen étranger.

Ce qui permet d'hybrider des lignées suffisamment auto-stériles et inter-compatibles sans qu'il y ait besoin de castrer les fleurs.

Il est possible de définir cinq étapes distinctes (figure:16) ayant lieu, par temps ensoleillé, au cours de la matinée. Il convient de préciser que pour une plante et pour une même exposition, il semble exister une quasi-synchronisation de ces phases sur l'ensemble des capitules en floraison.

A l'abri de toute intervention d'insectes, il suffit pour effectuer une fécondation croisée de couper aux stades 3 et 4 (figure:16) une fleur de la plante pollinisatrice et d'appliquer ses organes reproducteurs sur ceux de la plante réceptrice considérée comme "femelle".

Les autofécondations quant à elles se réalisent en passant délicatement le doigt sur le capitule choisi en prenant soin de bien se nettoyer les mains à l'alcool entre chaque opération, de façon à détruire tout pollen résiduel.

2.6) APPLICATION DE L'HERBICIDE SUR DU MATERIEL VEGETAL EN SERRE

Nous avons utilisé des molécules pures et des produits commerciaux. Ces derniers testés plus tardivement nous furent offerts gracieusement par la société DU PONT DE NEMOURS et par M^r GASQUEZ (I.N.R.A. de DIJON).

2.6.1) DISSOLUTION DES PRODUITS

Molécules pures:

dissoutes dans du DMSO à 1 mg ml⁻¹, elles sont diluées aux concentrations voulues dans de l'eau distillée additionnée de 0.02% de TWEEN 80 et selon le type d'utilisation de 5% d'acétone (pulvérisations foliaires).

Produits commerciaux:

l'ALLIE (matière active: sulfometuron CH₃ 20%) ou le GLEAN (matière active: chlorsulfuron 20%) sont dilués directement aux concentrations requises dans de l'eau distillée.

2.6.2) TRAITEMENTS

Ils sont principalement effectués par pulvérisation foliaire en utilisant un matériel simple constitué d'un vaporisateur à bouche Lefranc et Bourgeois. La répartition du produit, bien que moins régulière que celle obtenue avec le montage d'une buse de traitement, s'est cependant révélée satisfaisante, à condition toutefois que les solutions soient pulvérisées à environ 20 cm des plantules et avec un volume minimum de 2.5 cm³ par barquette à traiter.

2.7) COMPARAISON DE L'ACTION DE L'HERBICIDE ENTRE SOUCHES CELLULAIRES DIFFERENTES

De manière à pouvoir chiffrer une différence de comportement entre deux souches cellulaires distinctes, nous déterminerons (par souche) la dose d'herbicide (DI 50), responsable d'une inhibition de croissance de 50 % .

Il suffira alors d'effectuer le rapport, entre la DI 50 d'une souche sélectionnée et celle d'une souche sensible, de façon à en utiliser le résultat "X" pour en conclure:

- qu'une souche sélectionnée supporte (avec une même inhibition de croissance, dans notre cas 50 %) "X" fois plus d'herbicide qu'une souche sensible.

2.8) ANALYSES STATISTIQUES DES RESULTATS

Afin de pouvoir comparer entre elles les valeurs moyennes observées pour ni répétitions, toutes les expérimentations seront soumises à une analyse de variance (*test F*). Nous affecterons à la valeur du F calculé un renseignement relatif à la probabilité 'P' pour que ces différences entre moyennes soient dues au hasard.

NS	Non significatif (F calculé < F table)
F*	significatif $0.010 < P < 0.050$
F**	significatif $0.001 < P < 0.010$
F***	significatif $P < 0.001$

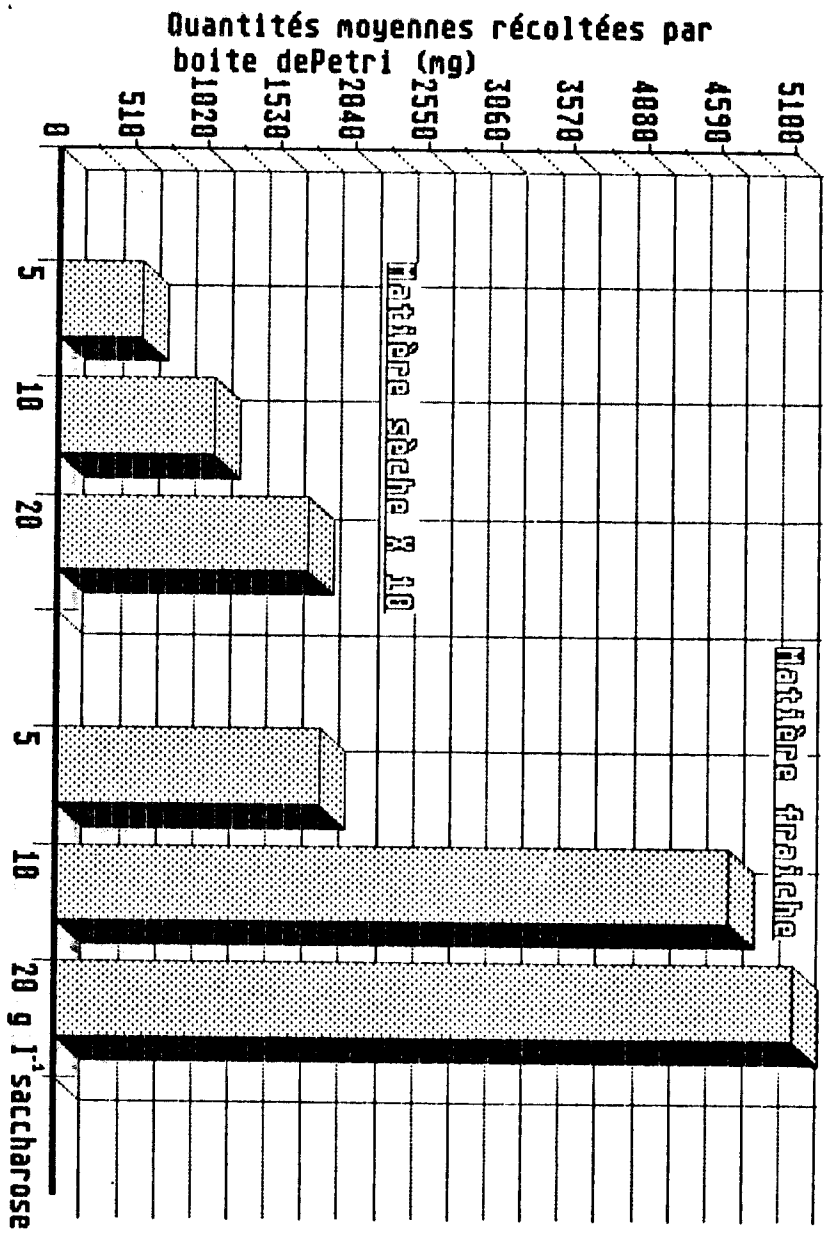
Si l'analyse de la variance montre que les différences constatées sont significatives (F observé > F table), nous appliquerons, pour comparer entre elles les moyennes, le test de la plus petite différence significative ou *L.S.D. test* (KÖHLER et al., 1984). Les moyennes seront alors affectées en exposant d'une ou plusieurs lettres (a, b, c ,...) qui seront:

- les mêmes lorsque cette différence ne sera significative qu'avec une probabilité inférieure à 0.950
- différentes dans le cas où la valeur de cette probabilité serait supérieure à 0.950 .

Ce qui devrait permettre aux lecteurs de vérifier directement dans les tableaux et figures si les résultats chiffrés diffèrent significativement les uns par rapport aux autres.

RESULTATS

- ETUDE DE LA COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE
- HERBICIDE ET CROISSANCE CELLULAIRE
- ISOLEMENT DE SOUCHES CELLULAIRES TOLERANTES
- VERIFICATION AUX CHAMPS DE LA TRANSMISSION DE LA TOLERANCE PAR VOIE SEXUEE



mg de matière sèche Moyennes écart-types n1	saccharose g l ⁻¹		
	5	10	20
	57.00 ^a 9.62 ₈	107.25 ^b 13.46 ₈	173.00 ^c 36.25 ₈
F	45.83***		
mg de matière fraîche Moyennes écart-types n1			
	F		
	1827.50 ^a 511.17 ₈	4666.00 ^b 831.50 ₈	5118.00 ^c 1161.60 ₈
F	9.98**		

Figure 17: Influence de la concentration en saccharose sur la production de matière fraîche et sèche après un mois de culture d'explants cotylédonaux de *Cichorium intybus* L. var. Witloof.

3) RESULTATS

3.1) ETUDE DE LA COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

Les objectifs poursuivis étaient:

- Augmenter la production de cals à partir d'explants primaires (ici des cotylédons) de façon à pouvoir disposer d'une grande quantité de matériel pour initier des suspensions cellulaires.

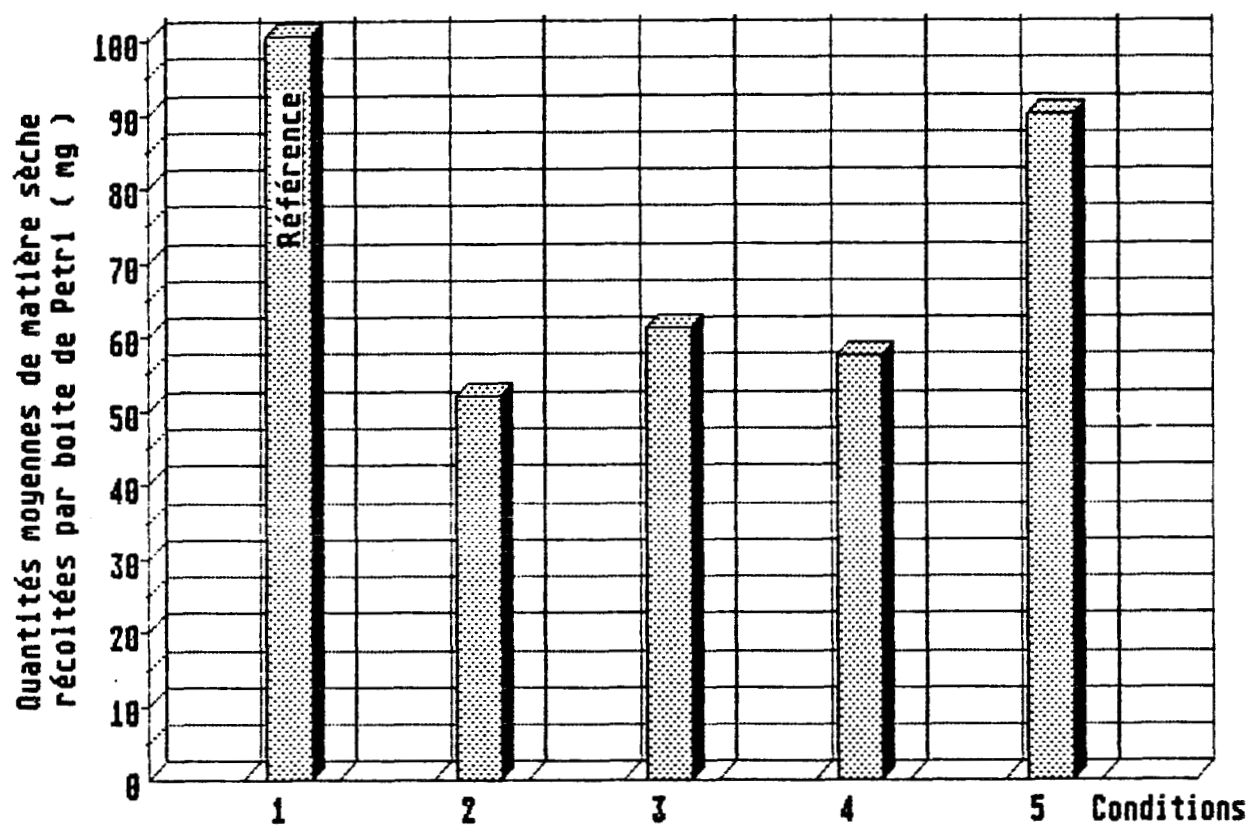
- entretenir des suspensions organogènes stabilisées permettant une production abondante de cals et de cellules libres à partir desquels il serait possible de mettre en place un programme de sélection.

3.1.1) OPTIMISATION DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE D'EXPLANTS COTYLEDONNAIRES

De façon à augmenter la production de cals friables sur des explants cotylédonnaires, une série d'essais visant à tester l'importance du saccharose furent mis en place.

Le milieu de base utilisé est celui de MURASHIGE et SKOOG, (1962). Les micro et macro éléments sont à concentration normale à l'exception du F. EDTA qui est réduit de moitié. On ajoute à ce milieu des vitamines (définies dans le § 3.1.3), 100 mg l⁻¹ d'inositol, de l'acide naphthalène-acétique (ANA) et de la benzyl amino purine (BAP) aux concentrations respectives de 5 10⁻⁶ M et 2.5 10⁻⁷ M. Milieu que nous compléterons avec 5, 10 ou 20 g l⁻¹ de saccharose.

Les masses de matières fraîche et sèche récoltées par boîte de Petri après un mois de culture, augmentent en fonction de la concentration en saccharose du milieu (figure:17). Toutefois l'apparition de colorations brunes sur certaines proliférations pour une concentration de saccharose de 20 g l⁻¹, nous a conduit à retenir pour les expériences suivantes la dose de 10 g l⁻¹.



	1	2	3	4	5
mg Matière fraîche	2097.40	1180.20	1075.60	1258.10	1993.26
Moyennes	685.00	543.90	594.90	559.00	788.06
écart-types	5	5	5	5	5
ni					
F	2.86 NS				
mg Matière sèche	100.42 ^d	60.90 ^{abc}	51.80 ^a	57.30 ^{ab}	89.70 ^{bc}
Moyennes	28.90	23.90	20.45	21.32	29.30
écart-types	5	5	5	5	5
ni					
F	3.88*				

Figure 18: Influence de la composition azotée de quelques milieux de culture sur la prolifération cellulaire de cals issus d'explants cotylédonnaires chez: *Cichorium intybus* L. Var. Witloof après un mois de culture.

- (1) Macro éléments de M.S. (1962) x 1/2 (sans azote minéral) + 750 mg l⁻¹ de glutamine.
- (2) Macro éléments de M.S. x 1
- (3) Macro éléments de M.S. x 1/2
- (4) Macro éléments de M.S. x 1/2 + NH₄NO₃ 1650 mg + KCl 1500 mg l⁻¹
- (5) Macro éléments de M.S. x 1/2 + KNO₃ 1900 mg + KCl 750 mg l⁻¹

3.1.2) OPTIMISATION DE LA PROLIFERATION DES MASSIFS CELLULAIRES.

L'obtention d'une croissance cellulaire maximale à partir de cals friables (excisés des explants cotylédonnaires), tant en milieu liquide que solide, semblait liée à la présence d'un apport d'azote organique (glutamine). Il a donc fallu envisager d'étudier les effets sur la croissance de la forme d'azote mise à la disposition des cultures.

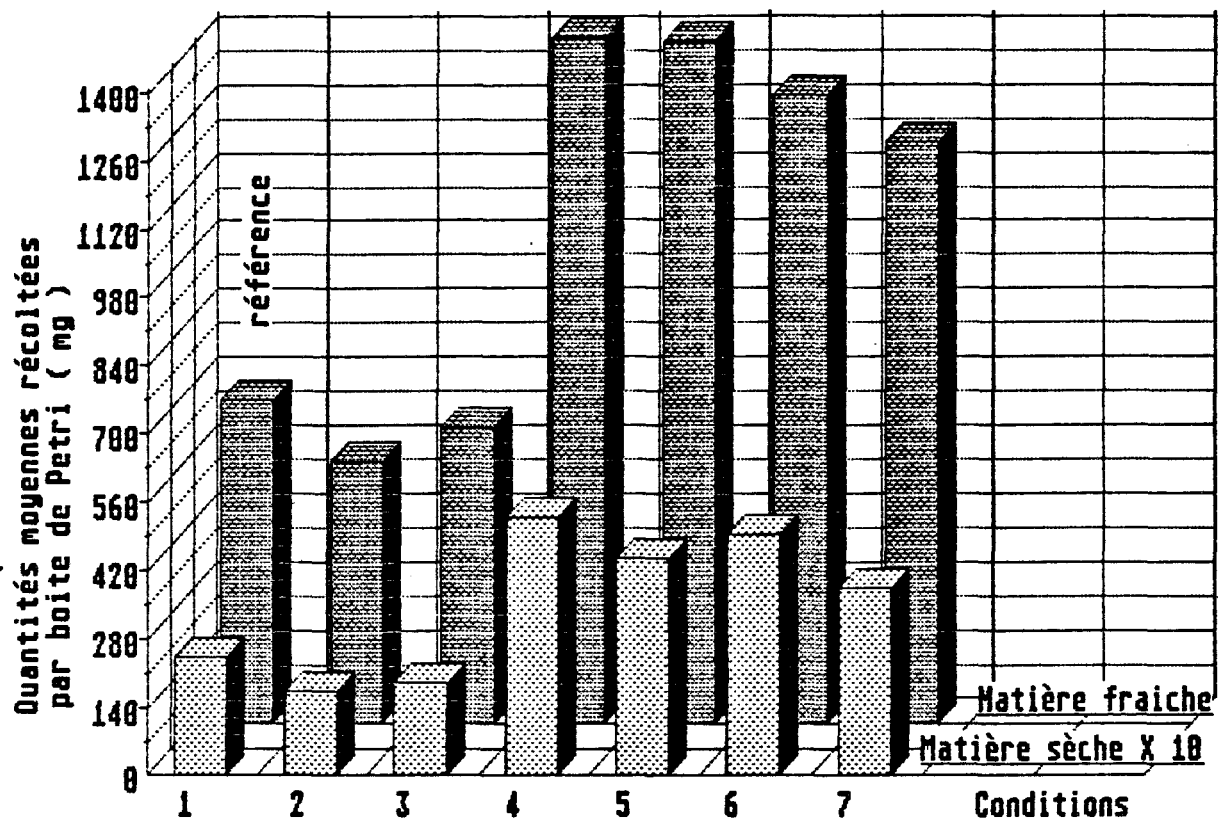
Il convenait alors de vérifier si la glutamine, le KNO_3 ou le NH_4NO_3 influait ou non sur la prolifération des cellules. Pour cela des massifs cellulaires, cultivés en milieu liquide agité et provenant d'une même fiole de culture, furent déposés à raison de 6 cals par boîte de petri sur des milieux différents.

Le milieu (1) (figure:18) dans lequel l'apport d'azote se fait sous forme de glutamine à raison de 750 mg l^{-1} est couramment utilisé au sein du laboratoire, il servira de référence. L'ensemble de ces milieux contient: des vitamines (définies § 3.1.3), les macro et micro éléments de MURASHIGE et SKOOG (1962) à concentration normale à l'exception du F.EDTA qui est réduit de moitié, 100 mg l^{-1} d'inositol, 5 g d'Agar BLOKAR, 10 g l^{-1} de saccharose de l'ANA et de la BAP à $5 \cdot 10^{-6} \text{ M l}^{-1}$.

Les variations présentées (figure:18) furent choisies arbitrairement et ne constituent qu'une première approche visant à déterminer les grandes lignes qu'il nous fallait suivre. Nous avons pesé, après un mois de culture les masses de matières fraîche et sèche récoltées par condition expérimentale. Les résultats observés (figure:18) soulignent à la fois l'importance de la glutamine (1) et du nitrate de potassium (5), conditions pour lesquelles la prolifération cellulaire est la plus importante.

De façon à vérifier ces résultats, nous avons mis en place une seconde expérimentation ayant pour objectif supplémentaire de déterminer si la nécessité d'introduire de la glutamine dans le milieu de culture pouvait être due à une carence phosphorique (BISTER-MIEL et al., 1984). Afin de limiter l'influence possible des réserves intra cellulaires, nous avons cultivé les cellules, au préalable et pendant 4 jours, en milieu liquide agité sans azote.

Le milieu de base utilisé pour cette étude comporte: les macro éléments du milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) dilués au demi (exempt d'azote) et ses micro éléments normalement concentrés, 100 mg l^{-1} d'inositol, des vitamines (définies § 3.1.3), 5 g l^{-1} de saccharose, 5 g l^{-1} d'agar BLOKAR, de l'ANA et de la BAP à $5 \cdot 10^{-6} \text{ M l}^{-1}$.



	1	2	3	4	5	6	7
Matière fraîche mg	663.10 ^a	533.64 ^a	604.90 ^a	1406.00 ^b	1394.40 ^b	1286.40 ^b	1190.20 ^b
Moyennes	663.10	533.64	604.90	1406.00	1394.40	1286.40	1190.20
écart-types	124.40	135.70	211.40	504.60	300.37	351.40	401.71
ni	5	5	5	5	5	5	5
F	7.61**						
Matière sèche mg	23.80 ^a	16.74 ^a	18.80 ^a	52.50 ^c	44.20 ^b	49.20 ^{bc}	38.18 ^b
Moyennes	23.80	16.74	18.80	52.50	44.20	49.20	38.18
écart-types	2.61	4.67	6.11	13.10	1.99	7.45	12.10
ni	5	5	5	5	5	5	5
F	16.72***						

Figure 19: Influence de la glutamine et du KNO_3 sur la prolifération cellulaire de cals issus d'explants cotylédonnaires chez: *Cichorium intybus* L. Var. Witloof après un mois de culture.

- (1) Glutamine 750 mg l^{-1}
- (2) NH_4NO_3 1197 mg l^{-1}
- (3) KNO_3 $950 \text{ mg} + \text{NH}_4\text{NO}_3$ $825 \text{ mg} + \text{KH}_2\text{PO}_4$ 136 mg l^{-1}
- (4) KNO_3 3040 mg l^{-1}
- (5) KNO_3 $3040 \text{ mg} + 150 \text{ mg glutamine l}^{-1}$
- (6) KNO_3 $3040 \text{ mg} + \text{KH}_2\text{PO}_4$ 136 mg l^{-1}
- (7) KNO_3 $3040 \text{ mg} + 150 \text{ mg glutamine} + \text{KH}_2\text{PO}_4$ 136 mg l^{-1}

Les milieux de culture choisis (figure 19) sont tels que l'azote varie de 143 mg.l^{-1} pour la condition (1) (milieu de référence) à 418 mg.l^{-1} dans le cas où le milieu ne comporte que de l'azote minéral et 446.8 mg.l^{-1} lorsque l'on ajoute en plus 150 mg.l^{-1} de glutamine.

Les résultats observés (figure:19) nous indiquent de suite qu'il existe un effet bénéfique du nitrate de potassium sur la prolifération cellulaire (conditions: 4,5,6,7). L'ajout de phosphate ne souligne aucune carence, puisque l'on n'observe pas de différence significative entre les conditions (4-5) et (6-7), le besoin en glutamine ne peut donc s'expliquer de cette manière. Une meilleure reprise des cals ayant été observée avec 3040 mg de KNO_3 et 150 mg de glutamine par litre de milieu (condition 5), il fut décidé d'utiliser ces concentrations pour l'élaboration des milieux d'entretien et de sélection.

3.1.3) RECAPITULATIF DES MILIEUX DE CULTURE.

Induction de cals sur cotylédons en milieu liquide

La solution minérale comporte les macro et micro éléments préconisés par MURASHIGE et SKOOG (MS,1962) sans NH_4NO_3 et dont le KNO_3 est porté à 3040 mg.l^{-1} et le Fe EDTA réduit de moitié. A cela s'ajoute un complexe vitaminique invariable (B_1, B_6 , panthoténate de calcium et acide nicotinique chacun à 1 mg.l^{-1}), de l'inositol à 100 mg.l^{-1} , du saccharose à 10 g.l^{-1} , de l'ANA $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ et de la BAP à $2.5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$. PH 5,5.

Installation et entretien de suspensions en milieu liquide agité

Milieu identique au précédent auquel nous ajoutons seulement 150 mg.l^{-1} de glutamine. PH 5,5

Milieu de sélection

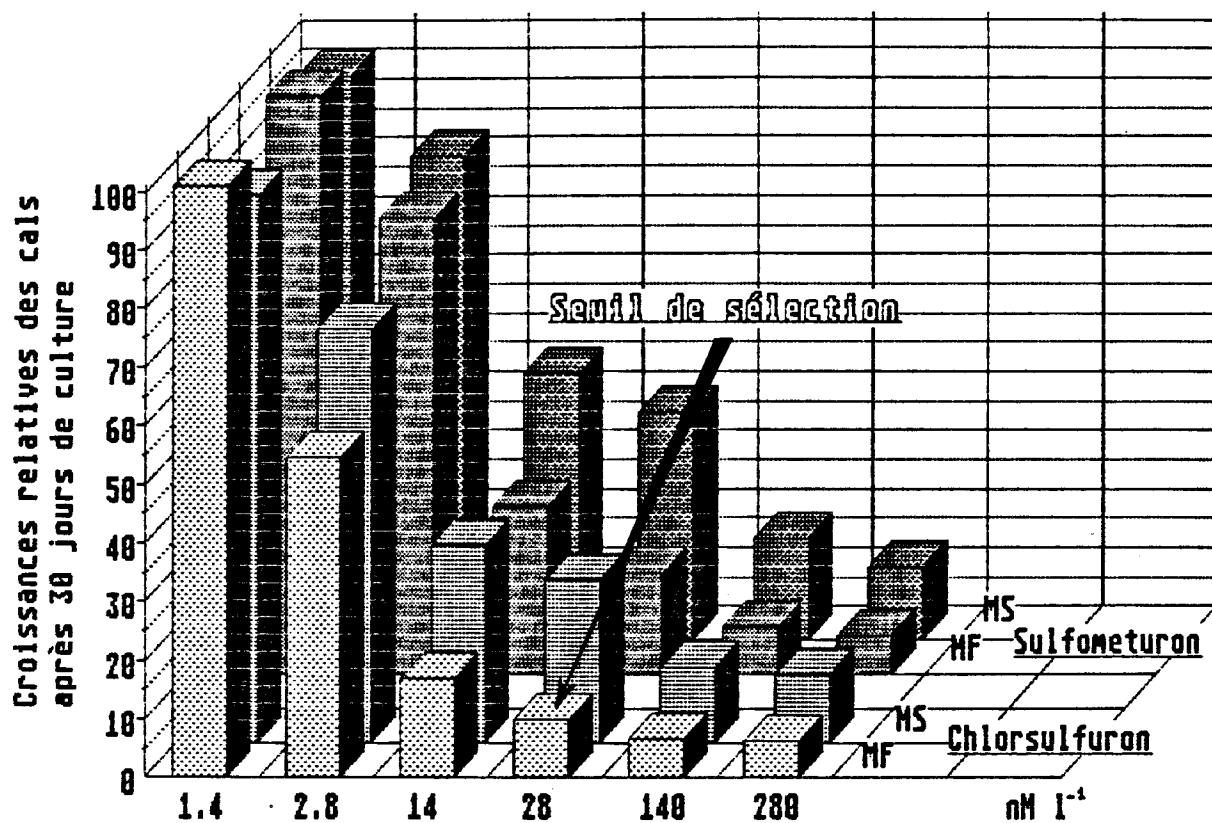
Il se compose: des macro éléments (MS,1962) dilués au demi sans NH_4NO_3 , 3040 mg.l^{-1} de KNO_3 et les micro éléments à concentration normale. Le tout est complété avec du saccharose 5 g.l^{-1} , des vitamines, de l'inositol à 100 mg.l^{-1} , de la glutamine à 150 mg.l^{-1} , de l'agar BLOKAR type E à 5 g.l^{-1} et de l'ANA et de la BAP aux concentrations respectives de $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. PH 5,5

Induction de bourgeons

Milieu identique au précédent sans glutamine ni ANA et dont la BAP est à la concentration de $2.5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. Il contiendra ou pas 5 g.l^{-1} d'agar BLOKAR type E selon que la différenciation de bourgeons s'effectue en milieu solide ou liquide. PH 5,5

Milieu de développement de bourgeons, d'enracinement et de germination d'akènes

Il se compose des macro et micro éléments de la solution de HELLER (1953) et du Fe EDTA d'un milieu de (MS,1962) dilué au demi, d'agar BLOKAR type E 5 g.l^{-1} , de saccharose 10 g.l^{-1} , de vitamines et d'inositol à 100 mg.l^{-1} . PH 5.5



CROISSANCES RELATIVES		Chlorsulfuron (nM)					
		1.4	2.8	14	28	140	280
Matière Fraîche	Moyennes	100.80 ^d	54.14 ^c	16.72 ^b	9.86 ^{ab}	6.52 ^a	5.90 ^a
	écart-types	42.70	28.90	5.65	5.72	5.43	7.80
	ni	5	15	15	25	25	25
F		57.86***					
Matière Sèche	Moyennes	93.36 ^d	70.47 ^c	33.55 ^b	27.50 ^b	12.78 ^a	11.57 ^a
	écart-types	33.15	25.70	8.69	15.63	10.56	16.40
	ni	5	15	15	25	25	25
F		44.26***					
		Sulfometuron (nM)					
		1.4	2.8	14	28	140	280
Matière Fraîche	Moyennes	98.59 ^d	77.59 ^c	28.46 ^b	16.96 ^b	7.67 ^a	6.39 ^a
	écart-types	38.78	40.10	16.23	8.29	6.39	5.70
	ni	5	15	15	25	25	25
F		52.11***					
Matière Sèche	Moyennes	95.83 ^c	82.50 ^c	44.99 ^b	38.36 ^b	16.86 ^a	12.37 ^a
	écart-types	33.13	29.07	18.62	15.91	8.75	11.02
	ni	5	14	15	25	25	25
F		53.91***					

Figure 20: Evolution des croissances relatives (Matière fraîche et sèche) de cals placés en présence de concentrations croissantes d'herbicide (Chlorsulfuron et Sulfometuron) chez: *Cichorium intybus* L. Var. Witloof après un mois de culture.

3.2) HERBICIDES ET CROISSANCE CELLULAIRE

Les milieux de culture étant définis, deux questions restaient en suspens:

- quelle molécule choisir (chlorsulfuron ou Sulfométuron) et quelle concentration retenir pour la sélection ?
- chez *Cichorium intybus* L. var. Witloof, les Sulfonylurées agissent-elles sur la synthèse des acides aminés à chaîne ramifiée ? Si tel est le cas, nous devons pouvoir réverser l'effet d'inhibition du milieu de screening en y ajoutant de la valine, de la leucine et de l'isoleucine.

3.2.1) RECHERCHE DES DOSES UTILISABLES POUR LA SÉLECTION

Il nous fallait définir une dose d'herbicide à employer dans notre milieu de sélection, qui empêcherait la croissance de cellules sensibles et autoriserait le développement d'ensembles cellulaires résistants. Il était bien entendu qu'au cours de passages successifs sur un tel milieu, toute cellule sensible s'éliminerait automatiquement.

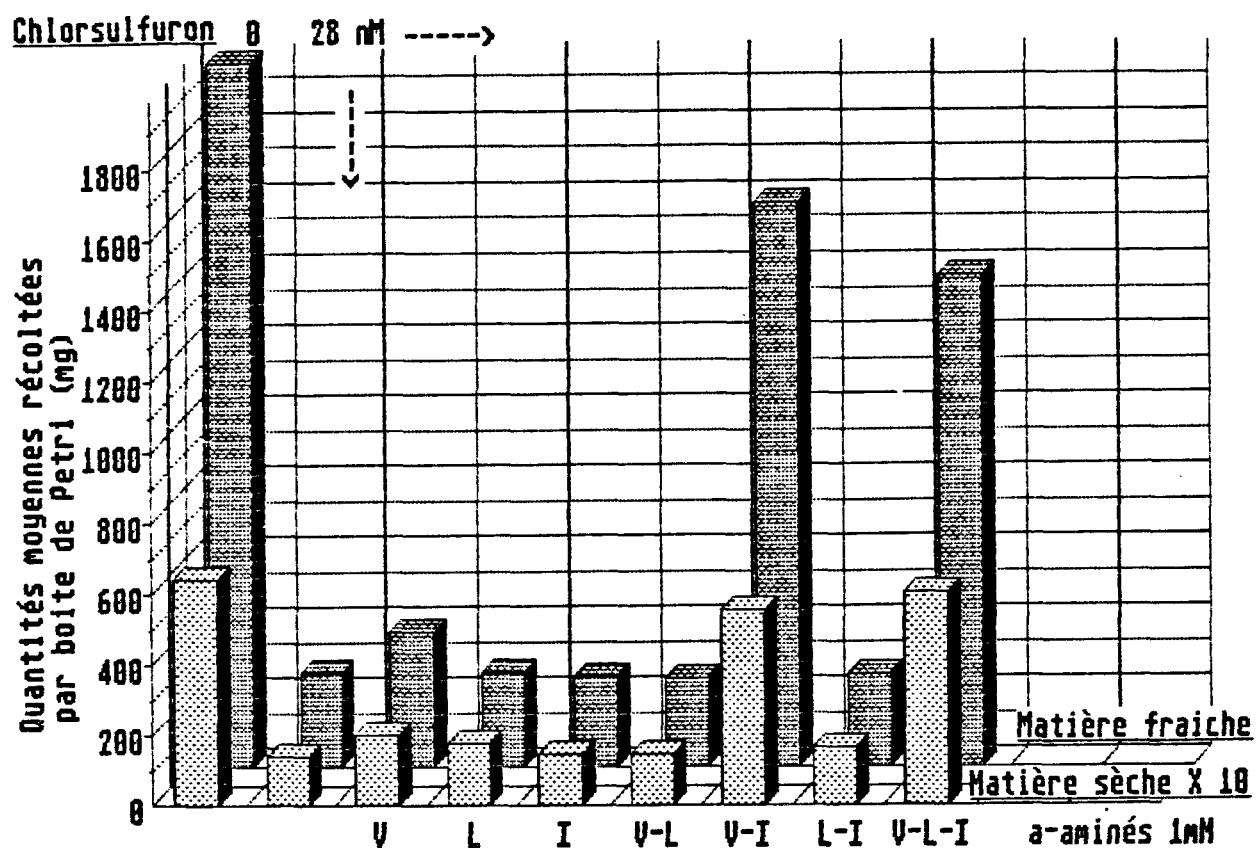
A cet effet des cals, issus d'un ensemble de suspensions hétérogènes (cals + cellules), sont déposés sur des milieux contenant des doses croissantes de Sulfonylurées. Nous déterminons avant ensemencement et après un mois de culture les masses de matière fraîche et sèche, de façon à définir la croissance relative des cultures s'exprimant comme suit:

$$\% \text{ croissance} = \frac{\begin{array}{c} \text{(masse obtenue - masse ensemencée)} \\ \text{pour une dose d'herbicide} \end{array}}{\begin{array}{c} \text{(masse obtenue - masse ensemencée)} \\ \text{sans herbicide} \end{array}} \times 100$$

A la lecture des résultats obtenus (figure:20) deux constatations s'imposent:

- Le chlorsulfuron dans nos conditions expérimentales semble plus actif que le Sulfométuron
- Au delà d'une concentration de 28 nM les cals et les cellules se nécrosent totalement.

C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser dans notre protocole de sélection le chlorsulfuron à la dose de 28 nM.



Conditions	Matière Fraîche (mg)			Matière Sèche (mg)		
	Moyennes	Ecart-types	ni	Moyennes	Ecart-types	ni
CS 0 nM	1989.58 ^c	116.03	9	63.77 ^c	5.16	9
CS 28 nM	260.77 ^a	68.67	9	13.37 ^a	4.24	9
V	377.61 ^a	118.70	10	19.78 ^a	10.64	10
L	260.37 ^a	55.34	10	17.14 ^a	8.77	10
I	253.01 ^a	64.29	10	14.14 ^a	8.20	10
V-L	246.64 ^a	53.54	10	14.33 ^a	7.42	10
V-I	1587.94 ^b	467.80	10	55.02 ^b	12.49	10
L-I	255.00 ^a	92.16	10	15.97 ^a	9.12	10
V-L-I	1379.71 ^b	239.47	10	59.85 ^{bc}	6.45	10
F	85.01***			78.63***		

Figure 21: Réversion de l'effet de 28 nM de Chlorsulfuron dans un milieu de sélection par ajout de valine (V), de leucine (L) et d'isoleucine (I) seuls ou associés aux concentrations respectives de 1 mM. La croissance des amas cellulaires est évaluée après un mois de culture.

3.2.2) REVERSION DE L'EFFET DU CHLORSULFURON

Chez un grand nombre de dicotylédones étudiées *in-vitro* les Sulfonylurées inhibent l'AHAS (enzyme nécessaire à la synthèse de la valine de la leucine et de l'isoleucine).

C'est pourquoi il convenait de vérifier que l'ajout de ces trois acides aminés, dans le milieu de sélection, avait pour effet de réverser l'action de l'inhibiteur. Dans le cas contraire il fallait imaginer la présence éventuelle d'une seconde cible, ce qui nous aurait obligé à reconsidérer le choix de l'herbicide.

Dans des milieux contenant 28nM de chlorsulfuron nous avons ajouté les trois acides aminés concernés (valine, leucine et isoleucine) seuls ou en associations aux concentrations respectives de 1mM.

Après un mois de culture, nous démontrons (figure:21) que l'apport des acides aminés peut réverser l'action de l'herbicide. Il existe donc bien une cible unique chez: *Cichorium intybus* L. Var. Witloof pour le chlorsulfuron, puisqu'il suffit pour obtenir la réversion d'ajouter dans le milieu de la valine et de l'isoleucine. .

Ces deux question résolues le screening de cellules pouvait commencer.

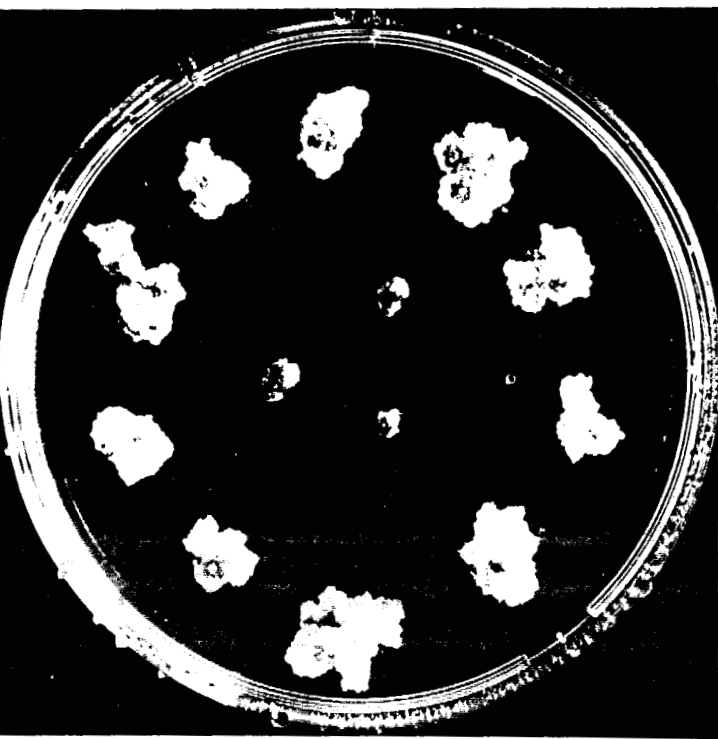


Figure 22: Evolution de cellules sensibles (au centre) et résistantes (en périphérie) après 1 mois de culture en présence de 28 nM de Chlorsulfuron.

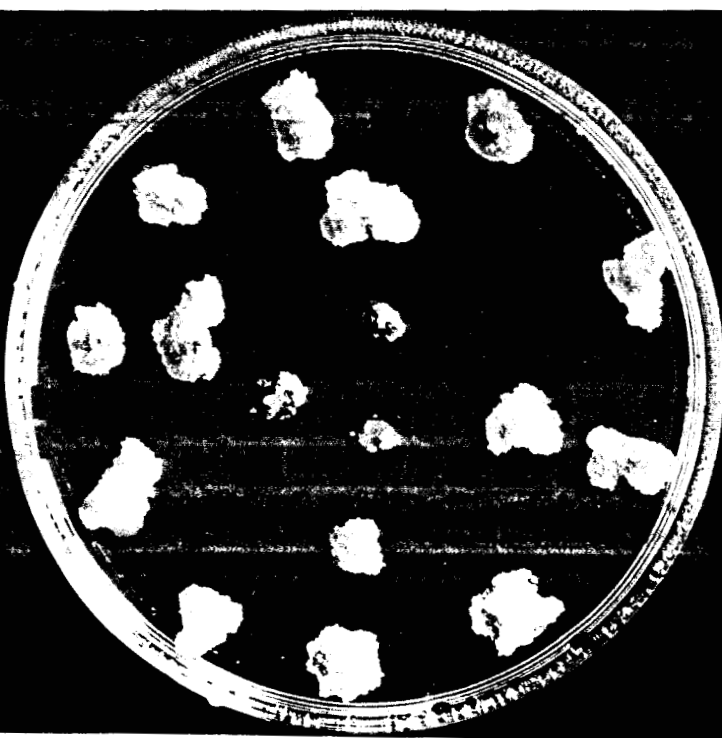


Figure 23: Evolution de cellules sensibles (au centre) et résistantes (en périphérie) après 1 mois de culture en présence de Chlorsulfuron et de Sulfometuron aux concentrations respectives de 28 nM

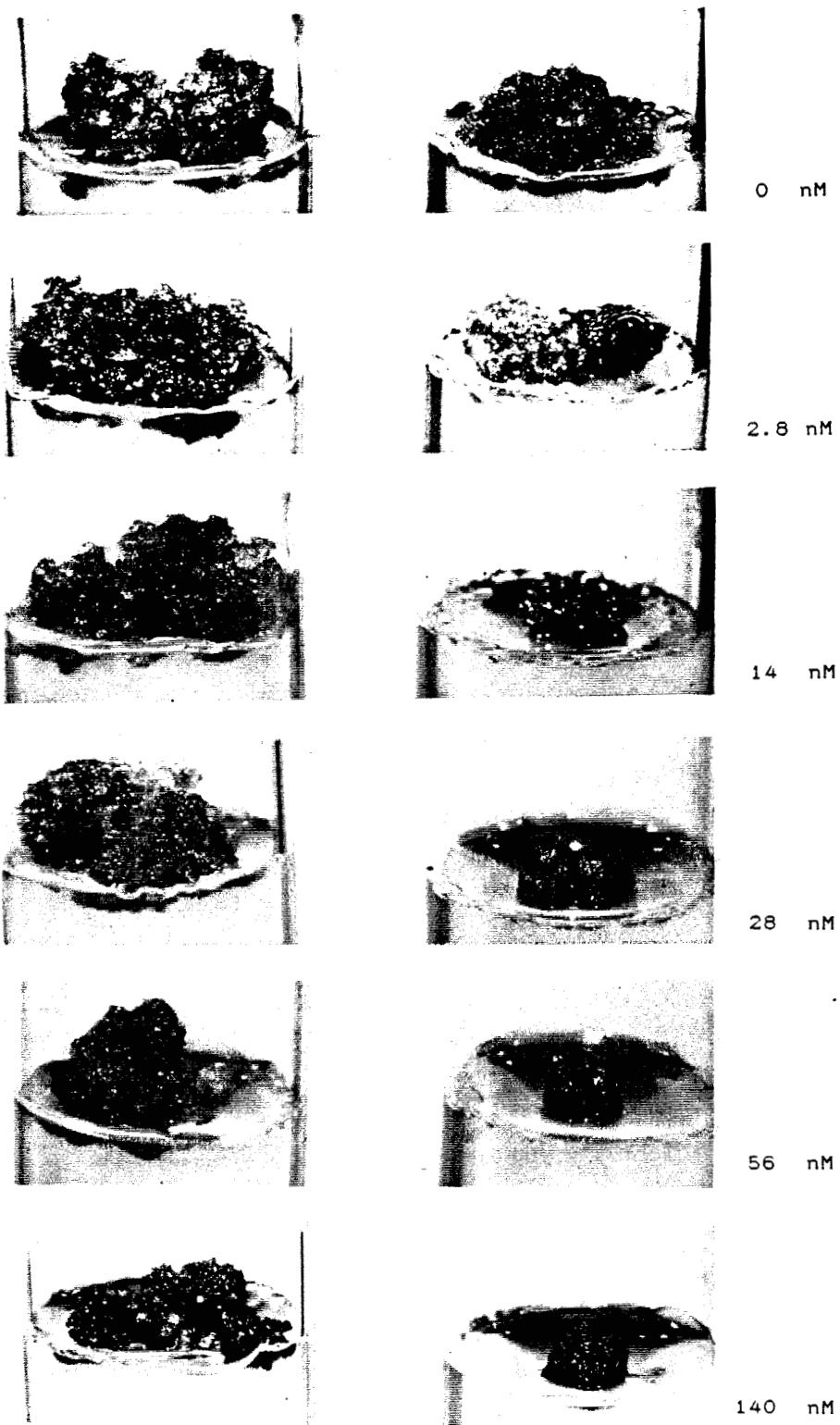


Figure 24: Comportement de cellules résistantes (à gauche) et sensibles (à droite) en présence de doses croissantes de Chlorsulfuron

3.3) ISOLEMENT DE SOUCHES CELLULAIRES PROLIFERANT SUR UN MILIEU DE SELECTION

Les différentes cultures cellulaires en milieu liquide agité, repiquées tous les quinze jours, furent soumises au protocole de sélection décrit dans le chapitre matériel et méthode (§ 2.3).

Trois souches d'origines distinctes, provenant d'un matériel cellulaire issu d'une population de Chicorées des Etablissements HOQUET, furent tout d'abord sélectionnées:

- R8 isolée en Décembre 1986
- R6 , Février 1987
- R11 , Mai 1987

Ce processus fut ensuite repris en Décembre 1987 avec des lignées homozygotes et autofertiles parentes d'un hybride à haute valeur commerciale. C'est ainsi que nous avons isolé à nouveau une souche:

- R1 OK , en Mai 1988

Ces quatre souches se développent normalement en présence de 28 nM d'herbicide et supportent à la fois le chlorsulfuron et le sulfométuron, que ces molécules soient employées séparément ou en mélange (figures:22,23).

Il convenait alors d'essayer d'évaluer les potentialités de prolifération de ces souches cellulaires sur des doses croissantes d'herbicide (chlorsulfuron) et de les comparer à celles de cellules sensibles issues des variétés de départ (figure:24).

Conditions de culture	Matière Fraiche (mg)				
	TEMOIN	R6	R11	R8	F souches
CS 0 nM Moyennes écart-types ni	^{be'} 2362.72 477.45 10	^{oc'} 1506.14 372.92 5	^{be'} 2138.70 314.10 5	^{bd'} 2421.52 319.73 9	6.83***
CS 2.8 nM Moyennes écart-types ni	^{d'} 1501.40 297.60 5				
CS 7 nM Moyennes écart-types ni				^{d'} 2251.90 194.07 5	
CS 14 nM Moyennes écart-types ni	^{oc'} 755.33 311.59 5	^{bc'} 1490.58 297.11 5	^{bd'} 1810.80 190.17 5	^{cd'} 2127.00 347.89 10	28.97***
CS 28 nM Moyennes écart-types ni	^{ab'} 434.68 213.57 10	^{bb'} 1279.20 318.25 5	^{cd'} 1735.10 168.39 5	^{cb'} 1828.70 377.82 10	43.75***
CS 56 nM Moyennes écart-types ni	^{ab'} 340.88 217.84 10	^{bb'} 1182.28 213.82 5	^{bc'} 1275.24 105.48 5	^{cb'} 1770.00 309.60 10	117.01***
CS 140 nM Moyennes écart-types ni	^{ab'} 301.72 182.24 10	^{bb'} 971.16 204.98 5	^{bb'} 771.20 44.73 5	^{cb'} 1681.60 238.80 10	85.22***
CS 280 nM Moyennes écart-types ni	^{aa'} 125.28 45.08 5	^{ba'} 607.60 90.23 5	^{ba'} 502.40 110.37 5	^{ca'} 1191.00 313.47 10	60.97***
F Herbicide	69.94***	9.19***	51.82***	15.28***	

Tableau II: Masses moyennes de matière fraîche récoltées par boîte de Petri, après avoir cultivé pendant un mois des cals issus des souches R6, R8 et R11 ainsi que ceux provenant d'une souche sensible sur des milieux contenant différentes doses de Chlorsulfuron (CS).

l'analyse de la variance a été effectuée:

_ soit pour comparer les souches entre elles (par ligne dans le tableau) pour une même concentration d'herbicide. Dans ce cas les comparaisons de moyennes se feront en affectant comme exposant a,b,c...etc!

_ soit pour analyser le comportement d'une souche donnée en fonction de concentrations croissantes d'herbicide (par colonne). Dans ce cas les comparaisons de moyennes se feront en affectant comme exposant a',b',c'...etc!

Conditions de culture	Matière Sèche (mg)				
	TEMOIN	R6	R11	R8	F souches
CS 0 nM Moyennes écart-types ni	^{b f'} 79.58 12.61 10	^{a c'} 61.84 5.17 5	^{a c'} 62.78 9.01 5	^{b c'} 76.56 4.72 9	6.89***
CS 2.8 nM Moyennes écart-types ni	^{e'} 62.28 5.26 5				
CS 7 nM Moyennes écart-types ni				^{c'} 74.44 1.42 5	
CS 14 nM Moyennes écart-types ni	^{a'} 48.39 10.37 10	^{b'} 62.78 8.31 5	^{b c d'} 66.12 5.72 5	^{c c'} 76.14 7.97 5	11.96***
CS 28 nM Moyennes écart-types ni	^{a c'} 29.45 11.05 10	^{b b'} 57.38 6.76 5	^{cd'} 69.68 7.49 5	^{b a'} 65.58 9.25 10	32.81***
CS 56 nM Moyennes écart-types ni	^{a b'} 20.09 11.27 10	^{b b'} 54.72 4.83 5	^{b c'} 59.70 2.65 5	^{c b'} 67.61 5.82 10	69.3***
CS 140 nM Moyennes écart-types ni	^{a a'} 14.94 8.68 10	^{b b'} 53.00 7.50 5	^{b b'} 47.08 2.26 5	^{c a'} 66.18 4.69 10	29.22***
CS 280 nM Moyennes écart-types ni	^{a a'} 6.74 1.55 5	^{c a'} 42.68 2.31 5	^{b a'} 33.82 3.83 5	^{d a'} 60.11 8.09 10	100***
F herbicide	57.59***	7.03***	28.01***	7.16***	

Tableau III: Masses moyennes de matière sèche récoltées par boîte de Petri, après avoir cultivé pendant un mois des caïs issus des souches R6, R8 et R11 ainsi que ceux provenant d'une souche sensible sur des milieux contenant différentes doses de Chlorsulfuron (CS).

l'analyse de la variance a été effectuée:

_ soit pour comparer les souches entre elles (par ligne dans le tableau) pour une même concentration d'herbicide. Dans ce cas les comparaisons de moyennes se feront en affectant comme exposant a,b,c...etc!

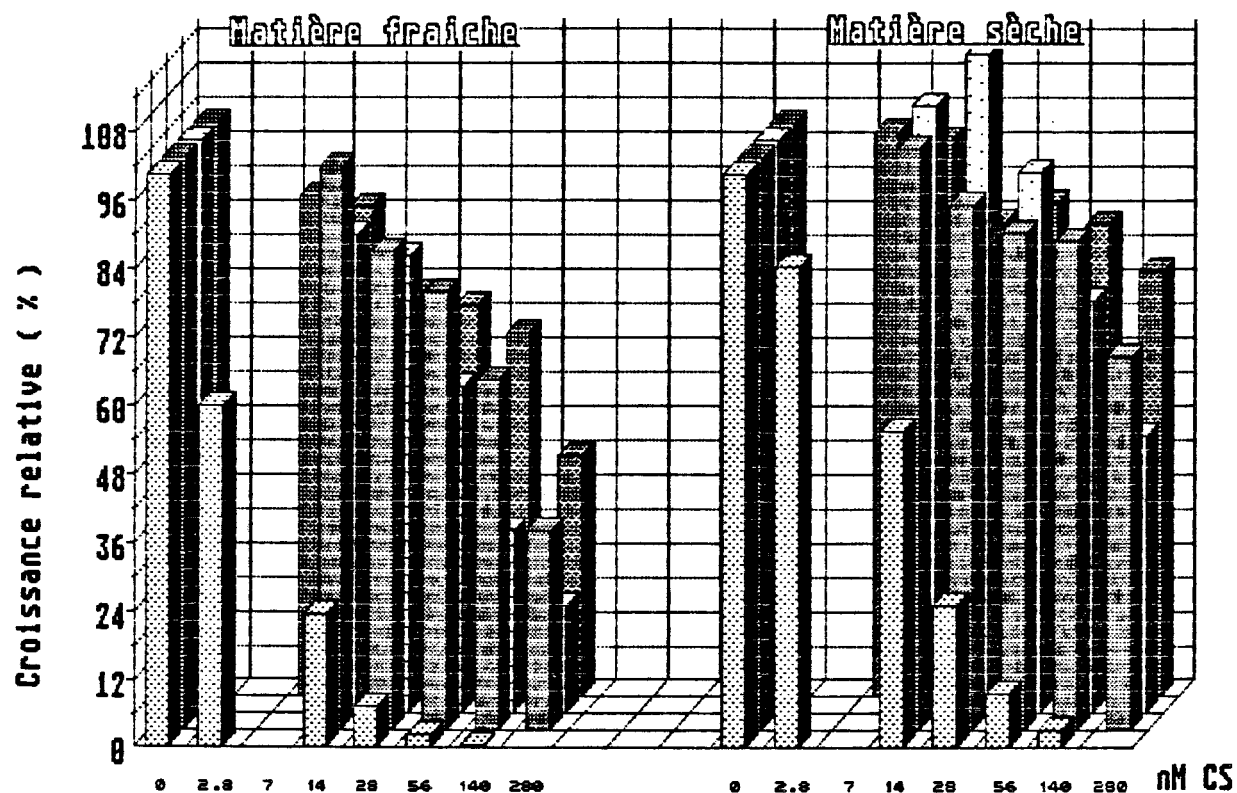
_ soit pour analyser le comportement d'une souche donnée en fonction de concentrations croissantes d'herbicide (par colonne). Dans ce cas les comparaisons de moyennes se feront en affectant comme exposant a',b',c'...etc!

TEMOIN

R6

R11

R8



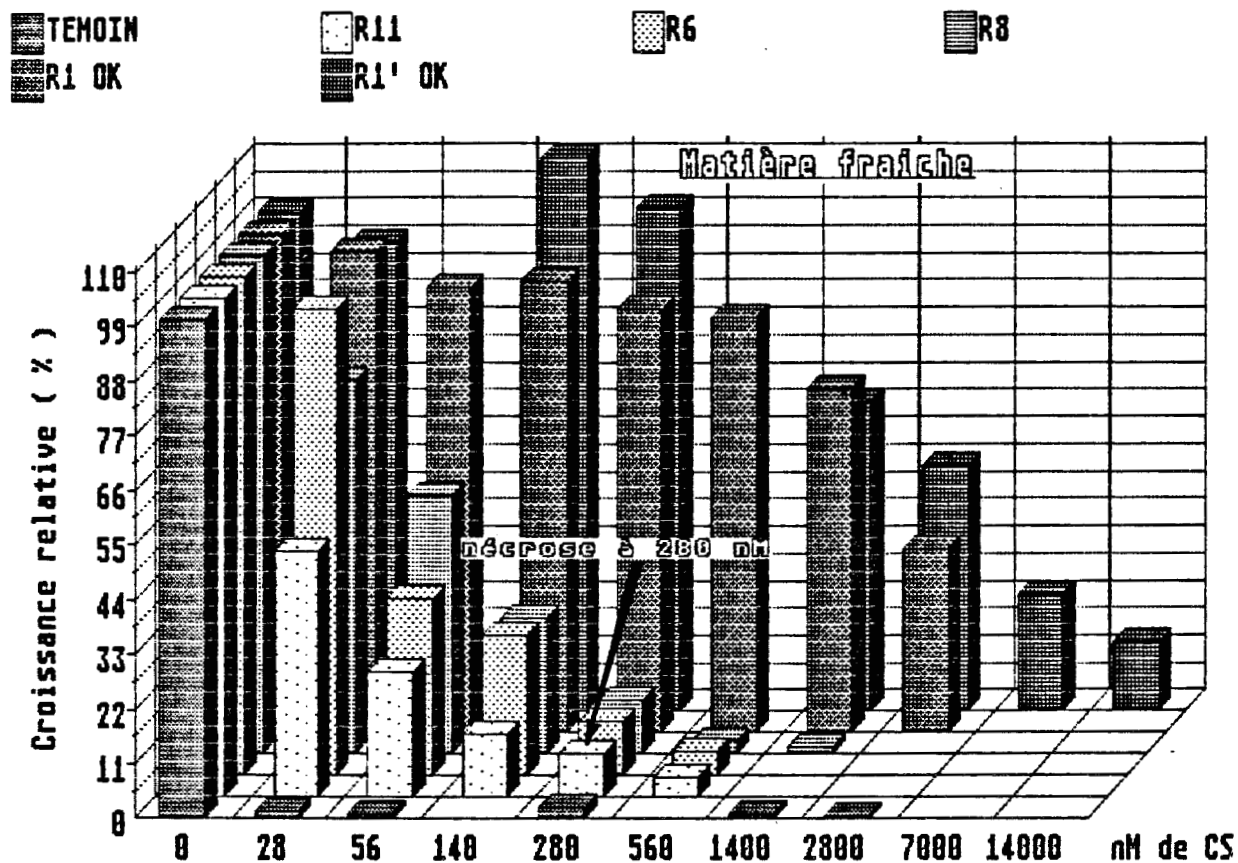
		Matière Fraîche (croissance relative)			
		TEMOIN	R6	R11	R8
Herbicide nM	0	100.00	100.00	100.00	100.00
	2.8	59.68			
	7				87.39
	14	23.19	98.85	83.67	85.50
	28	6.92	83.65	79.90	70.56
	42				
	56	2.23	76.46	57.00	68.23
	140	0.10	61.12	31.92	63.47
	280	-0.20	34.70	18.53	41.83
		Matière Sèche (croissance relative)			
		TEMOIN	R6	R11	R8
	0	100.00	100.00	100.00	100.00
	2.8	83.82			
	7				98.56
	14	55.05	101.62	106.12	97.26
	28	24.77	91.88	115.39	82.80
	56	9.22	87.04	94.62	86.08
	140	2.77	85.50	72.02	82.59
	280	-0.15	65.14	48.23	74.09

Figure 25: Variation de la croissance relative (MF et MS après un mois de culture) des cals issus des souches R1, R6, R11 ainsi que ceux provenant d'une souche sensible (témoin) en fonction de différentes doses de Chlorsulfuron (CS).

	Matière fraîche (mg)					
	Témoin	R1 OK	R1' OK	R8	R6	R11
CS 0 nM Moyennes écart-types ni	^{b'} 1019.20 155.96 5	^{c'} 1186.40 27.62 5	^{e'} 1301.50 364.00 10	^{d'} 1204.40 167.20 5	^{c'} 902.80 150.36 5	^{c'} 1160.80 145.28 5
CS 28 nM Moyennes écart-types ni	^{a'} 129.00 26.99 5	^{c'} 1151.60 180.55 5	^{e'} 1244.40 204.57 5	^{d'} 954.40 82.27 5	^{c'} 855.20 337.41 5	^{b'} 662.00 118.76 5
CS 56 nM Moyennes écart-types ni	^{a'} 123.00 37.44 5	^{b'} 1075.60 114.39 5		^{b'} 726.20 93.10 5	^{c'} 411.80 83.09 5	^{b'} 429.80 79.14 5
CS 140 nM Moyennes écart-types ni	^{a'} 101.00 31.93 5	^{b'} 1091.20 251.00 5	^{e'} 1424.20 107.45 5	^{b'} 482.40 159.80 5	^{c'} 356.60 119.86 5	^{b'} 307.20 50.00 5
CS 280 nM Moyennes écart-types ni	^{a'} 134.00 44.47 4	^{b'} 1031.80 166.93 5	^{e'} 1119.90 271.37 10	^{b'} 320.40 25.55 5	^{c'} 226.40 41.30 5	^{a'} 267.40 56.34 5
CS 560 nM Moyennes écart-types ni	^{a'} 109.60 33.44 5	^{b'} 1014.80 112.96 5		^{a'} 237.80 29.84 5	^{c'} 179.00 59.33 5	^{a'} 221.40 32.16 5
CS 1400 nM Moyennes écart-types ni	^{a'} 122.40 16.01 5	^{b'} 867.80 83.29 5	^{d'} 884.60 112.49 10	^{a'} 225.60 92.70 5	^{c'} 124.80 30.16 5	^{a'} 161.40 45.93 5
CS 2800 nM Moyennes écart-types ni	^{a'} 118.20 31.63 5	^{a'} 537.60 101.90 5	^{b'} 749.40 103.20 10	^{a'} 178.60 56.88 5	^{c'} 133.00 28.82 5	^{a'} 176.60 63.26 5
CS 7000 nM Moyennes écart-types ni			^{b'} 453.00 111.40 10			
CS 14000 nM Moyennes écart-types ni			^{a'} 350.90 71.74 10			
F herbicide	5.83 ***	2.45*	2.58**	2.78*	NS	3.25***

Tableau IV: Masses moyennes de matière fraîche récoltées par boîte de Petri, après avoir cultivé pendant un mois des cals issus des souches R6, R8, R11, R1 et R1' OK (deux expérimentations) ainsi que ceux provenant d'une souche sensible (témoin) sur des milieux contenant différentes doses de Chlorsulfuron (CS).

l'analyse de la variance a été effectuée pour étudier le comportement d'une souche donnée en fonction de concentrations croissantes d'herbicide (par colonne). Les comparaisons de moyennes se feront en affectant un exposant a', b', c'...etc!



herbicide nM	Matériau fraîche (croissance relative)					
	TEMOIN	R1 OK	R1' OK	R8	R6	R11
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
28	1.22	96.59	94.00	74.76	93.71	48.81
56	0.55	89.14		51.72	35.16	24.97
140	-1.89	90.67	111.00	27.10	27.87	12.39
280	1.77	84.85	101.00	10.74	10.67	8.31
560	-0.94	83.18		2.40	4.41	3.59
1400	0.48	68.78	62.00	1.17	-2.75	-2.57
2800	0.02	36.42	49.00	-3.57	-1.66	-1.01
7000			22.90			
14000			13.60			

Figure 26: Variation de la croissance relative (MF après un mois de culture) des cals issus des souches R1, R6, R11, R1 et R1' OK (deux expérimentations) ainsi que ceux provenant d'une souche sensible (témoin) en fonction de différentes doses de Chlorsulfuron (CS).

3.3.1) EVALUATION DE LA CROISSANCE RELATIVE DES SOUCHES SELECTIONNEES

3.3.1.1) Souche R8, R6 et R11

Après un mois de culture, les masses de matières fraîche et sèche récoltées furent enregistrées pour toutes les conditions expérimentales. Ayant constaté l'uniformité et la faible importance relative de l'inoculum dans l'expression de la croissance finale (4% des quantités récoltées), il fut décidé de ne pas en tenir compte.

L'évolution des teneurs en matières fraîche et sèche (tableaux: II, III) nous indique que les souches prolifèrent de façon analogue sur un milieu sans herbicide, mais qu'elles divergent rapidement en présence de doses croissantes de chlorsulfuron. En effet 28 nM d'herbicide suffisent à inhiber totalement la souche sensible, alors que 280 nM ne parviennent pas à nécroser les souches R6, R8 et R11.

Il est possible de transformer ces données en valeurs relatives traduisant la perte de croissance en fonction de l'augmentation des doses d'herbicide dans le milieu. Il suffit pour cela d'appliquer à chaque souche la formule de calcul (§:3.2.1), permettant de définir l'évolution des croissances relatives des trois souches sélectionnées par comparaison à celle d'une souche sensible (figure:25). On vérifie ainsi, que les DI 50 (§: 2.7) des cellules sélectionnées sont de 10 à 20 fois supérieures à celle de cellules témoins (environ 3 nM de chlorsulfuron). Cette méthode confirme les résultats liés à l'évolution des teneurs en matières fraîche et sèche, mais fait aussi apparaître que la souche R11 (non chlorophyllienne) est inhibée plus rapidement par l'augmentation des doses de chlorsulfuron.

Les teneurs en matière fraîche et sèche variant de la même façon, nous avons décidé de ne tenir compte désormais que de la matière fraîche.

3.3.1.2) Souche R1 OK

Nous avons répété le processus consistant à déposer à la fois des cals sensibles (issus de la suspension d'où furent isolées les cellules R1 OK) et d'autres provenant des souches (R6, R8, R11 et R1 OK) sur un milieu contenant des doses croissantes de chlorsulfuron. On remarque, une fois encore, que les cellules de toutes origines présentent une même potentialité de prolifération sur le milieu sans herbicide (Tableau: V). Cependant la souche R1 OK se démarque des trois précédemment sélectionnées, en effet sa DI 50 est 1000 fois supérieure à celle des cals témoins (figure:26), de plus ses cellules continuent à proliférer en présence de 14 000 nM de chlorsulfuron.

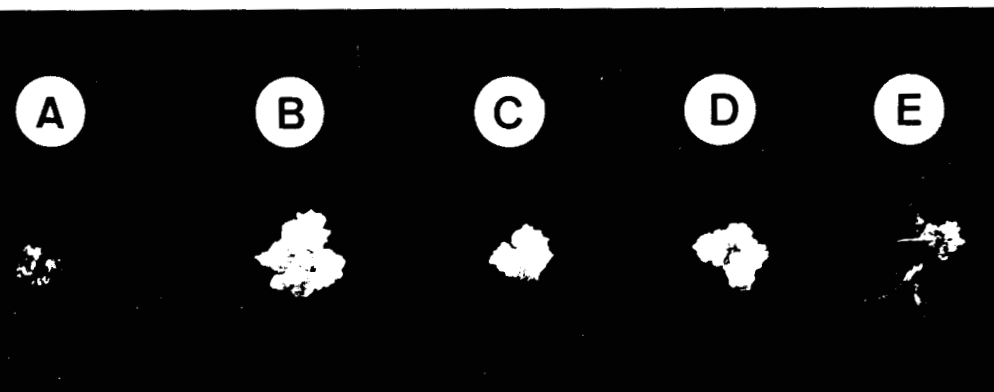


Figure 27: Cals transférés sur un milieu inducteur de bourgeons contenant 28 nM de Chlorsulfuron, ces cals proviennent des souches :

- | | | | |
|----------|-----|-------|-----|
| - Témoin | (A) | - R8 | (B) |
| - R6 | (C) | - R11 | (D) |
| - R1 OK | (E) | | |

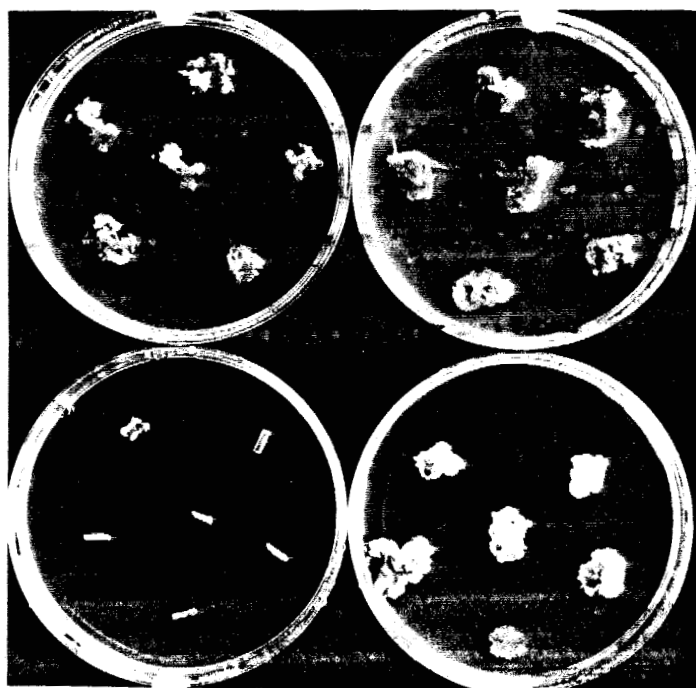
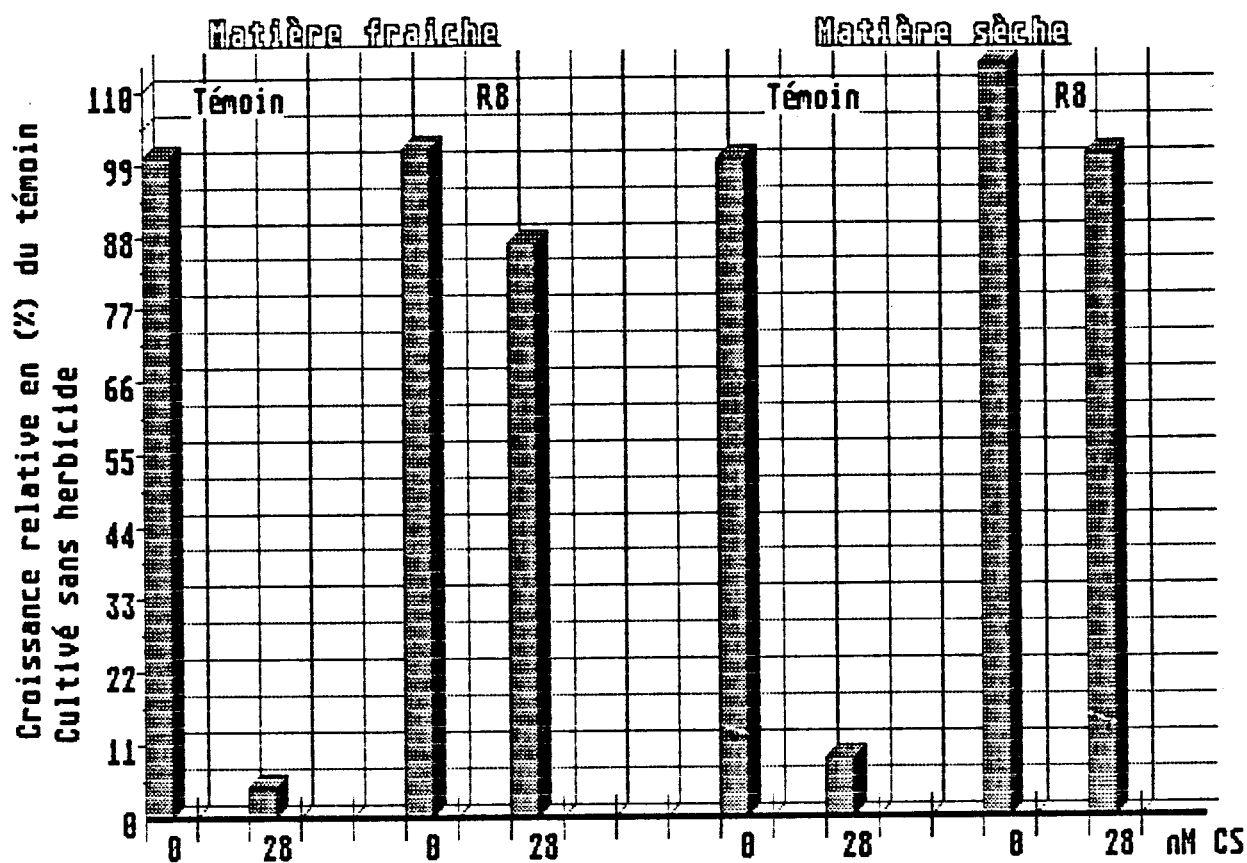


Figure 28: Callogénèse sur explants (fragments de nervures) issus de vitro-plants non enracinés:

- en haut: milieu sans herbicide.
- en bas: milieu renfermant 26nM de chlorsulfuron:
- à gauche: plantule sensible
- à droite: plantule issue de souche résistante



	Croissances relatives en %			
	Témoin		R 8	
	0 nM	28 nM	0 nM	28 nM
Chlorsulfuron				
Matière Fraîche				
Moyennes	100.00 ^b	4.38 ^a	101.11 ^b	86.78 ^b
écart-types	14.50	2.16	10.47	4.41
ni	5	5	5	4
F	100.28***			
Matière Sèche				
Moyennes	100.00 ^b	8.76 ^a	114.09 ^c	100.10 ^b
écart-types	8.29	8.72	8.48	6.20
ni	5	5	5	4
F	169.44***			

Figure 29: Croissance relative (matières fraîche et sèche) de fragments de nervures issus d'une plante sensible (témoin) et R8 cultivés pendant 1 mois en présence ou non de 28 nM de Chlorsulfuron (CS).

3.3.2) VERIFICATION DU "PASSAGE" DE L'APTITUDE A LA PROLIFERATION EN PRESENCE D'HERBICIDE, DE CELLULES INDIFFERENCIEES AUX BOURGEONS NEOFORMES ET INVERSEMENT.

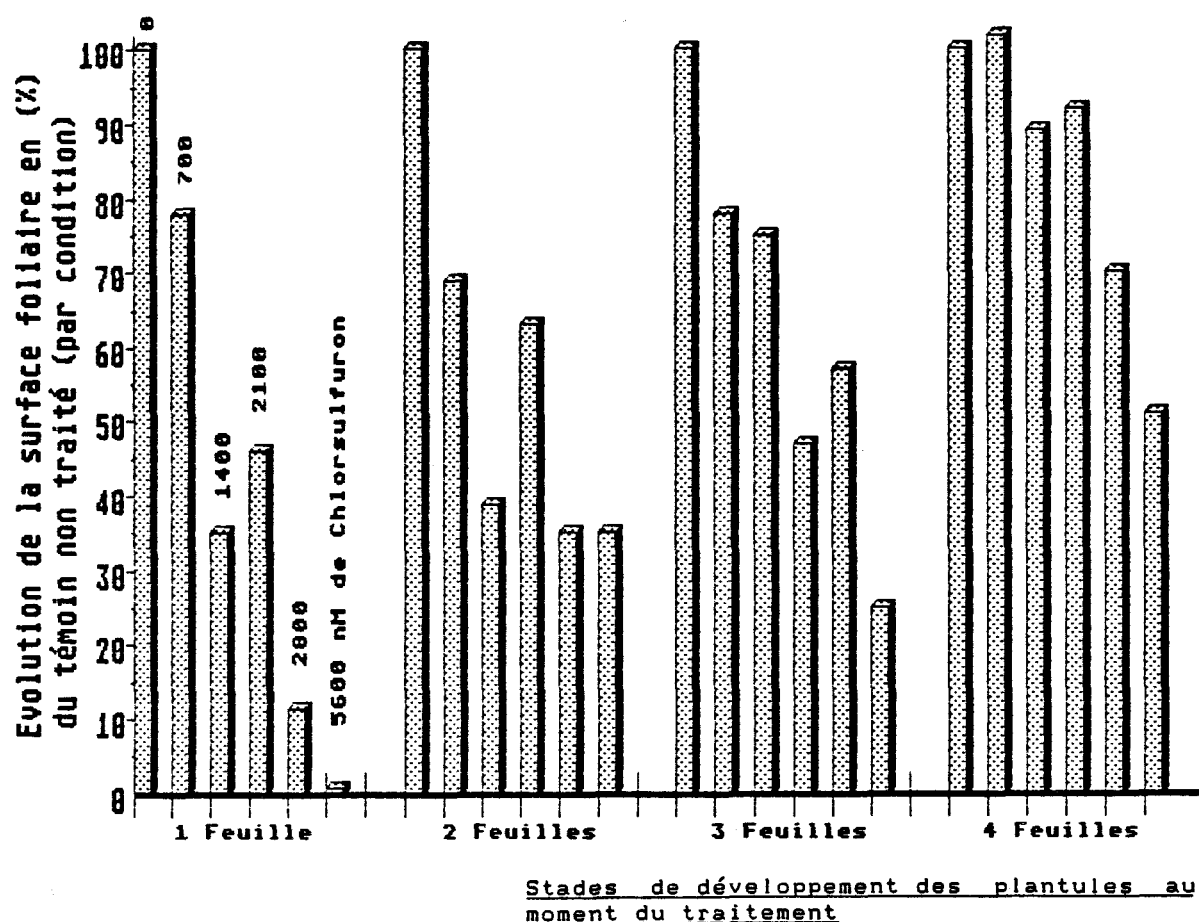
Au cours de cette étude nous avons pu remarquer que les trois premières souches sélectionnées ne produisaient des bourgeons que sur des milieux de culture sans herbicide et que par contre la quatrième (R1 OK) en formait spontanément sur le milieu de sélection (figure:27). Ces bourgeons, régénérés à partir de ces différentes souches, s'enracinèrent puis furent placés en serre dans des conditions normales de culture.

Des fragments de nervures, prélevés avant que les *vitro*-plants ne soient repiqués en miniserre, furent déposés sur un milieu de sélection. La figure 28 présente le comportement de ces explants après un mois de culture. On y remarque une nécrose des tissus prélevés sur un témoin alors que ceux issus des *vitro*-plants ayant pour origine les souches R8, R6, R11 et R1 OK donnent naissance à des proliférations cellulaires en présence d'herbicide.

Nous pouvons en conclure que l'aptitude à la prolifération cellulaire en présence de Sulfonylurées s'exprime dans un tissu organisé, il y a transmission de cette potentialité du cal à la plante.

Nous devions aussi nous assurer que cette aptitude se conservait au sein d'un tissu différencié en dehors de toute pression de sélection. C'est pourquoi nous avons prélevé et aseptisé des fragments de nervures provenant de plantes adultes et les avons cultivés sur le milieu de sélection. Après un mois de culture en présence de 28 nM de chlorsulfuron les explants issus de la plante sensible se sont nécrosés (figure:29) alors que ceux d'origine R8 manifestent 86 % de croissance relative, ce qui montre qu'il y a bien eu conservation de cette propriété.

Ce caractère est donc stable au sein de tissus différenciés, nous pouvons donc conclure que le développement en serre des *vitro*-plants n'affecte pas l'expression cellulaire de cette aptitude.



stades des plantules	CHLORSULFURON					
	0 nM	700 nM	1400 nM	2100 nM	2800 nM	5600 nM
1 feuille	100.00	78.00	35.00	46.00	11.40	0.70
2 feuilles	100.00	69.00	39.00	63.00	35.00	35.00
3 feuilles	100.00	78.00	75.00	47.00	57.00	25.00
4 feuilles	100.00	102.00	89.00	92.00	70.00	51.00

Figure 30: Action de doses croissantes de Chlorsulfuron appliquées à des stades différents du développement de jeunes plantules de *Cichorium intybus* L. var. Witloof cultivées en pots (par pulvérisation foliaire de 2 cm³ d'une solution d'herbicide).

3.4) VERIFICATION AUX CHAMPS DE LA TRANSMISSION DE CETTE PROPRIETE PAR VOIE SEXUEE

3.4.1) CRITERES DES TRAITEMENTS

3.4.1.1) Introduction

Chez les plantes cultivées trois paramètres importants sont définis préalablement à l'utilisation d'un herbicide:

- La quantité de produit à utiliser pour une surface donnée
- Le mode de traitement, pulvérisation foliaire ou incorporation au sol.
- Le moment du traitement qui inclut à la fois le stade de développement de la plante cultivée et celui des adventices.

Les Sulfonilurées sont des herbicides antidicotylédones totaux, *Cichorium intybus* L. var. Witloof est donc une plante sensible à ces molécules. C'est pourquoi elle n'a fait l'objet, à notre connaissance, d'aucune recherche antérieure visant à utiliser dans cette culture de tels herbicides.

Néanmoins il fallait pouvoir vérifier la transmission possible par graine, ainsi que l'expression de la résistance aux Sulfonilurées dans la descendance issue de plantes sélectionnées. C'est pourquoi, afin de mener à bien ce travail, il fut tenté de définir de façon simple et dans des conditions précises un stade de traitement puis une dose d'herbicide appropriée à la réalisation d'un screening sur de jeunes plantules. Le principe était de pouvoir contrôler si, dans la descendance de plantes issues des cellules sélectionnées *in-vitro*, les individus traités exprimaient eux aussi cette potentialité par rapport à des plantules témoins.

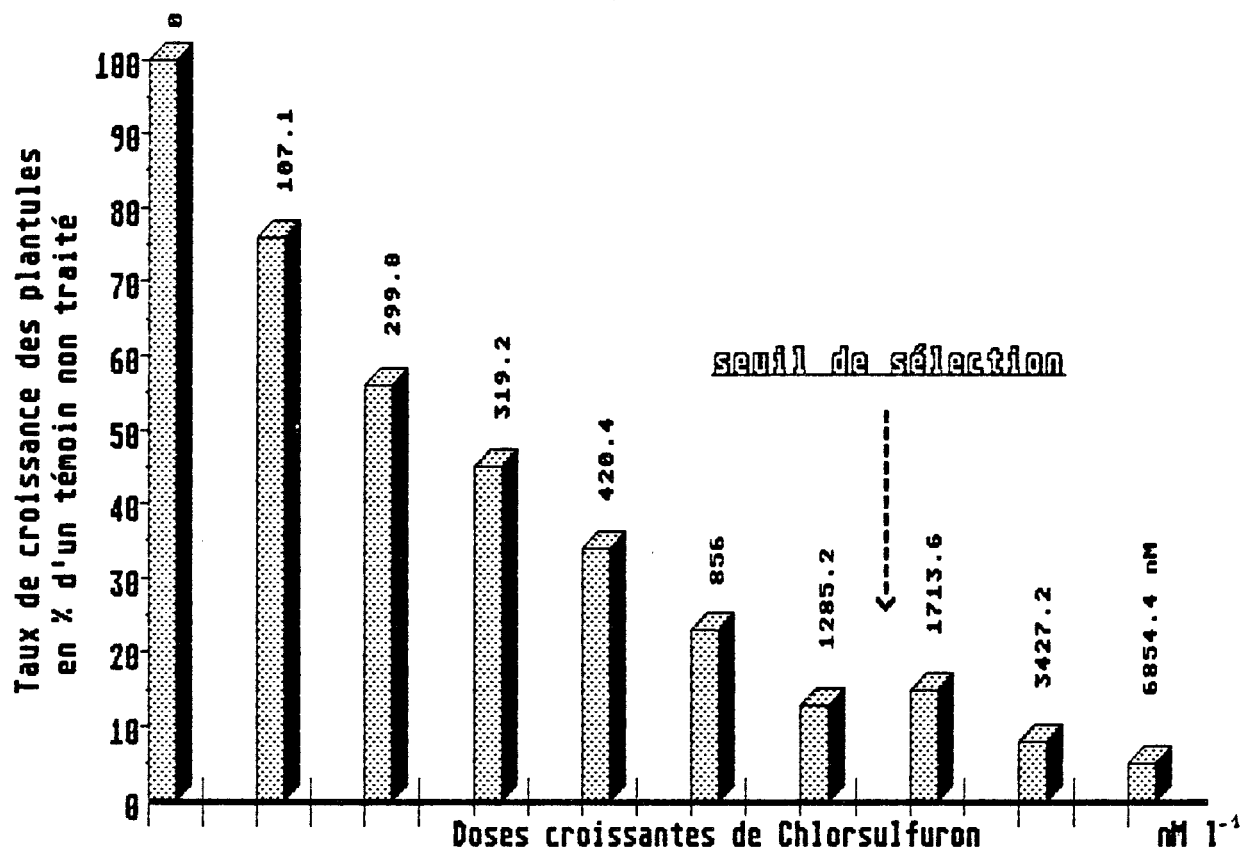
3.4.1.2) Définition du stade de traitement

Il s'agissait de définir un stade de développement des semis, plus propice à l'activité de l'herbicide. Pour ce faire, après germination en pots, un traitement est effectué par pulvérisation foliaire (figure:30) à raison de 2 cm³ d'une solution mère contenant:

700, 1400, 2100, 2800, 5600 nM de chlorsulfuron

sur des plantules aux stades suivants:

- 2 cotylédons + 1 feuille de 1 cm
- + 2 feuilles
- + 3 feuilles
- + 4 feuilles.



Doses de Chlorsulfuron appliquées	Taux de croissance		
	Moyennes	écart-types	ni
0 nM	100.00 ⁱ	31.00	219
107.1 nM	76.00 ^h	34.00	195
299.8 nM	56.00 ^g	29.00	260
319.2 nM	45.00 ^f	25.00	231
428.4 nM	34.00 ^e	20.00	239
856.0 nM	23.00 ^d	13.00	245
1285.2 nM	13.00 ^c	6.00	121
1713.6 nM	15.00 ^{bc}	8.00	203
3427.2 nM	8.00 ^{ba}	4.00	113
6854.4 nM	5.00 ^a	2.00	43
F	306.56***		

Figure 31: Evolution du taux de croissance en % (quantité matière fraîche observée pour une condition de traitement divisée par la quantité de matière fraîche récoltée à partir de lots témoins non traités) pour des doses croissantes d'herbicide pulvérisées sur de jeunes plantules cultivées en terrines et examinées 30 jours après l'application du traitement.

Après 30 jours de culture on compare dans chaque cas la surface foliaire des plantules traitées à celle de plantules témoins, grâce au calcul suivant:

$$\frac{\text{Surface foliaire des individus traités}}{\text{Surface foliaire de témoins non traités}} \times 100$$

Il n'est pas utile pour une telle approche d'effectuer une analyse statistique complète, on remarquera seulement (figure:30) que l'effet herbicide est d'autant plus prononcé que l'on traite précocement les plantes. Deux observations s'en dégagent:

- le stade 2 cotylédons vrais plus une feuille d'environ 1 cm semble le plus adéquat à l'expression maximale de l'action herbicide.
- de même, plus les plantules sont âgées au moment du traitement, plus l'effet de l'herbicide est délicat à apprécier.

3.4.1.3) Recherche de la dose d'herbicide optimale à utiliser

Au stade de développement requis et par barquette de 20 plantules, nous pulvérisons sur le feuillage 2,5 ml d'herbicide (du GLEAN dosant 20% de chlorsulfuron). On teste ensuite une gamme croissante de concentrations d'herbicide, puis nous pesons après un mois de culture les plantules des différents lots traités. Nous définissons alors un taux de croissance s'exprimant de la façon suivante:

$$\frac{\text{Matière fraîche (mg) de la plante observée}}{\text{Matière fraîche (mg) moyenne de l'ensemble des témoins}} \times 100$$

puis l'on observe son évolution au cours des différentes expériences.

On remarque que la pulvérisation d'une solution contenant 1285 nM de chlorsulfuron (figure:31) limite à environ 13% la croissance des plantules ce qui suffit à la réalisation de ce screening. Néanmoins pour plus de sécurité nous avons décidé d'appliquer sur la descendance des plantes sélectionnées et dans les conditions précisées ci dessus, une solution titrant 1400 nM de chlorsulfuron.

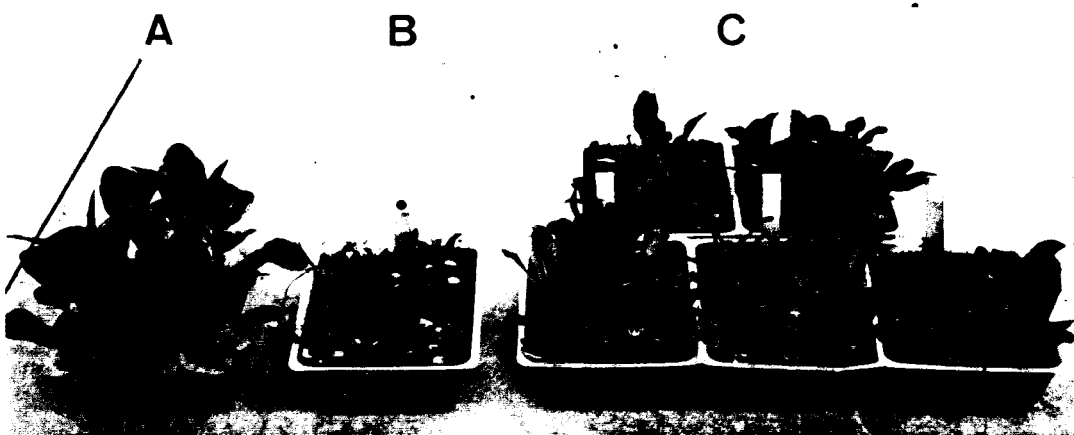


Figure 32: Effets d'une pulvérisation foliaire de Chlorsulfuron sur des semis (2.5 cc / barquette d'une solution titrant 1400 nM) après 30 jours en serre.

- A - semis témoins non traités
- B - semis témoins traités
- C - semis, issus d'autofécondations de plants "R8", traités

3.4.2) TRAITEMENTS REALISES SUR DES PLANTULES ISSUES D'AUTOFECONDATIONS DE PLANTES PROVENANT DE CELLULES SELECTIONNEES

3.4.2.1) Introduction

Pendant l'Hiver 1987-88 une première plante issue d'une souche R8 a subi un processus d'autofécondation et de croisement avec une plante de type "448" (origine I.N.R.A. de Versailles) que nous avons maintenue en floraison dans les serres de l'U.S.T.L. Afin de se placer dans des conditions optimales d'isolement et de bénéficier des compétences de professionnels, l'ensemble des autres autofécondations (effectuées sur les plantes sélectionnées) fut réalisé aux Etablissements HOQUET avec du personnel parfaitement rodé.

Les plantes se sont heureusement révélées fertiles, cependant il faut souligner que la Chicorée n'est pas un matériel qui se prête aisément aux autofécondations (§ 2.5). C'est ainsi que les trois types de plantes "R8", "R6" et "R11" ne provenant pas d'une population d'origine spécifiquement autofertile, ne produisirent que de faibles quantités d'akènes (100 à 200 akènes par série de plantes).

Les différents lots récoltés furent mis à germer dans des terrines. Au stade propice "2 cotylédons + 1 feuille", nous avons alors pulvérisé sur les plantules une solution d'herbicide (du GLEAN) titrant 1400 nM de chlorsulfuron.

Le traitement ainsi réalisé, les plantules furent pesées après 30 à 40 jours de culture, afin de pouvoir comparer entre elles:

- celles provenant de germinations d'akènes des plantes "R6", "R8" et "R11"
- celles issues de germinations d'akènes issus de témoins (traités ou non).

3.4.2.2) Résultats

N'ayant pas d'akène en notre possession, il n'a pas été possible d'étalonner l'action de l'herbicide sur les plantes "448", par précaution nous avons traité la descendance issue de ce croisement avec une dose double de celle préconisée. Les témoins (variété d'origine des plantes "R8") étaient totalement nécrosés, la F1 ("448" x "R8") quant à elle présentait 24 plantules nécrosées et 29 plantules continuant à se développer mais exprimant un retard de croissance par rapport aux témoins non traités. Nous remarquons dans ce cas qu'un test X^2 permet d'accepter l'hypothèse de la ségrégation d'un seul gène qui serait présent à l'état hétérozygote dans la plante "R8".

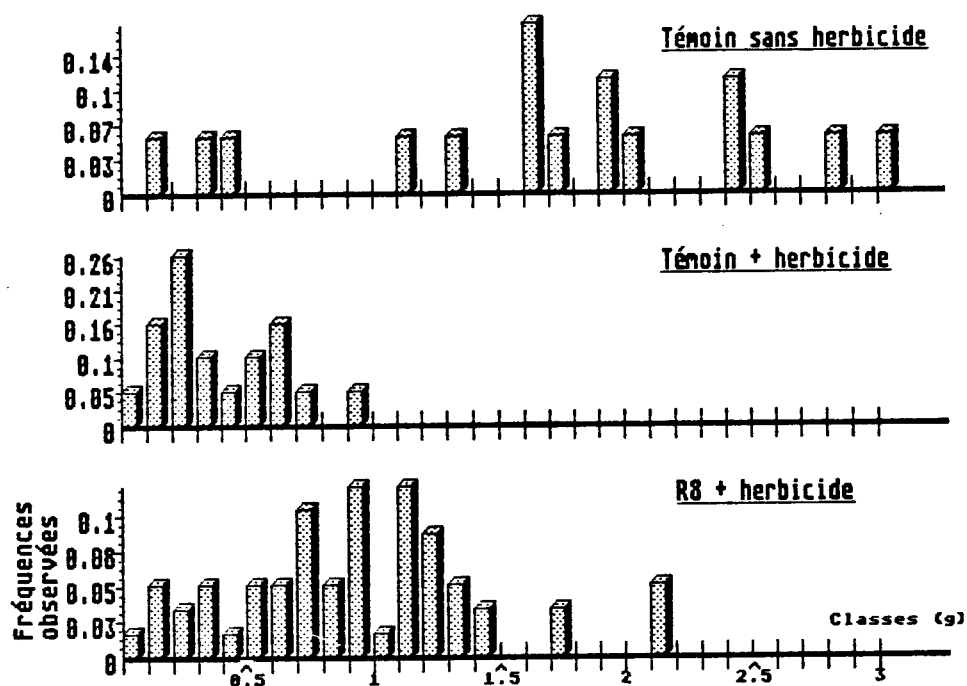


Figure 33: Dispersion des fréquences par masse de matière fraîche des plantules (provenant d'akènes issus d'autofécondations) récoltés 30 jours après un traitement au Chlorsulfuron par pulvérisation foliaire (2.5 cc / barquette d'une solution titrant 1400 nM).

	PLANTULES		
	non traitées	traitées	
	Témoins	Témoins	" R8 "
	Matière fraîche (mg)		
Moyennes	1865.28 ^c	495.11 ^a	1049.00 ^b
écart-types	849.09	253.77	512.00
ni	18	19	55
F	70.76 **		

Tableau V: Action d'une pulvérisation foliaire de Chlorsulfuron (2.5 cc / barquette d'une solution titrant 1400 nM) sur la matière fraîche moyenne des plantules R8 et témoins 30 jours après le traitement.

3.4.2.2.1) Autofécondations réalisées sur une plante R8 à l'U.S.T.L.

Trois lots de plantules (figure:32):

- "Population Hoquet" (variété d'origine), non traitées (A)
- "Population Hoquet", traitées (B)
- "R8", traitées (C)

furent pesées 30 jours après le début de l'expérience. On remarque de suite l'hétérogénéité de la croissance des plantes du groupe "R8", bien que dans l'ensemble le développement de ce lot soit de loin supérieur à celui des témoins traités (figure:32).

Dans un premier temps, après avoir classé les valeurs des masses individuelles de matière fraîche obtenues par individu pour chacun des lots, nous avons étudié la distribution des fréquences par classe de poids (figure:33). Ce mode de représentation souligne l'expression d'une certaine hétérogénéité de la population de départ mais aussi et surtout un meilleur comportement de la descendance "R8" face à celle des témoins traités.

Sur d'avoir parfaitement isolé la plante "R8" pendant sa phase d'autofécondation, nous avons alors décidé de séparer sa descendance traitée (55 plantules) en trois classes phénotypiquement différentes:

- une première regroupant 13 individus nécrosés identiques aux témoins traités (Masse moyenne des individus, $X = 492$ mg de MF)
- une seconde constituée de 31 plantes présentant une croissance affaiblie mais aussi des déformations foliaires ($X = 1062$ mg MF)
- une troisième comprenant 11 plantes non déformées mais accusant un retard de croissance par rapport à un témoin non traité ($X = 1588$ mg MF).

Le nombre des plantes dispersées dans ces trois classes nous permet de retenir, après avoir effectué un test X^2 , l'hypothèse de la ségrégation d'un seul gène codominant.

Il y a donc bien transmission sexuelle, d'un caractère sélectionné au niveau cellulaire. Néanmoins dans le cas présent la moyenne des valeurs de matière fraîche obtenues dans la descendance des plantes "R8" (tableau:V) n'égale pas celle exprimée par l'ensemble des témoins non traités.

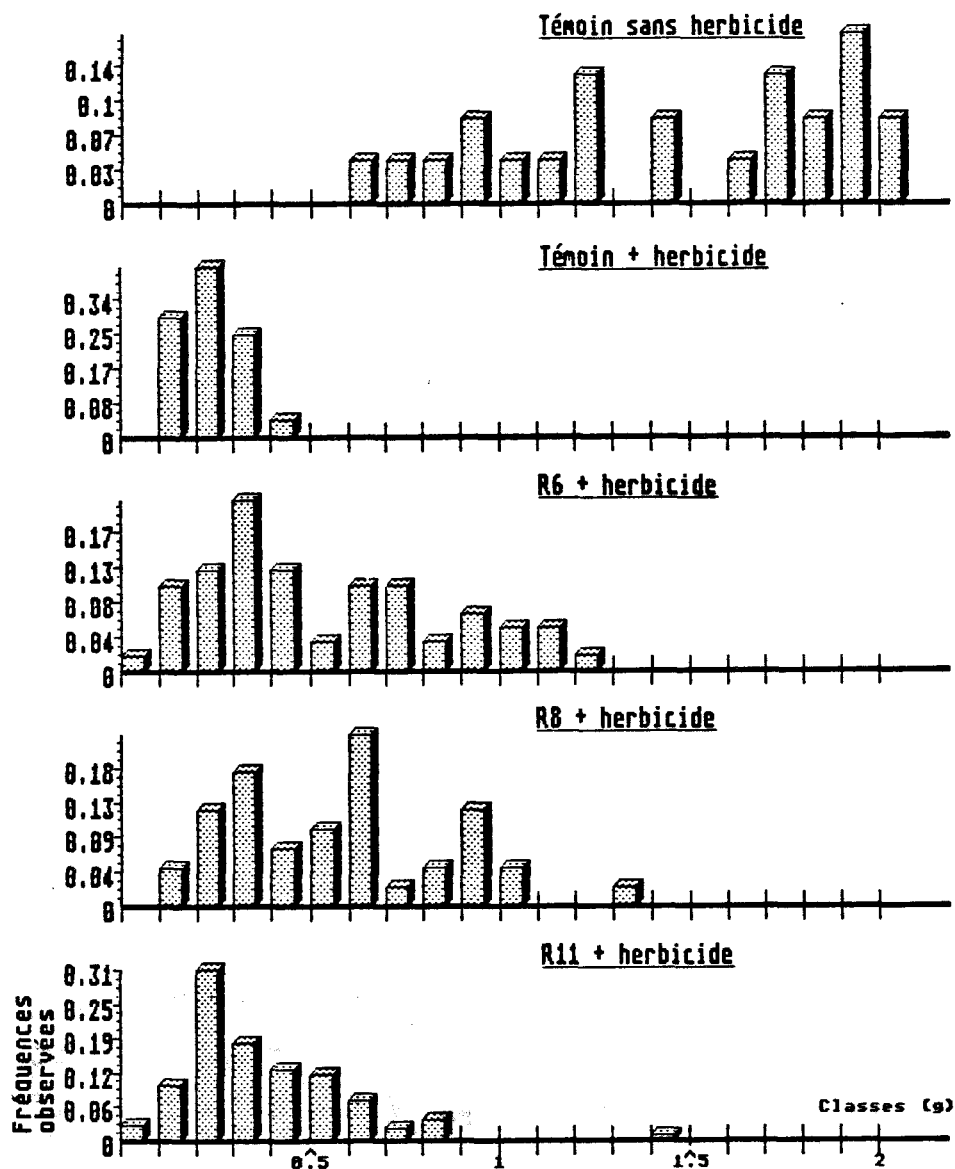


Figure 34: Dispersion des fréquences par masse de matière fraîche des plantules (provenant d'akènes issus d'autofécondations) récoltés 30 jours après un traitement au Chlorsulfuron par pulvérisation foliaire (2.5 cc / barquette d'une solution titrant 1400 nM)

	PLANTULES				
	non traitées	traitées			
	Témoin	Témoin	" R8 "	" R11 "	" R6 "
Matière fraîche (mg)					
Moyennes	1511.59 ^c	260.70 ^a	593.87 ^b	383.76 ^a	579.19 ^b
écart-types	411.96	80.75	277.81	200.89	338.94
ni	23	23	40	140	57
F	54.19 **				

Tableau VI: Action d'une pulvérisation foliaire de Chlorsulfuron (2.5 cc / barquette d'une solution titrant 1400 nM) sur la matière fraîche moyenne des plantules R6, R8, R11 et témoins 30 jours après le traitement.

3.4.2.2.2) Autofécondations réalisées sur les plantes "R8", "R6" et "R11" aux Etablissements HOQUET

Après germination, les différents lots d'akènes (à l'exception de celui du témoin non traité) subirent une pulvérisation foliaire d'herbicide. Il convient néanmoins de noter, que contrairement au cas précédent, le nombre d'akènes par terrine n'est plus que de 12 au lieu de 20.

La dispersion des fréquences, par classe de poids en fonction des masses de matière fraîche récoltées pour les individus "R6" et "R8" (figure:34) confirme les résultats précédemment obtenus avec les plantes "R8" (figure:33). Par contre, la descendance des plantes "R11" n'évolue pas de la même façon et se comporte comme la variété sensible d'origine.

Il y a bien transmission dans la descendance, pour les individus issus de plantes "R8" et "R6" seulement (tableau:VI), d'une aptitude précédemment sélectionnée au niveau cellulaire.

3.4.2.3) Conclusion

L'observation de la descendance d'une plante "R8" ainsi que celle issue du croisement ("448" x "R8") nous incite à penser que l'expression de ce caractère pourrait être due à la modification d'un seul gène. Néanmoins, il semble qu'il faille pour que la résistance aux Sulfonilurées puisse s'exprimer dans la plante, que les cellules sélectionnées *in-vitro* le soient suffisamment. Les souches "R6" et "R8" ne répondent sans doute pas à ces critères; c'est pourquoi, les individus issus de leurs autofécondations ne récupèrent pas (après application d'herbicide) la croissance des témoins non traités.

Les plantes "R11" par contre ne diffèrent pas de la variété d'origine, ce qui semblerait refléter le comportement de la souche cellulaire "R11" non chlorophyllienne et moins apte à proliférer en présence d'herbicide.

L'analyse de la descendance des plantes issues de la souche R1 OK nous laisse espérer des résultats encore plus probants: en effet la DI 50 de cette souche est 1000 fois supérieure à celle du témoin dont elle est issue. Il convient d'ajouter aussi que sa croissance n'est pas totalement inhibée malgré la présence de (14 000 nM) de chlorsulfuron dans le milieu de culture.

DISCUSSION

- INTRODUCTION
- INFLUENCE DE L'HERBICIDE SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE
- LES CULTURES CELLULAIRES
- SELECTION DE SOUCHES TOLERANTES ORGANOGENES
- CONCLUSION

4) DISCUSSION

4.1) INTRODUCTION

La variabilité naturelle ou induite constitue la source à laquelle s'adresse le sélectionneur végétal pour y déceler des caractères à intérêt agronomique. La sélection de mutants, quant à elle, permet d'analyser génétiquement des systèmes biologiques, ce qui joue un rôle essentiel dans le développement de la biologie moléculaire végétale.

Puisque l'on admet que les cultures *in-vitro* nous donnent la possibilité:

- de régénérer des plantes entières à partir de cellules isolées
- d'utiliser les phases cellulaires pour bénéficier d'une variation somaclonale et de pouvoir l'augmenter grâce à des techniques de mutagenèse
- de manipuler génétiquement les cellules de façon à étendre la variabilité naturelle

nous pensions pouvoir exploiter ces diverses propriétés pour mettre en place un processus de sélection *in-vitro*.

De façon générale, notre système expérimental devait permettre de passer au crible une population cellulaire importante et d'obtenir à partir de souches de cellules jugées intéressantes, des plantes fertiles cytologiquement normales et mis à part les caractères considérés, peu modifiées par rapport aux plantes mères. Le phénotype recherché comme but du programme devait être déterminé au mieux par un gène dont la fonction physiologique devait être, ne fût que partiellement, établie. Le gène impliqué devait aussi s'exprimer au cours de la phase cellulaire sur laquelle s'exercerait la pression de sélection.

Si ces conditions étaient réunies; nous pouvions envisager l'utilisation de suspensions cellulaires et leur étalement sur milieux sélectifs, comme une solution applicable à la sélection de souches résistantes à un herbicide.

4.2) INFLUENCE DE L'HERBICIDE CHOISI SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE

Afin de répondre aux exigences exprimées par la profession il était impératif de choisir un produit de désherbage présentant un large spectre d'activité, une bonne efficacité *in-vitro* ainsi qu'une action biochimique parfaitement connue.

Nous pensions que l'isolement d'une résistance liée à la dénaturation spécifique d'un inhibiteur nécessiterait l'introduction, dans le génome considéré, d'une information génétique étrangère (technique qui n'était pas envisageable au commencement de ce travail) et induirait peut être la formation de cals chimères où seraient étroitement associées des cellules détoxifiant l'herbicide et d'autres bénéficiant de cette propriété. Par contre la sélection d'une forme enzymatique insensible (par modification de la cible biochimique d'un inhibiteur) semblait concevable. C'est pourquoi après avoir réalisé une étude bibliographique, nous avons retenu comme herbicides possibles les Sulfonilurées.

De telles molécules, précédemment utilisées en sélection *in-vitro*, avaient déjà donné lieu à l'obtention de résultats satisfaisants avec le Tabac (CHALEFF et RAY, 1984). En effet, dans une population cellulaire haploïde et après mutagénèse, des souches de cellules résistantes possédant une forme altérée de l'AHAS insensible aux Sulfonilurées et parfaitement fonctionnelle, avaient été sélectionnées. Ils observèrent de même que les individus possédant cette forme enzymatique mutée supportaient des doses d'herbicide supérieures à celles admises par des plantes ayant la propriété de dénaturer (par hydroxylation et glucosylation), ces mêmes Sulfonilurées (CHALEFF, 1988). Il existait donc un préalable nous permettant d'envisager à la fois l'utilisation d'une technique et d'un inhibiteur, dans un processus de sélection qui à priori n'était pas évident.

Ayant déterminé le type d'herbicide (le chlorsulfuron) et la concentration nécessaire à l'élaboration d'un milieu de sélection (28 nM); il nous a d'abord fallu vérifier, que chez *Cichorium intybus* L. var. Witloof, la cible biochimique des Sulfonilurées était bien l'AHAS (§:1.3.4). Pour cela nous avons tenté de réverser l'effet du chlorsulfuron en ajoutant dans le milieu de culture: de la valine, de la leucine et de l'isoleucine, acides aminés dont il devait théoriquement inhiber les synthèses (RAY, 1986).

Les essais démontrèrent que pris un par un ces acides aminés sont inefficaces et ne réversent pas l'inhibition causée par 28 nM de chlorsulfuron (milieu de screening). Néanmoins l'association de la valine et de l'isoleucine suffit à la réversion de l'effet herbicide.

Nous ne pouvons cependant en déduire, puisqu'elle ne semble pas indispensable à la réversion, que la synthèse de la leucine ne soit pas tributaire de l'AHAS. En effet les auteurs s'accordent généralement pour admettre que l'introduction de Sulfonylurées dans un milieu de culture entraîne une baisse de la valine, de la leucine et de l'isoleucine dans le pool des acides aminés libres (RHODES et al., 1987). Toutefois ces auteurs soulignent qu'il existe peut être des inhibitions différentielles selon les organismes ou les plantes étudiés. C'est ainsi que les essais de réversion montrent par exemple que chez le Pois la valine et l'isoleucine sont nécessaires (RAY, 1984 ; SCHEEL et CASSIDA, 1985), que par contre chez le Soja c'est la valine et la leucine qui sont indispensables (SCHEEL et CASSIDA, 1985), alors que pour *Escherichia coli* l'isoleucine seule convient (SCHEEL et CASSIDA, 1984).

Nos résultats s'inscrivent dans ce contexte et permettent de déduire que chez *Cichorium intybus* L. var. Witloof, le chlorsulfuron agit probablement sur l'AHAS. Les Sulfonylurées agissent donc : en tant qu'inhibiteurs d'une cible unique et s'expriment au cours de la phase cellulaire pendant laquelle s'exerce la pression de sélection, ce qui répond parfaitement à nos exigences de départ.

Ce travail de sélection fut réalisé, à partir de suspensions cellulaires issues de cotylédons provenant d'une population de Chicorées fournie par les Etablissements HOQUET. Nous avons répété ce procédé par la suite, avec un matériel constitué de lignées parentales d'hybrides commerciaux présentant un intérêt agronomique supérieur.

4.3) LES CULTURES CELLULAIRES

La technologie habituellement mise en place dans les méthodes de screening *in-vitro* s'appuie le plus souvent sur l'utilisation de cultures cellulaires haploïdes (BOURGAIN, 1978). Un tel procédé est avantageux car il autorise :

- l'expression de gènes récessifs et augmente de ce fait les probabilités d'isolement de mutants.
- l'obtention (après doublement chromosomique) d'individus homozygotes résistants, sans passer par le stade de l'autofécondation toujours délicat chez *Cichorium intybus* L. var. Witloof.

Ne possédant pas de matériel haploïde, nous n'avons pas envisagé d'effectuer des traitements mutagènes. En effet ces derniers, en plus de la mutation désirée, avaient déjà induit (dans le cadre d'une sélection de résistants aux Sulfonilurées), de nouvelles propriétés pénalisantes:

- une diminution de rendement chez *Brassica napus* L. pour les plantes régénérées (SWANSON et al., 1987)

- ou par exemple la perte de la totipotence cellulaire chez *Datura innoxia* (SAXENA et KING, 1988)

C'est pourquoi nous avons décidé d'exploiter la variabilité naturelle de cultures cellulaires issues d'explants diploïdes. Cette technique, hasardeuse il est vrai tant les chances d'isolement de mutant semblent faibles, n'est pas sans poser un problème de fond. En effet si nous réussissons à isoler facilement des cellules résistantes; il serait alors tout à fait concevable que sous une forte pression de sélection, des adventices résistantes puissent apparaître dans les cultures.

L'établissement de suspensions cellulaires organogènes chez *Cichorium intybus* L. var. Witloof ayant déjà été réalisé (DUBOIS et al., 1989), nous avons décidé d'utiliser cette technique afin de produire rapidement (repiquages tous les 15 jours) une masse cellulaire importante. Ces suspensions volontairement hétérogènes étaient constituées de cellules indifférenciées et de micro cals présentant généralement des phénomènes de néotrachéogénèse (organisation cellulaire nécessaire à la néoformation ultérieure de bourgeons). Les cals, après une filtration grossière, étaient alors susceptibles d'être déposés sur un milieu de sélection tout en conservant des propriétés organogènes.

La manière dont nous exerçons la pression de sélection est aussi à considérer. Nous avons décidé de l'appliquer d'emblée, en une fois (mais avec la possibilité d'effectuer plusieurs subcultures sur le milieu de screening) et dans des conditions déterminant une inhibition totale nécrosant les cellules de type sauvage. Cependant nous aurions pu l'exercer graduellement, par palier, en augmentant par exemple la concentration de l'inhibiteur au cours des repiquages successifs de souches cellulaires de plus en plus résistantes. Néanmoins Cette seconde méthode n'était pas souhaitable car elle augmentait les manipulations *in-vitro* et favorisait peut être l'obtention de génotypes résultants de phénomènes d'amplifications géniques, difficilement exploitables par le sélectionneur.

4.4) ISOLEMENT DE SOUCHES ORGANOGENES

4.4.1) SOUCHES R6, R8 ET R11

Utilisant des suspensions cellulaires issues d'une population de Chicorées, 3 souches "R6", "R8" et "R11" furent d'abord isolées. Elles présentaient toutes trois un index d'inhibition de 50 % (DI 50), que pour des doses d'herbicide 10 à 20 fois supérieures à celle induisant un effet semblable chez des cellules sensibles (suspension cellulaire utilisée pour la sélection). Cependant, l'une d'entre elles ("R11") avait le défaut de ne pas être chlorophyllienne en présence d'herbicide.

Bien qu'obtenues sur un milieu de culture différent, ces trois souches semblaient posséder les mêmes caractéristiques d'inhibition (face à des doses croissantes de chlorsulfuron), que les proliférations cellulaires de Tabac issues d'individus hétérozygotes résistants de type [S4/+], (CHALEFF et RAY, 1984).

Il fut possible de provoquer la néoformation de bourgeons à partir de ces souches puis de cloner les plantes obtenues. Cependant aucune organogénèse ne put être réalisée en présence de chlorsulfuron, ce qui semblait déjà limiter la notion de résistance. Il paraissait inconcevable, en admettant qu'il y ait résistance, que la présence d'herbicide puisse empêcher le déroulement normal d'un processus de différenciation. Néanmoins nous ne savions pas si les plants de Tabac résistants précédemment obtenus (CHALEFF et RAY, 1984) avaient été néoformés sur des milieux contenant de l'herbicide, c'est pourquoi nous avons décidé de poursuivre nos expérimentations. Les plantes régénérées à partir de ces trois souches subirent alors un processus d'autofécondation, de façon à vérifier leur fertilité et à savoir si elles transmettaient sexuellement ce caractère dans leur descendance.

Se posait alors la question de la méthode qu'il allait falloir utiliser afin d'effectuer un screening sur la descendance des plantes sélectionnées. Bien que le chlorsulfuron soit une molécule largement employée en prélevée et parce que nous ne connaissions pas les taux de germination des diverses descendance, nous avons préféré l'utiliser en traitement foliaire, procédé qui nous permettait de contrôler l'action de l'herbicide sur des plantules déjà en place. Nous avons pour cela déterminé la dose qui appliquée par pulvérisation foliaire à un stade précis de développement (deux cotylédons + une feuille de 1 cm) nécrosait ou inhibait sévèrement la croissance de plantules sensibles. Nous avons ensuite appliqué ce traitement à la descendance des plantes sélectionnées R6, R8 et R11 ainsi qu'à des plantules issues de la population d'origine utilisée pour créer les suspensions cellulaires.

Nous observons (un mois après le traitement herbicide) que la descendance des plantes:

- témoins est inhibée dans son développement mais présente aussi (selon les individus) des phénomènes de nécrose.
- "R8" et "R6" continue à se développer, plus faiblement toutefois que des plantules témoins non traitées.
- "R11" se comporte comme une population sensible.

Il convient alors de se rappeler qu'au niveau cellulaire (§ 3.3.1.1) la DI 50 de la souche "R11" était inférieure à celles des deux autres, l'expression de cette différence se serait donc conservée dans la descendance.

Le type de ségrégation de cette résistance, exprimée par les individus "R8" et "R6" est abordé dans ce travail. Bien qu'il soit délicat de définir des classes où l'on puisse ranger les différents phénotypes (surtout lorsque l'expression de cette aptitude est faible), nous avons lors de premiers essais, trié arbitrairement les plantules.

- Premièrement, lors d'un croisement avec une plante "448", deux classes d'individus avaient été observées
- Deuxièmement, lors de l'autofécondation des plantes "R8", trois classes pouvaient être séparées

Dans les deux cas un test X^2 permettait d'accepter l'hypothèse de la ségrégation d'un seul gène à deux allèles codominants à l'état hétérozygote. Cependant ce résultat est à relativiser, puisque cette analyse ne porte que sur de faibles quantités d'akènes.

Cette première étude démontre cependant qu'il est possible de sélectionner à partir de techniques *in-vitro*, des cellules supportant l'herbicide d'un milieu de screening, puis des plantes capables de transmettre cette propriété. L'effet dépressif de l'herbicide sur les individus "R8" et "R6" issus d'autofécondation, s'explique peut être par le fait que les souches cellulaires initialement sélectionnées présentaient une résistance de nature différente. Nous pourrions en effet émettre l'hypothèse qu'il ne s'agit pas d'une mutation de la cible biochimique (l'AHAS), mais au contraire d'un phénomène lié soit à une faible détoxification de l'inhibiteur ou à une différence perméabilité cellulaire envers ce dernier.

Nous n'avons pas continué nos investigations, car nous avons déjà réorienté nos travaux et commencé à nouveau un processus de sélection à partir de cultures cellulaires issues de lignées.

4.4.2) SOUCHE R1 OK

Isolée à partir d'une suspension cellulaire provenant d'une plante homozygote, elle se caractérise par le fait que sa DI 50 est 1000 fois supérieure à celle d'une souche sensible (suspension cellulaire d'origine) et qu'elle conserve 13 % de sa croissance initiale (exprimée sur un milieu sans herbicide) en présence de 14 000 nM de chlorsulfuron. Ce résultat n'est aucunement comparable à ce qui a été préalablement obtenu avec les souches "R6", "R8" et "R11". De par sa valeur, il rejoint les résultats observés sur des mutants [S4hra/S4] isolés à partir de cultures cellulaires de Tabac, mutants ayant ensuite régénéré des plantes sur lesquelles une application d'herbicide (à la dose normale d'emploi aux champs) ne donne lieu à aucun effet dépressif (CREASON et CHALEFF, 1988).

Bien que ce qui touche la photosynthèse (ou tout autre fonction non vitale *in-vitro*) ne suive pas cette règle, nous savons qu'en général les mutations affectant la biosynthèse des acides aminés, les mécanismes de perméabilité ou de résistance aux agents pathogènes, toxines ou inhibiteurs s'expriment aussi bien en cultures cellulaires que chez les plantes issues de ces cultures. Le fait que cette propriété se soit conservée puis exprimée dans les tissus différenciés des plantes régénérées à partir de la souche "R1 OK" (tout comme cela fut rendu possible avec les souches "R6" et "R8"), semble indiquer qu'il puisse en être de même avec sa descendance. Il convient aussi de préciser que cette souche, contrairement à "R8", "R6" et "R11", est apte à néoformer des bourgeons en présence d'une dose d'herbicide supérieure à celle d'un milieu de sélection (560 nM de chlorsulfuron).

L'étude de la ségrégation de ce caractère pourrait s'effectuer simplement, en analysant à la fois le comportement:

- de plantes provenant de la germination d'akènes issus d'autofécondations
- de celles résultant des croisements réciproques avec la lignée utilisée pour créer la suspension cellulaire, dont est issue la souche "R1 OK".

Nous devrions néanmoins, de façon à éliminer toute variation génétique causée par la phase de culture *in-vitro* et avant que de chercher à quantifier véritablement la mutation, réaliser un programme de Backcross.

Le terme de mutant ne pouvant s'appliquer qu'aux phénotypes pour lesquels une analyse génétique ou au moins biochimique aura été effectuée, seule l'étude de la descendance permettra de vérifier si nous sommes bien en présence d'une mutation. Un tel caractère, puisque fixé sur une lignée aurait la propriété d'être plus rapidement exploitable par les sélectionneurs.

Ce travail d'analyse ne pourra néanmoins se substituer à celui qu'il faudra effectuer "aux champs". En effet le moment et le type de traitement employé ainsi que le comportement final des plantes au forçage, sont autant d'inconnues qui nécessiteront des études ultérieures.

4.5) CONCLUSION

La population de Chicorées des Etablissements HOQUET nous a permis de tester la méthode de screening, d'en vérifier l'efficacité et de démontrer qu'il était possible de transmettre sexuellement une résistance aux Sulfonylurées préalablement sélectionnée *in-vitro*.

Néanmoins ce choix de "départ" ne fut pas judicieux. En effet cette population, extrêmement hétérogène, supportant mal un système d'autofécondation, n'était pas génétiquement intéressante. Nous avons, lors d'une récente visite, remarqué qu'il apparaissait quelquefois dans la descendance de plantes autofécondées (issues d'une sélection massale) des phénotypes "déficients" pouvant constituer 25 % de la F1 et résultant peut être de l'expression d'un gène récessif létal. Phénomène, qui ajouté à l'effet de l'herbicide, pourrait avoir faussé nos résultats.

Heureusement, l'utilisation de suspensions issues de lignées homozygotes autofertiles et dont les potentialités génétiques étaient parfaitement connues, nous a permis d'isoler une souche dont la résistance au chlorsulfuron avoisine celle obtenue chez des mutants de type [S4hra/S4] chez le Tabac. Mutants qui à ce jour n'expriment aucun effet "dépressif" après traitement herbicide (CREASON et CHALEFF, 1988).

Cette souche, si l'on se réfère aux résultats obtenus avec la descendance "R8", devrait nous permettre d'obtenir une descendance exprimant aux champs une résistance de loin supérieure. En effet, les masses moyennes de matière fraîche par plantes obtenues pour les trois classes de la descendance "R8" étaient respectivement d'environ 500, 1000 et 1500 mg alors que celles des témoins avoisinaient 500mg. Ces résultats laissent apparaître au niveau de la croissance des plantes un rapport résistants/sensibles compris entre 2 et 3 donc une résistance double ou triple. Or cette valeur résulte de l'expression de plantes issues de souches cellulaires dont les DI 50 étaient de 10 à 20 fois supérieures à celle de cellules sensibles. En admettant qu'il y ait une relation entre ces deux valeurs, la DI 50 de "R1 OK" étant 1000 fois supérieure à celle de son témoin, nous devrions observer aux champs une expression bien plus prononcée de la résistance (peut être 50 à 100 fois plus).

Nous pouvons en déduire, en raison de la variabilité présente dans l'explant de départ et induite au cours des phases de culture *in-vitro* ainsi que de la taille des populations cellulaires et du fait que la cible biochimique soit unique, qu'il n'est pas toujours indispensable de faire appel à des agents mutagènes. La variabilité liée aux cultures cellulaires hétérogènes à croissance rapide convient donc parfaitement au procédé de sélection utilisé pour les Sulfonylurées. Il serait possible de l'appliquer à d'autres herbicides, à condition de vérifier que la cible biochimique de l'inhibiteur employé soit unique et fonctionnelle sous une forme mutée.

Le seul handicap propre à cette technique est que les cellules résistantes, incluses dans un cal, affrontent à la fois l'effet de l'herbicide, mais aussi celui de toxines larguées dans le milieu de culture par les tissus nécrosés. Bien que nous ayons cherché à limiter la densité des cellules et cals sur le milieu de sélection, l'effet de ces toxines aura vraisemblablement diminué la probabilité de sélectionner un plus grand nombre de souches en entraînant leur mort au cours de ce travail.

Le fait d'avoir isolé deux types de souches cellulaires peut nous inciter à nous demander si nous n'avons pas plutôt sélectionné deux types de résistances:

- La première exprimée par des cellules dont les DI 50 seraient de 10 à 20 fois supérieures à celles de souches sensibles, pourrait reposer sur:
 - un phénomène d'amplification du gène de l'AHAS
 - le dérèglement d'un système de répression entraînant une surproduction de l'AHAS
 - une légère détoxification de l'herbicide
 - une différence de perméabilité cellulaire au chlorsulfuron, entre souches sensibles et résistantes.

Ce qui expliquerait les difficultés liées à la néoformation de plantes en présence d'herbicide ainsi que la faible résistance de ces cellules.

- La seconde exprimée par la souche "R1 OK" serait véritablement liée à la modification de la cible de l'herbicide et nécessite donc, comme indiqué précédemment, la vérification de la transmission sexuelle de ce caractère et son type de ségrégation.

De nombreux auteurs accordent à l'AHAS une propriété remarquable. Cette enzyme semble pouvoir présenter des formes altérées insensibles aux Sulfonyleurées tout en gardant un fonctionnement normal non pénalisant pour la plante ou les cultures cellulaires concernées (CHALEFF, 1988). Nous confirmons une fois encore cette hypothèse; en effet toutes les souches résistantes sélectionnées se comportent, lorsqu'elles sont placées en dehors de toute pression de sélection, comme des souches témoins.

Nous savons maintenant, que les causes d'apparition d'une résistance aux Sulfonyleurées résident généralement dans la substitution d'acides aminés au sein de la protéine constituant l'AHAS. C'est pourquoi nos résultats, si la résistance des individus "R1 OK" s'exprime parfaitement, peuvent justifier l'étude au plan moléculaire et enzymatique de cette nouvelle propriété, afin d'en élucider les mécanismes.

Nous avons commis pendant cette étude quelques erreurs, qu'il faudrait à tout prix éviter dans de futurs travaux:

- Les Sulfonyleurées sont des herbicides à action lente, c'est pourquoi il serait plus judicieux d'en vérifier les effets, non pas au bout de 4 semaines comme le préconisait CHALEFF (1984), mais après un temps plus long. Cette technique permettrait peut être d'observer des écarts plus importants entre des individus sensibles et résistants.

- Nous aurions peut être dû utiliser le GLEAN comme un herbicide de prélevée, plutôt qu'en application foliaire et le fait d'avoir détourné son utilisation a peut être joué en notre défaveur. Nous pouvons en effet imaginer que les adjuvants présents dans le produit commercial n'étaient pas spécifiquement prévus pour un tel mode d'action.

- Dans le cas où il serait envisagé de réaliser une autre sélection de cellules résistantes chez *Cichorium intybus* L. var. Witloof, il conviendrait de ne travailler qu'avec des lignées homozygotes. En effet, malgré une plus faible variabilité de départ, nous n'aurions plus à affronter les phénomènes de pseudo-auto-incompatibilité qui pénalisèrent cette étude et nous pourrions alors nous servir, comme élément de comparaison, de témoins homogènes et non plus d'une population.

De nouveaux produits, récemment commercialisés, inhibent eux aussi l'AHAS et seraient susceptibles d'être utilisés dans le but de sélectionner d'autres mutants chez *Cichorium intybus* L. var. Witloof. Il s'agit de nouvelles molécules issues des Sulfonylurées ou des Imidazolinones mais aussi de familles comme les Triazolo pyrimidines ou les Sulphonanilides, qu'il nous est pour l'instant impossible de nous procurer sous des formes purifiées exploitables *in-vitro*. Il serait envisageable de vérifier, qu'une résistance faible pour un herbicide donné puisse se révéler intéressante pour un autre (CHALEFF, 1988 ; SAXENA et KING, 1988). Puisque des souches "R6", "R8", "R11" et "R1 OK" encore organogènes sont conservées au laboratoire, nous pourrions régénérer des plantes afin d'induire de nouvelles cultures cellulaires susceptibles d'être testées avec ces différents herbicides.

Lorsqu'il semble impossible d'obtenir une résistance par le biais d'une mutation isolée à partir des cultures cellulaires, le procédé de sélection utilisé dans cette étude cède la place à de nouvelles méthodes plus coûteuses. Bon nombre de firmes ou de laboratoires préfèrent alors isoler des gènes de résistance ou induire des mutations dans un matériel "étranger" (bactéries, levures, champignons et végétaux) afin d'essayer de les introduire et de les faire s'exprimer dans des plantes à hautes valeurs agronomiques. Il est maintenant possible d'acheter ou de se procurer quelque uns de ces gènes, nous pourrions donc concevoir l'utilisation de techniques de transformation chez *Cichorium intybus* L. var. Witloof dans le cadre d'un autre programme de sélection.

Il nous faut revenir sur le fait qu'il nous ayons sélectionné sans trop de difficulté et sans mutagénèse 4 souches cellulaires résistantes, or ce qui a été réalisé *in-vitro* doit pouvoir se répéter assez facilement aux champs. Le chlorsulfuron est malheureusement un produit persistant, effectuant une longue pression de sélection sur les adventices, il n'est donc pas étonnant qu'il existe déjà des mauvaises herbes résistantes aux Sulfonylurées (GASQUEZ I.N.R.A. Dijon, communication personnelle). La perte d'efficacité de ces herbicides ne pourra alors être palliée, que par :

- des rotations culturales appropriées permettant de diversifier les herbicides utilisés (ce qui n'est pas toujours, techniquement ou économiquement réalisable).
- l'introduction de plusieurs résistances dans une même plante, par croisements traditionnels ou par utilisation des techniques de transformation des végétaux (autorisant alors les traitements herbicides croisés).

Méthodes qui dans les deux cas permettraient d'éviter la sélection de plantes adventices résistantes.

Toutefois, en dehors de toute considération d'ordre économique, cette observation a le mérite de poser le problème de l'utilisation à grande échelle d'une culture possédant un seul type de résistance. Les futures contraintes agronomiques sous-jacentes nous incitent à penser, qu'il vaudrait peut être mieux essayer d'introduire deux gènes de résistance dans une plante avant que de commercialiser ses semences. Cette démarche est cependant des plus délicates, puisqu'elle nécessiterait l'insertion, dans une même variété, de gènes de résistance détenus par des firmes phytosanitaires concurrentes.

Nous pouvons nous demander si l'obtention de plantes résistantes aux herbicides n'est pas plus une démonstration de ce que l'on arrive à réaliser dans le domaine des biotechnologies, qu'une nécessité. En effet, la plupart des grandes cultures possèdent déjà des herbicides qui leur soient sélectifs et le problème majeur est plutôt celui des rotations culturales en présence d'herbicides persistants. Les plus grands trusts réunissant à la fois les entreprises phytosanitaires et celles de production de semences, il est aisé de concevoir que la recherche de plantes résistantes répond plutôt à une stratégie économique normale. Le marché des semences, dans les années à venir, s'enrichira de variétés présentant des améliorations "technologiques". Variétés qu'il conviendra peut être d'utiliser rationnellement, selon les caractéristiques de l'herbicide pour lequel elles auront été "programmées".

Dans le cas où la mutation affectant les souches cellulaires R1 OK s'exprimerait efficacement au niveau des plantes, nous pourrions envisager de supprimer le sarclage manuel et de contrôler les dicotylédones dans la culture endivière par un désherbage chimique.

L'introduction de ce gène par des croisements traditionnels étendrait l'utilisation des Sulfonylurées à la fois pour d'autres cultivars ou lignées de la variété "Witloof", mais aussi à d'autres Chicorées. Démarche, qui ajouterait à cette étude un aspect scientifique certes intéressant, mais surtout des prolongements économiques non négligeables.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON (P.C.) and GEORGESON (M.),1986._Selection and caractérisation of imidazolinone tolerant mutants of Maize. The biochemical basis of herbicide action. Twenty seventh harden conference programme and abstracts. Wye college, Ashford, united Kingdon.
- ANDING (C.) and GORE (N.),1986._Les voies de biosynthèse, cible des herbicides.Biofutur,46:49-54.
- BANNEROT (H.) et DE CONINCK (B.),1984_Le progrès génétique chez l'endive en france. Développements récents.Proc. Eucarpia Meeting on Leafy Vegetables.Versailles.p.115-122
- BISTER-MIEL (F.), GUIGNARD (J.-L.), BURY (M.) and AGIER (J.), 1985._ Glutamine as an active component of caseine hydrolysate: its balancing effect on plant cells cultured in phosphorus deficient medium. Plant Cell Reports,4:161-163.
- BOURGAIN (J.P.),1978._ Isolement de mutants à partir de cellules végétales in-vitro. Physiol. Vég.,3:339-351.
- BRYAN (J.K.),1980._Synthesis of the aspartate family and branched chain amino acids. The biochemistry of plants. B.J. Mifflin editor Academic press I.N.C. 111 fith avenue New York.,5:403-452
- CHALEFF (R.S.) and MAUVAIS (C.J.),1984._Acetolactate synthase is the site of action of two Sulfonylurea herbicide in higher plants. Science, 224:1443-1445.
- CHALEFF (R.S.) and RAY (T.B.) ,1984._Herbicide-resistant mutants from Tobacco cell cultures. Science,223:1148-1151.
- CHALEFF (R.S.),1988._ Herbicide-resistant plants from cultured cells. p3-20. from: application of plant cell and tissue culture (CIBA FOUNDATION) . ed by John Wiley & Sons Ltd, Baffin lane, CHICHESTER SUSSEX PO 19 1UD, UK.
- COLANDUONI (J.A.) and VILLAFRANCA (J.J.),1986._Inhibition of *Escherichia coli* glutamine synthétase by phosphinotricin. Bioorganic chemistry,14:163-169.
- COMAI (L.), SEN (L.C.) and STALKER (D.M.),1983._An altered *aroA* gene product resistance to the herbicide glyphosate. Science,221:370-371.
- COMAI (L.), FACCIOITTI (D.), HIATT (W.R.), THOMPSON (G.), ROSE (R.E.) and STALKER (D.M.),1985._Expression in plants of a mutan *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confere tolerance to glyphosate. Nature,317:741-744.

- COPPENS d'EECKENBRUGGE (G.), GOBBE (J.) et EVRARD (B.), 1987. Mécanismes de la reproduction chez la Chicorée de Bruxelles: fondements et applications à la sélection. ed. I.R.S.I.A. 6, rue de Crayer 1050 BRUXELLE.
- CREASON (G.L.) and CHALEFF (R.S.), 1988. A second mutation enhance resistance of a Tobacco mutant to Sulfonylurea herbicides. Theor. Appl. Genet., 76:177-182
- DAS SARMAS (S.), TISHER (H.) and GOODMAN (H.M.), 1986. Plant Glutamine synthetase complement a glnA mutation of Escherichia coli. Science, 232:1242-1244.
- DE BLOCK (M.), BOTTERMAN (J.), VANDEWIELE (M.), DOCKX (J.), THOEN (C.), GOSSELE (V.), MOVVA (N.R.), THOMPSON (C.), VAN MONTAGU (M.) and LEEMANS (J.), 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. EMBO journal, 9:2513-2518.
- DE FELICE (M.), LAGO (C.T.), SQUIRES (C.H.) and CALVO (J.M.), 1982. Acetohydroxy acid synthase isoenzymes of Escherichia coli K12 and Salmonella typhimurium. Ann. microbiol. (inst. Pasteur), 133A:251-256
- DONN (G.), TISCHER (E.), SMITH (J.A.) and GOODMAN (H.M.), 1984. Herbicide resistant Alfafa cells: an example of gene amplification in plants. J. of Mol. and appl. gen., 2:621-635.
- DUBOIS (J.), DROUJININSKI (A.) et VASSEUR (J.), 1989. Croissances et potentialités organogènes de suspensions cellulaires de Cichorium intybus L. var. Witloof. Soc Bot Fr (in press)
- EOYANG (L.) and SILVERMAN (P.M.), 1984. Purification and subunit composition of acetohydroxyacid synthase I from Escherichia coli K-12. J. of Bacteriol., 157:184-189.
- FALCO (S.C.) and DUMAS (K.S.), 1984. Genetic analisys of mutants of Saccharomyces cerevisiae resistant to the herbicide sulfometuron methyl. Genetic, 109:21-35.
- FILLATI (J.J.), KISER (J.), ROSE (R.) and COMAI (L.), 1987. Efficient transfer of a glyphosate tolerant gene into Tomato using a binary Agrobacterium tumefaciens vector. Biotechno 5-7:726-30.
- FRALEY (R.), KISHORE (G.), GASSER (C.), PADGETTE (S.), HORSCH (R.), ROGERS (S.), DELLA-CIOPPA (G.) and SHAH (D.), 1987. Genetically-engineered herbicide tolerance - Technical and commercial consideration. British crop protection conference-Weeds, 5-1:463-471.
- HAUGHN (G.W.) and SOMERVILLE (C.), 1986. Sulfonylurea resistant mutant of Arabidopsis thaliana. Molecular and general genetics. 204:430-434.

- HELLER (R.), 1953. Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in-vitro*. Ann. Sci. Nat. Biol. Vég., 14:1-223.
- HOAGLAND (R.E.) and DUKE (S.O.), 1982. Biochemical effect of glyphosate [N-(Phosphonomethyl)Glycine]. American chemical society, symp. series, 181:175-205.
- HUTCHINSON (J.M.), SHAPIRO (R.) and Sweetser (P.B.), 1984. Metabolism of chlorsulfuron by tolerant broadleaves. Pest. Biochem. and Physio., 22:243-247.
- JACOB (G.S.), SCHAEFER (J.), STEJSKAL (E.O.) and McKAY (R.), 1985. Solid-state NMR Determination of Glyphosate Metabolism in a *Pseudomonas* sp. The Journal of Biological Chemistry vol 260, 10:5899-5905.
- JENSEN (R.A.), 1986. The shikimate/arogenate pathway/ link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. Physiol. plant., 66:164-168.
- JONES (A.V.), YOUNG (R.M.) and LETO (K.), 1985. Subcellular localisation and properties of acetolactate synthase, target site of the Sulfonylurea herbicides. Plant physiol. (supplément). 77:55.
- KHÖHLER (W.), SCHACHTEL (G.) und VOLESKE (P.), 1984. Der Grenzdifferenzen-test (LSD test). p155-157 Von Biometrie Einführung in die statistik für Biologen und Agrarwissenschaftler , ed bei Neuman und al. Springer BERLIN HEIDELBERG.
- KRITON (K.), HATZIO and PENNER (D.), 1980. Localizing the action of two thiadiazolyl herbicidal derivatives. Pest. Biochem. and Physiol., 13:237-243.
- RHODES (D.), HOGAN (A.L.), DEAL (L.), JAMIESON (G.C.) and HAWORTH (P.), 1987. Amino acid metabolism of *Lemna minor* L. II. responses to Chlorsulfuron. Plant Physiol., 84:775-780.
- La ROSSA (R.) and FALCO (S.C.), 1984. Amino acid biosynthetic enzyme as target of herbicide action. Trend in biotech., 6:158-161
- La ROSSA (R.) and SCHLOSS (J.V.), 1984. The Sulfonylurea herbicide Sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate syntase in *Salmonella typhimurium*. J. of Bio. Chem., 14:8753-8757.
- La ROSSA (R.) and SMULSKI (D.R.), 1984, ilvB-Encoded acetolactate synthase is resistant to the herbicide Sulfometuron Methyl. J. of Bacteriol., 160:391-394.
- LEASON (M.), CUNLIFFE (D.), PARKIN (D.) LEA (P.J.) and MIFLIN (B.J.), 1982. Inhibition of Pea leaf glutamine synthetase by methionine sulphoximine, phosphinotricin and other glutamates analogues. Phytochem., 4:855-857.

- LEE (K.Y.), TOWNSEND (J.), TEPPERMAN (J.), BLACK (M.), CHUI (C.F.), MAZUR (B.), DUNSMUIR (P.) and BEBBROOK (J.), 1988. The molecular basis of Sulfonylurea herbicide resistance in tobacco. The EMBO journal, 7:1241-1248.
- MOORE (J.K.), BRAYMER (H.G.) and LARSON (A.L.), 1983. Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilizes the phosphonate herbicide glyphosate. Applied and Environmental Microbiology, 2:316-320.
- MUHITCH (M.J.), SHANER (D.L.) and STIDHAM (M.A.), 1987. Imidazolinones and acetohydroxyacid synthase from higher plants. Plant physiol., 83:451-456.
- MURASHIGE (T.) et SKOOG (F.), 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15:473-497.
- RAY (T.B.), 1981. The mode of action of Chlorsulfuron: a new herbicide for cereals. Pest. Biochem. and Physio., 17:10-17.
- RAY (T.B.), 1982. The mode of action of Chlorsulfuron: the lack of direct inhibition of plant DNA synthesis. Pest. Biochem. and Physio., 18:262-266.
- RAY (T.B.), 1984. Site of action of Chlorsulfuron, inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. Plant Physiol., 75:827-831.
- RAY (T.B.), 1986. Sulfonylurea herbicides as inhibitor of amino acid biosynthesis in plants. Trends Biochem Sci., 11:180-183.
- RUBIN (J.L.), GAINES (C.G.) and JENSEN (R.A.), 1984. Glyphosate inhibition of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from suspension-cultured cells of *Nicotiana glauca*. Plant physiol., 75:839-845.
- SAXENA (P.K.) and KING (J.), 1988. Herbicide resistance in *Datura innoxia*. Plant Physiol, 86:863-867.
- SCHEEL (D.) and CASSIDA (J.E.), 1984. Sulfonylurea herbicides: Growth inhibition in Soybean cell suspension cultures and in bacteria correlated with block in biosynthesis of valine, leucine, or isoleucine. Pest. Biochem. and Physio., 23:398-412.
- SCHEEL (D.) and CASSIDA (J.E.), 1985. Acetohydroxyacid synthase inhibitors as herbicides., p344-355. from: Primary and secondary metabolism of plant cell culture, ed by Neuman and al. Springer Verlag BERLIN HEIDELBERG.
- SCHLOSS (J.V.), VAN DYK (D.E.), VASTA (J.F.) and KUTNY (R.M.), 1985. Purification and properties of *Salmonella typhimurium* acetolactate synthase isozyme II from *Escherichia coli* HB101/pDU9. Biochem., 24:4952-4959.

- SEBASTIAN (S.A.) and CHALEFF (R.S.),1987._Soybean mutants with increased tolerance for Sulfonylurée herbicides.Crop Science,27:948-952.
- SHANER (D.L.), ANDERSON (P.C.) and STIDMAN (M.A.), 1984._Imidazolinones potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. Plant physiol.,76:545-546.
- SOKAL (R.R.) and ROHLF (F.J.),1980._ BIOMETRY The principles and practice of statistics in biological research. Second ed. by W.H. FREEMAN and company, San FRANCISCO.
- STALKER (D.M.), HIATT (W.R.) and COMAI (L.),1985._A single amino acid substitution of the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. J. of bio. chem.,260:4724-4728.
- STEINRUCKEN (H.C.)and AMRHEIN (N.),1980._The herbicide Glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate acid-3-phosphate synthase. Biochem. and biophys. res. comm.,94:1207-1212.
- SWANSON (E.P.), COUMANS (M.P.), BROWN (G.L.), PATEL (J.D.) and BEVERSDORF (W.D.),1988._The characterization of herbicide tolerant plants in *Brassica napus* L. after *in-vitro* selection of microspores and protoplasts.Plant Cell Reports,7:83-87.
- SWEETSER (P.B.), SHOW (S.G.) and HUTCHINSON (J.M.),1982. Metabolism of Chlorsulfuron by plants: Biological basis for selectivity of a new herbicide for cereals. Pest. Biochem. and Physio.,17:18-23.
- THOMPSON (C.J.), MOVVA (N.R.), TIZARD (R.), CRAMERI (R.), DAVIES (J.E.), LAUWEREYS (M.) and BOTTERMAN (J.),1987._Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. EMBO journal,9:2519-2523
- WEEK (R.C.),HAUSER (C.A.) and HATFIELD (G.W.),1985._The nucleotide sequence of the *ilvBN* operon of *Escherichia coli* :sequence homologies of the acetohydroxy acid synthase isosymes. Nucleic Acids research,13:3995-4010.
- YADAV (N.), McDEVITT (R.E.), BENARD (S.) and FALCO (S.C.),1986._Single amino acid substitution in the enzyme acetolactate synthase confer resistance to the herbicide sulfometuron methyl.Proc. Natl. Acad. Sci. USA,83:4418-4422.

RESUME

A partir de diverses suspensions cellulaires de *Cichorium intybus* L. var. Witloof n'ayant pas subi de traitement mutagène, nous avons isolé, en utilisant la variabilité induite par les cultures *in-vitro*, plusieurs souches de cellules résistantes au chlorsulfuron (matière active d'un herbicide de la famille des Sulfonylurées).

Ayant défini un milieu de sélection contenant 28 nM de chlorsulfuron, nous avons vérifié qu'il était possible de réverser l'action inhibitrice de cette molécule sur la voie de biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée. En effet un simple ajout dans le milieu de sélection de valine et d'isoleucine supprime l'action de l'herbicide. Nous avons étalé des suspensions de 14 jours sur ce milieu de sélection, puis prélevé au bout de 3 à 4 semaines de culture les cals viables et répété cette opération jusqu'à la nécrose totale des cellules ou l'apparition de souches résistantes.

Par ce biais, nous avons isolé 4 souches cellulaires organogènes dont la croissance n'est inhibée de 50 % qu'avec des concentrations en herbicide de 10 à 1000 fois supérieures à celles produisant un effet identique sur une souche non sélectionnée. L'analyse de la descendance des plantes provenant de ces souches résistantes est en cours.

MOTS CLES : *Cichorium intybus*, Cultures in-vitro, Suspensions, Herbicide, Sulfonylurées, Chlorsulfuron, Sélection, Résistance.

ABSTRACT

Several mutant resistant to the sulfonylurea herbicides were isolated from non mutagenised cell suspensions of *Cichorium intybus* L. var. Witloof.

After setting up a screening medium using chlorsulfuron at 28 nM and reversing the herbicide effect by adjonction of the appropriate branched-chain amino acids (valine and isoleucine), we started a selection process by plating 14 days cell suspensions on the screening medium. Surviving cell lines were picked up after 3 to 4 weeks and replaced on the same medium till complete necrosis or appearance of any callus proliferation.

We selected 4 cell lines, witch proliferations were only 50 % inhibited by media containing 10 to 1000 times more herbicide that medium inducing the same growth inhibition on control cells. Plants regenerated from the higher resistant cell lines are under investigations.