N° d'ordre : 785

LANCCEID



67742 50376 1991 226

THESE

présentée

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Claudine SELLIN

RECHERCHE DE CHICOREES A CAFE (Cichorium intybus L. var Magdebourg) RESISTANTES AUX HERBICIDES (GLYPHOSATE ET GLUFOSINATE) PAR CULTURES CELLULAIRES

Soutenue le 13 novembre 1991 devant la Commission d'Examen

M. J. VASSEUR	Professeur, Université de Lille I	Président
M. J. GASQUEZ	Directeur de Recherche, Laboratoire de Malherbologie	Rapporteurs
	I.N.R.A 21000 Dijon	
M. E. NIELSEN	Directeur de Recherche, Laboratoire de Génétique et	
	Microbiologie, Université de Pavie, Italie	
M. J. DUBOIS	Maître de Conférences, Univervité de Lille I	
M. M. DESPREZ	Ingénieur Agronome, Directeur des Etablissements	Examinateurs
	Florimond Desprez, Capelle en Pévèle	
M R. BOURIQUET	Professeur Emérite, Université de Lille I	

A MA FAMILLE



Ce travail a été réalisé grâce à la collaboration entre le Laboratoire de Physiologie de la Différenciation et des Biotechnologies végétales de Lille I, l'Interprofession de la Chicorée (59800 LILLE) et les Etablissements Florimond Desprez (Cappelle, 59242 TEMPLEUVE).



Je remercie Monsieur le Professeur Jacques VASSEUR, Président du jury, de m'avoir accueillie dans son laboratoire pour effectuer cette étude. Je lui sais gré de l'attention qu'il a accordé à ce travail.

Je suis très reconnaissante à Monsieur Erik NIELSEN (Université de Pavie) d'avoir bien voulu lire ce mémoire en qualité de rapporteur et d'avoir accepté que je m'initie au sein de son laboratoire au dosage de l'EPSP synthase. J'exprime ma profonde gratitude à son collaborateur Monsieur Giuseppe FORLANI qui m'a formée à cette technique enzymologique et fourni le shikimate-3-phosphate indispensable au dosage de cette enzyme.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Jacques GASQUEZ (INRA de Dijon) qui a accepté de lire cette thèse en qualité de rapporteur.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur Jean DUBOIS qui a suivi l'évolution de ce travail et qui a bien voulu être rapporteur.

Ma gratitude va aussi à Monsieur le Professeur Robert BOURIQUET et à Monsieur Michel DESPREZ, Directeur des Etablissements Florimond Desprez qui me font l'honneur d'être parmi les membres du jury de ma thèse.

Je remercie, par l'intermédiaire de son Président Monsieur Victor BOURET, l'Interprofession de la Chicorée de m'avoir chargée de cette étude. Je suis reconnaissante à ses membres, du climat de confiance qu'ils ont immédiatement instauré. Que Madame Ginette LAMPIN se sente associée à ces remerciements.

J'exprime ma profonde gratitude à Messieurs Louis DELESALLE et Charles DHELEMMES des Etablissements Florimond Desprez pour l'aide qu'ils m'ont apporté dans la réalisation de ce travail.

Je tiens également à remercier Messieurs Michel LEROUX, Michel HERMAND et Maurice BRICOUT de la Chicorée Leroux et Messieurs Pierre DEVAUX et Bruno DESPREZ des Etablissements Florimond Desprez pour l'intérêt qu'ils ont manifesté pour ces travaux.

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.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Monsieur Stephen PADGETTE de Monsanto USA pour son don de shikimate-3-phosphate et à Monsanto Europe pour leur don de glyphosate.

J'adresse enfin mes remerclements aux étudiants et au personnel technique du laboratoire qui à des titres divers ont contribué à la réalisation de ce travail.

ADP : Adénosine diphosphate

AHAS : Acétohydroxyacide synthase

AIA : Acide indolylacétique
AIB : Acide indolylbutyrique
ALS : Acétolactate synthase
ANA : Acide naphtylacétique
ATP : Adénosine triphosphate

BAP : Benzylaminopurine

DAHP synthase : 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase

EDTA : Acide éthylène diamino-tétraacétique

EPSP synthase : 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase

E4P : Erythrose-4-phosphate
GS : Glutamine synthétase

Hepes : Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineéthanesulfonique

Kin : Kinétine

MF : Matière fraîche

mRNA : Acide ribonucléique messager

P : Souche sélectionnée pour la tolérance au glufosinate

PAL : Phénylalanine ammonia-lyase

PEP : Phosphoenolpyruvate

phe : Phénylalanine

PVPP : Polyvinylpolypyrrolidone

R1 : Souche sélectionnée pour la tolérance au glyphosate R2 : Souche sélectionnée pour la tolérance au glyphosate

S : Souche sensible

S3P : Shikimate-3-phosphate

tyr : Tyrosine trp : Tryptophane

2,4-D : Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

SOMMAIRE

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 2. 1 CARACTERISTIQUES DES HERBICIDES : SPECIFICITE, SELECTIVITE, PERSISTANCE 2. 2 SELECTION DE MUTANTS PAR CULTURE IN VITRO 2. 3 HERBICIDES POUVANT ETRE UTILISES IN VITRO 2. 4 CHOIX DE L'HERBICIDE 2. 41 SULFONYLUREES 2. 42 IMIDAZOLINONES 2. 43 GLUFOSINATE ET BIALAPHOS 2. 44 GLYPHOSATE 2. 45 CONCLUSION 10 2. 5 ETUDE DU GLUFOSINATE ET DU BIALAPHOS 2. 51 INHIBITION DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 52 EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES INHIBITEURS DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 521 Symptômes visibles 2. 522 Accumulation de NH4 2. 523 Quantités d'acides aminés libres 2. 524 Photosyntèse 2. 525 Donneurs NH2 2. 526 Transport membranaire 2. 527 Conclusion 2. 533 SOUCHES RESISTANTES AU GLUFOSINATE 2. 531 Luzerne 2. 531 Luzerne 2. 532 Tabac 2. 61 MODE D'ACTION 2. 611 Absorption et transport 2. 612 Interférence avec la biosynthèse des acides aminés aromatiques 2. 613 Autres effets biochimiques et physiologiques 2. 613 PAL 2. 6132 PAL 2. 6133 AIA		Page
2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 2. 1 CARACTERISTIQUES DES HERBICIDES; SPECIFICITE, SELECTIVITE, PERSISTANCE 2. 2 SELECTION DE MUTANTS PAR CULTURE IN VITRO 2. 3 HERBICIDES POUVANT ETRE UTILISES IN VITRO 2. 4 CHOIX DE L'HERBICIDE 2. 41 SULFONYLUREES 2. 42 IMIDAZOLINONES 2. 43 GLUFOSINATE ET BIALAPHOS 2. 44 GLYPHOSATE 2. 45 CONCLUSION 10 2. 5 ETUDE DU GLUFOSINATE ET DU BIALAPHOS 2. 51 INHIBITION DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 52 EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES INHIBITEURS DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 521 Symptômes visibles 2. 522 Accumulation de NH4 2. 523 Quantités d'acides aminés libres 2. 524 Photosyntèse 2. 525 Donneurs NH2 2. 526 Transport membranaire 2. 527 Conclusion 2. 53 SOUCHES RESISTANTES AU GLUFOSINATE 2. 531 Luzerne 2. 531 Luzerne 2. 532 Tabac 2. 61 MODE D'ACTION 2. 611 Absorption et transport 2. 612 Interférence avec la biosynthèse des acides aminés aromatiques 2. 613 Autres effets biochimiques et physiologiques 2. 613 PAL 2. 6132 PAL 2. 6133 AIA	SOMMAIRE	
2. 1 CARACTERISTIQUES DES HERBICIDES : SPECIFICITE, SELECTIVITE, PERSISTANCE 2. 2 SELECTION DE MUTANTS PAR CULTURE IN VITRO 2. 3 HERBICIDES POUVANT ETRE UTILISES IN VITRO 2. 4 CHOIX DE L'HERBICIDE 2. 41 SULFONYLUREES 2. 42 IMIDAZOLINONES 2. 43 GLUFOSINATE ET BIALAPHOS 2. 44 GLYPHOSATE 2. 45 CONCLUSION 1 2. 5 ETUDE DU GLUFOSINATE ET DU BIALAPHOS 2. 51 INHIBITION DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 52 EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES INHIBITEURS DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 521 Symptômes visibles 2. 522 Accumulation de NH4 2. 523 Quantités d'acides aminés libres 2. 524 Photosyntèse 2. 525 Donneurs NH2 2. 526 Transport membranaire 2. 527 Conclusion 2. 53 SOUCHES RESISTANTES AU GLUFOSINATE 2. 531 Luzerne 2. 532 Tabac 1 2. 61 MODE D'ACTION 2. 611 Absorption et transport 2. 612 Interférence avec la biosynthèse des acides aminés aromatiques 2. 613 Autres effets biochimiques et physiologiques 2. 613 PAL 2. 6133 PAL 2. 6133 AIA	1. <u>INTRODUCTION</u>	1
PERSISTANCE 2. 2 SELECTION DE MUTANTS PAR CULTURE IN VITRO 2. 3 HERBICIDES POUVANT ETRE UTILISES IN VITRO 2. 4 CHOIX DE L'HERBICIDE 2. 41 SULFONYLUREES 2. 42 IMIDAZOLINONES 2. 43 GLUFOSINATE ET BIALAPHOS 2. 44 GLYPHOSATE 2. 45 CONCLUSION 1 2. 5 ETUDE DU GLUFOSINATE ET DU BIALAPHOS 2. 51 INHIBITION DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 52 EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES INHIBITEURS DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 521 Symptômes visibles 2. 522 Accumulation de NH4 2. 523 Quantités d'acides aminés libres 2. 524 Photosyntèse 2. 525 Donneurs NH2 2. 526 Transport membranaire 2. 527 Conclusion 2. 531 Luzerne 2. 531 Luzerne 2. 531 Luzerne 2. 532 Tabac 2. 61 MODE D'ACTION 2. 611 Absorption et transport 2. 612 Interférence avec la biosynthèse des aciues aminés aromatiques 2. 613 Autres effets biochimiques et physiologiques 2. 6131 Synthèse des protéines 2. 6132 PAL 2. 6133 AIA	2. <u>REVUE</u> <u>BIBLIOGRAPHIQUE</u>	2
2. 2 SELECTION DE MUTANTS PAR CULTURE IN VITRO 2. 3 HERBICIDES POUVANT ETRE UTILISES IN VITRO 2. 4 CHOIX DE L'HERBICIDE 2. 41 SULFONYLUREES 2. 42 IMIDAZOLINONES 2. 43 GLUFOSINATE ET BIALAPHOS 2. 44 GLYPHOSATE 2. 45 CONCLUSION 1 2. 5 ETUDE DU GLUFOSINATE ET DU BIALAPHOS 2. 51 INHIBITION DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 52 EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES INHIBITEURS DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 521 Symptômes visibles 2. 522 Accumulation de NH4 2. 523 Quantités d'acides aminés libres 2. 524 Photosyntèse 2. 525 Donneurs NH2 2. 526 Transport membranaire 2. 527 Conclusion 2. 53 SOUCHES RESISTANTES AU GLUFOSINATE 2. 531 Luzerne 2. 532 Tabac 2. 61 MODE D'ACTION 2. 611 Absorption et transport 2. 612 Interférence avec la biosynthèse des aciues aminés aromatiques 2. 613 Autres effets biochimiques et physiologiques 2. 6131 Synthèse des protéines 2. 6132 PAL 2. 6133 AIA		2
2. 41 SULFONYLUREES 2. 42 IMIDAZOLINONES 2. 43 GLUFOSINATE ET BIALAPHOS 2. 44 GLYPHOSATE 2. 45 CONCLUSION 1 2. 5 ETUDE DU GLUFOSINATE ET DU BIALAPHOS 2. 51 INHIBITION DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 52 EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES INHIBITEURS DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 521 Symptômes visibles 2. 522 Accumulation de NH4 2. 523 Quantités d'acides aminés libres 2. 524 Photosyntèse 2. 525 Donneurs NH2 2. 526 Transport membranaire 2. 527 Conclusion 2. 53 SOUCHES RESISTANTES AU GLUFOSINATE 2. 531 Luzerne 2. 532 Tabac 1 2. 61 MODE D'ACTION 2. 611 Absorption et transport 2. 612 Interférence avec la biosynthèse des aciues aminés aromatiques 2. 613 Autres effets biochimiques et physiologiques 2. 6131 Synthèse des protéines 2. 6132 PAL 2. 6133 AIA	2. 2 SELECTION DE MUTANTS PAR CULTURE IN VITRO	3 3
2. 42 IMIDAZOLINONES 2. 43 GLUFOSINATE ET BIALAPHOS 2. 44 GLYPHOSATE 2. 45 CONCLUSION 12. 5 ETUDE DU GLUFOSINATE ET DU BIALAPHOS 2. 51 INHIBITION DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 52 EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES INHIBITEURS DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 521 Symptômes visibles 2. 522 Accumulation de NH4 2. 523 Quantités d'acides aminés libres 2. 524 Photosyntèse 2. 525 Donneurs NH2 2. 526 Transport membranaire 2. 527 Conclusion 2. 53 SOUCHES RESISTANTES AU GLUFOSINATE 2. 531 Luzerne 2. 532 Tabac 2. 61 MODE D'ACTION 2. 611 Absorption et transport 2. 612 Interférence avec la biosynthèse des aciues aminés aromatiques 2. 6131 Synthèse des protéines 2. 6132 PAL 2. 6133 AIA	2. 4 CHOIX DE L'HERBICIDE	4
2. 51 INHIBITION DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 52 EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES INHIBITEURS DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 521 Symptômes visibles 2. 522 Accumulation de NH4 2. 523 Quantités d'acides aminés libres 2. 524 Photosyntèse 2. 525 Donneurs NH2 2. 526 Transport membranaire 2. 527 Conclusion 2. 53 SOUCHES RESISTANTES AU GLUFOSINATE 2. 531 Luzerne 2. 532 Tabac 11 2. 6 ETUDE DU GLYPHOSATE 12 2. 611 Absorption et transport 2. 612 Interférence avec la biosynthèse des aciues aminés aromatiques 2. 613 Autres effets biochimiques et physiologiques 2. 6131 Synthèse des protéines 2. 6132 PAL 2. 6133 AIA	2. 42 IMIDAZOLINONES2. 43 GLUFOSINATE ET BIALAPHOS2. 44 GLYPHOSATE	4 6 8 9 12
2. 52 EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES INHIBITEURS DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE 2. 521 Symptômes visibles 2. 522 Accumulation de NH4 2. 523 Quantités d'acides aminés libres 2. 524 Photosyntèse 2. 525 Donneurs NH2 2. 526 Transport membranaire 2. 527 Conclusion 2. 53 SOUCHES RESISTANTES AU GLUFOSINATE 2. 531 Luzerne 2. 532 Tabac 1 2. 61 MODE D'ACTION 2. 611 Absorption et transport 2. 612 Interférence avec la biosynthèse des aciues aminés aromatiques 2. 613 Autres effets biochimiques et physiologiques 2. 6131 Synthèse des protéines 2. 6132 PAL 2. 6133 AIA	2. 5 ETUDE DU GLUFOSINATE ET DU BIALAPHOS	13
2. 522 Accumulation de NH4 2. 523 Quantités d'acides aminés libres 2. 524 Photosyntèse 2. 525 Donneurs NH2 2. 526 Transport membranaire 2. 527 Conclusion 2. 53 SOUCHES RESISTANTES AU GLUFOSINATE 2. 531 Luzerne 2. 532 Tabac 2. 6 ETUDE DU GLYPHOSATE 2. 61 MODE D'ACTION 2. 611 Absorption et transport 2. 612 Interférence avec la biosynthèse des acides aminés aromatiques 2. 613 Autres effets biochimiques et physiologiques 2. 6131 Synthèse des protéines 2. 6132 PAL 2. 6133 AIA	2. 52 EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES INHIBITEURS DE LA GLUTAMINE	13 14
2. 53 SOUCHES RESISTANTES AU GLUFOSINATE 2. 531 Luzerne 2. 532 Tabac 1 2. 6 ETUDE DU GLYPHOSATE 2. 61 MODE D'ACTION 2. 611 Absorption et transport 2. 612 Interférence avec la biosynthèse des aciues aminés aromatiques 2. 613 Autres effets biochimiques et physiologiques 2. 6131 Synthèse des protéines 2. 6132 PAL 2. 6133 AIA	 522 Accumulation de NH4 523 Quantités d'acides aminés libres 524 Photosyntèse 525 Donneurs NH2 526 Transport membranaire 	14 14 15 15 15
2. 61 MODE D'ACTION 2. 611 Absorption et transport 2. 612 Interférence avec la biosynthèse des aciues aminés aromatiques 2. 613 Autres effets biochimiques et physiologiques 2. 6131 Synthèse des protéines 2. 6132 PAL 2. 6133 AIA	 SOUCHES RESISTANTES AU GLUFOSINATE Souches Resistantes au Glufosinate Souches Resistantes au Glufosinate 	16 16 16
 2. 611 Absorption et transport 2. 612 Interférence avec la biosynthèse des aciues aminés aromatiques 2. 613 Autres effets biochimiques et physiologiques 2. 6131 Synthèse des protéines 2. 6132 PAL 2. 6133 AIA 	2. 6 ETUDE DU GLYPHOSATE	17
2. 613 Autres effets biochimiques et physiologiques 2 2. 6131 Synthèse des protéines 2 2. 6132 PAL 2 2. 6133 AIA 2	 611 Absorption et transport 612 Interférence avec la biosynthèse des aciues aminés aromati- 	17 17 17
2 613/ Chlorophyllo	2. 613 Autres effets biochimiques et physiologiques2. 6131 Synthèse des protéines2. 6132 PAL	20 20 20 20 20

	2. 62 SOUCHES RESISTANTES AU GLYPHOSATE	21
	2. 621 Carotte	21
	2. 622 Ceratopteris	21
	2. 623 Corydalis sempervirens	21
	2. 624 Mais	22
	2. 625 Pervenche de Madagascar	22
	2. 626 Pétunia	22
	2. 627 Tabac	23
	2. 628 Tomate	24
	2. 629 Conclusion	24
	3. MATERIEL ET METHODES	25
3.	1 MATERIEL VEGETAL	25
	3. 11 ORIGINE ET CONSERVATION	25
	3. 12 ASEPTISATION	25
	3. 13 COMPOSITION DES MILIEUX DE BASE	25
	3. 14 MISE EN CULTURE	25
	3. 15 INSTALLATION DE SUSPENSIONS CELLULAIRES	26
	3. 16 CONDITIONS D'ECLAIREMENT ET DE TEMPERATURE DES PIECES DE CULTURE	26
3.	2 HERBICIDES	27
3.	3 ESSAIS DE REVERSION DE L'ACTION DU GLYPHOSATE	27
3.	4 SELECTION IN VITRO	27
	3. 41 AVEC LE GLYPHOSATE	27
	3. 42 AVEC LE GLUFOSINATE	28
_		
3.	5 PRODUCTION DE VITRO-PLANTS	28
3.	6 CARACTERISATION DES SOUCHES	28
	3. 61 COMPARAISON DE L'ACTION DE L'HERBICIDE ENTRE SOUCHES CELLULAIRES DIFFERENTES	28
	3. 62 DOSAGE DE L'ACIDE SHIKIMIQUE	29
	3. 63 DOSAGE DE L'EPSP SYNTHASE	29
	3. 631 Extraction	29
	3. 632 Détermination de l'activité spécifique	30
	3. 633 Sensibilité au glyphosate	30
	3. 634 Dosage des protéines	30
	3. 64 DOSAGE DES CHLOROPHYLLES	31
3.	7 TRAITEMENTS DES PLANTES EN SERRE	31

4. <u>RESULTATS</u>	32
4. 1 <u>POTENTIALITES DE DIFFERENTS ORGANES DE LA CHICOREE A CAFE EN CULTURE IN VITRO</u>	32
4. 11 RACINES TUBERISEES PROVENANT DE PLANTES ADULTES	32
4. 111 Conditions callogènes	32
4. 1111 Explants primaires	32
4. 1112 Installation de suspensions cellulaires	32
4. 112 Conditions de bourgeonnement	33
4. 1121 Sur explants primaires	33
4. 1122 Sur cals	33
4. 12 COTYLEDONS ISSUS DE GERMINATIONS	34
4. 121 Conditions callogènes	34
4. 1211 Explants racinaires	34
4. 12111 Rôle des auxines	34
4. 12112 Rôle de la durée d'éclairement	34
4. 1212 Installation de suspensions cellulaires	34
 1213 Développement des cals issus d'étalements de suspen- sions cellulaires 	35
4. 12131 Rôle des cytokinines	35
4. 12132 Rôle du saccharose	35
4. 122 Conditions de bourgeonnement	35
4. 1221 Sur explants primaires	35
4. 1222 Sur cals	36
4. 13 CONCLUSION	36
4. 2 SELECTION AVEC LE GLYPHOSATE	37
4. 21 RECHERCHE DES DOSES UTILISABLES POUR LA SELECTION	37
4. 22 ESSAIS DE REVERSION	38
4. 221 Acides aminés aromatiques	38
4. 222 Acide chorismique	38
4. 223 Acide α-cétoglutarique et acide glutamique	39
4. 224 AIA	40
4. 225 Conclusion	40
4. 23 ISOLEMENT DE SOUCHES CELLULAIRES PROLIFERANT SUR UN MILIEU DE SELECTION	40
4. 24 COMPARAISON DE L'ACTION DE L'HERBICIDE ENTRE SOUCHES SELECTIONNEES ET SOUCHES SENSIBLES	41
4. 241 Croissance	41
4. 242 Acide shikimique	41
4. 243 Activité EPSP synthase	42
4. 244 Concentration en chlorophylle totale	42
4. 25 OBTENTION DE "VITROPLANTS"	43
4. 251 Conditions de bourgeonnement	43
4. 2511 Sur cals R1	43

4. 25111 Role du temps de culture	43
4. 25112 Rôle de la présence du glyphosate	44
4. 25113 Rôle de la composition du milieu	44
4. 25114 Conclusion	44
4. 2512 Sur cals R2	44
4. 25121 Rôle de l'auxine	44
4. 25122 Rôle des cytokinines	45
4. 251221 BAP	45
4. 251222 Kinetine	45
4. 25123 Rôle du sucre	45
4. 25124 Conclusion '	46
4. 252 Conditions d'enracinement	46
4. 2521 Sur bourgeons R1	46
4. 25211 Le saccharose	46
4. 25212 Les auxines	47
4. 25213 Le trempage dans une solution d'AIB	47
4. 25214 Conclusion	47
4. 2522 Sur bourgeons R2	48
4. 26 DESCRIPTION DES PLANTES APRES ACCLIMATATION	48
4. 261 R1	48
4. 262 R2	49
4. 27 VERIFICATION DU TRANSFERT AUX PLANTES ENTIERES DES	49
CARACTERISTIQUES DES CALS SELECTIONNES	
4. 271 Mesure de l'activité EPSP synthase chez les plantes entières	49
4. 272 Traitement des cals issus de plantes entières	49
4. 2721 Conséquence sur la croissance	49
4. 2722 Conséquence sur l'activité EPSP synthase	50
4. 2723 Conclusion	50
4. 28 VERIFICATION DE LA TRANSMISSION DANS LA DESCENDAN- CE DES CARACTERISTIQUES DES CALS SELECTIONNES	50
4. 281 Vérification de la floraison et de la fertilité	50
4. 282 Recherche de la dose d'herbicide à utiliser	51
4. 283 Traitement en serre des croisements réalisés entre la	52
souche sélectionnée et des souches sensibles	
 284 Mesure de l'activité EPSP synthase dans les plantes issues des croisements 	52
4. 285 Traitement in vitro des cals dérivant des croisements entre	52
la souche sélectionnée et les souches sensibles	
4. 2851 Conséquence sur la croissance	52
4. 2852 Conséquence sur l'activité EPSP synthase	53
4. 2853 Conclusion	53
4. 3 <u>SELECTION AVEC LE GLUFOSINATE</u>	54
4. 31 INTRODUCTION	54
4. 32 RECHERCHE DES DOSES UTILISABLES POUR LA SELECTION	54
4. 33 ISOLEMENT D'UNE SOUCHE CELLULAIRE PROLIFERANT SUR UN MILIEU DE SELECTION	54

4. 34 COMPARAISON DE L'ACTION DE L'HERBICIDE ENTRE LA SOU- CHE SELECTIONNEE ET LA SOUCHE SENSIBLE	54
4. 35 CONDITIONS D'INDUCTION DU BOURGEONNEMENT	55
5. CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION	56
6. <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	69
7. <u>RESUME</u>	90

1. INTRODUCTION

La Chicorée à café (*Cichorium intybus* var. Magdebourg) est cultivée pour sa racine. Après transformation industrielle, elle sert principalement pour la préparation de boissons et est commercialisée sous forme de grains, d'extraits solubles ou liquides. Depuis peu de temps, elle est également utilisée pour l'extraction du fructose et des fructosanes.

Les possibilités de désherbage de cette culture sont très limitées (STRY-KERS, 1983). Les molécules commercialisées entraînent des retards de croissance et en France, des adventices telles que les Matricaires et les Galinsogas ne sont pas ou mal contrôlées par ces herbicides. Les agriculteurs doivent par conséquent les éliminer manuellement ce qui entraîne des surcoûts de production importants.

La solution idéale à ce problème consisterait à disposer d'un herbicide sélectif de la Chicorée à café mais les surfaces emblavées sont trop faibles pour qu'une entreprise phytosanitaire puisse envisager de rentabiliser des frais de recherche inhérants à la mise au point d'un tel herbicide.

La solution qui a été proposée à l'Interprofession de la Chicorée de France par le Laboratoire de Physiologie végétale de Lille consiste à rechercher des plantes résistantes à un herbicide déjà commercialisé en exploitant la variabilité génétique des cultures cellulaires in vitro.

La première partie de cette étude est consacrée à la vérification des potentialités de différents organes de la Chicoré à café en culture *in vitro*.

La seconde partie traite de la sélection avec le glyphosate. Nous avons d'abord recherché les doses utilisables pour la sélection, tenté de reverser l'action du glyphosate puis comparé les souches sélectionnées aux souches non sélectionnées. Nous avons ensuite défini les conditions d'obtention des vitroplants. Le transfert aux plantes entières des caractéristiques des cals sélectionnés a été contrôlé et la transmission dans la descendance vérifiée.

La dernière partie concerne la sélection avec le glufosinate. Nous avons déterminé les doses utilisables pour la sélection et comparé les souches sélectionnées aux souches non sélectionnées.

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les adventices sont des plantes qui croissent sur un terrain cultivé sans y avoir été semées ou plantées. Ce sont aussi bien des espèces sauvages que des espèces cultivées qui, en se ressemant naturellement ou en se reproduisant par voie végétative se comportent en espèces concurrentes pour la lumière, l'eau et les éléments nutritifs.

Leur présence dans les cultures et leur récolte entraîne une baisse de qualité et de productivité qui se traduit pour l'agriculteur par des pertes financières. Le désherbage manuel, s'il permet d'éradiquer les mauvaises herbes, contribue à une augmentation des coûts de production. Avec le désherbage chimique, il est possible de les abaisser. Aussi, dans le contexte économique actuel, de plus en plus compétitif, l'emploi des herbicides tend à se généraliser. Le marché de ces molécules qui représentait 4085 millions de \$US en 1972, est passé en 1988 à 8925 millions \$US et il devrait atteindre 10150 millions \$US en 1995 (BORDERON, communication personnelle).

2. 1 <u>CARACTERISTIQUES DES HERBICIDES</u> : <u>SPECIFICITE</u>, <u>SELECTIVITE</u>, <u>PERSISTANCE</u>

Un désherbant se définit par rapport d'une part aux adventices, d'autre part à la plante cultivée.

La spécificité caractérise le spectre d'activité de la molécule vis-à-vis des plantes à détruire.

La sélectivité traduit l'absence de toxicité de cette molécule vis-à-vis de la culture à protéger, ceci pour une dose donnée.

La sélectivité ou la spécificité d'un herbicide par rapport à une plante dépendent des mécanismes permettant au désherbant d'atteindre sa cible mais également des mécanismes de défense mis en place par la plante elle-même.

Plusieurs possibilités existent:

- l'échappement spatial ou temporel de la plante au traitement
- la présence d'une barrière physique (cuticule cireuse et épaisse) empêche la pénétration du produit
- le transport de l'herbicide après pénétration foliaire ou racinaire n'est pas assuré et seules les cellules au contact de la molécule sont tuées
- la plante dispose d'un mécanisme de détoxication et inactive le produit
- la cible a muté et n'est plus reconnue
- la cible est sensible mais en quantité telle que l'herbicide ne peut l'inhiber complètement.

La persistance est une autre caractéristique importante des herbicides. C'est une notion complexe qui couvre des aspects différents (VACHER, 1983).

- la persistance absolue (chimique) représente le temps pendant lequel la molécule herbicide non transformée peut être détectée par des méthodes physiques, chimiques ou biologiques.

- la persistance agronomique est le temps pendant lequel un effet toxique est observable soit sur des mauvaises herbes, soit sur des cultures.
- la persistance biologique est le temps pendant lequel la molécule herbicide ou ses métabolites, peuvent avoir un effet sur des êtres vivants animaux ou végétaux autres que ceux visés par le traitement.

Un herbicide sera considéré comme d'autant plus efficace qu'il détruira un maximum de mauvaises herbes (spécificité large), qu'il épargnera uniquement ou es-sentiellement la plante cultivée (sélectivité restreinte) et qu'il ne présentera pas de danger pour les cultures suivantes (persistance agronomique limitée).

Dans un programme de désherbage, le choix de l'herbicide, la dose employée, la localisation et le moment du traitement sont des facteurs déterminants qu'il faut prendre en considération.

2. 2 <u>LA SELECTION DE MUTANTS PAR CULTURE IN VITRO</u>

Si les techniques classiques faisant appel à la mutagénèse sur plantes entières, sur graines ou sur pollen, ont permis d'isoler certains mutants très intéressants (BOURGIN, 1978), elles nécessitent la mise en place d'une logistique lourde, en temps, en espace et en moyens (NABORS, 1976; GRESSEL, 1989).

Par comparaison, la culture in vitro permet de tester de nombreuses molécules, sur un grand nombre de cellules, simultanément, dans de bonnes conditions d'homogénélté, sur une surface restreinte (BOURGIN, 1978; BRANCHARD, 1984; DUNCAN & WIDHOLM, 1986). L'apparition de variants somaclonaux (LARKIN & SCOWCROFT, 1981) résultant de l'instabilité génétique des cellules en culture in vitro est un phénomène général qui caractérise aussi les plantes régénérées (BOURGIN, 1985; LARKIN et al., 1985; DUNCAN & WIDHOLM, 1986; WERSUHN, 1989). L'origine de ces variations est très diverse : changement du nombre de chromosomes (aneuploīdie, polyploīdie), variation des structures chromosomales (duplication, translocation), modification des séquences du DNA (point de mutation, activation de transposons, amplification et réduction sélective) (LARKIN & SCOWCROFT, 1981; EVANS et al., 1984; BOURGIN, 1985; LARKIN et al., 1985; DUNCAN & WIDHOLM, 1986; WERSHUN 1989). Cette source de variabilité peut être exploitée dans un programme d'amélioration des plantes (LARKIN & SCOWCROFT, 1981; EVANS et al., 1984; HESKZY et al., 1989) notamment pour la résistance aux herbicides (MALIGA, 1984; FACCIOTTI, 1985; LOR, 1985; RAJNCHA-PEL-MESSAI & GUERCHE, 1985; DUNCAN & WIDHOLM, 1986). II est possible d'augmenter cette variabilité par des traitements mutagènes.

2. 3 HERBICIDES POUVANT ETRE UTILISES IN VITRO

Plus de 100 molécules différentes (BOTTERMAN & LEEMANS, 1988a) entrent dans la composition des divers herbicides commercialisés. Toutes ne peuvent pas être utilisées dans un programme de sélection de mutants par culture *in vitro* en particulier celles dont les cibles sont multiples et ou celles dont la cible est présente dans les tissus différenciés mais pas dans les tissus indifférenciés.

L'emploi de certains herbicides peut nécessiter des conditions particulières. Ainsi pour les inhibiteurs de la photosynthèse, la sélection de mutants requiert des cultures photomixotrophes c'est-à-dire des cultures dont l'activité photosynthétique assure partiellement les apports en carbone, l'autre partie étant fournie par le sucre du milieu de culture (CSEPLO & MEDGYESY, 1986; WANG et al., 1991) ou mieux photoautotrophes c'est-à-dire des cultures se développant uniquement grâce à la photosynthèse (FACCIOTTI, 1985; SATO et al., 1987; REY et al., 1989; 1990). Les exemples de cultures de ce type sont encore rares.

2. 4 LE CHOIX DE L'HERBICIDE

Les herbicides susceptibles d'être retenus pour cette étude devaient :

- avoir une spécifité large, une sélectivité étroite ou nulle, une cible biochimique unique connue, de préférence sous contrôle nucléaire et leur utilisation devait être compatible avec les conditions de culture *in vitro*.

Parmi toutes les substances proposées :

- les sulfonylurées
- les imidazolinones
- le glufosinate et le bialaphos
- le glyphosate

présentaient ces caractéristiques.

2. 41 SULFONYLUREES

Cette famille regroupe un grand nombre de molécules distinctes mais proches structurellement. Elles sont utilisées à faibles doses (quelques grammes hectare) pour le désherbage antidicotylédones des céréales. Elles sont faiblement toxiques pour les animaux (HAWKES et al., 1989). Elles présentent l'inconvénient de persister longtemps dans le sol et de provoquer dans le cas de rotations culturales de sévères dommages aux cultures suivantes (PETERSON & ARNOLD, 1985). Mais selon BLAIR & MARTIN (1988), les auteurs qui ont rapporté ces problèmes avaient utilisé des doses très supérieures à celles recommandées en Grande-Bretagne.

D'après GRESSEL (1989) le chlorsulfuron est un des herbicides qui présente la plus forte activité résiduelle. Il peut par conséquent exercer une très forte pression de sélection ce qui expliquerait que, bien que les sulfonylurées soient d'un emploi récent (1982), des adventices résistantes aient déjà été observées. Après 4 ans de traitements consécutifs au chlorsulfuron, une souche de *Stellaria media* résistante est apparue (MAURICE D. cité par HALL & DEVINE, 1990). Elle présente une résistance croisée avec un autre herbicide le D 484 qui est une triazolopyrimidine (HALL & DEVINE, 1990). Une souche de *Lactuca serriola* résistante au metsulfuron méthyl a aussi été observée (THILL et al., 1989; MALLORY-SMITH et al., 1990). Cinq applications de chlorsulfuron ont suffi pour isoler un *Kochia scoparia* résistant au chlorsulfuron (PRI-MIANI et al., 1990; SAARI et al., 1990) et aux imidazolinones. Une *Salsola iberica* résistante à différentes sulfonylurées a aussi été mentionnée par THILL et al. (1989).

Le site d'action des sulfonylurées est parfaitement connu. Ce sont des inhibiteurs de la voie de biosynthèse des acides aminés à chaîne branchée (valine, leucine et isoleucine). Chez les bactéries, les levures et les plantes, ils bloquent l'acétolactate synthase (ALS) encore appelée acétohydroxyacide synthase (AHAS) (CHALEFF & MAUVAIS, 1984; LAROSSA & FALCO, 1984; SCHEEL & CASIDA, 1985).

Des mutants résistants aux sulfonylurées ont été isolés chez Arabidopsis thaliana (HAUGHN & SOMERVILLE, 1986), Brassica napus (SWANSON et al., 1988; SAXENA et al., 1990), Chlamydomonas reinhardtii (HARTNETT et al., 1987), Cichorium intybus (MILLECAMPS, 1989), Datura innoxia (SAXENA & KING, 1988), Escherichia coli (YADAV et al., 1986), Glycine max (SEBASTIAN & CHALEFF, 1987), Linum usitatissimum (JORDAN & McHUGHEN, 1987), Nicotiana tabacum (CHALEFF & RAY, 1984), Saccharomyces cerevisiae (FALCO & DUMAS, 1985), Salmonella typhimurium (LAROSSA & SCHLOSS, 1984), Synchococcus (FRIEDBERG & SEIJFFERS, 1988).

Chez les plantes, différentes techniques ont été employées pour sélectionner les mutants:

- le screening in vitro de graines (Arabidopsis, Soja)
- le screening de cals (Lin)
- le screening de suspensions cellulaires (Colza, Datura, Cichorium, Tabac)
- le screening de microspores et protoplastes (Colza)

Dans tous les cas un traitement mutagène a été appliqué excepté pour Cicho-rium .

La résistance aux sulfonylurées résulte de différents mécanismes.

- Dans le cas des céréales pour lesquelles les sulfonylurées sont sélectives et des dicotylédones *Solanum nigrum* et *Linum usitatissimum* (HUTCHISON *et al.*, 1984), les sulfonylurées sont métabolisées en O-glucosides, composés sans propriété herbicide (SWEETSER *et al.*, 1982).
- Chez Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae et Salmonella typhimurium des mutations dominantes confèrent la résistance. Il a été montré que la substitution d'un seul acide aminé dans les gènes codant pour l'ALS entraîne une modification de l'activité de l'enzyme et une sensibilité différente à l'herbicide (BOTTERMAN & LEE-MANS, 1988b). Chez les plantes supérieures (*Arabidopsis*, Tabac), la résistance découle également de mutations. La simple substitution dans le gène de l'ALS de la proline 197 par de la serine rend l'*Arabidopsis* résistant (HAUGHN *et al.*,1988). Chez le Tabac où l'ALS est codé par 2 gènes non liés coségrégeant (CHALEFF & RAY, 1984) on a trouvé dans la souche mutante C3 (CHALEFF & RAY, 1984; CHALEFF & BASCOMB, 1987) au locus SuRA une simple mutation due à la substitution de la proline 196 en glutamine (LEE *et al.*, 1988) alors que dans la lignée mutante HRA (CREASON & CHALEFF, 1988) au locus SuRB, il y a trois mutations dues à des substitutions de la proline 196 en alanine, du tryptophane 573 en leucine et une mutation silencieuse (LEE *et al.*, 1988).

La transmission du caractère de résistance dans la descendance a été montrée pour l'*Arabidopsis* (type monogénique dominante (HAUGHN & SOMERVILLE, 1986)), pour

le Colza (type monogénique semi-dominante (SWANSON et al., 1988)), pour le Cicho-rium (type monogénique dominante (GASQUEZ, résultats non publiés)), pour le Soja (type monogénique récessive (SEBASTIAN & CHALEFF, 1987)), type monogénique semi-dominante (SEBASTIAN et al.,1989)) et pour le Tabac (type dominante ou semi-dominante avec 2 gènes non liés coségrégeant (CHALEFF & RAY, 1984; CREASON & CHALEFF, 1988)).

Une autre approche a été utilisée pour obtenir des plantes résistantes aux sulfonylurées : la transformation par génie génétique.

Le gène de l'ALS isolé d'un mutant d'*Arabidopsis* (lignée GH 50) (HAUGHN & SOMERVILLE, 1986) a été introduit dans un Tabac sensible (HAUGHN *et al.*, 1988). Les plantes transgéniques présentent une résistance élevée et les résultats de l'auto-fécondation suggèrent que les copies du gène de l'ALS ont été insérées à un seul locus nucléaire.

Les gènes codant pour la forme résistante de l'ALS du Tabac ont aussi été réintroduit chez cette même espèce dans des souches sensibles. Ils leur confèrent une forte résistance (LEE et al., 1988). Des cas de recombinaisons homologues entre le gène introduit et le gène sauvage ont été signalés par LEE et al. (1990). L'analyse génétique des plantes montre que le nouveau gène ségrège comme un simple caractère mendelien.

Des gènes mutants ont aussi été introduits chez la Betterave sucrière, le Colza (BEDBROOK et al., 1988), le Lin (McHUGHEN, 1989), la Luzerne, le Melon (BEDBROOK et al., 1988), le Maïs (FROMM et al., 1990), la Tomate (MAZUR et al., 1987; BEDBROOK et al., 1988; MAZUR & FALCO, 1989). Ces plantes transformées présentent une résistance aux sulfonylurées.

2. 42 IMIDAZOLINONES

Les imidazolinones constituent une famille d'herbicides actifs contre les mono-et dicotylédones annuelles et pérennes (SHANER *et al.*, 1984; SHANER & ANDERSON, 1985; ANDERSON, 1986). Elles présentent une faible toxicité pour les organismes autres que les plantes. Elles peuvent être appliquées en pré- et en post-levée (OR-WICK *et al.*, 1983). Elles sont absorbées par les racines et le feuillage et transportées par le xylème et le phloème (SHANER & ANDERSON, 1985; ANDERSON, 1986). Comme les sulfonylurées, elles présentent l'inconvénient de persister longtemps dans le sol, ce qui peut entraîner des dommages aux cultures suivantes. Ainsi, 11 mois après l'application d'imazaquin sur une culture de Soja, des dommages ont été constatés sur la culture de Maïs qui suivait dans la rotation culturale (RENNER *et al.*, 1988a). Il a été vérifié expérimentalement que des résidus de 35 g ha⁻¹ de cet herbicide réduisaient bien la taille du Maïs (RENNER *et al.*, 1988b).

Ces molécules, compte-tenu de leur persistance dans le sol, exercent une forte pression de sélection sur les adventices. Si, jusqu'à présent aucune mauvaise herbe résistante aux imidazolinones n'a été signalée, il est à noter que des essais en serre

ont montré que des Kochia scoparia résistantes aux sulfonylurées le sont aussi aux imidazolinones (PRIMIANI et al., 1990; SAARI et al., 1990).

Leur mode d'action est similaire à celui des sulfonylurées (HAWKES et al., 1989). Elles interfèrent avec la biosynthèse des acides aminés à chaîne branchée (valine, leucine et isoleucine) (ANDERSON & HIBBERD, 1985), en inhibant l'acétohydroxyacide synthase (AHAS) (SHANER et al., 1984; MUHITCH et al., 1987). Toutefois, l'absence de résistance croisée avec les sulfonylurées de certaines souches de Chlamydomonas reinhardtii (WINDER & SPALDING, 1988), de Datura innoxia (SAXENA & KING, 1988) et de Maïs (ANDERSON & GEORGESON, 1989) laisserait supposer que les sites d'action sur l'enzyme de ces 2 groupes de molécules sont légèrement différents (SANEXA & KING, 1988; ANDERSON & GEORGESON, 1989). Les travaux de SAXENA & KING (1990) ont confirmé cette séparation des sites d'action et selon ces auteurs, les différents phénotypes observés résulteraient de mutations séparées dans le gène de l'ALS, ce qui reste à vérifier.

Des mutants résistants aux imidazolinones ont été trouvés chez Arabidopsis thaliana à partir de graines cultivées in vitro préalablement traitées par l'éthyl éthane sulfonate (agent mutagène) (HAUGHN & SOMERVILLE, 1990), chez Chlamydomonas reinhardtii parmi des cellules traitées au N-méthyl-N'-nitrosoguanidine (WINDER & SPALDING, 1988), dans des suspensions cellulaires de Datura innoxia traitées à l'éthyl éthane sulfonate (SAXENA & KING, 1988), parmi des cals de Maïs embryogènes (ANDERSON & GEORGESON, 1989; FINCHER, 1989).

Plusieurs mécanismes expliquent la résistance aux imidazolinones :

- La métabolisation rapide de l'herbicide en composé non toxique (OWEN 1987, 1989): c'est le cas du Blé et du Maïs vis-à-vis de l'imazamethabenz (BROWN *et al.*, 1987) et du Soja vis-à-vis de l'imazaquin (SHANER *et al.*, 1983, SHANER & ROBSON, 1985).
- l'altération de l'enzyme (AHAS) (SHANER & ANDERSON, 1985; ANDERSON, 1986; FINCHER, 1989) entraînant une diminution de sensibilité à l'herbicide (ANDERSON, 1986; SAXENA & KING, 1988; WINDER & SPALDING, 1988; ANDERSON & GEORGESON, 1989): c'est le cas de *Arabidopsis*, de *Chlamydomonas*, de *Datura* et du Maïs. A l'origine de cette altération se trouve chez *Arabidopsis* une simple mutation nucléaire dominante, probablement une substitution d'acide aminé (HAUGHN & SOMERVILLE, 1990). Chez *Chlamydomonas*, selon les souches, elle résulterait d'une mutation dominante ou semi-dominante (WINDER & SPALDING, 1988) tandis que chez le Maïs, elle proviendrait d'une mutation semi-dominante (ANDERSON & GEORGESON, 1989).

Un programme de recherche a été mis en place par Pioneer et American Cyanamid pour introduire la résistance aux imidazolinones dans des hybrides commerciaux de Maïs (FRALEY et al., 1987; FINCHER, 1989) à partir des souches isolées par SHANER & ANDERSON (1985).

2. 43 GLUFOSINATE ET BIALAPHOS

Le glufosinsate ou phosphinothricine (BAYER et al., 1972), et le bialaphos (OGAWA et al., 1973; KONDO et al., 1973) sont des herbicides non sélectifs (SCHWERDTLE et al., 1981; BUBL & LANGELUDDEKE, 1984), post-émergence, agissant par contact (KOCHER, 1983; MAZUR & FALCO, 1989) et non mobiles dans le phloème (MAZUR & FALCO, 1989). Le bialaphos est un tripeptide antibiotique produit par Streptomyces hygroscopicus (KONDO et al., 1973; OGAWA et al., 1973) et par Streptomyces virido-chromogenes (BAYER et al., 1972). Il est consitué du glufosinate et de 2 résidus de L-alanine. Alors que le glufosinate est synthétisé chimiquement, il est produit par fermentation de S. hygroscopicus (LEEMANS, et al., 1987; BOTTERMAN & LEEMANS, 1989).

Le glufosinate est un inhibiteur de la glutamine synthétase (GS) (BAYER et al., 1972; LEASON et al., 1982; WILD & MANDERSCHEID, 1984; COLANDUONI & VILLA-FRANCA, 1986; MANDERSCHEID & WILD, 1986).

Des mutants résistants au glufosinate ont été isolés chez la Luzerne (DONN et al., 1984) et le Tabac (ISHIDA et al., 1989) à partir de suspensions cellulaires. Dans le cas de Luzerne, la résistance des suspensions cellulaires a été transférée à des souches sensibles par fusion de protoplastes (DEAK et al., 1988).

Deux mécanismes de résistance ont été décrits dans la littérature. Chez les plantes, la résistance résulte d'une augmentation de l'activité enzymatique de la GS (DONN et al., 1984; DEAK et al., 1988; ISHIDA et al., 1989). Il a pu être démontré qu'elle était liée à une amplification du gène (DONN et al.,1984; DEAK et al., 1988). Chez les bactéries, il existe un mécanisme de détoxification. Le gène bar isolé de Streptomyces hygroscopicus (MURAKAMI et al., 1986; THOMPSON et al., 1987b) et le gène pat isolé de Streptomyces viridochromogenes (STRAUCH et al., 1988; WOHLLE-BEN et al., 1988) codent pour une enzyme, la phosphinothricine acétyl transférase, qui convertit la molécule de phosphinothricine en un composé acétylé sans activité herbicide (THOMPSON et al., 1987b).

Les outils du génie génétique ont permis de transférer la résistance à des plantes sensibles.

Le gène amplifié de la Luzerne (TISCHER et al., 1986) a été introduit dans le Tabac (ECKES, 1987). Mais la surexpression n'entraîne qu'un faible niveau de résistan-

ce à la phosphinothricine (ECKES & WENGEMAYER, 1987). Ceci pourrait être dû (QUINN, 1990) à l'existence de multiples gènes nucléaires de la GS dont l'expression est spécifique d'un tissu et d'un organite (TINGEY *et al.*, 1987). La présence d'un seul gène muté pourrait ne pas être suffisante pour rendre une plante résistante (KISHORE & SHAH, 1988).

L'introduction du gène pat chez le Tabac a conféré à celui-ci la résistance à la phosphinothricine (WOHLLEBEN et al., 1988).

Le gène bar a été employé pour transformer Arabidopsis thaliana (DE ALMEIDA et al., 1989), Brassica napus, Brassica oleracea (DE BLOCK et al., 1989), la Betterave, la Luzerne (D'HALLUIN et al., 1990), le Maïs (SPENCER et al., 1990), la Pomme de terre, le Tabac, la Tomate (DE BLOCK et al., 1987). Les essais en champs sur de la Pomme de terre, du Tabac (LEEMANS et al., 1987; DE GREEF et al., 1989) et de la Luzerne (D'HALLUIN et al., 1990) ont montré une résistance élevée au glufosinate. Le caractère est hérité comme un simple caractère mendellen (LEEMANS et al., 1987; BOTTERMAN & LEEMANS, 1989; OXTOBY & HUGHES, 1989). Les performances agronomiques des Tabacs et des Pommes de terre transgéniques sont comparables à celles des plantes non transformées (DE GREEF et al., 1989; BOTTERMAN & LEEMANS, 1989).

2. 44 GLYPHOSATE

Le glyphosate est un herbicide post-émergence, non sélectif (CASELEY & COU-PLAND, 1985), transporté par voie symplastique (GOUGLER & GEIGER, 1981) et apoplastique (JACHETTA et al., 1986; DUKE, 1988) jusqu'aux méristèmes où il est accumulé (HOAGLAND & DUKE, 1982; MOLLENHAUER et al., 1987). Il n'est pas toxique pour l'homme (ATKINSON, 1985). Sa persistance dans le sol est variable (TORSTENS-SON, 1985; DEVLIN et al., 1986) mais elle ne pose pas de problèmes majeurs aux cultures suivantes car le glyphosate est peu absorbé par voie racinaire (DUKE, 1988). Il est généralement très rapidement adsorbé sur les particules d'argile et la matière organique (TORSTENSSON, 1985) et dégradé par la microflore ubiquiste du sol (RUEP-PEL et al., 1977; TORSTENSSON & AAMISEPP, 1977; QUINN et al., 1988).

Bien que le glyphosate soit employé depuis de nombreuses années dans le monde entier, jusqu'en 1988 aucune adventice résistante n'avait été signalée (DUKE, 1988). Il semblerait néanmoins que les résistances de *Elymus repens* (PUTWAIN & COLLIN, 1989) et *Lolium perenne* (GRESSEL, 1990a; 1990b) aient augmenté dans le temps mais les informations dont nous disposons ne nous permettent de savoir s'il s'agit d'un tri de biotypes préexistants ou de l'apparition de nouveaux biotypes; des différences de sensibilité naturelle entre biotypes ayant déjà été décri'es chez *Convolvulus arvensis* (DE GENNARO & WELLER, 1984), *Cynodon dactylon* (BRYSON & WILLS, 1985) et *Lotus corniculatus* (BOERBOOM et al., 1990).

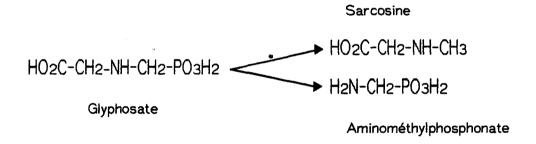
Le glyphosate est un inhibiteur de la voie shikimate. Il bloque, dans cette voie conduisant aux acides aminés aromatiques (JAWORSKI, 1972) et à de très nombreux métabolites secondaires, l'activité de la 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase (STEINRUCKEN & AMRHEIN, 1980).

Des mutants résistants au glyphosate ont été isolés chez Aerobacter aerogenes (SCHULZ et al., 1984), Escherichia coli (KISHORE et al., 1986) et Salmonella typhymurium (STALKER et al., 1985). Parmi les plantes, des souches cellulaires résistantes ont été sélectionnées chez la Carotte (NAFZIGER et al., 1984; GONZALEZ & WILDHOM, 1985), Ceratopteris (HICKOK, 1987), Corydalis sempervirens (AMRHEIN et al., 1983; SMART et al. 1985), le Maïs (RACCHI et al., 1989), le Pétunia (STEINRUCKEN et al., 1986), la Pervenche de Madagascar (CRESSWELL et al., 1988), le Tabac (SINGER & Mc DANIEL, 1985; DYER et al., 1988) et la Tomate (SMITH et al., 1986).

Trois mécanismes principaux expliquent la résistance au glyphosate:

- La métabolisation de l'herbicide:

Des souches de *Pseudomonas*, d'*Arthrobacter*, d'*Alcaligenes*, de *Flavobacterium*, d'*Agrobacterium* sont capables d'utiliser le glyphosate comme seule source de phosphore (P) (MOORE, et al., 1983; SHINABARGER et al., 1984; TALBOT et al., 1984; JACOB et al., 1985, 1988; BALTHAZOR & HALLAS, 1986; WACKETT et al., 1987; PIPKE & AMRHEIN, 1988; QUINN et al., 1988). Elles le dégradent en sarcosine et/ou en acide aminométhylphosphorique.



Les enzymes impliquées dans l'une et l'autre voie n'ont pas encore été caractérisées (QUINN et al., 1990). Néanmois, une enzyme appelée C-P hydrolase (MURATA et al., 1989a) présentant une certaine activité vis-à-vis du glyphosate (MURATA et al., 1989b) a été purifiée à partir de Enterobacter aerogenes (MURATA et al., 1988) mais la voie de dégradation n'a pas été spécifiée.

- L'insensibilité de l'EPSP synthase au glyphosate:

Il a été montré que la substitution dans le gène de l'EPSP synthase de la proline 101 en serine chez *E. coli* (KISHORE *et al.* 1986) et de la glycine 95 en alanine chez *Salmonella typhimurium* (STALKER *et al.*, 1985) conférait l'insensibilité au glyphosate. Dans une suspension cellulaire de Maïs, une isoenzyme insensible à l'herbicide a aussi été isolée (RACCHI *et al.*, 1989; RACCHI, 1990).

- L'augmentation d'activité de l'EPSP synthase:

Plusieurs auteurs (AMRHEIN et al., 1983; ROGERS et al., 1983; DUNCAN et al., 1984; NAFZIGER et al., 1984; SMART et al., 1985; SMITH et al., 1986; STEINRUCKEN et al., 1986; CRESSWELL et al., 1988; DYER et al., 1988) ont démontré que la tolérance de certaines bactéries et de toutes les plantes sélectionnées à ce jour, excepté le Maïs, résulterait d'une augmentation d'activité de l'EPSP synthase, forme sensible au glyphosate.

Pour transférer la résistance à des plantes sensibles, deux méthodologies ont été développées : la fusion de protoplastes et le génie génétique.

- La fusion de protopiastes

YE et al. (1987) ont fait fusionner des Tabacs sensibles au glyphosate portant une double mutation (nitrate réductase, azetidine-2-carboxylate,) avec des Carottes résistantes (par amplification de gène) et ils ont observé que les produits de fusion étaient résistants au glyphosate mais moins toutefois que le parent donneur. Ils ont noté également que le nombre de chromosomes des hybrides obtenus avait augmenté.

HAUPTMANN et al. (1988) ont réalisé des hybrides somatiques entre une Carotte résistante au glyphosate et une Carotte sensible portant une double mutation (DL-5 méthyltryptophane^R, azetidine-2-carboxylate^R). Les produits de fusion ont exprimé la résistance au glyphosate de manière dominante ou semi-dominante. Dans la plupart des cas, en absence prolongée de pression de sélection (3 ans), l'amplification de l'EPSP synthase a été conservée. Ils ont eux aussi observé que les hybrides possédaient des chromosomes supplémentaires par rapport aux lignées parentales.

- Le génie génétique

La résistance au glyphosate a été transférée à *Populus* (FILLATI et al., 1987b), au Tabac (COMAI et al., 1985) et à la Tomate (FILLATI et al., 1987a) en introduisant le gène mutant aro A de *Salmonella typhimurium*. Les plantes transformées se sont montrées plus résistantes au glyphosate que les plantes non-transformées mais leur croissance comparée à celles des plantes non-traitées est plus faible (COMAI & STALKER, 1986). Dans le cas du Tabac, il a été prouvé que le caractère de résistance est transmis à la descendance (THOMPSON et al., 1987a).

Le gène bactérien exprime son activité dans le cytosol des plantes transformées (DELLA-CIOPPA *et al.*, 1987) or la voie shikimate est prédominante dans les chloroplastes. La résistance conférée par l'enzyme cytosolique est donc surprenante selon KISHORE & SHAH (1988).

Le gène mutant de *E. coli* a été transféré au Tabac. Lorsque l'activité EPSP synthase est localisée dans le cytosol, les cals ne sont pas résistants au glyphosate (KISHORE & SHAH, 1988), mais lorsqu'on ajoute la séquence peptide signal qui assure le transfert de l'EPSP synthase dans le chloroplaste (DELLA-CIOPPA *et al.*, 1987), les cals sont résistants.

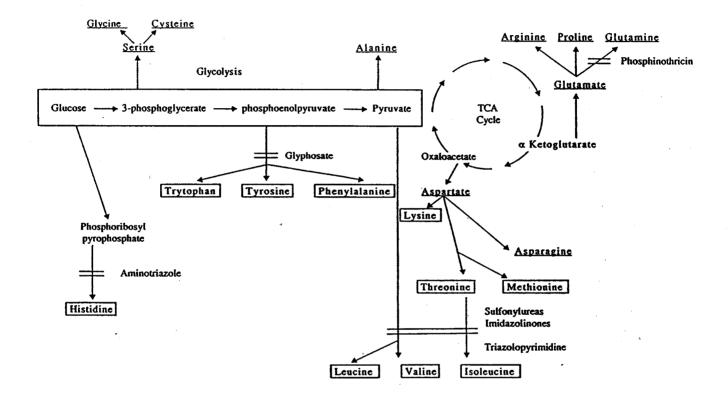


Fig. 1 : Cible des herbicides dans les voies de biosynthèse des acides aminés (MAZUR & FALCO, 1989).

Afin d'éviter de se poser la question de la localisation de l'expression du gène, SHAH et al., (1986) ont utilisé pour les transformations directement un gène EPSP synthase d'origine végétal. Ils ont placé le cDNA du Pétunia tolérant sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du Tabac et l'ont réintroduit dans le Pétunia. Les plantes transformées sont devenues résistantes au glyphosate. Le gène s'est exprimé en surproduisant l'enzyme.

KLEE et al. (1987) ont obtenu des résultats similaires en introduisant dans Arabidopsis les séquences codantes de l'EPSP synthase d'Arabidopsis fusionnées avec le promoteur 35S du virus de la mosaïque du Tabac.

Le gène du Pétunia a aussi été introduit dans le Lin (JORDAN & McHUGHEN, 1988). Il a conféré la résistance aux plantes transformées et il a été transmis dans la descendance comme un simple gène mendelien dominant.

Il faut toutefois noter que lorsque les plantes transgéniques (surproduisant l'enzyme) sont traitées à l'herbicide, elles ont une croissance réduite par rapport aux plantes non traitées (KISHORE & SHAH, 1988).

Par contre, quand les tabacs sont transformés avec un gène d'EPSP synthase de Pétunia ayant subi une mutagénèse dirigée, elles montrent après traitement au glyphosate, une croissance identique à celles des témoins. Dans ce cas, l'enzyme synthétisée est insensible à l'herbicide (KISHORE & SHAH, 1988). Des sojas également transformés avec le gène mutant de Pétunia ont transmis le caractère de résistance à leur descendance comme un simple gène mendélien (HINCHEE et al., 1988).

2. 45 CONCLUSION

La figure 1 montre que les herbicides qui pouvaient être utilisés dans notre étude (sulfonylurées, imidazolinones, glufosinate, bialaphos, glyphosate) interféraient tous avec la synthèse des acides aminés. Ils avaient déjà tous été employés pour sélectionner des résistants par culture *in vitro*. Il était donc envisageable d'utiliser l'une ou l'autre molécule indifféremment. Notre choix s'est porté sur le glyphosate et le glufosinate pour trois raisons:

- ce sont des herbicides post-émergence et les agriculteurs ne disposent d'aucun produit dit de "rattrapage" capable de détruire les adventices sans porter préjudice au développement de la Chicorée.
- ce sont des herbicides non sélectifs par conséquent aucune adventice ne devait échapper au traitement.
 - leur cible est sous contrôle de gènes nucléaires.

2. 5 ETUDE DU GLUFOSINATE ET DU BIALAPHOS

Deux résidus d'alanine distinguent le bialaphos du glufosinate

Glufosinate

Bialaphos

2. 51 INHIBITION DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE

Le glufosinate est un analogue du glutamate (BAYER et al., 1972) et en tant que tel inhibe, de manière irréversible (MANDERSCHEID & WILD, 1986; WILD et al., 1987) mais cela n'a pas encore été démontré chez toutes les plantes supérieures, la réaction catalysée par la glutamine synthétase (GS) (BAYER et al., 1972; KOCHER, 1989).

L glutamate + NH3 + ATP
$$\stackrel{Mg^{2+}}{\longleftarrow}$$
 L glutamine + ADP + Pi

8 sites actifs (un par sous unité) ont été trouvés sur la GS chloroplastique de Moutarde, (HOPFNER et al., 1988).

Bien que le glufosinate soit synthétisé sous forme d'isomères D et L (KOCHER, 1983), seule la forme L est biologiquement active (MANDERSCHEID & WILD, 1986).

Le bialaphos quant à lui n'inhibe pas la GS *in vitro* (BAYER *et al.*, 1972; TACHI-BANA *et al.*, 1986a; WILD & ZIEGLER, 1989). Dans les plantes entières des peptidases intracellulaires (BAYER *et al.*, 1972) coupent les résidus alanine libèrant ainsi le glufosinate qui inhibe alors la GS (TACHIBANA *et al.*, 1986a; WILD & ZIEGLER, 1989).

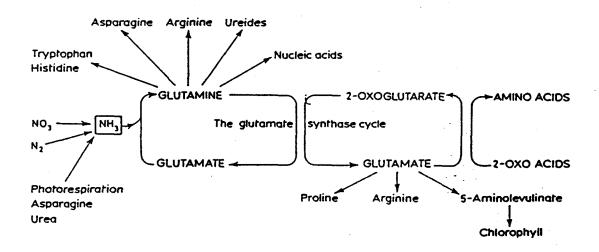


Fig. 2 : Métabolisme de l'azote chez les plantes supérieures (LEA & RIDLEY, 1989).

Le blocage de la GS est très préjudiciable pour les plantes car cette enzyme joue un rôle crucial dans la conversion de l'azote minéral en azote organique (Fig. 2) (KOCHER, 1989; LEA & RIDLEY, 1989). Elle permet l'incorporation de l'ammonium provenant de la réduction des nitrates, du turn-over des acides aminés ou de la photorespiration (DE BLOCK et al., 1987). Son inhibition entraîne une accumulation d'ammonium intracellulaire (TACHIBANA et al., 1986b; LACUESTA et al., 1989) qui conduit à la mort de la plante.

Des différences de sensibilité au glufosinate entre isoenzymes ont été observées (MANDERSCHEID & WILD, 1986). Mais selon RIDLEY & McNALLY (1985), elles n'expliqueraient pas les variations de sensibilité des plantes entières à l'herbicide. Les raisons seraient à rechercher entre le point d'application de la molécule et le premier site d'inhibition.

2. 52 EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES INHIBITEURS DE LA GS

2. 521 Symptômes visibles

Des symptômes de chlorose (TROGISCH et al., 1989) et de nécrose puis de desséchement se produisent sur les feuilles 1 à 2 jours après le traitement au glufosinate (TACHIBANA et al., 1986b; KOCHER, 1989). Si les plantes sont placées à l'obscurité immédiatement après l'application de l'herbicide, les symptômes visibles liés à la phytotoxicité sont nettement moins importants (KOCHER, 1989).

2. 522 Accumulation NH4

La quantité d'ammonium dans les feuilles – qui est habituellement très faible – augmente considérablement (KOCHER, 1983; WILD & MANDERSCHEID, 1984; TACHI-BANA et al., 1986b; WILD et al., 1987; LACUESTA et al., 1989; TROGISCH et al., 1989; ZIEGLER & WILD, 1989; WENDLER et al., 1990) si l'inhibiteur est appliqué pendant la phase diurne. 4h après le traitement elle est 10 fois plus élevée, 24 h plus tard 100 fois plus élevée et ensuite elle n'augmente plus que faiblement (KOCHER, 1989). Quand les plantes sont transférées à l'obscurité immédiatement après le traitement, l'accumulation d'ammonium est moins élevée (KOCHER, 1983; KOCHER & LOTZSCH, 1985). Ceci est attribué au fait que 2 sources importantes de production d'ammonium – la réduction du nitrate et la photorespiration – sont dépendantes de la lumière (KOCHER, 1989). L'accumulation d'ammonium se produit chez les plantes en C3 comme en C4 mais les plantes en C4 en accumulent moins (KOCHER & LOTZSCH, 1985; WENDLER et al., 1990) vraisemblablement à cause de leur plus faible activité photorespiratoire (WENDLER et al., 1990).

2. 523 Quantités d'acides aminés libres

Le dosage des acides aminés libres chez la Moutarde après traitement au glufosinate montre que l'accumulation d'ammonium dans les feuilles s'accompagne d'une diminution considérable des teneurs en glutamine, en acide glutamique et en acide

aspartique. L'asparagine, la sérine et le glycocolle diminuent également tandis, que de manière surprenante, les acides aminés branchés (leucine et valine) augmentent fortement (WENDLER et al., 1990).

2. 524 Photosynthèse

Des mesures d'activité photosynthétique montrent qu'après traitement, la fixation photosynthétique du CO2 décline (SAUER et al., 1987; TROGISCH et al., 1989; ZIE-GLER et al., 1989; WENDLER et al., 1990) parallèlement à l'accumulation d'ammonium (KOCHER, 1983; WILD & MANDERSCHEID, 1984; WILD et al., 1987). Il est bien connu qu'in vitro l'ammonium peut découpler la photophosphorylation (KOCHER, 1989). Aussi a-t-il été suggéré que l'inhibition de la photosynthèse, après application des inhibiteurs de la GS, serait due à l'augmentation de l'ammonium dans les feuilles. Cependant sous des conditions où la photorespiration ne peut pas se produire (0,1 % CO2, 2 % O2), l'inhibition de la photosynthèse par la phosphinothricine est très faible, bien qu'il y ait d'importantes quantités d'ammonium accumulées (SAUER et al., 1987; WILD et al., 1987; ZIEGLER & WILD, 1989; WENDLER et al., 1990). En condition photorespiratoire, lorsqu'on traite des feuilles excisées par du glufosinate et de la glutamine, la photosynthèse n'est inhibée que de 20%, tandis que sans apport de glutamine exogène, elle chute rapidement (SAUER et al., 1987; ZIEGLER & WILD, 1989; WENDLER et al., 1990). Les plantes traitées au glufosinate mais auxquelles on a apporté de la glutamine produisent davantage d'ammonium (SAUER et al., 1987; ZIEGLER & WILD, 1989; WEN-DLER et al., 1990). Aussi a-t-il été conclu que la toxicité de l'ammonium n'est que faiblement responsable de l'inhibition de la photosynthèse par le glufosinate (KOCHER, 1989).

2. 525 Donneurs NH2

Il a été montré que l'inhibition de la photosynthèse est due à un épuisement de donneurs de groupement NH2 pour assurer la conversion de l'acide glyoxylique en glycine (ZIEGLER & WILD, 1989) lors de la photorespiration. Cela résulterait soit d'une insuffisance du recyclage du carbone - de la photorespiration au cycle de CALVIN - et en conséquence un manque de ribulose-1,5-biphosphate soit directement de l'inhibition de la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase par accumulation de glyoxylate (KOCHER, 1989; WENDLER et al., 1990). Les travaux de ZIEGLER & WILD (1989) conduiraient plutôt à accepter la seconde hypothèse.

On peut présumer que le manque de donneurs-NH2, qui est une conséquence de l'inhibition de la GS, interfère non seulement avec la conversion photorespiratoire du glyoxylate en glycine mais aussi avec tous les processus métaboliques où des réactions de transamidation et de transamination sont impliquées. Il n'a pas été prouvé pour le moment que cela expliquerait la rupture rapide de l'intégrité membranaire qui entraîne ultérieurement le dessèchement des tissus foliaires (KOCHER, 1989).

2. 526 <u>Transport membranaire</u>

Un ensemble de données laissent supposer que le glufosinate agirait d'abord sur les processus de transport membranaire avant l'apparition des symptomes visibles

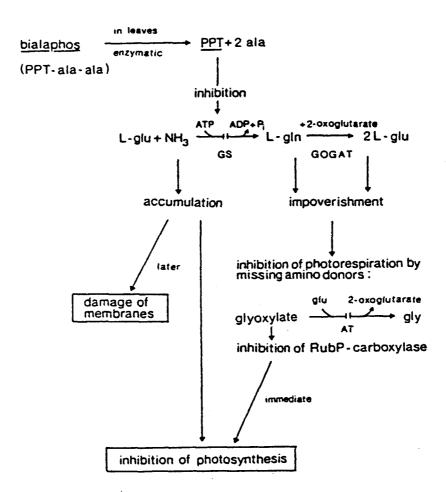


Fig. 3 : Mode d'action du bialaphos (ZIEGLER & WILD, 1989). ala, alanine; AT, transaminase; L-gln, glutamine; L-glu, glutamate; gly, glycocolle; GS, glutamine synthase; GOGAT, glutamine- α -céto-glutarate-transférase; PPT, glufosinate; RubP, ribulose diphosphate.

(KOCHER, 1989). Chez des feuilles de Moutarde, une forte augmentation de l'efflux de K^+ ainsi qu'une augmentation des concentrations en ammonium ont été observées après un traitement au glufosinate (KOCHER, 1983).

Chez Lemna minor, quelques heures après un traitement au glufosinate, on constate une diminution de l'absorption du nitrate et du phosphate. L'efflux de K⁺ des tissus de la plante commence à augmenter 1 heure après le traitement et cet effet est attribué à une diminution du potentiel membranaire provoqué par l'accumulation d'ammonium (TROGISCH et al., 1989).

2. 527 Conclusion

ZIEGLER & WILD (1989) ont donné un schéma récapitulatif (Fig. 3) des effets du bialaphos qui reprend les principales données qui ont été discutées ci-dessus.

2. 53 SOUCHES RESISTANTES AU GLUFOSINATE

2. 531 Luzerne

DONN et al. (1984) ont sélectionné des suspensions cellulaires de Luzerne 20 à 100 fois plus résistantes au glufosinate que les suspensions de type sauvage. Elles ont été isolées en augmentant progressivement la concentration d'herbicide.

Des mesures d'activité enzymatique ont montré que l'activité de la GS est 3 à 7 fois plus élevée chez la souche variante. La résistance à l'herbicide résulte d'une amplification de 4 à 11 fois d'un gène de la GS, d'une augmentation de 8 fois de la quantité de mRNA et d'une augmentation de la synthèse d'enzyme.

Cette souche n'étant pas organogène, DEAK *et al.* (1988) ont tenté de transférer le caractère de résistance à une souche qui l'était. Pour cela, ils ont fait fusionner des protoplastes issus de suspensions cellulaires résistantes au glyphosate avec des protoplastes issus de feuilles de plantes sensibles porteur du gène de résistance à la kanamycine. Ils ont obtenu des produits de fusion résistants au glufosinate et à la kanamycine, mais les propriétés embryogènes du parent résistant à la kanamycine n'ont pas été retrouvées. Ils ont également provoqué la fusion de cellules résistantes au glufosinate entre elles et ils ont observé que la résistance des produits de fusion était plus élevée. Sur 2 x 10⁴ colonies, 1 plante issue d'une fusion interspécifique et 2 plantes issues d'une fusion intraspécifique ont régénéré sur un milieu non sélectif. Elles se sont montrées toutes 3 sensibles au glufosinate. Selon ces auteurs l'absence de régénération de plantes à partir de la souche isolée par DONN *et al.* (1984) et des souches hybrides pourrait résulter d'un changement significatif dans le métabolisme de l'azote dû à l'amplification du gène de la GS.

2. 532 Tabac

ISHIDA et al. (1989) ont utilisé des colonies issues de protoplastes et de suspensions cellulaires pour tenter d'isoler une souche résistante au glufosinate. Ils ont rapidement abandonné les colonies provenant des protoplastes et focalisé leur étude

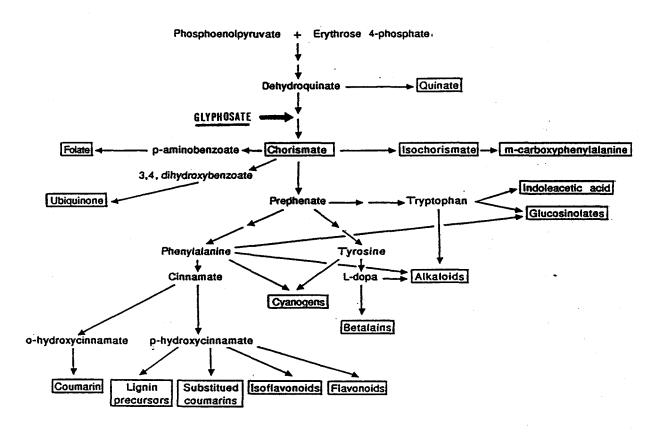


Fig. 4: Métabolites secondaires dérivant de la voie shikimate (KOSUGE & SANGER, 1986).

sur les suspensions cellulaires. En augmentant progressivement les concentrations de glufosinate – qu'ils ont employé sous forme de produit commercial formulé – ils ont pu sélectionner une souche 10 fois plus résistante que la souche sauvage. Elle présente une activité GS 20 fois plus élevée. Le poids moléculaire de la GS issue de la lignée cellulaire résistante est similaire à celui de la lignée cellulaire sauvage, mais la lignée résistante en accumule 5 fois plus. Il n'y a pas de différence ni dans le nombre de chromosomes, ni dans la quantité d'ADN par noyau ce qui indiquerait que la résistance ne résulte pas d'une augmentation de la ploïdie. Des plantes entières n'ayant pas encore été régénérées, il n'a pas pu être prouvé que la résistance était sous contrôle génétique.

2. 6 ETUDE DU GLYPHOSATE

Une littérature abondante, composée de milliers de publications a été consacrée au glyphosate. Une synthèse des travaux a été rassemblée en 1985 dans un livre publié par GROSSBARD & ATKINSON . Des données plus récentes ont été réunies par DUKE en 1988.

La N-(phosphonomethyl)glycine ou glyphosate et ses sels sont biologiquement actifs. Dans le Roundup, commercialisé par Monsanto, le glyphosate est sous forme de sel d'isopropylamine.

2. 61 MODE D'ACTION

2. 611 Absorption et transport

Le glyphosate, appliqué sur les parties foliaires, traverse la cuticule de la plupart des plantes et entre dans l'apoplaste. Il passe ensuite passivement dans le symplaste et il est transporté principalement par le phloème vers les lieux de fortes activités métabolites. Comme il n'est pas métabolisé par les plantes, de grandes quantités peuvent s'accumuler dans les zones méristèmatiques, à des distances relativement éloignées du site d'application (DUKE, 1988).

2. 612 Interférence avec la biosynthèse des acides aminés aromatiques

Le glyphosate est un inhibiteur de la voie shikimate (Fig. 4) qui conduit aux acides aminés aromatiques, phénylalanine, tyrosine, tryptophane ainsi qu'à une large variété de métabolites secondaires. Les composés aromatiques représentent jusqu'à 35% du poids sec d'une plante et une partie du flux de carbone passe par cette voie (BOUDET et al., 1985).

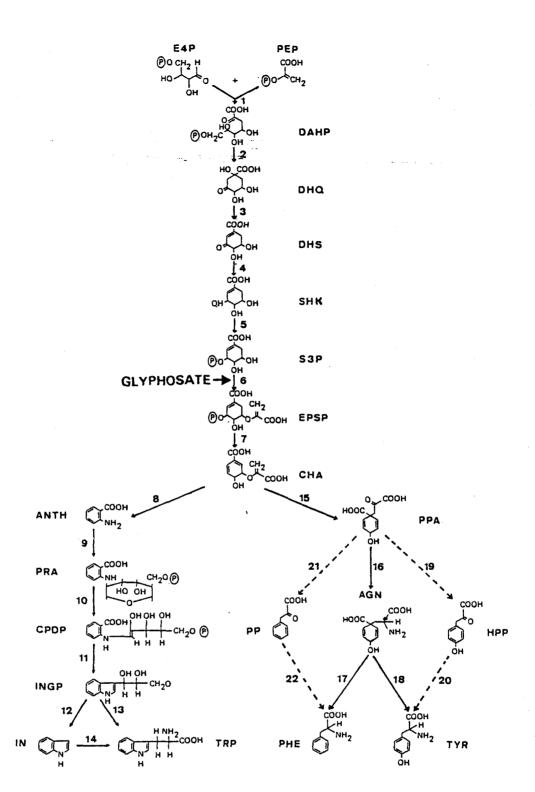


Fig. 5 : Voie shikimate. Les lignes en pointillées représentent les voies découvertes chez les entérobactéries (COLE, 1985, légèrement modifié).

Abréviations: E4P, erythrose-4-phosphate; PEP, Phosphoenolpyruvate; DAHP, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate; DHQ, 3-dehydroquinate; DHS, 3-dehydroshikimate; SHK, shikimate; S3P, shikimate-3-phosphate; EPSP, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate; CHA, chorismate; ANTH, anthranilate; PRA, phosphoribosylanthranilate; CPDP, carboxyphenylamino-deoxyribulose-5-phosphate; INGP, indole-3-glycerolphosphate; IN, indole; TRP, tryptophane; PPA, prephenate; AGN, arogenate; PHE, phenylalanine; TYR, tyrosine; HPP, 4-hydroxyphenylpyruvate; PPY, phenylpyruvate.

Enzymes: (1) 3-deoxy-D-arabino-heptulosanate-7-phosphate synthase; (2) 3-dehydroquinate synthase; (3) 3-dehydroquinate dehydratase; (4) shikimate dehydrogenase; (5) shikimate kinase; (6) 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase; (7) chorismate synthase; (8) anthranilate synthase; (9) anthranilate phosphoribosyl transferase; (10) phosphoribosyl anthranilate isomerase; (11) indole glycerol phosphate synthase; (12)(13)(14) tryptophane synthase; (15) chorismate mutase; (16) prephenate aminotransferase; (17) arogenate deshydratase; (18) arogenate dehydrogenase; (19) prephenate dehydrogenase; (20) aromatic aminotransferase; (21) prephanate dehydratase; (22) aromatic aminotransferase.

JAWORSKI (1972) est le premier auteur à avoir fait l'hypothèse que le glyphosate agissait en bloquant la synthèse des acides aminés aromatiques. Cette hypothèse était basée sur le fait que *Lemna gibba* et *Rhizobium japonicum* pouvaient se développer sur un milieu de culture contenant du glyphosate, à condition d'y ajouter de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane.

De nombreux travaux ultérieurs sur des microorganismes et des suspensions cellulaires (ROISCH & LINGENS, 1974; 1984; HARDELIE et al., 1977; DAVIS & HARVEY, 1979; GRESSHOFF, 1979; BODE et al., 1985; BYNG et al., 1985; SMART et al., 1985; CRESSWELL et al., 1988) ont montré que l'apport d'acides aminés exogènes permettait bien de lever l'inhibition du glyphosate. Cependant LEE (1980a) et RUBIN et al. (1984) sur des suspensions cellulaires et DUKE & HOAGLAND (1978, 1981), COLE & DODGE (1979), COLE et al. (1980), RUBIN et al. (1982), HOAGLAND (1990) sur des plantes entières n'ont pas observé de réversion. La seule plante entière où la réversion a été obtenue est *Arabidopsis thaliana* (GRESSHOFF, 1979).

La réversion partielle ou totale de l'action du glyphosate a aussi été obtenue avec d'autres molécules telles que le chorismate, l'o-succinylbenzoate, l'aspartate, l' α -cétoglutarate, le glutamate, le pyruvate, le malate, l'acide indolylacétique (AIA) et l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) (JAWORSKI, 1972; LEE, 1980a; 1982a; AMRHEIN et al., 1980a; KILLMER et al., 1981; NAFZIGER et al., 1983; BODE et al., 1985). Pour, l'aspartate, l' α -cétoglutarate, le glutamate, le pyruvate et le malate, leur action s'expliquerait par la diminution d'absorption du glyphosate (NAFZIGER et al., 1983; BODE et al., 1985).

Par la suite, les travaux réalisés au laboratoire d'AMRHEIN ont montré que le blocage se situait en amont de la synthèse du chorismate (AMRHEIN et al., 1980a; HOLLANDER & AMRHEIN, 1980). Les importantes quantités d'acide shikimique (AMRHEIN et al., 1980b; 1981; 1983; BERLIN & WITTE, 1981; FISCHER et al., 1986; SMITH et al., 1986; CRESSWELL et al., 1988; DYER et al., 1988) accumulées dans les vacuoles (HOLLANDER-CZYTKO & AMRHEIN, 1983) impliquaient que le site d'action fût localisé entre l'acide shikimique et le chorismate. STEINRUCKEN & AMRHEIN (1980) ont les premiers démontré que le glyphosate inhibait l'activité de l'EPSP synthase (Fig. 5). Cette enzyme catalyse de manière réversible (BOOCOCK & COGGINS, 1983) la réaction ci-dessous.

Le glyphosate agit comme un inhibiteur compétitif du phosphoénolpyruvate (PEP) et comme un inhibiteur incompétitif du shikimate-3-phosphate (S3P) (BOOCOCK & COGGINS, 1983; STEINRUCKEN & AMRHEIN, 1984)

Selon KISHORE & SHAH (1988), l'EPSP synthase est l'une des enzymes les mieux caractérisées de la voie shikimate. Elle a été isolée et purifiée chez les bactéries, les champignons et les plantes supérieures. C'est un monomère d'un poids moléculaire de 44000-48000 chez les bactéries et les plantes (REAM et al., 1988). Chez les champignons, elle fait partie du complexe pentafonctionnel arom (KISHORE & SHAH, 1988).

Des études sur la structure de l'enzyme ont montré que certains résidus amino acides étaient nécessaires au fonctionnement de l'enzyme. La lys₂₃, l'arg₂₈, l'his₃₈₅, la lys₄₁₁ joueraient un rôle essentiel dans l'activité de l'EPSP synthase et pourraient représenter une partie du site d'actif (HUYNH, 1987; 1991; HUYNH *et al.* 1988; PADGETTE *et al.*, 1988; KISHORE & SHAH, 1988). Les données de séquençage tendent à confirmer cette idée car ces résidus sont très conservés chez tous les EPSP synthases analysées (KISHORE & SHAH, 1988).

Des formes isoenzymatiques de l'EPSP synthase ont été isolées chez le Maïs (RACCHI et al., 1989; RACCHI, 1990), le Pois (MOUSDALE & COGGINS, 1985), le Sorgho (REAM et al., 1988) et le Tabac (RUBIN et al., 1984; JENSEN, 1986a). Pour les 2 premières espèces, il est rapporté une forme plastidiale et une forme cytosolique. Les isoenzymes du Sorgho et du Tabac présentent la même sensibilité au glyphosate tandis que chez le Maïs la forme cytosolique est résistante (FORLANI et al., 1990).

L'existence de différentes formes enzymatiques localisées dans différents compartiments cellulaires chez d'autres enzymes de la voie shikimate renforce l'hypothèse de JENSEN (1986b) selon laquelle il y aurait 2 voies shikimate séparées, l'une dans le cytosol et l'autre dans les plastes.

Il a été démontré que l'EPSP synthase était synthétisée dans le cytoplasme sous forme d'une pré-enzyme (DELLA-CIOPPA et al., 1986) comprenant une séquence peptide signal nécessaire au transfert dans le chloroplaste (DELLA-CIOPPA et al., 1987). Cette préenzyme, comme l'enzyme mature, est inhibée par le glyphosate. Quand elle est complexée avec le S3P et le glyphosate, elle n'est pas transportée dans le chloroplaste. Ce nouveau rôle du glyphosate a été démontré par DELLA-CIOPPA & KISHORE (1988).

D'autres enzymes de la voie shikimate sont inhibées par le glyphosate. La 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP) Co ²⁺ synthase, localisée dans le cytosol, (JENSEN, 1986b) ne fonctionne plus avec des doses millimolaires (RUBIN et al., 1982). La forme Mn ²⁺, localisée dans les plastes est, quant à elle, insensible au glyphosate. L'inhibition de la DAHP Co ²⁺ synthase pourrait s'expliquer par la formation d'un complexe entre l'herbicide et l'ion (KISHORE & SHAH, 1988), le glyphosate étant un chélateur de métaux (NILSSON, 1985). Pour la déhydroquinate synthase et l'anthranilate synthase (ROISCH & LINGENS, 1974; 1980; FISCHER et al., 1986) la même hypothèse peut être formulée (KISHORE & SHAH, 1988). Les doses de glyphosate nécessaires pour inhiber ces enzymes sont de l'ordre de 10 mM, ce qui ne correspondrait pas, selon COLE (1985), à des doses physiologiques. Cependant, une étude sur des feuilles d'Epinard avec du ¹⁴C glyphosate montre qu'après 3 jours la concentration

en herbicide est de 65 μ M dans le stroma, de 1140 μ M dans le cytosol et de 13 μ M dans la vacuole. Il peut donc y avoir une accumulation d'herbicide supérieure à 1 mM dans certains compartiments de la cellule (AMRHEIN, 1986).

En conclusion, il apparait que le glyphosate bloque l'EPSP synthase cytosolique, l'EPSP synthase plastidiale et la DAHP Co²⁺ synthase. JENSEN (1986b) a émis l'hypothèse que le shikimate-3-P accumulé proviendrait du fonctionnement de la DAHP Mn²⁺ synthase insensible au glyphosate. Cette isoenzyme est soumise à une régulation en feed-back par la L-arogénate (RUBIN & JENSEN, 1985; JENSEN, 1986a) et la diminution de sa concentration (provoquée par le blocage de l'EPSP synthase) pourrait conduire à une entrée continue de substrats (PEP et E4P) dans la voie shikimate. L'accumulation incontrôlée de shikimate entraînerait à terme une perte d'énergie (JENSEN, 1986b) et pourrait être à la base de l'absence de réversion par les acides aminés aromatiques.

2. 613 Autres effets biochimiques et physiologiques

2. 6131 Synthèse des protéines

Le glyphosate bloque la synthèse des protéines. L'inhibition serait due à un épuisement du pool d'acides aminés libres plutôt qu'à une interférence directe ou indirecte sur le processus de la synthèse des protéines (DUKE, 1988).

2. 6132 PAL

L'activité phénylalanine ammonia-lyase (PAL) des tissus traités au glyphosate augmente progressivement dans le temps. Cela représente certainement une augmentation de la synthèse de la protéine ce qui est en contradiction avec l'inhibition de synthèse des protéines induite par le glyphosate. Une explication consisterait à dire que le glyphosate stopperait la synthèse des protéines dans les tissus méristématiques où il est accumulé, mais il aurait d'autres effets sublétaux dans la majorité des tissus où il n'est pas accumulé (DUKE, 1988). Selon HOAGLAND (1990), l'action du glyphosate sur la PAL est un mécanisme secondaire.

2. 6133 AIA

Le glyphosate entraîne rapidement une diminution de la quantité d'AIA dans les tissus (LEE, 1982a; 1982b; LEE et al. 1983). LEE & DUMAS (1985) ont montré que les plantes avec un métabolisme AIA élevé étaient moins sensibles au glyphosate, probablement car elles étaient moins dépendantes de l'AIA (DUKE, 1988). Selon HOA-GLAND (1990), les effets du glyphosate sur le métabolisme de l'AIA sont indirects ou secondaires. D'autre part, le glyphosate réduit aussi le transport de l'AIA (BAUR, 1979).

2. 6134 Chlorophylle

Le glyphosate n'a pas d'action directe sur la photosynthèse (DUKE, 1988). Par contre, ces effets sur la synthèse de chlorophylle sont relativement importants (KIT-

CHEN et al., 1981a; LEE, 1981; COLE et al., 1983; CANAL VILLANUEVA et al., 1985; EL-HATTAB et al., 1987) car il inhibe la formation de l'acide 5-aminolévulinique (ALA) qui est précurseur de la chlorophylle a. Cependant, il n'agit pas sur l'incorporation de l'ALA dans la chlorophylle elle-même (KITCHEN et al., 1981b). Une des conséquences principales qui découlent d'un traitement à des doses sublétales de glyphosate est l'apparition de feuilles chlorotiques (COLE, 1985). Le glyphosate agirait également en accélérant la photodégradation de la chlorophylle (LEE, 1981).

2. 62 SOUCHES RESISTANTES AU GLYPHOSATE

2. 621 Carotte

NAFZIGER et al.(1984) ont sélectionné, en augmentant progressivement les doses d'herbicide, des cellules de Carotte capables de se développer sur 25 mM de glyphosate. Les concentrations requises pour inhiber 50% de la croissance sont de 0,12 mM pour les cellules non-adaptées et de 6,3 mM pour les cellules adaptées. La résistance des cellules de Carottes a donc été augmentée de 52 fois. L'activité EPSP synthase des cellules résistantes est 12 fois plus élevée que celle des cellules sensibles, mais dans les 2 cas, elle est inhibée par 10 µM de glyphosate. HAUPTMANN et al. (1988) ont caractérisé de manière plus précise la souche isolée par NAFZIGER. Ils ont montré que l'augmentation d'activité enzymatique (5,5 fois) était associée à une augmentation de la quantité de protéines (8,7 fois) et à une augmentation du nombre de copies du gène, mais ils n'ont pas pu déterminer ce nombre exactement puisqu'ils ne disposaient pas d'une sonde de Carotte homologue. Aucune plante n'a pu être régénérée.

2. 622 Ceratopteris

Cette plante a été employée pour rechercher des mutants résistants au glyphosate car elle présente l'avantage d'avoir une génération gamétophytique et une génération sporophytique, ce qui permet de retrouver aisément des mutations dominantes et récessives. HICKOK (1987) en traitant des spores avec un agent mutagène a ainsi obtenu et caractérisé 2 mutants gamétophytiques. La comparaison de l'inhibition de croissance de ces souches avec un témoin a montré que les mutants étaient plus résistants respectivement de 5 et de 15 fois. Il a été noté comme pour la Carotte (NAFZIGER et al., 1984), qu'en absence d'herbicide la croissance des mutants est plus faible que celle des plantes sauvages. Les effets sur la génération sporophytique n'ont pas été rapportés; de même qu'on ne connait pas les bases enzymatiques de la résistance.

2. 623 Corydalis sempervirens

Pour sélectionner leur souche de *Corydalis* résistante au glyphosate AMRHEIN *et al.* (1983) ont augmenté progressivement les doses d'herbicide. Ils ont ainsi obtenu des cellules capables de se développer sur 10 mM puis 20 mM de glyphosate (SMART *et al.*, 1985). Ils ont montré que la croissance des cellules non-adaptées est inhibée à 50% avec une concentration de 0,2 mM tandis que celle des cellules adaptées est inhibée à 50 % avec une concentration de 25 mM. Comparées aux cellules sauvages,

les cellules adaptées présentent donc une résistance 100 fois plus élevée. L'activité EPSP synthase des cellules adaptées est aussi plus élevée (40 fois); mais les propriétés physiques, cinétiques et immunologiques de l'enzyme extraite des 2 types de cellules sont identiques. La souche résistante contient également davantage de protéine EPSP synthase (40 fois), de mRNA transcrit (8-12 fois) et traduit (10 fois) (HOL-LANDER-CZYTKO & AMRHEIN, 1987) mais il n'y a pas d'amplification du gène. Pour expliquer ces résultats HOLLANDER-CZYTKO et al. (1988) font l'hypothèse d'une moindre dégradation protéolytique. Contrairement à la Carotte (NAFZIGER et al., 1984), la souche de *Corydalis* adaptée (SMART et al., 1985) n'accumule pas d'acides aminés aromatiques.

2. 624 Mais

RACCHI et al. (1989, 1990) ont sélectionné 2 souches de suspensions cellulaires de Maïs d'origine génétique différente (BMS; A188 x W64A) résistant naturellement au glyphosate. Elles sont capables de se développer sur des concentrations de 10 mM, contrairement aux semences provenant des populations d'origine qui voient leur développement inhibé par 0,1 mM de glyphosate. Les suspensions cellulaires (BMS) contiennent 2 formes d'EPSP synthase : une forme plastidiale sensible au glyphosate (inhibée à 50 % par 6 μM) et une forme cytosolique insensible (plus de 70 % d'activité à 10 mM) (FORLANI et al., 1990). L'expression de l'isoenzyme résistante dépend du stade de développement des suspensions cellulaires. Elle est à peine détectable durant les premiers jours de culture, elle augmente considérablement au cours de la phase exponentielle, puis ensuite elle décline (FORLANI et al., 1990). Dans les plantes entières à l'origine des suspensions cellulaires, ces auteurs n'ont pas trouvé la forme isoenzymatique résistante. L'absence de cette forme cytosolique, dans d'autres lignées cellulaires (BMS) provenant d'autres laboratoires, permet à FORLANI (communication personnelle) de supposer qu'on pourrait être en présence d'un gène muté ou que l'isoenzyme résistante ne s'exprimerait que dans certaines conditions expérimentales. Notons que cette souche n'est pas embryogène.

2. 625 Pervenche de Madagascar

CRESSWELL et al. (1988) ont isolé, en augmentant progressivement les concentrations en herbicide, une souche de Pervenche capable de se développer sur 35 mM de glyphosate mais cette résistance n'est pas stable dans le temps. L'activité enzymatique qui était 60 fois plus élevée chez les cellules résistantes que chez les cellules témoins n'était plus que de 12 fois après 10 mois de culture sans herbicide. L'activité enzymatique des 2 types de souches (résistantes et sensibles) est inhibée à 50 % par $10~\mu M$ de glyphosate. Comme pour le *Corydalis* (SMART et al., 1985), mais contrairement à la Carotte (NAFZIGER et al., 1984), la Pervenche résistante n'accumule pas d'acides aminés aromatiques.

2. 626 <u>Pétunia</u>

La souche de Pétunia résistante, isolée par STEINRUCKEN et al. (1986), a été obtenue, elle aussi, par augmentation successive des concentrations d'herbicide. Quand la souche sauvage est inhibée à 50 % par 0,34 mM de glyphosate, il faut employer

pour obtenir un résultat similaire, 6,6 mM avec la souche adaptée. Il y a donc une augmentation de la résistance de 20 fois chez la souche sélectionnée par rapport à la souche sauvage. A l'origine de la surexpression de l'activité EPSP synthase (10 à 20 fois), de la surproduction d'enzyme (15 à 20 fois), de l'augmentation du mRNA (20 fois) observée chez la souche résistante se trouve l'amplification du gène (20 fois) codant pour l'EPSP synthase (SHAH $et\ al.$, 1986). Pour les 2 lignées (la résistante et la sensible), le glyphosate inhibe l'EPSP synthase à une concentration de 55 μ M. Il faut aussi noter que la croissance de la souche résistante est plus lente.

2. 627 Tabac

Une première série de travaux a été réalisée par SINGER & Mc DANIEL (1985). Ils ont isolé des cals de Tabac résistants parmi des cellules haploïdes. Certaines souches ont conservé leur résistance après une culture prolongée sans herbicide (supérieure à 9 mois) tandis que d'autres l'ont perdue. Des plantes ont été régénérées. Après application de glyphosate, aucune plante résistante n'a été observée mais plusieurs ont réagi en produisant des bourgeons axillaires. D'une manière surprenante une plante contrôle s'est montrée résistante à la suite du traitement au glyphosate; la résistance a été conservée 2 ans puis la plante est redevenue sensible. Du cal a été initié à partir des plantes entières qui se sont montrées résistantes : certaines lignées étaient toujours résistantes au glyphosate tandis que d'autres étaient devenues sensibles. Par ailleurs, les plantes résistantes ont une croissance inférieure à celle des plantes sauvages.

Une deuxième série de travaux a été effectuée par DYER et al. (1988). Ils ont obtenu 11 souches résistantes en les exposant d'emblée à une dose d'herbicide élévée. Ils en ont caractérisé une. Elle présente une résistance 10 fois plus élevée (I_{50} : 3-4 mM) que la souche sensible. Elle est stable dans le temps. Sa croissance est néanmoins plus lente. Elle n'accumule pas d'acides aminés aromatiques. Elle montre des activités DAHP synthase et EPSP synthase plus élevées que le témoin respectivement de 4 et de 2 fois. L'augmentation d'activité de l'EPSP synthase serait le reflet d'une augmentation de la quantité d'enzyme car l'enzyme extrait des cellules résistantes et des cellules sensibles est inhibée de la même manière par le glyphosate. Des plantes ont été régénérées. Elles ont survécu à l'application de 1 kg ha-1 de glyphosate, cependant leur croissance a été très retardée. Des différences de résistance entre les plantes ont été notées. A 0,6 kg ha-1 la croissance des méristèmes apicaux a été ralentie pendant plusieurs semaines, puis elle a repris chez certaines plantes. Des bourgeons axillaires se sont développés chez toutes les plantes résistantes, 2 semaines après le traitement. Une partie des plantes a fleuri et produit des graines, mais il n'a pas été précisé si la résistance a été transmise dans la descendance.

A partir de la souche caractérisée par DYER et al. (1988) , GOLDSBROUGH et al. (1990) ont augmenté progressivement les doses d'herbicide pour sélectionner de nouvelles souches plus résistantes (jusqu'à 20 mM). La croissance de ces souches est plus lente que celle des témoins mais finalement elles atteignent toutes le même maximum de développement. Parmi les souches sélectionnées, celle qui présente l'activité enzymatique la plus élevée par rapport au témoin (20 fois) présente également la résistance la plus importante. Elle possède aussi la quantité la plus élevée de protéines

amplification it du gène		ino		uou	-		× 20	oui : 1 gène oui : 2 gènes	
mRNA traduit R/S				x 10					
mRNA transcrit R/S				× 8-12		——————————————————————————————————————	× 20		
Concentration en protéine EPSP synthase R/S		7,8 ×		× 40			x 15-20		
Glyphosate (μΜ) inhibant 50 % de l'activité EPSP synthase	Я	0		identique	1 forme : 6 1 forme : 10000	0	22	identique -	5
Glyphc inhibant 50 EPSP s	S	- -		l den		.	ີ້ທີ່	ig epi	2
Activité EPSP synthase R/S		x 12 x 5,5		× 40		de x 60 passe à x 12	x 10-12	× × × 20	x 8-13
Résistance des tissus R/S		x 52	x 5 et 15	× 100	naturellement résistant	non stable	× 20	× 10	× 100
Glyphosate (mM) n'inhibant pas la croissance	Я				10	35			
te (mM) 0 % de la ance	В	6,3		25			9,9	3-4.	-
Glyphosate (mM) inhibant 50 % de la croissance	တ	0,12		0,2			0,34	0,3-0,4	
Espèce		Carotte	Ceratopteris	Corydalis	Maïs	Pervenche de Madagascar	Pétunia	Tabac	Tomate

Tab. 1 Principales caractéristiques d'espèces végétales résistantes (R) au glyphosate. S signifie sensible.

et de mRNA. Ceci résulte de l'amplification de 2 séquences codant pour l'enzyme. Il a été montré que ces 2 séquences correspondaient à 2 pseudogènes. Dans la souche isolée par DYER et al. (1988) il n'y aurait amplification que d'un seul gène.

2. 628 Tomate

SMITH et al. (1986) ont obtenu une souche de Tomate résistante au glyphosate en irradiant aux rayons Υ une suspension cellulaire. La croissance de cette souche n'est pas affectée par 10 mM de glyphosate, ce qui représente une résistance de 100 fois par rapport à la souche sauvage. L'augmentation d'activité (8 à 13 fois) de la forme sensible de l'EPSP synthase (inhibée à 50 % par 25 μ M de glyphosate) différencie les 2 souches. Des bourgeons ont été régénérés, mais les auteurs ne sont pas parvenus à les enraciner. Ils ont néanmoins montré que les cals issus de ces bourgeons étaient toujours résistants.

2. 629 Conclusion

Les principales caractéristiques des différentes souches résistantes sont rassemblées dans le tableau 1. 3. MATERIEL ET METHODES

3. 1 MATERIEL VEGETAL

3. 11 ORIGINE ET CONSERVATION

Cette étude a été effectuée sur *Cichorium intybus* L. var. Magdebourg Cultivar Pévèle. Dans les programmes de croisements, d'autres cultivars ont été employés dont Dageraad (Etablissement Florimond Desprez).

La conservation des racines récoltées à l'automne se fait en chambre froide à 4°C et celles des akènes en congélateur à - 20° C.

3. 12 ASEPTISATION

Les racines sont épluchées, immergées pendant 25 min dans une solution filtrée d'hypochlorite de calcium (110° chlorométrique) à 150 g l^{-1} puis rincées à l'eau stérile 3 fois, pendant 5, 10 et 20 min respectivement.

Les akènes sont désinfectés pendant 20 min par une solution de chlorure mercurique à 1%. Ils sont ensuite rincés à 3 reprises pendant 5, 10 et 15 min avec de l'eau stérile.

3. 13 COMPOSITION DES MILIEUX DE BASE

Le milieu de base A utilisé pour la mise en culture d'explants de racines tubérisées, l'enracinement de bourgeons et les germinations comprend les macro- et microéléments de HELLER (1953), le Fer-EDTA de MURASHIGE & SKOOG (1962) dilué au demi, de la thiamine à 0,1 mg l^{-1} , de la pyridoxine à 0,5 mg l^{-1} , de l'acide nicotinique à 0,5 mg l^{-1} et de l'inositol à 100 mg l^{-1} .

Le milieu de base B utilisé pour la mise en culture de cotylédons, l'entretien de cals et de suspensions cellulaires contient les macro- et microéléments de MURA-SHIGE & SKOOG (1962), du Fer-EDTA, des vitamines et de l'inositol aux concentrations précitées.

3. 14 MISE EN CULTURE

- Des racines

Après aseptisation, des cylindres de 6 mm de diamètre sont prélevés à l'aide d'un emporte-pièce dans la partie médiane de la racine, au niveau de la zone génératrice. Ils sont ensuite débités en tronçons de 2 mm d'épaisseur puis, placés en tube fermé par des bouchons en cellulose (1 explant par tube). Pour initier des suspensions cellulaires et pour rechercher les doses d'herbicides utilisables pour la sélection, ils sont cultivés en boîte de Pétri de 90 mm de diamètre (5 explants par boîte).

- Des akènes

Les akènes aseptisés sont mis à germer en boîte de Pétri de 90 mm de diamètre (20 akènes par boîte) sur un milieu comprenant le milieu de base A (\S 3.13), du saccharose (10 g l⁻¹) et de l'agar Biokar type E (6 g l⁻¹); le pH étant ajusté à 5,5

avant autoclage. Les boîtes sont scellées avec du parafilm et placées à l'obscurité dans une pièce de culture à une température de 22° ± 2° C.

- Des cotylédons

Les cotylédons sont prélevés sur des germinations âgées de 5 à 15 jours, lacérés pour augmenter les surfaces réactionnelles et mis en culture sur milieu solide en boîte de Pétri de 90 mm de diamètre à raison de 6 à 8 cotylédons par boîte.

3. 15 INSTALLATION DE SUSPENSIONS CELLULAIRES

- D'origine racinaire

Des explants primaires de racines ou des explants ayant proliféré pendant 3 semaines sur un milieu solide gélosé (6 g l^{-1}) comprenant le milieu de base A et de l'ANA à 5. 10^{-6} M (pH : 5,5) sont placés dans des Erlenmeyers de 100 ml (5 explants par fiole) contenant 50 ml de milieu de base B additionné d'ANA (5. 10^{-6} M) et de saccharose (5 g l^{-1}). Après 14 jours de culture en milieu liquide agité sur un agitateur orbital, les explants initiaux sont éliminés. Les cellules isolées et les minicals, récupérés après décantation, sont repiqués dans du milieu neuf de même composition à l'exception du sucre dont la concentration est portée à 10 g l^{-1} . Les repiquages sont effectués toutes les 2 semaines et à partir du 3ème repiquage les cellules sont transférées dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu.

- D'origine cotylédonnaire

Des cotylédons sont prélevés sur des germinations âgées de 5 à 15 jours. Ils sont lacérés et placés soit directement dans des Erlenmeyers de 100 ml (20 cotylédons par fiole) contenant 50 ml de milieu de base B additionné d'ANA (5.10-6 M) et de saccharose (10 g l-1) soit après une phase de callogénèse de 28 jours sur un milieu gélosé de composition analogue à celle précitée. Les milieux sont changés tous les 14 jours et au 3ème repiquage, les explants initiaux sont enlevés; les cellules libres et les minicals sont transférés dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu. Au cours des subcultures suivantes des racines peuvent se former; elles sont systématiquement éliminées à chaque repiquage.

L'initiation de suspensions en présence de glyphosate (à 10^{-4} , 2.10^{-4} , $2,5.10^{-4}$, 10^{-3} M) est effectuée à partir de cotylédons ayant été repiqués 1 à 3 fois sur milieu gélosé en présence d'herbicide.

3. 16 CONDITIONS D'ECLAIREMENT ET DE TEMPERATURE DES PIECES DE CULTURE

L'induction et l'entretien des cals se fait en lumière continue (type Cool White De Luxe) à une température de $22^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C. La régénération des bourgeons et l'entretien des suspensions cellulaires a lieu en présence de 16 h de lumière tandis que l'enracinement des bourgeons se fait en présence de 12 h de lumière. La température de ces pièces est de $24^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C le jour et $20^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C la nuit.

Lorsque d'autres conditions ont été utilisées, elles sont spécifiées dans le texte.

3. 2 HERBICIDES

Les molécules utilisées dans cette étude sont :

- le glyphosate
 - . soit sous forme free acide pur à 99%
 - . soit sous forme de Roundup (360 g l-1 d'équivalent free acide)
- le glufosinate d'ammonium pur à 99%

Une partie du glyphosate nous a été fourni gracieusement par Monsanto Europe. L'autre partie, ainsi que le glufosinate provient de la société Cluzeau Info-Labo (Ste Foye la Grande).

L'incorporation aux milieux de culture est réalisée à partir de molécules pures. Pour le glyphosate, on prépare une solution-mère à 100 mg ml⁻¹ (pH : 5,5) dans de la soude 1N. Pour le glufosinate d'ammonium, les solutions-mère à 1 et 10 mg ml⁻¹ sont préparées dans de l'eau. Les solutions d'herbicide sont filtrées sur millipore (0,2 μ M) avant d'être additionnées aux milieux de culture autoclavés.

3. 3 ESSAIS DE REVERSION DE L'ACTION DU GLYPHOSATE

Les essais de réversion sont réalisés en boîte de Pétri sur des étalements de suspensions cellulaires sauf pour l'expérience avec l'AIA où des cals ont été utilisés. Les molécules dont on veut tester l'action sont ajoutées par filtration (millipore 0,2 μ m) au milieu de prolifération (milieu de base B additionné d'ANA (5.10⁻⁶ M), de BAP (10⁻⁷ M) et de saccharose (10 g l⁻¹) contenant ou non du glyphosate à 10⁻³ M.

3.4 **SELECTION** IN VITRO

3. 41 AVEC LE GLYPHOSATE

Des cotylédons sont placés en boîte de Pétri, sur des milieux d'induction de la callogénèse (milieu de base B additionné d'ANA (5.10^{-6} M) et saccharose (10 g I^{-1})) en présence d'herbicide aux doses définies dans les résultats . Après 4 semaines, on repère les cotylédons sur lesquels de petits cals se sont développés. On les repique sur un milieu de prolifération (milieu de base B comprenant de l'ANA (5.10^{-6} M) , de la BAP (10^{-7} M) et du saccharose $(10 \text{ g I}^{-1}))$ avec la même concentration d'herbicide. 1 mois plus tard, les cals qui ont proliféré sont placés sur des milieux avec des concentrations en herbicide plus élevées. Le mois suivant, on transfère les cals qui se sont développés sur des milieux avec des concertrations égales ou supérieures d'herbicide. Le processus est répété plusieurs fois.

<u>Des suspensions cellulaires</u> cultivées en présence ou non de glyphosate, sont prélevées après 14 jours de culture et étalées sur un lieu de prolifération (analogue à celui décrit ci-dessus) contenant de l'herbicide à la concentration définie dans les résultats. Au bout de 4 semaines, les cals qui se sont développés, sont repiqués sur

un milieu de sélection de composition identique. Cette opération est répétée jusqu'à ce qu'il soit possible de sélectionner des cellules capables de se multiplier normalement en présence d'herbicide.

3. 42 AVEC LE GLUFOSINATE

<u>Des suspensions cellulaires</u> sont étalées sur un milieu de prolifération (§ 3.41) renfermant de l'herbicide à la dose définie dans les résultats. Après 4 semaines, les cals qui ont proliféré, sont transférés sur un milieu de même composition. L'opération est répétée plusieurs fois puis, les cals sont placés sur des milieux contenant des concentrations plus élevées.

3. 5 PRODUCTION DE "VITRO-PLANTS"

Les cals sélectionnés (R1 et R2) sont placés en boîte de Pétri (10 cals par boîte) sur des milieux gélosés de diverses compositions pour induire le bourgeonnement. Le délai d'apparition des bourgeons étant variable, les cultures sont repiquées tous les mois sur des milieux neufs.

Les essais d'enracinement décrits dans les résultats ont été effectués dans des tubes fermés par des bouchons en cellulose et éclairés selon les conditions spécifiées au § 3.16. Lorsque l'enracinement ne se produit pas dans un délai de 30 jours, les bourgeons sont repiqués sur du milieu neuf en prenant soin d'éliminer les tissus nécrosés qui ont pu se former à la base.

Quand les "vitro-plants" enracinés sont suffisamment développés, ils sont sortis délicatement de leur tube de culture, lavés avec une solution fongique (Rovral 1,5 g l-1) à titre préventif, et repiqués en miniserre dans un terreau non stérile. Après 4 à 8 jours, la miniserre est ouverte progressivement, jusqu'à complète acclimatation. Lorsque les plantes ont atteint un développement suffisant, elles sont vernalisées.

3. 6 CARACTERISATION DES SOUCHES

3. 61 <u>COMPARAISON DE L'ACTION DE L'HERBICIDE ENTRE SOUCHES CELLULAIRES DIFFERENTES</u>

Les comparaisons de croissance entre souches cellulaires ont été effectuées en plaçant plusieurs cals (10) dans des boîtes de Pétri sur un milieu de prolifération (milieu de base B additionné d'ANA (5.10^{-6} M) , de BAP (10^{-7} M) et de saccharose (10 g l-1)) contenant des quantités variables d'herbicide.

La dose inhibant (DI) 50% de la croissance (DI50) de chaque souche a été déterminée.

En effectuant le rapport entre la DI50 d'une souche sélectionnée et celle d'une souche sensible, on obtient une valeur "X" qui permet de conclure qu'une souche sélectionnée supporte (avec une même inhibition de croissance, dans ce cas 50%) "X fois" plus d'herbicide qu'une souche sensible.

3. 62 DOSAGE DE L'ACIDE SHIKIMIQUE

Le dosage du shikimate a été effectué selon le protocole de CRESSWELL *et al.* (1988) avec toutefois des modifications.

Des cals lyophilisés (20 mg) sont broyés au mortier et placés dans un appareil de SOXLHEY. L'extraction se fait par épuisement dans 80 ml de méthanol 70°C pendant une 1 h. L'extrait est ensuite séché sous vide à 45°C, repris dans 10 ml d'eau + 10 ml d'hexane puis placé dans une ampoule à décanter. La phase aqueuse est récupérée, évaporée à sec et le résidu est redissous dans 10 ml d'eau acidifiée avec de l'acide phosphorique pH : 3,5. Une cartouche Sep-PAK C₁₈ (Millipore), est activée par 2 ml de méthanol 100 % puis rincée par 5 ml d'eau acidifiée avec de l'acide phosphorique pH : 3,5. Une quantité aliquote (2 ml) d'extrait est passée sur la cartouche, puis on élue avec 8 ml d'eau acidifiée. La phase aqueuse collectée (10 ml) peut être analysée par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) pour détecter l'acide shikimique.

Le système HPLC (LKB) est équipé d'un détecteur UV-visible à longueur d'onde variable, d'un intégrateur (Shimadzu C-R5A Chromatopac) et d'une colonne ODS dp5 4,6 mm \times 15 cm (Ultrasphère, Beckman). Le volume injecté dans l'appareil est de 20 μ l, le débit de la phase mobile (acide phosphorique pH : 3,5) est de 0,5 ml min⁻¹ et la colonne est thermostatée à 25° C. La détection se fait à 220 nm. Le temps de rétention de l'acide shikimique est de 5 mn. La colonne est lavée par du méthanol à 100 % et rééquilibrée à l'acide phosphorique avant toute nouvelle injection.

La quantité d'acide shikimique contenue dans les différents extraits est déterminée en corrélant la surface du chromatogramme de l'acide shikimique étalon avec celle des chromatogrammes des différents échantillons.

3. 63 DOSAGE DE L'EPSP SYNTHASE

Nous avons suivi pour l'essentiel le protocole fourni par GIUSEPPE FORLANI pendant notre séjour dans le laboratoire dirigé par ERIK NIELSEN (Pavie, Italie).

3. 631 Extraction

Les cals cultivés en boîte de Pétri sur un milieu sans herbicide sont récoltés 15 jours après la mise en culture c'est-à-dire pendant la phase de croissance active et placés dans du tampon à 4°C (4 ml g MF⁻¹) (Hepes NaOH 50 mM pH : 7,0 + glycerol 10 % + glutathion réduit 5 mM + heptamolybdate d'ammonium 0,1 mM + EDTA 0,1 mM). Ils sont homogénéisés dans un broyeur de Potter. 10 mg ml⁻¹ de PVPP sont ajoutés pour empécher l'oxydation par les phénols. L'ensemble est centrifugé pendant 15 min à 10 000 rpm (12 000 g) dans une centrifugeuse réfrigérée Sorvall. Les surnageants sont fractionnés au sulfate d'ammonium (0-70 % de saturation, 436 mg ml⁻¹). Les protéines sont récupérées après 20 mn de centrifugation à 10 000 rpm. Les culots sont remis en suspension dans 3 ml de tampon d'extraction dilué au demi et dessalés

sur une colonne (L : 15 cm, diamètre : 1,5 cm) contenant 2,5 g de résine Biogel P6DG (Bio-rad). L'élution se fait avec 20 ml de tampon d'extraction dilué au demi et à la sortie de colonne on recueille la fraction 0-6 ml.

Dans le cas des feuilles, le protocole utilisé est identique mais les tissus sont broyés en présence d'azote liquide dans un mortier et après la première centrifugation les surnageants sont filtrés sur Miracloth.

3. 632 <u>Détermination</u> de <u>l'activité</u> spécifique

Le S3P synthétisé par *Aerobacter aerogenes* nous a été fourni gracieusement par GIUSEPPE FORLANI (Université de Pavie) et par STEPHEN PADGETTE (Monsanto USA).

Chaque extrait enzymatique, dont la quantité en protéines est connue, est incubé pendant des durées variables , à 35° C, dans un milieu réactionnel contenant pour 100 μ l de volume final : 1 mM de S3P, 1 mM de PEP, 0,2 mM de (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O et 100 mM de Hepes NaOH pH : 7,0. La réaction est stoppée en ajoutant 1 ml de réactif coloré au vert de malachite spécifique des phosphates inorganiques (le Tergitol NP 10 (Sigma) dilué à 1 % a été utilisé à la place du Sterox dans le mélange coloré décrit par LANZETTA et al. (1979)). La coloration est stabilisée en ajoutant, 1 mn après l'arrêt de la réaction, 100 μ l de citrate de sodium. Les réactions contrôles ne sont pas incubées. Les activités aspécifiques libérant du phosphate sont mesurées en omettant le S3P ou le PEP du milieu réactionnel. La lecture des échantillons se fait à 660 nm.

L'activité de l'EPSP synthase (S3P+PEP ----> EPSP+Pi) est calculée en appliquant la formule ci-dessous:

EPSP synthase = DO_{660} (+S3P+PEP) - DO_{660} (-S3P+PEP) - DO_{660} (+S3P-PEP)

La relation entre la quantité de phosphate inorganique et la DO a été déterminée à partir de la courbe étalon établie avec le KH_2PO_4 ; 1 nmole de PO_4^{2-} correspond à une $DO_{660} = 0,065$.

3. 633 Sensibilité au glyphosate

Pour évaluer les effets du glyphosate sur l'activité de l'EPSP synthase in vitro, une quantité aliquote d'extrait est incubée 30 min à 35° C avec le milieu réactionnel décrit plus haut et 10 μ l de glyphosate à concentrations variables. La quantité d'enzyme est choisie de manière à ce que le phosphate inorganique formé en absence de glyphosate corresponde à une DO660 = 1.

3. 634 <u>Dosage</u> des protéines

La concentration en protéines des extraits dessalés est mesurée avec la solution commerciale Biorad selon la méthode de BRADFORD (1976). La courbe étalon est établie avec de la sérum albumine bovine. A 1 μ g de protéine correspond une DO₅₉₅ = 0,059.

3. 64 DOSAGE DES CHLOROPHYLLES

L'extraction des chlorophylles des cals et des feuilles a été effectuée d'après le protocole de LEE (1981), légèrement modifié.

Les tissus (3,5 g dans le cas des cals et 0,5 g dans le cas des feuilles) sont homogénéisés au broyeur de Potter avec 10 ml d'éthanol pur et centrifugés à 10000 g pendant 10 min. Pour obtenir un épuisement complet 4 extractions supplémentaires à l'éthanol sont effectuées. Les surnageants rassemblés (50 ml) présentant fréquemment une certaine turbidité, une quantité aliquote (10 ml) est soumise à une nouvelle centrifugation. La densité optique de l'extrait limpide est alors mesurée à 649 nm et à 665 nm avec un spectrophotomètre Unikon.

La concentration en chlorophylle totale est déterminée selon WINTERMANS & DE MOTS (1965).

Chi a = (13,70 DO₆₆₅ - 5,76 DO₆₄₉) μ g ml⁻¹ Chi b = (25,80 DO₆₄₉ - 7,60 DO₆₆₅) μ g ml⁻¹ Chi a + Chi b = (6,10 DO₆₆₅ + 20,04 DO₆₄₉) μ g ml⁻¹

3. 7 TRAITEMENTS DES PLANTES EN SERRE

La recherche d'une dose de traitement est effectuée selon la méthodologie suivante : des plantules (9 par barquette) au stade 2 feuilles sont pulvérisées avec 2,5 ml d'herbicide à différentes concentrations, à l'aide d'un vaporisateur à bouche Lefranc et Bourgeois. Le volume appliqué correspond à 1000 l ha⁻¹. Après 4 semaines, les plantes ont été observées et pesées.

Pour comparer la sensibilité des plantes sensibles au Roundup avec celle des plantes provenant des croisements entre plantes sensibles et plantes sélectionnées, la méthode suivante a été utilisée. Un montage équipé d'une buse est réglé de manière à délivrer 0,5 l ha⁻¹ de Roundup avec un volume de 200 l d'eau. L'application de concentrations plus élevées se fait en passant les plantes plusieurs fois sous la buse.

4. RESULTATS

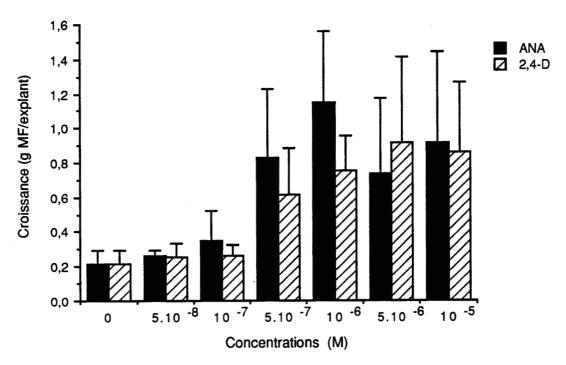


Fig. 6 : Influence de l'acide naphtylacétique (ANA) et de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) sur la croissance (g de matière fraiche (MF) par boîte de Pétri) d'explants racinaires, après 14 jours de culture. Les hormones ont été additionnées au milieu de base A. La masse initiale d'un explant est de 64 mg. Les écart-types ont été calculés sur 6 explants.

4. 1 <u>POTENTIALITES DE DIFFERENTS ORGANES DE LA CHICOREE A CAFE EN CUL-</u> <u>TURE IN VITRO</u>

Avant d'entreprendre la recherche de Chicorées à café résistantes aux herbicides par cultures cellulaires, il était indispensable, en raison de l'absence totale de données bibliographiques, de vérifier les aptitudes de cette plante en culture *in vitro*. Pour cela, nous nous sommes servis de racines tubérisées et de cotylédons issus de germinations.

4. 11 RACINES TUBERISEES PROVENANT DE PLANTES ADULTES

4. 111 Conditions callogènes

4. 1111 Pour explants primaires

De manière à déterminer les conditions hormonales permettant d'obtenir une callogénèse importante sur des explants primaires de racines tubérisées, une série d'essais avec l'ANA et le 2,4-D a été mise en place.

Au milieu de base A, nous avons ajouté de l'ANA et du 2,4-D à différentes concentrations (agar à 6 g l^{-1} et pH : 5,5).

Les résultats (fig. 6) montrent qu'après 14 jours de culture, la meilleure croissance est obtenue avec 10^{-6} M d'ANA et avec 5.10^{-6} M de 2,4-D. Toutefois pour ces doses, l'ANA permet une prolifération plus importante (1,1 g par explant) que le 2,4-D (0,9 g par explant). Nous avons donc préféré, pour la suite de notre étude, utiliser l'ANA. Par ailleurs, nous avons observé qu'en absence d'auxine ou aux faibles concentrations (5.10^{-8} ; 10^{-7} M) des bourgeons se développent.

4. 1112 <u>Installation de suspensions cellulaires</u>

Les expériences réalisées sur les explants primaires de racines ont montré qu'on pouvait induire aisément de la callogénèse, il devait donc être possible d'installer des suspensions cellulaires soit en transférant des cals formés sur milieu solide en milieu liquide, soit en plaçant directement des explants primaires en milieu liquide.

Avec les deux méthodes, des suspensions cellulaires ont été obtenues. La phase initiale en milieu solide n'est par conséquent pas indispensable.

Pensant que les réserves de sucres endogènes contenus dans les explants primaires étaient suffisantes, dans un premier temps, nous n'avons pas apporté de sucre au milieu d'initiation des suspensions. Mais comme nous avons constaté qu'en présence de 5 g l⁻¹ de saccharose la croissance est meilleure, nous avons été amenés à en ajouter. Cette quantité est portée à 10 g l⁻¹ lorsque les explants initiaux sont éliminés. La présence de 15 ou 20 g l⁻¹ de saccharose dans le milieu de culture accélère la croissance mais entraı̂ne une coloration jaune brunâtre qui laisse supposer que les cellules sont en mauvais état physiologique.

Cytokinine	Concentration (M)	% de cals organogènes (n=12)	Nombre moyen de bourgeons/ explant organogène
	0	83	3,5 ± 2,3
	5.10 ⁻⁷	75	2,8 ± 1,5
Kin	10-6	100	3,2 ± 2,5
	5.10 ⁻⁶	91,7	5,8 ± 3,2
	10 ⁻⁵	75	5,2 ± 3,3
	5.10 ⁻⁷	100	5,8 ± 2,1
BAP	10 ⁻⁶	91,7	4,0 ± 1,9
	5.10 ⁻⁶	83,3	3,6 ± 2,8
e.	10 ⁻⁵	58,3	1,6 ± 0,8

Tab. 2 : Influence de la kinétine (Kin) et de la benzylaminopurine (BAP) sur le bourgeonnement d'explants racinaires après 28 jours de culture. Les hormones ont été additionnées au milieu de base A. n représente le nombre d'explants mis en culture par condition.

4. 112 Conditions de bourgeonnement

4. 1121 Sur explants primaires

Les expériences sur la callogénèse ont montré que les explants cultivés en absence d'auxine régénérent des bourgeons. L'apport de cytokinines aux milieux de culture devait favoriser ce phénomène.

Au milieu de base A, nous avons apporté de la BAP et de la kinétine à différentes concentrations (agar à 6 g l^{-1} et pH : 5,5).

Le tableau 2 montre que les cytokinines ne sont pas indispensables à la formation des bourgeons. Néanmoins, la présence plus particulièrement de kinétine à 5.10-6 M ou de BAP à 5.10-7 M augmente le nombre moyen de bourgeons par explant, mais la taille de bourgeons est alors plus faible. Toutefois ce nombre, peut être très variable d'une racine à l'autre. Ceci est dû au fait que nous avons utilisé un matériel végétal issu d'une population à large base génétique.

4. 1122 Sur cals

L'utilisation des cals impliquait qu'à terme ils puissent régénèrer des bourgeons. Pour le vérifier, des cals ont été placés sur un milieu de base B contenant 5 g I^{-1} de saccharose et de la BAP à 5.10^{-7} M ou de la kinétine à 10^{-6} M (agar 6 g I^{-1} et pH : 5,5). Ces concentrations en hormones ont été choisies car sur les explants primaires, elles ont permis d'obtenir 100% de cals organogènes.

Cytokinine (M)	n	% de cals organogènes
Kin 10 ⁻⁶	111	42,6
BAP 5.10 ⁻⁷	108	64,7

Tab. 3 : Influence de la kinétine (Kin) et de la benzylaminopurine (BAP) sur le bourgeonnement de cals d'origine racinaire, après 28 jours de culture. Les hormones ont été additonnées au milieu de base B (saccharose (5 g l⁻¹)). n représente le nombre de cals mis en culture.

Le tableau 3 montre qu'après 28 jours de culture, 64% des cals cultivés avec de la BAP et 42% des cals cultivés avec de la kinétine ont régénéré des bourgeons.

Nous n'avons pas cherché à améliorer ces pourcentages de régénération car il n'était pas certain que des cals résistants aux herbicides nécessitent les mêmes conditions de régénération que des cals sensibles.

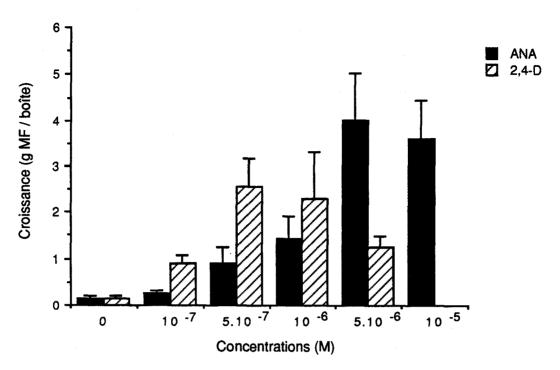


Fig. 7 : Influence de l'acide naphthylacétique (ANA) et de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) sur la croissance (g de matière fraiche (MF) par boîte de Pétri) d'explants cotylédonnaires après 28 jours de culture. Les hormones ont été additionnées au milieu de base B (saccharose (10 g l⁻¹)). Chaque boîte renferme 6 explants. La masse de matière fraiche mis en culture par boîte est de 48 mg.

Concentr	Croissance (g MF / boîte)	
ANA 10 ⁻⁶	0 2,4-D 10 ⁻⁸ 2,4-D 5.10 ⁻⁸	$1,414 \pm 0,521$ $1,080 \pm 0,485$ $2,336 \pm 0,717$
ANA 5.10 ⁻⁶	0 2,4-D 10 ⁻⁸ 2,4-D 5.10 ⁻⁸	$4,029 \pm 1,010$ $3,096 \pm 0,364$ $3,105 \pm 0,204$

Tab. 4: Influence de l'acide naphtylacétique (ANA) et de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) sur la croissance d'explants cotylédonnaires (g de matière fraiche (MF) par boîte de Pétri) après 28 jours de culture. Les hormones ont été additionnées au milieu de base B (saccharose (10 g l⁻¹)). Chaque boîte contient 6 cotylédons. Les écart-types ont été calculés à partir de 3 boîtes.

Eclairement (heures / jour)	Croissance (g MF / boîte)
16	2,746 ± 0,408
24	4,123 ± 0,453

Tab. 5 : Rôle de l'éclairement sur la croissance d'explants cotylédonnaires (g de matière fraiche (MF) par boîte de Pétri), après 28 jours de culture sur le milieu de base B additionné d'ANA (5.10⁻⁶ M) et de saccharose (10 g l⁻¹). Chaque boîte contient 6 cotylédons. Les écart-types ont été calculés sur 3 boîtes.

4. 12 COTYLEDONS ISSUS DE GERMINATIONS

4. 121 Conditions callogènes

4. 1211 Explants primaires

4. 12111 Rôle des auxines

De l'ANA ou du 2,4-D à différentes concentrations ont été additionnés avec du saccharose (10 g I^{-1}) au milieu de base B gélifié par de l'agar (6 g I^{-1}) (pH : 5,5).

Après 28 jours de culture, les croissances les plus importantes ont été obtenues avec 5.10⁻⁶ M d'ANA et avec 5.10⁻⁷ M de 2,4-D (Fig. 7). Comme pour les racines tubérisées, la prolifération a été plus intense avec l'ANA, mais des racines se sont formées même aux concentrations les plus élevées, ce qui n'était pas le cas avec le 2,4-D. Aussi, avons-nous tenté de supprimer ces racines en ajoutant au milieu de faibles quantités de 2,4-D. Ces apports n'ont pas supprimé la rhizogénèse mais ont par contre entraîné une diminution de la croissance exceptée dans le cas où 5.10⁻⁸ M de 2,4-D ont été ajoutés à 10⁻⁶ M d'ANA (Tab. 4).

La suite de notre étude nécessitant la production d'une biomasse importante, nous avons préféré utiliser de l'ANA à $5.10^{-6}~\rm M$, même si des racines pouvaient se former.

4. 12112 Rôle de la durée d'éclairement

Les expériences de callogénèse ont été réalisées en lumière continue sans qu'au préalable le rôle de la durée d'éclairement n'ait été étudié. C'est pourquoi des essais ont été réalisés comparativement en jour long (16 h de lumière) ou en lumière continue.

La croissance s'étant avérée plus importante en lumière continue (Tab. 5), nous avons donc continué à utiliser cette condition dans toutes les études impliquant la formation de cals.

4. 1212 Installation de suspensions cellulaires

La capacité des cotylédons à produire du cal nous permettait d'envisager l'installation de suspensions cellulaires à partir de ce matériel.

Différents essais ont été réalisés. Les cotylédons ont été placés soit directement en milieu liquide agité, soit après une phase de callogénèse en milieu solide.

L'obtention de suspensions cellulaires exploitables nécessitant un minimum de 3 mois dans les deux cas, nous avons préféré le plus souvent l'induction directe en milieu liquide car elle est plus simple à mettre en œuvre.

Concentr	Croisssance (g MF / boîte)	
0	0	8,616 ± 1,100
Kin	5.10 ⁻⁸ 10 ⁻⁷	8,509 ± 0,874 8,151 ± 1,563
ВАР	5.10 ⁻⁸ 10 ⁻⁷	8,211 ± 1,442 8,347 ± 0,742

Tab.6 : Rôle des cytokinines (kinétine (Kin) et benzylaminopurine (BAP) sur la croissance (g de matière fraiche (MF) par boîte de Pétri), après 28 jours de culture. Ces hormones ainsi que de l'acide naphtylacétique (5.10⁻³ M) ont été additionnés au milieu de base B (saccharose 10 g l⁻¹). La masse de l'inoculum mis en culture est de 830 mg par boîte. Les écart-types ont été calculés sur 6 boîtes.

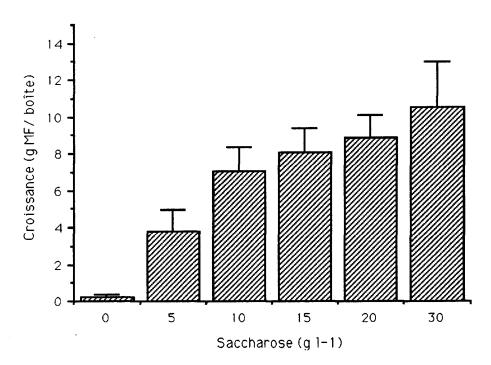


Fig. 8 : Influence du saccharose sur la croissance (g de matière fraiche (MF) par boîte de Pétri) d'étalements de suspensions cellulaires, après 28 jours de culture sur le milieu de base B additionné d'acide naphtylacétique (5.10⁻⁶ M) et de benzylaminopurine (10⁻⁷ M). La masse de l'inoculum mis en culture est de 830 mg par boîte. Les écart-types ont été calculés sur 3 boîtes.

Craignant de perdre le pouvoir organogène des suspensions cellulaires au cours du temps, nous n'avons jamais filtré les cultures lors des repiquages. Les suspensions ont donc toujours été constituées de cellules isolées et de minicals visibles à l'œil nu.

4. 1213 <u>Développement des cals issus d'étalements de suspensions cellulaires</u>

4. 12131 Rôle des cytokinines

La sélection devant être effectuée sur des étalements de suspensions cellulaires, il était indispensable qu'en absence d'herbicide ce milieu favorise une croissance importante de cals et que ceux-ci soient, si possible, chlorophylliens afin de faciliter le tri des cals. Dans ce but, des cytokinines à différentes concentrations, de l'ANA à 5.10^{-6} M et du saccharose à 10 g l⁻¹ ont été ajoutés au milieu de base B (agar 6 g l⁻¹ et pH : 5,5).

Le tableau 6 montre que l'apport de cytokinines a entraîné une très légère diminution de croissance. Mais comme en présence de BAP à 10⁻⁷ M des cals chlorophylliens se sont formés, nous avons préféré utiliser dans les milieux qui serviraient pour les étalements de suspensions cellulaires et l'entretien des cals l'ANA à 5.10⁻⁶ M et de la BAP à 10⁻⁷ M dans la mesure où la sélection serait facilitée.

4. 12132 Rôle du saccharose

Le saccharose est un élément du milieu de culture qui peut favoriser la croissance. Nous avons donc additionné au milieu de base B de l'ANA à 5.10^{-6} M, de la BAP à 10^{-7} M, et du saccharose à différentes concentrations. Il apparaît que les suspensions cellulaires étalées en boîtes de Pétri ont une croissance d'autant plus importante que la concentration en saccharose est élevée (Fig. 8). Cependant, nous avons noté que les tissus jaunissent à partir de 15 g 1^{-1} . Nous avons donc préféré opter ultérieurement pour du **saccharose à 10 g 1^{-1}.**

4. 122 Conditions de bourgeonnement

4. 1221 Sur explants primaires

Avant d'utiliser des suspensions cellulaires pour le programme de sélection, il convenait de vérifier si des bourgeons pouvaient se former sur des explants cotylédonnaires. Une série d'essais avec des cytokinines a été menée pour tenter d'induire le bourgeonnement. De la kinétine et de la BAP à différentes concentrations ainsi que du saccharose à 5 g l^{-1} ont été ajoutés au milieu de base B solidifié par de l'agar à 6 g l^{-1} .

Cytokinine	Concentration (M)	% de cals organogènes (n=32)	Nombre moyen de bourgeons/ explant organogène	
	0	0	0	
	10 ⁻⁷	54	1,8	
Kin	5.10 ⁻⁷	100	7,8*	
·	10-6	88	6,2*	
	5.10 ⁻⁶	84	8,1*	
	10 ⁻⁷	100	5,8 *	
BAP	5.10 ⁻⁷	97	8,2*	
	10 ⁻⁶	100	6,7*	
	5.10 ⁻⁶	78	4,8*	

Tab. 7: Influence de la kinétine (Kin) et de la benzylaminopurine (BAP) sur le bourgeonnement d'explants cotylédonnaires, après 28 jours de culture. Les hormones ont été additionnées au milieu de base B (saccharose 5 g l⁻¹ M). n représente le nombre d'explants mis en culture par condition. Quand le nombre de bourgeons par cotylédon est supérieur à 10, le comptage est difficile et la valeur 10 a alors été attribuée(+).

Cytokinine (M)	n	% de cals organogènes
Kin 10 ⁻⁶	39	89,4
BAP 5.10 ⁻⁷	26	92,3

Tab. 8 : Influence de la kinétine (Kin) et de la benzylaminopurine (BAP) sur le bourgeonnement de cals d'origine cotylédonnaire, après 28 jours de culture. Les hormones ont été additionnées au milieu de base B (saccharose 5 g l⁻¹ M). n représente le nombre de cals mis en culture.

Contrairement aux racines (Tab. 7), les cotylédons exigent la présence de cytokinines pour former des bourgeons. Le nombre moyen de bourgeons par explant est très fréquemment supérieur à 10, excepté pour 10^{-7} M de kinétine, ce qui rend leur dénombrement difficile. Leur taille est fonction du nombre moyen de bourgeons par explant : plus ils sont nombreux, plus ils sont petits. De plus, nous avons constaté que du cal pouvait se former avec de la kinétine à 10^{-6} M et avec de la BAP à partir de 5.10^{-7} M.

4. 1222 Sur cals

L'utilisation des cotylédons dans le programme de sélection impliquait qu'on puisse régénérer des bourgeons sur les cals comme cela avait été possible pour les racines. Par conséquent, nous avons placé des cals sur des milieux contenant des cytokinines. Au milieu de base B nous avons ajouté soit de la BAP à 5.10^{-7} M, soit de la kinétine à 10^{-6} M (saccharose à 5 g l⁻¹ et agar à 6 g l⁻¹).

Il apparaît (Tab. 8) que les deux cytokinines induisent la formation de bourgeons sur environ 90% des cals. Pour la suite de notre étude, nous avons retenu la BAP.

4. 13 CONCLUSION

Nous avons montré qu'à partir de racines tubérisées et de cotylédons de Chicorée à café, il était possible d'induire la callogénèse, d'installer des suspensions cellulaires et de régénérer des bourgeons. Les milieux de culture ayant donné les meilleurs résultats dans nos conditions expérimentales sont récapitulés dans le tableau 9. Notre travail de sélection pouvait donc commencer.

		Milieu de base	Hormones	Saccharosə
	Callogénèse sur explants primaires	Α	ANA 10 ⁻⁶ M	0
R A C	Installation de suspensions cellulaires	В	ANA 5.10 ⁻⁶ M	10 g l ⁻¹
1	Induction du bourgeonnement :		_	
N E S	sur explants primaires	А	BAP 5 10 ⁻⁷ M ou Kin 5 10 ⁻⁶ M	0
	sur cals	В	BAP 5.10 ⁻⁷ M	5gt ⁻¹
С	Callogénèse sur explants primaires	В	ANA 5.10 ⁻⁶ M	10 g l ⁻¹
C O T Y	Installation de suspensions cellulaires	В	ANA 5.10 ⁻⁶ M	10 g l ⁻¹
	Entretien des cals	В	ANA 5.10 ⁻⁶ M + BAP 10 ⁻⁷ M	10 g l ⁻¹
LEDO	Induction du bourgeonnement :			
O N S	sur explants primaires	В	10-7 M ≤ BAP ≥ 5.10 ⁻⁶ M 5.10-7 M ≤ Kin ≥ 5.10 ⁻⁶ M	5 g l ⁻¹
	sur cals	В	BAP 5 10 ⁻⁷ M	5 g l ⁻¹

Tab. 9 : Récapitulatif des milieux de culture utilisés dans nos expérimentations. La composition des milieux de base est donnée § 3. 13.

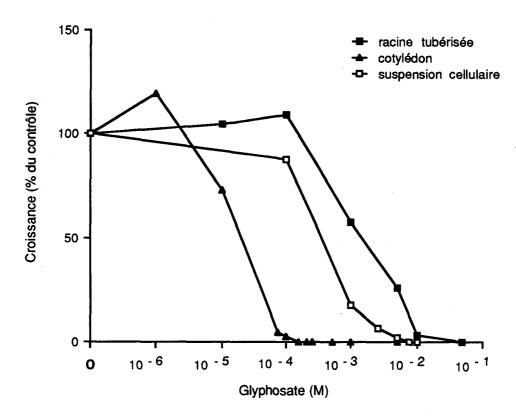


Fig. 9 : Effet du glyphosate sur la croissance (en pourcentage d'un contrôle cultivé sans herbicide) d'explants de racines tubérisées, de cotylédons et d'étalements de suspensions cellulaires après 28 jours de culture. Le milieu de base B est additionné d'acide dichlorophénoxyacétique (10⁻⁶ M) pour les explants racinaires; d'acide naphtylacétique (5.10⁻⁶ M) et de saccharose (10 g l⁻¹) pour les explants cotylédonnaires; d'acide naphtylacétique (5.10⁻⁶ M), de benzylaminopurine (10⁻⁷ M) et de saccharose (10 g l⁻¹) pour les étalements de suspensions cellulaires.

4. 2 <u>SELECTION AVEC LE GLYPHOSATE</u>

4. 21 RECHERCHE DES DOSES UTILISABLES POUR LA SELECTION

Pour commencer notre étude nous avions à notre disposition quatre types de tissus : des racines tubérisées, des cotylédons et des suspensions cellulaires d'origine cotylédonnaire et racinaire. Nous connaissions les conditions de milieux nécessaires à la callogénèse. Il était alors indispensable de définir la dose d'herbicide à employer dans ces milieux pour empêcher la croissance des cellules sensibles tout en autorisant le développement des cellules résistantes.

A cet effet, nous avons ajouté aux milieux de culture des concentrations croissantes de glyphosate et nous avons déterminé le poids des inoculums au moment de l'ensemencement et après 28 jours de culture, en présence et en absence d'herbicide. Cela, nous a permis d'exprimer la croissance en pourcentage par rapport aux lots témoins cultivés sans herbicide.

Les résultats (Fig. 9) montrent qu'il existe une différence d'efficacité selon le type de matériel végétal utilisé. Le glyphosate est plus actif sur les cotylédons (DI50 : 2.10^{-5} M) que sur les étalements de suspensions cellulaires d'origine cotylédonnaire (DI50 : 3.10^{-4} M) et que sur les explants racinaires (DI50 : 10^{-3} M).

Par conséquent, il est indispensable de définir une dose de sélection en fonction des tissus. Celles que nous avons retenues sont les suivantes:

- 5.10-3 M de glyphosate pour les étalements de suspensions cellulaires
- entre 10-4 et 2,5 10-4 M de glyphosate pour les cotylédons.

Nous avons décidé d'abandonner les explants de racines tubérisées pour plusieurs raisons :

- Les réserves importantes contenues dans les explants racinaires pouvaient être à l'origine d'une sensibilité plus faible au glyphosate.
- Le développement de cellules résistantes au coeur d'un explant racinaire, compte tenu de sa taille, aurait pu passer inaperçu.
- En absence d'herbicide, nous avons constaté qu'il existait d'une racine à l'autre une grande variabilité de croissance due probablement à la variabilité génétique du matériel végétal. En conséquence, nous avons également abandonné les suspensions cellulaires provenant de ces tissus.

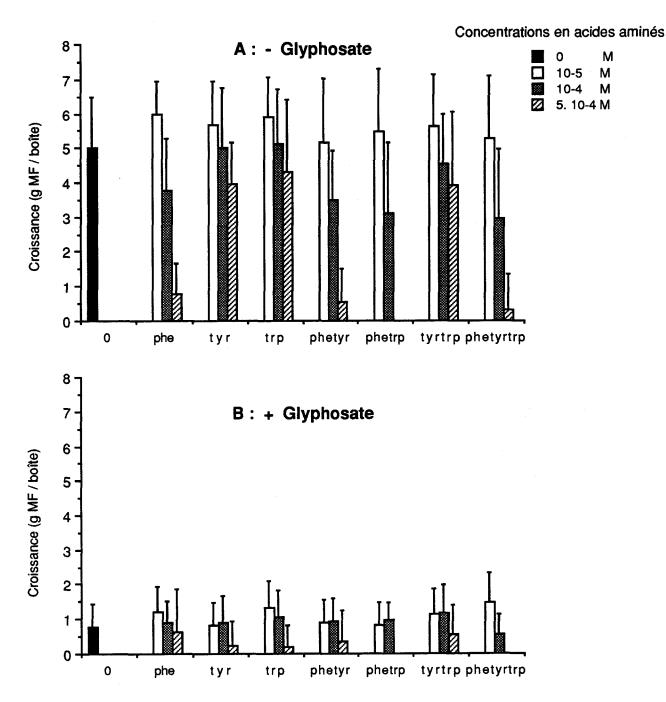


Fig. 10 : Effet des acides aminés aromatiques : phénylalanine, tyrosine et tryptophane, utilisés individuellement ou associés à des concentrations variables, sur la croissance (g de matière fraiche (MF) par boîte de Pétri) d'étalements de suspensions cellulaires cultivés en présence (B) ou non (A) de glyphosate (10⁻³ M) pendant 28 jours. Le milieu de base B est additionné d'acide naphtylacétique (5.10⁻⁶ M), de benzylaminopurine (10⁻⁷ M) et de saccharose (10 g l⁻¹). La masse de l'inoculum mis en culture est de 830 mg par boîte. Les écart-types ont été calculés sur au moins 2 répétitions de 5 boîtes chacune.

4. 22 ESSAIS DE REVERSION

Avant d'entreprendre la sélection avec le glyphosate, nous avons voulu vérifier si le mode d'action du glyphosate décrit dans la littérature était valide dans le cas de la Chicorée à café et si par conséquent il était possible de lever l'inhibition de croissance provoquée par cet herbicide. Les travaux de STEINRUCKEN & AMRHEIN (1980) ont montré que le glyphosate bloque l'action de l'EPSP synthase. Cela conduit à un arrêt de la synthèse des acides aminés aromatiques phénylalanine, tyrosine, tryptophane. On pouvait donc penser qu'en les ajoutant au milieu de culture, on annulerait l'action inhibitrice de l'herbicide.

4. 221 Acides aminés aromatiques

Nous avons apporté les acides aminés aromatiques à différentes concentrations individuellement ou en association à des milieux contenant ou non du glyphosate. Nous avons choisi délibérément d'utiliser une concentration en herbicide (10^{-3} M) qui n'inhibe pas totalement la croissance (85%) des étalements de suspensions cellulaires, afin de ne pas se trouver dans une situation où les effets n'auraient plus été physiologiques.

Les résultats (Fig. 10) montrent que :

- Il n'y a pas de réversion de l'action du glyphosate quelles que soient la concentration et la combinaison d'acides aminés employées.
- La phénylalanine exerce une action inhibitrice sur la croissance des cellules cultivées en absence d'herbicide qui est fonction de la concentration utilisée.
- La tyrosine et le tryptophane seuls ou associés influent très modérément sur la croissance des cellules.
- Par contre l'association de la phénylalanine à la tyrosine et/ou au tryptophane entraîne une inhibition égale ou supérieure à celle obtenue avec la phénylalanine seule.

L'action inhibitrice de la phénylalanine a rendu difficile l'interprétation des essais de réversion avec le glyphosate. Les résultats ne permettaient donc pas de conclure à une inhibition de l'EPSP synthase par le glyphosate.

4. 222 L'acide chorismique

Pour tenter de contourner cette difficulté, nous avons ajouté au milieu de culture de l'acide chorismique qui est situé en amont dans la voie métabolique des acides aminés aromatiques (Fig. 5) et dont la synthèse est également bloquée lorsque l'EPSP synthase ne fonctionne pas.

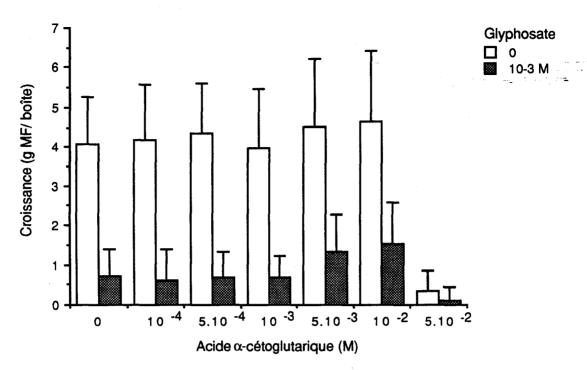


Fig. 12 : Effet de l'acide α-cétoglutarique sur la croissance (g de matière fraiche (MF) par boîte de Pétri) d'étalements de suspensions cellulaires cultivés pendant 28 jours en présence ou non de glyphosate (10⁻³ M). Le milieu de base B est additionné d'acide naphtylacétique (5.10⁻⁶ M), de benzylaminopurine (10⁻³ M) et de saccharose (10 g l⁻¹). La masse de l'inoculum mise en culture est de 830 mg par boîte. Les écart-types ont été calculés sur au moins 2 répétitions de 5 boîtes chacune.

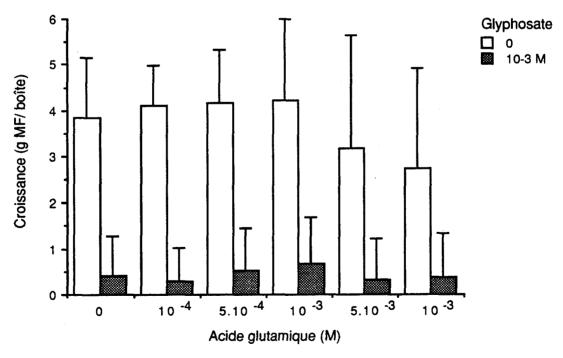


Fig. 13: Effet de l'acide glutamique sur la croissance (g de matière fraiche (MF) par boîte de Pétri) d'étalements de suspensions cellulaires cultivés pendant 28 jours en présence ou non de glyphosate (10⁻³ M). Le milieu de base B est additionné d'acide naphtylacétique (5.10⁻⁶ M), de benzylaminopurine (10⁻⁷ M) et de saccharose (10 g l⁻¹). La masse de l'inoculum mise en culture est de 830 mg par boîte. Les écart-types ont été calculés sur 5 boîtes.

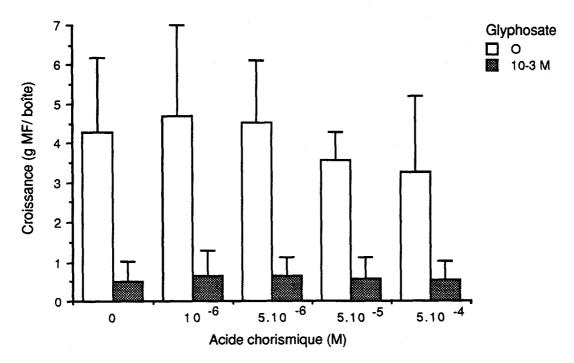


Fig. 11: Effet de l'acide chorismique sur la croissance (g de matière fraiche (MF) par boîte de Pétri) d'étalements de suspensions cellulaires cultivés pendant 28 jours en présence ou non de glyphosate (10⁻³ M). Le milieu de base B est additionné d'acide napthylacétique (5.10⁻⁶ M), de benzylaminopurine (10-7 M), de saccharose (10 g l⁻¹). La masse de l'inoculum mise en culture est de 830 mg par boîte. Les écart-types ont été calculés sur au moins 2 répétitions de 5 boîtes chacune.

Il apparaît (Fig. 11) qu'en absence de glyphosate, cette molécule n'est pas toxique pour les cellules même si aux fortes concentrations elle peut inhiber légèrement la croissance. Son addition, dans le milieu de culture en présence de glyphosate n'a pas permis de lever l'inhibition provoquée par l'herbicide.

4. 223 Acide α-cétoglutarique et acide glutamique

Le blocage de l'EPSP synthase conduit à une accumulation de shikimate-3-phosphate (S3P). Selon JENSEN (1986b), cela entraı̂ nerait une perte d'énergie (1 molécule de phosphoénolpyruvate (PEP) et 1 molécule d'érythrose-4-phosphate (E4P) par molécule de S3P accumulé (Fig. 5). KILLMER et al. (1981) et BODE et al. (1985) ont observé que l'acide pyruvique, l'acide α -cétoglutarique et le glutamate via vraisemblablement l'acide α -cétoglutarique permettent de lever l'inhibition de croissance due au glyphosate chez la Carotte et *Candida maltose*, respectivement. Nous avons voulu vérifier si en ajoutant ces molécules à différentes concentrations au milieu de culture on parvenait à annuler l'effet inhibiteur du glyphosate.

L'acide α -cétoglutarique n'a pas d'action inhibitrice sur la croissance des cellules (Fig. 12) en absence de glyphosate, excepté à la dose de 5.10⁻² M. Mais il ne permet cependant pas de lever l'inhibition de croissance provoquée par le glyphosate.

L'acide glutamique apporté au milieu de culture a un effet légèrement inhibiteur à partir de 5.10⁻³ M(Fig. 13). En présence du glyphosate, aucune réversion n'a puêtre observée.

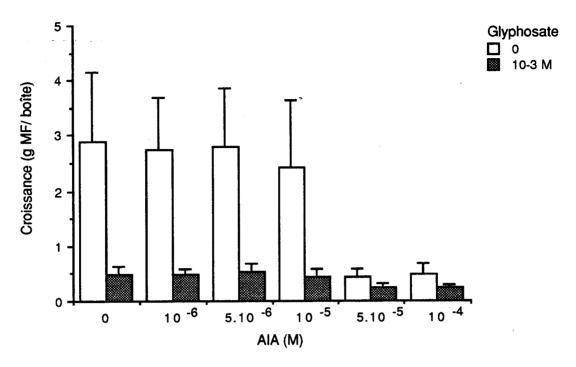


Fig. 14 : Effet de l'acide indolylacétique (AIA) sur la croissance (g de matière fraiche (MF) par boîte de Pétri) de cals cultivés pendant 28 jours en présence ou non de glyphosate (10⁻³ M). Le milieu de base B est additionné d'acide naphtlylacétique (5.10⁻⁶ M), de benzylaminopurine (10⁻⁷ M) et de saccharose (10 g l⁻¹). La masse de l'inoculum mise en culture est de 73 mg par boîte. Les écart-types ont été calculés sur 5 boîtes.

4. 224 AIA

Le glyphosate entraîne une diminution des concentrations en AIA (LEE, 1982a; 1982b; LEE *et al.*, 1983). Les travaux de LEE (1980a; 1982a) mentionnent qu'il est possible de réverser l'action du glyphosate en apportant des auxines (AIA ou 2,4D) au milieu de culture.

Nous avons tenté de supprimer l'effet inhibiteur du glyphosate en additionnant de l'AIA à différentes concentrations, à nos milieux de culture.

Là encore, aux concentrations où l'AlA n'est pas toxique (Fig. 14) c'est-à-dire jusqu'à 10^{-5} M, il n'a pas été possible de lever l'inhibition de croissance provoquée par le glyphosate.

4. 225 Conclusion

Tous les essais que nous avons effectués pour tenter de réverser l'action du glyphosate ont été infructueux. Mais cela ne signifie pas que les mécanismes d'action proposés pour le glyphosate sont à remettre en cause pour la Chicorée. Le blocage de l'EPSP synthase peut avoir des conséquences multiples : épuisement en acides aminés, entrée incontrôlée d'intermédiaires carbonés phosphorylés dans la voie shikimate, etc... En apportant au milieu de culture seulement certains éléments, il est possible que l'on ne puisse pas annuler l'ensemble des effets. C'est pourquoi, bien que le mode d'action de cette molécule, chez la Chicorée, ne soit pas vérifié nous avons tout de même entrepris la sélection avec le glyphosate.

4. 23 <u>ISOLEMENT DE SOUCHES CELLULAIRES PROLIFERANT SUR UN MILIEU DE SELECTION</u>

Des résultats préliminaires nous ont montré que sans appliquer de pression de sélection, le glyphosate était moins actif sur les cals dérivant de cotylédons que sur les cotylédons eux-mêmes. On ne pouvait par conséquent, pas trier les cals issus de cotylédons avec la dose de sélection que nous avions définie pour les cotylédons.

Dans la mesure où la sensibilité des suspensions cellulaires ne variait pas dans le temps, nous avons donc jugé qu'il était préférable de les utiliser pour la suite de notre étude.

Deux souches d'origine distincte ont été isolées :

- $\,$ R1 : au cours du 2ème passage sur un milieu solide contenant 5.10-3 M de glyphosate. Elle provient d'une suspension cellulaire qui a été entretenue pendant 10 mois avec 10-4 M de glyphosate.
- R2: au cours du 8ème passage sur un milieu solide contenant 5.10-3 M de glyphosate. Elle provient d'une suspension cellulaire qui a été entretenue pendant 8 mois avec 10-3 M de glyphosate.

Aucune souche n'a pu être isolée à partir de suspensions cellulaires entrenues sans herbicide.

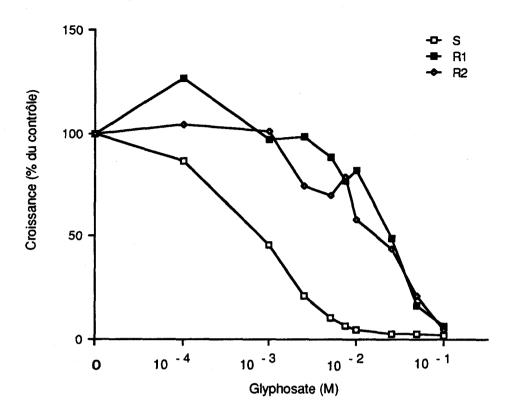


Fig. 15 : Effet du glyphosate sur la croissance (en pourcentage d'un contrôle cultivé sans herbicide) de cals sensibles (S) et sélectionnés (R1 et R2) après 28 jours de culture. Le milieu de base B est additionné d'acide naphtylacétique (5.10⁻⁶ M), de benzylaminopurine (10⁻⁷ M) et de saccharose (10 g l⁻¹).La croissance de matière fraiche par boîte de Pétri en fin de culture est de 2,184 g pour S, de 1,173 g pour R1 et de 1,706 g pour R2. La masse de inoculum mise en culture est de 73 mg.

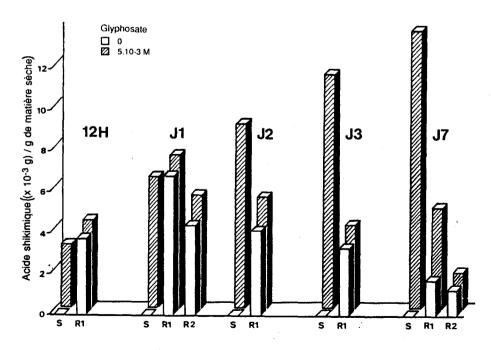


Fig. 16 : Teneur en acide shikimique dans les cals sensibles (S) et sélectionnés (R1 et R2) cultivés en présence ou non de glyphosate (10^{-3} M) après 12 heures, 1, 2, 3 ou 7 jours de culture. Le milieu de base B est additionné d'acide naphtylacétique (5.10^{-6} M), de benzylaminopurine (10^{-7} M) et de saccharose (10 g l^{-1}).

4. 24 <u>COMPARAISON DE L'ACTION DE L'HERBICIDE ENTRE SOUCHES SELECTION-NEES ET SOUCHES SENSIBLES</u>

4. 241 Croissance

Les colonies tissulaires sélectionnées R1 et R2 et sensibles S ont été placées sur un milieu de prolifération contenant des quantités variables de glyphosate. Après 28 jours de culture, les tissus ont été pesés et la croissance en % du contrôle a été calculée selon la formule définie au § 4. 21.

Nous avons observé qu'en absence d'herbicide la croissance des souches R1 (1,173 g par boîte) et R2 (1,706 g par boîte) est plus faible que celle de la souche S (2,184 g par boîte) d'environ 50 et 25% respectivement.

En présence d'herbicide (Fig. 15) les cals sélectionnés R1 et R2 sont capables de se développer sur des milieux contenant des concentrations d'herbicide beaucoup plus élevées que les cals sensibles S. Les deux souches R1 et R2 ont un comportement analogue. La DI50 de R1 et de R2 est de 2,5.10⁻² M tandis que celle de S est de 10⁻³ M. Les tissus sélectionnés ont donc une DI50 25 fois supérieure à celle des tissus sensibles.

4. 242 Acide shikimique

Comme les tissus traités au glyphosate accumulent d'importantes quantités d'acide shikimique (AMRHEIN *et al.*, 1980b, 1981, 1983), nous avons voulu contrôler s'il existait une différence d'accumulation entre les cals sélectionnés et les cals sensibles.

Des cals R1, R2 et S ont été placés sur un milieu de prolifération en présence ou non de 5.10^{-3} M de glyphosate. Les tissus ont été récoltés à différents moments après la mise en culture et lyophilisés. L'acide shikimique a été extrait et dosé selon le protocole décrit précédemment (§ 3. 62).

Il apparaît qu'en absence de glyphosate (Fig. 16) les tissus S n'accumulent pas d'acide shikimique au cours du temps. Par contre, en présence de glyphosate les quantités accumulées augmentent considérablement en fonction de la durée de la culture. Les tissus R1 et R2, quant à eux, contiennent de l'acide shikimique en absence d'herbicide; le maximum est atteint après 24 heures de culture, ensuite les quantités décroissent rapidement au cours du temps. Lorsqu'on ajoute du glyphosate au milieu de culture des tissus R1 et R2, ils n'accumulent à peine plus d'acide shikimique que lorsqu'ils sont cultivés sans herbicide. Donc contrairement à ce qui ce passe chez les tissus S, le glyphosate ne déclenche pas d'accumulation d'acide shikimique dans les deux souches sélectionnées R1 et R2.

La présence d'une quantité importante d'acide shikimique dans les tissus S de Chicorée à café traités à l'herbicide est donc une preuve indirecte que le glyphosate bloque le fonctionnement de l'EPSP synthase. Les tissus R1 et R2 en accumulant peu, on pouvait se demander si c'était lié à une activité plus importante de l'enzyme ou à une insensibilité de celle-ci au glyphosate.

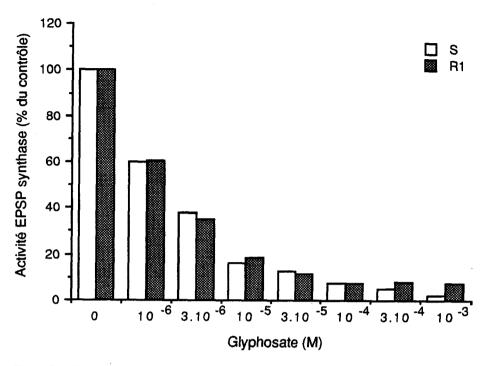


Fig. 17 : Comparaison de l'effet du glyphosate sur l'activité EPSP synthase (en pourcentage d'un contrôle mesuré sans herbicide) de cals sensibles (S) et sélectionnés (R1) .

4. 243 Activité EPSP synthase

Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons extrait l'enzyme EPSP synthase (§ 3. 631) des cals S, R1, R2, cultivés sur un milieu sans herbicide, en phase de croissance active et mesuré son activité spécifique (§ 3. 632).

Souches	Activité spécifique (nkat / mg de protéines)	Rapport
S	0,25 ± 0,13	
R1	1,11 ± 0,40	x 4,4
R2	1,01 ± 0,21	x 4

Tab. 10 : Comparaison de l'activité spécifique EPSP synthase de cals sensibles (S) et sélectionnés (R1 et R2). Les extractions ont été répétées au moins 3 fois. Les dosages ont été effectués en double après 3 temps différents d'incubation.

On constate que par rapport aux tissus sensibles (Tab. 10), l'activité spécifique des tissus R1 et R2 est plus élevée, respectivement de 4,4 et de 4 fois.

Nous avons aussi mesuré l'activité EPSP synthase des cals S et R1 en fonction de la concentration en glyphosate (§ 3. 633). Les résultats montrent que l'enzyme issue des 2 souches est inhibée de la même manière (Fig. 17). Dans les deux cas, il y a 50% de perte d'activité en présence de 2 μ M de glyphosate.

L'aptitude des tissus R1 et R2 à proliférer en présence de concentrations de glyphosate plus élevées que les tissus S est donc associée à la non-accumulation d'acide shikimique en liaison avec l'augmentation de l'activité EPSP synthase. L'enzyme étant sensible au glyphosate, la suractivité pourrait s'expliquer par une quantité de protéine EPSP synthase produite plus importante que dans les tissus S.

3. 244 Concentration en chlorophylle totale

Si les deux souches sélectionnées R1 et R2 présentent une sensibilité au glyphosate comparable, leur aspect est très différent. Les cals de la souche R1 sont très chlorophylliens et très durs tandis que ceux de la souche R2 sont beaucoup moins chlorophylliens et plus friables.

In vitro, nous avons observé que le glyphosate entrainaît un "jaunissement" des tissus S. Nous avons donc mesuré la quantité de chlorophylle totale contenue dans les tissus S et dans les tissus R1 et R2 (entretenu ou non avec 5.10^{-3} M de glyphosate), 15 jours après leur transfert sur un milieu contenant ou non du glyphosate à 5.10^{-3} M.

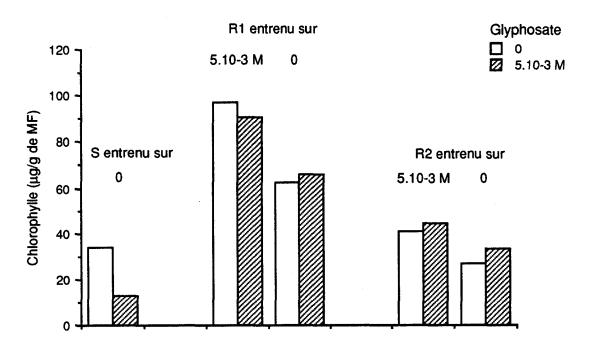


Fig. 18 : Contenu en chlorophylle des cals sensibles (S) et sélectionnés (R1) (entretenu préalablement pendant 32 mois avec ou sans 5.10⁻³ M de glyphosate) et (R2) (entretenu prélablement pendant 27 mois avec ou sans 5.10⁻³ M de glyphosate), 15 jours après leur transfert sur un milieu contenant ou non 5.10⁻³ M de glyphosate. Le mileu de base B est additionné d'acide naphtylacétique (5.10⁻⁶ M), de benzylaminopurine (10⁻⁷ M) et de saccharose (10 g l⁻¹).

Nombre	% de cals organogènes				
de	Souches				
passages	S	R1			
	n = 70	n =250			
1	23	4			
2	51	29			
3	58	45			
4	58	55			

Tab. 11 : Influence du nombre de passages sur le bourgeonnement de cals sensibles (S) et sélectionnés (R1). Le milieu de base B est additionné de benzylaminopurine (5.10 $^{-7}$ M) et de saccharose (5 g l $^{-1}$). n représente le nombre de cals mise en culture. La durée d'un passage est de 4 semaines.

On observe que la présence de glyphosate entraîne une réduction des teneurs en chlorophylle dans les tissus S (Fig. 18). Cela doit s'accentuer avec le temps de contact car après 1 mois de culture, nous avons toujours observé que les cals n'étaient plus chlorophylliens.

La souche R1 entretenue ou non avec du glyphosate sur une longue durée contient des quantités de chlorophylle très supérieures à la souche S. Par rapport à la souche entretenue en présence de glyphosate, la souche entretenue sans herbicide contient des quantités de chlorophylle plus faibles mais l'addition de glyphosate n'entraîne pas une diminution de la teneur en chlorophylle.

La souche R2 entretenue avec le glyphosate présente des teneurs en chlorophylle comparables à celles de la souche S. Lorsque les cals sont entretenus en absence prolongée d'herbicide, la concentration en chlorophylle est plus faible que lorsqu'ils sont entretenus en présence de glyphosate, comme pour la souche R1. Mais lorsqu'on remet les cals entretenus sans herbicide en contact avec du glyphosate, la quantité de chlorophylle reste constante.

Par conséquent, chez les souches R1 et R2 le glyphosate n'entraîne pas de diminution des teneurs en chlorophylle, contrairement à ce qui se produit avec la souche S.

4. 25 OBTENTION DE VITROPLANTS

L'isolement de souches capables de se développer sur des doses d'herbicides plus élevées que les souches S, nous a conduit à la régénération de plantes, ce qui impliquait d'induire la formation de bourgeons puis celle de racines.

4. 251 Conditions de bourgeonnement

- 4. 2511 Sur cals R1
- 4. 25111 Rôle du temps de culture

Nous avons tout d'abord utilisé le milieu de culture qui avait permis d'induire le meilleur bourgeonnement sur des cals S (milieu de base B avec de la BAP à 5.10^{-7} M et du saccharose à 5 g I^{-1}) et nous avons noté le pourcentage de cals qui produisaient des bourgeons en fonction du temps.

Il apparaît (Tab. 11) que les cals R1 forment des bourgeons plus lentement que les cals S. Au 2ème passage, 51% des cals S présentent des bourgeons contre seulement 29% des cals R1. A l'issue du 4ème mois de culture, les cals S et R1 ont le même pourcentage de régénération.

	% de cals organogènes (n=40)						
Nombre		Souches					
de		S	A	1			
passages		Milieux de base					
	MS	MS/2	MS	MS/2			
1	15	13	5	1			
2	65	48	48	49			

Tab. 12 : Influence du milieu minéral sur le bourgeonnement de cals sensibles (S) et sélectionnés (R1) en fonction du nombre de passages. MS correspond aux éléments minéraux complets de MURASHIGE & SKOOG (1962) et MS/2 aux mêmes éléments dilués de moitié. Le milieu de base B est additionné de benzylaminopurine (5.10⁻⁷ M) et de saccharose (5 g l⁻¹) La durée d'un passage est de 4 semaines. n représente le nombre de cals mis en culture par condition.

		·	Conc	entration (M)
			BAP 5.10 ⁻⁷	BAP 5.10 ⁻⁷ + ANA 10 ⁻⁷
		n	50	50
Nombre de	1	% de cals non ou partiellement nécrosés % de ces cals avec bourgeons	94 0	96 0
passages	2	% de cals non ou partiellement nécrosés % de ces cals avec bourgeons	68 9	58 0

Tab. 13 : Influence de l'acide naphtylacétique (ANA) en présence ou non de benzylaminopurine (BAP) sur le pourcentage de cals sélectionnés (R2) pas ou seulement partiellement nécrosés et le pourcentage de ces cals avec bourgeons en fonction du nombre de passages. La durée d'un passage est de 4 semaines. Les hormones ont été additionnées au milieu de base B (saccharose 5 g l⁻¹). n représente le nombre de cals mis en culture.

4. 25112 Rôle de la présence du glyphosate

Cette induction du bourgeonnement ayant eu lieu en absence de glyphosate, nous avons voulu contrôler si elle pouvait se produire en sa présence.

Les cals R1 ont bien régénéré des bourgeons mais ils sont apparus très tardivement (après cinq mois de culture). Les cals S sont quant à eux, morts dès le 1er mois de culture.

Donc contrairement à la souche S, la différenciation des bourgeons sur la souche R1 peut être induite en présence de glyphosate mais le ralentissement observé dans la néoformation de bourgeons nous a conduit à ne plus ajouter de glyphosate aux milieux d'induction.

4. 25113 Rôle de la composition du milieu

Pour tenter d'accélérer la néoformation des bourgeons, nous avons modifié la composition minérale du milieu d'induction. Les cals R1 et S ont été ensemencés sur un milieu identique à celui du \S 4. 25111 et sur un milieu dont les sels minéraux ont été réduits de moitié.

La composition minérale du milieu de culture n'a pas entraîné pour les cals R1 de modification du pourcentage de régénération en fonction du temps de culture (Tab. 12). Avec les cals S, ce pourcentage est plus faible lorsque les sels minéraux sont réduits de moitié.

Le milieu minéral complet donnant des résultats comparables pour la souche R1 et supérieurs pour la souche S à celui réduit de moitié, nous avons décidé d'employer le milieu complet.

4. 25114 Conclusion

La régénération de bourgeons sur la souche R1 est donc possible. Le milieu d'induction que nous avons défini n'est peut-être pas le meilleur, mais nous avons estimé qu'il nous permettrait d'obtenir suffisamment de bourgeons pour obtenir des plantes après enracinement.

4. 2512 Sur Cals R2

4. 25121 Rôle de l'auxine

Dans un premier temps, les tissus R2 ont été placés sur le milieu d'induction défini pour R1.

Après 2 mois de culture (Tab. 13) en absence d'ANA, 30% des cals sont morts et le bourgeonnement est très faible (9%) sur les cals pas ou partiellement nécrosés.

				BAP (M)	
			10 ⁻⁷	5.10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
		n	40	387	40
	1	% de cals non ou partiellement nécrosés	92	94	97
		% de ces cals avec bourgeons	0	0	0
Nombre de	2	% de cais non ou partiellement nécrosés	85	57	80
passages		% de ces cals avec bourgeons	20	15	9
	3	% de cals non ou partiellement nécrosés	100	65	100
		% de ces cals avec bourgeons	10	18	10

Tab. 14: Influence de la concentration en benzylaminopurine (BAP) sur le pourcentage de cals sélectionnés (R2) pas ou seulement partiellement nécrosés et le pourcentage de ces cals avec bourgeons en fonction du nombre de passages. L'hormone a été additionnée au milieu de base B (saccharose 5 g l⁻¹). La durée d'un passage est de 28 jours. n représente le nombre de cals mis en culture.

			Kin (M)			
			5.10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	
		n	70	70	30	
Nombre	1	% de cals pas ou partiellement nécrosés	76	78	73	
de		% de ces cals avec bourgeons	0	0	0	
passages	2	% de cals pas ou partiellement nécrosés	17	27	3	
		% de ces cals avec bourgeons	8	15	100	

Tab. 15: Influence de la concentration en kinétine (Kin) sur le pourcentage de cals sélectionnés (R2) pas ou partiellement nécrosés et le pourcentage de ces cals avec bourgeons en fonction du nombre de passages. L'hormone a été additionnée au milieu de base B (saccharose 5 g l⁻¹). La durée d'un passage est de 28 jours. n représente le nombre de cals mis en culture.

Nous avons pensé que l'absence brutale d'ANA dans le milieu d'induction pouvait être à l'origine de la mort des cals R2. C'est pourquoi une faible quantité d'ANA $(10^{-7} \, \text{M})$ a été ajoutée à la BAP.

Dans ces conditions (Tab. 13), la mortalité des tissus R2 a légèrement augmenté (40% après 2 mois de culture) et les cals ne régénérent plus de bourgeons.

4. 25122 Rôle des cytokinines

4. 251221 BAP

La concentration de BAP utilisée pour régénérer des bourgeons sur la souche R1 ne produisant pas des effets analogues sur la souche R2, des essais de bourgeonnement ont été réalisés sur différentes concentrations de BAP.

Le tableau 14 montre qu'après 3 mois de culture, quelle que soit la dose de BAP employée, le pourcentage de cals pas ou partiellement nécrosés est faible, inférieur à 20%. La régénération semble plus importante après 3 mois de culture avec la BAP à 10⁻⁷ M et à 10⁻⁶ M. Cependant, si on rapporte le pourcentage de cals organogènes au nombre d'explants mis en culture, on s'aperçoit qu'il est préférable d'avoir un grand pourcentage de cals vivants même s'ils régénèrent moins, plutôt que le contraire. La BAP à 5.10⁻⁷ M est par conséquent la concentration que nous avons choisie.

4. 251222 Kinétine

La mort des cals pouvait être liée à la nature de la cytokinine utilisée (BAP), par conséquent, nous avons testé les effets de la kinétine.

Il apparaît que les cals se nécrosent encore plus rapidement en présence de kinétine que de BAP (Tab. 15). Après 2 mois de culture, seulement 27% des cals ont survécu et ceci pour la moins mauvaise des concentrations 10⁻⁶ M. Nous avons donc continué à utiliser la BAP.

4. 25123 Rôle du sucre

L'origine de la mortalité des cals n'étant toujours pas identifiée, nous nous sommes demandé quel était le rôle du sucre. Au milieu de base B comprenant de la BAP à 5.10^{-7} M, nous avons ajouté du saccharose ou du maltose à diverses concentrations.

			Sac	charose (g	l ⁻¹)	М	laltose (g i	1)
			5	10	15	5	10	15
		n	100	30	30	120	120	50
	1	% de cals pas ou partiellement nécrosés	94	60	53	92	78	60
		% de ces cals avec bourgeons	3	0	0	1	0	0
Nombre	2	% de cals pas ou partiellement nécrosés	62	25	30	65	70	50
passages		% de ces cals avec bourgeons	5	3	22	6	4	0
	3	% de cals pas ou partiellement nécrosés	36	0	0	28	51	46
		% de ces cals avec bourgeons	36	0	0	30	41	26

Tab. 16 : Influence de la concentration en saccharose et en maltose sur le pourcentage de cals sélectionnés (R2) pas ou partiellement nécrosés et le pourcentage de ces cals avec bourgeons en fonction du nombre de passages. Le milieu de base B est additionné de benzylaminopurine (5.10-7 M). La durée d'un passage est de 28 jours. n représente le nombre de cals mis en culture.

	Saccharose (g l ⁻¹)						
	0	5	10	20			
n % de bourgeons vivants % de bourgeons vivants enracinés	21 24 2	522 65 2	169 74 2	157 67			

Tab. 17: Influence du saccharose sur le taux de survie des bourgeons sélectionnés (R1)et le pourcentage d'enracinement des bourgeons vivants, après 2 mois de culture. Les milieux (de base A sans hormone) ont été renouvelés après 1 mois de culture. n représente le nombre de bourgeons mis en culture.

Le saccharose (Tab. 16) a entraîné très rapidement des nécroses aux concentrations les plus fortes (10 et 15 g I^{-1}). A 5 g I^{-1} , il a permis après 3 mois de culture à 36% des cals de survivre. Ceux-ci ont régénéré des bourgeons dans 36% des cas.

Le maltose à 10 et 15 g l^{-1} a favorisé la survie d'environ 50% des cals après 3 mois de culture. Le meilleur pourcentage de régénération (41%) a été obtenu avec la concentration de 10 g l^{-1} .

La concentration plus que la nature du sucre semble donc responsable de la survie des cals.

La capacité des cals à régénérer, exprimée en fonction du nombre de cals ensemencés et non du nombre de cals pas ou partiellement nécrosés, est encore très faible, de l'ordre de 21% avec la meilleure concentration en maltose (10 g I^{-1}) et de 13% avec la meilleure concentration en saccharose (5 g I^{-1}).

4. 25124 Conclusion

La régénération des bourgeons sur la souche R2 est possible mais elle est difficile à induire en raison d'une mortalité importante des cals. Les différents milieux testés n'ont pas permis d'améliorer de manière importante le taux de survie des explants. Néanmoins, le nombre des bourgeons formés sur les explants qui régénérent permet d'envisager l'obtention de plantes par la recherche d'un milieu favorable à l'enracinement.

4. 252 Conditions d'enracinement

4. 2521 Sur bourgeons R1

Compte-tenu des difficultés d'enracinement, nous avons testé différents facteurs susceptibles de l'améliorer.

4. 25211 Le saccharose

Pour induire l'enracinement des bourgeons R1, nous les avons placés sur un milieu comprenant le milieu de base A (agar à 6 g I^{-1}) et différentes concentrations de saccharose.

Il apparaît (Tab. 17) que si le saccharose est indispensable à la survie des explants, la concentration utilisée n'influence pas l'enracinement qui dans tous les cas est quasiment nul.

Comme cette expérience n'a pas permis de dégager la meilleure concentration à utiliser, nous avons arbitrairement décidé d'employer le **saccharose à 5 g l^{-1}** pour les expériences suivantes.

			AIA (M)					AN	A (M)				AIE	3 (M)	
	0	5. 10 ⁻⁷	10-6	5.10-6	10 ⁻⁵	10-8	5.10 ⁻⁸	10-7	5.10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	10-7	10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	10-5
n	106	332	64	64	22	21	21	21	42	21	21	22	22	22	22
% de bourgeons vivants	50	60	48	34	23	57	57	52	45	52	33	40	55	36	18
% de bourgeons vivants enracinés	0	2	3	9	0	0	8	01	16	9	0	• 0	25	17	25

Tab. 18 : Influence de l'acide indolylacétique (AIA), de l'acide naphtylacétique (ANA) et de l'acide indolylbutyrique (AIB) sur le taux de survie des bourgeons sélectionnés (R1) et le pourcentage d'enracinement des bourgeons vivants, après 2 mois de culture. Les milieux (base A, saccharose 5 g l⁻¹)ont été renouvelés après un mois de culture. n représente le nombre de bourgeons mis en culture.

	***	AlB (mg mi⁻¹)					
	0	0,1	0,2	0,5	1		
n	21	26	26	26	257		
% de bourgeons vivants	61	31	46	23	54		
% de bourgeons vivants enracinés	0	0	16	0	51		

Tab. 19 : Effet du trempage (1 à 2 secondes) de la base des bourgeons sélectionnés (R1) dans une solution d'acide indolylbutyrique (AIB) sur le taux de survie des bourgeons et le pourcentage d'enracinement des bourgeons vivants, après 2 mois de culture sur un milieu (base A, saccharose 5 g l⁻¹) sans hormone. Les milieux ont été renouvelés après 1 mois de culture et à ce moment-là un nouveau trempage a été effectué. n représente le nombre de bourgeons mis en culture.

4. 25212 Les auxines

Le rôle des auxines dans l'enracinement est maintenant bien connu; nous avons ajouté au milieu décrit au paragraphe précédent, de l'AIA, de l'ANA et le l'AIB à différentes concentrations.

Au-delà de 5.10⁻⁷ M, l'AIA (Tab. 18) entraîne une mortalité importante des bourgeons qui est fonction de la concentration utilisée et le taux d'enracinement est très faible. L'AIA étant une hormone naturelle, elle a certainement été dégradée par la lumière au cours de la culture.

Les bourgeons placés sur des milieux avec de l'ANA ont un taux de survie comparable à celui des bourgeons cultivés sans hormone, excepté pour la concentration 5.10⁻⁶ M où il est plus faible. Le meilleur taux d'enracinement, quoique toujours très faible a été obtenu avec de l'ANA à 5.10⁻⁷ M.

Les bourgeons cultivés en présence d'AIB ont jusqu'à 10^{-6} M un taux de survie comparable à celui des bourgeons cultivés sans hormone, ensuite il décroît. Le taux d'enracinement des bourgeons survivants atteint 25% avec 10^{-6} M et 10^{-5} M. Cette valeur est faible rapportée au nombre de bourgeons mis en culture mais cependant meilleure par rapport aux résultats obtenus avec les autres auxines testées.

4. 25213 Le trempage dans une solution d'AIB

Les auxines incorporées au milieu de culture ont conduit à une légère augmentation du taux d'enracinement, en particulier avec l'AlB. On pouvait alors se demander si leur présence prolongée n'entraînait pas une action inhibitrice ce qui nous a conduit à vérifier si le trempage de la base des bourgeons dans une solution d'AlB concentrée, pendant un temps bref (1 à 2 s) ne suffisait pas pour induire l'enracinement après transfert sur un milieu sans hormone (§ 4. 25211).

Les résultats du tableau 19 montrent que le trempage dans des solutions d'AlB comprises entre 0,1 et 0,5 mg ml $^{-1}$ n'induisent pas ou peu l'enracinement. Par contre, sur les 50% des bourgeons qui survivent, le trempage dans une solution d'AlB à 1 mg ml $^{-1}$ permet d'obtenir un taux d'enracinement de 50%.

4. 25214 Conclusion

L'importante mortalité des bourgeons que l'on a pu noter lors des essais d'enracinement est en partie imputable à leur taille parfois réduite (<0,5 cm) et à leur mauvais état physiologique (trés souvent vitreux).

L'enracinement des bourgeons R1 a été très difficile à induire. Après avoir testé diverses compositions de milieux de culture, nous sommes parvenus grâce à la technique du trempage dans une solution d'AIB à 1 mg ml⁻¹ à provoquer l'enracinement de 50% des bourgeons survivants, soit 25% des bourgeons traités. Ce chiffre peut paraître faible, mais il constitue un progrès considérable par rapport aux résultats obtenus en incorporant les auxines aux milieux de culture.



Photos : (1) plante non sélectionnée S, (2) plante sélectionnée R1, (3) plante sélectionnée R2

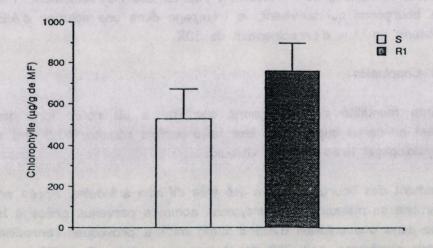


Fig. 19: Contenu en chlorophylle des plantes sensibles (S) et sélectionnées (R1).

4. 2522 Sur bourgeons R2

Pour induire l'enracinement des bourgeons R2, la technique du trempage mise au point pour les bourgeons R1 a été appliquée.

	AIB (mg ml ⁻¹)
n	191
% de bourgeons vivants	15,7
% de bourgeons vivants enracinés	3,7

Tab. 20 : Effet du trempage (1 à 2 secondes) de la base des bourgeons sélectionnés (R2) dans une solution d'acide indolylbutyrique (AIB) sur le taux de survie des bourgeons et le pourcentage d'enracinement des bourgeons vivants, après 2 mois de culture sur un milieu (base A, saccharose 5 g l⁻¹) sans hormone. Les milieux ont été renouvelés après 1 mois de culture et à ce moment-là un nouveau trempage a été effectué. n représente le nombre de bourgeons mis en culture.

Le tableau 20 montre qu'un très faible pourcentage de bourgeons survivent au traitement à l'AIB. On ne peut donc pas tirer de conclusion sur le taux d'enracinement des survivants.

L'origine de la mortalité est en majeure partie liée aux bourgeons eux-mêmes. Ils sont toujours petits (< à 0,5 cm), vitreux et anormaux (feuilles étroites).

Lorsqu'on parvient à les enraciner, cela a été le cas uniquement pour 10 bourgeons, ils ne se développent pratiquement pas.

4. 26 <u>DESCRIPTION DES PLANTES APRES ACCLIMATATION</u>

4. 261 R1

La morphologie des plantes R1 (Photo 2) est distincte de celle des germinations de la population Pévèle d'origine (Photo 1). Les feuilles sont légèrement ondulées, la nervation se rapproche de celle d'une monocotylédone.

Comme elles paraissaient plus vertes, nous avons mesuré les quantités de chlorophylle totale contenues dans les jeunes feuilles de plantes R1 et S cultivées en serre.

La figure 19 montre que les plantes R1 contiennent davantage de chlorophylle que les plantes S, ce qui concorderait avec les résultats obtenus sur les cals dont elles sont issues. Il est toutefois prudent de ne pas tirer de conclusion de cette observation, les conditions de culture et d'éclairement des plantes cultivées en serre ont pu jouer un rôle non négligeable.

Souches	Activité spécifique (nkat / mg de protéines)	Rapport
s	0,21 ± 0,04	
R1	0,53 ± 0,12	x 2,5
S x R1	0,25 ± 0,07	x 1,2
R1 x S	0,24 ± 0,05	x 1,1

Tab. 21 : Comparaison de l'activité spécifique EPSP synthase de plantes sensibles (S) et sélectionnées (R1) et de leur descendance F1 (S \times R1) et (R1 \times S). Les extractions ont été répétées au moins 4 fois. Les dosages ont été effectués en double après 3 temps différents d'incubation.

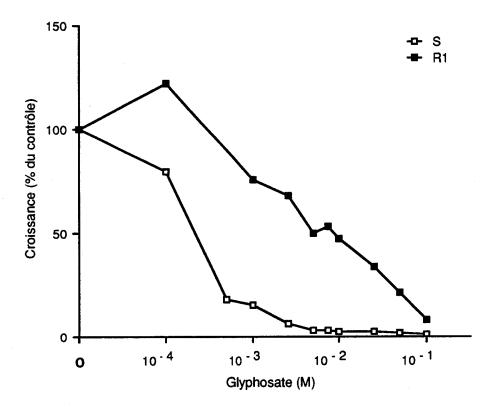


Fig. 20 : Effet du glyphosate sur la croissance (en pourcentage d'un contrôle cultivé sans herbicide) de cals issus de plantes sensibles (S) et sélectionnés (R1) après 28 jours de culture. Le milieu de base B est additionné d'acide naphtylacétique (5.10⁻⁶ M), de benzylaminopurine (10⁻⁷ M) et de saccharose (10 g l⁻¹). La croissance de matière fraiche par boîte de Pétri en fin de culture est de 5,520 g pour S et de 2,244 g pour R1. La masse de inoculum mise en culture est de 73 mg.

4. 262 R2

Sur les 10 plantes R2 qui ont été enracinées, 7 sont mortes pendant la phase d'acclimatation, vraisemblablement à cause de leur très petite taille. Trois ont pu être acclimatées mais elles sont mortes assez rapidement.

Leur morphologie (Photo 3) était complètement anormale. Elles avaient des feuilles très étroites et la dominance apicale avait complètement disparu. Ce phénomène de croissance en touffe a aussi été observé *in vitro*.

4. 27 <u>VERIFICATION DU TRANSFERT AUX PLANTES ENTIERES DES CARACTERISTI-QUES DES CALS SELECTIONNES</u>

Le contrôle de la sensibilité au glyphosate des plantes régénérées devait permettre de vérifier si les caractéristiques des cals étaient transférées aux plantes. Comme toutes les plantes R2 sont mortes après acclimatation, cette étude a été réalisée uniquement avec les cals R1.

4. 271 Mesure de l'activité EPSP synthase chez les plantes entières

L'activité spécifique EPSP synthase a été mesurée sur les plantes R1 et S.

Les résultats du tableau 21 montrent que l'activité enzymatique des plantes R1 est 2,5 fois supérieure à celle des plantes S. Elles ont donc conservé partiellement l'activité enzymatique plus élevée présentée par les cals initialement.

4. 272 Traitement des cals issus de plantes entières

4. 2721 Conséquence sur la croissance

Des tests de sensibilité au glyphosate ont été pratiqués *in vitro* sur des cals issus des plantes régénérées.

Dans un premier temps, des fragments de feuilles ont été placés sur un milieu de callogénèse contenant 5.10⁻³ M de glyphosate. Les explants R1 n'ont pas ou très peu proliféré mais sont demeurés chlorophylliens contrairement aux explants de plantes S.

Dans un deuxième temps, les explants foliaires ont été cultivés en absence d'herbicide sur un milieu de callogénèse, puis les cals formés ont été placés sur des concentrations variables de glyphosate.

Il apparaît (Fig. 20) que le glyphosate est beaucoup moins actif sur les cals issus de plantes R1 que sur les cals issus de plantes S. La DI50 des cals R1 est de 5.10⁻³ M et celle des cals S de 2,8.10⁻⁴ M. Le rapport entre les deux est de 18 fois. L'aptitude à proliférer sur des doses d'herbicide supérieures à celles des cals S se retrouve donc dans les cals issus de plantes R1. Mais, la différence de sensibilité entre les deux souches a diminué.

Souches	Activité spécifique (nkat / mg de protéines)	Rapport
s	0,40 ± 0,12	
R1	1,33 ± 0,30	x 3,3

Tab. 22 : Comparaison de l'activité spécifique EPSP synthase de cals issus de plantes sensibles (S) et sélectionnées (R1). Les extractions ont été répétées 3 fois. Les dosages ont été effectués en double après 3 temps différents d'incubation.

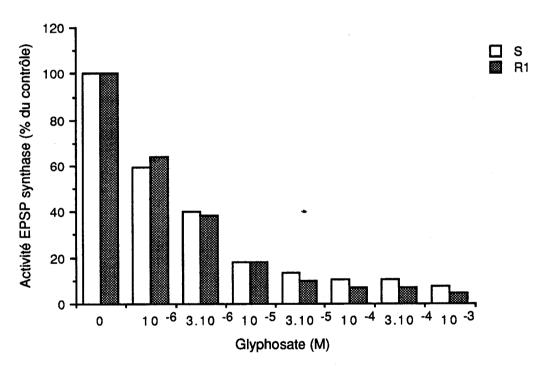


Fig. 21 : Comparaison de l'effet du glyphosate sur l'activité EPSP synthase (en pourcentage d'un contrôle mesuré sans herbicide) de cals issus de plantes sensibles (S) et sélectionnés (R1) .

Il a de nouveau été noté qu'en l'absence d'herbicide, la croissance des tissus R1 est plus faible (2,244 g par boîte) que celle des tissus S (5,520 g par boîte) d'environ 40%.

4. 2722 Conséquence sur l'activité EPSP synthase

On pouvait se demander si les résultats sur la croissance seraient corroborés par les dosages de l'activité EPSP synthase.

Il ressort du tableau 22 que si les cals issus des plantes R1 ont une activité spécifique EPSP synthase 3,3 fois plus élevée que celle issue des plantes S, celle-ci est moins élevée que dans les cals sélectionnés à l'origine.

Nous avons aussi contrôlé la sensibilité de l'enzyme extraite des cals R1 et S à différentes concentrations de glyphosate. Il apparaît (Fig. 21) que l'enzyme est inhibée dans les deux cas de la même manière. 2.10⁻⁶ M de glyphosate réduisent l'activité EPSP synthase de 50%.

4. 2723 Conclusion

L'aptitude des tissus R1 à se développer en présence de doses d'herbicide plus élevées que les tissus S s'est retrouvée dans les cals après un passage par plante entière. Cependant, celle-ci a diminué conjointement à l'activité EPSP synthase.

4. 28 <u>VERIFICATION DE LA TRANSMISSION DE LA DESCENDANCE DES CARACTE-RISTIQUES DES CALS SELECTIONNES</u>

Toute étude sur la descendance implique qu'au préalable les plantes fleurissent et produisent de graines.

4. 281 Vérification de la floraison et de la fertilité

Des programmes de croisements ont été mis en oeuvre en 1989 et en 1990.

En 1989, la montée à fleur des plantes R1 ne s'est pas produite spontanément, vraisemblablement à cause d'une vernalisation insuffisante (6 semaines). Elle a dû être déclenchée par un traitement à la gibberelline. Une solution contenant 75 mg I^{-1} de GA3 et 0,5 m I^{-1} de Tween a été appliquée à la fréquence suivante:

- 3 traitements par pulvérisation à 48 h d'intervalle
- 1 semaine sans traitement
- 3 traitements identiques aux précédents

Le retard dans la floraison (2 mois) a empêché la réalisation de tous les croisements prévus avec des plantes S. Seules les fécondations entre plantes R1 ont pu avoir lieu. Elles n'ont donné aucune graine. Les plantes R1 sont totalement auto-incompatibles.

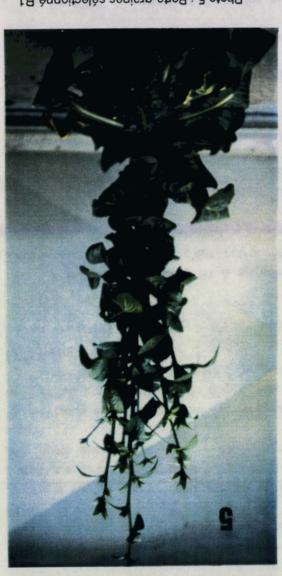




Photo 4 : Porte-graines non sélectionné S

En 1990, la montée des plantes R1 a encore été tardive, bien que le temps de vernalisation ait été prolongé (au moins 8 semaines). Le port de ces plantes (Photo 5) est très caractéristique, plus dressé et beaucoup moins développé que celui des plantes "normales" (Photo 4). En raison du retard à la floraison, un seul croisement réciproque a été réalisé; les autres croisements sont le fruit d'une fécondation libre entre les plantes R1 et un ensemble de plantes S.

Des graines ont été récoltées dans les croisements réciproques de R1 avec Dageraad, mais R1 a été meilleure femelle (1 g de graines récolté par pied) que mâle (54 graines récoltées par pied). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que certaines anthères de R1 sont nécrosées.

Des croisements réciproques entre R1 et Pévèle effectués dans les serres de l'Université ont aussi fourni des graines dans les deux sens de croisements.

La plante R1 est donc fertile. Elle peut servir de parent femelle comme de parent mâle.

4. 282 Recherche de la dose à utiliser

L'efficacité d'un herbicide dépend de plusieurs paramètres :

- la quantité de produit utilisé
- le mode de traitement
- le stade de développement de la plante cultivée et celui des adventices.

Le glyphosate s'emploie par pulvérisation foliaire sur des plantes en croissance active. Les adventices étant des concurrentes de la Chicorée surtout au début de la culture, il a donc été décidé de définir une dose de traitement sur les plantes au stade 2 feuilles.

A titre de comparaison, 2 séries de traitement ont été effectuées, l'un avec le glyphosate pur, l'autre avec le Roundup.

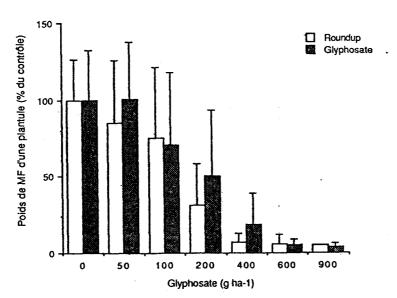
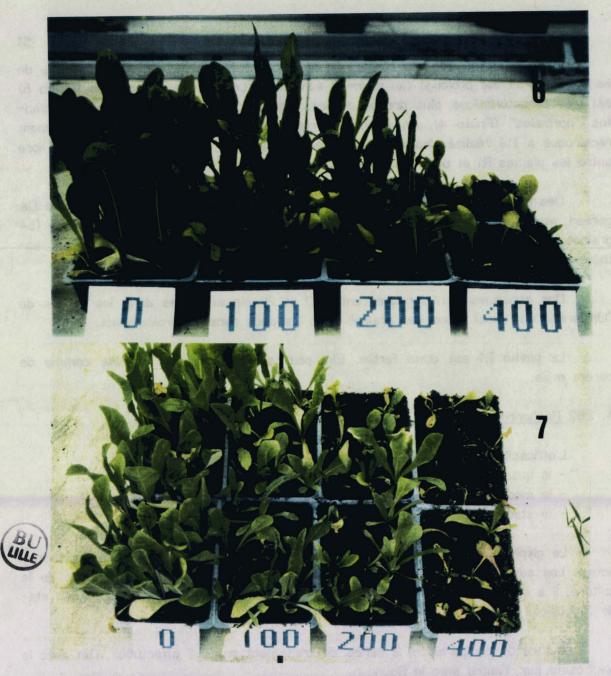


Fig. 22: Effet du glyphosate et du Roundup, 4 semaines après le traitement, sur le poids de matière fraiche (MF) des plantules (en pourcentage d'un témoin non traité). Le traitement a été appliqué au stade 2 feuilles. Il y 36 plantules par condition. Les écart-types ont été calculés sur les plantes qui ont survécu au traitement.



Photos (6 et 7) : Effets d'une pulvérisation foliaire de glyphosate (g ha-1) (6) et de Roundup (7) sur des semis, après 30 jours en serre. Les plantes ont été traitées au stade 2 feuilles.



Photo (8): Effets d'une pulvérisation de Roundup (de gauche à droite 0, 50, 200, 500, 900 g ha ⁻¹) sur le développement des racines. Les plantes ont été traitées au stade 4 feuilles.

Le Roundup est légèrement plus inhibiteur que le glyphosate (Fig. 22), les adjuvants contenus dans le produit formulé accroissant l'efficacité de la molécule pure.

A la dose de 400 g ha^{-1} et un mois après le traitement, toutes les plantes S sont mortes ou quasiment mortes. Aux doses inférieures, l'herbicide a entraîné un arrêt plus ou moins rapide du fonctionnement des méristèmes foliaires (Photo 6,7) et racinaires (Photo 8).

4. 283 <u>Traitement en serre des croisements réalisés entre la souche sélectionnée et des souches sensibles</u>

Ne disposant pas de graines issues d'autofécondation, les plantes R1 s'étant montrées totalement autoincompatibles, les tests sur la transmission du caractère ont été effectués sur les plantes issues du croisement entre R1 et différentes plantes S.

Les essais de doses de traitement ont montré qu'à 400 g ha $^{-1}$ de glyphosate, toutes les plantes S mouraient. Nous avons donc choisi de pulvériser des concentrations de 0,5 , 1 et 2 l ha $^{-1}$ de Roundup soit 180, 360 et 720 g ha $^{-1}$ de glyphosate. Les traitements ont été appliqués sur des plantes au stade 4 feuilles.

Deux mois et demi après le traitement, toutes les plantes S et toutes les plantes issues des croisements avec R1 sont mortes ou quasiment mortes. A 0,5 l ha^{-1} les symptômes ont été plus lents à se manifester.

Ces différents résultats montrent que le caractère sélectionné au niveau cellulaire est récessif ou qu'il n'a pas été transmis lors des croisements sexués.

4. 284 Mesure de l'activité EPSP synthase des plantes issues des croisements

La sensibilité au glyphosate étant liée à l'activité EPSP synthase, il était important de contrôler celle-ci dans les plantes issues des croisements. Les mesures ont été réalisées sur les croisements réciproques de R1 avec Dageraad et de R1 avec Pévèle.

Comme nous n'avons pas noté de différences d'activité entre les deux parents S, nous avons confondus leurs résultats dans le tableau 21. Il ressort que l'activité EPSP synthase des plantes issues des croisements avec R1 est sensiblement identique à celle des plantes S. Le sens du croisement n'a eu aucune influence.

4. 285 <u>Traitement in vitro des cals dérivant des croisements entre la souche sélectionnée et les souches sensibles</u>

Nous avons voulu contrôler si les résultats obtenus en serre, se retrouvaient in vitro.

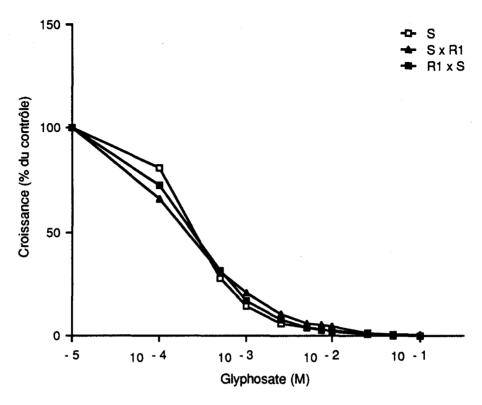


Fig. 23 : Effet du glyphosate sur la croissance (en pourcentage d'un contrôle cultivé sans herbicide) de cals (S) issus de plantes sensibles et de cals (S x R1) et (R1 x S) issus de plantes sensibles croisées avec des plantes sélectionnées (R1), après 28 jours de culture. Le milieu de base B est additionné d'acide naphtylacétique (5.10⁻⁶ M), de benzylaminopurine (10-7 M) et de saccharose (10 g l⁻¹).

Souches	Activité spécifique Rapport (nkat / mg de protéines)		
s	0,54 ± 0,06		
S x R1	0,60 ± 0,07	x 1,1	
R1 x S	0,55 ± 0,11	x 1,0	

Tab. 23 : Comparaison de l'activité spécifique EPSP synthase de cals (S) issus de plantes sensibles et de cals (S x R1) et (R1 x S) issus de plantes sensibles croisées avec des plantes sélectionnées (R1).Les extractions ont été répétées au moins 4 fois. Les dosages ont été effectués en double après 3 temps d'incubation.

4. 2851 Conséquence sur la croissance

Des cals ont d'abord été induits en absence d'herbicide sur des fragments foliaires de plantes issues des croisements réciproques de R1 avec Pévèle et de R1 avec Dageraad. Un mois plus tard, ils ont été placés sur différentes concentrations de glyphosate.

Les résultats ont montré qu'il n'existait pas de différences de sensibilité au glyphosate entre les cals provenant des croisements réalisés avec Pévèle et ceux obtenus avec Dageraad, ils ont donc été réunis.

La figure 23 montre que tous les cals, quelle que soit leur origine, ont la même sensibilité au glyphosate. Leur DI50 est de 3.10^{-5} M.

4. 2852 Conséquence sur l'activité EPSP synthase

L'activité EPSP synthase mesurée à partir des cals issus des croisements de R1 avec Dageraad a été réunie avec celle des croisements avec Pévèle puisqu'il n'existe pas de différences.

Le tableau 23 confirme les résultats obtenus sur plantes entières à savoir que l'activité EPSP synthase de la F1 n'est pas plus élevée que celle des parents sensibles.

4. 2853 <u>Conclusion</u>

Les résultats obtenus *in vitro* concordent par conséquent avec ceux obtenus en serre. Le caractère sélectionné au niveau cellulaire n'a pas été transmis ou il est récessif. Le traitement *in vivo* et *in vitro* de la F2 permettra de trancher entre ces hypothèses.

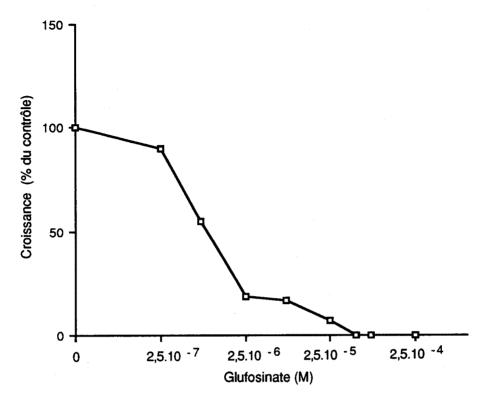


Fig. 24 : Effet du glufosinate sur la croissance (en pourcentage d'un contrôle cultivé sans herbicide) d'étalements de suspensions cellulaires, après 28 jours de culture. Le milieu de base B est additionné d'acide naphtylacétique (5.10 $^{-6}$ M), de benzylaminopurine (10 $^{-7}$ M) et de saccharose (10 g l $^{-1}$).

4. 3 SELECTION AVEC LE GLUFOSINATE

4. 31 INTRODUCTION

Les difficultés rencontrées pour isoler des cals résistants au glyphosate, puis ensuite induire le bourgeonnement et l'enracinement des souches sélectionnées, nous ont conduit à entreprendre une sélection avec une autre molécule : le glufosinate qui est aussi un herbicide non sélectif mais dont le site d'action est différent de celui du glyphosate. Il s'agit sur la GS.

4. 32 <u>RECHERCHE DES DOSES UTILISABLES POUR LA SELECTION</u>

Des suspensions cellulaires âgées de 15 jours, ont été étalées en boîte de Pétri, sur un milieu de callogénèse gélosé (milieu de base B additionné d'ANA (5.10^{-6} M) , de BAP (10^{-7} M) et de saccharose (10 g I^{-1})) contenant différentes concentrations de glufosinate.

La croissance, après 28 jours a été déterminée de la même manière qu'avec le glyphosate (§ 4. 21).

La sensibilité des cellules aux différentes concentrations présentée figure 24 permet de constater qu'au delà de 2,5.10⁻⁵ M de glufosinate la nécrose est totale.

4. 33 <u>ISOLEMENT</u> <u>D'UNE SOUCHE CELLULAIRE PROLIFERANT SUR UN MILIEU DE SELECTION</u>

Des suspensions cellulaires agées de 15 jours ont été soumises régulièrement au protocole de sélection décrit dans le matériel et méthodes.

Une souche dénommée P a été sélectionnnée.

Elle a été repérée par sa croissance et sa couleur (chlorophyllienne) au 3ème passage sur 2,5. 10^{-5} M de glufosinate parmi un ensemble de cals. Elle a été repiquée 8 fois sur cette même concentration afin de la stabiliser et ensuite elle a été transférée sur 10^{-4} M. La stabilisation sur cette nouvelle concentration a à nouveau demandé 7 mois.

4. 34 <u>COMPARAISON DE L'ACTION DE L'HERBICIDE ENTRE LA SOUCHE SELECTION-NEE ET LA SOUCHE SENSIBLE</u>

Une fois la souche sélectionnée, il était indispensable de déterminer ses potentialités à proliférer sur des doses croissantes d'herbicide et de les comparer avec celles des souches sensibles.

Dans ce but, des cals des souches P et S ont été placés sur des milieux de prolifération (identiques à ceux du § 4.32) contenant différentes concentrations d'herbicide. Après 28 jours de culture, la croissance en % du contrôle a été déterminée.

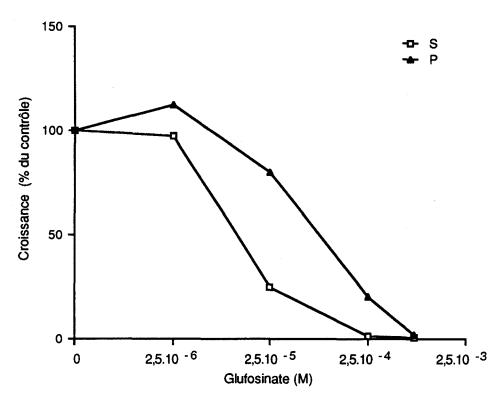


Fig. 25 : Effet du glufosinate sur la croissance (en pourcentage d'un contrôle cultivé sans herbicide) de cals sensibles (S) et sélectionnés (P) après 28 jours de culture. Le milieu de base B est additionné d'acide naphtylacétique (5.10⁻⁶ M), de benzylaminopurine (10⁻⁷ M) et de saccharose (10 g l⁻¹). La croissance de matière fraiche par boîte de Pétri en fin de culture est de 2,712 g pour S et de 1,872 g pour P. La masse de inoculum mis en culture est de 73 mg.

	BAP (M)		
	5.10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶
n	10	10	10
% de cals non ou partiellement nécrosés % de ces cals avec bourgeons	40 0	. 30 . 0	100 0

Tab. 24: Influence de la concentration en benzylaminopurine (BAP) sur le pourcentage de cals sélectionnés (P) pas ou seulement partiellement nécrosés et le pourcentage de ces cals avec bourgeons, après 2 mois de culture. L'hormone a été additionnée au milieu de base B (saccharose 5 g l⁻¹). Le milieu a été renouvelé après un mois de culture. n représente le nombre de cals mis en culture.

En absence d'herbicide, la croissance des souches P (1,872 g par boîte) est inférieure à celle des S (2,712 g par boîte) d'environ 30%.

En présence d'herbicide, on constate (Fig. 25) que les tissus P peuvent proliférer sur des doses plus élevées que les tissus S . La DI50 de la souche S est de 10^{-5} M tandis que celle de la souche P est de 7,5. 10^{-5} M. Les tissus sélectionnés ont par conséquent une DI50 7,5 fois plus élevée que les tissus S.

4. 35 CONDITIONS D'INDUCTION DU BOURGEONNEMENT

La stabilisation tardive de la souche P ne nous a pas permis de définir les conditions d'induction du bourgeonnement.

Un seul essai sur une gamme de concentration en BAP a été réalisé. Après 2 mois de culture (Tab. 24), 60 à 70% des cals cultivés en présence des concentrations en BAP les plus faibles $(5.10^{-7} \text{ et } 10^{-6} \text{ M})$ se sont nécrosés et aucun bourgeon n'a régénéré. Le nombre limité de cals mis en culture ne permet pas toutefois de conclure que la BAP à 5.10^{-6} M assure un meilleur taux de survie des cals.

5. CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION

L'objet de cette étude était de rechercher des Chicorées à café résistantes aux herbicides par cultures cellulaires. Cette approche présente par rapport à la sélection classique, un moyen de trier un grand nombre de cellules dans des conditions standar-disées et dans un espace restreint (BOURGIN, 1978; BRANCHARD, 1984; DUNCAN & WIDHOLM, 1986). Elle permet également d'exploiter en plus de la variabilité naturelle, celle induite par les conditions de culture *in vitro* (BOURGIN, 1985; LARKIN *et al.*, 1985; DUNCAN & WIDHOLM, 1986; WERSUHN, 1989; D'AMATO, 1990), ce qui, compte tenu de la probabilité de sélectionner un mutant, (de l'ordre de 10⁻⁶ à 10⁻⁷ pour une mutation sur un gène nucléaire et de 10⁻²⁰ pour une mutation sur un gène chloroplastique (GRESSEL, 1990b)), est loin d'être négligeable.

La mise en œuvre de cette méthodologie nécessitait de vérifier les aptitudes de la Chicorée à café en culture *in vitro* car si nous disposions de données bibliographiques concernant la variété Witloof(SENNE, 1984; DUBOIS *et al.*, 1988) aucune ne traitait de la variété Magdebourg. Il n'était pas certain, même si nous avions tout lieu de le croire, que leurs potentialités fussent analogues.

En nous inspirant des travaux réalisés sur *Cichorium intybus* var. Witloof (SE-NE, 1984; DUBOIS *et al.*, 1988), il nous a été possible de définir pour les racines tu-bérisées et pour les cotylédons des conditions de milieux et d'éclairement favorables à la callogénèse d'explants primaires, à l'initiation de suspensions cellulaires, au développement et à l'entretien de cals issus d'étalements de suspensions cellulaires.

L'utilisation des cultures cellulaires, dans le programme de sélection impliquait qu'à terme des plantes puissent être régénérées. Les essais d'induction du bourgeonnement, d'abord effectués sur des explants primaires puis, sur des cals issus de suspensions cellulaires, ont montré que des bourgeons pouvaient être induits. Toutefois, les "meilleures" conditions de milieux n'ont pas été recherchées pour la néoformation de bourgeons puisque les souches que nous devions sélectionner pourraient avoir des exigences particulières.

Comme pour la variété Witloof, il était donc possible, sur des milieux et dans des conditions de culture qui ne sont pas fondamentalement différentes d'induire la callogénèse, d'initier des suspensions cellulaires et de régénérer des bourgeons à partir de racines matures et de cotylédons de Chicorée à café. On pouvait par conséquent, envisager l'utilisation des cultures cellulaires comme moyen de sélection de souches résistantes à un herbicide.

Le choix des molécules utilisées dans ce programme a été effectué en fonction des souhaits de l'Interprofession de la Chicorée et des nécessités de la culture *in vitro*. Les molécules devaient avoir des spectres d'activité les plus larges possibles, une action post-émergence, une cible sous contrôle nucléaire, un mode d'action ne nécessitant pas de cultures cellulaires photoautotrophes : le glyphosate et le glufosinate remplissaient ces conditions. De plus, ils avaient déjà permis d'isoler des souches résistantes par cultures cellulaires (AMRHEIN *et al.*, 1983; DONN *et al.*, 1984; NAFZIGER *et al.*, 1984; SINGER & Mc DANIEL, 1985; SMITH *et al.*, 1986; STEINRUCKEN *et al.*, 1986; HICKOK, 1987; CRESSWELL *et al.*, 1988; ISHIDA *et al.*, 1989; GOLDS-BROUGH *et al.*, 1990).

Notre étude a débuté avec le glyphosate. Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier si chez la Chicorée à café, la cible du glyphosate était l'EPSP synthase, STEINRUCKEN & AMRHEIN (1980) ayant montré que cette molécule bloquait le fonctionnement de cette enzyme. Un moyen indirect de contrôle consistait à réverser l'action de l'herbicide en ajoutant au milieu de culture de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane, le blocage de l'enzyme conduisant à un épuisement du pool d'acides aminés aromatiques libres (HOAGLAND et al., 1978; HOLLANDER & AMRHEIN, 1980; DUKE, 1988). Les essais que nous avons réalisés n'ont pas permis de lever l'inhibition de croissance provoquée par le glyphosate. Ces résultats étaient contraires à ceux obtenus par JAWORSKI (1972), ROISCH & LINGENS (1974, 1980), HARDELIE et al. (1977), DAVIS & HARVEY (1979), GRESSHOFF (1979), BODE et al. (1985), BYNG et al. (1985), SMART et al. (1985), CRESSWELL et al. (1988), mais corroboraient ceux obtenus par LEE (1980a) et RUBIN et al. (1984) sur des suspensions cellulaires et ceux de DUKE & HOAGLAND (1978, 1981), COLE & DODGE (1979), COLE et al. (1980), RUBIN et al. (1982), HOAGLAND (1990) sur des plantes entières. L'absence de réversion par les acides aminés ne permettait pas de conclure que l'EPSP synthase était bloquée. Toutefois, l'action inhibitrice de la phénylalanine rendait difficile l'interprétation des essais de réversion. La toxicité des acides aminés vis-à-vis des cultures cellulaires n'est pas spécifique de la Chicorée à café. Elle a déjà été rapportée chez différentes espèces par plusieurs auteurs (GAMBORG, 1970; BEHREND & MATELES, 1976; FUKUNAGA & KING, 1982; BONNER et al., 1991a, b). Elle est fonction de la concentration (FUKUNAGA & KING, 1982; BONNER et al., 1991a, b), ce que nous avons également observé, de la densité de l'inoculum initial (BONNER et al., 1991b) et de l'acide aminé utilisé. Les travaux de BONNER et al. (1991a) ont montré que sur 20 acides aminés testés chez le Tabac, la phénylalanine est le plus inhibiteur, ce qui concorde avec nos propres résultats. Ces mêmes auteurs ont également montré qu'on pouvait lever l'inhibition de croissance induit par la phénylalanine en ajoutant au milieu de culture de la glutamine. Dans le cas de la Belladone, il a été montré (NYMAN & SIMOLA, 1988) que la glutamine réprimait la synthèse des transporteurs de phénylalanine. Cependant, la régulation de l'absorption de la phénylalanine par les cellules serait fortement limitée par les propriétés liposolubles de cette molécule.

Dans le but d'éviter l'inhibition induite par les acides aminés, des essais de réversion de l'action du glyphosate ont été réalisés avec l'acide chorismique. Ce composé dérivant directement de l'EPSP est situé en amont des acides aminés aromatiques dans la voie shikimate (Cf Fig. 6). Là non plus, il n'y a pas eu de levée d'inhibition. Cette molécule avait pourtant permis à JAWORSKI (1972) d'observer une réversion partielle chez *Rhizobium japonicum*. L'absence de réversion par les acides aminés et par le chorismate pouvait signifier que la cible du glyphosate n'était pas l'EPSP synthase ou que l'inhibition de croissance ne découlait pas uniquement des teneurs en ces composés.

En effet, elle pouvait aussi provenir de l'accumulation d'acide shikimique (AM-RHEIN et al., 1980b, 1981, 1983; BERLIN & WITTE, 1981; FISCHER et al., 1986; SMITH et al., 1986; CRESSWELL et al., 1988; DYER et al., 1988). Selon JENSEN (1986b), cette accumulation entraînerait une perte d'énergie (une molécule de PEP et une molécule d'ATP par molécule de S3P accumulée). En ajoutant au milieu de culture soit de l'acide α-cétoglutarique (un intermédiaire du cycle de KREBS), soit de l'acide glutamique

(un acide aminé lié au cycle de KREBS) KILLMER et al. (1981) et BODE et al. (1985) ont observé une levée d'inhibition de croissance. Dans le cas de la Chicoré à café, ces composés n'ont pas permis de réverser l'action du glyphosate.

L'inhibition de croissance pouvait également découler d'un changement du métabolisme auxinique. Le glyphosate diminue les concentrations en AIA (LEE, 1982a; b; 1984; LEE et al., 1983; LEE & DUMAS, 1985; LEE & STARRATT, 1986; CANAL et al., 1987) et en composés phénoliques totaux mais augmente la teneur de certains acides hydroxybenzoïques (LYDON & DUKE, 1989). Le fonctionnement de l'AIA oxydase étant influencé par les composés phénoliques (LEE, 1980b), l'arrêt de l'EPSP synthase conduit à une modification de sa régulation (LEE, 1982b, CANAL et al., 1987). En apportant de l'auxine (soit sous forme d'AIA soit sous forme de 2,4-D) à des cals de Soja et de Tabac, LEE (1980a; 1982a) a observé une réversion partielle de l'action du glyphosate. Ces résultats n'ont pas été confirmés sur la Chicorée à café. Ils ne l'avaient pas été non plus sur des proliférations de bourgeons axillaires de Vaccinum macrocarpon (SCORZA et al., 1984) ni sur des germinations de Soja (HOAGLAND, 1990).

L'absence de réversion pouvait alors signifier que cette molécule n'avait pas pour cible l'EPSP synthase chez la Chicorée à café. Ceci paraissait peu vraisemblable d'autant que cela n'a été montré chez aucune autre espèce. Il était plus probable que le blocage de l'enzyme entraînât des effets multiples sur les cellules (épuisement des acides aminés aromatiques, absence de régulation du flux d'entrée de carbone dans la voie shikimate, blocage partiel du métabolisme secondaire) dont les conséquences ne pouvaient pas être annulées par des simples apports dans le milieu de culture de molécules telles que les acides aminés par exemple. Aussi, bien que la levée d'inhibition de l'action du glyphosate n'ait été obtenue, cet herbicide pouvait être retenu pour sélectionner des souches de Chicorée à café résistantes dans la mesure où il existait d'autres moyens de contrôler son mode d'action en particulier, en dosant l'acide shikimique et en mesurant l'activité EPSP synthase.

Lors des essais pour déterminer la dose de sélection, il est apparu qu'il existait une différence de sensibilité entre les tissus. La DI50 des racines est plus élevée (10⁻³ M) que celle des étalements de suspensions cellulaires (3.10⁻⁴ M) et que celle des cotylédons (2.10-5 M). Les réserves importantes contenues dans les explants racinaires pouvaient expliquer la sensibilité moindre de ces tissus au glyphosate. Les différences observées entre les cotylédons et les étalements de suspensions cellulaires d'origine cotylédonnaire sont plus surprenantes. Mais SATO et al. (1987) ont aussi observé que les germinations de Tabac sont plus sensibles au glyphosate que les suspensions cellulaires. La réponse à l'herbicide serait selon ces auteurs, le reflet d'une différence d'activité métabolique; la diminution de la production de métabolites secondaires par les suspensions cellulaires pourrait être une explication. Dans le cas de la Chicorée à café, on peut aussi penser que la balance hormonale existant au sein des cotylédons est différente de celle existant au sein de suspensions cellulaires ce qui pourrait expliquer que le glyphosate, susceptible d'agir sur le métabolisme (LEE, 1982a; b; LEE & STARRATT, 1986; CANAL et al., 1987) et le transport de l'auxine (BAUR, 1979) entraîne des différences de sensibilité. Il a donc été indispensable, pour la sélection, de définir des doses en fonction des tissus. La très grande hétérogénéité de croissance des explants racinaires en absence d'herbicide - lié probablement à la variabilité génétique du matériel -, les réserves importantes contenues dans les explants ainsi que les difficultés pour repérer des cellules résistantes au sein de masses cellulaires importantes, nous a conduit à ne pas entreprendre de sélection à partir d'explants racinaires.

Les essais préliminaires réalisés sur les cotylédons ont montré qu'en absence de pression de sélection, les cals étaient moins sensibles au glyphosate que les cotylédons eux-mêmes. Ceci confirmait ce qui avait été observé lors de la recherche de doses de sélection : les tissus différenciés sont plus sensibles au glyphosate que les tissus indifférenciés. La sensibilité des suspensions cellulaires, constante au cours du temps, nous a conduit à privilégier ce matériel pour la sélection.

Les différents étalements de suspensions effectués n'ont permis de sélectionner que deux souches (R1 et R2). Elles proviennent toutes deux de suspensions qui ont été initiées en présence d'herbicide à partir de cotylédons. Comme pour la Carotte (NAF-ZIGER et al., 1984), le Corydalis (AMRHEIN et al., 1983), la Pervenche de Madagascar (CRESSWELL et al., 1988) et le Pétunia (STEINRUCKEN et al., 1986), elles résultent donc d'une méthodologie où les doses ont été progressivement augmentées. Avec les agents mutagènes, il est possible d'augmenter la fréquence de mutations (HIBBERD, 1984; NEGRUTIU et al., 1984; VAN DEN BULK et al., 1990). Toutefois, ces taux fluctuent en fonction de l'agent mutagène utilisé, du moment où il est appliqué, de la durée du traitement et de la dose employée (NEGRUTIU et al., 1984). Leur utilisation chez la Chicorée à café aurait impliqué des mises au point technique. Ils peuvent par ailleurs, entraîner des effets secondaires condulsant à des difficultés de régénération, à des plantes anormales (NEGRUTIU et al., 1984). Or, notre objectif était de sélectionner des plantes qui différaient des plantes sauvages uniquement par leur caractère de résistance à l'herbicide.

Les doses qui inhibent 50% (DI50) de la croissance de ces souches sont 25 fois plus élevées que celles qui induisent un effet semblable chez les tissus sensibles Cette différence entre souches est à rapprocher de celle obtenue chez le Pétunia (20 fois)(STEINRUCKEN et al., 1986). Elle est supérieure à celle du Ceratopteris (5 et 15 fois)(HICKOK, 1987), du Tabac (10 fois)(DYER et al., 1988) mais inférieure à celle de la Carotte (52 fois)(NAFZIGER et al., 1984), du Corydalis et de la Tomate (100 fois) (SMARTet al., 1985; SMITH et al., 1986). Il faut cependant remarquer que la DI50 des souches R1 et R2 (2,5.10-2 M) est identique à la plus élevée observée c'est-à-dire celle du Corydalis (SMART et al., 1985)(Cf. Tab. 1).

Contrairement à ce qu'on avait espéré, les souches R1 et R2 ne se distinguent pas uniquement des souches S par leur aptitude à se développer sur des doses plus élevées d'herbicide.

En absence de glyphosate, la croissance des cals R1 et R2 est plus faible que celle des cals S. Ceci n'est pas une caractéristique propre à la Chicorée à café. Ce fait a aussi été signalé chez la Carotte (NAFZIGER et al. 1984), le Ceratopteris (HIC-KOK, 1987), le Pétunia (STEINRUCKEN et al., 1986) et le Tabac (DYER et al., 1988).

Les souches R1 et R2 se distinguent également par leur morphologie; les cals R1 sont très compacts alors que les cals R2 sont plus friables; et par leur couleur, les cals R1 sont d'un vert foncé tandis que les cals R2 ont une couleur vert jaune. Les dosages des chlorophylles ont confirmé, ces observations. Par rapport à la souche S, la souche R1 est beaucoup plus chlorophyllienne.

Plusieurs mécanismes pouvaient expliquer la résistance au glyphosate :

- une détoxication de la molécule
- une mutation de la cible
- une amplification de la cible

Cependant, chez les plantes, le premier n'a jamais été rapporté. Quant au second, une seule étude (FORLANI et al., 1990) sur le Maïs, mentionnant l'existence d'une forme isoenzymatique de l'EPSP synthase insensible au glyphosate, pourrait y faire penser (FORLANI, communication personnelle). D'après les données de la littérature (AMRHEIN et al., NAFZIGER et al., 1984; SMITH et al., 1986; STEINRUCKEN et al., 1986; DYER et al., 1988; CRESSWELL et al., 1988; HAUPTMANN et al., 1988; GOLDSBROUGH et al., 1990), le troisième était le plus probable. Une étude biochimique était donc indispensable.

Les essais effectués pour caractériser les souches ont débuté par le dosage de l'acide shikimique. Un blocage de l'activité EPSP synthase devait conduire à une accumulation de ce composé (AMRHEIN et al., 1980b, 1981, 1983; BERLIN & WITTE, 1981; FISCHER et al., 1986; SMITH et al. 1986; CRESSWELL et al., 1988; DYER et al., 1988). Cela s'est vérifié pour les cals S, mais pas pour les cals R1 et R2. L'absence d'accumulation d'acide shikimique dans les cals capables de se développer en présence de glyphosate a été signalé dans d'autres cas où des cellules résistantes ont été isolées (SMITH et al., 1986; CRESSWELL et al., 1988; DYER et al, 1988). Elle pouvait résulter soit d'une suractivité de l'EPSP synthase soit d'une insensibilité de l'enzyme vis-à-vis du glyphosate.

Les mesures d'activité enzymatique ont montré que les cals R1 et R2 ont une activité respectivement 4,4 et 4 fois plus élevée que les cals S. La sensibilité de l'EPSP synthase au glyphosate de la souche R1 est identique à celle de la souche S. Dans les 2 cas, l'enzyme est inhibée à 50% avec 2 μM de glyphosate. Le blocage de l'enzyme de la souche S par le glyphosate est la preuve que chez la Chicorée à café, il agit bien sur l'EPSP synthase. Les essais de réversion avaient laissé planer un doute. Par conséquent, si la technique de réversion présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre, elle présente aussi l'inconvénient, nous le voyons ici, de ne pas toujours permettre de conclure à un blocage de la voie shikimate que des moyens plus lourds à utiliser (dosage de l'acide shikimique et mesure de l'activité EPSP synthase) permettent de démontrer. L'aptitude à proliférer des cals R1 et R2 sur des doses 25 fois plus élevées que les cals S découle donc comme pour la Carotte (NAFZIGER et al., 1984; HAUPTMANN et al., 1988), le Corydalis (AMRHEIN et al., 1983), la Pervenche de Madagascar (CRESSWELL et al., 1988), le Pétunia (STEINRUCKEN et al., 1986), la Tomate (SMITH et al., 1986), le Tabac (DYER et al., 1988; GOLDSBROUGH et al., 1990) d'une augmentation d'activité enzymatique. L'enzyme extraite des cals R1 étant inhibée de la même manière que l'enzyme extraite des tissus S, on peut penser que la protéine EPSP synthase est synthétisée en plus grande quantité comme cela a

été démontré dans le cas de la Carotte (HAUPTMANN et al., 1988), du Corydalis (HOLLANDER-CZYTKO & AMRHEIN, 1987) et du Pétunia (STEINRUCKEN et al., 1986). Le mécanisme généralement proposé pour expliquer la résistance des cals au glyphosate est dans ce cas l'amplification de gène (SHAH et al., 1986; HAUPTMANN et al., 1988; GOLDSBROUGH et al., 1990) mais chez le Corydalis où des augmentations de mRNA transcrit et traduit ont été observées, la résistance ne résulterait pas d'une amplification de gène mais d'une stabilité plus importante due à une moindre dégradation protéolytique de l'enzyme (HOLLANDER-CZYTKO et al., 1988). Si l'on disposait d'une sonde moléculaire du gène de l'EPSP synthase, il serait possible de connaître, l'origine de l'augmentation d'activité de l'EPSP synthase chez la Chicorée à café et ainsi de déterminer si elle résulte d'une amplification de gène ou d'un autre mécanisme.

Les dosages des chlorophylles effectués en présence d'herbicide ont montré que le glyphosate entraînait une diminution très importante du contenu en chlorophylles des cals S. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par KITCHEN et al. (1981a), CANAL et al. (1985), EL-HATTAB et al. (1987) sur plantes entières et ceux de LEE (1981) sur cals. Sur les cals R1 et R2 par contre, le glyphosate n'a eu aucune action. La simple augmentation d'activité de l'EPSP synthase permet donc aux cals R1 et R2 de ne pas manifester un des effets secondaires induit par le glyphosate.

La néoformation de bourgeons pouvait être problématique dans la mesure où chez la Carotte aucune plante n'a pu être régénérée (HAUPTMANN et al., 1988). Il s'est avéré que la souche R1 régénère des bourgeons relativement facilement, ce qui n'est pas le cas de la souche R2. La suppression de l'auxine dans le milieu de culture entraîne un pourcentage très élevé de mortalité des cals avant qu'ils soient organogènes. Des bourgeons ont néanmoins été obtenus avec cette souche, mais leur morphologie est anormale et leur croissance est très faible.

L'enracinement des bourgeons a, par contre, été très difficile à induire. Dans le cas de la Tomate, il a été impossible à obtenir (SMITH, et al., 1986). La vitrosité importante et la taille réduite des bourgeons sont vraisemblablement à l'origine de la mort d'un pourcentage élevé de bourgeons. Les auxines incorporées aux milieux de culture n'ont induit qu'un très faible pourcentage d'enracinement. Par trempage dans une solution d'AIB, ce taux a été amélioré, mais il demeure faible. Avec des temps de contact plus longs et une concentration plus faible, BRASSART et al. (1985) était parvenu à enraciner 75% de bourgeons d'une autre variété (Witloof) de Cichorium intybus.

La Chicorée à café est après le Tabac (SINGER & Mc DANIEL, 1985; DYER et al., 1988) la seule espèce où des plantes entières ont été régénérées à partir de cals résistants.

Les plantes R1 ont pu être obtenues en grand nombre tandis qu'il n'a été possible d'obtenir, malgré nos nombreuses tentatives, que quelques exemplaires des plantes R2. Ces dernières sont mortes pendant ou peu de temps après la phase d'acclimatation. Ni les plantes R1 ni les plantes R2 ne sont conformes aux plantes S issues de germinations. Les secondes citées qui sont totalement anormales ont présenté la particularité de ne plus avoir de dominance apicale, leur métabolisme auxinique

pourrait avoir été modifié. Il n'est pas à exclure que l'absence de conformité, particulièrement pour la R2, tienne au maitien prolongé des souches en culture *in vitro* car parmi les plantes S qui ont régénéré, quelques variants sont apparus. Ils n'ont cependant pas fait l'objet d'étude comparative.

Le traitement de plantes R1 au glyphosate n'a pas été réalisé car si nous sommes parvenus à améliorer les taux d'enracinement, il n'a pas été possible de le faire sur un nombre important de bourgeons simultanément. Traiter des plantes à des stades de développement différents aurait compliqué voir rendu impossible l'interprétation des résultats. Des changements dans l'activité EPSP synthase pourraient se produire au cours du développement de la plante. Ainsi, chez le Maïs des variations de l'activité spécifique ont été observées durant la croissance des germinations (FORLANI, communication personnelle).

Nous avons cherché à contrôler si les caractéristiques des cals avaient été transmises aux plantes. Les mesures d'activité enzymatique montrent que les plantes R1 ont une activité EPSP synthase 2,5 fois plus élevée que les plantes S. Par rapport aux cals, les différences entre les 2 souches existent toujours mais elles sont plus réduites.

A partir des plantes R1 et S, du cal a été initié pour tester *in vitro* la sensibilité au glyphosate. Les cals issus de plantes R1 ont une aptitude à proliférer sur des doses 18 fois plus élevées que les cals issus de plantes S. Après passage par l'état de plantes, les cals R1 ont conservé partiellement leur aptitude à proliférer sur des doses plus importantes que les cals S. Par des tests analogues, SMITH *et al.* (1986) ont également signalé que chez la Tomate la résistance persistait après un processus de différenciation et de dédifférenciation. La croissance plus faible de la souche R1 s'est retrouvée dans les cals issus de plantes. Cette caractéristique semble par conséquent liée à la souche. Par ailleurs, nous avons noté que la D150 des cals provenant de plantes issues de germinations S est de 2,8.10⁻⁴ M alors que celle des cals S initiaux était de 10⁻³ M. Comme nous avons montré précédemment qu'il existait une différence de sensibilité entre les tissus différenciés et les tissus indifférenciés, on peut penser qu'au moment où les tests ont été réalisés (2 et 3 mois après la mise en culture *in vitro*), les cals n'avaient pas encore atteint un état de stabilisation comparable à celui de cals cultivés depuis plusieurs mois sur un milieu de callogénèse.

Les mesures d'activité enzymatique ont montré que les cals dérivant des plantes R1 présentent une activité EPSP synthase 3,3 fois plus élevée que celles des cals dérivant de plantes S. Cette valeur est plus faible que celle observée dans les cals dont dérivent les plantes (4,4 fois) mais est supérieure à celle des plantes elles-mêmes (2,5 fois). Comme il a été à nouveeu confirmé que l'EPSP synthase de la souche R1 est inhibée de la même manière que celle de la souche S (2 μ M réduisant 50% de l'activité), la résistance pourrait bien dépendre d'un mécanisme d'amplification de gène. La diminution de l'aptitude à proliférer sur des doses plus élevées des cals issus de plantes R1 par rapport aux cals issus de plantes S, est associée à une diminution de l'activité EPSP synthase. Il se pourrait donc que cette souche ne soit pas tout à fait stable. Ceci a déjà été signalé chez la Pervenche de Madagascar (CRESSWELL et al., 1988) mais dans ce cas, les contrôles n'ont pas été effectués après une phase de

régénération. Dans la mesure où l'activité EPSP synthase est plus élevée dans les cals R1 dérivant de plantes que dans les plantes R1, on peut se demander si les conditions de cultures *in vitro* ne stimuleraient pas l'expression de cette activité. La résistance pourrait aussi avoir une base génétique stable mais l'expression pourrait être soumise à une régulation plus ou moins importante selon la nature des tissus.

La floraison des plantes R1 est plus tardive que celle des plantes S. La résistance aurait par conséquent un coût pour la plante. Il faut noter ici que contrairement à Cichorium intybus var. Witloof, la Chicorée à café est sélectionnée pour son rendement en racines. En conséquence, les semis sont plus précoces et les risques de montée à graines plus importants. Afin de les éviter, les sélectionneurs se sont attachés à rechercher des plantes particulièrement résistantes à la montée. Du point de vue agronomique ce coût pourrait donc présenter un intérêt. Par autofécondation, il n'a été obtenu aucune graine. Ces plantes sont totalement autoincompatibles. Mais d'une manière générale chez Cichorium intybus, l'autostérilité est la règle (VAN HEE & BOCKSTAELE, 1983; COPPENS D'EECKENBRUGGE et al., 1987a). Le déterminisme de la réaction d'incompatibilité est sporophytique, monogénique et pluriallèlique (COPPENS D'EECKEBBRUGGE et al., 1987b). Par croisement avec des plantes S, des graines ont été obtenues. Les plantes R1 sont fertiles.

Les traitements réalisés en serre sur les plantules issues de ces graines avec 180 et 360 g ha⁻¹ de glyphosate ont entraîné la mort de l'ensemble des plantules.

Les tests effectués in vitro ont montré que les cals dérivant des hybrides S \times R1 et R1 \times S sont inhibés de la même façon par le glyphosate que les cals issus de germinations S.

L'activité EPSP synthase des hybrides est quasiment identique à celle des germinations S.

Pour expliquer ces résultats, 2 hypothèses sont à envisager: le caratère sélectionné est récessif ou il n'a pas été transmis. Dans le dernier cas, il s'agirait d'un variant épigénique très stable puisque la suppression de la pression de sélection chez les plantes entières n'a pas entraîné la disparition de la résistance dans les cals qui en dérivaient. Il parait plus vraisemblable, compte-tenu du maintien de la résistance sans herbicide, que le caractère soit génétique. Il sera réellement possible de trancher entre les 2 hypothèses lorsque les tests auront été effectués *in vivo* et *in vitro* sur la F2.

Une approche moléculaire de ce travail aurait pu apporter des éléments de réponse en faveur de l'une ou l'autre des hypothèses. Elle aurait en particulier permis de vérifier si la surproduction de l'EPSP synthase est basée sur une amplification de gène (SHAH et al., 1986; HAUPTMANN et al., 1988; GOLDSBROUGH et al., 1990), sur une moindre dégradation protéolytique de l'enzyme (HOLLANDER—CZYTKO et al., 1988) ou sur un autre mécanisme.

Lorsqu'on introduit par génie génétique le gène amplifié de l'EPSP synthase chez les plantes, la résistance est transmise comme un simple gène mendélien dominant

(SHAH et al., 1986; JORDAN & McHUGHEN, 1988). Le gène EPSP synthase amplifié d'une plante non transformée se transmettrait-il de manière récessive?

DYER et al. (1988) ont montré que les plants de Tabacs issus de cals résistants survivaient à des applications de 1 kg ha⁻¹ de glyphosate et qu'il existait des différences de sensibilité entre les plantes. Ils ont également rapporté que leurs plantes fleurissaient, mais ils n'ont pas précisé si la résistance était transmise dans la descendance. Nous ne pouvons donc pas comparer nos résultats directement avec les leurs. Pour d'autres herbicides, bentazone et phenmedipham, il a été signalé (MALIGA, 1984) que la résistance est sous contrôle de gènes récessifs.

La mort des plantes R2 au cours de l'acclimatation ne nous a pas permis de déterminer si les caractéristiques de la souche sont conservées après passage par l'état de plante entière. Elle ne nous a pas permis non plus de réaliser des croisements avec des plantes R1 et S. Il n'a donc pas été possible de vérifier si la résistance de cette souche observée *in vitro* est transmise à la descendance et si elle est du même type que celle de la R1.

L'inconvénient majeur des souches que nous avons sélectionné (R1 et R2) réside dans leur non-conformité par rapport à la souche S. Celle-ci peut être la conséquence d'un maintien prolongé des souches en culture in vitro. En effet, la variabilité génétique (LARKIN & SCOWCROFT, 1981) et épigénique augmente avec le temps ce qui est une observation fréquente (BOURGIN, 1985). Elle peut aussi découler de la résistance au glyphosate. La croissance plus faible des souches résistantes a été rapportée par NAFZIGER et al. (1984), HICKOK (1987), STEINRUCKEN et al. (1986), DYER et al. (1988). Des mutants résistants à d'autres herbicides en particultier au diuron, au paraquat, et aux triazines présentent également des déficiences (THOMAS & PRATT, 1982; GRESSEL, 1986; BEVERSDORF & KOTT, 1987; REY et al. (1990); WANG et al. (1991). Selon QUINN (1990), la résistance aurait un coût métabolique. En cas de surproduction d'enzyme, il y aurait nécessairement création de déséquilibre métabolique et gaspillage et lorsqu'il se produirait une modification dans l'affinité de l'enzyme pour l'herbicide, elle pourrait s'accompagner d'une diminution de son activité. Chez la Carotte, il a été montré (NAFZIGER et al., 1984) que conjointement à l'augmentation d'activité de l'EPSP synthase, il y a une augmentation de la concentration en acides aminés, mais cela n'a pas été observé chez le Corydalis (SMART et al., 1985) et le Tabac (DYER et al., 1988). Il serait intéressant de contrôler si chez la Chicorée à café, les concentrations en acides aminés et en métabolites secondaires, en particulier les acides hydroxybenzoiques et plus spécifiquement l'acide gentisique - pour son action sur l'AlA oxydase (CANAL et al., 1987), sont modifiés. Les difficultés rencontrées pour enraciner les bourgeons et la croissance plus faible des souches résistantes pourraient avoir pour origine un changement du métabolisme auxinique en liaison avec l'augmentation de l'activité EPSP synthase.

L'emploi du glyphosate depuis plusieurs années en champ n'a toujours pas conduit à la sélection de mutants. Ceci pourrait être en raison de la présence de plusieurs formes isoenzymatiques de l'EPSP synthase. Selon JENSEN (1986 b), en effet, il existerait 2 voies shikimate, une localisée dans les plastes et une autre localisée dans le cytosol. Cette dernière n'a pas été entièrement démontrée. Une forme cytosolique

naturellement insensible au glyphosate a été rapportée dans une souche cellulaire de Maïs (RACCHI et al., 1989; RACCHI, 1990), mais l'expression de cette forme est fonction du stade de développement. On peut émettre l'hypothèse que des gènes distincts codent pour les différentes formes enzymatiques et qu'une mutation sur un seul gène ne serait pas suffisante pour conférer la résistance. Selon SCHULZ et al. (1990), une mutation dans le gène de structure de l'EPSP synthase s'accompagnerait d'une perte des propriétés catalytiques de l'enzyme et par conséquent le site d'action serait très conservé c'est-à-dire qu'il n'y aurait qu'une faible plasticité génique (DUKE, 1988). Pour expliquer l'absence de mutants DUKE (1988) n'exclut pas l'hypothèse que le glyphosate ait d'autres sites d'action que l'EPSP synthase. L'absence de résistance pourrait aussi être liée à la molécule elle-même. La nature n'a aucune raison de mettre sur pied un système de détoxication à un analogue structural d'un substrat enzymatique. D'ailleurs, il n'existe pas d'exemple connu. Elle pourait aussi tenir au coût de la mutation. Si elle est très élevée, elle a peu de chance d'apparaître et elle risque d'être fortement contre-sélectionnée. Il a été montré chez le moustique qu'en absence d'insecticide, la valeur adaptative des phénotypes résistants est plus faible (RAYMOND et al., 1985).

Devant les difficultés rencontrées pour isoler des cals résistants au glyphosate, induire et enraciner les bourgeons, nous avons entrepris la sélection de nouvelles souches avec le glufosinate d'ammonium qui, comme le glyphosate, est un herbicide non sélectif, post-levée mais dont la cible (GS) se situe sur une autre voie métabolique : celle de l'azote. La sélection a été effectuée uniquement sur des suspensions cellulaires.

L'isolement de souches résistantes n'a pas été plus aisé qu'avec le glyphosate. Une seule souche de Chicorée à café résistante au glufosinate a pu être sélectionnée. Elle a été obtenue en augmentant progressivement les concentrations en herbicide. Cette méthode avait été utilisée avant nous par DONN et al. (1984) pour sélectionner des Luzernes et par ISHIDA et al. (1989) pour sélectionner des Tabacs. Les exemples d'espèces résistantes au glufosinate obtenus en exploitant la variabilité des cultures cellulaires sont encore rares. La Chicorée à café (Composées) représente la 3ème espèce après la Luzerne (Papilionacées) et le Tabac (Solanacées). La dose qui inhibe 50% de la croissance (DI50) de la souche sélectionnée (P) est 7,5 fois plus élevée que celle qui inhibe la souche sauvage. La différence de sensibilité au glufosinate entre les 2 souches est plus faible que celle observée chez la Luzerne (20 à 100 fois) (DONN et al., 1984) et le Tabac (10 fois) (ISHIDA et al., 1989).

Les cals sélectionnés P ont une croissance plus faible que les cals S en absence d'herbicide. On retrouve ainsi une caractéristique observée avec les cals résistants au glyphosate. Là encore, cette réduction de croissance pourrait être liée à des variations génétiques ou épigéniques (LARKIN & SCOWCROFT, 1981, NEGRUTIU et al., 1984; BOURGIN, 1985).

En raison de la stabilisation tardive de la souche P, nous n'avons pas pu déterminer si son aptitude à proliférer sur des doses d'herbicide plus élevées que la souche S, est associée à une augmentation d'activité de la GS comme cela a été démontré chez la Luzerne (DONN et al., 1984) et chez le Tabac (ISHIDA et al., 1989).

De même, nous n'avons pas pu déterminer les conditions de régénération de plantes à partir de la souche P. Pour la Luzerne, il a été précisé que la souche avait perdu ces propriétés organogènes (DEAK et al., 1988). Par fusion de protoplastes, DEAK et al. (1988) ont tenté de transférer la résistance à des souches organogènes. La résistance a bien été transmise aux produits de fusion mais les capacités organogènes n'ont pas été retrouvées. Ces auteurs expliqueraient l'impossibilité de régénérer des plantes par un changement du métabolisme azoté à la suite de l'amplification du gène de la GS. Lorsque le gène amplifié a été introduit chez le Tabac par génie génétique, les plantes n'ont montré qu'un faible niveau de résistance au glufosinate. Ceci pourrait être dû à l'existence de multiples gènes nucléaires de la GS dont l'expression est spécifique d'un tissu (QUINN, 1990).

Les difficultés rencontrées pour sélectionner au laboratoire et au champ des mutants résistants au glyphosate et au glufosinate pourraient découler de leur mode d'action. Ces 2 herbicides sont des analogues structuraux des substrats naturels des réactions qu'ils inhibent, aussi se lient-ils directement avec le site réactionnel de l'enzyme. Toute mutation dans ce site, conférant la résistance à l'herbicide, serait très probablement combinée avec une perte de propriétés catalytiques de l'enzyme. Ceci pourrait expliquer la vigueur plus faible des mutants résistants au glyphosate et au glufosinate (SCHULZ et al., 1990). D'un autre coté, la résistance par amplification de gènes présente également des inconvénients car elle semble causer des changements métaboliques conduisant à une limitation de croissance et probablement à une diminution des capacités de régénération.

En conclusion, ce travail aura abouti à la sélection de 2 souches résistantes au glyphosate (R1 et R2) et une souche résistante au glufosinate (P). Des plantes ont été régénérées à partir des deux souches résistantes au glyphosate mais seules celles issues de la souche R1 ont survécu après la phase d'acclimatation. Lorsque ces plantes ont été croisées avec des plantes sensibles, elles ont produit des graines. Après traitement au glyphosate toutes les plantes de la F1 sont mortes. On peut alors supposer que le caractère est récessif ou qu'il n'a pas été transmis par voie sexuée. Si le caractère est récessif, il sera exploitable par le sélectionneur tandis que s'il s'agit d'un variant épigénique, il ne pourra être utilisé et les planteurs de Chicorée à café sans herbicide de post-levée devront continuer à désherber manuellement. L'étude de la F2 devrait permettre de trancher entre les deux hypothèses. Actuellement les plantes F1 laissée en panmixie sont sous forme de porte-graines. Au début de l'été la plupart d'entre-elles avaient une morphologie anormale. Certaines présentaient des anomalies au niveau des inflorescences, pour d'autres le géotropisme des apex est inversé, etc... et on pouvait craindre que des boutons floraux de type normal ne puissent se former. Il semble maintenant que si toutes les anomalies n'ont pas disparu, il y aura des graines et il sera par conséquent possible d'étudier la descendance.

Les souches que nous avons isolées sont issues d'un processus de sélection naturel, aucun agent mutagène n'ayant été utilisé. *In vitro*, la résistance des tissus au glyphosate et au glufosinate s'est traduite par une croissance plus faible c'est-à-dire par un coût. Dans le cas des Endives résistantes aux sulfonylurées, ce coût est inexistant (MILLECAMPS, 1989). Chez la Chicorée à café, le coût de la résistance au glyphosate a persisté lors de la régénération des bourgeons, de l'enracinement, de la

mise à fleur. Maintenant, on peut supposer que si des mutants résistants apparaissent en champ, la résistance entraîne également chez eux un coût élevé. La probabilité de leur maintien dans les populations serait alors faible et pourrait expliquer que jusqu'à présent aucun mutant naturel n'ait été rapporté.

Le contrôle génétique de la résistance est un élément qui contribue fortement au risque d'apparition de mutants. La probabilité ne sera pas la même s'il s'agit d'un contrôle monogénique ou polygénique, nucléaire ou cytoplasmique, si l'expression est dominante ou récessive.

Des lignées de Chicorées à café haploïdes, aurait facilité notre travail de sélection *in vitro*, s'il se confirmait que le caractère est récessif. Malheureusement, elles n'existent pas chez cette variété.

La résistance monogénique dominante sous contrôle nucléaire est celle qui a le plus de chance d'apparaître naturellement *in vitro* mais c'est aussi celle qui a le plus de chance d'apparaître parmi les adventices.

Le maintien dans la nature des types résistants dépend de leur valeur adaptative (fitness). Si en absence de l'herbicide considéré, il n'y a pas de coût, le maintien dans les populations sera très élevé. Il semble que se soit le cas pour la résistance aux sulfonylurées chez l'Endive (GASQUEZ, communication personnelle). Ce maintien dépend aussi du mode de reproduction. Une plante à fécondation allogame transmettra plus facilement son pollen à des espèces voisines. Chez la Chicorée à café des croisements avec des Endives et des Chicorées sauvages peuvent se produire. Les risques de dispersion des gènes se situent principalement chez le multiplicateur de semences. Les risques existent aussi chez le sélectionneur, même si celui-ci utilise des isolements géographiques. Ils demeurent également en cas de repousses chez le cultivateur où la pratique des rotations de cultures tend à les éliminer.

Une alternative à la sélection de souches résistantes par cultures cellulaires est représentée par le génie génétique. Les résultats obtenus avec plusieurs herbicides sont prometteurs (KISHORE & SHAH, 1988). Ainsi, chez les plantes où le gène de détoxification du glufosinate a été introduit, la résistance s'est exprimée. Lorsqu'elles sont traitées, elles ont une croissance comparable à celle des plantes non traitées (DE GREEF et al., 1989; BOTTERMAN & LEEMANS, 1989). Le caractère s'hérite comme un caractère monogénique dominant (LEEMANS et al., 1987; BOTTERMAN & LEEMANS, 1989; OXTOBY & HUGHES, 1989). Mais pour l'instant la mise sur le marché de variétés obtenues par génie génétique n'a pas été autorisée. Avant de donner leur accord, les autorités ont exigé que des études soient faites sur les conséquences de l'introduction de gènes, sur l'environnement. Ces études seront longues et elles pourraient beaucoup retarder la commercialisation de ces variétés.

L'utilisation et la commercialisation des plantes cultivées résistantes aux herbicides obtenues par cultures cellulaires seront à manipuler avec précaution. Lorsque la résistance n'entraîne pas de coût pour la plante, le risque de disperser le gène dans les espèces sauvages et de voir apparaître dans les cultures des adventices résistan-

tes est potentiellement élevé. Dans les monocultures toujours désherbées avec le même herbicide, il est possible que l'emploi des sulfonylurées sur des plantes résistantes contribue à l'apparition de mutants résistants sauvages et ce d'autant plus vite que les phénomènes de surdosage seront sans conséquence pour la culture. Lorsque la résistance entraîne un coût élevé pour la plante, la probabilité d'apparition d'adventices naturellement résistantes est faible voire nulle. Les herbicides agissant ainsi paraissent par conséquent plus avantageux. Cependant, si l'on introduit dans la nature par exemple des plantes cultivées résistantes au glyphosate, les gènes de résistance pourraient être transmis à des espèces voisines qui ainsi, pourraient devenir résistantes alors que naturellement, elles ne le seraient probablement jamais devenues. Pour éviter ce risque, il conviendrait d'introduire conjointement à ces types de résistance des gènes "suicides" ou tout au moins, des gènes qui réduiraient la compétitivité de la plante pour des caractéristiques non agronomiques (réduction de production de semences pour des chicorées par exemple). D'une manière générale, beaucoup des précautions devront être prises avant et pendant l'utilisation de ces variétés afin de ne pas se retrouver avec des cultures résistantes envahies par des adventices résistantes.

6. BIBLIOGRAPHIE

- AMRHEIN N., DEUS B., GEHRKE P., STEINRUCKEN H.C., 1980a. The site of the inhibition of shikimate pathway by glyphosate. II. Interference of glyphosate with chorismate formation *in vivo* and *in vitro*. Plant Physiol. 66: 830-834.
- AMRHEIN N., SCHAB J., STEINRUCKEN H.C., 1980b. The mode of action of the herbicide glyphosate. Naturwissenchaften 67: 356-357.
- AMRHEIN N., DEUS B., GEHRKE P., HOLLANDER H., SCHAB J., SCHULZ A., STEIN-RUCKEN H.C., 1981 Interference of glyphosate with the shikimate pathway. Proc. Growth Regulation Soc. America 8: 99-106.
- AMRHEIN N., JOHANNING D., SCHAB J., SCHULZ A., 1983. Biochemical basis for glyphosate-tolerance in a bacterium and a plant tissue culture. FEBS Lett. 157: 191-196.
- AMRHEIN N., 1986. Specific inhibitors as probes into the biosynthesis and metabolism of aromatic amino acids. In: The shikimate acid pathways. (CONN E.E., ed.) Plenum Press, New York, p. 83-117.
- ANDERSON P.C., HIBBERD K.A., 1985. Evidence for the interaction of an imidazolinone herbicide with leucine, valine, and isoleucine metabolism. Weed Sci. 33: 479-483.
- ANDERSON P., 1986. Cell culture selection of herbicide tolerant corn. In: Proceedings of the forty-first annual corn and sorghum industry research conference (WILKINSON D., ed) American Seed Trade Association, p. 48-55.
- ANDERSON P.C., GEORGESON M., 1989. Herbicide-tolerant mutants of corn. Genome 31: 994-999.
- ATKINSON D., 1985. The toxicological properties of glyphosate a summary. In : The herbicide glyphosate. (GROSSBARD E., ATKINSON D., eds.) Butterworths, London, p. 127-133.
- BALTHAZOR T.M., HALLAS L.E., 1986. Glyphosate-degrading microorganisms from industrial activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. 51: 432-434.
- BAUR J.R., 1979. Effect of glyphosate on auxin transport in corn and cotton tissues. Plant Physiol. 63: 882-886.
- BAYER E., GUGEL K.H., HAGELE K., HAGENMAIER H., JESSIPOW S., KONIG W.A., ZAHNER H., 1972. 25. Stoffwechselprodukte von Microorganismen. 98. Mitteilung (1). Phosphinothricin und phosphinothricyl-alanyl-alanin. Helvetica Chimica Acta. 55: 224-239.
- BEDBROOK J.R., CHALEFF R.S., FALCO S.C., MAZUR B.J., YADAV N.S., 1988. Nucleic acid fragment encoding herbicide resistant plant acetolactate synthase. European Patent Office 0 257 993 p. 1-68.

- BEHREND J., MATELES R.I., 1976. Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. II. Role of organic acids during growth on ammonia. Plant Physiol. 58: 510-512.
- BERLIN J., WITTE L., 1981. Effects of glyphosate on shikimic acid accumulation tobacco cell cultures with low and high yields of cinnamoyl putrescines. Z. Naturforsch. 36c: 210-214.
- BEVERSDORF W.D., KOTT L.S., 1987. Development of triazine resistance in crops by classical plant breeding. Weed Sci. 35: 9-11.
- BLAIR A.M., MARTIN T.D., 1988. A review of the activity, fate and mode of action of sulfonylurea herbicides. Pestic. Sci. 195-219.
- BODE R., KUNZE G., BIRNBAUM D., 1985. Reversal of glyphosate-induced growth inhibition of *Candida maltosa* by several amino acids and pyruvate. Biochem. Physiol. Pflanzen 180: 613-619.
- BOERBOOM C.M., WYSE D.L., SOMERS D.A., 1990. Mechanism of glyphosate tolerance in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*). Weed Sci. 38: 463-467.
- BONNER C.A., RODRIGUES A.M., MILLER J.A., JENSEN R.A., 1991a. Amino acids are general growth inhibitors of *Nicotiana silvestris* in tissue culture. Physiol. Plant.: sous presse.
- BONNER C.A., RODRIGUES A.M., MILLER J.A., JENSEN R.A., 1991b. Growth inhibitors of *Nicotiana silvestris* in tissue culture by aromatic amino acids. Physiol. Plant.: sous presse.
- BOOCOCK M.R., COGGINS J.R., 1983. Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. FEBS Lett. 154: 127-133.
- BOTTERMAN J., LEEMANS J., 1988a. Engineering herbicide resistance in plants: status and perspectives. Proc. EWRS Symp., Factors affecting herbicidal activity and selectivity, EWRS, Wageningen, p. 331-336.
- BOTTERMAN J., LEEMANS J., 1988b. Engineering herbicide resistance in plants. TIG 4: 219-222.
- BOTTERMAN J., LEEMANS J., 1989. Discovery, transfer to crops, expression and biological significance of a bialaphos resistance gene. BCPC MONO. 42 Amino acid biosynthesis inhibitors, p. 63-68.
- BOUDET A.M., GRAZIANA A., RANJEVA R., 1985. Recent advances in the regulation of the prearomatic pathway. Ann. Proc. Phytochem. Soc. Europe 25: 135-159.
- BOURGIN J.P., 1978. Isolement de mutants à partir de cellules végétales en culture *in vitro*. Physiol. Vég. 16: 339-351.

- BOURGIN J.P., 1985. Mutations et variations en culture de cellules végétales. Aspects industriels des cultures cellulaires d'origine animale et végétale. 10 èmecolloque organisé par la section de microbiologie industrielle et de biotechnologie de la société française de microbiologie. 7-8 mars 1985. p.208-229.
- BRADFORD M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- BRANCHARD M., 1984. Application des vitrométhodes à la mise en œuvre de programmes de sélection de plantes résistantes à des maladies. Agronomie 4 : 905-911.
- BRASSART C., DUBOIS J., VASSEUR J., 1985. Multiplication par culture *in vitro* de racines de *Cichorium intybus* L. au cours d'un programme de sélection. Bull. Soc. Bot. N. France 38 : 1-6.
- BROWN M.A., CHIU T., MILLER P., 1987. Hydrolytic activation versus oxidative degradation of Assert herbicide, an imidazolinone aryl-carboxylate, in susceptible wild oat versus tolerant corn and wheat. Pestic. Biochem. Physiol. 27: 24-29.
- BRYSON C.T., WILLS G.D., 1985. Susceptibility of bermudagrass (*Cynodon dactylon*) biotypes to several herbicides. Weed Sci. 33:848-852.
- BUBL W, LANGELUDDEKE P., 1984. Basta ein modernes Herbizid für den Weinbau. Der Dt Weinbau. 18: 850-851.
- BYNG G.S., WHITAKER R.J., JENSEN R.A., 1985. Glyphosate as a probe of pentafunctional arom protein of Euglena gracilis. Can. J. Bot. 63: 1021-1024.
- CANAL VILLANUEVA M.J., FERNANDEZ MUNIZ B., TAMES R.S., 1985. Effects of glyphosate on growth and the chlorophyll and carotenoid levels of yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*). Weed Sci. 33: 751-754.
- CANAL M.J., SANCHEZ TAMES R.S., FERNANDEZ B., 1987. Glyphosate-increased levels of indole-3-acetic acid in yellow nutsedge leaves correlate with gentisic acid levels. Physiol. Plant. 71: 384-388.
- CASELEY J.C., COUPLAND D., 1985. Environmental and plant factors affecting gly-phosate uptake, movement and activity. In: The herbicide glyphosate. (GROSS-BARD E., ATKINSON D., eds.) Butterworths, London, p.92-123.
- CHALEFF R.S., MAUVAIS C.J., 1984. Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. Science 224: 1443-1445.
- CHALEFF R.S., RAY T.B., 1984. Herbicide-resistant mutants from tobbaco cell cultures. Science 223: 1148-1151.
- CHALEFF R.S., BASCOMB N.F., 1987. Genetic and biochemical evidence for multiple forms of acetolactate synthase in *Nicotiana tabacum*. Mol. Gen. Genet. 210: 33-38.

- COLANDUONI J.A., VILLAFRANCA J.J., 1986. Inhibition of *Escherichia coli* glutamine synthetase by phosphinothricin. Bioorganic Chemistry 14: 163-169.
- COLE D.J., DODGE A.D., 1979. Effects of glyphosate on protein synthesis and phenylalanine metabolism in rhizome buds of *Agropyron repens*. Plant Physiol. 63S: 96.
- COLE D.J., DODGE A.D., CASELEY J.C., 1980. Some biochemical effects of glyphosate on plant meristems. J. Exp. Bot. 31: 1665-1674.
- COLE D.J., CASELEY J.C., DODGE A.D., 1983. Influence of glyphosate on selected plant processes. Weed Research 23: 173-183.
- COLE D.J., 1985. Mode of action of glyphosate a literature analysis. In : The herbicide glyphosate. (GROSSBARD E., ATKINSON D., eds.) Butterworths, London, p.48-73.
- COMAI L., FACCIOTTI D., HIATT W.R., THOMPSON G., ROSE R.E., STALKER D.M., 1985. Expression in plants of a mutant aroA gene from Salmonella typhimurium confers tolerance to glyphosate. Nature 317: 741-744.
- COMAI L., STALKER D., 1986. Mechanism of action of herbicides and their molecular manipulation. Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol. 3: 166-195.
- COPPENS D'EECKENBRUGGE G., GOBBE J., EVRARD B., 1987a. II Systèmes de reproduction. 2.1. Fertilité. In : Mécanismes de la reproduction chez la Chicorée de Bruxelles : fondements et applications à la sélection (LONGLY B., LOUANT B.P., eds.) IRSIA, Bruxelles, p. 21-26.
- COPPENS D'EECKENBRUGGE G., LOUANT B.P., SWENNE A., 1987b. Systèmes de reproduction. 2.2. Système d'incompatibilité. In : Mécanismes de la reproduction chez la Chicorée de Bruxelles : fondements et applications à la sélection (LON-GLY B., LOUANT B.P., eds.) IRSIA, Bruxelles, p. 27-40.
- CREASON G.L., CHALEFF R.S., 1988. A second mutation enhances resistance of a tobacco mutant to sulfonylurea herbicides. Theor. Appl. Genet. 76: 177-182.
- CRESSWELL R.C., FOWLER M.W., SCRAGG A.H., 1988. Glyphosate-tolerance in *Catharanthus roseus*. Plant Sci. 54: 55-63.
- CSEPLO A., MEDGYESY P., 1986. Characteristic symptoms of photosynthesis inhibition by herbicides are expressed in photomixotrophic tissue cultures of *Nicotiana*. Planta 168: 24-28.
- D'AMATO F., 1990. Somatic nuclear mutations *in vivo* and *in vitro* in higher plants. Caryologia 43: 191-204.
- DAVIS C., HARVEY R.G., 1979. Reversal of glyphosate toxicity to alfalfa calli by phenylalanine and tyrosine. Proc. North. Weed Sci. Soc. 33: 112-113.

- DE ALMEIDA E.R.P., GOSSELE V., MULLER C.G., DOCKX J., REYNAERTS A., BOTTER-MAN J., KREBBERS E., TIMKO M.P., 1989. Transgenic expression of two marker genes under the control of an *Arabidopsis rbcS* promoter: sequences encoding the Rubisco transit peptide increase expression levels. Mol. Gen. Genet. 218: 78-86.
- DEAK M., DONN G., FEHER A., DUDITS D., 1988. Dominant expression of gene amplification-related herbicide resistance in medicago cell hybrids. Plant Cell Rep. 7: 158-161.
- DE BLOCK M., BOTTERMAN J., VANDEWIELE M., DOCKX J., THOEN C., GOSSELE V., RAO MOVVA N., THOMPSON C., VAN MONTAGU M., LEEMANS J., 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. EMBO J. 6: 2513-2518.
- DE BLOCK M., DE BROUWER D., TENNING P., 1989. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants. Plant Physiol. 91: 694-701.
- DeGENNARO F.P., WELLER S.C., 1984. Differential susceptibility of field bindweed (*Convolvulus arvensis*) biotypes to glyphosate. Weed Sci. 32: 472-476.
- DE GREEF W., DELON R., DE BLOCK M., LEEMANS J., BOTTERMAN J., 1989. Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions. Bio/technology 7: 61-64.
- DELLA-CIOPPA G., BAUER S.C., KLEIN B.K., SHAH D.M., FRALEY R.T., KISHORE G.M., 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 6873-6877.
- DELLA-CIOPPA G., BAUER S.C., TAYLOR M.L., ROCHESTER D.E., KLEIN B.K., SHAH D.M., FRALEY R.T., KISHORE G.M., 1987. Targeting a herbicide-resistant enzyme from *Escherichia coli* to chloroplasts of higher plants. Bio/technology 5: 579-584.
- DELLA-CIOPPA G., KISHORE G.M., 1988. Import of a precursor protein into chloroplasts is inhibited by the herbicide glyphosate. EMBO J. 7: 1299-1305.
- DEVLIN R.M., KARCZMARCZYK S.J., ZBIEC I.I., KOSZANSKI Z.K., 1986. Initial and residual activity of glyphosate and SC. 0224 in a sandy soil. Crop Protection 5: 293-296.
- D'HALLUIN K., BOTTERMAN J., DE GREEF W., 1990. Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions. Crop Sci. 30: 866-871.
- DONN G., TISCHER E., SMITH J.A., GOODMAN H.M., 1984. Herbicide-resistant alfalfa cells : an example of gene amplification in plants. J. Mol. Appl. Genet. 2 : 621-635.

- DUBOIS J., DROWININSKI A., VASSEUR J., 1988. Croissance et potentialités organogènes de suspensions cellulaires de *Cichorium intybus* L. var. Witloof. Bull. Soc. bot. Fr. 135 : 311-322.
- DUKE S.O., HOAGLAND R.E., 1978. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds. I. Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in dark-grown maize roots. Plant Sci. Lett. 11: 185-190.
- DUKE S.O., HOAGLAND R.E., 1981. Effects of glyphosate on the metabolism of phenolic compounds: VII. Root-fed amino acids and glyphosate toxicity in soybean (*Glycine max*) seedlings. Weed Sci. 29: 297-302.
- DUKE S.O., 1988. Glyphosate. In: Herbicides, chemistry, degradation, and mode of action. (KEARNEY P.C., KAUFMAN D.D., eds.) Marcel Dekker, Inc., New York. 3: 1-70.
- DUNCAN K., LEWENDON A., COGGINS J.R., 1984. The purification of 5-enolpyruvyl-shikimate 3-phosphate synthase from an overproducing strain of *Escherichia coli*. FEBS Lett. 165: 121-127.
- DUNCAN R.D., WIDHOLM J.M., 1986. Cell selection for improvement. Plant Breeding Reviews 4: 153-173.
- DYER W.E., WELLER S.C., BRESSAN R.A., HERRMANN K.M.- 1988. Glyphosate tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Plant Physiol. 88: 661-666.
- ECKES P., 1987. Isolation of L-phosphinothricin resistant plants. In: Plant molecular biology. (VON WETTSTEIN D., CHUA N.H., eds.) Plenum Press, New York, p.635.
- ECKES P., WENGEMAYER F., 1987. Overproduction of glutamine synthetase in transgenic plants. Abs. 29th Harden conference: Regulation of plant gene expression, Biochemical Society, London, 62.
- EL-HATTAB A.H., HASSAN E.A., SHABAN S.A., ABO-EL SUOUD M.R., 1987. -Effect of some growth factors and glyphosate herbicide on pigments and protein in faba beans (*Vicia faba* L.) J. Agronom. Crop Sci. 158: 250-258.
- EVANS D.A., SHARP W.R., MEDINA-FILHO H.P., 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. Amer. J. Bot. 71: 759-774.
- FACCIOTTI D., 1985. Les aspects prospectifs de la culture cellulaire végétale. Aspects industriels des cultures cellulaires d'origine animale et végétale. 10 ème colloque organisé par la section de microbiologie industrielle et de biotechnologie de la société française de microbiologie. 7-8 mars 1985. p.341-353.
- FALCO S.C., DUMAS K.S., 1985. Genetic analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the herbicide sulfometuron methyl. Genetics 109: 21-35.
- FILLATI J.J., KISER J., ROSE R., COMAI L., 1987a. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. Bio/technology 5: 726-730.

- FILLATTI J.J., SELLMER J., McCOWN B., HAISSIG B., COMAI L., 1987b. Agrobacterium mediated transformation and regeneration of *Populus*. Mol. Gen. Genet. 206 : 192-199.
- FINCHER R.R., 1989. Transfer of *in vitro* selected imidazolinone resistance to commercial maize hybrids. BCPC MONO. 42 Amino acid biosynthesis inhibitors.p. 69-73.
- FISCHER R.S., BERRY A.C., GAINES C.G., JENSEN R.A., 1986. Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in Eubacteria. J. Bact. 168: 1147-1154.
- FLAVELL R.B., 1989. Plant biotechnology and its application to agriculture. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 324 : 525-535.
- FORLANI G., RACCHI M.L., MUSITELLI G., NIELSEN E., 1990. Glyphosate tolerance in tissue cultures of maize: evidence for the expression of a cytosolic EPSP-synthase isozyme resistant to the herbicide. Giorn. Bot. Ital. 123, suppl. 2: 175-176.
- FRALEY R., KISHORE G., GASSER C., PADGETTE S., HORSCH R., ROGERS S., DEL-LA-CIOPPA G., SHAH D., 1987. Genetically-engineered herbicide tolerance technical and commercial considerations. British Crop Protect. Conference-weeds, BCPC Publications, Survey UK p.463-471.
- FRIEDBERG D., SEIJFFERS J. 1988. Sulfonylurea-resistant mutants and natural tole-rance of *Cyanobacteria*. Arch. Microbiol. 150: 278-281.
- FROMM M.E, MORRISH F., ARMSTRONG C., WILLIAMS R., THOMAS J., KLEIN T., 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. Bio/technology 8: 833-839.
- FUKUNAGA Y., KING J., 1982. The effect of L-amino acids on the growth of and nitrate reductase activity in cultured cells of *Datura innoxia*. Plant Sci. Lett. 24: 45-54.
- GAMBORG O.L., 1970. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. Plant Physiol. 45: 372-375.
- GOLDSBROUGH P.B., HATCH E.M., HUANG B., KOSINSKI W.G., DYER W.E., HERR-MANN K.M., WELLER S.C., 1990. Gene amplification in glyphosate tolerant tobacco cells. Plant Sci. 72: 53-62.
- GONZALES R.A., WILDHOM J.M., 1985. Altered amino acid biosynthesis in amino acid analog and herbicide-resistant cells. In: Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. (NEWMANN K., BRAZ W., REINHARD E., eds.) Springer-Verlag, Berlin, p. 337-343.
- GOUGLER J.A., GEIGER D.R., 1981. Uptake and distribution of N-phosphonomethylgly-cine in sugar beet plants. Plant Physiol. 68: 668-672.

- GRESSEL J., 1986. The challenges of conferring herbicide resistance on crops. In: Biotechnology for Solving Agricultural Problems (AUGUSTINE P.C., DANFORTH H.D., BAKST R.M., eds) Beltsville symposia in agricultural research. 10: 369-383.
- GRESSEL J., 1989. Conferring herbicide resistance on susceptible crops. In: Herbicides and plant metabolism. (DODGE A.D., ed.) Cambridge University Press, Cambridge, p. 237-259.
- GRESSEL J., 1990a. The genus *Lolium*: species that rapidly evolve resistance to herbicides and xenobiotics. Phytoparasitica 18: 256.
- GRESSEL J., 1990b. Need herbicide resistances have evolved? Generalizations from around the world. Proceedings of the 9th australian weeds conference Adelaide, South Australia, August 6-10 1990 p. 173-183.
- GRESSHOFF P.M., 1979. Growth inhibition by glyphosate and reversal of its action by phenylalanine and tyrosine. Aust. J. Plant Physiol. 6: 177-185.
- GROSSBARD E., ATKINSON D., 1985. The herbicide glyphosate. Butterworths, London, 490p.
- HALL L.M., DEVINE M.D., 1990. Cross-resistance of a chlorsulfuron-resistant biotype of *Stellaria media* to a triazolopyrimidine herbicide. Plant Physiol. 93: 962-966.
- HARDELIE L.C., WIDHOLM J.M., SLIFE F.W., 1977. Effect of glyphosate on carrot and tobacco cells. Plant Physiol. 60: 40-43.
- HARTNETT M.E., NEWCOMB J.R., HODSON R.C., 1987. Mutations in *Chlamydomonas* reinhardtii conferring resistance to the herbicide sulfometuron methyl. Plant Physiol. 85: 898-901.
- HAUGHN G.W., SOMERVILLE C., 1986. Sulfonylurea-resistant mutants of *Arabidop-sis thaliana*. Mol. Gen. Genet. 204: 430-434.
- HAUGHN G.W., SMITH J., MAZUR B., SOMERVILLE C., 1988. Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides. Mol. Gen. Genet. 211: 266-271.
- HAUGHN G.W., SOMERVILLE C.R., 1990. A mutation causing imidazolinone resistance maps to the *Csr1* locus of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 92: 1081: 1085.
- HAUPTMANN R.M., DELLA-CIOPPA G., SMITH A.G., KISHORE G.M., WIDHOLM J.M., 1988. Expression of glyphosate resistance in carrot somatic hybrid cells through the transfer of an amplified 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase gene. Mol. Gen. Genet. 211: 357-363.
- HAWKES T.R., HOWARD J.L., PONTIN S.E., 1989. Herbicides that inhibit the biosynthesis of branched chain amino acids. In : Herbicides and plant metabolism. (DODGE A.D., ed.) Cambridge University Press, Cambridge, p. 113-136.

- HELLER R., 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég. 14: 1-223.
- HESZKY L.E., NAM L.S., SIMON-KISS I., LOKOS K., GYULAI G., KISS E., 1989.

 Organ-specific and ploidy-dependent somaclonal variation; a new tool in bree-ding. Acta Biologica Hungarica 40: 381-394.
- HIBBERD K.A., 1984. Induction, selection, and characterization of mutants in maize cell cultures. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants (VASIL I.K., ed.) Academic Press, New York, vol.1, p. 571-576.
- HICKOK L.G. 1987. Applications of *in vitro* selection systems: whole-plant selection using the haploid phase of *Ceratopteris*. ACS Symp. Ser. 334: 53-65.
- HINCHEE M.A.W., CONNOR-WARD D.V., NEWELL C.A., McDONNEL R.E., SATO S.J., GASSER C.S., FISCHHOFF D.A., RE D.B., FRALEY R.T., HORSCH R.B., 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. Bio/technology 6: 915-922.
- HOAGLAND R.E., DUKE S.O., ELMORE C.D., 1978. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds II. Influence on soluble hydroxyphenolic compound, free amino acid and soluble protein levels in dark-grown maize roots. Plant Sci. Lett. 13: 291-299.
- HOAGLAND R.E., DUKE S.O., 1982. Biochemical effects of glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine]. ACS Symp. Series 181: 175-205.
- HOAGLAND R.E., 1990. Interaction of indoleacetic acid and glyphosate on phenolic metabolism in soybeans. Pestic. Biochem. Physiol. 36: 68-75.
- HOLLANDER H., AMRHEIN N., 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. I. Inhibition by glyphosate of phenylpropanoid synthesis in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). Plant Physiol. 66: 823-829.
- HOLLANDER-CZYTKO H., AMRHEIN N., 1983. Subcellular compartmentation of shikimic acid and phenylalanine in buckwheat cell suspension cultures grown in the presence of shikimate pathway inhibitors. Plant Sci. Lett. 29: 89-96.
- HOLLANDER-CZYTKO H., AMRHEIN N., 1987. 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, the target enzyme of the herbicide glyphosate, is synthesized as a precursor in higher plant. Plant Physiol. 83: 229-231.
- HOLLANDER-CZYTKO H., JOHANNING D., MEYER H.E., AMRHEIN N., 1988. Molecular basis for the overproduction of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in a glyphosate-tolerant cell suspension culture of *Corydalis sempervirens*. Plant Mol. Biol. 11: 215-220.
- HOPFNER M., REIFFERSCHEID G., WILD A., 1988. Molecular composition of glutamine synthase of *Sinapis alba* L. Z. Naturforsch. 43c : 194-198.
- HUTCHINSON J.M., SHAPIRO R., SWEETSER P.B., 1984. Metabolism of chlor-sulfuron by tolerant broadleaves. Pestic. Biochem. Physiol. 22: 243-247.

- HUYNH Q.K., 1987 Reaction of 5-enol-pyruvoylshikimate-3-phosphate synthase with diethyl pyrocarbonate: evidence for a essential histidine residue. Archiv. Biochem. Biophys. 258: 233-239.
- HUYNH Q.K. BAUER S.C., BILD G.S., KISHORE G.M., BORGMEYER J.R., 1988. Site-directed mutagenesis of *Petunia hybrida* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Lys-23 is essential for substrate binding. J. Biol. Chem. 263: 11636-11639.
- HUYNH Q.H., 1991. 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*-The substrate analogue bromopyruvate inactivates the enzyme by modifying Cys-408 and Lys-411. Archiv. Biochem. Biophys. 284: 407-412.
- ISHIDA Y., HIYOSHI T., SANO M., KUMASHIRO T., 1989. Selection and characterization of a herbicide-tolerant cell line of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Plant Sci. 63: 227-235.
- JACHETTA J.J., APPLEBY A.P., BOERSMA L., 1986. Apoplastic and symplastic pathways of atrazine and glyphosate transport in shoots of seedling sunflower. Plant Physiol. 82: 1000-1007.
- JACOB G.S., SCHAEFER J., STEJSKAL E.O., Mc KAY R.A., 1985. Solid-state NMR determination of glyphosate metabolism in a *Pseudomonas* sp. J. Biol. Chem. 260: 5899-5905.
- JACOB G.S., GARBOW J.R., HALLAS L.E., KIMACK N.M., KISHORE G.M., SCHAEFER J., 1988. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2953-2958.
- JAWORSKI E.G., 1972. Mode of action of N-phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. J. Agr. Food Chem. 20: 1195-1198.
- JENSEN R.A., 1986a. Tyrosine and phenylalanine biosynthesis: relationship between alternative pathways, regulation and subcellular location. In: The shikimic acid pathway. (CONN E.E., ed.) Plenum Press, New York, p. 57-81.
- JENSEN R.A., 1986b. The shikimate/arogenate pathway : link between carbo hydrate metabolism and secondary metabolism. Physiol. Plant. 66 : 164-168.
- JORDAN M.C., McHUGHEN A., 1987. Selection for chlorsulfuron resistance in flax (*Linum usitatissimum*) cell cultures. J. Plant Physiol. 131 : 333-338.
- JORDAN M.C., McHUGHEN A., 1988. Glyphosate tolerant flax plants from Agrobacterium mediated gene transfer. Plant Cell Reports 7: 281-284.
- KILLMER J., WIDHOLM J., SLIFE F., 1981. Reversal of glyphosate inhibition of carrot cell culture growth by glycolytic intermediates and organic amino acids. Plant Physiol. 68: 1299-1302.

- KISHORE G.M., BRUNDAGE L., KOLK K., PADGETTE S.R., ROCHESTER D., HUYNH Q.K. DELLA-CIOPPA G., 1986. Isolation, purification and characterization of a glyphosate tolerant mutant *E. coli* EPSP synthase. Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol. 45: 1506.
- KISHORE G.M., SHAH D.M., 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. Ann. Rev. Biochem. 57: 627-663.
- KITCHEN L.M., WITT W.W., RIECK C.E., 1981a. Inhibition of chlorophyll accumulation by glyphosate. Weed Sci. 29: 513-516.
- KITCHEN L.M., WITT W.W., RIECK C.E., 1981b. Inhibition of *d* -aminolevulinic acid synthesis by glyphosate. Weed Sci. 29: 571-577.
- KLEE H.J., MUSKOPF Y.M., GASSER C.S., 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. Mol. Gen. Genet. 210: 437-442.
- KOCHER H., 1983. Influence of the light factor on physiological effects of the herbicide Hoe 39866. Aspects Appl. Biol. 4: 227-234.
- KOCHER H., LOTZSCH K., 1985. Uptake, translocation and mode of action of the herbicide glufosinate-ammonium in warm climate weed species. Proceedings Asian-Pacific Weed Science Society, Tenth Conference 1985, p. 193-198.
- KOCHER H., 1989. Inhibitors of glutamine synthetase and their effects in plants. BCPC MONO. 42 Amino acid biosynthesis inhibitors p. 173-182.
- KONDO Y., SHOMURA T., OGAWA Y., TSURUOKA T., WATANABE H., TOTSUKAWA K., SUZUKI T., MORIYAMA C., YOSHIDA J., INOUYE S., NIIDA T., 1973. Studies on a new antibiotic SF-1293. I. Isolation and physico-chemical and biological characterization of SF-1293 substance. Sci. Reports Meiji Seika Kaisha 13: 34-41.
- KOSUGE T., SANGER M., 1986. Indoleacetic acid, its synthesis and regulation: a basis for tumorigenicity in plant disease. In: The shikimic acid pathway. (CONN E.E., ed.) Plenum Press, New York, p. 147-161.
- LACUESTA M., GONZALEZ-MORO B., GONZALEZ-MURUA C., APARICIO-TEJO P., MUNOZ-RUEDA A., 1989. Effect of phosphinothricin (glufosinate) on activities of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Medicago sativa* L. J. Plant Physiol. 134: 304-307.
- LANZETTA P.A., ALVAREZ L.J., REINACH P.S. CANDIA O.A., 1979. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. Anal. Biochem. 100: 95-97.
- LARKIN P.J., SCOWCROFT W.R., 1981. Somacional variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.

- LARKIN P.J., BRETTELL R.I.S., RYAN S.A., DAVIES P.A., PALLOTTA M.A., SCOW-CROFT W.R., 1985. Somaclonal variation: impact on plant biology and breeding strategies. In: Biotechnology in plant science. Relevance to agriculture in the eighties. (ZAITLIN M., DAY P., HOLLAENDER A., eds.) Academic Press Inc., London, p. 329-338.
- LAROSSA R.A., FALCO S.C., 1984. Amino acid biosynthetic enzymes as targets of herbicide action. Trends in Biotechnol. 2: 158-161.
- LAROSSA R.A., SCHLOSS J.V., 1984. The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem. 259: 8753-8757.
- LEA P.J., RIDLEY S.M., 1989. Glutamine synthetase and its inhibition. In: Herbicides and plant metabolism. (DODGE A.D., ed.) Cambridge University Press, Cambridge, p. 137-170.
- LEASON M., CUNLIFFE D., PARKIN D., LEA P.J., MIFLIN B.J., 1982. Inhibition of pea leaf glutamine synthetase by methionine sulphoximine, phosphinothricin and other glutamate analogues. Phytochem. 21: 855-857.
- LEE K.Y., TOWNSEND J., TEPPERMAN J., BLACK M., CHUI C.F., MAZUR B., DUNS-MUIR P., BEDBROOK J., 1988. The molecular basis of sulfonylurea herbicide in tobacco. EMBO J. 7: 1241-1248.
- LEE K.Y., LUND P., LOWE K., DUNSMUIR P., 1990. Homologous recombination in plant cells after *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Cell 2: 415-425.
- LEE T.T., 1980a. Characteristics of glyphosate inhibition of growth in soybean and tobacco callus cultures. Weed Research 20: 365-369.
- LEE T.T., 1980b. Effects of phenolic substances on metabolism of exogenous indole-3-acetic acid in maize stems. Physiol. Plant. 50: 107-112.
- LEE T.T., 1981. Effects of glyphosate on synthesis and degradation of chlorophyll in soybean and tobacco cells. Weed Res. 21: 161-164.
- LEE T.T., 1982a. Mode of action of glyphosate in relation to metabolism of indole-3-acetic acid. Physiol. Plant. 54: 289-294.
- LEE T.T., 1982b. Promotion of indole-3-acetic acid oxidation by glyphosate in tobacco callus tissue. J. Plant Growth Regul. 1: 37-48.
- LEE T.T., DUMAS T., JEVNIKAR J.J., 1983. Comparison of the effects of glyphosate and related compounds on indole-3-acetic acid metabolism and ethylene production in tobacco callus. Pestic. Biochem. Physiol. 20: 354-359.
- LEE T.T., 1984. Release of lateral buds from apical dominance by glyphosate in soybean and pea seedlings. J. Plant Growth Regul. 3: 227-235.

- LEE T.T., DUMAS T., 1985. Effect of glyphosate on indole-3-acetic acid metabolism in tolerant and susceptible plants. J. Plant Growth Regul. 4: 29-39.
- LEE T.T., STARRATT A.N., 1986. Phenol-glyphosate interaction: effects on IAA metabolism and growth of plants. In: Proceedings of the first international symposium on adjuvants for agrochemicals. Brandon, Canada 5-7 Aug 1986.
- LEEMANS J., DE BLOCK M., D'HALLUIN K., BOTTERMAN J., DE GREEF W., 1987. The use of glufosinate as a selective herbicide on genetically engineered resistant tobacco plants. British Crop Protection Conference -Weeds 8C-1 p. 867-870.
- LOR D., 1985. Applications agronomiques en sélection des cultures cellulaires végétales. Aspects industriels des cultures cellulaires d'origine animale et végétale. 10 ème colloque organisé par la section de microbiologie industrielle et de biotechnologie de la société française de microbiologie. 7-8 mars 1985. p.309-324.
- LYDON J., DUKE S.O., 1989. Pesticide effects on secondary metabolism of higher plants. Pestic. Sci. 25: 361-373.
- MALIGA P., 1984. Isolation and characterization of mutants in plant cell culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 519-542.
- MALLORY-SMITH C.A., THILL D.C., DIAL M.J., 1990. Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). Weed Technol. 4: 163-168.
- MANDERSCHEID R., WILD A., 1986. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. J. Plant Physiol. 123: 135-142.
- MAZUR B.J., FALCO S.C., KNOWLTON S., SMITH J.K., 1987. Acetolactate synthase, the target enzyme of the sulfonylurea herbicides. In: Plant molecular biology (VON WETTSTEIN D., CHUA N.H., eds.) Plenum Press, New York, p. 339-349.
- MAZUR B.J., FALCO S.C., 1989. The development of herbicide resistant crops. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 441-470.
- McHUGHEN A., 1989. *Agrobacterium* mediated transfer of chlorsulfuron resistance to commercial flax cultivars. Plant Cell Rep. 8: 445-449.
- MILLECAMPS J.L., 1989. Sélection de chicorées *Cichorium intybus* L. var. Witloof résistantes aux sulfonylurées par cultures cellulaires. Thèse, Université Lille I, 57p.
- MOLLENHAUER C., SMART C.C., AMRHEIN N., 1987 Glyphosate toxicity in the shoot apical region of the tomato plant. I. Plastid swelling is the initial ultrastructural feature following *in vivo* inhibition of 5-enolpyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase. Pestic. Biochem. Physiol. 29: 55-65.

- MOORE J.K., BRAYMER H.D., LARSON A.D., 1983. Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilizes the phosphonate herbicide glyphosate. Appl. Environ. Microbiol. 46: 316-320.
- MOUSDALE D.M., COGGINS J.R., 1985. Subcellular localization of the common shikimate-pathway enzymes in *Pisum sativum* L. Planta 163: 241-249.
- MUHITCH M.J., SHANER D.L., STIDHAM M.A., 1987. Imidazolinones and acetohy-droxyacid synthase from higher plants. Plant Physiol. 83: 451-456.
- MURAKAMI T., ANZAI H., IMAI S., SATOH A., NAGAOKA K., THOMPSON C.J., 1986.

 The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster. Mol. Gen. Genet. 205: 42-50.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- MURATA K., HIGAKI N., KIMURA A., 1988. Detection of carbon-phosphorus lyase activity in cell free extracts of *Enterobacter aerogenes*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 157: 190-195.
- MURATA K., HIGAKI N., KIMURA A., 1989a. Carbon-phosphorus hydrolase : some properties of the enzyme in cell extracts of *Enterobacter aerogenes*. Agric. Biol. Chem. 53 : 1225 1229.
- MURATA K., HIGAKI N., KIMURA A., 1989b. Carbon-phosphorus hydrolase: functional association of two different proteins for the enzyme activity *Enterobacter aerogenes*. Agric. Biol. Chem. 53: 1419-1420.
- NABORS M.W., 1976. Using spontaneously occurring and induced mutations to obtain agriculturally useful plants. BioScience 26: 761-768.
- NAFZIGER E.D., WIDHOLM J.M., SLIFE F.W., 1983. Effects of aspartate and other compounds on glyphosate uptake and growth inhibition in cultured carrot cells. Plant Physiol. 71: 623-626.
- NAFZIGER E.D., WIDHOLM J.M., STEINRUCKEN H.C., KILLMER J.L., 1984. Selection and characterization of a carrot cell line tolerant to glyphosate. Plant Physiol. 76: 571-574.
- NEGRUTIU I., JACOBS M., CABOCHE M., 1984. Advances in somatic cell genetics of higher plants approach in basic studies on mutagenesis and isolation of biochemical mutants. Theor. Appl. Genet. 67: 289-304.
- NILSSON G., 1985. Interactions between glyphosate and metals essential for plant growth. In: The herbicide glyphosate. (GROSSBARD E., ATKINSON D., eds.) Butterworths, London, p. 35-47.
- NYMAN S., SIMOLA L.K., 1988. The uptake of phenylalanine into suspension-cultured cells of *Atropa belladonna*. Physiol. Plant. 74: 623-630.

- OGAWA Y., TSURUOKA T., INOUYE S., NIIDA T., 1973. Studies on a new antibiotic SF-1293. II. Chemical structure of antibiotic SF-1293. Sci. Reports Meiji Seika Kaisha 13: 42-48.
- ORWICK P.L., MARC P.A., UMEDA K., SHANER D.L., LOS M., CIARLANTE D.R., 1983.

 Ac 252,214 A new broad spectrum herbicide for soybeans : greenhouse studies. Proc. S. Weed Sci. Soc. 36 : 90.
- OWEN W.J., 1987. Herbicide detoxification and selectivity. British Crop Protection Conference-Weeds 4B-1 p.309-318.
- OWEN W.J., 1989. Metabolism of herbicides-detoxification as a basis of selectivity. In : Herbicides and plant metabolism. (DODGE A.D., ed.) Cambridge University Press, Cambridge, p. 171-198.
- OXTOBY E., HUGHES M.A., 1989. Breeding for herbicide resistance using molecular and cellular techniques. Euphytica 40: 173-180.
- PADGETTE S.R., SMITH C.E., HUYNH Q.K., KISHORE G.M., 1988. Arginine chemical modification of *Petunia hybrida* 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Arch. Biochem. Biophys. 266: 254-262.
- PETERSON M.A., ARNOLD E., 1985. Response of rotational crops to soil residues of chlorsulfuron. Weed Sci. 34: 131-136.
- PIPKE R., AMRHEIN N., 1988. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1293-1296.
- PRIMIANI M.M., COTTERMAN J.C., SAARI L.L., 1990. Resistance of kochia (Kochia scoparia) to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. Weed Technol. 4: 169-172.
- PUTWAIN P.D., COLLIN H.A., 1989. Mechanisms involved in the evolution of herbicide resistance in weeds. In: Herbicides and plant metabolism. (DODGE A.D., ed.) Cambridge University Press, Cambridge, p. 211-235.
- QUINN J.P., PEDEN J.M., DICK R.E., 1988. Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29: 511-516.
- QUINN J.P., 1990. Evolving strategies for the genetic engineering of herbicide resistance in plants. Biotech. Adv. 8: 321-333.
- RACCHI M.L., FORLANI G., PELANDA R., NIELSEN E., 1989. Glyphosate effects on growth and EPSP synthase isozymes activity in cultured maize cells. XII Eucarpia Congress 26-11 Vortrage fur Pflanzenzuchtg. 15.
- RACCHI M.L., 1990. Glyphosate tolerance in plant cell cultures. In: The impact of biotechnology in agriculture (SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S., eds) Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 437-446.

- RAJNCHAPEL-MESSAI J., GUERCHE P., 1985. Méthodes in vitro et productions végétales. Biofutur oct. : 31-45.
- RAYMOND M., PASTEUR N., FOURNIER D., CUANY A., BERGE J., MAGNIN M., 1985. Le gène d'une acétylcholinestérase insensible au propoxur détermine la résistance de *Culex pipiens* L. C.R. Acad. Sc. Paris Série III 300 : 509-512.
- REAM J.E., STEINRUCKEN H.C., PORTER C.A., SIKORSKI J.A., 1988. Purification and properties of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from dark-grown seedlings of *Sorghum bicolor*. Plant Physiol. 87: 232-238.
- RENNER K.A., MEGGITT W.F., LEAVITT R.A., 1988a. Influence of rate, method of application, and tillage on imazaquin persistence in soil. Weed Sci. 36: 90-95.
- RENNER K.A., MEGGITT W.F., PENNER D., 1988b. Response of corn (Zea mays) cultivars to imazaquin. Weed Sci. 36: 625-628.
- REY P., EYMERY F., PELTIER G., SILVY A., 1989. Establishment and characterization of photoautotrophic protoplast-derived cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. Plant Cell Rep. 8: 234-237.
- REY P., EYMERY F., PELTIER G., 1990. Atrazine and diuron resistant plants from photoautotrophic protoplast-derived cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. Plant Cell Rep. 9: 241-244.
- RIDLEY S.M., McNALLY S.F., 1985. Effects of phosphinothricin on the isozymes of glutamine synthase isolated from plant species which exhibit varing degrees of susceptibility to the herbicide. Plant Sci. 39: 31-36.
- ROGERS S.G., BRAND L.A., HOLDER S.B., SHARPS E.S., BRACKIN M.J., 1983. Amplification of the *aroA* gene from *Escherichia coli* results in tolerance to the herbicide glyphosate. Appl. Environ. Microbiol. 46: 37-43.
- ROISCH U., LINGENS F., 1974. Effect of the herbicide N-phosphonomethylglycine on the biosynthesis of aromatic amino acids. Angew. Chem. internat. Edit. 13: 400.
- ROISCH U., LINGENS F., 1980. Zum Wirkungs mechanismus des Herbizids N-(Phosphonomethyl)glycin. Einfluss von N-(Phosphonomethyl)glycin auf das Wachstum und auf die Enzyme der Aromatenbiosynthese von *Escherichia coli*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361: 1049-1058.
- RUBIN J.L., GAINES C.G., JENSEN R.A., 1982. Enzymological basis for herbicidal action of glyphosate. Plant Physiol. 70: 833-839.
- RUBIN J.L., GAINES C.G., JENSEN R.A., 1984. Glyphosate inhibition of 5-enolpyruvyl-shikimate 3-phosphate synthase from suspension-cultured cells of *Nicotiana* silvestris. Plant Physiol. 75: 839-845.
- RUBIN J.L, JENSEN R.A., 1985. Differentially regulated isozymes of 3-deoxy-D-ara-bino-heptulosonate 7-phosphate synthase from seedlings of *Vigna radiata* [L.] Wilczek. Plant Physiol. 79: 711-718.

- RUEPPEL M.L., BRIGTHWELL B.B., SCHAEFER J., MARVEL J.T., 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. J. Agric. Food Chem. 25: 517-528.
- SAARI L.L., COTTERMAN J.C., PRIMIANI M.M., 1990. Mechanism of sulfonylurea herbicide resistance in the broadleaf weed, *Kochia scoparia*. Plant Physiol. 93: 55-61.
- SATO F., TAKEDA S., YAMADA Y., 1987. A comparison of effects of several herbicides on photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic cultured tobacco cells and seedlings. Plant Cell Reports 6: 401-404.
- SAUER H., WILD A., RUHLE W., 1987. The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis. II. The causes of inhibition of photosynthesis. Z. Naturforsch. 42c: 270-278.
- SAXENA P.K., KING J., 1988. Herbicide resistance in *Datura innoxia*. Cross-resistance of sulfonylurea-resistant cell lines to imidazolinones. Plant Physiol. 86: 863-867.
- SAXENA P.K., WILLIAMS D., KING J., 1990. The selection of chlorsulfuron-resistant cell lines of independent origin from an embryogenic cell suspension culture of *Brassica napus* L. Plant Sci. 69: 231-237.
- SCHELL D., CASIDA J.E., 1985. Sulfonylurea herbicides: growth inhibition in soybean cell suspension cultures and in bacteria correlated with block in biosynthesis of valine, leucine, or isoleucine. Pectic. Biochem. Physiol. 23: 398-412.
- SCHULZ A., SOST D., AMRHEIN N., 1984. Insensitivity of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase to glyphosate confers resistance to this herbicide in strain of *Aerobacter aerogenes*. Arch. Microbiol. 137: 121-123.
- SCHULZ A., WENGENMAYER F., GOODMAN H.M., 1990. Genetic engineering of herbicide resistance in higher plants. Plant Sci. 9: 1-15.
- SCHWERDTLE F., BIERINGER H., FINKE M., 1981.- HOE 39866 Ein neues nicht selectives Blattherbizid. Z. Pflkrankh. PflSchutz, Sonderh. 9: 431-440.
- SCORZA R., WELKER W.V., DUNN L.J., 1984. The effects of glyphosate, auxin, cytokinin combinations on *in vitro* development of cranberry node explants. Hortsci. 19: 66-68.
- SEBASTIAN S.A., CHALEFF R.S., 1987. Soybean mutants with increased tolerance for sulfor/lurea herbicides Crop Sci. 27: 948-952.
- SEBASTIAN S.A., FADER G.M., ULRICH J.F., FORNEY D.R., CHALEFF R.S., 1989.

 Semidominant soybean mutation for resistance to sulfonylurea herbicides. Crop Sci. 29: 1403-1408.

- SENE A., 1984. Capacité de prolifération et d'organogénèse de petits explants racinaires de *Cichorium intybus* L. cultivés *in vitro*. Thèse de 3ème cycle, Université Lille I, 148p.
- SHAH D.M., HORSCH R.B., KLEE H.J., KISHORE G.M., WINTER J.A., TUMER N.E., HIRONAKA C.M., SANDERS P.R., GASSER C.S., AYKENT S., SIEGEL N.R., ROGERS S.G., FRALEY R.T., 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. Science 233: 478-481.
- SHANER D.L., ROBSON P., SIMCOX P.D., CIARLANTE D.R., 1983. Absorption, translocation, and metabolism of AC 252,214 in soybeans, cocklebur, and velvetleaf. Proc. Southern Weed Sci. Soc. 36: 92.
- SHANER D.L., ANDERSON P.C., STIDHAM M.A., 1984. Imidazolinones. Plant Physiol. 76: 545-546.
- SHANER D.L., ANDERSON P.C., 1985. Mechanism of action of the imidazolinones and cell culture selection of tolerant maize. In: Biotechnology in plant science. Relevance to agriculture in the eighties. (ZAITLIN M., DAY P., HOLLAENDER A., eds.) Academic Press Inc., London, p. 329-338.
- SHANER D.L., ROBSON P.A., 1985. Absorption, translocation, and mechanism of AC 252 214 in soybean (*Glycine max*), common cocklebur (*Xanthium strumarium*), and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). Weed Sci. 33: 469-471.
- SHINABARGER D.L., SCHMITT E.K., BRAYMER H.D., LARSON A., 1984. Phosphonate utilization by the glyphosate-degrading *Pseudomonas* sp. strain PG2982. Appl. Environ. Microbiol. 48: 1049-1050.
- SINGER S.R., Mc DANIEL C.N., 1985. Selection of glyphosate-tolerant tobacco calli and expression of this tolerance in regenerated plants. Plant Physiol. 78: 411-416.
- SMART C.C., JOHANNING D., MULLER G., AMRHEIN N., 1985. Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. J. Biol. Chem. 260: 16338-16346.
- SMITH C.M., PRATT D., THOMPSON G.A., 1986. Increased 5-enolpyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase activity in a glyphosate-tolerant variant strain of tomato cells. Plant Cell Rep. 5: 298-301.
- SPENCER T.M., GORDON-KAMM W.J., DAINES R.J., START W.G., LEMAUX P.G., 1990.

 Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. Theor. Appl. Genet. 79: 625-631.
- STALKER D.M., HIATT W.R., COMAI L., 1985. A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. J. Biol. Chem. 260: 4724-4728.

- STEINRUCKEN H.C., AMRHEIN N., 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthetase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 94: 1207-1212.
- STEINRUCKEN H.C., AMRHEIN N., 1984. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of Klebsiella pneumoniae. II. Inhibition by glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine]. Eur. J. Biochem. 143: 351-357.
- STEINRUCKEN H.C., SCHULZ A., AMRHEIN N., PORTER C.A., FRALEY R.T., 1986. Overproduction of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in a glyphosate-tolerant *Petunia hybrida* cell line. Archiv. Biochem. Biophys. 244: 169-178.
- STRAUCH E., WOHLLEBEN W., PUHLER A., 1988. Cloning of a phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. Gene 63: 65-74.
- STRYCKERS J., 1983. 10. Chicorée à café. 10.2 Le désherbage rationnel de la chicorée à café. Revue de l'agriculture 36 : 1025-1027.
- SWANSON E.B., COUMANS M.P., BROWN G.L., PATEL J.D., 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., HUTCHINSON J.M., 1982. Metabolism of chlorsulfuron by plants: biological basis for selectivity of a new herbicide for cereals. Pest. Biochem. Physiol. 17: 18-23.
- TACHIBANA K.; WATANABE T., SEKIZAWA Y., TAKEMATSU T., 1986a. Inhibition of glutamine synthetase and quantitative changes of free amino acids in shoots of bialaphos-treated japanese barnyard millet. J. Pest. Sci. 11: 27-31.
- TACHIBANA K., WATANABE T., SEKIZAWA Y., TAKEMATSU T., 1986b. Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. J. Pest. Sci. 11: 33-37.
- TALBOT H.W., JOHNSON L.M., MUNNECKE D.M., 1984. Glyphosate utilization by *Pseudomonas* sp. and *Alcaligenes* sp. isolated from environmental sources. Current Microbiol. 10: 255-260.
- THILL D.C., MALLORY C.A., SAARI L.L., COTTERMAN J.C., 1989. Sulfonylurea resistance Mechanism of resistance and cross resistance. Weed Sci. Soc. America 29: 132.
- THOMAS B.R., PRATT D., 1982. Isolation of paraquat-tolerant mutants from tomato cell cultures. TAG 63: 169-176.
- THOMPSON G.A., HIATT W.R., FACCIOTTI D., STALKER D.M., COMAI L., 1987a. Expression in plants of a bacterial gene coding for glyphosate resistance. Weed Sci. 35: 19-23.

- THOMPSON C.J., RAO MOVVA N., TIZARD R., CRAMERI R., DAVIES J.E., LAUWE-REYS M., BOTTERMAN J., 1987b. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from Streptomyces hygroscopicus. EMBO J. 6: 2519-2523.
- TINGEY S.V., WALKER E.L., CORUZZI G.M., 1987. Glutamine synthase genes of pea distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. EMBO J. 6: 1-9.
- TISCHER E., DASSARMA S., GOODMAN H.M., 1986. Nucleotide sequence of an alfalfa glutamine synthetase gene. Mol. Gen. Genet. 1986.
- TORSTENSSON L., 1985. Behaviour of glyphosate in soils and its degradation. In : The herbicide glyphosate. (GROSSBARD E., ATKINSON D., eds.) Butterworths, London, p. 137-150.
- TORSTENSSON N.T.L., AAMISEPP A., 1977. Detoxification of glyphosate in soil. Weed Research 17: 209-212.
- TROGISCH G.D., KOCHER H., ULLRICH W.R., 1989. Effects of glufosinate on anion uptake in Lemna gibba G 1. Z. Naturforsch. 44c: 33-38.
- VACHER C., 1983. Persistance et dégradation des herbicides. Agromaïs 23 : 35-41.
- VAN DEN BULK, R.W., LOFFLER H.J.M., LINDHOUT W.H., KOORNNEEF M., 1990. Somaclonal variation in tomato: effect of explant source and a comparison with chemical mutagenesis. Theor. Appl. Genet. 80: 817-825
- VAN HEE L., BOCKSTAELE L., 1983. 10. Chicorée à café. 10.1 La culture de la chicorée. Revue de l'agriculture 36 : 1015-1024.
- WACKETT L.P., SHAMES S.L., VENDITTI C.P., WALSH C., 1987. Bacterial carbon-phosphorus lyase: products, rates, and regulation of phosphonic and phosphinic acid metabolism. J. Bact. 169: 710-717.
- WANG W.C., MYERS J.R., COLLINS G.B., 1991. Selection of atrazine-resistant tobacco variants from photomixotrophic cultures. Plant Sci. 73: 199-209.
- WENDLER C., BARNISKE M., WILD A., 1990. Effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis and photorespiration of C_3 and C_4 plants. Photosynthesis Research 24 : 55-61.
- WERSUHN G., 1989. Obtaining mutants from cell cultures. Plant Breeding 102: 1-9.
- WILD A., MANDERSCHEID R., 1984. The effects of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants Z. Naturforsch. 39c : 500-504.
- WILD A., SAUER H., RUHLE W., 1987. The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis. I. Inhibition of photosynthesis and accumulation of ammonia. Z. Naturforsch. 42c : 263-269.

- WILD A., ZIEGLER C., 1989. The effect of bialaphos on ammonium-assimilation and photosynthesis. I. Effect on the enzymes of ammonium-assimilation. Z. Naturforsch. 44c 97-102.
- WINDER T., SPALDING M.H., 1988. Imazaquin and chlorsulfuron resistance and cross resistance in mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol. Gen. Genet. 213: 394-399.
- WINTERMANS J.F.G.M., DE MOTS A., 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. Biochim. Biophys. Acta 109: 448-453.
- WOHLLEBEN W., ARNOLD W., BROER I., HILLEMANN D., STRAUCH E., PUHLER A., 1988. Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. Gene 70: 25-37.
- YADAV N., Mc DEVITT R.E., BERNARD S., FALCO S.C., 1986. Single amino subsitutions in the enzyme acetolactate synthase confer resistance to the herbicide sulfometuron methyl. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4418-4422.
- YE J., HAUPTMANN R.M., SMITH A.G., WIDHOLM J.M., 1987. Selection of a *Nico-tiana plumbaginifolia* universal hybridizer and its use in intergeneric somatic hybrid formation. Mol. Gen. Genet. 208: 474-480.
- ZIEGLER C., WILD A., 1989. The effect of bialaphos on ammonium-assimilation and photosynthesis. II. Effect on photosynthesis and photorespiration. Z. Naturforsch. 44c: 103-108.

Les aptitudes de *Cichorium intybus* L. var. Magdebourg en culture *in vitro* ont été contrôlées. A partir de racines tubérisées matures ainsi que de feuilles cotylédonnaires issues de germinations, il est possible d'obtenir une callogénèse importante, d'installer des suspensions cellulaires et d'induire la formation de bourgeons.

En exploitant la variabilité induite par la culture *in vitro*, deux souches de cals résistantes au glyphosate et une souche résistante au glufosinate ont été isolées. Comparées aux souches sensibles, elles prolifèrent respectivement sur des doses 25 et 7,5 fois plus élevées.

Il a été montré que les souches résistantes au glyphosate ont une activité EPSP synthase plus élevée que les souches sensibles (4,4 et 4 fois) alors que l'enzyme est inhibée de la même manière par l'herbicide. Ceci laisserait supposer l'existence d'un mécanisme d'amplification génique.

A partir de ces souches, des plantes ont été obtenues mais après acclimatation en serre une seule souche s'est montrée viable. Du cal a été initié à partir de ces plantes. Les tests *in vitro* ont montré que la résistance est conservée partiellement (18 fois) et que l'activité enzymatique a légèrement diminué (3,3 fois).

Ces plantes sont totalement autoincompatibles, mais par croisement avec des plantes sensibles des graines ont été obtenues. Les traitements en serre effectués sur des jeunes plantules ont montré que toutes les plantes F1 sont sensibles au glyphosate. Les tests *in vitro* ont confirmé ces résultats. L'activité enzymatique des plantes F1 *in vivo* et *in vitro* est comparable à celles des plantes sensibles. 2 hypothèses sont envisageables, il s'agit soit d'un caractère récessif soit d'un variant épigénique.

Mots clefs: Cichorium intybus, Culture in vitro, Herbicide, Glyphosate, Glufosinate, Résistance, Sélection, EPSP synthase, Acides aminés.

It has been verified that the mature roots and cotyledons of *Cichorium intybus* var. Magdebourg cultured *in vitro* have engendered the formation of callus, cell suspensions and bud regeneration.

Two strains resistant to glyphosate and one resistant to glufosinate were isolated from non-mutagenized *in vitro* culture. Compared to sensitive strains, resistant strains proliferated respectively on concentrations which were 25 and 7,5-fold higher.

It has been established that strains resistant to glyphosate had EPSP synthase activity higher than sensitive strains (4,4 and 4-fold) in spite of the fact that enzymes are still sensitive to glyphosate inhibition. This could suppose a mechanism of gene amplification.

Plants were regenerated from the glyphosate resistant lines but after acclimatization, only one strain survived. Callus was initiated from the plants. Resistance was partially maintained and the EPSP synthase activity slightly decreased.

These plants were self-incompatible. The crossing with sensitive strains, resulted to obtainment of seeds. After spraying glyphosate on a sample of the F1 generation no plants survived. *In vitro* assays confirmed these results. The EPSP synthase activity of F1 plants were comparable in both *in vivo* and *in vitro* culture to sensitive plants. 2 hypothesis were considered: either there exist a recessive trait or an epigenic variation.

