

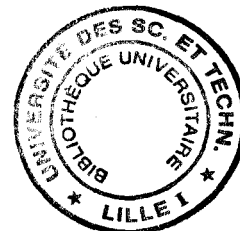
gen 2000 5775
N° d'ordre : 2061

50376
1997
221

THESE de DOCTORAT
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
présentée par

ERIC DEWAELE

pour obtenir le titre de
Docteur en SCIENCES DE LA VIE ET SANTE



***ACQUISITION DE LA RESISTANCE AUX SULFONYLUREES
CHEZ UNE SOUCHE DE CHICOREE (*Cichorium intybus* L. var.
Witloof) ET CONSEQUENCES SUR LE METABOLISME DES
ACIDES AMINES BRANCHES***

Soutenue le 4 juillet 1997 devant le jury composé de :

S. RAMBOUR
E. NIELSEN
M. JACOBS
H. VAN DIJK
M. HOQUET

Professeur à l'Université de Lille
Professeur à l'Université de Pavie
Professeur à l'Université de Bruxelles
Professeur à l'Université de Lille
Société Hoquet Graines

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Invité

La rédaction d'un mémoire de thèse est l'aboutissement, non seulement d'années de travail, mais aussi le fruit de la confiance que le directeur de recherche a investi dans ce jeune étudiant qui s'est présenté devant lui quelques années auparavant. Je tiens donc vivement à remercier Monsieur le Professeur Serge Rambour pour m'avoir accordé sa confiance et pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire naissant. Qu'il me soit également permis de le remercier pour le sujet très intéressant qu'il m'a proposé, ainsi que pour l'encadrement et le soutien qu'il m'a fournis.

Je suis très reconnaissant à Messieurs les Professeurs Jacobs et Nielsen d'avoir accepté de lire ce mémoire et de juger en qualité de rapporteur mon travail. Bien que le rôle d'un chercheur soit d'analyser avant, pendant et après ses expériences, la portée de son travail, il est toujours enrichissant de confronter son analyse à celles qu'en ont fait des scientifiques confirmés spécialistes des différents domaines étudiés. C'est en ce sens que j'apprécie leurs critiques constructives. Pour ces raisons, je remercie également Monsieur le Professeur Henk Van Dijk qui a accepté d'être examinateur de cette thèse.

Je remercie aussi le Professeur E. Nielsen de m'avoir accepté en stage dans son laboratoire de l'Université de Pavie. Tout d'abord, j'y ai trouvé un collègue, Giuseppe Forlani, qui m'a appris à mesurer l'activité ALS, à doser les acides aminés, et qui, au fil des expériences m'a permis de rompre l'isolement scientifique, propre aux personnes qui travaillent seules sur un sujet. Aujourd'hui, je ne considère plus Giuseppe comme un collègue mais comme un ami. Merci Giuseppe pour tout ce que tu m'as apporté tant sur le plan scientifique qu'humain. Continuons sur cette voie.

Dans ce registre je ne peux bien sûr pas oublier de mentionner Benoît Palms qui a initié le "cultivateur in vitro" que j'étais aux techniques de biologie moléculaire dont je ne connaissais que le nom.

Parfois pour les besoins ponctuels d'une expérience, nous rencontrons des personnes qui vous offrent leur collaboration. Parmi celles là, je tiens à remercier Pierre pour son aide lors du séquençage et Nour-Eddine qui m'a tout appris de la fluorescence.

On ne saurait les oublier, Nathalie, Malika, Delphine, Christophe, Robert, Jeff et les autres qui ne se sont pas contentés d'être de simples collègues. Merci à eux pour leur aide, leur humour, souvent caustique, qui créent l'ambiance d'un labo.

Par l'intermédiaire de son président, Monsieur Michel Hoquet, je tiens à remercier les entreprises Hoquet Graines pour nous avoir confié l'analyse de leur souche de chicorées résistantes, ainsi que pour le support financier qu'il nous a accordé. Que soit également remercié le Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais qui a co-financé ce travail. Outre l'aspect financier, un tel partenariat permet à la fois de rompre l'isolement du scientifique en lui permettant d'intégrer dans sa démarche les dimensions économique et stratégique associées au développement d'une recherche appliquée. J'espère que d'autres thésards pourront à leur tour bénéficier de cette expérience enrichissante.

Pour leur soutien moral et financier, pour leur patience et pour m'avoir permis d'être ce que suis aujourd'hui, je remercie de tout coeur mes grand-parents et parents.

Magali, même si la patience n'est pas la première de tes qualités, tu as eu le mérite de m'épauler jusqu'à la fin de cette thèse, de lire et relire un manuscrit dont le contenu a dû te paraître bien étrange. Tu as également supporté les horaires décalés et l'humeur d'un thésard en cours de rédaction. Je saurai m'en souvenir.

Je dédie cette thèse à mon Grand-Père, qui plus qu'un grand-père, as été pour moi un modèle.

ABBREVIATIONS

Liste des abréviations

2,4 D :	acide 2,4 dichloro-phénoxy-acétique
ADN :	acide désoxyribonucléique
AHAS :	acétohydroxy acide syntéthase
AIA :	acide indolyl 3 acétique
ALS :	acétolactate syntéthase
ARN :	acide ribonucléique
ARNaseA :	ribonucléase A
ARNm :	acide ribonucléique messenger
BCIP :	bromo-5-chloro-4-indolyl-phospate de toluidine
CaMV35S :	promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur
CLHP :	chromatographie liquide haute performance
DEPC :	di-éthyle pyro carbonate
ddNTP :	didéoxynucléotides tri-phosphate
dNTP :	déoxy nucléotides tri-phosphate
DO :	densité optique
DI ₅₀ :	dose inhibant 50% de l'activité
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA :	éthylène diamine tétraacétate de sodium
EGTA :	éthylène glycol-bis(b-aminoéthyl éther)N,N,N',N' tétraacétate
EMS :	acide 2-(N-morpholino) éthanesulfonique
EPSPS :	enol-pyruvyl-3-shikimate phosphate synthétase
ES :	erreur standard
FAD :	flavine adénine di-nucléotide
Fm :	fluorescence maximale
Fv :	fluorescence variable
GS :	glutamine synthétase
ha ⁻¹ :	pour un hectare
Ile :	isoleucine
IPTG :	isopropyl-b-D-galactoside
kb :	kilo paire de bases
kDa :	kilo dalton
ki :	constante d'inhibition
km :	constante d'affinité
LB :	Luria Bertani
Leu :	leucine
ma :	matière active
MOPS :	Morpholino optane sulfonic acid
MS :	matière sèche
Mf :	matière fraîche
NaAc :	acétate de sodium
NBT :	chlorure de paranitrotétrazolium bleu
nM :	nanomolaire
nm :	nanomètre

nts :	nucléotides
PBS :	phosphate buffer saline
PCR :	réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN
pKat :	10^{-12} katal
p/v :	poids pour volume
PVP :	polyvinylpyrrolidone
PVPP :	polyvinylpolypyrrolidone
RDI ₅₀ :	dose inhibant 50% de l'activité chez le tolérant
RFLP :	polymorphisme des fragments de restriction
RAPD :	amplification aléatoire de fragments d'ADN
SAB :	serum albumine bovine
SDI ₅₀ :	dose inhibant 50% de l'activité chez le sensible
SDS :	sodium dodecyl sulfate
SSC :	tri-sodium citrate
ssp :	sous-espèce
TAE :	tampon trisHCl, acide acétique, EDTA
TBE :	tampon trisHCl, acide borique, EDTA
TPP :	thiamine pyrrophosphate
UTP :	uridine tri-phosphate
UV :	ultra violet
v/v :	volume pour volume
Val :	valine
X Gal :	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Avant propos.....	2
Abréviations.....	3
Sommaire.....	5
Introduction.....	8

Analyse bibliographique

1. La chicorée de Bruxelles.....	10
2. Importance économique.....	12
3. Le désherbage actuel.....	13
4. L'obtention des plantes résistantes.....	14
5. Généralités sur les herbicides.....	14
6. Les inhibiteurs de l'ALS.....	16
7. L'acétolactate synthétase.....	17
7.1. La protéine.....	17
7.1.1. Structure.....	18
7.1.2. Fonction.....	19
7.1.3. Régulation.....	19
7.1.4. Action des herbicides sur l'activité ALS.....	19
7.2. Le gène.....	20
7.2.1. Structure.....	20
7.2.2. Conditions d'expression.....	21
8. Les plantes résistantes aux inhibiteurs de l'ALS.....	21
8.1. L'apparition de résistances spontanées.....	22
8.2. Les résistances sélectionnées.....	22
8.2.1. La résistance aux sulfonylurées.....	22
8.2.2. La résistance aux imidazolinones.....	23
8.2.3. Les autres inhibiteurs de l'ALS.....	23
8.3. Les mécanismes mis en jeu.....	24
8.4. Rétrocontrôle par les acides aminés chez ces mutants.....	27
9. Résistance et transgénèse.....	28

Matériels et méthodes

1. Matériels végétaux et conditions de culture.....	29
1.1. Matériels végétaux.....	29
1.2. Conditions de culture.....	29
1.2.1. Culture <i>in vitro</i>	29
1.2.2. Culture en serre.....	29
2. Techniques moléculaires.....	30
2.1. Extraction des acides nucléiques.....	30
2.1.1. Extraction de l'ADN génomique.....	30
2.1.2. Extraction des ARN totaux.....	31
2.2. Polymérisation en chaîne de l'ADN.....	31
2.3. Hybridations à l'aide de sondes ADN.....	32
2.3.1. Marquage de la sonde.....	32
2.3.2. Hybridation sur ADN.....	32
2.3.3. Hybridation sur ARN.....	32
2.4. Criblage et analyse de banque génomique.....	33
2.4.1. Criblage.....	33
2.4.1.1. Titration et étalements.....	33
2.4.1.2. Criblage.....	34

2.4.2. Transfert de l'insert dans un vecteur plasmidique.....	34
2.4.2.1. Préparation et analyse de l'ADN phagique.....	34
2.4.2.2. Sous-clonage dans un vecteur plasmidique.....	34
2.4.2.3. Préparation de l'ADN plasmidique.....	35
2.4.3. Séquençage.....	35
3. Hybridation <i>in situ</i>.....	36
3.1. Fixation du matériel.....	36
3.2. Synthèse de sonde ARN.....	36
3.3. Hybridation.....	37
3.4. Coloration nucléaire de Feulgen.....	37
4. Mesure de l'activité acétolactate synthétase.....	38
4.1. Extraction et dosage des protéines.....	38
4.2. Mesure de l'activité acétolactate synthétase.....	38
5. Western blot.....	39
5.1. Transfert des protéines sur membrane.....	39
5.2. Hybridation.....	39
6. Dosage des acides aminés.....	39
7. Extraction des protéines totales.....	39

Résultats

I. La chicorée et les sulfonylurées	41
1. Symptômes consécutifs à un apport de chlorsulfuron.....	41
2. Effet du chlorsulfuron sur la photosynthèse chez la chicorée.....	42
3. Conclusion.....	43
II. L'ALS de chicorée	45
1. Structure de la protéine.....	45
1.1. Spécificité de l'anticorps F14 vis-à-vis de l'ALS de chicorée.....	45
1.2. Structure de l'ALS.....	46
2. L'activité enzymatique.....	48
2.1. Quelques caractéristiques.....	48
2.2. Régulation allostérique.....	49
2.3. Les inhibiteurs de l'ALS.....	49
3. Obtention d'une sonde <i>als</i> homologue de la chicorée par PCR.....	49
3.1. Choix des amorces.....	50
3.2. Amplifications et clonages des fragments PCR.....	51
3.3. Le fragment 25'.....	53
4. Détermination du nombre de gène(s) <i>cials</i>	54
5. Détermination de la taille et du nombre d'ARN <i>cials</i>	54
6. Conclusion.....	54
III. Expression de <i>cials</i>	56
1. Expression de <i>cials</i> chez la chicorée.....	56
1.1. Les premiers stades végétatifs.....	56
1.2. La phase reproductrice	57
2. Localisation de l'expression de <i>cials</i> dans la racine.....	58
Planches A à D.....	61
IV. Analyse des individus R1OK	65
1. Description du mutant.....	65
2. Mécanisme de la résistance aux sulfonylurées.....	66
2.1. L'ALS.....	66
2.1.1. Comparaison des teneurs en ALS entre individus sensibles et résistants.....	67

2.1.2. Comparaison de la transcription chez les souches sensible et résistante.....	68
2.2. La sensibilité de l'ALS vis à vis des herbicides.....	68
2.3.L'affinité pour le substrat.....	70
3. Régulation allostérique.....	71
3.1. Le rétrocontrôle par les produits finaux.....	71
3.2. Les conséquences sur la synthèse des acides aminés.....	72
4. Apport exogène d'acides aminés branchés.....	72
4.1. La valine.....	73
4.2. La leucine.....	73
4.3. L'isoleucine.....	73
4.4. Les associations binaires et ternaires.....	74
4.5. La suppression des acides aminés.....	74
5 Conclusion.....	75
Planches E à I.....	76
V. Clonage du gène <i>cials</i>	81
1. Le criblage de la banque génomique.....	81
2. Analyse de l'insert.....	82
2.1. Sous-clonage.....	82
2.2. La séquence.....	83

Discussion

1. Mode d'action du chlorsulfuron sur la chicorée.....	84
2. Analyse de la résistance aux sulfonylurées	86
2.1..Surproduction de la cible.....	86
2.2..Sensibilité de l'ALS de la souche R1OK.....	87
2.3. Capacité de la chicorée à métaboliser les sulfonylurées.....	90
2.4. Intérêt agronomique.....	91
3. Régulation du métabolisme des acides aminés branchés.....	92
3.1. Expression de <i>cials</i>	92
3.2. Régulation allostérique.....	93
4. Clonage de <i>cials</i>	96

Perspectives	98
--------------------	----

Résumé.....	100
-------------	-----

Annexes	101
---------------	-----

Références bibliographiques	106
-----------------------------------	-----

INTRODUCTION

L'une des plus grandes interrogations à laquelle est confrontée l'humanité en ce début de 21^{ème} siècle, est : " Comment va-t-on pouvoir répondre aux besoins alimentaires d'une population mondiale sans cesse en croissance ? ". Celle-ci s'accroît de 200 000 personnes chaque jour (Cobb, 1992 d'après les sources de l'ONU) et doublera d'ici dix ans, or seuls 2,7% de la surface du globe sont cultivables. Le développement de productions marines et une gestion plus appropriée des politiques agricoles dans les pays en voie de développement, permettront, certes, une augmentation de la production alimentaire, mais c'est vers les 2,7% de terres arables que se focalisent la plupart des regards. Hier pour devenir autosuffisant, aujourd'hui pour exporter vers des régions du globe qui ne le sont pas, les scientifiques et les agronomes cherchent sans cesse à augmenter la productivité mais aussi à améliorer la qualité nutritive des cultures. Leurs efforts portent principalement sur les céréales (riz, maïs, blé, orge, sorgho...), les pommes de terre et le soja qui représentent à eux seuls la majeure partie de l'alimentation humaine et animale. La sélection de génotypes performants ainsi que la maîtrise des besoins nutritifs des plantes a permis une augmentation du potentiel de production. Pour que celui-ci s'exprime pleinement il est impératif de contrôler les populations des parasites des récoltes, qu'elles soient d'origine microbienne, animale ou même végétale. Afin de limiter les pertes qu'elles engendrent, l'emploi de pesticides s'est très largement développé.

Parallèlement, l'opinion publique est très sensibilisée aux dangers que peut représenter l'accumulation de molécules de synthèse au sein de la chaîne alimentaire dont, bien généralement, l'homme représente le dernier maillon. Aussi, les firmes agrochimiques sont soucieuses de développer des pesticides spécifiques, facilement biodégradables, et dont les cibles biochimiques sont parfaitement identifiées. En réponse à ce défi est apparue, dans les années 1980, une nouvelle génération d'herbicides très performants (glyphosate, sulfonilurées, imidazolinones), rapidement biodégradables et faiblement toxiques pour les animaux. Les nombreuses études menées afin d'identifier leur mode d'action ont montré qu'ils bloquaient les voies de biosynthèse de certains acides aminés.

Paradoxalement, ces découvertes se sont révélées être des outils intéressants pour l'étude du second problème posé par l'alimentation humaine qu'est l'insuffisance des apports en certains acides aminés essentiels par les principales cultures qui nourrissent l'humanité. En effet, l'homme, mais bien plus largement, tous les animaux monogastriques, ne possèdent pas l'équipement enzymatique nécessaire à la synthèse de dix des vingt acides aminés. Il est donc contraint de les trouver dans son alimentation.

D'un point de vue biochimique, les voies de biosynthèse des acides aminés sont relativement bien connues, mais les mécanismes de régulation qui les gouvernent sont loin d'être entièrement élucidés. Aussi, les mutants sont d'un grand intérêt car ils constituent des outils indispensables à la connaissance de la régulation de ces voies métaboliques (Ghislain *et al.*, 1995).

Si la chicorée de Bruxelles n'a pas pour ambition de répondre aux besoins alimentaires de la planète, loin s'en faut, les résultats des études réalisées sur

ses mutants sont d'autant plus intéressants qu'elle est éloignée des modèles expérimentaux généralement étudiés (céréales, colza, tabac...) puisqu'il s'agit d'une astéracée bisannuelle.

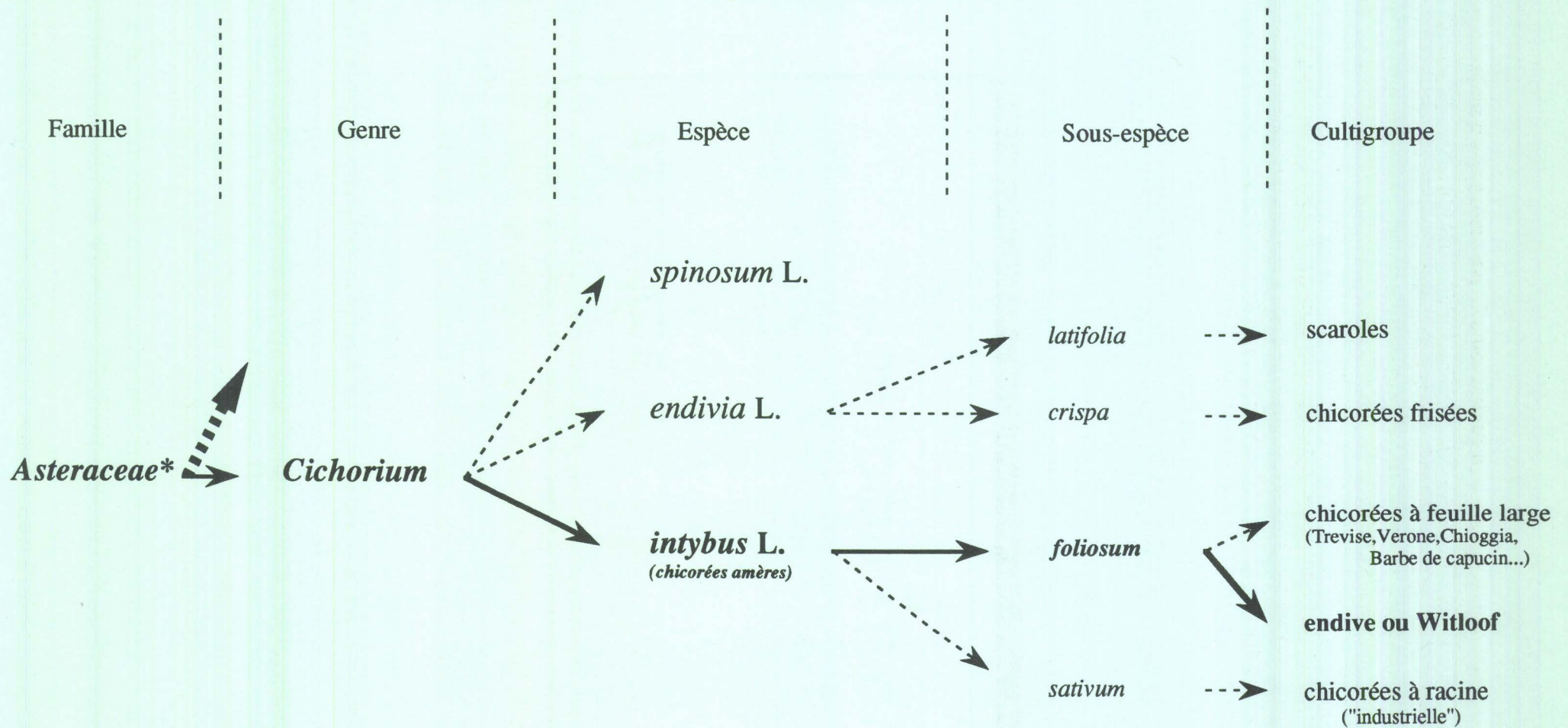
L'obtention de chicorées résistantes aux herbicides n'est pas le fruit du hasard. En effet, la chicorée est une plante dont les premiers stades de développement sont lents. La culture se trouve alors en compétition directe avec un nombre important d'adventices, qui, durant cette période, présentent un développement très actif. Les programmes actuels de désherbage chimique ne permettent pas un contrôle correct des mauvaises herbes, ce qui implique généralement une intervention manuelle pénible et honéreuse. Alors que l'automatisation de la culture et des chaînes de production de l'endive permet une concentration de la production au sein d'exploitations spécialisées, le recours à la main d'oeuvre salariée pour le désherbage s'avère être un frein à ce développement. Aussi, pour répondre à ce problème posé par une culture d'importance économique dans notre région, le laboratoire de physiologie végétale de l'université de Lille I et les entreprises Hoquet Graines (Raillencourt, 59 France) ont sélectionné la souche R1OK de chicorée (*Cichorium intybus* L. var Witloof) résistante à un herbicide existant, le chlorsulfuron (Millecamps, 1989).

La résistance aux herbicides chez les végétaux s'explique par l'existence de mécanismes particuliers : la surproduction d'une cible biochimique, une diminution de l'affinité de l'enzyme pour son inhibiteur ou la détoxification de l'herbicide en un composé inactif. L'objectif premier de notre travail était de déterminer la nature du mécanisme impliqué dans l'acquisition de la résistance chez cette souche de chicorée de façon à mieux en apprécier la portée et les conditions de son utilisation agronomique. L'acétolactate synthétase (ALS), cible biochimique du chlorsulfuron, a été le point central de notre étude. Après avoir montré que l'altération de la sensibilité de l'ALS envers les herbicides était à l'origine de la résistance, nous avons entrepris le clonage du gène codant pour cette enzyme chez la chicorée.

L'ALS initiant la voie de biosynthèse des acides aminés branchés, nous nous sommes demandé si l'acquisition de la résistance pouvait interférer sur la régulation de cette voie métabolique, et par là même sur le développement de la plante. En effet, les acides aminés sont connus pour être impliqués dans le contrôle des divisions cellulaires. Nous avons ainsi pu mettre en évidence un effet pléiotropique de l'altération de l'ALS. En effet, l'ALS s'est avérée être un point important de régulation de la biosynthèse de ces acides aminés, puisque les teneurs en valine et leucine sont corrélées à l'efficacité du rétrocontrôle exercé par ces deux molécules sur l'ALS.

ANALYSE

BIBLIOGRAPHIQUE



(* *Asteraceae* : Phanérogame, Angiosperme, Dicotylédone, Gamopétale)

figure 1 : la chicorée au sein du monde végétal

1. La chicorée de Bruxelles

C'est l'Antiquité qui nous fournit les premiers témoignages se rapportant à la culture de la chicorée. En 4000 avant JC, les Egyptiens la cultivaient déjà sur les bords du Nil. Via les civilisations grecque et romaine, elle se répand très rapidement autour du bassin méditerranéen et en Europe, pour finalement gagner l'Asie.

Les chicorées sont d'abord appréciées pour leurs vertus médicinales. En effet, elles sont reconnues pour avoir une excellente action sur le foie, en prévenant la formation des calculs hépatiques, mais aussi comme dépuratif de la rate et des reins. On leur attribue également des valeurs curatives du scorbut et de l'hystérie.

Par la suite, l'homme s'intéressera à sa racine, qui, torréfiée, servira de succédané au café, et à ses feuilles que l'on peut consommer en salade, fraîche ou cuite. Outre ses propriétés médicinales et alimentaires, la chicorée a également une vocation industrielle car sa racine est richement pourvue en fructanes de type inuline dans lesquels les fructoses ont des liaisons β 1-2.

C'est une plante rudérale que l'on rencontre encore assez facilement à l'état naturel, sur le bord des routes et dans les terrains vagues des pays méditerranéens. Le genre *Cichorium* regroupe une dizaine d'Astéracées, dont trois espèces sont principalement rencontrées en Europe :

C. spinosum L., *C. endivia* L., *C. intybus* L. (figure 1). L'espèce *C. endivia*, à laquelle appartiennent les scaroles et les chicorées frisées, est cultivée pour la production de salades de quatrième gamme.

Cichorium intybus est sans conteste l'espèce la plus diversifiée agronomiquement. Selon l'utilisation qui en est faite, on distingue deux sous espèces :

- ssp. *sativum*, regroupant les variétés dont la racine est destinée à l'industrie.

- ssp. *foliosum*, regroupant les variétés dont les feuilles sont consommées en salade.

Parmi la sous-espèce *foliosum*, on rencontre les chicorées à feuilles larges (trévise, vérone, chioggia...) et la chicorée de Bruxelles, également dénommée chicorée Witloof.

Vivace à l'état sauvage (Sechley *et al.*, 1991), elle se comporte sous nos latitudes comme une hémicryptophyte bisannuelle (figure 2). Après une germination épigée, le bourgeon dominant conduit à la mise en place d'une rosette de 20 à 25 feuilles. C'est à ce moment (mois d'août) que la racine principale s'épaissit pour prendre l'aspect d'un pivot de 20 à 25 centimètres de long et d'un diamètre de 4 à 5 centimètres. Pendant cette phase de tubérisation, la racine se charge en réserves glucidiques, principalement sous forme d'inuline qui représente jusqu'à 80% de la masse de matière sèche (Fiala et Jolivet, 1984), et en réserves azotées (environ 1% de la matière sèche). L'azote est principalement stocké sous forme organique (60% en

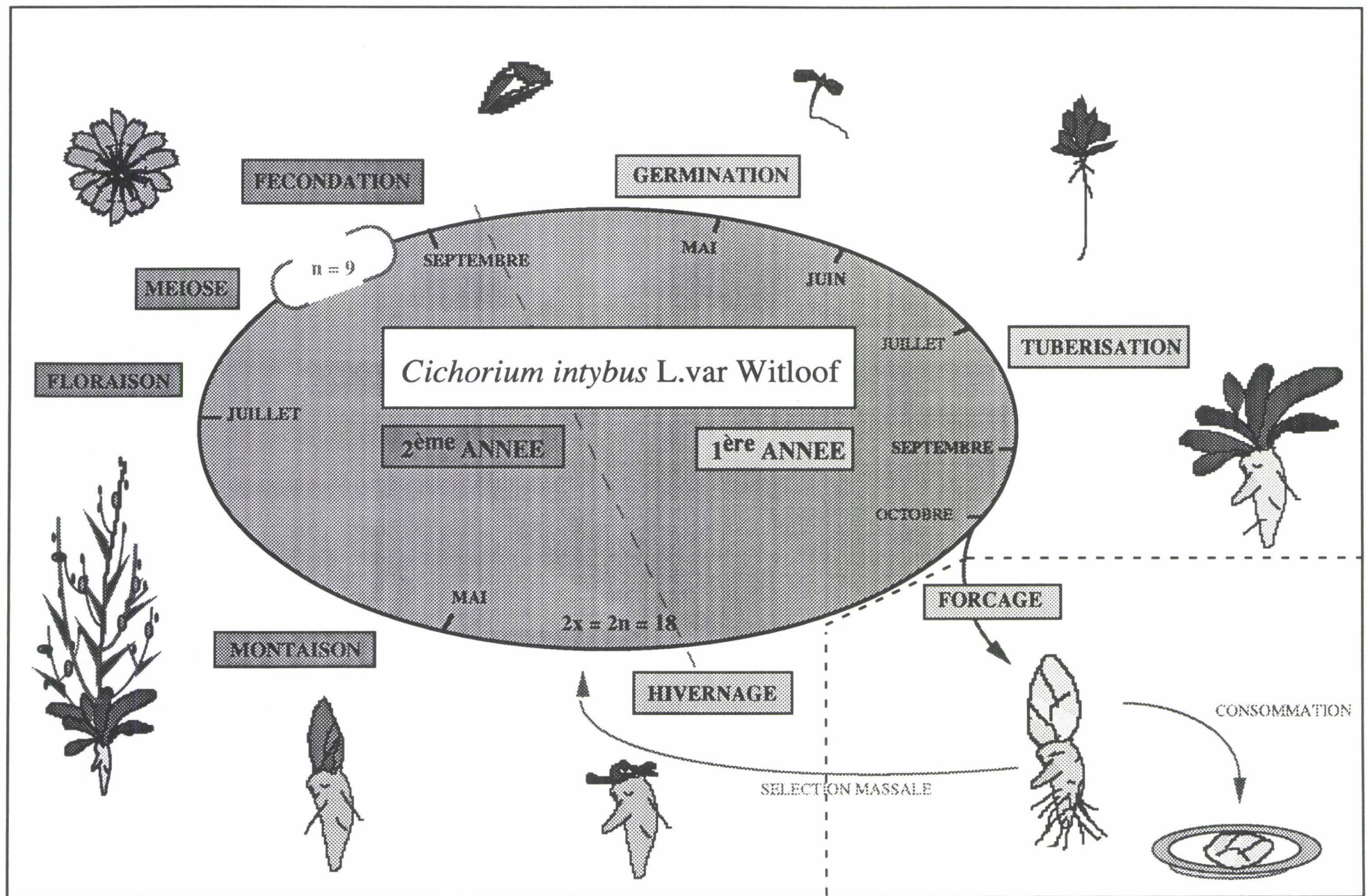


figure 2 : Les cycles biologique et agronomique de la chicorée

acides aminés libres et 40% en protéines). L'arginine (65%), la glutamine et l'asparagine représentent la majeure partie des réserves aminées (Limami et Laville, 1991).

Ces réserves sont remobilisées au printemps suivant, en vue de l'édification de l'appareil reproducteur (annexe 1). La floraison, induite par les jours longs (>16 heures) et les températures basses (<15°C), se prolonge durant les mois d'été. Chaque matin, quelques capitules s'ouvrent dès le lever du soleil pour se fermer en début d'après-midi. Cette période de la journée correspond au pic d'activité des abeilles et des bourdons (annexe 2), qui représentent la majeure partie des pollinisateurs des chicorées. Les graines tombent un mois après la fécondation.

La morphologie de sa fleur, son mode de fécondation entomophile, les systèmes d'autoincompatibilité et de compétition pollinique en font une plante préférentiellement allogame. Cependant, les analyses par les techniques RFLP et RAPD ont montré que les taux d'allogamie pouvaient varier de 60 à 95% chez les variétés cultivées (Bellamy, 1995 ; Dewaele, non publié). Comme chez la plupart des allogames, l'autofécondation s'accompagne d'une diminution de vigueur chez les homozygotes de l'ordre de 20%. C'est pour produire des variétés 100% hybrides que les sélectionneurs introduisent la stérilité mâle cytoplasmique dans leurs schémas de sélection.

La culture de la chicorée Witloof est annuelle. La racine tubérisée est récoltée à l'automne pour être forcée. Le forçage est une technique culturale qui consiste à placer la racine de chicorée dans des conditions artificielles (obscurité, température relativement élevée (16-18°C), humidité saturante) de façon à provoquer la croissance accélérée (20 jours) du bourgeon apical alors appelé endive et plus communément, "chicon", dans son bassin de production. Il est formé d'un axe court (figure 3) autour duquel s'insèrent des feuilles étiolées, dressées, imbriquées, au limbe réduit et à la nervure charnue (CTIFL, 1991). L'édification du chicon s'effectue aux dépens des réserves accumulées dans la racine (70% de l'inuline se retrouve dans le bourgeon néoformé). Très riche en eau (93%), le chicon est recommandé pour les régimes hypocaloriques. Il est, de plus, très pauvre en nitrates (10 fois moins qu'une laitue).



figure 3 : l'endive (a) et l'endive en coupe longitudinale (b)

2. Importance économique

La culture de la chicorée, pour la production du chicon, a débuté en Belgique au milieu du 19^{ème} siècle. Elle s'est naturellement répandue aux régions voisines, les Pays Bas et la France. Ces pays en sont les principaux producteurs (tableau 1). L'Espagne et la Suisse quant à elles n'assurent qu'une production très limitée.

En France, la production, longtemps associée à la région Nord-Pas-de-Calais, s'étend vers le sud à la Picardie et à l'ouest avec la Bretagne.

France*	206 000 t	stable
Pays Bas	72 000 t	légère hausse
Belgique	90 000 t	légère baisse
Espagne	5 000 t	stable
Suisse	2 000 t	stable

tableau 1 : La production mondiale d'endive et ses tendances évolutives (CTIFL, 1991). * dont 170 000 tonnes pour la région Nord-Pas-de-Calais

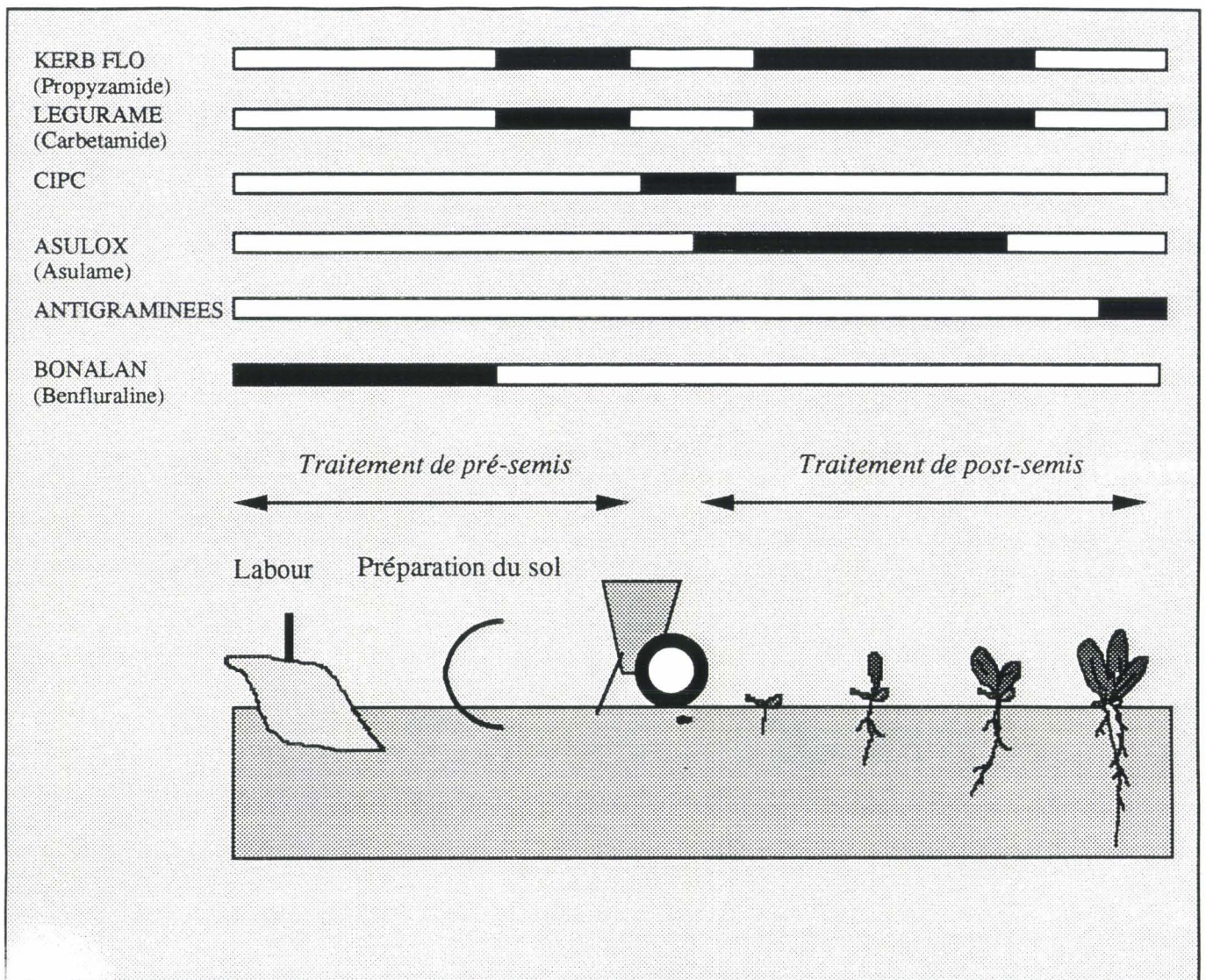


figure 4 : le désherbage actuel de la chicorée

(■ Période conseillée de traitement)

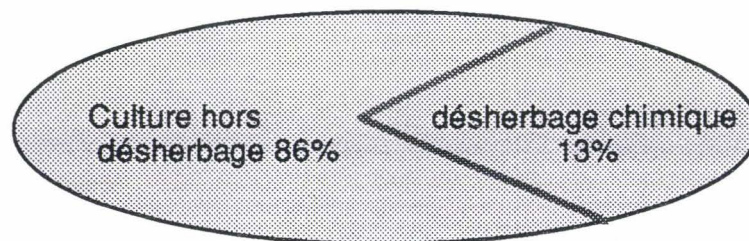


figure 5 : coût relatif du désherbage dans la culture de la chicorée exprimé en % du coût total de production des racines

(Ce coût ne comprend pas l'intervention manuelle qui peut représenter de 2 à 20% du coût total de production des racines)

Bien que les surfaces emblavées aient tendance à diminuer, les volumes produits ont augmenté depuis 1985. Ceci s'explique par le gain de productivité permis par l'amélioration variétale, mais aussi par le développement des techniques culturales permettant une production quasi annuelle (semis bâchés, conservation de -1 à +4°C des racines, techniques de forçage en hydroponique).

Cependant, les exportations croissantes n'ont pas permis d'enrayer la saturation du marché, qui n'était pas préparé à cette augmentation de production.

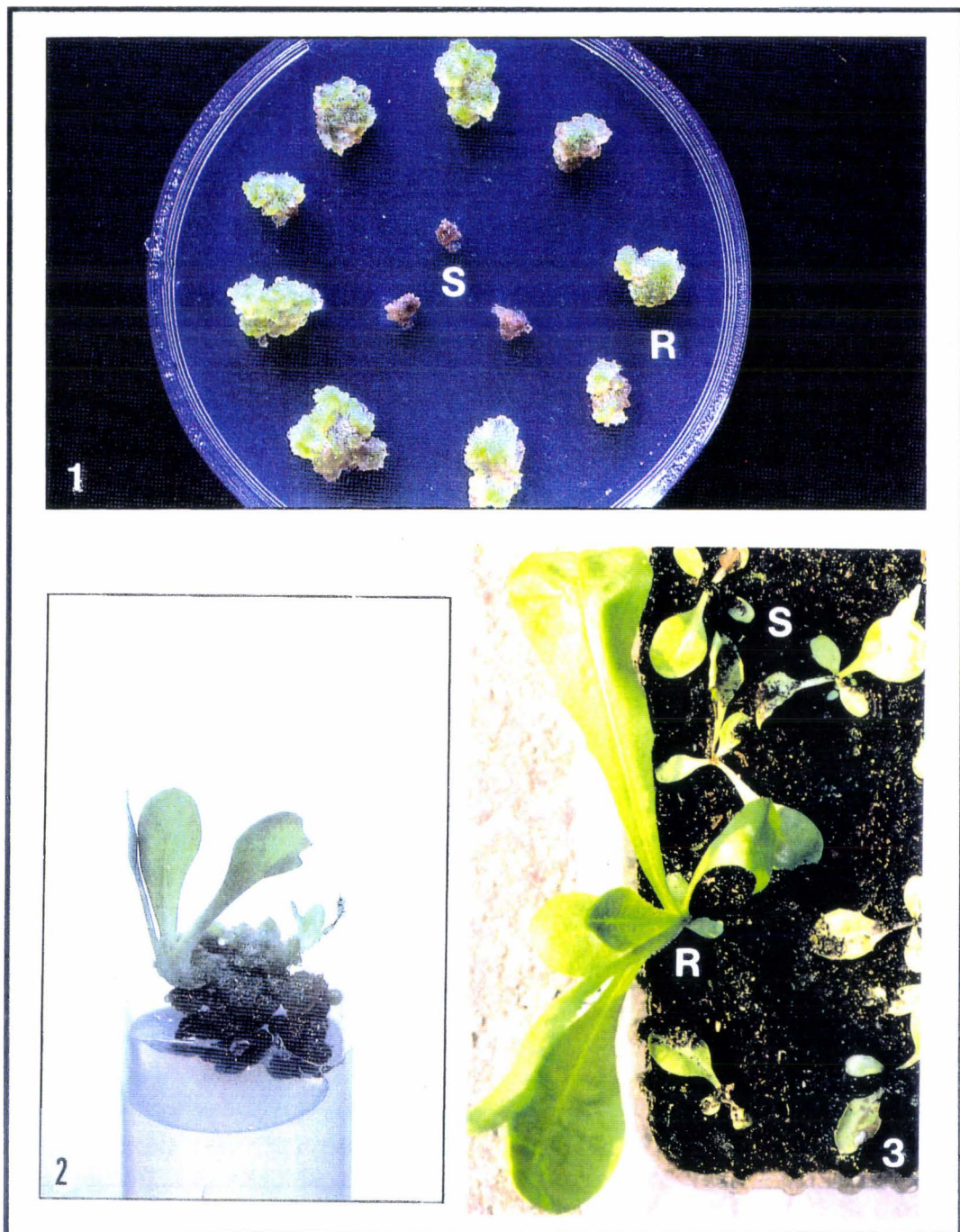
Les professionnels de l'endive cherchent à améliorer la qualité, à diversifier et mieux faire connaître leur gamme de produits (ex : endive rouge) et à limiter les coûts de production par l'optimisation des techniques culturales : l'objectif étant d'améliorer la qualité de la production.

3. Le désherbage actuel

La chicorée est une plante dont les premiers stades de développement sont lents. En effet, il ne lui faut pas moins de deux mois avant de couvrir le sol. La culture se trouve, alors, en compétition directe avec un nombre important d'adventices, qui, durant cette période (mai-juin), présentent un développement très actif. Cette compétition est si importante qu'elle peut engendrer des baisses de rendement de l'ordre de 50%.

Les programmes actuels de désherbage chimique (figure 4) permettent un contrôle correct des principales mauvaises herbes, à l'exception des galinsogas, senebières, laitrons et mercuriales. Des herbicides de post-levée, dits de "rattrapage", existent, mais leur emploi est délicat et peut affecter la culture en causant des retards de croissance. En l'absence d'un herbicide efficace et sélectif de la chicorée, il est fréquent de devoir procéder à l'élimination des adventices restants par un binage mécanique, complété d'un sarclage manuel (illustration de couverture), opérations qui engendrent un surcoût très important (figure 5).

Un nouvel herbicide (le premier depuis 1983) de la famille des sulfonilurées, le Safari[®], vient de recevoir l'homologation pour la culture de la chicorée. Par son large spectre d'action, il permet l'élimination des adventices difficilement contrôlables par le désherbage classique. Toutefois, le fabricant (Du Pont de Nemours) déconseille fortement son utilisation sur cultures bâchées ainsi qu'en association avec des huiles, insecticides et principaux herbicides utilisés sur chicorée, à l'exception du Légurame[®] dont la matière active est la carbétamide. Un nouveau semis de chicorée après une application de Safari[®] est également déconseillé. Des retards de croissance associés à une dépigmentation ont été constatés, sans toutefois engendrer d'incidence notable sur le rendement.



- ① Culture de cals résistants (R) et sensibles (S) en présence de 28 nM de chloresulfuron
- ② Régénération de bourgeon à partir de cals
- ③ Plantules résistantes (R) et sensibles (S) ayant reçu $2\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$ de chloresulfuron au stade une feuille

figure 6 : Obtention de chicorées résistantes (Millecamps, 1989)

4. L'obtention des plantes résistantes

Dans le cadre de leur collaboration, le laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Lille I et les entreprises Hoquet Graines (Raillencourt, 59400, France) ont sélectionné une souche de chicorée Witloof résistante à un herbicide, le chlorsulfuron, commercialisé par la firme Du Pont de Nemours pour le désherbage anti-dicotylédones des céréales. Cette molécule a été retenue car elle présente une cible biochimique connue (l'acétolactate synthase), un large spectre d'activité, un dossier écologique satisfaisant (faible toxicité vis à vis des animaux, persistance de la molécule active dans le sol inférieure à un mois, employé à raison de quelques grammes à l'hectare) et exprime ses potentialités lorsqu'elle est utilisée *in vitro*.

A partir de suspensions cellulaires non traitées aux agents mutagènes, Millecamps (1989) a isolé, par culture en présence de chlorsulfuron (28 nM), des cals résistants à cet herbicide. Ces derniers ont permis la régénération de chicorées fertiles (figure 6) capables de supporter des doses d'herbicide de 1500 à 2000 fois supérieures pour les individus homozygotes, et de 300 fois supérieures pour les individus hétérozygotes, à celles qui provoquent la mort des individus non sélectionnés.

Des résistances croisées sont observées vis à vis des sept sulfonyles testées (amidosulfuron, bensulfuron, rimsulfuron, metsulfuron, thifensulfuron, triasulfuron, tribenuron) et une imidazolinone (imazamethabenz) (Lavigne *et al.*, 1994).

Afin d'estimer les risques de dissémination du gène résistant vers les populations sauvages de chicorées, Lavigne *et al.* (1995) ont comparé la valeur sélective des lignées sensible et résistante en l'absence d'herbicide. Aucun coût, consécutif à l'acquisition de la résistance, n'est mesurable, tant sur le développement végétatif, que sur les potentialités reproductrices de la lignée résistante.

5. Généralités sur les herbicides

C'est avec Barate qui, en 1911, préconise l'emploi d'acide sulfurique comme désherbant des céréales, que débute l'ère du désherbage chimique (Scalla, 1991). La première génération de molécules utilisées était de nature inorganique. Apparus avant la seconde guerre mondiale, ce sont des herbicides de contact, persistants, non sélectifs, qui causent souvent des ruptures de membranes. Seuls quelques-uns sont encore utilisés comme débroussaillants (ex : chlorate de soude : le chlorate est réduit en chlorite toxique par la nitrate réductase). Les progrès de la chimie et les découvertes de la physiologie des végétaux (ex: découverte des hormones végétales) ont

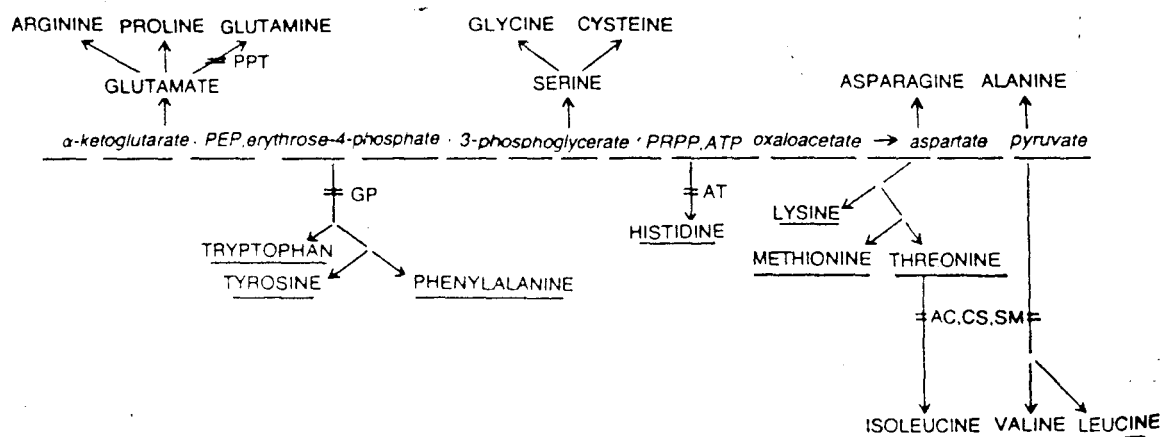


figure 7 : Les herbicides inhibiteurs des voies de biosynthèse des acides aminés
(GP : glyphosate; PPT : phosphinothricine; AC, CS et SM : sulfonilurées; AT : aminotriazole)

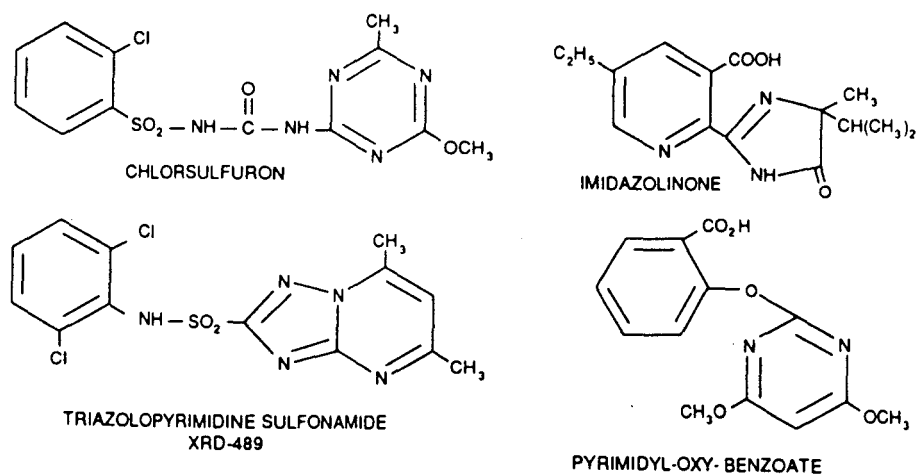


figure 8 : Structure des inhibiteurs des l'ALS

été les moteurs du développement des herbicides organiques, qui représentent la majorité des herbicides utilisés par l'agriculture moderne. Ils ont l'avantage d'être biodégradables et certains sont sélectifs des récoltes (Hatzios, 1994). Parmi la centaine d'herbicides commercialisée de nos jours, on distingue une grande diversité de structures chimiques, que l'on peut regrouper en une vingtaine de familles. Bien que les cibles biochimiques ne soient pas déterminées pour toutes ces molécules, il est cependant possible de les classer selon leurs modes d'action. Ils affectent des fonctions particulières du monde végétal. Certains agissent sur la photosynthèse alors que d'autres perturbent certains processus de la division cellulaire ou bloquent certaines voies de biosynthèse (Botterman et Leemans, 1988).

L'inhibition de la photosynthèse peut être due à un blocage du transfert des électrons au sein des photosystèmes (PSI et PSII). En effet, des herbicides de la famille des triazines, ou encore des urées substituées, empêchent la fixation des plastoquinones sur la protéine Q B du PSII, ayant pour conséquence la production de singulets d'oxygène qui induisent la peroxydation des membranes lipidiques, détruisant ainsi l'intégrité cellulaire. Le paraquat, entrant en compétition pour les électrons avec le premier accepteur du PSI, génère également des radicaux libres responsables de la désorganisation cellulaire.

Mais l'inhibition de la photosynthèse peut aussi être due à l'inhibition de la synthèse des pigments chlorophylliens par les oxadiazoles et des caroténoïdes, par l'aminotriazole ou l'amtrole. L'absence de caroténoïdes et la photo-oxydation des pigments chlorophylliens entraînent le photoblanchiment des végétaux sensibles, ce qui pénalise fortement la photosynthèse. Ces herbicides altèrent également les membranes.

Depuis la découverte de l'AIA en 1934, de nombreux analogues aux propriétés herbicides ont été développés. Ainsi, les acides phénoxyalcaloïques (2,4D) et carboxypyrimidiques (picloram) miment l'action des facteurs de croissance végétaux et se comportent comme des défoliants, alors que d'autres, comme les acides phtaliques, bloquent la synthèse de l'auxine.

Les acides phtaliques, comme les dinitroanilines, sont également capables d'inhiber, à des niveaux divers, la formation des microtubules et, par conséquent, la migration des chromosomes et la formation des phragmoplastes lors des divisions cellulaires.

Les voies métaboliques propres aux végétaux sont d'excellentes cibles pour les herbicides. Environ la moitié des vingt acides aminés (aromatiques : tryptophane, phénylalanine et tyrosine ; branchés : valine, leucine et isoleucine ; soufrés : méthionine et cystéine ; lysine et histidine) ne sont produits que par les plantes et les microorganismes, ce qui fait des enzymes catalysant leur synthèse des cibles privilégiées de par leur absence du règne animal (Schell et Casida, 1985; Schulz *et al.*, 1990).

Ces dernières années, trois enzymes impliquées dans ces voies métaboliques ont constitué des cibles pour de nouvelles familles d'herbicides (figure 7).

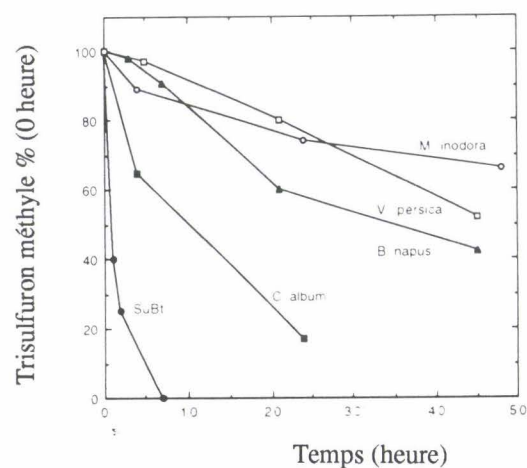
Le glyphosate, herbicide de post-levée non sélectif, est apparu en 1971 (Hoagland et Duke, 1982). Il inhibe la 5-énol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate

$ \begin{array}{c} R_1 \\ \\ R_2 - \text{C}_6\text{H}_3 - \text{C}_3\text{H}_2 - \text{SO}_2\text{NHCNH} - \text{C}_4\text{H}_2\text{N}_2 \\ \\ R_3 \end{array} $					Dose inhibant 50% de la croissance Betterave Colza	
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅		
COOCH ₃	H	CH ₃	N(CH ₃) ₂	OCH ₂ CF ₃	>500	10
COOC ₃ H ₇	H	CH ₃	N(CH ₃) ₂	OCH ₂ CF ₃	>500	3
COOCH ₃	CH ₃	H	N(CH ₃) ₂	OCH ₂ CF ₃	220	150
COOCH ₃	H	H	N(CH ₃) ₂	OCH ₂ CF ₃	1	1
COOCH ₃	H	Cl	N(CH ₃) ₂	OCH ₂ CF ₃	10	10
COOCH ₃	H	CH ₃	NHCH ₃	OCH ₂ CF ₃	180	28
COOCH ₃	H	CH ₃	NHCH ₃	OCH ₂ CH ₃	10	18
COOCH ₃	H	H	NHCH ₃	OCH ₂ CH ₃	2	860

figure 9 : Sélectivité des sulfonylurées (Wittenbach et al., 1994)

Plante	Dose inhibant 50% de l'activité ALS (nM)	Résistance
<i>Beta vulgaris</i>	33	+++
<i>Chenopodium album</i>	92	+
<i>Matricaria inodora</i>	37	-
<i>Brassica napus</i>	62	-
<i>Veronica persica</i>	26	-

(A)



(B)

figure 10 : Vitesse de métabolisation (B) et résistance (A) aux sulfonylurées chez *Beta vulgaris* (SuBt), *Chenopodium album* (C. album), *Matricaria inodora* (M. inodora), *Brassica napus* (B. napus) et *Veronica persica* (V. persica) (Wittenbach et al., 1994)

synthétase (Streinrucken et Amrhein, 1980), ce qui bloque la formation du chorismate et donc la synthèse des acides aminés aromatiques, des flavonoïdes, des tanins et des terpènes.

Le glufosinate est un sel d'ammonium de la phosphinothricine utilisé comme défoliant non sélectif. Chez les plantes traitées, il est responsable de l'accumulation d'ammonium et d'un déficit en glutamine, résultant de l'inhibition compétitive de la glutamine synthétase (Leason *et al.*, 1982).

La synthèse de l'histidine est bloquée par l'aminotriazole qui, outre son action sur la synthèse des carotènes, inhibe l'imidazole-glycérol-phosphate-déshydratase (Davies, 1971). Cette action est secondaire car l'apport d'histidine ne permet pas de protéger tous les végétaux contre l'aminotriazole.

L'acétolactate synthétase est sans conteste un cas d'école en ce qui concerne les herbicides inhibiteurs du métabolisme des acides aminés. Cette enzyme est en effet la cible de plusieurs familles d'herbicides (figure 8) de structures chimiques non apparentées (Mourad et King, 1992) : les sulfonylurées (Chaleff et Mauvais, 1984 ; Ray, 1984), les imidazolinones (Shaner *et al.*, 1984), les triazolopyrimidine sulfonanilides (Hawkes, 1989 ; Subramanian *et al.*, 1990), les pyrimidinyl-oxo-benzoate (Shimizu *et al.*, 1994).

6. Les inhibiteurs de l'ALS

Les sulfonylurées, apparues dans les années 1980, représentent une famille d'herbicides très puissants (5 à 20 grammes de matière active par hectare sont suffisants pour contrôler les adventices). Elles sont commercialisées par la firme Du Pont de Nemours pour le désherbage de post-levée des cultures. Ces herbicides sont dotés d'un large spectre d'action puisqu'ils permettent le contrôle des principales adventices dicotylédones et de certaines monocotylédones (Lefebvre, 1984; Lichtner *et al.*, 1995). La nature des radicaux greffés sur le squelette de base conditionne la sélectivité de l'herbicide (figure 9). Bon nombre de sulfonylurées (ex. : le chlorsulfuron) permettent le désherbage des céréales comme le blé, l'orge ou l'avoine (Sweester *et al.*, 1982), alors que seul le triflursulfuron est sélectif de la betterave. La tolérance des cultures réside dans l'aptitude à métaboliser rapidement la molécule herbicide en un composé non actif (Wittenbach *et al.*, 1994). Cette aptitude varie selon les espèces (figure 10) mais aussi selon les variétés au sein d'un même genre. En effet, certaines variétés de blé sont plus sensibles aux sulfonylurées que d'autres, leur système enzymatique impliqué dans la métabolisation étant moins efficace sur ces molécules (Dastgheib, 1994).

Absorbé par les feuilles et les racines, l'herbicide est véhiculé dans toute la plante et s'accumule préférentiellement dans les méristèmes des tiges et des racines. Le premier symptôme consécutif à l'application d'une sulfonylurée sur une plante sensible est l'arrêt de la croissance, qui se

manifeste très rapidement pour des doses voisines de 5 g de ma.ha⁻¹ *in situ* et de 5-30 nM *in vitro* (Ray, 1984 ; Forlani *et al.*, 1991). Ceci est dû à l'inhibition des divisions cellulaires (Ray, 1984) et de l'élongation cellulaire (Schell et Casida, 1985).

Une heure après avoir reçu 14 à 28 nM de chlorsulfuron, le soja présente des concentrations anormalement basses de valine et de leucine, légèrement diminuées d'isoleucine, alors que celles des autres acides aminés restent inchangées (Schell et Casida, 1985). Anderson et Hibberd (1985) observent également un arrêt de la croissance chez les cellules de maïs consécutivement à l'addition de 10 à 30 nM d'imidazolinone (AC 243 997) au milieu de culture. Une diminution significative de la synthèse protéique est alors décelable. L'analyse du contenu en acides aminés libres indique aussi que les teneurs en valine et leucine sont fortement réduites, alors que celles des autres acides aminés augmentent (Höfgen *et al.*, 1995). Des observations similaires ont été faites chez des cultures de cals de blé dont la croissance est inhibée par 50 nM d'imazapyr (Heering *et al.*, 1992). L'action de ces herbicides peut être atténuée, voire réversée, par l'apport *in vitro* de valine, leucine et isoleucine à raison de 0,1 à 1 mM (Ray, 1984; Anderson et Hibberd, 1985; Haughn et Sommerville, 1986). L'isoleucine qui, seule, n'a aucun effet chez le soja, permet la réversion des effets du chlorsulfuron chez les bactéries (La Rossa et Schloss, 1984). Le site d'action des sulfonilurées est donc l'une des quatre enzymes communes aux voies de biosynthèse des acides aminés branchés puisque l'addition des trois est nécessaire à la levée de l'inhibition imposée par l'herbicide. La Rossa et Schloss (1984) ont démontré que certains isozymes de l'ALS sont la cible de ces herbicides chez les bactéries. Ces résultats ont été confirmés par Falco et Dumas (1985) chez les levures et par Chaleff et Mauvais (1984) et Ray (1984) chez les plantes. Aucune autre enzyme ne semble affectée (Muhitch *et al.*, 1987). Bien que, l'accumulation d' α -cétobutyrate semblerait toxique chez les microorganismes (La Rossa *et al.*, 1987), Shaner et Singh (1993) ont démontré que l'accumulation de α -oxobutyrate ou/et d' α -aminobutyrate ne provoquerait pas de phytotoxicité mais que la carence en acides aminés en serait la cause première. Höfgen *et al.* (1995) n'observent pas d'accumulation de tels métabolites consécutivement à la perte de l'activité ALS, que ce soit par traitement au Scepter® ou chez les plantes exprimant une construction anti-sens de l'ALS.

7. L'acétolactate synthétase

7.1. La protéine

L'acétolactate synthétase (ALS), encore appelée acétohydroxyacide synthétase (AHAS, E.C.4.1.3.18), est présente chez les bactéries, les champignons et les plantes (Durner *et al.*, 1991). Son absence du règne animal confère aux inhibiteurs de l'ALS une faible toxicité vis-à-vis des animaux. La dose requise pour tuer 50% des individus d'une population de

rats et de lapins est respectivement de 5 et 2g.kg⁻¹ de poids vif en ingestion orale (Lefebvre, 1984).

7.1.1. Structure

Les bactéries possèdent de multiples isozymes de l'ALS. Ainsi, chez *E. coli*, on distingue trois isozymes (I, II et III). Deux sous-unités composent les ALS bactériennes. Une petite sous-unité, d'une taille variant de 9 kDa pour l'isozyme I d'*E. coli* à 19,2 kDa chez *Streptomyces avermitilis* (De Rossi *et al.*, 1995), est le siège de la fonction régulatrice. La grande sous-unité, d'une taille comprise entre 60 et 66 kDa, assure la fonction catalytique. Ces deux sous-unités, ainsi assemblées, peuvent s'associer en polymères (Eoyang et Silverman, 1984; Schloss *et al.*, 1985). La polymérisation semble requise pour l'activité enzymatique (Ibdha *et al.*, 1996).

Saccharomyces cerevisiae, présente une seule ALS (Ryan et Kohlhaw, 1974). La préprotéine présente la même organisation structurale et un degré d'homologie en acides aminés élevé avec la grande sous-unité bactérienne (Falco et Dumas, 1985). Toutefois, elle diffère de l'enzyme bactérienne par la présence d'un peptide signal de 90 acides aminés à son extrémité N terminale. Le clivage de ce peptide signal libère la forme mature de l'ALS dans la mitochondrie.

Chez les plantes, L'ALS est une protéine chloroplastique codée par un ou plusieurs gènes nucléaires (Miflin, 1974). La préprotéine contient un signal d'adressage chloroplastique (Mazur *et al.*, 1987, Lee *et al.*, 1988) dont le clivage libère la protéine active. Peu abondante et très labile, elle n'a jamais pu être purifiée à homogénéité sous sa forme native (Singh *et al.*, 1991; Hattori *et al.*, 1995). La comparaison des séquences de la protéine mature montre de fortes homologies avec l'ALS de levure et la grande sous-unité bactérienne (Mazur *et al.*, 1987). L'ALS végétale transférée chez les bactéries est fonctionnelle, bien qu'elle ne possède pas de petite sous-unité, mais elle perd alors sa sensibilité au rétrocontrôle par les produits finaux (valine, leucine et isoleucine) de la réaction. Toutefois, la présence d'un peptide signal est un obstacle à la complémentation de *Salmonella typhimurium* par les gènes végétaux (Wiersma *et al.*, 1990).

Les séquences des gènes isolés chez les différentes espèces permettent d'estimer la taille de la préprotéine à 670 acides aminés soit 72 kDa (Mazur *et al.*, 1987). Par western blot en conditions dénaturantes, Singh *et al.* (1991) ont estimé la taille du peptide mature à 65 kDa chez les monocotylédones (maïs, blé, orge, riz) et certaines dicotylédones (sorgho, haricot, soja, tabac et épinard). Cette valeur concorde avec les valeurs estimées à partir des séquences diminuées du peptide signal. Toutefois, les tailles d'ALS, déterminées en conditions non dénaturantes à partir d'extraits semi-purifiés, sont beaucoup plus grandes (Singh *et al.*, 1988; Muhitch *et al.*, 1987) et correspondraient à des polymères du peptide de base.

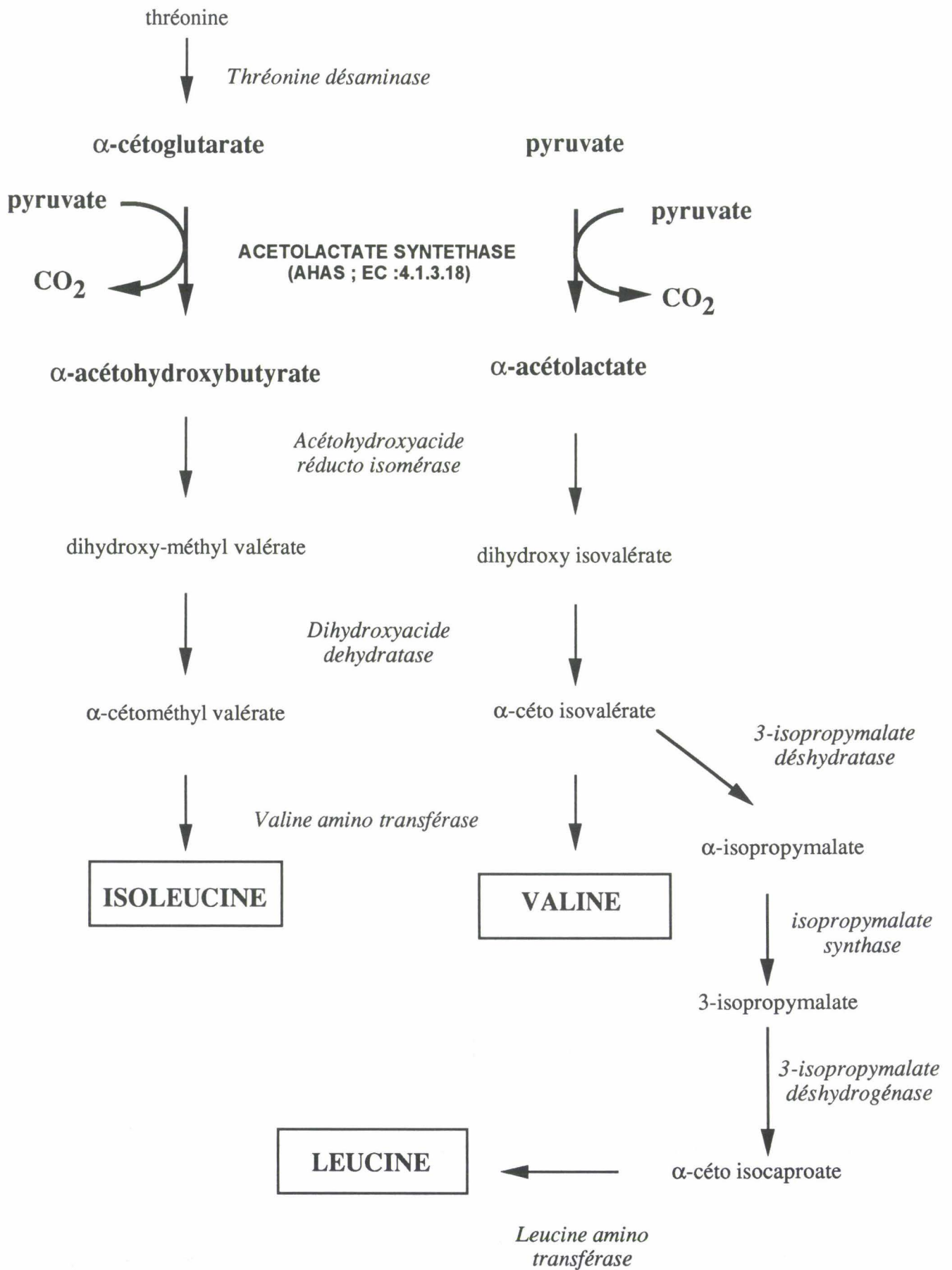


figure 11 : biosynthèse des acides aminés branchés

7.1.2. Fonction

L'ALS est la première enzyme des voies de biosynthèse des acides aminés branchés (Umbarger, 1987). Elle catalyse, selon les substrats (figure 11), soit la condensation de deux molécules de pyruvate pour former l' α -acétolactate, soit la condensation d'une molécule de pyruvate et d' α -céto-glutarate pour former l' α -acétohydroxybutyrate. La thiamine pyrophosphate et le magnésium activent l'enzyme alors que le co-facteur, la flavine adénine dinucléotides (FAD), stabilise la protéine sans participer à la réaction enzymatique (Muhitch *et al.*, 1987 ; Schloss *et al.*, 1988).

7.1.3. Régulation

L'activité enzymatique n'est pas uniquement due à la quantité d'ALS présente, mais aussi à son activation / désactivation en fonction des teneurs en acides aminés branchés. En effet l'ALS est une enzyme allostérique dont l'activité est modulée par les produits finaux, valine, leucine et, à un degré moindre, l'isoleucine (Mifflin, 1971; Relton *et al.*, 1986). Valine et leucine agissent de façon coopérative (Mifflin, 1974). La dose requise pour inhiber 50% de l'activité enzymatique est de l'ordre de la mM.

L'activité ALS varie selon les espèces et au sein d'une même plante, selon l'organe considéré. Elle est dix fois plus élevée dans les organes jeunes en division active que dans les tissus matures différenciés. Chez la jeune plantule de maïs, la synthèse de l'ALS a lieu lors des divisions actives puis cesse alors que l'élongation cellulaire débute et que la synthèse protéique est encore très active (Stidham, 1991).

Les six isozymes du maïs présentent des sensibilités différentes au rétrocontrôle par les acides aminés branchés (Umbarger, 1987).

7.1.4. Action des herbicides sur l'activité ALS

Les sulfonylurées, les imidazolinones et les triazolopyrimidines se fixent en une même région de l'ALS (Schloss *et al.*, 1988).

Les sulfonylurées n'empêchent pas la fixation et la décarboxylation du premier pyruvate mais entrent en compétition avec la deuxième molécule de pyruvate se traduisant par une très forte inhibition de l'activité enzymatique ($4 < DI_{50}$ Sulfométuron méthyle < 160 nM) (Stidham et Singh, 1991). Au cours du temps, la liaison enzyme-inhibiteur se renforce et devient très stable.

Les imidazolinones sont des inhibiteurs non compétitifs de l'ALS, ils viennent se fixer sur le complexe enzyme-substrat-TPP. Avec le temps (plus de 4 heures), cette inhibition s'accroît pour devenir irréversible (Muhitch *et al.*, 1987). La force de l'inhibition varie selon la nature de la molécule inhibitrice (Stidham et Singh, 1991).

7.2. Le gène

Le fait que l'ALS soit impliquée dans la résistance à plusieurs familles d'herbicides a suscité un vif intérêt pour l'étude du gène chez plusieurs espèces.

7.2.1. Structure

Les isozymes I, II et III d'*E. coli* sont codés par trois opérons (*ilvBN*, *ilvGM* et *ilvIH*) renfermant chacun deux gènes. L'un code pour la petite sous-unité alors que l'autre code pour la grande sous-unité (Falco *et al.*, 1985). Chez *Streptomyces avermitilis* (De Rossi *et al.*, 1995) le gène *B* de l'opéron *ilv BNC* code pour une grande sous-unité de 617 acides aminés, alors que le gène *N* code pour la petite sous-unité de 176 acides aminés.

Un seul gène, *ivl2*, code pour une préprotéine ALS de 687 acides aminés chez *Saccharomyces cerevisiae* (Falco et Dumas, 1985).

En utilisant les gènes codant pour les ALS de levure, Mazur *et al.* (1987) isolent les gènes codant pour les ALS de tabac et d'*Arabidopsis thaliana*. Ces gènes présentent une homologie de séquences nucléotidiques de 73% qui se traduit par une homologie de 85% en acides aminés.

Un gène unique de 2013 nucléotides, situé au locus *csr* sur le chromosome 3 d'*Arabidopsis thaliana*, code pour l'ALS (Haughn et Sommerville, 1986 ; Haughn *et al.*, 1988).

Chez le tabac, deux loci codent pour l'ALS. Ceci s'explique par la nature amphidiploïde de *Nicotiana tabacum* qui résulte du croisement de *N. sylvestris* et de *N. tomentosiformis*. Le locus *SurA* est originaire de *N. sylvestris*, alors que *SurB* est issu de *N. tomentosiformis* (Lee *et al.*, 1988). Leurs séquences (2004 nucléotides) diffèrent de 0,7%.

L'allotétraploïde *Brassica napus* (*B. campestris* + *B. oleracea*) possède une famille de cinq gènes nucléaires codant pour les différents isozymes de l'ALS (Wiersma *et al.*, 1989). Les gènes *AHASI*, issus de *B. oleracea*, et *AHASII*, issus de *B. campestris*, présentent des similitudes de séquences nucléotidiques de 97% dans les régions codantes et adjacentes. Ils proviendraient d'un gène ancestral commun. Le gène *AHASII* présente une homologie de 80% par rapport à *AHASI* et *AHASIII*, limitée à la région codante. *AHASIV* et *V* sont des gènes tronqués, non exprimés (Rutledge *et al.*, 1991 ; Hattori *et al.*, 1992a). L'homologie des différents gènes de colza par rapport aux gènes de tabac et d'*Arabidopsis* varie entre 23 et 85%.

Il apparaît donc qu'il n'existe qu'un seul gène par génome haploïde (Ouellet *et al.*, 1994), et que la présence de plusieurs gènes ne soit que le reflet de l'évolution de l'espèce (Keller *et al.*, 1993). Aucun intron n'a été trouvé dans les gènes codant pour l'ALS chez les eucaryotes.

Les séquences nucléotidiques codant pour les peptides signaux des gènes analysés jusqu'à présent sont relativement peu conservées (50% environ). Il semblerait que la polarité des acides aminés soit plus importante que la structure primaire. Des analyses hydropatiques montrent des domaines

hydrophiles et hydrophobes communs aux différents peptides signaux bien que leurs séquences diffèrent.

7.2.2. Conditions d'expression

Lorsque plusieurs gènes sont présents, tous ne sont pas exprimés simultanément. Chez le colza, *AHASI* et *III* sont faiblement exprimés (0,001 à 0,01% des ARN totaux) et semblent constitutifs, alors que l'expression d'*AHASII* est limitée à l'ovule et aux graines (Hattori *et al.*, 1992a; Ouellet *et al.*, 1992).

Chez le tabac, les deux gènes (*SurA* et *SurB*) sont exprimés dans les mêmes organes et sont régulés de la même façon (Keller *et al.*, 1993). La transcription est plus importante au sein des organes en croissance active comme les jeunes organes (plantules, apex racinaires et bourgeons) et l'appareil reproducteur (anthère, pistil et pétale) (Singh et Matthews, 1994) mais reste néanmoins faible (Samach *et al.*, 1991). Elle diminue lorsque les cellules vieillissent.

Des régulations analogues ont été mises en évidence par Höfgen *et al.* (1995) chez la pomme de terre et par Schmidt et Singh (1990) chez le haricot.

La stimulation de la transcription du gène *als*, placé sous le contrôle du promoteur CaMV35S chez les tabacs transgéniques, ne s'accompagne pas d'une augmentation proportionnelle de l'activité enzymatique, ce qui implique un contrôle post-transcriptionnel des taux d'ALS (Odell *et al.*, 1990 ; Ouellet *et al.*, 1994). Tourneur *et al.* (1993) ont cependant montré que l'utilisation du promoteur fort p70 (CaMV35S associé à deux enhancers) permet de produire davantage d'ARN messagers ALS, mais aussi d'augmenter jusqu'à dix fois l'activité ALS sans toutefois modifier la synthèse des acides aminés branchés. La séquence de tête située en amont du gène ALS est de 18 nucléotides plus courte dans la construction de Odell que celle utilisée par Tourneur. Ceci peut modifier le devenir de l'ARN messenger produit, et, par conséquent, l'activité ALS mesurée (Tourneur *et al.*, 1993).

8. Les plantes résistantes aux inhibiteurs de l'ALS

Alors que certaines plantes sont naturellement tolérantes aux herbicides, d'autres n'ont acquis ce caractère qu'après modification de leur patrimoine génétique. Le déterminisme génétique de ce nouveau caractère est généralement de nature monogénique dominant ou semidominant. L'Homme, par des traitements herbicides, volontairement ou non, les a sélectionnées.

8.1. L'apparition de résistances spontanées

L'emploi répété de matières actives rémanentes, à cible unique et sans rotation, a conduit à la sélection de plantes résistantes parmi les populations d'adventices soumises à ces traitements. Ainsi, plus de 100 plantes tolérantes, concernant une quinzaine de familles d'herbicides, sont actuellement dénombrées (Hatzios, 1994). Bien que les résistantes aux triazines représentent plus de 50% des cas recensés, aucun type d'inhibiteur, à l'exception du glyphosate, n'est épargné.

Ainsi, dès la fin des années 80, quelques adventices échappent aux sulfonylurées qui, jusque là permettaient leur contrôle. Hall et Devine (1990) décrivent l'apparition d'une stellaire (*Stellaria media*) résistante au chlorsulfuron dans un champ traité 4 années de suite à l'aide de cet herbicide. Ce biotype présente une forte résistance croisée avec les triazolopyrimidines, mais très faible envers les imidazolinones. La liste s'étend très vite aux *Lactuca serriola* (Mallory-Smith *et al.*, 1990 a et b), *Kiochia scoparia* (Saari *et al.*, 1990 ; Primiani *et al.*, 1990), *Salsola iberica* (Thill *et al.*, 1989), *Lolium rigidum* (Christopher *et al.*, 1992), *Xanthium strumarium* (Schmitzer *et al.*, 1993 ; Bernasconi *et al.*, 1995). En Australie, un biotype de *Sonchus oleraceus* et deux biotypes de *Sisymbrium orientale* présentent des résistances aux sulfonylurées, imidazolinones et triazolopyrimidines (Boutsalis et Powels, 1995).

8.2. Les résistances sélectionnées

8.2.1. La résistance aux sulfonylurées

La substitution de radicaux au sein des sulfonylurées a permis d'étendre l'utilisation de cette famille au désherbage de dicotylédones telles que la betterave, colza (Lichtner *et al.*, 1995) et le soja (Shaner et Robson, 1985). Cependant, de nombreuses cultures souffrent de la toxicité due aux résidus de sulfonylurées utilisées pour désherber les cultures précédentes (Jordan et Mac Hughen, 1987 ; Sebastian *et al.*, 1989 ; Tonnemaker *et al.*, 1992 ; Baillie *et al.*, 1993 ; Dastgheib *et al.*, 1994). La solution à ce problème réside dans la sélection de variants résistants.

Chaleff et Ray (1984) isolent, à partir de suspensions cellulaires mutagénéisées de tabac, plusieurs mutants résistants au chlorsulfuron. La ségrégation des mutations s'effectue de façon monogénique semi-dominante dans deux groupes de liaison C3 et S4. A partir de la lignée S4, Chaleff et Bascomb (1987) isolent un double mutant Hra 1000 fois plus résistant que le type sauvage. D'autres mutants de tabac résistants au chlorsulfuron (Caretto *et al.*, 1993) et au primisulfuron (Harms et DiMaio, 1991) ont été obtenus.

La sélection cellulaire a également conduit chez le lin (Jordan et Mac Hughen, 1987), le *Datura innoxia* (Saxena et King, 1988), la chicorée

(Millecamps, 1989), le lotier corniculé (Popelis *et al.*, 1992), l'orge (Baillie *et al.*, 1993), la betterave (Hart *et al.*, 1993) et le colza (Hattori *et al.*, 1995) à l'apparition de clones résistants au chlorsulfuron. Cette sélection appliquée à des protoplastes de colza a permis l'obtention de résistances multiples au chlorsulfuron (Swanson *et al.*, 1988 ; Magha *et al.*, 1993), au metsulfuron méthyle, au triasulfuron et à l'imazaméthabenz, mais seule la résistance envers l'imidazolinone permet un désherbage chimique (Magha *et al.*, 1993).

A partir de graines d'*Arabidopsis thaliana* mutagénisées par l'EMS, Haughn et Sommerville (1986) ont isolé une souche (GH50) résistant plus de 300 fois au chlorsulfuron et 100 fois au sulfométuron méthyle. Une démarche analogue, entreprise par Sebastian *et al.* (1989), a permis l'obtention de soja dont l'altération de l'ALS conférait une résistance d'intérêt agronomique (100 fois supérieure à celle du témoin vis-à-vis du chlorsulfuron).

8.2.2. La résistance aux imidazolinones

Quatre lignées de maïs ont été isolées par pression de sélection *in vitro* par Anderson et Georgeson (1989). La résistance est de nature monogénique, nucléaire et semidominante. Une seule d'entre elles, XA17, présente une résistance aux sulfonylurées (100 fois pour l'homozygote). Les *Datura* résistants aux imidazolinones, isolés à partir de suspensions cellulaires, ne présentent pas de résistances croisées avec d'autres imidazolinones, ou avec les sulfonylurées (Saxena et King, 1990).

Reprenant le schéma de sélection qu'ils avaient utilisé pour isoler chez *Arabidopsis thaliana* une résistance au chlorsulfuron, Haughn et Sommerville (1990) utilisent cette fois l'imazapyr comme agent de sélection. Ils obtiennent ainsi une souche (GH90) 200 fois plus résistante à cet herbicide que ne l'est le type sauvage.

8.2.3. Les autres inhibiteurs de l'ALS

Subramanian *et al.* (1990) isolent un mutant de tabac et deux mutants de coton résistants aux triazolopyrimidines à partir de cultures tissulaires. Les profils de résistance diffèrent selon les mutants :

Herbicides :	triazolopyrimidines	sulfonylurées	imidazolinones
<i>(Le chiffre correspond au facteur d'augmentation de la résistance)</i>			
tabac (KS43) :	180	520	118
coton (PS-3) :	2,9	13 à 1500	1,2
(DO-2) :	4456	90 à 715	2000

tableau 2 : Profils de résistance des mutants isolés par Subramanian et al. (1990)

La mutagenèse de graines d'*Arabidopsis* a permis l'obtention, en présence de triazolopyrimidine, d'un mutant résistant aux sulfonylurées et aux triazolopyrimidines (Mourad et King, 1992) comparable à celui décrit par Haughn et Sommerville (1986).

8.3. Les mécanismes mis en jeu

L'étude des plantes résistantes aux différents herbicides permet de distinguer trois mécanismes différents :

1/ Le développement d'un système enzymatique capable de convertir une molécule herbicide en un composé inactif avant qu'il n'atteigne sa cible. Cette transformation comprend dans un premier temps, une hydroxylation des chaînes aliphatiques ou des noyaux aromatiques, suivie d'une conjugaison avec un sucre, un glutathion ou certains acides aminés comme le glutamate ou l'acide aspartique (Schulz *et al.*, 1990; Hatzios, 1994). Les changements structuraux modifient fortement la constante de dissociation et le coefficient de partage de la molécule herbicide. La mobilité de cette dernière s'en trouve fortement affectée et le nouveau composé est immobilisé dans certains compartiments cellulaires comme la paroi ou la vacuole (Cobb, 1992). Chez le maïs, la glutathion-S-transférase est capable d'inactiver l'atrazine (Marrs, 1996).

2/ La surproduction de la cible biochimique de l'herbicide (exemple : la surproduction de l'EPSPS confère au *Petunia hybrida* une tolérance au glyphosate (Smart *et al.*, 1985), de même la surproduction de la GS procure à la luzerne une tolérance à la phosphinothricine (Donn *et al.*, 1984).

3/ Une diminution de l'affinité de l'herbicide vis-à-vis de sa cible biochimique, causée par une mutation du gène codant pour cette dernière. Une mutation du gène chloroplastique *psbA*, entraînant une altération de la

protéine QB au niveau des acides aminés (Val219, Ala251, Phe255, Ser264 et Leu275), confère une résistance à l'atrazine (Schulz *et al.*, 1990).

Les résistances aux inhibiteurs de l'ALS dépendent principalement de deux mécanismes :

✧ La métabolisation de la molécule herbicide se rencontre chez les espèces naturellement tolérantes à un ou plusieurs herbicides (Sweester *et al.*, 1982 ; Hutchinson *et al.*, 1984). La tolérance est d'autant plus forte que la demi-vie de l'herbicide dans la plante est courte (Shaner et Robson, 1985). Alors qu'il est tolérant au metsulfuron méthyle, le blé est sensible au sulfométuron méthyle de structure pourtant très proche. Ceci est dû au fait qu'il est capable de l'hydroxyler et de le conjuguer à un radical glucose plus rapidement (Anderson et Swai, 1992). Il en est de même pour *Echinochloa crus galli* L. (Neighbors et Privalle, 1990), *Solanum nigrum*, *Linum usitatissimum* (Hutchinson *et al.*, 1984) ainsi que pour le *Lolium rigidum* (Cotterman et Saari, 1992) qui métabolise le chlorsulfuron en un composé 36 fois moins actif alors que l'ALS est toujours aussi sensible. Le colza est capable de métaboliser très rapidement l'éthametsulfuron méthyle (sa demi-vie est de 1 à 3 heures) en deux composés plus polaires inactifs sur l'ALS (Lichtner *et al.*, 1995). Ce métabolisme, moins important dans les cotylédons et les racines que dans les feuilles, rend les colzas sensibles à l'herbicide avant le stade deux feuilles. La betterave qui est généralement utilisée comme indicateur de rémanence des sulfonilurées est capable, par l'intermédiaire de sa glutathionne-S-transférase, de métaboliser le trisulfuron méthyle (Wittenbach *et al.*, 1994).

La sélectivité des imidazolinones s'explique elle aussi par l'aptitude qu'ont certaines plantes à métaboliser ces molécules. Tecle *et al.* (1993) montrent que le soja est capable de transformer rapidement l'imazaquin et l'imazethapyr en composés inactifs. La métabolisation de l'imazaquin consiste en une cyclisation de l'azote du groupe imidazonyle et du groupe carboxyle, suivie d'une dégradation rapide en plusieurs composés. L'imazethapyr quant à lui est hydroxylé sur le 5-éthyle du cycle pyrimidique, puis conjugué à un radical glucose.

✧ Les plantes résistantes, sélectionnées après un contact prolongé avec les molécules herbicides, sont corrélées à l'altération de l'ALS dont la conséquence est une diminution de la sensibilité vis à vis de la molécule inhibitrice (Sivakumaran *et al.*, 1993). Ainsi l'ALS des *Xanthium strumarium* résistants au Scepter (imidazolinone) est 300 fois moins sensible à cet herbicide (Schmitzer *et al.*, 1993). L'analyse de deux biotypes Missouri et Mississippi de *Xanthium* indique que l'ALS de Mississippi présente la même altération (Alanine 57-> Thréonine) que celle d'une lignée de maïs (ICI 8532 IT) sélectionnée par Sandoz pour sa résistance aux imidazolinones. L'altération qui touche l'écotype Missouri (Tryptophane 522-> Leucine) est analogue elle aussi à celle d'une lignée de maïs (Pioneer 3180 IR) et lui confère une résistance croisée aux quatre inhibiteurs de l'ALS (Bernasconi *et al.*, 1995). Guttieri *et al.* (1992) montrent que l'altération de l'ALS chez *Lactuca serriola* et *Kiochia scoparia* est due à la substitution de la proline 173

par une histidine (*Lactuca*) ou par une thréonine (*Kiochia*) au sein d'un domaine très conservé de l'ALS. Cette mutation est également à l'origine des résistances observées chez *Arabidopsis* de la lignée GH50. La substitution d'une proline en sérine (Haughn *et al.*, 1988) rend l'ALS 1000 fois moins sensible au chlorsulfuron. La substitution de cette même proline par une glutamine confère au mutant C3 de tabac une résistance 300 fois, alors que les substitutions de la proline 196 par alanine et du tryptophane 573 par une leucine rend le tabac 1000 fois moins sensible au chlorsulfuron (Lee *et al.*, 1988).

Chez le maïs, la résistance aux imidazolinones peut être apportée par les substitutions thréonine 57-> alanine (Siehl *et al.*, 1996) ou tryptophane 572-> leucine (Bernasconi *et al.*, 1995). Le clonage du gène *imr1* codant pour l'ALS d'*Arabidopsis* (souche GH90) permet d'attribuer la résistance aux imidazolinones à une substitution d'une sérine 653 par une asparagine (Sathisavan *et al.*, 1991 ; Hattori *et al.*, 1992b).

Une substitution du Trp557 par une Leu confère au gène *AHASIII* de colza une résistance croisée aux imidazolinones, sulfonilurées et triazolopyrimidines (Hattori *et al.*, 1995).

Comme le montrent tous ces exemples, la nature du (ou des) point(s) de mutation confère des propriétés particulières à l'ALS, et par conséquent, des profils et des degrés de résistance spécifiques de chaque mutant. Toutefois, certaines régions du gène de l'ALS semblent fortement impliquées dans l'acquisition de résistances (Mazur et Falco, 1989, Hervieu et Vaucheret, 1996). Ces portions du gène sont très conservées, non seulement entre espèces, mais aussi entre règnes.

Il est également intéressant de remarquer que sélection naturelle et sélection *in vitro* génèrent des mutants aux propriétés semblables alors que les doses d'herbicide et les moyens d'application n'ont rien de commun. Harms et DiMaio (1991) ont d'ailleurs obtenu des mutants de tabac aux propriétés comparables bien qu'ils aient été sélectionnés par des doses d'herbicide très différentes.

De rares cas particuliers viennent entraver cette règle. Christopher *et al.* (1992) décrivent un biotype de *Lolium rigidum* (WLR1) présentant à la fois une ALS dont la sensibilité aux imidazolinones et au chlorsulfuron est altérée, mais aussi une capacité de détoxification rapide de ces molécules herbicides.

L'analyse des ALS de 7 lignées de maïs différant par leur sensibilité aux résidus de chlorsulfuron montre une forte corrélation entre l'activité spécifique ALS dans les racines et la tolérance à l'herbicide (Forlani *et al.*, 1991), alors que la sensibilité de cette dernière n'est pas modifiée. Cette corrélation se retrouve dans les cals issus de ces plantes, mais pas dans les feuilles.

Le seuil de tolérance du rimsulfuron (herbicide sélectif du maïs) varie de 40 000 fois selon les variétés. Sur les 57 lignées dont ils ont testé le

comportement enzymatique envers l'herbicide, Green et Ulrich (1994) n'en ont répertorié qu'une seule dont la sensibilité de l'ALS soit altérée.

Parallèlement à ces observations, Harms *et al.* (1992) montrent que la résistance conférée par une mutation du gène *als* peut être augmentée par amplification du gène. L'augmentation des concentrations d'ALS, obtenues par transgénèse chez le tabac, occasionne une augmentation proportionnelle de la résistance aux herbicides (Odell *et al.*, 1990 ; Tourneur *et al.*, 1993).

8.4. Rétrocontrôle par les acides aminés chez ces mutants

Peu nombreuses sont les données concernant l'effet des mutations impliquées dans l'acquisition de la résistance aux herbicides sur le rétrocontrôle exercé par les acides aminés branchés sur l'ALS.

Pour Stidham (1991), la régulation par les acides aminés branchés ne semble pas affectée chez les nombreux mutants résistants aux imidazolinones. De même Anderson et Georgeson (1989) ne considèrent pas que le doublement de la teneur en valine soit suffisant pour permettre d'affirmer que le rétrocontrôle est modifié. Saari *et al.* (1990), Newhouse (1991), Hattori *et al.* (1995) et Bernasconi *et al.* (1995) abondent également dans le même sens, car ils n'observent pas de différences chez leurs mutants de *Kiochia*, de maïs, de colza et de *Xanthium*.

Par ailleurs, certains mutants résistants à la valine présentent une ALS dont la sensibilité au rétrocontrôle, par cette molécule, est diminuée (Relton *et al.*, 1986 ; Wu *et al.*, 1995). Hervieu et Vaucheret (1996) ont montré que la substitution de la sérine en position 214 par une leucine (ou tout autre acide aminé hydrophobe) confère cette propriété aux ALS de tabac et d'*Arabidopsis*. L'isozyme II d'*E. coli*, qui n'est pas sensible au rétrocontrôle, présente lui aussi une alanine en position 214, alors que les isozymes I et III présentent une sérine à cette position. Il est important de noter que tous ces mutants ne sont pas résistants aux herbicides.

Ces exemples tendent à prouver l'existence de deux sites de fixation des inhibiteurs sur l'ALS : l'un spécifique des herbicides, l'autre spécifique des acides aminés branchés. Cependant, Rathinasabapathi et King (1991) observent chez le *Datura* une altération du rétrocontrôle par la leucine (K_i résistant = 0,19-0,74 / K_i sensible = 0,07mM) consécutive à l'acquisition de la résistance aux sulfonilurées. Ceci est confirmé par les résultats de Subramanian *et al.* (1990) qui observent une insensibilité très marquée de l'ALS au rétrocontrôle par la valine (43 à 350 fois) et la leucine (29-34 fois) chez le mutant PS-3 de coton résistant aux triazolopyrimidines. Comme les gènes n'ont pas été clonés, il n'est pas impossible qu'une mutation unique soit à l'origine de ces doubles altérations.

9. Résistance et transgénèse

L'utilisation de gènes de résistance aux herbicides revêt des intérêts tant fondamentaux qu'appliqués. Les premières transformations réalisées avec des gènes ALS mutés avaient pour unique but de vérifier que les mutations identifiées étaient bien à l'origine de l'acquisition de la résistance et qu'aucun autre phénomène ne venait s'y adjoindre. Très rapidement, ils sont devenus un outil de sélection des cellules transformées. Bien que de nombreux obstacles limitent l'emploi agronomique des plantes transgéniques, l'introduction de gènes est réalisée dans le but de permettre un désherbage chimique de cultures dont les adventices sont encore mal contrôlées (Vermeulen *et al.*, 1992). Les gènes d'*Arabidopsis*, de colza et de tabac résistants aux sulfonyleurées ont donc été transférés dans de nombreuses espèces *via Agrobacterium tumefaciens* (tableau ci dessous) afin de leur conférer un niveau de résistance élevé aux sulfonyleurées.

tabac	-> tabac	(Lee <i>et al.</i> , 1988 et 1990)
	-> betterave	(D'Halluin <i>et al.</i> , 1992)
csrl-1 d' <i>Arabidopsis</i> GH50	-> tabac	(Haughn <i>et al.</i> , 1988)
	-> tabac	(Gabard <i>et al.</i> , 1989)
	-> lin	(Mac Hughen, 1989)
		(Mac Sheffrey <i>et al.</i> , 1992)
		(Mac Hughen et Holm, 1995)
	-> chicorée	(Vermeulen <i>et al.</i> , 1992)
colza	-> tabac	(Wiersma <i>et al.</i> , 1989)

tableau 3 : les plantes transgéniques résistantes aux sulfonyleurées

Sathasivan *et al.* (1991) ont obtenu des tabacs résistants aux imidazolinones par introduction du gène *imr* isolé chez *arabidopsis*. Hattori *et al.* (1992) ont introduit une construction chimérique constituée de l'extrémité 5' de *csrl-1* et de l'extrémité 3' de *imr* provenant des souches d'*Arabidopsis* GH50 (résistante aux sulfonyleurées) et GH90 (résistante aux imidazolinones), dans des tabacs. Les tabacs transgéniques ainsi obtenus présentent des résistances croisées aux deux familles d'herbicides.

MATERIEL

&

METHODES

1. Matériel végétal et conditions de culture

1.1. Matériel végétal

Plusieurs génotypes de chicorée ont été utilisés pour cette étude :

- la lignée R1OK, homozygote pour le caractère de résistance aux sulfonylurées
- la variété hybride F1 Flash* (lignée AL* x lignée BL*), sensible aux sulfonylurées
- un hétérozygote issu du croisement entre la lignée BL* sensible et la lignée R1OK résistante utilisée comme pollinisateur

(*Chez la chicorée la sélection a abouti à la création de deux groupes (A et B) de lignées complémentaires qui sont largement utilisées pour l'obtention des hybrides F1 en France).

1.2. Conditions de culture

La nature des expériences menées sur le matériel végétal impose deux types de culture.

1.2.1. Culture *in vitro*

Pour mesurer les effets consécutifs à l'apport d'une molécule, il est nécessaire de maîtriser tous les paramètres de culture. Ceci est permis par la culture aseptique sur des milieux synthétiques de compositions définies. Les akènes sont aseptisés par immersion durant 15 minutes dans une solution aqueuse de chlorure mercurique à 0,1% (p/v). L'excès de mercure, qui pourrait nuire au développement harmonieux des jeunes plantules, est éliminé par trois lavages successifs par de l'eau stérile. Les graines sont ensuite mises à germer en boîte de Pétri contenant du milieu de Heller (Heller, 1953) renfermant 20 g.l⁻¹ de saccharose et soumises à une photopériode de 18 heures/6 heures (jour/nuit) pour une thermopériode de 22/20°C. L'énergie lumineuse est apportée à l'aide de tubes Cool White Deluxe à raison de 1,5 W.m.⁻².sec⁻¹. Les jeunes plantules sont transférées en tubes renfermant le même milieu, additionné de la molécule dont on désire étudier les effets (photo et thermo-périodes restant inchangées).

1.2.2. Culture en serre

Les akènes sont semés en terrine sur terreau horticole et sont placés dans une serre thermorégulée à 20°C. La lumière du jour est complétée par un

éclairage artificiel composé de lampes au sodium fournissant une énergie de $50 \text{ W.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$ au niveau des plantes.

2. Techniques moléculaires

2.1. Extraction des acides nucléiques

La chicorée est une plante riche en composés polysaccharidiques et phénoliques. Des protocoles d'extraction particulièrement longs sont mis en oeuvre. Afin de limiter la dégradation des acides nucléiques, il est donc indispensable de travailler à température basse (4°C) chaque fois que cela est possible, de porter des gants et de ne travailler qu'avec du matériel stérile à usage unique, ou à défaut traité une nuit au DEPC 0,01% (v/v), puis stérilisé.

2.1.1. Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN selon Dellaporta (1983) permet, chez la chicorée, une préparation d'ADN de qualité satisfaisante pour la PCR et l'analyse par Southern blot. Toutefois, certaines préparations ne permettent pas d'obtenir des profils de restriction reproductibles. Il a donc été décidé de purifier, sur gradient de chlorure de césium, les ADN destinés à l'analyse par Southern blot.

Le matériel végétal, pulvérisé en présence d'azote liquide, est resuspendu dans un tampon (0,5 M NaCl ; 0,05 M EDTA ; 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 ; 0,01 M β -mercaptoéthanol) à raison de 10 ml.g^{-1} de matière fraîche. Après avoir ajouté 0,7 ml de SDS à 20% (p/v) et agité vigoureusement, le mélange est incubé 15 minutes à 65°C . La majeure partie des polysaccharides et des protéines est éliminée par une précipitation à l'acétate de potassium pH 8,0 (1,1 M en concentration finale) de 30 minutes sur glace suivie d'une centrifugation (7500 g, 15 minutes, 4°C). Le surnageant est alors clarifié par filtration sur Miracloth® (Calbiochem). Les acides nucléiques qu'il contient sont précipités par l'ajout de 7 ml d'isopropanol. Le culot, obtenu après centrifugation (mêmes paramètres), est resuspendu dans 700 μl de tampon TE (Tris-HCl 0,01 M pH 8,0 ; 0,001 M EDTA) contenant $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de ribonucléase A. Après une incubation de 30 minutes à 37°C , la solution d'ADN subit une déprotéinisation supplémentaire en présence de phénol.

L'ADN est précipité par de l'isopropanol (0,8 volume). Après séchage du culot obtenu par centrifugation, l'ADN est resuspendu dans un volume minimal de TE.

Cette extraction peut être suivie d'une purification sur gradient de chlorure de césium ($1,0125 \text{ g.ml}^{-1}$). Après ultracentrifugation (53000 tours.min⁻¹ durant 20 heures), la bande d'ADN est prélevée et le bromure d'éthidium est extrait à l'aide de butanol saturé en eau (Sambrook *et al.*, 1989). L'ADN est précipité par l'éthanol (2 volumes). Après centrifugation, il est resuspendu dans le volume désiré de TE et conservé à 4°C .

2.1.2. Extraction des ARN totaux

Le matériel végétal, réduit en poudre fine par broyage en présence d'azote liquide, est resuspendu dans un tampon guanidium (4,2 M thiocyanate de guanidium ; 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 ; 1% (v/v) β -mercaptoéthanol) à raison de 5 ml.g⁻¹ de matière fraîche. Après centrifugation (6000 g durant 20 minutes à 4°C), une série d'extractions par un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (24/24/1, v/v/v) permet une déprotéinisation du surnageant. Les ARN contenus dans la phase aqueuse sont ensuite précipités par ajout d'éthanol froid (0,8 volume) et d'acide acétique 1N (0,08 volume). Après un séjour d'une nuit à -20°C, les ARN précipités sont collectés par centrifugation (mêmes paramètres) et dissous dans 3 ml d'un tampon NETS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 0,1 mM NaCl ; 1 mM EDTA pH 8,0 ; 0,5% (p/v) N-laurylsarcosine de sodium). Les acides nucléiques sont ensuite précipités (AcNa 0,15 M, 2 volumes d'éthanol). Le culot obtenu après centrifugation (mêmes paramètres) est repris dans un volume minimum de tampon TE (50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 1 mM EDTA pH 8,0). Les ARN totaux sont précipités sélectivement par du chlorure de lithium (2 M en concentration finale, associé à une incubation d'une nuit à 4°C). Les culots de centrifugation des ARN (centrifugation selon les mêmes paramètres) sont resuspendus dans un volume minimal d'eau stérile.

2.2. Polymérisation en chaîne de l'ADN

La polymérisation en chaîne de l'ADN ou PCR est utilisée pour l'isolement de sondes homologues. Elle permet d'amplifier un fragment d'ADN compris entre deux extrémités (amorces) dont on connaît la séquence. Son principe est simple et s'articule autour d'une répétition de trois étapes successives : un μ g d'ADN cible extrait selon la technique de Dellaporta (1983) est dénaturé (5 minutes à 96°C), de façon à permettre l'hybridation des amorces (400 ng de chaque) aux régions de l'ADN de séquences complémentaires. La température d'hybridation est un paramètre important. Elle sera choisie entre 50 et 60°C selon le degré de complémentarité du couple amorce/ADN cible.

L'extrémité 3'OH de ce duplex permet à la *Taq* polymérase (2,5 unités) d'initier la synthèse du produit d'amplification. La *Taq* polymérase (Appligène) utilisée pour cette étude présente un optimum d'activité à 70°C. L'utilisation d'un appareil thermostaté programmable (Techne PHC-3) permet de placer le mélange réactionnel dans les conditions requises. Les amorces ont une taille voisine de 20 nucléotides (Appligène).

2.3. Hybridations à l'aide de sondes ADN

2.3.1. Marquage de la sonde

Les sondes sont rendues radioactives à l'aide du kit "T7 Quick Prime" distribué par Pharmacia. De courtes amorces (nanomères) de séquence arbitraire sont incubées 30 minutes à 37°C en présence de 50 ng d'ADN matrice dénaturé (5 minutes à 100°C), 40 μCi d' $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, des dNTP et de l'ADN polymérase T7. Le mélange réactionnel est ensuite chargé sur une colonne Sephadex G50 afin de séparer la sonde marquée des nucléotides radioactifs non incorporés.

2.3.2. Hybridation sur ADN

Les fragments d'ADN obtenus par digestion enzymatique sont séparés selon leur taille par électrophorèse non dénaturante sur un gel d'agarose (1% agarose, TAE 1X ; 10 heures à 40 volts), puis transférés sur une membrane de nylon chargé (Biohyland-Z⁺ Bioprobe) par transfert alcalin dans une solution de NaOH 0,4 M. L'ADN est fixé de façon covalente à la membrane par une exposition de 3 minutes aux UV (254 nm). Cette membrane est préhybridée 4 heures à 42°C en présence de tampon phosphate de sodium 50 mM pH 6,8 renfermant 50% de formamide déionisée, SSC 5X (0,75 M NaCl ; 0,075 M trisodium citrate), Denhardt's 5X (0,5 g de ficoll ; 0,5g de PVPP ; 0,5 g de SAB (Sigma, Fraction V) par litre), 0,2% (p/v) de SDS et 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ d'ADN soniqué de sperme de hareng, de façon à saturer les sites libres de la membrane. Ce tampon est ensuite remplacé par un autre, de composition analogue, complété par l'apport de sulfate de dextran (concentration finale de 10% (p/v)) et de la sonde radioactive dénaturée. L'hybridation se poursuit durant 12 heures. Deux lavages de 30 minutes à 42°C dans du tampon (SSC 2X ; 0,1% (p/v) SDS) sont nécessaires pour éliminer les signaux aspécifiques. La membrane hybridée est ensuite mise en exposition sur un film radiologique (Kodak X-OMAT) à -70°C.

2.3.3. Hybridation sur ARN

Après séparation électrophorétique (12 heures à 40 volts) sur gel dénaturant (1,2% (p/v) agarose ; 2,4 M formaldéhyde ; 0,02 M MOPS pH 7,0 ; 5 mM NaAc ; 1 mM EDTA pH 8,0), les ARN sont transférés sur une membrane de nylon (Biohyland-Z⁺ ; Bioprobe) selon le protocole de Southern (1975) adapté aux ARN par Thomas (1980). Les ARN sont fixés de façon covalente à la membrane par une exposition de 3 minutes sous UV (254 nm).

L'hybridation est réalisée selon Church et Gilbert (1984). La membrane est incubée à 60°C dans le tampon de préhybridation (0,25 M Na₂HPO₄ pH 7,0 ; 7% (p/v) SDS ; 1% (p/v) SAB). Après 3 heures d'incubation, le tampon est renouvelé. La sonde radioactive dénaturée est alors ajoutée. L'hybridation se poursuit durant 12 heures à 60°C. L'élimination du bruit de fond et l'exposition sur film radiologique s'effectuent selon le protocole décrit au chapitre 2.3.2., mais les lavages ont lieu à la température de 60°C. Un lavage supplémentaire dans du tampon (SSC 2X ; 0,1% (p/v) SDS) peut être envisagé si cela s'avère nécessaire.

Afin de faciliter l'analyse des signaux d'hybridation, les autoradiogrammes sont scannés et leurs images digitalisées à l'aide du système Microtek Color/Gray™ (Biorad) associé à un micro-ordinateur MacIntosh LCIII (Apple). Le logiciel d'image NIH-1.56. a été utilisé à cet effet. Les données sont traitées à l'aide du logiciel Cricket Graph™. Le produit des aires par leur densité diminuée du bruit de fond, est le paramètre utilisé pour comparer les différentes conditions. Afin de s'affranchir de possibles erreurs de dosage des ARN dues au spectrophotomètre, chaque gel est chargé d'une double série de dépôts. L'une est utilisée pour l'hybridation, l'autre, colorée à l'acridine orange (Sambrook *et al.*, 1989) permet de contrôler les quantités et l'intégrité des ARN déposés.

2.4. Criblage et analyse de banque génomique

2.4.1. Criblage

2.4.1.1. Titration et étalements

Avant toute amplification ou tout criblage, il est nécessaire de déterminer le titre (nombre de phages.ml⁻¹) des suspensions de bactériophages à analyser.

Dix microlitres d'une série de dilutions (en général 10⁻³ à 10⁻⁷) sont mis en présence de 200 µl de cellules hôtes (solution d'*E. coli* cultivés en présence de 10 mM de MgSO₄ et 0,2% (p/v) de maltose reprise dans 10 mM de MgSO₄ de façon à atteindre 0,5 de DO_{600 nm}). Après infection (incubation de 15 minutes à 37°C en agitation modérée) le mélange est étalé sur boîte de Pétri (Ø 90 mm) selon la technique de double couche et incubé une nuit à 37°C. Le produit du nombre de plages de lyse obtenues par le facteur de dilution donne le titre. Ce dernier permet de déterminer la densité de phages qu'il est souhaitable d'étaler.

2.4.1.2. Criblage

Le criblage a pour but d'isoler, à partir d'une quantité de phages représentant deux fois la banque primaire, un ou plusieurs phage(s) recombinant(s) renfermant le gène recherché. Le criblage consiste en une hybridation moléculaire (voir chapitre 1.3) réalisée sur la réplique* d'un étalement de phages. Il permet de localiser et d'isoler les phages répondant positivement à l'hybridation.

* Une membrane de nylon est mise en contact avec les phages durant 2,5 minutes. Elle est ensuite déposée sur une solution dénaturant l'ADN (1,5 M NaCl ; 0,5 M NaOH) durant 5 minutes, avant d'être transférée sur une solution de neutralisation (1,5 M NaCl ; 0,5 M Tris-HCl pH 7,5) pour une durée de 5 minutes. Après un rinçage sur une solution de SSC 2X, la membrane est incubée 2 heures à 80°C afin d'y fixer l'ADN.

2.4.2. Transfert de l'insert dans un vecteur plasmidique

2.4.2.1. Préparation et analyse de l'ADN phagique

L'extraction de l'ADN des phages se fait selon le protocole suivant. Chaque millilitre de lysat bactérien est mélangé à 0,2 ml d'une solution renfermant 2,5% (p/v) de SDS ; 0,25 M EDTA ; 0,5 M Tris-HCl pH 9, puis est incubé 30 minutes à 70°C. Les protéines sont éliminées par une incubation sur glace de 15 minutes en présence de 0,25 ml d'acétate de potassium 8 M, suivie d'une centrifugation de 20 minutes à 10 000 g. Le surnageant est filtré à travers du tissu Miracloth®. L'ADN est précipité par 2 volumes d'éthanol, puis collecté par centrifugation (mêmes paramètres) pour être resuspendu dans 200 µl de solution d'acétate d'ammonium 2 M. Après une seconde précipitation par l'éthanol, l'ADN est recueilli par centrifugation, resuspendu dans 25 µl d'eau distillée et puis dosé par spectrophotométrie à 260 nm.

2.4.2.2. Sous-clonage dans un vecteur plasmidique

L'insert (fragment issu de la digestion de l'ADN phagique) est incubé avec le vecteur (pBluescript KS(-) digéré par une enzyme générant des extrémités cohésives) dans un rapport 3/1 (molécule/molécule) en présence de l'ADN ligase du bactériophage T4 et de son tampon (Boehringer Mannheim). L'ensemble est incubé une nuit à 12°C.

Le produit de la ligation est laissé en contact 30 minutes sur glace en présence de 200 µl d'une suspension de bactéries compétentes, préparées selon la méthode au chlorure de calcium (bactéries DH5α en phase exponentielle de croissance reprises dans une solution de chlorure de calcium 50 mM).

Un choc thermique de 90 secondes à 42°C facilite l'entrée de la construction dans les bactéries. Après avoir ajouté 0,8 ml de LB, les bactéries sont incubées 1 heure à 37°C sous agitation, puis elles sont étalées sur un milieu de sélection (LB + 50 µg.ml⁻¹ d'ampiciline + 0,02% (p/v) X-Gal + 1 mM IPTG).

2.3. Préparation de l'ADN plasmidique

L'ADN utilisé pour le contrôle des clones recombinants sélectionnés est préparé selon la technique décrite par Birnboim et Doly (1979) à partir d'une culture bactérienne liquide (1,5 ml) incubée une nuit à 37°C dans le milieu de culture idoïne.

Afin de dresser des cartes de restriction complètes mais aussi à des fins de séquençage, une extraction générant une quantité importante d'un ADN pur est indispensable. La technique utilisée est une adaptation de la précédente. Les bactéries, obtenues après une culture dans 100 ml de milieu (conditions inchangées), sont resuspendues dans 5 ml de tampon GTE (50 mM Glucose ; 25 mM Tris-HCl ; 10 mM EDTA ; 0,1 ml.ml⁻¹ ARNaseA). Une lyse alcaline est obtenue par adjonction de 10 ml de solution de lyse (1% (p/v) SDS ; 0,2 M NaOH), suivie d'une incubation de 10 minutes sur glace. Les protéines sont dénaturées par une incubation de 30 minutes sur glace en présence de 5 ml de solution acétate (2,55 M AcK pH 4,8) puis précipitées par centrifugation (8000 g durant 20 minutes à 4°C). Le surnageant, filtré sur MiraclothTM, est purifié sur colonne Qiagen-tip 100 selon les recommandations du fabricant (Diagen).

2.4.3. Séquençage

Le séquençage est réalisé à l'aide du kit "Sequenase® Version 2.0" selon les instructions du fournisseur (United States Biochemical). La méthode décrite par Sanger (1977) est appliquée au séquençage de l'ADN plasmidique, rendu simple brin par dénaturation alcaline (incubation de l'ADN double brin durant 30 minutes à 37°C dans une solution de 0,2 M NaOH ; 0,2 mM EDTA). Les vecteurs utilisés pour le sous-clonage (pBluescript SK(-) et pCRII®) possèdent tous deux les amorces "reverse" et "forward" du phage M13.

Ces amorces sont utilisées pour initier les réactions de marquage (³⁵S dATP). La réaction d'élongation est bloquée par l'incorporation aléatoire du didésoxynucléotide spécifique de chacun des quatre tubes réactionnels (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). La réaction est stoppée par l'addition du tampon de charge. Les produits d'élongation sont ensuite séparés sur gel dénaturant (TBE 1X ; Urée 7M ; Acrylamide 6% (p/v); 5h30, 1400 volts, cuve Prolabo). Après séchage sous vide à 80°C, le gel est mis en contact avec un film autoradiographique (Kodak XAR-5) durant 24 heures.

L'analyse des séquences (comparaisons d'homologies, traductions, sites de restriction) est réalisée à l'aide du logiciel PC/Gene®.

3. Hybridation *in situ*

Le protocole décrit par de Feirreira *et al.* (1994), adapté à la chicorée par Palms *et al.* (1996), permet de localiser la transcription au sein d'organes entiers.

3.1. Fixation du matériel

Le matériel végétal est fixé par un mélange volume pour volume d'heptane et de tampon PBS (0,13 M NaCl ; 7 mM Na₂HPO₄ ; 3 mM NaH₂PO₄ ; 0,27 mM KCl ; pH 7,4) complété par 0,1% (v/v) de tween 20, 0,08 M EGTA, 5% (v/v) formaldéhyde et 10% (v/v) de diméthylsulfoxyde. Le passage dans plusieurs bains d'éthanol permet la déshydratation de l'échantillon. A ce stade, les échantillons peuvent être conservés à -20°C.

3.2. Synthèse de sonde ARN

La synthèse des sondes ARN s'effectue à l'aide du kit "DIG RNA Labelling Kit®" commercialisé par Boehringer Mannheim. Le fragment du gène correspondant à la sonde est inséré dans un vecteur (PCRII®) renfermant les promoteurs T7 et SP6. Après linéarisation du vecteur, la synthèse de la sonde sens est initiée à partir du promoteur SP6 et à partir du promoteur T7 pour la sonde antisens. Un microgramme d'ADN matrice est incubé 2 à 4 heures à 37°C dans un tampon de transcription, en présence des dNTP, de 2 unités d'inhibiteurs de ribonucléase et de 40 unités de promoteur. L'UTP étant couplé à la digoxigénine, la réaction génère 10 à 20 µg d'ARN marqué. La sonde subit une hydrolyse à 60°C dans un tampon carbonate (0,075 M Na₂CO₃ et 0,075 M NaHCO₃). Le temps (t) d'hydrolyse est calculé de façon à générer des fragments de 150 nucléotides, qui diffusent mieux dans les tissus :

$$t = (L_o - L_f) / (k.L_f.L_o)$$

où

L_o est la taille initiale de la sonde synthétisée

L_f est la taille désirée (150 nucléotides)

k = 0,11 Kb.minute⁻¹

3.3. Hybridation

Afin de faciliter la pénétration de la sonde dans l'organe, les tissus sont immergés 45 minutes dans un mélange éthanol/xylène (v/v) ; ils subissent ensuite plusieurs lavages par de l'éthanol 100%, une réhydratation dans du tampon PBT (PBS complété par du tween 20 à raison de 0,1%(v/v), suivie d'un traitement à la protéinase K ($40 \mu\text{g.ml}^{-1}$) durant 20 minutes à 37°C .

La préhybridation commence après plusieurs rinçages dans du PBT (le premier contient 5% (v/v) de formaldéhyde). Les échantillons sont alors placés 2 heures à 60°C dans un bain de citrate de sodium 75 mM pH 7,0 ; 0,75 M NaCl, 50% (v/v) formaldéhyde et $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ d'ADN soniqué de sperme de hareng.

Le tampon de préhybridation est remplacé par 250 μl de tampon analogue, contenant $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de sonde ARN dénaturée. Le mélange est incubé 20 heures à 60°C .

L'excès de sonde est ensuite éliminé par un traitement à la ribonucléase A ($40 \mu\text{g.ml}^{-1}$) et de nombreux lavages au NTE (0,5 M NaCl ; 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 1 mM EDTA).

La présence de la sonde est révélée à l'aide d'un anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline. L'anticorps dilué au 1/2000 dans du PBT ; 2% (p/v) de SAB et 1% (p/v) d'agent bloquant (Boehringer Mannheim) est laissé en contact 2 heures avec l'échantillon. Après 3 lavages, l'addition de BCIP et NBT dans un tampon 100 mM NaCl ; 50 mM MgCl_2 ; 100 mM Tris-HCl pH 9,5 et 0,1% (v/v) de tween 20, permet de révéler l'activité phosphatase alcaline. La réaction est stoppée par l'ajout d'EDTA (20 mM).

Pour mieux contraster la coloration, une décoloration des tissus au chlorolactophénol (tichloro-éthane-diol/ acide lactique/ phénol ; 2/1/1 ; v/v/v) est fortement conseillée.

3.4. Coloration nucléaire de Feulgen

Le matériel végétal est fixé dans un mélange éthanol/acide acétique (3/1 ; v/v). Une hydrolyse acide de 15 minutes à 60°C dans une solution d'acide chlorhydrique 1N, permet de libérer les sucres réducteurs des acides nucléiques. Après un lavage à l'eau, ces sucres sont révélés par le réactif de Schiff (Biorad). L'échantillon est ensuite placé entre lame et lamelle puis légèrement écrasé avant d'être observé au microscope.

4. Mesure de l'activité acétolactate synthétase

L'acétolactate synthétase étant une enzyme très labile, son extraction nécessite de travailler à 4°C avec du matériel stérile ainsi que le port de gants. Faiblement représentée dans le pool protéique, il est nécessaire d'extraire et de concentrer les protéines totales afin de pouvoir mesurer son activité.

4.1. Extraction et dosage des protéines

Le matériel végétal réduit en poudre en présence d'azote liquide est resuspendu à raison de 5 ml.g⁻¹ de matière fraîche dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,5 contenant 0,5 mM dithiothréitol (DTT) ; 1 mM MgCl₂ ; 0,1 mM thiamine pyrophosphate (TPP) ; 0,01 mM de flavine adénine dinucléotide (FAD) ; 20% (v/v) de glycérol et 20 g.l⁻¹ de polyvinyl polypyrrolidone (PVPP). Le surnageant obtenu après centrifugation (10 000 g durant 20 minutes à 4°C) est filtré à travers du Miracloth®, puis amené à 70% de saturation en sulfate d'ammonium et placé 20 minutes sur glace. Les protéines totales sont ensuite recueillies par centrifugation et resuspendues dans 4 ml de tampon d'extraction dilué de moitié. L'extrait est alors chargé sur une colonne Sephadex G25 (Pharmacia) pour être déssalé.

Le dosage des protéines est réalisé selon le protocole "Bio-Rad Protein Assay" (Biorad) avec une gamme de sérum albumine bovine comme référence (Bradford, 1976).

4.2. Mesure de l'activité acétolactate synthétase

Deux cents microlitres d'extrait sont incubés 90 minutes à 35°C dans un tampon phosphate de potassium 20 mM pH 7,5 renfermant 40 mM pyruvate de sodium, 1 mM MgCl₂ ; 0,1 mM TPP et 0,01 mM FAD.

L'acétolactate produit est décarboxylé en acétoïne en incubant l'extrait 20 minutes à 35°C après avoir ajouté 40 µl d'H₂SO₄ à 50% (v/v). L'acétoïne est alors dosée selon la méthode de Westerfeld (1945). 960 µl de solution colorimétrique (1,145 M NaOH ; 7 mM créatine ; 10 mg.ml⁻¹ d'α-naphtol) sont ajoutés au mélange réactionnel. La coloration se développe durant 20 minutes à 35°C, puis, après une brève centrifugation (1 minute à 10 000g), la densité optique est lue à 525 nm contre le blanc approprié (extrait non décarboxylé permettant le dosage de l'acétoïne endogène).

Pour chaque condition expérimentale, trois réactions de dosage sont menées en parallèle à partir d'un même extrait protéique. La moyenne qui en est déduite correspond à la valeur retenue pour le dosage. Les dosages étant répétés trois fois, le traitement statistique s'applique donc à trois extractions indépendantes.

5. Western blot

5.1. Transfert des protéines sur membrane

Les protéines, extraites selon le protocole décrit dans le chapitre précédent, sont séparées sur gel dénaturant (12% acrylamide/bis (29,2/0,8; p/p/100 ml) ; 0,1% SDS) selon leur taille avant d'être transférées sur une membrane de nitrocellulose.

5.2. Hybridation

La membrane est incubée une nuit dans un tampon de saturation (TBS : 0,025 M Tris-HCl pH 7,4 ; 0,15 M NaCl), contenant 2% de PVP (PM : 40 000) (p/v). L'hybridation avec l'anticorps primaire est réalisée à 22°C durant deux heures dans du tampon TBS, 1% de PVP et 0,01% (v/v) Triton X100. L'excès d'anticorps primaire est éliminé par trois lavages de 10 minutes dans le même tampon. L'anticorps de détection, dilué 2000 fois, est mis en contact durant deux heures avec la membrane. Après plusieurs rinçages, l'activité phosphatase alcaline est révélée par une incubation dans 50 ml de tampon carbonate pH 8,9 (0,1 M NaHCO₃ ; 0,67 mM MgCl₂) contenant 7,5 mg de BCIP et 15 mg de NBT.

6. Dosage des acides aminés

Les acides aminés libres sont dosés par CLHP en phase inverse. Le matériel végétal est réduit en poudre en présence d'azote liquide et incubé une heure à température ambiante dans une solution d'acide sulfosalicylique (3% (p/v)) à raison de 1 ml.g⁻¹ de matière fraîche. Une centrifugation (12 000 g à 4°C durant 20 minutes) permet d'éliminer les débris végétaux.

La séparation des acides aminés est réalisée à l'aide d'une colonne Zorbax ODS. Le dosage des acides aminés a été réalisé par G. Forlani au laboratoire du Pr. Nielsen à Pavie.

7. Extraction des protéines totales

Le matériel végétal est broyé en présence d'azote liquide. La poudre obtenue est resuspendue dans une solution d'acétone contenant 10% (p/v), d'acide trichloracétique et 0,07% (v/v) de β -mercaptoéthanol, à raison de 100 μ l.mg⁻¹ de matière fraîche. Le tout est mis à précipiter 1 heure à -20°C, puis centrifugé. Le culot est repris dans un même volume de mélange acétone/ β -mercaptoéthanol 0,07% et placé 1 heure à -20°C. L'opération est renouvelée,

mais l'incubation s'étend à la nuit. Le culot obtenu par centrifugation est séché et les protéines sont dissoutes (une nuit à température ambiante) dans de la soude molaire, à raison de $60 \mu\text{l.mg}^{-1}$ de matière sèche. Enfin, ce mélange est centrifugé (8 000 g, 20 minutes), le surnageant est dilué 10 fois de façon à permettre le dosage des protéines selon la méthode de Bradford (1976).

RESULTATS

I. La chicorée et les sulfonylurées

1. Les symptômes consécutifs un apport de chlorsulfuron

Le chlorsulfuron est l'une des sulfonylurées les plus largement étudiées mais aussi des plus utilisées. Cette molécule, à des doses de 20 g.ha⁻¹, permet le désherbage anti-dicotylédones de certaines céréales. Les chicorées cultivées en terre, que se soit en plein champs ou en serre, sont déjà fortement affectées par des doses dix fois plus faibles. Les effets consécutifs à cette sensibilité sont d'autant plus rapides que la dose d'herbicide employée est élevée.

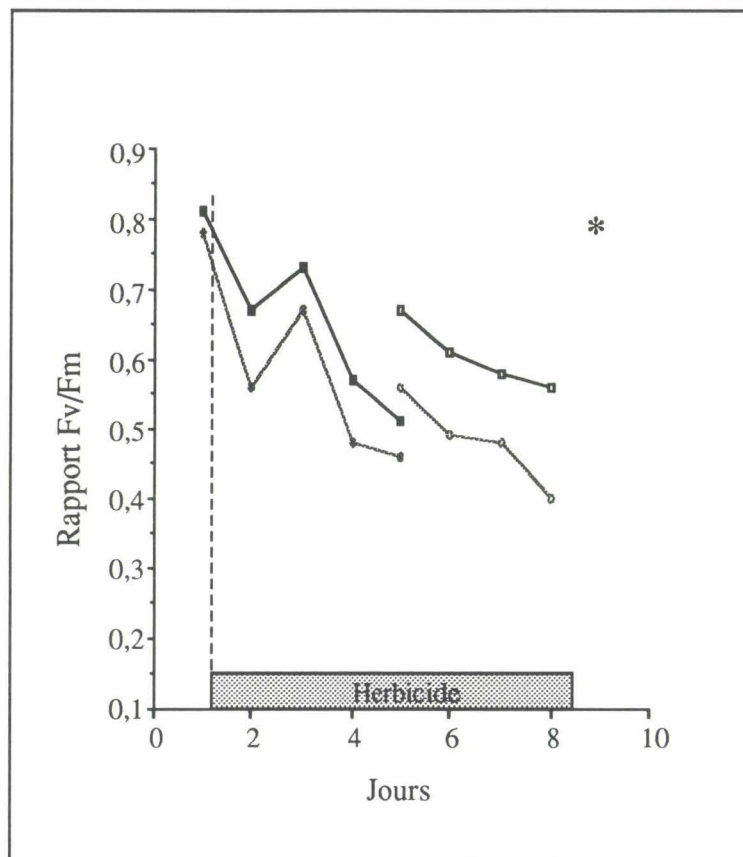
Le premier effet visible est l'arrêt de la croissance racinaire et foliaire (tableau 1).

chlorsulfuron (g.ha ⁻¹)	Masse de matière fraîche en mg
0	100
2	8,8
20	5,8

tableau 1 : Effet d'une application foliaire de 2 et 20 g.ha⁻¹ de chlorsulfuron sur la production primaire des chicorées. Le poids moyen de 25 plantules est exprimé en fonction de la production en absence d'herbicide.

Celui-ci est rapidement perceptible chez les jeunes plantes (jusqu'au stade 3 feuilles) en pleine croissance, alors qu'il est plus difficile à apprécier chez les plantes plus développées (stade 10 feuilles), mais est néanmoins présent. Le second effet, plus tardif (environ 5 jours pour les jeunes plantules (stade 3 feuilles) et 10 jours pour les plantes au stade 10 feuilles), correspond à une dépigmentation irréversible et un affaissement des structures de l'appareil aérien, qui débouchent sur la mort des plantes (Photo ci-contre).

Les modifications phénotypiques décrites précédemment ne permettent pas d'appréhender les délais de l'action de l'herbicide en temps réel. Aussi nous fallait-il déterminer un paramètre susceptible de rendre compte de l'action du chlorsulfuron dans un délai relativement court.



Traitement à :

5 g.ha ⁻¹	—■—	Feuille 1
	—□—	Feuille 2
20 g.ha ⁻¹	-●-	Feuille 1
	-○-	Feuille 2

* Rapport Fv/Fm mesuré le 8^{ème} jour sur une plante non traitée.

figure 1 : Evolution du potentiel photochimique chez la chicorée après l'application foliaire de chlorsulfuron correspondant à des doses de 0 (témoin), 5 et 20 g.ha⁻¹. Les mesures ont été effectuées durant les 5 premiers jours sur la feuille 1, puis les jours suivant sur la feuille 2. Le rapport Fv/Fm ne fluctue pas chez les individus sensibles non traités. Il n'est donc représenté qu'au 8^{ème} jour. La période de traitement est indiquée par le cadre grisé.

2. Effet du chlorsulfuron sur la photosynthèse chez la chicorée

Les modifications phénotypiques, consécutives à l'application de chlorsulfuron sur des chicorées précédemment décrites, ne sont visibles que tardivement, alors que la plante est déjà morte. Afin de déterminer de façon plus précoce l'action de cet herbicide sur les fonctions essentielles du métabolisme, la fluorescence a été utilisée comme un paramètre intrinsèque rendant compte de l'état du système photosynthétique. L'énergie lumineuse qui n'est pas utilisée par la photosynthèse est dissipée sous forme de fluorescence ($\lambda = 650 \text{ nm}$) ou de chaleur. La mesure *in vivo* de cette fluorescence permet d'apprécier l'ensemble des aspects de la photosynthèse et notamment, l'évolution de l'état physiologique d'une plante soumise à un stress (Baker, 1991 ; Krause et Weis, 1986 ; Schreiber, 1983).

La fluorescence variable (Fv), différence entre la fluorescence maximale (Fm) et Fo, la fluorescence émise par les pigments de l'antenne avant que les excitons n'aient atteint les centres réactionnels (tous les accepteurs d'électrons sont alors oxydés), exprime le nombre de centres réactionnels fonctionnels. Le rapport Fv/Fm, considéré comme un indicateur du potentiel photochimique du photosystème II, est proportionnel au rendement quantique des réactions photochimiques.

Les mesures de fluorescence ont été réalisées toutes les 24 heures sur des plantules de chicorée au stade 3 feuilles cultivées en pot (photopériode 16/8), ayant reçu une application foliaire équivalente à 0 (témoin) ; 5 et 20 g de chlorsulfuron.ha⁻¹. Afin de pouvoir comparer les différentes mesures, nous avons pris soin d'effectuer les mesures sur la même feuille, à savoir la première apparue.

Ce rapport Fv/Fm diminue de façon très nette (figure 1). Cette baisse est proportionnelle à la quantité de matière active appliquée sur la plante. Quatre jours après le traitement, le rapport Fv/Fm a chuté de 40% pour les individus traités par 20 g de ma.ha⁻¹ alors que sa baisse est limitée à 15% après un traitement par 5 g de ma.ha⁻¹. Quelle que soit la dose employée, la chute est brutale le premier jour (environ 25%), puis on observe une reprise des potentialités photosynthétiques au deuxième jour (80% du témoin), avant une chute irrémédiable. A ce stade (cinquième jour), la feuille utilisée présente une dépigmentation marquée. Les mesures effectuées les jours suivants ont donc été réalisées sur la seconde feuille formée. Celle-ci ne semble affectée que plus tardivement par le traitement, mais cette fois la chute du rapport Fv/Fm est régulière.

Les mesures effectuées sur des cinétiques rapides de fluorescence (figure 2) montrent que, contrairement aux herbicides de la famille des atrazines, le CSF n'affecte pas directement le transfert des électrons au sein du PS II.

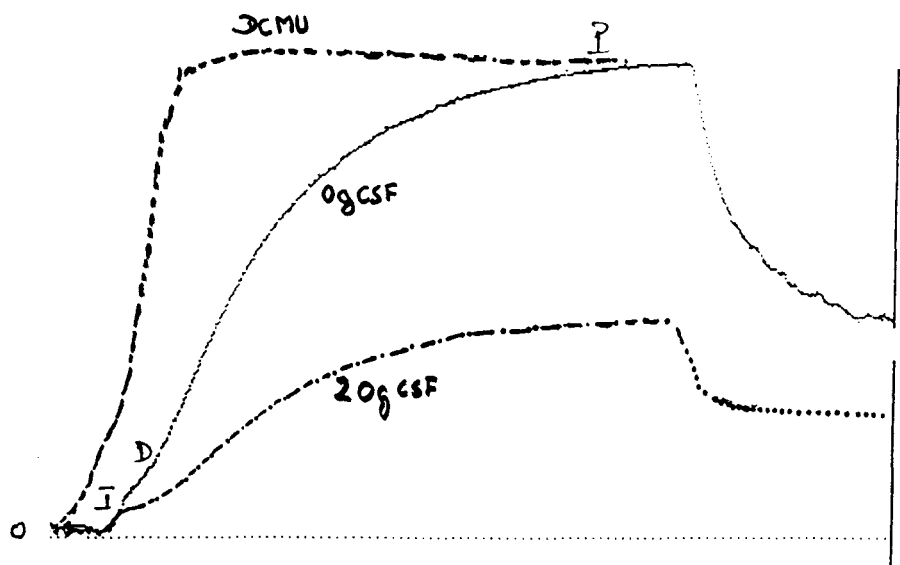


figure 2 : Cinétique rapide de fluorescence réalisée chez les chicorées sensible ayant reçu une application de chlorsulfuron. La courbe en pointillé représente l'allure théorique d'une cinétique rapide observée chez une plante soumise à un traitement herbicide dont la matière active inhibe le transfert des électrons au sein du photosystème comme le D.C.M.U..

3. Conclusion

Les sulfonylurées affectent la croissance et le développement des chicorées, quel que soit leur stade de développement au moment du traitement herbicide. Millecamps (1989) a montré qu'il en était de même pour les cultures cellulaires réalisées *in vitro* lorsque l'herbicide est incorporé au milieu de culture. Un retard de croissance se manifeste très rapidement. Il est suivi d'une dépigmentation et d'un affaissement des structures de l'appareil aérien. A ce stade la plante est déjà morte.

L'étude des cinétiques rapides ne permet pas de conclure à une inhibition du transfert des électrons dans les feuilles traitées par le chlorsulfuron. Une analyse des effets à long terme laisse penser que la chute du

rapport F_v/F_m correspond à une dégradation des protéines constituant l'antenne du PSII et la chaîne de transfert des électrons. Par ailleurs, les deux types de feuilles sur lesquelles les mesures ont été effectuées ont reçu simultanément la même dose d'herbicide, cependant, elles ne semblent pas affectées de la même façon. La deuxième feuille, plus jeune, se trouvait en pleine croissance lors des mesures et nécessitait par conséquent une synthèse importante d'acides aminés. Or, bien que l'ALS soit inhibée par l'herbicide, la carence semble moins marquée.

- L'ALS CHEZ LA CHICORÉE -

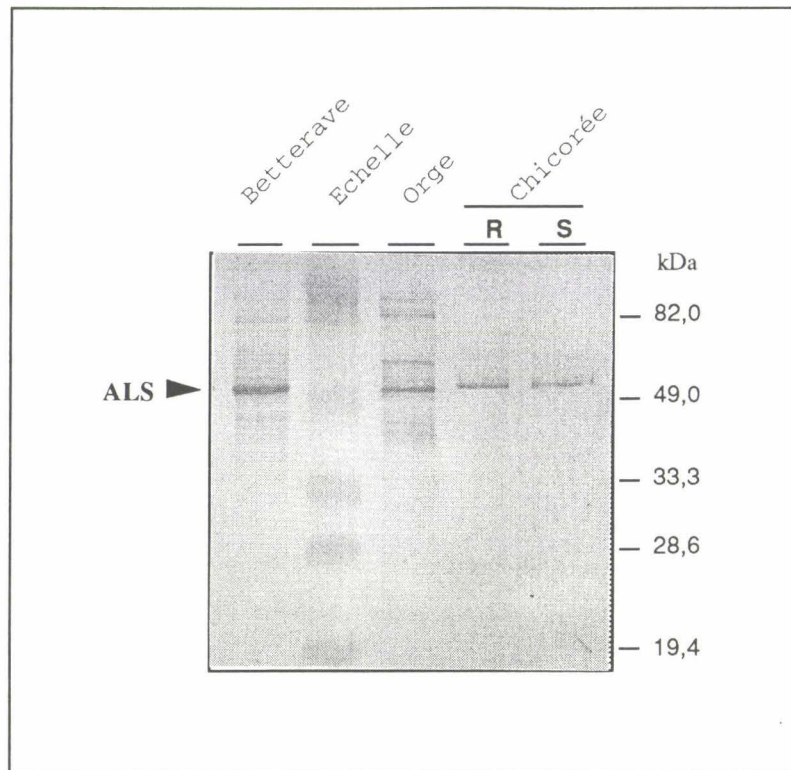


figure 1 : Spécificité des anticorps F14 envers les ALS de chicorée. 5 μ g de protéines totales provenant de chicorées sensible (S) et résistante (R), de betterave et d'orge ont été déposés dans chaque puits. Le sérum est dilué 2500 fois. La révélation de l'anticorps est permise par un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline.

II. L'ALS de chicorée

1. Structure de la protéine

Peu abondante et très labile, l'ALS est extrêmement difficile à purifier. La perte rapide d'activité ne permet pas en effet de la suivre lors des différents fractionnements. Afin de remédier à cet inconvénient, Bekkaoui *et al.* (1993) ont fait exprimer dans *Escherichia coli* une construction chimérique associant le fragment 924-1838 du gène *als2* de colza au gène codant pour une protéine de liaison au maltose (maltose binding protein). L'injection de cette protéine de fusion à un lapin a permis la production d'un anticorps polyclonal (F14), capable de reconnaître spécifiquement les ALS de différentes espèces. Grâce à cet anticorps, gracieusement fourni par Monsieur le Professeur W.B. Crosby, nous avons pu envisager la caractérisation immunologique de l'ALS de chicorée.

1.1. Spécificité de l'anticorps F14 vis-à-vis de l'ALS de chicorée

Afin de déterminer l'aptitude de l'anticorps F14 à reconnaître l'ALS de chicorée, les protéines de plantules âgées d'un mois ont été extraites selon le protocole décrit pour la mesure d'activité, puis séparées selon leurs tailles par électrophorèse SDS-PAGE. Les extraits correspondant à deux génotypes différents de chicorée ont été analysés. Les masses moléculaires des peptides composant l'ALS ont été décrites comme variant de 58 kDa chez l'orge (Durner et Boger, 1988) à 65 kDa chez de nombreuses espèces, dont la betterave (Singh *et al.*, 1991). Une quantité analogue (5 µg) de protéines foliaires d'orge et de betterave a donc été analysée en tant que témoin interne de notre expérimentation (figure 1). Le western blot réalisé à l'aide de l'anticorps F14 indique que celui-ci reconnaît de façon spécifique, chez toutes les espèces présentes, un polypeptide dont la taille est estimée à 57 kDa. L'anticorps a également reconnu chez l'orge trois autres polypeptides de 65, 79 et 82 kDa.

Pour s'assurer que le polypeptide reconnu par l'anticorps F14 correspondait à l'ALS de chicorée, des quantités croissantes de sérum ont été incubées durant 2 heures à 0°C en présence de 100 µg de protéines. Après une centrifugation de 30 minutes à 10 000 g, l'activité enzymatique de l'ALS a été mesurée dans les surnageants. Comme le montre la figure 2, l'activité diminue lorsque la quantité d'anticorps apportée au milieu d'incubation augmente. Aucune activité ALS n'a été retrouvée dans le culot de centrifugation.

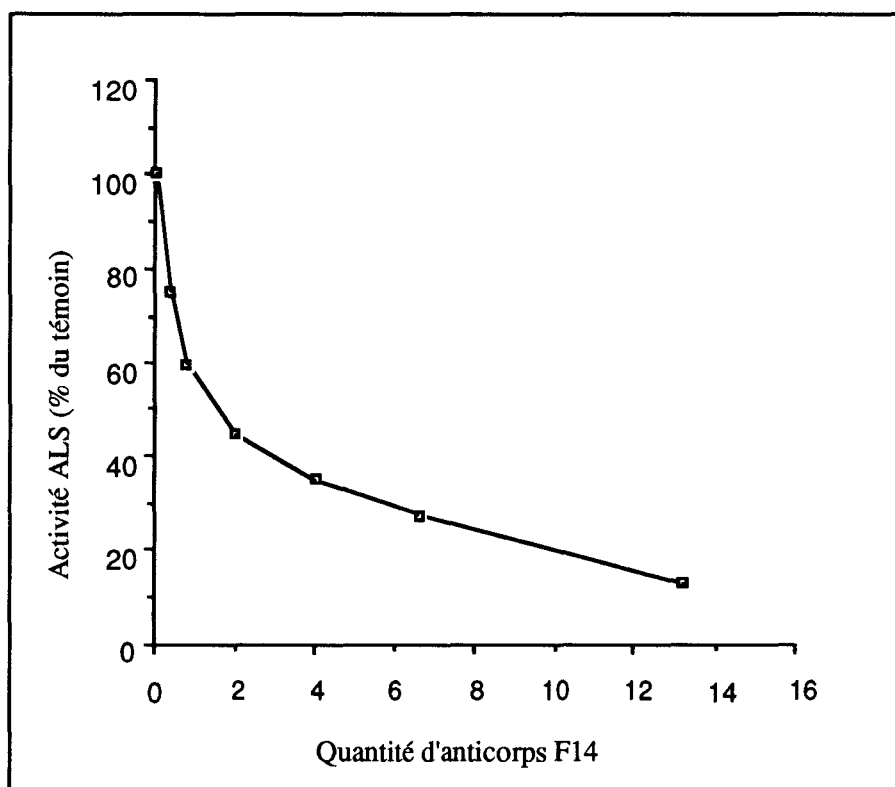


figure 2 : Immunoprécipitation de l'activité ALS par l'anticorps F14. En abscisse est figuré le volume de sérum ajouté à 200 μ g de protéines désalées. Le volume final de 200 μ l est obtenu en complétant avec du tampon de colonne.

L'anticorps F14 reconnaît spécifiquement un peptide de 57 kDa en conditions dénaturantes. Il est en outre capable d'immunoprécipiter l'activité ALS. Par conséquent, sa spécificité vis-à-vis de l'ALS de chicorée est prouvée.

1.2. Structure de l'ALS

Les ALS apparaissent comme des complexes protéiques de hauts poids moléculaires. Ceci explique le choix d'une colonne Sephadex G200 pour déterminer, par tamisage moléculaire, la masse de l'ALS en conditions non dénaturantes. Le domaine de fractionnement du gel G200 s'étend de 5 à 800 kDa pour les protéines globulaires. La calibration de cette colonne a été réalisée à l'aide de protéines de masses moléculaires connues (figure 3). Les protéines (500 μ g), extraites selon le protocole décrit précédemment, sont chargées sur la colonne (dimensions du gel : $\varnothing$ 1,5 x L 63 cm). Le tampon d'élution est composé d'un tampon phosphate de potassium 0,05 M pH 7,5 renfermant 0,15 M NaCl et 0,01 mM FAD. Il est apporté à raison de 0,2 ml.min⁻¹. L'éluat est collecté par fractions de 2 ml. Une quantité aliquote (10 μ l) de chaque fraction est déposée sur une membrane de nitrocellulose. Les protéines y sont fixées par cuisson d'une heure à 80°C. La détection à l'aide de l'anticorps indique la

présence de l'ALS dans les fractions 16 à 20. Ces fractions contiennent les protéines dont les masses moléculaires sont comprises entre 400 et 440 kDa (figure 3).

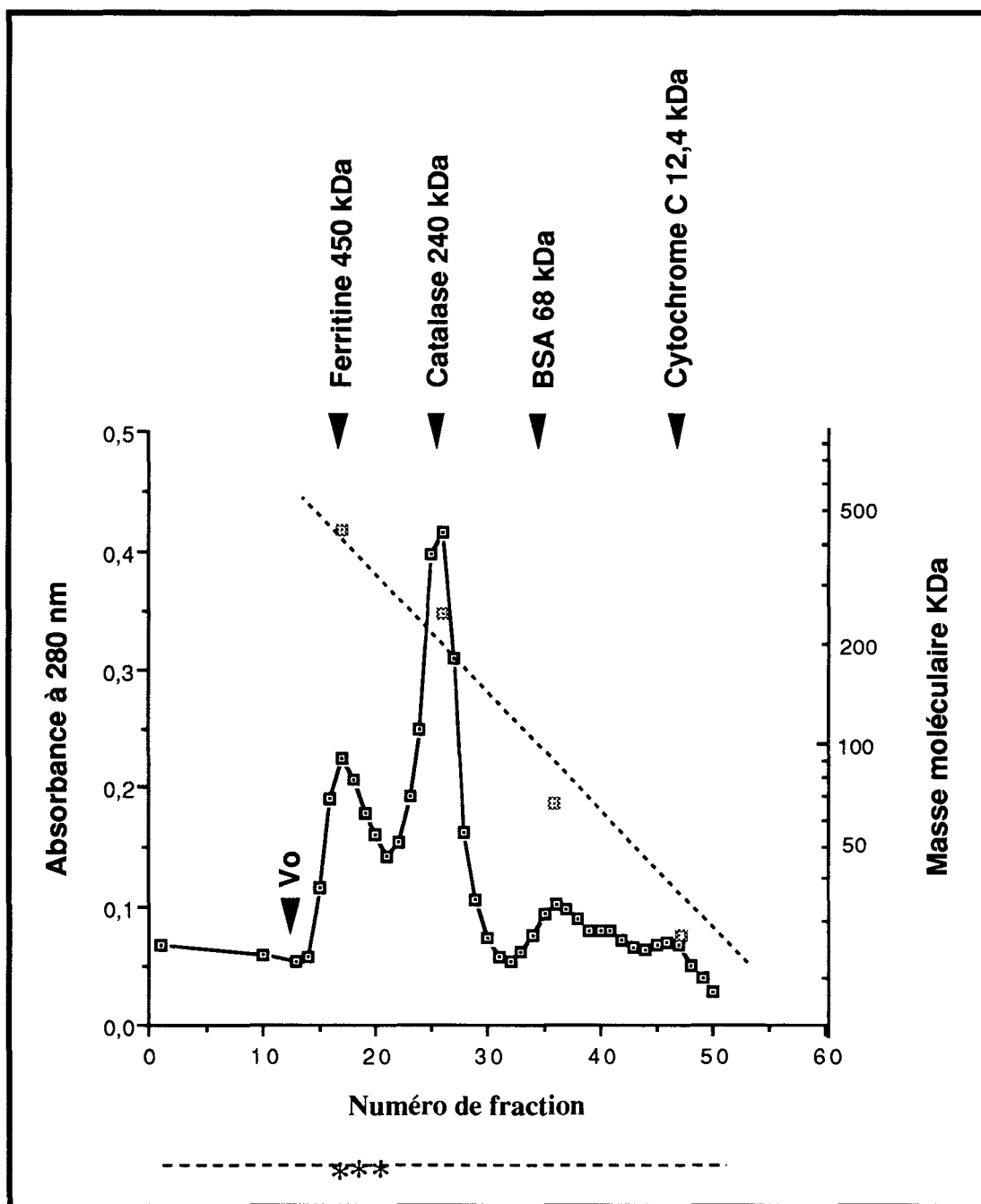


figure 3 : Détermination de la masse moléculaire de l'ALS en conditions non dénaturantes. La calibration de la colonne Sephadex G200, à l'aide de différents marqueurs de poids moléculaires connus, permet d'élaborer le profil d'élution figuré en pointillé. La ligne pleine représente la densité optique lue à 280 nm. Les fractions dans lesquelles a été détectée l'ALS sont indiquées par le symbole *.

2. L'activité enzymatique

2.1. Quelques caractéristiques

Une incubation d'une heure est généralement suffisante pour produire une quantité d'acétoïne aisément dosable par la méthode de Westerfeld (1945). Dans le cas de la chicorée, la faible activité spécifique de l'ALS pose des problèmes de dosage. Bien que la méthode de dosage soit très fiable, ces faibles valeurs de densité optique peuvent constituer une source d'erreur. Il nous fallait donc augmenter le temps d'incubation. Auparavant, afin de vérifier la stabilité de l'activité dans le temps, nous avons effectué une cinétique d'incubation sur des temps plus longs (figure 4).

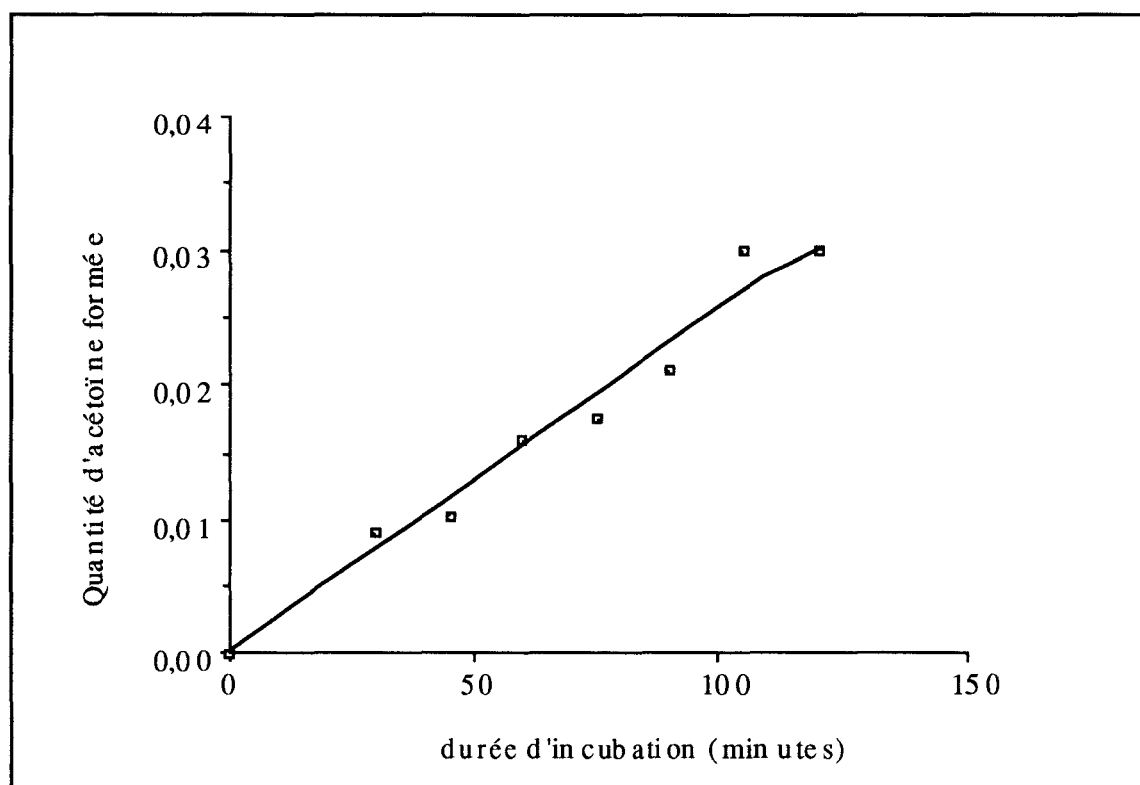


figure 4 : Evolution de l'activité ALS en fonction du temps obtenue pour un extrait de 200 μ g de protéines totales.

L'activité est stable durant les 100 premières minutes puis régresse progressivement. Nous avons donc fixé à 90 minutes le temps d'incubation pour la mesure de l'activité enzymatique. Ce compromis permet de mesurer une absorbance 50% plus élevée tout en étant compatible avec la stabilité de l'enzyme.

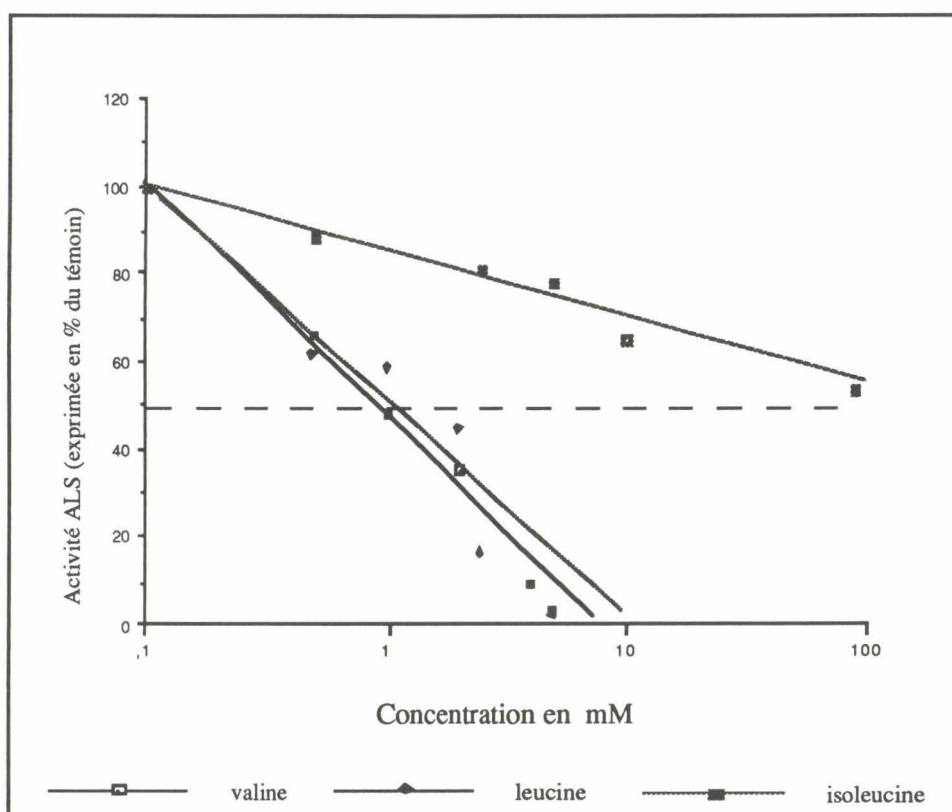


figure 5 : Inhibition de l'activité ALS par les acides aminés branchés.

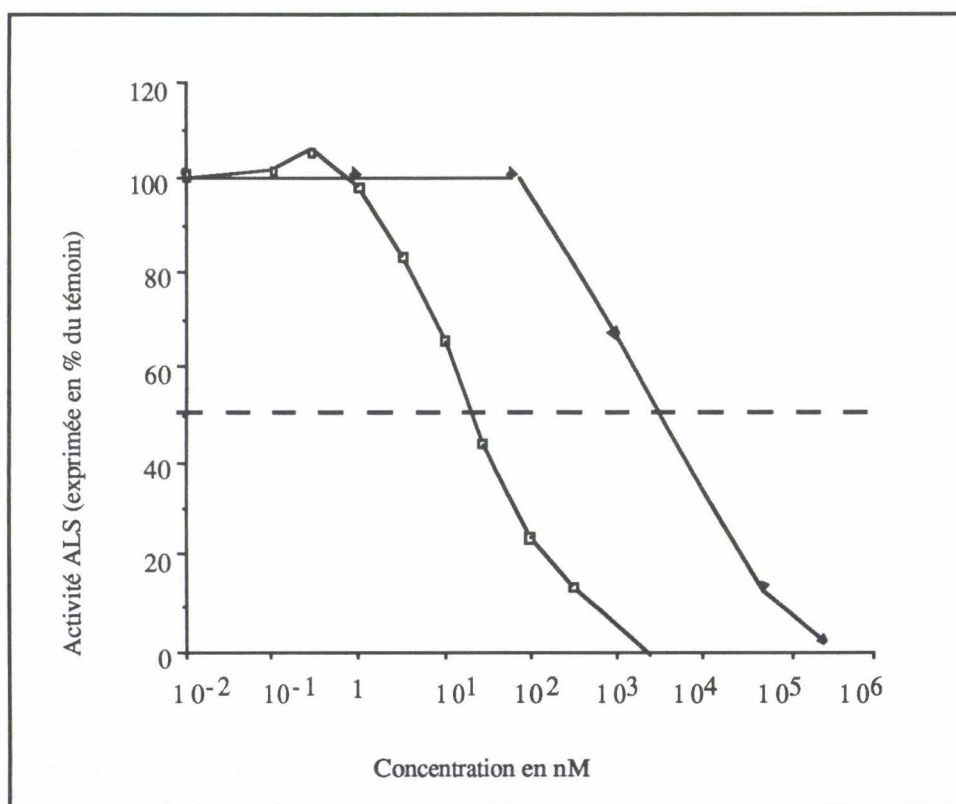


figure 6 : Inhibition de l'activité ALS par le chlorsulfuron () et l'imazaméthabenz ().

Toujours dans le souci de contrôler la stabilité de l'activité enzymatique, celle-ci a été mesurée avant et après une congélation brutale dans l'azote liquide d'un extrait protéique non dessalé. Ce traitement affecte peu l'activité enzymatique puisque l'on retrouve, après congélation, environ 85% de l'activité initiale.

2.2. La régulation allostérique

L'ALS est une enzyme allostérique connue pour être régulée négativement chez les bactéries et les plantes par les acides aminés branchés. Afin de déterminer l'efficacité de ce rétrocontrôle sur l'ALS de chicorée, l'activité enzymatique a été mesurée en présence de concentrations croissantes de valine, leucine ou isoleucine (figure 5).

La valine et la leucine exercent un effet similaire très marqué sur l'activité enzymatique. Une dose de 1 mM est en effet capable d'inhiber la moitié de cette activité.

L'inhibition imposée par l'isoleucine est très faible, 100 mM ne suffisent d'ailleurs pas à inhiber 50% de l'activité. Une expérience similaire réalisée à l'aide d'alanine, qui n'exerce pas de rétrocontrôle sur l'activité ALS, fournit une courbe d'inhibition très proche.

2.3. Les inhibiteurs de l'ALS

Les sulfonylurées et les imidazolinones sont des inhibiteurs puissants de l'activité ALS. L'activité ALS de chicorée a été mesurée en présence de concentrations croissantes de chlorsulfuron et d'imazaméthabenz introduites dans le milieu d'incubation (figure 6). L'ALS de chicorée est également très sensible à ces deux molécules. Les courbes d'inhibition sont parallèles, seule la dose efficace des deux inhibiteurs est différente. Pour inhiber 50% de l'activité, il faut utiliser l'imazaméthabenz à 1,5 μ M alors qu'une telle inhibition est atteinte pour 0,021 μ M de chlorsulfuron.

3. Obtention d'une sonde *als* homologue de la chicorée par PCR

Pour effectuer l'analyse du gène *cials* codant pour la fonction ALS chez la chicorée, nous disposons d'une sonde hétérologue codant pour l'ALS de tabac : le gène *SuRA*, fourni par la société Du Pont de Nemours. Après plusieurs

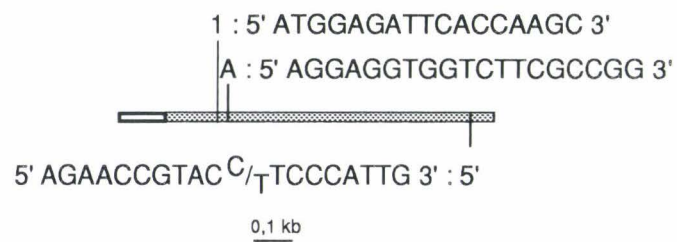
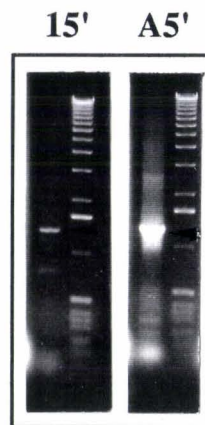


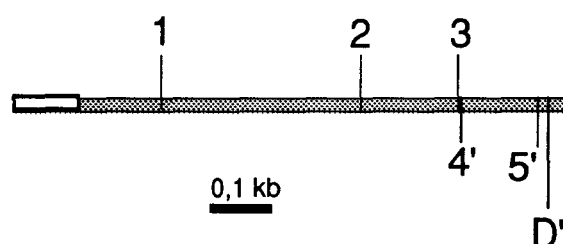
figure 7 : Synthèse d'une sonde als de colza par PCR.
(* Position des amorces sur le gène BNALS).

tentatives infructueuses d'hybridation avec l'ADN génomique et les ARN totaux, pour différentes températures d'hybridation (48 ; 50 ; 52,5 ; 55 et 60 °C), il nous a fallu renoncer à l'emploi de cette sonde sur le matériel chicorée. Une sonde de 1350 nucléotides (*BNALSA5*), représentant 55% du gène *ALS1* de colza (Wiersma *et al.*, 1989) a été obtenue par PCR à l'aide des amorces A et 5' (figure 7). Utilisée dans les mêmes conditions d'hybridation que la sonde issue du tabac, *BNALSA5* n'a pas permis la reconnaissance de son homologue chez la chicorée. Ces deux sondes hétérologues ont également été testées en Southern blot dans un tampon d'hybridation contenant 10% (p/v) de sulfate de dextran et 50% (v/v) de formamide déionisée à 42°C, sans succès. Face à cette impasse, l'obtention d'une sonde homologue par PCR s'imposait.

3.1. Le choix des amorces

Lorsque ce travail a été entrepris, seules les séquences des gènes codant pour les ALS de tabac (*SuRA* et *SuRB*), d'*Arabidopsis thaliana* (*csr*) (Mazur *et al.*, 1987) et de colza (Wiersma *et al.*, 1989) étaient disponibles chez les plantes. Après avoir aligné et comparé leurs séquences, nous avons retenu six courtes régions parmi les domaines les plus conservés du gène, susceptibles de générer des amorces pour une approche PCR.

Trois amorces sens ont été synthétisées à partir des séquences les plus proches de l'extrémité 5' du gène, alors que les trois situées vers l'extrémité 3' du gène ont permis la synthèse d'amorces antisens (figure 8). Le positionnement relatif des amorces retenues est présenté ci-dessous :



Réf	Séquences	Orientation	Position
1	5' ATG GAG ATT CAC CAA GC 3'	sens	(536-553)
2	5' TTT GGG GTG AGG TTT GAT GAT 3'	sens	(1274-1295)
3	5' GGG CAA CAC CAG ATG TGG GCT 3'	sens	(1622-1643)
4'	5' GCC CAC ATC TGG TGT TGC CC 3'	antisens	(1622-1643)
5'	5' AGA ACC GTA C ^C /TT CCC ATT G 3'	antisens	(1883-1902)
D'	5' ACC TTG ACT GGT AGA TGC 3'	antisens	(1950-1968)

figure 8 : Description et positionnement relatif des amorces retenues pour la synthèse par PCR d'une sonde homologue dirigée contre *cials*. La position de chaque amorce est basée sur la séquence de SuRA (Mazur *et al.*, 1987).

3.2. Amplifications et clonages des fragments PCR

L'optimisation de l'amplification par PCR chez la chicorée a permis de fixer les paramètres suivant :

- la quantité d'ADN génomique minimale pour générer une amplification est de 100 ng. Toutefois, l'augmentation jusqu'à un µg permet d'augmenter de façon proportionnelle la quantité de fragments produits. Au-delà, l'amplification aspécifique devient trop importante,

- l'apport de magnésium au tampon d'incubation commercial n'a pas permis d'améliorer l'amplification,

- parmi les *Taq* polymérases utilisées, la *Taq* polymérase commercialisée par Appligène nous a fourni les meilleurs résultats. Quatre unités sont suffisantes pour amplifier de façon reproductible des fragments de taille allant jusqu'à 1,5 kb en 2 minutes,

- la quantité d'amorces utilisées a peu d'incidence sur l'amplification dans nos conditions expérimentales car elles sont toujours en excès. La quantité de chaque amorce est fixée à 250 ng,

- l'étape de polymérisation du dernier cycle d'amplification est prolongée de 2 minutes (soit 4 minutes), de façon à favoriser l'activité terminale transférase de la polymérase. L'ajout préférentiel d'une adénosine aux

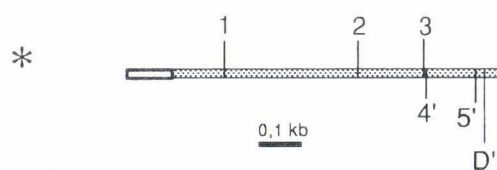
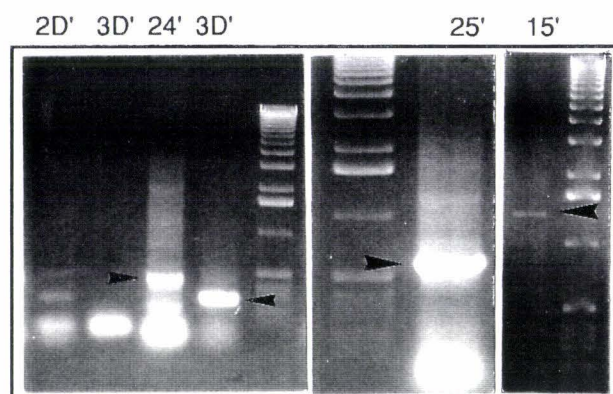


figure 9 : Amplifications à partir d'ADN génomique de chicorée.
 (* Position des amorces sur le gène *ci*als).

extrémités des fragments favorise leur clonage dans les vecteurs de type TA comme le PCRIITM.

Toutes les combinaisons possibles entre les six amorces précédemment décrites ont été testées pour différentes températures d'annealing. Les résultats positifs sont collectés dans le tableau 1 et la figure 9.

Amorces	4'	D	5'
1	51°C <i>1120 nt</i> <i>faible</i>	<i>1279 nt</i> <i>rien</i>	51,5°C <i>1350 nt</i> <i>faible</i>
2	52,5°C <i>590 nt</i>	<i>559 nt</i> <i>rien</i>	52°C <i>630 nt</i>
3		<i>290 nt</i> <i>rien</i>	52,5°C <i>361 nt</i>

tableau 1 : Amplification de fragments d'ADN génomiques par PCR.

Chaque case correspond à une combinaison différente d'amorces. Au sein de chaque case, figure en italique la taille attendue du fragment amplifié en nucléotide (nt) Le chiffre en gras indique la température optimale ayant permis de générer, de la façon la plus spécifique, le fragment attendu.

Les fragments dont la taille était proche de celle attendue ont été clonés dans le vecteur PCRIITM à l'exception des fragments synthétisés à partir des couples d'amorces 1-5' et 1-4' que nous n'avons pas réussi à cloner. En effet, ces amplifications ne permettaient pas une synthèse d'ADN suffisante tout en étant rarement reproductibles.

Les extrémités des fragments 2-4', 2-5' et 3-5' ont été séquencées de façon à s'assurer de la nature du produit amplifié. Les trois produits PCR présentent des homologies marquées avec les séquences publiées des gènes codant pour l'ALS. Comme les fragments 2-4' et 3-5' sont internes au fragment 2-5', seule la séquence de ce dernier a été intégralement déterminée.

Amorce 2

GTAACAGGGAGCTTGAGGCGTTTGCAAGCAGAGCCAAAATCGTTCACATCGACATCG
C N R E L E A F A S R A K I V H I D I

ATTCTGCAGAAATCGGTAAGAACAAGCAACCCCATGTCTCTGTTGTGGTGATATCAAGA
D S A E I G K N K Q P H V S V C G D I K

TCGCATTACAGGGTCTCAACAAAATTCTGGAAGAAAAAGCGAGATGAAAAATCTCGATT
I A L Q G L N K I L E E K S E M K N L D

TCTCATCCTGGAGAAAGGAATTAGACGAACAAAATCAACCANCCCATTAACCTTCAAAA
F S S W R K E L D E Q K S T X P L T F K

CCTTCGGAGATGCATTCTCCAATACGCNATNCAAGTGCTCGATGANTTGACTGGCGGGA
T F G D A F S Q Y X X Q V L D X L T G G

ATGCAATCATAAGCACCGGAGTTGGTCAACACCAGATGTGGGCAGCACAGTTCTACAAAT
N A I I S T G V G Q H Q M W A A Q F Y K

ACACCCCTAGACAGTGGCTGACCTCTGGTGGACTTGGAGCCATGGGGTTTCGGCCTCCCTG
Y T P R Q W L T S G G L G A M G F G L P

CCGCCATTGGTGCCGCTGTTGCAAGACCAGCNGCCATTGTAGTAGACATCGATGGTGATG
A A I G A A V A R P X A I V V D I D G D

GAAGCTTCATGATGAACGTTCAAGAACTCGCCACCATTAGGGTTGAAAATCTTCCCGTTA
G S F M M N V Q E L A T I R V E N L P V

AGATACTTCTACTCAATAACCAACATTTAGGTATGGTGGTT
K I L L L N N Q H L G M V V

Amorce 3

figure 10 : Séquence nucléotidique du produit pcr cials25' et sa traduction en acides aminés.

3.3. Le fragment 2-5'

La séquence nucléotidique du fragment 2-5' (figure 10) présente une homologie allant de 55,2 à 73,8 % avec les séquences des différents gènes connues à ce jour (tableau 2), ce qui se traduit par une homologie voisine de 82 % des séquences protéiques qui en découlent chez les plantes. Ce bon degré de conservation s'explique assez bien malgré les problèmes d'homologie rencontrés lors des hybridations précédentes, car ce fragment correspond à la partie du gène qui code pour le site de fixation de la thiamine pyrophosphate. C'est aussi dans cette région que se trouve le site principal des mutations conférant la résistance aux inhibiteurs de l'ALS.

Organisme	Gène	% d'homologie
Tabac	<i>SuRA</i>	73,8
	<i>SuRB</i>	72,8
Colza	<i>AHAS I</i>	72,0
	<i>AHAS II</i>	71,3
	<i>AHAS III</i>	72,4
<i>Arabidopsis</i>	<i>ATCSR 1,2</i>	71,1
Maïs	<i>ZMAHAS 108</i>	67,9
<i>Saccharomyces</i>	<i>SCILV 2</i>	55,2

tableau 2 : Homologies entre *cials2-5'* et les régions correspondantes de gènes codant pour les ALS de différents organismes.

Ce fragment 2-5' a été utilisé comme sonde afin d'analyser l'activité transcriptionnelle par Northern blot ou l'ADN génomique en Southern blot. Il est capable de reconnaître de façon spécifique et reproductible une séquence du génome de la chicorée.

Ce fragment de 630 nucléotides présentant une homologie marquée vis-à-vis des séquences des gènes codant pour les ALS d'autres espèces et capable d'hybridations spécifiques avec les acides nucléiques de chicorée, constitue une sonde homologue que l'on a nommée *cials25*. Ce nouvel outil est d'un grand intérêt pour l'étude du gène *cials*.

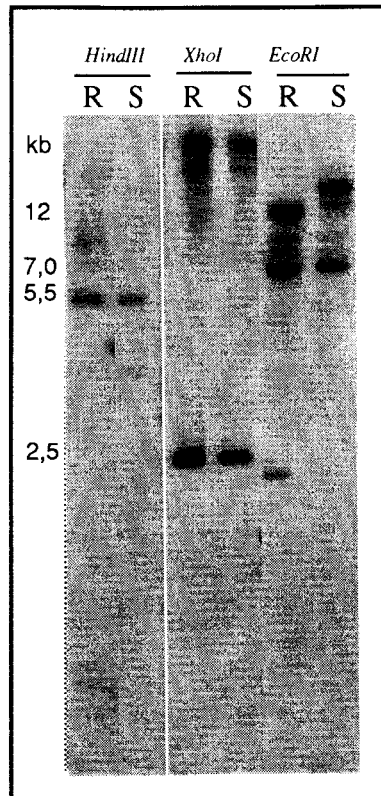


figure 11 : Détermination du nombre de copie(s) du gène *cials*. L'ADN génomique de chicorée a été digéré par les enzymes de restriction *XhoI*, *EcoRI* et *HindIII*. Les fragments obtenus ont été séparés sur gel et hybridés avec la sonde *cials25'*. Les pistes indiquées par un R correspondent à de l'ADN extrait des individus résistants et les pistes indiquées par un S à de l'ADN extrait d'individus sensibles.

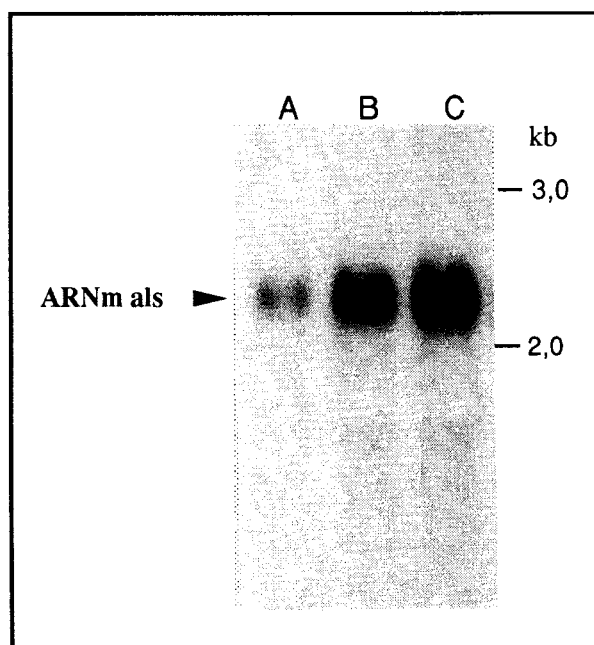


figure 12 : Analyse de l'expression du gène *cials*. par Northern. Les pistes A, B et C correspondent à des dépôts de 5, 10 et 20 µg d'ARN totaux.

4. Détermination du nombre de gène(s) *cials*

Le nombre de gène(s) codant pour l'ALS varie de 1 à 5 selon les espèces. Il est généralement corrélé au degré de ploïdie de l'espèce considérée. Afin de déterminer le nombre de copies du gène *cials* chez la chicorée, l'ADN génomique total a été digéré par les enzymes de restriction *XhoI*, *HindIII* et *EcoRI*, puis hybridé avec la sonde *cials25* (figure 11).

Les profils d'hybridation montrent deux signaux dans les pistes correspondant aux enzymes de restriction qui présentent un site de coupure dans la sonde. Les autres ne présentent qu'un seul fragment de séquence complémentaire de la sonde. Ces observations indiquent qu'il n'existerait qu'un seul gène codant pour l'ALS de chicorée. Néanmoins, on ne peut écarter définitivement l'existence d'un second gène, dont la différence d'homologie avec *cials25* ne lui permettrait pas d'être reconnu par la sonde dans nos conditions expérimentales. En effet, une diminution de la température d'annealing lors de la PCR qui permet l'obtention de *cials25*, provoque l'apparition de fragments fortement amplifiés dont la taille est proche de celle de *cials25*.

L'utilisation de l'enzyme de restriction *EcoRI* permet de mettre en évidence un polymorphisme de restriction entre les ADN issus des souches de chicorée sensibles et tolérantes, alors que les profils obtenus pour les deux souches en utilisant les enzymes *XhoI* et *HindIII* sont identiques.

5. Détermination de la taille de l'ARN messager(s) *cials*

Les analyses réalisées en Northern blot sur les ARN totaux de différentes plantes, d'une même plante à différents stades de développement ou de plantes isogéniques placées dans des conditions de culture différentes, ne révèlent qu'un seul transcrit dont la taille est voisine de 2,2 kb (figure 12). Des hybridations réalisées à des températures plus basses (48, 50 et 55°C) n'ont pas permis la mise en évidence d'éventuels transcrits *als* d'un degré d'homologie inférieur.

6. Conclusion

L'ALS de chicorée se présente comme un complexe protéique de haut poids moléculaire composé d'un peptide de base de 57 kDa. Par PCR, nous avons pu générer une sonde de 630 nucléotides correspondant au site de fixation de la thiamine pyrophosphate : une région bien conservée du gène. La séquence nucléotidique du fragment obtenu présente une homologie proche de

70% avec celle des gènes, codant pour les ALS, isolées à ce jour. Cette sonde homologue a permis de mettre en évidence un ARN messenger *als* unique de 2,2 kb. Les hybridations réalisées sur l'ADN génomique ne révèlent qu'un seul gène *als* par génome haploïde. L'unicité rencontrée, tant sur le plan immunologique que moléculaire, sont des éléments qui tendent à prouver le déterminisme monogénique de l'acétolactate synthétase chez la chicorée.

Après avoir caractérisé la structure de l'ALS, nous avons mesuré son activité enzymatique en présence de différents inhibiteurs. Il apparaît que l'activité ALS est régulée de façon allostérique non seulement par la valine, la leucine et à un degré moindre par l'isoleucine mais aussi par les herbicides de la famille des sulfonilurées et des imidazolinones qui sont de puissants inhibiteurs de l'ALS.

- *EXPRESSION DE CIALS* -

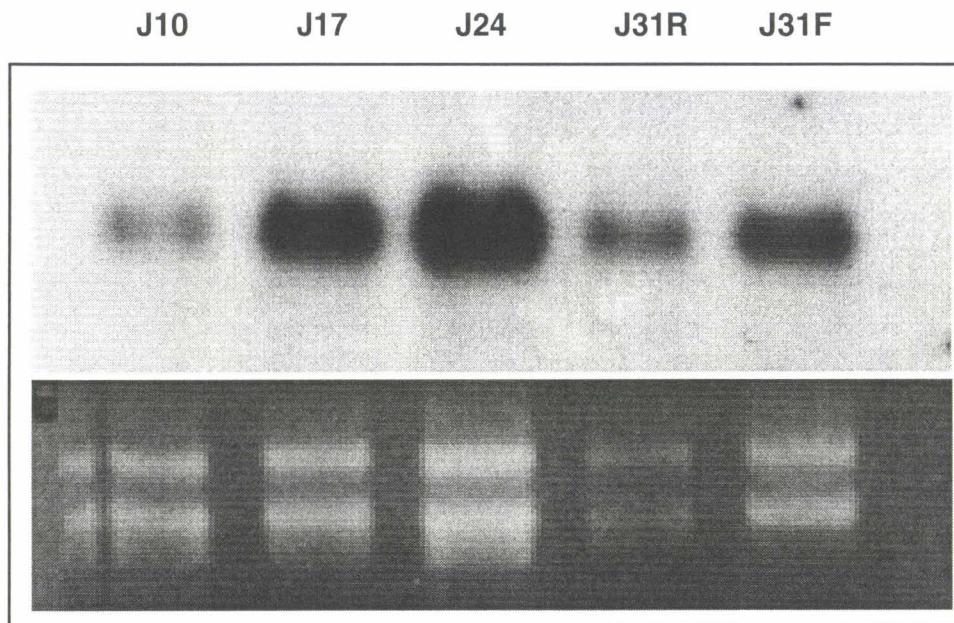


figure 1 : Analyse en Northern blot de la transcription de *cial25* durant les premiers stades de développement de la chicorée. L'hybridation a été réalisée à l'aide de la sonde *cial25* sur l'ARN extrait de plantules de 10 (J10), 17 (J17), 24 (J24) et 31 (J31) jours. Au 31ème jour, la transcription du gène *cial25* dans les feuilles et les racines est étudiée séparément. La photo permet la comparaison des dépôts d'ARN totaux.

III. Expression de *cials*

La régulation *in situ* de l'ALS est relativement peu décrite chez les plantes. Pour cette raison, nous avons étudié la transcription du gène *cials*, parallèlement à la mesure de l'activité enzymatique en fonction du stade de développement de la plante.

1. L'expression de *cials* chez la chicorée

1.1. Les premiers stades végétatifs

L'expression d'un gène est souvent modulée par des modifications de l'environnement dans lequel sont placés les organismes. Aussi, pour s'affranchir des aléas d'une culture en serre, les akènes de chicorée ont été, après aseptisation, cultivés *in vitro* sur milieu H2O. La culture des plantules en tube sur ce milieu n'est possible que durant un mois. Afin de suivre l'évolution de la régulation de la fonction ALS, l'activité ALS a été déterminée tous les 7 jours. L'intensité de la transcription du gène *cials* au cours de ce mois a également été analysée (figure 1 et tableau 1).

Jours	J10	J17	J24	J31
Stade végétatif	1 feuille	2 feuilles	4 feuilles	6 feuilles
Masse MF en mg	15	45	137	220
Activité ALS	3,1	12,2	34,7	22,1
ARNm ALS	1,0	1,19	1,42	2,77

tableau 1 : Evolution de l'activité ALS et de la transcription du gène *cials* au cours des premiers stades de développement de la chicorée. L'activité est exprimée en pKat.mg^{-1} de protéine. Les teneurs en ARNm-ALS sont exprimées en fonction de la quantité d'ARNm-ALS détectée pour la condition J10.

L'activité et la transcription augmentent parallèlement à la production de biomasse au cours du développement de la jeune plantule. Afin de confirmer le lien qui existe entre la croissance et la fonction ALS, nous avons

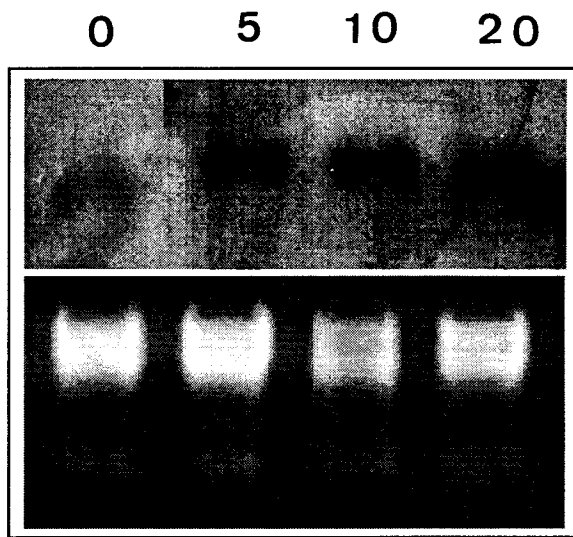


figure 2 : Analyse en Northern blot de la transcription de cials chez les plantules de chicorée cultivées sur le milieu H₂O contenant 0, 5, 10 et 20 g.l⁻¹ de saccharose

mesuré l'activité et la transcription de l'ALS sur des plantules cultivées en présence de concentrations croissantes de saccharose dans le milieu de culture. L'apport de saccharose au milieu de culture stimule la croissance des plantules de chicorée lorsqu'il est utilisé à des doses inférieures à 25 g.l⁻¹. Dans ces conditions, la transcription du gène *cials* est corrélée à la présence de sucre dans le milieu de culture et ce, jusqu'à des doses de 20 g.l⁻¹ (figure 2 et tableau 2). Au-delà, la quantité d'ARN messagers de l'ALS demeure constante. L'activité enzymatique suit l'évolution des teneurs en ARNm-ALS pour des doses de saccharose inférieures à 10 g.l⁻¹.

Saccharose g.l ⁻¹	0	5	10	20
Masse MF en mg	90,9	151	166	276
Activité ALS	0,4	4,5	11,9	22,1
ARNm ALS	1,0	2,8	6,7	8,8

tableau 2 : Evolution de l'activité ALS et de la transcription du gène *cials* en fonction de la concentration en saccharose dans le milieu de culture. L'activité est exprimée en pKat.mg⁻¹ de protéine. Les teneurs en ARNm-ALS sont exprimées en fonction de la quantité d'ARNm-ALS détectée pour la condition saccharose 0.

1.2. La phase reproductrice

La floraison de la chicorée (annexe 1) se prolonge plusieurs mois, aussi est-il possible de trouver sur un même individu des inflorescences à tous stades de développement. Ceci permet de comparer aisément les lieux d'expression de *cials* au sein des différents organes d'une même plante sans devoir envisager le passage obligé de la culture *in vitro* (rappelons qu'une chicorée en phase reproductrice mesure plus de 1,50m).

Les organes reproducteurs ne pouvant être séparés à cause de la petite taille et de la fragilité des fleurs, l'activité ALS et le taux de transcrits ont été mesurés dans les inflorescences. Ceci ne constitue pas un obstacle à l'interprétation des résultats puisque dans un capitule, toutes les fleurs sont sensiblement au même stade de développement. Les inflorescences ont donc été regroupées en trois classes : avant fécondation (non ouvertes), fécondées depuis peu (fleurs ouvertes) et en post-fécondation (fleurs fanées).

La partie végétative de la plante a, quant à elle, été divisée en 4 parties : la racine tubérisée, les feuilles, les bractées inflorescentielles et les hampes florales.

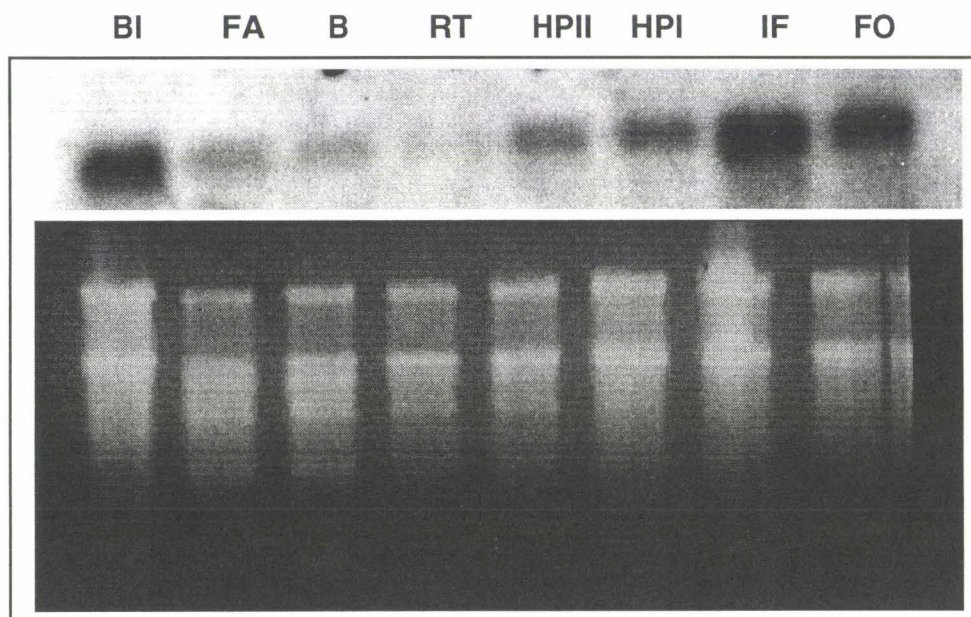


figure 3 : Analyse en Northern blot de la transcription de *cials* dans les différents organes de chicorée lors en floraison (BI : bouton inflorescentiel ; FA : feuille agée ; B : bractée inflorescentielle ; RT : racine tubérisée ; HPI : hampe florale principale ; HPII : hampe florale latérale ; IF : inflorescence fécondée ; FO : fleur ouverte). L'hybridation a été réalisée à l'aide de la sonde *cials25*. La photo permet la comparaison des dépôts d'ARN totaux.

Organe	RT	FA	B	HPI	HPH	BI	FO	IF
Activité ALS	2,6	4,0	5,45	6,3	5,8	10,8	14,1	24,9
ARNm ALS	1,0	1,1	1,2	1,5	1,3	5,3	8,1	11,2

tableau 3 : Comparaison de l'activité ALS et de la transcription du gène *cials* au sein des différents organes d'une plante en fleur (RT : racine tubérisée ; FA : feuille âgée ; B : bractée inflorescentielle ; HPI : hampe florale principale ; HPH : hampe florale latérale BI bouton inflorescentiel ; FO : fleur ouverte ; IF : inflorescence fécondée). L'activité est exprimée en $\mu\text{Kat.mg}^{-1}$ de protéine. Les teneurs en ARNm-ALS sont exprimées en fonction de la quantité d'ARNm-ALS détectée pour la condition racine tubérisée (RT).

L'appareil végétatif présente une activité enzymatique et un taux d'ARNm-ALS assez homogènes mais très faibles, alors que la partie reproductrice est le siège à la fois d'une transcription et d'une activité nettement supérieures (figure 3 et tableau 3). Deux observations sont à noter :

- la mise en place et la croissance des pièces florales lors de l'ouverture de la fleur engendrent une augmentation de la fonction ALS.
- la fécondation et le développement du zygote sont eux aussi cause d'une augmentation importante de l'activité.

Ces augmentations d'activité ALS sont corrélées à l'augmentation de la transcription de *cials*.

2. Localisation de l'expression de *cials* dans la racine

La technique d'hybridation *in situ* sur organes entiers décrite par de Ferreira *et al.* (1994) et adaptée à la chicorée par Palms *et al.* (1996), génère un signal aspécifique lorsqu'elle est utilisée sur l'appareil aérien et ne semble fiable, chez la chicorée, que sur des organes racinaires. En effet, l'utilisation de sonde ARN sens produit sur ce matériel foliaire un signal identique à celui généré par la sonde anti-sens.

Les méristèmes primaires situés dans la zone subapicale des racines (planche A : photos 1, 3 et 4) sont les sièges privilégiés de la transcription de *cials*. Aucun signal n'est décelable au sein des tissus différenciés de la coiffe, de l'épiderme ou de la stèle (planche A : photos 1 à 6).

Lors de la ramification du système racinaire, des cellules du péricycle se différencient et prolifèrent pour donner naissance à un massif de cellules aux caractéristiques méristématiques : le primordium de la racine latérale. La transcription de *cials* est très forte au sein de ces massifs qui donnent naissance à ces racines latérales (Planche A : photos 2, 5 et 6). Ce phénomène intervient à distance du méristème primaire, au niveau de cellules différenciées. Une poche digestive provoquant la lyse des tissus corticaux se forme, permettant le développement du primordium et l'émergence de la racine latérale (Planche B : photos 1, 2 et 3). Au fur et à mesure de la différenciation des cellules issues de ce méristème apical néoformé, la transcription diminue, puis disparaît alors qu'elle reste forte dans les cellules en division active. Paradoxalement, elle se maintient à un niveau élevé au sein du massif initial, où s'effectue le raccordement des systèmes vasculaires de la racine néoformée à ceux de la racine dont elle est issue.

Cette localisation ne fluctue ni avec l'âge ni avec la fonction de la racine. En effet, on retrouve toujours les ARN messagers *als* dans les méristèmes apicaux des radicules émergeant de la graine, de la racine primaire ou latérale des plantules au stade deux cotylédons, deux feuilles vraies ou encore dans une racine qui débute sa phase de tubérisation (Planche C : photos 2, 3 et 4).

La transcription de *cials* est donc limitée aux cellules en division (Planche D: photos 1a et 1b). Toutefois, cela n'implique pas forcément une transcription préférentielle de ce gène au sein de ces zones. Les colorations nucléaires au Feulgen montrent en effet une densité supérieure des noyaux en ces points par rapport au reste de la racine, ce qui traduit l'existence de cellules jeunes, petites et très nombreuses. D'autre part, l'activité transcriptionnelle générale y est sans doute plus élevée qu'ailleurs.

Il est cependant intéressant de noter une superposition des lieux de transcription de *cials* et des profils d'expression du gène *uidA* placé sous le contrôle du promoteur *cyclAt* actives (Planche D : photos 3) chez des chicorées transgéniques (Kimpe, communication personnelle). Ce promoteur permet l'expression de la cycline mitotique *CyclAt* juste avant l'induction de la mitose au niveau des zones de division active chez *Arabidopsis thaliana*. Chez les chicorées transgéniques, l'expression se trouve localisée au niveau des zones d'élongation et de croissance racinaire, plus particulièrement au niveau des méristèmes des apex racinaires et des *primordia* latéraux (Kimpe, communication personnelle).

Ferreira *et al.* (1994) ont montré que chez *Arabidopsis thaliana*, ce gène était transcrit lors de la formation de racines latérales à partir des cellules du péricycle, mais également au niveau des cellules destinées à générer le phloème et le xylème lors de la connexion des systèmes vasculaires de la racine latérale à celui de la racine parentale. L'emploi d'inhibiteurs de la division cellulaire tels que l'oryzaline chez la chicorée inhibe la formation des *primordia* et de la croissance des racines. La désorganisation du réseau de microtubules empêche

la formation des phragmoplastes et par conséquent la cytodiérèse, conduisant à l'apparition de grosses cellules polyploïdes. Tout comme Ferreira *et al.* (1994) ont pu observer la transcription du gène *cyclAt* chez *Arabidopsis thaliana*, nous observons une accumulation des ARN messagers de l'ALS au niveau des zones décrites précédemment (Planche B).

Toutes ces observations mettent en évidence des régulations colocalisées des gènes *cials* et *cyclAt*.

Planche A : Localisation de la transcription du gène cials au sein du système racinaire de chicorée. Les plantules âgées d'un mois ont été cultivées sur milieu H2O. L'hybridation in situ réalisée avec la sonde ARN cial25 sens (photos 1 et 2) sert de contrôle négatif, alors que celle utilisant la sonde ARN cials25 anti-sens permet la localisation de la transcription (photos 3 et 4). Les tissus sont légèrement écrasés, de façon à mieux apprécier les assises de cellules qui présentent une transcription active du gène cials (photos 5 et 6) (le chiffre au dessus de la barre indique la valeur correspondante en micromètres). La signification des abréviations est : stèle (St), apex racinaire (ar), méristème subapical (ms), méristème latéral (ml), pôle vasculaire (pv), racine primaire (r1), racine secondaire (r2), coiffe (c).

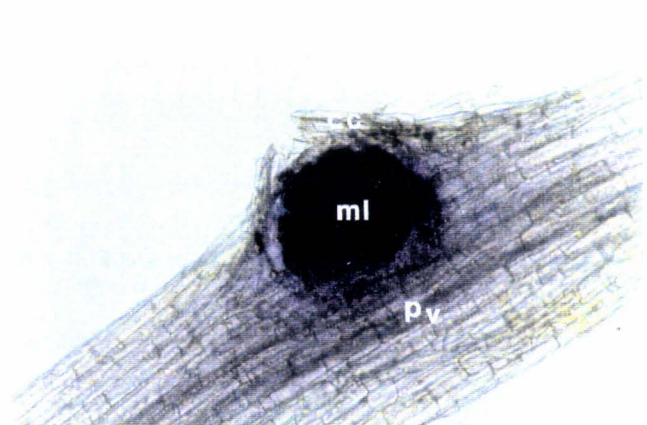
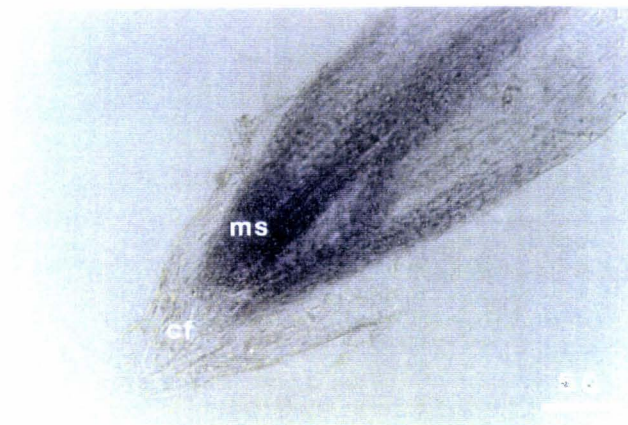
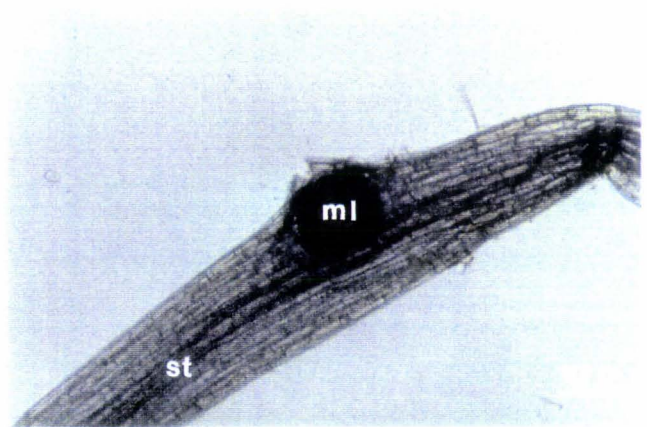
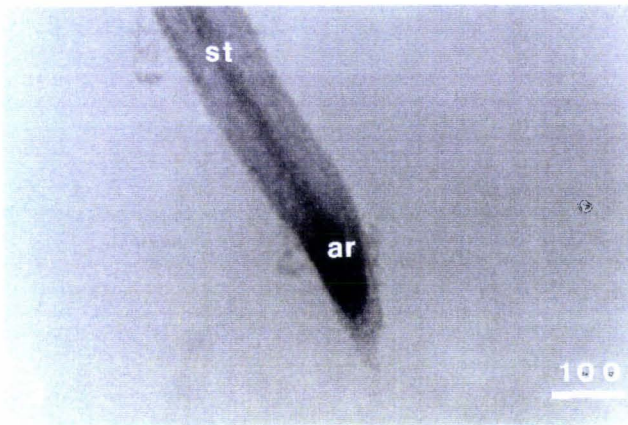
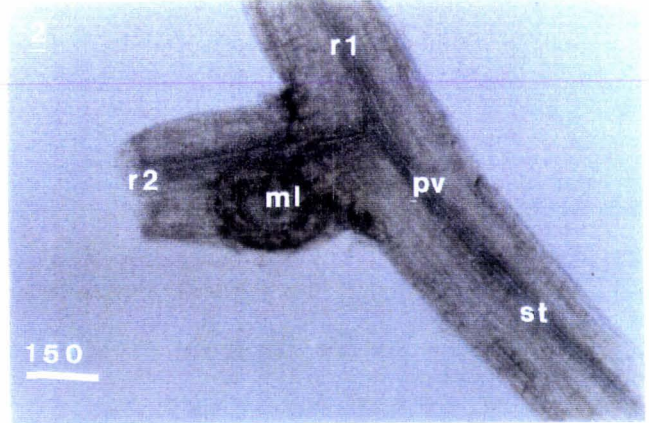
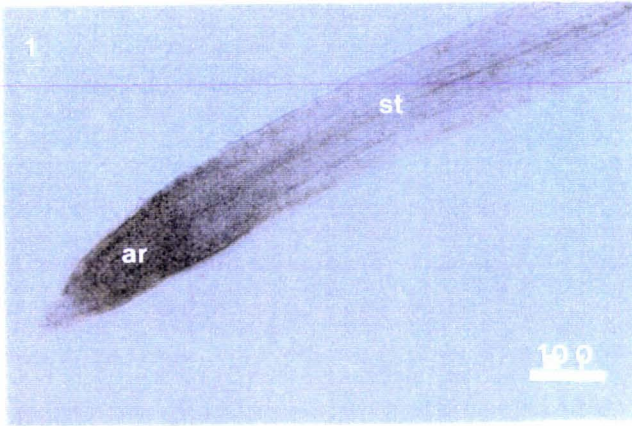


Planche B : Localisation de la transcription du gène cials lors de la différenciation d'une racine latérale de chicorée. L'hybridation est réalisée avec la sonde ARN cials25 anti-sens sur des plantules âgées d'un mois cultivées sur milieu H2O en présence de 30 μ M d'oryzaline. La transcription est forte au sein du primordium racinaire (pr) qui est à l'origine du méristème latéral (ml), et du méristème subapical néoformé (msn) de la racine latérale (r2), alors qu'elle est absente des cellules corticales (cc). (le chiffre au dessus de la barre indique la valeur correspondante en micromètres).

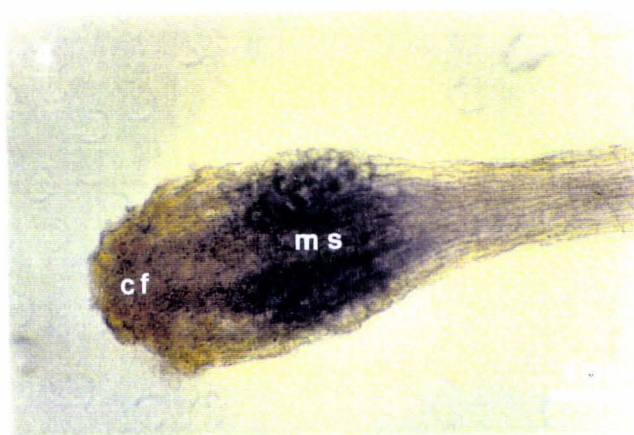
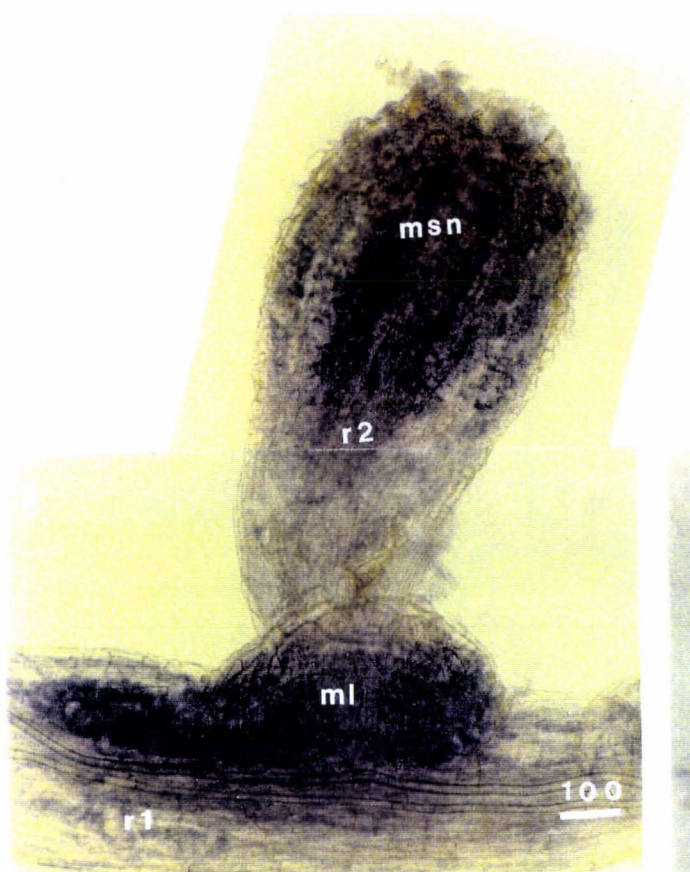
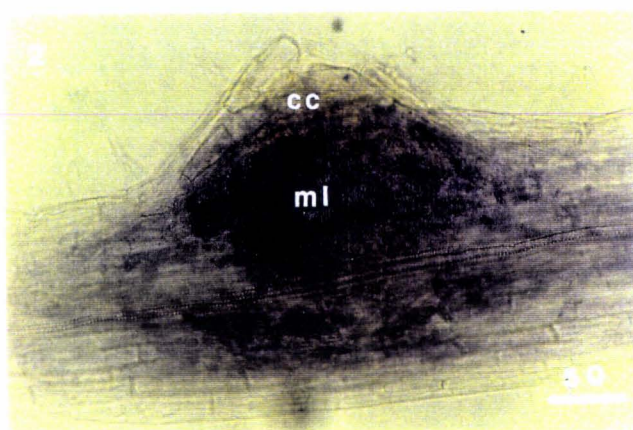
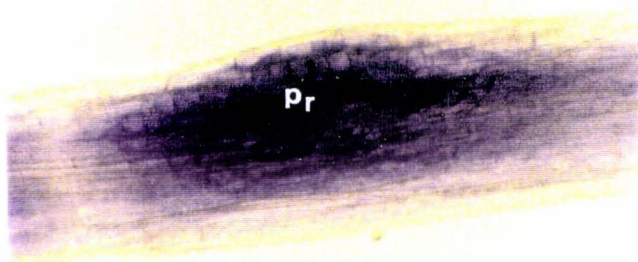


Planche C : Localisation de la transcription du gène ciats lors de la différenciation racinaire chez la chicorée. L'hybridation est réalisée avec la sonde ARN ciats25 anti-sens sur des plantules âgées d'une semaine (photo 2) et de deux mois (photo 3) cultivées sur milieu H2O. La transcription est limitée aux méristèmes subapicaux (ms). La photo 1 représente l'hybridation obtenue lorsque la sonde sens est utilisée sur des racines de plantules âgées de deux mois (le chiffre au dessus de la barre indique la valeur correspondante en micromètres). L'abréviation ms indique la position du méristème subapical.

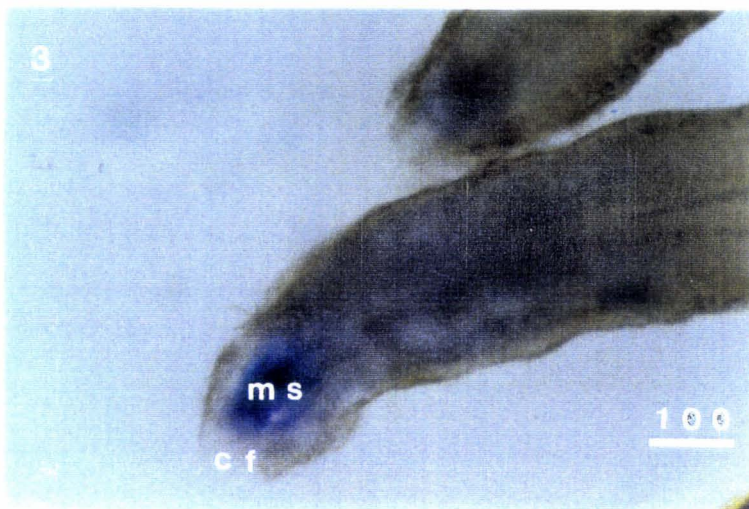
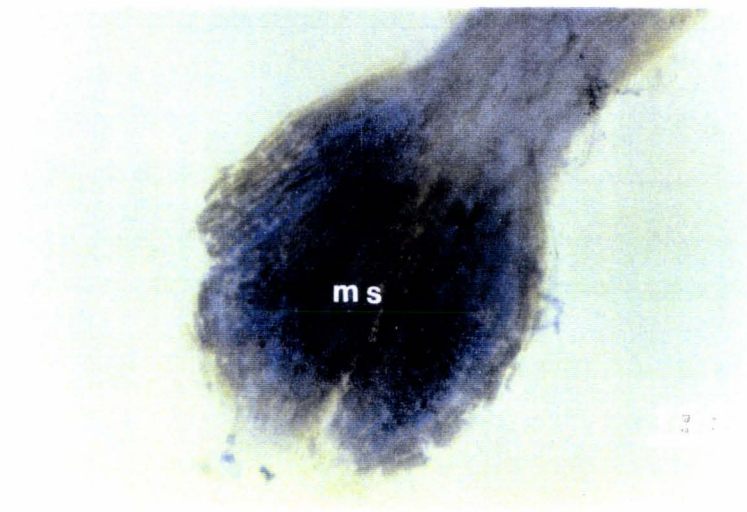
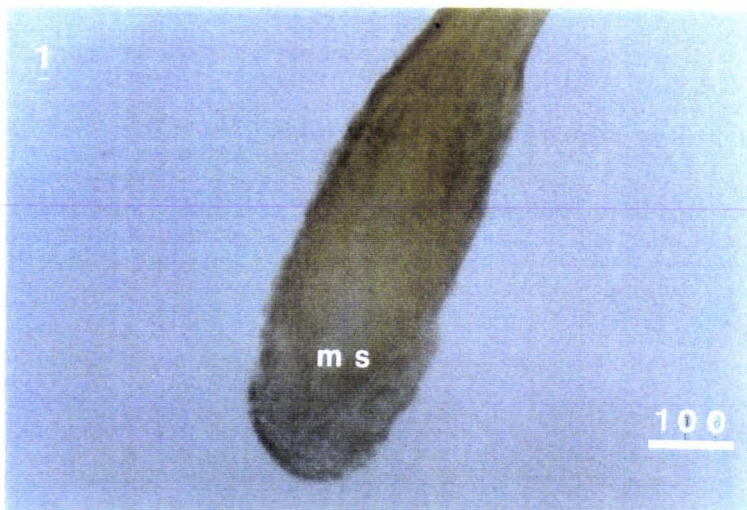
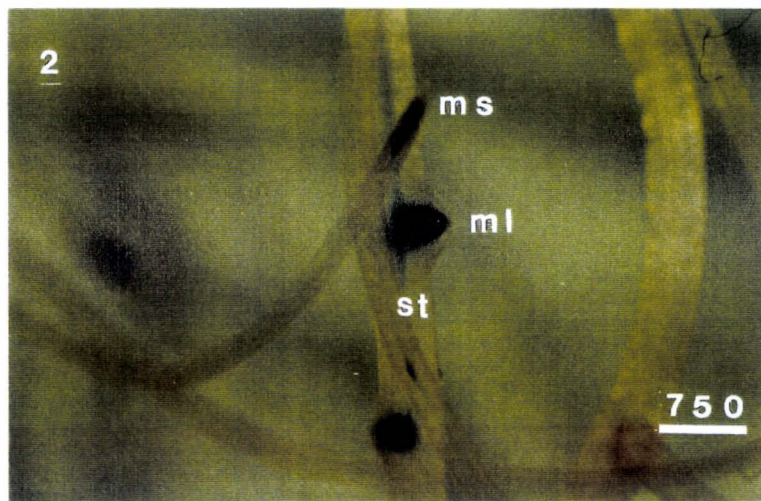
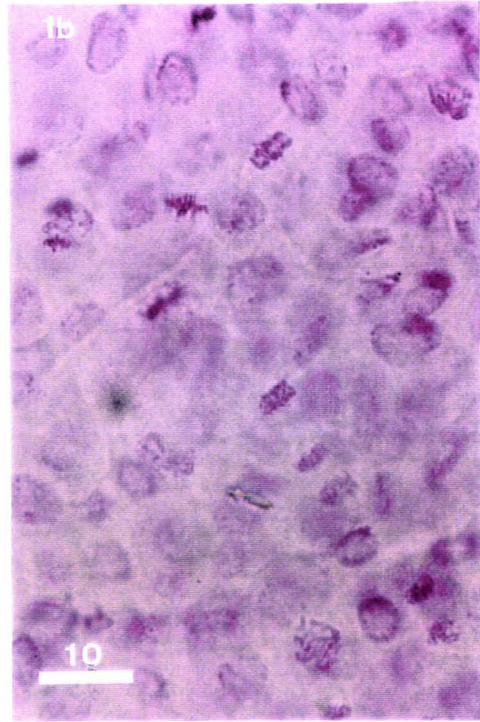


Planche D :

Photo 1 : Localisation de la division cellulaire dans la racine de chicorée. La coloration selon la technique de Feulgen permet de situer la zone de division et d'élongation des cellules au sein de la racine (photo 1a). La photo 1b montre les figures de divisions cellulaires au sein de ce méristème.

Photo 2 : Localisation de l'expression du gène uidA placé sous le contrôle du promoteur cyclAt dans le système racinaire de chicorées transgéniques. La signification des abréviations est : stèle (St), méristème subapical (ms), méristème latéral (ml).

(le chiffre au-dessus de la barre indique la valeur correspondante en micromètres).



- ANALYSE DE LA SOUCHE R1OK -

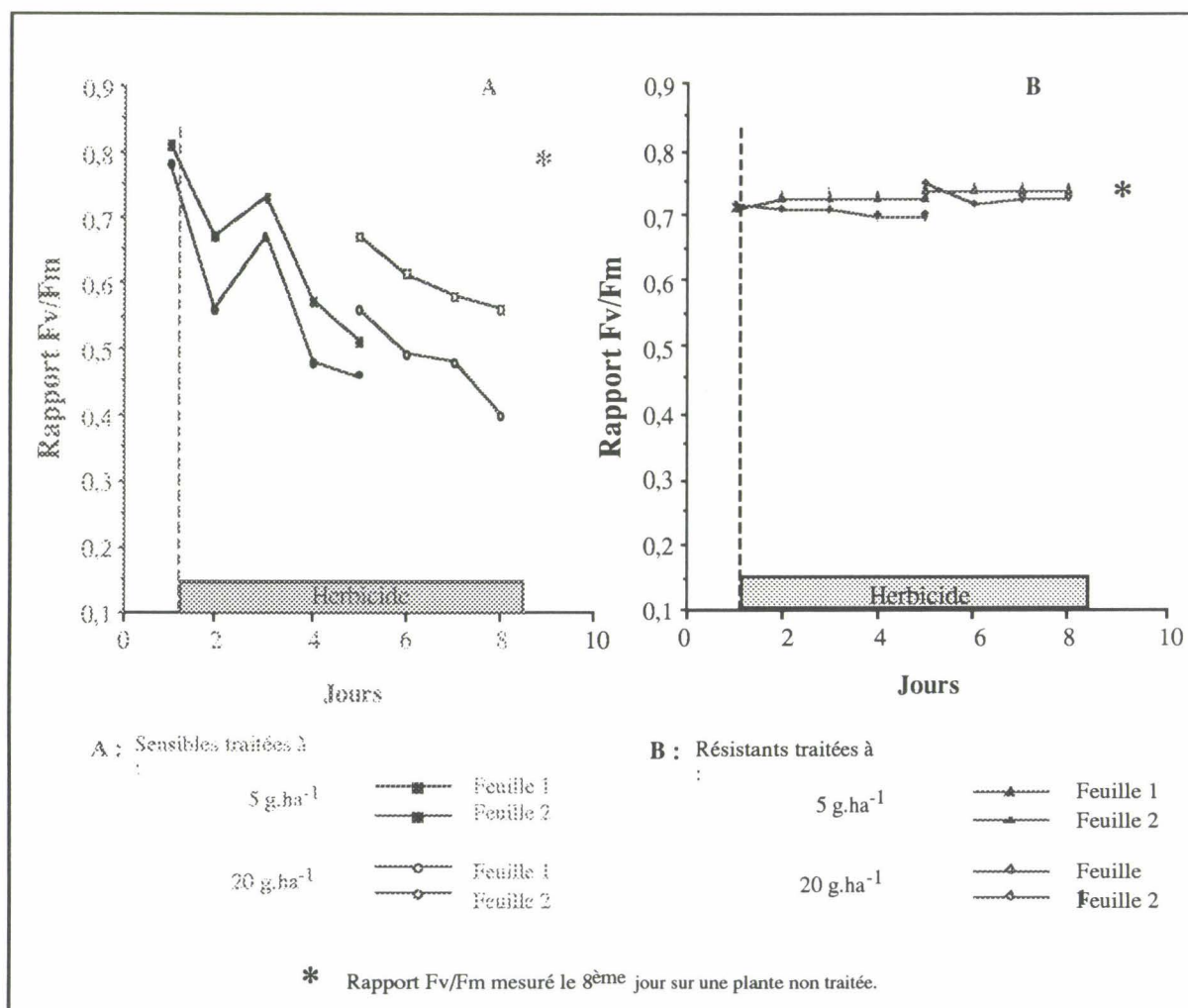


figure 1 : Evolution du potentiel photochimique des chicorées résistantes (B) consécutivement à l'application foliaire de 0 ; 5 et 20 g de chlorsulfuron par ha. La période de traitement est indiquée par le cadre grisé. Le graphe obtenu pour l'expérimentation identique chez les individus sensibles est donné en rappel (A). Le rapport Fv/Fm ne fluctue pas chez les individus sensibles non traités. Il n'est donc représenté qu'au 8^{ème} jours.

IV. Analyse des individus R1OK

1. Description du mutant

Comme l'a montré Millecamps (1989), la souche R1OK, isolée à partir de suspensions cellulaires, est capable de croître en présence de doses de chlorsulfuron 1000 fois supérieures à celles qui provoquaient la mort de la lignée initiale (28 nM). Cette résistance se confirme au niveau de la plante entière (tableau 1) puisque les doses habituellement utilisées pour contrôler les adventices n'affectent ni la croissance, ni le développement des individus tolérants, qu'ils soient homo ou hétéro-zygotes pour ce caractère. Les chicorées de la souche R1OK et de ses descendants peuvent par un simple traitement herbicide être distinguées des individus sensibles (planche E) .

chlorsulfuron (g.ha ⁻¹)	Masse de matière fraîche (% du non traité)	
	Sensibles	Résistants
0	100	100
2	8,8	119
20	5,8	141

tableau 1 : Effet d'une application foliaire de 2 et 20 g.ha⁻¹ de chlorsulfuron sur la production primaire des individus sensibles et résistants. La masse moyenne de 25 plantules est exprimée en fonction de la production de chaque génotype en absence d'herbicide.

Afin de compléter ces observations visuelles et pondérales, des mesures de fluorescence ont été réalisées sur les individus résistants ayant reçu une application foliaire équivalente à 5 et 20 g de chlorsulfuron par ha (figure 1). Le rapport Fv/Fm, mesuré avant traitement, est légèrement plus faible chez les individus résistants (0,71-0,72) que celui observé chez les individus sensibles (0,78-0,81). Ces valeurs reflètent la faible différence de développement foliaire observée entre les deux lots de plantes.

Contrairement à ce qui avait été observé chez les individus sensibles, le traitement herbicide n'affecte pas ce rapport et ce, quelle que soit la dose appliquée. Il apparaît donc que le métabolisme général de ces plantes n'est pas perturbé, ce qui explique l'absence des symptômes observés consécutivement à un traitement au chlorsulfuron chez les individus sensibles.

Le choix d'une référence à prendre en compte lorsque l'on veut comparer deux types de plantes, d'un point de vue biomasse ou activité enzymatique, est toujours un point délicat. Aussi, avons-nous jugé nécessaire de comparer de quelques caractères biométriques entre individus sensibles et résistants, cultivés dans les mêmes conditions (tableau 2).

	Sensibles	Résistants
Masse de matière fraîche	2,35	1,95
Masse de matière sèche	0,32	0,27
% de matière sèche	13,6	13,8
Teneur en protéine ($\mu\text{g.g}$ de MS^{-1})	5,2	5,0

tableau 2 : Comparaisons de quelques paramètres biométriques chez les individus sensibles et résistants. Les différents paramètres ont été déterminés sur des plantules âgées d'un mois cultivées en serre.

2. Le mécanisme de la résistance aux sulfonylurées

La chicorée n'est pas naturellement résistante aux inhibiteurs de l'ALS. L'acquisition de ce caractère implique, soit des modifications qualitatives et/ou quantitatives de la protéine cible, soit la mise en place d'un système de détoxication.

2.1. L'ALS

L'activité spécifique ALS mesurée chez les individus résistants est de $7,8 \pm 0,8$ pKat.mg⁻¹ de protéine, soit 35% plus faible que celle observée chez les individus sensibles qui est de $12 \pm 1,1$ pKat.mg⁻¹ de protéine. L'activité spécifique reflète la potentialité enzymatique présente dans l'extrait mais ne représente qu'un indicateur pour une protéine aussi labile que l'ALS. La quantification de la protéine s'impose donc.

2.1.1. Comparaison des teneurs en ALS entre individus sensibles et tolérants

Les faibles teneurs en ALS chez la chicorée ne nous ont pas autorisé l'emploi de la technique ELISA pour le dosage de cette protéine. De plus, un dosage absolu n'est pas possible car nous ne disposons pas de la forme purifiée de l'enzyme. Par conséquent, nous nous limiterons à l'analyse semi-quantitative par la technique Western blot pour deux gammes de protéines, l'une issue d'individus sensibles et l'autre d'individus tolérants (figure 2), qui nous a permis de comparer les teneurs en ALS des deux souches.

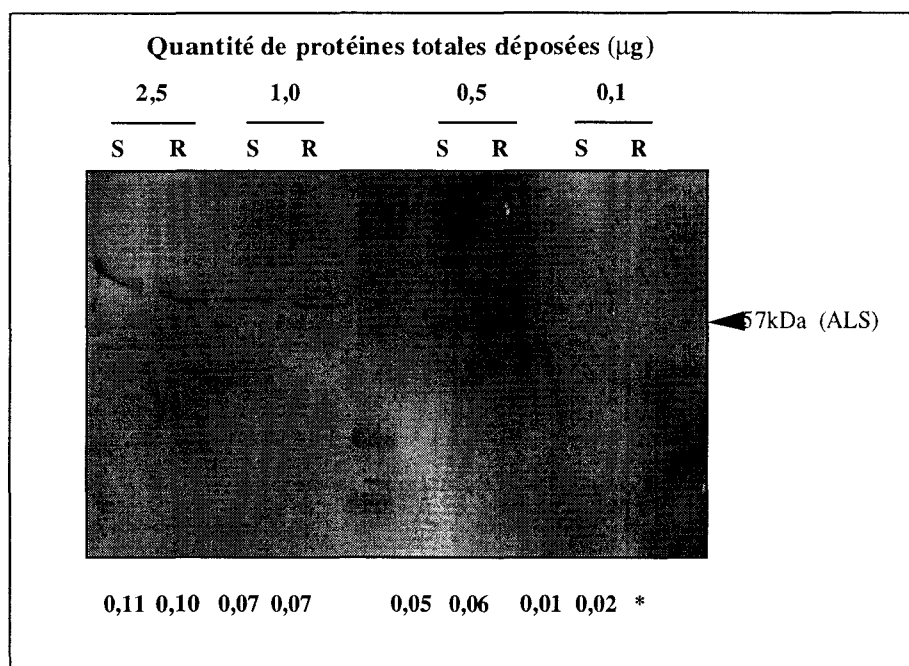


figure 2 : Comparaison des teneurs en ALS chez les souches sensible (S) et tolérante (R). La protéine ALS est détectée par l'anticorps FI4. L'analyse densitométrique n'indique pas de différence significative entre les deux conditions. (* Valeurs de quantification obtenues à l'aide du logiciel NIH-1,56).

Les signaux observés pour les dépôts de 2,5 ; 1,0 et 0,5 µg de protéines sont d'intensités très proches pour une concentration donnée chez les deux types d'individus. En-deçà de 0,5 µg, il n'est plus possible de distinguer de signal aussi bien chez les individus sensibles que tolérants. Les teneurs en ALS chez les deux souches sont donc très proches.

2.1.2. Comparaison de la transcription chez les souches sensible et résistante

Une hybridation à l'aide de la sonde *cials25* réalisée sur une même quantité d'ARN totaux, extraits sur des plantules d'un mois cultivées *in vitro*, n'indique aucune différence significative entre les signaux obtenus pour chacun des dépôts (figure 3).

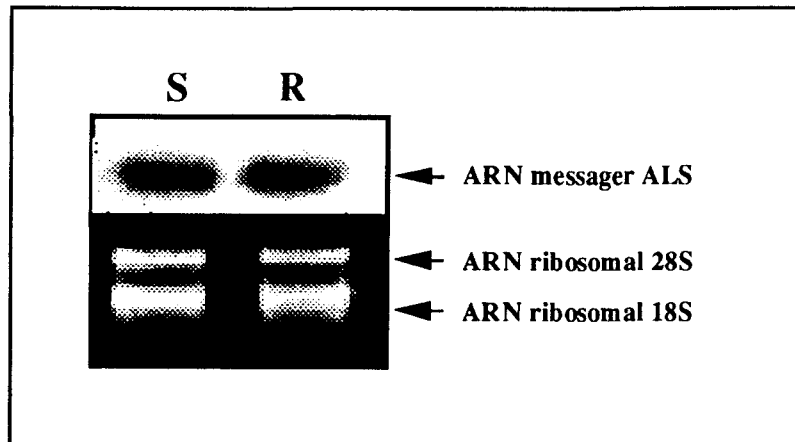


figure 3 : Comparaison de la transcription chez les souches sensible (S) et résistante. (R). L'hybridation est réalisée à l'aide de la sonde *cials25* sur 10 µg d'ARN totaux. La quantification obtenue à l'aide du logiciel NIH-1,56 indique que le rapport entre les quantités d'ARN 28S déposées pour les échantillons sensible et résistant est de 1,23, alors que celui obtenu pour les signaux ALS est de 1,18.

2.2. La sensibilité de l'ALS vis-à-vis des herbicides

L'activité ALS mesurée sur un extrait protéique de plantes sensibles (200 µg), en présence de concentrations croissantes de chlorsulfuron dans le milieu réactionnel (figure 4), montre que 50% de l'activité enzymatique est inhibée par une dose d'herbicide égale à 0,02 µM. A une dose 10 fois plus forte, l'activité mesurée sur un extrait protéique provenant d'un individu résistant homozygote n'est pas affectée. Il ne faut pas moins de 12 µM pour inhiber 50% de l'activité enzymatique de ces plantes. Chez l'individu hétérozygote résultant du croisement d'une lignée sensible fécondée par un individu de la lignée R1OK, l'allure biphasique de la courbe indique que le pool ALS est composé des deux types enzymatiques. Les faibles concentrations de chlorsulfuron inhibent l'activité enzymatique résultant de l'expression de l'allèle sensible. L'activité mesurée aux fortes concentrations d'herbicide correspond, quant à elle, à l'activité permise par les ALS résultant de l'expression de l'allèle résistant.

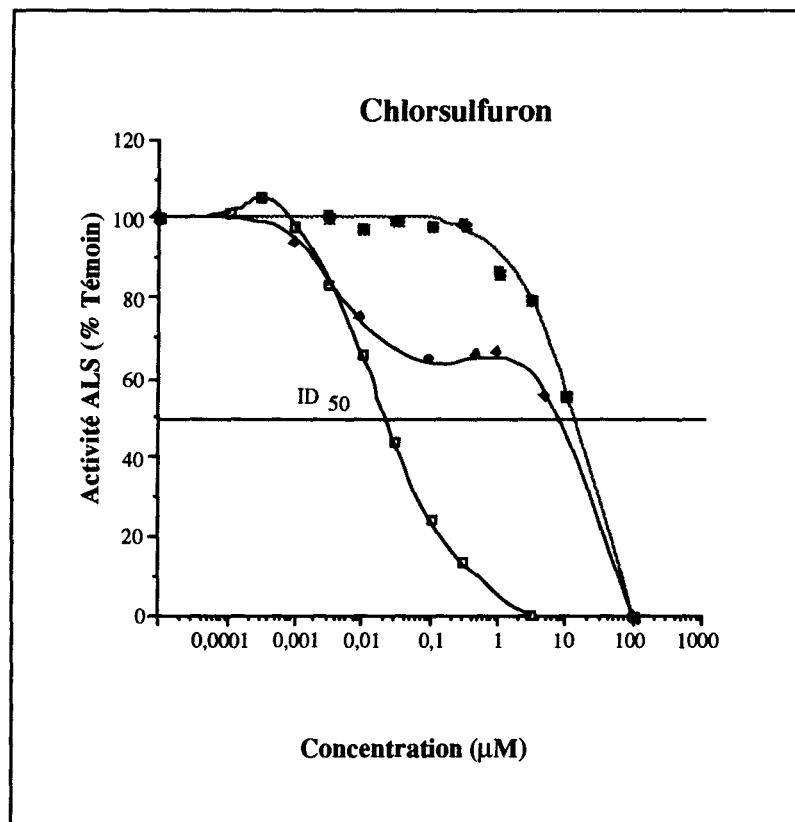


figure 4 : Activités ALS mesurées en présence de concentrations croissantes de chlorsulfuron dans le milieu réactionnel sur des chicorées sensibles (—▼—), résistantes (—■—) et d'un hétérozygote résultant du croisement des deux génotypes précédents (—□—). La barre horizontale matérialise la moitié de l'activité enzymatique en absence d'herbicide (ID_{50}).

Une expérience similaire a été réalisée avec l'imazamethabenz, herbicide de la famille des imidazolinones (figure 5). Une dose équivalente à 200 μM est nécessaire pour inhiber 50% de l'activité enzymatique des individus résistants, alors que 1,8 μM provoquent un effet similaire sur l'activité des individus sensibles. L'ALS des individus sélectionnés pour la résistance aux sulfonylurées, présente une sensibilité à l'imazaméthabenz 125 fois plus faible que celle des individus non sélectionnés (Dewaele *et al.* 1997).

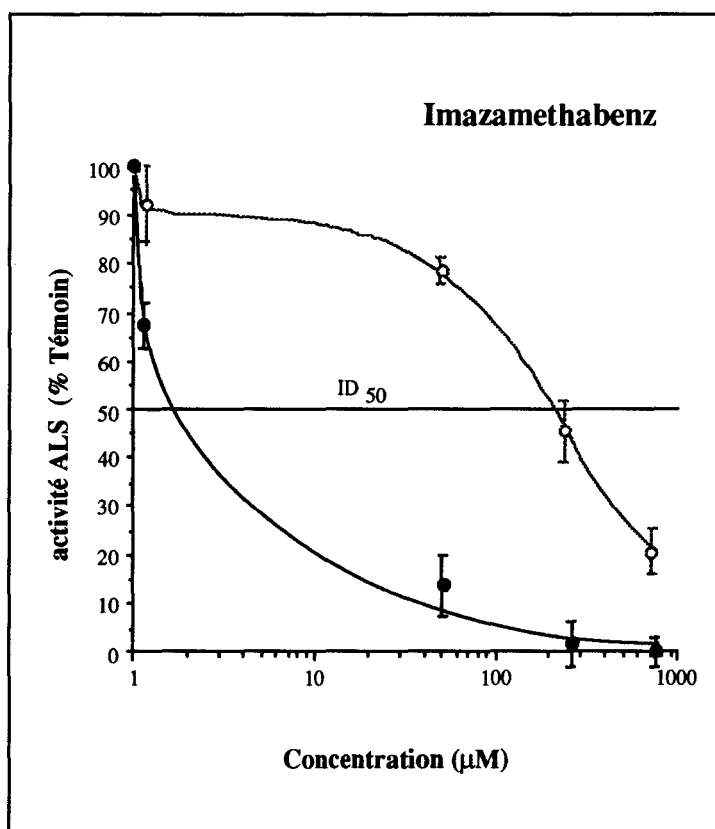


figure 5 : : Activités ALS mesurées en présence de concentrations croissantes d'imazamethabenz dans le milieu réactionnel chez des chicorées sensible (—●—), résistante (—○—). La barre horizontale matérialise la moitié de l'activité enzymatique en absence d'herbicide.

2.3. L'affinité pour le substrat

L'activité de l'ALS a été déterminée pour différentes concentrations de pyruvate chez chacune des deux souches (figure 6). Les K_m pour le pyruvate respectifs sont de 10 mM pour l'ALS extraite de la souche sensible et de 6,66 mM pour celle issue de la souche résistante, ce qui ne constitue pas une différence très importante. L'affinité de l'ALS envers l'un de ses substrats n'est quasiment pas modifiée par l'altération responsable de l'insensibilisation de l'enzyme envers le chloresulfuron.

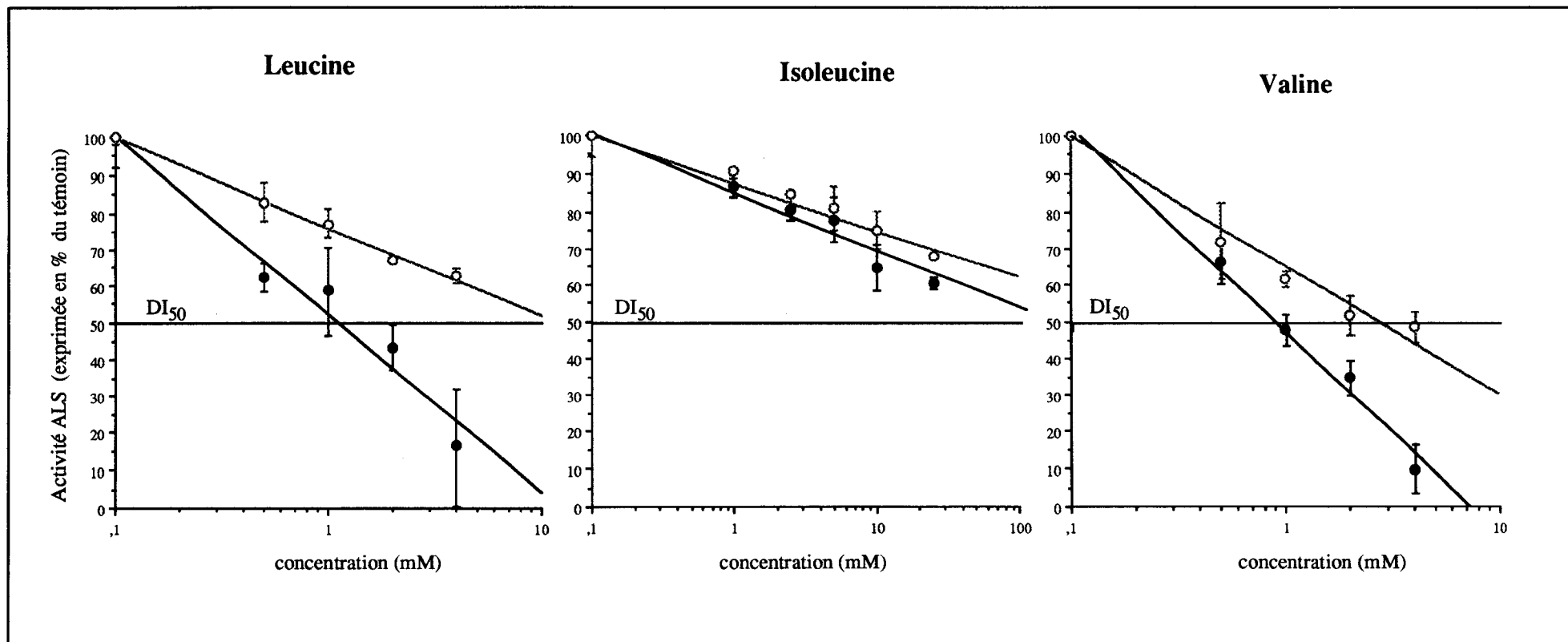


figure 7 : Activité ALS mesurée chez les chicorées sensibles (●) et résistantes (○), en présence de concentrations croissantes d'acide aminé branché dans le milieu réactionnel. L'activité est exprimée en pourcentage du témoin. La barre horizontale indique la moitié de l'activité du témoin.

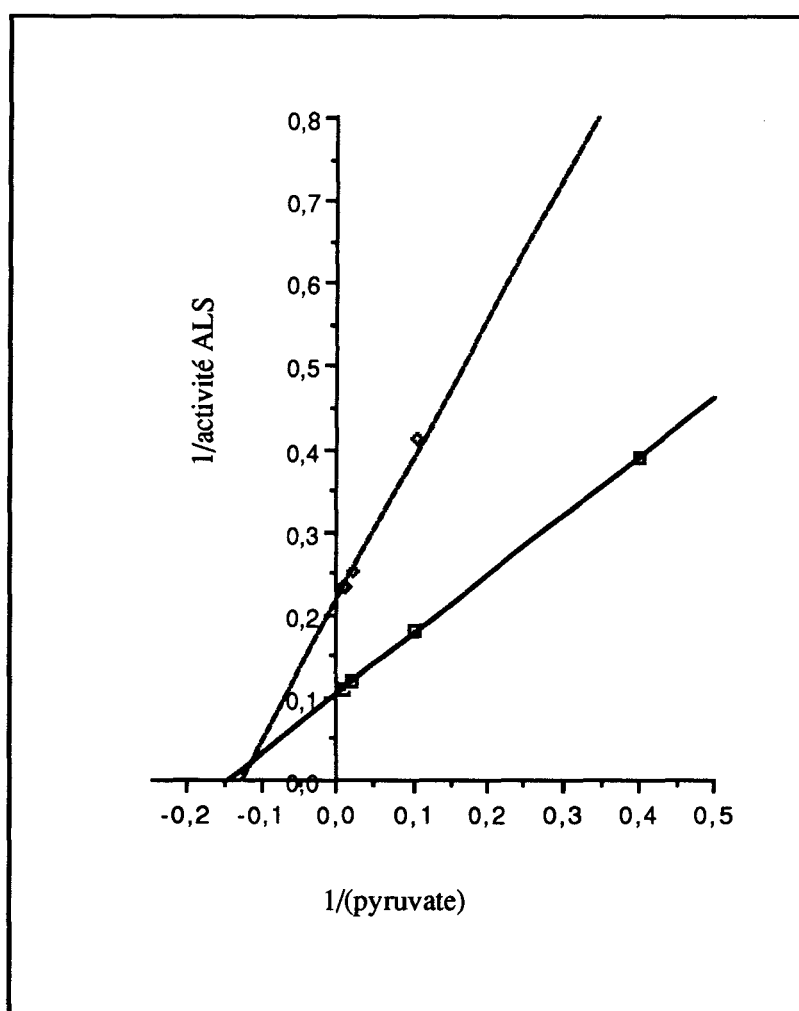


figure 6 : Affinité des deux formes de l'ALS sensible (—◇—) et résistante (—■—) vis-à-vis du pyruvate représenté selon Lineweaver et Burk.

3. La régulation allostérique

3.1. Le rétrocontrôle par les produits finaux

L'ALS est une enzyme allostérique régulée par les acides aminés branchés (chapitre I). Afin de vérifier si les changements conformationnels de l'ALS, qui ont engendré l'insensibilisation aux deux herbicides, ont eu des conséquences sur ce mode de régulation, nous avons mesuré l'activité enzymatique en présence de doses croissantes de valine, leucine et isoleucine dans le milieu réactionnel. Les résultats obtenus sont consignés dans la figure 7.

L'action inhibitrice de l'isoleucine sur l'activité enzymatique est faible. Une dose de 100 mM ne provoque qu'une baisse de 35% de l'activité, ce qui est très proche de l'effet observé dans les extraits issus de plantes sensibles.

Acide Aminé	Contenu exprimé en nmol.g ⁻¹ de matière fraîche		E.S. 5%
	Sensible	Résistant	
Acide glutamique	483,9 ± 29,7	643,6 ± 32,6	S
Acide aspartique	272,8 ± 19,5	300,9 ± 19,4	NS
Asparagine	211,0 ± 31,4	146,5 ± 14,9	S
Sérine	184,8 ± 14,0	208,0 ± 16,6	NS
Alanine	114,8 ± 13,1	91,9 ± 7,6	NS
Glutamine	104,4 ± 4,0	124,1 ± 38,7	NS
Glycine	32,8 ± 11,0	21,1 ± 4,3	NS
Arginine	28,5 ± 13,1	19,8 ± 1,2	NS
Thréonine	22,9 ± 3,7	21,9 ± 1,8	NS
Phénylalanine	12,1 ± 2,1	8,5 ± 0,9	NS
Valine	10,1 ± 1,4	24,3 ± 1,8	S
Leucine	9,0 ± 1,9	16,0 ± 1,6	S
Isoleucine	6,9 ± 1,1	8,2 ± 1,2	NS
Histidine	4,3 ± 2,2	8,1 ± 2,8	NS
Lysine	2,1 ± 0,9	1,4 ± 1,0	NS
Tryptophane	0,6 ± 0,3	0,7 ± 0,3	NS
Méthionine	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2	NS
Tyrosine	nd	nd	NS

tableau 3 : Teneur en acides aminés libres des feuilles de chicorées âgées d'un mois. Les acides aminés branchés sont indiqués en gras. S indique une différence significative entre les deux souches, NS indique une différence non significative.

Cependant, alors que des doses de valine et de leucine proches de 1 mM sont suffisantes pour provoquer une chute de 50% de l'activité (DI_{50}) chez la lignée sensible, il ne faut pas moins de 3 mM de valine et de 10 mM de leucine pour obtenir une diminution de même ampleur chez le résistant.

3.2. Les conséquences sur la synthèse des acides aminés

L'inactivation *in vitro* de l'activité ALS nécessite chez les individus résistants des doses de valine et de leucine nettement supérieures à celles utilisées pour les individus sensibles. Pour connaître le comportement *in vivo* d'une ALS ainsi modifiée, le contenu en acides aminés libres a été déterminé à partir de feuilles provenant de plantules âgées d'un mois.

Sur l'ensemble des 18 acides aminés dosés chez les plantules (tableau 3 et 4), seuls l'acide glutamique et l'asparagine ainsi que la valine et la leucine présentent des teneurs significativement différentes entre sensibles et résistants. La teneur en asparagine diminue alors que celle de l'acide aspartique augmente de 22%. Les variations des teneurs en valine et leucine sont très significatives. Le pool de valine est 2,2 fois plus important et celui de la leucine est 1,6 fois plus élevé chez les résistants R1OK que chez les sensibles. La teneur en isoleucine reste quant à elle inchangée.

Acide aminé	Teneur en acide aminé exprimée en % du total	
	Sensible	Résistant
Asparagine	14,00	9,00
Acide glutamique	32,20	39,00
Isoleucine	0,46	0,49
Leucine	0,60	0,97
Valine	0,66	1,47
Total	100	100

tableau 4 : Teneur en acides aminés dont les teneurs varient entre les deux souches de chicorées, exprimées en % du pool total d'acide aminés

4. Apport exogène d'acides aminés branchés

L'ALS des individus R1OK est moins sensible au rétrocontrôle exercé par la valine et la leucine, ce qui se traduit par une augmentation des teneurs endogènes de ces derniers. Afin de vérifier si cela se traduit par une tolérance accrue à l'apport d'acides aminés exogènes, des plantules de chicorée au stade deux cotylédons ont été cultivées sur un milieu H2O complété en valine, leucine et isoleucine. Les résultats observés après 10 jours de culture sont présentés dans les planches F à I et dans le tableau 5.

Composition du milieu	Masse de matière fraîche exprimée en mg			
	Sensibles		Résistants	
	feuilles	racines	feuilles	racines
Témoin (H2O)	30,3	9,3	28,8	8,0
H2O + Val 0,25 mM	24,2	5,5	26,9	5,3
H2O + Val 0,50 mM	21,7	4,9	22,3	4,9
H2O + Val 1,00 mM	19,5	4,8	19,5	4,1
H2O + Val 5,00 mM	16,5	3,0	14,6	3,2
H2O + Leu 0,10 mM	28,0	7,8	27,5	5,7
H2O + Leu 0,25 mM	24,8	4,2	26,5	4,3
H2O + Leu 1,00 mM	12,2	2,6	11,0	2,9
H2O + Ile 0,10 mM	27,1	7,6	25,0	7,3
H2O + Ile 0,25 mM	26,4	7,2	23,3	7,1
H2O + Ile 1,00 mM	19,4	6,3	18,5	6,8
H2O + Val/Leu/Ile	29,6	9,1	24,4	7,1
H2O + Val/Leu 0,25 mM	20,2	2,5	19,2	2,2
H2O + Val/Ile 0,25 mM	24,0	4,6	23,1	5,5
H2O + Ile/Leu 0,25 mM	19,0	3,7	20,2	4,1

tableau 5 : Masse de matière fraîche exprimée en mg de feuilles et de racines de plantules après une culture de 15 jours sur un milieu renfermant des acides aminés.

En l'absence d'acides aminés, aucune différence n'apparaît (planche F) entre les souches sensibles et résistantes. Le système racinaire se compose d'une racine principale pivotante qui porte de nombreuses racines latérales plus courtes. Les appareils foliaires sont tous deux au même stade de développement (deux feuilles vraies) toutefois, une différence de biomasse de l'ordre de 12% en faveur des plantules sensibles est à signaler (voir chapitre 1).

4.1. La valine

L'apport de valine provoque un arrêt très marqué de la croissance en longueur du système racinaire (planche G). Cet effet s'accroît avec la dose employée. Le taux de ramification ne varie pas, mais la croissance des racines latérales est totalement inhibée. Les racines prennent un aspect sphérique. Les colorations au Feulgen ne mettent plus en évidence un méristème apical bien structuré mais un amas indifférencié de cellules gonflées qui n'est pas sans rappeler l'effet produit par l'oryzaline (Chapitre III). Le système foliaire subit également un arrêt de croissance très marqué mais moins brutal que celui observé pour les racines. Le stade de développement est malgré tout comparable à celui obtenu pour le milieu témoin au même temps de culture. Alors qu'aucune différence significative n'apparaît entre les systèmes racinaires des deux souches, la croissance foliaire semble légèrement moins affectée chez le résistant.

4.2. La leucine

Des effets similaires à ceux provoqués par la valine sont observés quand la leucine est ajoutée au milieu (planche H). La diminution de croissance de la racine s'accompagne d'un gonflement des zones méristématiques ainsi que d'un brunissement des racines. A dose égale, la leucine cause des effets plus marqués que ceux induits par la valine. En effet, il faut apporter 5 mM de valine pour observer les mêmes symptômes que ceux causés par 1 mM de leucine.

Aucune différence marquante n'apparaît entre les individus sensibles et résistants.

4.3. L'isoleucine

L'apport d'isoleucine freine de façon nette la croissance racinaire, mais son action est beaucoup moins prononcée que celle des deux autres acides aminés (planche G). Les racines primaires et latérales se développent plus

lentement qu'en absence d'acide aminé mais ne présentent aucun gonflement au niveau des zones méristématiques.

4.4. Les associations binaires et ternaires

Afin d'éviter toute toxicité rapide due à un seul acide aminé, chaque acide aminé a été introduit dans le milieu de culture à raison de 0,25 mM.

L'apport simultané dans le même milieu de culture de valine, leucine et isoleucine (planche I) n'affecte que très peu le développement et la croissance des plantules, alors qu'employés séparément, ces acides aminés provoquent des symptômes déjà bien marqués.

Les combinaisons binaires présentent, selon les associations, des effets très variables (planche I).

Le couple valine/leucine a une action comparable à celle de la valine utilisée à 2,5 mM. La croissance est entièrement bloquée et le nombre d'ébauches de racines latérales est réduit.

Les combinaisons associant un acide aminé produit par chacune des voies de biosynthèse initiées par l'ALS (valine/isoleucine ou leucine /isoleucine), exercent une action moins marquée. La présence de valine et d'isoleucine dans le milieu de culture ne diminue que de 25% la croissance pondérale. Les racines des plantules résistantes ont un développement comparable à celui du témoin alors qu'elles sont légèrement plus courtes chez les plantules sensibles. Le développement de l'appareil foliaire n'est que très peu ralenti.

Enfin l'association valine/isoleucine cause des effets intermédiaires à ceux produits par les deux autres combinaisons.

4.5. La suppression des acides aminés

Les plantes décrites précédemment ont été transférées sur un milieu de culture H₂O dépourvu d'acides aminés. Comme le montre l'exemple de la valine (planche J), dès le deuxième jour de sevrage, la croissance racinaire reprend de façon importante à partir des structures sphériques qui s'étaient formées lors de la culture en présence des acides aminés. Cette reprise est inversement proportionnelle à la dose d'acides aminés appliquée précédemment. Les colorations Feulgen effectuées sur ces racines n'indiquent pas la présence d'un méristème bien défini dans les apex.

5. Conclusion

La sélection cellulaire réalisée *in vitro* en présence de chlorsulfuron a permis l'isolement d'une lignée de plantes résistantes aux chlorsulfuron et à l'imazamethabenz, et ce, quel que soit le stade de traitement. Ces plantes ne présentent aucun coût associé à l'acquisition de ce caractère.

L'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS n'affecte pas la transcription de *ciAls*, ni la teneur en protéines ALS. La surproduction de la cible biochimique n'est donc pas à l'origine de ce caractère nouveau. Par contre, elle s'accompagne d'une diminution très marquée de la sensibilité de l'ALS vis-à-vis des sulfonylurées (570 fois moins sensibles au chlorsulfuron) et des imidazolinones (123 fois moins sensibles à l'imazamethabenz). Les individus issus du croisement entre un parent résistant mâle et un parent sensible femelle, présentent un niveau de résistance intermédiaire car ils produisent les deux formes de l'ALS. Les allèles codant pour ces deux formes sont donc codominants et s'expriment simultanément. L'altération du gène *ciAls* est à l'origine de l'insensibilisation de l'ALS vis-à-vis des inhibiteurs testés, et par conséquent de la résistance des plantes R1OK aux herbicides qui contiennent ces molécules pour matières actives.

Cette altération présente des effets pléiotropiques, notamment sur la régulation allostérique de l'enzyme par la valine et la leucine. Les doses requises pour inhiber 50% de l'activité enzymatique sont respectivement 3 et 10 fois supérieures pour la valine et la leucine. Le rétrocontrôle par l'isoleucine n'est, quant à lui, pas affecté de façon significative.

Le manque de rétrocontrôle se traduit par une augmentation dans les plantes R1OK de 240% des teneurs en valine libre et de 140% en ce qui concerne la leucine, sans pour autant engendrer de tolérance aux apports exogènes d'acides aminés branchés.

Planche E : Chicorées sensibles (S) et résistantes (R) cultivées sur milieu H₂O complété en valine, leucine et isoleucine à raison de 1 mM. La photo 1 montre les plantules après 3 jours de culture et la photo 2 après 10 jours de culture sur ces milieux.

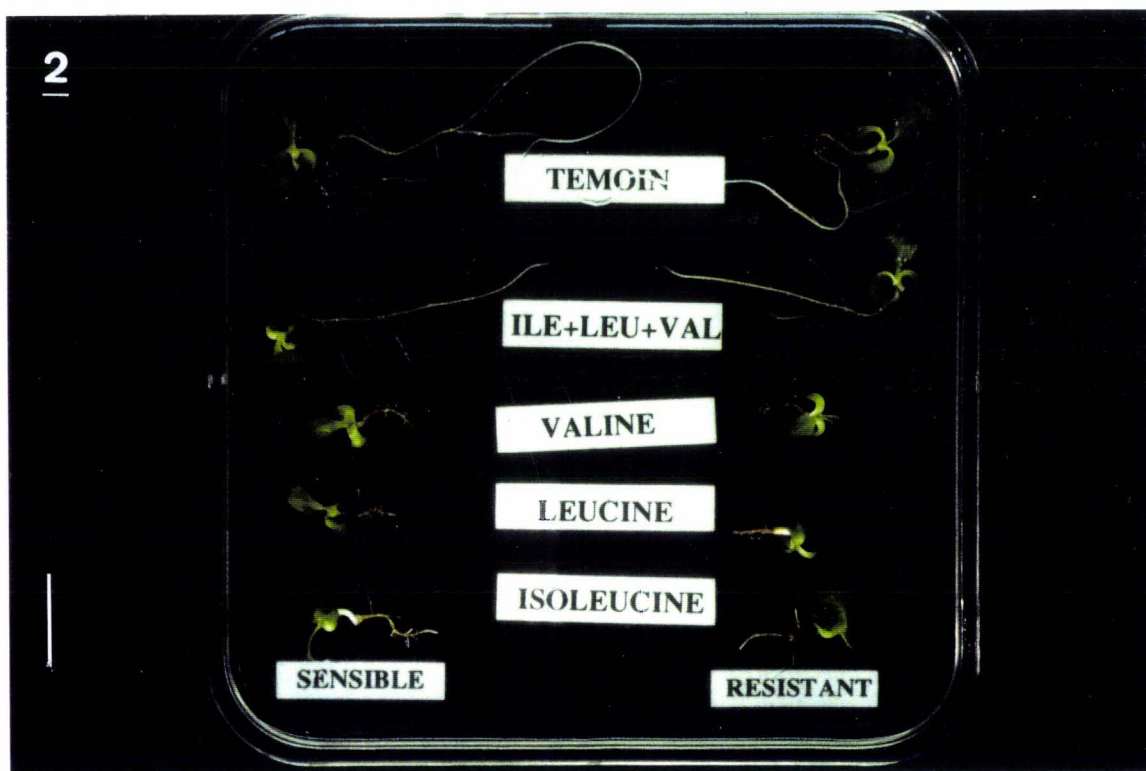
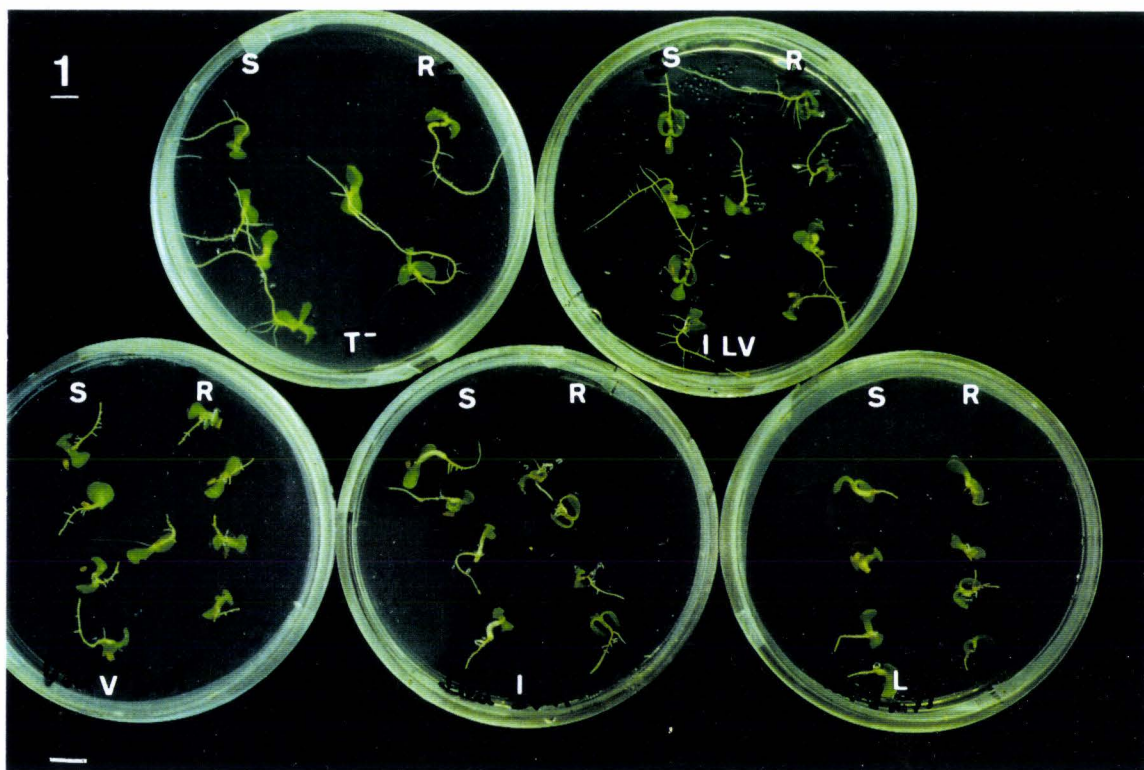


Planche F : Chicorées sensibles (S) et résistantes (R) cultivées sur milieu H2O complété par différentes concentrations de valine. La photo 1 montre les plantules après 3 jours de culture et la photo 2 après 10 jours de culture sur ces milieux.

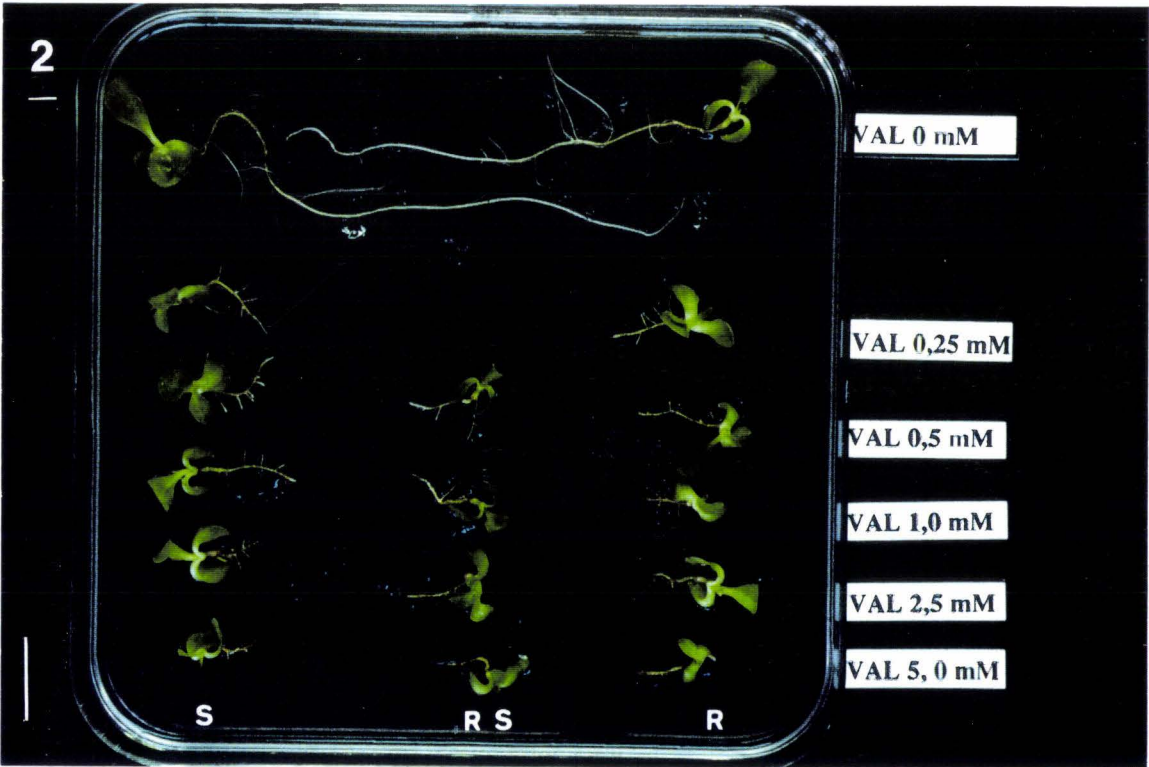
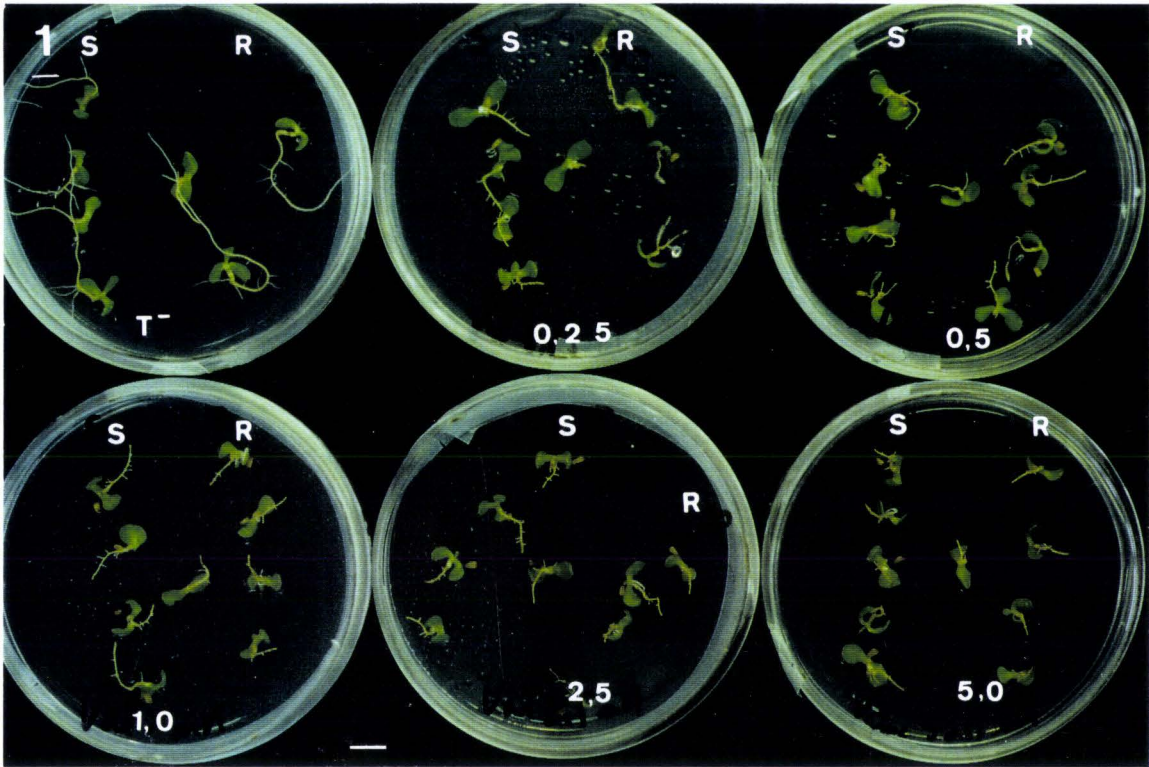


Planche G : Chicorées sensibles (S) et résistantes (R) cultivées sur milieu H2O complété par différentes concentrations de leucine et d'isoleucine. La photo 1 montre les plantules après 3 jours de culture et la photo 2 après 10 jours de culture sur ces milieux.

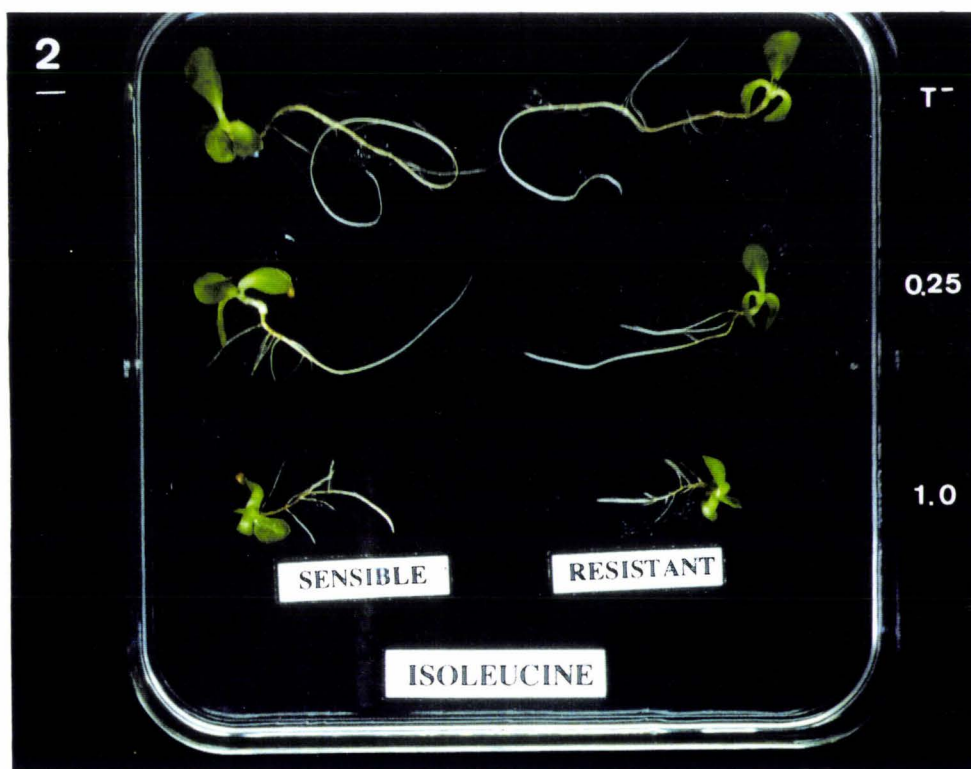
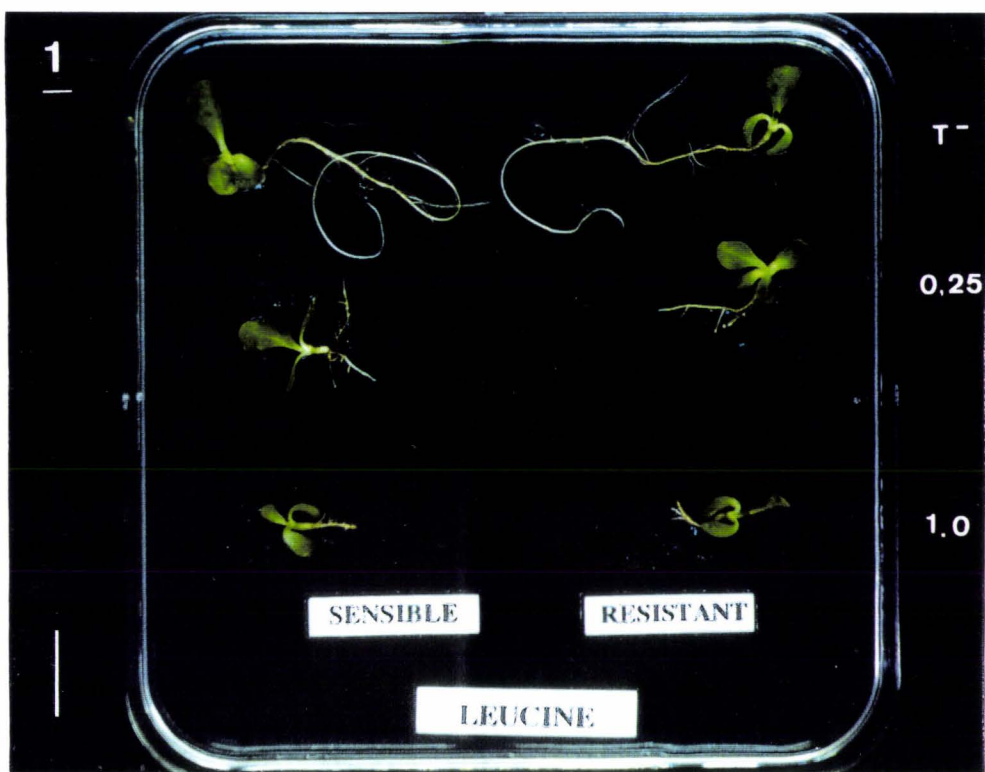


Planche H : Chicorées sensibles (S) et résistante (R) cultivées sur milieu H₂O complété par différentes combinaisons de valine, leucine et isoleucine utilisées à raison de 0,25 mM chacun. La photo 1 montre les plantules après 3 jours de culture et la photo 2 après 10 jours de culture sur ces milieux.

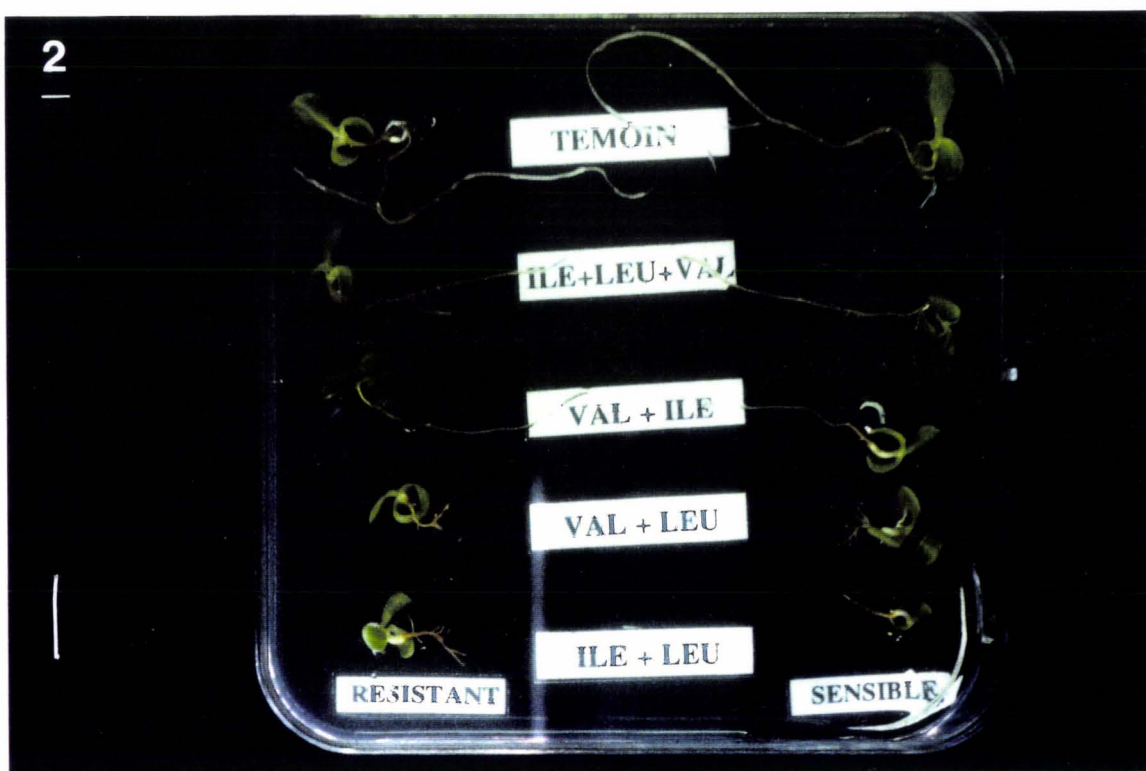
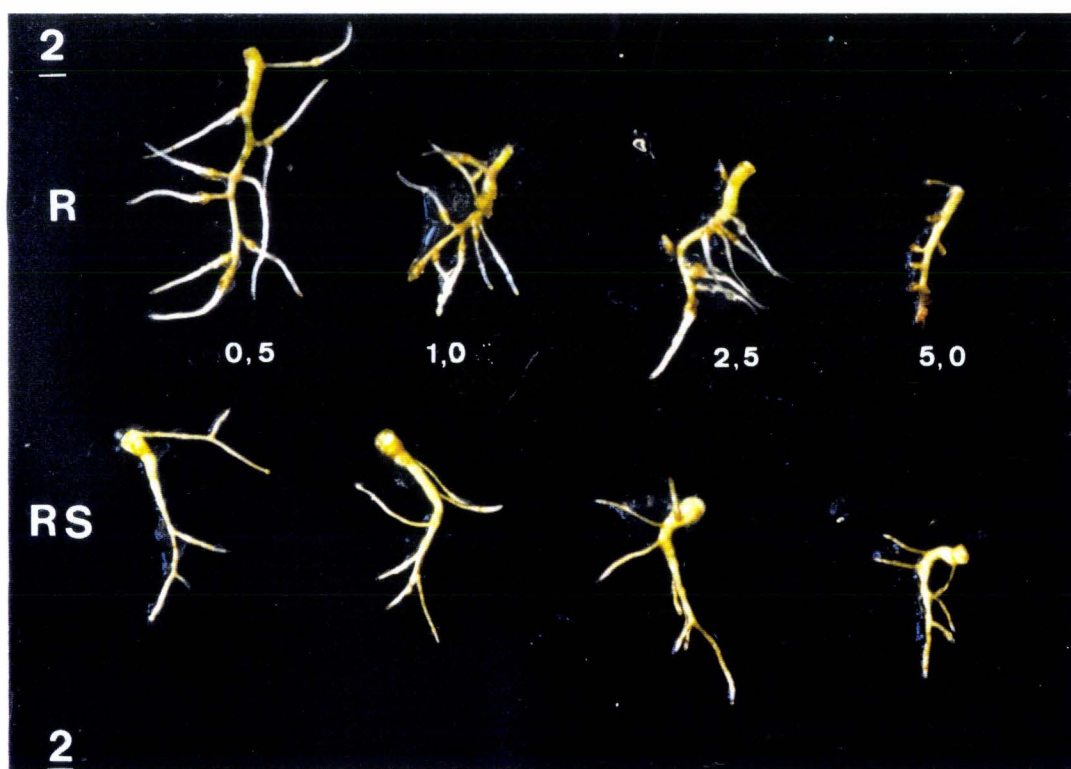
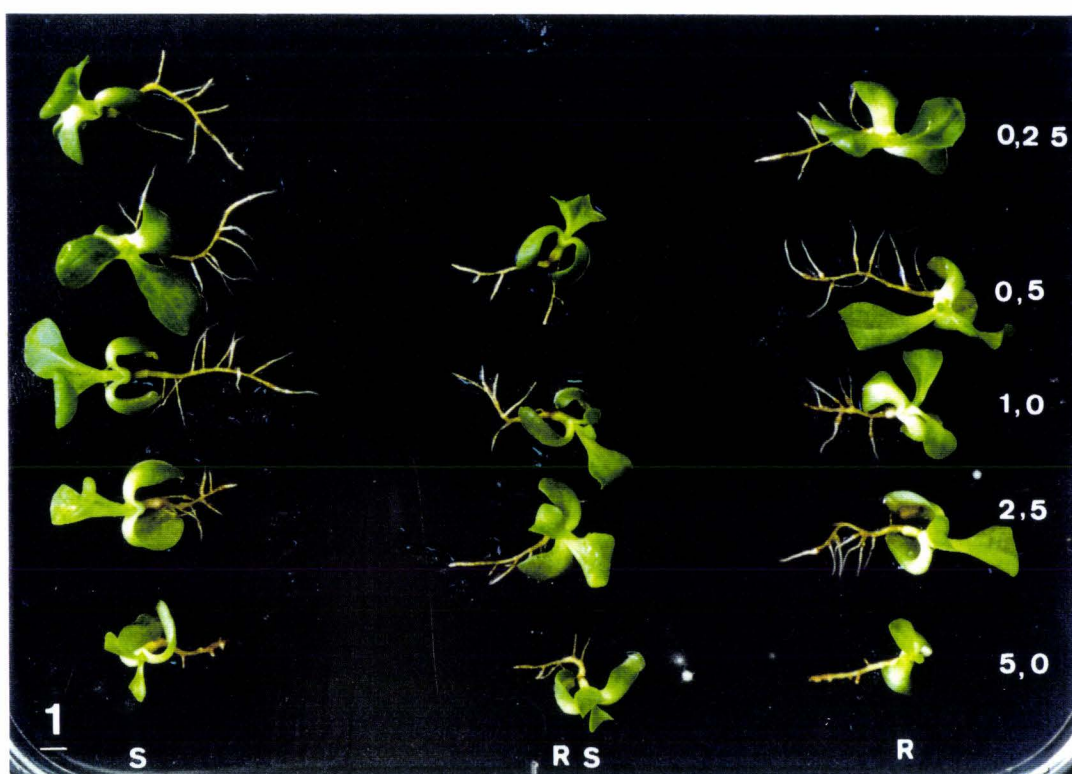


Planche I : Chicorées sensibles (S) et résistantes (R) présentées en planche G après un transfert de 2 jours sur milieu H₂O dépourvu d'acides aminés.

La photo 1 montre la plante entière alors que la photo 2 présente plus en détail l'évolution de l'appareil racinaire.



- *CLONAGE DE CIALS* -

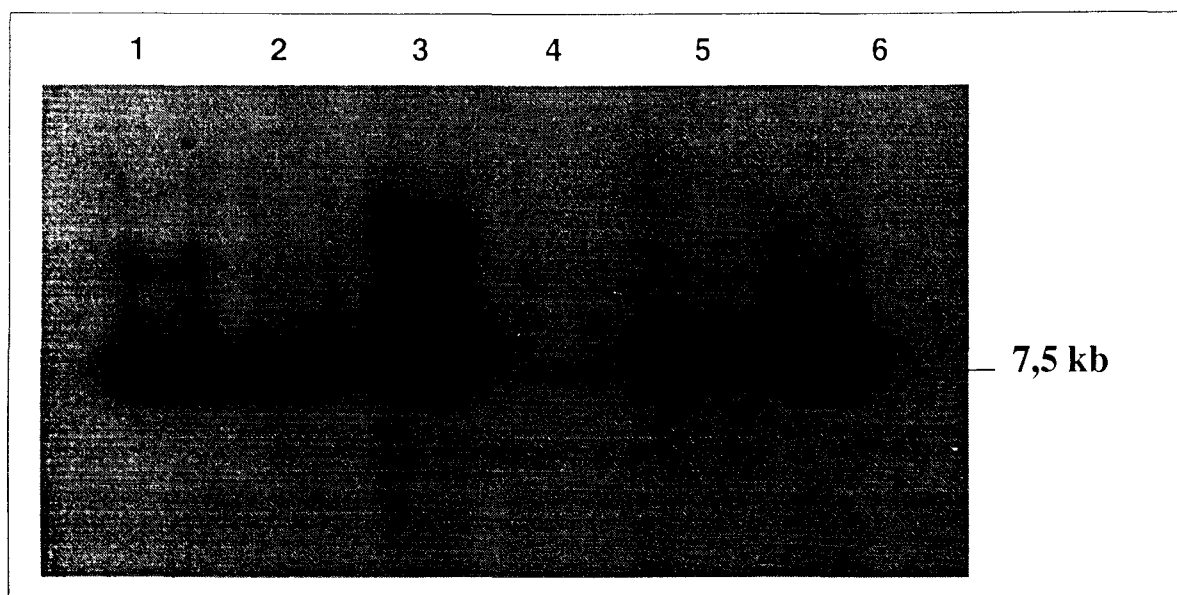


figure 1 : Vérification de l'homogénéité du clone DCIALS1 par hybridation avec les ADN extraits des clones 1 à 6 digérés par EcoRI. L'hybridation est réalisée à l'aide de la sonde cial25'.

V. Clonage du gène *cials*

Disposant d'une banque génomique de chicorée (réalisée par B. Huss) au sein de notre laboratoire et d'une sonde homologue, l'isolement de *cials* par criblage de cette banque s'imposait.

1. Le criblage de la banque génomique

L'ADN total de la lignée AL de chicorée a été partiellement digéré par l'enzyme de restriction *Sau3A*, de façon à générer des fragments dont les tailles s'échelonnent entre 13 et 25 kb. Ces derniers sont insérés dans le site *BamHI* du bactériophage λ DashII, en remplacement du fragment central, à raison de 8 molécules de vecteur par molécule d'insert. Les produits de ligature sont encapsidés à l'aide du kit Stratagene Gigapack® II gold. La titration effectuée avant amplification de la banque primaire estime à $1,25 \cdot 10^6$ le nombre de bactériophages recombinants. Cette banque peut être considérée comme complète et totale. En effet, la taille du génome de la chicorée étant voisine de $1,5 \cdot 10^6$ kb, le nombre minimal de recombinants nécessaires pour représenter le génome dans son intégralité est de $5 \cdot 10^5$. Cette valeur est déterminée en considérant que seules les constructions chimériques contenant un insert dont la taille est comprise entre 9 et 23 kb ont pu donner naissance à une particule virale recombinante.

L'étalement de $6 \cdot 10^6$ phages, soit 4 fois le titre de la banque avant amplification, a été réalisé sur 6 boîtes de Pétri (20 x 20 cm) afin d'isoler le gène *cials*. Après une incubation d'une nuit à 37°C, l'ADN des plages de lyse est transféré sur une membrane Biohyland Z⁺. Deux répliques sont réalisées pour chaque boîte. Ces membranes sont ensuite hybridées avec la sonde *cials25*, obtenue par PCR. Quatre signaux d'hybridation, de tailles variables d'une réplique à l'autre mais dont la superposition est parfaite, sont observés. Les plages de lyse correspondant aux zones d'hybridation sont prélevées dans un rayon de 0,5 cm (soit environ 2500 bactériophages). Lors du criblage secondaire, qui avait pour but d'enrichir les fractions en clones, seuls deux des quatre candidats ont été confirmés positifs. Un troisième criblage a permis de les purifier à homogénéité. L'analyse des ADN isolés de 10 représentants de chacun des deux recombinants a montré que les candidats correspondaient à un seul et même clone (figure 1) que nous avons nommé DCIALS. L'insert de ce bactériophage, dont la taille est de 14 kb, renferme une région homologue à la sonde *cials25*.

2. Analyse de l'insert

2.1. Sous-clonage

Une carte de restriction pour quelques enzymes a été établie et les hybridations réalisées à l'aide de *cials25* sur les produits de digestion ont permis de déterminer une zone homologe au gène *cials* au sein de l'insert (figure 2).

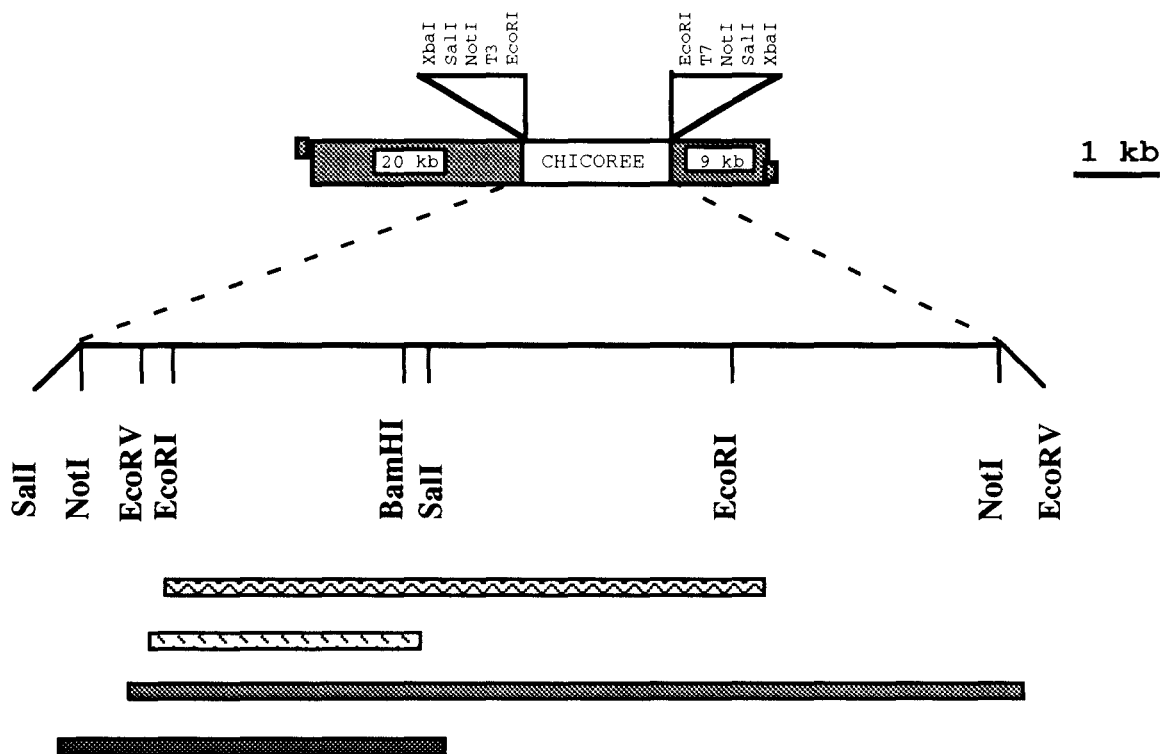


figure 2 : Structure du bactériophage DCIALS1. Les barres indiquent les fragments hybridant avec la sonde *cials25*'.

Le gène *cials* semble localisé dans un fragment *EcoRI/BamHI* de 3,2 kb. Ce fragment a été sous-cloné dans le vecteur pBluescript ks(-) afin de faciliter l'analyse de cette région. Une carte de restriction plus précise (figure 3) indique que l'intégralité de *cials* peut être renfermée dans cette construction (DCIALSEB32).

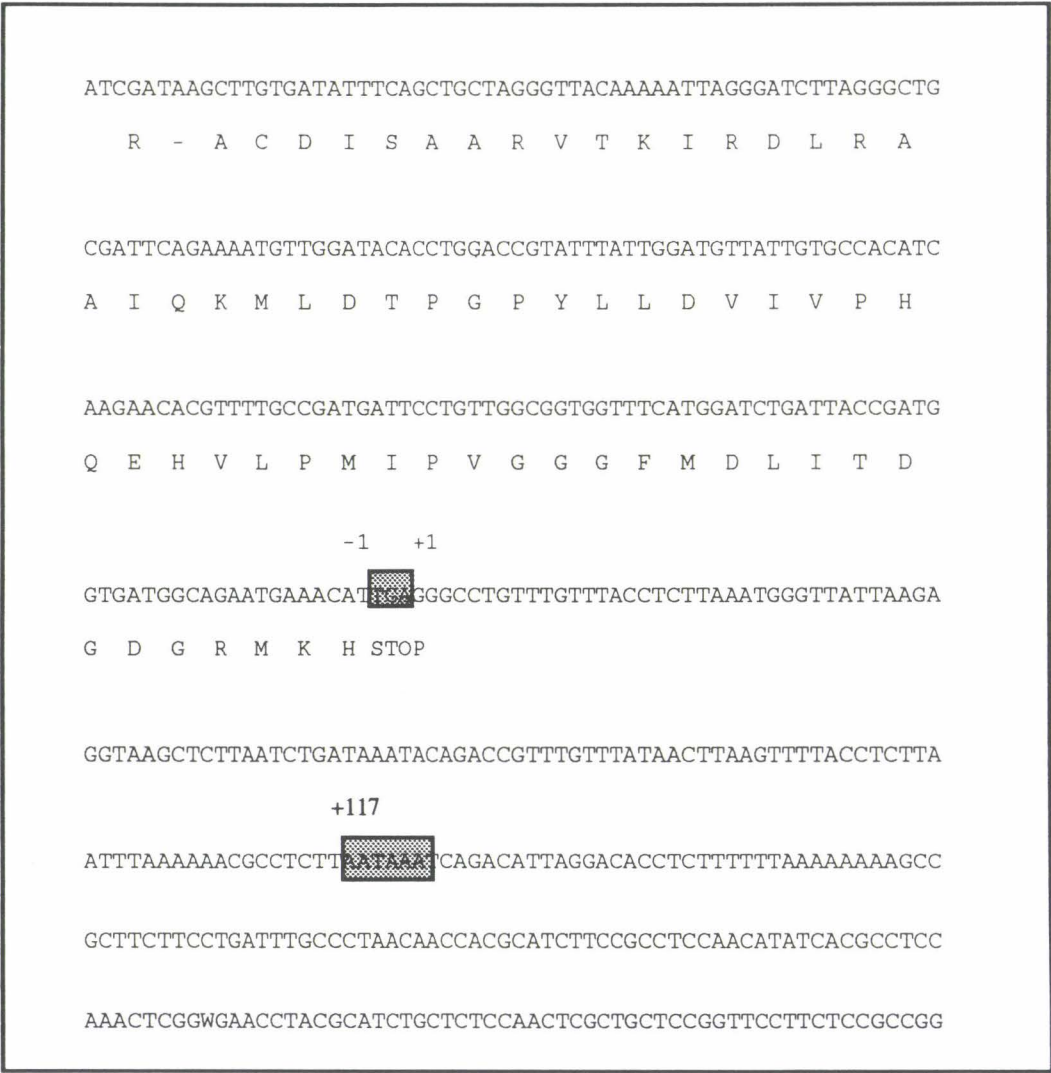


figure 4 : Séquence terminale de cials.

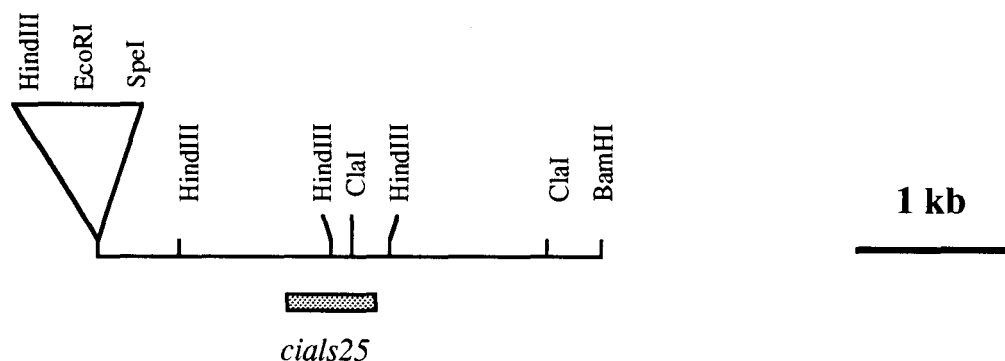


figure 3 : Structure du clone DCIALSEB32

2.2. La séquence

Le séquençage mené sur les différents sous-clones *HindIII* de DCIALSEB32 confirme la carte de restriction et la présence de *cials*. En effet, le fragment *HindIII*-*BamHI* contient l'extrémité 3' du gène *cials*. Sa séquence nucléotidique ainsi que la traduction qui en a été déduite sont présentées en figure 4. Au-delà du codon stop TGA, on trouve en position +117 un signal potentiel de polyadénylation (AAUAAA).

La séquence du sous-clone H02 correspond aux 194 nucléotides situés en amont de la séquence décrite précédemment. Par contre, le sous-clone H10 est de nature chimérique. Seuls les 96 nucléotides de son extrémité 3'OH présentent un degré d'homologie élevé avec les séquences connues des gènes codant pour l'ALS. En amont de cette zone, aucune homologie avec les séquences connues n'est retrouvée. Il en est de même pour le fragment H06. La nature chimérique de l'insert ne s'explique pas par une réassociation de fragments *Sau3A* lors de la ligation des fragments d'ADN de chicorée dans les bras des bactériophages, puisque ce site n'est pas retrouvé à la limite de la région correspondant à *cials*.

La séquence nucléotidique du fragment du gène *cials* contenu dans le bactériophage et sa traduction en acides aminés sont présentées en figure 5. Les comparaisons de séquences nucléotidiques et peptidiques (annexes 4 et 5) indiquent que la séquence obtenue présente un domaine très conservé au niveau du site présumé de fixation de la TPP, ainsi qu'au niveau des acides aminés impliqués dans le site de fixation des herbicides. Au sein des domaines moins conservés, les divergences observées pour quelques acides aminés permettent de différencier l'ALS de chicorée des ALS d'autres espèces. Cela est intéressant car il devient possible de distinguer notre souche, de chicorées transgéniques ayant intégré un gène codant pour une ALS tolérante chez une autre espèce.

CTGGTGGACTTGGAGCCATGGGGTTCGGCCTCCCTGCCG
 S G G L G A M G F G L P A

CCATTGGTGCCGCTGTTGCAAGACCAGATGCCATTGTAGTAGACATCGATGGTGATGGAA
 A I G A A V A R P D A I V V D I D G D G

GCTTCATGATGAACGTTCAAGAAGTTCGCCACCATTAGGGTTGAAAATCTTCCAGTTAAGA
 S F M M N V Q E L A T I R V E N L P V K

TCCTTCTACTCAATAACCAACATTTAGGTATGGTGGTTCAATGGGAAGATCGTTTTTGCA
 I L L L N N Q H L G M V V Q W E D R F C

AAGCAAATCGAACTCATACGTATTTAGGAAACCCATCAAAGAATCTGAAATATTCCCAA
 K A N R T H T Y L G N P S K E S E I F P

TAATGTTGAAGTTTGCTGAAGCTTATCGATAAGCTTGTGATATTTTACGCTGCTAGGGTTA
 I M L K F A E A Y R - A C D I S A A R V

CAAAAATTAGGGATCTTAGGGCTGCGATTTCAGAAAATGTTGGATACACCTGGACCGTATT
 T K I R D L R A A I Q K M L D T P G P Y

TATTGGATGTTATTGTGCCACATCAAGAACACGTTTTGCCGATGATTCCTGTTGGCGGTG
 L L D V I V P H Q E H V L P M I P V G G

GTTTCATGGATCTGATTACCGATGGTGATGGCAGAATGAAACATTGAGGGCCTGTTTGT
 G F M D L I T D G D G R M K H -

TACCTCTTAAATGGGTTATTAAGAGGTAAGCTCTTAATCTGATAAATACAGACCGTTTGT
 TTATAACTTAAGTTTTACCTCTTAATTTAAAAACGCCTCTTAATAAATCAGACATTAGG
 ACACCTCTTTTTTAAAAAAAAGCCGCTTCTTCCTGATTTGCCCTAACAACCACGCATCTT
 CCGCCTCCAACATATCACGCCTCCAACTCGGWGAACCTACGCATCTGCTCTCCAACTCG
 CTGCTCCGGTTCTCTCCGCCGGCGACGCTGCTGGTTTCGGTTCTCTCCGNCGGCGANC
 TCCTCTGCTCCTTCGGCTTCCCTGTTCAGTTGCAGGNTCGTTCTCCATTTTCGTATGTC
 GTTTATGTTGCTCGGTTTTGTTGATGTCTTGCTCGATGTCGTTTTTCTCTGGTTGAAAT
 GCTCATATCATAGTCTTCTATTTCTGGTTGAAAATGCTCATATCATCTCGTTTTTGTGTGCT
 CGGATTGCTGTTAATTGTTGCTGAATATTGTTGTTATTTTGTGCTGCATGTGGTCGATATG
 CCTTTTANTTGTGCTGAATTGTGTGCATTTGCTATTATTGTTGCTGATGCTCCGCTCTTCT
 CGTTTTGTAATTGTGCTTTATGTCTGGTTGAAACTTGACTTACTCNGACATCGATTCTAT
 CAAACTATGAYTGTGTGTTCTATCA

figure 5 : Séquence du clone DCIALSEB32 correspondant à l'ALS de chicorée et sa traduction en acide aminé. La séquence déterminée sur les 700 nucléotides situés en aval du codon stop est également présentée.

DISCUSSION

1. Mode d'action du chlorsulfuron sur la chicorée

La chicorée est une plante naturellement très sensible aux herbicides de la famille des sulfonylurées appliqués sur les feuilles ou directement dans le sol.

Des retards de croissance importants dus à la rémanence de ces molécules ont d'ailleurs été constatés après une période hivernale peu pluvieuse. Il s'agissait de cultures ayant pour antécédent une céréale dont le désherbage avait été effectué avec cette famille d'herbicide (M. Hoquet, communication personnelle). Des constatations similaires ont été rapportées pour le soja (Sebastian *et al.*, 1989), le lin (Jordan et McHughen, 1987), le colza (Swanson *et al.*, 1988) et l'orge (Baillie *et al.*, 1993).

L'application d'une dose ($2 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$) dix fois inférieure à celles utilisées pour le désherbage des céréales, cause un arrêt brutal de la croissance racinaire et foliaire suivi d'une dépigmentation qui apparaît, selon les stades de développement, après une à plusieurs semaines. Ces symptômes ne sont qu'une constatation tardive et ultime des effets engendrés par l'herbicide. En effet, l'utilisation de la fluorescence émise au niveau du photosystème II comme marqueur de l'état physiologique de la plante, permet d'observer une diminution du potentiel photochimique dans les 24 heures qui suivent l'application foliaire de chlorsulfuron. Toutefois, les mesures effectuées sur des cinétiques rapides de fluorescence indiquent que le transfert des électrons au sein du PSII n'est pas affecté. Une légère reprise de ce potentiel photochimique est constatée avant d'assister à une chute irréversible des potentialités photosynthétiques coïncidant alors avec la dépigmentation.

Toutes les feuilles de la plante sont affectées simultanément par l'herbicide, néanmoins les plus jeunes feuilles restent vertes plus longtemps et présentent une diminution de leur potentiel photosynthétique décalée de 24 heures par rapport à celle observée chez les feuilles plus âgées. Bien qu'approximatif lorsqu'il est appliqué à un matériel sénescant, si ce n'est déjà mort, le dosage des protéines totales indique des teneurs supérieures en protéines chez les feuilles jeunes des plantes traitées, comparativement à leurs homologues des plantes n'ayant pas reçu d'herbicide. Rhodes *et al.* (1987), mais aussi Royuela *et al.* (1991) ont montré qu'un traitement à base de chlorsulfuron engendrait l'hydrolyse des protéines, libérant ainsi des acides aminés. La baisse des capacités photosynthétiques pourrait donc s'expliquer par l'hydrolyse des protéines, notamment celles impliquées dans le photosystème II. Une réallocation préférentielle des acides aminés ainsi libérés, pour la synthèse *de novo* des protéines impliquées dans la photosynthèse expliquerait assez bien la reprise observée au deuxième jour. La carence en acides aminés se prolongeant, l'équipement protéique alloué à la photosynthèse n'est plus privilégié et se trouve hydrolysé à son tour, ce qui se traduit par la chute définitive de l'activité photosynthétique. L'application de valine tritiée sur des feuilles âgées de chicorée montre une exportation vers les organes en croissance active tels que les jeunes feuilles et le système racinaire (N. Druart, communication personnelle). Par contre, le dépôt sur des feuilles jeunes ne met pas en évidence d'exportation importante vers le reste de la plante. Les organes plus jeunes se comportent donc comme des puits vis-à-vis des acides aminés. Aussi n'est-il

pas surprenant qu'ils manifestent plus tardivement les symptômes consécutifs à l'application de chlorsulfuron, puisque les carences sont compensées par l'importation d'acides aminés provenant de l'hydrolyse des protéines au sein des organes plus âgés.

Ray (1984) a montré que la cible biochimique des sulfonylurées était l'acétolactate synthétase (ALS). L'activité ALS de chicorée, dosée en présence de concentrations croissantes de chlorsulfuron, montre que les sulfonylurées sont des inhibiteurs puissants de l'activité enzymatique, la dose requise pour inhiber 50% de l'activité ALS n'étant que de 21 nM. Les valeurs que nous avons mesurées s'inscrivent tout à fait dans la gamme de sensibilité définie chez d'autres plantes sensibles à cet herbicide (Wittenbach *et al.*, 1994). Il en est de même pour les imidazolinones, puisque 3 μ M d'imazamethabenz suffisent à inhiber 50% de l'activité, ce qui est voisin des doses requises pour produire un effet similaire chez le maïs (Anderson et Hibberd, 1985).

L'inhibition de l'ALS provoque une carence en valine, leucine et isoleucine dont elle initie la biosynthèse. Cette carence en acides aminés branchés limite la synthèse protéique, et donc indirectement la croissance. Une deuxième conséquence de l'inhibition de l'ALS est l'accumulation de 2-cétobutyrate, substrat de l'enzyme. La Rossa *et al.* (1987) ont montré qu'à fortes concentrations, le 2-cétobutyrate était toxique pour *Salmonella typhimurium*. Chez les plantes, ce n'est pas le 2-cétobutyrate qui s'accumule mais son produit de transamination, le 2-aminobutyrate, qui inhibe la division cellulaire chez l'ail (Langzagorta *et al.*, 1988) et chez l'orge (Reid *et al.*, 1988). De nombreux auteurs ont donc conclu que la mort des plantes après un traitement au chlorsulfuron était due à l'accumulation de 2-cétobutyrate ou de 2-aminobutyrate. Cette hypothèse n'est malheureusement pas en mesure d'expliquer pourquoi l'apport exogène des trois acides aminés branchés, voire dans certains cas de valine et d'isoleucine, permet une réversion beaucoup plus efficace de l'effet de l'herbicide que l'apport d'isoleucine seule, comme cela a été observé chez de nombreuses plantes, dont la chicorée (Millecamps, 1989 ; Ray, 1984 ; La Rossa et Schloss, 1984 ; Schell et Casida, 1985 ; Anderson et Hibberd, 1985 ; Haughn et Sommerville, 1986). En effet, l'isoleucine régule de façon allostérique la thréonine désaminase qui convertit la thréonine en 2-cétobutyrate (Umbarger, 1978). L'apport d'isoleucine devrait donc être suffisant pour limiter la production du métabolite toxique et par conséquent la toxicité de l'herbicide. Par ailleurs, Shaner et Singh (1993) ont montré que l'apport de 2-aminobutyrate à des cultures de maïs avait pour effet d'augmenter la production d'isoleucine, sans pour autant affecter la croissance, alors qu'en inhibant la synthèse de l'ALS par une stratégie antisens, Höfgen *et al.* (1995) ont obtenu des plantes présentant les symptômes caractéristiques du blocage de l'ALS par les sulfonylurées.

C'est donc la carence en valine, leucine et isoleucine qui est à l'origine du blocage des divisions cellulaires (Shaner et Singh, 1993). Hall et Devine (1993) avaient observé que, non seulement l'inhibition privait les zones de croissance d'acides aminés branchés, mais qu'elle limitait fortement le transport des photoassimilats vers les zones méristématiques. Si, comme nous l'avons décrit

chez la chicorée, l'inhibition de l'ALS altère considérablement le photosystème II, alors il n'est pas surprenant que les méristèmes puissent souffrir conjointement d'une privation de valine, leucine, d'isoleucine et de source de carbone.

2. Analyse de la résistance aux sulfonylurées

La dose de chlorsulfuron (3 nM) nécessaire pour diminuer de moitié la croissance des cals de chicorée isolés par Millemans (1989) est 1000 fois supérieure à celle qui produit des effets similaires sur des cultures cellulaires obtenues à partir de ces souches. Les plantes qui ont été régénérées à partir de ces cals supportent des doses d'herbicide 1500 à 2000 fois supérieures de chlorsulfuron. L'analyse génétique a montré que la transmission s'effectuait par voie sexuée de façon monogénique co-dominante. Par ailleurs, l'acquisition de la résistance au chlorsulfuron s'est accompagnée de résistances croisées envers d'autres sulfonylurées ainsi que l'imazaméthabenz, un herbicide de la famille des imidazolinones dont la cible est également l'acétolactate synthétase (Lavigne *et al.*, 1994).

Comme nous avons pu le développer au chapitre 1 de l'analyse bibliographique, la résistance aux herbicides s'articule dans la grande majorité des cas autour des trois mécanismes principaux que sont la métabolisation de la molécule herbicide en un composé inactif, la surproduction de la cible biochimique et la diminution de la sensibilité de cette dernière vis-à-vis de la molécule inhibitrice.

2.1. Surproduction de la cible

La surproduction de la cible biochimique de l'herbicide est fréquemment rencontrée chez les plantes présentant des résistances au glyphosate (Smart *et al.*, 1985). C'est d'ailleurs le seul cas décrit de résistance aux herbicides sélectionnée chez la chicorée (Sellin *et al.*, 1992). Bien qu'elle puisse conférer une résistance (Falco et Dumas, 1985 ; Forlani *et al.*, 1991 ; Caretto *et al.*, 1994 ; Harms *et al.*, 1992 ; Tourneur *et al.*, 1993), la surproduction de l'ALS est un événement rare d'acquisition de résistance aux inhibiteurs de l'ALS. Nous avons néanmoins vérifié cette hypothèse.

La comparaison de l'activité transcriptionnelle du gène *als*, par Northern blot, n'indique aucune différence significative entre les taux d'ARN messagers *als* des chicorées de souche sensible et résistante lorsque celles-ci sont placées dans le même environnement. La stabilité de ces ARNm ainsi que leur traduction ne sont pas affectées, puisque la comparaison de teneurs en protéine ALS réalisée par immunodétection, sur des gammes de protéines extraites de plantes sensibles et résistantes, montre des teneurs très proches. Fort de ces observations nous pouvons conclure que l'acquisition de la résistance aux sulfonylurées chez les chicorées n'est pas due à la surproduction de l'enzyme cible. Au contraire, la mesure de l'activité ALS a révélé une baisse

de 35% de l'activité spécifique de la forme enzymatique extraite de la souche résistante, comparativement à celle mesurée chez la souche sensible. Malgré cette chute d'activité spécifique, il est intéressant de noter que la croissance des plantes sensibles et résistantes est comparable et ne laisse donc pas imaginer que l'activité ALS *in situ* soit altérée, ce qui malheureusement ne peut être vérifié en l'état actuel de la méthode. L'ALS est une protéine très labile. L'extraction qui précède la mesure de l'activité enzymatique (*in vitro*) est une étape délicate qui cause certainement une baisse de l'activité réelle. Une altération de l'ALS affectant la stabilité de l'enzyme, pourrait être à l'origine de cette baisse d'activité spécifique, constatée chez les individus résistants alors qu'aucune variation de la teneur en ALS et de la croissance n'est mesurable.

2.2. Sensibilité de l'ALS de la souche R1OK

Nous avons pu montrer que les effets du chlorsulfuron sur l'activité ALS de la souche résistante, mesurée *in vitro*, est 570 fois moins sensible à cet herbicide que ne l'est l'ALS extraite de la souche sauvage. Une diminution si importante de la sensibilité de la cible biochimique envers son inhibiteur justifie pleinement l'acquisition d'une résistance d'une telle ampleur pour les individus ou les cellules qui contiennent une telle enzyme. Ce changement d'affinité de l'ALS envers les sulfonylurées a également été constaté chez de nombreuses plantes sélectionnées pour la résistance au chlorsulfuron, comme le tabac (Chaleff et Ray, 1984), l'*Arabidopsis thaliana* (Haughn et Sommerville, 1986), le lin (Jordan et Mac Hughen, 1987), le soja (Sebastian et Chaleff, 1987), le *Datura* (Saxena et King, 1988), le lotier (Popelis *et al.*, 1992). L'emploi répété de sulfonylurées a également conduit à la sélection d'adventices dont les ALS présentaient des sensibilités aux sulfonylurées diminuées. C'est le cas entre autres des stellaires (Hall et Devine, 1990), *Lactuca serriola* (Mallory-Smith *et al.*, 1990 a et b), *Kiochia scoparia* (Saari *et al.*, 1990), et des *Xanthium strumarium* (Bernasconi *et al.*, 1995). Toutes ces plantes présentent une diminution de sensibilité variant de 2 à plus de 1000 fois. L'altération qui a touché la souche R1OK figure donc parmi les références en la matière.

Il faut cependant noter que la diminution de sensibilité de l'ALS vis-à-vis du chlorsulfuron ($RID_{50}/SID_{50} = 570$) se traduit par une résistance 2 et 3 fois plus forte respectivement chez les cultures cellulaires et les plantes. Des observations similaires ont été faites chez des maïs (Anderson et Georgeson, 1989 ; Newhouse *et al.*, 1991 ; Shield *et al.*, 1996) ainsi que chez *Arabidopsis thaliana* (Haughn et Sommerville, 1986). Dans la plante, l'herbicide doit d'abord être absorbé, puis transporté avant d'atteindre sa cible biochimique. De plus, durant ce trajet il peut être partiellement inactivé par des systèmes enzymatiques particuliers, aussi est-il difficile d'estimer la dose efficace qui atteint réellement l'ALS. Hall et Devine (1993) ont montré que l'efficacité d'une sulfonylurée était diminuée car l'herbicide limite son transport vers les parties distales de la plante. De plus, selon son coefficient de partage entre la phase aqueuse et la phase organique, la molécule herbicide se retrouvera préférentiellement accumulée dans certains compartiments cellulaires (Cobb,

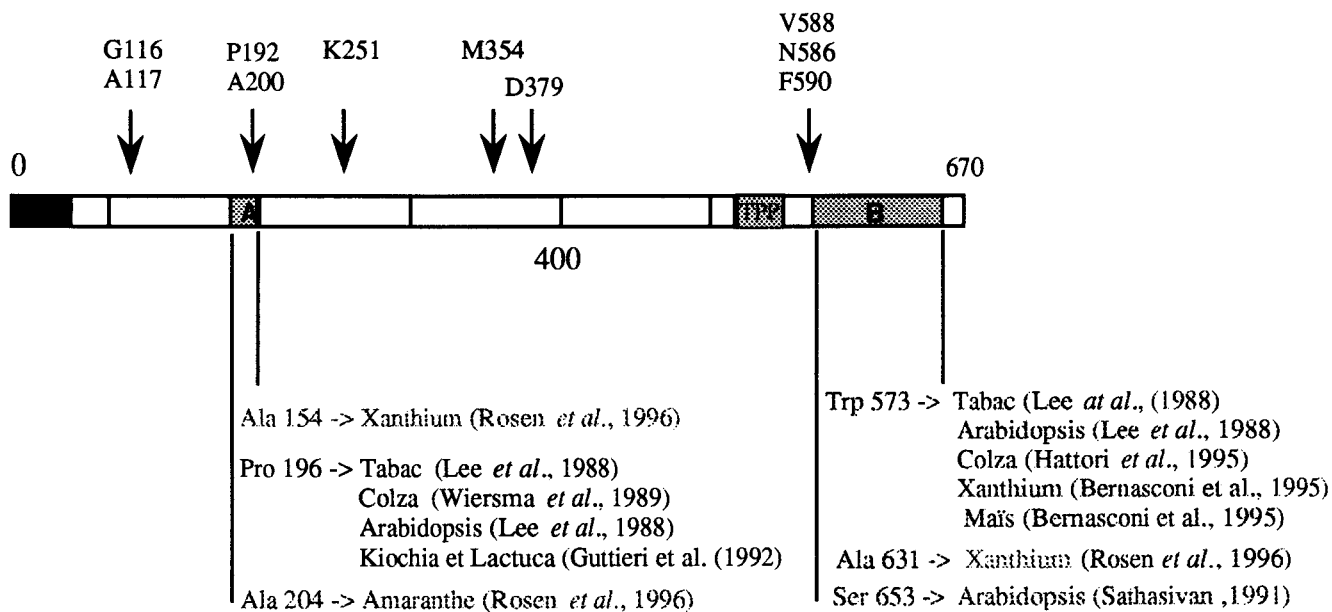


figure 1 : Mutations conférant une tolérance aux inhibiteurs de l'ALS

(Les flèches indiquent les points de mutation conférant une tolérance aux sulfonylurées chez la levure (Falco et Dumas, 1985)).

1992). Or, l'ALS se trouvant dans le stroma du chloroplaste, est plus facilement accessible aux composés hydrophiles.

Un autre élément susceptible d'expliquer cette différence est qu'il est toujours difficile d'apprécier, dans un dénombrement, le degré de sensibilité de chaque individu. En effet certains individus peuvent se trouver moins fortement exposés à l'herbicide.

Les chicorées R1OK ayant acquis simultanément une résistance croisée avec l'imazamethabenz, nous avons vérifié si la sensibilité à cette imidazolinone avait été modifiée par l'altération de l'ALS. En effet, bien que sélectionnée pour la résistance au chlorsulfuron, l'ALS de la souche R1OK est 125 fois moins sensible à l'imazaméthabenz que ne l'est celle de la souche sauvage. L'altération de la sensibilité de l'ALS aux imidazolinones a été décrite comme étant la cause de la résistance à ces herbicides chez *Arabidopsis thaliana* (Haughn et Sommerville, 1990) et le *Datura* (Saxena et King, 1990).

L'acquisition de résistances multiples après une sélection axée sur une seule molécule n'est pas un cas isolé, car plusieurs familles d'herbicides sont capables d'inhiber une cible commune : l'ALS. Bien que l'on n'observe pas de règle générale en la matière, des plantes aux résistances croisées ont pu être obtenues (Hattori *et al.*, 1995 ; Bernasconi *et al.*, 1995 ; Boutsalis et Powels, 1995).

Les gènes codant des ALS aux résistances spécifiques d'une famille d'herbicide ou de résistances croisées, ont été clonés. La comparaison de leurs séquences à celles de leurs homologues chez les plantes sensibles ont mis en évidence un ensemble de mutations ponctuelles responsables des différentes altérations des propriétés de l'ALS. L'introduction et l'expression de ces gènes dans des plantes sensibles a confirmé qu'ils étaient à l'origine de la résistance (Hattori *et al.*, 1992b). Aussi, une mutation du gène *cials* est probablement à l'origine de la résistance acquise par les chicorées R1OK. Ces points de mutations se répartissent en deux courtes régions très conservées du gène (Guttieri *et al.*, 1992). Le domaine A est situé à 600 nucléotides de l'ATG alors que le domaine B s'étend sur les derniers nucléotides de la région codante du gène (figure 1).

Depuis qu'il a été trouvé qu'une mutation unique pouvait conférer la résistance aux quatre familles d'herbicides capables d'inhiber, l'unicité du site de fixation des herbicides avancée par Schloss (1988) ne fait aucun doute. Cependant, l'absence de résistances croisées chez certains mutants suggère fortement l'existence, au sein de ce site unique, de domaines spécifiques à chaque herbicide. Aussi est-ce dans l'espace que doit être envisagée l'analyse des mutations, car les modifications de la structure primaire peuvent se traduire par des modifications des structures secondaire et tertiaire du site de fixation des herbicides.

Jusqu'à présent, l'absence de structures cristallographiques de l'ALS n'autorisait pas une approche raisonnée des points de mutation susceptibles de modifier les propriétés de cette enzyme. Cependant, le nombre croissant de séquences protéiques publiées permet une modélisation tri-dimensionnelle de protéines aux structures inconnues, par comparaison de l'homologie qui existe

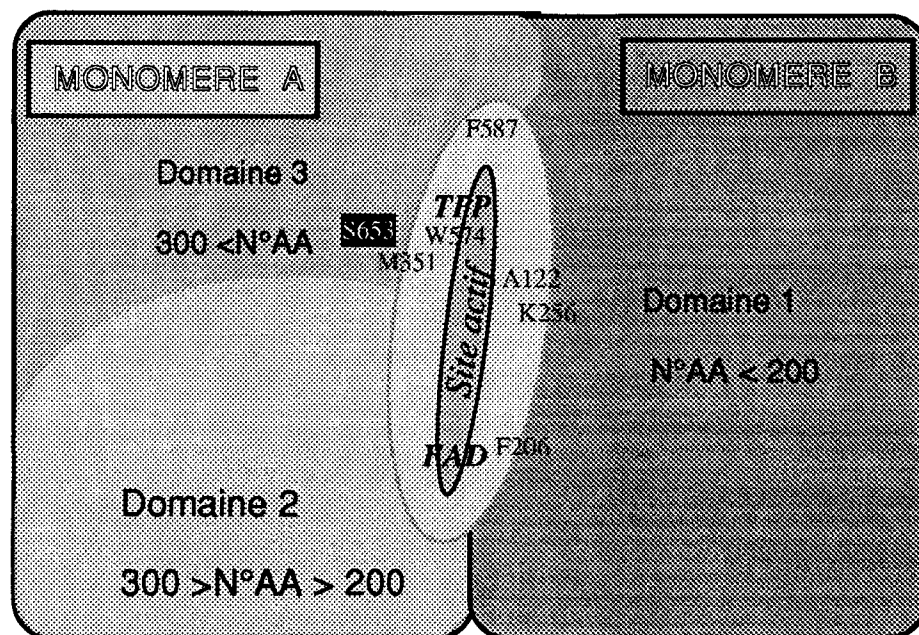


figure 2 : structure de L'ALS d'après Ott *et al.* (1996) et Ibdha *et al.* (1996)
 (Les domaines sont définis en fonction de la position des acides aminés dans la séquence peptidique du monomère de base. Les acides aminés figurés à l'entrée du site confèrent des tolérances aux herbicides).

entre leur séquence et celles de protéines dont la structure a été déterminée par RMN et rayon X (Sali, 1995). L'ALS appartient à une famille d'enzymes homologues, nécessitant de la thiamine pyrophosphate, qui catalysent des réactions dont la première étape est la décarboxylation du pyruvate (Ibdah *et al.*, 1996). Parmi celles-ci, figure la pyruvate oxydase (POX) dont la structure 3D chez *Lactobacillus plantarum* a été déterminée par Muller et Schulz (1993). Cette enzyme présente de nombreuses similitudes avec l'ALS. Outre leur substrat commun, elles nécessitent les mêmes cofacteurs (FAD, TPP et Mg^{2+}), ce qui a permis de démontrer leur origine commune (Schloss *et al.*, 1988 ; Chang et Cronan, 1988). La POX présente d'ailleurs une faible activité acétolactate synthétase. La modélisation de structure tridimensionnelle de l'AHASIII d'*E. coli* (Ibdah *et al.*, 1996), mais aussi de l'ALS d'*Arabidopsis thaliana* (Ott *et al.*, 1996) a pu être conçue à partir de la structure cristallographique de la POX.

Par homologie avec la pyruvate oxydase dont la forme active est un homotétramère (Muller et Schulz, 1993), les auteurs suggèrent que le site actif se trouverait à l'interface de deux grandes sous-unités chez les bactéries ou de deux monomères chez les plantes. Cette hypothèse est compatible avec l'association minimale entre deux grandes sous-unités et deux petites sous-unités indispensable pour retrouver une activité enzymatique chez l'isozyme III d'*E. coli* (Vyazmensky *et al.*, 1996) et les complexes de haut poids moléculaire retrouvés chez les ALS de plantes. Le besoin absolu de FAD qui, rappelons-le ne participe pas à la réaction, s'expliquerait par le fait qu'il permettrait la multimérisation (Singh et Schmitt, 1989).

Le site actif (figure 2 et annexe 3) apparaît dans ce modèle sous la forme d'une poche définie par trois régions distinctes de chaque monomère. La plupart des acides aminés impliqués dans les résistances aux différents inhibiteurs de l'ALS se trouvent positionnés à l'entrée de cette poche en surface de la protéine (Ott *et al.*, 1996 ; Ibdha *et al.*, 1996). Ceci confirme les travaux de Schloss et Alabaugh (1990) et de Sathasivan *et al.* (1991) concernant la nature extrinsèque du site de fixation des herbicides, ceux de Schloss *et al.* (1988) qui suggéraient la proximité du site de fixation des herbicides par rapport au cofacteur FAD, et l'altération de la fixation du pyruvate sur l'ALS observée chez des mutants de *Datura* résistants aux sulfonylurées (Rathinasabapathi et King, 1991). Le site de fixation des herbicides apparaît dans le modèle comme un ensemble de boucles et d'hélices α provenant de différents domaines du monomère. Cette modélisation semble reproduire assez bien la structure de l'ALS puisqu'elle a permis un choix raisonné de mutations susceptibles de conférer une résistance aux herbicides. L'analyse par mutagénèse dirigée a montré que ces mutations étaient le support de résistances aux imidazolinones (Ott *et al.*, 1996), confirmant ainsi les suggestions de Sathasivan *et al.* (1991). Selon ces auteurs les changements d'acides aminés, consécutifs à une mutation, causent de légères modifications des charges électriques et provoquent des encombrements stériques au niveau du site de fixation des herbicides, diminuant ainsi l'affinité de l'herbicide pour son site.

Ne disposant pas de la séquence entière du gène *cials* codant l'ALS de la souche R1OK, il nous est difficile de définir la ou les mutation(s) qui ont été

sélectionnées par Millecamps (1989). Toutefois la nature et l'intensité des résistances observées nous amènent aux déductions suivantes :

- le gain de résistance à l'imazaméthabenz observé chez l'ALS de la souche R1OK ($RDI_{50}/SDI_{50} = 125$) est très significatif et se rapproche beaucoup plus des niveaux de résistance observés à la suite de mutations internes au domaine B (Sathasivan *et al.*, 1991) que lorsque celle-ci se produit à l'intérieur du domaine A (Rosen *et al.*, 1996).
- la résistance croisée avec les sulfonylurées rend peu probable une mutation de la sérine 653 (Sathasivan *et al.*, 1991) car celle-ci est propre à la résistance aux imidazolinones.
- la substitution au niveau du tryptophane 573 pourrait expliquer le profil de résistance croisée aux imidazolinones et à plusieurs sulfonylurées, obtenue chez la souche R1OK.
- les amplifications par PCR à l'aide des amorces 2 et 5' n'ont pas été possibles à partir de l'ADN des plantes résistantes alors qu'elles l'ont été aisément à partir de l'ADN de la souche sensible. Sachant que l'amorce 5' chevauche la région codant pour ce tryptophane, une mutation au sein de la séquence complémentaire de l'amorce permettrait à la fois d'expliquer la non-amplification, mais aussi le profil de résistance.
- l'affinité de l'ALS pour le pyruvate n'étant pas modifiée dans la lignée résistante, il y a de fortes chances pour que la mutation n'intervienne pas dans la région catalytique du site actif, mais en surface de la protéine.

2.3. Capacité de la chicorée à métaboliser les sulfonylurées

La résistance naturelle aux sulfonylurées est généralement le fruit d'une capacité à rendre inactif le composé herbicide. Aussi la sensibilité naturelle des chicorées envers les sulfonylurées rend peu probable l'existence d'un tel mécanisme chez cette dernière. Toutefois, le Safari, un herbicide de la famille des sulfonylurées (trisulfuron méthyle) est toléré par les chicorées lorsqu'il est appliqué en post-levée uniquement et à un stade de développement précis (culture en croissance et saine dont plus de 80% des plantes ont atteint le stade 1 feuille vraie). Lorsque ces conditions optimales sont remplies, les chicorées présentent tout de même un retard de croissance de une à trois semaines ainsi qu'une légère dépigmentation, ce qui correspond aux premiers symptômes observés après un traitement à base de chlorsulfuron. En dehors, de ces conditions optimales, tout emploi de trisulfuron méthyle est fortement déconseillé. Nous pensons que ceci doit probablement être dû à une métabolisation plus active dans les feuilles vraies par rapport à celle des cotylédons et des racines, comme cela a été observé chez le colza par Lichtner (1995). D'ailleurs, tout nouveau semis de chicorée est vivement déconseillé sur une terre ayant reçu une application récente de trisulfuron méthyle. Nous ne pouvons donc pas rejeter l'éventualité que la résistance acquise par la souche

R1OK puisse être due à la mise en place ou l'activation d'un système de détoxification. Cependant la forte diminution, chez cette souche, de sensibilité de l'ALS à l'inhibition imposée par le chlorsulfuron ainsi que l'existence de résistance étendue à d'autres sulfonylurées (Lavigne *et al.*, 1994) et même aux imidazolinones rendent peu probable cette éventualité. En effet, Anderson et Swai (1992) ont montré que la capacité du blé à métaboliser le metsulfuron méthyle ne s'étendait pas au sulfométuron méthyle de structure pourtant voisine.

2.4. Intérêt agronomique de la souche R1OK

La chicorée est une espèce dont la culture souffre de l'absence d'un herbicide sélectif performant permettant le contrôle des adventices durant les premiers mois de la culture. Aussi, l'obtention d'une chicorée résistante aux sulfonylurées et aux imidazolinones, à des doses nettement supérieures à celles qui permettent un contrôle total des principales adventices, présente un très grand intérêt agronomique. Une telle résistance autorise un désherbage chimique efficace à moindre frais. Cinq épandages d'herbicides sont actuellement nécessaires pour contrôler les populations d'adventices. L'efficacité et la rémanence des sulfonylurées permet de réduire à 2 ce nombre et par là-même, la quantité de pesticide, mais surtout évite le sarclage manuel. L'autre intérêt est de pouvoir sélectionner très facilement dans la descendance d'une plante, les individus hybrides de ceux issus d'autofécondation, ce qui facilite le travail du sélectionneur et permet au producteur de ne cultiver que des individus bénéficiant de la vigueur hybride. De plus elle met les producteurs à l'abri de tout risque de rémanence de ces molécules, auxquelles les chicorées sont très sensibles.

Cependant si l'on veut pouvoir profiter longtemps de cet intérêt, deux précautions sont à prendre. Comme l'acquisition de la résistance n'a pas occasionné de coût pour les plantes R1OK (Lavigne *et al.*, 1995), les individus qui portent le gène mutant ne seront pas contre-sélectionnés en l'absence de sulfonylurées. Or, comme la chicorée est une plante allogame qui est capable de fécondations croisées avec des astéracées sauvages, il existe un risque de dispersion du gène responsable de la résistance vers les adventices. Les chicorées, plantes bisannuelles, sont cultivées en tant qu'annuelles, par conséquent il est relativement rare (sauf en cas de froids tardifs prolongés) de trouver ces plantes en fleur. Afin de minimiser le risque de dispersion, il est impératif d'éliminer toute floraison à partir des racines non récoltées, au cours de la culture suivante. Ceci peut être aisément réalisé à l'aide d'un herbicide n'ayant pas pour cible l'ALS, ce qui présente l'avantage de ne pas créer de façon prolongée une pression de sélection par les inhibiteurs de l'ALS, ce qui aurait inévitablement pour terme ultime l'apparition d'adventices résistantes. Ceci aurait pour conséquence de rendre inefficace le désherbage chimique des chicorées à partir de sulfonylurées. L'emploi combiné de différents désherbants compatibles avec les récoltes en place étant limitées, les jachères représentent une opportunité pour l'application d'herbicides totaux comme le glyphosate, dont l'emploi ne génère pas l'apparition spontanée de résistances. Rappelons

que la règle générale en matière de désherbage est l'alternance, non pas des matières actives, mais des cibles biochimiques.

3. Régulation du métabolisme des acides aminés branchés

Le métabolisme des acides aminés branchés chez la chicorée est sous le contrôle de l'ALS. Nous avons montré que celle-ci était codée par un gène unique *cials* codant pour l'acétolactate synthétase. L'analyse de la sensibilité d'un extrait protéique, issu d'un individu hétérozygote pour le caractère de résistance aux sulfonylurées, nous indique que les deux allèles du gène sont exprimés simultanément, puisque l'on retrouve les formes enzymatiques sensible et résistante. L'expression de *cials* varie au cours du développement de la plante et permet la synthèse d'une ALS sensible au contrôle allostérique imposé par les produits finaux valine et leucine.

3.1. Expression de *cials*

Contrairement à ce qui est observé chez le colza (Ouelet *et al.*, 1992) la chicorée ne présente qu'une seule forme enzymatique. La régulation de la biosynthèse des acides aminés branchés ne peut donc pas reposer sur l'existence d'isozymes dont l'expression tissu-spécifique permettraient, dans certains organes, une régulation différente de celle qui a lieu dans le reste de la plante. Comme l'ont démontré Schmidt et Singh (1990) et Keeler *et al.* (1993) respectivement chez le haricot et le tabac, nous avons pu mesurer une activité ALS dans tous les tissus de la chicorée. Toutefois, selon le stade de développement mais aussi la nature de l'organe considéré, d'importantes fluctuations sont observables.

Chez la jeune plantule, l'activité ALS et la croissance pondérale sont corrélées positivement. Il suffit d'ailleurs de modifier les conditions de croissance, en incorporant des concentrations variables de saccharose dans les milieux de culture, pour s'apercevoir que l'activité ALS se maintient à un haut niveau dans les conditions qui favorisent la croissance alors qu'elles chutent fortement pour les conditions limitant le développement des plantes. L'activité transcriptionnelle de *cials* présente des fluctuations assez proches de celles observées pour l'activité enzymatique. Dans les premiers stades de développement de la plantule, l'activité enzymatique semble avant tout gouvernée par l'activité transcriptionnelle du gène. Toutes deux sont d'autant plus fortes que ces organes sont jeunes, en croissance active, et qu'ils présentent une synthèse protéique active nécessitant une production importante d'acides aminés.

Chez les végétaux, la division cellulaire est limitée dans l'espace aux zones méristématiques. Les résultats obtenus que nous avons obtenus en hybridation *in situ* sur l'appareil racinaire de jeunes chicorées ont permis une superposition précise des lieux de division cellulaire et de sites de transcription du gène *cials*. La résolution de la technique ne nous permet malheureusement

pas de déterminer précisément si la transcription de *cials* s'arrête au moment de la division cellulaire ou si elle se produit plus tardivement, lorsque la cellule commence à se différencier.

Il est néanmoins intéressant de noter que le promoteur du gène *cials* permet la même expression dans la racine de chicorée que le promoteur *cyclAt* qui gouverne l'expression de la cycline mitotique *CyclAt*. V. Kimpe a montré au sein de notre laboratoire que ce promoteur permettait l'expression du gène rapporteur *uidA* dans les méristèmes racinaires (communication personnelle). Cette cycline s'exprime juste avant l'induction de la mitose des cellules des méristèmes apicaux, mais aussi dès les premières divisions qui donneront par la suite naissance aux racines secondaires (Ferreira *et al.*, 1994). L'ajout d'oryzaline, qui inhibe la formation du fuseau de microtubules lors de la division cellulaire, et nous a permis de mettre en évidence des quantités d'ARNm *als* importantes dans les zones méristématiques.

L'étude de la plante en phase reproductrice montre des fluctuations importantes à la fois de l'expression du gène mais aussi de l'activité enzymatique. Cette fois encore nous avons pu établir une forte corrélation entre l'activité enzymatique ALS et de la transcription du gènes *cials*.

L'expression est importante dans les organes qui présentent des divisions cellulaires comme l'ensemble de l'appareil reproducteur. La constitution de réserves lors de la formation des akènes nécessite beaucoup d'acides aminés ce qui explique la très forte activité ALS au sein des inflorescences fécondées (le développement des fleurs d'une même inflorescence est synchrone), ainsi qu'une transcription importante du gène *cials*. Le développement des boutons floraux et l'ouverture des fleurs, bien qu'étant des organes en croissance nécessitent moins de précurseurs de la synthèse protéique. Leurs activités ALS et leurs taux de transcrits *als* sont deux fois moins importants que ceux observés après la fécondation.

L'expression de *cials* dans les parties végétatives de la plante est relativement uniforme mais basse. Il en est de même pour l'activité enzymatique, à l'exception cependant des tiges et des bractées inflorescentielles.

Dans leur globalité, nos résultats concordent avec ceux obtenus par Keeler *et al.* (1993) chez le tabac et par Ouellet *et al.* (1992) chez le colza. Toutefois, la faible activité mesurée dans les racines tubérisées et les feuilles de la plante fleurie se justifient par la biologie de notre matériel expérimental. En effet, la chicorée étant une bisannuelle, la racine tubérisée ne présente pas de phase de croissance la seconde année et par conséquent ne nécessite pas d'importants besoins en acides aminés. Au contraire, elle représente une source de protéines vacuolaires solubles susceptibles d'être réallouées (Limami *et al.*, 1996). De même, au moment de la floraison, le bouquet foliaire est définitivement mis en place et l'absence de croissance se traduit par une faible activité ALS et une expression du gène.

3.2. Régulation allostérique de l'ALS

La mesure d'une activité enzymatique *in vitro* traduit les potentialités enzymatiques d'un extrait protéique mais ne reflète en rien l'activité *in situ*.

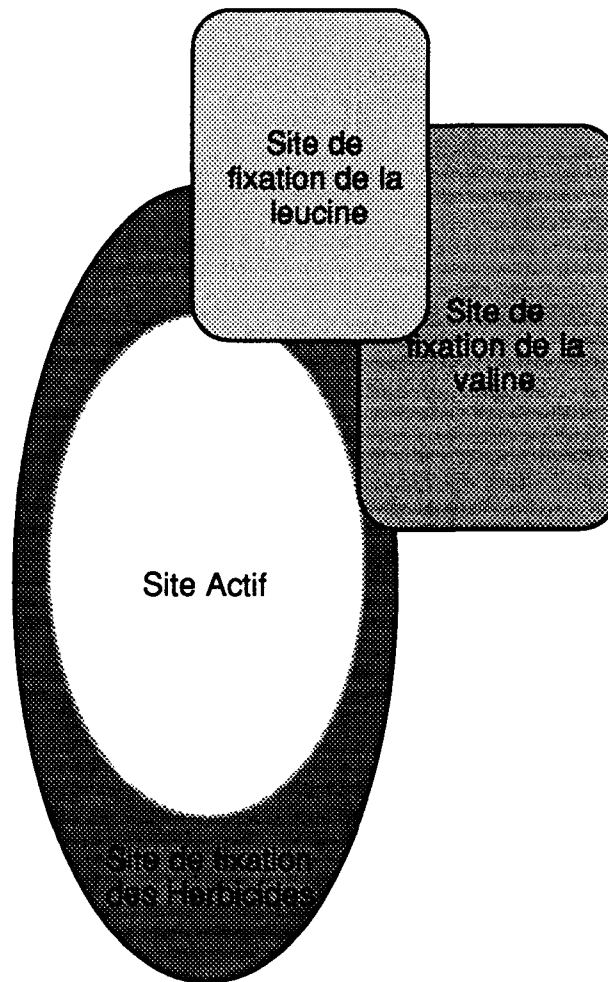


figure 3 : Modèle possible du positionnement des sites de fixation des inhibiteurs de l'ALS

Aussi ne devons-nous pas être surpris de n'avoir pu mettre en évidence, dans nos mesures précédentes, de régulation post-traductionnelles. La mesure de l'activité ALS implique au cours de l'extraction une étape de désalage durant laquelle les molécules inhibitrices de petites tailles (valine et leucine) sont séparées de l'ALS. L'activité enzymatique mesurée sur l'extrait désalé permet d'estimer la quantité d'enzymes mais ne correspond qu'à une surestimation de l'activité *in situ*.

En effet, l'ALS de chicorée est régulée de façon allostérique par la valine et la leucine avec une efficacité proche de celle observée chez d'autres plantes (Shield *et al.*, 1996). Si la régulation allostérique au niveau des enzymes clés des voies de biosynthèse est admise (Wallsgrave, 1990 ; Galili *et al.*, 1995), le recours aux mutants présentant des altérations de cette régulation est nécessaire à l'étude de l'interdépendance et de la hiérarchie de régulation entre les différentes enzymes impliquées dans ces voies ainsi que les conséquences sur la synthèse du ou des produits finaux. La souche R1OK dont l'ALS présente un rétrocontrôle par la valine et la leucine inférieur à l'ALS sauvage, constitue un outil intéressant pour l'étude de la régulation de cette voie de biosynthèse. Le fait que la sensibilité au rétrocontrôle par l'isoleucine ne soit pas modifiée n'est pas surprenante, car l'inhibition allostérique imposée par l'isoleucine s'effectue plus en amont de l'ALS, au niveau de la thréonine désaminase (Wallsgrave, 1990). Ceci explique la dose élevée d'isoleucine ($DI_{50} > 100$ mM) requise pour inhiber l'activité ALS. D'ailleurs, nous avons pu constater qu'à de telles doses l'incorporation d'acides aminés non-branchés (alanine et cystéine) dans le mélange réactionnel provoque une diminution semblable de l'activité ALS.

L'altération conjointe de la régulation par la valine et la leucine indique que ces deux acides aminés agissent sur un site unique de l'ALS. Toutefois les degrés d'insensibilisation étant différents il est fort probable qu'ils agissent sur des domaines différents mais chevauchants au sein de ce site (figure 3). Buttler et Shield (1992) positionnent le site de fixation de la leucine comme chevauchant le site de fixation des herbicides. Il est donc envisageable que l'altération de la structure quaternaire de l'ALS puisse avoir à la fois réduit la sensibilité aux herbicides et aux acides aminés. Après avoir vérifié que l'affinité pour le substrat n'était pas modifiée par l'acquisition de la résistance, nous avons déterminé la teneur en acides aminés libres chez le mutant et le type sauvage.

Parmi les 18 acides aminés dosés, seuls la valine et la leucine présentent des variations importantes de leurs teneurs. L'altération de sensibilité de l'ALS au rétrocontrôle par la valine et la leucine se traduit par une augmentation des teneurs respectives de ces acides aminés chez les plantes R1OK, ce qui tendrait à prouver qu'il n'existerait pas de point de régulation entre l'acétolactate ou l'acétohydroxybutyrate et les acides aminés branchés. Tourneur *et al.* (1993) ont montré que la surexpression de l'ALS pouvait conférer une résistance accrue à la valine. C'est donc l'ALS qui, seule, contrôle le flux de carbone vers la voie de biosynthèse de la leucine et de la valine. La voie parallèle qui mène à la synthèse de l'isoleucine présente donc quant à elle deux points de régulation, l'un par son produit final au niveau de la thréonine désaminase et l'autre par la valine et la leucine au niveau de l'ALS. Schell et Casida (1985) ont d'ailleurs montré que l'apport de valine diminuait la synthèse d'isoleucine chez *Spirodella*. Contrairement à ce que l'on aurait pu attendre, la diminution de la sensibilité au rétrocontrôle ne confère pas à nos chicorées de résistance à la

valine ni à la leucine. La présence dans le milieu de culture de 1mM de valine, de leucine ou de l'association conjointe de valine et de leucine, inhibe très fortement la croissance, alors que la présence à même concentration des trois acides aminés permettent une croissance proche de celle observée en absence d'acides aminés comme avaient pu l'observer Anderson et Hibberd (1985) chez des suspensions cellulaires de maïs. Nous avons observé que l'apport de valine ou de leucine associé à celui d'isoleucine permettait une croissance intermédiaire. Ceci confirme le schéma de régulation proposé précédemment, l'apport de valine et/ou de leucine crée une carence en isoleucine car l'ALS est inhibée, mais explique plus difficilement le rôle de l'isoleucine seule.

Parmi les mutants résistants aux quatre familles d'herbicides capables d'inhiber l'ALS, rares sont ceux dont l'ALS présentait une diminution de la sensibilité à l'herbicide associée à une altération du rétrocontrôle (Subramanian *et al.*, 1991 ; Rathinasabapathi *et al.*, 1990 ; Rathinasabapathi et King, 1992). Parallèlement, des plantes résistantes à la valine ont été obtenues (Bourgin, 1978 ; Relton, 1986 ; Wu *et al.*, 1994; Forlani *et al.*, 1996). L'acquisition de cette résistance est permise par une diminution de l'absorption de l'acide aminé (Bourgin *et al.*, 1985 ; Relton *et al.*, 1986), ou alors par une altération de la sensibilité de l'ALS dont le seul support génétique connu à ce jour est la substitution d'une sérine en leucine en position 214 du gène codant pour l'ALS du mutant Val⁻¹ de tabac (Hervieu et Vaucheret, 1996). Les isozymes AHAS I et III d'*E. coli* sensibles à la valine comportent une sérine en position 214, alors que chez l'isozyme II, insensible à la valine, c'est une alanine que l'on retrouve en position 214. Ce point de mutation ne semble cependant pas être le seul capable de conférer une résistance à cet acide aminé (Hervieu et Vaucheret, 1996). Les études génétiques réalisées par Wu *et al.* (1994) chez *Arabidopsis* indiquent que la résistance enzymatique aux trois acides aminés est de nature monogénique et se situe dans le gène *csr* d'*Arabidopsis*. Toutefois, ces plantes ne sont résistantes qu'à la valine, ce qui suggère l'existence d'un autre point de contrôle dans la voie spécifique de la leucine.

De même, Tourneur *et al.* (1993) n'observent qu'un doublement des teneurs en acides aminés branchés bien qu'ils aient réussi à multiplier par 12 l'activité de l'ALS de tabac. Les dosages d'acides aminés réalisés chez les chicorées montrent que si l'augmentation de valine endogène est proportionnelle à la diminution de la sensibilité au rétrocontrôle qu'elle impose à l'ALS, il n'en est pas de même pour la leucine dont une diminution d'un facteur de 10 de la sensibilité au rétrocontrôle ne se traduit que par un doublement des teneurs endogènes de cet acide aminé. La 2-isopropylmalate synthétase, enzyme connue pour être inhibée par la leucine pourrait bien correspondre à ce point de contrôle spécifique de la synthèse de la leucine. La voie de biosynthèse de la leucine présente donc deux points de régulation: l'ALS et la 2-isopropylmalate synthétase.

L'ALS représente donc le point régulation majeur du flux de carbone vers la voie de biosynthèse des acides aminés branchés, toutefois deux autres enzymes, la thréonine désaminase et l'isopropylmalate synthétase permettent le contrôle des proportions relatives en chacun de ces trois acides aminés. Ce

système de régulation est très efficace car ces proportions relatives fluctuent très peu d'un organisme à un autre pendant la phase de croissance végétative. Cette balance est très importante pour l'orientation de la croissance, ce qui explique l'effet des déséquilibres dus à l'apport exogène d'acides aminés. Nous avons d'ailleurs montré que l'inhibition de la croissance pouvait être levée dans ce cas par une simple suppression des acides aminés. Un déséquilibre des teneurs en acides aminés branchés dû à l'inhibition de l'ALS par les herbicides, l'apport exogène de valine ou d'isoleucine ou encore par l'emploi d'une stratégie antisens, provoque un arrêt des divisions cellulaires.

4. Clonage de *cials*

Le clonage du gène *cials* a été entrepris dans le but d'identifier la ou les mutation(s) se trouvant à l'origine de la diminution de la sensibilité de l'ALS vis-à-vis des sulfonylurées, des imidazolinones mais aussi de l'altération du rétrocontrôle par la valine et la leucine. L'utilisation de sondes hétérologues sur les acides nucléiques de chicorée pose de nombreux problèmes. Aussi, n'ayant pas été capables de détecter le gène *cials* à l'aide des sondes hétérologues correspondant aux gènes *SuRA* et *BNALS* codant respectivement pour l'ALS de tabac et de colza, nous avons produit une sonde homologue par PCR à partir d'amorces situées en position 1274 - 1295 et 1883 - 1902. Le fragment amplifié correspond à la taille attendue pour cette partie du gène (628 nucléotides) et confirme tout comme la taille de l'ARNm *als* dans le gène *cials*, l'absence d'intron observée chez les autres espèces (Mazur *et al.*, 1987 ; Lee *et al.*, 1988). L'homologie de la séquence nucléotidique par rapport aux séquences correspondantes déterminées chez les dicotylédones est de 71,1 à 73,8% alors qu'elle est de 68% lorsqu'on la compare à la séquence du maïs et seulement de 55,2% par rapport à l'ALS de levure. Ces taux élevés d'homologie ne sont en rien surprenants car cette partie du gène, très conservée, code entre autres pour le site impliqué dans la fixation de la thiamine pyrophosphate qui fait partie du site catalytique (Ott *et al.*, 1996). Tous les acides aminés consensus dans cette région se retrouvent chez la chicorée de type sauvage.

A l'aide de cette sonde, il nous a été possible de mettre en évidence un polymorphisme pour l'enzyme de restriction *EcoRI* entre les individus sensibles et résistants, mais aussi d'isoler à partir d'une banque génomique (réalisée à partir d'individus sensibles aux sulfonylurées) un bactériophage recombinant. Le séquençage a malheureusement confirmé la nature chimérique du clone dont la carte de restriction ne correspondait qu'en partie à celle réalisée à partir de l'ADN génomique. Néanmoins, il nous a permis de déterminer la séquence du gène *cials* située en aval du produit PCR *cials*25' jusqu'au codon stop TGA. Cette région du gène est relativement bien conservée puisque la séquence nucléotidique présente 73,8 % d'homologie avec la séquence correspondante chez le tabac, alors que la séquence peptidique qui en est déduite présente un homologie de 82 % (annexe 4 et 5). Bien que parmi les séquences de gènes codant, celle du gène *cials* est la plus proche de celle de la levure, le degré d'homologie observé vis-à-vis des séquences des gènes codant pour les ALS de tabac et de colza n'explique pas les problèmes d'hybridation

rencontrés avec les sondes hétérologues provenant de ces deux espèces. Nous ne sommes malheureusement pas en mesure d'expliquer ce problème. En position 573 et 653 nous retrouvons respectivement un tryptophane et une sérine caractéristiques, en ces positions, des séquences des ALS de plantes sensibles. Seules les séquences codant pour la NADH déshydrogénase, la Rubisco et la nitrate réductase de chicorée sont connues chez la chicorée. Parmi ces séquences le codon stop TGA n'a été retrouvé que chez la NADH déshydrogénase. Nous avons également déterminé à partir de ce clone la séquence non codante située en aval du codon stop. Le signal potentiel de polyadénylation (AAUAAA) est retrouvé en position +117.

PERSPECTIVES

Notre travail a permis de déterminer la nature du mécanisme impliqué dans l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS chez la souche de chicorée R1OK. Il a également montré qu'une diminution de l'efficacité de la régulation allostérique de l'ALS par la leucine et la valine y était associée. Le clonage du gène entier *cials* des souches sensibles et résistantes est maintenant indispensable pour une meilleure compréhension des modifications du site de fixation des herbicides et des différents domaines du site de régulation allostérique. Une étude tridimensionnelle par comparaison des séquences de l'ALS de chicorée sauvage et de l'ALS modifiée consécutivement à l'acquisition de la résistance à celle de la pyruvate oxydase serait alors envisageable. Elle permettrait de définir de façon bien plus précise, la position relative du ou des sites de fixation des inhibiteurs sur l'ALS.

Nous disposons actuellement d'une séquence de 900 nucléotides du gène *cials* issu de chicorées sensibles. Cette région située à l'extrémité 3'OH du gène recouvre largement le domaine connu pour être le siège des mutations conférant la résistance aux inhibiteurs de l'ALS. Aussi pouvons nous prétendre isoler assez rapidement, par PCR, la région correspondante du gène *cials* issu de la souche résistante, afin d'en comparer la séquence à celle de son homologue sensible. Si, comme nous le pensons la ou les mutation(s) se situent dans cette région du gène, nous aurons une idée précise de l'altération à l'origine de la résistance. Pour que cette étude soit complète, il nous faudra prouver que l'introduction du gène confère la résistance à des plantes sensibles. Cela implique le clonage de l'extrémité 5' du gène *cials*. La technique de PCR inverse devrait pouvoir nous fournir ce fragment manquant.

L'isolement du gène *cials* issu de la souche résistante est intéressant à plusieurs titres. Son introduction dans d'autres cultures maraîchères qui, comme la chicorée, souffrent d'une insuffisance d'herbicides sélectifs efficaces, permettrait à moindre frais un désherbage chimique. Ce gène peut être utilisé en tant que gène de sélection pour étudier la compatibilité des croisements entre espèces ou lignées proches. En choisissant un parent sensible et un parent pollinisateur résistant, un simple traitement par l'herbicide permet de sélectionner les produits d'allofécondation. Il constitue également un excellent gène de sélection pour l'isolement de plantes transgéniques.

Des coupes semi-fines permettraient d'analyser les modifications histologiques qui sous-tendent les changements morphologiques provoqués par l'apport exogène d'acides aminés branchés sur la croissance et la morphogenèse de plantules de chicorées. L'augmentation des teneurs en valine et leucine constatée chez les plantes de la souche R1OK montre que l'ALS constitue un point de contrôle important de la biosynthèse de ces acides aminés. Toutefois, l'absence de corrélation stricte entre l'importante diminution de la sensibilité de l'ALS au rétrocontrôle imposé par la leucine et l'augmentation de la teneur en cet acide aminé observée chez le résistant, laisse penser qu'il existe un autre point de régulation.

Par transfert de la construction comprenant le gène *ciAls* placé en orientation sens et anti-sens sous le contrôle de différents promoteurs, nous pourrions étudier l'effet de sa surexpression ou de son inactivation dans différents organes de la plante sur la régulation tissulaire de la biosynthèse des acides aminés branchés. Cette démarche nous permettrait d'apprécier la hiérarchie de régulation entre les différentes enzymes impliquées dans ces voies métaboliques dans la perspective de pouvoir un jour contrôler les teneurs en acides aminés branchés indispensables à notre alimentation.

Dans cette démarche, un intérêt tout particulier doit être porté aux organes floraux qui expriment plus fortement l'ALS et qui sont connus pour surexprimer la thréonine désaminase (Samach *et al.*, 1995).

RESUME

L'acétolactate synthétase (ALS, E.C 4.1.3.18.) est la première enzyme commune des voies de biosynthèse des acides aminés branchés valine, leucine et isoleucine. Notre travail décrit pour la première fois la régulation de cette enzyme chez la chicorée.

Extraite en présence de FAD, elle se présente sous la forme d'un complexe peptidique de haut poids moléculaire (440 kDa). L'ALS, chez la chicorée, est codée par un gène unique *cials* dont les deux allèles sont exprimés. Il permet la synthèse d'un ARNm unique de 2,2 kb codant pour un monomère de 57 kDa.

Après avoir mesuré l'activité ALS dans tous les organes de la plante, il apparaît que les tissus présentant une phase active de croissance sont les sièges principaux à la fois de la transcription du gène *cials* et de l'activité enzymatique. Par hybridation *in situ*, nous avons montré que la transcription du gène *cials* dans la racine était limitée aux zones méristématiques. C'est le cas chez les jeunes plantules et les organes reproducteurs. La formation des akènes est une phase du développement de la plante qui nécessite une activité ALS importante.

L'ALS est la cible biochimique de 4 familles d'herbicides. L'acquisition de la résistance à deux de ces herbicides (les sulfonylurées et imidazolinones) chez le variant de chicorée R1OK n'est pas due à la surproduction de l'enzyme, mais à une modification structurale qui diminue la sensibilité de la protéine vis-à-vis ces herbicides. Le clonage du gène *cials* nous a fourni la séquence codante d'un domaine impliqué dans la fixation des herbicides chez la plante sensible.

La mutation de l'ALS chez le variant R1OK a diminué la sensibilité de l'enzyme au rétrocontrôle exercé par la leucine et la valine respectivement d'un facteur 10 et 3. Le doublement des teneurs en valine et leucine chez ces plantes indique que l'ALS constitue un point de contrôle de la voie de biosynthèse de la valine, alors que la synthèse de leucine présente sans doute en plus un deuxième point de contrôle situé en aval de l'ALS dans la voie de biosynthèse des acides aminés branchés. L'altération de la sensibilité à la régulation allostérique de l'ALS par ces acides aminés ne confère pas pour autant à la plante une résistance vis-à-vis d'apports exogènes de valine et de leucine.

ANNEXES

Description de l'appareil reproducteur



Photo 1 : Floraison de l'endive (x 0,07)

Bisannuelle, l'endive édifie son appareil reproducteur la deuxième année. Ce dernier se présente sous la forme d'une hampe florale portant quelques dizaines de capitules réunis, par deux ou trois, à l'aisselle des feuilles supérieures et à l'extrémité des rameaux florifères (photo 1). Ces capitules, entourés d'un involucre de bractées, regroupent de 15 à 20 fleurs hermaphrodites (photo 2).

Les pétales (5), de couleur bleue, sont soudés à leurs bases pour former une corolle tubuleuse qui s'allonge d'un côté en languette : fleur ligulée (schéma 1).

Les étamines (5) peu distinctes, sont soudées en un tube au travers duquel passe le style. Les fentes de déhiscence sont tournées vers l'intérieur. Au sein d'une même fleur, les anthères étant mûres avant les stigmates, la fécondation est indirecte.

L'ovaire est infère, uniloculaire, et, bien que formé par la soudure de deux carpelles "ouverts", uniovulé.

Le fruit est un akène surmonté d'une couronne d'écailles persistantes : le pappus (schéma 1).



Photo 2 : Coupe transversale de bouton floral (a), capitule épanoui (b) et fécondé d'endive (c)

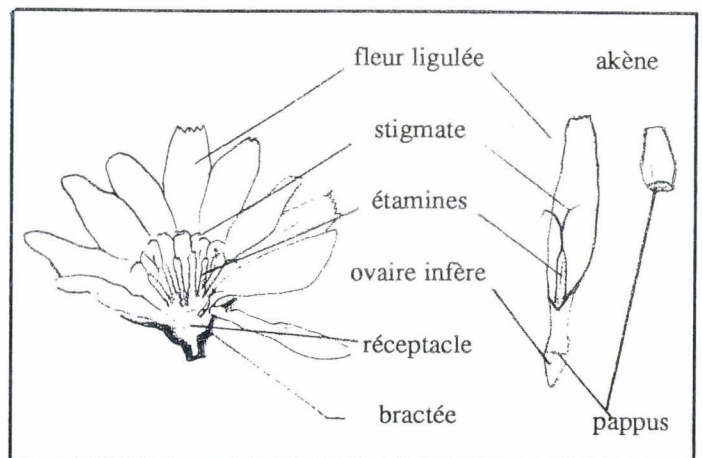
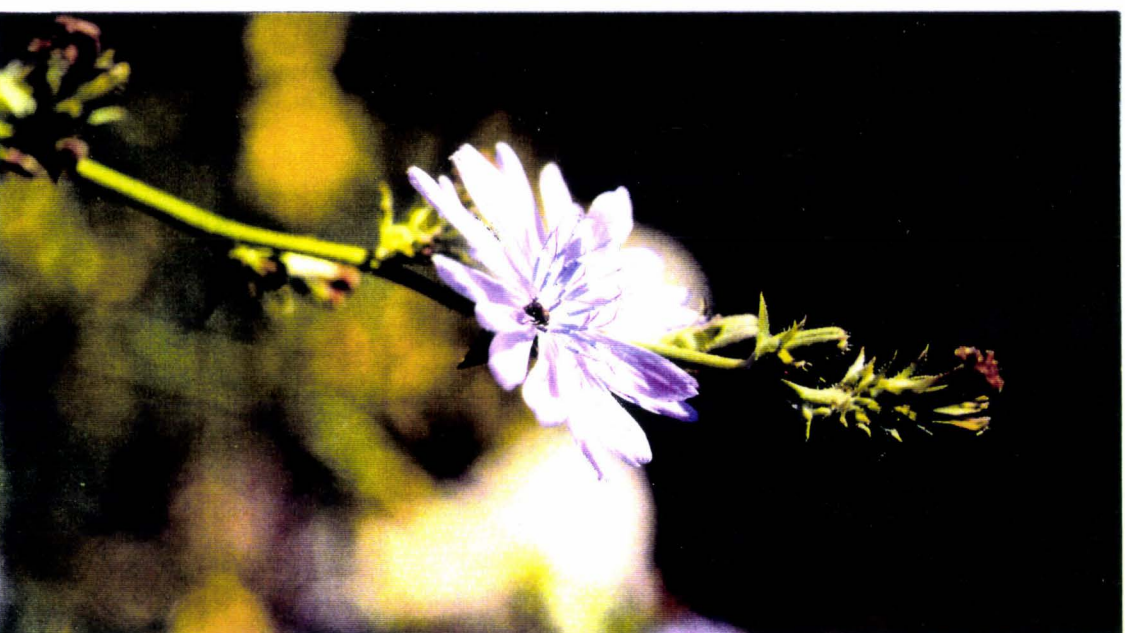
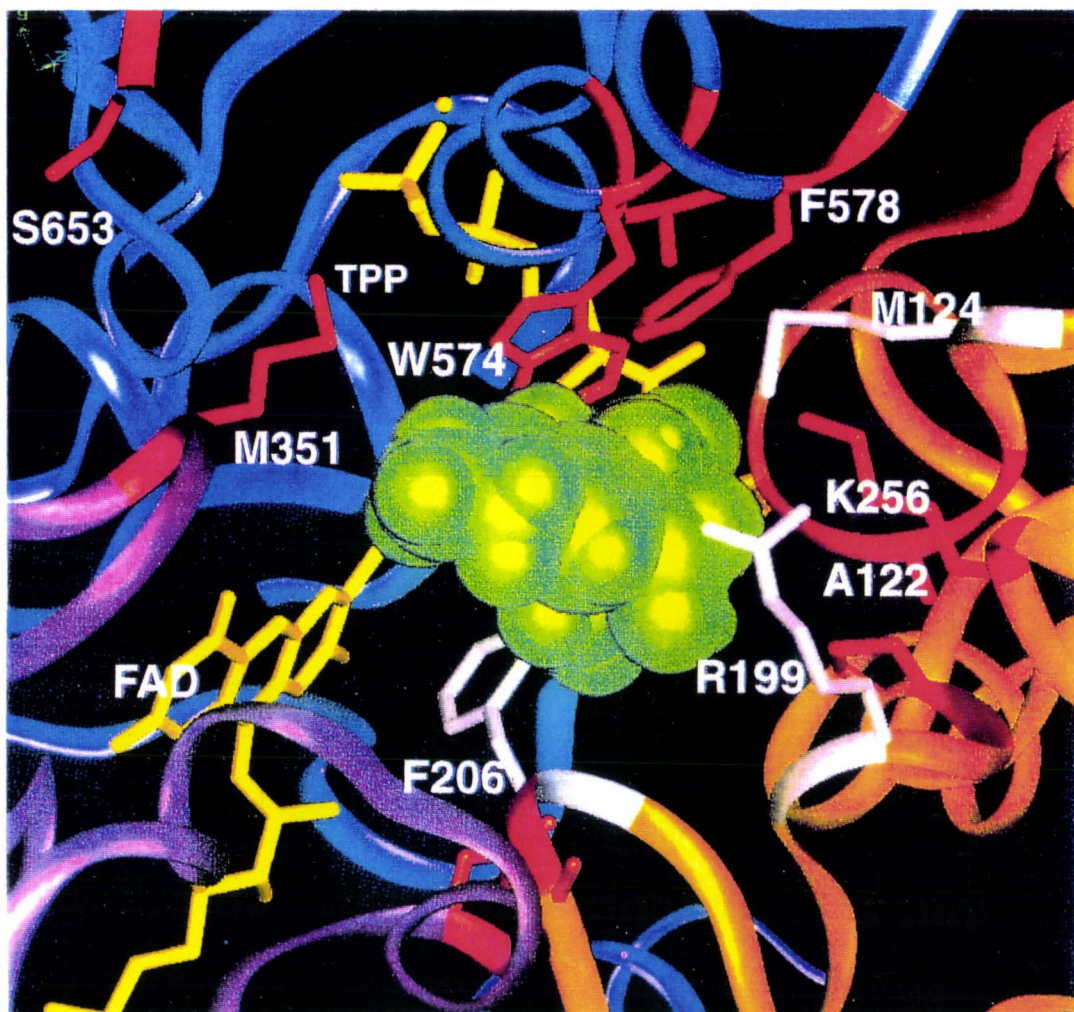


Schéma 1 : Anatomie d'un capitule (x 1), d'une fleur (x 1,5) et d'un akène (x 3) d'endive



La chicorée : une astéracée hermaphrodite à fécondation entomophile.



Annexe 3 : Représentation tridimensionnelle du site actif de l'ALS d'*Arabidopsis thaliana* selon Ott *et al.* (1996). Les cofacteurs FAD et TPP sont représentés en jaune. La molécule d'imidazolinone est représentée en vert

- Annexe -

```
BNALS -----GTGACCGGAAAGCTT
ATCSR12 -----GTCACGGGTAAGCTT
NTALSURA ----- + 1125 ---GTTACTGGAAAGTTA
CIALS -----GTAACAGGGA-GCTT
SCILV2C -----TAAGC---GTTGCTT
.. * .. * *.

BNALS GAGGCCTTT-GCTAGCCGGGCCAAGATCGTGCATATTGAT-ATTGATTCT
ATCSR12 GAGGCCTTT-GCTAGTAGGGCTAAGATTGTTTCATATTGAT-ATTGACTCG
NTALSURA GAAGCCTTT-GCTAGCCGAGCAAAAATTGTTTCACATTGAT-ATTGATTCA
CIALS GAGGCCTTT-GCAAGCAGAGCCAAAATCGTTTCACATCGAC-ATCGATTCT
SCILV2C TCAACATATAGCATACCG--CAACACACCTGCCATGAGATCAGTAGCTCT
. . . * . * * . . . * . . . * . . . * . . . * .

BNALS ---ACCGAAATCGGGAAGAACAAGACACCTCATGTGTCGGTGTGTTGTGA
ATCSR12 ---GCTGAGATTGGGAAGAATAAGACTCCTCATGTGTCGTGTGGTGA
NTALSURA ---GCTGAGATTGGGAAGAACAAGCAGCCTCATGTTTCCATTGTGCAGA
CIALS ---GCAGAAATCGGTAAGAACAAGCAACCCCATGTCTCTGTTGTGGTGA
SCILV2C CGCGCAGCGCTTTATAGTTCGT-CTTCCCGTTATACAGTGCCTGCCA
. * . * . . . * . . . * . * . * . * . * .

BNALS TGTTCAGCTAGCCTTGCAAGGGATGAACGAGGTTCTTGA-GAACCGA---
ATCSR12 TGTTAAGCTGGCTTTGCAAGGGATGAATAAGGTTCTTGA-GAACCGAG--
NTALSURA TATCAAGTTGGCGTTACAGGGTTGAATTCGATACTGGA-GAGTAAG--
CIALS TATCAAGATCGCATTACAGGGTCTCAACAAAATTCTGGAAGAAAAAG--
SCILV2C TTACCAGC---CTCTAAAGGCCAGAGCCTGCTCCAAGTTCAATGTTGA
* . . * . * . * . * . * . * . * . * .

BNALS --CGAGA----TGTGCTTGACTTCGGGGAATGGA-GATGTGAATTGAAC
ATCSR12 --CGGAGGAGCTTAAGCTTGATTTTGGAGTTTGGGA-GGAATGAGTTGAAC
NTALSURA --AAGGTAACTGAAGTTGGATTTTCTGCTTGGGA-GGCAGGAGTTGACG
CIALS --CGAGATGA-AAAATCTCGATTCTCATCTGGA-GAAAGGAATTAGAC
SCILV2C TCCATTAGAACA--GCCCGCTGAACCTTCAAATTGGCTAAGAACTAC
. . . . . * . . . . . * . . . . .

BNALS GAACAGAGACTAAAGTT---CC-CTCTCCGCTACAAGACGTTTGGGGAA
ATCSR12 GTACAGAAACAGAAGTT---TC-CGTTGAGCTTTAAGACGTTTGGGGAA
NTALSURA GAGCAGAAAGTGAAGCA---CC-CATTGAACTTTAAACCTTTTGGTGAT
CIALS GAACAAAAATCAACCAN---CC-CATTAACTTCAAACCTTCGGAGAT
SCILV2C GCGCTGAGCCTGACATGGATACCTCTTTTCGTCGGTTAACTGGTGGT---
* . * . * . * . * . * . * . * . * . * .

BNALS GAGATTCTCCACAGTACGCCATTCAACTACTTGACGAGCTAACCGACGG
ATCSR12 GCTATTCTCCACAGTATGCGATTAAAGTCCTTGATGAGTTGACTGATGG
NTALSURA GCAATTCTCCCAATATGCTATCCAGGTCTTAGATGAGTTAACTAATGG
CIALS GCATT--CTCC-CAATACGCNATNCAAGTGCTCGATGANTGACTGGCGG
SCILV2C -CAAATATTTAACGAAATGATGTCCAGA--CAAACGTTGATACTGT---
. . . * . * . * . * . * . * . * . * .

BNALS GAAGGCCAATTACTACTGGTGTGCGGGCAACACCAGATGTGGGCCGCC
ATCSR12 AAAAGCCATAAAGTACTGGTGTGCGGGCAACATCAAATGTGGGCGGCG
NTALSURA GAATGCTATTATAAGTACTGGTGTGCGGGCAACACCAGATGTGGGCTGCTC
CIALS GAATGCAATCATAAGCACCGGAGTTGGTCAACACCAGATGTGGGCAGCAC
SCILV2C -----ATTTGGTTATCCAGGTG--GTGCTATCCTACCTGTTACGATGC
. * . . . * * . * . * . * . * . * . * .

BNALS AATTCTACA-GATTCAAGAAACCCCGCCAATGGCTGTCTTCAGGAGGCTT
ATCSR12 AGTTCTACA-ATTACAAGAAACCAAGGCAGTGGCTATCATCAGGAGGCTT
NTALSURA AATACTATA-AGTACAGAAAGCCACGCCAATGGTTGACATCTGGTGAT
CIALS AGTTCTACA-AATACA---CCCCTAGACAGTGGCTGACCTCTGGTGGACT
SCILV2C CATTCTAATCAGTGATAAATTCAACTTCGTT--CTTCCAAAACACGAACA
. * . . . * . * . . * . * . * . * . * .

BNALS AGGAGCCATGGGGTTCGGTCTTCCTGCAGCCATGGGAGCCGCTATAGCCA
ATCSR12 TGGAGCTATGGGATTTGGACTTCCTGCTGCGATTGGAGCGCTGTTGCTA
NTALSURA AGGAGCAATGGGATTTGGTTTGGCCGCTGCTATTGGTGGCGCTGTTGGAA
CIALS TGGAGCCATGGGGTTCGGCCTCCCTGCGGCCATTGGTGCCGCTGTTGCAA
SCILV2C AGGTGCC--GGTCACATGGCAGAAGGCTAC-GCCAGAGCTTCTGGT---A
. * . * . * . * . * . * . * . * . * .

BNALS ACCCGGGAGCAGTGGTTGTGACATTGATGGGGATGGTAGCTTCATCAT-
ATCSR12 ACCCTGATGCGATAGTTGTGGATATTGACGGAGATGGAAGCTTTATAAT-
NTALSURA GACCGGATGAAGTTGTGGTTGACATTGATGGTGATGGCAGTTTCATCAT-
CIALS GACCAGATGCCATTGTAGTAGACATCGATGGTGATGGAAGCTTCATGAT-
SCILV2C AACCGAGTGTGTCTTGGTT-ACTTC--TGGGCCAGGTGCCACCAATGTC
. * . * . * . * . * . * . * . * . * .
```

BNALS	GAACATTCAGAAGCTGGCAACCATCAGGGTTGAGAATCTTCCAGTCAAGG
ATCSR12	GAATGTGCAAGAGCTAGCCACTATTTCGTGTAGAGAATCTTCCAGTGAAGG
NTALSURA	GAATGTGCAAGAGCTTGGCAACAATTAAGGTGGAGAATCTCCCAGTTAAGA
CIALS	GAACGTTCAGAAGCTCGCCACCATTAGGGTTGAAAATCTTCCAGTTAAGA
SCILV2C	GTTACTCCAATGGCA-GATGCCTTTCAGACGGGA---TTCCAATGGTTG *.. * * * * * . * . * . * . * . * . * * * * . * . . .
BNALS	TTTTGCTGATTAATAATCAGCACCTCGGAATGGTCTTCAGTGGGAAGAC
ATCSR12	TACTTTTATTAACAACAGCATCTTGGCATGGTTATGCAATGGGAAGAT
NTALSURA	TTATGTTACTGAATAATCAACACTGGGAATGGTGGTTCAATGGGAGGAT
CIALS	TCCTTCTACTCAATAACCAACATTTAGGTATGGTGGTTCAATGGGAAGAT
SCILV2C	TCTTTACAGGGCAAGTCC--CACTAGTGTATCGGTACTGATG----- * . * . . * . * . * * * * . * . * . * . * . . .
BNALS	CACCTCTACGAGCTAACAGAGCCGATTCTTTCTGGGAGACCCGGCGAA
ATCSR12	CGGTCTTACAAAGCTAACCGAGCTCACACATTTCTCGGGGATCCGGC--T
NTALSURA	CGGTCTTATAAGGCTAACAGAGCACACATACCTGGGGAATCCTTCTAA
CIALS	CGTTTTTGCAGCAAGCAATCGAATCATACGTATTTAGGAAACCCATCAA
SCILV2C	CT-TTCCAAGAGGCTGAC--GTCGTGGTATTTCTAGATCTTGTACGAAA * . * * . . . * * . * . * . . * . * *
BNALS	CCCTGAGGCGG---TATTCGCGATATGCTGTTGTTGCGCCGATCGTG-C
ATCSR12	CAGGAGGACGA-GATATTCGCGAATGTTGCTGTTTGCAGCAGCTTG-C
NTALSURA	---TGAGGCGGAGATCTTTCCTAATATGCTGAAATTTGCAGAGGCTTG-T
CIALS	---AGAATCTGAAATATTCCTAATAATGTTGAAGTTTGTGGAAGCTTATC
SCILV2C	TGGAATGTCATGGTCAAGTCCGTGGAAG----AATTGCCATTGCGTATT* . . * * . . * * . . * * * * . . * * . . . * . . .
BNALS	GGTATA-C-----CAGCC-GCCAGGGT---CACCAGA--AGGG
ATCSR12	GGGATT-C-----CAGCG-GCGAGGGT---GACAAAG--AAAG
NTALSURA	GGCGTA-C-----CTGCT-GCAAGAGT---GACACAT--AGGG
CIALS	GATAAG-CTTGTGATATTTCAGCT-GCTAGGGT---TACAAA--ATTA
SCILV2C	AACGAGGCTTTTGAAATTGCCACGAGCGGTAGACCGGGACCAAGTCTTGGT * . * * * * . * *
BNALS	AGGACCTCCGAGAGGCAATCCAG--ACAATGCTGGACACCTGGACCAT
ATCSR12	CAGATCTCCGAGAAGCTATTTCAG--ACAATGCTGGATACACCAGGACCTT
NTALSURA	ATGATCTTAGAGCTGCCATTTCAG--AAGATGTTAGACACTCTGGGCCAT
CIALS	GGGATCTTAGGGCTGCGATTTCAG--AAAATGTTGGATACACCTGGACCGT
SCILV2C	CGATTACCAAAGGATGTTACAGCAGCTATCTTAAGAAATCCAATTCCAA * * * * . * * * * . * * * * . * * * * . * * . . .
BNALS	TCTTGTGGATGTGGTCTGTC---CTCACCAGGACCATGTGTACCACCTC
ATCSR12	ACCTGTGGATGTGATTGTC---CGCACCAAGAACATGTGTGCCGATG
NTALSURA	ACTTGTGGATGTGATTGTAC---CTCATCAGGAACATGTTTACCTATG
CIALS	ATTTATTGGATGTTATTGTG---CACATCAAGAACCGTTTGGCCGATG
SCILV2C	--CAAAAACAACCTCTTCCATCAAACGCA-CTAAACCA--ATTAACCACTC* . * . * . * * * * * * * * . . . *
BNALS	ATCCCTAGTGGCGGCACCTTCAAGGACATTATTGTGTAGTACTACTTTAA
ATCSR12	ATCCCGAATGGTGGCACTTTCAACGATGTCATAACGGAAGGAGATGGCCG
NTALSURA	ATTCCAGTGGCGGAGCTTTCAAAGATGTGATCAGAGGGTGACGGGAG
CIALS	ATTCCTGTTGGCGGTGGTTTCATGGATCTGATTACCGATGGTGTATGCGAG
SCILV2C	G-CGCACAAGATGAATTGTCTATG---CAAAGTATCAATAAGCA-GCAG . . * . . * . . . * *
BNALS	TGTTTGATTATTC
ATCSR12	GATTAAATAC
NTALSURA	AAGTTCCTATTGA
CIALS	AATGAAACATTGA
SCILV2C	ATTTGATCAACTT

Annexe 4 : Alignement des séquences nucléotidiques de l'extrémité 3' (à partir du nucléotide 1125 selon Mazur et al., 1987) des gènes BNALS, ATCSR12, NTALSURA, CIALS et SCILV12 codant respectivement pour les ALS de colza, Arabidopsis, tabac, chicorée et Saccharomyces. Les séquences consensus sont indiquées par un astérisque.



- Annexe -

ATCSR12	DDE-LSLHMLGMHGTVYANYAVEHSDLLLAFGVRFDDRVTGKLEAFAS--	387
NTALSURA	GDE-LSLSMLGMHGTVYANYAVDSSDLLLAFGVRFDDRVTGKLEAFAS--	384
PBNALS	DDEEFSLQMLGMHGTVYANYAVEYSDLLLAFGVRFDDRVTGKLEAFAS--	364
CIALS	-----LEAFAS--	9
SCILV2	QEDPKSLDMLGMHGCATANLAVQNADLI IAVGARFDDRVTGNISKFAPEA	392
	.. **.	
ATCSR12	-----RAKIVHIDIDS AEIGKNKTPHVSVC GDVKLAL-QGMNKVLENR	429
NTALSURA	-----RAKIVHIDIDS AEIGKNKQPHVSICADIKLAL-QGLNSILESK	426
PBNALS	-----RAKIVHIDIDSTEIGKNKTPHVSVC CDVQLAL-QGMNEVLENR	406
CIALS	-----RAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSVCGDIKIAL-QGLNKILEEK	51
SCILV2	RRAAAEGRGGI IHFEVSPKNINKVVQTQIAVEGDATTNLGKMMSKIFPVK	442
	*. *. *..... *. * * . *.....	
ATCSR12	AEELKLDFGVWRNELNVQKQKFPLSFK--TFGEAIPPQYAIKVLD ELTDG	477
NTALSURA	EGKLKLDFSAWRQELTEQKVKHPLNFK--TFGDAIPPQYAIQVLD ELTNG	474
PBNALS	RDVL--DFGEWRCELNEQRLKFPLRYK--TFGEEIPPQYAIQLLD ELTDG	452
CIALS	SEMKNLDFSSWRKELDEQKSTXPLTFK--TFGDAFS-QYXXQVLDXL TGG	98
SCILV2	ER-----SEWFAQINKWKKEYPYAYMEETPGSKIKPQTVIKKLSKVAND	486
	. * * .. * * . . * . *	
ATCSR12	KA---IISTGVGQHQMWA AQFYNYKKPRQWLSSGGLGAMGFGLPAAIGAS	524
NTALSURA	NA---IISTGVGQHQMWA AQYYKYRKPRQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGAA	521
PBNALS	KA---IITGVGQHQMWA AQFYRFKKPRQWLSSGGLGAMGFGLPAAMGAA	499
CIALS	NA---IISTGVGQHQMWA AQFYKYT-PRQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGAA	144
SCILV2	TGRHVIVTTGVGQHQMWA QHWTWRNPHTFITSGGLGTMGYGLPAAIGA Q	536
	.. *..*****. * . *..*****. * * .*****. * *	
ATCSR12	VANPDAIVVDIDGDGSFIMNVQELATIRVENLPVKVLLNNQHLMVMQW	574
NTALSURA	VGRPDEVVVDIDGDGSFIMNVQELATIKVENLPVKIMLLNNQHLMVVQW	571
PBNALS	IANPGAVVVDIDGDGSFIMNIQELATIRVENLPVKVLLINNQHLMV LQW	549
CIALS	VARPDAIVVDIDGDGSFMMNVQELATIRVENLPVKILLNNQHLMVVQW	194
SCILV2	VAKPESLVIDIDGDASFNM LTELSSAVQAGTPVKILILNNEEQGMVTQW	586
	...*...*.*****. * * .. * * * * .. * * .. * *	
ATCSR12	EDRFYKANRAHTFLGDPAQEDEIFPNMLLFA----AACGIPAARVTKKAD	620
NTALSURA	EDRFYKANRAHTYLG NPSNEAEIFPNMLKFA----EACGVPAARVTHRDD	617
PBNALS	EDHFYAANRADSFLGD PANPEAVFPDMLLFA----ASCGIPAARVTRRED	595
CIALS	EDRFCKANRTHTYLG NPSKESEIFPIMLKFA----EACDISAARVTKIRD	244
SCILV2	QSLFYE----HRY----SHTHQLNPDFIKLAEAM----GLKGLRVKKQEE	624
	.. *. * .. * .. * .. * .. * .. * .. * ..	
ATCSR12	LREAIQTMLDTPGPYLLDVICPHQEHVLP MIPNGGTFNDVITEGDGRIKY	670
NTALSURA	LRAAIQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLP MIPSGGAFKDVITEGDGRSSY	667
PBNALS	LREAIQTMLDTPGPFLLDVVC PHQDHVLP LIPSGGTFKDII V	637
CIALS	LRAAIQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLP MIPVGGGFMDLITDGDGRMKH	294
SCILV2	LDAKLKEFVSTKG PVLLEVEVDKKVPVLP MVAGSGLDEFINFDPEVERQ	674
	* * * * * * .. * * * * * .. * .. *	
SCILV2	QTEL RHKRTGGKH 687	

Annexe 5 : Alignement des séquences peptidiques des ALS d'Arabidopsis (ATCSR12), de tabac (NTALSURA), de colza (PBNALS), de chicorée (CIALS) et de Saccharomyces (SCILV12). Le symbole () indique les acides aminés conservés chez les 5 espèces.*

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Anderson P. C. et Hibberd K. A.** (1985) Evidence for interaction of an imidazolinone herbicide with leucine, valine, and isoleucine metabolism. *Weed Science* **33**: 479-483.
- Anderson P. C. et Georgeson M.** (1989) Herbicide-tolerant mutants of corn. *Genome* **31**: 994-999.
- Anderson J. J. et Swai R. S.** (1992) Metabolism of sulfometuron methyl in wheat and its possible role in wheat tolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**: 2279-2283.
- Baillie A. M. R., Rossnagel B. G. et Kartha K. K.** (1993) *In vitro* selection for improved chlorsulfuron tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Euphytica* **67**: 151-154.
- Baker N. R.** (1991) A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Plant* **81**: 563-570.
- Bellamy A., Mathieu C., Vedel F. et Bannerot H.** (1995) Cytoplasmic DNAs and nuclear rDNA restriction fragment length polymorphisms in commercial Witloof chicories. *Theoretical and Applied Genetics* **91**: 505-509.
- Bekkaoui F., Schorr P. et Crosby W.B.** (1993) Acetolactate synthase from *Brassica napus* : Immunological characterisation and quaternary structure of the native enzyme. *Physiologia Plantarum* **88** : 475-484.
- Bernasconi P., Woodworth A. R., Rosen B. A., Subramanian M. V. et Siehl D. L.** (1995) A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: (29) 17381-17385.
- Birnboim H. C. et Doly J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research* **7**: 1513-1523.
- Botterman J. et Leemans J.** (1988) Engineering herbicide resistance in plants. *Trends in Genetics* **4**: (8) 219-222.
- Bourgin J. P.** (1978) Valine-resistant plants from *in vitro* selected tobacco cells. *Molecular and General Genetics* **161**: 225-230.
- Bourgin J. P., Goujaud J., Missonier C. et Pethe C.** (1985) Valine resistance, a potential marker in plant cell genetics. I. Distinction between two types of valine-resistant tobacco mutants isolated from protoplast-derived cells. *Genetics* **109**: 393-407.

- Boutsalis P. et Powles S. B.** (1995) Resistance of dicot weeds to acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicides in Australia. *Weed Research* **35**: 275-282.
- Bradford M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Annals of Biochemistry* **72**: 254-284.
- Buttler J. et Shield D.** (1992) The inhibitor binding pocket acetolactate synthase. In *Biosynthesis and molecular biology of amino acids in plants* (ed. B. K. Singh, H. E. Flores and J. C. Shanon), pp. 361-363. Rockville: American Society of Plant Physiologists.
- Caretto S., Giardina M. C., Nicolodi C. et Mariotti D.** (1993) *In vitro* cell selection: production and characterization of *Nicotiana tabacum* L. cell lines and plants resistant to the herbicide chlorsulfuron. *Journal of Genetic and Breeding* **47**: 115-120.
- Chaleff R. S. et 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. et Ray T. B.** (1984) Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures. *Science* **223**: 1148-1151.
- Chaleff R. S. et Bascomb N. F.** (1987) Genetic and biochemical evidence for multiple forms of acetolactate synthase in *Nicotiana tabacum*. *Molecular and General Genetics* **210**: 33-38.
- Chang Y.-Y. et Cronan Jr J. E.** (1988) Common ancestry of *Escherichia coli* pyruvate oxydase and the acetohydroxy acid synthase of the branched chain amino acid biosynthetic pathway. *Journal of Bacteriology* **170**: (9) 3937-3945.
- Christopher J. T., Powles S. B. et Holtum J. A. M.** (1992) Resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*) involves at least two mechanisms. *Plant Physiology* **100**: 1909-1913.
- Church G. et Gilbert W.** (1984) Genomic sequencing. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* **81**: 1991-1995.
- Clark L. et Carbon J.** (1976) A colony bank containing ColE1 hybrid plasmids representative of entire E. coli genome. *Cell* **9**: 91-99.
- Cobb A.** Herbicides and plant physiology. 176 pages. Chapman et Hall (eds.), London (1992)
- Cotterman J. C. et Saari L. L.** (1992) Rapid metabolic inactivation is the basis for cross-resistance to chlorsulfuron in diclofop-methyl-resistant rigid

ryegrass (*Lolium rigidum*) biotype SR4/84. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **43**: 182-192.

CTIFL (1991) L'endive : Guide pratique. Les éditions du CTIFL. pp. 271, Paris ISBN 2-87911-014-9

D'Halluin K., Bossut M., Bonne E., Mazur B., Leemans J. et Botterman J. (1992) Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. *Bio/Technology* **10**: 309-314.

Dastgheib F., Field R. J. et Namjou S. (1994) The mechanism of differential response of wheat cultivars to chlorsulfuron. *Weed Research* **34**: 299-308.

Davies M. E. (1971) Regulation of histidine biosynthesis in cultured plant cells : evidence from studies on amitrole toxicity. *Phytochemistry* **10**: 783-788.

De Rossi E., Leva R., Gusberti L., Manachini P. L. et Ricardi G. (1995) Cloning, sequencing and expression of the *ilvBNC* gene cluster from *Streptomyces avermitilis*. *Gene* **166**: 127-132.

Dellaporta S. L., Wood J. et Hicks J. B. (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reports* **1**: 19-21.

Dewaele E., Forlani G., Degrande D., Nielsen E. et Rambour S. (1997) Biochemical characterization of chlorsulfuron resistance in *Cichorium intybus* L. var Witloof. *Journal of Plant Physiology* (sous presse).

Donn G., Tischer E., Smith J. A. et Goodman H. M. (1984) Herbicide-resistant alfalfa cells : an example of gene amplification in plants. *Journal of Molecular and Applied Genetics* **2**: 621-635.

Durner J. et Böger P. (1988) Acetolactate from Barley (*Hordeum vulgare* L.) : Purification and partial characterisation. *Z. Naturforsch* **43c** : 850-856.

Durner J., Gailus V. et Böger P. (1991) New aspects on inhibition of plant acetolactate synthase by chlorsulfuron and imazaquin. *Plant Physiology* **95**: 1144-1149.

Eoyang L. et Silverman P. M. (1984) Purification and subunit composition of acetohydroxyacid synthase I from *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **157**: (1) 184-189.

Falco S. C. et Dumas K. S. (1985) Genetic analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the herbicide sulfometuron methyl. *Genetics* **109**: 21-35.

Falco S. C., Dumas K. S. et Livak K. J. (1985) Nucleotide sequence of the yeast *ILV2* gene which encodes acetolactate synthase. *Nucleic Acids Research* **13**: 4011-4027.

Ferreira P. C. G., Hemerly A. S., de Almeida Engler J., Van Montagu M., Engler G. et Inzé D. (1994) Developmental expression of the *Arabidopsis* cyclin gene *cyc1At*. *The Plant Cell* **4**: 1763-1774.

Fiala V. et Jolivet E. (1984) Mise en évidence d'une nouvelle fraction glucidique dans la racine de chicorée et son évolution au cours de la formation des réserves. *Physiologie Végétale* **22**: 315-321.

Forlani G., Nielsen E., Landi P. et Tuberosa R. (1991) Chlorsulfuron tolerance and acetolactate synthase activity in corn (*Zea mays* L.) inbred lines. *Weed Science* **39**: 553-557.

Forlani G., Suardi C. M. et Nielsen E. (1996) Deregulated branched-chain amino acid synthesis in a *Nicotiana plumbaginifolia* cell line resistant to valine. *Plant Growth Regulation* **19**: 241-248.

Gabard J. M., Charest P., Iyer V. N. et Miki B. L. (1989) Cross-resistance to short residual sulfonylurea herbicides in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology* **91**: 574-580.

Galili G. (1995) Regulation of lysine and threonine synthesis. *The Plant Cell* **7**: 899-906.

Ghislain M., Frankard V. et Jacobs M. (1995) A dinucleotide mutation in dihydropicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* leads to lysine overproduction. *The Plant Journal* **8** (5): 733-743.

Green J. M. et Ulrich J. F. (1994) Response of maize (*Zea mays*) inbreds and hybrids to rimsulfuron. *Pesticide Science* **40**: 187-191.

Guttieri M. J., Eberlein C. V., Mallory-Smith C. A., Thill D. C. et Hoffman D. L. (1992) DNA sequence variation in domain A of the acetolactate synthase genes of herbicide-resistant and susceptible weed biotypes. *Weed Science* **40**: 670-678.

Hall L. M. et Devine M. D. (1990) Cross-resistance of a chlorsulfuron-resistant biotype of *Stellaria media* to a triazolopyrimidine herbicide. *Plant Physiology* **93**: 962-966.

Hall L. M. et Devine D. (1993) Chlorsulfuron inhibition of phloem translocation in chlorsulfuron-resistant and susceptible *Arabidopsis thaliana*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **45**: 81-90.

Harms C. T. et DiMaio J. J. (1991) Primisulfuron herbicide-resistant tobacco cell lines. Application of fluctuation test design to *in vitro* mutant selection with plant cells. *Journal of Plant Physiology* **137**: 513-519.

Harms C. T., Armour S. L., Dimajo J. L., Middlesteadt L. A., Murray D., Negrotto D. V., Thompson-Taylor H., Weymann K., Montoya A. L., Shillito R. D. et Jen G. C. (1992) Herbicide resistance is due to an amplification of a mutant acetohydroxyacid synthase gene. *Molecular and General Genetics* **233**: 427-435.

Hart S. E., Saunders J. W. et Penner D. (1993) Semidominant nature of monogenic sulfonylurea herbicide resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris*). *Weed Science* **41**: 317-324.

Hattori J., Rutledge G., Miki B. L. et Baum B. R. (1992a) DNA sequence relationships and origins of acetohydroxy acid synthase genes of *Brassica napus*. *Canadian Journal of Botany* **70**: 1957-1963.

Hattori J., Rutledge R., Labbé H., Brown D., Sunohara G. et Miki B. (1992b) Multiple resistance to sulfonylureas and imidazolinones conferred by an acetohydroxyacid synthase gene with separate mutations for selective resistance. *Molecular and General Genetics* **232**: 167-173.

Hattori J., Brown D., Mourad G., Labbé H., Ouellet T., Sunohara G., Rutledge R., King J. et Mikki B. (1995) An acetohydroxy acid synthase mutant reveals a single site involved in multiple herbicide resistance. *Molecular General Genetics* **246**: 419-425.

Hatzios K. K. (1994) Herbicides and herbicide resistance. *Encyclopedia of Agricultural Science* **2**: 501-512.

Haughn G. W. et Somerville C. R. (1986) Sulfonylurea-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics* **204**: 430-434.

Haughn G. W., Smith J., Mazur B. et Somerville C. R. (1988) Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides. *Molecular and General Genetics* **211**: 266-271.

- Haughn G. W. et Somerville C. R.** (1990) A mutation causing imidazolinon resistance maps to the *Csrl* locus of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **92**: 1081-1085.
- Hawkes T.J., Howard J.L. et Potin S.E.** (1989) Herbicide that inhibit the biosynthesis of branched chain amino acids. Dans Dodge A. (Ed.) *Herbicides and plant metabolism*. Cambridge Academic, Cambridge, pp. 112-126.
- Heering D. C., Guenz A. C., Peeper T. F. et Claypool P. L.** (1992) Growth response of wheat (*Triticum aestivum*) callus to imazapyr and *in vitro* selection for resistance. *Weed Science* **40**: 174-179.
- Heller R.** (1953) Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Annales de Sciences Naturelles et de Biologie Végétale* **14**: 1-223.
- Hervieu F. et Vaucheret H.** (1996) A single amino acid change in acetolactate synthase confers resistance to valine in tobacco. *Mol. Gen. Genet* **251**: 220-224.
- Hoagland R. E. et Duke S. O.** (1982) Biochemical effects of glyphosate (N-(phospho-nomethyl)glycine). *ACS Symposium Series* **181**: 175-205.
- Höfgen R., Laber B., Schüttke I., Klonus A.-K., Streber W. et Pohlenz H.-D.** (1995) Repression of acetolactate synthase activity through antisense inhibition. Molecular and biochemical analysis of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L. cv Désirée) plants. *Plant Physiology* **107**: 469-477.
- Hutchison J. M., Shapiro R. et Sweetser P. B.** (1984) Metabolism of chlorsulfuron by tolerant broadleaves. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **22**: 243-247.
- Ibdah B.-I., Livnah O., Schloss J. V., Barak Z. et Chipman.** (1996) Homology modelling of the structure of bacterial acetohydroxyacid synthase and the examination of the active site by direct mutagenesis. *Biochemistry* **35**: (50) 16282-16291.
- Jordan M. C. et Mac Hughen A.** (1987) Selection for chlorsulfuron resistance in flax (*Linum usitatissimum*) cell cultures. *Journal of Plant Physiology* **131**: 333-338.
- Keeler S. J., Sanders P., Smith J. K. et Mazur B. J.** (1993) Regulation of tobacco acetolactate synthase gene expression. *Plant Physiology* **102**: 1009-1018.

Krause G. H. et Behrend U. (1986) Δ pH-dependent chlorophyll fluorescence quenching indicating a mechanism of protection against photoinhibition of chloroplasts. *FEBS Letters* **200**: 298-302.

La Rossa R. A. et Schloss J. V. (1984) The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *The Journal of Biological Chemistry* **259**: (14) 8753-8757.

La Rossa R. A., Van Dyk T. K. et Smulski D. R. (1987) Toxic accumulation of α -cetobutyrate caused by inhibition of the branched-chain amino acid biosynthetic enzyme acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* **169**: 1372-1378.

Langzagorta A., de la Torre J. M. et Aller P. (1988) The effect of butyrate on cell cycle progression in *Allium cepa* root meristems. *Physiologia Plantarum* **72**: 775-781.

Lavigne C., Millecamps J. L., Manac'h H., Cordonnier P., Matejicek A., Vasseur J. et Gasquez J. (1994) Monogenic semidominant sulfonylurea resistance in a line of white chicory. *Plant Breeding* **113**: 305-311.

Lavigne C., Manac'h H., Guyard C. et Gasquez J. (1995) The cost of herbicide resistance in chicory: ecological implications for its commercial release. *Theoretical and Applied Genetics* **91**: 1301-1308.

Leason M., Cunliffe D., Parkin D., Lea P. J. et Mifflin B. J. (1982) Inhibition of *Pisum sativum* leaf glutamine synthetase EC 6.3.1.2. by methionine sulfoximide phosphinothricin and other glutamate analogues. *Phytochemistry* **21**: 855.

Lee K. M., Townsend J., Tepperman J., Black M., Chui C. F., Mazur B., Dunsmuir P. et Bedbrook J. (1988) The molecular basis of sulfonylurea herbicide resistance in tobacco. *EMBO Journal* **7**: 1241-1248.

Lee K. Y., Lund P., Lowe K. et Dunsmuir P. (1990) Homologous recombination in plant cells after *Agrobacterium*-mediated transformation. *The Plant Cell* **2**: 415-425.

Lefebvre P. (1984) Qu'est-ce que le metsulfuron methyl ? *La Défense des Végétaux* **230**: .

Lichtner F. T., Dietrich R. F. et Brown H. M. (1995) Ethametsulfuron methyl metabolism and crop selectivity in spring oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **52**: 12-24.

Limami A. et Laville J. (1991) Agronomie et physiologie. Dans Leteinturier J.J., Cochet J.P., Marle M. et Beghini M. : L'endive Guide pratique, pp. 123-144; Les éditions du CTIFL, Paris ISBN 2-87911-104-9.

Limami A., Dufossé C., Richard-Mollard C., Fouldrin K., Roux L. et Morot-Gaudry J.F. (1996) Effect of exogenous nitrogen ($^{15}\text{NO}_3$) on utilisation of vegetative storage proteins (VSP) during regrowth in chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of plant Physiology* **149**: 564-572.

Mac Hughen A. (1989) Agrobacterium mediated transfer of chlorsulfuron resistance to commercial flax cultivars. *Plant Cell Report* **8**: 445-449.

Mac Hughen A. et Holm F. A. (1995) Transgenic flax with environmentally and agronomically sustainable attributes. *Transgenic Research* **4**: 3-11.

Mac Sheffrey S. A., Mac Hughen A. et Devine M. D. (1992) Characterization of transgenic sulfonylurea-resistant flax (*Linum usitatissimum*). *Theoretical and Applied Genetics* **84**: 480-486.

Magha M. P., Guerche P., Bregeon M. et Renaud M. (1993) Characterization of spontaneous rapeseed mutant tolerant to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. *Plant Breeding* **111**: 132-141.

✓ **Mallory-Smith C. A., Thill D. C. et Dial M. J.** (1990a) Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology* **4**: 163-168.

✓ **Mallory-Smith C. A., Thill D. C., Dial M. J. et Zemetra R. S.** (1990b) Inheritance of sulfonylurea herbicide resistance in *Lactuca* spp. *Weed Technology* **4**: 787-790.

Marrs K. A. (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Reviews in Plant Physiology: Plant Molecular Biology* **47**: 127-158.

Mazur B. J., Chui C. F. et Smith J. K. (1987a) Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. *Plant Physiology* **85**: 1110-1117.

Mazur B. J. et Falco S. C. (1989) The development of herbicide-resistant crops. *Annual Reviews in Plant Physiology* **40**: 441-470.

Mifflin B. J. et Cave P. R. (1971) The control of leucine, isoleucine, and valine biosynthesis in a range of higher plants. .

- Mifflin B. J.** (1974) The location of nitrate reductase and other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plastids of root and leaves. *Plant Physiology* **54**: 550-555.
- Millecamps J. L.** (1989) Sélection de chicorées *Cichorium intybus* L. var; Witloof résistantes aux sulfonylurées par culture cellulaire: Université des Sciences et Technologies de Lille Flandres-Artois, France.
- Mourad G. et King J.** (1992) Effect of four classes of herbicides on growth and acetolactate-synthase activity in several variants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **188**: 491-497.
- Muhitch M. J., Shaner D. L. et Stidham M. A.** (1987) Imidazolinones and acetohydroxyacid synthase from higher plants. *Plant Physiology* **83**: 451-456.
- Muller Y.A et Schulz G.E.** (1993) Structure of the thiamine- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science* **259** : 965-967.
- Neighbors S. et Privalle L. S.** (1990) Metabolism of primisulfuron by barnyard grass. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **37**: 145-153.
- Newhouse K., Singh B., Shaner D. et Stidham M.** (1991) Mutations in corn (*Zea mays* L.) conferring resistance to imidazolinone herbicides. *Theoretical and Applied Genetics* **83**: 65-70.
- Odell J. T., Caimi P. G., Yadav P. G. et Mauvais C. J.** (1990) Comparison of increased expression of wild-type and herbicide-resistant acetolactate synthase genes in transgenic plants, and indication of posttranscriptional limitation on enzyme activity. *Plant Physiology* **94**: 1647-1654.
- Ott K.H., Kwagh J.G., Stockton G.W., Sidorov V. et Kakefuda G.** (1996) Rational molecular design and genetic engineering of herbicide resistant crops by structure modeling and site-directed mutagenesis of acetohydroxyacid synthase. *Journal of Molecular Biology* **263** : 359-368.
- Ouellet T., Rutledge R. G. et Miki B. L.** (1992) Members of the acetohydroxyacid synthase multigene family of *Brassica napus* have divergent patterns of expression. *The Plant Journal* **2**: (3) 321-330.
- Ouellet T., Mourad G., Brown D., King J. et Miki B.** (1994) Regulation of acetohydroxyacid synthase activity levels in transgenic tobacco. *Plant Science* **102**: 91-97.

- Palms B., Goupil P., de Almeida Engler J., Van Der Straeten D., Van Montagu M. et Rambour S.** (1996) Evidence for the nitrate-dependent spatial regulation of the nitrate reductase gene in chicory roots. *Planta* **200**: 20-27.
- Popelis S., Le H. et Grand W. F.** (1992) The development of sulfonylurea herbicide-resistant birds foots trefoil (*Lotus corniculatus*) plants from *in vitro* selection. *Theoretical and Applied Genetics* **83**: 480-488.
- Primiani M. M., Cotterman J. C. et Saari L. L.** (1990) Resistance of kochia (*Kochia scoparia*) to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. *Weed Technology* **4**: 169-172.
- Rathinasabapathi B., Williams D. et King J.** (1990) Altered feedback sensitivity to valine, leucine and isoleucine of acetolactate synthase from herbicide-resistant variants of *Datura innoxia*. *Plant Science* **67**: 1-6.
- Rathinasabapathi B. et King J.** (1991) Herbicide resistance in *Datura innoxia*: Kinetic characterization of acetolactate synthase from wild-type and sulfonylurea-resistant cell variants. *Plant Physiology* **96**: 255-261.
- Ray T. B.** (1984) Site of action of chlorsulfuron. *Plant Physiology* **75**: 827-831.
- Reid R.J., Field L.D. L.D. et Pitman M.S.** (1985) Effects of external pH, fusicoccin and butyrate on the cytoplasmic pH in barley root tips measured by ³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta* **166**: 341-347.
- Relton J. M., Wallsgrove R. M., Bourgin J. P. et Bright S. W. J.** (1986) Altered feedback sensitivity of acetohydroxyacid synthase from valine-resistant mutants of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Planta* **169**: 46-50.
- Rhodes D., Hogan A. L., Deal L., Jamieson G. C. et Haworth P.** (1987) Amino acid metabolism of *Lemna minor* L.: II response to chlorsulfuron. *Plant Physiology* **84**: 775-780.
- Rosen B., Woodworth A. et Bernasconi P.** (1996) The emergence of broad base resistance to acetolactate synthase inhibitor herbicides. *Plant Physiology and Biochemistry Special Issue*: 296.
- Royuela M., Arrese-Igor C., Munoz-Rueda A., Gonzalez-Murua C.** (1991) *In vitro* and *in vivo* effects of chlorsulfuron in sensitive and tolerant plants. *Journal of Plant Physiology* **139**: 235-239.
- Rutledge R. G., Ouellet T., Hattori J. et Miki B. L.** (1991) Molecular characterization and genetic origin of the *Brassica napus* acetohydroxyacid synthase multigene family. *Molecular and General Genetics* **229**: 31-40.

- Ryan E. D. et Kohlhaw G. B.** (1974) Subcellular localization of isoleucine-valine biosynthetic enzyme in yeast. *Journal of Bacteriology* **120**: (2) 631-637.
- Saari L. L., Cotterman J. C. et Primiani M. M.** (1990) Mechanism of sulfonylurea herbicide resistance in the broadleaf weed, *Kochia scoparia*. *Plant Physiology* **93**: 55-61.
- Sali A.** (1995) Modelling mutations and homologous proteins. *Current Opinion in Biotechnology* **6**: 437-451.
- Samach A., Hareven D., Gutfinger T., Ken-Dror S. et Lifstchitz E.** (1991) Biosynthetic threonine deaminase gene of tomato; isolation, structure, and upregulation in floral organs. *Proceeding of National Academy of Sciences USA* **88**: 2678-2682.
- Samach A., Broday L., Hareven D. et Lifschitz** (1995) Expression of an amino acid biosynthesis gene in tomato flowers : developmental upregulation and MeJa response are parenchyma-specific and mutually compatible. *The Plant Journal* **8** (3) : 391-406.
- Sambrook J., Fritsch E. F. et Maniatis T.** (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger F.** (1981) Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* **214**: 1205-1210.
- Sathasivan K., Haughn G. W. et Murai N.** (1991) Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone-resistant *Arabidopsis thaliana* var. Columbia. *Nucleic Acid Research* **18**: (8) 2188.
- Saxena P. K. et King J.** (1988) Herbicide resistance in *Datura innoxia*. *Plant Physiology* **86**: 863-867.
- Saxena P. K. et King J.** (1990) Lack of cross-resistance of imidazolinone-resistant cell lines of *Datura innoxia* P. Mill to chlorsulfuron. *Plant Physiology* **94**: 1111-1115.
- Scalla R.** (1991) Les herbicides/ modes d'action et principes d'utilisation, pp. 450. INRA Eds., Paris.
- Schell D. et Casida J. E.** (1985) Acetohydroxyacid synthase inhibitors as herbicides. In *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*. (ed. e. a. Neumann), pp. 334-35. Berlin: Springer-Verlag.

Schloss J. V., Van Dyk D. E., Vasta J. F. et Kutny R. M. (1985) Purification and properties of *Salmonella typhimurium* acetolactate synthase isozyme II from *Escherichia coli* HB101/pDU9. *Biochemistry* **24**: 4952-4959.

Schloss J. V., Ciskanik L. M. et Van Dyk D. E. (1988) Origin of the herbicide binding site of acetolactate synthase. *Nature* **331**: 360-362.

Schloss J. V. et Alabaugh (1990) Acetolactate synthase and keto-acid reductoisomerase : a search for reason and a reason for search. In *Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids* (Barak Z.J.M., Chipman D.M. and Schloss J.V. Eds.), pp. 329-356, VCH Publisher, Weinheim, Germany.

Schmidt G. et Singh B.K. (1990) Tissue distribution of acetohydroxyacid synthase activity at various developmental stages of Lima bean. *Pesticide Science* **30** (4) : 418-419.

Schmitzer P. R., Eiler R. J. et Cséke C. (1993) Lack of cross-resistance of imazaquin-resistant *Xanthium strumarium* acetolactate synthase to flumetsulam and chlorimuron. *Plant Physiology* **103**: 281-283.

Schulz A., Wengenmayer F. et Goodman H. W. (1990) Genetic engineering of herbicide resistance in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science* **9**: 1-15.

Schreiber U. (1983) Chlorophyll fluorescence yield changes as a tool in plant physiology. *Photosynthesis Research* **4** : 361-373.

Sebastian S. A. et Chaleff R. S. (1987) Soybean mutants with increased tolerance for sulfonylurea herbicides. *Crop Science* **27**: 948-952.

Sebastian S. A., Fader G. M., Ulrich J. F., Forney D. R. et Chaleff R. S. (1989) Semidominant soybean mutation for resistance to sulfonylurea herbicides. *Crop Science* **29**: 1403-1408.

Sechley K. A., Oaks A. et Bewley J. D. (1991) Enzymes of nitrogen assimilation undergo seasonal fluctuations in the roots of the persistent weedy perennial *Cichorium intybus*. *Plant Physiology* **97**: 322-329.

Sellin C., Forlani G., Dubois J., Nielsen E. et Vasseur J. (1992) Glyphosate tolerance in *Cichorium intybus* L. var. Magdebourg. *Plant Science* **85**: 223-231.

Shaner D. L., Anderson P. C. et Stidham M. A. (1984) Imidazolinones. Potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology* **76**: 545-546.

- Shaner D. L. et Robson P. A.** (1985) Absorption, translocation, and metabolism of AC 252 214 in soybean (*Glycine max*), common cocklebur (*Xanthium strumarium*), and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). *Weed Science* **33**: 469-471.
- Shaner D. L. et Singh B. K.** (1993) Phytotoxicity of acetohydroxyacid synthase inhibitors is not due to the accumulation of 2-keto-butyrate and/or 2-aminobutyrate. *Plant Physiology* **103**: 1221-1226.
- Shield D. L., Bengtson A. S., Brockman J. P., Butler J. H., Kraatz G. W., Lamoreaux R. J. et Subramanian M. V.** (1996) Patterns of cross-tolerance to herbicides inhibiting acetohydroxyacid synthase in commercial corn hybrids designed for tolerance to imidazolinones. *Crop Science* **36**: (2) 274-278.
- Shimitzu T., Nakayama I., Nakao T., Nezu Y. et Abe H.** (1994) Inhibition of plant acetolactate synthase herbicides, Pyrimidinlsalicylic acids. *Journal of Pesticide Science* **19**: 59-67.
- Singh B. K., Stidham M. A. et Shaner D. L.** (1988) Separation and characterization of two forms of acetohydroxyacid synthase from black mexican sweet corn cells. *Journal of Chromatography* **44**: 251-261.
- Singh B. K. et Schmitt G. K.** (1989) Flavin adenine dinucleotide causes oligomerisation of acetohydroxyacid synthase from Black Mexican Sweet corn cells. *FEBS Letters* **258**: 113-115.
- Singh B. J., Schmitt G., Lillis M., Hand J. M. et Misra R.** (1991) Overproduction of acetohydroxyacid synthase from *Arabidopsis thaliana* as an inducible fusion protein in *Escherichia coli*. *Plant Physiology* **97**: 657-662.
- Singh B. K. et Matthews B. F.** (1994) Molecular regulation of amino acid biosynthesis in plants. *Amino Acids* **7**: 165-174.
- Sivakumaran K., Mulugeta D., Fay P. K. et Dyer W. E.** (1993) Differential herbicide response among sulfonylurea-resistant *Kochia scoparia* L. accessions. *Weed Science* **41**: 159-165.
- Smart C. C., Johanning D., Muller G. et Amrhein N.** (1985) Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerate high doses of the herbicide glyphosate. *Journal of Biological Chemistry* **260**: 16338-16346.
- Southern E. M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 50-517.

- Steinrucken H. C. et Amrhein N.** (1980) The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **94**: 1207-1212.
- Stidham M. A** (1991) Herbicides that inhibit acetohydroxyacid synthase. *Weed Sciences* **39** : 428-429.
- Stidham M. A. et Singh B. K.** (1991) Imidazolinone-acetohydroxyacid synthase interactions. In *The imidazolinone herbicides*. (ed. O. C. Shaner D.L., S.L. (Eds)), pp. 71-90. Boca Raton: CRC Press.
- Subramanian M. V., Hung H. Y., Dias J. M., Miner V. W., Butler J. H. et Jachetta J. J.** (1990) Properties of mutant acetolactate synthase resistant to triazolopyrimidine sulfonamide. *Plant Physiology* **94**: 239-244.
- Subramanian M. V., Loney-Gallant V., Dias J. M. et Mireles L. C.** (1991) Acetolactate synthase inhibiting herbicides bind to the regulatory site. *Plant Physiology* **96**: 310-313.
- Swanson E. B., Coumans M. P., Brown G. L., Patel J. D. et Beversdorf W. D.** (1988) The characterisation 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., Schow G. S. et Hutchinson J. M.** (1982) Metabolism of chlorsulfuron by plants: biological basis for selectivity of new herbicide for cereals. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **17**: 18-23.
- Tecle B., Da Cunha A. et Shaner D. L.** (1993) Differential routes of metabolism of imidazolinones: basis for soybean (Glycine max) selectivity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **46**: 120-130.
- Thomas P. S.** (1980) Hybridization of denatured RNA and DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **77**: (9) 5201-5205.
- Tonnemaker K. A., Auld D. L., Thill D. C., Mallory-Smith C. A. et Erickson D. A.** (1992) Development of sulfonylurea-resistant rapeseed using chemical mutagenesis. *Crop Science* **32**: (6) 1387-1391.
- Tourneur C., Jouanin L. et Vaucheret H.** (1993) Over-expression of acetolactate synthase confers resistance to valine in transgenic tobacco. *Plant Science* **88**: 159-168.
- Umbarger H. E.** (1978) Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annual Reviews of Biochemistry* **47**: 533-606.

Umbarger H. E. (1987) Biosynthesis of branched-chain amino acids. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium : cellular and molecular biology*, vol. 1 (ed. F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik and H. E. Umbarger), pp. 368. Washington: American Society for Microbiology.

Vermeulen A., Vaucheret H., Pautot V. et Chupeau Y. (1992) *Agrobacterium*-mediated transfer of a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene confers resistance to chlorsulfuron in chicory (*Cichorium intybus* L.). *Plant Cell Reports* 243-247.

Vyazmensky M., Sella C., Barak Z. et Chipman D. M. (1996) Isolation and characterization of subunits acetohydroxyacid synthase isozyme III and reconstitution of the holoenzyme. *Biochemistry* 35: 10339-10346.

Wallsgrave R. M. (1990) Enzymes of leucine, valine and isoleucine biosynthesis. *Methods in Plant Biochemistry* 3: 325-333.

Westerfeld W. W. (1945) A colorimetric determination of blood acetoin. *Journal of Biological Chemistry* 161: 495-502.

Wiersma P. A., Schmiemann M. G., Condie J. A., Crosby W. L. et Moloney M. M. (1989) Isolation, expression and phylogenetic inheritance of an acetolactate synthase gene from *Brassica napus*. *Molecular and General Genetics* 219: 413-420.

Wiersma P. A., Hachey J. E., Crosby W. L. et Moloney M. M. (1990) Specific truncation of an acetolactate synthase gene from *Brassica napus* efficiently complement *ilvB/ilvG* mutants of *Salmonella typhimurium*. *Molecular and General Genetics*. 224: 155-159.

Wittenbach V. A., Koeppe M. K., Lichtner F. T., Zimmerman W. T. et Reiser R. W. (1994) Basis of selectivity of triflurosulfuron methyl in sugar beets (*Beta vulgaris*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 49: 72-81.

Wu K., Mourad G. et King J. (1994) A valine-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* displays an acetolactate synthase with altered feedback control. *Planta* 192: 249-255.

