

PARTIE II

La plante et la sélection

15

Implication de l'acide abscissique dans la résistance du blé à la sécheresse

SAMIR EL JAAFARI¹, PHILIPPE LEPOIVRE², JEAN SEMAL²

1. Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université My Ismail, Meknès, Maroc.

2. Laboratoire de Pathologie Végétale, FSAGx, 5030 Gembloux, Belgique.

Résumé

La sélection des plantes pour leur résistance vis-à-vis de la sécheresse doit être envisagée selon une démarche synthétique, tenant compte des interactions qui existent entre organes et fonctions au sein de l'organisme. L'acide abscissique, synthétisé et accumulé par les plantes en conditions de sécheresse, est impliqué dans un grand nombre de réponses au stress hydrique. La réactivité vis-à-vis de l'ABA, ou l'aptitude à accumuler cette hormone en réponse au stress hydrique, pourraient être utilisées comme critères de sélection pour la résistance à la sécheresse.

La sélection des céréales dans des régions à forte contrainte hydrique implique une identification des mécanismes de résistance à la sécheresse, une analyse de leurs interactions et une évaluation de leurs effets sur le rendement.

Nous discuterons de l'amélioration de la productivité en conditions de déficit hydrique et nous analyserons les implications possibles de l'acide abscissique (ABA) dans la sélection des plantes pour la résistance à la sécheresse.

La sélection pour la résistance à la sécheresse

La difficulté d'identifier et de caractériser les paramètres de la résistance au stress hydrique chez les plantes, à travers l'observation d'un caractère phénotypique complexe et de faible héritabilité, comme le rendement en conditions de déficit hydrique, a conduit à s'intéresser à des critères morpho-physiologiques de la résistance à la sécheresse. Des approches analytiques, consistant à isoler et à étudier individuellement un mécanisme de résistance donné, *via* l'observation d'un paramètre particulier (critère de sélection) ont été proposées. Plusieurs critères physiologiques et biochimiques ont été ainsi identifiés dans le but de distinguer les variétés sensibles des variétés résistantes au stress hydrique : accumulation de proline, induction de protéines spécifiques, résistance stomatique, fluorescence chlorophyllienne. Ces recherches ont généré une connaissance approfondie des processus physiologiques liés à la réponse de la plante au stress hydrique, mais pourraient conduire à une vue partielle et réductionniste du comportement de la plante entière, en séparant artificiellement l'organe de l'organisme et en dissociant les mécanismes biochimiques des fonctions globales du végétal. Cela montre que le problème de la résistance à la sécheresse doit être abordé *via* une démarche synthétique, tenant compte des relations fonctionnelles, des liens de causalité et des interactions entre les mécanismes impliqués [24].

La sélection pour la résistance à la sécheresse repose sur l'identification et la création de génotypes capables de produire un maximum de biomasse ou de grains en conditions de déficit hydrique. Il existe en la matière une large gamme de mécanismes, que Turner [36] a classés en mécanismes d'évitement, d'esquive ou de tolérance vis-à-vis de la sécheresse.

Les mécanismes d'esquive permettent à la plante de conserver un potentiel hydrique faiblement négatif en conditions de stress, évitant ainsi la déshydratation des tissus. Cela peut être réalisé par une absorption efficace de l'eau du sol, grâce à un système racinaire très développé [19], ou par une grande conductivité hydraulique des tissus [21]. La limitation des pertes d'eau peut également résulter de la réduction de la surface transpirante (feuilles de petite taille ou abscission, [4]) ou encore de la diminution de la radiation interceptée (couche épicuticulaire cireuse ou lipidique, [3]). Chez le blé, l'enroulement foliaire observé chez certaines variétés résistantes relève de ces mécanismes d'économie en eau [8]. Enfin, la fermeture stomatique constitue également un mécanisme réversible contribuant à réduire les pertes en eau.

Les mécanismes de tolérance favorisent quant à eux le maintien de la turgescence de la plante alors que son potentiel hydrique est très négatif. L'ajustement osmotique constitue le processus majeur permettant à la cellule de maintenir sa turgescence sous contrainte hydrique [36], grâce à l'accumulation active de molécules particulières : alcools (comme le glycérol), polyols, généralement dérivés de l'inositol, sels de potassium [16] et sucres solubles [1, 2]. Cependant, les substances qui ont retenu le plus l'attention des physiologistes et des sélectionneurs sont des composés contenant un azote quaternaire, comme la bétaine ou la proline [15, 23, 35].

D'autres mécanismes encore peuvent intervenir dans le maintien de la turgescence cellulaire, comme l'élasticité membranaire, la réduction de la taille des cellules [37] et la résistance protoplasmique. Cette dernière dépend de la capacité des cellules à résister à un dommage mécanique et à la dénaturation des protéines au niveau membranaire ou cytoplasmique [17].

L'ensemble de ces mécanismes montre que la sélection de plantes possédant une résistance à la sécheresse peut s'opérer à différents niveaux d'organisation du génotype

sans omettre les interactions multiples qui peuvent exister entre organes et fonctions du système plante.

En fonction de ces considérations, la recherche d'une résistance vis-à-vis de la sécheresse peut se concevoir en essayant d'assembler des mécanismes de résistance dans un même génotype, présentant par ailleurs des caractéristiques agronomiques intéressantes. Ces mécanismes sont dans la plupart des cas contrôlés par plusieurs gènes dont il faut maximiser les effets pour obtenir un rendement optimal en conditions de déficit hydrique (Figure 1.1).

Une seconde approche de la sélection pour la résistance à la sécheresse pourrait viser à éliminer des facteurs limitant le rendement en conditions de déficit hydrique (Figure 1.2). A cet égard, la forte accumulation de l'acide abscissique ou la réactivité élevée vis-à-vis de cette hormone en présence de stress hydrique semblent affecter négativement la croissance et l'activité photosynthétique de la plante en conditions de sécheresse. En effet, l'ABA joue un rôle de médiateur dans les réponses au stress hydrique, principalement dans les mouvements stomatiques [33]. Des travaux effectués au niveau moléculaire sur les effets de l'ABA et du stress hydrique confortent l'hypothèse selon laquelle cette hormone joue un rôle clé dans la réponse au stress hydrique [7, 34]. C'est ainsi que, chez le maïs, la famille des gènes *rab* présente une régulation similaire en conditions de stress hydrique ou sous l'effet de l'ABA [25, 26].

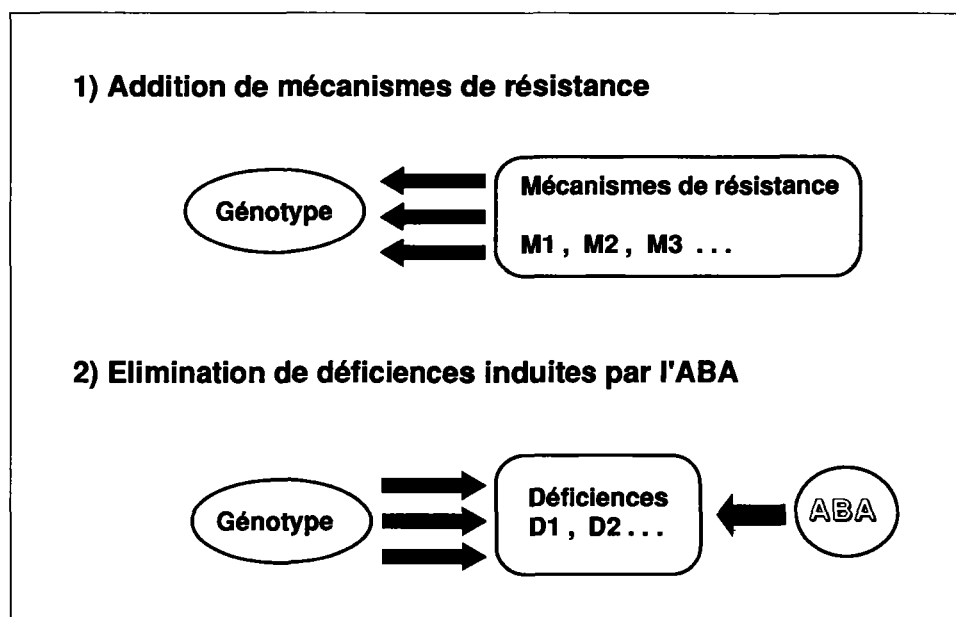


Figure 1. Amélioration du rendement en conditions de sécheresse.

Implications de l'ABA dans la sélection pour la résistance à la sécheresse

L'étude des implications de l'ABA dans les réponses des plantes au stress hydrique [12], montre que des mécanismes d'esquive réduisant la photosynthèse sont induits tant par une forte accumulation de cette hormone que par une réactivité élevée de la plante à son égard (Figure 2). Citons, entre autres, la stimulation de la croissance racinaire [5], la réduction de la surface foliaire [4], la diminution de la radiation absorbée [3], l'abscission des feuilles [29] et la fermeture stomatique [18].

Ces mécanismes d'esquive ont des effets bénéfiques sur le plan de l'économie en eau, mais accélèrent la sénescence et inhibent la photosynthèse et la croissance, ce qui contribue à réduire le rendement. La diminution de la surface transpirante se traduit par une réduction de la surface photosynthétisante. L'abaissement de la conductance stomatique par l'ABA limite la disponibilité en CO_2 à l'intérieur de la feuille et inhibe

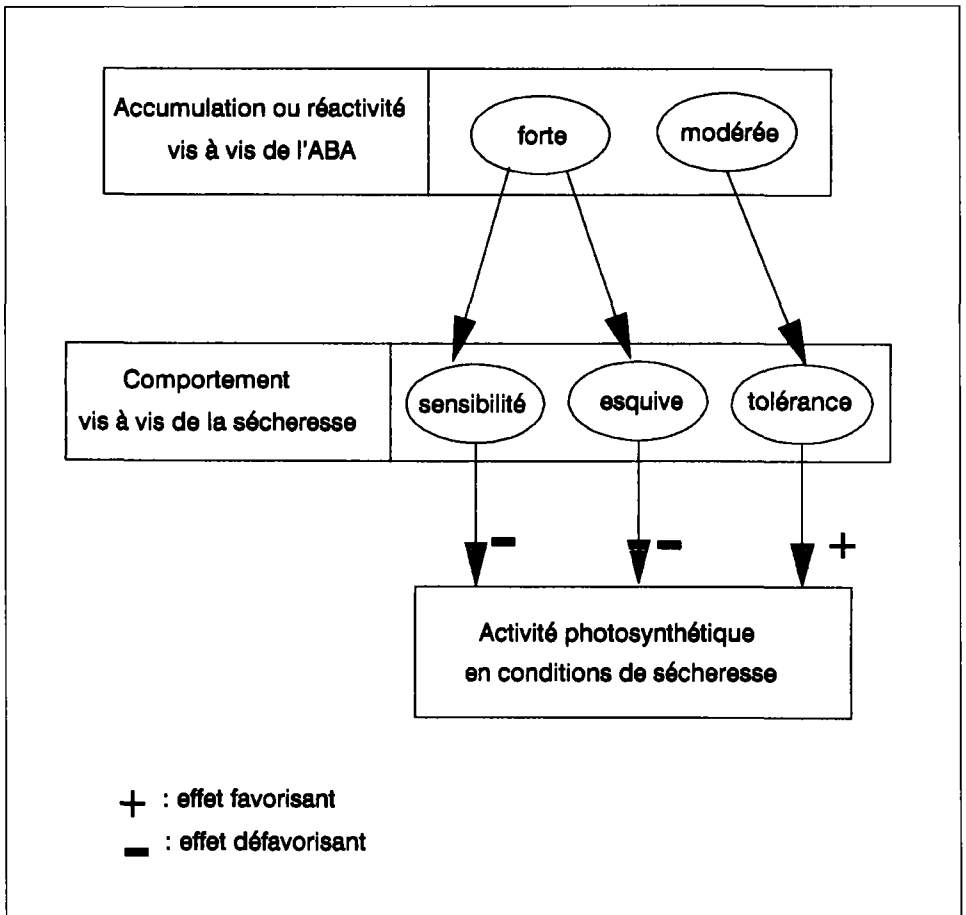


Figure 2. Hypothèses concernant les implications de l'ABA dans les mécanismes de résistance à la sécheresse et conséquences sur l'activité photosynthétique.

ainsi la photosynthèse [9, 11, 20]. D'autres travaux ont également rapporté des inhibitions non stomatiques de la photosynthèse sous l'effet de l'ABA [6, 10, 31].

L'identification de génotypes capables de maintenir une photosynthèse active sous contrainte hydrique repose sur une réduction des mécanismes d'esquive induits par l'ABA. Cet objectif pourrait être atteint en sélectionnant des plantes qui accumulent moins d'ABA en conditions de déficit hydrique ou qui présentent une moindre réactivité vis-à-vis de l'ABA [14].

Les progrès dans les connaissances des bases génétiques de la synthèse et de l'accumulation de l'ABA suggèrent la possibilité de modifier des caractères comme le niveau de base de cette hormone, l'aptitude à accumuler l'ABA en conditions de stress hydrique ou encore la réactivité des plantes à son égard. Le succès de telles approches repose sur la compréhension du métabolisme de l'ABA et sur l'analyse de son action au niveau de la plante entière, car les interactions entre les différentes fonctions du végétal et les effets compensatoires qui peuvent exister entre elles sont susceptibles de modifier l'expression biochimique de l'accumulation (ou de la synthèse) de cette hormone au niveau de l'organisme.

La prédiction des effets au champ est encore plus difficile, d'où un besoin pressant de comprendre le rôle de l'ABA dans la croissance, le développement et la réponse au déficit hydrique *in situ*.

Jusqu'à présent, les seuls travaux d'amélioration de la résistance à la sécheresse conduits en utilisant comme critère de sélection la teneur en ABA endogène de feuilles excisées au champ et déshydratées au laboratoire ont été réalisés par Quarrie [27, 28, 30]. Des lignées à haute teneur (HS) ou à faible teneur (LS) en ABA ont été développées à partir d'un croisement entre deux parents qui diffèrent par leur aptitude à produire cette hormone. La caractérisation des lignées sélectionnées a été basée sur le rendement et les composantes du rendement en conditions de déficit hydrique. Les rendements, en conditions de stress hydrique, des lignées à haute teneur en ABA se sont révélés supérieurs aux lignées à faible teneur en ABA. Par contre, Read *et al.* [32] ont obtenu des résultats opposés sur ces mêmes lignées.

Plusieurs propriétés physiologiques de l'ABA ont été identifiées sans pour autant avoir été exploitées en matière de sélection ou d'études de corrélation avec la résistance à la sécheresse. Les comparaisons effectuées jusqu'à présent entre aptitude à accumuler l'ABA et résistance à la sécheresse ont utilisé le rendement en conditions de déficit hydrique comme critère pour évaluer la résistance. Or, il s'agit en l'occurrence d'un caractère polygénique, à faible héritabilité et qui, de surcroît, présente des problèmes de stabilité d'expression dans différents environnements.

Ces comparaisons ont toutefois été effectuées sans que soit décrit le statut hydrique des plantes. Or, il est nécessaire de distinguer, dans les différences de teneur en ABA endogène, la part due à une synthèse accrue de cette hormone et la part résultant des changements de statut hydrique (accumulation passive par perte de turgescence).

Nous avons montré chez trois variétés de blé (Sabine, 1723 et Siete Cerros respectivement, sensible, tolérante et esquivante vis-à-vis de la sécheresse) que la réactivité vis-à-vis de l'ABA n'est pas liée directement à un niveau de résistance au stress hydrique [13]. En effet, une forte réactivité variétale vis-à-vis de cette hormone (mesurée *in vivo* par les effets d'applications exogènes d'ABA sur les réponses stomatiques, les échanges gazeux et le statut hydrique) peut se traduire par une sensibilité de la variété au stress hydrique (Sabine) ou par une aptitude à esquiver le stress hydrique en limitant les pertes en eau (Siete Cerros).

Chez ces mêmes variétés, nous avons analysé l'accumulation foliaire d'ABA endo-

gène en réponse à un stress hydrique de - 2 MPa, induit par déshydratation de feuilles excisées ou par conduite à sec de plantes entières (Tableau I). Nous avons noté de fortes accumulations d'ABA en réponse à la contrainte hydrique nettement plus élevées lorsque celle-ci résulte d'une conduite à sec de plantes entières que lorsqu'elle est obtenue par déshydratation de feuilles excisées. Ces résultats confortent l'hypothèse d'une synthèse racinaire de l'ABA et qui serait accumulé au niveau des feuilles [38]. Les différences significatives du niveau d'accumulation d'ABA observées entre les trois variétés semblent être liées au niveau de résistance à la sécheresse. La variété sensible Sabine accumule le plus d'ABA, ce qui suggère qu'une forte accumulation de cette hormone révèle un symptôme de stress plutôt qu'une réponse adaptative.

Tableau I. L'hydratation foliaire (H) et la teneur en ABA endogène sous l'effet d'un stress hydrique (*) chez les variétés de blé Sabine, 1723 et Siete Cerros.

		Variétés		
		Sabine	1723	Siete Cerros
Déshydratation de feuilles excisées	Hydratation H (%)	59.3 (1.2)	64.3 (3.5)	60.7 (2.1)
	[ABA] ng/g PS	1492	1218	941
Conduite à sec de plantes	Hydratation H (%)	69.7 (2.1)	77.3 (2.1)	68.3 (3.5)
	[ABA] ng/g PS	5495	3815	3691

entre parenthèses = erreur standard

(*) : Le stress hydrique est instauré par déshydratation de feuilles excisées ou par conduite à sec de plantes entières jusqu'à un potentiel hydrique de - 2 MPa.

Conclusion

La sélection de la résistance à la sécheresse devrait se concevoir selon une approche synthétique reliant un ensemble de mécanismes dont l'intégration pourrait améliorer le rendement en conditions de déficit hydrique.

L'ABA étant impliqué dans une gamme étendue de réponses de la plante au stress hydrique, son utilisation dans un programme de sélection permettrait la liaison entre un critère de sélection analytique (réactivité vis-à-vis de l'ABA ou aptitude à accumuler l'ABA) et des processus physiologiques globaux, comme les régulations stomatiques, le statut hydrique et l'activité photosynthétique.

Toutefois, il faut prendre en compte que, si cette hormone a des effets bénéfiques sur le statut hydrique *via* la limitation des pertes d'eau, elle affecte négativement la photosynthèse *via* des effets stomatiques et non stomatiques.

Références

1. Acevedo E, Fereres E, Hsiao TC, Henderson DW (1979). Diurnal growth trends, water potential, and osmotic adjustment of maize and sorghum leaves in the field. *Plant Physiol* 64 : 476-480.
2. Ackerson RC (1981). Osmoregulation in cotton in response to water stress. II. Leaf carbohydrate status in relation to osmotic adjustment. *Plant Physiol* 67 : 489-493.
3. Anderson WH, Gellerman JL, Schlenk H (1984). Effect of drought on Phytol wax esters in Phaseolus leaves. *Phytochemistry* 23 : 2695-2696.
4. Begg JE, Turner NC (1976). Crop water deficits. *Adv Agron* 28 : 161-217.
5. Biddington NL, Dearman AS (1982). The effect of abscisic acid on root and shoot growth of cauliflower plants. *Plant Growth Regul* 1 : 15-24.
6. Bunce JA (1987). Species-specific responses to water stress of gas exchange parameters mimicked by applied abscisic acid. *Can J Bot* 65 : 103-106.
7. Cattivelli, Crosatti C, Grosi M, Portesi A, Rizza F, Stanca AM (1995). Relationship among the modifications of gene expression induced by ABA, drought and gold stress in barley. In : « Reproductive Biology and Plant Breeding » XIIIth EUCARPIA Congress 6-11 juillet 1992, Angers, France.
8. Clarke JM (1986). Effect of leaf rolling in leaf water loss in Triticum spp. *Can J Plant Sci* 66 : 885-891.
9. Cornic G, Briantais JM (1991). Partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ and O₂ in a C3 leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO₂ concentrations and during drought stress. *Planta* 183 : 178-184.
10. Cornic G, Migonilac E (1983). Non stomatal inhibition of net CO₂ uptake by abscisic acid in Pharbitis mil. *Plant Physiol* 73 : 529-533.
11. Downton WJS, Loveys BR, Grant WJR (1988). Non uniform stomatal closure induced by water stress causes putative non-stomatal inhibition of photosynthesis. *New Phytol* 110 : 503-509.
12. El Jaafari S (1992). ABA et sélection de la résistance à la sécheresse. *Annales de Gembloux* 98 : 259-275.
13. El Jaafari S (1993). Contribution à l'étude des mécanismes biophysiques et biochimiques de résistance à la sécheresse chez le blé (*Triticum aestivum* L.) Thèse de Doctorat es Sciences Agronomiques, Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux, 214 p.
14. El Jaafari S, Paul R (1993). Accumulation foliaire de proline et résistance à la sécheresse chez le blé (*Triticum aestivum* L.). *Arch Int Physiol Biochem Biophys* 101 : B8.
15. El Jaafari S, Paul R, Lepoivre P, Semal J, Laitat E (1993). Résistance à la sécheresse et réponses à l'acide abscissique : analyse d'une approche synthétique. *Cahiers Agricultures* 2, 256-263.
16. Ford CW, Wilson JR (1984). Changes in levels of solutes during osmotic adjustment to water stress in leaves of four tropical pasture species. *J Plant Physiol* 8 : 79-91.
17. Gaff DF (1980). Protoplasmic tolerance of extreme water stress. In : Turner NC, Kramer PJ eds. *Adaptation of plants to water and high temperature stress*. Wiley, NY, 207-230.
18. Hartung W, Radin JW, Hendrix DL (1988). Abscisic acid movement into the apoplastic solution of water stress cotton leaves. Role of apoplastic pH. *Plant Physiol* 86 : 908-913.
19. Hsiao TC, Acevedo E (1974). Plant responses to water deficits, water use efficiency and drought resistance. *Agric Meteorol* 14 : 59-84.
20. Lauer MJ, Boyer JS (1992). Internal CO₂ measured directly in leaves. Abscisic acid and leaf water potential cause opposing effects. *Plant Physiol* 98 : 1310-1316.
21. Levitt J (1982). Water stress. In : « Responses of plant to environmental stress, water radiation, salt and other stress ». New York Academic Press : 25-282.
22. Lichtenthaler HK 1988. Application of Chlorophyll Fluorescence. Dordrecht, Kluwer, 366p.
23. McCue KF, Hanson AD (1990). Drought and salt tolerance : towards understanding and application. *Tibtech* 8 : 358-62.

24. Monneveux Ph (1991). Quelles stratégies pour l'amélioration génétique de la tolérance au déficit hydrique des céréales d'hiver ? In : AUPELF-UREF ed. *L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides*, John Libbey Eurotext, Paris 165-186.
25. Pages M, Pla M, Jensen AB, Freire MA, Arenas C, Poca E, Goday A (1992). Regulation of ABA and water stress responsive genes in maize embryos. In : Datte Y, Dumas C, Gallais A eds. *Reproductive Biology and Plant Breeding*, Springer Verlag, Berlin : 275-283.
26. Pla M, Vilardell J, Guiltinan MJ, Marcotte WR, Niogret MF, Quatrano RS, Pages M (1986). The cis-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water stress responses of the maize gene rab23. *Plant Molecular Biology* 21 : 259-266.
27. Quarrie SA (1981). Genetic variability and heritability of drought induced abscisic acid accumulation in spring wheat. *Plant Cell Environ* 4 : 147-151.
28. Quarrie SA, Lister PG (1983). Characterization of spring wheat genotypes differing in drought-induced abscisic acid accumulation. *J Exp Bot* 34 : 1260-1270.
29. Quarrie SA (1985). Genetic differences in abscisic acid physiology and their potential uses in agriculture. In : Addicot FT ed. *Absciscic Acid*, Praeger Publisher, NY.
30. Quarrie SA (1991). Implications of genetic differences in ABA accumulation for crop production. In : Davies WJ, Jones HG eds. *Absciscic Acid physiology and biochemistry*. Bios Scientific Publishers, Cambridge, UK : 227-244.
31. Raschike K, Hedrich R (1985). Simultaneous and independent effects of abscisic acid on stomata and the photosynthetic apparatus in whole leaves. *Planta* 193 : 105-18.
32. Read JJ, Johnson BC, Carver BF, Quarrie SA (1991). Carbon isotope discrimination, gas exchange and yield of spring wheat selected for abscisic acid content. *Crop Sci* 31 : 139-146.
33. Sarda X, Vansuyt G, Tousch D, Casse-Delbart F, Lamaze T (1992). Les signaux racinaires de la régulation stomatique. In : « Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne : diversité génétique et amélioration variétale ». Colloques INRA n° 64, 75-79.
34. Skiver K, Mundy J (1990). Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2 : 503-512.
35. Stewart CR (1981). Proline accumulation : Biochemical aspects. In : Paleg LG, Aspinall D eds. *The physiology and biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Academic Press, Sydney : 629-635.
36. Turner NC (1986). Adaptation to water deficits ; a changing perspective. *Aust J Plant Physiol* 13 : 175-190.
37. Tyree MT, Jarvis PG (1982). Water in tissues and cells. In : Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H, eds. *Encyclopedia of plant physiology*. New Series, Vol. 12B Physiological plant ecology II., Water relations and carbon assimilation. Springer-Verlag, Berlin : 36-77.
38. Zhang J, Davies WJ (1989). Sequential response of whole plant water relations to prolonged soil drying and the involvement of xylem sap ABA in the regulation of stomatal behaviour of sunflower plants. *New Phytol* 113 : 167-174.

16

Intégration des approches physiologiques, génétiques et moléculaires pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse chez les céréales

P. MONNEVEUX, D. DEPIGNY-THIS

UFR Génétique et Amélioration des Plantes, ENSA-INRA, Montpellier, France.

Résumé

Après quelques réflexions critiques concernant les stratégies empiriques d'amélioration génétique des rendements utilisées dans les milieux à fortes contraintes, une stratégie globale est proposée, associant des études conduites à différents niveaux d'intégration (génome, plante, peuplement) et intégrant divers outils physiologiques, génétiques, et moléculaires. Les programmes conduits dans notre laboratoire et quelques résultats obtenus dans ces études sont donnés à titre d'exemples. Le problème de l'utilisation de ressources génétiques à base large est enfin abordé.

Quelques réflexions critiques concernant l'approche empirique

La productivité comme objectif

Dans les zones favorables ou à faibles contraintes environnementales, le choix du rendement potentiel (ou aptitude génétique au rendement), à la fois comme objectif et critère de sélection, s'avère relativement justifié dans la mesure où les conditions de milieu (sol, climat, techniques culturales) permettent l'expression de cette aptitude génétique [36] ; dans les régions à contraintes environnementales fortes et erratiques, la

productivité ne peut être retenue, ni comme objectif de sélection (des niveaux de rendement proches du rendement potentiel ayant de très faibles probabilités d'être atteints), ni, *a fortiori*, comme critère de sélection. La définition des objectifs passe en effet dans ces zones par une analyse de variabilité des rendements intégrant l'analyse de la variabilité environnementale (spatiale et interannuelle), en d'autres termes par une analyse des interactions génotype x milieu ; dans le cas contraire, le risque est grand pour le sélectionneur de tomber dans ce piège que Reitz [43] appelait la *one-year miracle variety*...

Les interactions génotype x milieu

Dès 1974, Reitz regroupe les variétés d'espèces cultivées en trois catégories :

- les variétés maintenant des rendements élevés dans une large gamme d'environnements ;
- les variétés assurant une production de grains relativement élevée dans les environnements à fortes contraintes (ces variétés sont souvent qualifiées de rustiques) ;
- les variétés ne donnant de bons rendements qu'en conditions très favorables (on rejoint ici la notion de variété à haute productivité, évoquée plus haut).

Différents modèles ont été proposés pour analyser les interactions génotype x milieu. Ils reposent tous sur un suivi du comportement d'un même groupe de variétés, dans une large gamme de situations différentes ; la stabilité du rendement d'une variété est évaluée dans la plupart de ces modèles (Figure 1 et Tableau I) :

- à partir des valeurs du coefficient de régression, du rendement moyen obtenu en prenant en compte l'ensemble des « situations » et du carré moyen de la déviation Sd2 [18] ;
- à partir du coefficient de détermination r^2 [42].

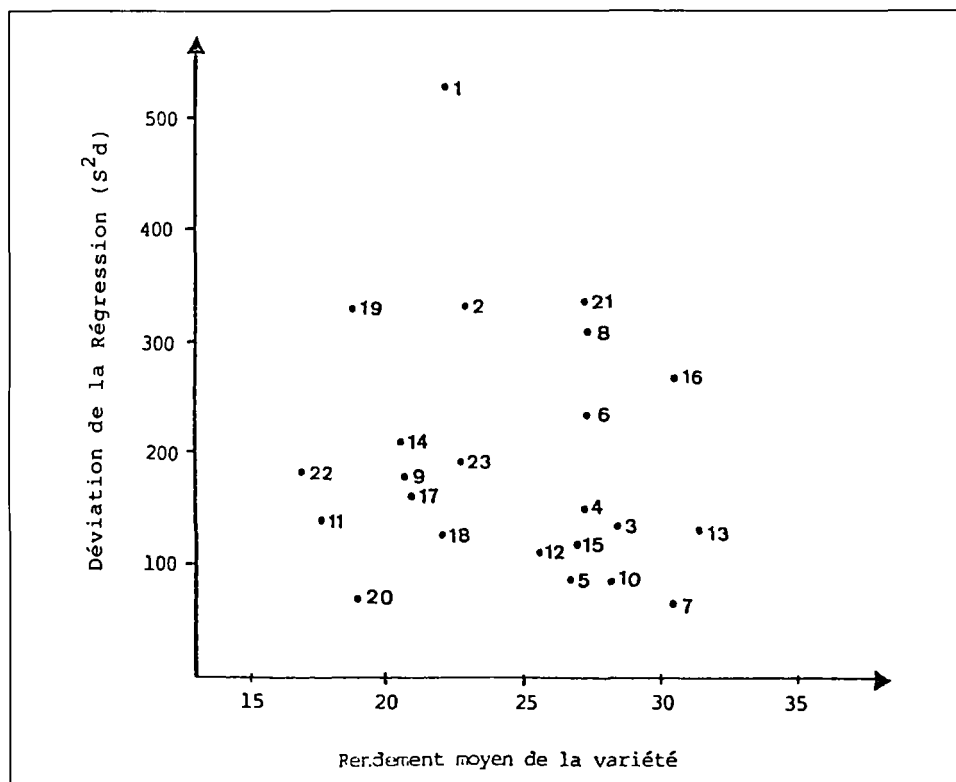
Ces modèles linéaires d'analyse ont fait l'objet de nombreuses critiques [12] ; on leur reproche en particulier [41, 46] :

- de confondre les effets principaux et les effets d'interaction ;
- de ne pas prendre en compte la non-linéarité évidente des réponses des génotypes aux variations des conditions environnementales.

Des modèles multivariés ont été plus récemment proposés [25, 31, 47] ; le programme AMMI (*additive main effects and multiplicative interactions*) est un exemple d'application de ces modèles pour l'analyse du comportement ; il a été utilisé pour comparer le comportement de différentes variétés de blé dur dans le Bassin méditerranéen [41]. En tout état de cause, les modèles d'étude d'interactions génotype x milieu (tant linéaires que multivariés) doivent être considérés :

- comme des modèles purement descriptifs du comportement : ils relèvent d'une approche biométrique qui ne cherche pas à définir ni à expliquer le rôle des facteurs de l'environnement ou le fonctionnement biologique de la plante ;
- comme fortement dépendants de l'échantillon génétique testé, c'est-à-dire de la nature des génotypes inclus dans les essais [14].

Les revues bibliographiques de Hardwick et Wood [26], Freeman [21], Hewstone [27], et Fox et Rosielle [20] mettent bien en évidence les limitations de ces modèles en même temps que leur intérêt en vue d'une description succincte des comportements variétaux.



- | | |
|----------------------------|-------------------------|
| 1 = Kabir 1 | 13 = Mrb 5 |
| 2 = M 1086 | 14 = Oued Zenati 368 |
| 3 = Heider (Marjawi) | 15 = Belikh 2 |
| 4 = Quadalete | 16 = Sham 1 |
| 5 = Jordan coll. 86 n° 42 | 17 = Haurani |
| 6 = Korifla | 18 = Ain Arous |
| 7 = Mrb 17 | 19 = Akbash |
| 8 = Daki (Ceyhan) | 20 = Mavragani Iraklion |
| 9 = Gezira 17 | 21 = Gr/Boy |
| 10 = Jordan coll. 86 n° 21 | 22 = Cannizzara |
| 11 = Baladia Hamra | 23 = Hedba 3 |
| 12 = Furat 1 | |

Figure 1. Relation entre le rendement moyen de la variété et déviation de la régression chez 23 génotypes de blé dur. (L'analyse, qui reprend les résultats du Tableau I, permet d'identifier quelques génotypes « à large adaptation », tels que : Om Rabi 17, Om Rabi 5, Jordan n° 21, Jordan n° 42, Heider, Belikh 2, Furat 1 et Quadalete.)

Tableau I. Analyse de la stabilité de rendement de 23 variétés de blé dur.

Génotypes	X	b	a	S ² d	r ²
Kabir 1	22,02	1,107*	- 4,080	529,85	0,882
M 1086	22,75	0,810*	3,156	330,52	0,865
Heider/Marjawi	28,35	1,312**	- 2,576	137,61	0,966
Quadalete	27,15	1,323**	- 4,042	150,60	0,950
Jordan N° 42	26,82	1,182**	- 1,030	86,40	0,930
Korifla	27,38	1,196**	- 0,814	234,65	0,950
Mrb 17	30,39	1,311**	- 0,524	67,21	0,988
Daki/Ceyhan	27,44	1,078**	2,330	310,00	0,920
Gezira 17	20,71	0,900*	- 0,518	179,73	0,890
Jordan N° 21	28,25	1,300**	- 2,372	86,94	0,980
Baladia Hamra	17,61	0,733**	0,303	137,65	0,890
Furat 1	25,49	1,137**	- 1,316	111,80	0,974
Mrb 5	31,42	1,233**	2,362	134,72	0,973
Oued Zenati 368	20,61	0,820*	1,230	210,04	0,910
Belikh 2	27,03	1,123**	0,558	121,60	0,970
Sham 1	30,44	1,307**	- 0,377	270,07	0,950
Haurani	20,94	0,852**	0,866	163,89	0,930
Aïn Arous	21,95	0,850**	1,966	128,99	0,950
Akbash	18,76	0,760*	0,843	328,46	0,850
Mav. Iraklion	19,03	0,714**	2,183	69,00	0,900
Gr/Boy	27,30	1,317**	- 3,740	339,70	0,940
Cannizzara	16,83	0,830**	- 2,703	179,73	0,926
Hedba 3	23,66	1,230**	- 6,250	194,55	0,870
Moyenne	24,40	1,061		195,80	0,928
	± 1,28	± 0,217			± 0,040
PPDS (0,05)	8,73				

X = rendement moyen (X) ; b = coefficient de régression ; (a) = pente de la régression entre rendement de l'essai et rendement de la variété ; S²d = carré moyen de la déviation ; r² = coefficient de détermination.

L'analyse a été effectuée sur 12 sites environnementaux en Syrie (Tell-Hadya, Breda) et en France (Montpellier).

(D'après Ali Dib, 1992)

Le rendement comme critère

De nombreux travaux, parmi lesquels ceux de Frey [22] et Daday *et al.* [16], aboutissent à la conclusion que la sélection pour le rendement (et ses composantes) est peu efficace en conditions environnementales défavorables, la variance génétique et l'héritabilité de ce caractère étant, dans ces conditions, peu élevées.

L'opportunité, pour obtenir des génotypes tolérants au stress, d'effectuer la sélection en conditions favorables, ou défavorables, a été discutée par Ceccarelli [15] ; ce débat apparaît toutefois relever quelque peu de la casuistique : en effet, la distinction entre « milieux favorables » et « milieux défavorables » implique une caractérisation précise de ces milieux, une quantification des stress subis, et des pressions de sélection appliquées ; par ailleurs, la capacité d'un génotype à produire une quantité de grains élevée dans un milieu caractérisé par des contraintes données peut dépendre, comme nous le verrons plus loin, de caractères aussi différents que :

- des adaptations spécifiques liées à une grande rusticité (production de biomasse végétative importante, faible indice de récolte), qui interviendront surtout dans des milieux à très fortes contraintes ;
- des adaptations « inductibles », à faible coût énergétique cumulé, compatibles avec une productivité élevée (comme cela semble être le cas pour l'ajustement osmotique par exemple) ;
- des « adaptations » recouvrant en fait des « effets résiduels » de potentiels élevés de rendement, qui s'expriment surtout dans des milieux favorables ou à contraintes modérées.

Il convient, bien entendu, d'éviter que les milieux (sol, climat, techniques) dans lesquels est pratiquée la sélection présentent une trop grande disparité d'avec les milieux où les futures variétés doivent être cultivées.

L'incapacité du rendement à être utilisé comme seul critère en conditions environnementales difficiles conduit à définir et à mettre en œuvre une véritable « stratégie de sélection » permettant une identification, une description, et une validation des caractères de tolérance, une étude génétique de ces caractères, et la recherche de marqueurs moléculaires leur étant associés. C'est cette stratégie, qui amène à mettre en œuvre à la fois des outils physiologiques, génétiques, et moléculaires, que nous cherchons à développer au sein de notre laboratoire, au bénéfice de l'amélioration de l'orge et du blé dur.

Identification et hiérarchisation des caractères phénologiques et morphologiques de tolérance (Figure 2)

Face à la multiplicité des caractères d'adaptation [36], il convient d'effectuer parmi eux un « tri » ; le choix des caractères à sélectionner peut relever en fait de deux types de démarches :

- **une première démarche, de type théorique**, consiste à se baser sur les connaissances physiologiques acquises sur ces mécanismes pour en déduire leur pertinence. Une telle démarche doit avoir en particulier pour objectif d'écarter (ou de prendre en compte avec circonspection) les caractères susceptibles de conduire à contre-sélectionner pour la productivité, et de privilégier au contraire les caractères inductibles, ayant sur l'ensemble du cycle de la plante un faible coût énergétique, et susceptibles d'inter-

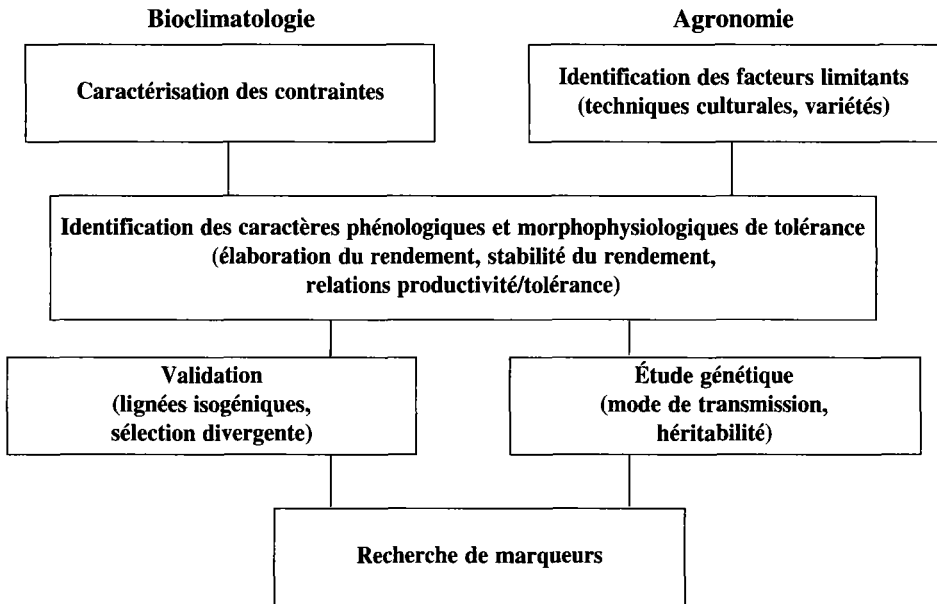


Figure 2. Schéma général d'amélioration génétique de la tolérance à la sécheresse.

venir dans une large gamme d'intensités de stress, voire face à différents types de stress. Une telle démarche (qui se doit de prendre en compte également l'héritabilité du caractère, si celle-ci a déjà été évaluée) conduira par exemple à accorder une grande importance à un mécanisme tel que l'ajustement osmotique (Tableau II).

– **une deuxième démarche, de type expérimental**, consiste à rechercher, dans le cadre d'essais effectués dans différentes conditions environnementales, les relations existant entre le rendement, ou certains indices exprimant la tolérance du génotype, et l'expression de certains caractères morphophysiologiques ou phénologiques ; cette approche, décrite en détail par Acevedo [48], a été reprise depuis par de nombreux sélectionneurs et a permis d'identifier les principaux caractères associés à différents types de sécheresse (Tableau III). Elle présente toutefois de sérieuses limitations :

– plusieurs « indices de tolérance » ont été proposés (Tableau IV), faisant tous intervenir le rendement sous stress et le rendement potentiel ; or, le fait de prendre en compte l'un quelconque de ces indices, ou au contraire le rendement comme base de calcul des corrélations, conduit à des interprétations très diverses : le mode de calcul de la plupart de ces indices « pénalisant » en effet très fortement les génotypes à rendement potentiel élevé, des valeurs très fortes caractérisent plutôt des génotypes rustiques à faible productivité que des génotypes à rendement stable et élevé ; par ailleurs certains modèles font intervenir la précocité, faisant ainsi abstraction de la capacité d'évitement ;

– seuls les caractères facilement mesurables au champ (caractères phénologiques, composantes du rendement, caractères morphologiques, et certains caractères physiologiques) peuvent entrer dans ce type d'analyse ;

Tableau II. Intérêt des mesures de capacité d'ajustement osmotique en tant que critère d'évaluation de la tolérance au stress hydrique.

Type d'adaptation	Inductible
Facteurs d'induction	– teneur en eau du sol
Rôles	– maintien de la turgescence – maintien de la croissance [13] – retardement de l'enroulement et de la sénescence foliaires [29] – maintien de l'ouverture stomatique [35]
Facilité de mesure	– implique des mesures conjointes de potentiels hydrique, osmotique et de turgescence et des mesures de teneur en eau relative. – les dosages d'osmolytes sont difficiles à relier aux capacités d'ajustement.
Relations avec le comportement au champ	– relations entre capacité d'ajustement et rendement en grains sous stress [10, 38]
Variabilité génétique	– élevée [11, 38]
Déterminisme génétique	– caractère monogénique récessif ? [38]

Tableau III. Quelques exemples de caractères morphophysiologiques et phénologiques liés au rendement dans différentes situations de sécheresse.

Espèce	Région	Caractères	Référence
Orge	Moyen-Orient	Indice de récolte élevé, gros grains, tallage-épis et fertilité de l'épi élevés, précocité, tolérance au froid.	[2]
Orge	Sud Espagne	Tallage-épis élevé, forte biomasse à l'anthèse	[23]
Orge	Nord-Est Espagne, Sud France	Bonne capacité de maintien de la teneur en eau relative, gros grain.	[37]
Orge	Maroc	Précocité d'épiaison, longueur des racines séminales, enroulement des feuilles.	[7]
Blé dur	Moyen-Orient	Indice de récolte élevé, tallage-épis et fertilité de l'épi élevés, précocité, cols d'épis longs.	[2]
Blé dur	Maroc	Précocité d'épiaison, enroulement des feuilles, tallage, longueur du col de l'épi, fertilité de l'épi.	[40]

Tableau IV. Présentation de différents modes de calcul des « indices de sensibilité à la sécheresse ».

Indice de sensibilité à la sécheresse (<i>Drought Susceptibility Index</i>) de Fischer et Maureer [19] :
$S = Y_d/Y_p$
Y_d = rendement en grains en conditions de sécheresse
Y_p = rendement en conditions « optimales » (irriguées)
Utilisation des indices de stabilité [10]
Indice de résistance à la sécheresse (<i>Drought Resistance Index</i>) de Bidinger <i>et al.</i> [8] :
$I = (Y_a - Y_s)/SE_s$
Y_a = rendement en conditions de stress
Y_s est obtenu par ajustement, en utilisant l'équation :
$Y_s = a + b_1 (Y_c) + b_2 (b_1) + b_3 (b_1^2)$, avec Y_c = rendement en conditions irriguées, et b_1 = nombre de jours entre semis et floraison
Indice de sensibilité à la sécheresse (<i>Drought Susceptibility Index</i>) de Acevedo [2] :
$S = (1 - Y_d/Y_p)/D$ avec :
Y_d = rendement en conditions de sécheresse
Y_p = rendement en conditions favorables (irriguées)
$D = \text{« intensité de la sécheresse »} = 1 - Y_{dm}/Y_{pm}$
Y_{dm} = moyenne de rendement de l'essai, en conditions de sécheresse
Y_{pm} = moyenne de rendement de l'essai, en conditions favorables (irriguées)

Comme dans le cas des études d'interactions génotype x milieu, ces analyses doivent prendre en compte plusieurs lieux et plusieurs années pour intégrer au mieux la variabilité environnementale (spatiale et interannuelle), ce qui induit des dispositifs expérimentaux relativement lourds.

Les deux démarches décrites ci-dessus, loin de s'opposer, doivent au contraire être utilisées de manière complémentaire. Un exemple de « convergence » de ces deux démarches peut, par exemple, être trouvé dans la mise en évidence du rôle de l'épi et des barbes dans la tolérance au stress hydrique terminal chez le blé, mise en évidence qui relève aussi bien de la « logique physiologique » (importance de l'épi dans la photosynthèse et de la transpiration après l'anthèse) que de mises en évidence expérimentales (corrélations entre caractères de l'épi et indices de sensibilité). Au cours de la phase de remplissage du grain, l'épi assurerait au minimum, et en conditions favorables, 13 % de la photosynthèse [9] ; en conditions de déficit hydrique, le rôle de l'épi devient plus important que celui des dernières feuilles [30], du fait de la sénescence de ces dernières ; cela est particulièrement vrai chez le blé dur [24].

Validation des caractères morphophysiologiques de tolérance au déficit hydrique (sélection divergente, lignées isogéniques)

Les paramètres morphophysiologiques retenus ne peuvent, en toute rigueur, être utilisés en sélection qu'après que leur rôle effectif dans la tolérance ait été vérifié, et que leur héritabilité soit suffisante pour donner prise à la sélection. La validation du rôle de ces caractères peut être effectuée, soit en créant des lignées isogéniques, soit en appliquant

un schéma de sélection divergente. La création de lignées isogéniques n'est en fait, en l'état actuel des recherches, réalisable que pour des caractères morphologiques simples : des lignées isogéniques pour la glaucescence ont par exemple permis à Nachit *et al.* [41] de démontrer le rôle de ce caractère dans l'utilisation de l'eau par la plante. Dans le cas de caractères physiologiques (à déterminisme génétique plus complexe), il est plus réaliste d'envisager la création de lignées issues de sélections divergentes. Un exemple de schéma de sélection divergente est présenté par Acevedo et Ceccarelli [1] ; un poster présenté au cours de ce colloque (Al Hakimi et Monneveux) donne également un exemple de sélection divergente pour divers caractères morpho-physiologiques, conduite sur des populations issues de croisements interspécifiques.

Étude génétique des caractères morphophysiologiques de tolérance au déficit hydrique

L'étude génétique des caractères de tolérance au déficit hydrique implique d'étudier ces caractères sur des populations ségrégantes F2, F3, et éventuellement BC1. La principale difficulté, sur le plan expérimental, réside alors dans le fait que les mesures physiologiques souvent lourdes et parfois longues doivent être conduites sur un grand nombre d'individus hétérozygotes différents, ce qui interdit par ailleurs toute répétition des mesures. Il n'est dès lors pas étonnant que les études de transmission ou d'héritabilité des caractères physiologiques soient peu nombreuses.

La création d'haploïdes doublés permet de surmonter partiellement cette difficulté (en permettant de travailler sur des groupes d'individus homozygotes), sans résoudre toutefois le problème du nombre d'individus à tester ; cette technique reste par ailleurs mal maîtrisée chez certaines espèces (blé tendre et surtout blé dur).

Le développement des techniques de biologie moléculaire nous fournit en revanche de nouveaux outils pour l'analyse génétique de la tolérance.

Recherche de marqueurs moléculaires des caractères morphophysiologiques d'adaptation

Face aux difficultés d'utilisation de « critères physiologiques de prédiction » en sélection, le développement des outils de marquage moléculaire est susceptible d'apporter d'importants éléments de réponse, l'idée de base étant de rechercher des relations entre la présence de certains marqueurs et certains mécanismes physiologiques liés à la tolérance. La mise en œuvre de cette démarche passe donc par une analyse du polymorphisme, soit au niveau des protéines, soit au niveau de l'ADN.

L'étude du polymorphisme protéique peut concerner soit des protéines de réserve, soit des protéines enzymatiques. L'analyse des protéines de réserve et isoenzymes s'intéresse à un nombre limité de protéines de fonction connues analysables après une séparation selon la charge ou la masse moléculaire (électrophorèse monodimensionnelle). L'électrophorèse bidimensionnelle permet, en rajoutant une dimension de séparation selon le point isoélectrique, l'analyse de l'ensemble des protéines d'un organe donné ; elle est cependant plus lourde à mettre en œuvre. Ces techniques sont intéressantes et sont également relativement peu coûteuses et rapides, mais le nombre de sys-

tèmes utilisables est limité : dans les deux cas, les marqueurs sont dépendants des conditions environnementales qui modifient l'expression du génome.

L'analyse du polymorphisme de l'ADN est menée actuellement sur la base de trois techniques : RFLP (*restriction fragment lenght polymorphism*), RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), ADN satellites [44]. Ces techniques permettent de révéler un polymorphisme de taille entre fragments d'ADN révélés par une sonde homologue ou amplifiés à partir d'amorces données. Les stratégies d'utilisation de marqueurs en vue de l'amélioration génétique de la tolérance à la sécheresse peuvent quant à elles être regroupées autour de trois axes : l'étude des mécanismes moléculaires de réponse au stress, la localisation de marqueurs de tolérance inductibles par le stress hydrique, et la recherche de QTL (*quantitative trait loci*, locus contrôlant des caractères quantitatifs).

Étude des mécanismes moléculaires de réponse au stress

Celle-ci consiste à induire un stress sur une plante entière, puis à suivre les modifications induites par ce stress au niveau des protéines ou des ARN messagers ; on peut ensuite « remonter » aux gènes correspondants en utilisant les protéines ou ARNm spécifiques du stress comme sonde pour cribler des « banques de gènes » constituées par l'ADN d'une plante, fragmenté et isolé par morceaux dans des vecteurs de clonage qui permettent leur amplification par une bactérie. Des résultats intéressants ont été également obtenus par des suivis de l'expression génique au cours du développement, et en particulier, au cours de la phase de déshydratation du grain, qui représente une situation de stress hydrique naturelle. Un ensemble de gènes régulés au cours du stress hydrique ont ainsi pu être mis en évidence [17, 32]. De la séquence des gènes, on a pu déduire la séquence des protéines correspondantes ; la plupart de ces protéines (*déhydrines*, *late embryogenesis abundant proteins*, *responsive to abscisic acid proteins*, *germines*, *prolin rich proteins*, *hydroxyprolin rich proteins*) présentent des similitudes de structure, et d'abondance en certains acides aminés (proline, glycine, sérine). Il est possible d'utiliser les gènes identifiés pour transformer des plantes et étudier ainsi le rôle du gène dans la plante transgénique obtenue ; l'étude des séquences régulatrices présentes en amont de ces gènes et des éléments régulateurs agissant en « trans » (c'est-à-dire codés en un autre endroit du génome) doit par ailleurs permettre d'aborder le problème de la régulation génique [39].

Ce premier axe de travail amène toutefois à se poser une série de questions :

- Les gènes induits par le stress ont-ils un rôle effectif dans l'acquisition de la tolérance, ou bien ne font-ils que marquer un état de stress ?
- Comment relier ces gènes aux mécanismes et critères physiologiques préalablement définis, et comment les utiliser dans un schéma de sélection ?

Notre laboratoire est impliqué dans la recherche et la localisation de marqueurs de tolérance inductibles par le stress hydrique. La démarche consiste à comparer des profils protéiques, des cinétiques d'accumulation d'ARN messagers ou de leurs produits de traduction dans un système acellulaire chez des génotypes à comportement « contrasté ». Ce type d'étude a déjà été réalisé sur la tolérance au froid [28], et sur la résistance aux hautes températures [45]. Nous avons entamé cette étude sur plusieurs génotypes d'orge à comportement contrasté vis-à-vis de la sécheresse, avec l'espoir de trouver des marqueurs protéiques de tolérance.

Étude du polymorphisme RFLP de marqueurs moléculaires et relation avec la tolérance au stress

Un polymorphisme de type RFLP peut être recherché sur un grand nombre de génotypes à comportement contrasté, en vue de repérer des corrélations entre le polymorphisme observé et les différences de comportement vis-à-vis du stress ; si des corrélations statistiques fortes peuvent être notées entre la présence d'allèles donnés au locus de certains marqueurs et un caractère donné de tolérance, ces relations marqueurs/caractères doivent être alors validées par l'étude de populations en ségrégation. On utilisera de préférence comme sondes, des séquences ADNc ou génomiques correspondant à des gènes impliqués dans la réponse au stress hydrique ; un tel travail a été engagé par Weng et Nguyen [45] et Nachit *et al.* [41]. Les allèles statistiquement corrélés à un caractère de tolérance pourraient correspondre à une séquence codant pour un gène plus « efficace » dans la réponse au stress. En utilisant des marqueurs anonymes de type RAPD, il pourrait être possible d'associer un fragment donné à une tolérance et définir ainsi de nouveaux marqueurs « candidats » pour la tolérance au stress hydrique.

Recherche de marqueurs liés à la sécheresse, par l'approche QTL et gènes candidats

Le sens de la démarche est ici de localiser des zones du génome impliquées dans les variations de caractères quantitatifs, donc de type multigénique [33]. Pour ce faire, on mesure les valeurs du caractère sur une « descendance en ségrégation » (BC, F₂, haploïdes doublés) sur laquelle a été préalablement établie une carte génétique sommaire ; on suit alors la coségrégation de marqueurs et de caractères physiologiques ou agronomiques intéressants. S'il existe des QTL intervenant dans la tolérance à la sécheresse, chacun d'eux sera entouré de marqueurs qui n'en sont pas trop distants : on pourra donc exploiter les fréquences de recombinaison entre les QTL et leurs « marqueurs bordants » dans des populations en ségrégation. Parallèlement, le positionnement des gènes candidats sur cette même cartographie à proximité des QTL permettrait une validation concomitante de ces deux types de marqueurs. Ce type de démarche fait actuellement l'objet de recherche sur maïs (GIS Moulon) et sur orge (ENSA-INRA Montpellier). A terme, et ayant défini des marqueurs moléculaires liés aux caractères de tolérance, il devrait être possible de suivre plus facilement leur évolution dans un programme de sélection assistée par marqueurs. Le type le plus simple de sélection assistée par marqueurs pour améliorer la tolérance à la sécheresse est sans doute l'introgession de caractères apportés par des ressources génétiques issues d'espèces voisines, d'où l'intérêt de leur étude.

Problème de l'utilisation de ressources génétiques « à base large »

Dans la plupart des programmes de sélection (et en particulier dans ceux animés par l'espérance d'une rentabilité à court terme), les croisements sont souvent limités à du matériel « amélioré ». En fait, il faut bien reconnaître que l'intérêt du sélectionneur pour les variétés locales (et *a fortiori* pour les espèces sauvages apparentées) a été freiné par plusieurs constatations :

– les variétés connues comme très tolérantes à la sécheresse (Oued Zenati, Haurani chez le blé dur, Tichedrett, Saïda, Albacete chez l'orge, pour n'en citer que quelques-unes) n'expriment cette tolérance que dans des milieux (= combinaisons de stress) très particuliers, très spécifiques ; des études comparatives de variétés « à adaptation locale » et de variétés plus productives et à « adaptation large » ont permis de montrer que le comportement de ces premières s'expliquait surtout par des caractères morphologiques (faible indice de récolte, enracinement profond) ou par des caractères physiologiques très précis conduisant à une adaptation très stricte à un milieu donné [5, 6] ; ces mêmes variétés locales semblent d'ailleurs jouir d'une moindre capacité d'ajustement osmotique que les variétés à large adaptation [6, 34, 37]. Dans le cas d'espèces sauvages voisines apparentées, la variabilité intraspécifique souvent considérable des caractères morphophysiologiques d'adaptation oblige à des opérations de tri et de criblage beaucoup plus lourdes. Enfin, le niveau très faible de productivité de ce type de matériel encourage peu les sélectionneurs à l'utiliser ;

– des résultats encourageants quant à la création de matériel génétique combinant une productivité élevée et un niveau satisfaisant de tolérance à la sécheresse ont, à l'inverse, été obtenus. La variété d'orge Zaïda, obtenue en 1987 par Molina-Cano, et qui présente une bonne adaptation à diverses zones semi-arides de l'Espagne, provient d'un croisement entre les variétés Union et Adora, originaires d'Europe centrale, et très productives ; des variétés de blé dur telles que Cham 1, Om Rabi 5, ou Om Rabi 17, obtenues par l'ICARDA (*International Center for Agricultural Research in Dry Areas*) combinent un niveau élevé de productivité et une bonne adaptation aux conditions méditerranéennes. Ces comportements peuvent s'expliquer en considérant que des « effets résiduels » de productivité ont été conservés (même si la signification physiologique de ces « effets » reste à élucider), et/ou que les caractères de tolérance présents dans ces matériels sont des caractères inductibles, à faible coût énergétique, non antagonistes du rendement.

Le risque apparaît donc très grand, en ayant recours à des ressources génétiques « à base large », d'introduire des caractères de tolérance liés en fait à des caractéristiques d'architecture (forte production de biomasse végétative et faible indice de récolte « tamponnant » les effets du stress sur la production de grain) antagonistes d'une haute productivité (un risque que l'attrait mythique d'un retour aux ressources sauvages ou originelles ne suffit pas à compenser !). Des résultats encourageants ont certes été obtenus dans le cas du blé dur à partir de croisements interspécifiques au sein du groupe tétraploïde [49], mais il s'agissait en fait d'espèces primitives assez proches et parfois domestiquées (*T. dicoccum*, *T. polonicum*, *T. carthlicum*). L'utilisation de ressources génétiques sauvages pour l'amélioration de la tolérance aux stress (espèces du genre *Aegilops* en l'occurrence dans le cas du blé) nous semble requérir deux conditions préalables :

– une meilleure connaissance de la physiologie des ressources sauvages, et en particulier des mécanismes d'adaptation aux stress, afin d'être en mesure d'identifier les caractères dont le transfert chez l'espèce cultivée puisse s'effectuer sans érosion de la potentialité de rendement ;

– la recherche de marqueurs moléculaires permettant d'évaluer la variabilité intra et interspécifique, de suivre les introgressions, et la transmission des caractères physiologiques dans les descendance.

Conclusion

La tolérance à la sécheresse est un phénomène complexe, faisant intervenir, face à la pression erratique des contraintes environnementales, de nombreux mécanismes interactifs, et à déterminisme génétique complexe. Face à cette réalité, l'amélioration génétique de la tolérance à la sécheresse ne peut se contenter ni d'une amélioration empirique (qui a d'ores et déjà montré ses limites), ni d'une introduction « à l'aveugle » de caractères de tolérance chez des génotypes productifs. La stratégie à mettre en œuvre dans une telle situation nous semble devoir prendre en compte plusieurs niveaux d'intégration, en définissant pour chacun d'eux un objectif spécifique ; la description du comportement global dans des milieux donnés, la caractérisation physiologique, l'analyse génétique des caractères, et la recherche de marqueurs pour ces caractères apparaissent ainsi comme autant de maillons dans une chaîne faisant intervenir des connaissances et compétences en matière de physiologie, génétique, et biologie moléculaire. La mise en place de programmes basés sur de telles stratégies (Figure 2) requiert donc la constitution d'équipes pluridisciplinaires et la mise en place de larges collaborations.

Références

1. Acevedo E, Ceccarelli S (1989). Role of physiologist-breeder in a breeding program for drought tolerance conditions. In : FWG Baker, ed. *Drought resistance in cereals*, CAB International : 117-139.
2. Acevedo E (1991). Improvement of winter cereals in Mediterranean environments. Use of yield, morphological and physiological traits. In : *Physiology-Breeding of winter cereals for stressed mediterranean environments*, INRA-ICARDA, Montpellier (France) : 273-306.
3. Acevedo E (1992). Morphological traits of adaptation of cereals to Mediterranean environments. In : *Improvement and management of winter cereals under temperature, drought and salinity stress*, ICARDA-INIA, Cordoba (Spain) : 85-96.
4. Ali Dib T (1992). Contribution à l'étude de la tolérance à la sécheresse chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). Étude de la diversité des caractères phénologiques et morphophysiologiques d'adaptation. Thèse ENSA-Montpellier Sciences Agronomiques, 186p.
5. Ali Dib T, Monneveux P (1992). Adaptation à la sécheresse et notion d'idéotype chez le blé dur. I. Caractères morphologiques d'enracinement. *Agronomie* 12 : 371-379.
6. Ali Dib T, Monneveux P, Araus JL (1992). Adaptation à la sécheresse et notion d'idéotype chez le blé dur. II. Caractères physiologiques d'adaptation. *Agronomie* 12 : 381-393.
7. Amri A, Mekni MS (1991). Barley breeding strategies under rainfed conditions of Morocco. In : *Physiology-Breeding of winter cereals for stressed mediterranean environments*, INRA-ICARDA, Montpellier (France) : 161-178.
8. Bidinger FR, Mahalakshmi V, Talukdar BS, Alagarswamy G (1987). Improvement of drought resistance in millet. In : *Drought resistance in crop plants with emphasis on rice*. International Rice Research Institute, Los Banos (Philippines) : 357-365.
9. Biscoe PV, Gallagher J, Littleton EJ, Monteith JL, Scott RK (1975). Barley and its environment. Sources of assimilates. *J Appl Ecol* 12 : 295-302.
10. Blum A, Mayer J, Gozlan G (1983). Associations between plant production and some physiological components of drought resistance in wheat. *Plant, Cell and Environment* 6 : 219-225.
11. Blum A (1989). Osmotic adjustment and growth of barley genotypes under drought stress. *Crop Sci* 29 : 230-233.
12. Bogyo TP, Russell TS, Konzak CF (1973). The analysis of genotype-environment interac-

- tion on durum wheat. In : Scarascia-Mugnosa GI, ed. *Genetics and Breeding of durum wheat*, Bari (Italy) : 413-435.
13. Boyer JS (1985). Water transport. *Ann Rev Plant Physiol* 36 : 473-516.
 14. Brennan PS, Byth DE (1979). Genotype x environmental interactions for wheat yields and selection for widely adapted wheat genotypes. *Aust J Agric Res* 30 : 221-227.
 15. Ceccarelli S (1989). Wide adaptation : how wide ? *Euophytica* 40 : 197-205.
 16. Daday HF, Biner E, Grassia A, Peak JW (1973). The effect of environment on heritability and predicted selection response in *Medicago sativa*. *Heredity* 31 : 293.
 17. Delseny M, Gaubier P, Hull G, Saez-Vasquez J, Gallois P, Raynal M, Cooke R, Grellet F (1993). Nuclear genes expressed during seed desiccation : relationship with response to stress. In : *Stress induced gene expression*, Harwood Academic Reading (UK).
 18. Finlay KW, Wilkinson GN (1963). The analysis of adaptation in a plant breeding program. *Aust J Agric Res* 14 : 742.
 19. Fischer RA, Maurer R (1978). Drought resistance in spring wheat cultivars. Grain yield responses. *Aust J Agric Res* 29 : 897.
 20. Fox PN, Rosielle AA (1982). Reference sets of genotypes and selection for yield in unpredictable environments. *Crop Sci* 22 : 1171-1176.
 21. Freeman GH (1973). Statistical methods for the analysis of genotype x environment interactions. *Heredity* 31 : 339-345.
 22. Frey KJ (1964). Adaptation reaction of oat strains selected under stress and non-stress environmental conditions. *Crop Sci* 4 : 55-61.
 23. Garcia del Moral LF, Ramos JM (1992). Identification des paramètres morphophysiologiques d'adaptation aux contraintes environnementales. Adaptation de l'orge dans le sud de l'Espagne. In : *Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale*. Colloque INRA-ENSA-AGROPOLIS, Montpellier (France), à paraître (Colloque INRA n° 64).
 24. Gate P, Bouthier A, Casabianca H, Deleens E (1993). Caractères physiologiques décrivant la tolérance à la sécheresse des blés cultivés en France : interprétation des corrélations entre le rendement et la composition isotopique des grains. In : *Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale*. Colloque INRA-ENSA-AGROPOLIS, Montpellier (France), à paraître (Colloque INRA n°64).
 25. Gauch HG (1988). Model selection and validation for yield trials with interaction. *Biometrics* 40 : 705-715.
 26. Hardwick RC, Wood JT (1972). Regression methods for studying genotype-environment interactions. *Heredity* 28 : 209-222.
 27. Hewstone C (1979). El analisis de grupos de experimentos y de las relaciones del genotipo y el medio ambiente sobre el rendimiento de variedades comerciales de trigo. In : *Analisis del rendimiento de variedades comerciales de trigo y de algunos factores del medio ambiente que lo afectan en el sur de Chile*, Publication INIA n°11, Temuco (Chile), 3-19.
 28. Houde M, Dhindsa RS, Sarhan F (1992). A molecular marker to select for freezing tolerance in *gramineae*. *Mol Gen Genet* 234 : 43-48.
 29. Hsiao TC, Oliveira EC, Hall WM (1978). Adaptation of cotton leaves to water stress. *Plant Physiol* 61 : 80-86.
 30. Johnson RR, Moss DN (1976). Effect of water stress on 14CO_2 fixation and translocation in wheat during grain filling. *Crop Sci* 14 : 728-731.
 31. Kempton RA (1984). The use of the biplots in interpreting variety by environment interactions. *Biometrics* 88 : 705-715.
 32. Ledoigt G, Coudret A (1992). Stress hydrique : étude des mécanismes moléculaires et des modifications de l'expression du génome. *Bull Soc Bot Fr* 139 : 175-190.
 33. Lefort-Buson M, Rodolphe F, Charcosset A (1990). De nouvelles perspectives pour l'analyse génétique des caractères quantitatifs. A la recherche des locus importants. *Biofutur* : 30-37.
 34. Lewicki S (1993). Évaluation de paramètres liés à l'état hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) et l'orge (*Hordeum vulgare* L.), soumis à un déficit hydrique modéré, en vue d'une application à la sélection de génotypes tolérants. Thèse ENSA-Montpellier : 87 p.

35. Ludlow MM, Fischer MJ, Wilson JR (1985). Stomatal adjustment to water deficits in three tropical grasses and tropical legumes grown in controlled conditions and in the field. *Aust J Plant Physiol* 12 : 131-139.
36. Monneveux P (1991). Quelles stratégies pour l'amélioration génétique de la tolérance au déficit hydrique des céréales ? In : *L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides*, AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext : 165-186.
37. Monneveux P, Chaballier C, Lewicki S, Lafarga A, Sombrero R, Romagosa I (1992). Étude du comportement de lignées d'orge dans différentes conditions de sécheresse en Espagne. Estimation du rôle de la capacité d'ajustement osmotique dans l'adaptation à la variabilité environnementale. In : *Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale*. Colloque INRA-ENSA-AGROPOLIS, Montpellier (France) : 64 : 217-237.
38. Morgan JM, Hare RA, Fletcher RJ (1986). Genetic variation in osmoregulation in bread and durum wheats and its relationship to grain yields in a range of field environments. *Aust J Agric Res* 37 : 449-457.
39. Mundy J, Shinozaki K, Chua N (1990). Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid responsive promoter of rice rab gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 1406-1410.
40. Nachit M, Ketata H (1991). Selection of morphophysiological traits for multiple abiotic stresses resistance in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). In : *Physiology-Breeding of winter cereals for stressed mediterranean environments*, INRA-ICARDA, Montpellier (France) : 273-306.
41. Nachit M, Nachit G, Ketata H, Gauch HG, Zobel RW (1992). Use of AMMI and linear regression models to analyze genotype-environment interaction in durum wheat. *Theor Appl Genet* 83 : 597-601.
42. Pedersen AR, Everson EH, Grafius JE (1978) The gene pool concept as a basis for cultivar selection and recommendation. *Crop Sci* 18 : 883-886.
43. Reitz LP (1974). Breeding for more efficient water-use – is it real or a mirage ? *Agric Meteorol* : 14 : 3-7.
44. This D, This P (1993). Les principaux types de marqueurs moléculaires applicables à la sélection pour la tolérance à la sécheresse. Avantages et limites. In : *Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale*. Colloque INRA-ENSA-AGROPOLIS, Montpellier (France), à paraître (Colloque INRA n° 64).
45. Weng J, Nguyen HT (1992). Differences in the heat-shock response between thermotolerant and thermosusceptible cultivars of hexaploid wheat. *Theor Appl Genet* : 84 : 941-946.
46. Wright AJ (1971). The analysis and prediction of some two factor interactions in grass breeding. *J Agric Sci* 76 : 301-306.
47. Zobel RW, Wright MJ, Gauch HG (1988). Statistical analysis of a yield trial. *Agron J* 80 : 388-393.

17

Cancer végétal *in vitro* : aspects morphogénétiques et biochimiques

T. GASPAR¹, C. KEVERS¹, B. BISBIS¹, M. CRÈVECŒUR², C. PENEL²,
H. GREPPIN², F. LE DILY³, J.-P. BILLARD³, C. HUAULT³, J.-M. FOIDART⁴

1. Université de Liège, Institut de Botanique B22, Sart Tilman, B-4000 Liège, Belgique.

2. Université de Genève, Physiologie végétale, 3, place de l'Université, CH-1211 Genève, Suisse.

3. Université de Caen, Physiologie végétale, F-14032 Caen, France.

4. Université de Liège, Biologie générale, CHU, B 23, B-4000 Liège, Belgique.

Les notions de cancer végétal et de cellules cancéreuses sont restées très vagues en biologie végétale et le plus souvent associées aux tumeurs induites par des bactéries ou des virus [4, 7, 16]. Le cancer végétal induit en l'absence de pathogènes est rarement décrit même si les termes de néoplasmes végétaux et de progression néoplasique sont cités [38]. Les cals dits habitués (anergisés ou accoutumés aux hormones), c'est-à-dire ne nécessitant pas d'auxine ou pas de cytokinine, ou les 2, pour leur croissance, sont généralement classés comme tumeurs en parallèle aux tumeurs « génétiques » résultant d'hybrides interspécifiques [3, 40]. Nous avons eu la chance d'étudier une lignée de cellules habituées, totalement indépendantes d'auxines et de cytokinines exogènes. Leur caractérisation morphologique et biochimique [5, 9, 10, 14, 15, 20, 23, 25, 33, 35] nous a amenés à les considérer comme des cellules vitrifiées (hyperhydriques) d'abord [10, 14], puis comme de véritables cellules cancéreuses, comparables à des cellules cancéreuses animales [15, 17, 23]. Cela nous conduit à préciser ci-dessous la notion de cancer végétal à l'état cellulaire. Étudiant par ailleurs le processus de vitrification (malformations hyperhydriques) de pousses feuillées en cours de micropropagation [13, 15, 17], nous avons rencontré des situations où la subculture de pousses vitrifiées en conditions vitrifiantes conduisait à leur habitude, avec acquisition de caractères morphologiques et biochimiques comparables à ceux de cals habitués. Les

nécroses d'apex et la perte progressive de totipotence qui en résultent accompagnent une progression néoplasique et une cancérisation générale, en l'absence de pathogènes, que nous pouvons maintenant mieux préciser à l'état organismique. Habituation et vitrification peuvent donc être considérés comme des processus faisant partie de ces progressions néoplasiques chez les végétaux.

Cal habitué = cal vitrifié ?

L'habituation est généralement considérée comme un processus réversible (le processus serait donc de nature épigénétique), et la plupart des cellules habituées décrites dans la littérature, d'apparence normale, gardent en principe toute ou une partie de leur totipotence, c'est-à-dire la capacité de régénérer des bourgeons, des racines, ou des embryons somatiques [31, 37]. Ainsi en va-t-il d'une lignée cellulaire chlorophyllienne de betterave, habituée aux auxines et aux cytokinines, et régénérant automatiquement, sans traitement particulier, des pousses feuillées [28]. Mais cette lignée, ne répondant plus à l'apport exogène d'auxine, s'avère incapable de régénérer des racines, et peut être considérée comme ayant perdu une partie de sa totipotence organogène. Des cellules blanches, peu ou pas chlorophylliennes, apparaissant sporadiquement sous forme de petits clones (d'origine monoclonale ?) à la surface de cals habitués verts organogènes ont été isolées et ont fourni la lignée cellulaire habituée non organogène [27] que nous décrivons ici. Ces cellules peuvent être considérées comme vitreuses [9, 14].

Comme les cellules de pousses vitrifiées, en effet :

- elles sont peu chlorophylliennes [9, 14, 25, 34] et apparaissent glauques, translucides ;
- elles sont hyperhydriques [9, 14], en faisant remarquer que le surplus d'eau se trouve surtout dans les espaces intercellulaires et dans des parois jouant le rôle d'éponges [30] ;
- les parois sont déficientes en cellulose et en lignine [9, 14, 20, 21], ce qui permet la formation de hernies cytoplasmiques apparemment nues au travers de leurs mailles [23] ;
- l'hyperlignification se traduit par l'absence de différenciation de cellules ligneuses, en particulier d'éléments xylémiques [9, 14] ;
- elles sont friables ; cette dissociation aisée étant à rapprocher de la fragilité des pousses vitrifiées qui sont cassantes ;
- elles se nécrosent rapidement lorsqu'elles ne sont pas subcultivées sur milieux frais régulièrement, ce qui est à rapprocher des nécroses de bordure de feuilles jeunes et des apex chez les pousses vitrifiées ;
- biochimiquement, elles manifestent une forte activité glutamate déshydrogénase, accumulent du glutamate [32, 34] et produisent peu d'éthylène [22].

Cellules habituées = cellules cancéreuses ?

Il existe différents degrés d'habituation aux hormones et sans doute tous les types de cellules habituées n'ont-elles pas toutes les mêmes caractéristiques. Celles qui appartiennent au cal habitué non-organogène de betterave décrit ci-dessus présentent cepen-

dant toute une série de caractéristiques [1] qui les ont fait reconnaître comme de véritables cellules cancéreuses :

- leur origine monoclonale [27],
- leur degré de juvénilité (rapport nucléo-cytoplasmique élevé ; paroi peu ou pas différenciée) et leur taux élevé de réplication [20, 23],
- leur indépendance hormonale,
- leur degré de polyploidie et d'aneuploïdie, associé aux noyaux volumineux, poly-invaginsés, avec plusieurs nucléoles et peut-être fragmentés en micronoyaux [20],
- leur friabilité correspondant à une perte de mécanismes spécifiques d'adhésion cellulaire [36] comparable à celle qui caractérise des métastases animales,
- des caractéristiques biochimiques comme l'accumulation de malonyldialdéhyde [19], une teneur élevée en diacylglycérol et un turnover accéléré des inositol-phosphates [12], une déviation des sucres dans la voie des pentose-phosphates [5].

Cette cancérisation cellulaire végétale, à son état terminal, pourrait être caractérisée non seulement par l'absence de différenciation cellulaire, mais surtout par l'incapacité de telles cellules à se réorganiser en méristèmes primaires (les cals normaux croissent autour de points méristématiques ; dans le cal habitué non-organogène, chaque cellule se multiplie indépendamment des autres, sans méristèmes). La perte irréversible de totipotence organogène en résulterait, comme aboutissement d'une progression néoplasique, telle qu'esquissée au Tableau I.

Tableau I. Quelques étapes d'une progression néoplasique *in vitro* aboutissant à des cellules totalement habituées et non-organogènes.

Matériel	Autonomie hormonale (auxines et cytokinines <i>in vitro</i>)	Méristèmes ou points méristématiques	Totipotence
Organes et tissus d'une plante-mère	–	+	+
Cal normal	–	+	+
Cal habitué organogène	+	+	partielle
Cal habitué non-organogène	+	–	– (irréversible)

Vitrification, habitude et cancérisation à l'état organismique

Les malformations hyperhydriques accompagnant la vitrification des pousses feuillées ont été bien décrites [13, 17, 41]. Si elles ne résultent pas directement d'un dysfonctionnement des méristèmes primaires apicaux ou axillaires, elles doivent bien traduire, à côté d'une différenciation cellulaire déficiente des parois, une perturbation des facteurs

d'organisation tissulaire. La vitrification est d'ailleurs considérée généralement comme un processus réversible, entendant par là que placés en conditions non-vitrifiantes, des méristèmes de pousses vitrifiées peuvent générer des pousses feuillées normales.

Ce qu'on sait moins, et qui est peut-être moins courant, c'est que la subculture répétée de pousses vitrifiées en conditions vitrifiantes conduit à leur habitude : à partir d'un certain stade, de telles pousses continuent de proliférer en l'absence d'apport de régulateurs exogènes mais les organes formés sont de plus en plus anormaux. Des signes de disfonctionnement des méristèmes primaires se manifestent avec l'apparition de tiges fasciées. De telles pousses habituées ont perdu la faculté de s'enraciner, et ne répondent pas à l'apport d'auxine exogène. Il y a donc perte partielle de totipotence. Des nécroses d'apex se font de plus en plus fréquentes, et il arrive un moment où elles sont généralisées : cette mort subite des pousses feuillées par lâchage des méristèmes n'est-elle pas l'équivalent de l'arrêt de fonctionnement du cœur ? Et, dans les présentes circonstances, à la suite d'un cancer généralisé où les cellules du méristème, entre autres mécanismes, avaient perdu le contact par adhésion cellulaire, avec le reste de l'organisme ? Toutes les cellules de pousses feuillées où les apex se nécrosent ne sont cependant pas mortes. En culture *in vitro*, la base de telles pousses génère un cal (blanc) habitué non organogène [17]. C'est la perte totale et irréversible de la totipotence organogène caractérisant le cancer à l'état organismique à sa phase terminale : perte des méristèmes existants et incapacité des cellules restées vivantes et proliférant de se réorganiser en méristèmes primaires organogènes. Cette perte totale de totipotence est l'aboutissement d'une progression néoplasique à l'état organismique telle qu'on peut l'esquisser au Tableau II.

Tableau II. Quelques étapes d'une progression néoplasique *in vitro* aboutissant à des pousses feuilles habituées générant un cal habitué non-organogène

Matériel	Autonomie hormonale	Méristèmes	Organes formés	Situation des méristèmes
Organes d'une plante mère, souche en prolifération axillaire <i>in vitro</i>	–	Fonctionnent bien	Tiges et feuilles normales	Normale
Souche vitrifiée	–	Fonctionnent bien	Tiges et feuilles anormales	Réversible (pour tous les méristèmes)
Souche vitrifiée multipliée en conditions vitrifiantes	+	Fonctionnent mal	Tiges fasciées Feuilles très anormales	Réversible (pour certains méristèmes)
Souche précédente subcultivée en conditions vitrifiantes	+	Fonctionnent anormalement	Organes aberrants	Irréversible (nécrose)
Cal formé à la base	+	Absents	Aucun	–

Cancérisation en l'absence de pathogènes

Des tumeurs et des cancers animaux peuvent être provoqués par des radiations, des composés chimiques et des stress divers [1, 16]. La vitrification (et l'habituation qui peut suivre) est généralement considérée comme une réponse adaptative à plusieurs stress simultanés :

- les blessures inhérentes à la découpe des explants et au repiquage ;
- la quantité et/ou la qualité des cytokinines, ou le thidiazuron (celui-ci est considéré comme cancérigène en biologie animale [4]) utilisés ;
- la quantité d'ions ammonium dans les milieux de culture ;
- l'infiltration des espaces intercellulaires par les éléments des milieux de culture (facilitée dans les milieux mous [6]) et l'anoxie et/ou le choc osmotique qui peuvent en résulter [30] ;
- l'humidité atmosphérique à l'intérieur des flacons de culture ;
- le confinement gazeux (éthylène et autres gaz) ;
- etc.

Une étude récente sur des pousses en voie de vitrification contrôlée nous a indiqué (résultats non publiés) que leurs tissus, s'ils avaient vu leur activité superoxyde dismutase augmenter, avaient au contraire une activité diminuée de leurs autres enzymes de défense (ascorbate peroxydase et glutathion réductase, notamment) contre les formes actives de l'oxygène générées à la suite de stress. L'accumulation de telles formes actives de l'oxygène initie-t-elle un stress oxydatif [16, 33] ou est-ce l'aboutissement de dérégulations métaboliques, en relation avec les nécroses constatées ? Dans des extraits du cal habitué non-organogène (cancéreux) de betterave, les enzymes de protection contre les formes actives de l'oxygène ont une activité plus élevée que dans des extraits de cellules normales [24], mais on ne peut affirmer que ces enzymes fonctionnent bien *in situ* parce qu'on ne mesure pas d'acide ascorbique notamment. Des extraits de ces cellules habituées [26] et des cellules entières [8] manifestent un important pouvoir réducteur. L'interprétation de déviations métaboliques spécifiques à ces cellules cancéreuses, entre autres une déficience en composés tétrapyrroliques [14, 21, 27, 28, 29, 35], une accumulation de produits azotés tels le glutamate, la proline, les polyamines [18, 32, 34], une orientation des sucres dans la voie des pentose-phosphates [5], l'accumulation de dérivés de l'acide benzoïque [11], conclut cependant à une accumulation de formes toxiques de l'oxygène [34] et à considérer les cellules du cal habitué non-organogène sous stress permanent [35]. L'accumulation de malonyldialdéhyde [2, 19], une composition membranaire modifiée [2, 22] et les nécroses pourraient traduire cette situation.

On se trouve donc confronté à des résultats et conclusions actuellement contradictoires. Les signes de stress sont cependant évidents. Une étude plus approfondie de la réaction des végétaux à chacun des stress supposés dans les conditions particulières des cultures *in vitro* s'avère indispensable.

Références

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Rass M, Roberts K, Watson J (1989). Cancer. In : Alberts B, Bray D, Lewis J, Rass M, Roberts K, Watson J, eds. *Molecular Biology of the Cell*, 2nd Ed., Garland, NY : 1187-1216.

2. Arbillot J, Le Saos J, Billard JP, Boucaud J, Gaspar Th (1991). Changes in fatty acid and lipid composition in normal and habituated sugar beet calli. *Phytochem* 30 : 491-494.
3. Bayer MH (1982). Genetic tumors : physiological aspects of tumor formation in interspecies hybrids. In : Kahl G, Schell JS, eds. *Molecular Biology of Plant Tumors*. Acad Press, NY, 33-67.
4. Bednar TW, Linsmaiser-Bednar EM (1989). Chemical carcinogenesis in plants and interaction with viruses and cancer causation. In : Kaiser HE, ed. *Comparative Aspects of Tumor Development*. Kluwer Acad Publ, Dordrecht : 240-248.
5. Bisbis B, Le Dily F, Kevers C, Billard JP, Huault C, Gaspar Th (1993). Disturbed sugar metabolism in a fully habituated nonorganogenic callus of *Beta vulgaris* (L.). *Plant Growth Regulation* 13 : 257-261.
6. Böttcher I, Göring H (1987). Die Vittrifikation der Pflanzen bei der *in vitro*-Kultur als Infiltration Problem. *Biol Rundsch* 25 : 191-193.
7. Braun AC (1978). Plant tumors. *Biochem Biophys Acta* 516 : 167-191.
8. Carrie B, Gaspar Th, Greppin H, Penel C (1994). Redox characteristics of normal and habituated cell lines of sugarbeet. *Plant Cell Environment* 17 : 457-461.
9. Crèveœur M, Kevers C, Greppin H, Gaspar Th (1987). A comparative biochemical and cytological characterization of normal and habituated sugarbeet calli. *Biol Plant* 29 : 1-6.
10. Crèveœur M, Hagege D, Catesson AM, Greppin H, Gaspar Th (1992). Ultrastructural characteristics of cells from normal and habituated sugar beet calli. *Plant Physiol Biochem* 30 : 87-95.
11. Engelmann I, Macheix JJ, Gaspar Th (1993). Phenolic compounds in hormone-dependent and independent sugarbeet callus lines compared to donor-plants. *Saussurea* 24 : 15-21.
12. Feutry S, Poder D, Hagege D (1995). Embancement of diacylglycerol level and inositol phosphates turnover in fully habituated sugar beet cell line. *Plant Physiol Biochem* 33. In press..
13. Gaspar Th (1991). Vittrification in micropropagation. In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 17. High-Tech and Micropropagation. Springer, Berlin : 116-126.
14. Gaspar Th, Kevers C, Penel C, Crèveœur M, Greppin H (1988). Biochemical characterization of normal and habituated sugarbeet calli. Relationship with anatomy, habituation and organogenesis. *Potsdamer Forschungen B* 57 : 20-30.
15. Gaspar Th, Hagege D, Kevers C, Penel C, Crèveœur M, Engelmann I, Greppin H, Foidart JM (1991). When plant teratomas turn into cancer in the absence of pathogens. *Physiol Plant* 83 : 691-701.
16. Gaspar Th, Hagege D, Penel C, Foidart JM, Greppin H (1992). *Peroxidases and plant cancer in the absence of pathogens*. In : Penel C, Gaspar Th, Greppin H, eds. *Plant Peroxidases. 1980-1990. Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects*. Univ. of Genève, Switzerland : 125-137.
17. Gaspar Th, Kevers C, Crèveœur M, Penel C, Foidart JM, Greppin H (1992). Habituation and vittrification of plants cultured *in vitro* : a reciprocal relationship. *Wiss. Zeitschr. Humboldt-Univ. Berlin, Mathem./Naturwiss.* 41 : 35-40.
18. Hagege D, Kevers C, Boucaud J, Duyme M, Gaspar Th (1990). Polyamines, phospholipids, and peroxides in normal and habituated sugar beet calli. *J Plant Physiol* 136 : 641-645.
19. Hagege D, Nouvelot A, Boucaud J, Gaspar Th (1990). Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts : avoidance of pigment interference. *Phytochemical Analysis* 1 : 86-89.
20. Hagege D, Kevers C, Gaspar Th, Thorpe TA (1991). Abnormal growth of habituated sugarbeet calli and cell suspensions. *In Vitro Cell Dev Biol* 27 : 112-116.
21. Hagege D, Kevers C, Crèveœur M, Tollier MTh, Monties B, Gaspar Th (1991). Peroxidases, growth and differentiation of habituated sugarbeet cells. In : J. Lobarszewski *et al.* eds., *Molecular and Physiological Aspects of Plants Peroxidases*. Univ. de Genève 281-290.
22. Hagege D, Kevers C, Gaspar Th (1991). A comparison between ethylene production, ACC and mACC contents, and hydroperoxide level in normal and habituated sugarbeet calli. *Physiol Plant* 82 : 397-400.

23. Hagege D, Catania R, Micalef H, Gaspar Th (1992). Nuclear shape and DNA content of fully habituated nonorganogenic sugarbeet cells. *Protoplasma* 166 : 49-54.
24. Hagege D, Kevers C, Salabert Ph, Gaspar Th (1992). Protective systems against activated oxygen species compared in normal and fully habituated nonorganogenic sugarbeet calluses. *In Vitro Cell Dev Biol* 28P : 143-147.
25. Hagege D, Werck-Reichart D, Schmitt P, Gaspar Th (1992). Deficiency in tetrapyrrole-containing compounds in a non-organogenic habituated sugarbeet cell line. *Plant Physiol Biochem* 30 : 649-654.
26. Hagege D, Deby C, Kevers C, Foidart JM, Gaspar Th (1993). Anti-lipoperoxidant potential of the fully habituated nonorganogenic sugarbeet callus. *Arch Intern Physiol Biochim Biophys* 101 : 9.
27. Kevers C, Coumans M, De Greef W, Hofinger M, Gaspar Th (1981). Habituation in sugarbeet callus : auxin content, auxin protectors, peroxidase pattern and inhibitors. *Physiol Plant* 51 : 281-286.
28. Kevers C, Coumans M, De Greef W, Jacobs M, Gaspar Th (1981). Organogenesis in habituated sugarbeet callus : auxin content and protectors, peroxidase pattern and inhibitors. *Zeitschr Pflanzenphysiol* 101 : 79-87.
29. Kevers C, Sticher L, Penel C, Greppin H, Gaspar Th (1982). Calcium-controlled peroxidase secretion by sugarbeet cell suspensions in relation to habituation. *Plant Growth Regul* 1 : 61-66.
30. Kevers C, Gaspar Th (1986). Vitrification of carnation *in vitro* : changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels. *Physiol Veg* 24 : 647-653.
31. Krsnik-Rasol M (1991). Peroxidase as a developmental marker in plant tissue culture. *Int J Dev Biol* 35 : 259-263.
32. Le Dily F, Billard JP, Gaspar Th, Huault C (1993). Disturbed nitrogen metabolism associated with the hyperhydric status of fully habituated callus of sugarbeet. *Physiol Plant* 88 : 129-134.
33. Le Dily F, Billard JP, Huault C, Kevers C, Gaspar Th. Fully habituated sugarbeet callus : under permanent stress ? *In Vitro Cell Dev Biol*. 29P : 149-154.
34. Le Dily F, Huault C, Gaspar Th, Billard JP (1993). Does altered nitrogen metabolism and H₂O₂ accumulation explain the vitrified status of the fully habituated callus of *Beta vulgaris* (L.) ? *Plant Cell Tissue Organ Culture* 35 : 69-74.
35. Le Dily F, Kevers C, Huault C, Billard JP, Gaspar Th (1993). Peroxidase deficiency in plant cancer cells as resulting from deviated nitrogen and sugar metabolisms ? In : Welinder KG, Rasmussen SK, Penel C, Greppin H, eds. Proceedings IIIrd Intl Symposium : *Plant Peroxidases : Biochemistry and Physiology*. Univ. de Genève, Switzerland, 345-348.
36. Liners F, Gaspar Th, Van Cutsem P (1994). Acetyl- and methylesterification of pectins of friable and compact sugarbeet calli : consequences for intercellular adhesion. *Planta* 192 : 545-556.
37. Meins F Jr (1982). Habituation of cultured plant cells. In : Kahl G, Schell JS, eds. *Molecular Biology of Plant Tumors*. Acad. Press, NY : 3-31.
38. Pengelly WL (1989). Neoplastic progression in plants. In : Kaiser HE, ed. *Comparative Aspects of Tumor Development*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht : 15-23.
39. Schmitt P, Gaspar Th, Hagege D (1994). Sterol composition of normal and habituated sugarbeet calli (*Beta vulgaris* L. *altissima*). *In vitro Cell Dev Biol*. 30P : 1-3.
40. Serafini Fracassini D, Bagni N, Torrigiani P (1980). *Nicotiana glauca* x *Nicotiana langsdorffii* tumor hybrid : growth, morphology, polyamines, and nucleic acids *in vitro*. *Can J Bot* 58 : 2285-2293.
41. Ziv M (1991). Vitrification : morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In : Debergh PC, Zimmerman RH, eds. *Micropropagation. Technology and Application*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht : 45-69.

18

Les biopesticides

V. HEUZÉ, J. DESTAIN, PH. THONART

Centre Wallon de Biologie Industrielle, Belgique.

L'emploi des micro-organismes pour lutter contre les ennemis des cultures (biopesticides) est un moyen de protection phytosanitaire respectant l'environnement. En effet, la plupart des parasites (champignons, insectes, mauvaises herbes) des plantes ont un ou plusieurs ennemis microbiologiques naturels (bactéries, champignons, etc.). Mais pour garantir l'efficacité d'un biopesticide, il faut bien connaître le cycle de développement du parasite et les conditions d'activité de l'antagoniste. Le présent travail décrira la démarche conduisant à la mise au point d'une biopréparation.

La première étape consiste à sélectionner des antagonistes potentiels, généralement à partir du milieu naturel. La force de l'antagonisme *in vitro* constitue le premier critère de sélection, mais d'autres paramètres, tels que l'aptitude à adhérer aux surfaces biologiques, peuvent également intervenir dans ce processus.

Une fois le micro-organisme sélectionné, celui-ci doit être produit en grandes quantités. Cette production industrielle nécessite une infrastructure de base : le bioréacteur, et un savoir-faire détenu par les biotechnologues.

L'étape suivante doit permettre le conditionnement, la formulation des micro-organismes. C'est sans doute l'une des étapes les plus délicates puisqu'il faut :

- préserver l'intégrité de l'agent biologique,
- préserver son activité spécifique vis-à-vis du parasite,
- favoriser son installation et son développement sur le matériel traité.

La maîtrise technique de ces étapes est chaque jour améliorée. Néanmoins, les coûts de production pour de tels produits restent élevés et cela constitue un handicap des biopesticides vis-à-vis des produits chimiques classiques. C'est pourquoi, on préconise, pour l'heure, leur utilisation dans des exploitations horticoles ou arboricoles où les productions présentent de hautes valeurs ajoutées.

