

A C A D E M I E   D E   M O N T P E L L I E R  
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc  
pour obtenir le grade de :  
Docteur Ingénieur en Agronomie option Phytotechnie

ESSAI D'ISOLEMENT  
A PARTIR DE PROTOPLASTES DE CLONES DE MANIOC  
( MANIHOT ESCULENTA GRANTZ )  
EN VUE D'INDUIRE UNE RESISTANCE A LA BACTERIOSE

par

Joseph MABANZA  
*Ingénieur Agronome*

soutenue le 21 décembre 1982 devant la Commission d'Examen

JURY : M. R. JONARD                      Président  
         M. Y. DEMARLY  
         M. P. GRIGNAC  
         M. Y. MEYER  
         M. P. BAUDIN  
         M. F. HALLE

A Mes Parents

A mon Epouse et Fils

## R E M E R C I E M E N T S

---

Ce travail de recherche a été réalisé au Laboratoire d'Histophysiologie et de Radiobiologie végétale de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc (USTL) sous la direction du Professeur JONARD.

Qu'il me soit permis de lui exprimer toute ma gratitude pour avoir accepté de me recevoir dans son laboratoire, pour les facilités mises à ma disposition tout au long de mon séjour en France, ainsi que les conseils qu'il m'a prodigués.

Je tiens à remercier Monsieur BAUDIN, chef de service de Phytopathologie du GERDAT qui a permis de conserver les plantes de manioc dans ses serres pendant toute la durée de mon stage.

J'apprécie très vivement l'honneur que m'ont fait Monsieur DEMARLY, Professeur à l'Université de Paris-Sud (ORSAY) et Monsieur HALLE Professeur à l'Institut de Botanique de Montpellier, de faire partie de mon jury. Je leur prie d'agréer mes très respectueux remerciements.

Que Monsieur MEYER, chargé de Recherches CNRS au laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Perpignan, trouve ici ma profonde gratitude. Il a constamment soutenu mes efforts en me faisant bénéficier de ses conseils dans le domaine de la culture des protoplastes.

Je remercie très sincèrement Monsieur TARDIEU, Responsable du Service d'Amélioration des plantes au GERDAT pour l'attention particulière qu'il a accordé à mon travail. Grâce à son

obligeance, une partie de matériel végétal utilisé dans ces travaux a été mise à ma disposition.

Mes remerciements s'adressent également à Madame BAYONOVE  
Son aide matérielle et ses conseils ont fourni une contribution précieuse à l'élaboration de ce travail.

Je ne saurais terminer sans remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué efficacement à la réalisation de ce travail. Je pense ici à Madame LOPEZ, Monsieur DUBOIS et à mes amis des différents laboratoires où j'ai travaillé pendant mon séjour en France.

# P L A N

---

	Page
I - INTRODUCTION.....	1
II - HISTORIQUE.....	5
<u>2.1. LA PLANTE ET SA LOCALISATION.....</u>	5
<u>2.2. LE MANIOC EN AGRONOMIE.....</u>	
<u>2.3. L'IMPORTANCE DU MANIOC DANS LE MONDE.....</u>	8
2.3.1. Les caractéristiques les plus impor- tantes du manioc.....	8
2.3.2. Les utilisations du manioc et produits à base de manioc.....	10
2.3.2.1. L'alimentation humaine.....	10
2.3.2.2. L'aliment de bétail.....	13
2.3.2.3. Les sous produits industriels.....	13
<u>2.4. LA BACTERIOSE DU MANIOC.....</u>	15
2.4.1. Historique et description.....	15
2.4.2. Le Xanthomonas manihotis.....	18
<u>2.5. LE MANIOC ET LA CULTURE IN VITRO.....</u>	19
<u>2.6. LES SYSTEMES D'ETUDE ET D'OBTENTION DE LA         VARIABILITE GENETIQUE.....</u>	21
2.6.1. Le système "Population - Environnement"	21
2.6.2. Les systèmes "Hôte - parasites" et "Hôte - milieu sélectif".....	22
2.6.3. L'hybridation somatique et la Manipu- lation génétique.....	22
<u>2.7. LA TOXINE BACTERIENNE ET LE FLETRISSEMENT.</u>	23
2.7.1. La toxine bactérienne.....	23
2.7.1.1. Sa définition, son isolement.....	23
2.7.1.2. La toxine, outil de recherches....	26
2.7.2. Le flétrissement bactérien.....	27
<u>2.8. LES HYBRIDATIONS SOMATIQUES.....</u>	27
<u>2.9. LA DIGESTION ENZYMATIQUE DE LA PAROI CELLU-         LAIRE.....</u>	28

	page
2.10. LE PROTOPLASTE MESOPHYLIEN.....	30
III - MATERIELS ET METHODES.....	32
<u>3.1. MATERIELS.....</u>	32
3.1.1. La plante.....	32
3.1.2. Les cultivars de manioc utilisés.....	33
3.1.3. La culture in vitro et les organes prélevés.....	34
3.1.3.1. Les microboutures.....	34
3.1.3.2. Les entrenoeuds, les pétioles et les limbes.....	34
3.1.3.3. Les apex caulinaires.....	34
3.1.3.4. Les cotylédons.....	35
3.1.3.5. Le limbe foliaire utilisé pour l'isolement des protoplastes.....	35
3.1.3.6. Le limbe utilisé pour l'étude de la toxine.....	36
3.1.3.6.1. Le limbe porteur de germe pathogène.....	36
3.1.3.6.2. Le limbe servant aux bio essais	36
3.2.3.7. L'agent pathogène.....	36
3.1.4. Préparation des milieux de culture et des solutions enzymatiques.....	36
3.1.4.1. Les milieux pour le bouturage, la culture du cal et du méristème.....	37
3.1.4.2. Les milieux utilisés pour l'isolement de la toxine.....	39
3.1.4.3. Les solutions enzymatiques et les milieux de culture des protoplastes	40
3.1.4.3.1. Les solutions enzymatiques....	40
3.1.4.3.2. Les milieux de cultures pour les protoplastes.....	40
3.1.4.4. Le milieu sélectif et la solution d'hybridation somatique.....	42
<u>3.2. METHODES.....</u>	43
3.2.1. La désinfection et la stérilisation....	43
3.2.1.1. Des boutures, cals et méristèmes...	43
3.2.1.2. Des feuilles pour l'isolement des protoplastes.....	43
3.2.2. Les ensemencements.....	44

	Page
3.2.3. Les techniques d'isolement et d'étude de la toxine bactérienne.....	44
3.2.3.1. Préparation du filtrat de culture..	45
3.2.3.2. Mise en évidence de l'effet toxique du filtrat de culture.....	45
3.2.3.3. Isolement et purification de la toxine bactérienne.....	46
3.2.4. L'isolement et la culture des protoplastes.....	49
3.2.4.1. L'isolement des protoplastes.....	49
3.2.4.1.1. A partir des feuilles obtenues par la culture in vitro.....	49
3.2.4.1.2. A partir des feuilles de serre.	49
3.2.4.2. La culture des protoplastes.....	50
3.2.4.3. Culture des protoplastes dans un milieu sélectif.....	50
3.2.4.3.1. Conditions générales de culture	51
3.2.4.3.2. La toxine.....	51
3.2.4.3.3. La culture en présence de la toxine.....	51
3.2.5. Les hybridations somatiques.....	51
3.2.6. Les conditions d'environnement.....	52
3.2.7. Les transferts.....	52
3.2.7.1. Lors du bouturage.....	52
3.2.7.2. Au cours de la culture des cals et des méristèmes.....	53
3.2.7.3. Au cours des cultures de protoplastes.....	53
3.2.8. Les observations réalisées.....	53
3.2.8.1. Au cours du bouturage in vitro.....	53
3.2.8.2. Au cours de la culture des cals et des méristèmes.....	54
3.2.8.3. Au niveau de la toxine bactérienne	54
3.2.8.4. Au cours de la culture des protoplastes.....	54
 IV - RESULTATS.....	 56
<u>4.1. LES ESSAIS DE REGENERATION DE PLANTES ENTIERES DE MANIOC PAR LES TECHNIQUES DE CULTURE IN VITRO.....</u>	 56

	Page
4.1.1. Le microbouturage.....	56
4.1.1.1. L'influence de la position de la bouture sur la tige.....	56
4.1.1.2. Le rôle du cultivar utilisé.....	56
4.1.1.3. Le rôle du milieu de culture et des phytohormones exogènes.....	57
4.1.1.4. Une technique originale de multi- plication rapide in vitro du ma- nioc ; l'obtention de plusieurs pous- ses puis de plusieurs plantes à partir d'une seule bouture.	60
4.1.1.5. Le transfert en pot de plantes ob- tenues en bouture in vitro.....	63
4.1.1.6. Conclusion.....	65
4.1.2. Le développement des cals .....	65
4.1.2.1. Entrenoeuds et pétioles.....	65
4.1.2.2. Limbe et cotylédon.....	67
4.1.2.2.1. Le limbe .....	68
4.1.2.2.2. Le cotylédon.....	68
4.1.2.3. Discussion.....	73
4.1.3. L'isolement et le développement in vi- tro des apex caulinaires.....	74
4.1.3.1. La morphogénèse et l'induction des cals.....	74
4.1.3.2. L'inhibition du développement de l'explant apex.....	74
4.1.3.3. Le développement des pousses.....	75
4.1.3.3.1. Les apex de 0,2 à 0,3 mm.....	75
4.1.3.3.2. Les apex de 0,4 à 0,8 mm.....	75
4.1.3.4. L'obtention de plusieurs pousses à partir d'un seul explant.....	76
4.1.3.5. Discussion.....	80
4.3.1.6. Origine et conditions de néoforma- tion des bourgeons.....	80
4.1.4. Conclusion sur les essais de régénéra- tion de plantes entières de Manioc par les techniques de culture in vitro.....	84
<u>4.2. LES RECHERCHES SUR LA TOXINE BACTERIENNE.</u>	85
4.2.1. Le comportement du lobe foliaire dans les conditions des bio-essais.....	85

	Page
4.2.2. Le bio-essai sur le filtrat de culture	87
4.2.3. Les effets du pH sur la toxicité du filtrat de culture.....	89
4.2.4. Le bio-essai avec le composé toxique purifié.....	89
4.2.4.1. Purification à partir des filtrats de culture réalisés sur le HEC et l'APG.....	90
4.2.4.2. Comparaison entre 2 techniques de purification : une technique utilisant le méthanol et l'autre l'éthanol.....	90
4.2.4.3. Le choix de la source de carbone....	91
4.2.4.4. Comparaison entre les techniques qui utilisent les résines échangeuses d'ions et celles qui utilisent la dialyse.....	91
4.2.4.5. Discussion.....	93
4.2.5. Validité et limites du bio-essai.....	94
4.2.6. Les essais de résistance à la bactériose sur les cultivars de manioc.....	97
4.2.7. Conclusion.....	99
<u>4.3. LE DEVELOPPPEMENT DES PROTOPLASTES ISOLES A PARTIR DU MANIOC.....</u>	<u>101</u>
4.3.1. Recherche des meilleures conditions d'isolement de protoplastes sur le manioc...	101
4.3.1.1. L'isolement des protoplastes.....	101
4.3.1.2. La quantité des protoplastes isolés	101
4.3.1.3. La taille des protoplastes obtenus	105
4.3.1.4. L'isolement des protoplastes à double macération.....	108
4.3.2. La mise en culture des protoplastes isolés.....	110
4.3.2.1. Les conditions d'ensemencement.....	110
4.3.2.1.1. Recherche des meilleurs milieux d'ensemencement.....	110
4.3.2.1.1.1. Introduction.....	110
4.3.2.1.1.2. Les milieux de référence utilisés sur le Tabac: W06 et C1	111
- Le milieu W06.....	111
- Le milieu C1.....	111

	Page
4.3.2.1.1.3. Les milieux mis au point sur manioc.....	112
- Le milieu F.....	112
- Le milieu M.....	113
4.3.2.1.1.4. Conclusion et discussion...	114
4.3.2.1.2. Le rôle de la densité de culture	115
4.3.2.1.2.1. Densité des cultures dans le milieu F.....	115
4.3.2.1.2.2. La densité de culture dans le milieu WO6.....	115
4.3.2.1.2.3. Les densités de culture dans les milieux Cl et M.....	118
4.3.2.1.3. Essai de conservation des protoplastes aux basses températures avant leur ensemencement.....	120
4.3.2.2. Les transferts.....	121
4.3.3. Les différents aspects des protoplastes isolés et des colonies obtenues au cours de leur évolution.....	123
4.3.3.1. La mortalité.....	123
4.3.3.2. Les agrégats cellulaires.....	124
4.3.3.3. Le grandissement cellulaire.....	124
4.3.3.4. Le bourgeonnement.....	124
4.3.3.5. La prolifération par clivage.....	127
4.3.3.6. L'aspect des cellules en culture..	133
4.3.3.6.1. Le regroupement des chloroplastes autour du noyau.....	133
4.3.3.6.2. Les travées cytoplasmiques....	133
4.3.3.6.3. La reconstitution d'une nouvelle paroi.....	133
4.3.3.7. Les cals formés.....	134
4.3.3.7.1. Le développement des cals sur le milieu liquide.....	134
4.3.3.7.2. Le développement des cals sur gélose.....	137
4.3.4. Conclusion sur les protoplastes.....	139
<u>4.4. ESSAI D'APPLICATION DES PROTOPLASTES A L'ETUDE DES VARIABILITES GENETIQUES</u>	142
4.4.1. Les cultures sur un milieu sélectif renfermant la toxine (Manihocine).....	142



## I - INTRODUCTION

La bactériose du Manioc (ou flétrissement bactérien du Manioc) due au *Xanthomonas manihotis* est devenue ces dernières années un redoutable fléau qui peut dévaster toute une plantation constituée de variétés sensibles.

Des travaux d'hydratation <sup>brida</sup> et de sélection pour la résistance à la bactériose réalisés à l'IITA (Institut International d'Agriculture Tropicale basé à Ibadan au Nigéria) ont créé des variétés nouvelles résistantes à la maladie (HAHN 1978). L'introduction de ces variétés sous forme de semences dans d'autres pays, outre le risque de transfert de germes pathogènes qu'elle comporte a imposé un programme secondaire de sélection dans les pays d'accueil (Zaïre, Congo).

Il semble que dans les pays où cette maladie sévit beaucoup de cultivars soient très adaptés à leur écologie, mais demeurent cependant sensibles aux attaques de *Xanthomonas manihotis*. La nécessité d'utiliser des variétés résistantes implique l'abandon inévitable des variétés traditionnelles quand elles sont en majorité sensibles et l'adoption de nouvelles variétés dites améliorées. Un tel abandon conduirait à une grande perte en ressources génétiques dans cette zone (WALSH 1981). Une amélioration de la résistance de ces cultivars vis-à-vis de la bactériose, sans trop modifier leur patrimoine génétique, permettrait alors de les conserver et d'améliorer par conséquent leur productivité.

Aujourd'hui, de nombreux chercheurs admettent que la culture in vitro peut conduire à une variabilité génétique orientable. GAUTHERET (1959) puis DALY (1977) signalent que les tissus peuvent acquérir au cours de leur développement in vitro une résistance complète à l'égard d'un parasite, en culture associée tissu-parasite. De même, CARLSON (1970) LIU (1977),



Fig. 1 : Plante de Manioc âgée de 4 mois  
(cultivar MM78)

MARTIN (1977), BIGOT (1978) et SHEPARD (1980) pensent que la culture in vitro peut conduire à une amélioration génétique des espèces agricoles. Pour DEMARLY, la possibilité existe en culture in vitro de produire "des phénovariants" ayant une mémoire transmissible par voie femelle, avec possibilité de stabiliser cette source de variation. On peut par conséquent avec des milieux sélectifs espérer diriger l'orientation de cette variation.

Il apparaît dès lors que pour tenter de résoudre par la culture in vitro, le problème ainsi posé, 3 points principaux doivent être éclaircis :

- Il convient en première étude d'approfondir notre connaissance sur le comportement du Manioc en culture in vitro.

- Il importe aussi de mieux saisir les effets de l'agent pathogène. Puisque *Xanthomonas Manihotis* est une bactérie vasculaire, son action se limiterait donc à l'obstruction des vaisseaux du fait de sa propre multiplication dans l'hôte ; mais, le flétrissement observé peut être provoqué par une toxine qu'il faudra alors isoler.

- Il est souhaitable d'essayer d'isoler des protoplastes de Manioc. En effet, grâce aux protoplastes végétaux, on peut réaliser des hybridations somatiques entre 2 espèces, mais le protoplaste se révèle aussi dans cette étude comme le matériel le plus indiqué pour analyser les interactions "environnement - individu" et orienter d'une manière sélective, par l'emploi d'une toxine, une variabilité recherchée.

Dans le but de mettre en évidence les propriétés organogènes des tissus de Manioc, nous avons essayé la régénération des plantes entières à partir des cals obtenus à partir de divers organes de la plante ; puis, nous avons cherché à isoler des protoplastes mésophylliens capables de fournir par prolifération des clones de Manioc. L'isolement des toxines bactériennes

et une accoutumance des protoplastes vis-à-vis de ces toxines a été notre 3<sup>e</sup> orientation. Enfin la fusion de protoplastes issus des espèces résistantes sauvages et des espèces comestibles sensibles et la régénération d'hybrides était notre dernier objectif de recherches.

## II - HISTORIQUE

## 2.1. LA PLANTE ET SA LOCALISATION

Le Manioc est originaire d'Amérique du Sud. Les deux centres de diversification du Manioc sont situés, l'un au Mexique, l'autre au Nord-Est du Brésil (PURSEGLOVE 1977, GRACE 1978). On pense que les marchands d'esclaves ont été les premiers à l'introduire au 16<sup>e</sup> siècle sur la côte occidentale de l'Afrique. Les Portugais l'ont apporté ensuite dans leurs comptoirs voisins de l'embouchure du Congo d'où il va gagner les autres régions du Continent africain. Il a été connu un peu tard en Extrême Orient vers 1835 ; importé du Brésil à Java, il arrive ensuite à Singapour et en Malaisie, puis en Thaïlande.

## 2.2. LE MANIOC EN AGRONOMIE

Le Manioc est cultivé dans les pays situés entre les tropiques et même jusqu'au 30<sup>e</sup> degré de latitude. Il possède une grande facilité d'adaptation à des climats très divers, ce qui avec la simplicité de sa culture, le rend précieux et lui permet de contribuer pour une grande part à l'alimentation humaine.

L'humidité entraîne très souvent un développement exagéré des parties aériennes alors que pendant la saison sèche, une grande quantité de grains d'amidon va s'accumuler dans les tubercules.

Bien que le Manioc s'adapte à des sols divers parfois médiocres, il préfère des sols bien drainés, des terres d'alluvions légères et même sablonneuses, mais se contente également de sols compacts tels que la latérite dure.

Les rendements sont nettement influencés par le climat, mais également par la qualité des sols.



Fig. 2 : Une plante de Manioc de la collection d'Odziba âgée de 6 mois

Les variétés cultivées au Congo sont nombreuses et existent dans une synonymie abondante de langage (appellations différentes de la même variété) ou de lieu d'origine (même appellation pour les variétés provenant d'un même lieu). Jusqu'en 1979, nous avons réuni dans les collections vivantes de Loudima et de Mbé près de 100 cultivars. Les variétés multipliées dans les fermes d'Etat sont des variétés locales collectées sur les lieux d'implantation des fermes. Ces variétés sujettes à beaucoup d'attaques parasitaires mériteraient d'être améliorées.

Le Manioc ne demande pas une préparation fine du terrain. Dans les plantations paysannes au Congo, après brûlis, en fin de saison sèche, on émiette le sol en pratiquant des buttes dans lesquelles on enfouit 3 ou 4 boutures croisées ou parallèles. Dans les zones argileuses, à la place des buttes, on pratique des trous de 30 à 40 cm de diamètre dans lesquels on enfouit les boutures dès les premières chutes des pluies. Quand la culture de Manioc a été précédée d'une culture nettoyante, comme l'arachide, dès la récolte de cette dernière, on plante le Manioc mais très souvent, le paysan pratique la culture associée qui consiste à mettre en place pendant la même période des cultures à cycles de développement, port de la plante et exigences vis-à-vis du milieu différents comme l'arachide, le maïs, les courges et le Manioc qui sont très souvent cultivés en même temps sur la même parcelle. Le paysan exploite le même champ en Manioc pendant 3 ans, âge auquel interviennent les dernières récoltes en ramassant les tubercules au fur et à mesure de leur arrivée à maturité. Il y a vingt ans, après la récolte, il laissait le sol se restaurer pendant près de 10 ans. Aujourd'hui à cause d'une exploitation intense des sols, cette jachère longue se raccourcit parfois jusqu'à 4 ans ; ce qui contribue à une dégradation rapide des sols, compte tenu de l'apport inexistant des éléments fertilisants.

Par contre, les exploitations des fermes utilisent des techniques modernes de culture. On laboure le terrain, on le travaille au pulvérisateur juste avant la saison sèche, puis ce labour mûrit durant toute la saison sèche. Avant la tombée des premières pluies, on passe à nouveau le pulvérisateur de façon à casser les mottes. Le bouturage se fait avec une seule bouture de 25 cm de long par poquet. Trois sarclages pendant le premier quart de la culture sont parfois utiles suivant l'enherbement du terrain. Quand il n'existe pas de maladies défoliatrices, dans les zones moins sales et pour les cultivars qui couvrent parfaitement le sol, la culture peut passer les 3 derniers quarts de son cycle sans l'intervention de l'homme. Suivant les zones et les variétés, la récolte des tubercules s'effectue en une seule fois entre le 12<sup>e</sup> et le 24<sup>e</sup> mois en arrachant la plante entière. Dans les parcelles d'ouverture de terrain, une parcelle peut supporter 3 cycles successifs de culture avant de laisser la place à une jachère cultivée durant 3 cycles.

### 2.3. L'IMPORTANCE DU MANIOC DANS LE MONDE

L'igname, le Manioc, le taro, la patate douce et la pomme de terre sont les racines et tubercules les plus importants du monde (AYENOR 1978, SHEPARD et al 1980). Parmi eux, le Manioc se place au premier rang dans les pays tropicaux. Dans ces pays, il joue un rôle soit de premier ordre, soit de second ordre, ou un rôle de complémentarité dans l'alimentation humaine. On estime de nos jours que plus de 200 millions d'habitants se nourrissent de manioc.

#### 2.3.1. Les caractéristiques les plus importantes du manioc

Le Manioc produit beaucoup plus d'énergie par unité de surface que grand nombre d'autres cultures. Il manifeste un

TABLEAU N°1 : Les principaux pays producteurs de Manioc  
 et leurs productions. (en 1000 MT)  
 (Annuaire FAO de la production 1980 Vol. 34  
 296 p. Coll. FAO : statistique N°34. 1981)

Pays \ Années	1969-71	1978	1979	1980
ANGOLA	1597	1700	1800	1850
CAMEROUN	637	950	1000	1000
CENTRAFRIQUE	767	940	970	980
CONGO	543	532	538	543
ZAIRE	10 232	11 779	12 000	12 500
NIGERIA	9 473	10 500	10 500	11 000
AFRIQUE	38 406	44 220	45 207	46 773
BRESIL	29 924	25 459	24 935	24 554
THAILANDE	3 208	18 399	11 100	13 500
INDONESIE	10 695	12 902	13 751	13 300
MONDE	96 760	12 280	117 505	122 134

très haut rendement photosynthétique ; les racines contiennent 20 à 45 % de fécule et 5 % de sucres réducteurs. La fécule contient 90 % de matière sèche. Non seulement le Manioc peut produire des tubercules dont la récolte peut s'échelonner jusqu'à 3 ans, mais peut également fournir des feuilles comestibles qui dans certaines régions, peuvent, à partir du premier quart de la culture, être consommées durant tout le cycle. La possibilité qu'a la plante de Manioc de pouvoir conserver intacts dans le sol, des tubercules mûrs sans altération de leur qualité, représente un mode de conservation pratique et peu coûteux.

La plantation et les récoltes peuvent s'effectuer sur une grande partie de l'année agricole.

Le Manioc ne demande pas de travaux culturaux fins et s'adapte facilement à beaucoup de types de climats et de sols. Il y a seulement une douzaine d'années, en Afrique, le Manioc ne connaissait pas de parasites économiquement importants.

### 2.3.2. Les utilisations du manioc et produits à base de manioc

Les principaux producteurs de Manioc sont le Brésil, la Thaïlande, l'Indonésie, le Zaïre et le Nigéria. Contrairement à la Thaïlande qui est le premier exportateur mondial, les autres pays consomment 90 % de leur propre production. Les principaux marchés sont les pays de la CEE, le Japon, l'Indonésie et les U.S.A qui l'achètent sous forme de chips, de cossettes ou d'amidon.

#### 2.3.2.1. L'alimentation humaine

On distingue les produits de consommation immédiate qui sont les tubercules que l'on peut consommer crus ou bouillis et les produits de conservation. Au Congo et au Zaïre, on consomme les feuilles. Ces feuilles qui d'après ROGERS et MILNER (1963)

contiennent des protéines de l'ordre de 17,8 à 34,8 % du poids de matière sèche, constituent, comme on peut le constater, un apport substantiel de protéines. Pilées et séchées, elles peuvent se conserver très longtemps.

Les produits de conservation sont de différentes sortes.

a) Le fufu et la chikouangue, au Congo, proviennent des racines rouies. Elles sont séchées, moulues et consommées sous forme de semoule après transformation en farine. Cette dernière pouvant se conserver fort longtemps. La chikouangue est une pâte de Manioc enveloppée dans des feuilles et cuite à grand feu. Il peut se conserver plus d'une semaine dans les conditions ordinaires.

b) Le gari est consommé en Afrique occidentale. Les tubercules rapés sont mis à fermenter et la pâte ainsi obtenue, partiellement transformée en dextrines par la chaleur, est ensuite séchée.

c) Le fufu au Ghana, le dumboï au Libéria, l'atiéké en Cote d'Ivoire constituent d'autres formes de consommation du Manioc.

d) le galpeck ou racines coupées et séchées est consommé en Indonésie et à Madagascar.

e) En Amérique latine on mange la farinha et le couac, Manioc rapé, pilé, tamisé puis cuit. Il peut se conserver indéfiniment. Les farines servent également à la fabrication des gâteaux.

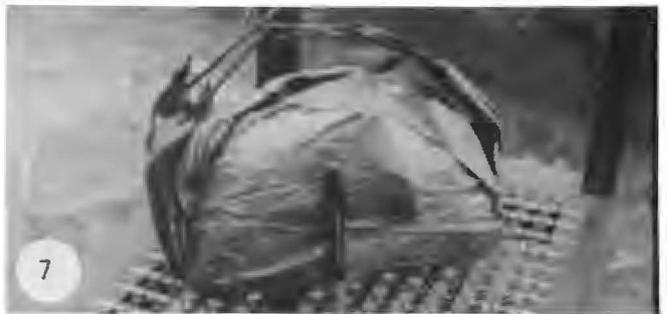
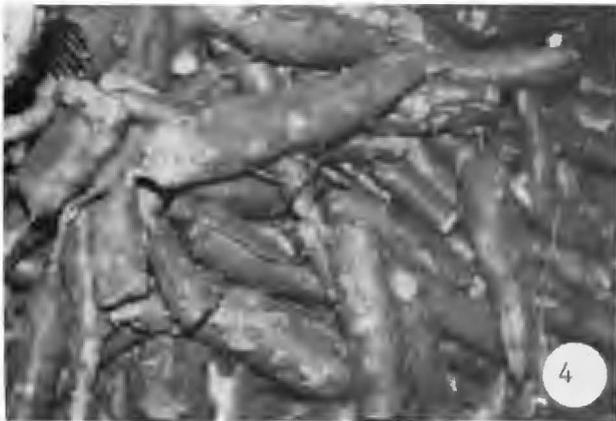


Fig. 3 : Vente de saka saka (feuilles de Manioc) au marché Total de Bacongo (Brazzaville) Août 1981)

Fig. 4 : Tubercules de Manioc de la ferme d'Etat de Mbé à Brazzaville. Août 1981

Fig. 5 : Epluchage des tubercules de Manioc

Fig. 6 : Le fufu, ou farine de Manioc, vendu au marché Total de Bacongo

Fig. 7 : La chikouangue, telle qu'elle est fabriquée dans la région du Pool.

f) Le riz de Manioc est un produit très répandu aux Philippines. Il conserve en grande partie les protéines de la racine. On peut le garder 6 mois sans qu'il moisisse. En Inde, on a commencé récemment à produire un riz synthétique à base de Manioc (GRACE 1978).

#### 2.3.2.2. L'aliment de bétail

Les principaux pays acheteurs de Manioc, la CEE, le Japon, l'Indonésie et les U.S.A. l'utilisent en grande partie pour l'alimentation du bétail. La Thaïlande exporte en 1976, 3,5 millions de tonnes de produits de Manioc composés d'amidon (7 %) de chips et de cossettes (93 %). C'est pour ce pays après le riz le deuxième produit exporté.

Une usine japonaise installée en Thaïlande broie feuilles et jeunes tiges après récolte. Cela constitue une source de protéines pour le bétail (BOOTH et WHOLEY 1978).

#### 2.3.2.3. Les sous produits industriels

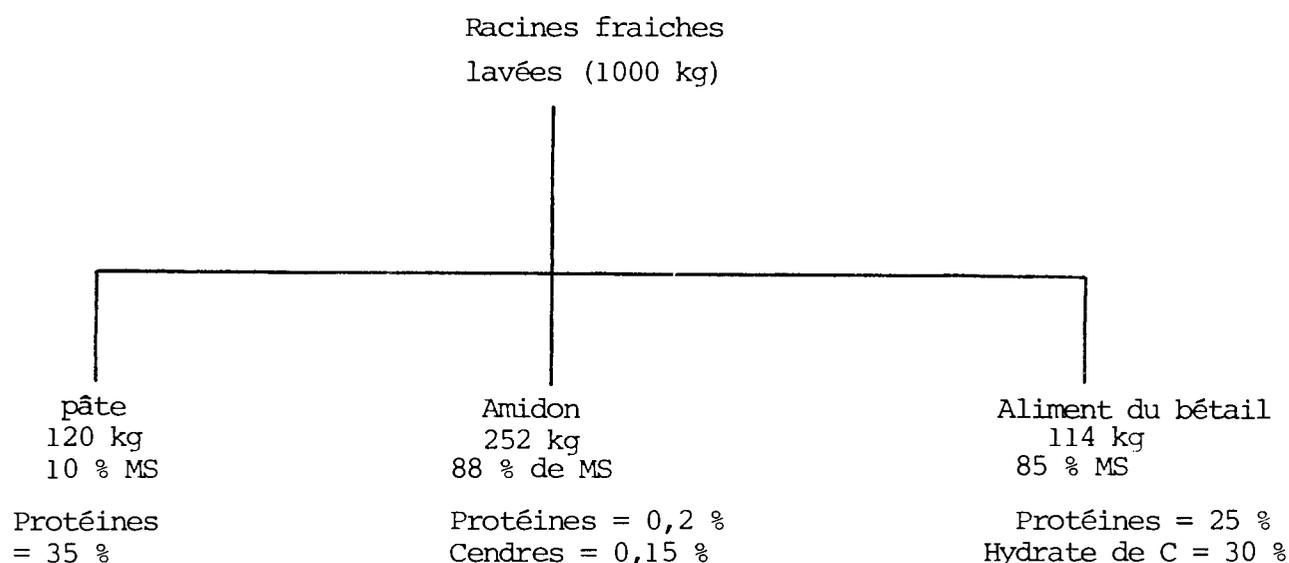
Le principal sous produit industriel du Manioc est l'amidon. L'amidon est avec ses dérivés utilisé dans de nombreuses industries alimentaires (tapioca) ou non. On l'utilise en confiserie, dans les conservations des fruits et des confitures.

L'industrie des adhésifs utilise pour une grande part des sous-produits de Manioc qui servent à la fabrication de cartons ondulés, de gommes à rehumecter. Ils sont utilisés en fonderie, forage des puits, dans les industries du papier, des textiles du bois et de l'ameublement.

D'après DALBERG (1978), à partir d'1 tonne de racines fraîches lavées (soit 35 % de matière sèche) on obtient 120 kg

de pâte (ou 10 % de MS<sup>x</sup> et 35 % de protéines), 252 kg de fécule (soit 86 % de MS avec 0,2 % de protéines et 0,15 % de cendres) puis 114 kg d'aliment de bétail (avec 86 % de MS, 25 % de protéines et 30 % d'hydrates de carbone).

FIGURE N°8 : Les produits obtenus à partir d'1 tonne de tubercules frais de Manioc d'après DALBERG 1978



L'industrie qui tend à consommer beaucoup de manioc est de nos jours l'industrie de production d'alcool. Avec la crise de l'énergie, des pays comme le Brésil ont essayé d'intégrer l'alcool dans les carburants utilisés pour l'automobile. Le programme brésilien prévoit pour 1985, à partir du Manioc 1/4 de toute la production d'alcool, prévue pour cette année (MILFONT 1978).

x MS = matière sèche

Le manioc apparaît donc comme une plante connue et utilisée par l'homme depuis de longue date. La facilité de sa culture mais aussi ses diverses potentialités d'utilisation (alimentation directe de l'homme, transformation en protéines animales par le bétail, diverses industries utilisant l'amidon, production d'alcool) en font une plante utile à l'homme. A partir de 1970 cette plante qui n'avait pas connu des dégâts agricoles importants en Afrique, subit l'attaque d'une maladie dévastatrice, la bactériose du Manioc. Il est indispensable, pour maintenir ou augmenter les productions de cette denrée que l'ensemble des chercheurs des pays concernés mettent au point des méthodes de lutttes adaptées visant à contrôler ce fléau.

#### 2.4. LA BACTERIOSE DU MANIOC

##### 2.4.1. Historique et description

La bactériose du manioc ou CBB (cassava bacterial blight) est une maladie en provenance de l'Amérique latine. Elle a été signalée pour la première fois en 1912 par BONDAR (1912, 1915, 1939) qui décrit les symptômes provoqués par l'agent : le *Bacillus manihotis* (= *Xanthomonas manihotis*). En 1916, BRANDAO fait état des mesures phytosanitaires à prendre pour lutter contre la maladie qui devient une véritable épidémie. Il préconise l'utilisation des variétés résistantes. Cette maladie est caractérisée par l'apparition de taches angulaires, d'un flétrissement de la feuille puis de la pousse, par une exsudation de gomme et par des nécroses qui apparaissent sur la tige. ARAGO en 1931 étudie l'agent causal afin de mettre au point un test de criblage des variétés. La méthode d'inoculation consiste à utiliser directement le latex d'une plante malade pour l'inoculer à une plante saine.

En Afrique PYNART (1951) parle d'une maladie causée par *Bacterium cassavae* Hansf et *Bacterium robiti* alors que *Phytomonas manihotis* (*Xanthomonas manihotis*) ne cause des dégâts qu'en Amérique latine, mais c'est en 1953 que WIEHE et DOWSON observent des taches foliaires puis des défoliations au Nyassaland et qu'ils proposent le nom de *Xanthomonas cassavae* pour classer l'agent responsable de la maladie, alors que le *Xanthomonas manihotis* est considéré comme l'agent causal de la flétrissure bactérienne en Amérique du sud. En fait, il s'agit de 2 espèces différentes de *Xanthomonas*.

En 1970 une bactériose due au *Xanthomonas manihotis* apparaît au Nigéria, puis au Zaïre. L'introduction de cette maladie en Afrique (date et moyen d'introduction) n'a pas été établie. PERSLEY (1976) pense que son existence dans les points isolés de la région montre qu'elle existait depuis très longtemps. Cependant, cette maladie n'a provoqué des dégâts qu'à partir de 1970 au Zaïre et 1976 au Congo.

Au Congo, un programme de lutte est mis en place (BANTSIMBA et MABANZA 1976, Daniel et al 1978). Il commence par la constitution d'une collection vivante des cultivars locaux et étrangers, leur caractérisation et leur criblage vis-à-vis de la résistance à la bactériose.

Cependant, la majorité des cultivars de Manioc multipliés en Afrique demeurent sensibles. Seul le *Manihot glaziovii*, une espèce qui ne tubérise pas apparaît comme source de résistance à la bactériose (HAHN 1978). Des croisements très importants ont été réalisés au Nigéria dans les années 70 entre *Manihot esculenta* Grantz et *Manihot glaziovii*. Des variétés nouvelles résistantes à la bactériose ont été ainsi créées (HAHN 1978). Le problème d'échange de variétés entre les pays



Fig. 9 : Cultivar sensible à la bactériose : les flèches montrent les tiges défoliées.

Fig. 10 : Symtômes de taches angulaires sur la feuille du cultivar Ngamfouo.

Fig. 11 : Cultivar sensible à la bactériose. on observe une défoliation de la tige, puis die-back.

Fig. 12 : Cultivar tolérant . Quelques feuilles seulement flétrissent.

se pose avec acuité, la bouture étant le mode le plus banal de la propagation de la maladie. L'introduction de ces variétés nouvelles au Zaïre et au Congo s'est faite sous la forme de semences, ce qui nécessite dans les pays d'introduction, un programme de sélection secondaire assez lourd.

#### 2.4.2. Le *Xanthomonas manihotis*

ARAGO (1931) met en culture un bacille à flagelle isolé à partir des exsudats de gomme. La culture est faite sur le milieu nutritif de Novy et de Mac Neal, ou celui de Noeller et d'autres milieux classiques à base de sang de cheval. BRADBURY (1978) a décrit de nombreux tests qui permettent d'identifier et de caractériser le *Xanthomonas manihotis*. Au Congo une étude des souches isolées dans les plantations a été réalisée par comparaison avec celles des autres pays (tableau II). Lorsqu'elle est isolée sur un milieu LPGA (levure -peptone-glucose-Agar) la souche de *Xanthomonas manihotis* développe des colonies jaune blanchâtre.

Le *Xanthomonas manihotis* est une bactérie qui se développe dans les zones vasculaires de la plante. On a souvent pensé que le flétrissement du végétal était obtenu après obstruction des vaisseaux au moment du développement de l'agent pathogène (DURBIN 1972). Cependant, pour FEDER (1951) HODGSON et al (1949), les bactéries produisent souvent des substances capables d'induire le flétrissement.

TABLEAU II

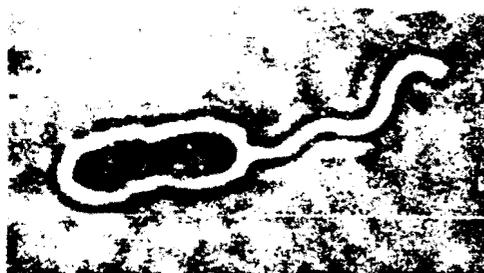
D'après Daniel et al. 1978

Caractères biochimiques des isolats de *Xanthomonas manihotis*

	République Populaire du Congo	Empire Centrafricain	Brésil <sup>1</sup>	Colombie <sup>2</sup>
Hugh et Lefson	Oxydatif	ox.	ox.	ox.
Milieu B de King	-	-	-	-
Levane	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	-
Pectine	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Hypersensibilité sur tabac	+	+	+	+
Nitrates	-	-	-	-
Esculine	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-
Uréase	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+
Citrate de Simmons	+	+	+	+
Gélatinase	+	+	+	+
Amidon	+	+	+	+
Polypectate pH 5	-	-	-	-
Polypectate pH 7	+F	+F	+F	+F
Polypectate pH 8	+F	+F	+F	+F
Tween estérase	+	+	+	+
+ réaction positive - réaction négative +F réaction faiblement positive				

(1) Souches envoyées par le Docteur R. Neto, Instituto Biologico Campinas, Sao Paulo, Brasil.

(2) Souches envoyées par le Docteur J. C. Lozano, CIAT, Cali, Colombie.

Figure N°13  
D'après Daniel et al. 1978Flagelle polaire du *Xanthomonas manihotis*.

## 2.5. LE MANIOC ET LA CULTURE IN VITRO

Les essais d'une culture in vitro d'organes de manioc sont très récents. PROTUGUEZ et MOGILNER (1967) ont été les premiers à appliquer la culture in vitro au Manioc. Leur publication fait état des conditions de mise en culture des méristèmes radiculaires du Manioc.

Mais, c'est surtout à partir de 1974 lorsque KARTHA et al mirent au point un milieu convenable pour la culture des méristèmes caulinaires, que le 1er cycle de recherches systématiques a commencé; à partir de ce moment en effet, plusieurs chercheurs se mirent à étudier le développement des cals obtenus à partir d'organes ou de fragments d'organes de Manioc. Ainsi, ESKES et al. (1974) mettent en culture des fragments de parties apicales mais n'obtiennent que des racines. LIU (1975) s'intéresse à l'apex apical d'une longueur de 5 mm, MOH (1975) aux anthères. SENAWI (1975) étudie le développement des cals formés à partir des entrenoeuds, de pétioles ou de limbes. PRABUDESAI (1975) se propose de mettre en culture les tissus du tubercule. LIU et CHEN (1977) tentent, mais sans succès, des croisements interspécifiques par la culture des protoplastes.

En 1978, d'importantes recherches seront réalisées. PARKE (1978) réalise la régénération de plantes à partir des cals d'entrenoeuds. Jusque là en dehors des apex caulinaires capables selon KARTHA et al. (1975) de fournir des plantes de manioc viables, les autres parties de la plante ne permettaient de régénérer que des racines. TILQUIN la même année, a obtenu des plantes entières à partir des entrenoeuds, des pétioles et des limbes alors que NAIR et al. (1979) travaillant dans les mêmes conditions n'obtenaient aucun résultats positif. FERREOL (1978) pratique le bouturage in vitro auquel il associe la thermothérapie pour éliminer le virus du manioc. KARTHA (1978) KAISER et TEEMBA (1979) et ADEJARE et COUTTS (1981) ont montré qu'on pouvait obtenir une quantité appréciable de plantes indemnes de virus par culture des méristèmes caulinaires. Dès 1980, nous avons indiqué qu'il était relativement aisé d'obtenir des néoformations de plantes à partir des cotylédons (MABANZA 1980) et des méristèmes caulinaires (MABANZA 1980 et MABANZA et JONARD 1981). Des embryons somatiques ont été obtenus à partir des cotylédons (STAMP et HENSHAW, la même année.

Nous pouvons donc remarquer que beaucoup de travaux réalisés sur les cultures in vitro du manioc se sont surtout intéressés, avec succès, aux méristèmes apicaux, généralement dans le but d'éliminer la mosaïque due à un virus, mais de nos jours, l'objet de la culture in vitro s'étend aussi à d'autres domaines comme la recherche d'une variabilité génétique au sein d'une espèce végétale.

Nous constatons qu'au niveau de la néoformation des plantes, le succès obtenu dans les différents travaux restent toujours liés à la nature des cultivars utilisés.

## 2.6. LES SYSTEMES D'ETUDES ET D'OBTENTION DE LA VARIABILITE GENETIQUE

La variabilité génétique est devenue ces dernières années une des préoccupations principales chez le généticien compte tenu des problèmes posés par l'agriculture moderne, les espèces cultivées ayant subi une forte pression de la part des sélectionneurs. L'ensemble des variétés traditionnelles ont été remplacées par quelques hybrides seulement qui génétiquement sont très proches les uns des autres ; et ces cultures deviennent par conséquent vulnérables aux attaques de maladies. En 1970, on notait, par exemple, l'apparition du flétrissement épidémique sur le maïs aux U.S.A. (WALSH 1981). Les chercheurs pensent qu'il est indispensable de développer une diversité génétique chez les plantes agricoles en sauvegardant le "pool génétique" que constituent les "plasmés" germinatifs.

### 2.6.1. Système "population - environnement"

Certains auteurs pensent qu'il peut se produire une grande variation génétique chez les individus d'une population face à tel ou tel environnement. Ainsi pour HEDRICK (1978), le

système "population - environnement" peut aider à l'étude de variabilité génétique au sein d'une population donnée. C'est encore l'avis de FREY <sup>et al.</sup> (1977) qui propose <sup>nt</sup> un système de "management" de gènes de résistance des plantes aux maladies et parasites pour lutter contre la majorité des fléaux. Pour DEMARLY (1978), les "espaces génétiques et cytoplasmiques" sont le siège d'interaction entre l'hôte et l'agent pathogène ; dans ce cas il y a une possibilité de rationalisation des perspectives d'utilisation des multilignées dans la lutte contre un pathogène.

#### 2.6.2. Les systèmes "hôte - pathogène" et "hôte - milieux sélectifs".

De plus en plus le système d'étude " hôte-pathogène" se développe. En dehors de la variation obtenue en culture in vitro (DESHAYES 1978 : variation somatique sur *Nicotiana tabacum* ; SKIRVIN 1978 : variation naturelle et variation induite en culture des tissus ; CORNU 1978 : variation héréditaire spontanée ou induite transmise par reproduction sexuée ),

le système "hôte parasite" peut conduire à l'obtention d'une variabilité orientée dans le sens de la résistance contre les attaques d'un parasite. La prolifération rapide du parasite ne permet pas parfois de mettre au point un tel système. L'emploi d'un milieu sélectif contenant les toxines de l'hôte s'est avéré plus pratique. (SHEFFER et Ulltrups 1965, PRINGLE et SCHEFFER <sup>a et b</sup> 1967, GRACEN <sup>et al</sup> 1971, COMSTOCK et al. 1972, 1973, YODER 1973, GOODMAN et al. 1974).

#### 2.6.3. L'hybridation somatique et la manipulation génétique

Le développement de la technique de culture de protoplastes a, ces dernières années, permis la réalisation de quelques hybrides somatiques viables (KAO et MYCHAYLUK 1974).

Il est maintenant admis que les hybrides somatiques possèdent une plus grande variabilité que les hybrides obtenus par la voie sexuée : (EVANS 1981a, CARLSON 1973 a . L'hybridation somatique est donc une méthode qui peut permettre l'obtention et l'étude des variations génétiques. La maîtrise de cette technique peut être d'un grand intérêt en sélection et en amélioration des plantes.

Nous assistons également à des essais d'induction directe de la variabilité en introduisant dans la cellule des corps étrangers (ADN, ARN, mitochondries, chloroplastes etc...) (EVANS 1981a, CARLSON 1970, DAVEY et COCKING 1972, COCKING 1973, BONNETT et ERIKSON 1974, SUZUKI et TAKEBE 1976, ZEGLER et GALUN (1976), LANDGREEN et BONNET 1979, GILES 1978).

## 2.7. LA TOXINE BACTERIENNE ET LE FLETRISSEMENT

### 2.7.1. La toxine bactérienne

#### 2.7.1.1. Sa définition - son isolement

L'agent phytopathogène est généralement introduit dans une plante à partir d'une lésion primaire de pénétration. Cette lésion est à la base de toute une chaîne de réactions métaboliques de la part des deux partenaires. L'étude biochimique et physiologique d'une maladie peut se baser sur cette constatation.

Dès 1953, DIMMOND et WAGGONER définissent les toxines comme étant des composés produits par des microorganismes capables d'entraîner la mort des plantes. Pour WHEELER et LUKE (1963) les critères essentiels qui définissent une toxine sont les suivants :

a) La toxine isolée, appliquée à des concentrations qui peuvent être signalées au niveau des plantes malades, produit sur la plante sensible tous les symptômes caractéristiques de la maladie.

b) L'agent pathogène et la toxine induisent la même spécificité d'attaque.

c) L'aptitude de l'agent de produire la toxine varie parallèlement avec l'aptitude à provoquer la maladie.

d) Une seule toxine est produite. Si le composé satisfait à ces critères, il est alors appelé "pathotoxine".

Pour PRINGLE et SCHEFFER (1963) cependant, la toxine est simplement un produit métabolique d'un microorganisme pathogène qui est néfaste pour l'hôte du parasite. Ce métabolite toxique produit tous les symptômes de la maladie de telle sorte qu'il peut être substitué au pathogène dans l'étude biochimique et physiologique de la maladie.

GRANITI (1972) observe qu'il n'est pas certain que la production d'une toxine soit la même in vivo et in vitro. C'est ainsi qu'on est toujours amené à concentrer le filtrat toxique avant son utilisation et certains composés toxiques ne peuvent agir sur la plante in vivo qu'en synergie avec un ou plusieurs autres composés. Ainsi certains auteurs en tirent la conclusion, qu'une toxine est un ensemble de "semi-pathotoxines". DURBIN (1972) définit la phytotoxine comme étant un composé non enzymatique synthétisé par une bactérie phytopathogène qui, à des concentrations physiologiques dans une plante, affecte le comportement de celle-ci. Ce qui le conduit à distinguer 2 catégories de phytotoxines : celles produites uniquement en culture et celles produites au sein des

plantes malades. Le second groupe va seulement inclure les seuls composés réellement phytotoxiques, et exclure ceux qui ne sont pas directement phytotoxiques mais qui ont une toxicité secondaire (par exemple ; les inhibiteurs de la synthèse d'oxydase chez la plante hôte). Pour GRANITI S'il y a isolement d'un composé d'une plante malade, si la purification de ce composé est réalisée et s'il y a production d'une partie des symptômes après réintroduction du composé dans une plante saine, ce composé peut être appelé alors " vivotoxine".

Nous constatons donc qu'un large choix de termes est possible suivant la diversité des cas: *Vivotoxine* (DIMMOND et WEGGONER 1953, GRANITI 1972) , *pathotoxine* (WHEELER et LUKE (1963) *toxine spécifique* (PRINGLE et SCHEFFER 1963) ou encore *phytotoxine* et *mycotoxine*.

Le terme phytotoxine plus large, doit donc désigner un composé non spécifique. Dans notre travail le terme de phytotoxine ou simplement toxine sera utilisé dans le sens le plus large comme étant le composé produit par *Xanthommas manihotis*, composé qui manifeste une action dépressive sur le métabolisme de la plante; ainsi nous éliminons toute substance agissant par ses activités enzymatiques.

La mise en évidence d'une toxine se fait sur la base d'un bio-essai effectué au niveau d'attaque du parasite sur une plante donnée ou, un organe vivant de cette plante ( ainsi l'application d'un filtrat de culture (BRAUN 1955) avec la toxine de *Pseudomonas tabacci* sur feuille de Tabac). Pour obtenir une meilleure activité des toxines, il est souvent nécessaire de concentrer le filtrat de culture. LUKE et WHEELER (1955) ont réussi à concentrer et isoler le composé toxique synthétisé par *l'Helminthosporium victoricae* à partir d'un milieu de culture liquide. L'isolement de cette toxine en grande quantité à partir de 100 litres de filtrat de culture a été réalisé par PRINGLE et BRAUN (1957) de la manière suivante : par évaporation en dessous de 45°C ils obtiennent 10 litres du milieu initial, avec addition

de la même quantité de méthanol en volume à 5°C, pendant 48 heures, ils obtiennent un précipité qui est éliminé. Le surnageant repris est concentré à 45°C pour enlever le méthanol. Par bains successifs dans du butanol, ils opèrent l'extraction du composé toxique. Un volume égal de méthanol est ensuite ajouté au mélange butanolique. Le mélange ainsi obtenu est alors chromatographié. Par cette technique, la production de la toxine est de l'ordre de 100 mg pour 100 litres de filtrat de culture. Avec des procédés semblables d'autres chercheurs ont mis au point des techniques d'isolement et de purification de diverses toxines. A la place du méthanol, GOODMAN et al. (1974) utilisent de préférence l'éthanol qui permet la précipitation des polysaccharides. Le précipité polysaccharide repris en solution est ensuite lyophilisé et va constituer l'extrait toxique.

#### 2.7.1.2. La toxine, outil de recherches .....

Dès l'apparition du flétrissement bactérien du manioc les généticiens ont recherché la création de variétés nouvelles résistantes par la voie de l'hybridation avec le *Manihot glaziovii* résistant à la bactériose. Les biochimistes et les bactériologistes de leur côté se sont attachés à la connaissance exacte du parasite et à son comportement épidémiologique. La recherche de l'élément inducteur du flétrissement au moment de l'attaque n'a jusque là fait l'objet de recherches systématiques.

En 1964, SCHEFFER et al. notent une corrélation étroite entre l'aptitude de production d'une toxine par un parasite et sa pathogénéicité au niveau de la plante. La toxine quand elle peut être isolée et purifiée en quantité appréciable offre un excellent matériel de travail, surtout pour le criblage de variétés, comme l'ont signalé de nombreux auteurs (RUDOLPH et WARRICK 1968, BAJAJ et SAETLER 1968 et 1970, HOOKER et al 1970, COMSTOCK et al 1972, GRACEN et al 1971, GENGENBACH et GREEN 1975, GENGENBACH et al 1977, MATTERN et al 1978 et BEHNKE 1979).

### 2.7.2. Le flétrissement bactérien

L'existence des masses bactériennes et des gommes dans les vaisseaux de la plante conduit à penser que le flétrissement serait dû à la colonisation du xylème par les bactéries. De nos jours, associées aux nombreuses carbohydrases synthétisées par les agents pathogènes, les toxines apparaissent comme les inducteurs du flétrissement et sont, sans doute l'un des agents responsables des symptômes observables: d'après FEDER (1951) HODGSON et al (1949) les bactéries produiraient souvent des substances capables d'induire le flétrissement. Beaucoup de bactéries phytopathogènes synthétisent des composés en culture, notamment des polysaccharides de poids moléculaire élevé. On peut donc admettre que ces composés produits par l'agent pathogène provoquent le flétrissement des plantes malades. Pour RAI et STROBEL (1969), le *Corynebacterium michiganense* produit un glycopeptide extracellulaire qui affecte directement la membrane cellulaire. Pour ORENTAS cité par DURBIN (1970) la majorité des xanthomonas synthétisent des heteropolysaccharides dans lesquels le galactose remplace le mannose.

### 2.8. LES HYBRIDATIONS SOMATIQUES

SCHENK et HILDEBRANDT (1968) ont pensé à l'hybridation somatique comme un moyen d'augmenter la variabilité génétique ; opinion partagée par NICKELL et TORREY (1969). De nombreuses méthodes de fusion ont été récemment mises au point : POWER et al (1970) ERIKSON (1971) SCHENK et HILDEBRANDT (1972) KELLER et al (1973), et des résultats de fusion interspécifiques ont été obtenus : POTRYKUS (1971) CARLSON et al. (1972) KELLER et al. (1973) HARTMANN et al (1973). La majorité de ces travaux utilisent le polyéthylène glycol (PEG) comme agent favorisant la fusion entre les protoplastes. La molécule de PEG de formule  $\text{HOCH}_2 (\text{CH}_2\text{-O-CH}_2)_n \text{CH}_2 \text{OH}$ , portant une légère charge négative, est capable d'établir des ponts hydrogènes avec les molécules

d'eau, de protéines, d'hydrates de carbones etc... ,. Pour KAO et MYCHAYLUK (1974), quand la molécule de PEG est longue, elle peut servir de pont entre les surfaces de protoplaste, ce qui favorise la fusion. WALLIN et ERIKSON (1973) signalent que le PEG n'est pas toxique pour les protoplastes. KAO et <sup>MYCHAYLUK</sup> (1974) remarquent que la fusion des protoplastes et la croissance des hybrides cellulaires intergénériques dépendent beaucoup de la nature de la solution de PEG, des enzymes utilisées lors de l'isolement, du temps de macération et de la molarité de la solution de PEG.

La molarité de 0,34 M pour les solutions de PEG est la plus favorable ; les fréquences de fusions varient alors entre 15 et 35 % suivant les espèces. SCHIEDER (1981) fait remarquer que, les 10 dernières années, les protoplastes sont devenus un véritable outil pour l'obtention asexuée d'une variabilité génétique.

## 2.9. LA DIGESTION ENZYMATIQUE DE LA PAROI CELLULAIRE

Les protoplastes mésophylliens sont obtenus en général par une digestion enzymatique de la paroi pectocellulosique de la cellule végétale. Cette paroi est composée de 3 couches différenciables par leurs composants chimiques et la proportion de ces composants. Il s'agit de la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire.

La lamelle moyenne est une zone de jonction entre deux cellules voisines qui prend naissance au niveau de l'ancienne plaque télophasique.

La paroi primaire est la première formée avec une organisation bien définie ; elle correspond à la région la plus dynamique de la paroi cellulaire.

La paroi secondaire est la portion de la paroi élaborée après l'achèvement de la croissance.

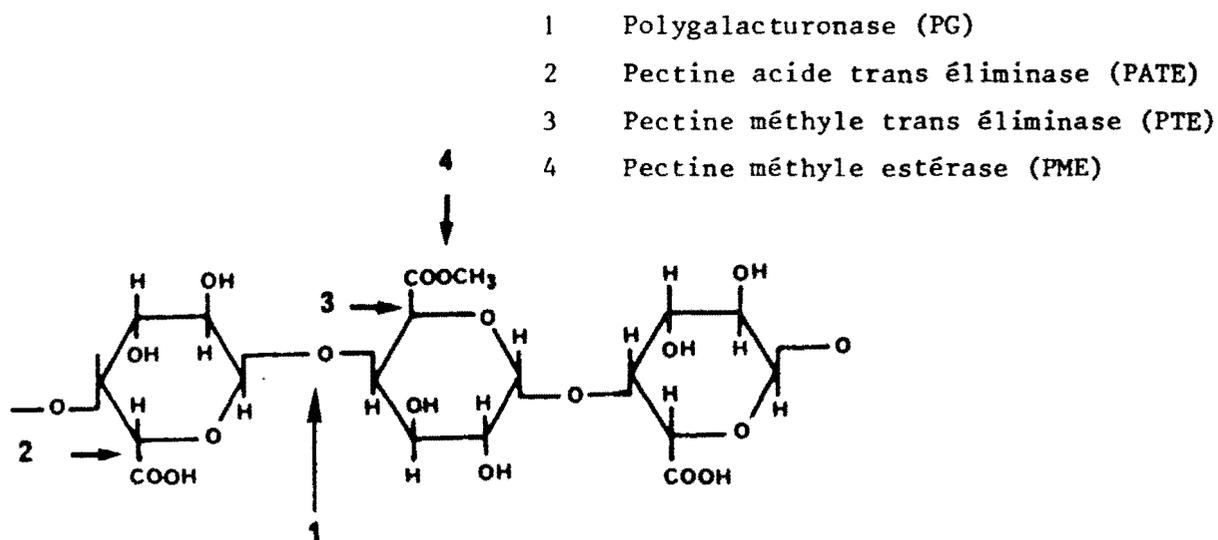
La majeure partie de la paroi cellulaire est constituée par des polysaccharides (substances pectiques, cellulose et hemicellulose) et des glucoprotéines structurales. Les polysaccharides sont majoritaires (NORTH-COTE 1963, JONES et ALBERSHEIM 1972, TALMADGE et al. 1973, DARVILL et al. 1978, MC NEIL et al. 1980 a et b, JARVIS et al. 1980).

Les substances pectiques sont les principaux constituants de la lamelle moyenne et de la paroi primaire des cellules des plantes supérieures

(TALMADGE et al 1973). La teneur en substances pectiques des parois cellulaires varie avec l'espèce, l'organe, le tissu et le stade de croissance. L'acide pectique est un acide polygalacturonique ; l'acide pectinique et la pectine un acide polygalacturonique méthylé (sur le carbone 6 des résidus) ; la pectine est encore <sup>plus</sup> méthylée que l'acide pectinique.

Les enzymes susceptibles de dissocier une paroi végétale sont très nombreuses. Une molécule de pectine peut être scindée par 4 activités différentes (MEYER 1981).

Figure 13 bis : Structure d'une molécule de pectine et possibilité de coupures enzymatiques. (MEYER 1981)



Il semble que les pectinases manifestent une certaine toxicité vis-à-vis des cellules végétales. Certains (BROWN 1955, MOUNT et al 1970, GARIBALDI et BATEMAN 1971, MULLEN et BATEMAN 1971, MUSSEL 1973) signalent que les enzymes responsables de la macération des tissus parasités sont responsables de la mort des cellules. Pour obtenir de bons résultats et isoler des protoplastes viables, il conviendra donc d'essayer un grand nombre de préparations macérantes.

#### 2.10. LE PROTOPLASTE MESOPHYLLIEN

Dans les cellules somatiques la notion de cycle mitotique a été introduite par STERN (1966) qui remarqua que chez les eucaryotes, contrairement aux procaryotes, la synthèse d'ADN s'effectue seulement pendant une période courte de la vie cellulaire. 4 phases ont alors été définies : la phase S dite de répllication des ADN cellulaires la phase M où s'effectue la mitose . La phase G<sub>1</sub> est l'intervalle de temps compris entre M et S, la cellule contient une quantité d'ADN égale à 2 génomes, G<sub>2</sub> à l'intervalle de temps entre S et M, les cellules contenant une quantité d'ADN correspondant à 4 génomes . Dans ce cycle, si les autres phases ont une durée relativement constante et précise pour chaque type cellulaire la phase G<sub>1</sub>, extrêmement variable d'une cellule à l'autre dans une culture, est responsable de la désynchronisation des populations cellulaires préalablement synchronisées. Les cellules d'eucaryotes et principalement les cellules spécialisées dans une fonction déterminée peuvent exister dans un état non mitotique. Elles contiennent généralement la quantité d'ADN correspondant à la phase G<sub>1</sub> et sont alors désignées comme étant G<sub>0</sub> (MEYER 1981). Pour MEYER (1981), les protoplastes de mésophylles sont des explantats primaires ayant l'avantage de constituer un tissu dissocié où le type cellulaire est unique : toutes les cellules sont en effet bloquées en G<sub>0</sub> et l'entrée en mitose

est totalement dépendante de l'apport d'auxines et de cytokinines exogènes. L'isolement et la mise en culture permettent à ces cellules de réexprimer leur potentialité mitotique. Les protoplastes en culture passent successivement par les phases  $G_0$ ,  $G_1$  S -  $G_2$  puis M quand les conditions de culture le permettent.

### III - MATERIELS ET METHODES

### 3.1. MATERIELS

#### 3.1.1. La plante

Le Manioc est une plante de la famille des Euphorbiacées à  $2n = 36$  chromosomes, du genre *Manihot* qui compte ~~100~~ <sup>plus</sup> espèces : *Manihot glaziovii*, *Manihot dichotoma*, *Manihot saxicola* Lang, *Manihot melanobasis*, (Muell Arg), *Manihot catinae* Ule et *Manihot utilissima* Pohl. L'espèce cultivée, le *Manihot utilissima* Pohl est aujourd'hui plutôt signalée sous l'appellation de *Manihot esculenta* Grantz. Au Congo, on rencontre de plus en plus fréquemment le *Manihot glaziovii* utilisé pour ses feuilles comestibles, qui peut également servir à dresser des haies.

Les racines de Manioc sont fasciculées. Elles se renflent en se gorgeant d'amidon dès le collet. Les tubercules de formes diverses (conique, cylindrique, fuselée) peuvent atteindre plus d'un mètre de long et 15 cm de diamètre et peser jusqu'à 8 kg. Ces tubercules constituent le principal produit de récolte. La teneur en fécule peut atteindre 45 %.

La tige est unique ou sous forme buissonnante. Elle est verticale jusqu'à ramification et se ramifie d'une manière trichotomique ; elle ne s'aouite que dans la moitié basse où il y a formation de moelle centrale.

Les feuilles de Manioc sont alternes et palmilobées. On peut compter jusqu'à 11 lobes. Les pétioles sont parfois un peu plus longs que les limbes. La couleur du pétiole est caractéristique de la variété. Les feuilles âgées tombent au point d'insertion où il y a formation d'une protubérance qui protège un bourgeon : appelé bouture, oeil ou noeud.

L'influorescence est une grappe à fleurs unisexuées elle porte environ une soixantaine de fleurs mâles dans la partie supérieure et une dizaine de fleurs femelles dans la partie inférieure. La fécondation est surtout entomophile à cause de la lourdeur du pollen.

Le fruit, de forme ovoïde, est à maturité 5 mois après fécondation. C'est une tricoque. Chaque coque contient une graine qui porte des marbrures et une caroncule proéminente.

Le Manioc contient une substance amère appelée manihotoxine qui est un glucoside cyanogénétique ; lequel est éliminé au cours des transformations technologiques successives.

### 3.1.2. Les cultivars de manioc utilisés

Cinq cultivars sont utilisés dans nos expériences. Leurs caractéristiques sont regroupées dans le tableau suivant :

TABLEAU N°III : Les cultivars utilisés et leurs caractéristiques

Désignation	Malela 1	MM 78	MA 255	Glaziovii Sp	CB
Lieu de récolte	Station de loudima au Congo	Station de loudima au Congo	Station de loudima au Congo	BRAZZAVILLE	Plante élevée en serre à Montpellier
Origine primaire	collecte paysanne	collecte paysanne	semence de l'IITA	-	côte d'ivoire
Port de la plante	érigé	semi rampant	cylindrique	arbustif	cylindrique
Sensibilité à la bactériose (évaluée au Congo en 1976-79)	+	+++	+	-	+++

### 3.1.3. La culture in vitro et les organes prélevés

#### 3.1.3.1. Les microboutures .....

Les boutures sont constituées ordinairement par des portions de tige munies d'un oeil (ou bourgeon axillaire). En ce qui concerne le Manioc, au niveau d'insertion de chaque pétiole, se trouve un bourgeon. En réalité dans la multiplication en champ on utilise des boutures ayant au moins 4 yeux dans la partie aoûtée de la plante. Pour la multiplication, végétative in vitro, nous donnerons le terme de *microbouture*, à une bouture n'ayant qu'un seul bourgeon, prélevé dans la partie verte de la plante. La microbouture est alors coupée 2 mm à 3 mm de part et d'autre de l'oeil.

#### 3.1.3.2. Les entrenoeuds, les pétioles et les limbes .....

Après avoir récupéré les microboutures, les parties restantes de la tige constituent les entrenoeuds. Le diamètre de ces entrenoeuds dépend de l'âge de la plante. Plus celle-ci est âgée, plus la tige est épaisse. Nous avons débité les entrenoeuds en rondelles de 3 mm d'épaisseur.

Les limbes de feuilles de manioc sont palmilobés. Dans chaque lobe, des portions basales de 15 mm x 15 mm sont prélevées. Nous utiliserons également les jeunes feuilles non encore déployées dont nous brossons la face inférieure.

Le diamètre des pétioles varie de 2 mm à 4 mm et leur longueur de 150 mm à 300 mm. Le pétiole nous donnera deux catégories d'explants : les explants courts mesurent entre 3 et 10 mm et les explants longs entre 10 et 20 mm.

### 3.1.3.3. Les apex caulinaires .....

En ce qui concerne l'extrémité des tiges, 2 types d'explants seront mis en culture : des explants dont les diamètres varient entre 0,2 et 0,4 mm, ou des explants de 0,4 à 0,8 mm.

### 3.1.3.4. Les cotylédons .....

Selon le stade de maturation des fruits, nous avons distingué 4 types d'explants :

- Les cotylédons issus des embryons isolés à partir des fruits récoltés au stade laiteux.
- Les cotylédons des fruits se trouvant au stade pâteux.

Les cotylédons des fruits cueillis immédiatement avant maturité.

Tous les fruits nous ont été fournis de la Côte d'Ivoire par l'intermédiaire du GERDAT.

- Les cotylédons des graines mûres. Les graines provenant de l'IITA d'Ibadan au Nigéria, sont issues de variétés reconnues résistantes à la bactériose. Certaines proviennent des sélections IITA de 1976.

### 3.1.3.5. Le limbe foliaire utilisé pour l'isolement des proto- ..... plastés .....

En commençant par le sommet de la tige, les 1ère, 2ème et 3ème feuilles complètement déployées seront prélevées en serre. Dans la majorité des expériences nous avons surtout utilisé des feuilles obtenues par le bouturage in vitro. Avec la technique de multiplication rapide que nous avons mise au

point, nous pouvions ainsi disposer d'une grande quantité de matériel au moment favorable. Les limbes obtenus ont en général 2 à 4 cm de longueur et pèsent en moyenne 0,03 g pour le cultivar CB.

#### 3.1.3.6. Les limbes utilisés pour l'étude de la toxine

##### 3.1.3.6.1. Les limbes porteurs de germes pathogènes

Les limbes porteurs de germes sont issus des feuilles fraîchement attaquées par la bactériose. Prélevées sur le cultivars NGAMFOUO de la collection Manioc d'ODZIBA (CONGO) en février 1981, elles ont été séchées pour la conservation. Elles présentent des symptômes de flétrissement de lobe ou de limbe entier des plages de flétrissement sur les lobes ou des taches angulaires.

##### 3.1.3.6.2. Les limbes servant aux bio-essais

Les feuilles sur lesquelles s'effectue le bio-essai pour la mise en évidence de la toxine bactérienne sont des feuilles âgées, fraîchement prélevées en serre.

#### 3.1.3.7. L'agent pathogène

Lorsque *Xanthomonas manihotis* est isolé à partir des taches foliaires la souche obtenue est gardée dans l'eau distillée stérile et peut être réutilisée jusqu'à une durée de conservation de 9 mois.

#### 3.1.4. Préparation des milieux de culture et des solutions enzymiques

3.1.4.1. Les milieux pour le bouturage, la culture du cal et  
 .....  
 du méristème  
 .....

Comme la plupart des chercheurs spécialistes de la culture in vitro du Manioc, nous avons utilisé la solution de MURASHIGE et SKOOG (1962). Au niveau du bouturage, nous avons essayé également le milieu de KNOP et pour la culture des explants de pétiole le milieu de LEPOIVRE et al (1977). Des phytohormones sont ajoutées à la solution minérale de base composée des macro et micro éléments additionnée de saccharose et des vitamines du groupe B. Ces milieux sont solidifiés par la gélose (0,8 %). Nous ajustons le pH à 5,6 - 5,8 avant le passage à l'autoclave. D'après PARKE (1978) en effet, aucune différence significative en ce qui concerne le développement des cals n'est enregistré sur Manioc lorsque le pH est compris entre 5,4 et 6,4.(Tab. V).

TABLEAU IV : Phytohormones utilisées

NATURE	DESIGNATION	ABREVIATION	MASSE MOLAIRE
CYTOKININES	BENZYLAMINOPURINE	B.A.P.	225,3
	KINETINE	-	215,22
AUXINES	ACIDE NAPHTALENE ACETIQUE	A.N.A.	186
	ACIDE 2,4 DICHLOROPHENOXY ACETIQUE	2,4 D	221
ACIDE GIBBERELLIQUE	ACIDE GIBBERELLIQUE AG <sub>3</sub>	AG <sub>3</sub>	346,37

Les vitamines employés dans nos expériences :

- . Acide nicotinique
- . Thiamine chlorhydrate
- . Chlorhydrate de pyridoxine.

LES MILIEUX UTILISES ET LEUR DIFFERENTES COMPOSITIONS  
EN PHYTOHORMONES

N° DU MILIEU	DESIGNATION milieu de base	PHYTOHORMONES	mg. l <sup>-1</sup>
1	MS	BAP ANA AG <sub>3</sub>	0,5 1 0,1
2	MS	BAP ANA AG <sub>3</sub>	1 1 1
3	MS	BAP ANA AG <sub>3</sub>	1 1 0,1
4	MS	BAP ANA AG <sub>3</sub>	0,1 0,2 0
5	MS	BAP ANA AG <sub>3</sub>	1 1 0,5
6	MS	BAP ANA AG <sub>3</sub>	0,5 0,1 0
7	MS	BAP ANA AG <sub>3</sub>	0,5 0 0,1
8	MS	BAP ANA AG <sub>3</sub>	0,2 0,1 0

LES MILIEUX UTILISES ET LEUR DIFFERENTES COMPOSITIONS  
EN PHYTOHORMONES

N° DU MILIEU	DESIGNATION	PHYTOHORMONES	mg. l <sup>-1</sup>
9	LE POIVRE	BAP ANA AG <sub>3</sub>	2 0,1 0
10	LE POIVRE	BAP ANA AG <sub>3</sub>	0,4 1 0
11	MS	BAP ANA AG <sub>3</sub>	1 0,1 0
12	modifié MS avec NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> = 1200 NO <sub>3</sub> = 600	BAP ANA AG <sub>3</sub>	2 0,1 0
13	modifié MS avec NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> = 1300 NO <sub>3</sub> = 1200	BAP ANA AG <sub>3</sub>	2 0,1 0
14	MS	BAP ANA AG <sub>3</sub>	10 5 0,5
15	MS	BAP ANA AG <sub>3</sub>	0 0,05 0
16	MS	KINETINE 2,4 D AG <sub>3</sub>	0,05 0,20 0,0
17	K	-	-

### 3.1.4.2. Les milieux utilisés pour l'isolement de la toxine

Le milieu d'ensemencement pour la souche de l'agent pathogène est le milieu LPGA contenant de l'extrait de levure, des peptones, du glucose et de l'agar-agar dans les proportions suivantes : pour 1 l de milieu (milieu N°18)

Extrait de levure	5 gr
Bacto peptone	5 gr
Glucose	10 gr
Agar-agar	20 gr

Le pH est ajusté à 7 avec du KOH avant le passage à l'autoclave à 115°C pendant 20 mn.

Le milieu de culture pour la formation du filtrat de culture est le suivant : pour 1 l de milieu (N°19)

$K_2HPO_4$	5 gr
$(NH_4)_2SO_4$	5 gr
$MgSO_4$	0,2 gr
$NaH_2PO_4$	0,5 gr
Substrat	5 gr

pH ajusté à 7 par KOH

Avec autoclavage à 110°C pendant 20 mn.

### 3.1.4.3. Les solutions enzymatiques et les milieux de culture pour les protoplastes

#### 3.1.4.3.1. Les solutions enzymatiques

Beaucoup de solutions seront essayées pour l'isolement des protoplastes ; ne sont mentionnées ici que celles ayant donné les meilleurs résultats.

Solution N°1 : cellulase R 10            1 % à pH 5,6  
                  Macerozyme R 10        0,5 %  
                  Mannitol                            0,7 M

Solution N°2 : Cellulase R 10            2 % à pH 5,6  
                  Macerozyme R 10        0,5 %  
                  Mannitol                            0,7 M

Solution N°3 : Solution de préacération<sup>m</sup>  
                  Mannitol                            11 %  
                  Glycine                             0,4 % pH 8 - 8,5  
                  PATE                                 0,1 %

Solution N°4 : KCl                            2,5 %  
                  Mg SO<sub>4</sub>                             1 %    pH 5,6  
                  Cellulase RIO                    2 %  
                  Pectinol fest                    0,1 %

Solution N°5 : Solution de rinçage  
                  KCl                                 2,5 %  
                  Mg SO<sub>4</sub>                             1 %

#### 3.1.4.3.2. Les milieux de culture pour les protoplastes

Le tableau VI mentionne les divers milieux utilisés pour la culture des protoplastes. Ils sont tous ajustés au pH 5,6 et stérilisés par filtration à l'aide d'éléments SWINNEX MILLIPORE de porosité 0,45 µm.

TABLEAU VI : Les milieux de culture utilisés dans nos expériences sur les proto-plastes.

Composés		Teneurs en composés minéraux et organiques (exprimés en mg l - l) pour les milieux :					
		N°20 C1	N°21 C2	N°22 W06	N°23 CL	N°24 F	N°25 M
<u>Solutions minérales</u>							
	K Cl	-	-	4 000	-	-	-
	Na Cl	-	-	2 000	-	-	-
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825	800	-	-	-	800
	KN O <sub>3</sub>	950	1 010	5 000	7 600	3 800	760
	Ca Cl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	220	440	10 800	1 760	880	176
	Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	185	738	1 500	1 480	740	148
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85	136	250	680	340	68
	NH <sub>4</sub> Cl	-	-	250	-	-	-
	Na <sub>2</sub> EDTA	37	37	2,78	18,5	9,75	3,7
	Fe SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27	27	3,72	13,9	6,45	2,8
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1	3		3,1	1,55	0,6
	Mn Cl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	-	-		9,9	4,95	2,0
	Mn SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,1	0,3		-	-	-
	Zn SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1	3		4,6	2,3	0,9
	KI	0,01	0,03		0,42	0,21	0,08
	Na <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	-	0,1		0,13	0,065	0,03
	Cu SO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,03	0,09		0,013	0,0065	0,003
	Co SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	-	0,01		0,015	0,0075	0,003
	Al Cl <sub>3</sub>	0,03	0,09		-	-	-
	Ni SO <sub>4</sub>	0,03	0,09		-	-	-
	<u>Composés organiques</u>						
	Méso inositol	100	100	1 000	4 504	3 096	100
	Thiamine HCL (B <sub>1</sub> )	1	1	1	0,5	0,5	0,5
	Acide nicotinique	1	1	-	5	5	5
	Pyridine HCl (B <sub>6</sub> )	1	1	-	0,5	0,5	0,5
	Acide folique	-	-	1	0,5	0,5	0,5
	Biotine	0,01	0,01	-	0,05	0,05	0,05
	Pantothénate de Ca	1	1	-	-	-	-
	Glycine	-	-	-	2	2	2
	Caséine hydrolysée	-	-	-	50	50	50
	<u>sucre</u>						
	Mannitol	80 000	80 000	-	4,555	45 885	72 868
	Saccharose	20 000	20 000	30 000	68,46	45 000	20 000
	Sorbitol	-	-	-	4,554	36,440	-
	xylitol	-	-	-	3,803	-	-
	Agar agar	-	-	-	0,2 %	-	-
	<u>Phytohor-</u>						
	mones						
	ANA	3	2	2	2	2	4
	BAP	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Microéléments de  
Murashige et Skoog

3.1.4.4. Le milieu sélectif et la solution d'hybridation somatique.  
 .....  
 .....  
 .....

Le milieu sélectif ou MT (milieu toxique) a été réalisé en ajoutant au milieu C<sub>1</sub> (N°20) ou au milieu C<sub>2</sub> (N°21) une certaine quantité de l'extrait toxique isolé à partir du filtrat de cultures de *Xanthomonas manihotis*.

Le milieu de fusion des protoplastes à base de polyéthylène-glycol (PEG) est une solution minérale comprenant :

	en mg.l <sup>-1</sup>
	(solution N°6)
Ca Cl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	1700
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50
additionnée du Glucose	36000
et de PEG	(pH 5,8)

### 3.2. METHODES

#### 3.2.1. La désinfection et stérilisation

##### 3.2.1.1. Des boutures, cals et méristèmes .....

Les méristèmes apicaux sont désinfectés avant leur isolement à partir de pousses de 2 cm à 3 cm, par l'action de l'hypochlorite de calcium à 3 % pendant 15 mn. Les limbes âgés sont désinfectés dans les mêmes conditions pendant 10 mn. Le pétiole coupé en 3 parties et la tige sectionnée en portions de 5 cm sont mis dans de l'hypochlorite de calcium à 6 % pendant 20 mn, alors que les fruits et les graines y séjournent près de 120 minutes.

Après chaque passage dans l'hypochlorite de calcium auquel nous ajoutons quelques gouttes d'un agent mouillant, le tween 20, nous faisons 3 à 4 rinçages à l'eau stérile. Tout le travail de désinfection est réalisé dans une hotte stérile à flux laminaire.

Les scalpels, les pinces et les lames sont stérilisés à la chaleur à l'étuve à 120°C pendant 24 heures. Après chaque utilisation la désinfection est effectuée par trempage à l'alcool 95° puis par flambage.

##### 3.2.1.2. Des feuilles pour l'isolement des protoplastes .....

Les 1ères, 2èmes et 3èmes feuilles sont très souvent lésées par les applications d'hypochlorite de calcium à 10 g l<sup>-1</sup> pendant 3 minutes. Nous avons alors remplacé l'hypochlorite de calcium par l'hypochlorite de sodium à 1,25 degré chlorimétrique employé pendant 3 mn. Quant aux feuilles obtenues dans des conditions stériles en bouturage in vitro, elles n'ont pas été soumises à une seconde désinfection.

### 3.2.2. Les\_ensemencements

Après leur rinçage à l'eau stérile, les boutures sont coupées 2 à 3 mm de part et d'autre de l'oeil et plantées verticalement dans le milieu gélosé sans enfouir l'oeil.

Les lobes, les pétioles et les entrenoeuds sont sectionnés à l'aide d'une lame de rasoir stérilisée. Les morceaux de lobe sont posés à plat sur le milieu gélosé, les autres explants sont enfoncés de 1 à 2 mm dans le milieu solidifié. Les lobes des feuilles jeunes dont la face inférieure, a été soigneusement broyée, seront posés sur le milieu de culture.

Les méristèmes caulinares sont extraits sous la loupe binoculaire (grossissement 25 - 50) à l'aide d'un fragment de lame de rasoir monté sur mandrin. Le méristème une fois isolé est transféré immédiatement sur le milieu gélosé.

Les graines sont sectionnées à leurs deux extrémités de façon à enlever la gemmule et l'hypocotyle et casser facilement la coque dure qui recouvre l'ensemble albumen-cotylédon. Les cotylédons se présentant sous l'aspect de 2 feuilles minces emprisonnées entre 2 masses d'albumen, sont prélevés avec des pinces ~~minces~~ de 20 cm de long. Une fois que les cultures sont réalisées, les boîtes de pétri sont scellées avec du parafilm et les tubes à essai, fioles et flacons bouchés avec du coton, puis recouverts d'une mince feuille d'aluminium.

### 3.2.3. Les\_techniques\_d'isolement\_et\_d'étude\_de\_la\_toxine\_bactérienne

### 3.2.3.1. Préparation du filtrat de culture

L'isolement de la souche de *Xanthomonas manihotis* utilisée s'est fait à partir des taches foliaires sur des feuilles fraîchement attaquées par la bactériose. La méthode d'isolement utilisée est celle décrite par BRADBOURY (1978).

L'identification du *Xanthomonas manihotis* est faite avec une souche étalon identifiée des maniocs de Guyanne. Cette souche appartient au laboratoire de phytopathologie du GERDAT.

Une fois isolée, la souche de *Xanthomonas manihotis* est conservée dans de l'eau stérile en flacon de 20 ml à l'obscurité et à 4°C et peut être conservée pendant 9 mois environ.

Après 2 jours de culture sur le milieu LPGA, le parasite a proliféré et formé des bandes de 2 à 3 mm de largeur. Avec une lame de scalpel, nous prélevons en surface une partie de cette colonie bactérienne que nous ensemençons dans le milieu de culture liquide en erlenmeyer contenant 100 ml de milieu. Après un passage de 48 heures à l'agitateur rotatif, à l'obscurité et à 25°C, la culture est récupérée puis centrifugée à 2500 tours par minute. Le surnageant est passé au travers d'un filtre de 0,45  $\mu$ . Pendant ces opérations, le pH contrôlé est situé entre 6,6 et 6,8.

### 3.2.3.2. Mise en évidence de l'effet toxique du filtrat de culture

La mise en évidence de l'effet du filtrat est obtenue en effectuant un bio essai : l'organe test pour le bio essai est un lobe foliaire dont nous plongeons la base fraîchement coupée dans 1,5 ml de filtrat de culture mis dans un tube à essai.

Le tube est exposé à un éclairage en lumière de 2200 lux à 25°C pendant 72 heures.

Chaque essai comportera les traitements suivants :

- Le filtrat de culture dont l'effet toxique est analysé.
- Le traitement témoin-substrat ; le témoin-substrat est le milieu de culture autoclavé mais qui ne renferme pas l'agent pathogène.
- Un traitement témoin eau distillée stérile.

Chaque lobe foliaire représente un traitement et chaque feuille une répétition. Selon la taille de l'essai, le nombre de répétitions varie de 3 à 7.

#### 3.2.3.3. Isolement et purification de la toxine bactérienne

Après stérilisation de la solution bactérienne par filtration à travers un filtre millipore de 0,45 µm, la purification de la toxine est effectuée selon la figure N°14 ou 15.

La mise en évidence de l'effet toxique du composé purifié s'effectuera comme pour le filtrat de culture au moyen de bio essais réalisés sous un éclairage de 2200 lux et à 25°C pendant 72 heures. Dans ces essais, les traitements seront répétés 4 fois avec un témoin-substrat ayant subi les mêmes étapes du procédé de purification.

FIGURE N°14 : Schéma de purification de la toxine bactérienne  
(méthode avec le méthanol)

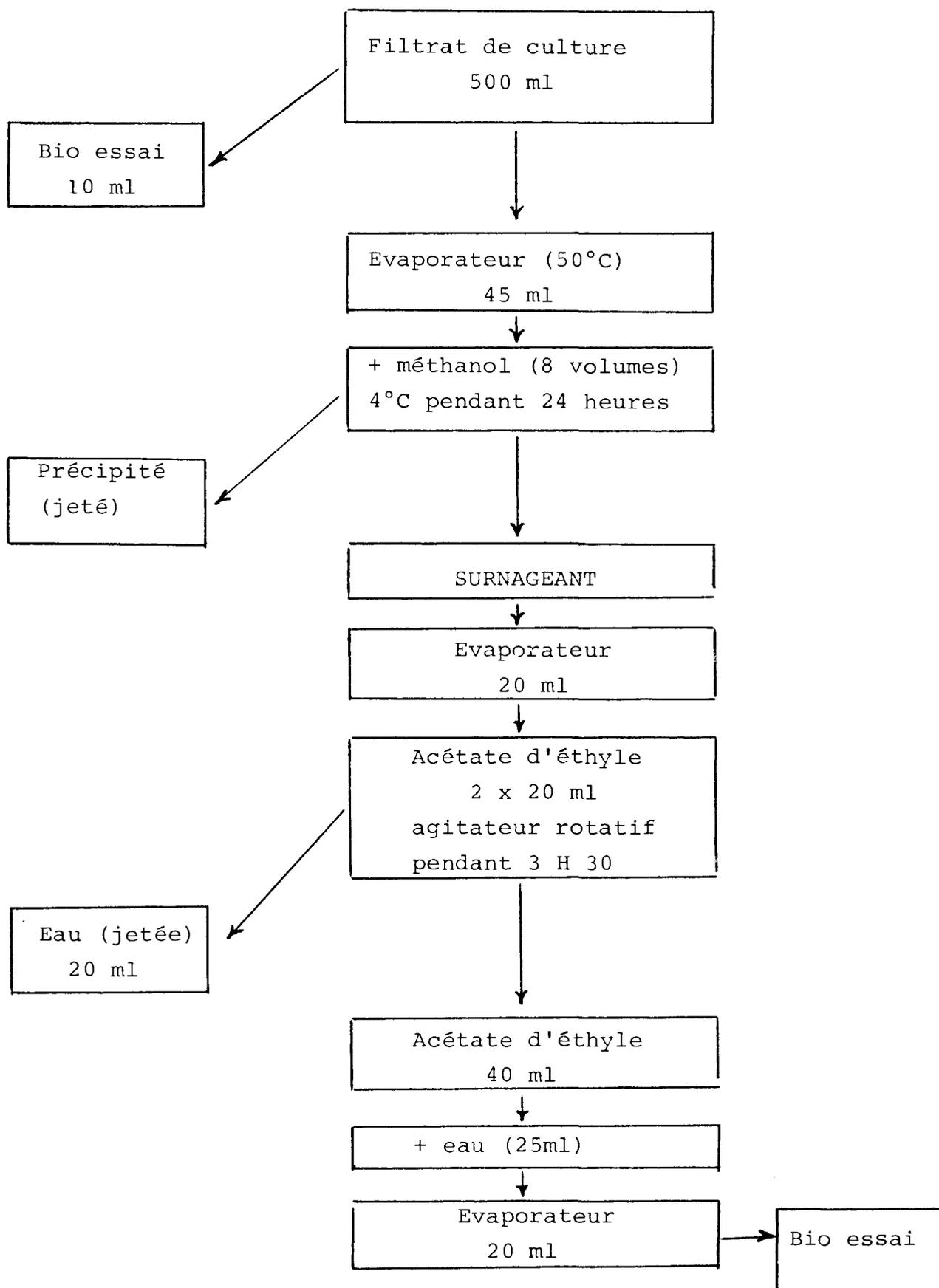
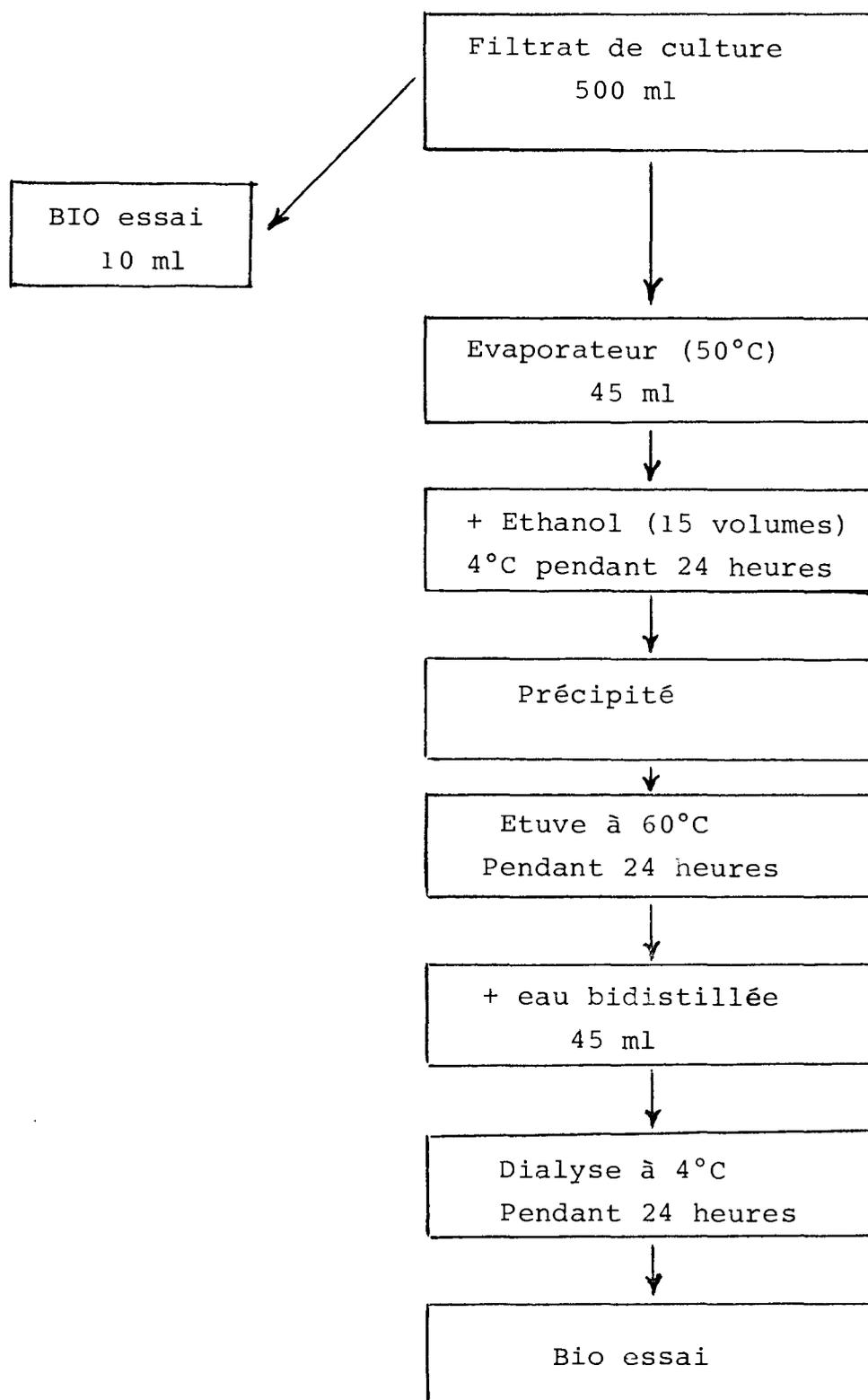


FIGURE N°15 : Schéma de purification de la toxine bactérienne  
(méthode avec l'éthanol)



### 3.2.4. Isolement et culture des protoplastes

#### 3.2.4.1. L'isolement des protoplastes

##### 3.2.4.1.1. A partir des feuilles obtenues par les cultures in vitro

Nous brossons la face inférieure du limbe avec une brosse souple en nylon. La feuille ainsi préparée est introduite dans un Erlen meyer contenant la solution enzymatique. Dans un erlen meyer de 250 ml contenant 20 ml de solution enzymatique N°2, nous faisons macérer 0,5 à 1 gramme de limbe, en agitation rotative à 25°C pendant 5H 00. Après la digestion du tissu végétal par les enzymes, nous récupérons les protoplastes en tamisant la solution au travers d'un tamis métallique, puis à l'aide d'une tulipe en verre, nous recueillons les protoplastes dans un tube à essai. En reprenant les tissus non digérés retenus par le tamis dans la solution enzymatique N°1, par l'agitation pendant 1 heure et demie, nous pouvons obtenir une seconde macération et obtenir ainsi une seconde production de protoplastes.

Les protoplastes recueillis sont libérés de la solution enzymatique par centrifugation à 2500 tours/minute (soit 1500 g), puis rincés soit avec les solutions de culture soit avec la solution de rinçage N°5, et centrifugés à nouveau à 1500 tours / minute (ou 500 g).

##### 3.2.4.1.2. A partir des feuilles de serre

Nous utiliserons la solution N°4 lorsque l'isolement est réalisé à partir des feuilles de serre. La feuille désinfectée est rincée 4 fois à l'eau stérile. La face inférieure est soigneusement brossée afin d'en ôter l'épiderme. Après plasmolyse dans une solution de KCl - MgSO<sub>4</sub> (N°5) pendant 15 mn, un

lavage par une solution de Mannitol 11 % et glycine 0,4 % (pH 8 - 8,5) précède une prémacération avec la solution enzymatique N°3 infiltrée sous vide <sup>et</sup> contenant: mannitol (11 %) glycine (0,4 %) et PATE (0,1 %) à pH 8 - 8,5. Cette <sup>pre</sup>macération dure environ 90 minutes. La macération est effectuée ensuite dans la solution N°4 contenant KCl 2,5 %, Mg SO<sub>4</sub> = 1 %, cellulase R 10 = 2 % et Pectinol fest = 0,1 % à pH 5,6. Cette seconde macération durera 90 à 150 minutes.

#### 3.2.4.2. La culture des protoplastes .....

A l'aide d'une cellule de Nageotte nous évaluons la densité en protoplastes par ml de milieu ce qui permet de ramener la densité de peuplement de notre isolement à la densité de peuplement convenable à la culture soit en concentrant soit en diluant la quantité de protoplastes dans le milieu de culture.

Nous déposons 4 ml de la culture dans chaque boîte de Pétri de 5 cm de diamètre (boîtes de Pétri GREINER) ou 1 ml dans les boîtes de 3,5 cm de diamètre (boîtes de Pétri POLY LABO). Ces boîtes de Pétri sont fermées au scel-o-frais et introduites dans une boîte de rangement plastique transparente dans laquelle nous disposons 2 béchers de 100 ml d'eau afin d'obtenir une atmosphère à humidité relative de 100 % et empêcher le dessèchement du milieu de culture.

Les boîtesensemencées sont gardées 2 nuits à l'obscurité à 25°C, puis exposées à un éclairage permanent de 2 200 lux pendant 21 à 30 jours, enfin à 3 500 lux pendant 16 heures sur 24 jusqu'à la fin de la culture.

#### 3.2.4.2. Culture de protoplaste dans un milieu sélectif .....

### 3.2.4.3.1. Conditions générales de culture

La culture de protoplastes dans un milieu sélectif n'est possible qu'après la mise au point d'une technique d'isolement de protoplastes viables au moins à 90 % avec très peu de débris, mais lorsque cette technique est mise au point, encore faut il trouver le milieu de culture favorable à la prolifération des cellules et à la formation des colonies cellulaires, puis de cals.

### 3.2.4.3.2. La toxine

Le composé obtenu dont l'activité toxique a été confirmée par le bio-essai sur les cultivars MM 78 et CB constitue la toxine ou l'élément de criblage des protoplastes. Il convient de l'utiliser à des concentrations physiologiques dans le milieu de culture. Nous avons donc utilisé des doses équivalentes à celles contenues dans le filtrat de culture de départ.

### 3.2.4.3.3. La culture en présence de la toxine

La culture des protoplastes dans un milieu enrichi en toxine se réalise comme une culture normale. Le pH du milieu de culture contenant la toxine est ajusté à 5,6 à l'aide d'HCl  $\frac{N}{10}$ , une culture dans un milieu sans toxine servant de témoin.

### 3.2.5. Les hybridations somatiques

L'hybridation des protoplastes est réalisée après leur isolement, dans les mêmes conditions de culture que pour un isolement classique. Les deux variétés ou espèces à fusionner sont traités en même temps. Après les avoir rincés, les protoplastes sont comptés pour chaque isolement, puis mélangés en parties

égales dans un même tube, en suspension dans le milieu C1 ou M : après avoir déposé à l'aide d'une pipette, 5 gouttes séparées de la solution de PEG dans chaque boîte de Pétri, goutte à goutte les protoplastes mélangés des 2 variétés sont placés sur chacune des gouttes de la solution de PEG. Le temps d'incubation varie entre 10 et 40 mn, après rinçage avec la solution C1 ou M répétées 3 ou 4 fois en 20 minutes, nous ajoutons dans chaque boîte 3 à 4 ml de milieu de culture et scellons les boîtes avec du scel -o-frais ; avant de les exposer à la lumière, elles seront gardées pendant 2 jours à l'obscurité, à 25°C.

### 3.2.6. Les conditions d'environnement

Les expériences dans leur ensemble se pratique<sup>nt</sup> dans une pièce affectée à cet effet et dont les caractéristiques sont les suivantes :

- Pièce à culture climatisée à la température de 25°C, les éclairage de 2 200 lux ou de 3 500 - 4 000 lux fournis par 1 à 6 lampes Philipps De Luxe de 40 W/55.

La photopériode est de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité.

### 3.2.7. Les transferts

#### 3.2.7.1. Lors du bouturage

Lorsque nous avons travaillé avec le milieu de KNOP et le milieu N°4 nous n'avons pas opéré le transfert des explants sur d'autres milieux. Par contre notre technique de multiplication rapide nécessitait un bouturage en 2 temps = avec débourement

rapide des bourgeons dans le milieu 6, suivi de l'enracinement de la pousse obtenue après un temps relativement court dans le milieu 15.

### 3.2.7.2. Au cours de la culture des cals et des méristèmes .....

Après un certain nombre de jours dans le milieu d'ensemencement, les explants qui ont développé des cals seront transférés sur d'autres milieux de culture.

Dans le milieu d'ensemencement (milieu 1) après 20 jours la croissance de l'explant est également stoppée ; il faut alors repiquer les explants de 0,2 - 0,3 mm sur le milieu 6, puis les remettre sur le milieu 4. Les explants plus grands sont transférés directement du milieu N°1 au milieu N°4.

### 3.2.7.3. Au cours des cultures de protoplastes .....

Le mauvais développement des protoplastes dans le milieu d'isolement C<sub>1</sub> nécessite des transferts souvent répétés dans le milieu C<sub>2</sub>; à partir de 21 jours de culture sur milieu liquide nous remettons les cals sur un milieu gélosé.

Le milieu M que nous avons mis au point a permis une évolution favorable des protoplastes depuis leur ensemencement jusqu'à 30 jours sans opérer de transfert dans un autre milieu liquide.

## 3.2.8. Les observations réalisées

### 3.2.8.1. Au cours du bouturage in vitro .....

Les principales observations sont orientées vers la reprise des boutures pour les différents cultivars analysés

de leur vigueur, des délais d'apparition de la pousse, de l'apparition des racines .

#### 3.2.8.2. La culture des cals et méristèmes .....

Nous nous sommes intéressés aux différents types de cals obtenus suivant la nature des explants mis en culture et à leur différence de comportement en fonction des concentrations des milieux en phytohormones.

Au niveau des explants de méristèmes, les observations portent sur la callogénèse, l'apparition des modules verdâtres sur le cal, la vigueur des pousses et leur potentialité rhizogène .

#### 3.2.8.3. Au niveau de la toxine bactérienne .....

Nos observations ont porté sur l'apparition du flétrissement qui est la manifestation la plus importante observée dans les plantations attaquées par la bactériose. Nous n'avons pas considéré le brunissement qui peut parfois affecter le lobe foliaire au cours d'un test, car la cause de ce brunissement n'est pas toujours bien définie.

#### 3.2.8.4. Au niveau des protoplastes .....

L'obtention de protoplastes viables en bon état et sans beaucoup de débris dans l'isolement, la maintenance en vie parfaite des protoplastes sont nos premiers objectifs.

Nous étudions au cours de la culture, la formation des vacuoles, le comportement des chloroplastes, le grandissement cellulaire, la formation des travées cytoplasmiques, l'apparition

des divisions cellulaires (bourgeonnement et clivage), la formation des colonies cellulaires et l'apparition des cals macroscopiques.

Ces observations ont été également effectuées lorsque le milieu d'ensemencement renfermait la toxine. Dans ce dernier cas, nous comptabilisons les taux de mortalité des cellules dus à la présence de la toxine en fonction des taux observés ordinairement dans le milieu sans toxine. Dans ces conditions nous avons souvent noté la formation des miniprotoplastes.

Au niveau de l'hybridation somatique, les principales observations que nous avons réalisées sont les facilités de fusion cellulaire et l'apparition de divisions cellulaires chez l'hybride.

## IV - RESULTATS

4.1. LES ESSAIS DE REGENERATION DE PLANTES  
ENTIÈRES DE MANIOC PAR LES TECHNIQUES  
DE CULTURE IN VITRO

#### 4.1.1. Le micro bouturage

Les boutures aoûtées de 2 yeux permettent une multiplication rapide du Manioc en chambre humide selon la technique de LOZANO (1974), les parties terminales des rameaux (20 à 25 cm) font aussi l'objet d'un bouturage direct en champ. Mais la multiplication rapide des parties non aoûtée de la plante ne peut être obtenue qu'en culture in vitro.

Au cours de nos expériences de microbouturage nous avons noté l'influence de 4 facteurs sur le développement des boutures : la position de la bouture sur la tige, la qualité du cultivar, la composition du milieu de culture et en particulier sa richesse en diverses phytohormones exogènes.

##### 4.1.1.1. L'influence de la position de la bouture sur la tige

Les boutures situées en dessous de la 5ème feuille se développent après 4 jours avec une très forte vigueur. Pour les boutures plus jeunes (situées au dessus de la cinquième feuille), après un débourrement rapide 2 jours après la mise en culture, une callogénèse importante qui ralentit fortement le développement ultérieur de la pousse s'installe. Cependant après 15 jours de culture, avec les 2 catégories de boutures se réalise l'induction rhizogène avec la régénération de plante entière.

##### 4.1.1.2. Le rôle du cultivar utilisé

L'influence du cultivar a été étudié avec des microboutures cultivées sur le milieu de KNOP sans phytohormones. Nous remarquons que les cultivars Malela 1 et MM 78 donnent facilement des plantes après 15 jours avec une réussite de 95 %. Avec le cultivar MA 255 par contre la levée est tardive et la réussite de 50 % seulement. Nous avons alors pensé à l'utilisation d'un



Nous remarquons que pour un nombre de 50 boutures sur chaque expérience, dans le milieu 4, le cultivar malela 1 donne d'excellents résultats alors qu'avec les cultivars MM78 et MA225 nous n'avons respectivement que 50 % et 20 % de formation de pousses. Le milieu 6 par contre améliore le pourcentage d'obtention des pousses au niveau des deux derniers cultivars.

Nous remarquons ainsi que :

- La levée est plus tardive dans le milieu 4 que dans le milieu 6.
- La pousse est plus vigoureuse lorsqu'elle est entretenue sur le milieu 6.
- La formation de cal est observée pour les 3 cultivars, sur le milieu 6.
- Après 15 jours de culture ce milieu 6 provoque le rabougrissement des pousses, (Fig. N°18) et n'induit aucune induction rhizogène. Le milieu de KNOP utilisé par FEREOL (1978) qui favorisait un bon développement de la pousse chez le cultivar malela 1, donne des résultats médiocres sur le cultivar MA 255. Le développement de la pousse feuillée est fortement influencé par la présence de phytohormones exogènes.

Le transfert ultérieur effectué sur le milieu 15 ne contenant que 0,05 mg/l d'ANA montre que lorsqu'il est opéré à un bon moment (au 15ème jour pour les explants sur milieu 6) les racines déjà initiées dans le milieu d'ensemencement se développeront rapidement après 4 à 5 jours ; avec parallèlement une élongation de la tige.

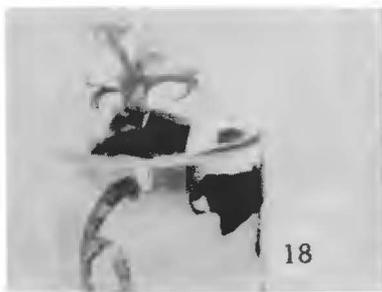


Fig. 17 : Microbouturage (cultivar MA 255)  
 A = ensemencement  
 B = 10 jours après ensemencement  
 (milieu 6 gélosé)  
 C = 10 jours après transfert sur le  
 milieu 15 avec vermiculite  
 (Echelle 15/27)

Fig. 18 : Effets de rabougrissement observés  
 avec le cultivar Maléla 1 après 15 jours  
 de culture sur milieu 6. (Echelle 1).

Fig. 19 : Plantes issues du microbouturage in  
 vitro après leur transfert en pot  
 (Echelle 1/10).

4.1.1.4. Une technique originale de multiplication rapide  
 .....  
 in vitro du manioc : l'obtention de plusieurs pousses  
 .....  
 puis plusieurs plantes entières à partir d'une seule  
 .....  
 bouture.  
 .....

Dès le quinzième jour, nous constatons souvent que la pousse feuillée s'épaissit. Si au vingtième jour, nous transférons les explants sur un nouveau milieu, le milieu 15, il se produit en 5 jours une élongation rapide de la tige et le départ des bourgeons axillaires en pousses feuillées. Dans les meilleures conditions, sur le cultivar Malela 1, en 5 jours, l'explant va former sur ce milieu 15 de nombreuses pousses axillaires de 5 à 10 mm de longueur. Lorsque nous isolons les pousses axillaires et que nous les transférons à nouveau sur le milieu 15, elles vont s'enraciner en 5 jours.

Le tableau N°VII indique la quantité de pousses enracinées obtenues après 30 jours à partir d'une unique bouture du cultivar maléla 1 prélevée en serre et d'une autre bouture issue, elle, d'une plante cultivée in vitro.

TABLEAU N° VII : levée de nombreux bourgeons axillaires et obtention de plantes entières à partir d'une seule bouture.

Origine de la bouture initiale	Nombre de plantes obtenues	
	en période favorable (juin - août)	pour les mois de décembre et janvier
Elevée en Serre	10	5
Cultivée in vitro	5	3

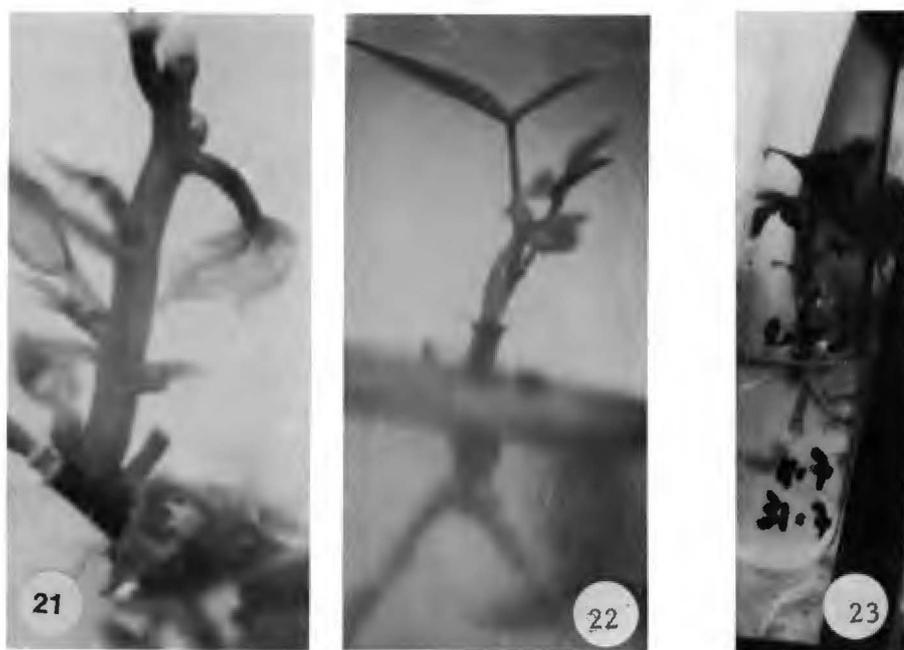


Fig. 20 : Effet de rabougrissement observables sur des boutures du cultivar MA 255  
 A = Pousse rabougrie après 15 jours sur milieu 6.  
 B = Après transfert dans le milieu 15, élongation des pousses axillaires.  
 (Echelle 36:27).

Fig. 21 : Boutures issues de plantes cultivées in vitro avec apparition de 5 pousses axillaires, (Echelle 45/27).

Fig. 22 : Rhizogénèse sur les pousses <sup>avec</sup> formation de cal cicatriciel.

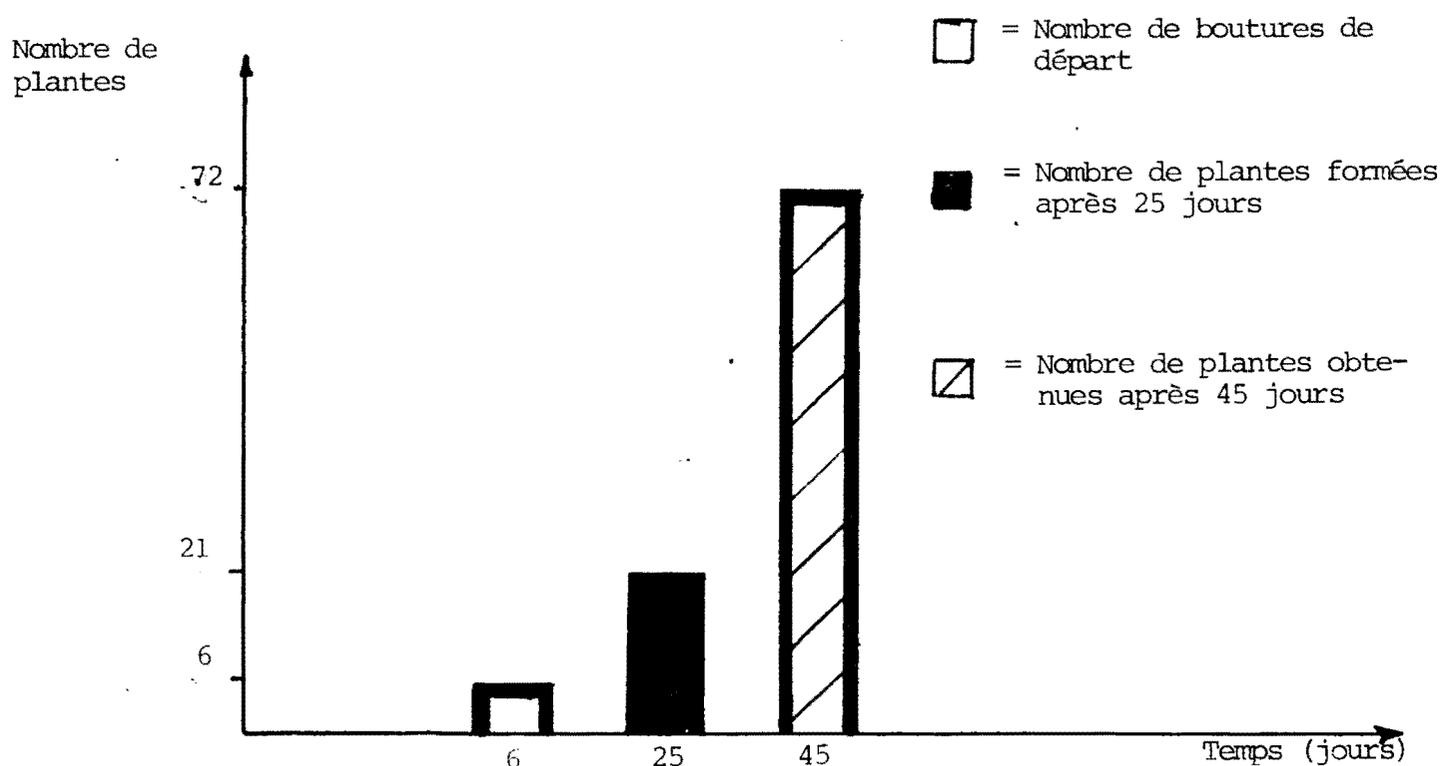
Fig. 23 : L'induction rhizogène sur les pousses sans formation de cal cicatriciel.  
 (Echelle 17/27)

Le tableau N° VII indique que pour les boutures prélevées en serre, nous multiplions la quantité des pousses obtenues par un facteur de 5 à 10 et pour les boutures issues de plantes cultivées in vitro par un facteur qui varie de 3 à 5. Ainsi au bout de 30 jours nous pouvons disposer de 10 plantes enracinées capables de supporter le transfert sur vermiculite en pot.

A partir des plantes ainsi obtenues, lorsqu'elles ont plus de 2 feuilles nous pouvons répéter la même opération et régénérer 5 plantes entières à partir de chaque nouvelle bouture. En 2 mois, à partir d'une seule bouture issue de serre, nous disposons donc de 50 plantes enracinées, en pots.

La figure N° 24 résume les résultats obtenus en 45 jours à partir des boutures prélevées en culture in vitro sur le cultivar CB du 24 mai au 7 juin 1982.

FIGURE N° 24 : Nombre de plantes obtenues après 25 et 45 jours à partir de 6 boutures prélevées des plantes cultivées in vitro.



Dans cet essai, le taux de multiplication entre les deux générations a été identique et égal à  $\frac{21}{6} = \frac{72}{21} = 3,5$ . C'est le taux moyen de multiplication que nous avons observé au niveau des boutures pour les plantes cultivées in vitro. Lorsque nous partons des plantes de serre, ce taux moyen de multiplication est égal à 5.

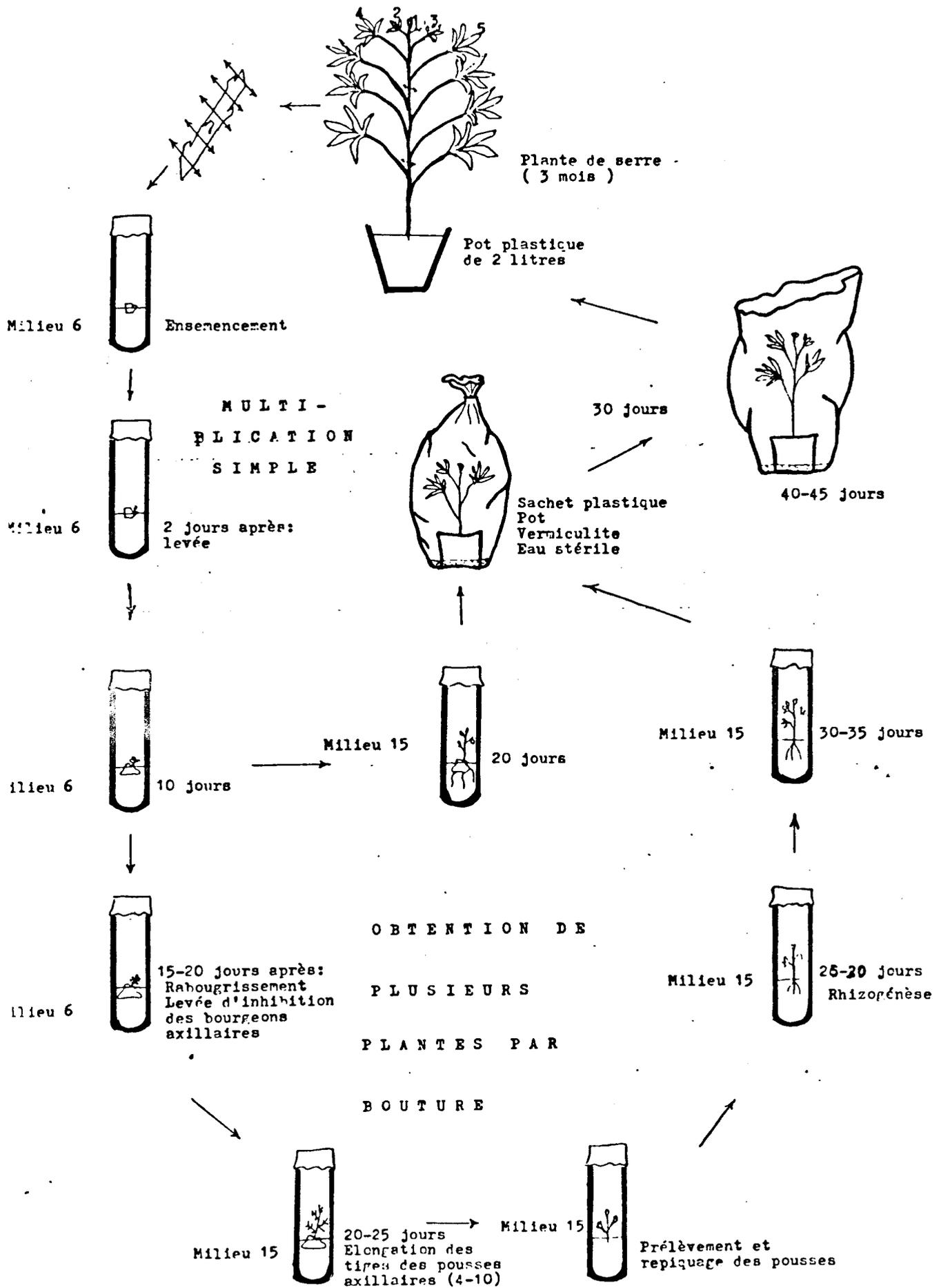
#### 4.1.1.5. Le transfert en pot des plantes obtenues en culture ..... in vitro .....

Le milieu utilisé pour induire la formation des racines est le milieu 15 : milieu de MURASHIGE et SKOOG ne renfermant que  $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$  d'ANA.

Lorsque la pousse a atteint 20 mm et les racines 10 à 20 mm, la plante est capable de supporter le transfert sur vermiculité. Les pousses de 30 mm dépourvues de racines peuvent également s'enraciner facilement sur vermiculite.

Pour ce transfert, des pots de 1/4 de litre en matière biodégradable sont utilisés. Ces pots sont remplis de vermiculite humidifiée par de l'eau distillée, puis autoclavée à  $120^{\circ}\text{C}$  pendant 1 heure. Le transfert en pot s'effectue dans une chambre stérile. Après avoir placé la plante dans le pot, ce dernier est introduit dans un sachet plastique désinfecté à l'alcool, et placé sous un éclairage de 6000 lux à  $25^{\circ}\text{C}$ . Après 7 jours le sachet plastique est ouvert progressivement, après 10 jours la plante est transférée dans un pot plastique de 1 à 2 litres contenant un mélange tourbe 1/3 + vermiculite 2/3 ou puzzolane 3/5 + vermiculite 2/5. Cette plante peut alors se développer en serre, arrosée par une solution minérale fertilisante.

Cette méthode de transfert nous a donné des résultats satisfaisants.



#### 4.1.1.6. Conclusion .....

Le bouturage in vitro du Manioc est relativement aisé. FEREOL (1978) l'avait réalisé avec succès sur le milieu de KNOP. Pour notre part, nous avons montré que la réussite sur ce milieu dépendait du cultivar utilisé. Un cultivar seulement sur cinq que nous avons utilisés donnent des résultats satisfaisants. L'utilisation du milieu de MURASHIGE et SKOOG avec diverses phytohormones (BAP =  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ , ANA =  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a très largement augmenté les chances de réussite pour les cinq cultivars.

#### 4.1.2. Le développement des cals

Les cals se sont formés à partir d'explants divers : pétiole, fragments de lobe foliaire, entrenoeuds et cotylédons.

##### 4.1.2.1. Entrenoeuds et pétioles .....

Les cals obtenus, de formes diverses, sont en majorité compacts. Nous n'obtenons des cals friables que sur les milieux N°4 et 9. Dans ce dernier type de cal, l'épiderme reste vert et seules les parties profondes de l'explant prolifèrent.

Dans les milieux d'ensemencement, aucun explant n'a formé d'organes, c'est pourquoi nous avons opéré le transfert des explants sur d'autres milieux.

Les transferts effectués à partir de cals d'âges différents de 5 à 30 jours, tous les 5 jours, nous montrent uniquement l'initiation des racines. Des résultats analogues avaient été obtenus antérieurement par PARKE (1978) et NAIR et al (1979) alors que TILQUIN (1978) obtenait des plantes entières.



Fig. 26 : Cals obtenus à partir de fragments de pétiole. A gauche, cal avec bourrelets obtenu à partir des fragments de pétiole de 15 mm de longueur; au milieu cal en prolifération active; à droite, cal sous forme de disque compact obtenu à partir d'explants de 3 mm d'épaisseur. (Echelle 18/27).

Fig. 27 : Rhizogénèse sur des explants à prolifération intense. Remarquer que l'épiderme de l'explant reste pratiquement inchangé. (Echelle 1).

Toutes nos observations montrent que le milieu d'ensemencement N°3 est le plus favorable à une organogénèse ultérieure après transfert sur un milieu neuf.

En conclusion, les explants constitués d'entre-nœuds ou de pétiole ont fourni des cals de morphologie très diverse. Malgré la gamme de milieux de culture utilisés et le nombre de transferts effectués nous n'avons pas obtenu de pousses feuillées. La rhizogénèse est la seule forme d'organogénèse décelable.

On admet que le rapport cytokinines /auxines détermine la nature de l'organogénèse sur le tabac (MURASHIGE 1974). Or la rhizogénèse a été observée aussi bien dans les milieux plus concentrés en ANA (4) que dans les milieux moins concentrés (milieux 6, 8, 11, 13, 15) par rapport aux concentrations respectives des milieux en BAP. NARAYANASWAMY (1977) observe qu'en culture des tissus, la rhizogénèse s'obtient beaucoup plus facilement que les autres formes d'organogénèse. Le milieu 4 a favorisé le développement des racines tubéreuses, les autres, des racines normales.

Dans notre milieu 3, les explants manifestent le développement le plus marqué avec une initiation racinaire dès le 15ème jour. Le développement ultérieur des racines ne peut cependant être déclenché que sur transferts sur d'autres milieux.

#### 4.1.2.2. Limbe et cotylédon

L'ensemble de nos essais réalisés sur 96 explants de limbes et de cotylédons utilisera donc ce milieu 3.

#### 4.1.2.2.1. Le limbe

Le limbe adulte a donné les mêmes résultats que le pétiole, formant des cals compacts et durs, mais le transfert sur d'autres milieux n'a déclenché aucune organogénèse.

Le limbe non encore déployé a développé un cal semi friable. 20 jours après l'isolement, ce cal envahit toute la surface libre du milieu (27 mm de diamètre). Il est de couleur blanchâtre ou jaune pâle avec certaines zones superficielles de couleur verte. A la suite de différents transferts sur d'autres milieux, ce cal a initié quelques racines.

#### 4.1.2.2.2. Le cotylédon

Pour ces essais observés sur 96 cotylédons de graines mûres, 96 ont été isolés de fruits cueillis juste avant maturité, 48 de fruits au stade pâteux et 12 des fruits cueillis au stade laiteux.

3 jours après leur ensemencement, les cotylédons se détachent de l'albumen et verdissent. Dès cet instant commence la callogénèse (Fig. 30). L'albumen, lui, n'évolue pas en cal ; il reste blanchâtre (Fig. 32) ; on peut dans ces conditions le dégager.

- Le cal issu des cotylédons extraits des semences au stade laiteux ne s'est formé que sur les 7/12 des explants mis en culture. Il est moins abondant et, est resté blanchâtre ou jaune pâle (Fig. 30).

- Le cal isolé des cotylédons des fruits au stade pâteux va après le verdissement proliférer intensément ; il peut en 15 jours dépasser 15 mm de diamètre (Fig. N°31).

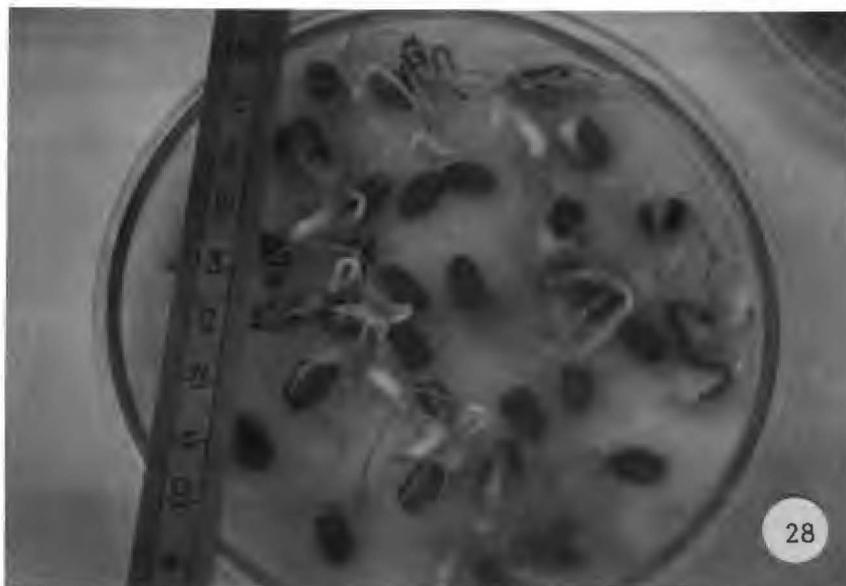


Fig. 28 : Graines mûres de Manioc. Test de germination (90 %).

Fig. 29 : Détail des graines de Manioc entières et disséquées

Fig. 30 : Ensemencement des cotylédons.  
A gauche = cotylédon d'embryon mûr  
A droite = cotylédon de fruit cueilli au stade laiteux.

Fig. 31 : induction organogène : tige et racine sur un cal de cotylédon issu de semences récoltées au stade pâteux.

- Le cal isolé des fruits cueillis juste avant maturité et celui isolé à partir des graines mûres se comportent de la même manière. La majorité des explants, après avoir verdi, grandissent. Cinq jours après la mise en culture, chaque explant peut être divisé en quatre nouveaux explants qui augmentent leur volume de  $1/3$ , puis stoppent leur développement.

### L'organogénèse

L'organogénèse apparaît différemment suivant le type de cal obtenu. Lorsque le fruit est récolté au stade laiteux, les cotylédons n'ont pas fourni de cals organogènes.

Au niveau des explants issus des cotylédons des fruits au stade pâteux nous observons à partir du 15<sup>ème</sup> jour la formation de nodules verdâtres. Sur la masse blanchâtre du cal une partie de ces nodules vont à partir de 20 jours de culture évoluer en pousses feuillées sur le même milieu de culture.

La néoformation de bourgeons a été plus abondante chez les cals issus des cotylédons des semences cueillies immédiatement avant maturité, ou de ceux obtenus à partir des graines mûres. L'explant vert, au développement presque stoppé dès le 10<sup>ème</sup> jour, initie dès le 15<sup>ème</sup> jour, une multitude de bourgeons, dans la région superficielle du cal (Fig. 34). Les bourgeons les plus vigoureux vont se développer rapidement (Fig. 35). A partir du 20<sup>ème</sup> jour, nous assistons à l'allongement des tiges et à la formation de pousses feuillées (Fig. 36). Cette pousse est d'autant vigoureuse qu'elle est seule à se développer sur un même explant. Quand elles sont nombreuses, l'élongation des tiges est plus difficile à obtenir (Fig. 35).

En ce qui concerne l'induction rhizogène, comme nous l'avons vu sur les cals de pétiole, l'enracinement a été facilement obtenu sur cals de cotylédons. En dehors



Fig. 32 : Callogénèse à partir des cotylédons de graines mûres. 5 jours après ensemencement l'albumen reste blanc, le cotylédon verdit. (Echelle 62/27).

Fig. 33 : Callogénèse sur explant de cotylédon extrait de fruit au stade pâteux (Echelle 85/27).

Fig. 34 : Caulogénèse sur calcs de cotylédon provenant de graine mûre (après 15 jours). (10/15).

Fig. 35 : Elongation de la tige chez la pousse néorformée (graine mûre). (Echelle 35/27).

Fig. 36 : Formation de pousse feuillée (graine mûre). (Echelle 35/27).

Fig. 37 : Formation de plante (cotylédon extrait des fruits au stade pâteux). (Echelle 3/5).

de ceux qui ont initié des nodules verdâtres, les cals des explants isolés à partir des fruits au stade pâteux ont dans l'ensemble développé des racines, mais n'ont pas formé de bourgeons. En ce qui concerne les fruits cueillis juste avant maturité, 50 % des explants ont fourni uniquement des racines après 20 jours. Chez les explants qui ont initié des bourgeons, la rhizogénèse a été déclanchée lorsque les pousses ont atteint une longueur supérieure à 5 mm avec 2 ou 3 feuilles (Fig. 37).

L'obtention de plantes entières à partir de cotylédon est relativement aisée. La plante entière est régénérée après 25 jours. Cette régénération dépend de l'âge du cotylédon; en effet, nous n'observons pas d'organogénèse avec les explants issus de fruits récoltés au stade laiteux ; les cotylédons récoltés dans les semences au stade pâteux fournissent des cals abondants qui peuvent initier des bourgeons; les graines mûres donnent des cotylédons qui développent les bourgeons à partir des zones superficielles, avec une faible induction callogène.

TABLEAU N° VIII : Comportement en culture in vitro des cotylédons suivant l'âge des semences.

Stade de maturation	Callogénèse	Caulogénèse	Rhizogénèse	Formation de plante en %	Temps en jours
FRUITS	Laiteux	+	-	0	-
	Pâteux	+++	+	+++	20-50
GRAINES	Immatures	++	++	50	30-45
	Mûres	+	+++	90	25-30

Le signe + indique l'existence du phénomène, le signe - son absence. Le milieu d'isolement est le milieu 3.

Nous avons donc enregistré une callogénèse abondante et une formation de quelques nodules méristématiques pour des milieux renfermant de fortes quantités d'ANA. Une forte quantité de BAP (plus de  $1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) n'a pas déclenché la formation de pousses feuillées. L'association des phytohormones présente dans le milieu 3 (ANA =  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  ; AG<sub>3</sub> =  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) permet le déclenchement à la fois de la caulogénèse et de la rhizogénèse, lorsque les cotylédons sont extraits de graines mûres. En un mois les plantes néoformées peuvent atteindre une longueur de 15 mm à 25 mm et supporter facilement le transfert en serre. La régénération de plantes entières à partir des cotylédons de graines mûres est importante (90 à 95 %). Les régénérations observées à partir des cotylédons des graines prélevées dans les fruits immatures (environ 50 %) montrent que cette technique, également réalisable à ce stade précoce, peut faciliter au niveau de la sélection l'obtention rapide de renseignement sur la plante avant la multiplication en champs, et permettre aussi le développement accéléré d'un génotype sélectionné.

#### 4.1.2.3. Discussion .....

Dans nos expériences, il n'a pas été possible d'obtenir la néoformation de plantes entières à partir des entrenoeuds des pétioles, et du limbe. Ces résultats sont en accord avec ceux enregistrés antérieurement par KARTHA et al 1974 NAIR et al (1979) et PARKE (1978). Nous avons pu remarquer que l'épiderme ne proliférait jamais, seul le tissu profond donnait le cal. Or si l'on croit BIGOT (1976), dans un tissu végétal, il existe des zones privilégiées qui suivant les conditions nutritives peuvent donner naissance à la formation de bourgeons et ces zones sont généralement situées au niveau de l'épiderme. Pour obtenir des pousses à partir des cals issus d'entre-noeuds et de pétioles, il conviendrait d'initier une prolifération de cal au niveau de ces tissus superficiels.

Le succès observé avec les cotylédons montre qu'il est par contre aisé d'obtenir des plantes entières en partant des tissus embryonnaires. Dans certaines conditions de culture, les cellules du cotylédon, organe juvénile, peuvent facilement se dédifférencier puis se redifférencier pour initier des organes.

Une graine représente cependant un matériel génétique hétérogène, la propagation d'un clone homogène n'étant donc pas possible à partir de ces graines ; elle peut par contre être envisagée à partir d'un organe jeune tel que l'apex caulinaire.

#### 4.1.3. L'isolement et le développement in vitro des apex caulinaires

##### 4.1.3.1. La morphogénèse et l'induction des cals

Une callogénèse abondante se produit rapidement chez les explants d'apex. L'explant de 0,2 à 0,3 mm de diamètre, lors de son ensemencement, peut après 7 jours donner un cal de 1 à 2 mm de diamètre. La croissance de ce cal est ensuite ralentie, puis totalement bloquée au bout de 10 jours.

Pour les explants dépassant 0,3 mm de diamètre au moment de leur ensemencement, des cals encore beaucoup plus volumineux pouvant atteindre 10 à 15 mm de diamètre, se formeront en 15 jours.

##### 4.1.3.2. L'inhibition du développement de l'explant-apex

Au moment où la callogénèse est stoppée sur les explants de 0,2 à 0,3 mm, des bourrelets verdâtres s'individualisent au niveau du dôme apical et la croissance de l'apex reste inchangé, même pendant un mois, si nous ne le transférons pas sur un nouveau milieu de culture (Fig. 38).

Les apex de 0,4 mm de diamètre vont développer des pousses feuillées nombreuses à partir du 10ème jour sur un cal qui poursuit sa croissance. L'apex de 0,6 à 0,8 mm va développer une pousse vigoureuse sur un cal volumineux. Dans tous les cas, le développement de la pousse est ralenti après 15 à 20 jours si l'explant est maintenu sur son milieu d'isolement (milieu 1).

#### 4.1.3.3. Le développement des pousses

L'inhibition du développement des explants constatée pour l'ensemble des explants isolés sur le milieu 1, nous a conduit à réaliser des transferts sur d'autres milieux.

##### 4.1.3.3.1. Apex de 0,2 à 0,3 mm de diamètre

Ces explants, bloqués après 20 jours lorsque le cal atteint 2 mm à 3 mm de diamètre, sont transférés une lère fois sur le milieu 6. Les cals vont alors se développer pour passer de 2 mm à 10 mm de diamètre en 10 jours. Parallèlement, nous observons une formation de touffes feuillées (Fig. 39). Un second transfert sur milieu 4 permet le développement de ces pousses formées, et favorisent leur élongation. Les pousses peuvent être jusqu'au nombre de 4 sur le même cal et sont de même longueur (Fig. 40).

##### 4.1.3.2.2. L'apex de 0,4 à 0,8 mm

Pour ces explants, le cal est bien développé sur le milieu d'isolement (milieu 1). Au cours du repiquage sur le milieu 4, nous éliminerons les 2/3 de ce cal. Ce transfert déclenche l'élongation de tiges vigoureuses et nombreuses (Parfois 7 sur un même cal).

4.1.4.4. L'obtention de plusieurs pousses à partir d'un seul  
 .....  
 explant  
 .....

Nous appelons pousse d'ordre 1 ou de niveau 1 la pousse "normale" issue du développement direct de l'apex. La pousse d'ordre 2 est une pousse néoformée, développée à partir du cal en même temps que la pousse d'ordre 1. La pousse d'ordre 3 est celle que nous obtenons à partir du cal formé sur la pousse d'ordre 2, et la pousse d'ordre 4, celle néoformée au sein du cal de la pousse d'ordre 3, etc....

Dans beaucoup de cas la pousse d'ordre 1 est difficile à récupérer, sauf dans le cas où le diamètre de l'apex explant dépasse 0,5 mm. Dans ce cas, elle se développe avec des entrenœuds courts, se distinguant alors des tiges plus longues issues des bourgeons néoformés. Les tableaux suivants nous montrent les résultats obtenus avec quelques cultivars (= CB, Malela 1 et MM78), en fonction du diamètre des apex isolés in vitro.

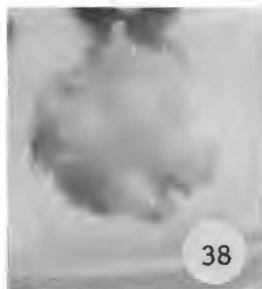
TABLEAU N° IX : L'obtention des pousses feuillées à partir des apex isolés in vitro.

Cultivar CB

Diamètre de l'explant : 0,2 mm - 0,4 mm

Eclairement ; 2.200 lux.

Niveau 1 Apex n°	Niveau 2 Nombre de pousses	Niveau 3 Nombre de pousses
1	4	4 + des amas méristématiques non développés
2	3	7 "
3	2	2 "
4	1	1 "
5	2	2 "
6	2	2 -
7	Nombreux bourgeons	Nombreux bourgeons
Total 7	14 + Bourgeons	18 + de nombreux bourgeons capables de se développer en pousses au niveau 4 ✓



- Fig. 38 : Développement des nodules et inhibition de la croissance de l'apex après 10 jours sur le milieu 1. (cultivar CB : explant de 0,2 mm). (Echelle 4).
- Fig. 39 : Développement des pousses à partir des nodules après un transfert sur le milieu 6 (cultivar CB). (Echelle 7/5).
- Fig. 40 : L'élongation des pousses est obtenue sur le milieu 4. (Echelle 7/5).
- Fig. 41 : Séparation artificielle des nombreuses pousses formées à partir d'un explant unique. (Echelle 5/9).

TABLEAU N° X : Cultivar Malela 1

Diamètre de l'explant ; 0,4 mm - 0,8 mm

Eclairement ; 2 200 Lux

Niveau 1 Apex n°	Niveau 2 Nombre de pousses	Niveau 3 Nombre de pousses
1	2	2 + de nombreux bourgeons
2	3 + des bourgeons	8 + "
3	7 "	18 + quelques bourgeons
4	-	-
TOTAL 4	12 + des bourgeons	28 + de nombreux bourgeons capables se développer en pousses au niveau 4

L'examen des tableaux IX et X nous montre qu'il est possible d'obtenir de nombreuses pousses feuillées à partir d'un seul apex caulinaire de Manioc d'un diamètre compris entre 0,2 mm et 0,8 mm. Lorsque le diamètre de l'explant est inférieur à 0,2 mm nous avons très peu de chance de régénérer une pousse feuillée.

Le transfert des pousses néoformées sur le milieu 15 développe des racines viables en l'espace de 5 jours sur le cal, ou directement, sur les pousses repiquées sans cal à leur base.

Au niveau du cal, se développent des pousses nouvelles, dites pousses d'ordre 3; le cal continue à croître et d'autres amas méristématiques se développent avec la même vigueur. Après 10 jours, en séparant les pousses formées, un autre repiquage permet d'obtenir des pousses d'ordre 4.



Fig. 42 : Formation de pousses d'ordre 3 sur un cal. (Echelle 17/27).

Fig. 43 : Développement en pot d'une plante néoformée. (Echelle 1/2).

Fig. 44 : Transfert de la plante en pot plastique. (Echelle  $\frac{3}{10}$ ).

Fig. 45 : Développement des plantes néoformées en serre. (Echelle 1/8).

Dans les cas les plus favorables, nous avons obtenu des pousses d'ordre 4 aussi vigoureuses que les pousses d'ordre 2.

#### 4.1.3.5. Discussion

Pour KARTHA et al 1974 l'obtention de plante de Manioc se faisait en une seule étape après 25 jours (LIU 1975 ; NAIR et al. 1979 ; KARTHA 1975, 1978 ; KAISER et TEEMBA 1978, ADEJARE et COUTTS 1981). Nos travaux n'ont pas permis l'obtention d'une plante en une seule étape sauf pour les explants dont le diamètre est supérieur à 0,5 mm. Nos explants développent un cal abondant dans lequel s'initie la néoformation de bourgeons qui ne se développent en pousses feuillées que lorsque les explants passent au moins 10 jours sur le milieu 4.

L'obtention de nombreux bourgeons à partir d'un seul apex nous a permis de mettre au point une technique de multiplication clonale rapide du manioc. En 35 jours, nous pouvons dans les meilleures conditions obtenir 30 à 50 plantes viables capables de se développer en serre.

#### 4.1.4.6. Origine et conditions de néoformation des bourgeons

Les pousses feuillées obtenues peuvent provenir des ébauches foliaires entourant l'apex isolé. Mais, certaines, au niveau du cal, sont nées de bourgeons néoformés. Ce phénomène a été maintes fois signalé par BIGOT (1976 et 1978).

et KHODER (1981). Nous l'avons nous même observé sur les explants de cotylédon. Les photos des figures 46, 47, 48 permettent d'observer une intense néoformation de bourgeons au niveau de l'explant apex.

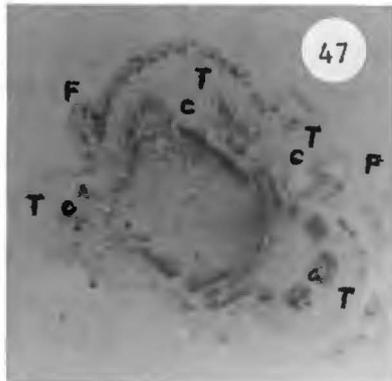


Fig. 46 : Apex en culture depuis 30 jours dont le développement a été stoppé. Remarquer les nombreux nodules. (Echelle 7/3).

Fig. 47 : Coupe histologique sur l'apex du cultivar *Glaziovii* dont le développement a été stoppé. Remarquer l'initiation de nouveaux nodules méristématiques. (apex de 0,2 mm). F = Ebauche foliaire ; C = Corpus ; T = Tunica (Echelle 5).

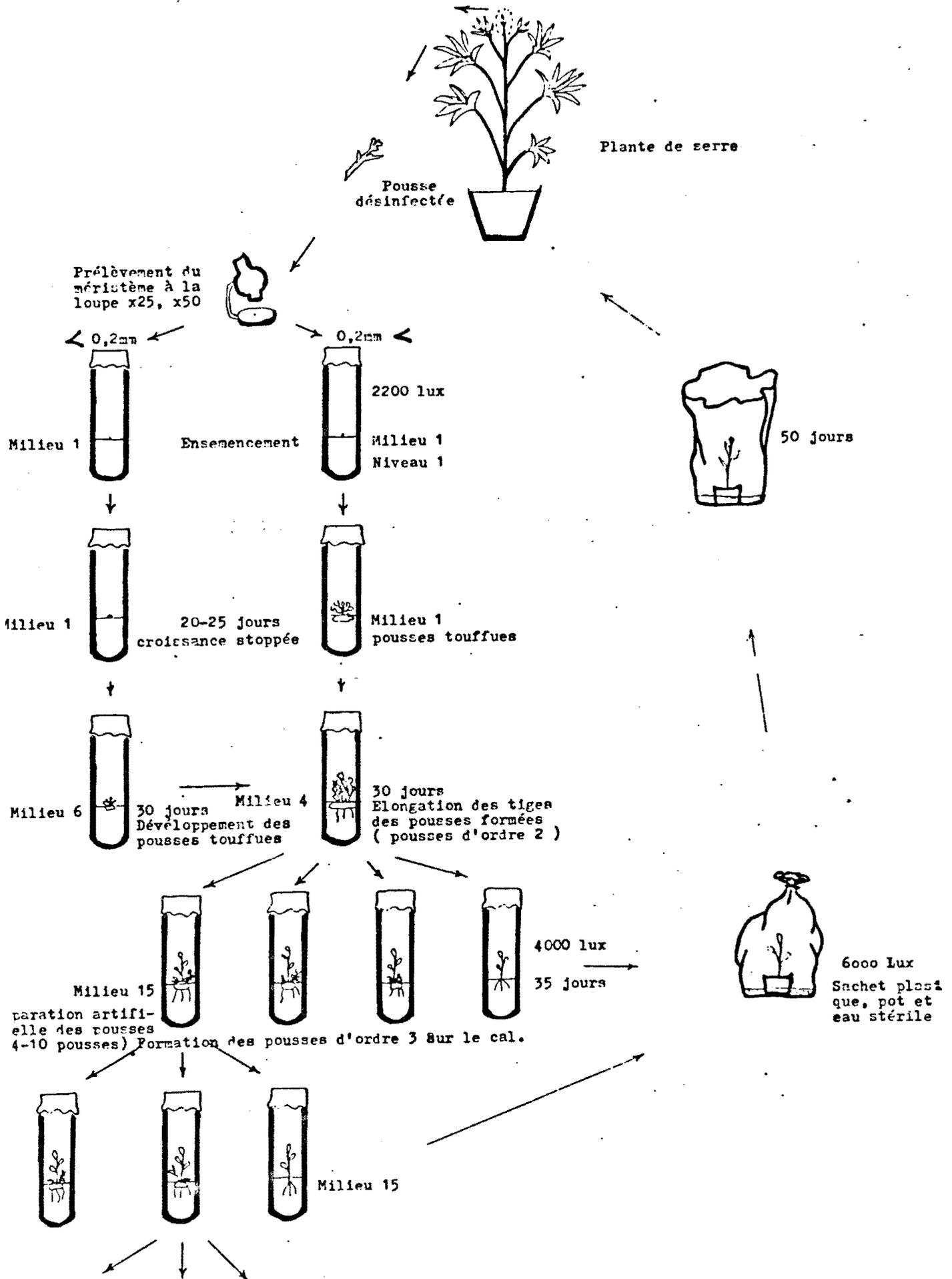
Fig. 48 : Coupe histologique dans un apex dont le développement est stoppé. (cultivar CB ; apex de 0,4 mm). Les flèches indiquent l'initiation de nouveaux nodules méristématiques. (Echelle 12).

Au cours de nos expériences nous avons remarqué que la néoformation des bourgeons était favorisée par un faible éclaircissement de 2 200 lux, la callogénèse conditionnant leur évolution ultérieure en pousses feuillées utilisables.

De même, LEFEBVRE (1979) a montré que le maintien à l'obscurité permettait aux tissus de racines d'endive de mieux exprimer leur faculté de bourgeonner. BIGOT (1976) a noté également la diversité des potentialités cellulaires au cours de la différenciation, soulignant ainsi la faculté de l'épiderme ou de l'assise sous épidermique à mettre en oeuvre un programme caulogène.

Les cellules du *dôme* apical sont aptes à répondre spécifiquement à la présence de la BAP en fonction des conditions d'éclaircissement. Ces cellules forment rapidement un massif large de 3 à 10 mm, massif qui peut évoluer en "plateau de prolifération" des bourgeons. C'est le retour rapide à un état de jeunesse provoqué par la formation d'un important cal qui a créé chez certaines cellules du *dôme* apical la réaction organogène.

Quand le plateau de prolifération mesure moins de 3 mm de diamètre, (Fig. n° 38, 46, 47, 48) l'élongation des tiges des bourgeons néoformés est alors nulle. Par contre dans le cas d'une callogénèse importante, le plateau de prolifération est large. Il s'établit de la sorte des corrélations d'inhibition entre les bourgeons : les bourgeons les plus développés évoluant en pousses vigoureuses, inhibent les bourgeons les moins développés, jusqu'à la levée d'inhibition qui s'opère après la séparation artificielle des différentes pousses formées (Fig. 42).



#### 4.1.4. Conclusion sur les essais de régénération de plante de manioc par les techniques de culture in vitro

Nous connaissons maintenant les multiples possibilités de multiplication végétative que nous offrent les tissus de Manioc cultivés in vitro.

Nous savons maintenant que sans éliminer l'apex caulinaire, nous pouvons à partir d'une pousse obtenir plusieurs autres pousses feuillées en stimulant le développement des bourgeons axillaires. Cette technique nous permet donc de disposer d'un grand nombre de plantes viables en un temps très court.

Un enracinement facile des pousses vigoureuses de plus de 5 mm est déclenché sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG gelosé à 6 % et additionné de  $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$  d'ANA, et, le transfert en serre des plantes viables est aisément réalisable.

La néoformation des bourgeons au niveau des cals de cotylédons et des cals d'explants d'apex caulinaires souligne également les potentialités organogènes du manioc.

Il nous est alors permis d'envisager la culture plus délicate du protoplaste de Manioc, jusqu'à son ultime développement ; les plantes régénérées à partir des cals issus de protoplastes.

4.2. LES RECHERCHES SUR LA TOXINE  
BACTERIENNE

4.2.1. Le comportement du lobe foliaire dans les conditions des bio-essais

L'organe choisi pour nos bio-essais est le lobe foliaire.

Comme le montre le tableau XI et les fig. 50 et 51, la feuille de Manioc ou le lobe foliaire restent des organes vivants même en dehors de la plante dont ils sont issus et ils peuvent normalement s'enraciner en formant des racines nourrices puis rester en survie pendant plus de 10 mois. Au cours de nos essais, les jeunes lobes continueront leur croissance en tube pour atteindre leurs dimensions normales. Les racines émises à la base du lobe foliaire ont moins de 6 cm de longueur. Après le 8ème mois, le lobe commençait à jaunir lentement.

TABLEAU N°XI : Les possibilités de survie des organes isolés de manioc, marquées par l'enracinement des lobes de manioc, de la feuille très jeune (N°1) à la feuille plus âgée (N°8)

Age des feuilles prélevées	nombre de lobes foliaires	quantités de lobes foliaires				longueur des racines (en cm)
		Sains	contaminés	Morts	enracinés	
1	6	6	0	0	6	6
2	6	3	2	1	1	6
3	6	1	5	0	0	0
4	6	3	3	0	2	6
5	6	5	1	0	2	5
6	6	5	0	1	0	0
7	6	6	0	0	1	1
8	6	5	0	1	1	3
TOTAL	48	34	11	3	13	

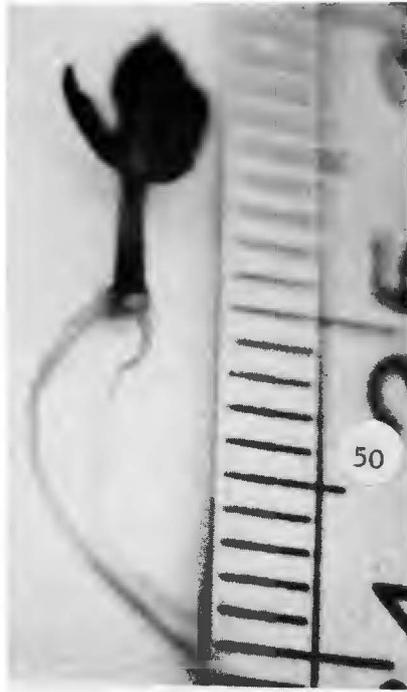


Fig. 50 : Photographie montrant l'enracinement d'une très jeune feuille de Manioc.

Fig. 51 : Enracinement dans les conditions du bio essai d'une feuille adulte de Manioc. (Echelle 1).

Ces observations faites après 1 mois indiquent que les lobes très jeunes ont une forte tendance à l'enracinement. Cependant nous observons le phénomène même pour les feuilles âgées chez lesquelles les racines peuvent apparaître après 45 jours.

#### 4.2.2. Le bio-essai sur le filtrat de culture

Le dispositif des bio-essais est le suivant :

- 2 cultivars : CB et MM 78 , tous les deux sensibles à la bactériose sont sélectionnés
  
- Pour chaque cultivar, nous utiliserons :
  - . 3 tubes avec le filtrat de culture bactérienne
  - . 1 tube témoin cellulose.
  - . 1 tube de témoin eau
  - . 1 tube de témoin glucose

L'observation notée dans notre expérience est l'apparition manifeste du flétrissement sur les lobes foliaires après 3 jours. Le filtrat de culture induit un flétrissement sur les lobes foliaires de CB ou MM 78 par contre, les lobes sur milieux témoins divers ne montrent aucun symptômes de flétrissement. (figure 52).

Le bio-essai ainsi pratiqué révèle la présence d'un produit toxique dans le filtrat de culture. La toxicité de ce produit vis à vis du lobe, organe viable, s'est manifestée par l'induction du flétrissement. La culture du *Xanthomonas manihotis* sur un milieu synthétique a donc conduit à la formation d'un composé toxique pour la feuille de manioc, transmis par le filtrat.



Fig. 52 : Photographies montrant les aspects d'un bio essai avec le cultivar MM 78. Avec le traitement B1, lobe de droite, on remarque un flétrissement net du lobe foliaire après trois jours. Les témoins substrat cellulose et eau ne montrent aucun symptôme de flétrissement. (Echelle 24/27).

#### 4.2.3. Les effets du pH sur la toxicité du filtrat de culture.

Notre milieu de culture pour la préparation du filtrat a utilisé le HEC comme substrat de culture. Deux pH ont été choisis pour ce test :

A = pH 3,5 (l'ajustement se fait à l'aide de HCl  $\frac{N}{10}$ )

B = pH 7 (l'ajustement se fait à l'aide de KOH  $\frac{N}{10}$ )

L'essai comportait alors 2 traitements et 4 témoins.

Traitement A = 3 répétitions

Traitement B = 3 répétitions

- Témoin substrat A = 1 répétition
- Témoin substrat B = 1 répétition
- Témoin eau A = 1 répétition
- Témoin eau B = 1 répétition

Les observations faites après 3 jours ont montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les traitements A et les traitements B qui ont tous montré des symptômes de flétrissement identiques.

#### 4.2.4. Le bio-essai avec le composé toxique purifié

Le filtrat de culture a été obtenu après culture des bactéries sur un milieu synthétique. Afin de pouvoir utiliser l'élément toxique avec beaucoup plus d'efficacité, il convenait de le débarrasser d'autres composants chimiques qui pouvaient être associés à la toxine.

Nous avons donc essayé de réaliser les cultures bactériennes sur 2 substrats différents (hydroxyéthyl cellulose = HEC

et acide polygalacturonique = APG), de comparer la technique qui utilise l'éthanol et celle avec le méthanol et l'acétate d'éthyle. Nous avons également fait des essais de comparaisons entre les différents substrats carbonés (HEC, APG, et carboxymethyl cellulose = CMC). Nous avons ensuite comparé les techniques qui utilisent les résines échangeuses d'ions à celles qui utilisent la dialyse.

4.2.4.1. Purification à partir des filtrats réalisés sur le  
 .....  
 HEC et l'APG  
 .....

La purification est réalisée par le méthanol et l'acétate d'éthyle. Les extraits obtenus à chaque étape ont tous montré des effets toxiques se manifestant par le brunissement des lobes foliaires. Mais nous avons pensé que la toxine étant peu soluble dans l'acétate d'éthyle, une grande partie de la toxicité pouvait être restée dans la fraction aqueuse.

4.2.4.2. Comparaison entre 2 techniques de purification :  
 .....  
 une technique utilisant l'éthanol et l'autre le méthanol.  
 .....

Nous avons dans cet essai comparé deux techniques de purification, celle qui consiste à déprotéiniser le filtrat concentré avec du méthanol et celle qui précipite les polysaccharides avec de l'éthanol.

Les extraits purifiés à l'éthanol ont provoqué des symptômes importants de flétrissement, confirmant ainsi les observations faites au niveau du bio essai avec filtrat de culture brut. L'utilisation du méthanol entraîne par contre une perte

de toxicité car le méthanol peut provoquer la précipitation d'une partie des polysaccharides toxiques responsables du flétrissement.

#### 4.2.4.3. Le choix de la source de carbone

Pour nos essais, nous disposons de 3 substrats carbonés : le HEC, le CMC et l'APG. Lorsque nous mettons la souche de *Xanthomonas manihotis* en culture sur les 3 substrats, nous remarquons après 2 jours que le parasite se développe convenablement sur le HEC et l'APG et moins bien sur le CMC.

Par ailleurs, une comparaison établie entre les témoins HEC et APG dans les bio essais montre que le substrat APG manifeste une légère toxicité sur les lobes foliaires des bio essais.

Dans nos tests ultérieurs, nous utiliserons par conséquent le HEG comme source de carbone utile à la culture du parasite.

#### 4.2.4.4. Comparaison entre les techniques qui utilisent les résines échangeuses d'ions et celles qui utilisent la dialyse

Dans le but d'éliminer les acides organiques et les sels minéraux que peut contenir l'extrait toxique, nous avons d'une part, effectué le passage de l'extrait sur des résines cationiques (BIO RAD DOWEX 50 10 - x 8) et anioniques (Amberlite IRA 400) et d'autre part opéré une dialyse de l'extrait à 4°C pendant une nuit.

Le bio-essai comprenait alors les traitements suivants :

- 1 traitement A = passage à travers des résines  
(avec 3 répétitions)
- 1 traitement B = dialyse avec boudin de cellophane  
(avec 3 répétitions)
- 3 témoins dont :
  - . 1 témoin cellulose avec résines
  - . 1 témoin cellulose avec dialyse
  - . 1 témoin eau

Les observations indiquent en plus du flétrissement un brunissement à la base des lobes foliaires avec l'extrait issu des traitements avec résines, alors que les extraits issus des traitements par dialyse ne provoquent que le flétrissement. La dialyse de l'extrait avec un boudin de cellophane a donc été conservée pour la purification des toxines réalisée de la manière suivante :

- Ensemencement de la souche de *Xanthomonas manihotis* laissé sur un milieu LPGA pendant 2 jours à l'obscurité et à 25°C.
- Culture du parasite sur milieu liquide agité à 25°C à l'obscurité pendant 2 jours. Ce milieu contient de l'hydroxyéthylcellulose comme source de carbone (HEC)
- Le filtrat de culture est obtenu en centrifugeant la solution de culture du parasite à 2 500 tours/mn pendant 10 mn puis en filtrant le surnageant à travers un filtre millipore de porosité 0,45  $\mu$ m.
- après concentration du filtrat au 1/10 du volume initial la précipitation par 15 volumes d'éthanol 95°C pendant

une nuit à 4°C à l'obscurité est réalisée, puis, récupération du précipité par centrifugation à 2 500 tours/mn pendant 10 mn et séchage du précipité à l'étuve 60°C pendant une nuit.

- Ce précipité est repris dans l'eau bidistillée et dialysé avec un boudin de cellophane pendant une nuit à 4°C et à l'obscurité.

#### 4.2.4.5. Discussion des résultats

Les bio essais que nous avons réalisés indiquent un effet toxique des filtrats de culture de *Xanthomonas manihotis*, obtenus après passage de la solution de culture à travers un filtre de porosité 0,45 µm. Cette action toxique s'exprime par le flétrissement du lobe foliaire : organe que nous avons utilisé pour nos bio essais. Les témoins utilisés n'ayant jamais exprimé des symptômes de flétrissement, on peut affirmer que cette action toxique est bien liée à la culture du parasite sur le milieu liquide. La culture de *Xanthomonas manihotis* sur milieu synthétique produit donc une substance toxique capable d'induire un flétrissement sur les lobes des feuilles fraîchement cueillies des cultivars CB et MM 78.

Les extraits purifiés produisent les mêmes symptômes que ce filtrat de culture brut. Le procédé de purification qui a utilisé la méthode de GOODMAN et al 1974 consistant à précipiter les polysaccharides par l'éthanol semble indiquer que le composé toxique responsable du flétrissement observé sur les lobes du bio essai est de nature polysaccharidique. Le fait que le milieu de culture utilisé contient de la cellulose comme source de carbone rend difficile la purification totale du composé toxique dans les conditions de nos essais, cependant le stade de purification atteint par notre méthode est néanmoins suffisant pour que le composé toxique obtenu puisse être utilisé pour un éventuel

criblage des cultivars de Manioc.

#### 4.2.5. Validité et limites du bio-essai

Le lobe foliaire du Manioc est un organe qui continue à vivre longtemps après son isolement de la feuille. Dans les conditions de nos bio-essais, le lobe reste vert pendant près de 7 mois en initiant des racines fonctionnelles.

La cellulose contenue dans certains milieux ne provoquera le flétrissement des lobes foliaires placés sur milieu témoin que tardivement bien après le temps requis pour l'élaboration de nos bio-essais lorsque les températures sont supérieures à 25°C.

Nos bio-essais ont toujours un témoin ayant subi le même processus que le traitement étudié. Dans ce test, l'observation principale a été le flétrissement (fig. 53 et 54) qui représente le symptôme principal de la maladie au champ. En dehors du jaunissement que nous avons éventuellement noté sur le témoin après la durée normale du test, nous observons parfois un enroulement des bords supérieurs des lobes pendant le temps normal, du test : ce phénomène intervient généralement lorsque la température est élevée, supérieure à 30°C.

Divers facteurs peuvent influencer l'apparition du flétrissement.

#### L'âge de la feuille

Dans nos expériences, les feuilles situées en dessous de la cinquième feuille du rameau fournissaient la meilleure réponse. Par contre, les feuilles plus jeunes peuvent facilement flétrir au moindre choc, avec n'importe quel polysaccharide en solution concentrée.

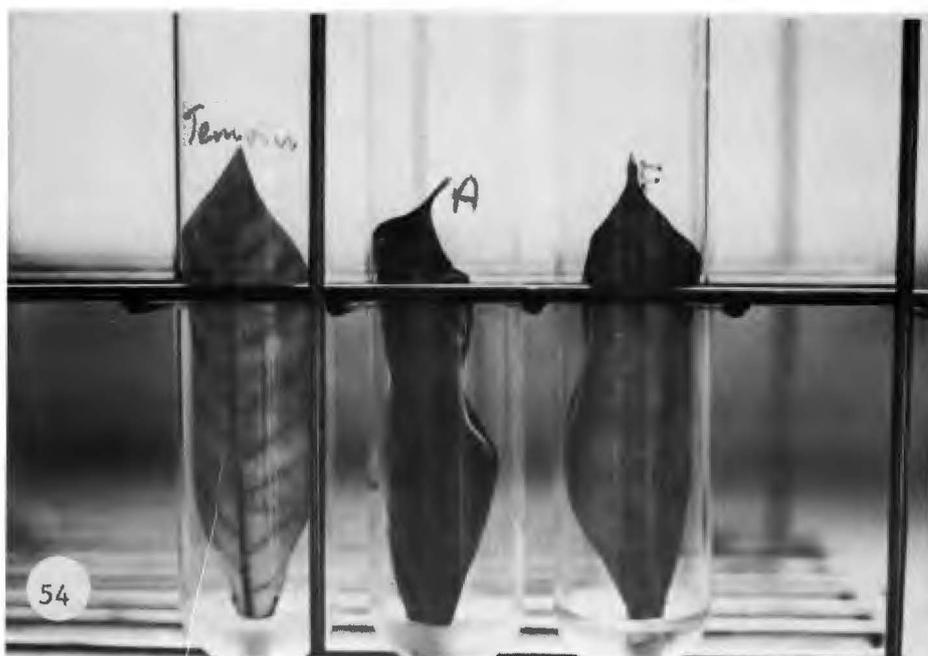


Fig. 53 : Photographie montrant le flétrissement obtenu dans les conditions du bio essai chez le cultivar CB. (Echelle 20/27).

Fig. 54 A = traitement toxine purifiée  
F = Filtrat de culture  
Le témoin ne montre pas de symptôme de flétrissement.  
Le traitements par les toxines induit un flétrissement plus manifeste que celui observé avec le filtrat de culture. (Echelle 20/27).

### La température

La température au moment du test joue un rôle important. La majorité de nos essais ont été effectués à 25°C. Dans ces conditions, le temps requis pour le test est de 3 jours ; mais lorsqu'on opère à 30°C, la réponse est rapide et se fait en 24 heures. Cette température élevée peut alors avec des feuilles jeunes ou des feuilles ombragées conduire à un flétrissement des lobes sur le milieu témoin HEC, mais alors, le flétrissement observé sur ce milieu témoin est tardif par rapport à celui observé avec un traitement toxique, et il est toujours accompagné d'un jaunissement contrairement à celui dû au composé toxique.

La concentration de l'extrait toxique modifie la réponse du lobe foliaire : ainsi le filtrat de culture induit les symptômes de flétrissement moins marqués que l'extrait toxique concentré, les dilutions à 1/5 de 1/10 de l'extrait fournissent des symptômes moins importants que dans le cas d'utilisation des mêmes extraits dilués (Fig. 54).

La durée de conservation de l'agent pathogène peut modifier également la réponse du bio-essai. En effet si nous considérons les résultats enregistrés de juillet 1981 à juillet 1982, nous constatons que, la souche X1 isolée en juillet 81 ne manifeste plus d'effet toxique dans nos tests du mois d'avril 1982. Cette souche présentait cependant une prolifération normale. Nous avons ainsi été amenés à isoler une nouvelle souche X11 capable d'induire un flétrissement important sur CB et MM 78. Une longue conservation de l'agent dans le milieu liquide est susceptible de modifier son aptitude à produire la toxine.

#### 4.2.6. Les essais de résistance à la bactériose sur 5 cultivars de Manioc

Dans le but de mieux connaître leur comportement vis-à-vis de la toxine, nous avons entrepris un essai avec les 5 cultivars dont nous disposions.

##### Appréciation du flétrissement

Nous avons choisis une échelle de notations allant de 0 à 5.

0 = le traitement sensiblement égal à l'effet témoin  
eau

1 = seule la partie terminale du lobe est flétrie

2 = 1/3 du lobe est flétri

3 = les 2/3 du lobe sont flétris

4 = les 3/4 du lobe sont flétris

5 = le lobe entier est flétri.

L'essai a été effectué à 25°C sous un éclairage continu de 2 200 lux pendant 3 jours, avec un extrait isolé, à partir d'une culture de la souche XII. Les résultats enregistrés sont consignés dans le tableau suivant.

TABLEAU N°XII : Essai d'analyse de la résistance à la toxine de 5 cultivars de Manioc en culture in vitro

Cultivar	MM78	Malela 1	CB	255	Glaziovii
Appréciation	3	2-3	3	1-2	0-1

Ces résultats montrent que CB et MM78 sont les plus sensibles à la toxine. Maléla 1 est un peu moins sensible et si MA 255 ne manifeste que des symptômes atténués de flétrissement le cultivar glaziovii lui semble résistant à la toxine bactérienne. Or ces notations correspondent aux appréciations réalisées sur les collections vivantes de ces cultures. En effet le criblage des cultivars de manioc à Loudima et à Mbé (Congo) a été réalisé pour étudier leur résistance à la bactériose : de 1976 à 1979) nous avons mis en place à Loudima et à Mbé des collections vivantes de cultivars de manioc. Au niveau de ces collections soumises aux attaques naturelles de bactériose, nous avons noté pour chaque cultivar l'importance des attaques de bactériose. Sur une échelle qui varie de 0 à 5 nous avons ainsi considéré que :

- 0 = attaque nulle ou négligeable
- 1 = attaque très faible
- 2 = attaque faible
- 3 = attaque moyenne
- 4 = attaque forte
- 5 = attaque très forte

Les renseignements recueillis durant 3 années sont les suivants :

TABLEAU N° XIII : Analyse de la résistance à la bactériose sur les 5 cultivars en champs.

Cultivars	MM78	Malela 1	CB	MA255	Glaz
Appréciation	3	2	3-4	1-2	-

Dans nos collections, CB est donc légèrement plus sensible que MM78, Malela 1 et MA255 reçoivent des attaques faibles. Le cultivar glaziovii qui ne fait pas partie de nos collections, mais se rencontre dans de nombreuses régions du Congo, n'est pas attaqué par la bactériose.

Il existe donc une différence de sensibilité des cultivars au flétrissement induit par l'extrait toxique au niveau de nos bio-essais et nos appréciations montrent une similitude très étroite avec l'appréciation des sensibilités aux bactéries observables avec les mêmes cultivars en plein champ. Les renseignements recueillis au niveau du bio-essai peuvent donc servir utilement à l'appréciation de la sensibilité à la bactériose des cultivars de manioc. A partir d'une souche de *Xanthomonas manihotis* nouvellement isolée, la production de toxine nous permet de réaliser in vitro un criblage des cultivars, vis-à-vis de leur résistance à la bactériose.

#### 4.2.7. Conclusion

*Xanthomonas manihotis*, agent responsable du flétrissement bactérien du manioc, se développe favorablement sur un milieu synthétique, utilisant comme source de carbone, l'hydroxyéthylcellulose. Le filtrat isolé d'une culture de 2 jours, induit in vitro sur lobe foliaire un flétrissement du même type que celui rencontré dans les plantations attaquées par la bactérie (photo 53).

Après son isolement du filtrat, la fraction purifiée a confirmé les symptômes de flétrissement au niveau des différents bio-essais mis au point au cours de nos expériences (fig. 50, 54). Le flétrissement observé dans nos tests a été plus ou moins intense parfois inexistant suivant que le cultivar est plus ou

moins résistant à la bactériose. Nous pensons donc que ce bio-essai que nous avons mis au point peut également servir de test de criblage à la bactériose pour les cultivars devant être par la suite multipliés en champs. Il a l'avantage de ne pas utiliser directement l'agent pathogène lui même, contrairement aux tests pratiqués jusqu'alors (ARAGO 1931, BANTSIMBA et MABANZA 1976, MARRAÏTE et PERREAUX 1978) qui consistaient à prendre comme inoculum le parasite que l'on injecte dans la plante, ou que l'on met au contact de la plante en blessant les feuilles avec un outil infecté. Ces tests avaient donc l'inconvénient de répandre dans le milieu environnant un inoculum fortement concentré en germes pathogènes.

Si la résistance reconnue des cultivars *Glaziovii* sp est commandée par une barrière génétique, la toxine peut constituer dans ces conditions un milieu sélectif de premier choix dans des expériences de physiopathologie. Dans un milieu sélectif renfermant la toxine il est possible de mettre en culture une population de protoplastes en espérant ainsi induire une variation génétique fournissant des protoplastes capables de résister à la toxine bactérienne.

Dans nos exposés ultérieurs, nous appellerons MANIHOCINE le composé toxique obtenu à partir d'un filtrat de culture de *Xanthomonas manihotis*.

4.3. LE DEVELOPPEMENT DES PROTOPLASTES

ISOLES A PARTIR DU MANIOC

#### 4.3.1. Recherche des meilleures conditions d'isolement des protoplastes sur le Manioc

##### 4.3.1.1. Isolement des protoplastes

Au cours d'essais préliminaires, l'élimination de l'épiderme inférieur du limbe, afin de mettre en contact direct le tissu du mésophylle et la solution enzymatique de digestion, a été effectuée par un brossage de la face inférieure de la feuille, les autres méthodes essayées (coupe fine des feuilles, utilisation du carborandum) donnent des résultats médiocres. Parmi les diverses solutions enzymatiques essayées, celles qui nous ont fourni les meilleurs résultats contenaient une pectinase (le macerozyme R 10) à 0,5 % et une cellulase (la cellulase R 10) dont les quantités sont comprises entre 2 et 3 %.

Les stabilisateurs osmotiques essayés ont été le saccharose (de 0,2 M à 0,4 M), le chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  à 0,2 M) ou le mannitol (de 0,5 M à 0,8 M).

Toutes nos observations indiquent que la concentration molaire convenable en saccharose est de 0,3 M (celle utilisée antérieurement par SHAHIM et SHEPARD 1980). Les protoplastes de Manioc ne supportent pas le  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  à 0,2 M qui nous a donné par contre de bons résultats sur l'orge et le riz. En ce qui concerne le mannitol, les protoplastes viables sont plus nombreux quand ils ont été isolés à une pression molaire comprise entre 0,6 M et 0,8 M. La pression en mannitol a été maintenue pour la suite de nos isollements à 0,7 M. Ces protoplastes isolés en présence de mannitol nous sont apparus de meilleure qualité que ceux isolés en présence de saccharose.

Si pour l'isolement des protoplastes à partir des feuilles prélevées en serre une prémacération des tissus foliaires était nécessaire, par contre les feuilles des plantes cultivées en tubes à essai ne nécessitaient pas de prémacération.

Les résultats obtenus à ce niveau sont reproductibles sur les cinq cultivars choisis.

La solution n° 4 est la plus efficace pour les feuilles prélevées sur les plantes de serre avec une macération d'au moins 120 mn. Ce temps de macération varie suivant le cultivar, mais il est surtout étroitement lié à l'état physiologique des plantes.

Chez les plantes ombragées, abondamment arrosées ou alimentées avec un apport azoté important, le temps de macération peut durer moins de 120 mn, alors que chez les plantes fortement éclairées, 3 H de macération sont nécessaires pour la digestion complète des parois cellulaires. En général, une durée faible de macération donne une grande quantité des cellules allongées et des cellules qui montrent des parois incomplètement digérées. La majorité de ces cellules éclateront quand nous les mettons en culture ultérieurement.

La solution n° 2 est utilisée pour les feuilles des plantes cultivées in vitro. Elle permet une digestion satisfaisante des tissus macérés, pendant 5 H. Nos observations sur l'ensemble des macérations effectuées nous ont permis de constater qu'un reliquat de tissu non complètement digéré reste toujours sur nos tamis après récupération des protoplastes. Nous avons pensé que ce tissu pouvait être récupéré. Nous avons donc mis en route une seconde macération en faisant agir la solution n° 1 pendant 1 H 30. D'une manière générale, les isollements de la deuxième macération ont été plus productifs, mais également plus propres avec beaucoup moins de débris.

Parfois utilisées, les solutions de culture sont utilisables en tant que solutions de rinçage. Avec les solutions D\* et F (ou milieu n° 24) nous obtenons des isollements très propres avec peu de débris. Elles présentent cependant 2 inconvénients :

Lorsque d'une centrifugation à basse vitesse beaucoup de protoplastes (moyens et petits) ne s'agglutinent pas en un culot, ils demeurent en suspension dans le surnageant, et seront par conséquent éliminés. 2 vitesses de centrifugation sont alors utilisées : la 1ère (de 40 g) fournira des protoplastes de 15  $\mu$  à 30  $\mu$  de diamètre. La 2ème (correspond à 900 g) permet de récupérer les protoplastes d'un diamètre de 7  $\mu$  à 15  $\mu$ . La mise en culture séparée de ces 2 catégories de protoplastes nous révèle qu'ils sont les uns et les autres viables.

Le deuxième inconvénient tient à la grande complexité des solutions D et F qui, outre les éléments minéraux, les phytohormones et les vitamines, renferment en plus du saccharose, du mannitol, du sorbitol et xylitol. Nous avons alors préparé une solution minérale de rinçage à base de KCl (2,5 %) et MgSO<sub>4</sub> (1 %). Cette solution facile à préparer permettait de libérer un grand nombre de protoplastes, avec cependant beaucoup de débris que les solutions précédentes et un taux de mortalité pouvant aller jusqu'à 30 %.

#### 4.3.1.2. Quantité de protoplastes isolés

Le tableau suivant nous donne les quantités de protoplastes obtenus après rinçage effectué avec les différentes solutions sur 5 cultivars.

TABLEAU N° XIV : Quantité de protoplastes obtenus après rinçage  
( $10^6$  proto/gr) à partir des feuilles de 5 cultivars de Manioc

Vitesse de centrifugation = 40 g

Solution \ Cultivar	Cultivar					Nombre Moyen pour chaque solution
	Malela 1	MM78	CB	MA255	Glaziovii	
D*	6,63	-	3,79	-	-	5,21
F	4,64	8,91	4,41	6,23	3,66	5,57
W06	2,37	1,11	7,84	6,29	0,45	3,6
Kcl MgSO4	8,2	5,97	8,6	4,29	4,79	6,37
Nombre moyen pour chaque Cultivar	5,46	5,33	6,16	5,6	2,96	Moyenne générale de l'iso- lement 5,1

\* solution D : milieu n° 23 (CL) dilué de moitié.

Il s'agit de feuilles prélevées sur des plantes  
cultivées in vitro.

Ce tableau indique que les cultivars Malela 1, MM78 et MA255 fournissent à peu près les mêmes quantités de protoplastes, CB en donnera davantage et Glaziovii beaucoup moins. Nous voyons également à travers ce tableau que la solution de rinçage KCl-MgSO<sub>4</sub> donne une quantité de protoplastes isolés (6,37 millions) nettement supérieure à celles obtenues avec les autres solutions. En moyenne, pour l'ensemble des cultivars, 5 millions des protoplastes sont isolés par gramme de limbe.

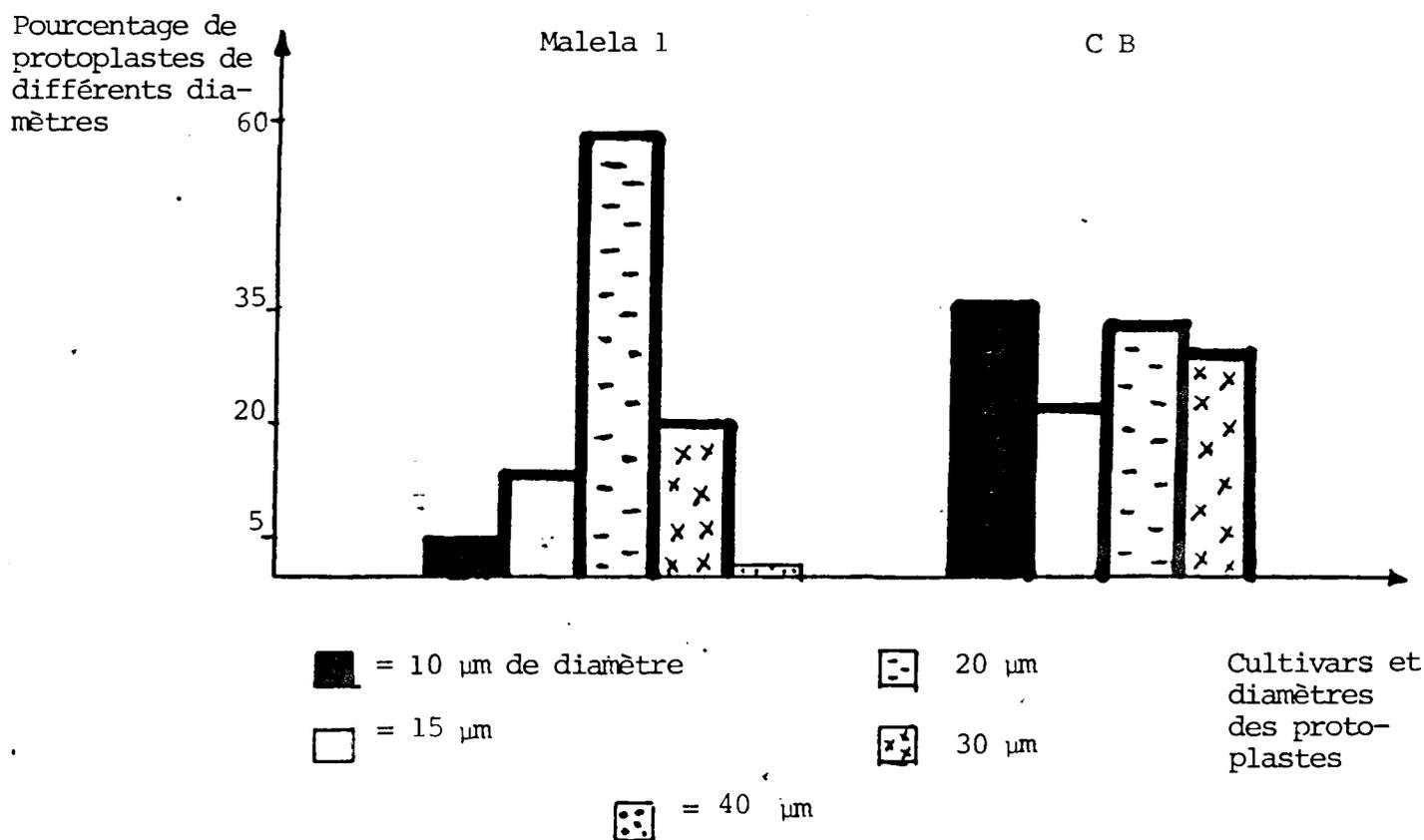
La quantité de protoplastes isolés au cours d'une expérience dépend encore de l'âge de la feuille au moment de l'isolement.

#### 4.3.1.3. La taille des protoplastes obtenus

Le protoplaste mesophyllien isolé chez le Manioc a un diamètre variant entre 7  $\mu\text{m}$  et 40  $\mu\text{m}$ . La grande majorité se situe entre 15  $\mu\text{m}$  et 30  $\mu\text{m}$ . La figure 55 nous indique le pourcentage de protoplastes de différents diamètres obtenus à partir des feuilles des 2 cultivars Malela 1 (cultivé en serre) et CB (cultivé in vitro). La taille des protoplastes est mesurée un jour après leur isolement.

Pour le cultivar malela 1 (5e feuille de plante de serre) 80 % de protoplastes ont des dimensions entre 20  $\mu\text{m}$  et 30  $\mu\text{m}$  avec une très forte majorité comprise à 20  $\mu\text{m}$  ; 14 % environ ont 15  $\mu\text{m}$  et 5 % seulement mesurent 10  $\mu\text{m}$ . En ce qui concerne les feuilles des plantes de CB cultivées in vitro, la dimension des protoplastes se situe entre 10  $\mu\text{m}$  et 20  $\mu\text{m}$ . Dans l'intervalle 20  $\mu\text{m}$  à 30  $\mu\text{m}$  nous n'avons plus que 41 % au lieu de 80 %. Par contre, une forte proportion de protoplastes ne mesure que 10  $\mu\text{m}$  (36 %).

FIGURE N° 55 : Pourcentage de protoplastes de différents diamètres obtenus à partir des feuilles des cultivars Malela1 et CB



Un protoplaste isolé est considéré comme viable quand, une nuit après son isolement, il se présente entièrement sphérique, peu vacuolisé avec des chloroplastes régulièrement répartis (figure 58). Nous n'avons noté aucune différence d'apparence entre les protoplastes des divers cultivars dont nous disposons.

Pour certains isolements, nous avons observé la présence de cellules aux parois non complètement digérées. Elles sont plus ou moins allongées et éclatent dans le milieu de culture pouvant ainsi favoriser la formation des composés toxiques. Les quelques cellules allongées non éclatées ne présentent pas de développement ultérieur. Ce type d'isolement a été obtenu lorsque les

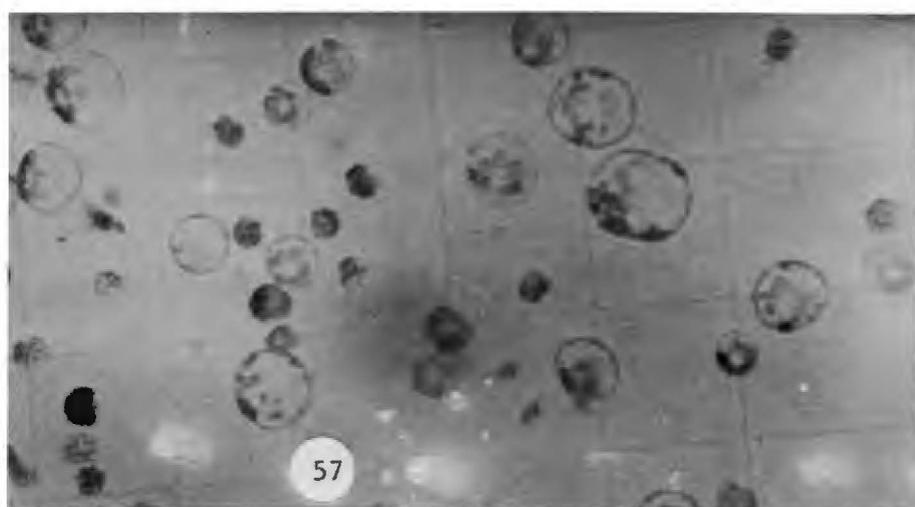
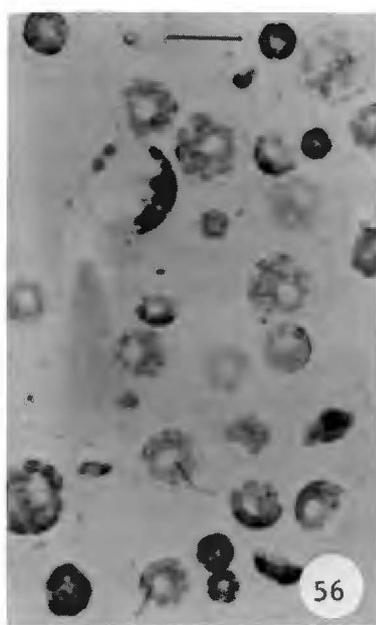


Fig. 56 : Protoplastes du cultivar *Glaziovii* avant exposition à la lumière 2 jours après leur ensemencement dans le milieu C1. (la barre = 20 microns).

Fig. 57 : Protoplastes du cultivars CB après 7 jours de culture dans le milieu W06. (le côté du carré = 40 microns).

Fig. 58 : Protoplastes du cultivar CB un jour après leur isolement dans le milieu F.

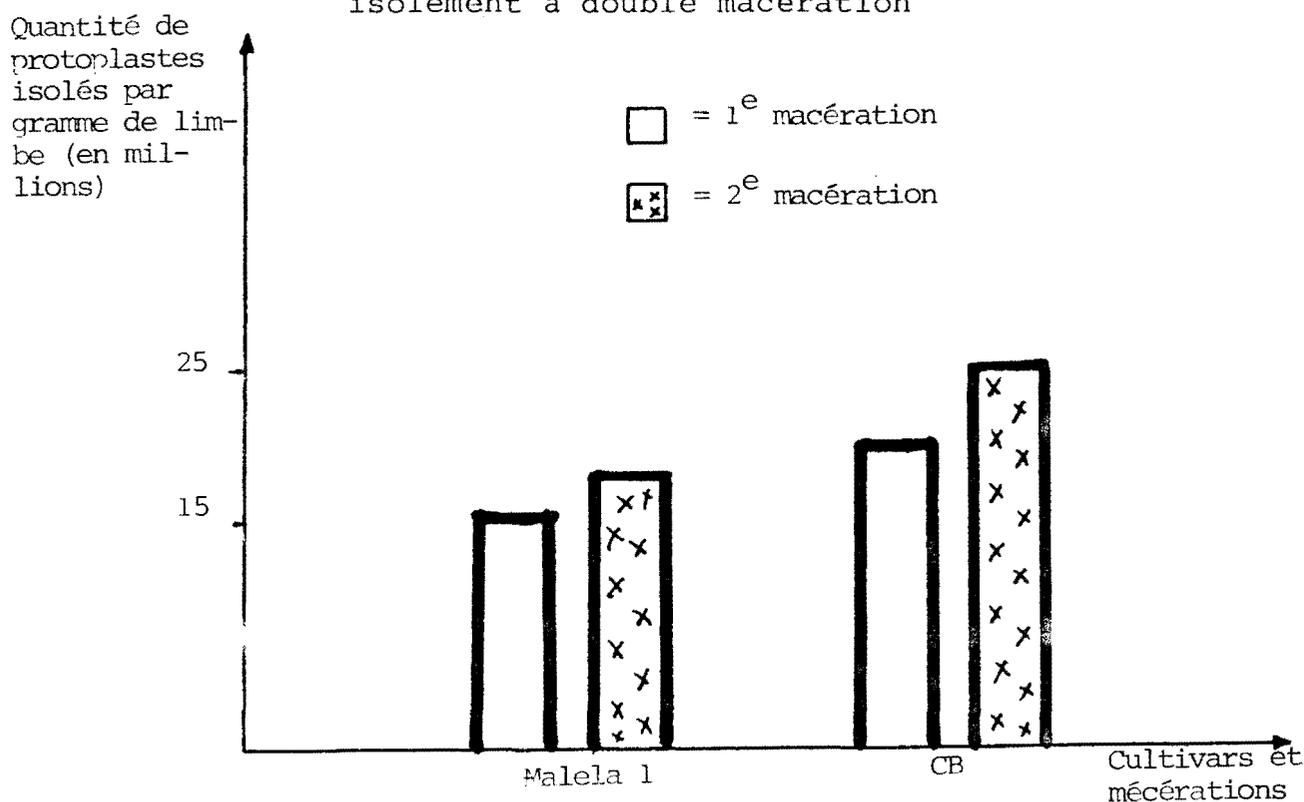
solutions renferment peu de cellulase ou lorsque le temps de macération était trop court. Par ailleurs, l'utilisation de trop grandes quantités d'enzymes (pectinases et cellulases) conduit à un éclatement des protoplastes. Au cours de nos isollements, la teneur de 0,7M en mannitol permettait au protoplaste isolé de rester en légère plasmolyse dans le milieu de suspension.

En tenant compte des résultats obtenus pendant nos premières expériences (Tableau N° XIV et figure N° 55), nous avons effectué dans les isollements ultérieurs une double macération et utilisé des vitesses de centrifugation variant entre 900 g et 1000 g en fonction des solutions employées.

#### 4.3.1.4. L'isolement des protoplastes à double macération

La double macération a consisté à utiliser de nouveau, pour la même expérience, les restes des tissus non digérés en première macération. Les résultats obtenus au cours des expériences sont consignés dans les figures N° 59 et N° 60.

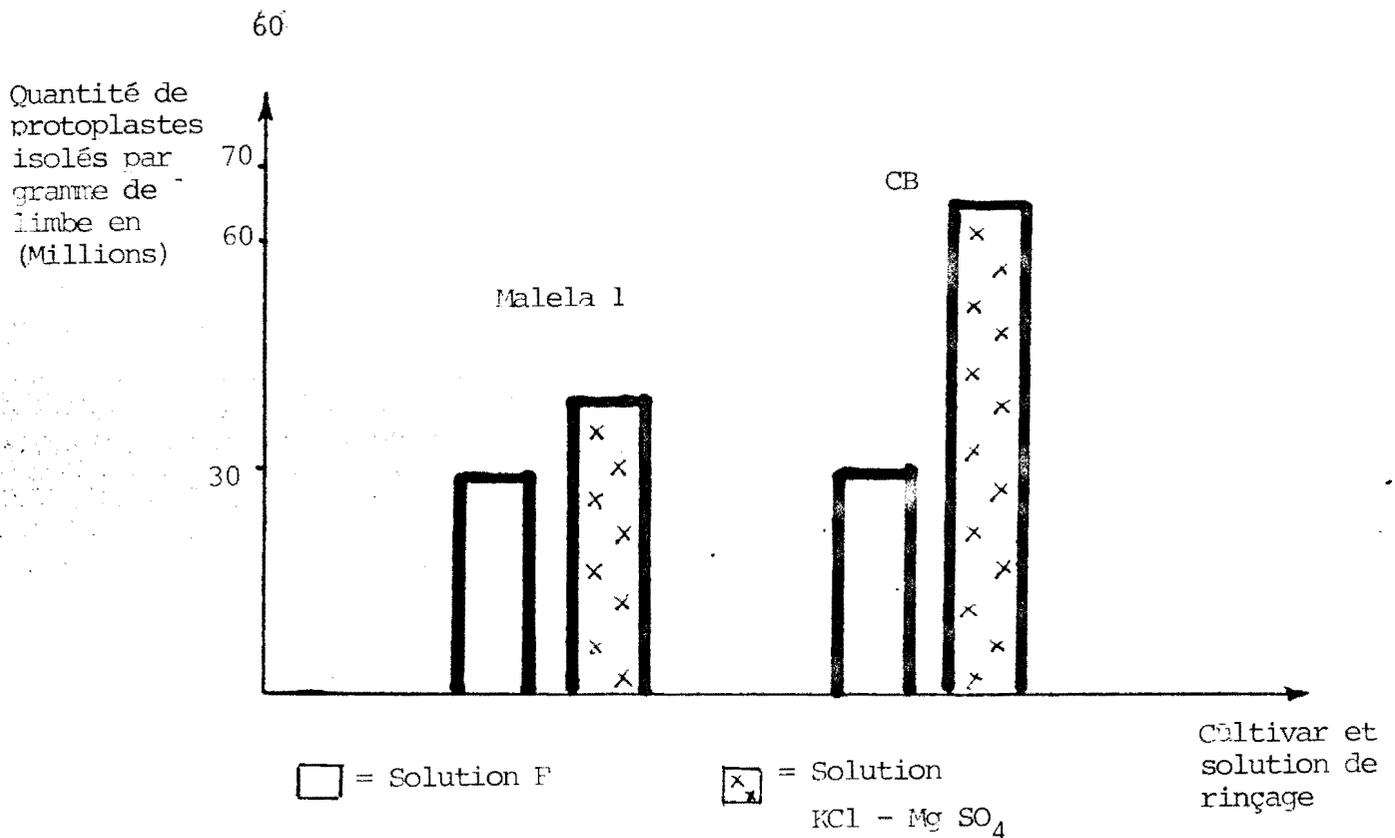
FIGURE N° 59 : Production de protoplastes par macération dans un isolement à double macération



Les résultats mentionnés dans cette figure sont des moyennes calculées sur 5 à 10 isolements. Ils montrent que la seconde macération fournit une quantité plus importante que la première, cependant, pour les feuilles de jeunes plantes, une très bonne digestion des tissus en première macération permet en deuxième macération une quantité plus faible de protoplastes.

La figure N° 60 nous donne la quantité totale de protoplastes isolés en utilisant deux solutions de rinçages (F et KCl-MgSO<sub>4</sub>) dans un isolement à double macération.

FIGURE N° 60 : Production totale de protoplastes par solution de rinçage dans un isolement à 2 macérations (en millions de protoplastes par gramme de limbe)



Les résultats résumés dans cette figure montrent que la solution minérale KCl-MgSO<sub>4</sub> libère beaucoup plus de protoplastes que la solution F.

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus indique que l'isolement de protoplastes de bonne qualité est aisé, quelle que soit la nature des feuilles utilisées. La production des protoplastes est abondante avec au moins 5 millions de protoplastes par gramme de limbe lorsque nous pratiquons des centrifugations à la vitesse de 40 g. Des vitesses de centrifugations plus élevées fournissent une moyenne de production d'environ 20 millions de protoplastes viables par gramme de limbe, avec notre technique de double macération : ce qui, nous permettant de travailler sur une quantité de feuilles relativement faible, constitue pour nous une étape fort encourageante.

#### 4.3.2. La mise en culture des protoplastes isolés

##### 4.3.2.1. Les conditions d'ensemencement

###### 4.3.2.1.1. Recherche des meilleurs milieux d'ensemencement

###### 4.3.2.1.1.1. Introduction

Après avoir subi des échecs répétés avec le milieu CL concentré préconisé par SHAHIN et SHEPARD (1980) nous avons été amenés à mettre au point deux milieux de culture, le milieu F retenu parmi les 6 que nous avons essayé et le milieu M. Le milieu F est la solution minérale CL diluée de moitié avec des concentrations différentes en mannitol, sorbitol, saccharose et xylytol. Le milieu M est composé d'une solution minérale fortement diluée qui renferme en outre l'ion ammonium sous la forme NH<sub>4</sub>N<sub>3</sub> qui n'existe pas dans les formules proposées par SHAHIM et SHEPARD.

Aussi, les milieux utilisés pour le Tabac, le milieu w06, milieu salin fortement concentré préparé par MEYER et le milieu C<sub>1</sub> milieu salin très dilué utilisé par CABOCHE, ont également été essayés.

4.3.2.1.1.2. Les milieux de références utilisés sur le Tabac : w06 et C1

- le milieu w06

Nous avons observé dans ce milieu une grande mortalité. Lorsque l'isolement a été réalisé avec un rinçage au mannitol remplaçant la solution saline KCl-MgSO<sub>4</sub>, la mortalité a sensiblement diminué dans le milieu de culture. Le milieu w06 confère aux cellules aussi une très forte tendance à l'aggrégation, surtout lorsque la densité de culture dépasse 250 000 protoplastes par ml .

Dans les cultures réussies, après 2 jours d'éclairage à 2 200 lux, les cellules commencent à grandir. Une bonne partie des cellules se divise par bourgeonnement. 9 jours après, les cellules commencent à se nécroser. Il faut généralement opérer un transfert dans le milieu C2 après 6 jours. Deux jours après le transfert des divisions par clivage commencent à s'observer. Dans nos essais répétés, le phénomène de division par clivage a atteint parfois 60 %.

- le milieu C1

Le milieu C1 est le milieu d'ensemencement préparé par CABOCHE pour le Tabac. Dans ce milieu, un encemencement à forte densité de culture est suivi d'un transfert à faible densité sur un nouveau milieu C2 (milieu T0 de CABOCHE 1980). En ce qui concerne les protoplastes de Manioc, ce milieu déclenche également

le bourgeonnement et si nous n'opérons pas de transfert à partir du 7e jour, les divisions par clivage (60 % environ) commencent alors à se produire avec une intensité maximale aux environs du 20e jour. Beaucoup de cellules isolées restent sans évolution malgré un grandissement important avec formation de travées cytoplasmiques.

Si après 6 jours de culture, nous remplaçons le milieu initial C1 par le milieu C2 en conservant la même densité de culture, les divisions par clivage vont continuer à se développer et au 20e jour elles peuvent atteindre 80 %.

#### 4.3.2.1.1.3. Les milieux mis au point sur Manioc

##### - le milieu F

Lorsque nous observons les protoplastes dans le milieu F après une nuit, ils apparaissent parfaitement sphériques avec leurs chloroplastes périphériques. Si aussitôt après leur ensemencement, les protoplastes sont exposés à la lumière (2 200 lux), il se produit dans ce milieu, dès le second jour une prolifération caractéristique par bourgeonnement avec une absence presque totale de formation des parois. Beaucoup de cellules après s'être divisées se séparent ; la plus grande partie cependant reste aggrégée formant ainsi des "pseudo colonies" puis des "pseudo calcs". Les colonies et les calcs formés par bourgeonnement sont conservés en parfait état, sans transfert des cellules dans un autre milieu, jusqu'à 30 jours, et deviennent macroscopiquement visibles à partir du 10e jour de la culture.

Ce milieu est incapable d'induire une formation pariétale correcte et par conséquent incapable de favoriser une prolifération par mitoses classiques. Les calcs ainsi formés par bourgeonnement des protoplastes n'ont pas manifesté de développement

après un transfert sur milieu gélosé. Nous avons donc été conduits à rechercher un milieu favorable à la régénération des parois cellulaires, capable d'induire des mitoses classiques.

Le milieu F ne renferme pas d'ion  $\text{NH}_4^+$ , or CABOCHE (1980) et MEYER (communication personnelle) insistent sur la nécessité d'une certaine quantité d'azote sous forme de  $\text{NH}_4^+$  nécessaire à la cellule pour la formation de ses parois. KAO et NAGATA (1974), CABOCHE (1980) préconisent l'utilisation des solutions peu concentrées en élément minéraux sur Tabac. Nous avons été donc amenés à préparer pour le Manioc une solution dite milieu M afin d'essayer d'obtenir une division classique de cellules dans nos cultures.

#### - le milieu M

Dans le milieu M, les protoplastes présentent un grandissement cellulaire très important qui commence dès le 3e jour. Un bourgeonnement important est observé également. Les cellules bourgeonnent, se séparent très souvent ou forment parfois des pseudo-colonies. Les colonies formées par bourgeonnement dans le milieu M sont moins volumineuses que celles observées avec le milieu w06. Les nombreuses cellules libres viables restantes vont subir un accroissement ; elles possèdent de nombreuses travées cytoplasmiques. A partir du 10e jour, apparaît l'initiation des parois cellulaires et vers le 11e jour apparaissent les premières mitoses. Et, à partir du 21e jour, de véritables colonies et des cals microscopiques se formeront, cals que nous pouvons alors transférer directement sur un milieu gélosé.

Ce milieu M nous a donné des résultats très reproductibles en ce qui concerne les cultivars Malela1 et CB. Dans ce milieu, , les clivages se réalisent en masse, presque toujours entre le 12e et le 16e jour. Ce milieu M nous a

permis de conserver les cellules pendant plus de 4 semaines sans que leur capacité d'évolution en soit altérée, alors que des nécroses apparaissaient après une semaine de culture, dans le milieu w06 et après 3 semaines dans le milieu C1, si l'on n'opérait pas un transfert dans d'autres milieux liquides.

Le milieu M a le mérite non seulement d'induire une division par clivage de façon régulière, mais encore d'initier des colonies très homogènes au développement régulier ; ainsi, au 20e jour les colonies sont presque toutes de même taille ; elles mesurent alors 0,2 mm de diamètre.

#### 4.3.2.1.1.4. Conclusion et discussion

La mise au point d'un milieu de culture capable de déclencher la prolifération des protoplastes est la seconde étape à franchir après leur isolement. De nombreuses solutions ont été proposées pour le Tabac et souvent de composition totalement différentes. Ainsi, KAO et MYCHAYLUK, ~~NAGATA~~ et TAKEBE, CABOCHE proposent des solutions peu concentrées en éléments minéraux, alors que MEYER (1981) conseille pour les protoplastes de Tabac un séjour d'environ 6 jours dans un milieu salin fortement concentré : le milieu w06.

Après les déboires enregistrés avec le milieu CL de SHAHIN et SHEPARD (1980) milieu fortement concentré, nous avons porté nos choix sur les milieux w06, C1 et F1. Le développement peu satisfaisant des cellules dans ces milieux, nous a alors amené à concevoir le milieu M : ce dernier fortement dilué, induit chez les protoplastes un comportement différent en favorisant l'apparition d'une prolifération naturelle par clivage.

#### 4.3.2.1.2. Le rôle de la densité de culture

##### 4.3.2.1.2.1. Densité des cultures dans le milieu F

Le milieu F ne déclenche que des proliférations par bourgeonnement, mais conduit à la formation de cellules viables. Les figures N°61, 62, 63, 64 résument les observations réalisées avec le milieu F. Leur examen montre que pour une culture exposée à la lumière dès l'ensemencement, le bourgeonnement apparaît dès le second jour. Au sixième jour environ, 70 % des cellules mises en culture ont bourgeonné et au 10e jour presque toutes les cellules de la culture ont bourgeonné. Quand la densité de culture est de 250 000 protoplastes par ml, des pseudo-colonies, puis des gros agrégats se forment à partir du 10e jour (fig 61).

Lorsque la densité de culture augmente pour 300 000 protoplastes par ml, le bourgeonnement ralentit, et au 8e jour, nous ne comptons plus que 60 % des cellules en bourgeonnement. Certaines de ces cellules se sépareront après avoir bourgeonné (voir fig. n° 64).

Une densité de culture plus faible de 81 000 protoplastes par ml induira, par contre, un bourgeonnement très rapide qui dès le sixième jour de la culture a gagné près de 90 % des cellules. Les densités de culture inférieures à 80 000 protoplastes par ml ont donné un rythme de bourgeonnement semblable à celui observé avec une densité élevée de 300 000 protoplastes par ml. Ce milieu F permet donc d'utiliser les densités de culture comprises entre  $8 \cdot 10^4$  et  $25 \cdot 10^4$  protoplastes par ml.

##### 4.3.2.1.2.2. la densité dans le milieu w06

Le milieu w06 a dans la majorité de nos expériences provoqué une mortalité importante des cellules. Pour des densités faibles, les cellules vivantes sont souvent présentes en quantité

Evolution de protoplastes dans le milieu F  
 en fonction de la densité des cultures  
 (Fig. 61 - 64)

FIGURE 61

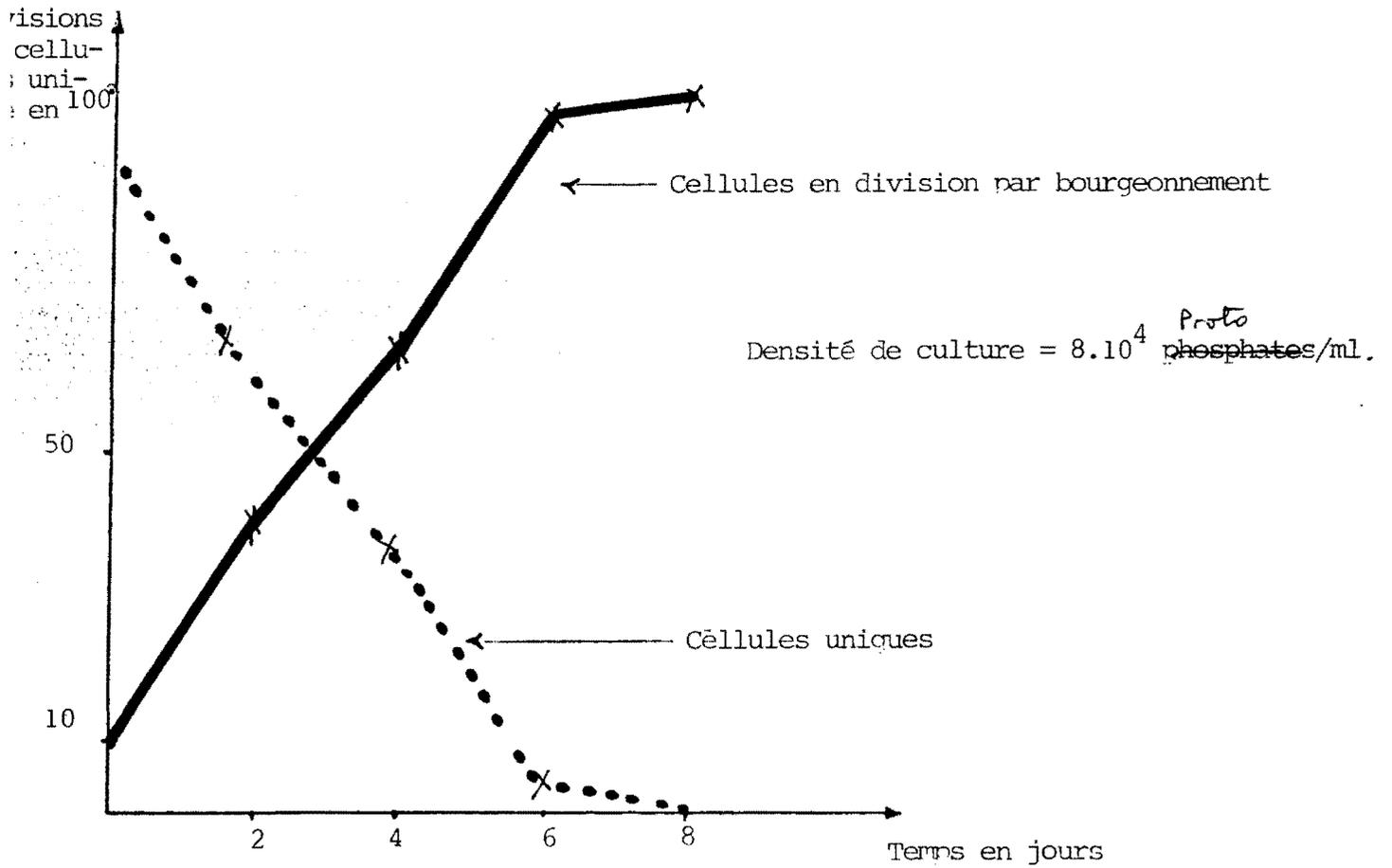


FIGURE 62

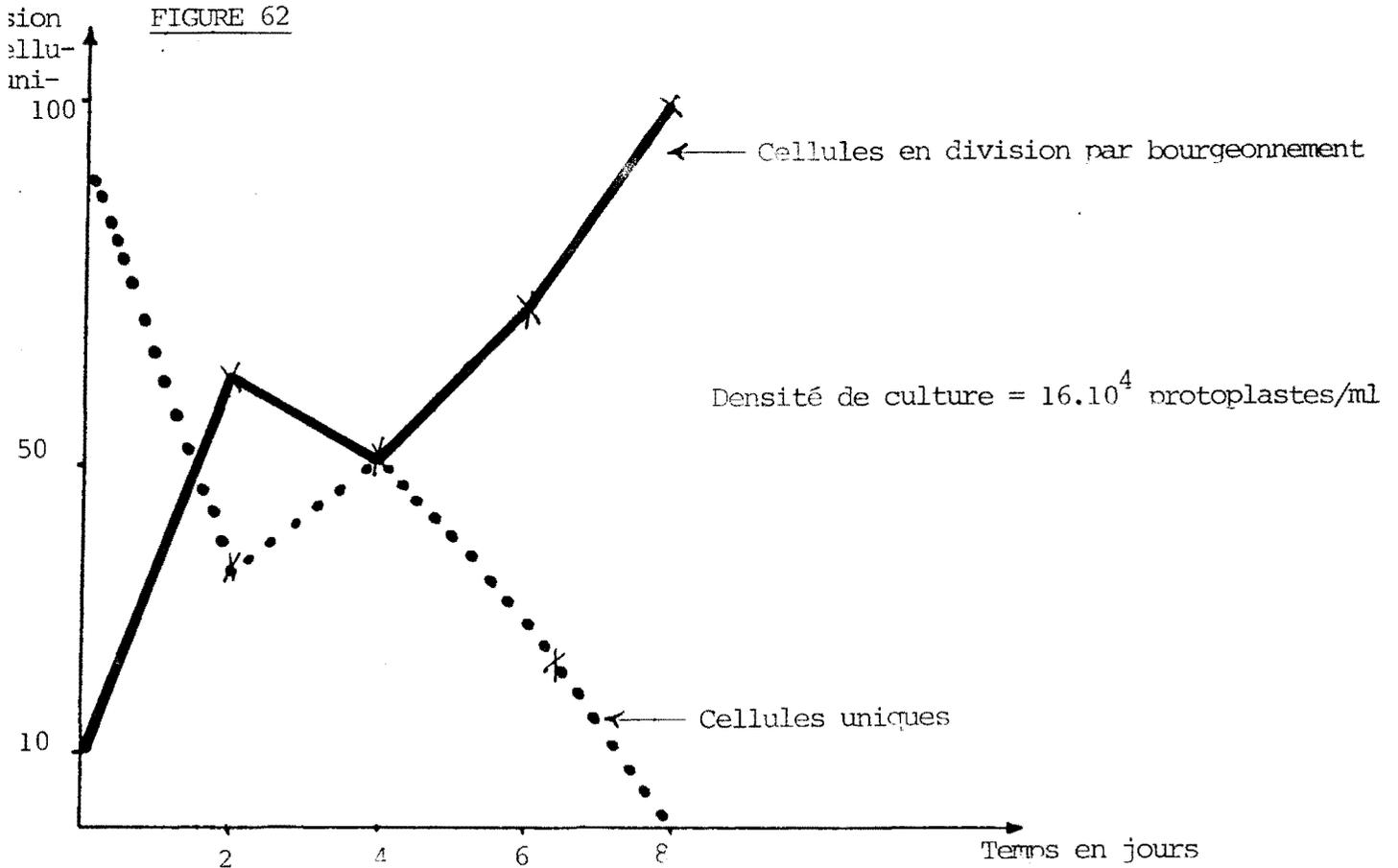


FIGURE 63

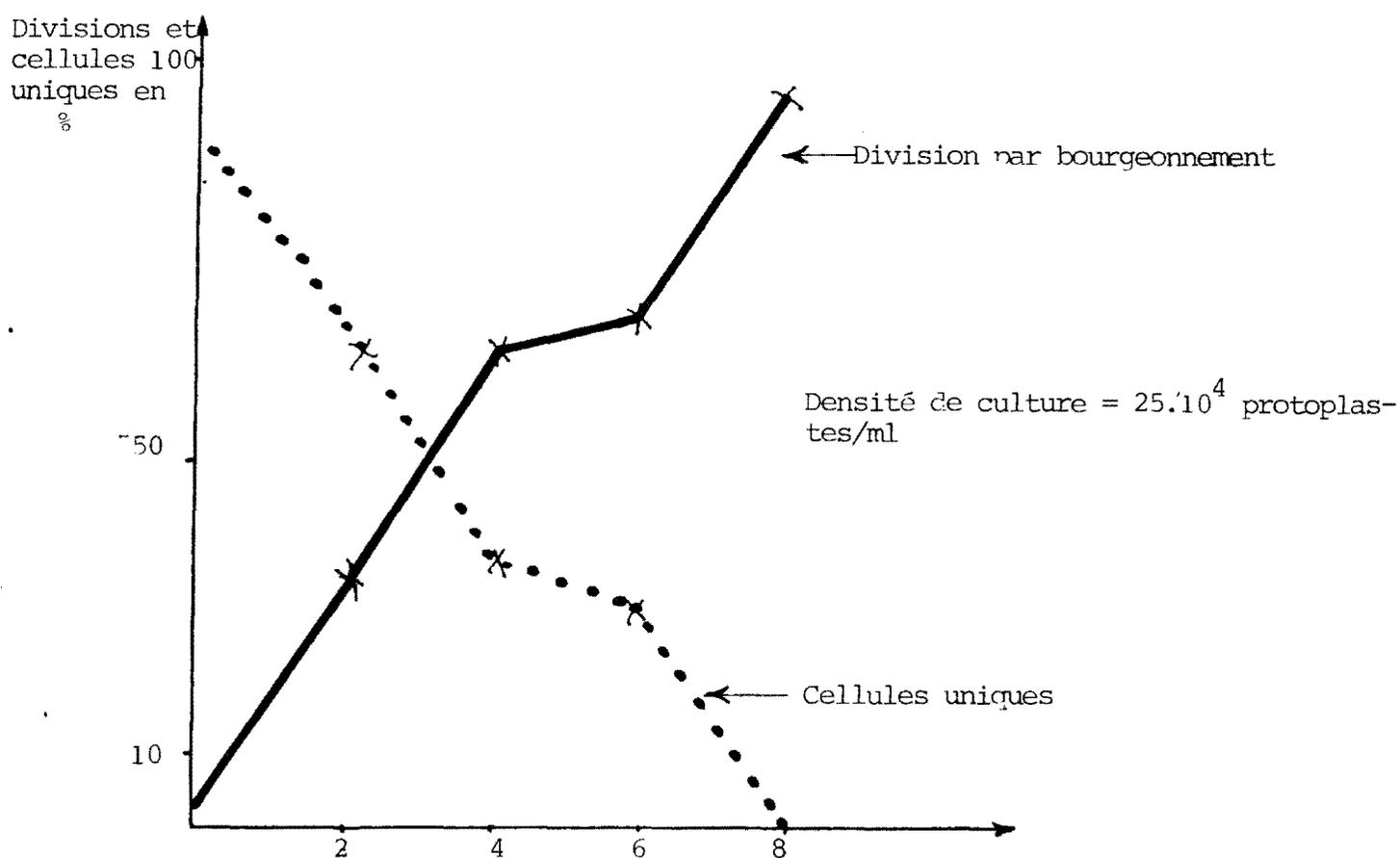
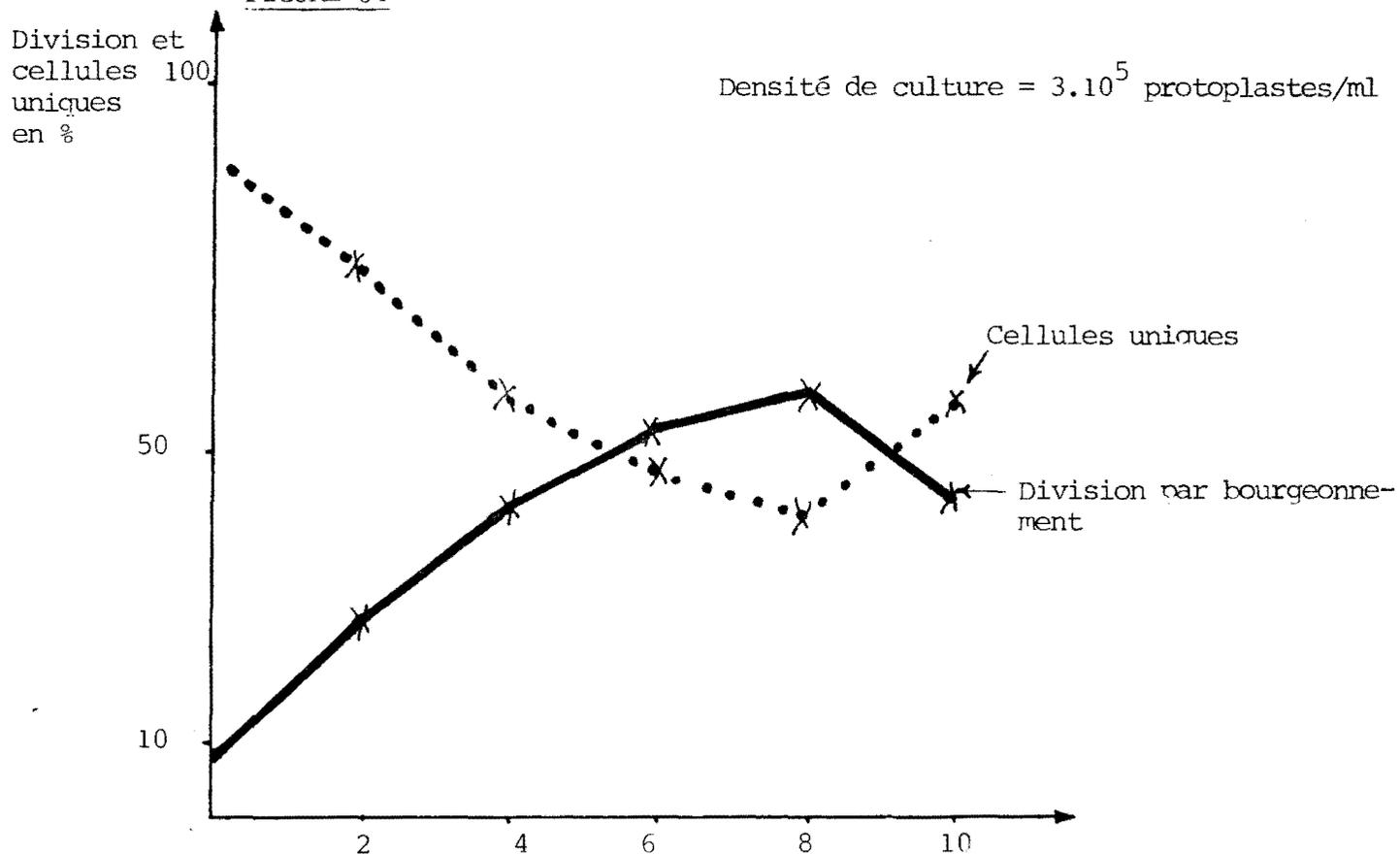


FIGURE 64



d'ensemencement trop faible pour conditionner le milieu. Nous avons donc utilisé des densités de culture élevées de l'ordre de  $3 \cdot 10^5$  protoplastes par ml ; ce qui conduisait à la formation d'aggrégats cellulaires nombreux.

#### 4.3.2.1.2.3. Les densités de culture dans les milieux C1 et M

Les essais effectués sur les cultivars Malela1 et CB ont fourni les meilleurs résultats avec des densités comprises entre  $2 \cdot 10^5$  et  $3,5 \cdot 10^5$  protoplastes par ml ; entre  $2 \cdot 10^5$  et  $3 \cdot 10^5$  pour le milieu C1 et entre  $2,5 \cdot 10^5$  et  $3,5 \cdot 10^5$  pour le milieu M. Ces deux milieux admettent sensiblement les mêmes densités de cultures. Les histogrammes des figures 65 et 66 permettent de comparer l'évolution des protoplastes dans ces deux milieux recevant une même densité de culture.

FIGURE N° 65 : Bourgeonnements, clivages, cellules uniques dans les milieux M et C1, 7 jours après la mise en cultures.

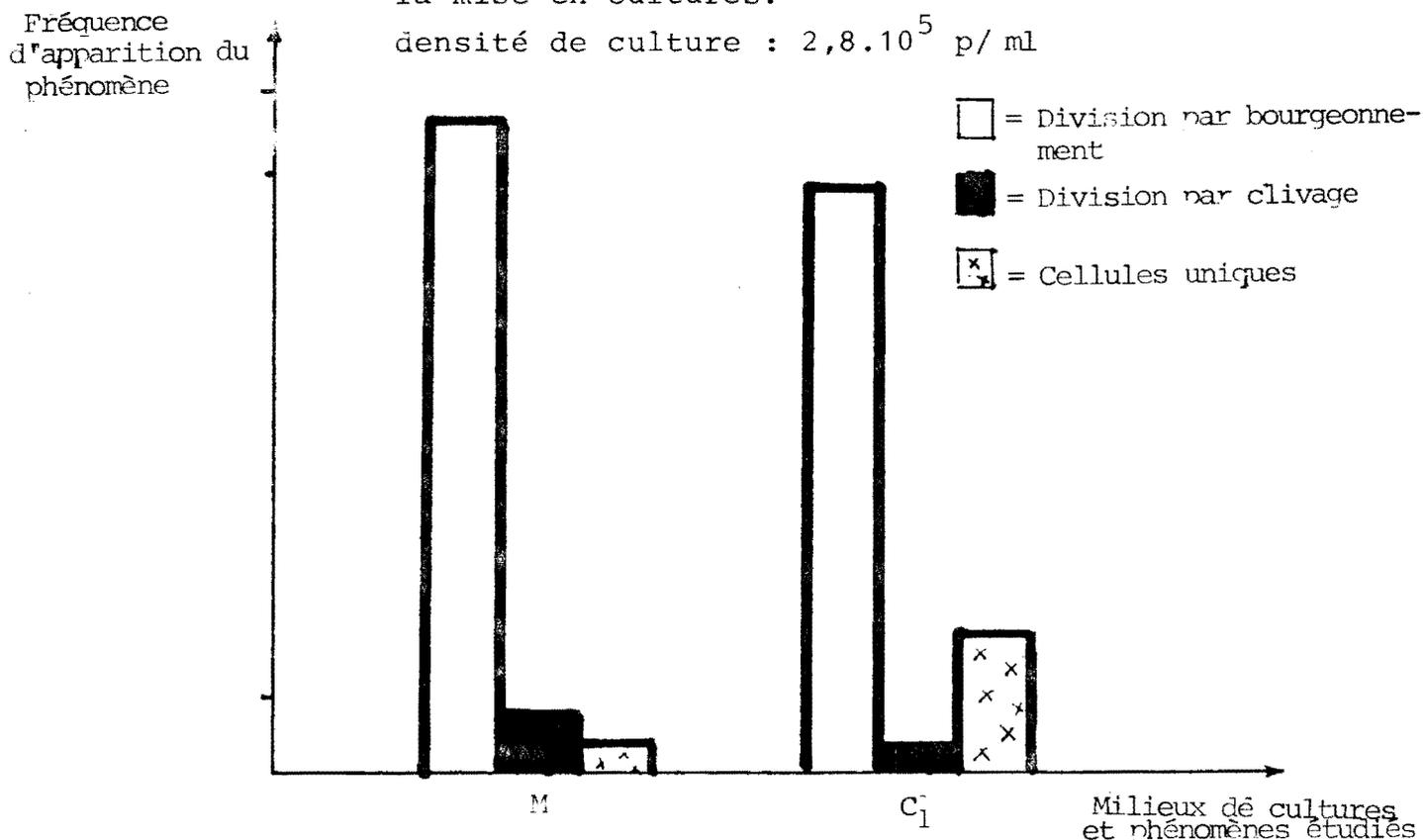
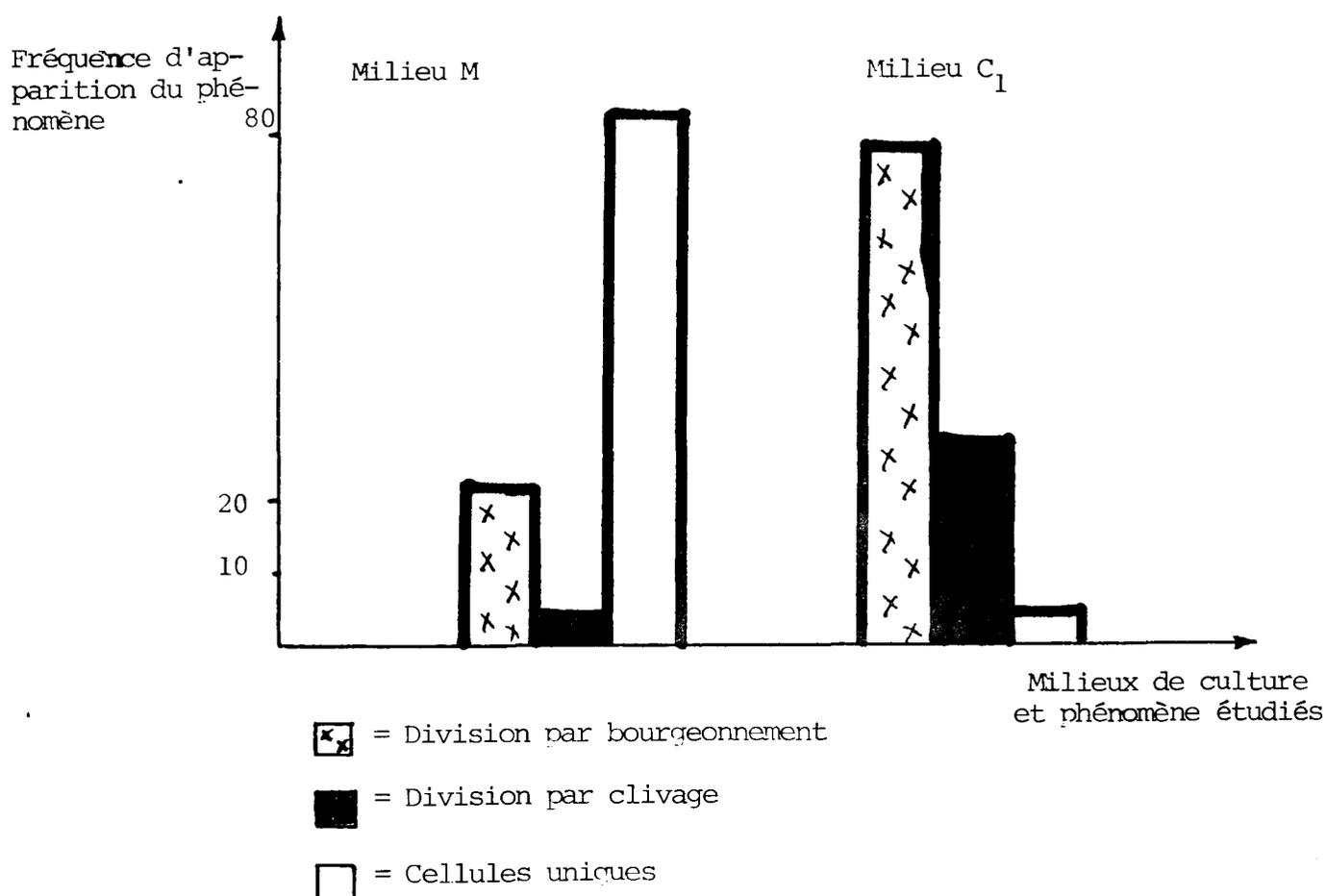


FIGURE N° 66 : Bourgeonnement, clivages et cellules  
uniques dans les milieux M et C<sub>1</sub>, 11 jours après  
le mise en culture.  
densité de culture :  $2,8 \cdot 10^5$  P/nul



L'examen de ces deux figures permet de mieux comprendre l'évolution de protoplastes dans ces 2 milieux d'ensemencement. Dans le milieu M, les cellules bourgeonnent. Au 7<sup>e</sup> jour de la culture, 87 % des cellules ont bourgeonné. Mais au même moment, nous observons des clivages (de l'ordre de 8 %) alors que le nombre de cellules uniques n'occupe seulement que 5 % de l'ensemble de la culture. Vers le 11<sup>e</sup> jour, les cellules filles bourgeonnées se dissocient et vont former plus de 70 % de cellules isolées dans le milieu de culture. Le clivage sans évolution

reste faible par rapport à l'ensemble des cellules présentes dans le milieu de culture (4,5 %) ; cependant, les colonies cellulaires déjà formées grandissent. C'est à partir du 11e jour que la formation des parois apparait pour l'ensemble des cellules (par un test de plasmolyse avec cristaux de NaCl). A partir du 15e jour, le déclenchement des clivages se manifestera sur l'ensemble des cellules de la culture.

Sur le milieu C1, le bourgeonnement est légèrement moins important et les clivages moins nombreux que ceux observés dans le milieu M au 7e jour. Par contre, la quantité des cellules uniques est beaucoup plus élevée dans ce milieu (17,6 %) alors que dans le milieu M, nous n'en avons que 4,4 %).

Lorsque nous effectuons un comptage au 11e jour, nous constatons sur ce milieu C1 que les cellules filles issues des bourgeonnements se sont très peu séparées ; le clivage est élevé (25 %) et les cellules uniques sont plus rares (de l'ordre de 5 %). Les cellules ont donc continué à se diviser par clivage sur ce milieu C1, pour former depuis le 7e jour des colonies non homogènes et, au 20e jour de la culture, des colonies de toutes les dimensions.

#### 4.3.2.1.3. Essai de conservations de protoplastes aux basses températures avant leur ensemencement

Des essais de conservation de protoplastes aux basses températures ont été mis en place. Après isolement, les protoplastes des cultivars Malela1 et CB sont conservés dans le milieu de culture M et C1 à 4°C à l'obscurité pendant 24 et 48 heures. Les protoplastes une fois isolés ont été placés dans des boites de pétri fermées avec du scel-o-frais et gardées au frigidaire. Après 24 H, nous avons sorti un lot que nous avons gardé 24 H à l'obscurité à 25°C, puis exposé à 2 200 lux comme <sup>pour</sup> la culture normale.

Après 48 H, nous avons sorti le deuxième lot du frigidaire et nous l'avons exposé à 2 200 lux comme pour la culture normale.

Nos observations nous ont montré une forte mortalité chez les protoplastes conservés sur le milieu C1. Le premier lot du milieu M évolue normalement, tandis qu'au niveau du second lot, une mortalité élevée nous a fait perdre environ 50% des cellules. Les cellules survivantes au niveau du second lot sur milieu M sont activement entrées en division par clivage. Après 21 jours, un transfert ultérieur sur gélose, permettait le développement des cals formés d'un diamètre d'environ 0,4 mm déjà macroscopiques.

#### 4.3.2.2. Les transferts .....

La formation pariétale acquise dans le milieu C1 n'est pas suffisante pour déclencher un départ massif des clivages chez les cellules, même si l'on remplace l'ancien milieu de culture par le même milieu neuf. Il est donc nécessaire de changer la composition des milieux de culture. Lors des transferts dans le milieu C2, la paroi cellulaire continue à se fortifier, il y a de plus en plus de divisions par clivage. Les nécroses observées dans ce milieu après 10 jours et le ralentissement du rythme des divisions nous obligent à faire souvent 2 transferts. Généralement, un séjour de plus de 8 jours dans le milieu C2 conduit à la formation de nécroses abondantes. Le premier transfert intervient après 6 jours, le second après 12 jours. A partir du second transfert, nous pouvons attendre jusqu'à 30 jours avant de repiquer les cals sur gelose.

TABLEAU N° XV : Mise en évidence de la nécessité des transferts lorsque le milieu de culture utilisé est le milieu C1

Transferts opérés après (en jours)			Observations
1 <sup>e</sup> Transfert	2 <sup>e</sup> Transfert	Transfert sur milieu gélosé	
0	0	18	Formation de colonies : 40 % se développent difficilement ensuite sur gélose
10	0	23	Formation de colonies : 80 % évoluent difficilement sur gélose
6	14	21	cals macroscopiques 90 % 50 % se développent normalement sur gélose
6	14	45	100 % de colonies viables

L'examen de ce tableau indique que pour obtenir la formation de cals viables capables d'évoluer sur milieu gélosé, 2 transferts successifs sont au moins nécessaires après un ensemencement opéré sur le milieu C1.

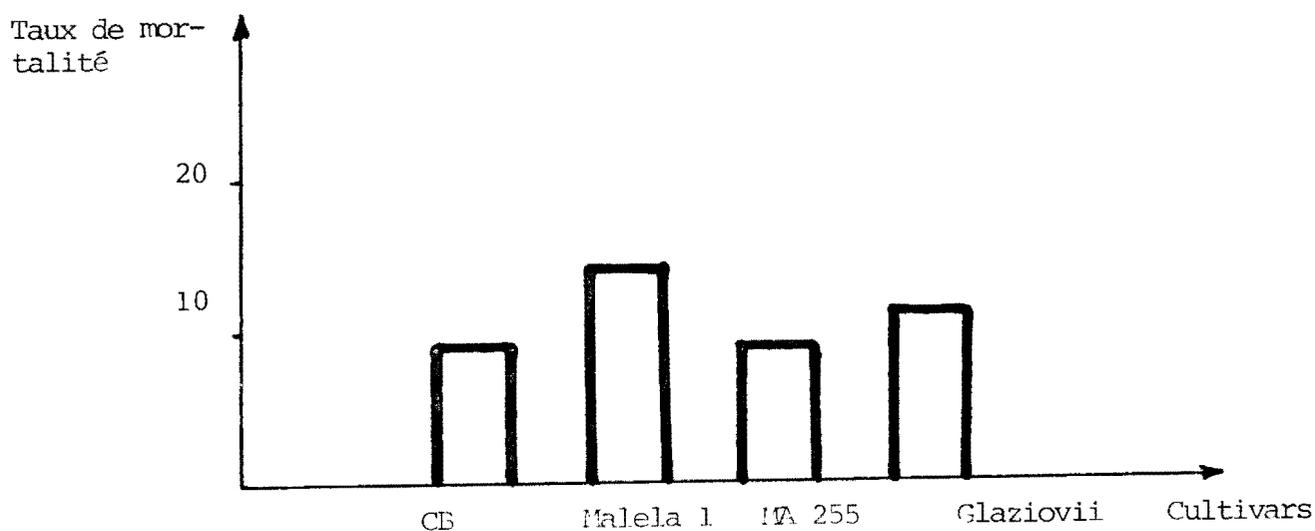
### 4.3.3. Les différents aspects des protoplastes isolés et des colonies obtenues au cours de leur évolution

#### 4.3.3.1. La mortalité .....

Dans le milieu liquide C1, une certaine quantité de protoplastes dépérit. Cette quantité, le plus souvent inférieure à 10 % au cours de nos expériences est surtout manifeste pour les protoplastes isolés de diamètre inférieur à 15  $\mu\text{m}$ .

Les histogrammes réunis dans la figure N° 67 nous fournissent les taux de mortalité après 4 jours de culture pour les protoplastes de 4 cultivars, isolés en solution saline de rinçage KCl-MgSO<sub>4</sub> et cultivés ensuite sur le milieu d'ensemencement C1. Cependant, une mortalité bien plus faible dans les mêmes conditions expérimentales est observée dans les milieux F et M.

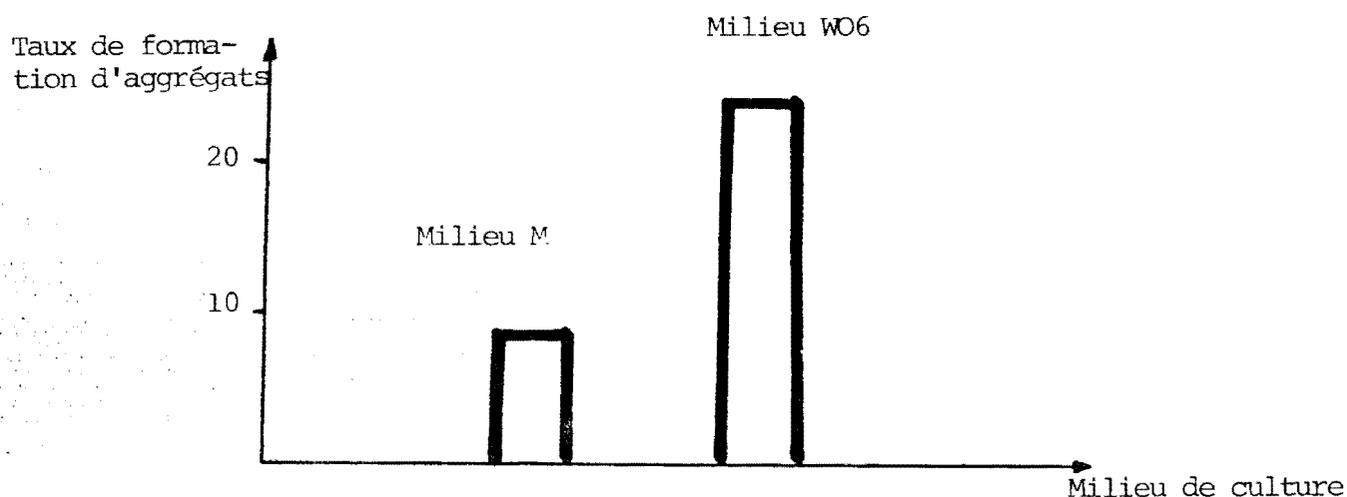
FIGURE N° 67 : Taux de mortalité observé après 4 jours de culture sur le milieu C1



#### 4.3.2.2. Les agrégats cellulaires

Ce phénomène a été fréquemment observé surtout avec le milieu de culture w06 comme l'indique les histogrammes de la figure N° 68.

FIGURE 68 : l'aggrégation des cellules sur les milieux de culture M et w06



#### 4.3.3.3. Le grandissement cellulaire

Il intervient souvent avant la division cellulaire. Il débute dès le 3e jour de l'ensemencement pour atteindre ses dimensions maximales le 5e jour. Le protoplaste peut alors doubler de taille. Ce phénomène observable sur tous les milieux, est beaucoup plus accentué pour les milieux w06 et M (figure 49).

#### 4.3.3.4. Le bourgeonnement

Le bourgeonnement est un phénomène rare chez les plantes supérieures. L'apparition de ce phénomène dans la culture des protoplastes a soulevé des controverses dans l'interprétation

sur sa nature pathologique ou normale ( NAGATA  
et TAKEBE 1970, DUTUIT 1981, MEYER 1981).

Dans nos conditions de culture, le bourgeonnement a été soit la seule forme de prolifération observée (milieu F) (fig. 61, 62, 63, 64), soit une forme de prolifération associée (milieu C1) ou précédant la prolifération par clivage (sur milieu M) (fig. 65, 66, 68, 69).

Nous avons observé deux comportements différents du bourgeonnement au sein de nos cultures : les cellules peuvent bourgeonner sans se séparer (sur les milieux F et w06, fig. 59) ou en ne se séparant que rarement (milieu C1, fig. 65, 66) ; ou les cellules bourgeonnent, puis se séparent totalement (milieu M) (fig. 65, 66).

Dans les milieux R06 et w06 (de MEYER 1981), la cellule bourgeonnait 2 à 3 fois seulement. Dans le milieu F, le nombre de divisions peut aller bien au delà. Les cellules ne se dissocient pas et créent de la sorte de véritables colonies microscopiques (fig. 71), puis macroscopiques (fig. 72 et 73). Ces structures qui ont parfois près d'un mm de diamètre au 15e jour de la culture, renferment des cellules parfaitement normales mais qui vont éclater, car elles ne possèdent pas de paroi pectique. lorsqu'après un mois nous les repiquons sur gélose.

Dans le milieu C1, les cellules bourgeonnent mais se séparent peu : seuls 9 % de cellules bourgeonnées se séparent. Le bourgeonnement observé dans ce milieu ne conduit donc pas à la formation d'importants amas cellulaires. Quand les conditions le permettent toutes les cellules bourgeonnées peuvent subir des divisions régulières par un clivage même au sein des amas cellulaires constitués (fig. 75).

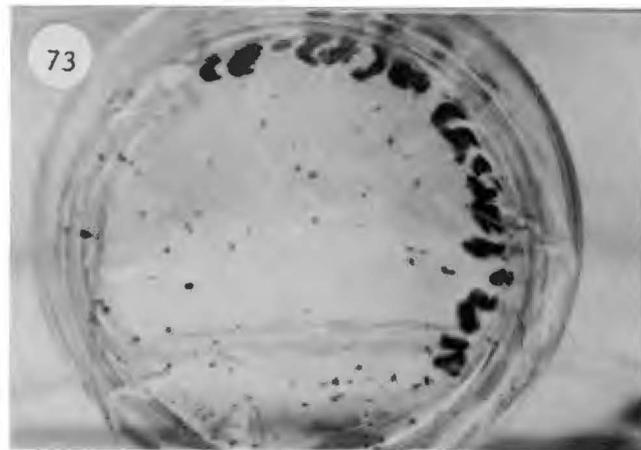
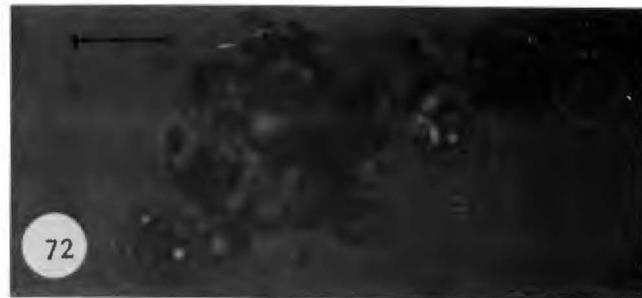
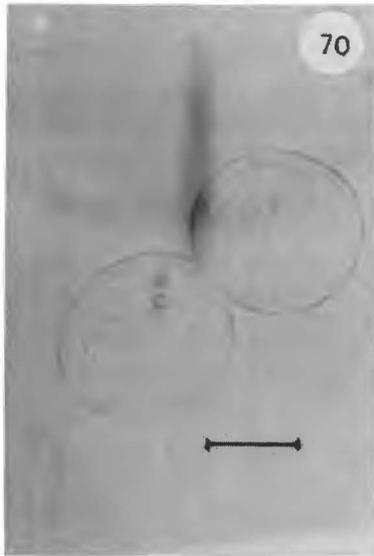
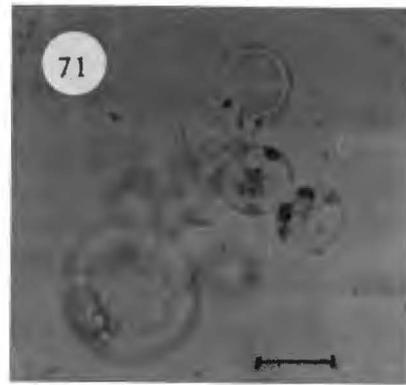
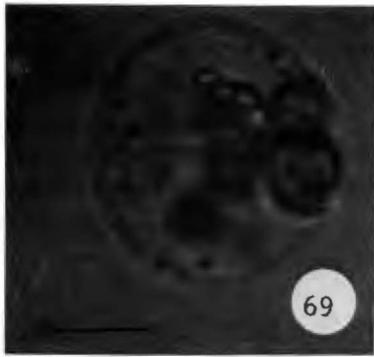


Fig. 69 : La formation des travées cytoplasmiques.  
(la barre = 10 microns).

Fig. 70 : Cellule en fin de bourgeonnement sur le milieu Cl. (la barre = 10 microns).

Fig. 71 : Cellules en voie de bourgeonnement sans séparation. (la barre = 10 microns).

Fig. 72 : Cal microscopiques formé par bourgeonnement.  
(la barre = 20 microns).

Fig. 73 : Cals macroscopiques obtenus avec le milieu F.  
(Echelle 6/5 ).

Dans le milieu M, le bourgeonnement intéresse au 7<sup>e</sup> jour de la culture près de 88 % des cellules. Au 11<sup>e</sup> jour, 66 % de cellules bourgeonnées se sont séparées. La séparation des cellules bourgeonnées conduit à l'augmentation inévitable du nombre de cellules uniques (fig. 65, 66) dans ce milieu où le clivage massif qui intervient après le 11<sup>e</sup> jour apparaît après le bourgeonnement.

Ces diverses observations indiquent clairement que le bourgeonnement ne constitue pas dans nos expériences un phénomène pathologique. Dans la plupart des travaux antérieurs, les auteurs signalent que les cellules bourgeonnent une ou deux fois, puis arrêtent leur prolifération. Dans nos isolements, le bourgeonnement peut aller jusqu'à la formation d'amas cellulaires macroscopiques de plus de 1 mm de diamètre composés de cellules parfaitement normales.

Lorsque les cellules bourgeonnées se séparent, et, en conditions favorables, ces dernières rentrent en clivage. Le phénomène de bourgeonnement se présente donc comme une alternative lorsque dans un milieu physiologique certaines conditions ne permettent pas la formation d'une paroi cellulaire.

#### 4.3.3.5. La prolifération par clivage (mitoses normales)

Pour le Manioc, la division par clivage n'a été observée que dans les 2 milieux d'ensemencement C1 et M. Comme celle observée et décrite par NAGATA et TAKEBE (1970), elle consiste en une division de la cellule mère en 2 cellules filles approximativement égales. Les cellules ne se séparent pas et forment des colonies. Dans le milieu C1 (fig. 74 et 75), ce phénomène se produit dès le 5<sup>e</sup> jour mais, au 18<sup>e</sup> jour il atteint à peine 60 % des cellules. Le rythme de divisions peut augmenter si nous opérons deux transferts successifs dans le milieu C2, comme l'indiquent les valeurs portées dans le tableau XVI.

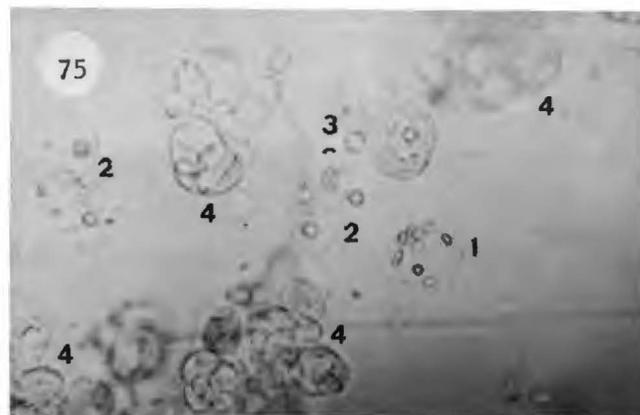


Fig. 74 : Une division par clivage

Fig. 75 : Divisions cellulaires dans le milieu Cl.

- 1 = Cellule unique
- 2 = Cellule en bourgeonnement
- 3 = Division par clivage
- 4 = Division par clivage dans les groupes de Cellules issues des bourgeonnements. Les cellules sont à leur deuxième division (et plus) par clivages successifs.

TABLEAU N° XVI : Pourcentage de divisions par clivage observées dans les milieux C1 et C2 avec le cultivar CB

Milieux de cultures utilisés	Pourcentage de division par clivage observable après (en jours de culture)								
	7	11	12	14	15	16	18	20	22
Ensemencement (C1)	5	27	-	-	33	-	53	56	57
1e transfert (C2)	-	-	18	45	-	73	77	79	
2e transfert (C2)	-	-	-	-	-	54	90	93	94

Le clivage dans les milieux C1 et C2 apparait donc comme un phénomène progressif du 5e jour jusqu'au 20e jour. On peut rencontrer aussi au 20e jour une cellule qui en est encore à sa première division alors que beaucoup d'autres sont au stade de calcs macroscopiques (fig. 75). Cependant, dans ces milieux, 70 % de divisions peuvent être obtenues entre le 12e et le 18e jour, donc en six jours, 70 % des cellules se trouvent donc à peu près au même stade de développement. Les figures 76, 77, 78 et 79 nous permettent de mieux comprendre le rythme de division des protoplastes dans les milieux C1 et C2.

La résultante de ces 3 graphiques nous donnera la courbe de la division cellulaire dans ces 2 milieux C1 et C2.

Figures 76-78 : Division de protonlastes par clivage pendant la culture dans les milieux C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub>

Fig. 76: Ensemencement

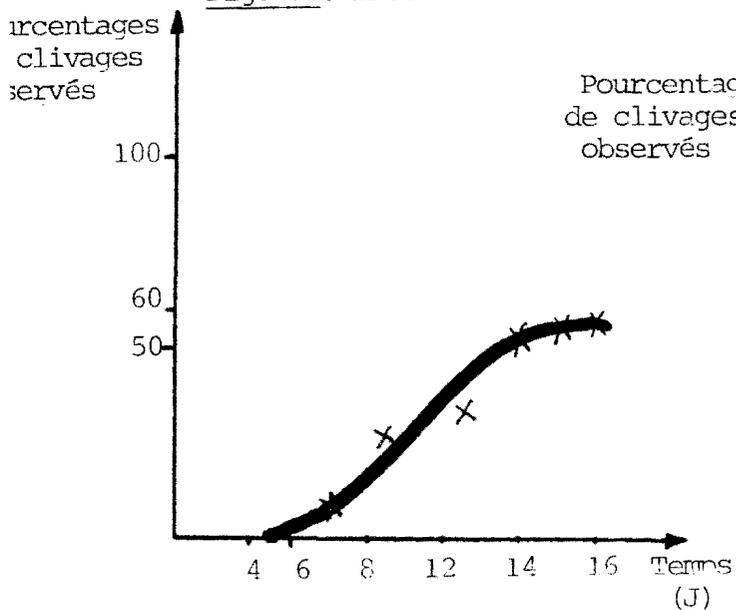


Fig. 77

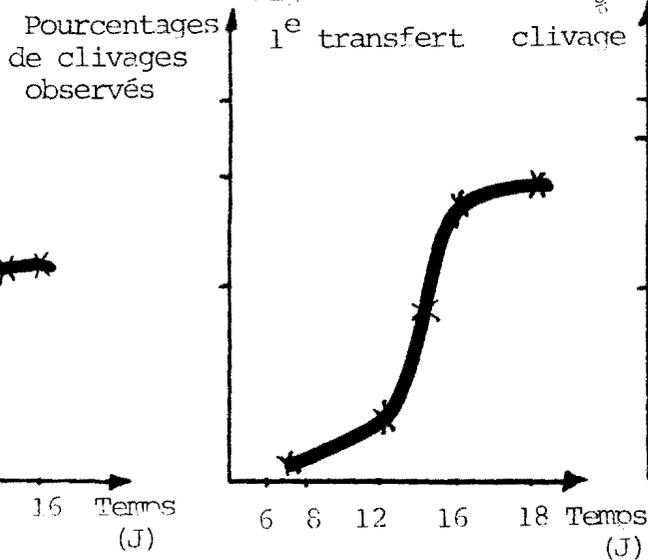


Fig. 78

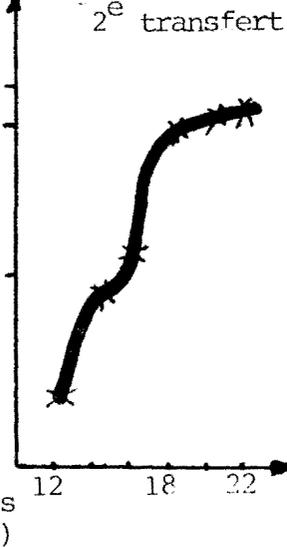
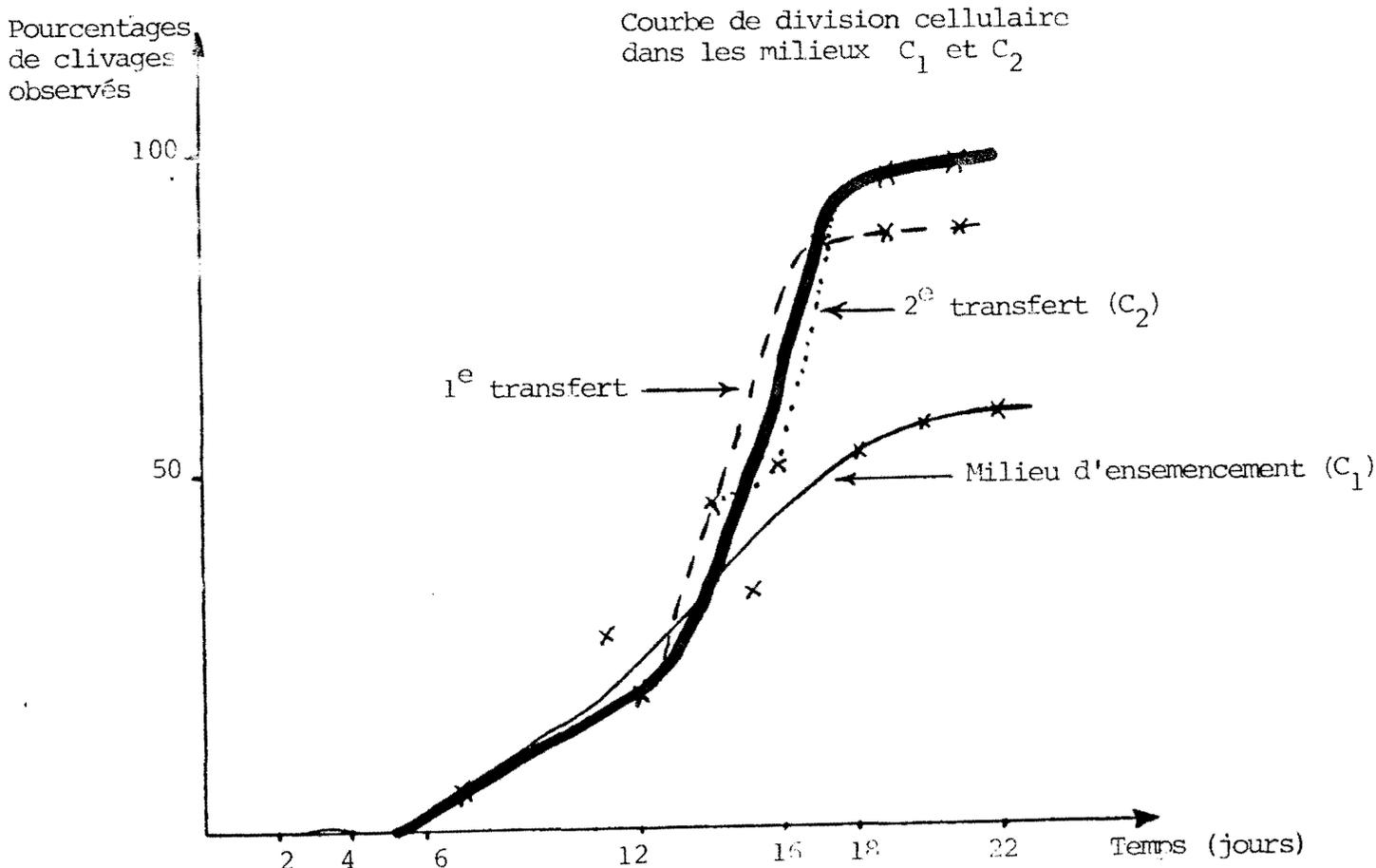
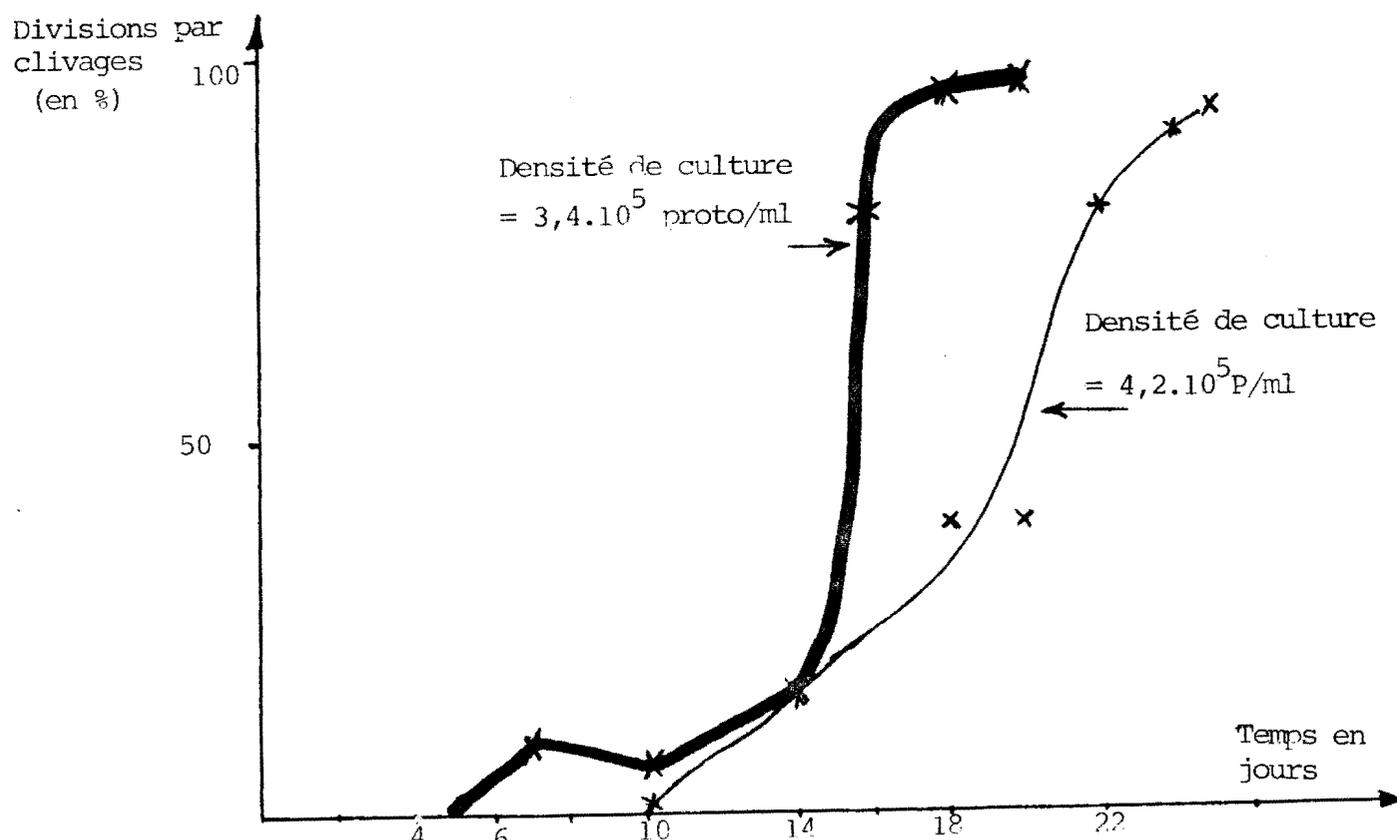


FIGURE N° 79 : Courbe de division cellulaire dans les milieux C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> (D = 2.10<sup>5</sup> - 3.10<sup>5</sup> p/ml)



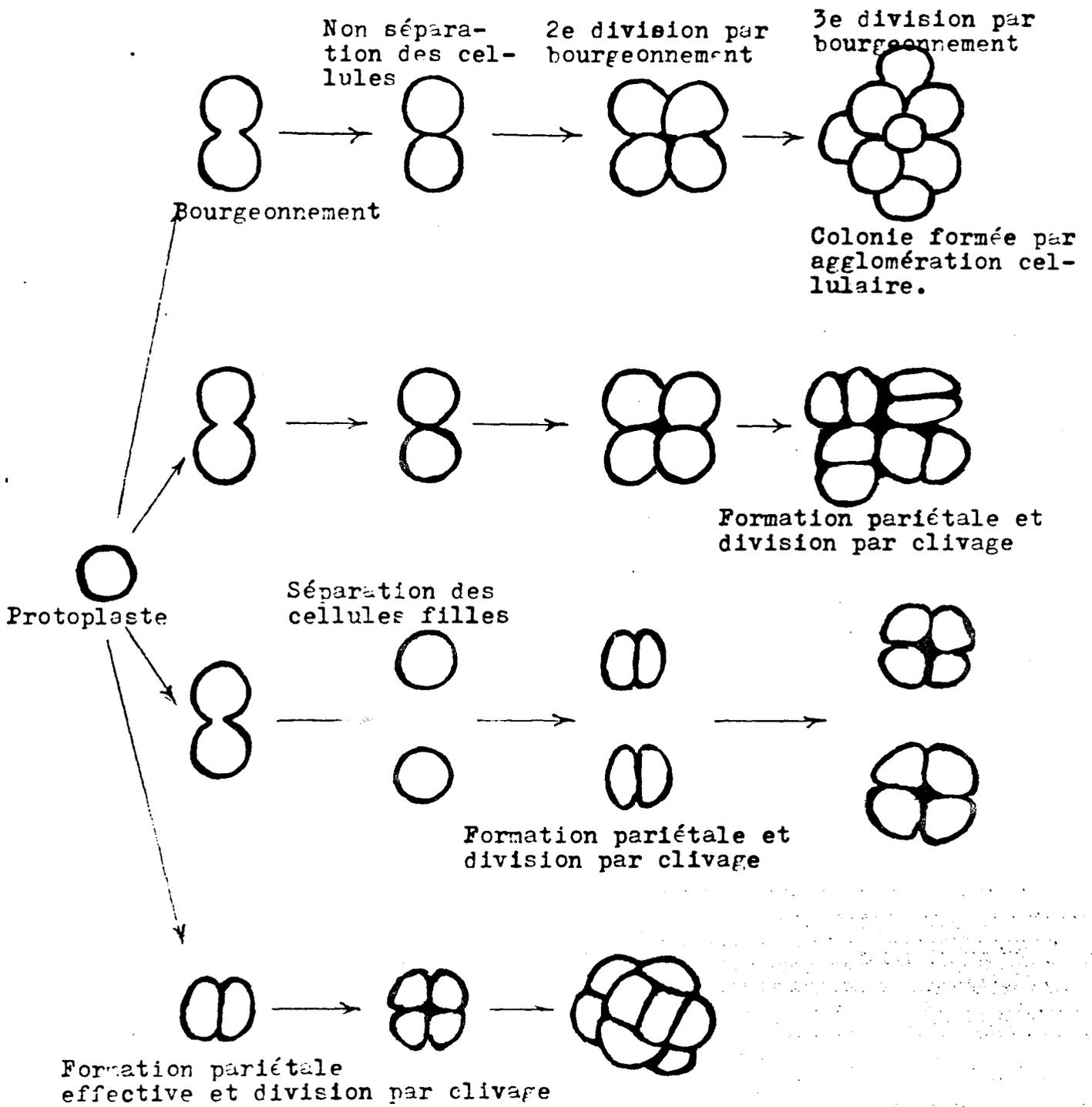
Dans le milieu M, le clivage commence également très tôt. Au 7<sup>e</sup> jour de la culture, le nombre de divisions par clivage atteint déjà 8 %. Ce nombre n'évolue pratiquement pas jusqu'à 2 semaines de culture. Au contraire, par le biais du bourgeonnement nous observons un nombre grandissant de cellules uniques dans le milieu, de telle sorte que les cellules en clivage ne représentent guère plus de 5 % du total. A partir du 15<sup>e</sup> jour nous observons que la totalité des cellules entrent en clivage. Nous obtenons alors environ 85 à 90 % de cellules au même stade de clivage et au 21<sup>e</sup> jour, des colonies nombreuses de même taille d'environ 0,3 mm de diamètre. La figure suivante nous montre le rythme des divisions par clivage dans le milieu M, avec 2 densités d'ensemencement.

Figure n°80 : Division par clivage dans le milieu M



DANS LES MILIEUX

C ET M



Nous pouvons d'autre part, observer qu'avec une densité supérieure à 350 000 protoplastes par ml, les divisions par clivage sont plus tardives et moins homogènes.

Lorsque nous considérons les figures 76, 77, 78, 79, 80, nous pouvons en conclure que le clivage est fonction du milieu de culture, mais aussi de la densité de peuplement. La reconstitution de la paroi cellulaire doit donc être également reliée à ces facteurs.

#### 4.3.3.6. L'aspect des cellules en culture

##### 4.3.3.6.1. Le regroupement des chloroplastes autour du noyau

Au 3e jour de la culture, dans l'ensemble des milieux que nous avons utilisés, les chloroplastes se regroupent autour du noyau. Ceci est bien visible, lorsque la cellule commence à se vacualiser le noyau entraîne à sa périphérie l'ensemble des chloroplastes.

##### 4.3.3.6.2. Les travées cytoplasmiques

Les travées cytoplasmiques sont des structures observables lorsque se produit le grandissement cellulaire. La cellule ne contient plus que de petites vacuoles. Nous observons alors à travers tout le cytoplasme des zones à cytoplasme plus réfringent.

##### 4.3.3.6.3. La reconstitution d'une nouvelle paroi

La formation de la paroi cellulaire est un phénomène que beaucoup d'auteurs ont analysé (NAGATA et TAKEBE 1970, 1971, GRAHBOW et al 1972, MEYER et COOKE 1979, BLASCHEK 1981, MEYER 1981).

Dans ces différentes études, la formation plus ou moins complète de la paroi semble déclencher les processus de la division cellulaire par clivage. MEYER (1981) pense qu'il s'installe des interactions entre paroi et plasmalemme. Ce qui, au niveau de la culture des protoplastes de Tabac dans le milieu w06, inhibe la division par bourgeonnement et enclenche la division par clivage dès la formation de la paroi observée dans ce milieu au 4e jour.

Pour SHEPARD et al. (1981), les protoplastes de pomme de terre ne synthétisent leur paroi qu'après 2 semaines. Pour tous les auteurs qui ont travaillé sur Tabac, il ressort qu'à ce niveau la formation pariétale complète est observée dès le 3e jour de la culture.

Dans nos expériences, sur le milieu F, les protoplastes ne forment jamais de paroi véritable. Nos observations réalisées sur les milieux C1 et M montrent que la formation pariétale peut être précoce chez le Manioc et commencer dès le 4e jour de la culture, pour se développer après 10 jours de culture.

#### 4.3.3. Les cals formés

##### 4.3.3.1. Le développement des cals sur milieu liquide

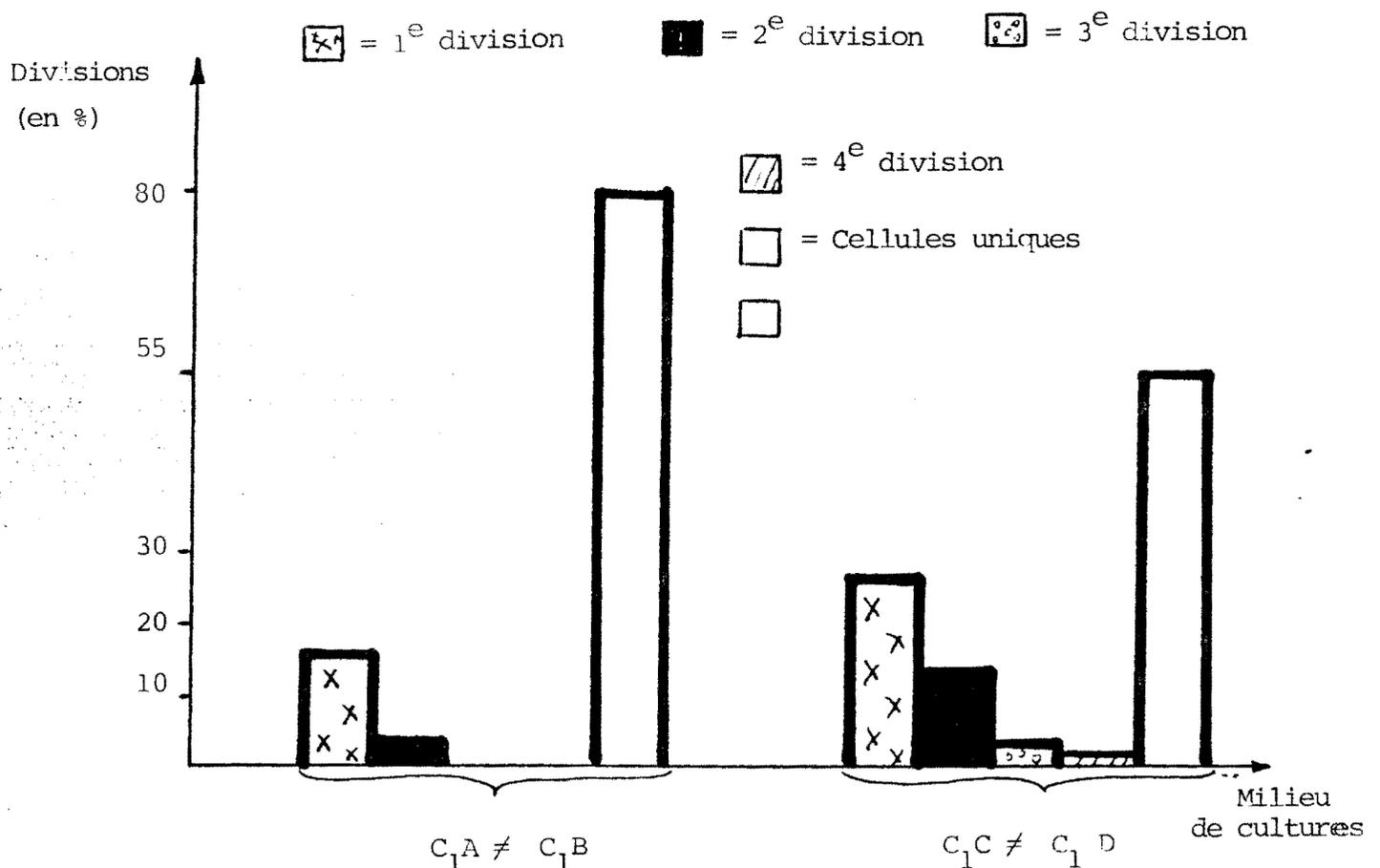
Nous avons compté au 7e jour de la culture 5 % de cellules qui se divisent dans le milieu C1 et 8 % dans le milieu M. L'évolution différente que prennent les cellules dans ces milieux va influencer sur le devenir de ces dernières.

Lorsque nous sommes dans le milieu C1, la majorité des colonies formées jusqu'au 12e jour vont évoluer en cals macroscopiques. Au 21e jour, ces cals peuvent mesurer dans le milieu liquide plus de 0,4 mm de diamètre. Nous constatons que ces cals

ont une tendance au dépérissement induit par le long séjour dans le milieu C2. Nous voyons dans les figures 76, 77, 78, 79 que 70 % des cals sont formés entre le 12e et le 18e jour. Les cals plus jeunes sont aptes à supporter le séjour dans le milieu C2 jusqu'au moment du transfert sur le milieu gélosé (tableau N° XVI) où ils vont proliférer activement.

La situation dans le milieu M est légèrement différente. Les 8 % de divisions de départ vont continuer à évoluer en cals assez grands jusqu'au moment où tout l'ensemble de la population cellulaire entre en clivage. Tous les cals formés vont continuer à évoluer dans le même milieu même après plus de 30 jours de culture.

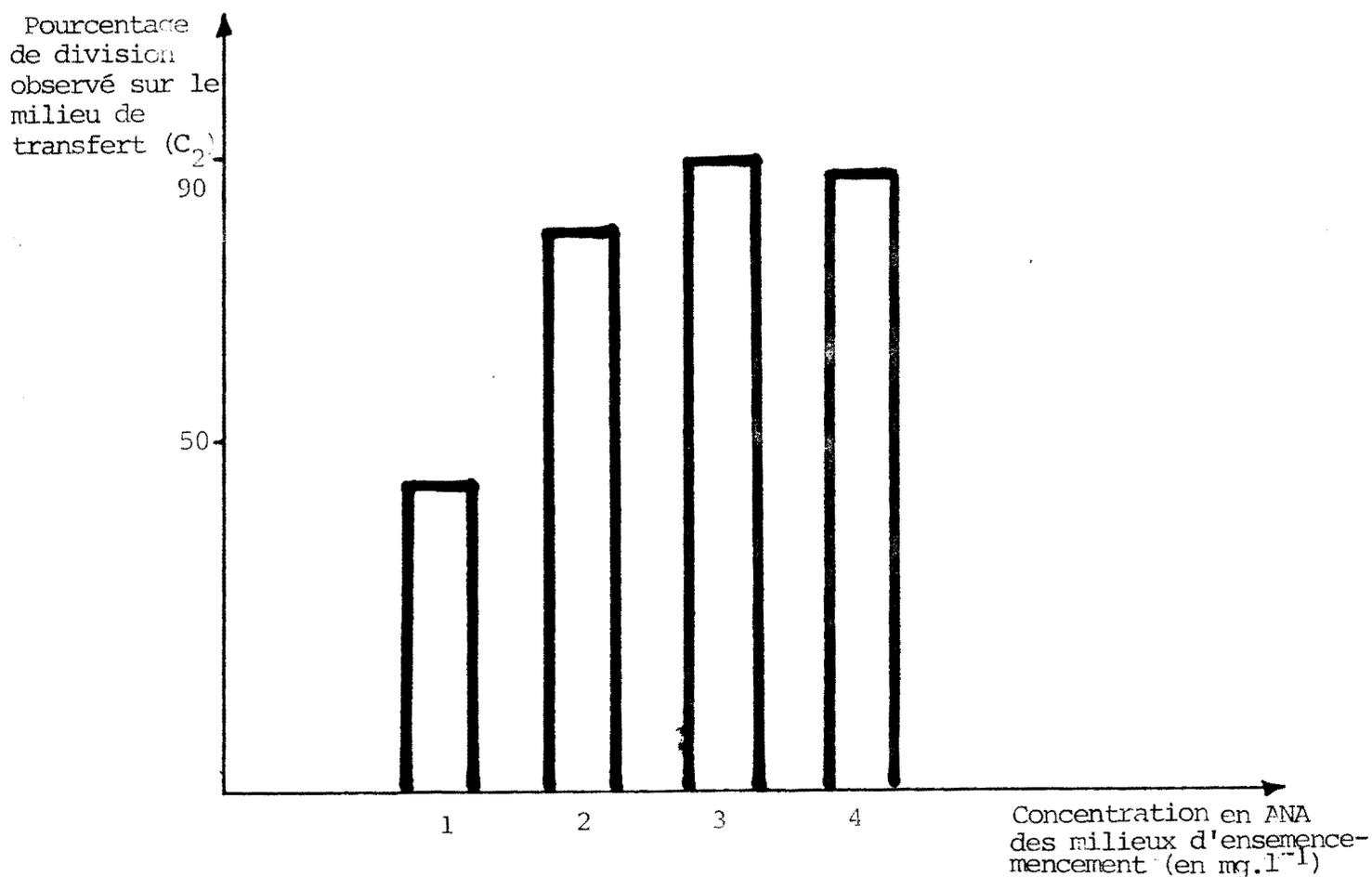
**FIGURE 82** : Taux de divisions cellulaires dans le milieu C, après 12 jours de culture en présence de différentes quantités d'ANA



Les histogrammes montrent que dans le milieu C1, en dessous de  $3 \text{ mg.l}^{-1}$  d'ANA, 20 % de cellules seulement se divisent au 12e jour ; elles sont presque toutes au stade de leur première division. Avec  $3 \text{ mg.l}^{-1}$ , on notera 45 % de division dont 2 % déjà au niveau de la quatrième division.

Dans les histogrammes portés dans la figure 83, l'évolution des cellules issues des milieux contenant différentes quantités d'ANA (C1A-B- et D) est différente après leur transfert.

Figure N° 83 : Evolution des cellules issues des milieux C1A, C1B, C1C et C1D, 6 jours après leur 2e transfert dans le milieu C2



Le meilleur taux de divisions et de formations de cals est enregistré en présence de  $3 \text{ mg.l}^{-1}$  d'ANA, dans le milieu d'ensemencement.

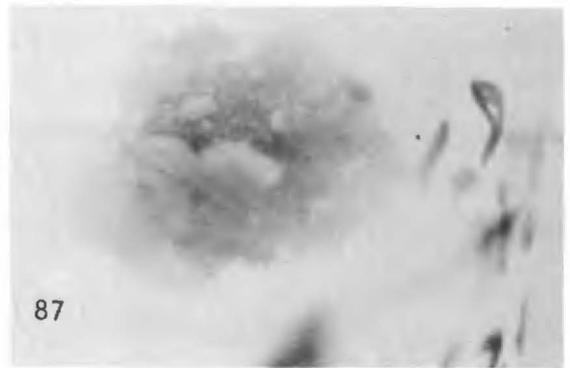
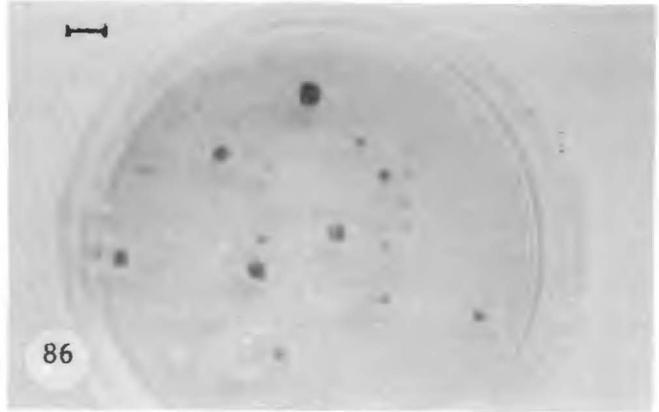
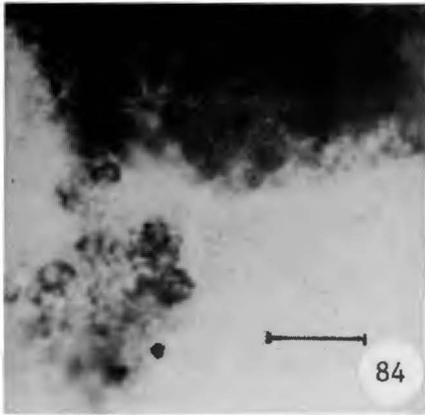
Les phytohormones exogènes sont indispensables pour la prolifération cellulaire des protoplastes du Manioc. Dans l'étude du contrôle hormonal de la division mitotique, MEYER (1981) établit que la dépendance vis-à-vis de l'auxine et de la cytokinine exogènes est absolue, que l'entrée en phase S est non seulement dépendante des auxines, comme toute mitose chez les végétaux supérieurs mais également des cytokinines. Dans nos expériences, la quantité d'auxine nécessaire à une meilleure induction des mitoses varie en fonction de la composition du milieu de culture.

#### 4.3.3.7.2. Le développement des cals sur gélose

Le transfert des cals sur gélose a été une étape délicate à franchir. Quand les cals formés dans le milieu liquide mesurent déjà 0,4 mm de diamètre, le transfert a été relativement facile. Avec des cals de 0,2 mm, nous avons résolu le problème en éliminant le choc de contact avec la gélose par la présence d'une fine pellicule de milieu liquide sur la surface gélosée.

Nous avons essayé d'incorporer dans des blocs de gélose les cals de faible dimensions obtenus en milieu liquide. Quel que soit le stade d'évolution du protoplaste dans le milieu F, son incorporation dans la gélose n'a pas stimulé la formation de la paroi. Ces mêmes résultats ont été par ailleurs observés sur les protoplastes issus des milieux M, C1 et w06. A l'intérieur de la gélose, les cellules poursuivent leurs divisions par bourgeonnement une ou deux fois, puis s'arrêtent.

Le transfert individuel est possible pour les cals les plus volumineux qui peuvent facilement être manipulés avec des pinces brucelles. Nous les repiquons un à un sur le milieu gélosé. Pour les cals de petite dimension, le transfert a été réalisé à la pipette.



- Fig. 84 : Détail des colonies au moment du transfert sur gélose (milieu M). (la barre = 0,1 mm).
- Fig. 85 : Développement des colonies sur milieu gélosé. (la barre = 0,2 mm).
- Fig. 86 : Cals sur milieu gélosé après 2 semaines. (la barre = 4 mm).
- Fig. 87 : Cal après 3 semaines sur milieu gélosé. (Echelle 8/3).
- Fig. 88 : Développement des cals après un mois sur milieu gélosé. (Echelle 4/3).

Le développement ultérieur des cals transférés sur gélose a été normal. Ces cals deviennent verts à partir du 15<sup>e</sup> jour. Ils sont de texture semi friable et sont apparentés à ceux obtenus à partir d'explants de cotylédons et de jeunes feuilles (photo 63).

#### 4.3.4. Conclusion sur l'isolement et le développement des protoplastes

De cette étude des protoplastes de Manioc nous pouvons dégager les traits essentiels :

- il est possible d'isoler des protoplantes viables de Manioc à partir de n'importe quel type de matériel sain, qu'il soit obtenu de serre ou de culture in vitro. La quantité de protoplastes isolés par gramme de limbe passe de  $20 \cdot 10^6$  à  $60 \cdot 10^6$  lorsque nous pratiquons 2 macérations successives. Cette facilité à produire les protoplastes permet un isolement à partir de 2 ou 3 plantes contenues dans les tubes à essai, âgées de 25 jours, soit environ 0,1 gramme de limbe pour l'obtention de  $2 \cdot 10^6$  à  $6 \cdot 10^6$  protoplastes ;

- Les protoplastes de Manioc sont capables de survivre plus de 30 jours dans le milieu de culture même sans leur paroi cellulaire. Leur prolifération se réalisera alors par bourgeonnement. Ces cellules issues des bourgeonnements peuvent se séparer, ce qui augmentera le nombre de cellules libres dans le milieu de culture ou s'associer en évoluant en véritable pseudo-cals de plus de 1 mm de diamètre. Le manque de formation de paroi complète rend ces structures non viables car elles éclateront au cours de leur transfert sur le milieu gélosé ;

- Les cellules filles bourgeonnées, séparées ou associées peuvent, quand les conditions de culture le leur permettent, à un moment quelconque, reconstruire leur paroi et se cliver avec formation de la lamelle moyenne entre les deux cellules filles. C'est le mode classique de la division mitotique chez les végétaux supérieurs ;

- La formation de la paroi nécessite la présence d'ammonium comme l'a souligné MEYER (1981). Nos cultures sans ammonium n'ont pas permis de développer une paroi rigide. A  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  nous n'avons pas eu de réponse positive à la formation pariétale. Par contre, les teneurs en  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  de  $800 \text{ mg.l}^{-1}$  ont permis l'induction d'une paroi cellulaire sur toutes les cellules sur le milieu M ;

- Les phytohormones exogènes influencent cette régénération des parois cellulaires. L'absence d'ANA n'a permis aucun développement, ni chez les protoplastes isolés des feuilles adultes, ni chez ceux isolés des feuilles jeunes.

Des quantités faibles de l'ordre de  $1 \text{ à } 2 \text{ mg.l}^{-1}$  d'ANA n'ont induit que le bourgeonnement. Le clivage nécessite des quantités d'auxines plus élevées de l'ordre de  $3 \text{ à } 4 \text{ mg.l}^{-1}$ , concentrations plus élevées que celles nécessaires au développement in vitro d'une colonie tissulaire de la même espèce, comme le remarquaient dans des travaux antérieurs CHUPEAU et BOURGIN (1980).

Selon le type d'explant mis en culture, la multiplication des protoplastes du Manioc en présence de faibles teneurs en auxine (ANA =  $1 \text{ à } 2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) s'effectuera uniquement par bourgeonnement sans reformation de la paroi. Lorsque nous avons des quantités suffisantes d'ANA et que les conditions générales de la culture sont favorables, la synthèse de la paroi intervient et la

prolifération se réalise par des mitoses avec formation de paroi : c'est le clivage.

L'obtention de colonies viables à partir des protoplastes du Manioc, nous permet donc d'envisager les possibilités de sélection des clones cellulaires à partir de divers cultivars de Manioc avec l'espoir d'obtenir des hybrides somatiques en choisissant l'un des parents parmi des cultivars résistants à la bactériose.

4.4. ESSAI D'APPLICATION DES PROTOPLASTES A L'ETUDE  
DES VARIABILITES GENETIQUES

#### 4.4.1. Les cultures sur un milieu sélectif renfermant la toxine (Manihocine .)

Les résultats obtenus dans le chapitre précédent dégagent 3 caractéristiques essentielles. Nous notons en effet :

- Une abondance, une homogénéité et une propreté des isolements ;

- une reproductibilité des phénomènes observés à travers les nombreux essais effectués ;

- une évolution favorable des cultures jusqu'à l'obtention de cals à croissance indéfinie, après les transferts sur milieux gélosés. Une situation génétique créée au sein d'une population de protoplastes en culture peut alors être maintenue et contrôlée à travers la culture. Aussi, nous était-il possible d'entreprendre un criblage de protoplastes vis-à-vis de la toxine bactérienne: la *manihocine* afin d'en observer ensuite les effets génétiques éventuels induits.

##### 4.4.1.1. Les protoplastes utilisés .....

Les protoplastes isolés à partir de variétés sensibles à la bactériose ont été donc choisis pour ces expérimentations. Il s'agit de protoplastes fraîchement isolés cultivés dans le milieu enrichi en *manihocine*. Les protoplastes affectés à ce type d'expérience doivent donc être d'une qualité parfaite, de façon que la mortalité liée à notre technique d'isolement soit réduite. La première macération de certains isolements peut offrir des protoplastes de bonne qualité, mais lorsque celle-ci révèle beaucoup de débris cellulaires ou des protoplastes de di-

mensions faibles, nous utiliserons alors les protoplastes issus d'une seconde macération, qui nous l'avons vu, sont en général toujours de bonne qualité.

#### 4.4.1.2. *La manihocine* .....

La toxine bactérienne : un extrait de *manihocine* utilisé pour ces recherches a été isolée en avril 1982 à partir des plages de flétrissement foliaires des feuilles du cultivar NGAMFOUO attaqué par la bactériose en mars 1981. Cet extrait a été soumis à de nombreux tests de toxicité décrits précédemment dans l'étude sur la toxine. Les résultats obtenus au niveau des tests foliaires, nous permettent de considérer que cet extrait suffisamment toxique et représentatif de l'effet toxique du flétrissement bactérien peut par conséquent servir à la confection d'un milieu sélectif de choix.

L'étude d'un tel milieu demande à être menée avec des concentrations physiologiques afin d'être plus proche des effets observés dans la nature. Pour cette raison, les tests effectués sur les protoplastes, contrairement à ceux appliqués aux lobes foliaires, nécessitent une dilution de la *manihocine*. Notre préparation d'extrait de *manihocine* a été réalisée en concentrant dix fois le volume initial. Ce concentré a été conservé au congélateur afin de pouvoir l'utiliser au moment voulu. Le pH du milieu sélectif est ajusté à 5,6 avec une solution normale d'HCL. Le milieu est stérilisé par filtration à travers un filtre millipore de porosité 0,45  $\mu$ .

#### 4.4.1.3. *Le milieu de culture* .....

Le milieu de culture de base choisi pour ce type d'expérience est le milieu C1. Nous l'avons choisi tout simplement parce que nous avons voulu imposer dans les essais avec

*manihocine* un rythme de changement de milieu qui correspond à celui respecté au moment où nous faisons une culture normale dans le milieu C1.

4.4.1.4. Etude de la tolérance des protoplastes vis-à-vis de  
 .....  
 la *manihocine*  
 .....

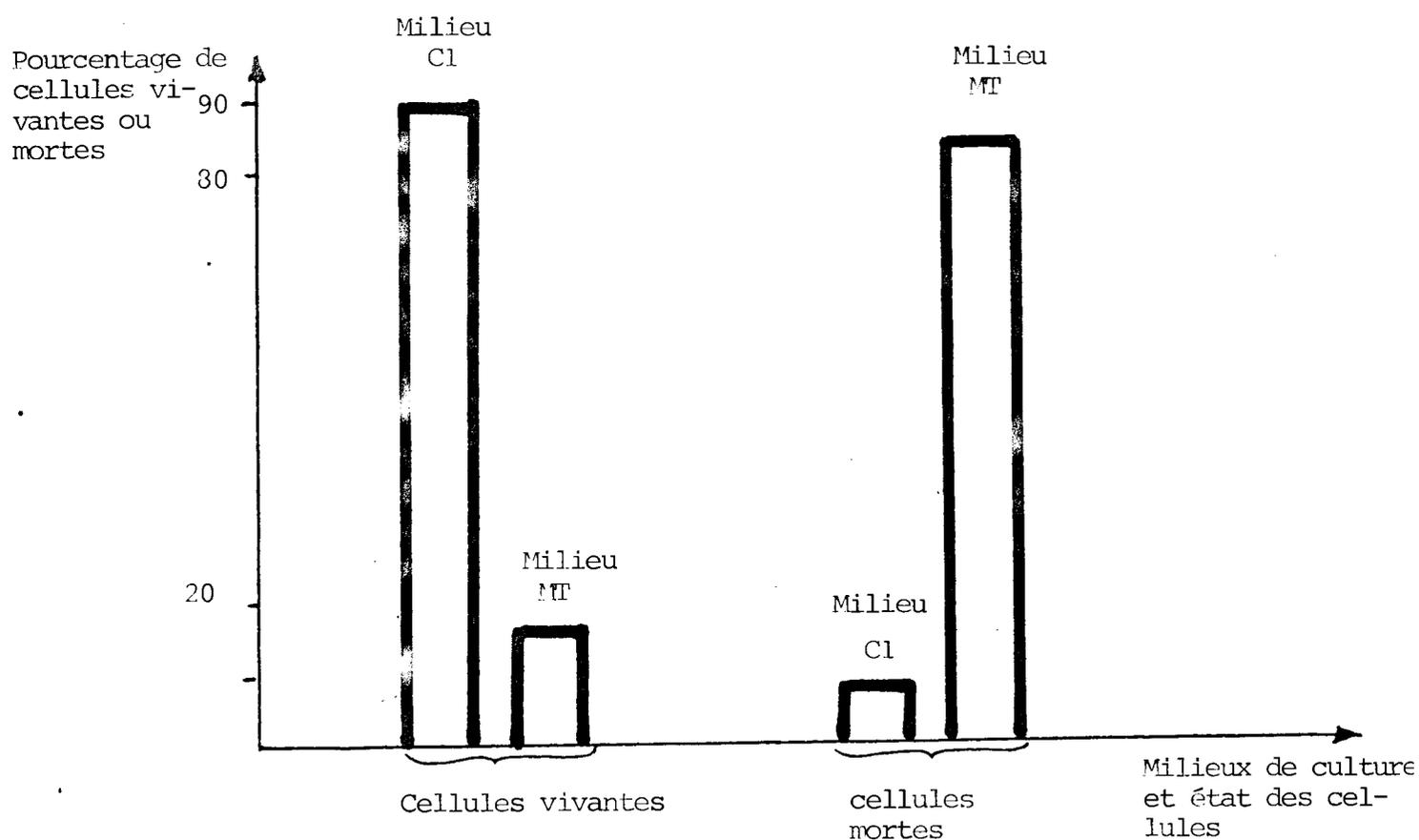
L'emploi correct de la *manihocine*, dans nos essais implique une connaissance préalable d'un seuil de tolérance. Le tableau suivant donne la mortalité induite par la *manihocine* dans le milieu C1 sur le cultivar CB en fonction des différentes teneurs en *manihocine* de ce milieu de base.

TABLEAU N° XVII : Mortalité observée en présence de la *manihocine* après 1, 2 et 4 jours. Les concentrations indiquées sont données en volume de *manihocine* par volume total du milieu.

Nombre de jours après l'ensemencement	Pourcentages de mortalité observés sur milieu renfermant diverses teneurs en <i>manihocine</i>			
	1 VOL /vol	1/2 VOL /vol	1/5 VOL /vol	1/10 VOL /vol
1	100	100	95	75
2	-	-	100	82
4	-	-	-	85

L'examen de ce tableau indique que la concentration en *manihocine* supportable par les protoplastes est celle qui correspond à la dilution  $10^{-1}$  de la *manihocine* dans le milieu de culture C1. Au 4e jour de la culture environ, 15 % de cellules restent vivantes. La figure N°89 nous montre la différence de mortalité entre le témoin milieu C1 sans *manihocine* et le milieu C1 avec *manihocine*. Elle nous montre que la mortalité courante induite par notre technique d'isolement est de 9 %, alors que la mortalité relevée dans le milieu MT est de 83 %. Si nous considérons que 9 % de la mortalité proviennent de nos techniques de culture, nous enregistrons donc une mortalité propre à la *manihocine* d'environ 75 %.

FIGURE N° 89 : Mortalité observée en milieu témoin C1 est sur milieu MT enrichi en *manihocine* 1/10. Les observations sont faites après 4 jours de culture.



Nous avons ensuite comparé les effets toxiques de la *manihocine* vis-à-vis de nos 4 cultivars.

TABLEAU N° XVIII : Malela1, CB, MA255 et Glaziovii  
Dilution de *manihocine*  $10^{-1}$   
(pourcentages de cellules mortes (CM) et des  
cellules vivantes (CV))

Milieux utilisés	Malela 1		CB		MA 255		Glaziovii	
	CM	CV	CM	CV	CM	CV	CM	CV
Milieu de base C1	14,2	85,8	9	91	8,9	91,1	11,4	88,6
Milieur enri- chi en Toxine MT	98,5	1,5	83	17	81,5	18,5	86,6	13,4

A la dilution de  $10^{-1}$ , la concentration trop forte est nocive pour les protoplastes de tous nos cultivars, en particulier, elle n'établit pas de différences au niveau des taux de mortalité entre les cultivars sensibles et résistants à la bactériose. Si nous voulons disposer d'un témoin cultivar résistant à la *manihocine* dans nos expériences, nous devons sans doute diminuer la concentration de la toxine dans le milieu de culture. Nous sommes amenés ainsi à essayer la dilution de 1/15.

Avec une dilution au 1/15, nous constatons alors une différence significative entre les cultivars résistants et les cultivars sensibles comme l'indiquent les résultats consignés dans le tableau XIX.

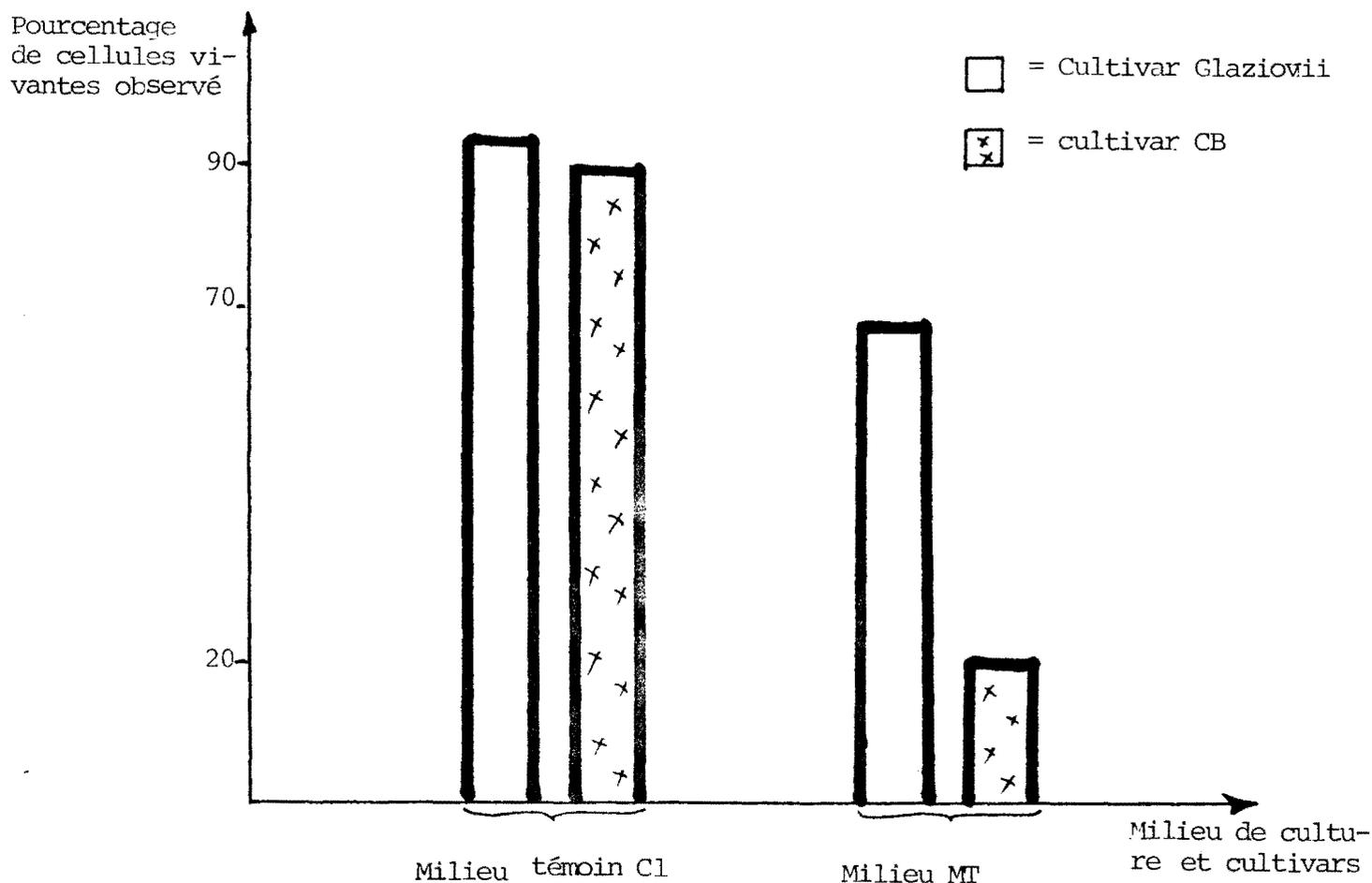
TABLEAU N° XIX : Comparaison de mortalité entre le cultivar CB et le cultivar Glaziovii avec la dilution 1/15 de *manihocine* (pourcentage des cellules mortes (CM) ou vivantes (CV))

Milieux utilisés	CB		Glazovii	
	CM	CV	CM	CV
Milieu de base C1	9,5	90,4	6,6	93,4
Milieu avec mahocine MT	79,5	20,5	32	68

Cette dilution, à 1/15 volume de *manihocine*, ne laisse que 20 % de cellules encore vivantes chez le cultivar sensible CB, alors que nous en obtenons 68 % chez le cultivar résistant glaziovii, différences visualisées dans les histogrammes de la figure 90.

Ces expériences montrent que si la dilution  $10^{-1}$  de *manihocine*, qui correspond à la concentration de *manihocine* existant dans le filtrat de culture, ne permettait pas d'établir de différences significatives entre les différents cultivars, par contre la dilution à 1/15 met en évidence des différences de sensibilité vis à vis de la *manihocine* entre les 2 cultivars, l'un sensible à la bactériose (CB), l'autre résistant (Glaziovii). Cette dilution au 1/15 a donc été retenue par la suite. Le cultivar Glaziovii peut donc à ce niveau être considéré comme un cultivar résistant à la *manihocine* utile pour nos futures expérimentations.

FIGURE 90 : Les différences de réponses vis à vis de la toxine de 2 cultivars : l'un résistant (Glaziovii), l'autre sensible (CB).



#### 4.4.1.5. La culture des protoplastes sur milieux renfermant la ..... *manihocine* .....

##### 4.4.1.5.1. Les ensemencements

Le pH du milieu C1 auquel nous ajoutons de la manihocine est ajusté à 5,6 à l'aide d'HCL (N). Nous incorporons les protoplastes isolés et rincés de la même façon que pour les cultu-

res normales (de la souche CB sensible) avec les mêmes densités de culture.

Un milieu de culture sans *manihocine* constitue le témoin dit milieu de base. Quand cela est nécessaire, un autre témoin, le témoin Glaziovii ou témoin résistant à la *manihocine* peut être ajouté à ce schéma expérimental.

#### 4.4.1.5.2. Les phénomènes observés

##### 4.4.1.5.2.1. L'aspect des protoplastes morts

Nous avons décrit ce phénomène plus haut dans les cultures normales où elle apparaît sur cette souche CB généralement inférieure à 10 %. Le tableau XIX nous a indiqué que la mortalité totale observée dans le milieu MT est de l'ordre de 80 %. Or l'aspect des protoplastes morts est très divers sur ce milieu MT. Nous l'avons regroupé en 3 catégories.

Une 1<sup>ère</sup> catégorie est constituée de protoplastes morts plus ou moins crispés, sans grandissement cellulaire. Cette catégorie intéresse surtout les protoplastes égaux ou inférieurs à 10  $\mu$ m de diamètre.

Comme ceux observables lors des mortalités enregistrées en culture sur milieu de base, le 2<sup>e</sup> aspect est marqué par la présence d'une énorme vacuole dans le protoplaste qui est sur le point d'éclater.

Dans le 3<sup>e</sup>, et lorsque l'attaque de *manihocine* est violente, le protoplaste éclate pour former une bouillie dans le milieu de culture. Cette situation se rencontre généralement, lorsque nous réalisons des dilutions de *manihocine* de 1/10 (V/V).

En ce qui concerne les protoplastes restés en vie sur le milieu renfermant la toxine, le bourgeonnement est la première forme de division qui apparaît sur ce milieu MT, mais il n'est pas continu comme dans la culture sans *manihocine*. Les cellules se divisent une ou deux fois et s'arrêtent, ce qui conduit à la formation des amas de 2 à 4 cellules. Ainsi, nous n'avons pas observé de volumineux amas cellulaires dans le milieu MT. Nous remarquerons par contre, la présence de mini protoplastes.

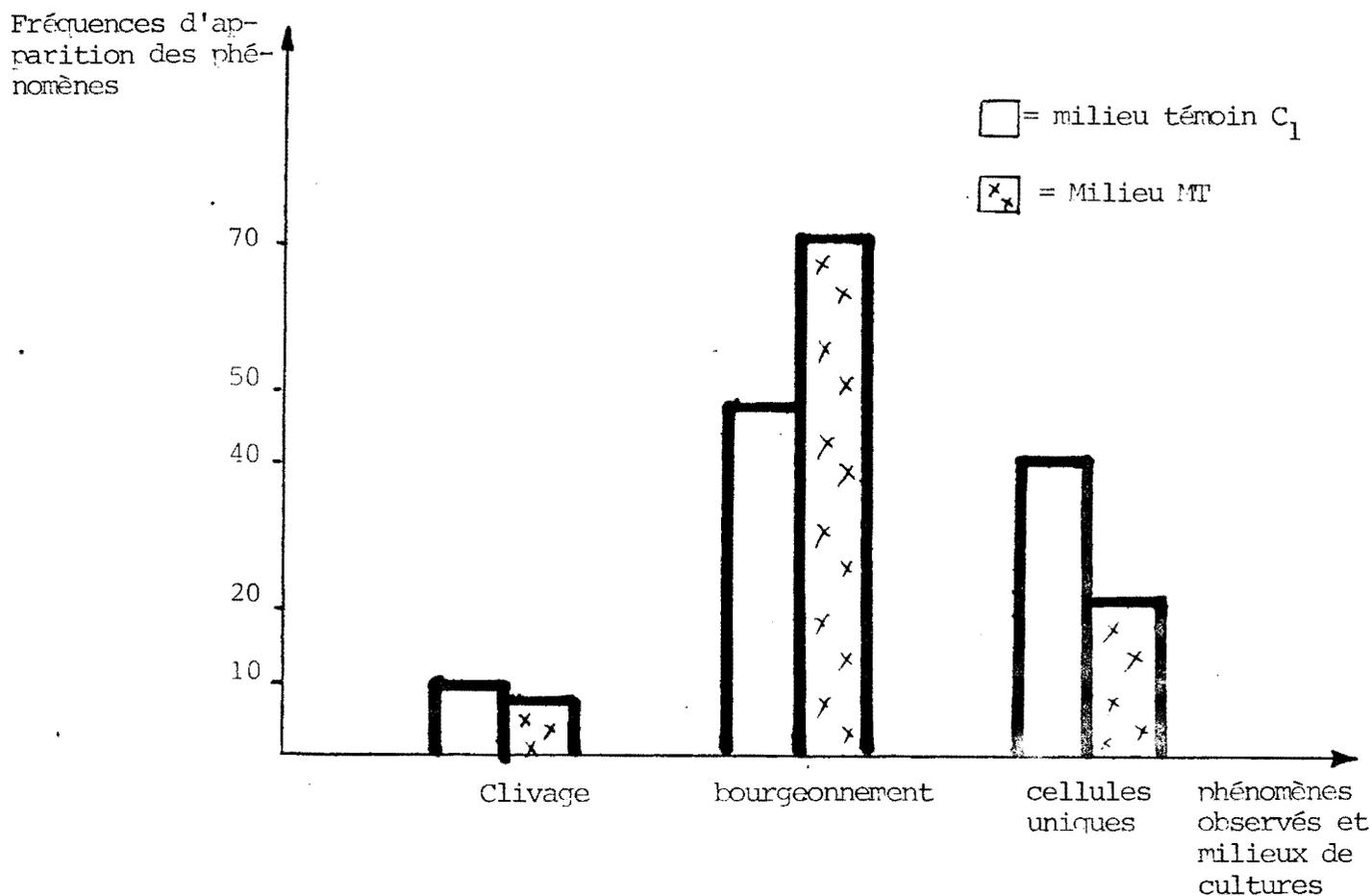
#### 4.4.1.5.2.2. La formation des miniprotoplastes

Après que les protoplastes aient bourgeonné une ou deux fois nous avons commencé à observer la formation de *mini-protoplastes*. Beaucoup de cellules uniques n'ayant pas bourgeonné ont formé de miniprotoplastes ; d'autres ont éjecté une partie de leur cytoplasme. Dans nos cultures, la formation de miniprotoplastes n'a été rencontrée que dans le milieu MT. De même, l'éjection du cytoplasme, qui semble représenter plutôt une réaction aux effets dépressifs du milieu toxique, n'a pas été observé en culture normale. La formation de miniprotoplastes est due à des bourgeonnements à partir d'un protoplasme normal qui forment une chaîne de petits protoplastes dont le nombre peut varier de 1 à 4. Ces miniprotoplastes mesurent environ 3 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre. Dans nos cultures, nous n'avons pas noté d'évolution pour ces miniprotoplastes.

#### 4.4.1.5.2.3. La division par clivage

Nous avons observé la division par clivage 1 à 2 jours après l'apparition des divisions dans le milieu normal. Le pourcentage de divisions est légèrement inférieur comme le montre la figure N° 91.

FIGURE N° 91 : L'apparition des divisions par clivage dans les milieux C1 et MT 12 jours après ensemencement



Pour le milieu MT, le bourgeonnement regroupe également la formation des miniprotoplastes. Ces observations sont faites 6 jours après le transfert pour les témoins sur le milieu C2. En ce qui concerne les protoplastes isolés sur le milieu MT, leur transfert a été réalisé sur un milieu C2 contenant de la *manihocine* diluée à 1/20 (V/V). Le clivage apparaît donc dans le milieu MT avec un taux (8 %) non négligeable. Notons cependant,

avec la présence de ces quelques protoplastes, clivés l'importance des bourgeonnements, la formation de miniprotoplastes et la faible quantité de cellules uniques.

Mais les protoplastes en divisions par clivage apparues dans le milieu MT évoluent normalement en formant des colonies puis des cals capables d'être par la suite cultivés sur un milieu gélosé.

#### 4.4.1.6. Conclusion .....

Lorsque les protoplastes du cultivar CB, cultivar sensible à la bactériose sont placés dans un milieu de culture contenant 1 volume de *manihocine* pour 15 volumes de milieu de culture, environ 20 % de protoplastes restent vivants. Quand, après une semaine nous changeons la dilution 1/15 (V/V) par la dilution 1/20 les cellules continuent à vivre comme dans un milieu sans *manihocine* et peuvent se diviser par clivage. Ces divisions, de l'ordre de 14 % au 19<sup>e</sup> jour de la culture, nous fourniront 8 % de cals viables capables de supporter un transfert ultérieur sur gélose.

Ces résultats nous montrent qu'un criblage vis à vis des effets toxiques de la *manihocine* est possible à réaliser au sein d'une population de protoplastes.

Nous savons que les cellules du mesophylle de Manioc sont d'un type unique issu d'un tissu homogène ; le fait que sous la pression de la *manihocine* un cinquième des protoplastes peut rester en vie permet de penser que, si les cellules du cultivar CB n'ont pas été tuées par la pression de *manihocine* 1/15, c'est parce qu'elles se comportent comme les cellules de *Glaziovii* (68 %) sous cette même pression de *manihocine*. Or nous

savons que le cultivar glaziovii n'est pas attaqué par la bactériose, et, dans nos expériences de bioessais, le lobe du cultivar glaziovii n'a pas été affecté par le flétrissement induit par la *manihocine* sur CB. Alors, les 20 % de protoplastes survivants constituent-ils une catégorie privilégiée des cellules de la variété, prédisposée à résister à la *manihocine* ? Ou, ces 20 % de protoplastes survivants ont-ils été modifiés en présence de la toxine pour résister aux attaques de manihocine ?

Dans les deux cas nous sommes en présence d'une variabilité qu'il sera important d'étudier ultérieurement.

#### 4.4.2. Les essais d'hybridation sur les protoplastes de Manioc

Nous avons essayé quelques solutions renfermant du polyéthylène glycol (PEG) susceptibles d'être utilisées en vue d'obtenir la fusion complète des protoplastes.

##### 4.4.2.1. Les solutions d'hybridation

La solution de PEG essayée renferme les éléments minéraux mentionnés au paragraphe 3144 et le PEG 1540. Trois teneurs en PEG ont été employées :

PEG1 = 10 grammes par 50 ml

PEG2 = 10 grammes par 20 ml

PEG3 = 15 grammes par 20 ml

Le rinçage des protoplastes est effectué après 2, 4, 5, 7 et 10 minutes. Les observations réalisées au cours de cet essai sont consignées dans le tableau XX.

TABLEAU N° XX : action du PEG 1540 à 10g/50 ml, 10gr/20 ml et 15gr/20 ml sur les protoplastes de manioc

Les temps d'action en mn	phénomènes observés en présence de diverses concentrations en PEG exprimées en gr par ml de solution		
	10/50	10/20	15/20
2	contact entre les cellules	uniquement contact entre les cellules	uniquement contact entre les cellules
4	"	groupements cellulaires nombreux	agglomérat cellulaire avec beaucoup de mortalité
5	début de fusion	fusion non parfaite	quelques fusions mais ensemble non sphérique
7	fusions non terminées	fusions non terminées	beaucoup d'agglomérats
10	"	nombre faible de fusions	pas de fusions véritables

Ce tableau nous indique que la quantité 10 grammes de PEG 1540 est trop faible pour favoriser les fusions de protoplastes même après 10 minutes d'incubation. La solution à 15 grammes de PEG pour 20 ml paraît trop forte et les agglomérats cellulaires constitués ont tendance à éclater par la suite. La solution à 10 grammes de PEG pour 20 ml semble par contre convenir. Avec cette dernière solution, nous avons quelques fusions déjà après 10 minutes d'incubation.

#### 4.4.2.2. Les temps d'action du PEG

Dans le but de déterminer le meilleur temps d'action du PEG avec cette solution à 10 grammes pour 20 ml, nous avons augmenté la durée d'observation en présence du PEG.

Nos différentes observations sont consignées dans le tableau XXI.

TABLEAU XXI : action du PEG 1540 sur les protoplastes de manioc avec des temps d'incubation variés

Temps en minutes	Les phénomènes observés			
	Cellules libres	2 cellules en contact	cellules agglomérées	Fusions véritables
20	64	8	19	9
30 *	76	8	5	11
40 *	81	7	4	8

\* beaucoup de cellules agglomérées n'ont pu être comptabilisées.

Après 20 minutes de contact, nous avons environ 19 % de cellules agglomérées. Au fur et à mesure que la durée d'exposition augmente, beaucoup de cellules des agglomérats éclatent et ne sont plus comptabilisables ; le nombre de cellules libres dans le milieu par rapport au nombre de fusions observées s'accroît. Pour cette teneur en PEG, le meilleur temps d'exposition est compris entre 20 minutes et 40 minutes avec formation d'environ 10 % de fusion.

par rapport aux cellules libres et agglomérats. Les observations que nous avons enregistrées, ont été réalisées au moment de la manipulation, lorsque les fusions s'opéraient sous le microscope. Une fois l'opération de fusion achevée, les cellules parfaitement fusionnées ne se distinguent plus des autres, sauf dans le cas où la fusion s'est réalisée entre deux volumineuses cellules ou entre une cellule issue des nervures, donc sans beaucoup de chloroplastes, et une cellule du mésophylle. Si on veut suivre plus avant les fusions, il importe d'opérer un marquage de l'une des espèces utilisées.

#### 4.4.2.3. L'évolution des divisions dans le milieu à PEG .....

Le comportement des cellules dans le milieu à PEG est identique à celui observé dans le milieu C1 normal. Dans le milieu renfermant le PEG, les cellules bourgeonnent une ou deux fois et ne constituent pas de gros agrégats. Les divisions par clivage commencent dès le septième jour. Cependant, au seizième jour de la culture, nous n'avons que 10 % de division par clivage, que ce soit pour les cellules rincées après 20 minutes d'incubation ou pour celles rincées après 30 minutes ; et ce taux de divisions par clivage n'évolue pas beaucoup pendant tout le reste de la culture. Mais, les divisions observées peuvent poursuivre leur évolution jusqu'à la formation des cals macroscopiques capables de supporter un transfert ultérieur sur gélose.

#### 4.4.2.4. Conclusion .....

Ces essais préliminaires sur la fusion des protoplastes montrent que l'hybridation somatique au niveau du manioc est réalisable. Il convient cependant d'améliorer le taux de fusion afin de rendre l'opération rentable. Il est nécessaire de pouvoir marquer l'une des deux espèces à fusionner afin de permettre un contrôle du phénomène et de pouvoir sélectionner les cellules hybrides formées.

V - CONCLUSION GENERALE

Nous pouvons à la fin de ce mémoire, tirer les conclusions générales suivantes :

1 - Le bouturage *in vitro* du manioc est facilement réalisable sur un grand nombre de cultivars, parmi lesquels les cultivars de l'espèce agricole (*Manihot Esculenta Grantz*) à ceux de l'espèce sauvage *Manihot Glaziovii* et leurs hybrides.

L'utilisation judicieuse des phytohormones a permis la mise au point d'une technique de multiplication rapide. On peut sans éliminer l'apex principal, lever l'inhibition des bourgeons axillaires d'une pousse obtenue en bouturage *in vitro*. Cette méthode permet l'obtention d'au moins 5 plantes par bouture en 25 jours lorsqu'on part d'une bouture issue de serre, et d'au moins 3 plantes pour des boutures issues des plantes cultivées *in vitro*. Cette technique est applicable à la multiplication industrielle du manioc.

2 - L'obtention *in vitro* de cals a montré que, lorsque nous partons d'organes juvéniles comme le cotylédon et l'apex caulinaire, les potentialités organogènes du Manioc s'expriment par une caulogénèse abondante. Nous observons la formation de pousses au niveau des cals cotylédonnaires et des cals formés lors du développement *in vitro* des méristèmes caulinaires. Avec le cotylédon, nous avons obtenu en moins de 25 jours de nombreuses plantes entières. Il est possible avec un seul méristème apical mis en culture *in vitro*, d'obtenir une cinquantaine de plantes en 35 jours. Il semble que chez le méristème apical, les cellules actives du dôme peuvent sous l'effet des phytohormones et de l'éclairement, initier un programme caulogène. Le développement des nodules méristématiques formés est totalement dépendant du rapport de phytohormones/exogènes BAP/ANA. Ce rapport qui, dans nos travaux est de 1/2 permet selon les conditions d'éclairement, soit l'initiation des bourgeons, soit leur développement en pousses feuillées.

3 - La bactérie, *Xanthomonas manihotis*, induit le flétrissement des feuilles sur les cultivars sensibles par l'intermédiaire d'une toxine, la *manihocine*. Cette *manihocine* peut être obtenue avec le filtrat de culture du parasite multiplié dans un milieu renfermant de l'*Hydroxyethylcellulose* (HÉC) comme source de carbone. Les résultats obtenus au niveau de différents essais ont montré que la toxicité du filtrat de culture induisait également un flétrissement au niveau du lobe de manioc ; et, ce flétrissement observé est semblable à celui rencontré lors des attaques naturelles de *Xanthomonas manihotis* en champs.

Le composé isolé à la suite de nos techniques de purification induit le même symptôme de flétrissement au niveau du lobe foliaire. Le procédé de purification basé sur la précipitation des polysaccharides par l'éthanol permet de penser que la *manihocine* est de nature polysaccharidique. Le niveau de purification atteint, autorise l'utilisation de la *manihocine* pour l'élaboration de milieux sélectifs pour la culture des protoplastes.

Le criblage des cultivars effectué au moyen de la *manihocine* a montré que les cultivars sensibles à la bactériose présentent les symptômes de flétrissement contrairement au cultivar de *Manihot glaziovii*, espèce résistante. La *manihocine* ainsi préparée peut donc servir dans un test de criblage des variétés de manioc vis à vis de la bactériose.

4 - L'isolement de protoplastes viables de manioc se réalise aisément. La production de protoplastes viables peut fournir plus de 20 millions de protoplastes par gramme de limbe lorsque nous pratiquons 2 macérations successives. Dans nos conditions de culture, deux phénomènes importants au niveau cellulaire ont été observés : la prolifération par bourgeonnement et la division par clivage.

#### 4.1. LA PROLIFERATION PAR BOURGEONNEMENT

Le bourgeonnement qui ne représente pas un phénomène pathologique, est chez les protoplastes de Manioc une division de la cellule avec partage du cytoplasme par constriction au niveau de la zone médiane. Ceci entraîne dans le milieu de culture deux conséquences : une augmentation du nombre de cellules libres quand les cellules filles bourgeonnées se séparent ; une formation de véritables colonies de cellules agglomérées quand les cellules filles bourgeonnées restent associées.

Les cellules qui se divisent par bourgeonnement sont celles qui ne reforment pas de paroi pecto-cellulosique. Certaines cellules qui se sont divisées initialement par bourgeonnement peuvent à un certain moment, quand les conditions de culture le permettent, reformer totalement leur paroi et entrer alors en division par clivage qui est la division habituelle observée chez la cellule végétale chez les plantes supérieures. La nature de la division par bourgeonnement implique que les cellules filles bourgeonnées n'ont pas nécessairement la même quantité d'organites intracellulaires, cela peut être un facteur de variation au sein de la population des colonies nouvellement formées par clivage.

#### 4.2. LA DIVISION PAR CLIVAGE

Tout au long de notre étude, nous avons vu que l'apparition du clivage est lié à la formation de la paroi des cellules.

Chez le Manioc, cette formation pariétale est précoce. Elle commence dès le cinquième jour.

La formation pariétale est un phénomène dépendant de la composition des milieux et en particulier de leur concen-

trations en auxines exogènes. La régénération des parois cellulaires semble exiger des conditions précises telles que la présence d'ions  $\text{NH}_4^+$  ( $800 \text{ mg.l}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  environ), une solution minérale fortement diluée, renfermant des teneurs en auxines élevées ( $3$  à  $4 \text{ mg.l}^{-1}$  d'ANA).

D'une manière générale, c'est le milieu M le moins concentré en éléments minéraux qui a initié la division par clivage d'une façon la plus régulière et la plus homogène. Les divisions initiées dans ce milieu conduisent à la formation des cals à développement régulier qui, dès le début de la 4<sup>e</sup> semaine de culture, peuvent être transférés sur milieu gélosé.

La formation des colonies, puis des cals à croissance indéfinie est régulièrement obtenue à partir de nos cultures de protoplastes. La formation de colonies tissulaires à partir de protoplastes est donc réalisable, le manque de temps ne nous a pas permis de mettre en oeuvre les essais de régénération de la plante entière. Toutefois, les remarquables potentialités organogènes des tissus de Manioc révélées au cours de nos premières expériences montrent qu'une régénération des plantes à partir du protoplaste de Manioc est possible.

5 - L'étude d'orientation de variation génétique s'est révélée réalisable dans les conditions de notre expérimentation. La *manihocine* : nous a permis de confectionner un milieu sélectif. La culture du protoplaste dans ce dernier a permis le criblage au sein d'une population de protoplastes, et, les cellules survivantes sont capables d'évoluer normalement en cal. Par ailleurs, des essais d'hybridation entrepris nous ont montré qu'il est possible d'obtenir des fusions entre protoplastes isolés du Manioc. Il serait intéressant cependant de mettre au point pour cette étude, une technique de marquage convenable afin de reconnaître facilement les espèces fusionnées.

Malgré le temps restreint qui nous était accordé, ce long travail montre que nos diverses mises au point techniques permettent la réalisation de notre objectif final qui était l'obtention par culture de protoplastes d'une variation génétique orientée chez une espèce agricole.

VI - BIBLIOGRAPHIE

- ADEJARE (G.O) COUTTS (R.H.A) :  
1981 : Eradication of cassava mosaic disease from Nigerian cassava clones by meristem tip culture.  
Plant cell Tissue organ culture,1 : 25-32
  
- AMARAL (J. Franco do)  
1912 : Estudo do organismo causador da bacteriose da mandioca. (Brazil).  
Arquivos do Instituto biologico 13 : 119-126
  
- AMARAL (J. Franco do)  
1945 : Novos estudos do agente etiológico de bacteriose da mandioca. (Brazil).  
Arquivos do Instituto biologico 16 : 361-368
  
- AMARAL (J. Franco do)  
1958 : Caracteres bioquímicos do xanthomonas manihotis ex. rubrisubalbicansis suas posições na chave de burkholder (Schizomycetes, pseudomonaceae), (Brazil).  
Arquivos do Instituto biologico 21 : 65-72
  
- AMMIRATO (P.V.)  
1977 : Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway - interaction of abscisic acid, zeatin and gibberellic acid -  
plant. physiol. 59 : 579-586 .
  
- ANDERSON (A.J)  
1977 : Isolation from three species of colletotrichum of Glucan containing polysaccharides that elicit browning and phytoalexin production in bean.  
Phytopathology,68 : 189-194
  
- ARAGO (H. de B)  
1931 : Pesquisas sobre phytomonas françai  
Memorias do Instituto Oswaldo Cruz,25(4) : 299-302
  
- AYENOR (G.S)  
1978 : Miscellaneous uses for starch : "what starch can do cassava starch does it best"  
IITA 1978 8P
  
- AYERS (A.R) EBEL (J) FINELLI (F) BERGER (N) ALBERSHEIM (P)  
1976 : Host pathogen interaction  
plant physiol. 57: 751 -759

- AYERS (A.R) EBEL (J) BARBARA (V) et ALBERSHEIM (P) 1976  
1976 : Host pathogen interaction  
Plant physiology 57 : 760-765
  
- AYERS (A.R) EBEL (J) BARBARA (V) ALBERSHEIM (P) 1976  
1976 : Host pathogen interaction  
Plant physiol. 57 : 766-774
  
- BAJAJ (Y.P.S) 1974  
1974 : Potentials of protoplasts culture work in agriculture  
Euphytica 23 : 633-649
  
- BAJAJ (Y.P.S) SAETTLER (A.W) 1968  
1968 : Effect of culture filtrates of pseudomonas phaseolicola  
on the growth of exised roots and callus tissu cul-  
tures of bean.  
Phytopath. 58 : 1041-1042
  
- BAJAJ (Y.P.S) SAETTLER (A.W)  
1970 : Effect of halotoxin containing filtrates of pseudo-  
monas phaseolicola on the growth of bean callus tissue.  
Phytopathology, 50 (7) 1065-1067
  
- BAPAT (V.A) SCHIEDER (J)  
1981 : Protoplast culture of several members of the genus  
physalis.  
Plant cell Reports, 1 : 69-70
  
- BALLIO (A)  
1972 : phytotoxins, an exercise in the chemistry of biologi-  
cally active natural products. in Phytotoxins in plant  
diseases. by WOOD (R.K.S), BALLIO (A) et GRANITI (A)  
BARI, Italy 1972, PP. 71-90
  
- BANKS (M.S) and EVANS (P.K)  
1976 : A comparison of the isolation and culture of meso-  
phyll protoplasts from several Nicotiana species  
and their hybrids.  
Plant Science letters, 7 : 409-416

- BANTSIMBA (J) et MABANZA (J)  
1976 : Une nouvelle maladie du manioc en république populaire du CONGO, la bactériose du manioc.  
in Cassava bacterial blight : workshop held at IITA.  
Ibadan, Nigeria 1-4 nov. 1976 PP. 32-34
  
- BAUER (W.D) TALMADGE (K.W) KEEGSTRA (K) ALBERSHEIM (P)  
1973 : The structure of plant cell walls  
Plant physiol 51 : 174-187
  
- BEHNKE (M)  
1976 : Kulturen isolierter zellen von einigen dihaploïden  
solanum tuberosum - klomen and ihre regeneration.  
Z. pflanzenphysiol. 78 : 77-81
  
- BEHNKE (M)  
1979 : Selection of potato callus for resistance to culture  
filtrates of phytophthora infestans and regeneration  
of resistant plants.  
Theor. and Appl. Genet. 55 : 69-71
  
- BELLIARD (G) PELLETIER (G)  
1978 : Hybridation cytoplasmique par fusion de protoplastes  
chez Nicotiana tabacum.  
Physiolo. Vég. 16 (3) 441-448
  
- BELLIARD (G) PELLETIER (G) et FERAULT (M)  
1977 : Fusion de protoplastes de Nicotiana tabacum à cyto-  
plasmes différents : étude des hybrides cytoplasmiques  
néoformés.  
C.R. Acad. Sci. Paris, 284 : 749-752
  
- BIDNEY (D.L) and SHEPARD (J.F)  
1980 : Colony development from sweet potato petiole pro-  
toplasts and mesophyll cells.  
Plant Sciences letters, 18 : 335-342
  
- BIGOT (C)  
1976 : Quelques aspects de la néoformation de bourgeons en  
relation avec la nature des tissus mis en culture.  
Actes du 101e Congrès national des sociétés savantes  
Lilles 1976, Sciences Fasc. 1 PP. 371-382

- BIGOT (C)  
1978 : Multiplication végétative in vitro par néoformation de bourgeons et d'embryons somatiques.  
Service de physiologie végétale ENSH Versailles  
1978 41 P.
  
- BLASCHEK (W) HASS (D) KHOLER (H) FRANZ (G)  
1981 : Cell wall regeneration by *Nicotiana tabacum* protoplasts : chemical and biochemical aspects.  
*Plant Science letters*, 22 : 47-57
  
- BONDAR (G)  
1912 : Una nova molestia bacteriana das hostes da mandioca  
*Chacaras e Quintaes (Brazil)* 5(4) 15-18
  
- BONDAR (G)  
1915 : Molestia bacteriana da mandioca  
*Buletin de agriculture Sao Paulo* 16 : 513-524
  
- BONDAR (G)  
1939 : A bacteriose da mandioca  
*Campo (Brazil)* 10(119) 28-30
  
- BONNETT (H.T)  
1976 : On the mechanism of the uptake of vaucheria chloroplasts by carrot protoplasts treated with polyethylene glycol.  
*Planta*, 131 : 229-233
  
- BONNETT (H.T) and ERIKSON (T)  
1974 : Transfer of algal chloroplasts into protoplasts of higher plants.  
*Planta*, 120 : 71-79
  
- BOOTH (R.H) WHOLEY (D.W)  
1978 : Cassava processing in South east Asia, in Cassava Harvesting and processing proceedings of a workshop held at CIAT, Cali Colombia 24-28 avril PP. 7-11
  
- BRADBURY (J.F)  
1978 : Identifications et caractéristiques du *Xanthomonas manihotis*.  
in la bactériose du manioc en Afrique : le présent, le passé, l'avenir - Compte rendu du Séminaire interdisciplinaire tenu à l'IITA Ibadan Nigéria  
26-30 juin 1978 PP.1-4

- BRAUN (A.C)  
1955 : A study on the mode of action of the wild fire toxin.  
phytopath. 45 : 659-664
  
- BROWN (W)  
1955 : Studies in the physiology of parasitism : the action  
of *Botrytis cinerea*.  
Ann. Botany, 29 : 343-348
  
- CABOCHE (M)  
1980 : Nutritional requirement of protoplasts derived haploid  
tobacco call grown at low cell densities in liquid  
medium.  
Planta, 149 : 7-18
  
- CARLSON (P.S)  
1970 : Induction and isolation of auxotrophic mutants in  
somatic cell cultures of *N. tabacum*  
Science, 168 : 487-489
  
- CARLSON (P.S)  
1973a: The use of protoplasts for genetic research.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70 : 598-602
  
- CARLSON (P.S)  
1973b: Methionine sulfoximine resistant mutants of tobacco  
science, 180 (4093) 1366-1368
  
- CARLSON (P.S) SMITH (H.H) DEARING (R.D)  
1972 : Parasexual interspecific plant hybridization  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69 : 2292-2294
  
- CARLSON (P.S) and POLACCO (J.C)  
1975 : Plant cell culture : genetic aspects of crop improv-  
ment.  
Science, 188 : 622-625
  
- CHALEF (R.S) and CARLSON (P.S)  
1974 : Somatic cell genetic of higher plants  
Ann. rev. genet. 1974) 8 : 267-278
  
- CHUPEAU (Y) et MOREL (G)  
1970 : obtention de protoplastes de plantes supérieures à  
partir de tissus cultivés in vitro.  
C.R. Acad. Sci. (Paris) Série D 270 : 2659-2662

- CHUPEAU (Y) et BOURGIN (J.P.)  
1980: Les protoplastes de cellules végétales.  
in Multiplication végétative des plantes supérieures  
par CHAUSSAT et BIGOT. Ed. Gauthier Villar. PP. 191-221
  
- COCK (J.H) WHOLEY (D) LOZANO (J.C)  
1976 : A rapid propagation system for cassava.  
Cali, CIAT 1976 10 P.
  
- COCKING (E.C)  
1961 : Properties of isolated plant protoplasts  
Nature, 191 : 780-782
  
- COCKING (E.C)  
1973 : Plant cell modification : problems and perspectives  
in collq. Intern. CNRS (Versailles) Ed. de l'Institut  
Nat. de la recherche agronomique  
Paris 1973 PP. 327-337
  
- COCKING (E.C)  
1977 : Genetic modification of plant cell : a reappraisal  
Nature 266 : 13-14
  
- COMSTOCK (J.C.) and SCHEFFER (R.P.)  
1972 : Production and relative host specificity of a toxin  
from helminthosporium maydis.  
Plant dis. Report 56 : 247-251
  
- COMSTOCK (J.C) MARTINSON (C.A) and GENGENBACH (B.G)  
1972 : Characteristics of a host specific toxin produced  
by phyllosticta maydis.  
Phytopath. 62 : 1107
  
- COMSTOCK (J.C) MARTINSON (C.A) and GENGENBACH (B.G.)  
1973 : Host specificity of a toxin from phyllosticta maydis  
for Texas cytoplasmically male sterile maize.  
Phytopath. 63 : 1357-1361
  
- COOKE (R) and MEYER (Y)  
1981 : Hormonal control of tobacco protoplast nucleic acid  
metabolism during in vitro culture.  
Planta, 152 : 1-7
  
- CORNU (A)  
1978 : Variabilité résultant de l'instabilité de la struc-  
ture de l'information héréditaire au cours de la mul-  
tiplication végétative.  
Physiol. veget. 16(2) 205-214

- DAHLBERG (B)  
1978 : Large scale cassava starch extraction processes.in  
cassava harvesting and processing. Proceedings of a  
workshop held at CIAT.cali,Colombia 24-28  
april 1978 PP. 33-36
  
- DALY (J.M)  
1977 : The early biochemical and cytological events in plant  
disease : a perspective in biochemistry and cytology  
of plant parasite interaction. Ed. by TOMIYAMA (K)  
DALY (J.M) URITANI (I) OKU (H) and OUCHI (S) 1977  
PP. 2-9
  
- bis - DANIEL (J.F), BOHER (B),MABANZA (J),MAKAMBILA (C)  
1978 : La bactériose du manioc au Gongo : étiologie  
épidémiologique et lutte.  
in la bactériose du manioc en Afrique : le passé  
le présent, l'avenir  
Compte rendu du séminaire interdisciplinaire qui  
s'est tenu à l'IITA, Ibadan Nigéria 26-30 juin 1978  
PP. 50-55
  
- DARVILL (A.G) Mc NEIL (M) and ALBERSHEIM (P)  
1978 : Structure of plant cell walls  
Plant physiology,62 :418-422
  
- DARVILL (J.E), McNEIL (M) DARVILL (A.G) and ALBERSHEIM (P)  
1980 : Structure of plant cell walls  
plant physiology,66 : 1135-1139
  
- DAVEY (M.R) and COCKING (E.G)  
1972 : Uptake of bacteria by isolated higher plant protoplasts  
Nature,239 : 455-456
  
- DAVEY (M.R) BUSH (E) and POWER (J.B)  
1974 : Cultural studies of a dividing legume leaf protoplast  
system  
plant Science letters,3 : 127-133
  
- DAVEY (M.R) FREARSON (E.M) and POWER (J.B)  
1976 : polyethylene glycol induced transplantation of chlo-  
roplasts into protoplasts : an ultrastructural asses-  
sonent.  
Plant Science letters,7 : 7-16

- DAVEY (M.R) CLOTHIER (R.H) BALLS (M) and COCKING (E.G)  
1978 : An ultrastructural study of the fusion of cultured amphibian cells with higher plant protoplasts  
Protoplasma 96 : 157-172
  
- DAVEY (M.R) COCKING (E.G) FREEMAN (J) PEARCE (N) and TUDOR (I)  
1980 : Transformation of petunia protoplasts by isolated agrobacterium plasmids  
Plant science letter, 18 : 307-313
  
- DEMARLY (Y)  
1972 : Régulation et hétérosis  
Ann. amélie. Plant. 22(2) 143-166
  
- DEMARLY (Y)  
1977a: Relations hôte - pathogène et stratégie des multili- gnées.  
Ann. phytopathol. 9(1) 21-31
  
- DEMARLY (Y)  
1977b: Génétique et amélioration des plantes  
Ed. Masson - Paris 1977 287 P.
  
- DESHAYES (A)  
1973 : Mise en évidence d'une corrélation entre la fréquence de variations somatiques sur feuilles et l'état physiologique d'un mutant chlorophyllien monogénique chez *Nicotiana tabacum* var. SAMSUN  
Mutation Research, 17 : 323-334
  
- DESHAYES (A)  
1978 : Induction de l'aptitude à la variation somatique par la multiplication végétative in vitro et modification de son expression in vivo selon l'état physiologique des cellules.  
Physiol. végét. 16(2) 215-229
  
- DIMMOND (A.E) and WAGGONER (P.E)  
1953 : on the nature and role of vivotoxins in plant diseases  
phytopathology 43 : 229-235
  
- DUBLIN (P)  
1980 : Induction de bourgeons néoformés et embryogénèse somatique. Deux voies de multiplications végétative in vitro des caféiers cultivés.  
Café, cacao, thé, 24(2):121-130.

- DURAND (J)  
1979 : High and reproducible plating efficiencies of protoplasts isolated from in vitro grown haploid *Nicotiana sylvestris* Spegaz and Comes.  
*Z. Pflanzenphysiol.* 93(4) 283-295
  
- DURBIN (R.D)  
1979 : Bacterial phytotoxins : a survey of occurrence, mode of action and composition in phytotoxins in plant diseases. Proceedings of NATO advanced study institute. Pugnochiuso, Italy June 1970 pp. 18-31
  
- DUTUIT (P)  
1981 : Le bourgeonnement des protoplastes issus de mésophylle chez le pétunia hybrida. Effet du niveau d'insertion des feuilles et de leur âge.  
*C. R. Acad. Sci. Paris t. 292 série D* 907-910
  
- EARLE (E.D)  
1978 : Phytotoxin studies with plant cells and protoplasts in *Frontiers of tissue culture*.  
Edit. by T.A THORPE. Proceeding. of the 4th Intern. Cong. of Plant tissue and cell culture - Canada 1978  
pp. 363-372
  
- EBEL (J) AYERS (A.R) and ALBERSHEIM (P)  
1976 : Host pathogen interaction  
*plant physiol.* 57 : 775-779
  
- ENGLISH (P.D) MAGLOTHIN (A) KEEGSTRA (K)  
1972 : A cell wall degrading endopolygalacturonase secreted by *Colletotrichum lindennuthianum*.  
*Plant physiol.* 49 : 293-297
  
- ERICKSON (T)  
1971 : Isolation and fusion of plant protoplasts. in *Les cultures de tissus de plantes*.  
CNRS Paris 1971 pp. 297-301
  
- ESKES (A.B) et al  
1974 : Callus growth and rooting cassava stem segments culture in vitro  
*Acta botanica Neerlandica* 23 (3) : 315 - 320

- EVANS (M.L)  
1974 : Rapid responses to plant hormones  
Ann. rev. plant physiol. 25 : 195-223
  
- EVANS (B.A)  
1981<sup>a</sup>: Genetic variability of somatic hybrid plants  
Newsletter, 33 : 6-11
  
- EVANS (D.A)  
1981<sup>l</sup>: Disease resistance : incorporation into sexually incompatible somatique Hybrid of the genus nicotiana.  
Science 213 : 907-909
  
- FEDER (W.A) et ARK (P.A)  
1951 : Wilting inducing polysaccharides derived from crown gall bean blight and soft rot bacteria  
phytopathology, 41 : 804-808
  
- FEREOLE (L)  
1978 : Multiplication végétative et élimination de la mosaïque du manioc par thermothérapie sur les plantes cultivées in vitro.  
in Diseases of tropical crops . Proceedings of an international symposium . louvain la Neuve, Belgium  
1978 pp. 285-295
  
- FOWKE (L.C) RENNIE (P.J) KIRKPATRICK (J.W) CONSTABEL (F)  
1975 : Ultrastructural Characteristics of intergenetic protoplast fusion  
Can. J. Bot 53 : 272-278
  
- FREY (K.J) BROWNING (J.A) and SIMONS (M.D)  
1977 : Management systems for host genes to control diseases loss.  
Ann. of the N. Y. Academy of sci. 287 : 255-261

- GARIBALDI (A) et BATEMAN (D.F)  
1971 : Pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi* and their effects on plant tissue.  
Physiol. plant patho. 1 : 25-40
  
- GAUTHERET (R.J)  
1959 : La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisation.  
Edition Masson et Cie, Paris 1959, 863 pages
  
- GENGENBACH (B.G) et GREEN (C.E)  
1975 : Selection of T. cytoplasm maize callus culture resistant to *helminthosporium maydis* race T pathotoxin.  
Crop Science, 15 : 645-649
  
- GENGENBACH (B.G), GREEN (C.E) and DONOVAN (C.M)  
1977 : Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74(11) 5113-5117
  
- GILES (K.L)  
1978 : The uptake of organelles and microorganisms by plant protoplasts : old ideas but new horizons.  
In Frontiers of tissue culture. Edit. by T.A THORPE  
Proceedings of the 4th International Congrès of plant tissue and cell culture - Canada 1978, pp. 67-73
  
- GILES (K.L) and WHITEHEAD (H)  
1977 : The localisation of introduced azotobacter cells within the mycelium of a modified mycorrhiza (rhizopogon) capable of nitrogen fixation.  
Plant Science letters 10 : 367-372
  
- GOODMAN (R.N) HUANG (J.S) and HUANG (P.Y)  
1974 : Host specific phytotoxin polysaccharide from apple tissue infected by *Erwinia amylovora*  
Science 183 : 1081-1082

- GOODMAN (R.N), PI-YU HUANG (J.S) and THAI-PANICH (V)  
1977 : Induced resistance to bacterial infection.in Biochemistry and cytology of plant parasite interaction.  
Edit. by TOMIYAMA (K) DALY (J.M) URITANI (I) OKU (H)  
et OUCHI (S) 1977 - PP. 35-42
  
- GOSCH (G) BAJAJ (Y.P.S) and REINERT (J)  
1975a : Isolation, culture and fusion studies protoplasts  
from different species  
Protoplasma 85 : 327-336
  
- GOCH (G) BAJAJ (Y.P.S) and REINERT (J)  
1975b: Isolation, culture and induction of embryogenesis  
in protoplasts from cell suspensions of Atropa  
belladonna.  
Protoplasma, 86(4) 405-410
  
- GRACE (M.A)  
1978 : Traitement du manioc  
FAO, Rome 1978 163 pages
  
- GRACEN (V.E) FORSTER (M.J) SAYRE (K.D) GROGAN (C.O)  
1971 : Rapid method for selecting resistant plants for  
control of southern corn leaf blight  
Plant. dis. reporter 55(6) 649-470
  
- GRANITI (A)  
1979 : The evolution of the toxin concept in plant pathology in Phytotoxins in plant diseases. Proceedings  
of NATO advanced study institute. Puguchiuso,  
Italy June 1970 PP. 272-288
  
- GRAMBOW (H.J) KAO (K.N) MILLER (R.A) and GAMBORG (O.L)  
1972 : cell division and plant developpement from protoplasts of carrot cell suspension culture  
Planta 103 : 348-355

- GREEN (C.E)  
1977 : Prospects for crop improvement in the field of cell culture.  
Hort. Sci. 12 : 131-134
  
- GREGORY (H.M) HAQ (N) and EVANS (P.K)  
1980 : Regeneration of plantlets from leaf callus of the winged bean psophocarpus tetragonolobus (L) DC.  
Plant Science letters, 18 : 395-400
  
- GRUN (P) and CHU (L.J)  
1978 : Development of plants from protoplasts of solanum (solanaceae).  
Amer. J. Bot 65(5) 538-543
  
- GUNN (R) and SHEPARD (J.F)  
1981 : regeneration of plant from mesophyll derived protoplasts of british potato (solanum tuberosum L) cultivars.  
Plant science letters, 22 : 97-101
  
- HAHN (S.K)  
1978 : Sélection du manioc pour la résistance à la bactériose. in La bacteriose du manioc en Afrique : le passé, le présent, l'avenir.  
Compte rendu du séminaire interdisciplinaire tenu à l'IITA Ibadan Nigéria 1978 - PP. 36-39
  
- HAHN (M.G) and ALBERSHEIN (P)  
1978 : Host pathogen interaction  
Plant physiol. 62 : 107-111
  
- HAHN (M.G) DARVILLA (A.G) and ALBERSHEIM (P)  
1981 : Host pathogen interaction  
Plant physiol. 68 : 1161-1169
  
- HALPERIN (W)  
1966 : Alternative morphogenetic events in cell suspensions  
Am. J. Botany 53(5) 443-453

- HARTMANN (J.X) KAO (K.N) GAMBORG (O.L) and MILLER (R.A)  
1973 : Immunological methods for agglutination of proto-  
plasts from cell suspension cultures of different  
genera  
Planta, 112 : 45-46
  
- HARTMANN (J.X) GALLA (J.D) EMMA (D.A) KAO (K.N) and  
GAMBORG (O.L)  
1976 : The fusion of erythrocytes by treatment with proteo-  
lytic enzymes and polyethylene glycol.  
Can J. Genet Cytol. 18 : 503-512
  
- HAYDU (Z) LAZAR (G) and DUDITS (D)  
1977 : Increased frequency of polyethylene glycol induced  
protoplast fusion by dimethylsulfoxide.  
Plant science letters, 10 : 357-360
  
- HEDRICK (P.W)  
1978 : Genetic variation in a heterogeneous environment.  
VI a possible experimental system.  
The journal of heredity 69 : 135-136
  
- HEITFUSS (R)  
1981 : Basic research on host parasite interaction - a way  
for future control measures of plant diseases ?  
Communication présentée au coll. Intern. sur la protec-  
tion des cultures tropicales. LYON FRANCE 1981.  
9 pages.
  
- HODGSON (R) PETERSON (W.H) RIKER (A.J)  
1949 : The toxicity of polysaccharides and other large mo-  
lecules to tomato cuttings.  
Phytopathology, 39 : 47-62
  
- HONNET (B)  
1980 : Isolated plant protoplasts in genetics and plant  
breeding  
Theor. appli. genet. 56 : 90
  
- HORINO (O)  
1977 : Induction of bacterial leaf blight resistance by  
incompatible strain of xanthomonas orizae in rice  
in Biochemistry and cytology of plant parasite  
interaction.  
Edit. by TOMIYAMA (K) DALY (J.M) URITANI (I) OKU (H)  
and OUCHI (S) Tokyo 1977 - PP. 43-55

- HOOKER (A.L) SMITH (D.R) LIM (S.M) and BECKETT (J.B)  
1970 : Reaction of corn seedlings with a male sterile cytoplasm to *Helminthosporium maydis*  
Plant Disease Reporter 54 : 708-712
  
- HSU (S.T) GOODMAN (R.N)  
1978 : Production of a host specific wilt inducing toxin in apple cell suspension cultures inoculated with *Erwinia amylovora*.  
Phytopath. 68(3) 351-354
  
- HUANG (P.Y) HUANG (J.S) and GOODMAN (R.N)  
1975 : Resistance, mechanisms of apple shoots to an avirulent strain of *Erwinia amylovora*  
Physiol. plant. pathol. 6 : 286-287
  
- INGRAM (D.S)  
1976 : Growth of biotrophic parasites in tissue culture  
physiol plant pathol. Edit by Heitefus and P.H Williams 1976 - PP. 743-758
  
- IKOTUM (T)  
1976 : Survival of *Xanthomonas manihotis*, the cassava bacterial blight pathogen.  
in cassava bacterial blight. Report of an interdisciplinary workshop held at IITA Ibadan, Nigeria  
1-4 November 1976 24-27
  
- JARVIS (M.C) HALL (M.A) THRELFALL (D.R) and FRIEND (J)  
1981 : The polysaccharids structure of potato cell walls : chemical fractionation  
Planta 252(2) 93-100
  
- JENNINGS (D.L)  
1972 : Breeding for resistance to cassava viruses in East Africa, Cassava mosaic workshop.  
Ibadan , Nigeria IITA 1972 - PP. 40-42
  
- JONES (J.M) and ALBERSHEIM (P)  
1972 : A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides.  
Plant physiol. 49 : 926-936

- JING FEN JIA and POTRYKUS (J)  
1981 : Mesophyll protoplasts from solanum melongenavar de-  
presum bailey regenerate to fertile planto  
plantcell reports 1 : 71-72
  
- KAISER (W.J) and TEEMBA (L.R)  
1979 : Use of tissue culture and thermotherapy to free East  
African cassava cultivars of african cassava mosaïc  
and cassava brown streak disease.  
Plant diseases reporter 63(9) 780-784
  
- KAMEYA (T) UCHIMIYA (H)  
1972 : Embryoïds derived from isolated protoplats of carrots  
planta 103 : 356-360
  
- KAO (K.N) GAMBORG (O.L) MILLER (R.A) and KELLER (W.A)  
1971 : Cell division in cells regenerated from soy bean  
and haplopappus gracilis.  
Nature new biology, 232 : 124
  
- KAO (K.N) CONSTABEL (F) MICHAYLUK and GAMBORG (O.L)  
1974 : Plant protoplast fusion and growth of intergeneric  
hybrid cells.  
Planta, 120(3) 215-227
  
- KAO (K.N) and MICHAYLUK (M.R)  
1974 : A method for high frequency intergeneric fusion of  
plant protoplast.  
Planta, 115 : 355-367
  
- KAO (K.N) and MICHAYLUK (M.R)  
1975 : Nutritional requirement for growth of Vicia hajas-  
tana cells and protoplasts at a very low population  
density in liquid media  
Planta, 126 : 105-110
  
- KARTHA (K.K) GAMBORG (O.L) CONSTABEL (F) and SHYLUK (J.P)  
1974 : Regeneration of cassava plants from apical meristem  
plant Science letters, 2 : 107-113
  
- KARTHA (K.K) MICHAYLUK (M.R) KAO (K.N) GAMBORG (O.L) and  
CONSTABEL (F)  
1974 : Callus formation and plant regeneration from meso-  
phyll protoplasts of rape plants (Brassica napus  
Lcv zephyr).  
Plant Science letters, 3 : 265-271

- KARTHA (K.K) and GAMBORG (O.L)  
1975 : Elimination of cassava mosaic disease by meristem  
Phytopathology, 65 : 826-828
  
- KARTHA (K.K) and GAMBORG (O.L)  
1978 : Meristem culture technique in production of disease  
free plant and freeze preservation of germ plasm of  
tropical tuber crops and grain legum.  
in Diseases of tropical crops. Proceedings of an  
international symposium, Louvain la Neuve, Belgium  
1978 - PP. 267-283
  
- KELLER (W.A) MELCHERS (G)  
1973 : The effects of high pH and calcium on tobacco leaf  
protoplast fusion.  
Z. Naturforsch 28 : 737-741
  
- KELLER (W.A) HARVEY (B.L) KAD (K.N) MILLER (R.A) and  
GAMBORG (O.L)  
1973 : Determination of the frequency of interspecific pro-  
toplast fusion by differential staining.  
in Protoplastes et fusion de cellules somatiques vé-  
gétales. CNRS Paris 1973 - PP. 456-463
  
- KELLER - (W.A) and ARMSTRONG (K.C)  
1979 : stimulation of embryogenesis and haploid production  
in brassica campestris anther culture by elevated  
temperature treatments.  
theor. Appl. Genet. 55 : 65-67
  
- KHODER (M) VILLEMUR (P) et JONARD (R)  
1981 : La multiplication végétale de l'espèce florale Bé-  
gonia elatior (cv Rieger) à partir de différents  
organes cultivés in vitro.  
C. R. Acad. Sci. Paris t. 293 Série III PP. 403-408
  
- KIRALY (Z) BARNA (B) and ERSEK (T)  
1972 : Hypersensitivity as a consequence, not the cause of  
plant resistance to infection.  
Nature 239 : 20
  
- KIRKHAM (M.B) GARDNER (W.R) and GERLOFF (G.C)  
1972 : Regulation of cell division and cell enlargement by  
turgor pressure.  
Plant physiol. 49 : 961-962

- KLEMENT (Z) and GOODMAN (R.N)  
1967 : The role of the living bacterial cell and induction time in the hypersensitive reaction of the tobacco plant.  
Phytopathology, 57 : 322-323
  
- KUC (J) CURRIER (W) ELLISTON (J) and Mc INTYRE (J)  
1977 : Determinants of plant disease resistance and susceptibility : a perspective based on three plant-parasite interaction.  
in Biochemical and Cytology of plant-parasite interaction. Edit by TOMIYAMA (K) DALY (J.M) URITANI (I) OKU (H) and OUCHI (S) japan 1977 - PP. 163-179
  
- LAM (S.L)  
1977 : Plantlet formation from potato tuber discs in vitro  
American potato journal, 54 : 465-468
  
- LANDGREEN (C.R) and BONNET (H.T)  
1979 : The culture of albinotobacco protoplasts treated with polyethylen glycol to induce chloroplast incorporation.  
Plant science letters, 16 : 15-22
  
- LEFEBVRE (R)  
1979 : Influence de l'éclaircissement sur le bourgeonnement de fragments de racines d'endive (*cichorium intybus*) cultivées in vitro.  
C. R. Acad. Sci. Paris 1979, 289 : 271-274
  
- LEPOIVRE (P.H) et QUOIRIN (M)  
1976-1977 : Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplifications in vitro des fruitiers ligneux.  
C. R. de recherches station de recherches de cultures fruitières et maraichères - Gembloux 1976-1977 - PP. 39-117
  
- LINTILHAC (P.M) VESECKY (T.B)  
1981 : Mechanical stress and cell orientation in plant.  
Am. J. Botany 68(9) 1222-1230

- LIU (M.C)  
1975 : The in vitro induction of callus and regeneration of cassava plant from shoot apical meristem.  
Taiwan sugar 1975, PP. 171-177
  
- LIU (M.C) and CHEN (W.H)  
1977 : Genetic modification of sugarcane and cassava cells through protoplast and other culture.  
Taiwan sugar 1977 24(2) 304-311
  
- LIU (M.C) and CHEN (W.H)  
1978 : Organogénésis and chromosome number in callus derived from cassava anthers.  
Taiwan sugar Res. Inst. taiwan 700, Taiwan  
Can. J. Botany 1978 56(10) 1287-1290
  
- LOUSBERG (J.J.CH) SALEMINK (C.A)  
1970 : The chemistry of polysaccharide and glycopeptide phytotoxin.  
in phytotoxins in plant diseases. Proceedings of NATO advanced study institute Pugnochiuso  
Italy, June 1970 127-137
  
- LOZANO (J.C) and WHOLEY (DCW)  
1974 : The production of bacteria free planting stock of cassava world crops 1974 26(3) 115-117
  
- LUKE (H.H) and WHEELER (H.E)  
1955 : Toxin production by *Helminthosporium victoriae*. Phytopathology 45 : 453-458
  
- LUTZ (A)  
1976 : Etude des aptitudes morphogénétiques des cultures de tissus. Analyse par la méthode des clones d'origine unicellulaire.  
Revue générale 1976 19(9) 309-319
  
- MABANZA (J)  
1980 : Essai d'isolement des clones de manioc (*Manihot esculenta* Grantz) en vue d'isoler ultérieurement des clones résistants à la bactériose.  
DEA Agronomie Phytotechnie - USTL Montpellier 1980  
61 pages.

- MABANZA (J) et JONARD (R)  
1981 : La multiplication des clônes du manioc (*Manihot esculenta* Grantz) à partir d'apex isolés in vitro.  
C. R. Acad. Sci. Paris t. 292 Série III PP. 839-842
  
- MAHESHWARI (R) HILDEBRANDT (A.C) and ALLEN (P.J)  
1967 : Factors affecting the growth of rust Fungi on host tissue cultures.  
Botanical gazette 3-4 : 153-159
  
- MARAITE (H) et PERREAUX (D)  
1978 : Développement comparatif des symptômes chez du manioc après infection par *Xanthomonas manihotis* ou *X. cassavae* en conditions contrôlées. in La bactériose du manioc en Afrique : le passé, le présent, l'avenir.  
Compte rendu du séminaire interdisciplinaire qui s'est tenu à l'IITA, Ibadan. Nigéria 26-30 juin 1978  
PP. 18-26
  
- MARTIN (C)  
1977 : Le tabac : plante modèle en virologie et en physiopathologie.  
Ann. du tabac sect. 2 Bergerac SEITA 1977  
N° spécial PP. 48-54
  
- MARTON (L) WULLEMS (G.J) MOLENDIJK L) and SCHILPEROORT (R.a)  
1979 : In vitro transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *agrobacterium tumefaciens*  
Nature 277 : 129-131
  
- MATTERN (U) STROBEL (G) and SHEPARD (J)  
1978 : Reaction to phytotoxins in a potato population derived from mesophyll protoplasts.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75(10) 4935-4939
  
- MAZZUCCHI (U) BAZZI (C) and PUPILO (P)  
1979 : The inhibition of susceptible and hypersensitive reactions by protein lipopolysaccharide complexes from phytopathogenic pseudomonads : relationship to polysaccharide antigenic determinants.  
Physiological Plant pathology 14 : 19-30
  
- Mc NEIL (M) DARVILL (A.G) ALBERSHEIM (P)  
1980 : Structure of plant cell walls  
Plant Physiol. 66 : 1128-1134

- MEEKS (J.C) MALMBERG (R.L) WOLK (C.P)  
1978 : Uptake of Auxotrophic cells of a heterocyst forming cyanobacterium by tobacco protoplasts and the fate of their association  
Planta, 139 : 55-60
  
- MEYER (Y)  
1981 : Le premier cycle mitotique des protoplastes de mesophylle de feuille de tabac : ses relations avec la régénération de la paroi et sa régulation hormonale.  
Thèse de doctorat d'Etat présentée à l'Université de Perpignan pour obtenir le grade de docteur es-sciences naturelles.  
Déc. 1981. 139 pages.
  
- MEYER (Y) and COOKE (R)  
1979 : Time course of hormonal control of the first mitosis in tobacco mesophyll protoplast cultivated in vitro.  
Planta, 147 : 181-185
  
- MEYER (Y) and CHARTIER (Y)  
1981 : Hormonal control of mitotic development in tobacco protoplasts.  
Plant physiol. 68 : 1273-1278
  
- MILFONT Jr (W.N)  
1978 : Prospects of cassava fuel alcohol in Brazil, in Cassava Harvesting and processing proceedings of a workshop held at CIAT Cali Comumbia 24-28 April 1978 - PP. 46-48
  
- MIURA (L) TAKATSU (A) TERNES (M)  
1980 : Resistance of cassava to Xanthomonas manihotis, inoculated at the stem tips with toothpicks in Itagai low valley, Santa Catarina  
Review of plant pathology 59 : 7
  
- MOGILNER (I) ORIOLI (C.A) and PROTUGUEZ (A.J.P)  
1967 : Influence de la intensidad luminica en el crecimiento "in vitro" de apices radicales de mandioca  
Bonplandia 1967 2(6)107-112
  
- MOH (C.L)  
1975 : Induction of anther callus in cassava tropical root and tuber crops.  
Newsletter, 8 : 5-7
  
- MOUNT (M.S) BATEMAN (D.E) and BASHAM (H.G)  
1970 : Induction of electrolyte loss, tissue maceration and cellular death of potato tissue by an endopolygalacturonate trans eliminase.  
Phytopathology, 60 : 924-931

- MULHBACH (H.P) AKAMACHO HENRIQUE et SANGER (J.L)  
1977 : Isolation and properties of protoplasts from leaves of healthy and viroid infected tomato plant.  
Plant science letters, 8 : 183-189
  
- MUIR (S.M)  
1970 : The control of growth by the synthesis of I.A.A and its conjugation.  
Proceedings of the 7th international conference on plant growth substances Canberra Australie 1970  
PP. 96-101
  
- MULLEN (J.M) and BATEMAN (D.F)  
1971 : Production of an endo-polygalacturonate transeliminase by potato dry rot pathogen *Fusarium roseum*, *Avenaceum* in culture on diseased tissue  
Physiol. Plant. pathol. 1 : 363-373
  
- MURASHIGE (T)  
1974 : Plant propagation through tissue cultures  
Ann. Rev. plant. physiol. 25 : 135-166
  
- MURASHIGE (T) and SKOOG (F)  
1962 : A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture.  
Physiol. Plant. 15 : 473-497
  
- MUSSEL (U.H.W)  
1973 : Endopolygalacturonase evidence for involvement in *Verticillium* wilt of cotton.  
Phytopathology, 63 : 62-70
  
- NAEF- ROTH (S)  
1970 : Production and bioassay of phytotoxins in phytotoxins in plant diseases. Proceedings of the NATO advanced study institute Pugnuchiuso, Italy June 1970  
PP. 48-69
  
- NAGATA (T) and TAKEBE (I)  
1970 : Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts.  
Planta, 92: 301-308
  
- NAGATA (T) and TAKEBE (I)  
1971 : Plating of isolated tobacco mesophyll protoplast on agar medium  
Planta, 99 : 12-20

- NAIR (N.G) KARTHA (K.K) and GAMBORG (O.L)  
1979 : Effect of growth regulators on plant regeneration from shoot apical meristem of cassava (*Manihot esculenta* Grantz) and on the culture of internode in vitro.  
Z. Pflanzenphysiol. 95(5) 51-56
  
- NARAYANASWAMY  
1977 : Regeneration of plants from tissue culture, in *Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture*.  
Ed. by Reinert (J) and Bajaj (Y.P.S) Berlin 1977  
PP. 179-204
  
- NEGRUTIU (I) and MULLER (J.F)  
1981 : Culture condition of protoplasts derived cells of *Nicotiana sylvestris* for mutant selection.  
Plant cell reports, 1 : 14-17
  
- NICKELL (L.G) et TORREY (J.G)  
1969 : CROP improvement through plant cell and tissue culture.  
Science 166 : 1068-1069
  
- NIIZEKI (M)  
1974 : Studies on plant cell and tissue culture.  
Effect of different kinds of media on the variations of chromosome number in tobacco callus and regenerated plant.  
Reprinted from the journal of the faculty of agriculture HOKKAIDO University, 54(4) 356-367
  
- NORTH COTE  
1963 : The biology and chemistry of cell walls of higher plant algae and fungi  
Intern. Rev. cytol. 14 : 223-263
  
- NOVAK (F.J)  
1979 : Phenotype and cytological status of plant regenerated from callus cultures of *allium sativum* L.  
Z. Pflanzenphysiol. 84 : 250-260
  
- NOZERON (R) et BANCILHON (L)  
1972 : Les cultures in vitro en tant que technique pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes.  
Ann. Amel. des plantes, 22(2) 167-185

- PARKE (D)  
1978 : Tissue culture of cassava on chemically defined media  
Physiol. Plant. 42 : 195-201
  
- PATIL (S.S) TAM (L.Q) KOLATTUKUDI (P.E)  
1970 : Isolation and mode of action of the toxin from  
pseudomonas phaseolicola.  
in Phytotoxins in plant diseases. Proceedings of  
the NATO advanced study institute, Pugnochiuso  
Italy June 1970 - PP. 365-372
  
- PERSLEY (G.J.)  
1978: Etudes sur l'épidémiologie et l'écologie de la  
bactériose du manioc. in La bactériose du manioc en  
Afrique. IITA, Ibadan, Nigeria, juin 1978. PP 5-8
  
- PERSON (C) GROTH (J.V) and MYLYK (O.M)  
1976 : Genetic change in host parasite population  
Ann. Rev. Phytopath - PP. 177-188
  
- PETIARD (V)  
1979 : Culture de cellules végétales : problèmes et perspectives  
Col. Soc. Franç. Microbiol. du 8-9 mars  
Compiègne 1979 - PP. 71-96
  
- PHILLIPS (G.C) and COLLINS (G.B)  
1981 : Induction and development of somatic embryos from  
cell suspension cultures of soybean  
Plant cell tissue and organ culture, 1 : 123-129
  
- PORTUGUEZ (A.J.D) and MOGILNER (I)  
1967 : Crecimiento in vitro de raices de manihot en distintas de iluminacion y temperatura  
Bonplandia 2(7) 113-120
  
- POTRYKUS (I)  
1971 : Intra and interspecific fusion of protoplasts from  
petal of Torenia bailloni and Torenia fournieri  
Nature New biology, 231 : 51-58
  
- POTRYKUS (I)  
1973 : Transplantation of chloroplasts into protoplasts of  
petunia  
Z. Pflanzenphysiol. 70 : 364-366
  
- POWER (J.B) FREARSON (E.M) MAYWARD (C) GEORGE (D)  
EVANS (P.K.) BERRY (S.F) and COCKING (E.C)  
1976 : Somatic hybridation of Petunia hybrida and  
P. parodii.  
Nature, 263 : 500 - 502

- PRABUDESAI (V.R) and NARAYANASWAMY  
1975 : A tissue culture from tapioca  
Plant science letters,4(4) 237-241
  
- PRINGLE (R.B) and BRAUN (A.C)  
1957 : The isolation of the toxin of Helminthosporium victor-  
toriae .  
Phytopathology,47 : 369-371
  
- PRINGLE (R.B) and SCHEFFER (R.P)  
1963 : Purification of the selective toxin of Pericornia  
circinata.  
Phytopathology,53 : 785-787
  
- PRINGLE (R.B) and SCHEFFER (R.P)  
1967 : Multiple host specific toxins from Pericornia circi-  
nata  
Phytopathology,55 : 530-532
  
- PRINGLE (R.B) and SCHEFFER (R.P)  
1967 : Isolation of the host specific toxin and related  
substance with non specific toxicity from Helmin-  
thosporium carbonum  
Phytopathology,57 : 1169-1172
  
- PURSEGLOVE (J.W)  
1977 : Tropical crops:Dicotyledon  
Longman - London 1977 ,719 pages
  
- PYNAERT (L)  
1951 : Maladies et ennemis du manioc  
in Le manioc - Bruxelles - Direction de l'Agricul-  
ture.Ministère des colonies.Royaume de Belgique  
PP. 61-79
  
- RAI (P.V) 1978  
1978 : Toxins produced by a virulent and a weakly virulent  
strain of xanthomonas orizae  
Indian Phytopathology,31(1) 60-64
  
- RAI (P.V) et STROBEL (G.A)  
1969 : Phytotoxic glycopeptide produced by corynebacterium  
michiganense - I Methods of preparation, physical  
and chemical characterization  
phytopathology,59 : 47-52

- RAI (P.V) et STROBEL (G.A)  
1969 : Phytotoxic glycopeptides produced by corynebacterium michiganense - II - biological properties  
phytopathology 59 : 53-57
  
- REINERT (J)  
1973 : Aspects of nuclear division and cell wall formation in protoplasts of different origin.  
in Colloq Intern. CNRS Versailles Ed. de l'INRA  
Paris 1973 - PP. 273-279
  
- ROBERTSEN (B) AMAN (P) DARVILLA (A) Mc NEIL (M) ALBERSHEIM (P)  
1981 : Host symbiont interaction  
Plant physiol. 67 : 389-400
  
- ROGERS (D.J.A) et MILNER (M)  
1963 : Amino acid profile of manioc leaf protein in relation to nutritive value.  
Economic Botany, 17 : 211-216
  
- RUDOLPH (K) WARICK (R.P)-  
1968 : The effect of toxin of pseudomonas phaseolicola on tissue cultures of bean (phaseolus vulgaris)  
Phytopathology, 58 : 1065
  
- SCHEFFER (R.P) NELSON (R.R) and PRINGLE (R.B)  
1964 : Toxin production and pathogenicity in Helminthosporium victoriae.  
Phytopathology, 54 : 602-603
  
- SCHEFFER (R.P) ULLSTRUP (A.J)  
1965 : A host specific toxic metabolite from helminthosporium carbonum  
Phytopathology, 55 : 1037-1038
  
- SCHNEIDER (E.A) and WIGHTMAN (F)  
1974 : Metabolism of auxin in higher plants  
Ann. Rev. Plant Physiology, 25 : 487-513
  
- SCHIEDER (O)  
1981 : Protoplast regeneration and somatic hybridization  
Newsletter, 33 : 2-6

- SCHENK (R.U) and HILDEBRANDT (A.C)  
1968 : Somatic hybridization : a new approach to genetic change.  
American J. Botany, 55 : 731
  
- SCHENK (R.U) and HILDEBRANDT (A.C)  
1972 : Medium and technique for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures.  
Canadian Journal of Botany, 50 : 199-204
  
- SENAWI (M. IBN M.T)  
1975 : Toward production of virus free manioc plants serdang, Malaysia Malaysian agriculture.  
Research and development institute (MARDI) 1975  
5 pages
  
- SEQUEIRA (L) GAARD (G) and DEZOETEN (G.A)  
1977 : Interaction of bacteria and host cell walls : its relation to mechanisms of induced resistance  
Physiol. Plant pathol. 10 : 43-50
  
- SERVAITES (J.C) OGREN (W.L)  
1977 : Rapid isolation of mesophyll cells from leaves of soybean for photosynthetic studies  
Plant physiol. 59 : 587-590
  
- SHAHIN (E.A) and SHEPARD (J.F)  
1980 : Cassava mesophyll protoplasts : isolation, proliferation and shoot formation.  
Plant Science letters, 17 : 459-465
  
- SHEPARD (J.F)  
1980 : Abscisic acid enhanced shoot initiation in protoplast derived calli of potato  
Plant science letters, 18 : 327-333
  
- SHEPARD (J.F) TOTTON (R.E)  
1975 : Isolation and regeneration of tobacco mesophyll cell protoplasts under low osmotic conditions  
Plant physiol. 55 : 689-694
  
- SHEPARD (J.F) and TOTTON (R.E)  
1977 : Mesophyll cell protoplasts of potato. Isolation, proliferation and plant regeneration  
Plant Physiol. 60 : 313-316

- SHEPARD (J.F) BIDNEY (D) SHAHIN (E)  
1980 : Potato protoplasts in crop improvement  
Science, 208 : 17-24
  
- SINK (K.C) and POWER (J.B)  
1977 : The isolation, culture and regeneration of leaf  
protoplasts of petunia parviflora juss  
Plant science letters, 10 : 335-340
  
- SKIRVIN (R.M)  
1977 : Natural and induced variation in tissue culture  
Euphytica, 27 : 241-266
  
- SÖNDAHL (M.R) and SHARP (W.R)  
1977 : High frequency induction of somatic embryos in  
cultured leaf explants of coffea arabica L.  
Pflanzenphysiol. 81 : 391-408
  
- STAMP (J.A) HENSHAW (G.G)  
1981 : Somatic embryogenesis in cassava  
Pflanzenphysiol. 105(2) 183-187
  
- STAAR (M.P)  
1959 : Bacteria as plant pathogens  
Ann. Rev. Microbiology 13 : 211-238
  
- STEINER (G.W) and BYTHER (R.S)  
1971 : Partial characterization and use of host specific  
toxin from helminthosporium sacchari in sugar cane  
Phytopathology, 61 : 691- 695
  
- STEPHENS (G.J) WOOD (R.K.B)  
1975 : Killing of protoplasts by soft rot bacteria  
Physiol. Plant Pathol. 5 : 165-181
  
- STERN (H)  
1966 : The regulation of cell division  
Ann. Rev. Plant physiол. 17 : 345-378
  
- STROBEL (G.A)  
1974 : Phytotoxins produced by plant parasites  
Ann. Rev. Plant physiology, 25 : 541-566

- SUZUKI ( ) et TAKEBE (I)  
1976 : Uptake of single stranded bacteriophage DNA by isolated tobacco protoplast  
Z. Pflanzenphysiol. 78 : 421-443
  
- TALMADGE (K.W) KEEGSTRA (K) BAUER (W.D) ALBERSHEIM  
1973 : The structure of plant cell walls  
Plant physiol. 51 : 158-173
  
- TERRY (E.R)  
1978 : Lutte intégrée contre la bactériose du manioc en Afrique, in La bactériose du manioc en Afrique : le passé, le présent, l'avenir.  
Compte rendu du séminaire interdisciplinaire IITA Ibadan Nigéria 1978 - PP.36-39
  
- TILQUIN ( J.P)  
1978 : Regeneration et multiplication du manioc par culture d'entronoeuds et de cals.  
in Diseases of tropical crops - Proceedings of an international symposium, Louvain La Neuve, Belgique 1978 - PP. 297-306
  
- WALKER (K.A) WENDELN (M.L) and JAWORSKI (E.G)  
1979 : Organogenesis in callus tissue of Medicago sativa  
The temporal separation of induction processes from differentiation processes.  
Plant Science letters, 16 : 23-30
  
- WALKER (K.A) SATO (S.J)  
1981 : Morphogenesis in callus of Medicago sativa  
The role of ammonium ion in somatic embryogenesis  
Plant cell tissue Organ culture, 1 : 109-121
  
- WALLIN (A) ERIKSON (T)  
1973 : Plating of protoplasts from cell suspension cultures of Daucus carota.  
in Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales.  
Paris CNRS pages 301 - 307
  
- WALSH (J)  
1981 : Germplasm resources are losing ground  
Science, 214 : 421-423
  
- WAREING (P.F) PHILLIPS (ID.J)  
1975 : The control of growth and differentiation in plants .  
Pergamon International Library 1975, 303 pages

- WARREN (G) FOWLER (M.W)  
1977 : A physical method for the separation of various stages in the embryogenesis of carrot cell culture  
Plant science letters, 9 : 71-76
  
- WENZEL (G) SCHIEDER (O) PRZEWOZNY (T) SOPORY (S.K)  
MELCHERS (G)  
1979 : Comparison of single cell culture derived solanum tuberosum L. plants and a model for their application in breeding programm.  
Theor. and Appl. Genetics 55 : 49-55
  
- WHEELER (H) and LUKE (H.H)  
1963 : Microbial toxins in plant disease  
Ann. Rev. Microbiol. 17 : 223 - 242.
  
- WIDHOLM (J.M)  
1974 : Cultured carrot cell mutants : 5 - Methyltryptophan - resistance trait carried from cell to plants and back.  
Plant science letters 3 : 323-330
  
- WIEHE (P.O) and DOWSON (W.J)  
1953 : A bacterial disease of cassava (Manihot utilisima) in Nyasaland  
Empire Journal of Experimental Agriculture  
21 (82) : 141 - 143
  
- WILDER (B.M) and ALBERSHEIM (P)  
1973 : The structure of plant cell walls  
Plant physiology 51 : 889-893
  
- YEOMAN (M.M) and AITCHISON (P.A)  
1977 : Growth patterns in tissue (callus) culture in Applied and fundamental aspect of plant cell, tissue, and organ culture. Edit. by REINERT (J) and BAJAJ (Y.P.S) 1977 - PP. 240-268
  
- YODER (O.C)  
1973 : A selective toxin produced by phyllosticta maydis  
phytopathology, 63 : 1361-1366
  
- ZEGLER (A) et GALUN (E)  
1976 : Culture of newly isolated tobacco protoplast : precursor incorporation into RNA and DNA  
Plant Science letters, 7 : 331-336
  
- ZEGLER (A) AVIV (D) GALUN (E)  
1978 : Interspecific transfer of cytoplasmic male sterility by fusion between protoplasts normal Nicotiana glauca and X Ray irradiated protoplasts of male sterile N. tabacum.  
Pflanzenphysiol. 90(5) 397-407

**SUD COPIE**  
*Les Terrasses d'Occitanie*  
*68 avenue de la Justice*  
34100 Montpellier - TEL. : (67) 41.23.63