

BIOTECHNOLOGIES AVENIR DU DÉVELOPPEMENT

ORSTOM
actualités

16 NOV. 1990

ORSTOM Fonds Documentaire DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
N° : 31 150 ex 1 POUR LE DEVELOPPEMENT
Cote : B EN COOPERATION

INSTITUT FRANCAIS

Sommaire

	Pages
Les biotechnologies à l'ORSTOM.	4
Fermentation en milieu solide. Fermentation lactique de l'amidon par Maurice RAIMBAULT	6
Valorisation des résidus agricoles ou agro-industriels tropicaux par fermentation en milieu solide par J. BALDENSPERGER	8
Microbiologie et Biotechnologie des fermentations par Vincent JACQ	10
Fermentation méthanique de résidus agro-industriels par Jean-Louis GARCIA	11
Symbioses actinorhiziennes par Y. DOMMERGUES et H.G. DIEM	12
Les légumineuses forestières tropicales par Y. DOMMERGUES et B. DREYFUS	13
Étude des nodules de <i>Sesbania rostrata</i> par Pierre de LAJUDIE	16
Légumineuses à nodules de tige par Bernard DREYFUS, Gérard RINAUDO, Didier ALAZARD	18
Fixation biologique de l'azote par les cyanobactéries par Pierre REYNAUD	19
Fixation biologique de l'azote par les cyanophycées libres dans les rizières submergées par Pierre ROGER	20
Amélioration de l'igname par fusion de protoplastes (hybridation somatique) par Bernard MALAURIE	21
Applications de la culture in vitro à l'amélioration de la production végétale par Jacqueline BUFFARD-MOREL, Janina HANOWER, Christian VARECHON	22
Mécanismes physiologiques et biochimiques de la production végétale par Bernard MARIN	24
Production de métabolites secondaires d'intérêt thérapeutique par voie de culture in vitro de plantes médicinales par Hervé CRESTIN	26
Étude des virus d'insectes pathogènes pour les ravageurs des palmeraies par Gilles FEDIERE	27
Étude des virus d'insectes : mise au point d'une production industrielle de virus entomopathogènes par Pierre MONSARRAT	28

ORSTOM Actualités : Supplément au N° 6 de Janvier-Février 1985

Directeur de la publication : Jean-Yves MARTIN
Rédactrice en chef : Catherine LEDUC-LEBALLEUR
Direction de la Formation, de l'Information
et de la Valorisation (DIVA)
ORSTOM 24 rue Bayard, 75008 PARIS - Tél. : (1) 723.38.29
ISSN 0758 833 X - Commission Paritaire n° 1 864 ADEP

Conception et Réalisation :
Copyright LOG'IMAGES - Tél. : 547.70.75
Couverture : ADEQUAT, Tél. : 664.94.06
Maquettes : © B. BARROMES et P. PYTKOWICZ
Photocomposition : S.M. - Tél. : 735.05.52
Imprimerie : Offset. Arcueil - Tél. : 664.01.02

Les progrès enregistrés par les sciences biologiques ont permis d'avancer vers une maîtrise croissante des mécanismes du vivant. Les applications qui en résultent se multiplient : ainsi sont de mieux en mieux valorisées les potentialités des micro-organismes, des cellules végétales et animales, des fragments biochimiquement actifs qui en dérivent.

Les pays du Tiers-Monde ne peuvent rester à l'écart de la recherche biologique fondamentale et de ses applications technologiques. La voie biotechnologique, parce qu'elle peut s'appuyer sur les ressources biologiques de chaque pays, est certainement l'une des meilleures voies de l'indépendance, en particulier pour les pays du monde intertropical dont les richesses biologiques sont considérables. La preuve a d'ailleurs déjà été faite qu'avec des investissements même modérés, les biotechnologies pouvaient, par exemple, en s'appuyant sur les ressources naturelles et sur certaines traditions sociales, répondre à des pénuries alimentaires, ou faciliter la lutte contre des endémies. En outre, beaucoup reste à faire pour connaître et valoriser les potentialités biologiques du monde intertropical, terrestre et aquatique.

L'ORSTOM, Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, a pour vocation de contribuer à la connaissance au service du développement, au service de l'indépendance, des pays du Tiers-Monde. La dépendance technico-économique de ces pays est l'un des facteurs de leur sous-développement : la recherche doit contribuer à permettre à chaque pays de réduire cette dépendance. La connaissance et la valorisation technologique des ressources biologiques est l'une des voies que l'ORSTOM a choisi, en plein accord avec plu-

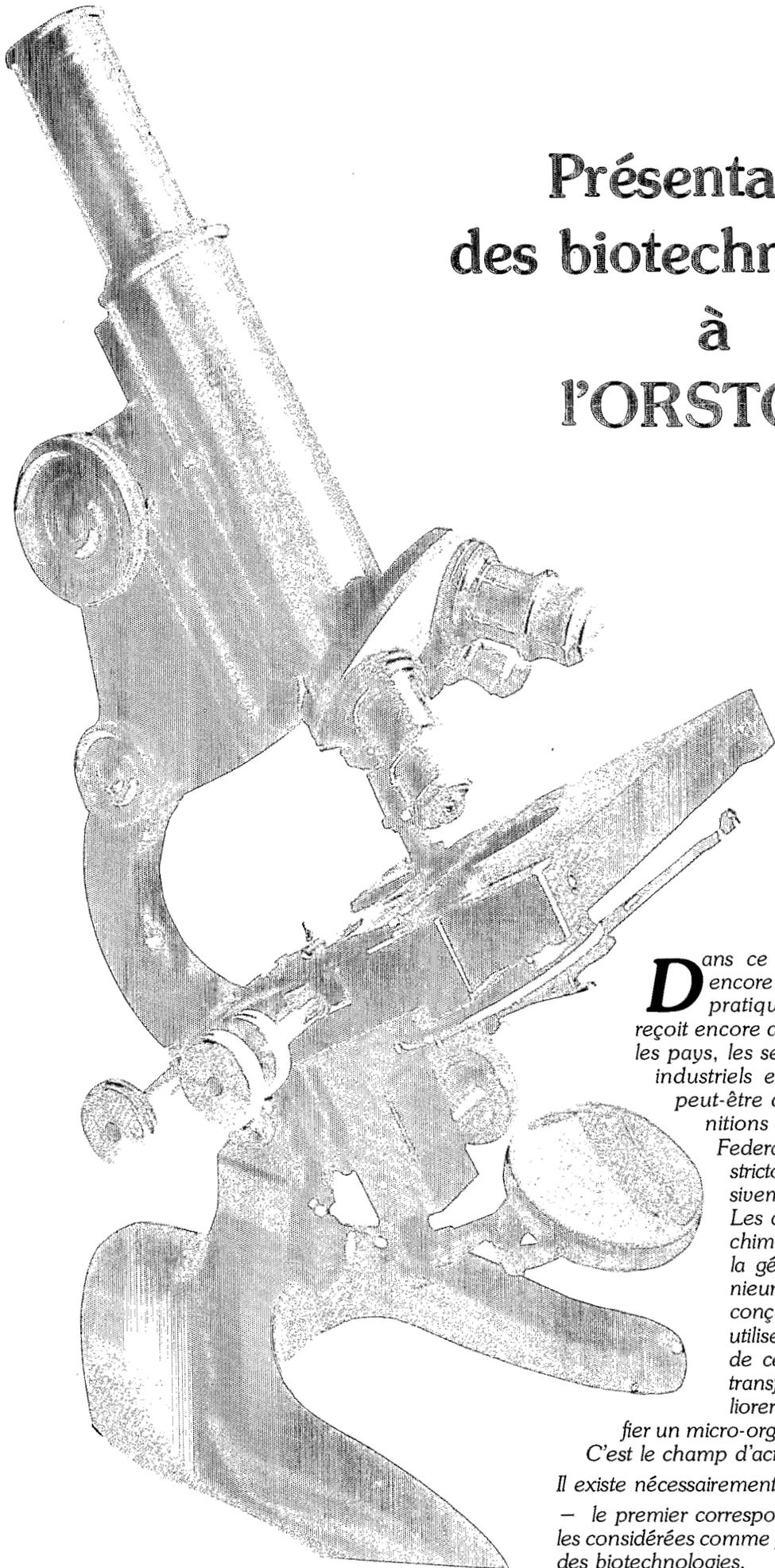
sieurs de ses partenaires scientifiques du Tiers-Monde, de développer, avec des moyens importants.

C'est ainsi que l'Institut a été amené à s'intéresser à l'amélioration des techniques de fermentation, à l'optimisation de la conversion des déchets agro-alimentaires (ou agro-industriels) à des fins énergétiques, à différents processus de bio-énergétique, à l'isolement et la synthèse de substances naturelles d'intérêt thérapeutique, à la sélection des variétés de plantes tropicales aux propriétés agronomiques intéressantes, à la production d'insecticides biologiques et à la mise au point d'engrais verts résultant de l'emploi judicieux de systèmes biologiques fixant l'azote atmosphérique.

Ces recherches sont à caractère finalisé. Elles n'ont de sens que si elles s'appuient sur les réalités biologiques et physiques et sur les traditions socio-économiques. Elles doivent donc être, le plus souvent possible, réalisées, du fondamental à l'appliqué, dans les pays concernés. C'est le pari permanent de l'ORSTOM : la recherche de pointe en coopération, permettant en particulier, dans les pays qui en ont besoin, la formation sur place, par la recherche, des cadres de la recherche et de la production ; permettant aussi les transferts réciproques de connaissances et de technologies.

Les pages qui suivent illustrent comment l'ORSTOM, avec ses partenaires étrangers et français, essaie, par les recherches biologiques et ses applications technologiques, de contribuer au Développement des pays et des peuples du Tiers-Monde.

Alain RUELLAN
Directeur Général
de l'ORSTOM



Présentation des biotechnologies à l'ORSTOM

Dans ce domaine, l'usage des mots n'a pas encore été sanctionné par une longue pratique. Le terme de biotechnologie reçoit encore des définitions très variables selon les pays, les secteurs économiques, les acteurs industriels et scientifiques. Le mieux serait peut-être de reprendre alors les deux définitions admises par la E.F.B. (European Federation of Biotechnology). Sensu stricto, la biotechnologie concerne exclusivement l'industrie et l'environnement. Les disciplines impliquées sont alors la chimie et la biochimie, la microbiologie, la génétique et les sciences de l'ingénieur. Toutefois, sensu largo, elle est conçue comme toute technologie qui utilise des organismes vivants (ou partie de ces organismes) pour produire ou transformer une molécule, pour améliorer une plante ou un animal, modifier un micro-organisme pour un besoin spécifique.

C'est le champ d'action de l'ORSTOM.

Il existe nécessairement deux axes d'action :

- le premier correspond à des recherches fondamentales considérées comme prioritaires pour le développement des biotechnologies,

— le second consiste à encourager les chercheurs à initier le développement des applications de leurs travaux. Il s'agit de valoriser les résultats obtenus.

L'ORSTOM possède une longue tradition de recherche dont la vocation est finalisée, une recherche orientée, une finalité socio-économique sous-tendant le plus souvent les actions en cours.

Ainsi, l'Institut a développé quatre axes prioritaires en matière de recherche fondamentale orientée vers le développement des pays du Tiers-Monde.

L'un de ces axes concerne la bioconversion de substrats agro-alimentaires et de résidus agro-industriels pour :

— la production de protéines alimentaires pour les animaux d'élevage, et d'enzymes pour l'industrie agro-alimentaire. Ces études ont porté sur l'utilisation de champignons filamenteux et ont permis d'enrichir jusqu'à 20 % en protéines divers substrats amylacés tels que la banane, le manioc, la fécule de pomme de terre...

— la production de bio-gaz, c'est un moyen de production d'énergie sans destruction des éléments minéraux. La production de biogaz est faite par voie anaérobie. L'intérêt de ce procédé est d'une part de pouvoir traiter des matériaux humides, d'autre part de réaliser simultanément une opération d'épuration tout en fournissant un compost utilisable comme amendement et engrais.

Le second des axes retenus développe tout un ensemble de programmes sur la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique par des systèmes biologiques symbiotiques aussi divers que :

- les associations légumineuses - *Rhizobium*,
- les associations plantes actinorhiziennes *Frankia*,
- les associations endo- ou ecto-mycorhiziennes,
- les symbioses *Azolla Anabaena*, et l'association de cyanobactéries.

Les recherches sont focalisées aussi sur quelques systèmes choisis en fonction de leur intérêt pour le développement de l'agriculture et de la foresterie en Afrique de l'Ouest comme :

- les légumineuses à nodules de tige (*Sesbania*, *Aeschynomene*),
- les légumineuses forestières (*Acacia*),
- les Casuarinacées.

Pour ce qui concerne les cultures de plantes vivrières, comme l'arachide ou le soja, l'un des objectifs est la mise au point d'une technologie permettant l'accroissement de la productivité végétale dans des conditions climatiques et édaphiques marginales (sols pauvres déficients en azote et en phosphate) ; sols en cours de dégradation par surexploitation ; sols en cours de désertification ; sols inondés). Les conditions optimales sont recherchées en réduisant l'apport d'engrais minéraux, souvent coûteux, mais aussi signalés comme des molécules polluant les nappes phréatiques.

Le troisième axe prioritaire concerne la production végétale selon les techniques de cultures cellulaires *in vitro*. Leur développement correspond à la résolution de problèmes différents :

- l'amélioration de plantes tropicales, décrites comme ayant des propriétés agronomiques et alimentaires importantes,
- la multiplication végétative d'espèces tropicales d'intérêt économique, comme le palmier-à-huile, le cocotier ou l'igname.
- la production de métabolites d'intérêt thérapeutique

par les cultures de cellules végétales, obtenues à partir de tissus de plantes tropicales utilisées dans la pharmacopée africaine,

— la conception de bioréacteurs réversibles permettant la synthèse de produits d'intérêt local ou non (thérapeutique ou autre) et fonctionnant dans des conditions photo-autotrophes.

Pour ce qui concerne les deux derniers programmes, les objectifs, à court terme, sont de valoriser pour les pays en voie de développement les potentialités offertes par les plantes tropicales. Le résultat à espérer est la production de substances naturelles utiles, de molécules à haute valeur ajoutée par un procédé biotechnologique moins coûteux que l'extraction classique à partir de la plante entière ou son obtention par synthèse chimique (quand elle est possible).

En conséquence, à moyen terme, il s'agit de contribuer à la mise au point d'un système de cellule automatisée en bioréacteurs, par un apport dans la connaissance des mécanismes régulateurs de la biosynthèse, de l'accumulation et de l'excrétion des métabolites par des cellules végétales cultivées en milieu liquide.

Le dernier axe prioritaire porte sur l'utilisation de virus pathogènes pour les ravageurs des cultures comme insecticides biologiques.

Deux programmes sont en cours :

- mise au point d'une technique de production industrielle de virus d'insectes,
- études sur deux groupes de virus paraissant présenter d'intéressantes potentialités en lutte biologique.

Ce numéro fait le point, de façon claire et vivante, sur l'ensemble des opérations de recherche menées dans le domaine des Biotechnologies à l'ORSTOM. Il est évidemment impossible dans le cadre restreint de cette brochure de décrire l'ensemble des thèmes de recherche en prise avec la Biotechnologie et les structures mises en place (en concertation ou non avec d'autres organismes publics ou privés) pour faciliter le passage des recherches aux technologies de production (phase industrielle).

On peut toutefois conclure qu'il est possible de réaliser des études performantes et utiles pour les pays en voie de développement, à condition de faire des choix raisonnables. Ces choix sont, la plupart du temps, déterminés comme prioritaires dans les plans de programmation scientifique des pays concernés. Dans tous les cas, il s'agit de la mise au point de procédés techniquement fiables et économiques sur lesquels les pays du tiers-monde peuvent être compétitifs. Ce n'est pas un hasard s'ils concernent essentiellement le secteur agro-alimentaire et agro-industriel. Dans les conditions actuelles de la crise économique, les programmes et les solutions proposées constituent une alternative intéressante pour les pays concernés. Les projets pour transformer les cultures microbiennes ou végétales en agents dépolluants, en producteurs d'énergie, de protéines et de substances médicamenteuses intéressent vivement les pays en voie de développement.

Bernard MARIN (dép. F),
André CHARRIER (dép. E),
Pierre MONSARRAT (dép. F)

Fermentation en milieu solide Fermentation lactique de l'amidon



RESPONSABLE :
Maurice RAIMBAULT

LABORATOIRE : Département de biotechnologie, Université autonome métropolitaine de Mexico, IZTAPALAPA, Mexico 13, DF (Mexique), et Antenne ORSTOM de Mexico, Calle Homero 1804 n° 404, Colonia Los Morales, 11.510 Mexico, DF (MEXIQUE) Tél. : 557.60.32

Mots-clés

- Matériel biologique :

Valorisation des productions végétales tropicales en vue de produire des aliments enrichis en protéines ou des enzymes d'intérêt agro-alimentaires.

- Techniques principales :

Celles de la microbiologie industrielle

- Problématique :

Valorisation de la fermentation en milieu solide à des fins agro-alimentaires.

THÈME

Parmi les différentes catégories de fermentations qui peuvent conduire à valoriser des substrats agricoles ou des sous-produits de l'industrie agro-alimentaire, les fermentations en milieu solide apparaissent comme une nouvelle voie biotechnologique encore peu exploitée mais prometteuse pour la fabrication de produits alimentaires, industriels ou pharmaceutiques. L'ORSTOM a entrepris depuis 1974 des recherches dans ce domaine pour la valorisation des productions végétales tropicales, soit en vue de produire de nouveaux aliments pour le bétail (AFEP), soit pour la production d'enzymes d'intérêt agro-alimentaires (amylases, cellulases, protéases, pectinases...) et autres métabolites microbiens d'intérêt alimentaire ou industriel.

Les fermentations en milieu solide traditionnelles de type alimentaire sont pratiquées depuis fort longtemps dans toutes les régions du globe (attieke en Afrique, koji au Japon, tempeh en Indonésie, fromages en Europe...) Ces fermentations impliquent le développe-

ment de micro-organismes (bactéries, levures et surtout moisissures) sur des substrats agricoles en phase solide. Elles présentent par rapport aux fermentations en phase liquide l'avantage de paraître plus simples de mise en œuvre, mieux adaptées à la nature et aux volumes des substrats de nature agricoles, donc saisonniers et dispersés géographiquement ; enfin la concentration du substrat en phase solide permet de réduire la taille des équipements et surtout d'éviter l'emploi de volumes d'eau importants qui sont un frein aux phénomènes de transfert d'oxygène et représentent un effluent gênant coûteux à éliminer.

Depuis 1974, une équipe de l'ORSTOM dirigée par M. RAIMBAULT a entrepris des recherches de base sur les fermentations en phase solide, ainsi que des études fondamentales sur la cinétique et la physiologie de la croissance, la sporulation et la taxonomie des moisissures d'intérêt agro-alimentaire, impliquées dans ce type de fermentation.

Les premiers résultats ont conduit dès 1976 à la mise au point d'un nouveau procédé d'enrichissement en protéines de substrats amyliacés. Ce procédé permet après 24 heures de fermentation, si le substrat est convenablement conditionné et si les conditions optimales de développement de la moisissure sont respectées, d'enrichir jusqu'à 20 % en protéines, divers substrats amyliacés tels que le manioc, la banane ou la féculé de pomme de terre. Ce procédé peut être utilisé pour la production d'AFEP (Aliments Fermentés Enrichis en Protéines).

PERSPECTIVES

Les recherches de base poursuivies à l'ORSTOM ont permis d'optimiser les paramètres de la croissance des champignons filamenteux en phase solide, de la production d'enzymes (amylases, cellulases...), de la sporulation et d'adapter les connaissances à des substrats amyliacés ou ligno-cellulosiques, qu'ils soient d'origine tropicale ou tempérée.

Les recherches appliquées ont débouché sur la mise au point de nouveaux fermenteurs statiques ou agités adaptés à la croissance en phase solide. Un appareil capable de traiter 100 Kg de poids sec de substrat amyliacé a été breveté par l'IRCHA (Institut National de la Recherche Chimique Appliquée) à la suite d'une étude de pré-développement réalisée sur pulpe de pomme de terre épuisée. Des essais toxicologiques et nutritionnels ont été réalisés par l'ORANA (Office de Recherche sur l'Alimentation et la Nutrition Africaine) au Sénégal sur farine de manioc enrichie, puis par l'INRA en France sur un résidu de féculerie de pomme de terre ; ils ont démontré l'innocuité de ces AFEP et permis de préciser les conditions de leur utilisation. Enfin la SPEICHIM (Société Pour l'Équipement des Industries Chimiques) s'est associée au groupe ORSTOM-IRCHA pour mettre au point un nouveau fermenteur.

Pour parvenir à une meilleure exploitation et à une meilleure connaissance des cultures des moisissures en phase solide, il a été nécessaire de développer des recherches de base plus générales concernant les mécanismes et les caractéristiques de la croissance en phase solide. D'autre part, en raison de la nécessité d'obtenir des inocula de spores en quantité abondante et de façon pratique, des études sur la production de spores en conditions contrôlées ont été poursuivies. Enfin, l'hydrolyse du substrat, qu'il soit amyliacé ou cellulosique, est une étape limitante dans le processus de croissance des moisissures sur substrats solides. C'est pourquoi des études cinétiques et biochimiques ont été faites pour caractériser les amylases et les cellulases synthétisées en phase solide. Les travaux de l'ORSTOM dans le domaine des fermentations en phase solide conservent une originalité reconnue tant sur le plan des études de base (publications sur la physiologie, la production d'amylases, de cellulases...) que sur les perspectives de développement de nouveaux procédés agro-industriels ayant donné lieu à des prises de brevets.

Les derniers résultats laissent prévoir que dans une seconde étape, les applications des fermentations en phase



solide ne concerneront pas seulement l'enrichissement en protéines d'aliments fourragers, mais également la production d'enzymes (amylases, cellulases, pectinases) ou autres métabolites synthétisés en abondance par les moisissures.

STRUCTURES

Après 4 ans de travail en région parisienne dans les locaux de l'IRCHA l'équipe ORSTOM sur les fermentations en phase solide a été transférée en Martinique et au Mexique de façon à pouvoir réaliser des études sur les substrats tropicaux.

Depuis 1981, l'ORSTOM et le Département de Biotechnologie de l'Université Autonome Métropolitaine (UAM) à Mexico, collaborent à un programme de recherche conjoint portant sur les fermentations en phase solide. Un accord de coopération a été signé entre ces deux organismes dans le cadre de l'accord général de coopération ORSTOM-CONACYT au Mexique. Ce groupe de recherche fonctionne sous la responsabilité scientifique du Prof. G. VINIEGRA de la UAM et du Dr. M. RAIMBAULT de l'ORSTOM.

Les études réalisées portent à la fois sur des études de base prospectives et

des études finalisées et concernent les domaines suivants :

- Enrichissement en protéines du manioc et autres substrats amylacés,
- Amélioration de la digestibilité de substrats ligno-cellulosiques (pailles, bagasse),
- Détoxification de résidus agro-industriels (pulpe de café),
- Fermentation lactique des amidons et ensilages,
- Production d'enzymes hydrolytiques (amylases, cellulases, pectinases) ou d'autres métabolites,
- Physiologie et modélisation de la croissance des moisissures en phase solide (sporulation, croissance, métabolisme secondaire),
- Contrôle des fermentations en phase solide (capteurs, contrôles de qualité, mycotoxines...) et ingénierie.

Pour la réalisation de ce programme de coopération, l'équipe de recherche franco-mexicaine comprend actuellement 2 chercheurs de l'ORSTOM (M. RAIMBAULT et S. ROUSSOS), 2 VSN du MRE, 4 Professeurs de la UAM à mi-temps, 2 chercheurs de la UAM actuellement en spécialisation en France, 4 étudiants de Licence ou Maîtrise et 4 chercheurs mexicains contractuels.

Le financement de ce programme

conjoint est assuré en partie par la UAM pour ses personnels et les infrastructures, par l'ORSTOM pour ses chercheurs et par des contrats de recherche avec des organismes nationaux et internationaux : CONACYT (Conseil National de la Science et de la Technologie - Mexico), FIS (Fondation Internationale pour la Science - Stockholm), OEA (Organisation des États Américains - Washington) et la CEE (Communauté Économique Européenne - Bruxelles).

L'infrastructure disponible pour l'équipe comporte 4 laboratoires de microbiologie et d'analyse, des bureaux, et 2 hall-pilote-fermentation.

La UAM souhaite intensifier sa coopération scientifique avec l'ORSTOM de façon à constituer un groupe enseignement - recherche d'un niveau international dans le domaine des fermentations agro-alimentaires et plus particulièrement sur les thèmes de la fermentation en phase solide et la fermentation lactique. Ce groupe serait alors destiné à former des scientifiques et des techniciens dans ce domaine, non seulement pour le Mexique mais également pour les autres pays d'Amérique Latine et permettrait d'intensifier les échanges avec les pays européens, en particulier avec la France.

COLLABORATIONS

Pour cela des collaborations avec des organismes de recherche français ont été entreprises et fonctionnent depuis plus de 2 ans. Tout d'abord avec l'IRCHA qui apporte son appui pour les problèmes d'équipements et de constructions de prototypes de fermenteurs ; avec l'INSA de Toulouse pour les aspects des recherches portant sur la cinétique des processus fermentaires, avec l'UTC de Compiègne enfin pour les aspects d'ingénierie des procédés. Ces collaborations se déroulent à travers des échanges de chercheurs. Un programme annexe s'est développé entre la UAM et l'UTC pour des recherches portant sur la fabrication d'arômes alimentaires par fermentation en milieu solide. Une collaboration avec l'INRA est envisagée pour les études zootechniques.

Le groupe ORSTOM/UAM collabore par ailleurs avec des organismes de recherche mexicains dans les domaines de l'agronomie, la nutrition et des aliments. Des collaborations avec d'autres pays d'Amérique Latine (Venezuela, Guatemala, Cuba, Brésil) se mettent en place.

On espère que les résultats des travaux de ce groupe pourront être transférés au secteur productif à travers la constitution d'une société franco-mexicaine pour le co-développement des nouvelles technologies. ■

Valorisation des résidus agricoles ou agro-industriels tropicaux par fermentation en milieu solide

RESPONSABLE :
J. BALDENSPERGER.

LABORATOIRE :
Laboratoire de biotechnologie et de
microbiologie appliquée, B.P. 81,
97201 Fort-de-France

Tél. : (596) 60.24.79.
Télex : ORSTOM 912024.

Adresse à compter de fin 85
Equipe ORSTOM, C.I.T.A., Universi-
dad de Costa Rica, San José, (COSTA
RICA), America Central.



Mots-clés

- **Matériel biologique :** écarts de triage de bananes,
- **Techniques :** séchage solaire ; fermentation en milieu solide dans un fermenteur type pétrin (I.R.C.H.A.) ; champignon filamenteux (*Aspergillus niger*),
- **Problématique :** production d'aliment fermenté enrichi en protéines (AFEP) pour les animaux.

THÈME

Le programme ORSTOM de valorisation des résidus agro-industriels par fermentation en milieu solide a débuté à Dakar en 1974. Son objectif était de mettre au point un procédé permettant de valoriser, dans un système de développement auto-centré, des quantités relativement faibles de résidus (de l'ordre de 1 500 t/an) en assurant une rentabilité économique à cette échelle, soit par la production d'un aliment enrichi en protéines pour le bétail, soit par la production d'enzymes ou de métabolites à forte valeur ajoutée.

La production de protéines d'organismes unicellulaires par fermentation de type classique, c'est-à-dire en milieu liquide, dans des conditions aseptiques et par des procédés comportant une séparation et un séchage de la biomasse, exige une technologie complexe et le seuil minimal de production économiquement rentable peut être supérieur aux marchés potentiels dans les pays en voie de développement.

Ces considérations ont conduit à envisager une approche différente, consistant en un enrichissement en

protéines par une technologie simplifiée, susceptible d'être mise en œuvre au niveau des communautés rurales, et permettant de combiner localement la culture de la matière première, sa conversion en protéines et son utilisation directe pour l'élevage. La fermentation en milieu solide par des champignons filamenteux pourrait permettre d'atteindre ces objectifs.

On constate dans les Antilles, et en particulier en Martinique et Guadeloupe, à la fois une dépendance des élevages sur des aliments importés et une disponibilité en certains résidus agricoles pauvres en protéines tels que les écarts de triage de bananes. Bien que des résultats aient été obtenus auparavant au stade pilote sur un substrat agro-industriel de région tempérée (résidu de féculerie de pomme de terre), plusieurs années de travail étaient nécessaires en région tropicale pour vérifier l'intérêt de la fermentation en milieu solide, pour la valorisation par la biotechnologie des résidus tropicaux. L'installation du laboratoire de biotechnologie en Martinique correspondait donc à la fois à une demande du Secrétariat d'État aux DOM-TOM et à une étape de ce programme.

ÉQUIPE ET LABORATOIRE

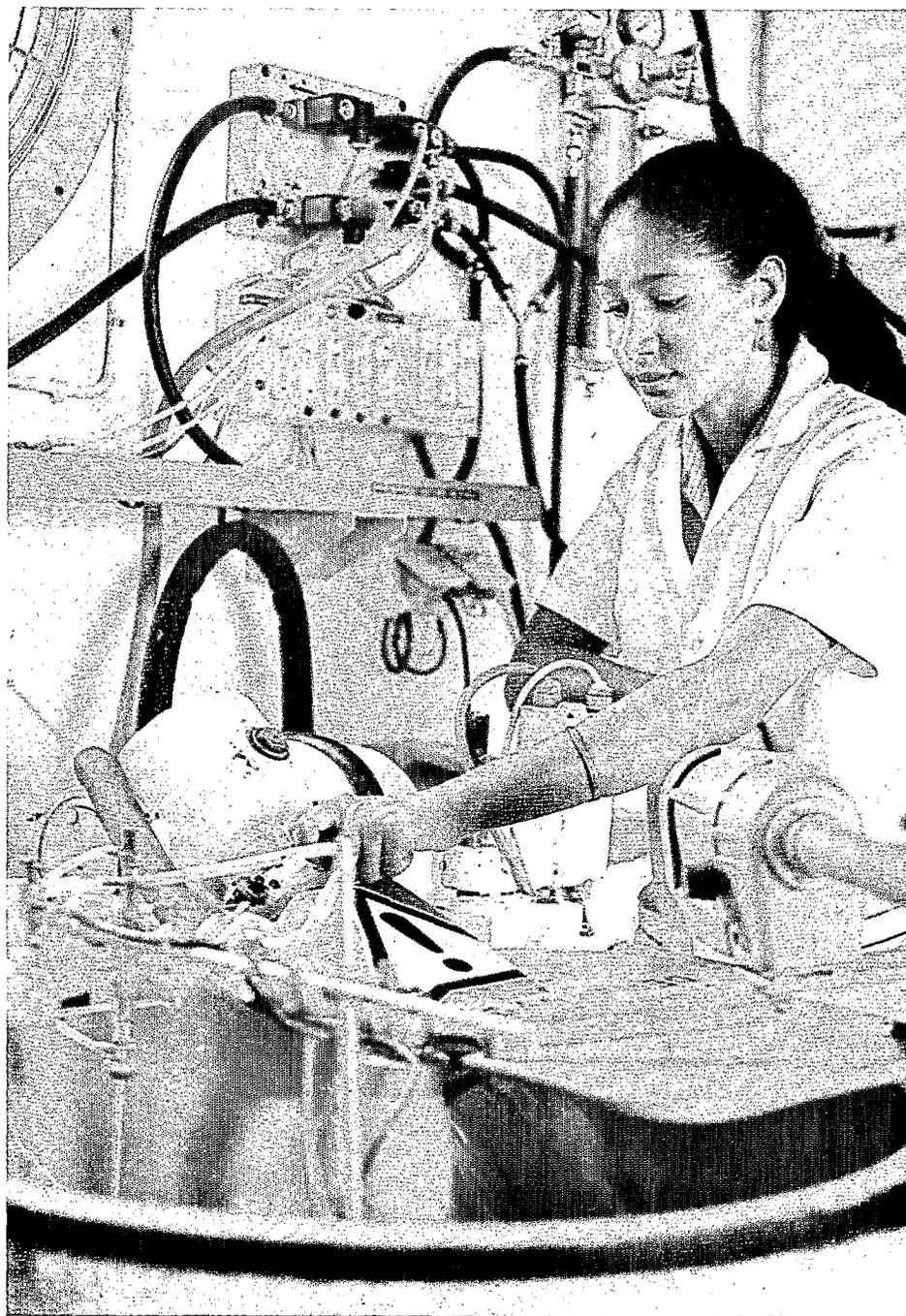
Initialement composée de trois chercheurs, une élève et une technicienne, l'équipe compte actuellement deux chercheurs, une technicienne et un volontaire de l'aide technique.

Le laboratoire est installé dans un local de 145 m² plus dépendances (hall de fermentation à l'échelle pilote). Le matériel scientifique nécessaire à la réalisation du programme exposé ci-dessus a été en grande partie acquis au cours des années précédentes et a été transféré à Fort-de-France. Le pilote de fermentation solide agitée a été construit à partir d'équipements mis au point et prêtés par l'IRCHA (Institut National de Recherches Chimiques Appliquées) et complété par du matériel acquis grâce à un financement de la CORDET (Commission de Coordination de la Recherche dans les DOM-TOM). D'autre part une aide de l'AFME a été obtenue pour la construction et l'étude d'un séchoir solaire adapté au climat tropical humide.

ÉTUDES ET TRAVAUX DE L'ÉQUIPE DE FORT-DE-FRANCE

**Études de base concernant
la fermentation en milieu solide :**

Optimisation des conditions physico-chimiques pour la fermentation en milieu solide de nouveaux substrats (tourteau d'ananas) et recherche des souches les plus performantes (souches



sauvages ou mutants obtenus par fusion de protoplastes).

Physiologie de la sporulation des champignons imparfaits (pour partie, étude terminée à Fort-de-France).

Constitution et entretien d'une collection de souches de champignons filamentueux.

Études finalisées :

Mise au point d'un procédé de pré-conditionnement économique, par exemple séchage solaire. L'utilisation des résidus agricoles frais, tels que les écarts de triage de bananes, se heurte en effet au problème de leur séchage

par des moyens économiques. Un séchoir expérimental construit par le CEEMAT (Centre d'Études et d'Expérimentation du Machinisme Agricole Tropical) a été mis en service. Sa capacité étant inférieure aux besoins du fermenteur pilote, un second séchoir de capacité double a été mis au point, construit par la Sté SUNWID ENERGIES et étudié dans le cadre d'une convention avec la Région Martinique.

Construction d'un fermenteur pilote.

Mise au point des conditions optimales de fermentation solide de la farine de banane verte et production de lots d'aliment enrichi.

Mise au point des conditions de production et d'extraction de cellulases à l'échelle pilote (programme terminé en Martinique).

Essais nutritionnels du produit enrichi de banane sur l'écrevisse d'élevage *Macrobrachium rosenbergii*.

COLLABORATIONS ET PERSPECTIVES

Pour mener à bien ses travaux, l'équipe de microbiologistes ORSTOM en Martinique a établi des relations avec divers organismes et sociétés aussi bien dans le domaine prospectif qu'appliqué. On peut citer :

- l'IRCHA et la SPEICHIM (Société pour l'Équipement des Industries Chimiques) auxquels l'ORSTOM était lié par des accords pour le développement du procédé.

- Des organismes ou sociétés disposant en Martinique de résidus agricoles tels que la SOCOMOR, le CTCS et l'IRFA, ou intéressés par la mise au point d'appareillages spécifiques (SUNWIND Recherche pour le séchage solaire).

- l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) pour les essais nutritionnels sur *Macrobrachium*, dont l'élevage est en pleine expansion dans la région et plus généralement dans les DOM-TOM.

- l'ICAITI (Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial) au Guatemala, qui étudie également sur un pilote l'IRCHA la valorisation des écarts de bananes.

Certains des objectifs finalisés ayant été atteints après 3 ans de travail en Martinique, il a semblé nécessaire de poursuivre les recherches en microbiologie appliquée à la valorisation des résidus agricoles par une coopération ouvrant des perspectives nouvelles. Il a donc été décidé d'installer l'équipe à compter de fin 85 au CITA (Centro de Investigaciones en Tecnología Alimentaria) de San José, Costa Rica. Cet institut universitaire dispose en effet à la fois de structures de recherche de base (Université de Costa Rica) dans les domaines de la microbiologie, de la biochimie et de la zootechnie, ainsi que de possibilités d'expérimentation de modèles s'appuyant sur un réseau constitué. D'autre part le CITA souhaite promouvoir fortement la formation de ses ingénieurs et chercheurs dans le domaine des fermentations. Enfin la valorisation des écarts de triage de bananes fait déjà l'objet au Costa Rica de réalisations concrètes et originales : production mécanique de farine de bananes vertes pour l'alimentation du bétail et aquaculture d'eau douce (*Macrobrachium*) en diversification dans les régions bananières. ■

Microbiologie et Biotechnologie des fermentations



RESPONSABLE :
Vincent JACQ

LABORATOIRE :

Antenne ORSTOM de microbiologie des fermentations, École Nationale Supérieure Universitaire de Technologie, Boîte Postale n° 5085, Dakar (SÉNÉGAL).

Mots-clés

- **Matériels biologiques :** déchets agro-industriels ; algues marines ; déchets d'abattoirs ; ordures ménagères ; coques d'arachides ; biomasse variée.
- **Techniques :** fermentation méthanique ; fermenteur de laboratoire ; digesteur-pilote (2 m³) ; pilote de compostage (8 m³) ; chromatographie en phase gazeuse.
- **Problématique :** dépollution industrielle, production d'énergie et de fertilisants.

THÈME

Il s'agit de recherches de microbiologie dont la valorisation porte sur la biotechnologie des fermentations (principalement à partir de déchets agro-industriels).

Elles concernent :

- la microbiologie **fondamentale** (recherche d'inoculum ; analyse de microflore fermentaire ; isolement de souches performantes),
- la méthanisation et le compostage :
 - d'algues échouées,
 - de déchets d'abattoir,
 - d'autres substrats agro-industriels.
- le compostage de coques d'arachide,
- la dépollution de déchets urbains.

Elles s'associent à un enseignement (I.U.T.), à la formation et l'accueil de stagiaires (de tout niveau entre la Maîtrise et le Doctorat), à des sessions de recyclage (formation permanente) mais aussi à l'animation de rencontres scientifiques de haut niveau (congrès, ateliers...).

PERSPECTIVES

L'effort porté sur la microbiologie fondamentale est prioritaire pour une période située entre 1985 et 1988. Deux réussites actuelles sont à signaler à son actif. D'une part, les panses de bœuf constitueraient une source intéressante de bactéries fermentaires et, en particulier, de bactéries méthanigènes. D'autre part, les boues de mangroves constituent un bon inoculum pour la fermentation anaérobie des macrophytes marins.

Quant au second thème abordé (les processus de méthanisation), il est prévu le passage, avant juin 1985, aux études en modèles semi-industriels (pilotes) pour une fermentation en continu ou en « batch ».

La recherche concernant les coques d'arachide portera sur une étude microbiologique sur les bactéries et les champignons cellulolytiques. Toutefois, on remarquera que la technique empirique développée actuellement permettra dans un premier temps la construction d'une usine de compostage près d'une huilerie.

L'équipe mise en place constitue un des bureaux d'étude pour la dépollution de la ville de Dakar, l'une des méthodes employées étant la méthanisation des déchets.

STRUCTURE

Il s'agit d'une structure **mixte**, liée à l'Université de Dakar (Faculté des sciences). L'Antenne ORSTOM constituée est jumelée (et intégrée) au Laboratoire de Valorisation des Substances

Naturelles de l'E.N.S.U.T. Il en résulte une double direction scientifique, la biotechnologie de l'E.N.S.U.T. étant sous la responsabilité du Professeur P. VIAUD, la microbiologie, le fait de V. JACQ. Il en est de même pour son administration.

Toutefois, ce laboratoire a un encadrement constitué d'un personnel qualifié nombreux (11 chercheurs en plus des techniciens locaux) permettant un accueil et une formation cohérente (liée à l'enseignement et à la recherche faits dans ce laboratoire). Il peut s'agir de stages de courte durée (d'au plus 3 mois). Dans ce cas quatre stagiaires au maximum peuvent être accueillis en simultané. Il peut s'agir de stages de longue durée (six mois à deux années).

Deux à trois postes sont disponibles, dont un nécessairement réservé à un jeune chercheur ORSTOM. Dans ce dernier cas, le niveau minimum exigé est la Maîtrise en Sciences (chimie ou biologie), voire un D.E.A. Dès lors, il sera possible de préparer une thèse.

COLLABORATIONS

Elles sont complexes.

Les recherches développées dans ce laboratoire sont menées en accord avec quatre ministères de tutelle sénégalais : la Recherche (M.R.S.T.), le Développement industriel (M.D.I.A.), l'Enseignement Supérieur (M.E.S.), et l'Environnement (M.E.). Il en résulte des contacts fréquents pour définir les priorités et mener des enquêtes communes sur les besoins locaux.

D'autres contacts existent :

- avec des structures de recherche :
 - en France, le C.N.R.S. (Laboratoire de chimie bactérienne de l'Université de Provence), et différents autres laboratoires des Universités d'Aix-Marseille I, de Nancy et de Paris-XII (Créteil), pour des collaborations en Microbiologie Fondamentale,
 - au Sénégal, l'I.S.R.A. (Institut Sénégalais de Recherches Agricoles) pour la fermentation algale et l'étude des composts, le C.E.R.E.R. (Centre d'Études et de Recherches sur les Énergies Renouvelables) et la Faculté des Sciences de Dakar pour les études de chimie et de biochimie, et l'O.N.G.

(CARITAS / E.N.D.A. - Tiers-monde / CORDIA) pour l'étude commune des applications en milieu rural,

- avec des organismes internationaux comme le F.I.C.U. (Fond International de Coopération Universitaire), le C.R.A.T. (Centre Régional Africain de Technologie), l'A.U.P.E.L.F., l'U.N.E.S.C.O., le F.E.D. ou la C.E.E., pour la formation, l'échange de chercheurs, diverses missions ou l'aide au financement. ■

Fermentation méthanique de résidus agro-industriels

RESPONSABLE :
Jean-Louis GARCIA

Mots-clés

– **Matériel biologique :** résidus agro-industriels (cellulose, hémicellulose, ligno-cellulose, protéines, sucres, composés aromatiques, corps gras...); bactéries anaérobies strictes méthanogènes, sulfo-réductrices, homo-acétogènes, syntrophiques, hydrohytiques...

– **Techniques :** dénombrements des populations bactériennes; isolement et caractérisation de souches pures; expérimentation et caractérisation de souches pures; expérimentation de cultures mixtes définies; fermentation en batch et en continu (fermenteurs de laboratoire).

– **Problématique :** dépollution industrielle; production d'énergie et de fertilisants.

THEME :

Un aspect possible de la valorisation des résidus agro-industriels est la production d'énergie (biogaz) couplée à la dépollution et l'obtention de fertilisants.

La fermentation méthanique représente une valorisation intéressante des sous-produits de l'agriculture. Elle a en effet l'avantage de produire de l'énergie sans détruire les éléments minéraux et même, au contraire, de favoriser leur concentration. Théoriquement, on peut obtenir 410 litres de méthane à partir de la décomposition complète de 1 kg de cellulose. Toutefois, en pratique, la production de biogaz varie fortement suivant la nature des matières premières utilisées pour la fermentation. L'intérêt de ce procédé est d'une part de pouvoir traiter des matériaux

LABORATOIRE :

Laboratoire de microbiologie ORSTOM, Université de Provence, 3, place Victor-Hugo,
13331 MARSEILLE-CEDEX 03
Tél. : (91) 50.64.04

humides, d'autre part de réaliser simultanément une opération d'épuration tout en fournissant un compost utilisable comme amendement et engrais.

PERSPECTIVES :

Contrairement aux déjections animales (fumiers et lisiers), les résidus celluloseux d'industries agro-alimentaires sont pauvres en micro-organismes et une inoculation est indispensable pour obtenir une fermentation méthanogène satisfaisante. Une étude approfondie des microflores spécifiques responsables des différentes étapes de la biodégradation anaérobie est donc nécessaire pour pouvoir introduire une microflore adaptée afin d'orienter et contrôler ce processus de fermentation.

La mise au point de techniques et de milieux de numération des populations bactériennes impliquées dans le processus de digestion anaérobie a contribué à constituer une collection de souches pures. Ces souches permettent actuellement la réalisation d'une expérimentation de cultures mixtes définies dans le but d'obtenir des inocula adaptés au substrat à digérer.

Cela devrait permettre de faire avancer les connaissances dans le domaine encore mal connu de la microbiologie de la digestion anaérobie, de faire progresser la technologie des cultures mixtes définies et d'optimiser au laboratoire la fermentation méthanique de divers substrats d'origine agricole (cellulose, hémicellulose, protéines, composés aromatiques, corps gras, etc...).

STRUCTURE

L'équipe ORSTOM s'est constituée grâce au recrutement récent de trois jeunes chercheurs qui ont reçu une formation très spécialisée lors de stages de longue durée aux U.S.A. L'équipement complet du laboratoire installé dans les locaux de l'Université de Provence a été acquis par une aide de l'A.F.M.E. (Agence Française pour la Maîtrise de l'Énergie) et du C.N.R.S. (A.T.P./P.I.R.S.E.M.).

Il est prévu d'étendre la superficie de ce laboratoire. Il s'équipera d'un petit hall de fermentation en collaboration avec l'équipe du Professeur J.-P. BELAICH. Cette opération permettra de développer plus particulièrement la partie finalisée de ce programme.

COLLABORATIONS

L'implantation de l'équipe dans les locaux même de la Maîtrise de Sciences et Techniques de Microbiologie Générale et Appliquée de l'Université de Provence a permis de créer un environnement scientifique universitaire remarquable. Une telle situation permet d'accroître les possibilités d'accueil et de formation pour les étudiants français et étrangers désireux de se spécialiser dans ce domaine. Actuellement, l'équipe comprend trois chercheurs, deux élèves ainsi que plusieurs étudiants (préparant une thèse).

L'équipe, qui a des relations privilégiées avec l'équipe du Professeur J.-P. BELAICH (Chaire de microbiologie, Université d'Aix-Marseille 1), collabore aussi activement avec l'I.R.C.H.A. (Institut National de Recherche Chimique Appliquée) pour l'expérimentation en pilote de toute innovation éventuellement mise au point au Laboratoire de Microbiologie. ■



Symbioses actinorhiziennes



RESPONSABLES :
Y. DOMMERGUES et H.G. DIEM

LABORATOIRE :

1 - Laboratoire de microbiologie des sols, ORSTOM BP. 1386 Dakar (SÉNÉGAL).

2 - Laboratoire de biotechnologie des systèmes symbiotiques forestiers tropicaux (BSSFT) CNRS/CTFT avenue de la Belle Gabrielle 94130 - Nogent-Sur-Marne,

3 - INIREB Apartado Postal 63 Xalapa 9100 (MEXIQUE).

Mots-clés

Actinorhize, Frankia, Fixation d'azote, reforestation.

THÈME

Comme dans le cas des légumineuses forestières, l'objectif visé est d'accroître les potentialités fixatrices d'azote des plantes actinorhiziennes, même lorsque celles-ci se trouvent placées dans des conditions environnementales hostiles (par ex. sols salés). Pour atteindre cet objectif on fera simultanément appel à deux approches :

(1) approche microbiologique consistant à sélectionner ou manipuler le microorganisme symbiotique fixateur d'azote, Frankia, (2) exploitation de la variabilité (spontanée ou provoquée) de la plante hôte en vue de l'obtention de clones présentant un potentiel fixateur d'azote accru, ainsi que des qualités remarquables telle que croissance rapide ou résistance à certaines contraintes environnementales.

On a commencé à étudier des Casuarinacées appartenant aux genres Casuarina et Allocasuarina. Ces recherches seront développées et complétées par l'étude de plantes actinorhiziennes tropicales notamment Coriaria sinica et divers Myrica de région tropicale humide.

Les principaux axes de recherches sont les suivants :

– étude de la physiologie et des exigences nutritionnelles de Frankia ; amélioration de la technique de culture *in vitro*;

– multiplication végétative de Casuarina à partir d'explants de différente nature y compris cônes femelles ; régénération de plantes entières à partir de calcs ;

– sélection de clones de Casuarina à potentiel fixateur d'azote nul (témoins dans les expériences d'évaluation de fixation d'azote) ou très élevé ;

– mise au point d'une technique d'évaluation fiable de la fixation d'azote, au champ.

PERSPECTIVES

– Biotechnologie de Frankia

Après avoir perfectionné les techniques de culture *in vitro* de différentes souches de Frankia on pourra en entreprendre l'étude génétique avec pour objectif final l'obtention de souches effectives et à spectre élargi.

– Biotechnologie des plantes actinorhiziennes

On poursuivra le programme de sélection de clones de Casuarina en fonction de leur potentialité fixatrice d'azote ainsi que d'accroître leur résistance à certaines contraintes de l'environnement notamment la salinité. L'élargissement de la variabilité génétique des Casuarina pourra être recherché en faisant appel à la mutagenèse. Compte tenu des résultats obtenus avec Casuarina, on pourra envisager d'appliquer la technologie mise au point à d'autres espèces actinorhiziennes.

– Valorisation des recherches

Lorsque l'on aura amené à maturation la préparation des inoculum de Frankia, il sera possible de procéder à des essais systématiques d'inoculation à grande échelle.

STRUCTURES

Les recherches sont conduites essentiellement, mais non exclusivement au BSSFT, les activités dans les trois laboratoires impliqués étant complémentaires. Ces activités sont de trois types :

– Recherches fondamentales : (1) physiologie de la croissance culture et génétique de Frankia ; (2) multiplication végétative *in vitro* des plantes hôtes, régénération à partir de calcs ; sélection de clones.

Ces recherches seront conduites au BSSFT (Nogent-Sur-Marne).

– Estimation de la fixation d'azote *in situ* ¹⁵N et valorisation des recherches sur les Casuarina. Ces recherches seront conduites en collaboration par l'ORSTOM, la Direction des Eaux et Forêts du Sénégal et le BSSFT.

– Inventaire des espèces actinorhiziennes Centre-Américain. Recherches conduites à l'INIREB (Xalapa, Mexique).

Le BSSFT sera fonctionnel à partir de la fin de l'année 1985. Deux chercheurs seront affectés à ce programme. L'équipement du BSSFT comprendra en particulier : une serre, des chambres de culture de tissus végétaux, une installation de microscopie électronique (transmission et balayage), l'équipement pour des recherches immunologiques et des études de croissance et de physiologie des Frankia. Il y aura possibilité d'accueillir au BSSFT deux stagiaires à partir du 1^{er} janvier 1986. Le laboratoire de l'ORSTOM à Dakar dispose d'un chercheur : ce laboratoire est doté de l'équipement nécessaire à l'exécution du programme.

Le laboratoire de l'INIREB est parfaitement équipé pour conduire à bien l'inventaire des espèces actinorhiziennes centre-américaines (Herbarium, moyens informatiques) et accessoirement procéder à des estimations de fixation d'azote. Deux chercheurs sont affectés au programme.

Inoculation de Casuarina equisetifolia. A gauche témoin non inoculé ; à droite inoculation parfaitement réussie ; au centre inoculation médiocre due à l'insuffisance du nombre d'unités infectieuses dans l'inoculum utilisé.

COLLABORATIONS

- Insitut Pasteur Paris (étude de la nitrogenase des *Frankia*),
- Université de Nice, laboratoire de physiologie végétale (Isoenzymes chez *Frankia*),
- INSA Toulouse, laboratoire de génie biochimique (culture de *Frankia*),
- Université de Dakar.
- Direction des Eaux et Forêts du Sénégal,
- Institut National de Recherche Forestière de Tunisie. ■

Les légumineuses forestières tropicales

RESPONSABLES : Y. DOMMERGUES et B. DREYFUS

LABORATOIRE : Laboratoire de Microbiologie des sols, ORSTOM B.P. 1386, Dakar - (SÉNÉGAL).



Mots-clés

Fixation d'azote, *Rhizobium*, arbres fixateurs d'azote, mycorhizes, reforestation.

THÈME

L'objectif majeur est de mettre au point une technologie permettant l'accroissement de la productivité des légumineuses forestières tropicales, notamment dans le cas de conditions climatiques et édaphiques défavorables. Cette technologie devrait en particulier contribuer efficacement à la lutte contre la désertification partout où les sols ont été dégradés par surexploitation, sans recourir à l'utilisation d'engrais azotés.

Pour atteindre cet objectif on fait essentiellement appel à l'approche microbiologique qui consiste (1) à étudier la biologie des microorganismes symbiotiques (*Rhizobium* et champignons mycorhiziens) à l'état isolé et la biologie de leur association avec la plante hôte (2) à acquérir la maîtrise des techniques d'établissement des associations symbiotiques les plus performantes (inoculation).

Les recherches en cours portent sur plusieurs espèces d'*Acacia*, notamment *A. Sénégal* (gommier), *A. Leta*, *A. raddiana*, *A. nilotica*, deux *Prosopis* (*P. africana*, *P. juliflora*) et un *Alzelia* (*A. africana*).

Les recherches portent à la fois sur les *Rhizobium* associés (spectre d'hôte ; sélection en fonction de l'effectivité) et sur la multiplication végétative des clones sélectionnés *in situ* pour leur productivité.

PERSPECTIVES

Trois volets de recherche seront développés :

- Constitution d'une collection de *Rhizobium* spécifique et étude de leur physiologie,
- Constitution d'une collection d'ectomycorhizes tropicaux et évaluation de leur effet sur le potentiel fixateur d'azote et la nutrition minérale des plantes hôtes,
- Sélection de clones d'arbres à hautes performances en ce qui concerne leur potentiel fixateur d'azote et leur productivité (ex. gomme arabique).

STRUCTURES

Les recherches correspondantes sont conduites au laboratoire de l'ORSTOM de Dakar en ce qui concerne les espèces sahéliennes et soudaniennes et au laboratoire CTFT/CNRS de Nogent-Sur-Marne (BSSFT) pour les espèces tropicales humides ou méditerranéennes.

Laboratoire de l'ORSTOM à Dakar

Ce laboratoire n'est pas encore équipé de salles climatisées pour cultures de tissus végétaux. Cet équipement devrait pouvoir être mis en place à la fin de l'année 1986. Le personnel comprend deux chercheurs et deux stagiaires.

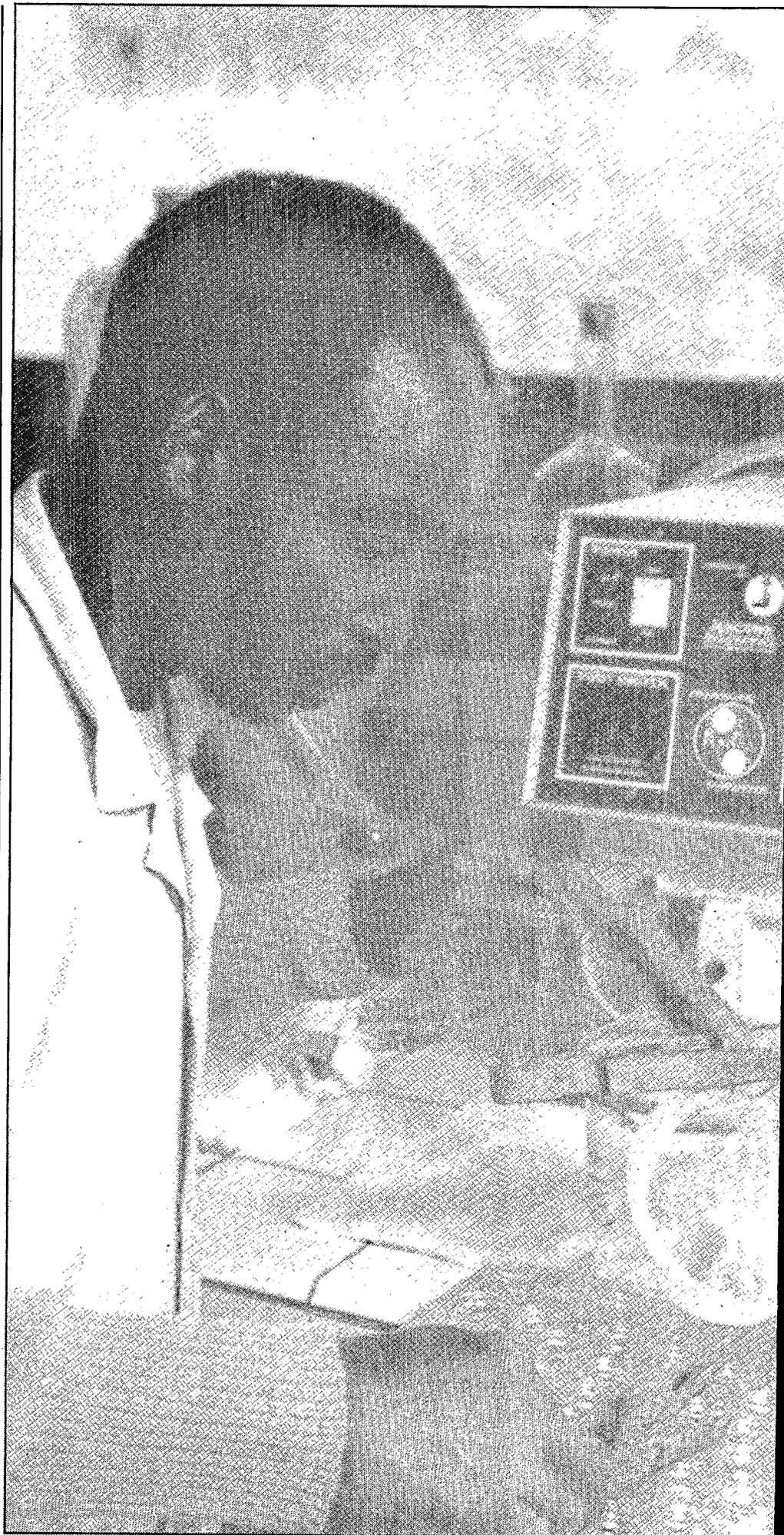
BSSFT de Nogent-Sur-Marne

Ce laboratoire sera fonctionnel à partir de la fin de l'année 1985.

L'IUFRO et la Banque Mondiale ont demandé l'aide de l'ORSTOM pour la mise sur pied en Afrique d'un vaste programme ayant pour objet le développement de nouvelles technologies en vue de la reforestation dans les zones Sahéliennes et Soudano-Sahéliennes avec des légumineuses forestières.

COLLABORATIONS

Université de Dakar. CNRF/ISRA (Sénégal) et National Academy of Sciences, Washington ; Direction des Eaux et Forêts du Sénégal. ■



La recherche de pointe en coopération, permettant en particulier, dans les pays qui en ont besoin, la



tion sur place, par la recherche, des cadres de la recherche et de la production ; facilite les transferts réciproques de connaissances et de technologies.

Étude des nodulines de *Sesbania rostrata*

RESPONSABLE :
Pierre de LAJUDIE

Mots-clés

– Matériel biologique :

Sesbania rostrata

Medicago

Rhizobium

Noduline

– Techniques principales :

Mesure de la fixation de l'azote

Électrophorèse bi-dimensionnelle

Isoélectrofocalisation

Synthèse protéique

– Problématique :

Compréhension du mécanisme de la symbiose fixatrice d'azote.

THÈME

La symbiose fixatrice d'azote *Rhizobium*-légumineuses fait intervenir une différenciation coordonnée (morphologique et biochimique) d'un procaryote et d'un eucaryote. Chaque étape dans l'établissement d'une telle symbiose, depuis l'infection de la plante par le *Rhizobium* jusqu'à la fixation de l'azote à l'intérieur des nodules, est sous le contrôle réciproque de chacun des deux partenaires (cf. D.P.S. VERMA et T. HOHN, 1984).

Parmi les légumineuses tropicales, *Sesbania rostrata* a retenu ces dernières années une attention toute particulière. Cette plante possède en effet des potentialités agronomiques certaines et constitue un modèle très intéressant pour des études de type fondamental visant la compréhension des mécanismes sous-jacents à la symbiose. *Sesbania rostrata* est en effet un système qui offre de multiples avantages : des

LABORATOIRE : Laboratoire de Biologie moléculaire des relations Plantes-micro-organismes, Centre de Recherches INRA-CNRS, Boite Postale N° 27, Auzeville, 31320 Castanet-Tolosan (FRANCE).

capacités remarquables pour la fixation d'azote qui en fait un matériel de choix pour son utilisation comme engrais vert (B. DREYFUS et al. 1981) et la présence à la fois de nodules racinaires et caulinaires en quantité très abondante. Par ailleurs, l'espèce *Rhizobium* associée à *Sesbania* possède la capacité de fixer l'azote en culture pure, ce qui permet l'étude génétique directe (C. ELMERICH et al., 1982).

ÉTAT ACTUEL DE LA RECHERCHE ET PERSPECTIVES

C'est le laboratoire de microbiologie des sols du Centre ORSTOM de Dakar-Hann qui, en 1979, a attiré l'attention du monde scientifique sur l'intérêt de la symbiose *Rhizobium*-*Sesbania* et en a commencé l'étude : ultrastructure, physiologie, biochimie (étude des leghémoglobines), étude des *Rhizobia* isolés des nodules de tiges et de racines (taxonomie, analyse génétique, recherche de plasmides, isolement de phages spécifiques) (B. DREYFUS, 1982 ; P. de LAJUDIE et al., 1982 ; P. de LAJUDIE et D. BOGUSZ, 1984).

En collaboration avec D. BOGUSZ (Centre ORSTOM de Dakar-Hann), il a été entrepris, au sein de l'équipe animée par Th. HUGUET (Laboratoire mixte INRA-CNRS d'Auzeville), l'étude des protéines végétales spécifiques de l'état symbiotique : les nodulines (selon la nomenclature de A. VAN KAMMEN, 1984).

Il a été montré, notamment chez le pois (T. BISSELING et al., 1983) et chez le soja (R.P. LEGOCKI et D.P.S. VERMA, 1980, F. FÜLLER et al., 1983 ; H. BERGMANN et al., 1983), que la plante, en réponse à sa colonisation par le *Rhizobium*, synthétise des protéines spécifiques. F. FULLER et al. (1983) les classent en trois types possibles :

- les protéines de structure du nodule,
- les enzymes nécessaires à l'assimilation de l'azote réduit,
- les protéines qui aident le rôle des bactériodes en facilitant la réduction de l'azote.

Au sein du laboratoire mixte INRA-CNRS d'Auzeville, qui travaille sur la symbiose *Rhizobium*-luzerne, il a été entrepris en parallèle l'inventaire des nodulines d'une légumineuse tempérée, *Medicago sativa*, et d'une légumineuse tropicale à nodules caulinaires *Sesbania rostrata*.

Les protéines solubles totales ont été préparées de divers tissus à analyser (nodules et racines pour *Medicago* ; nodules de tige, nodules de racine, tige et racine pour *Sesbania*). La comparaison des profils protéiques obtenus après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS fait apparaître des différences entre les tissus avant et après infection par le *Rhizobium* spécifique.

Afin de mieux pouvoir préciser ces différences, ces protéines ont été analysées par électrophorèse bidimensionnelle, comportant une première dimension par isoélectrofocalisation et une seconde par un classique PAGE-SDS. Parallèlement, il a été préparé toute une série d'antiséras par immunisation de lapins contre les protéines solubles totales des différents organes végétaux. Une telle approche est faite dans le but de pouvoir, par immunodétection, mettre en évidence les nodulines.

Par ailleurs, il est envisagé de purifier les RNA messagers à partir des différents organes, les mettre dans un système de traduction *in vitro*, comparer les polypeptides entre eux et à ceux mis en évidence *in vivo*.

Ce programme débouchera sur l'identification et le clonage des gènes des cellules végétales qui codent pour ces nodulines. Pour cela, il sera réalisé la synthèse *in vitro* du cDNA à partir des RNA messagers purifiés des nodules, que nous clonerons dans un vecteur d'expression.

Ces perspectives résultent de résultats préliminaires particulièrement intéressants obtenus dans le cadre de ce programme qui a été initié il y a un an à peine.



Sesbania rostrata âgée de 5 semaines, prête à être utilisée comme engrais vert pour la culture du riz.

STRUCTURES ET COLLABORATIONS

Ce programme se développe dans un environnement remarquable autant intellectuellement que matériellement (Laboratoire de biologie moléculaire des relations plantes-micro-organismes du centre INRA-CNRS d'Auzeville). Le dynamisme de l'équipe de Th. HUGUET lié à celui des équipes dirigées par Y. DOMMERGUES permettront le développement rapide et fructueux d'une telle opération de recherche. ■



JE VOUS SIGNALE
EN PASSANT QUE
VOUS TENEZ VOTRE
REVUE À L'ENVERS.



Legumineuses à nodules de tige

RESPONSABLES :

Bernard DREYFUS,
Gérard RINAUDO,
Didier ALAZARD.

Mots-clés

Fixation d'azote, Rhizobium, nodules de tige (= caulinaires).

THÈME

En 1980 nous avons découvert qu'une légumineuse poussant spontanément dans la vallée du Sénégal Sesbania rostrata possédait à la fois des nodules racinaires et des nodules de tige. Cette découverte a été le point de départ d'investigations approfondies qui ont montré en particulier que le Rhizobium spécifique, appelé ORS 571, présentait des propriétés uniques parmi les Rhizobium connus, en particulier la propriété de fixer l'azote en culture libre. En outre ce système est caractérisé par un potentiel fixateur d'azote très élevé et une bonne tolérance à l'azote combiné du sol.

Enfin sur le plan des applications, il a été montré, qu'utilisé comme engrais vert Sesbania rostrata pouvait accroître considérablement ($\times 1,5$ ou $\times 2,0$) les rendements de riz.

Parallèlement à l'étude de Sesbania rostrata nous avons entrepris des recherches sur une série de plantes également à nodules de tige mais appartenant au genre Aeschynomene. Les premiers résultats ont permis de mettre en évidence un certain nombre de différences entre ces systèmes, différences portant non seulement sur la physiologie des Rhizobium impliqués, mais aussi sur les modalités d'infection de la plante-hôte.

Les recherches en cours portent sur les points suivants :

- Rhizobium de Sesbania rostrata :

LABORATOIRE :

Laboratoire de microbiologie des sols,
ORSTOM - B.P. 1386 Dakar, (SÉNÉGAL).

taxonomie, physiologie, génétique (constitution d'une banque de gènes en collaboration avec le GEVI, Gand).

- Rhizobium d'Aeschynomene spp : taxonomie ; spectre d'hôte, physiologie.

- Étude ultrastructurale des processus d'infection.

- Identité et propriété des leghémoglobines des nodules de Sesbania rostrata.

- Cycles saisonniers et nycthéméraux de la fixation d'azote par S. rostrata.

- Évaluation de la fixation de N_2 *in situ* (15 N) et détermination du seuil d'inhibition par l'azote combiné.

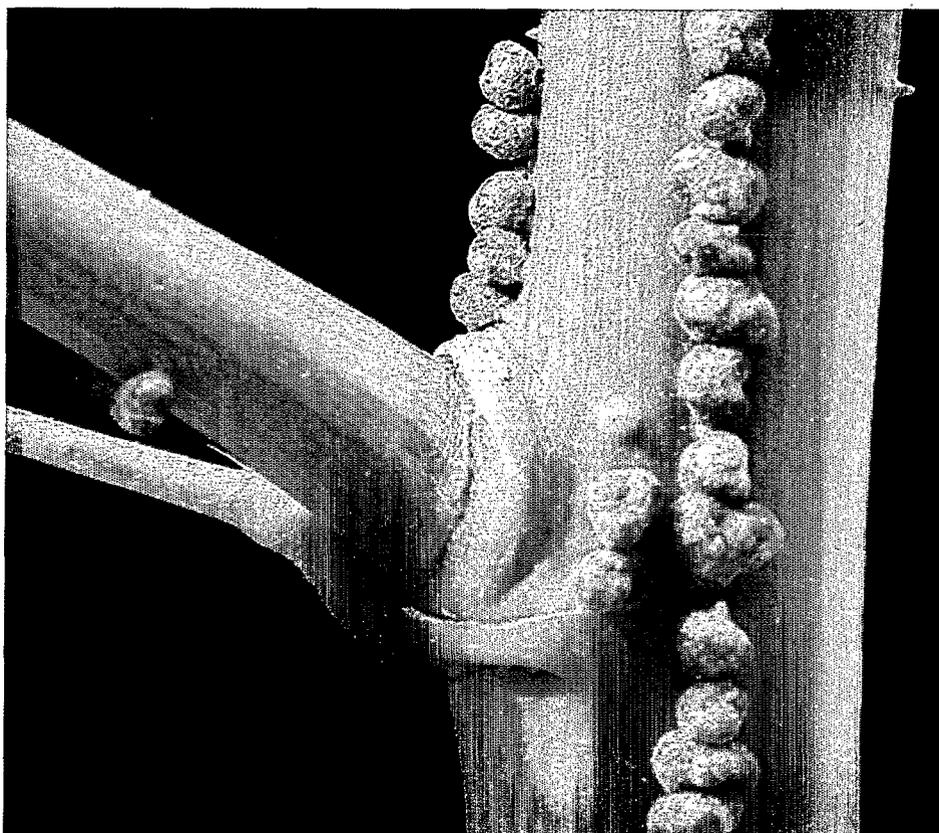
- Valorisation des recherches : utilisation de Sesbania rostrata et des Aeschynomene comme engrais vert ; valeur fourragère des légumineuses à nodules caulinaires.

PERSPECTIVES

Les recherches génétiques sur le Rhizobium de Sesbania rostrata ORS 571 auront pour objet de cloner les gènes codant pour la nodulation de tige et la fixation d'azote, l'objectif final étant d'obtenir les souches plus performantes (travaux à effectuer en collaboration avec le laboratoire GEVI de Gand).

Un effort particulier sera consacré à l'étude de l'infection chez Aeschynomene ainsi qu'à la physiologie des Rhizobium. On observera la variabilité génétique de Sesbania rostrata en vue de sélectionner des clones présentant des caractéristiques intéressantes sur le plan de la croissance, de la fixation d'azote et de la résistance à certains pathogènes.

Le transfert des biotechnologies mises au point au laboratoire en milieu paysan portera à la fois sur Sesbania rostrata (utilisé comme source d'engrais azoté en culture irriguée et en culture sèche) et sur différentes espèces d'Aeschynomene (utilisées comme fourrage et engrais vert).



Nodules de tige de Sesbania rostrata

Fixation biologique de l'azote par les cyanobactéries

certaines caractéristiques : résistance aux nématodes, non sensibilité à la photopériode : potentiel fixateur d'azote.

– Recherche de nouvelles applications agronomiques et développement des projets de valorisation.

Légumineuses forestières tropicales

Il s'agit là d'un programme en pleine expansion qui implique deux approches :

– Approche microbienne en vue de l'obtention de souches de Rhizobium à hautes performances et d'associations mycorhiziennes (de préférence ectomycorhizienne) permettant une meilleure nutrition des arbres en P et certains éléments et, par là, une meilleure fixation d'azote.

– Approche végétale consistant à perfectionner les techniques de multiplication végétative in vitro en vue de l'obtention de clones caractérisés par une productivité et un potentiel fixateur d'azote accrus.

Légumineuses à graines

Les objectifs des recherches effectués dans ce domaine sont à court terme. Il s'agit essentiellement de résoudre des problèmes appliqués dont l'étude est demandée par des instituts ou organismes de mise en valeur.

STRUCTURES

Le laboratoire de microbiologie des sols de Dakar comporte un équipement complet pour l'étude de la physiologie et de l'écologie microbienne ainsi qu'un terrain d'essai et des serres.

Le personnel affecté à ce programme comporte quatre chercheurs et deux stagiaires.

RESPONSABLE :
Pierre REYNAUD

Mots-clés

– **Matériel biologique :**

Cyanophycées

Anabaena

Anabaena azollae

Azolla

Azolla pinnata

– **Techniques principales :**

Fixation biologique de l'azote

– **Problématique :**

Compréhension des mécanismes de fixation biologique de l'azote.

THÈME

Les Cyanophycées sont des micro-organismes procaryotes photosynthétiques dont certaines espèces possèdent la faculté de fixer et d'utiliser l'azote atmosphérique pour leur nutrition azotée. Cette indépendance trophique leur confère un intérêt tout particulier en tant que source d'azote dans les écosystèmes naturels et cultivés.

Le centre ORSTOM de Dakar met l'accent plus particulièrement sur la symbiose existant entre Azolla et Anabaena azollae. Cette symbiose entre une fougère aquatique et une cyanobactérie fixe des quantités d'azote équivalentes à celles de légumineuses les plus efficaces. Son emploi en agronomie et en riziculture se développe en Afrique de l'Ouest de façon considérable.

PERSPECTIVES

Sous les conditions climatiques spécifiques à la zone tropicale sèche (hautes intensités lumineuses, longue période de sécheresse), les études écophysiolo-

LABORATOIRE : Laboratoire de Microbiologie des Sols, centre ORSTOM de Dakar-Hann, Boîte Postale N° 1386, Dakar-Hann (SÉNÉGAL).
Tél. : 21.34.80 et 22.34.76

giques sur un échantillonnage complet des biotopes et les essais d'inoculation des cyanobactéries libres (algalisation) ont mis en évidence :

– des corrélations positives entre la flore fixatrice et le pH, la concentration en C, N, Ca, P, K et la nature du sol (sableux),

– l'existence des populations algales sous trois états définis en fonction des potentialités fixatrices : sélectif, accumulatif ou actif,

– des probabilités de réussite optimale si l'algalisation avec des souches indigènes, en contrôlant les prédateurs, a lieu au début de l'état actif.

Dans le cadre de la lutte contre la désertification, les connaissances écophysiologiques acquises sont reportées aux croûtes de cyanophycées ralentissant l'érosion et apportant l'azote indispensable à la croissance des graminées.

Par ailleurs, une étude fondamentale sur la symbiose entre la fougère aquatique Azolla et la cyanobactérie Anabaena azollae s'est développée.

Par rapport aux autres systèmes fixateurs d'azote utilisés en riziculture, les avantages d'Azolla, en plus de son importante activité fixatrice, sont d'avoir une rapide croissance, d'être cultivé avec le riz sans dépense d'eau supplémentaire, de présenter lorsque les conditions sont défavorables des variations morphologiques spécifiques, de limiter la croissance des adventices, de nécessiter très peu de manipulation, d'avoir une décomposition lente favorisant un effet résiduel.

Les études effectuées sur une souche indigène *Azolla pinnata* variété *africana* ont aussi mis en évidence :

- les caractéristiques principales de la croissance ; de la fixation d'azote et de la reproduction sexuée,
- une hiérarchisation des facteurs favorisant son utilisation,
- un intérêt certain en riziculture traditionnelle.

Les études physiologiques sur la symbiose sont actuellement limitées par l'impossibilité de cultiver la cyanobactérie concernée (*Anabaena azollae*) à l'état libre. Une approche pour résoudre ce problème a été faite en travaillant directement sur le DNA de cette cyanobactérie, et en employant les techniques de génie génétique. La mise en évidence des parentés antigéniques entre les *Anabaena* libres et symbiotiques doit permettre à court terme de déterminer les souches libres proches des souches symbiotiques. Il sera alors possible de reconstituer la symbiose.

STRUCTURES ET COLLABORATIONS

L'équipe comprend 3 chercheurs (P. REYNAUD, C. FRANCHE-BOGUSZ, C. BOIVIN), un technicien et un manoeuvre. Elle travaille dans des conditions permettant de mener à terme l'ensemble de ce programme. Les travaux de génétique sont entrepris avec l'Institut Pasteur. ■



Fixation biologique de l'azote par les cyanophycées libres dans les rizières submergées

LABORATOIRE : mission ORSTOM à l'I.R.R.I. (International Rice Research Institute), P.O. Box n° 933, Manila (PHILIPPINES) Tél. : 88.48.69 et 88.45.14.

RESPONSABLE :
Pierre ROGER

Mots-clés

- **Matériel biologique**
Cyanophycées libres fixatrices d'azote
- **Techniques principales :**
Toutes celles de la fixation biologique d'azote à des fins agronomiques (riziculture)
- **Problématique :**
Techniques de fertilisation biologique

THÈME

Dans le cadre d'une convention existant entre l'ORSTOM et l'I.R.R.I., une équipe développe un programme sur les cyanophycées libres, leur écologie et leur utilisation pratique en riziculture.

En effet, les rizières inondées constituent un environnement favorable à leur développement et la possibilité d'utilisation des cyanophycées comme engrais organique en riziculture a été mentionnée il y a bientôt une cinquantaine d'années. Toutefois, les mécanismes d'action de ces organismes sont encore mal connus et leur utilisation pratique est sévèrement limitée par un manque chronique de connaissances sur leur écologie. C'est l'objet même du programme de recherches mené par l'équipe de P. ROGER et ses collaborateurs.

PERSPECTIVES

Les possibilités d'utilisation et l'intérêt agronomique d'un système fixateur d'azote dépendent d'au moins quatre facteurs :

- la potentialité absolue (quantité d'azote fixé par hectare et par an),

- la facilité d'établissement du système fixateur,
- des intrants nécessaires pour la production d'azote fixé et sa mise-à-disposition pour la plante hôte,
- la superficie totale des surfaces cultivées ou cultivables concernées.

Ainsi, les cyanophycées libres ont une potentialité moyenne, de l'ordre de 20 à 30 kg d'azote fixé par hectare et par cycle cultural, compensée par une possibilité d'utilisation élevée qui s'étend des sols faiblement acides aux sols alcalins.

Certes, les méthodes pratiques d'utilisation de ces micro-organismes ne sont encore qu'imparfaitement définies. Toutefois, trois techniques sont utilisables, séparément ou en association :

- le placement en profondeur de l'engrais azoté,

Les cyanophycées fixatrices d'azote atmosphérique sont des organismes peu compétitifs qui sont supplantés par une flore eucaryote non fixatrice d'azote atmosphérique, lorsque l'engrais azoté est épandu à la surface du sol. En conséquence, le placement en profondeur de l'engrais azoté d'une part permet le développement de la flore algale fixatrice d'azote atmosphérique et donc un apport supplémentaire d'azote et d'autre part, évite le développement d'une flore algale non fixatrice d'azote atmosphérique, qui entrerait en compétition avec le riz pour sa nutrition azotée et qui, en augmentant le pH de l'eau de submersion, entraîne d'abondantes pertes d'azote par volatilisation,

– le contrôle des populations de prédateurs des cyanophycées, principalement des gastéropodes et des microcrustacés, par des pesticides d'origine végétale peu coûteux,

– l'inoculation des rizières avec des souches indigènes ou importées, leur intérêt est évident. Le coût de leur utilisation est réduit, un facteur important pour leur emploi. Ainsi, les deux premières méthodes peuvent être considérées comme une composante, mineure sur le plan financier, d'un système de pratiques culturales intégrées. La troisième méthode implique l'emploi d'un inoculum sec dont la production peu coûteuse peut être assurée directement par le riziculteur.

Il en résulte une perspective claire et cohérente quant au devenir de ce programme de recherches.

STRUCTURES ET COLLABORATIONS

L'étude des cyanophycées libres fixatrices d'azote constitue l'un des trois programmes majeurs du Département de Microbiologie du Sol de l'I.R.R.I., où les activités de recherches sont orientées principalement vers l'étude des systèmes fixateurs d'azote utilisables en riziculture.

L'équipe de recherche comprend actuellement un « visiting scientist » (P. ROGER, ORSTOM) un « associate visiting scientist » (J. GRANT, Cornell University, ITHACA, U.S.A.), un « post doctoral fellow » (P.M. REDDY, Shilong University, Inde), deux assistantes, une technicienne et un manoeuvre.

Après une phase prospective de quatre ans durant laquelle les études ont été conduites principalement dans les laboratoires, les serres et la ferme expérimentale de l'I.R.R.I., les recherches entrent maintenant dans une phase d'études collaboratives.

Une enquête prospective pour l'établissement d'un réseau d'information et d'étude de l'écologie et de l'utilisation des cyanophycées dans les rizières a été effectuée en 1984. Des contacts ont déjà été établis avec des universités et des centres de recherches aux Philippines, en Egypte et en Inde. ■

Amélioration de l'igname par fusion de protoplastes (hybridation somatique)

RESPONSABLE :
Bernard MALAURIE

Mots-clés

– **matériel biologique :**
Igname

– **techniques principales :**
méthodes de cultures *in vitro*
Techniques de fusion de protoplastes

– **problématiques :**
Amélioration des cultivars

THÈME ET PERSPECTIVES

L'igname constitue une source alimentaire majeure assurant 12 % de l'alimentation dans les zones intertropicales. La production de l'Afrique de l'Ouest représente les 3/4 de la production mondiale (de l'ordre de 25 millions de tonnes annuelles).

Il semble difficile sinon impossible d'améliorer les variétés existantes par les méthodes génétiques classiques (hybridation par voie sexuée), du fait de l'absence de fleurs ou de l'existence d'incompatibilités chez certaines espèces cultivées.

Par ailleurs, le coût en main-d'œuvre de l'exploitation des variétés appréciées est très élevé, vu les problèmes posés lorsque l'on envisage la mécanisation des récoltes (tubercules allongés, gros et profondément enfouis). D'autre part, certaines espèces ou cultivars présentent une grande sensibilité vis-à-vis de nombreuses maladies (anthracnose, viroses, bactérioses,...).

Les méthodes de culture *in vitro* et en particulier les techniques de fusion de protoplastes, peuvent permettre de combiner différents caractères susceptibles de résoudre ces problèmes : appé-

LABORATOIRE : Laboratoire de Biotechnologie, centre ORSTOM d'Adiopodoumé, B.P. V-51, Abidjan (CÔTE-D'IVOIRE).

tance, morphologie des tubercules permettant la mécanisation de la récolte, résistance aux maladies, facteurs de conservation, productivité,...

STRUCTURES ET COLLABORATIONS

Ce programme, initié fin 1984, n'est actuellement développé que par un seul chercheur (B. MALAURIE).

Toutefois, il s'inscrit en droite ligne dans les objectifs prioritaires du plan scientifique quinquennal ivoirien, redéfini en 1984. Il constitue l'un des trois seuls pôles innovateurs en matière de biologie à l'ORSTOM en Côte-d'Ivoire. Il s'intègre dans notre participation à l'acquisition des pays en voie de développement à l'auto-suffisance alimentaire.

Ce programme bénéficiera pour se poursuivre dans les meilleures conditions possibles dans un très proche avenir d'une structure particulièrement importante : le laboratoire de Biotechnologie du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé.

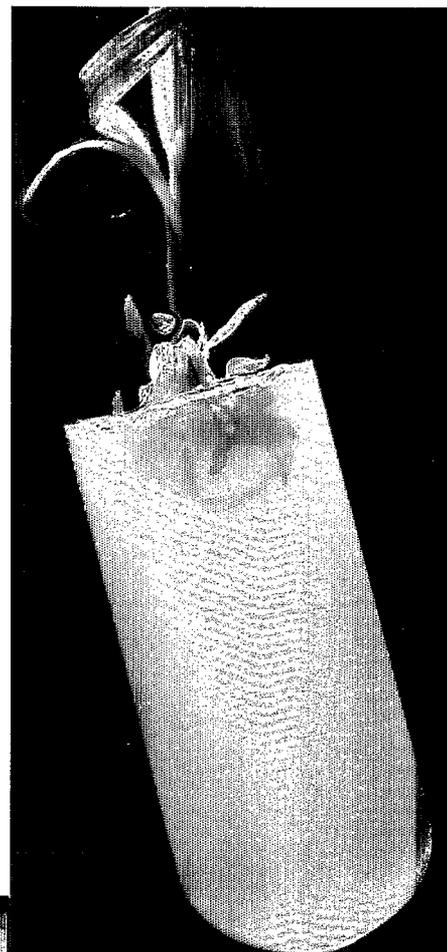
Par ailleurs, ce travail s'effectuera en concertation avec la Faculté des Sciences d'Abidjan et l'IDESSA (Bouaké, Côte-d'Ivoire). Une collaboration effective devrait s'engager fin 1985 - début 1986 avec le C.I.R.A.D. (Département I.R.A.T.), sous la forme d'un détachement d'un chercheur senior, au sein de nos structures. ■

Applications
de la culture in vitro
à l'amélioration
de la production
végétale

RESPONSABLES :
BUFFARD-MOREL Jacqueline
HANOWER Janina
VARECHON Christian.

LABORATOIRE

Laboratoire de physiologie végétale,
Services Scientifiques Centraux de
l'ORSTOM 70-74, route d'Aulnay,
93140 Bondy - Tél. : (1) 847.31.95



Mots-clés

- Matériel biologique :

Palmacées (*Eleais guineensis*, *Cocos nucifera*) *Sesbania* spp.

- Techniques employées :

Multiplication végétative *in vitro* (embryogenèse somatique) culture *in vitro* d'embryons, protoplastes.

- Problématiques :

Reproduction végétative *in vitro* des espèces végétales récalcitrantes. Sélection végétative. Hybridation somatique. Rapport nucléo-cytoplasmiques.

THÈME

Le laboratoire de Physiologie végétale de l'ORSTOM à Bondy (France) conduit depuis les années 70 des recherches sur la multiplication végétative des Palmacées grâce aux techniques de culture *in vitro*. Ces travaux ont été initiés par MARTIN et RABECHAULT sur le palmier à huile (*Eleais guineensis*) et étendus depuis 1980 au Cocotier (*Cocos nucifera*). Plus récemment, la mise au point de la régénération de protoplastes a été abordée en vue de développer des recherches sur la création de variabilité par la fusion somatique.

Dans le cadre de l'UR 507 (Bases biologiques de l'amélioration des plantes tropicales) relevant du département E (Indépendance alimentaire), trois opérations de recherches sont en cours :

- la multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile
- la multiplication végétative *in vitro* du cocotier
- la fusion et la régénération de protoplastes (*Sesbania*).

PERSPECTIVES

a) La multiplication végétative des Palmacées par embryogenèse somatique.

Les travaux sur la culture des tissus végétaux développés depuis une cinquantaine d'années ont abouti à la régénération de plantules et de plantes entières. L'utilisation pratique de ces résultats s'est considérablement développée au cours de ces dernières années. Cette technique permet en particulier d'accroître le taux de multiplication des techniques horticoles classiques (bouturage, greffage) et surtout de reproduire végétativement des espèces végétales que l'on ne pouvait reproduire par cette voie. C'est le cas des palmiers qui ne possèdent qu'un seul bourgeon végétatif terminal.

Le palmier à huile se reproduit normalement par fécondation croisée entre parents hétérozygotes, et il en résulte une descendance à contenu génétique hétérogène et des rendements individuels variables. La multi-

plication végétative *in vitro* des individus les plus performants dans un schéma nouveau de sélection végétative devrait accroître la production d'huile à l'hectare.

La technique de culture *in vitro* s'applique à des tissus de folioles provenant de la région basale des feuilles juvéniles dont le prélèvement n'entraîne pas la mort du pied-mère. La formation d'embryoïdes sur cal permet de régénérer des plantules. Cette technique de multiplication végétative du palmier à huile a été brevetée par l'A.N.V.A.R. La conformité des vitroplants issus de palmiers sélectionnés est testée en Côte d'Ivoire : les premières floraisons et fructifications s'avèrent normales.

Des travaux analogues sont en cours chez le cocotier et sur le point d'aboutir à la régénération d'embryons somatiques sur cal et de plantule. Par contre, la culture *in vitro* d'embryons zygotiques immatures de cette espèce est parfaitement maîtrisée.

b) La régénération de protoplastes

Une voie d'avenir à explorer dans le domaine de la variabilité s'est ouverte avec le transfert du matériel héréditaire appartenant à des espèces ou à des genres isolés par la reproduction sexuée grâce à l'hybridation somatique. La fusion de protoplastes permet aussi d'associer des cytoplasmes différents et d'engendrer toutes sortes d'associations cytoplasme - noyau sous la forme de cybrides. Cette technique ouvre la porte à l'investigation de rapports nucléocytoplasmiques variés.

Dans le cas de *Sesbania rostrata*, plante ligneuse portant des nodules caulinaires en relation avec la fixation symbiotique de l'azote, le but recherché est le transfert de cette aptitude à la nodulation caulinaire à d'autres espèces du genre *Sesbania* et à d'autres légumineuses.

STRUCTURE DU LABORATOIRE

Le laboratoire de Physiologie de Bondy se consacre entièrement aux techniques de culture *in vitro* : culture de tissus, d'embryons isolés et de protoplastes. Actuellement le laboratoire compte 4 chercheurs ORSTOM, 2 chercheurs IRHO et 6 techniciens. Il accueille annuellement 2 ou 3 stagiaires.

Les infrastructures se rapportant à la culture *in vitro* sont constituées de :

- 1 salle de préparation des milieux et une laverie
- 2 salles d'ensemencement comportant 7 postes stériles
- 4 salles de culture climatisées, avec ou sans éclairage (60 m²)

- 1 salle et le matériel de cytologie
- 1 serre tropicalisée humide (100 m²).

Le transfert de ce laboratoire vers le centre ORSTOM de Montpellier est prévu pour 1987. Ce serait l'amorce d'un nouveau laboratoire ORSTOM de culture *in vitro*. Il assurera bien entendu la continuité des actions de recherche en cours sur la multiplication végétative des Palmacées, dans le sens d'un approfondissement des résultats acquis. Ce sera aussi l'occasion de développer un thème de recherche commun aux généticiens et aux physiologistes centré sur la variabilité naturelle ou en culture *in vitro* et la conservation des ressources génétiques. L'unicité de ce thème fédérateur et interdisciplinaire entraînera progressivement le remplacement des actions de recherches en cours par de nouvelles opérations.

Soulignons aussi que d'autres équipes de recherches ORSTOM sont aussi intéressées par le laboratoire de culture *in vitro* de Montpellier (sélection de vitroplants résistants aux maladies, culture de suspensions cellulaires par la production de substances naturelles, etc...).

L'installation d'une équipe pionnière à Montpellier sera possible en 1987 à condition de disposer d'un laboratoire de culture *in vitro* équipé et d'une serre tropicalisée.

COLLABORATIONS

Les recherches conduites sur la multiplication végétative des Palmacées ont été réalisées en collaboration étroite avec l'IRHO, dans le cadre d'une convention signée en 1980. Le procédé de multiplication *in vitro* mis au point à Bondy est valorisé dans des unités pilotes de production de vitroplants de palmier à huile en Côte d'Ivoire (1980), en Indonésie (SOFINDO 1983) et en Malaisie (FELDA 1983) avec l'appui technique de l'IRHO et de l'ORSTOM. D'autres projets sont à l'étude. Les responsables de ces unités sont formés par l'ORSTOM (Bondy) et l'IRHO (La Mé).

Ce laboratoire entretient des relations avec de nombreux laboratoires universitaires français (Orsay, Strasbourg), l'INRA (Versailles) et des laboratoires étrangers, en particulier du fait de l'accueil de stagiaires.

L'opération de recherche sur les protoplastes de Bondy est associée à des opérations ORSTOM conduites dans les PVD :

- la fusion de protoplastes d'igname (Adiopodoumé, Côte d'Ivoire)
- la fixation symbiotique de l'azote (Dakar, Sénégal).

Mécanismes physiologiques et biochimiques de la production végétale

Isolement et purification de l'activité adénosine-triphosphatase tonoplastique.
Son rôle dans la cellule végétale.
Analyse comparative avec les autres pompes-à-protons membranaires réversibles ou non.
Aspects biotechnologiques de la synthèse d'ATP.

RESPONSABLE :
Bernard MARIN

LABORATOIRES :
- Groupe ATP du Laboratoire des biosystèmes simplifiés, Association

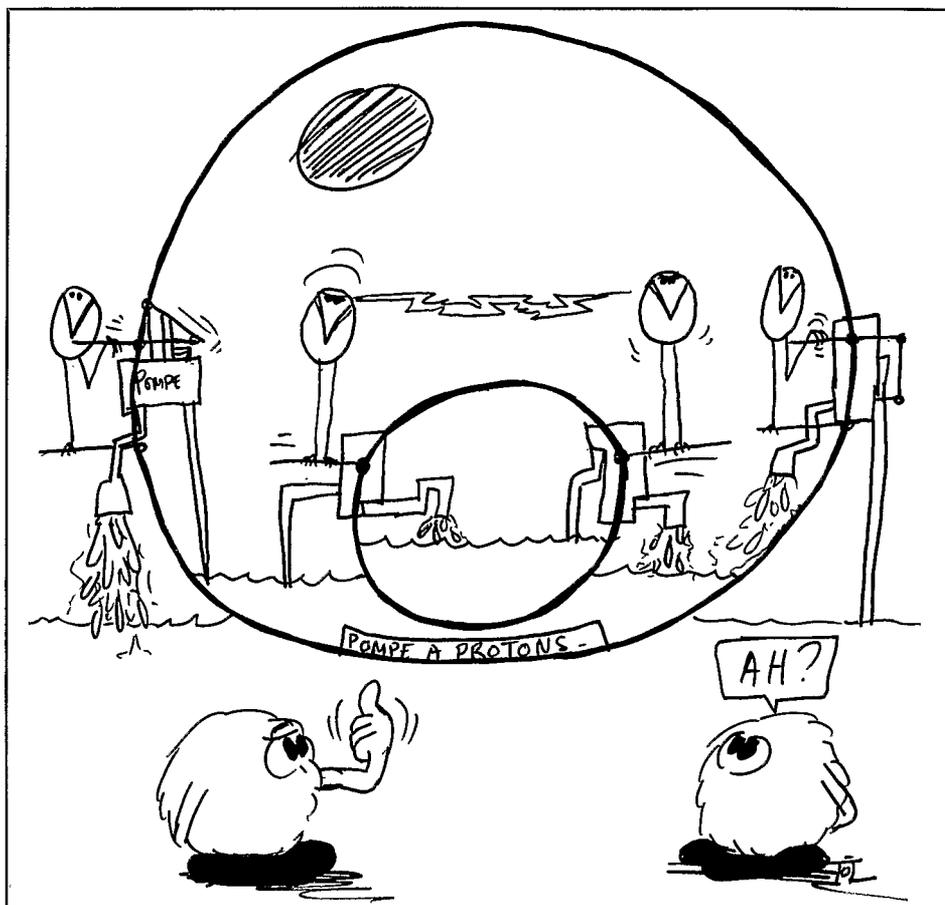
- Laboratoire de physiologie végétale appliquée, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Place Eugène Bataillon, 34060 - MONTPELLIER-CEDEX (France)
Tél. : (67) 63.91.44,

- Laboratoire de physiologie végétale, centre ORSTOM d'Adiopodoumé, B.P. V-51, ABIDJAN (Côte-d'Ivoire).

pour la Recherche en Bioénergie Solaire (A.R.B.S.), Centre d'Études Nucléaires de Cadarache, Bâtiment N° 161, Boite Postale N° 1, 13.115 - Saint-Paul-Lez-Durance (FRANCE)
Tél. : (42) 25.46.39,

Mots-clés

- **Matériel biologique :**
latex d'*Hevea brasiliensis*; ATPases membranaires de différentes origines (bactérienne, chloroplastique, mitochondriale, granules chromaffiniques, microsomes de différents tissus végétaux de plantes supérieures, tonoplastique).



- **Techniques employées :**
celles de la solubilisation et de la purification d'enzymes membranaires ayant une fonction vectorielle (chromatographie variée sur supports nouveaux ; reconstitution ; liposomes ; ...)

- **Problématiques :**
phylogénie de l'ATPase tonoplastique ; son rôle dans la compartimentation cellulaire végétale ; conception de bioréacteurs variés.

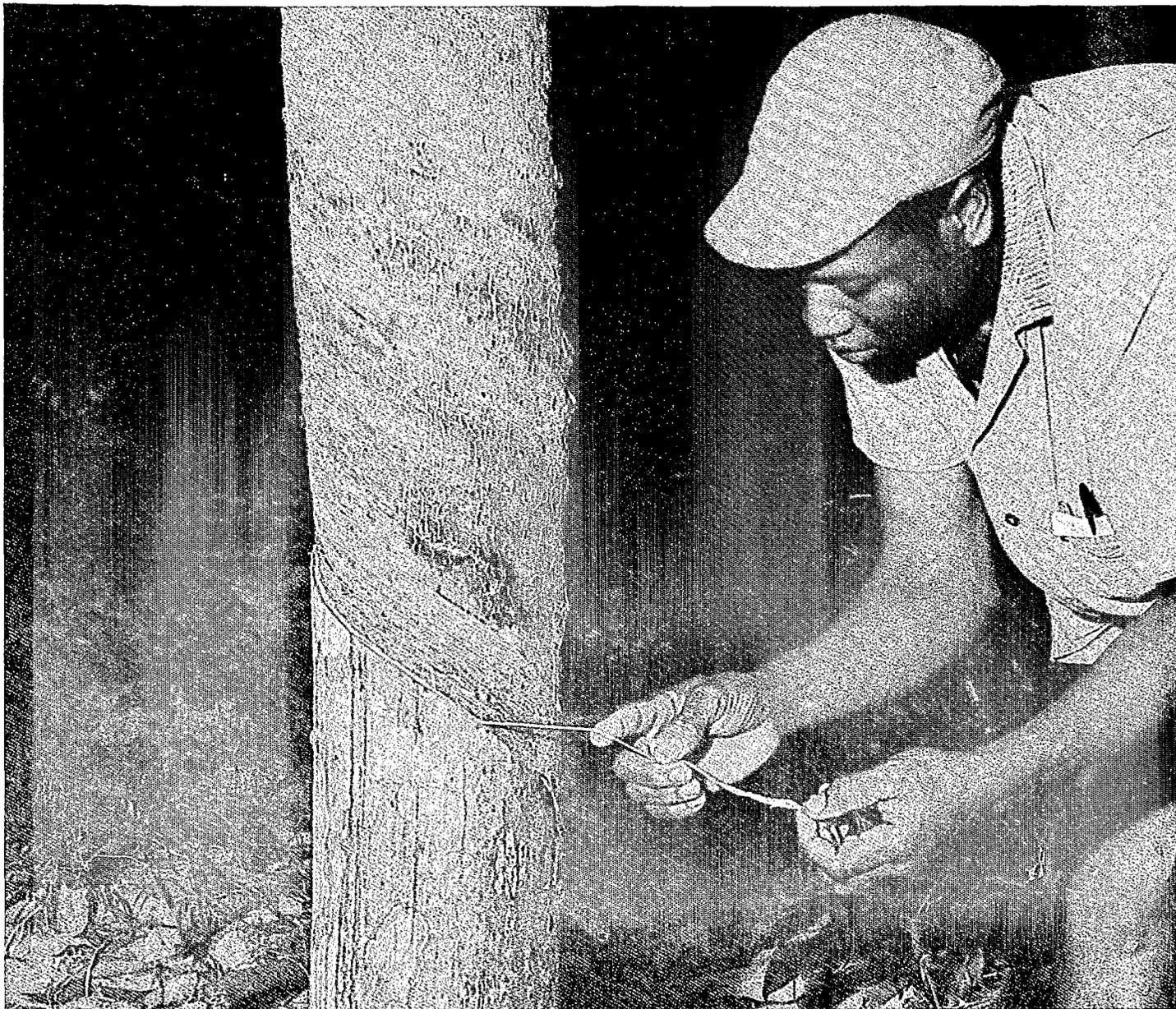
THÈME ET PERSPECTIVES

Il existe un grand nombre de molécules biologiquement actives dans le compartiment de la cellule végétale. Dans un programme à long terme, il est proposé d'étudier les mécanismes de leur accumulation et de leur séquestration dans ce compartiment cellulaire ainsi que les facteurs les contrôlant autant au niveau biochimique (aspect retenu jusqu'à présent) qu'au niveau génétique (en cours d'élaboration).

L'un des ces facteurs est l'énergisation de tonoplaste par l'activité adénosine-triphosphatase (ATPase) qui catalyse un flux électrogénique de protons et, par conséquent, accroît la force motrice protonique, source d'énergie de tous les transports actifs de solutés, caractérisés jusqu'à présent, entre les compartiments cytoplasmique et racolaire (cf. B. MARIN, 1985).

Cette ATPase tonoplastique correspond à un nouveau type de pompes-à-protons, intermédiaire entre les types réversibles ou non, mis en évidence actuellement (cf. P.C. MALONEY et T.H. WILSON, 1985 ; B. MARIN et al., 1985). L'étude approfondie de ses propriétés nous amènera à la comparer aux activités ATPases membranaires. Elle permettra entre autre d'en dégager son degré de parenté avec les deux autres classes d'ATPases membranaires : d'une part, l'ATPase réversible du type $F_1 F_0$ (mitochondries, chloroplastes, membranes bactériennes, ...) et d'autre part, l'ATPase non réversible du type $E_1 E_2$ (membranes plasmiques, membranes gastriques, membranes de reticulum sarcoplasmique, certains systèmes procaryotiques impliqués dans le transport d'ions comme Na^+ , K^+ , ou Ca^{2+} , ...). Elle se rapprocherait des systèmes membranaires hydrolysant l'ATP caractérisés au niveau d'autres vacuoles de végétaux (levures, *Neurospora*, ...), de granules chromaffiniques, de granules synaptiques, ... (cf. B. MARIN et al., 1985).

La caractérisation de son activité électrogène implique la formation de liposomes fonctionnels, où un gradient électrochimique de protons peut être créé artificiellement. Selon la nature de l'enzyme concernée (réversible ou non), il est possible de concevoir un bioréacteur synthétisant l'ATP.



STRUCTURES

Il s'agit de la continuation d'un travail initialement effectué par J. D'AUZAC (1975 et 1977). En effet, dès 1975, il avait caractérisé une activité ATPase liée au tonoplaste du latex d'Hevea brasiliensis. Deux années plus tard, il en décrivait les principales propriétés. Son activité pompe-à-protons électrogénique était caractérisée par la suite (B. MARIN *et al.*, 1982 ; H. CRETIN, 1983).

Par conséquent, ce programme est réalisé essentiellement par deux laboratoires :

- le Laboratoire de Physiologie Végétale du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé (ABIDJAN, Côte-d'Ivoire), avec l'équipe de M. CRESTIN,
- le Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc (MONTPELLIER, France), avec l'équipe du Professeur J. D'AUZAC,

Dans le meilleur des cas, dans la mesure où un consensus est trouvé, B. MARIN envisage de le continuer dans le Laboratoire des Biosystèmes Simplifiés de l'A.R.B.S.

Chacune de ces structures est susceptible d'accueillir des chercheurs en position post-doctorale ou non, selon des modalités à définir cas par cas.

COLLABORATIONS :

Les lutoïdes du latex d'Hevea brasiliensis correspondent à un compartiment vacuolaire qui a l'avantage d'être isolé facilement et sans contaminations majeures, dans un état natif (cf. J. D'AUZAC *et al.*, 1982). Cette propriété permet de caractériser sans ambiguïté une activité ATPase tonoplastique pompe-à-protons électrogène. Cette activité a été solubilisée et purifiée (B. MARIN et E. KOMOR, 1985 ; B. MARIN, J. PREISSER et E.

KOMOR, 1985). La plupart des équipes travaillant dans ce domaine considèrent ces résultats comme un élément de référence permettant de faire progresser utilement et rapidement leur propre recherche.

D'où des collaborations importantes avec de nombreux laboratoires autant français qu'étrangers (E.N.S.A.M. ; Institut für Botanik, T.H.D., Darmstadt, R.F.A. ; Botanisches Institut, Universität Bayreuth, Bayreuth, R.F.A. ; McGill University, Department of Biology, Montreal, Canada, Faculty of Science, University of California, Division of Natural Sciences, Thimann Laboratories, Santa-Cruz, U.S.A. ; Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, U.S.S.R. Academy of Sciences, Puschino, Moscou, U.R.S.S. ; Laboratoire de Physiologie Végétale, Université de Paris VII, Paris...)

Production de métabolites secondaires d'intérêt thérapeutique par voie de culture in vitro de plantes médicinales

RESPONSABLE :
Hervé CHRESTIN

Mots-clés

- matériel biologique :

Espèces végétales tropicales d'intérêt thérapeutique

- techniques principales :

Sélection et clonage rapide. Synthèse de molécules diverses. Optimisation de bioréacteurs en condition hétérotrophe, mixotrophe ou photoautotrophe.

- problématiques :

Production de métabolites secondaires à haute valeur ajoutée par la technique de cultures végétales.

THÈME ET OBJECTIFS

Les pays en voie de développement se heurtent quotidiennement aux problèmes posés par les grandes endémies et le manque chronique de soins de santé primaire apportés aux populations locales. Ainsi, aussi paradoxalement que cela puisse paraître, les plantes médicinales de ces pays constituent encore de nos jours la principale source de la pharmacopée africaine. Dans de nombreux cas, le principe actif contenu dans ces plantes est connu. Leur valorisation s'inscrit en droite ligne dans les objectifs prioritaires du plan scientifique quinquennal ivoirien redéfini en 1984. En conséquence leur valorisation selon des méthodes modernes doit être une préoccupation à prendre en compte par l'ORSTOM dans le cadre des nouvelles orientations prises. Elle s'impose d'autant que les applications industrielles de production par des cellules végétales en culture in vitro d'une grande

LABORATOIRE : Laboratoire de biotechnologie, centre ORSTOM d'Adiopodoumé, B.P. V-51, Abidjan - COTE D'IVOIRE

variété de substances utiles à l'homme semble devenir une réalité. Ce type de valorisation permet de résoudre en partie les difficultés liées à leur approvisionnement souvent saisonnier et aléatoire mais aussi à la grande hétérogénéité des teneurs en principes actifs souvent observée dans le matériel récolté.

Il est évident que ce type de valorisation implique la mise au point d'un procédé biotechnologique moins coûteux que les procédures longues et onéreuses d'extraction à partir de la plante entière, des méthodes souvent fastidieuses et caractérisées par un faible rendement, les classiques méthodes de la synthèse chimique étant pratiquement non exploitables dans ces cas.

D'où à court terme, le franchissement des étapes suivantes à envisager :

- le screening des espèces végétales offrant des possibilités intéressantes pour étudier les trois voies essentielles productrices de substances naturelles reconnues importantes (voie mévalonique, voie phénylpropanoïde, synthèse des alcaloïdes),

- la sélection et le clonage rapide des espèces, des variétés (plantes entières) et des souches (cellulaires), les plus performantes pour la production des substances recherchées (ciblées),

- la culture, en bioréacteurs, de suspensions cellulaires sélectionnées, assurant, en conditions hétérotrophes, mixotrophes ou photo-autotrophes, la production optimisée génétiquement et physiologiquement en continu, de substances naturelles d'intérêt thérapeutique à haute valeur ajoutée.

STRUCTURES ET CONTEXTE

Les objectifs ainsi définis sont développés sur la base d'un projet cherchant à associer le laboratoire de biotechnologie du centre ORSTOM d'Adiopodoumé avec d'autres structures métropolitaines ou non ayant des préoccupations voisines (groupe des cellules végétales et groupe ATP de l'Association pour la Recherche en Bioénergie solaire, C.E.N. de Cadarache, SAINT-PAUL-LEZ-DURANCE, France, par exemple).

L'équipe ORSTOM du centre d'Adiopodoumé travaillant sur ce programme se compose de 5 chercheurs (H. CHRESTIN, C. NEFF, J.J. BONO, Th. HARDY et I. CLARIS), d'un technicien supérieur (M. NIAMIEN N'GORAN) et d'une importante équipe d'assistants et de préparateurs. Un phytopharmacien et/ou un pharmacochimiste ivoiriens devraient être recrutés avant la fin de l'année 1985 pour renforcer l'équipe actuellement en place. Elle bénéficiera d'un laboratoire actuellement en cours d'installation et qui est fonctionnel depuis fin 84.

COLLABORATIONS

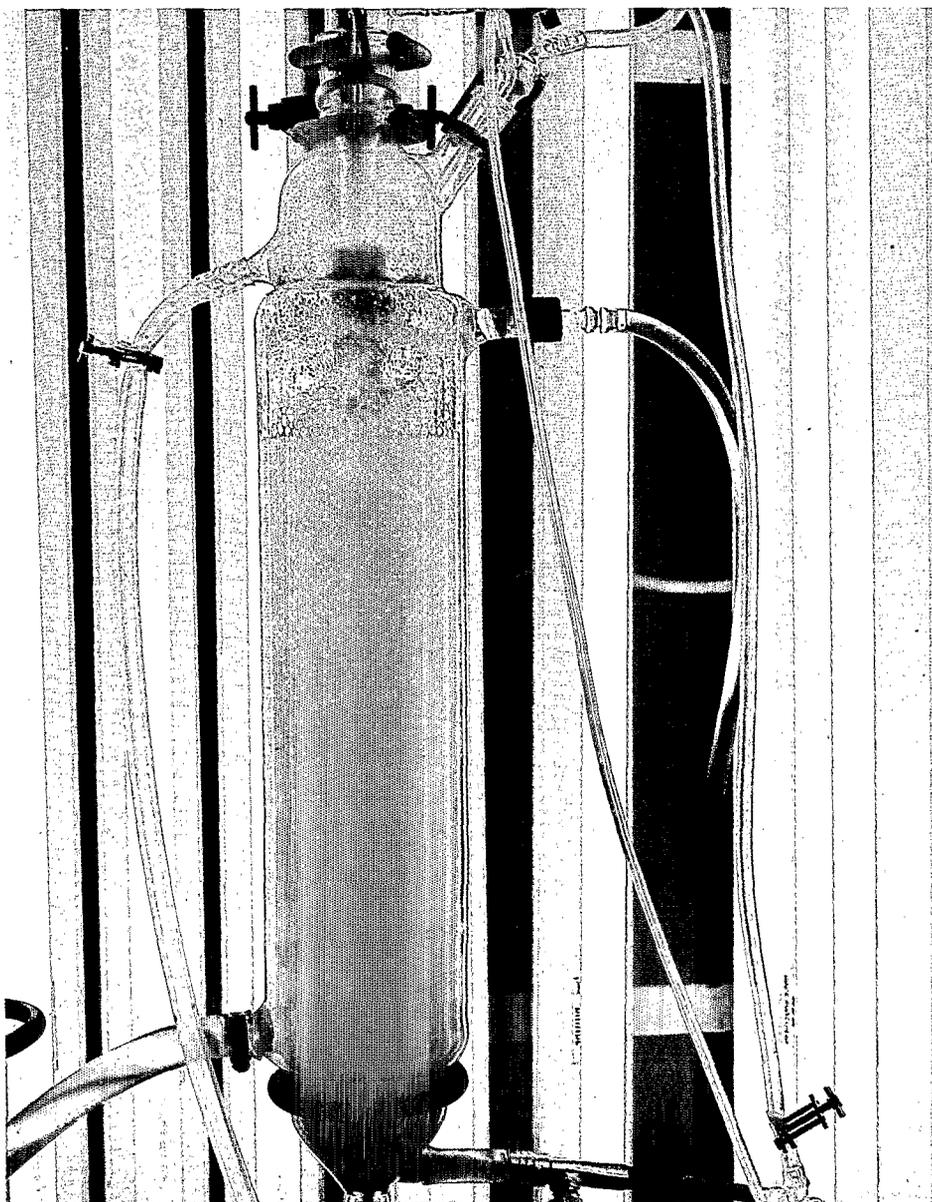
Elles sont multiples avec les laboratoires dont la problématique est la même. Elles impliquent l'agrément préalable des autorités de tutelle (Conseil ORSTOM du département F, Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche Scientifique de Côte-d'Ivoire).

Dès maintenant, on peut noter les relations privilégiées existant avec le groupe des cellules végétales de l'A.R.B.S., et M. F. TROUSLOT, en particulier. ■

Étude des virus d'insectes pathogènes pour les ravageurs des palmeraies

RESPONSABLE :
Gilles FEDIERE

LABORATOIRE :
Laboratoire d'entomovirologie - centre
ORSTOM D'Adiopodoumé - B.P.
V 51 Abidjan - COTE D'IVOIRE



Mots-clés

- **Matériel biologique :** Palmier à huile, Cocotier - Limacodidae - Hispinae - Densovirus - Picornavirus

- **Techniques principales :** Techniques virologiques de purification et identification de virus - Tests de pathogénéité - Essais sur le terrain.

THÈME :

Les palmeraies et cocoteraies sont des Biotopes relativement stables qui abritent des populations de divers ravageurs. Ces populations sont sujettes à d'importantes fluctuations. Un des principaux facteurs de contrôle naturel de ces populations en milieu tropical humide semble être les virus entomopathogènes.

Les études portent surtout sur les virus de Limacodidae, Lépidoptères représentés sur Palmacae dans toute la zone intertropicale. Deux grands groupes de virus libres ont retenu l'attention en raison de leur présence permanente dans les populations de Limacodidae et de leur efficacité. Il s'agit des densovirus et des picornavirus.

PERSPECTIVES :

Les densovirus et picornavirus d'insectes semblent capables en palmeraie après une épizootie d'assurer le contrôle des populations pendant plusieurs mois.

Lors d'essais de terrain le contrôle de populations de ravageurs a été obtenu par traitement à des doses extrêmement faibles (environ 30 - équivalent chenille à l'hectare).

Sous réserve de tests de pathogénéité sur vertébrés, ces virus présentent donc de très intéressantes potentialités d'utilisations.

Si leur spécificité est en général très étroite, il semble exister des souches à spectre relativement large permettant d'envisager une utilisation industrielle.

D'un point de vue plus fondamental l'étude de ces virus présente un très grand intérêt dans différents domaines et notamment en biologie moléculaire et en épidémiologie.

STRUCTURE ET COLLABORATIONS :

Ces études sont menées en très étroites collaborations avec la Station INRA-CNRS de Pathologie comparée de Saint-Christol-les-Ales, l'IRHO (Institut de Recherche sur les Huiles et Oléagineux) et la Station INRA de lutte biologique de la Minière. ■

Étude des virus d'insectes : mise au point d'une production industrielle de virus entomopathogènes

RESPONSABLE :
P. MONSARRAT

LABORATOIRE :

Station INRA de Lutte biologique et de Biocoenotique de la Minière - 78000 Versailles - Tél. : (3) 048.81.13 -(3) 723.38.29

Elle peut être conçue dans le cadre de programmes de lutte intégrée.

La production industrielle de virus peut être envisagée dans le pays utilisateur avec des investissements relativement peu élevés.

Les études portent sur la mécanisation de la production de virus sur l'hôte.

La souche de virus multipliée présente l'avantage d'avoir un spectre d'activité relativement large pour un baculovirus. Elle est active sur une dizaine d'espèces de ravageurs des cultures.

Une unité pilote de productions est en cours de montage.

STRUCTURES ET COLLABORATIONS

Cette action est menée en collaboration très étroite avec les stations INRA de la Minière et du Magneraud ainsi qu'avec l'IRCT (Institut de Recherche sur le Coton et les fibres Textiles).

L'équipe ainsi constituée travaille en collaboration très étroite avec la Société Calliope. ■

Mots-clés

- **Matériel biologique :** Baculovirus - Polyedrose Nucléaire - Noctuelles - *Mamestra brassicae*.

- **Techniques principales :** Élevage - Milieux semi-artificiels - Extractions - Purifications.

- **Problématique :** Production industrielle - Biopesticide.

THÈME

Les Baculovirus de Polyedrose nucléaire sont des virus qui n'ont été jusqu'à ce jour rencontrés que chez des invertébrés.

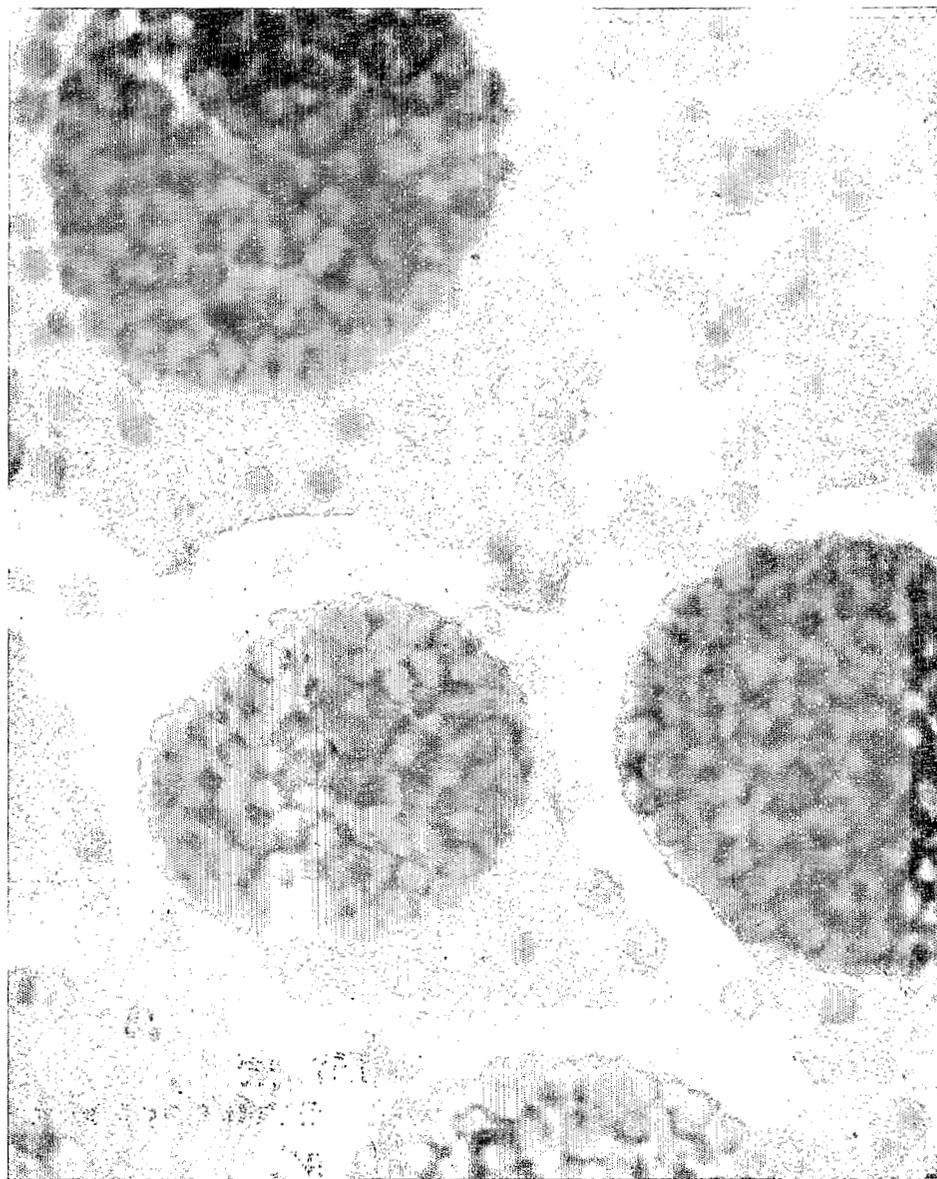
Ils sont responsables d'épizooties dans les populations de ravageurs de cultures. Les essais de pathogénité vis-à-vis des vertébrés, réalisés avec des virus de ce groupe, ont été totalement négatifs.

Leur utilisation comme pesticides biologiques présente certains avantages :

- Inocuité vis-à-vis des vertébrés.
- Grande spécificité - Ils ont donc un impact minimal sur la biocoenose et grâce à la sélectivité de leur action, leur utilisation permet la mise en œuvre d'autres techniques de lutte biologique (lutte par entomophages).
- Absence de Pollution.
- Utilisation possible en association avec des pesticides classiques.

PERSPECTIVES :

L'utilisation de Baculovirus pour la lutte contre les ravageurs des cultures peut parfaitement être envisagée pour un certain nombre de productions tropicales, comme le coton ou les cultures maraîchères.



Cellules atteintes de Polyédrose nucléaire