

ETUDE CYTOGENETIQUE d'*Hedysarum Pallidum* Desf., ESPECE ENDEMIQUE NORD-AFRICAIN, TOLERANTE A L'ANTIMOINE

Reçu le 11/12/2002 – Accepté le 11/06/2003

Résumé

L'étude cytogénétique de l'espèce *Hedysarum pallidum* Desf., endémique d'Afrique du Nord, est réalisée sur des populations tolérantes à l'antimoine. Les résultats obtenus apportent des éléments nouveaux sur la garniture chromosomique et le comportement méiotique de cette espèce. Le caryotype de l'espèce *Hedysarum pallidum* est établi pour la première fois. Il est constitué de six paires métacentriques et deux paires submetacentriques dont l'une est satellifère; il se révèle de type symétrique. La population témoin présente un nombre chromosomique constant alors qu'une variabilité intra et inter individuelle du nombre de chromosomes est observée chez les populations tolérantes. Cette variabilité est due à la présence des chromosomes B de nature hétérochromatique. Notons que l'étude du comportement méiotique des populations tolérantes a révélé l'existence de quelques anomalies. L'analyse du pollen a révélé que celui-ci est viable à 90% pour toutes ces populations.

Mots clés: *Hedysarum pallidum* Desf., antimoine, caryotype, chromosomes B, méiose.

Abstract

The cytogenic study of the *Hedysarum pallidum* Desf. species, endemic in North Africa, has been carried out tolerant populations to antimony. The obtained results have brought new elements about the chromosomes trimmings and the meiotic behavior of this species. The Karyotype of the *Hedysarum pallidum* species has for the first time been established. It is composed of six (6) metacentric pairs and two (2) submetacentric pairs. Among them, one is satellifere, revealed as symmetrical types. The control presents a constant number of chromosome while a variability intra and inter individual of the chromosomes number has been observed in tolerant populations. This variability is due to the presence of B chromosomes of heterochromatic nature. The study of the meiotic behavior of tolerant populations has revealed the existence of some anomalies. A pollen analysis has revealed that this latter is 90 % viable for its populations.

Keywords: *Hedysarum pallidum* Desf., antimonal, karyotype, B chromosomes, meiosis.

H. BENHIZIA¹
O. RACHED-MOSBAH²
Y. BENHIZIA³
A. KOUACHI¹
N. KHALFALLAH¹

¹ Laboratoire de Génétique,
Biochimie et Biotechnologies
Végétales

Faculté des Sciences
Université Mentouri
Constantine, Algérie

² Laboratoire d'Ecologie
Faculté des Sciences
Université Mentouri
Constantine, Algérie

³ Laboratoire des Biotechnologies
Faculté des Sciences
Université Mentouri
Constantine, Algérie

ملخص

دراسة الوراثة الخلوية للنوع *Hedysarum pallidum* Desf. المستوطن بشمال إفريقيا أنجزت على عشار تتحمل الأنتيمون. النتائج المتحصل عليها تبرز عناصر جديدة حول التركيبة الكروموسومية، وسلوك الإنقسام الإختزالي لهذا النوع. نمط النواة للنوع *H. pallidum* أنجز لأول مرة. ويتكون من ستة أزواج *metacentric* و *submetacentric* بينهما زوج واحد *satellifere*، وأمكن تحديد نوعه المتمثل. تظهر العشيرة الشاهد عددا كروموسوميا ثابتا، في حين تغير داخل نفس الفرد وما بين الأفراد لعدد الكروموسومات لوحظ لدى العشار المتحملة للأنتيمون. هذا التغير راجع لوجود الكروموسومات B ذات الطبيعة الكروماتينية غير المتجانسة. إن دراسة سلوك الكروموسومات أثناء الانقسام الإختزالي للعشار المتحملة للأنتيمون، أظهرت بعض الشذوات. أظهر تحليل اللقاح أنه قابل للحياة بنسبة 90% لكل العشار.

الكلمات المفتاحية: *Hedysarum pallidum* Desf. الأنتيمون، نمط النواة، الكروموسومات B الإنقسام الإختزالي.

L'espèce *Hedysarum pallidum* Desf., légumineuse à vocation Lfourragère, pousse spontanément en Algérie, au Maroc et en Tunisie (Endémique Nord- africaine). En Algérie, cette espèce présente une large répartition (Est, Ouest, Centre) et se rencontre dans des milieux assez divers [1] (Fig. 1). Son régime de reproduction est préférentiellement allogame [2, 3]. Foury [4] la considère comme supportant le mieux les sols salés.

L'étude réalisée par Rached-Mosbah [5, 3], a montré que cette espèce tolère la présence de l'antimoine à des taux très élevés. Elle est la seule à pouvoir se maintenir sur des déblais de mine contenant jusqu'à 22500 p.p.m. et peut accumuler dans ses organes aériens jusqu'à 165 p.p.m. d'antimoine (Fig. 2).



Figure 1: *Hedysarum pallidum* Desf. dans la région de Tandra (population non contaminée).



Figure 2: *Hedysarum pallidum* Desf. dans la région du Djebel Hamimat (populations contaminées).

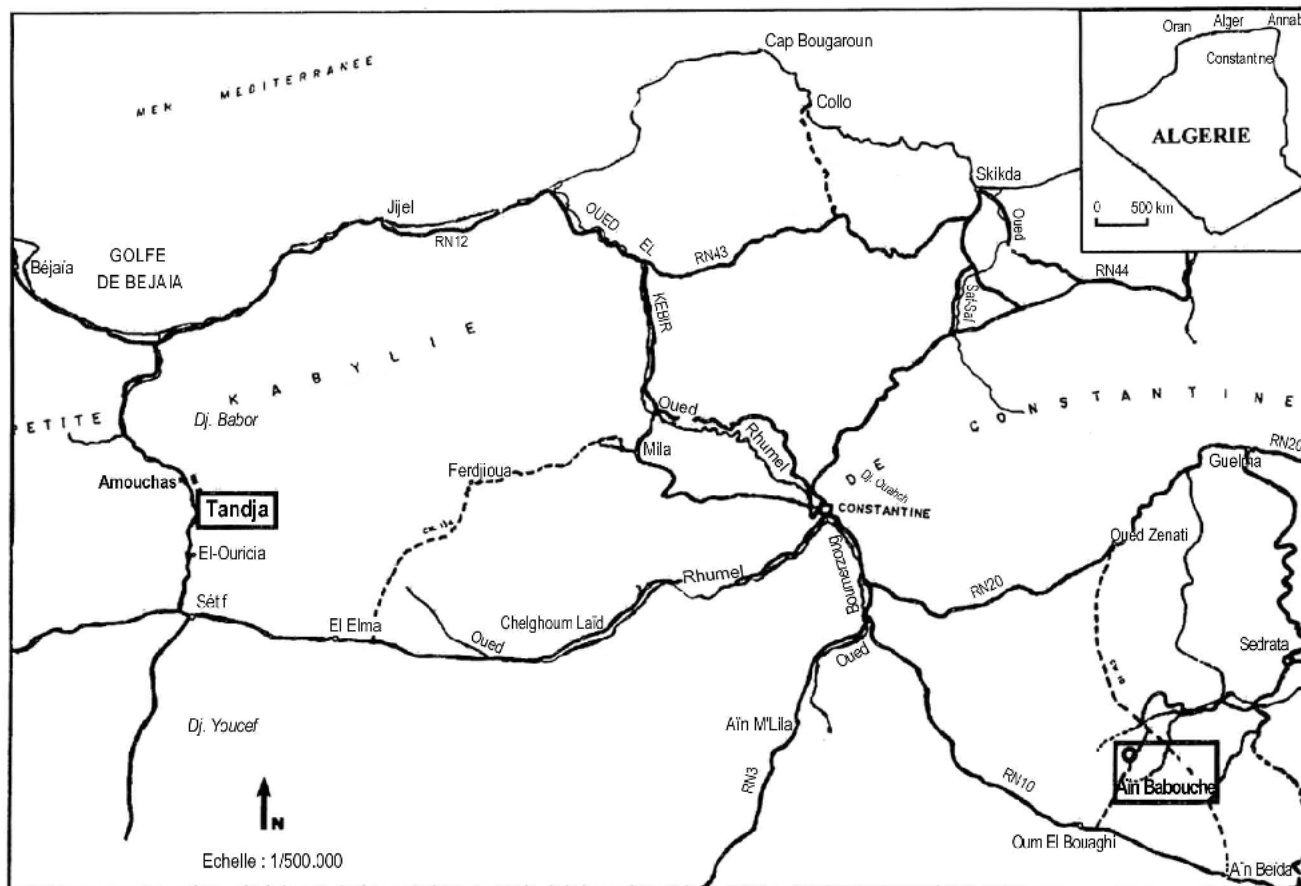


Figure 3: Localisation géographique des zones de prélèvement (o Djebel Hamimat).

L'objet de ce travail est de mettre en évidence des marqueurs cytogénétiques de la tolérance et de l'adaptation de *H. pallidum* à la présence de cet élément toxique dans le sol. Ces marqueurs sont recherchés à travers l'étude du caryotype et du déroulement de la méiose de quelques populations de cette espèce.

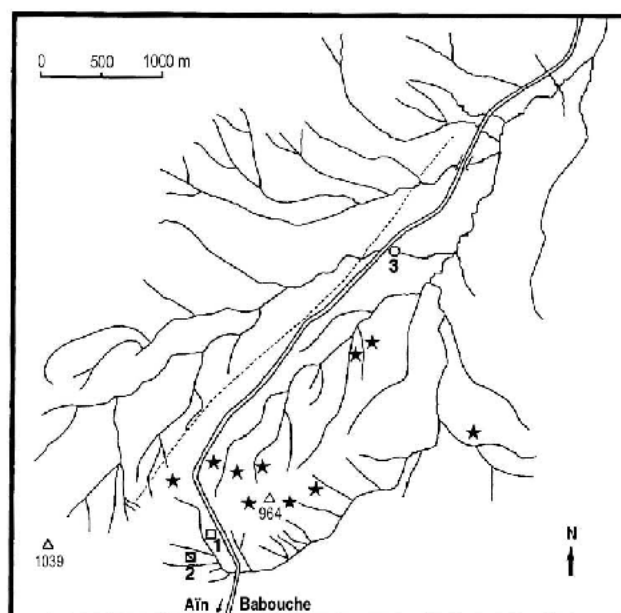
MATERIEL ET METHODES

Matériel

Le matériel végétal (graines et boutons floraux) utilisé provient des inflorescences de quatre (4) populations spontanées d'origine algérienne (Est du pays). Trois populations tolérantes sont récoltées dans la région de Aïn Babouche (Djebel Hamimat) contaminée par l'antimoine, et une population témoin dans la région de Sétif (Tandja) non contaminée. La présence d'une ancienne mine d'antimoine dans le Djebel Hamimat, exploitée jusqu'en 1952, est à l'origine de la contamination de la région de Aïn Babouche [6]. L'origine géographique, l'étage bioclimatique et les concentrations en antimoine dans le sol, sont présentés dans les figures 3 et 4 et le tableau 1.

Méthodes

La mitose est observée dans des apex racinaires, issus de graines mises à germer, prétraités à l'eau glaciale à 0°C pendant 24 à 27 heures, fixés dans l'éthanol acétique 3 : 1 V/V, puis conservés au réfrigérateur pendant 24h.



LEGENDES:

Teneurs en antimoine total (ppm):

- 22650
- ▣ 19850
- 27

- ★ Occurrences d'antimoine
- △ Sommet de djebel
- Limite de zone anticlinale
- ~ Réseau hydrographique
- == Route

Figure 4: Carte des teneurs en antimoine total des populations contaminées dans la région du Djebel Hamimat [7,6,3].

Numéros des populations	Antimoine total dans le sol (en p.p.m.)	Origine	Etage bioclimatique
1	22650	Djebel Hamimat	Semi-aride frais
2	19850	Djebel Hamimat	Semi-aride frais
3	27	Djebel Hamimat	Semi-aride frais
4	Traces	Tandja	Sub-humide frais

Tableau 1: Teneurs en antimoine total chez les populations étudiées, d'après les données de Rached-Mosbah [3].

L'hydrolyse est réalisée à l'acide chlorhydrique (HCl 1N) à 60°C pendant 12 à 15 minutes.

Nous avons utilisé deux méthodes de coloration :

- la méthode de Feulgen pour l'étude morphologique des chromosomes : les pointes racinaires sont colorées au réactif de Schiff durant 2 à 3 heures à l'obscurité et écrasées dans du carmin acétique à 1% ;

- la méthode de coloration différentielle au Giemsa (C-banding) pour l'étude structurale des chromosomes : nous avons appliqué la technique développée par Falistocco et Maurelli [8] sur l'espèce *H. coronarium*, à laquelle nous avons apporté des modifications.

La dénaturation est effectuée dans une solution d'hydroxyde de baryum Ba(OH)₂ pendant 5 minutes à 45°C. La renaturation est réalisée dans le tampon 2 x SSC à 60°C au bain-marie pendant 30 minutes.

Pour obtenir des préparations permanentes, les lamelles sont décollées à la neige carbonique et montées à l'Euparal.

L'établissement du caryogramme et de l'idiogramme est basé sur la méthode de Levan *et al.* [9]. L'asymétrie du caryotype, liée à la morphologie des chromosomes, est évaluée par l'indice d'asymétrie IAs% selon la formule d'Arano et Saito [10]:

$$IAs \% = (\Sigma BI / \Sigma LT) \times 100.$$

L'asymétrie liée à la taille des chromosomes (R) est évaluée par le rapport entre la plus grande et la plus petite

des paires chromosomiques. Les mesures (en mm) des longueurs des bras longs et des bras courts des chromosomes sont faites sur des photographies agrandies 3000 X, par la suite, la longueur réelle des chromosomes est calculée en µm. Ces mesures ont porté sur 6 plaques métaphasiques, appartenant à plusieurs individus de la même population. Les chromosomes sont classés dans le caryogramme par ordre décroissant.

La méiose est étudiée dans les cellules mères des grains de pollen (CMP). Les jeunes boutons floraux sont fixés dans l'éthanol acétique (3 : 1V/V) pendant 48 heures au réfrigérateur. Après lavage, une hydrolyse acide est réalisée pendant 1 à 3 minutes dans une solution d'HCl 1N à 60°C. La coloration des boutons floraux se fait dans le réactif de Schiff pendant une demi-heure à l'obscurité.

Viabilité du pollen

Les grains de pollen des fleurs sont mis entre lame et lamelle, dans une goutte du colorant d'Alexander [11]. L'observation a porté sur 5 fleurs par pied et un minimum de 600 grains de pollen par fleur. Une quinzaine de pieds a été ainsi traitée.

$$V\% = 100 \times (NGPV / NGPT)$$

V% : viabilité pollinique en pourcentage.

NGPV: nombre de grains de pollen vivants.

NGPT : nombre de grains de pollen total.

RESULTATS

Etude du caryotype

L'établissement du caryotype de l'espèce *H. pallidum* est difficile car les chromosomes sont de petite taille et de morphologie similaire. Les données numériques concernant la garniture chromosomique de l'espèce sont présentées dans le tableau 2.

Le calcul de l'indice centromérique (Ic) et le rapport

N° des paires Chromosomiques	Bras longs (en µm)	Bras courts (en µm)	Longueur totale	Longueur relative	Rapport BI / Bc	Indice centromérique	Types chromosomiques
Populations contaminées							
1	1.16 (0.09)*	0.89 (0.01)	2.05	149.52	1.30	43.41	m
2	1.11 (0.02)	0.84 (0.03)	1.95	142.23	1.32	43.07	m
3	1.27 (0.07)	0.55 (0.02)	1.82	132.75	2.30	30.22	sm-sat
4	1.01 (0.02)	0.68 (0.02)	1.69	123.26	1.48	40.23	m
5	0.99 (0.02)	0.67 (0.02)	1.66	121.08	1.47	40.36	m
6	0.93 (0.03)	0.73 (0.03)	1.66	121.08	1.27	43.97	m
7	0.95 (0.04)	0.50 (0.01)	1.45	105.76	1.90	34.48	sm
8	0.73 (0.05)	0.70 (0.01)	1.43	104.30	1.04	48.95	m
Population témoin							
1	1.26 (0.09)	0.93 (0.03)	2.19	146	1.35	42.47	m
2	1.03 (0.03)	0.87 (0.02)	1.9	126.66	1.18	45.79	m
3	1.3 (0.02)	0.59 (0.03)	1.89	126	2.20	31.22	sm-sat
4	1.08 (0.01)	0.8 (0.02)	1.88	125.33	1.35	42.55	m
5	1.12 (0.07)	0.75 (0.01)	1.87	124.66	1.49	40.11	m
6	1.07 (0.01)	0.79 (0.01)	1.86	124	1.35	42.47	m
7	1.2 (0.03)	0.65 (0.02)	1.85	123.33	1.85	35.14	sm
8	0.91 (0.01)	0.61 (0.03)	1.52	101.33	1.49	40.13	m

LEGENDES:

m = métacentrique

sm = submetacentrique

sat = satellite

* = erreur standard

LR = 1000 X (LT / Σ LT)

Ic = BC / LT X 100

Tableau 2: Données morphométriques concernant la garniture chromosomique de l'espèce *Hedysarum pallidum* Desf.

bras long sur bras court (BL/BC) permettent de reconnaître les chromosomes homologues. Ceux-ci montrent qu'il existe deux types de chromosomes : six (6) sont métacentriques, il s'agit des paires 1, 2, 4, 5, 6 et 8, et deux (2) submetacentriques, dont une est satellifère, il s'agit de la paire 3 et 7 (Planche 1b). Les satellites se trouvent sur les bras courts de la paire 3 et ont une longueur moyenne de 0.63µm. La formule chromosomique est donc la suivante :

$$2n = 2x = 16 = 6 m + 1 sm-sat + 1 sm$$

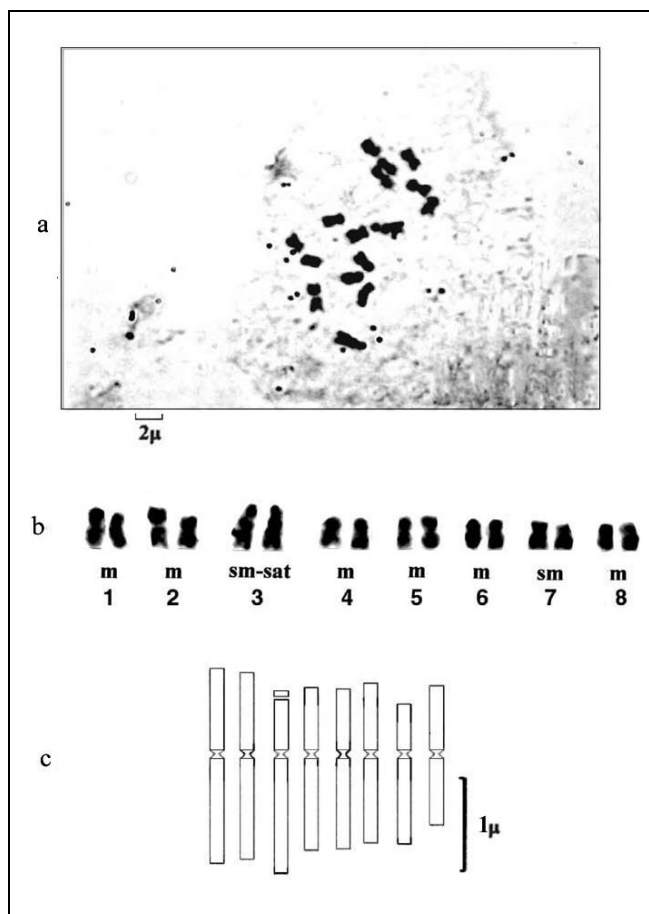


Planche 1: Caryotype de l'espèce *Hedysarum pallidum*:

- a- plaque métaphasique,
- b- caryogramme,
- c- idiogramme.

Le caryotype de l'espèce *H. pallidum* ne montre pas de grandes variations dans la taille des chromosomes (planche 1c). La longueur totale moyenne (LT) est comprise entre 2.05 et 1.43 µm. Tous les chromosomes sont de petite taille et sensiblement de la même dimension. La valeur du rapport de la taille entre la paire la plus longue et la paire la plus courte ($R = 1.43$) et la valeur de l'indice d'asymétrie (IAs % = 59.44) sont assez faibles. En ce sens, le caryotype se révèle symétrique tant pour la forme que pour la taille des chromosomes.

La coloration différentielle au Giemsa a mis en évidence deux types de bandes, intercalaires et télomériques. La planche (2b) donne le profil hétérochromatique obtenu après observation de plusieurs plaques métaphasiques :

- les paires n°1, 4 et 7 montrent une bande à chaque extrémité distale, une bande large intensément colorée sur

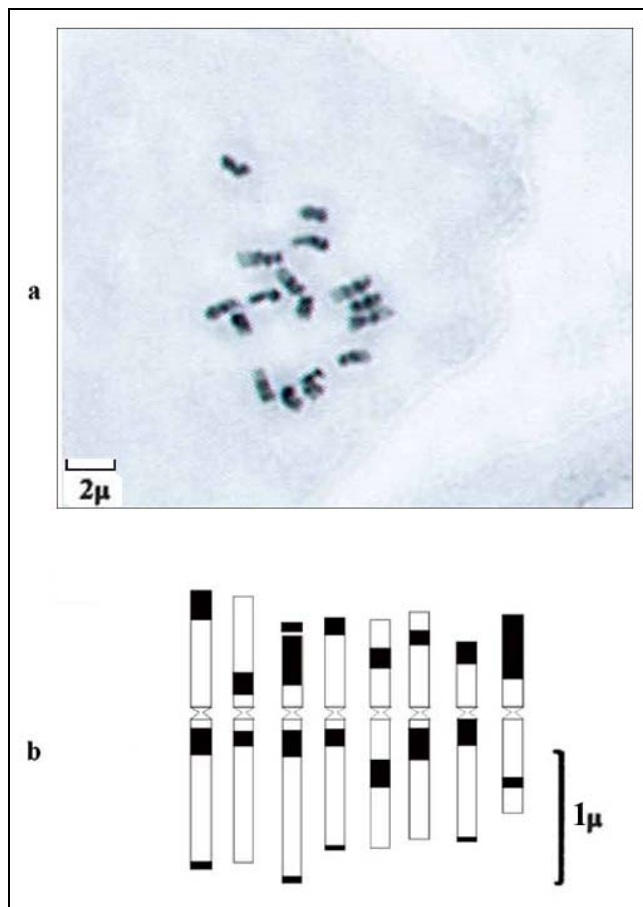


Planche 2: a/ Plaque métaphasique avec des bandes C.

- b/ Idiogramme présentant un profil hétérochromatique.

les bras courts et une fine sur les bras longs. Une troisième bande intercalaire sur les bras longs;

- les paires n°2 et 5 présentent une large bande sur les bras courts et une moins large sur les bras longs. Les deux bandes sont près du centromère;

- les satellites de la pair n°3 sont toujours bien colorés (de nature hétérochromatique), de même que les bras courts auxquels ils sont reliés. Sur les bras longs, on distingue toujours, près du centromère une large bande intercalaire et une bande mince et pâle dans la partie terminale;

- pour la paire n°6, on trouve une bande sur les bras courts et une large bande intercalaire sur les bras longs;

- la paire n°8 montre une large bande située dans la région terminale des bras courts et une moins large dans les bras longs.

L'observation des plaques métaphasiques (20 plaques par individu et 15 individus par population) montre une variation du nombre de chromosomes. La population témoin présente un nombre chromosomique constant $2n = 16$ chez l'ensemble des individus étudiés. Par contre, pour les populations contaminées par l'antimoine, on observe une variabilité intra et inter-individuelle du nombre chromosomique. En effet, au sein de la même population, on trouve des cellules à $2n = 16, 17, 18$ et 19 chromosomes. L'observation du nombre de chromosomes par individu peut être 16 et 17; 16 et 18, 16 et 19 ou 16, 17 et 18 (Planche 3).

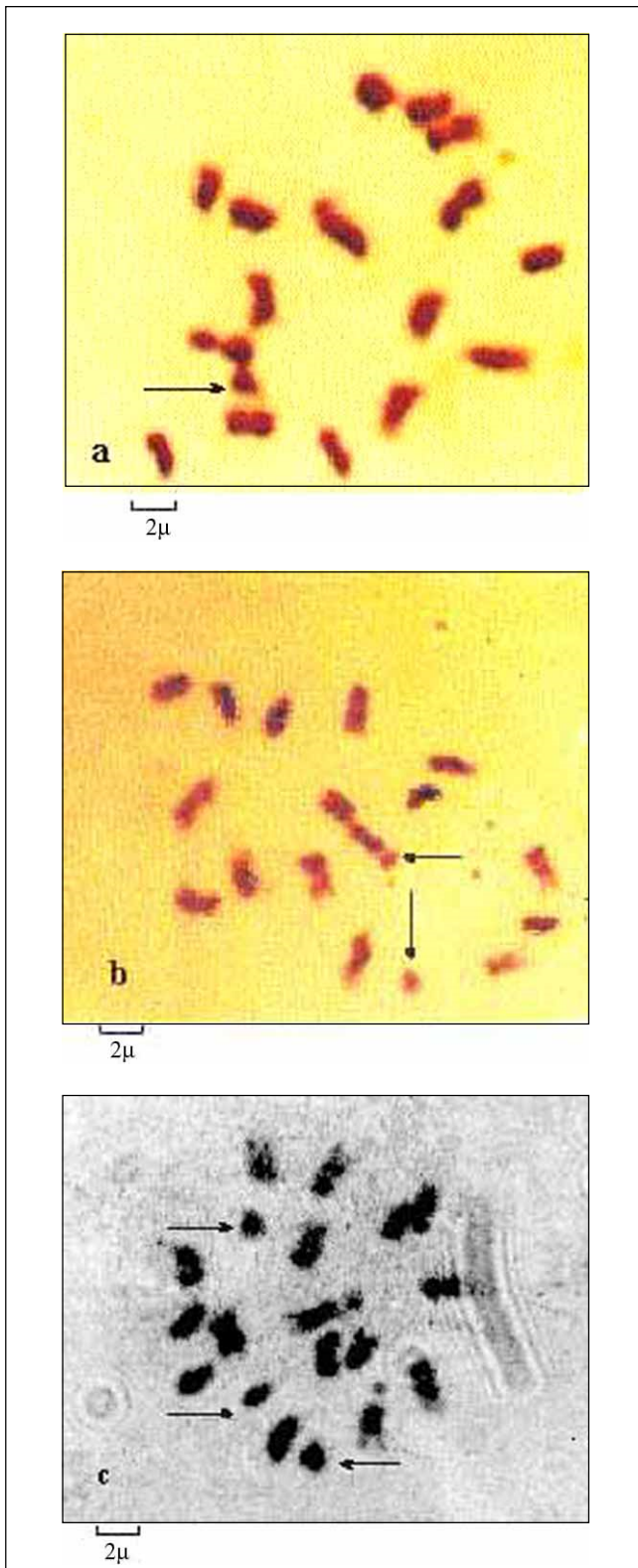


Planche 3: a/ $2n = 2x = 16$ chromosomes + 1B,
 b/ $2n = 2x = 16$ chromosomes + 2B,
 c/ $2n = 2x = 16$ chromosomes + 3B.

Déroulement de la méiose

La méiose est généralement observée dans la partie médiane des inflorescences en grappe. La gamétogenèse est asynchrone au niveau de la grappe. L'étude du

comportement méiotique chez les individus de différentes populations a montré, dans l'ensemble, une certaine régularité des divisions. Les différentes configurations méiotiques obtenues sur les cellules analysées au stade diacinèse, montrent en général, que l'appariement des chromosomes homologues se fait essentiellement sous forme de bivalents, en anneau et droits (Planche 4). La présence constante de huit bivalents (8) confirme le nombre chromosomique $2n = 2x = 16$ observé en mitose pour cette espèce. L'espèce *H. pallidum* présente donc un cytotype diploïde. Nos résultats confortent ceux obtenus par Abdelguerfi-Berreki *et al.* [12].

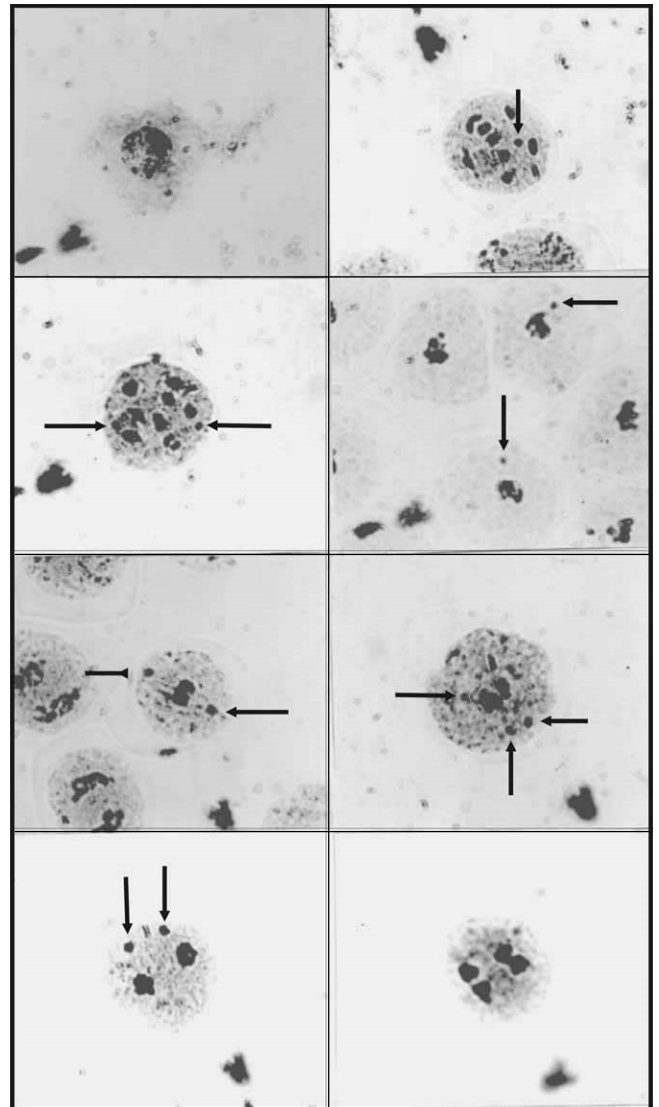


Planche 4: Chromosomes B en méiose.

L'observation des différents stades de la première division méiotique chez les populations tolérantes montre la présence de chromosomes de petite taille, situés généralement à la périphérie des cellules. Ces chromosomes se présentent sous forme d'univalents et ne s'apparient pas avec les huit bivalents observés. Leur nombre est variable parmi les cellules d'un même individu et entre les individus d'une même population (planche 4).

L'étude de la méiose des populations contaminées, a

révélé également l'existence de quelques anomalies affectant la première et la deuxième division (Planche 5):

- chromosomes retardataires à l'anaphase I,
- ponts de chromatine à la télophase I,
- tétrades mal formées.

Le test d'Alexander a révélé un taux de viabilité d'environ 90% pour les populations tolérantes (Fig. 5).

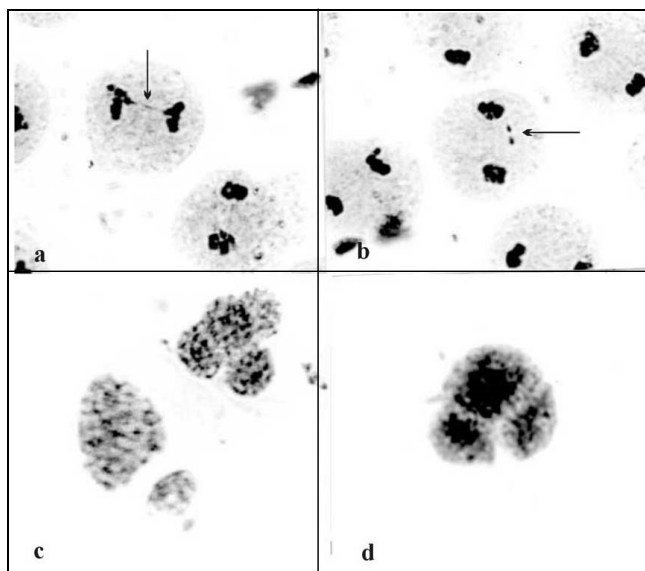


Planche 5: a/ Pont de chromatine à l'anaphase I, b/ Chromosomes retardataires à la télophase I, c et d/ Tétrades mal formées.

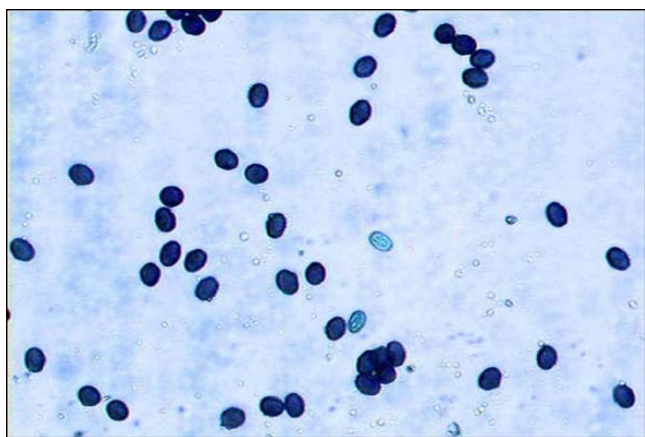


Figure 5: Grains de pollen viables (colorés en rouge violacé) et grains non viables colorés en vert.

DISCUSSION

Le caryotype de l'espèce *H. pallidum* Desf. est établi pour la première fois. Il est constitué de six paires métacentriques et deux paires submétacentriques dont une paire satellifère. Nos résultats se rapprochent de ceux établis par Falistocco et Maurelli [8], qui trouvent chez *H. coronarium* (espèce diploïde à $2n = 16$ chromosomes), quatre (4) paires de chromosomes métacentriques et quatre (4) paires submétacentriques dont une est satellifère. Ces auteurs notent aussi que les chromosomes sont de petite taille: la longueur totale moyenne est de 1.97 à 1.28 μm .

L'ensemble des populations étudiées présentent un caryotype semblable. Aucune différence visible dans la morphologie des chromosomes n'a été observée.

Sur le plan structure des chromosomes, l'analyse de la distribution de l'hétérochromatine constitutive au niveau des métaphases mitotiques a révélé qu'il est difficile de situer et de dénombrer avec précision toutes les zones hétérochromatiques des chromosomes; ceci est dû à leur petite taille (2.05 à 1.43 μm). C'est la raison pour laquelle, il n'a pas été possible d'établir avec précision un caryotype par population afin de rechercher un marqueur hétérochromatique. Ces premières observations devront être complétées par des études plus approfondies du polymorphisme hétérochromatique. Ces éléments contribueront à la connaissance des processus micro évolutifs au sein de cette espèce.

La variabilité numérique des chromosomes au niveau intra et inter individuelle (0 à 3 chromosomes), observée chez les populations tolérantes, est due à la présence des chromosomes B (planche 3). Ces chromosomes submétacentriques, de plus petite taille que les chromosomes A, sont de nature hétérochromatique (révélée par le C-banding). Pour Lespinasse [13], l'existence des chromosomes B, de nature hétérochromatique, dans les populations de Criquet (*Locusta migratoria*) permet une meilleure adaptation à un nouvel environnement. Il semble que le génome puisse utiliser l'hétérochromatine comme un moyen d'expression pour répondre aux conditions du milieu. L'espèce *H. pallidum* se développant dans des milieux fortement contaminés par un métal lourd, répond à la pression de sélection du milieu par l'apparition de chromosomes B dans ces cellules. Les chromosomes B ont un rôle relativement important dans l'apparition de la variabilité génotypique et dans l'adaptation des organismes aux variations du milieu.

La présence de ponts de chromatine et de chromosomes retardataires chez les populations tolérantes (planche 5a et b) peut engendrer une disjonction déséquilibrée du matériel génétique avec pour conséquence la formation des gamètes non fonctionnels entraînant une stérilité des plantes. Le test d'Alexander, permettant de vérifier la viabilité du pollen a montré que celui-ci est viable à 90 % pour l'ensemble de ces populations. Il semble donc que les cellules mères du pollen évoluent normalement et les tétraspores, libérés à la fin de la méiose, possèdent, pour la plupart, un cytoplasme et un noyau normal. La présence des anomalies méiotiques chez les populations tolérantes peut être due aux chromosomes B. Lespinasse *et al.* [14] ont observé les mêmes anomalies méiotiques chez l'espèce *Nicotiana sylvestris*. Ces auteurs signalent que les chromosomes B sont responsables de l'irrégularité des méioses.

CONCLUSION

L'étude de la mitose et de la méiose, a permis de confirmer le nombre chromosomique et le niveau de ploïdie $2n = 2x = 16$, et pour la première fois d'établir le caryotype et de mettre en évidence l'existence des chromosomes B chez l'espèce *Hedysarum pallidum*.

Si l'hypothèse selon laquelle l'hétérochromatine jouerait un rôle dans l'adaptation et l'évolution des espèces

végétales, nous pouvons dire que la présence des chromosomes B de nature hétérochromatique au niveau du génome des populations tolérantes pourrait être liée aux conditions difficiles du milieu et notamment la présence d'antimoine.

Le déroulement normal de la mitose et la régularité de la méiose ainsi que la présence des chromosomes B chez l'ensemble des populations tolérantes, montrent que *H. pallidum* s'est adaptée à la présence de l'antimoine dans le milieu. Cette espèce est donc capable de pousser dans des conditions très difficiles. Posséderait-elle des gènes de résistance à la toxicité de l'antimoine?

A l'issue de nos premières observations, nous pensons qu'il faut orienter les recherches vers :

- la localisation des gènes de la résistance par les techniques moléculaires afin de pouvoir les introduire chez d'autres espèces d'intérêts économiques et écologiques ;
- l'introduction de cette espèce dans des opérations de revalorisation des terres (lutte contre la désertification et satisfaction des besoins alimentaires du bétail).

REFERENCES

- [1]- Quezel P. et Santa S., "Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales", CNRS, Tome 1 (1962), pp. 539-541.
- [2]- El-Ouni M., "Variabilité et mode de reproduction de *Hedysarum pallidum* Desf. (Papilionacée) en Tunisie", D.E.A. Fac. Sci. Tunis, (1979), 61p.
- [3]- Rached-Mosbah O., "Action de l'antimoine sur la végétation en zone steppique et étude de l'adaptation d'une espèce tolérante (*Hedysarum pallidum* Desf)", Thèse de Doctorat d'Etat, Museum National d'Histoire Naturelle, (1993), 120 p.
- [4]- Foury A., "Les légumineuses fourragères au Maroc. Seconde Partie. Papilionacées (suite): tribu des Lotées, Galegées, Hedysarées, Viciées, Phaseolées, Dalbergiées, Sophorées et Swartziiées", Cahiers Rech. Agro. Rabat, (1954), pp. 374 - 388.
- [5]- Rached-Mosbah O., "Les exploitations minières et leurs nuisances, exemple d'une ancienne mine d'antimoine dans le Djebel Hamimat", II^{ème} journée de l'environnement de Constantine, (1997).
- [6]- Rached-Mosbah O., "Etude de l'influence des sols antimonieux de la région du Djebel Hamimat sur la végétation", Mém. Magistère en Ecologie. Univ. de Constantine, (1983), 133p.
- [7]- Sondag G., "Géochimie de surface des gîtes d'antimoine du Djebel Hamimat (sud-est du Constantinois. Algérie)", C. R. Acad. Sc., Paris, 292, série 11 (1980), pp. 65-68.
- [8]- Fallistocco E. et Maurelli L., "Chromosome study in *Hedysarum coronarium* L", Annali Di Botanica. Vol. XV III (1990), pp. 81-86.
- [9]- Levan A., Fredga K. et Sandberg A. A., "Nomenclature for centromeric position on chromosomes", Hereditas, 52, (1964), pp. 201-220.
- [10]- Arano H. et Saito H., "Cytological studies in family Umbelliferae 5. Karyotypes of seven species in subtribe Seselinae", Chromosoma, ser. 2, 17 (1980), pp. 471-480.
- [11]- Alexander M.P., "Differential staining of aborted and non-aborted pollen", Stain technology. 44, N°3, (1969), pp. 117-122.
- [12]- Abdelguerfi-Berrekia R., Abdelguerfi A., Bounaga N. et Guittonneau G.G., "Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Hedysarum* L. en Algérie. III- Dénombrement chromosomique chez 29 populations de huit (8) espèces", Ann. Inst. Nat. Agro. El-Harrach, Vol. 12, N°1, (1988), pp.233-247.
- [13]- Lespinasse R., "Etude du polymorphisme dû à l'existence de chromosome B chez *Locusta migratoria* (Orthoptères, acridiens) : analyse de leur transmission et mise en évidence de leurs rôles par l'étude comparative de populations d'origine géographique différente", Thèse de Doctorat d'Etat, Univ. Paris IX-Orsay, (1980), 106 p.
- [14]- Lespinasse R., de Paepe R. et Koulou A., "Induction of B chromosomes formation in androgenetic lines of *Nicotiana sylvestris*", Caryologia, 40, N°4, (1987), pp. 327-338. □