

Anomalie florale chez le palmier à huile

Caractérisation de l'expression génique différentielle

F. Morcillo¹ C. Hartmann³ A. Rival¹
H. Adam¹ T. Durand-Gasselín² Y. Duval¹
F. Richaud¹ E. Konan² J. Tregear¹

Chez le palmier à huile, la micropropagation en masse par embryogénèse somatique est une voie privilégiée pour multiplier des génotypes élités obtenus lors des programmes de sélection (Wooi, 1990 ; Duval *et al.*, 1995). Cette approche permet de surmonter le problème du fort degré de variabilité encore présent au sein des descendances améliorées et d'exploiter les individus donnant les meilleures performances. Dès le milieu des années 70, l'équipe Cirad-CP/IRD s'est intéressée au développement d'un procédé de régénération par embryogénèse somatique sur des cals d'origine foliaire (Pannetier *et al.*, 1981). Dans les années 80, ce procédé a été transféré et testé dans plusieurs laboratoires des pays producteurs : en Malaisie, en Indonésie et en Côte d'Ivoire. Ce travail a permis de démontrer l'intérêt de la multiplication clonale pour le palmier à huile grâce à un gain de productivité de l'ordre de 30 % (Duval *et al.*, 1997).

¹ Cirad-CP/IRD, UR116, BP 5045, 34032 Montpellier cedex 1, France.

² CNRA S.A., Station principale de La Mé, 13 BP 989, Abidjan 13, Côte d'Ivoire.

³ Université Paris-XI, Institut de biotechnologie des plantes, CNRS ERS 569, bâtiment 630, F-91405 Orsay cedex, France.

Aujourd'hui, le procédé IRD/Cirad a déjà permis l'obtention d'environ 1,2 millions de plants régénérés (« vitroplants »), représentant un millier de génotypes différents. Cependant, une proportion des plantes régénérées (5-10 %) présentent un phénotype variant (dit « *mantled* ») vis-à-vis de leur architecture florale (Corley *et al.*, 1986). Cette anomalie florale, dans les cas les plus graves, peut conduire à la stérilité de la plante adulte régénérée et affecter ainsi la production en huile. Le taux de l'anomalie pouvant varier de 0 % jusqu'à 80 % selon la descendance clonale, la présence de variants somaclonaux constitue un risque inacceptable pour les planteurs et limite, à l'heure actuelle, l'utilisation de la culture *in vitro* comme technique de propagation en masse du palmier à huile.

Plusieurs observations préalables n'ont pas permis de mettre en évidence d'altérations majeures de l'ADN génomique qui puissent être reliées au phénotype *mantled*. En particulier, une réversion au champ vers un phénotype normal a été constatée pour un pourcentage important de plants régénérés, même dans les cas les plus graves. De plus, il a été démontré par des croisements génétiques que l'anomalie florale peut être transmise à la descendance, mais d'une façon non Mendélienne. Enfin, aucune différence, au niveau de la taille et de la structure du génome, n'a pu être observée entre tissus conformes et variants par les méthodes de cytométrie de flux (Rival *et al.*, 1997), de RAPD (Rival *et al.*, 1998) ou d'AFLP (Rival, comm. pers.).

L'ensemble des observations décrites ci-dessus, incompatibles avec l'hypothèse d'une mutation génétique classique, suggère que l'apparition des variants serait à l'origine d'une altération épigénétique de l'expression du génome. Les études en cours dans notre laboratoire se focalisent donc sur deux facteurs potentiellement sous contrôle épigénétique : d'une part, la méthylation de l'ADN (Finnegan *et al.*, 1998) et, d'autre part, l'expression génique. Nous décrivons ici les résultats obtenus dans le cadre de nos études de l'expression génique différentielle en relation avec l'anomalie *mantled*. Le but final de ce travail étant d'identifier des gènes dont l'expression est modifiée en association avec l'état d'anomalie des cultures *in vitro*. Nous espérons qu'à terme, cette approche apportera un outil pour éliminer les plantes non-conformes avant leur

plantation au champ et/ou de perfectionner le procédé de multiplication pour éviter que des variants ne soient produits.

La technique retenue pour cette étude était la *differential display* RT-PCR (ddRT-PCR ; Liang et Pardee, 1992). Au laboratoire IRD/Cirad-CP de Montpellier, nous avons analysé l'expression génique différentielle dans des pousses feuillées prélevées sur des vitroplants régénérés à partir d'individus portant ou non l'anomalie. En parallèle, des études similaires ont été conduites à d'autres stades du procédé *in vitro*, sur des cals et des embryons somatiques en prolifération, par l'équipe du Prof. Hartmann (Institut de biotechnologie des plantes, université Paris-XI, Orsay) dans le cadre d'un projet cofinancé par le MPOB (anciennement Porim ; Institut de recherche sur le palmier à huile en Malaisie). Nous résumons ici les résultats obtenus avec les pousses feuillées de vitroplants de palmier à huile.

La technique de ddRT-PCR nous a permis de mettre en évidence un total de 46 marqueurs potentiels de l'anomalie *mantled* (voir tabl. 1).

Nombre total de marqueurs potentiels identifiés en ddRT-PCR	46
Nombre d'ADNc individuels clonés	58
Nombre d'ADNc validés par hybridation northern	16
Nombre d'ADNc normal-spécifique	9
Nombre d'ADNc anormal-spécifique	7

■ Tableau 1

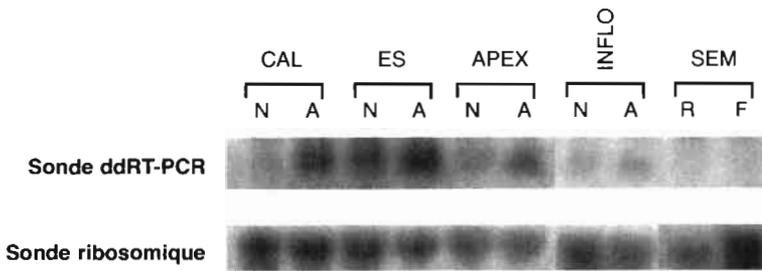
Résumé des résultats obtenus par *differential display* RT-PCR et validation des marqueurs par hybridation de type Northern.

Les ARN totaux extraits du matériel expérimental sont d'abord soumis à une rétrotranscription afin de générer un ADN simple brin qui sert ensuite comme substrat pour une amplification par PCR. Cette dernière se fait avec des amorces arbitraires permettant de cibler dans chaque réaction une sous-population d'ADNc. Les produits sont marqués par l'ajout dans le mélange réactionnel de dATP marqué par le phosphore 33. Une fois amplifiés, les ADNc sont

séparés sur gel de séquence. Les marqueurs potentiels sont identifiés sous forme de bandes dont l'intensité varie en fonction de la présence ou absence de l'anomalie *mantled* dans le matériel de départ. Les régions du gel correspondant aux ADNc d'intérêt sont découpées et l'ADN élué avant d'être réamplifié par PCR. Les fragments d'ADNc sont ensuite clonés dans un vecteur plasmidique et leur séquence déterminée. Ceci permet d'identifier d'éventuelles hétérogénéités de séquence au sein des clones. Ce dernier phénomène serait principalement dû à la présence dans le gel de produits PCR qui comigrent avec le marqueur identifié comme étant différentiel. De plus, cela explique pourquoi, pour 46 marqueurs, nous avons clonés un total de 58 ADNc différents.

Chaque ADNc est testé par hybridation northern afin de valider le profil d'expression observé en *differential display*. Les clones qui demeurent intéressants sont ensuite testés sur d'autres cultures *in vitro*, conformes et variantes, afin d'évaluer leur fiabilité comme marqueur de l'anomalie *mantled*. Après cette deuxième étape de validation, les ADNc qui semblent discriminer les cultures normales et anormales sont étudiés plus finement en analysant leur spécificité tissulaire d'expression. Enfin, une banque d'ADNc est criblée afin d'obtenir des clones « pleine longueur » pour un séquençage complet. Ceci permet d'obtenir des informations concernant la protéine codée par le gène en question et d'identifier une fonction éventuelle.

Plusieurs marqueurs ont été sélectionnés pour des études plus approfondies, dont le marqueur illustré dans le figure 1. Ce marqueur permet une bonne discrimination des cultures conformes et variantes au stade de cal. Le gène en question, qui code pour une protéine ayant un rôle éventuel dans la réponse au stress, est exprimé dans les cultures *in vitro* à tous les stades alors qu'au niveau de la plante entière, les transcrits n'étaient observés que dans les inflorescences (Tregear *et al.*, manuscrit soumis). D'autres gènes de type « anormal-spécifique » identifiés lors de cette étude coderaient, eux aussi, pour des protéines impliquées dans la réponse au stress, ce qui peut être expliqué par les effets physiologiques connus de la culture *in vitro* (Lo Schiavo *et al.*, 1989 ; Peschke et Phillips, 1992 ; Duncan, 1997 ; Kaeppler *et al.*, 1998).



■ Figure 1

Validation d'un marqueur potentiel de l'anomalie *mantled* par hybridation northern et caractérisation de la spécificité tissulaire d'accumulation de l'ARN messager correspondant.

Abréviations : N, culture conforme ; A, culture portant l'anomalie florale ; ES, embryon somatique ; APEX, partie de pousse feuillée issue de culture *in vitro* contenant l'apex caulinaire ; INFLO, inflorescence ; SEM, plante issue de graine.

Ces travaux seront poursuivis par l'évaluation de marqueurs sur une gamme plus large de génotypes. Pour la mise au point de tests de conformité, l'une des approches possibles, compte tenu du coût et de la facilité d'utilisation, serait basée sur une analyse protéique. Si une accumulation différentielle des protéines codées par les gènes marqueurs pouvait être mise en évidence, la conformité clonale pourrait éventuellement être évaluée à l'aide d'un anticorps. La disponibilité d'un test fiable de conformité clonale permettrait aux planteurs de profiter rapidement des progrès génétiques obtenus dans les programmes de sélection variétale et les gains de rendement qui en résulteraient pourraient être très importants. Par ailleurs, le protocole de régénération, basé sur milieu liquide, mis au point par l'équipe Cirad-CP/IRD (Touchet *et al.*, 1991), pourrait alors être exploité afin d'obtenir une baisse considérable des coûts de production.

D'un point de vue fondamental, nous espérons que ces études apporteront des informations utiles permettant de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui provoquent le déclenchement de l'anomalie *mantled*. Plusieurs facteurs sont susceptibles d'intervenir dans le déterminisme du phénotype *mantled* (voir fig. 2), dont certains sont en cours d'investigation dans la laboratoire IRD/Cirad-CP

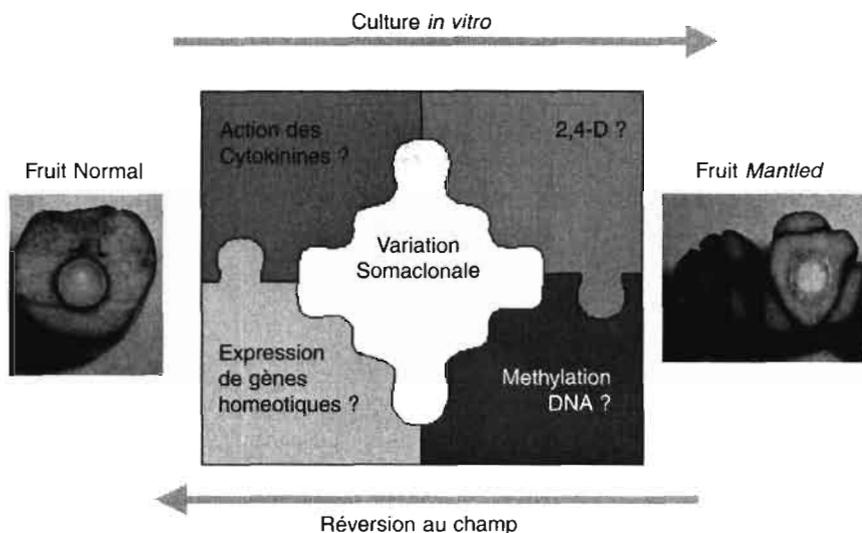


Figure 2
Facteurs potentiellement impliqués dans le déclenchement de l'anomalie *mantled*.

de Montpellier. En particulier, des études récentes ont démontré que l'ADN génomique des tissus anormaux est hypométhylé par rapport à l'ADN extrait de matériel conforme (Jaligot *et al.*, 2000). Grâce à la disponibilité des sondes obtenues par *differential display*, nous espérons pouvoir identifier des gènes individuels dont l'état de méthylation varierait en fonction de la conformité clonale. D'autres facteurs tels que l'activité des gènes homéotiques ainsi que les cytokinines (Besse *et al.*, 1992) sont susceptibles de jouer un rôle dans le déclenchement de l'anomalie *mantled*, via un mécanisme indéterminé à ce jour. Enfin, il est probable que le 2,4-D, auxine de synthèse utilisée pour induire la callogenèse, joue un rôle dans l'induction des variations somaclonales, qui sont en général favorisées par un état de dédifférenciation cellulaire (Karp, 1991). Nous espérons que l'approche moléculaire employée permettra d'identifier plus clairement comment les différents facteurs mentionnés interagissent. À plus long terme, nous espérons que les connaissances acquises sur le palmier à huile permettront également de mieux comprendre et de maîtriser les variations somaclonales chez les autres espèces affectées par ce phénomène.

Bibliographie

- Besse I., Verdeil J.-L., Duval Y., Sotta B., Maldiney R., Miginiac E. 1992 — Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal fidelity: Endogenous cytokinins and indoleacetic acid in embryogenic callus cultures. *J Exp Bot*, 43 : 983-989.
- Corley R. H. V., Lee C. H., Law L. H., Wong C. Y. 1986 — Abnormal development in oil palm clones. *The Planter*, Kuala Lumpur, 62 : 233-240.
- Duncan 1997 — Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Advances in Agronomy*, 58 : 201- 241.
- Duval Y., Engelman F., Durand Gasselín T. 1995 — Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In *Somatic embryogenesis and Synthetic Seed I*, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Y.P.S. Bajaj (ed.), Springer Verlag, 30 : 335-352.
- Duval Y., Amblard P., Rival A., Konan E., Gogor S., Durand Gasselín T. 1997 — Progress in oil palm tissue culture and clonal performance in Indonesia and the Côte d'Ivoire. *International Planters Conference*, Kuala Lumpur, 21-22 May 1997 : 291-307.
- Finnegan E.J., Genger R.K., Peacock W.J., Dennis E.S. 1998 — DNA methylation in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio*, 49 : 223-247.
- Jaligot E., Rival A., Beule T., Dussert S., Verdeil J.-L. 2000 — Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Rep.*, 7 : 684-690.
- Karp A. 1991 — On the current understanding of somaclonal variation. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, 7 : 1-58.
- Kaeppeler S.M., Phillips R.L., Olhoft P. 1998 — Molecular basis of heritable tissue culture-induced variation in plants. In *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*. Eds : Jain S.M., Brar D.S. et Ahloowalia B.S. Kluwer, Dordrecht : 465-499.
- Liang P., Pardee A. B. 1992 — *Differential display* of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257 : 967-971.
- Lo Schiavo F., Pitto L., Guilán G., Torti G., Nuti-Ronchi V., Marazziti D., Vergara R., Orselli S., Terzi M. 1989 — DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variation as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics*, 77 : 325-331.
- Pannetier C., Arthuis P., Lievoux D. 1981 — *Néof ormation de jeunes plantes d'Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro*. *Oléagineux*, 36 : 119-122.
- Peschke V.M., Phillips R.L. 1992 — Genetic implication of somaclonal variation in plants. *Advances in Genetic*, 30 : 41-75.
- Rival A., Bertrand L., Beulé T., Combes M. C., Trouslot P., Lashermes P. 1998 — Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm. *Plant Breeding*, 11 : 7 73-76.

- Rival A., Beulé T., Barre P., Hamon S., Duval Y., Noirot M. 1997 — Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Rep.*, 16 : 884-887.
- Touchet B. de, Duval Y., Pannetier C. 1991 — Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Rep.*, 10 : 529-532.
- Wooi K.C. 1990 — Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): tissu culture and micropropagation. *In* *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 10. Legumes and oilseeds crops I. Ed : Bajaj Y.P.S., Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg : 569-592.