

**Ecole Nationale
De Formation Agronomique
Toulouse Auzeville**

**Université Paul Sabatier
Toulouse**

DIPLOME UNIVERSITAIRE DE RESPONSABLE

EN

BIOTECHNOLOGIES VEGETALES

**ETUDE DE LA VARIATION SOMACLONALE
CHEZ LE PALMIER A HUILE :
MESURE DE LA TENEUR EN 2,4-D ET EN CYTOKININES DANS LES
TISSUS VEGETAUX PENDANT L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE**

Présenté par :

ELODIE PEPEY

Jeudi 23 Septembre 1999

Responsables de stage : Alain BORGEL et Valérie HOCHER

Stage effectué à :

IRD
Unité Génétique et Amélioration
Des plantes Tropicales
Avenue Agropolis
34032 Montpellier cedex 1

CIRAD
Département Cultures Pérennes
Avenue Agropolis
34032 Montpellier cedex 1



REMERCIEMENTS

Le stage s'est effectué dans l'Unité Génétique et Amélioration des Plantes du Laboratoire GeneTrop de l'IRD Montpellier.

Je tiens d'abord à remercier Serge HAMON, responsable du Laboratoire GeneTrop, de m'avoir accueillie dans son équipe.

Je remercie Yves DUVAL, responsable de l'unité Génétique et Amélioration des Plantes pour m'avoir permis de travailler au sein de l'équipe Palmier.

Je tiens plus particulièrement à remercier Alain BORGEL, qui m'a intégré avec confiance dans son programme de recherche. Je le remercie pour son soutien et son aide tout au long de ce stage.

Je suis très reconnaissante à Valérie HOCHER pour m'avoir initié aux techniques ELISA et HPLC. Je la remercie pour sa gentillesse, sa grande disponibilité, et son savoir.

J'adresse aussi mes remerciements à Fabienne MORCILLO, Estelle JALIGOT et Jean Luc VERDEIL pour leurs nombreux conseils.

Mes remerciements vont également à Sylvie DOULBEAU pour son assistance lors de l'utilisation de l'appareil HPLC.

Je n'oublie pas de remercier tous les autres membres du laboratoire GeneTrop, et plus particulièrement Frédérique GROSDÉMANGE pour sa sympathie et son aide en ELISA, et Véro NARDINI pour sa bonne humeur.

Et enfin un grand merci à tous ceux et toutes celles qui d'une manière ou d'une autre m'ont permis de passer 6 mois agréables.

ABREVIATIONS

◆ Phytohormones et dérivés

AIA	Acide indole-3-acétique
ANA	Acide naphthalène-1-acétique
2,4-D	acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
BAP	6-Benzyl amino-purine
Z	Zéatine
ZR	Zéatine riboside
iP	Isopentényladénine
iPA	Isopentényladénosine
9GiP	Isopentényladénosine-9-glucoside

◆ Réactifs et tampons

ABTS:	acide 2,2'-azino bis-(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique)
BSA :	Sérum Albumine Bovine
Mi 52 :	Milieu de culture n°52
PBS :	Tampon Phosphate Salin
SVF	Serum Veal Fœtal
TEA	Triéthylamine

◆ Divers

Ac :	Anticorps
Ag :	Antigène
AgF :	Antigène fixé
AgL :	Antigène libre
CCN	Cal Compact Nodulaire
CCR	Cal à Croissance Rapide
CIRAD :	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
DO :	Densité Optique
ELISA :	« Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay » : méthode de dosage enzymatique
GeneTrop	Génétique Tropicale
HPLC :	« High Performance Liquid Chromatography » : Chromatographie Liquide à Haute Performance
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
MF	Matière fraîche
MS	Matière sèche
RAPD	Random Amplified Polymorphism DNA
RFLP	Random Fragment Length Polymorphism

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
PRESENTATION DE L'ENTREPRISE	2
I. L'IRD (Institut de Recherche pour le Développement)	2
1.1. Statut Juridique et Missions de l'IRD	2
1.2. Historique	2
1.3. Les implantations au niveau mondial de l'Institut.....	2
1.4. Le Centre de Montpellier.....	2
1.5. Les coopérations de l'IRD.....	3
II. LE CIRAD	3
III. LE LABORATOIRE GENETROP	3
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. LE PALMIER A HUILE	5
1.1. Classification et Morphologie	5
1.2. Le mode de reproduction	5
1.3. Intérêts Economiques	5
1.4. Production de matériel végétal amélioré par voie sexuée	5
1.5. Production de matériel végétal amélioré par voie clonale	6
1.6. Variation Somaclonale	7
1.6.1. Quelques généralités	7
1.6.2. La variation somaclonale « mantled » chez le palmier à huile.....	7
1.6.3. Objectifs de l'étude proposée	9
MATERIEL ET METHODES	10
I. MATERIEL VEGETAL	10
1.1. Protocole expérimental	10
1.1.1 La prolifération cellulaire	10
1.1.2. La régénération de plantules.....	10
1.2. Le matériel végétal utilisé pour le dosage hormonal	11
II DOSAGE DES DIFFERENTES PHYTOHORMONES	12
2.1. Extraction et purification des hormones à partir de l'explant.....	12
2.1.1. L'Extraction	12
2.1.2 La Filtration	12
2.2. Séparation des différentes formes hormonales par HPLC	13
2.2.1. Principe général de l'HPLC.....	13
2.2.2. Conditions expérimentales nécessaires à la séparation des phytohormones	14
2.3. Dosage immunoenzymatique des phytohormones.....	16
2.3.1. Généralités	16
2.3.2. Le dosage par compétition appliquée aux phytohormones	17
RESULTATS	22
I MISE AU POINT DE LA METHODE DE DOSAGE DES PHYTOHORMONES.....	22
1.1. L'extraction des phytohormones.....	22
1.2. La purification par HPLC.....	22
1.2.1. Mise au point du gradient d'élution	22
1.2.2. Mise au point des conditions d'utilisation du [14C]-2,4-D.....	23
1.3. Quantification des phytohormones par méthode ELISA	23
1.3.1. Origine des anticorps utilisés pour le dosage du 2,4-D	24

1.3.2. Mise en place de tests pour homogénéiser le protocole 2,4-D avec celui des autres hormones du laboratoire	24
1.3.2. Récapitulatif des caractéristiques des 2 anticorps.....	27
II ETUDE DES QUANTITES DE PHYTOHORMONES PRESENTES DANS LES TISSUS VEGETAUX.....	27
2.1. Phytohormones détectées dans les tissus végétaux.....	27
2.2. Résultats des dosages sur les échantillons végétaux	28
2.2.1. Quelques remarques préliminaires des résultats du dosage des phytohormones..	28
2.2.2. Les suspensions cellulaires.....	28
2.2.3. Les pro-embryons.....	28
2.3. Evolution des teneurs en cytokinines endogènes au cours des 2 stades de développement étudiés.....	29
2.3.1. Les suspensions cellulaires.....	29
2.3.2. Les pro-embryons	29
DISCUSSION.....	30
I. POSSIBILITES ACTUELLES DE DOSAGE DES PHYTOHORMONES ET AMELIORATIONS A APPORTER.....	30
II. QUANTIFICATION DES PHYTOHORMONES.....	31
2.1. Dosage des phytohormones au stade suspensions cellulaires.....	31
2.2. Dosage des phytohormones au stade pro-embryons	32
2.3. Comparaison des phytohormones entre les stades suspensions cellulaires et pro-embryons	33
2.4. Synthèse	34
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	35
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	36
ANNEXES	

INTRODUCTION GENERALE

L'augmentation prévisible de la population mondiale, et l'élévation du niveau de vie des pays fortement peuplés, permet de prévoir une augmentation de la demande en corps gras de l'ordre de 5% par an (Hirsch, 1990). Deux plantes oléagineuses devraient principalement répondre à cette demande : le soja et le palmier à huile.

Le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.), qui est cultivé en zone tropicale humide, est actuellement la deuxième source mondiale d'huile végétale. Les palmeraies assurent ainsi aux pays producteurs une importante source de revenus.

Pour accroître la production de cet oléagineux, deux stratégies ont été optées : augmentation des surfaces cultivées, et augmentation des rendements en huile grâce aux travaux de sélection génétique.

Pour diffuser rapidement et en nombre important les meilleurs individus obtenus par sélection génétique, les sélectionneurs ont recours à la multiplication végétative par embryogenèse somatique. Les premiers essais clonaux ont confirmé un accroissement du rendement de 30 à 40%, pour les clones les plus performants par rapport aux meilleures semences commerciales disponibles (Duval *et al.*, 1997). Ces premiers résultats sont donc un argument majeur pour développer cette multiplication clonale.

Cependant, il a été observé après régénération des premiers vitroplants que certains clones n'ont pas le même phénotype que l'explant. Les clones non conformes présentent une anomalie florale qui peut rendre l'arbre stérile. Cette constatation est donc un frein au développement végétatif du palmier à huile par embryogenèse somatique.

Des recherches sont donc actuellement en cours afin de déterminer les causes de la formation de plants anormaux. Les premières recherches ont montré que ces variations sont somaclonales et qu'elles affecteraient la régulation de l'expression de certains gènes.

Des travaux effectués sur d'autres espèces végétales ont mis en évidence que le 2,4-D (acide 2,4 dichlorophénoxyacétique), utilisé comme auxine de synthèse dans les milieux de culture *in vitro*, pouvait induire l'apparition de variations somaclonales. En parallèle, il a été montré que le 2,4-D pourrait agir sur le degré de méthylation de l'ADN de manière directe ou indirecte. D'autres études ont aussi proposées l'implication des cytokinines sur la méthylation du génome.

Ainsi, nous proposons de tester l'hypothèse selon laquelle le 2,4-D aurait une action indirecte sur la méthylation de l'ADN, par l'intermédiaire des teneurs en cytokinines endogènes.

Pour cela, un protocole expérimental a été établi afin de connaître l'évolution des teneurs en cytokinines endogènes selon la quantité de 2,4-D apportée dans les milieux de culture.

Après avoir présenté le cadre de l'étude, et les caractéristiques du palmier à huile, il sera décrit la mise au point d'un protocole expérimental ayant permis le dosage de deux classes hormonales. Puis, l'application de la méthode de dosage sur des échantillons végétaux à deux stades de culture du processus d'embryogenèse somatique sera présentée. Enfin les résultats obtenus seront discutés dans la partie discussion.

PRESENTATION DE L'ENTREPRISE

I. L'IRD (Institut de Recherche pour le Développement)

1.1. Statut Juridique et Missions de l'IRD

L'IRD est un établissement public à caractère scientifique et technologique (EPST), placé sous la double tutelle des Ministères de la Recherche et des Affaires Etrangères.

Sa vocation primaire est de mettre en place des programmes de recherche aboutissant à un développement des pays du Sud.

Les recherches mises en œuvre concernent les relations entre les conditions sociales et économiques du développement, et la gestion des milieux et des ressources naturelles.

L'objectif final est de renforcer les compétences scientifiques des pays du Sud pour ensuite permettre une valorisation économique des résultats de la recherche.

1.2. Historique

L'Office de la Recherche Scientifique Coloniale (ORSC) est créé en 1942 pour promouvoir le développement économique et social des pays colonisés.

Jusqu'aux années 1950, les études menées sont faites à travers des missions dans les régions concernées.

Très vite, il s'avère nécessaire de construire sur place des infrastructures tels des laboratoires, des bureaux, des ateliers.

Ces Instituts de Recherche s'implantent progressivement en Afrique, Guyane, et en Océanie, et prennent en 1982 le nom d'Institut de Recherche Scientifique pour le Développement et la Coopération (ORSTOM).

Depuis 1998, le sigle ORSTOM a été remplacé par celui d'IRD (Institut de Recherche pour le Développement).

1.3. Les implantations au niveau mondial de l'Institut

A l'heure actuelle, 500 des 800 chercheurs sont affectés pour des missions de longues durées dans des pays de la zone intertropicale et notamment en Afrique, en Amérique Latine, en Asie du Sud Est et dans le Pacifique.

Néanmoins, grâce aux facilités de communication et de déplacement, les équipes interviennent beaucoup plus en missions, et sont rattachés à des centres de haute pointe technologique, comprenant principalement le centre d'Orléans inauguré en 1996, et le centre de Montpellier construit en 1986.

1.4. Le Centre de Montpellier

C'est la principale base scientifique de France comprenant 20 laboratoires et unités techniques avec un effectif regroupant plus de 500 personnes.

Différents thèmes de recherche appartenant à différents secteurs sont abordés :

- L'agronomie tropicale
- L'hydrologie
- La santé et la nutrition
- L'économie rurale

Ces axes d'études s'intègrent dans un des grands programmes de recherche de l'IRD, qui en comporte au total 8 :

- Bases biologiques de la valorisation agricole et agro-industrielle de la biodiversité.
- Dimensions économiques et sociales du développement.

- Dynamique et usage des milieux terrestres tropicaux.
- Dynamique et usage des écosystèmes marins et littoraux et de leurs ressources.
- Géodynamique, exploration des ressources minérales et évaluation des risques naturels.
- La question urbaine dans les politiques de développement.
- Santé et politique de développement.
- Variabilité climatique et ses conséquences régionales.

1.5. Les coopérations de l'IRD

Pour mener à bien ses recherches, l'IRD entretient des relations de partenariat avec les institutions nationales dans les pays du Sud.

Il accueille également dans ses centres métropolitains et dans les DOM-TOM ses partenaires du Sud et du Nord.

Le centre de Montpellier travaille aussi beaucoup en collaboration avec la communauté scientifique régionale (CNRS, Universités, INRA, l'INSERM, le CIRAD). Cela se traduit par la création de laboratoires mixtes (par exemple IRD-CIRAD), d'accueil de chercheurs d'autres organismes ainsi que des étudiants stagiaires.

II. LE CIRAD

Le CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) est un organisme scientifique français spécialisé en agriculture des régions tropicales et subtropicales.

Ce centre est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC) placé sous la double tutelle des Ministères de la Recherche et des Affaires Etrangères.

Il résulte de la fusion en 1984 d'instituts de recherche en sciences agronomiques, vétérinaires, forestières et agro-alimentaires.

Sa principale base scientifique se trouve à Montpellier, où viennent se greffer des bases de recherche implantées dans les régions directement concernées par les axes de recherche.

Une soixantaine de pays profitent des recherches menées par le CIRAD à travers une étroite collaboration avec les structures nationales de recherches agronomiques.

7 grands programmes de recherche subdivisés en départements contribuent au développement rural des régions tropicales et subtropicales :

- Agronomie, gestion de l'environnement et des ressources naturelles
- Connaissance et amélioration des plantes
- Défense des cultures
- Production animales
- Technologies (transformation des produits agricoles)
- Economie et sociologie (impact sur les marchés agricoles).
- Biométrie et mathématiques appliquées (application aux domaines liés à l'agronomie).

Le département « Cultures Pérennes » vise à améliorer la compétitivité de l'hévéa, du palmier à huile, du cocotier du caféier et du cacaoyer. En effet, les cultures pérennes tropicales (villageoises ou industrielles), ne produisent plus uniquement pour l'exportation, mais approvisionnent désormais les marchés intérieurs et régionaux.

III. LE LABORATOIRE GENETROP

GeneTrop (génétique tropicale) est un laboratoire regroupant des biologistes du CIRAD et de l'IRD. Ce rapprochement permet une étroite collaboration entre les deux organismes concernant les programmes de recherches communs.

Sa vocation primaire est de valoriser la biodiversité végétale des régions tropicales ayant un intérêt économique pour les pays producteurs.

GeneTrop est subdivisé en 3 unités :

- L'unité GAP (Génétique et Amélioration des Plantes).
- L'unité Phytopathologie.
- L'unité PCMA (Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Arbres).

D'une manière plus globale, GeneTrop a comme grands axes de recherche :

- L'étude de la variabilité du génome des plantes et des parasites.
- La possibilité de transférer un caractère d'une plante à une autre.
- La compréhension des interactions « hôte-microorganismes pathogènes ».
- La compréhension des mécanismes de l'embryogenèse somatique pour la production de plantes conformes.

Ces recherches concernent 5 espèces cultivées en zone tropicale et dont l'enjeu économique est majeur pour cette partie du monde et qui sont : le café, le cocotier, l'igname, le riz et le palmier à huile.

L'équipe qui travaille sur le palmier à huile s'intéresse principalement à l'embryogenèse somatique, aux variations somaclonales, à la création de banque d'ADN complémentaires, à la recherche de marqueurs moléculaires contre une anomalie florale, et à la méthylation de l'ADN génomique.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



Figure 1 : Plantation de Palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.)



Figure 2 : Régimes de fruits de Palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.)

I. LE PALMIER A HUILE

1.1. Classification et Morphologie

Le palmier à huile (*Elaeis guineensis Jacq*) est une monocotylédone pérenne arborescente de la famille des Arécacées.

A l'âge adulte, il est constitué d'un stipe unique sans ramification, présentant à son sommet une couronne de 40 à 50 palmes longues de 5 à 8 mètres (Figure 1). Chaque mois, le méristème apical unique initie en moyenne 2 feuilles à l'aisselle desquelles se développent les inflorescences mâles et femelles. L'ancrage de la plante est assuré par des racines adventives d'une longueur moyenne de 15 mètres.

1.2. Le mode de reproduction

Le palmier est une espèce dioïque temporelle présentant sur le même pied des cycles successifs de floraison mâle et femelle (Cruden, 1988). C'est donc une plante allogame obligatoire, à pollinisation essentiellement entomophile (Syed, 1982). Le régime de fruits, composé de 500 à 2000 drupes (Figure 2), atteint sa maturité environ 6 mois après la nouaison. Chaque fruit est composé d'un albumen renfermant un embryon, d'un endocarpe, d'un mésocarpe (pulpe) et d'un épicarpe.

1.3. Intérêts Economiques

Originaire de l'Afrique de l'Ouest, le palmier à huile a vu son exploitation industrielle débiter au début du XX^{ème} siècle, d'abord en Asie du Sud Est (Malaisie, Indonésie), puis en Afrique et au Brésil depuis le début des années 1920.

Son rendement en huiles, 4 tonnes/ha/an est le plus important de tous les oléagineux. Il est après le soja, la deuxième source mondiale de corps gras d'origine végétale .

Deux huiles sont extraites de ses fruits :

- L'huile de palme, extraite de la pulpe, constitue environ 90% de l'huile totale contenue dans le fruit. L'huile obtenue après plusieurs étapes de purification est principalement utilisée dans l'industrie alimentaire.
- L'huile de palmiste, extraite de l'amande, est parfaitement adaptée à la fabrication de savons et détergents grâce à sa forte teneur en acides gras insaturés.

Pour les pays producteurs, cette plante représente un intérêt économique majeur, d'autant plus que la consommation mondiale d'oléagineux ne cesse d'augmenter avec l'accroissement de la demande des pays très peuplés (Chine, Inde).

1.4. Production de matériel végétal amélioré par voie sexuée

Depuis 1960, la variété couramment cultivée dans les plantations résulte d'un croisement entre les variétés *dura* et *pisifera*. Les hybrides obtenus (appelés *tenera*) donnent des rendements élevés en huile de bonne qualité. Néanmoins, la longueur du cycle de sélection (10 à 15 ans) ralenti (très fortement) la fixation des caractères recherchés au cours des cycles successifs de sélection, d'où une hétérozygotie parentale importante, et une forte hétérogénéité des rendements obtenus sur la descendance. De plus, le palmier étant une plante allogame, il est très difficile d'effectuer une sélection classique sur les hybrides. Il a alors été mis en place, un schéma de sélection récurrente réciproque.

Callogenèse



Cals en prolifération au niveau d'un explant foliaire.



Prolifération cellulaire



Prolifération de suspensions cellulaires en milieu liquide.



Embryogenèse



Formation des embryons après étalement en milieu solide.



Développement des embryons en pousses feuillées.



Développement des vitroplants



Développement des pousses feuillées.



Enracinement des pousses feuillées

Planche 1 : Processus de production de clones de palmier à huile par embryogenèse somatique en milieu liquide.

**PROLIFERATION DES
SUSPENSIONS
EMBRYOGENES**

EXPRESSION DE L'EMBRYOGENESE

Phase 1 : Proembryogenèse

Phase 2 : Morphogenèse embryonnaire

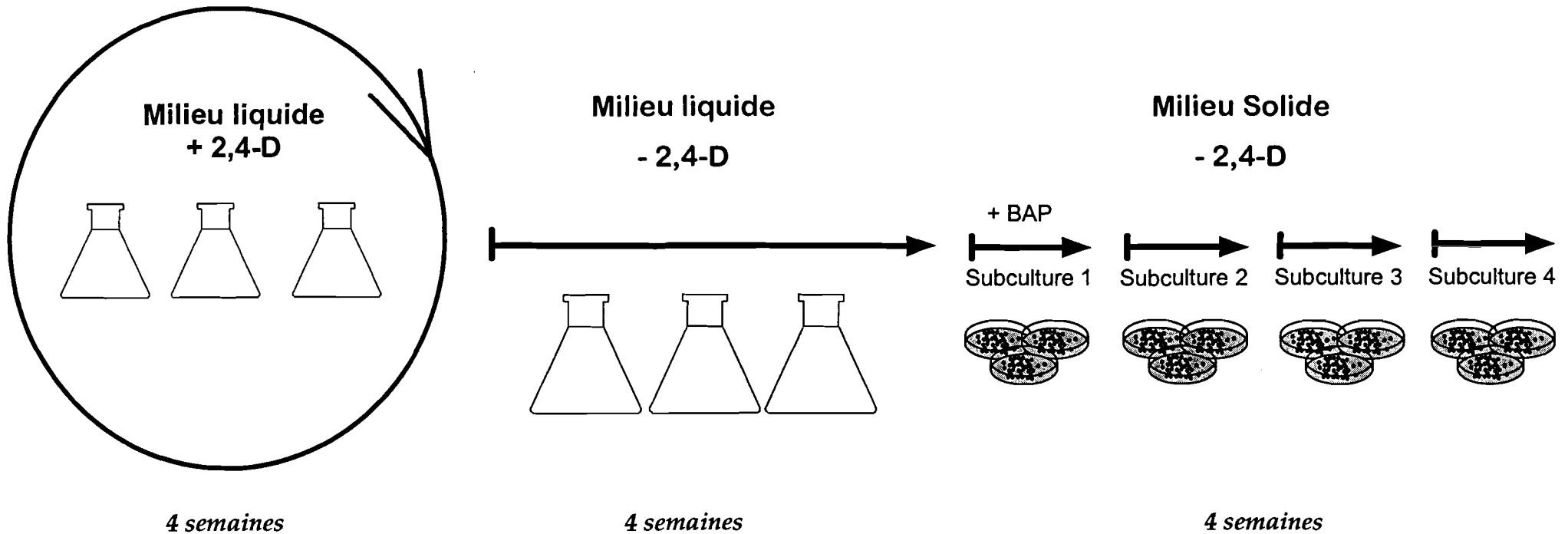


Figure 3 : Schéma du protocole d'embryogenèse somatique du Palmier à huile en milieu liquide montrant les différentes étapes en relation avec l'apport d'hormones exogènes.

Pour diffuser les résultats de la sélection traditionnelle, des techniques de multiplication végétative permettant la propagation clonale en masse des individus les plus performants ont été mises en place.

1.5. Production de matériel végétal amélioré par voie clonale

De part la présence d'un seul apex végétatif, et l'absence de rejets, la multiplication végétative du palmier à huile par les méthodes horticoles classiques n'est pas possible. La seule voie possible pour la propagation clonale d'individus élites reste l'embryogenèse somatique. Cette technique consiste à obtenir un embryon similaire à un embryon zygotique, à partir de cellules non reproductrices.

Depuis les années 1970, de nombreuses équipes travaillent sur la mise au point de protocoles d'embryogenèse somatique sur le palmier à huile, à partir de feuilles, de racines ou de fleurs pour multiplier à une échelle industrielle des individus élites (Duval *et al.*, 1995).

Un procédé de multiplication par embryogenèse somatique adventive sur cal (en milieu solide) a été mise au point par Pannetier *et al.* (1981) à partir de fragments de jeunes feuilles. Il est utilisé à l'échelle pilote dans différents pays (Rival *et al.*, 1997). Ce procédé passe obligatoirement par un stade callogenèse (embryogenèse indirecte). Trois types de cals embryogènes sont générés. Les CCN (Cals Compacts Nodulaires) observés en majorité et utilisés lors de la production de masse. Les cals granulaires qui sont friables et les CCR (Cals à Croissance Rapide) qui sont des massifs de cellules en division rapide, et très friables. Ces 2 derniers sont formés à la surface des CCN, avec une fréquence de 1%.

L'obtention de cals est réalisée sur un milieu riche en 2,4-D. Puis grâce à une modification de la balance hormonale, quelques cellules passent successivement par un stade callogenèse, embryogenèse, développement de la pousse feuillée puis enracinement.

La micropropagation par embryogenèse adventive nécessite beaucoup de temps et de main d'œuvre (longueur de l'expression de l'embryogenèse, séparation manuelle des plantules). Ainsi, le développement d'une technique de culture en milieu liquide a été étudié dès les années 80 et a permis d'envisager la mise au point d'un procédé d'embryogenèse à partir de suspensions embryogènes. De telles suspensions, initiées à partir de cals friables granulaires ont été obtenues notamment par de Touchet *et al.* (1991).

Avec ce système de régénération, les embryons sont produits en grande quantité, individualisés et présentent un développement relativement synchrone (Planche 1). La production d'embryons est comme précédemment déterminée par la présence ou par l'absence de régulateurs de croissance à des étapes clés du procédé (Figure 3).

Bien que ces procédés d'embryogenèse somatique semblent prometteurs pour produire des individus élites de palmier à huile en grand nombre, ils présentent encore plusieurs inconvénients notamment pour un développement industriel.

En effet, les délais d'obtention sont assez longs ; 2 ans sont nécessaires entre le prélèvement de l'explant et le sevrage des premiers vitroplants.

Par ailleurs, il a été constaté qu'un certain nombre de clones présentaient une variation phénotypique par rapport à l'arbre mère. La réalisation de plantations expérimentales à partir de vitroplants issus d'embryogenèse somatique, a mis en évidence une anomalie de la morphogenèse florale désignée sous le nom d'anomalie « mantled ». Le premier phénotype variant a été observé pour la première fois en 1986 en Malaisie (Corley *et al.*, 1986) puis en Côte d'Ivoire (Duval *et al.*, 1988).

Ce phénotype de variation somaclonale, observé uniquement sur des plants issus de culture *in vitro*, affecte de manière inégale les différents clones produits (sur 30000 palmiers issus de 127 clones, 9,6% présentent une anomalie).

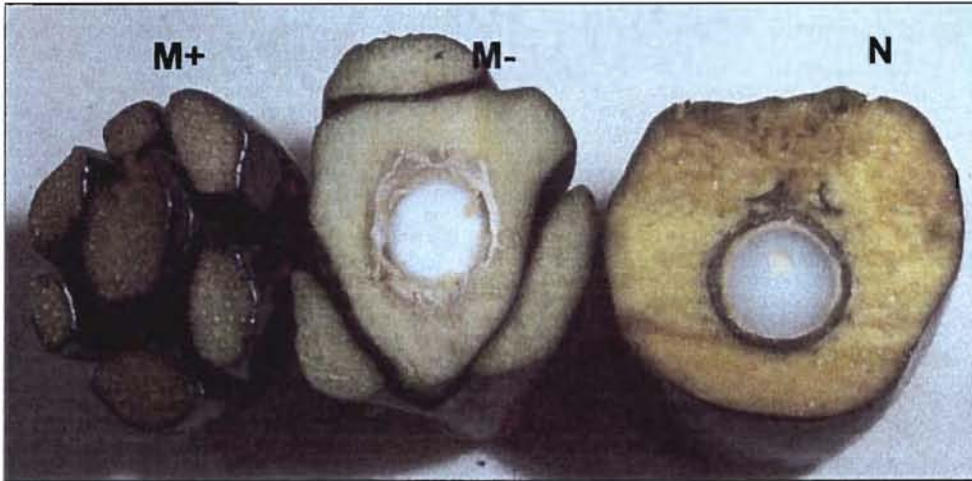


Figure 4 : Section transversale de fruits de palmier à huile : fruit normal (N), « mantled » léger (M-) et « mantled » grave (M+).

Les plants issus de semis ne présentant pas cette anomalie florale, il est probable qu'elle trouve son origine dans le processus de micropropagation.

1.6. Variation Somaclonale

1.6.1. Quelques généralités

Selon Larkin et Scowcroft (1981), une variation somaclonale est une variation incontrôlée du génotype ou du phénotype lors de la culture cellulaire. Les variations somaclonales sont le plus souvent hérissables, et peuvent affecter la structure du génome, ou bien son expression. Concernant la structure du génome, elles peuvent soit entraîner des modifications au niveau du génome (altération du niveau de ploïdie), soit au niveau du chromosome (translocation, délétion de morceaux de chromosome), ou bien au niveau du gène (mutation ponctuelle) (Fourré *et al.*, 1997). Pour ce qui est de l'expression du gène, le degré de méthylation de l'ADN génomique pourrait jouer un rôle dans les variations somaclonales. En effet, le taux de méthylation serait un signal d'activation ou d'inactivation des gènes (Phillips *et al.*, 1998 ; Holliday, 1989).

Les origines des variations somaclonales peuvent être multiples : nature du génotype, âge de la culture, composition des milieux de culture avec en particulier le contenu hormonal. En effet, les concentrations élevées en régulateurs de croissance seraient perçues par la culture végétale comme un stress environnemental, générateur d'anomalies (Karp, 1994). Parmi les régulateurs de croissance, l'herbicide 2,4-D (acide 2,4 dichlorophénoxyacétique), très utilisé pour l'embryogenèse somatique, est réputé augmenter l'instabilité chromosomique lorsqu'il est utilisé à forte concentration.

De plus, les résultats de Lo Schiavo *et al* (1989), a démontré l'action hyperméthylante du 2,4-D sur le génome de la carotte, entraînant l'apparition de variants par embryogenèse somatique.

Par ailleurs, des études faites sur le maïs ont mis en évidence un certain nombre d'effets des auxines de synthèse (2,4-D ; 2,4,5-T) sur l'ADN nucléaire, avec notamment une modification de son organisation et de sa composition (Nagl, 1988).

1.6.2. La variation somaclonale « mantled » chez le palmier à huile

A/ Observations phénotypiques de l'anomalie

L'anomalie « mantled » consiste en une féminisation des pièces mâles en pseudocarpelles dans les fleurs des deux sexes. L'anomalie touche aussi bien les fleurs mâles que les fleurs femelles. Ceci laisse supposer l'existence d'une perturbation au niveau du processus de différenciation sexuelle des organes floraux (Besse, 1992). La modification des verticilles floraux peut entraîner soit la formation de fruits anormaux (Figure 4), soit la stérilité partielle ou totale de l'arbre, selon la gravité de l'anomalie. La distribution de l'anomalie est très hétérogène ; ni toutes les fleurs d'un même arbre ni tous les arbres d'un même clone ne sont affectés au même degré.

Au cours du temps, il a été observé chez certains individus, une réversion totale du phénotype anormal vers le phénotype normal. Ce phénomène se produit d'autant plus lentement que l'anomalie est prononcée. Ainsi, en 9 ans, 100% des individus « anormaux légers » sont redevenus normaux, ainsi que 50% des « anormaux graves » (Konan *et al.*, 1997).

Il a aussi été observé au champ que la fréquence des anormaux varie selon la nature du cal d'origine (CCN ou CCR) (Duval *et al.*, 1988). Tous les palmiers issus de CCR sont anormaux alors que les CCN ne produisent peu d'anormaux.

La nature du cal utilisé est donc un élément important dans l'apparition et la fréquence des individus anormaux.

La non conformité d'une partie des palmiers régénérants (avec sa conséquence sur le rendement en huile) empêche la commercialisation des clones. Elle constitue une limite au développement de la multiplication végétative par embryogenèse somatique chez cette espèce.

La mise en place d'études expérimentales pour analyser cette anomalie florale et la recherche de son déterminisme est donc nécessaire.

B/ Recherche du déterminisme de l'anomalie "mantled" du palmier à huile

Différentes approches ont été utilisées pour mettre en évidence les mécanismes à l'origine de l'anomalie florale.

Tout d'abord, une recherche de modifications structurales du génome n'a montré aucune différence entre les plants variants et les plants normaux : pas de différence de quantité d'ADN nucléaire observable par cytométrie en flux, pas de polymorphisme observable par RAPD (Rival *et al.*, 1997-1998). Ces observations ponctuelles ainsi que les autres caractéristiques de l'anomalie florale observées au champ ont conduit à proposer une origine épigénétique (c'est à dire qu'elle affecterait la régulation de l'expression du gène, et non la structure proprement dite du gène) pour la variation somaclonale.

Dans cette optique, plusieurs axes de recherche sont actuellement développés au sein de l'équipe IRD-CIRAD-CP et visent à mettre en évidence le déterminisme moléculaire des phénomènes épigénétiques conduisant à l'apparition de variants somaclonaux.

Le but pratique de ces études est de diminuer et contrôler le taux de variants induits par la culture *in vitro*, et obtenir des outils et des marqueurs précoces pour détecter les plants variants.

Afin de mener à bien ces objectifs, 3 grands axes de recherche sont actuellement en cours :

- ✓ Recherche de marqueurs moléculaires précoces (à partir d'ARN messagers) pour différencier l'expression du génome entre les plants normaux et anormaux des mêmes clones à différents stades de développement.
- ✓ Recherche de différences de méthylation de l'ADN génomique entre des individus normaux et anormaux des mêmes clones: méthylation globale, méthylation de la partie transcrite de l'ADN, profils RFLP spécifiques.
- ✓ Etude du rôle des régulateurs de croissance sur la méthylation de l'ADN.

Les travaux du stage s'intègrent dans ce troisième axe de recherche. En effet, les régulateurs de croissance pourraient être impliqués directement ou indirectement dans les variations héritables ou non, induites par les protocoles de culture *in vitro* (Karp, 1994). De même, Hare et Van Staden (1997) ont proposé l'implication des cytokinines sur la méthylation du génome. Enfin, ces variations de la méthylation de la cytosine de l'ADN sont maintenant considérées comme un facteur important de variation de l'expression des gènes et de là, comme une cause de l'apparition de variants épigénétiques.

Dans le cas du palmier à huile, Besse (1992) a montré que les cals "anormaux" de type CCR montraient une chute de leur teneur en cytokinines endogènes par rapport aux CCN dits "normaux". Le 2,4-D est aussi soupçonné d'avoir une action sur la méthylation de l'ADN (Lo Schiavo, 1989), cette action pourrait être indirecte *via* son incidence sur la production de cytokinine.

Pour mener à bien ce type d'investigation, un protocole original a été établi afin de mesurer, au long du processus d'embryogenèse somatique, le degré de méthylation de l'ADN en parallèle avec les quantités de 2,4-D et de cytokinines endogènes présentes dans les tissus.

Ce protocole utilise l'embryogenèse somatique du palmier par suspension cellulaire sur milieu sans charbon actif, le prélèvement d'échantillons de tissus végétaux et de milieux de culture aux différentes phases clés du processus, la mise au point d'un procédé de détection et de dosage de traces de 2,4-D par ELISA, plus sensible que l'analyse par HPLC et le dosage de la méthylation de l'ADN des tissus.

1.6.3. Objectifs de l'étude proposée

L'objectif de cette étude est d'essayer de mettre en évidence un effet (ou non) du 2,4-D sur la teneur en cytokinines dans tissus de palmier à huile à différents stades de culture de l'embryogenèse somatique. L'approche choisie et la quantification simultanée de ces deux types d'hormones dans des échantillons de palmier à huile ayant reçus des traitements différents en 2,4-D et prélevés à deux stades de culture précis (stades suspensions cellulaires et proembryons).

La méthode choisie pour la quantification des hormones endogènes est celle développée au laboratoire du Prof. Miginiac (Université Paris VI) et son adaptation aux dosages simultanés des cytokinines et du 2,4-D a constitué la première partie de cette étude. Nous avons donc adapté chacune des étapes du dosage à nos conditions : définition d'un gradient de purification par HPLC des formes cytokinines et 2,4-D, définition des conditions optimales d'utilisation des anticorps anti-2,4-D en ELISA.

Dans une deuxième partie, nous avons appliqué cette méthode aux échantillons de palmier à huile (suspensions cellulaires et proembryons). Les résultats obtenus seront présentés et discutés.

MATERIEL & METHODES

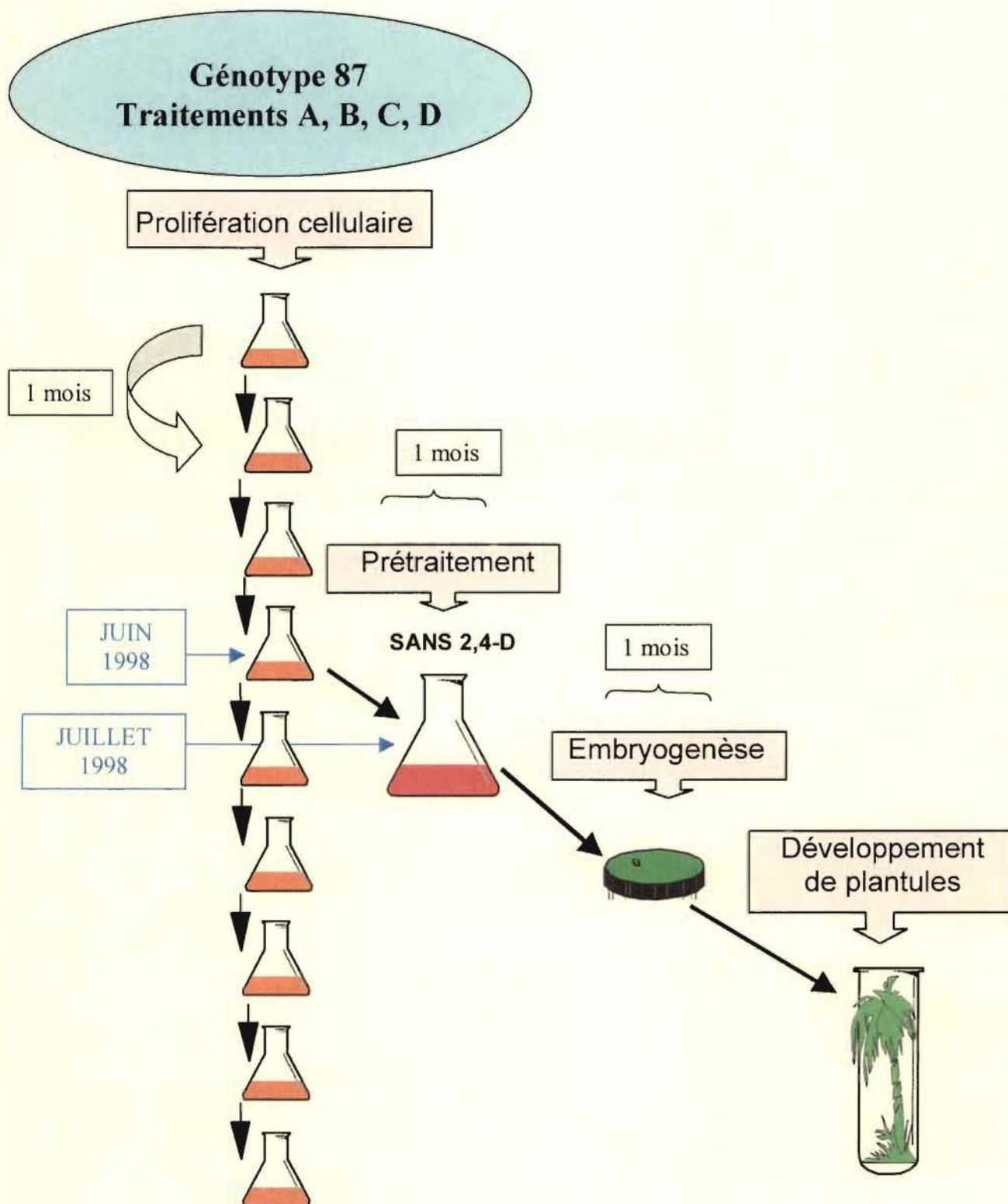


Figure 5 : Schéma expérimental utilisé pour obtenir le matériel végétal qui a servi au dosage des phytohormones.

La date « Juillet 1998 » représente la date de prélèvement des échantillons végétaux pour le dosage hormonal des suspensions cellulaires et des pro-embryons.

I. MATERIEL VEGETAL

Un protocole expérimental de régénération de plantules par suspensions cellulaires, a été mis au point afin de rechercher un effet du 2,4-D sur le degré de méthylation de l'ADN et sur les teneurs en cytokinines des tissus de palmier à huile, à différents stades du processus.

1.1. Protocole expérimental

Le dosage hormonal a été effectué sur du matériel prélevé à différents stades de culture, et issu d'un même génotype (n° 87) réputé se diviser rapidement en suspensions cellulaires.

1.1.1 La prolifération cellulaire

Dans le protocole standard (de Touchet *et al*, 1991), le milieu de prolifération des suspensions cellulaires contient du charbon actif (1g/l), du 2,4-D (75mg/l), et de la BAP (1mg/l). Afin de n'avoir aucune interaction entre ces 3 composés, la BAP et le charbon actif ont été supprimés dans cette expérimentation. Ce dernier composé adsorbe les composés organiques et les relargue dans le milieu de culture de manière mal contrôlée.

Des cals friables de type granuleux issus de CCN, ont été cultivés dans un milieu liquide contenant du 2,4-D (Annexe 1). La présence de cette phytohormone dans le milieu de culture, permet aux cellules indifférenciées de se proliférer. Pour notre expérience, quatre concentrations de 2,4-D ont été appliquées dans les milieux de culture :

Traitement	Concentration 2,4-D (mg/l)	Concentration (μ M)
Milieu A	0,5	2,26
Milieu B	0,75	3,38
Milieu C	1	4,52
Milieu D	1,2	4,61

Les suspensions cellulaires ont été repiquées chaque mois, pendant 18 mois. Le repiquage s'est effectué dans des erlenmeyers contenant 20 ml de milieu de prolifération cellulaire, à raison de 200 à 250 mg de suspension et de 8 répétitions par traitement et par mois. Les subcultures sont placées sur table d'agitation (à 90 rotations par minute), dans une chambre de culture à 27°C avec une photopériode de 12h/12h et une hygrométrie à 60%.

1.1.2. La régénération de plantules

A/ La pro-embryogenèse (= prétraitement)

Après 1 mois de prolifération cellulaire, une partie des cellules est repiquée sur un milieu de prolifération, et l'autre partie rejoint le schéma de régénération de plantules (Figure 5).

Le premier stade de différenciation cellulaire (prétraitement) est fait dans du milieu liquide (Mi 52, Annexe 1) ne contenant pas de 2,4-D pour induire l'embryogenèse.

Pour obtenir les pro-embryons, 500 mg de suspensions cellulaires sont repiquées dans 50 ml de milieu et sont placés 1 mois dans les mêmes conditions que la prolifération cellulaire dans des erlenmeyers de 250 ml. Au cours de cette phase, de nombreuses divisions

cellulaires sont observées (Morcillo, 1998). Ainsi, au terme de cette étape, des proembryons pluricellulaires seront formés.

B/ L'embryogenèse

Après un mois de culture en prétraitement, la culture est tamisée à travers une toile Scrynel à maille de 1mm. Les agrégats supérieurs à 1mm sont éliminés car ils génèrent des embryons multiples.

Les pro-embryons inférieurs à 1mm sont étalés sur milieu solide dans des boîtes de Pétri (50 mg/boîte), contenant 20 ml de Mi 52 solide, et de la BAP (1,127 mg/l) durant 1 semaine pour stimuler la mise en place de l'apex caulinaire. L'étalement sur milieu solide favorise le développement des embryons.

Ensuite, durant 3 semaines les embryons sont repiqués chaque semaine sur Mi 52 solide ne contenant pas d'hormones, où ils continuent à se développer (de 1 à 2 mm).

Après 4 semaines de culture en milieu solide, des embryons individualisés sont formés, avec la présence d'un pôle racinaire et d'un pôle caulinaire.

C/ Développement des vitroplants

A ce stade, les plantules sont comptabilisées et placées sur du Mi 52, contenant de l'ANA (0,5 mg/l) pour faciliter l'enracinement après émergence de la pousse feuillée.

1.2. Le matériel végétal utilisé pour le dosage hormonal

Comme nous l'avons vu précédemment pour chaque traitement de 2,4-D, les suspensions cellulaires obtenues après 1 mois de prolifération cellulaire sont divisées en 2 lots :

- Un premier lot est repiqué pour entretenir les suspensions cellulaires.
- Un second lot rejoint le stade de prétraitement pour permettre la régénération de plantules.

Ces 2 lots sont mis en culture en même temps et pour une durée identique. Ainsi, après 1 mois de culture, un échantillon de suspensions cellulaires et de pro-embryons est prélevé pour chaque traitement de 2,4-D (Figure 5). Ces prélèvements sont congelés et conservés à -80°C jusqu'au dosage hormonal. Pour chaque échantillon, le dosage a été répété 2 fois (Tableau 1).

Le stade suspension cellulaire et le stade pro-embryon ont tous les 2 eu une même durée de culture (1 mois) afin d'éviter une influence du facteur « temps » sur le dosage hormonal.

Tableau 1 : Caractéristiques et identifications des échantillons végétaux utilisés pour le dosage hormonal.

Traitements	Nature de l'échantillon	Nombre de répétitions
A	Suspensions cellulaires	2
	Pro-embryons	2
B	Suspensions cellulaires	2
	Pro-embryons	2
C	Suspensions cellulaires	2
	Pro-embryons	2
D	Suspensions cellulaires	2
	Pro-embryons	2

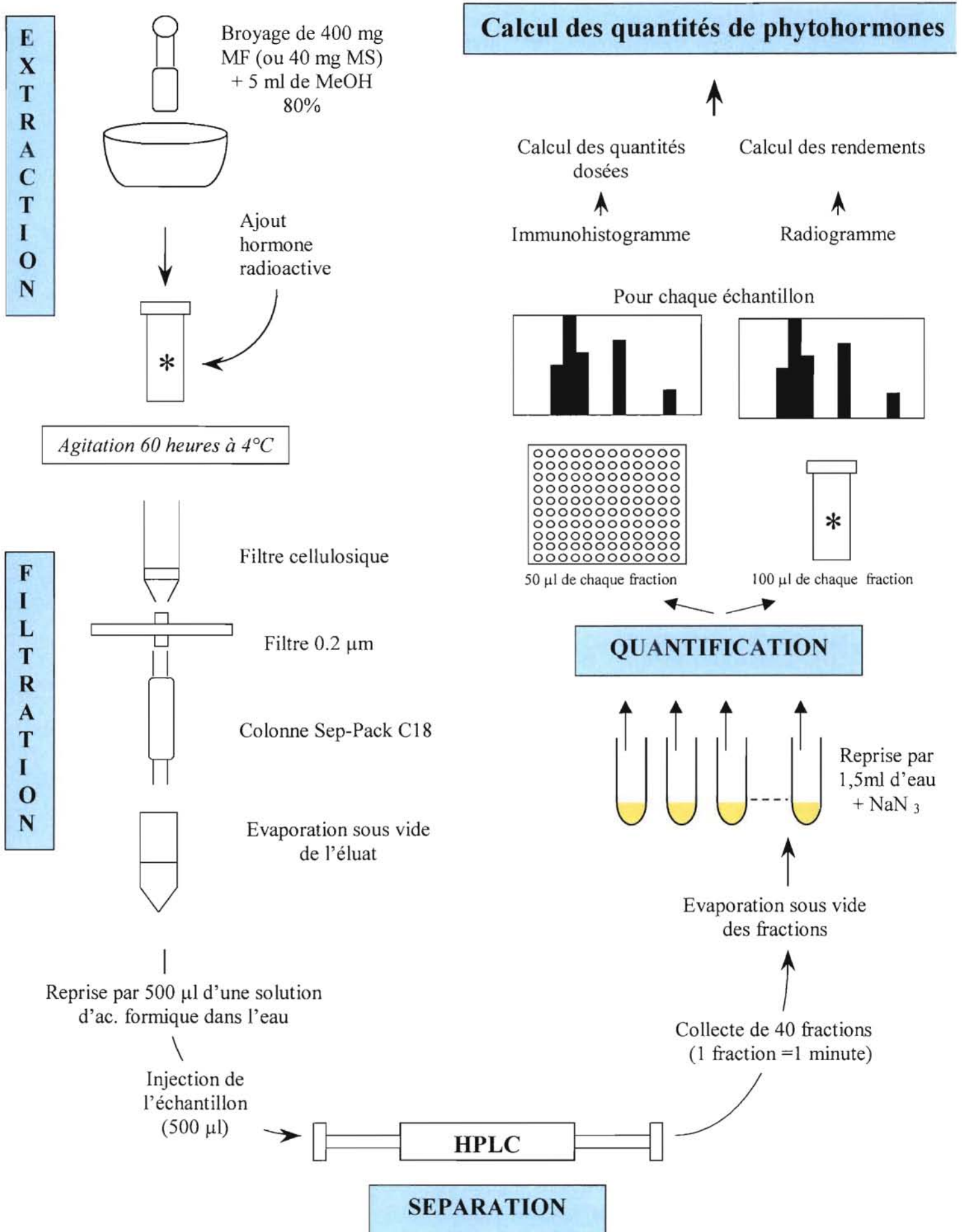


Figure 6 : Les différentes étapes du protocole suivi pour l'analyse des phytohormones contenues dans les échantillons végétaux d'après Hocher, 1992.

II DOSAGE DES DIFFERENTES PHYTOHORMONES

La méthode utilisée pour quantifier les hormones végétales étudiées a été mise au point par Leroux (1984), Sotta (1985) et Maldiney (1988). Elle permet de détecter dans un même échantillon différentes formes hormonales telles que les cytokinines, les auxines et l'acide abscissique.

Entre le prélèvement de l'explant à doser et le dosage lui-même, une série d'étapes sont nécessaires.

La première étape consiste à extraire avec une solution méthanolique les différentes formes hormonales présentes dans l'échantillon.

Dans un deuxième temps, le « mélange » hormonal extrait, est séparé par HPLC.

Ensuite, les hormones individualisées sont détectées et dosées par une méthode immunoenzymatique (ELISA).

Dans cette partie, nous décrivons chaque étape intervenant dans le protocole. Puis dans la partie résultats, nous exposerons les modifications du protocole faites pour séparer et doser les différentes phytohormones étudiées. Enfin nous discuterons des résultats obtenus tout en proposant des hypothèses pour optimiser la fiabilité de la méthode de dosage.

2.1. Extraction et purification des hormones à partir de l'explant

2.1.1. L'Extraction

400 mg d'échantillon conservé à -80°C sont broyés dans un mortier avec une solution contenant 2 ml de méthanol aqueux (80 :20, v :v) et un antioxydant, le butylhydroxytoluène (BHT, 40mg/l, Sigma USA). L'extrait est versé dans un tube de 30 ml (Figure 6).

Après avoir rincé le mortier avec 3 ml de solution, environ 1000 Becquerels de ZR radioactif (Olchemin, République Tchèque) marqué au tritium et environ 1000 Becquerels de 2,4-D radioactif, marqué au carbone 14 (Amersham, RU) sont ajoutés. L'apport de ces deux hormones marquées par radioactivité permettra, lors d'une étape ultérieure, de connaître le rendement de purification de chaque hormone suite aux pertes liées aux étapes d'extraction, de filtration et de séparation.

Le laboratoire GeneTrop ne disposant pas d'iPA marqué radioactivement, nous avons donc estimé le rendement de cette hormone à partir des résultats obtenus pour la zéatine riboside (ZR).

L'extrait ainsi obtenu est mis à 4°C en agitation à l'obscurité pendant deux jours.

2.1.2 La Filtration

Elle permet à l'issue de plusieurs étapes, d'éliminer un certain nombre de composés autres que les hormones. Il est indispensable de filtrer l'échantillon végétal pour ne pas gêner la purification par HPLC (Figure 6).

La première étape permet d'éliminer les débris grossiers et fins.

L'extrait est versé dans une seringue contenant du coton, et un filtre de $0,2\ \mu\text{M}$ (Sartorius, France) à son extrémité.

Pour minimiser la perte d'extrait, la paroi de la seringue est rincée avec du méthanol aqueux ayant servi à l'extraction.

En seconde l'extrait obtenu est ensuite passé sur mini-colonne Sep-Pack (Waters, Etats Unis).

Cette étape permet de retenir sur la mini-colonne les pigments végétaux ainsi que les composés phénoliques et certains lipides, tout en laissant passer les hormones.

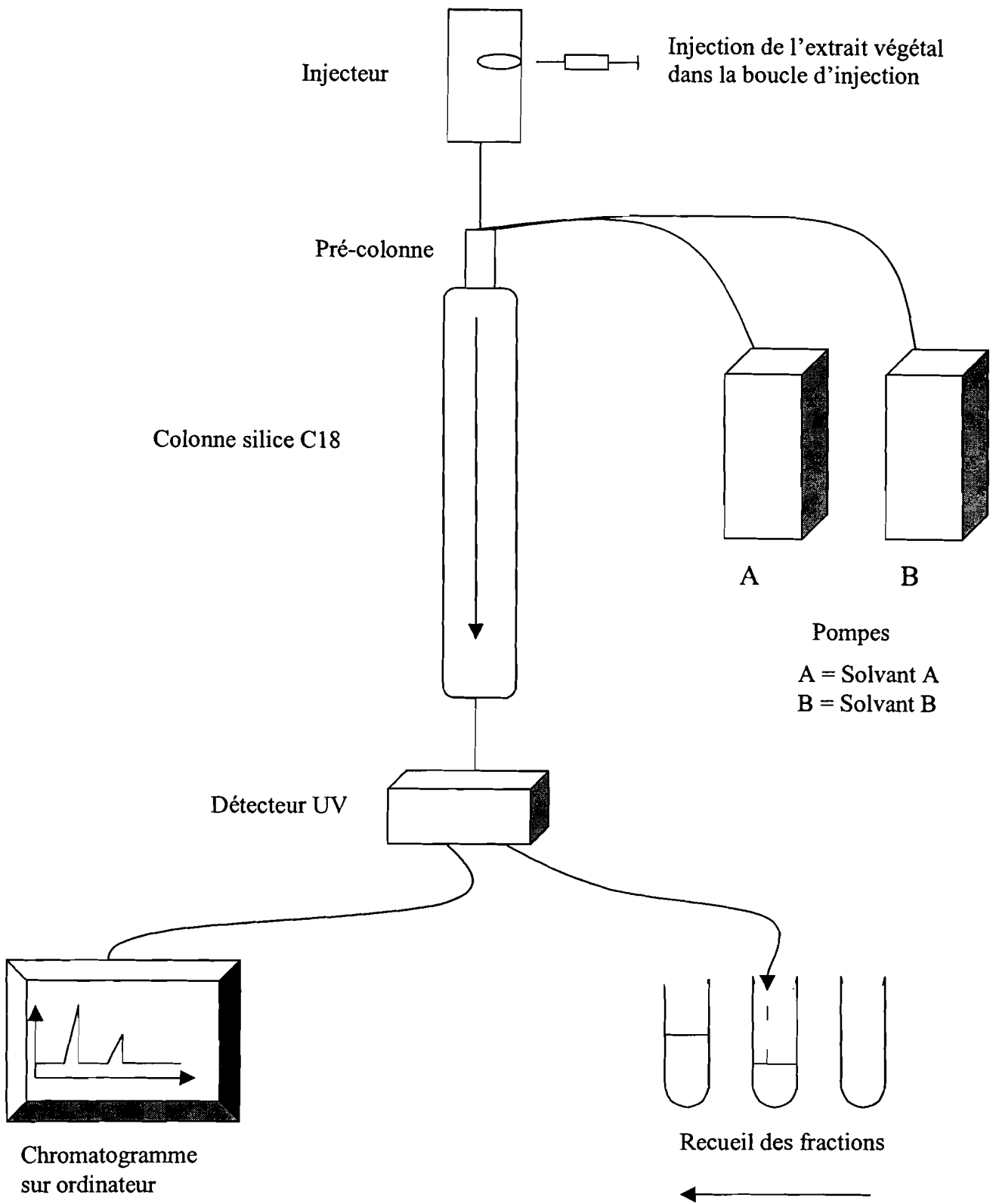


Figure 7 : Schématisation de la chaîne chromatographique à hautes performances.

Avant le passage de l'extrait, il est nécessaire d'équilibrer la mini-colonne en apportant 4 ml de méthanol 100% , puis 4 ml de méthanol aqueux utilisé pour l'extraction.

L'extrait est récupéré dans un tube de centrifugation.

A l'issue de cette étape, l'extrait est évaporé (évaporateur rotatif Jouan, France) .

Le culot peut ensuite être conservé à -80°C avant le passage à l'HPLC.

2.2. Séparation des différentes formes hormonales par HPLC

2.2.1. Principe général de l'HPLC (Chromatographie en Phase Liquide à Hautes Performances)

C'est une méthode physique qui permet de séparer et de quantifier de nombreux types de composés répartis entre deux phases : la phase stationnaire et la phase mobile.

La première chromatographie en phase liquide a été utilisée en 1903 par un botaniste Russe qui réussit à séparer des pigments végétaux.

La chromatographie liquide classique sur colonne, était caractérisée par des tubes ouverts, avec des dimensions de l'ordre de 15 à 20 cm de long, pour un diamètre de 1 à 4 cm. Le remplissage était effectué avec un matériau grossier. La force motrice agissant sur la phase mobile pour lui faire traverser la colonne était simplement la pesanteur.

Il a fallu attendre les années 1950 pour qu'apparaisse l'HPLC, qui présente de nombreux avantages par rapport à la chromatographie classique :

Les colonnes sont de petit diamètre (2 à 5 mm), et elles sont réutilisables.

Le remplissage des colonnes est fait avec un matériau composé de particules très fines permettant une séparation plus précise des composés.

La pression d'entrée est relativement élevée (environ 100 bars), et le débit de la phase mobile est contrôlé par des pompes à haute pression . Ce contrôle permet une meilleure reproductibilité du fonctionnement, améliorant ainsi la précision et la fidélité des résultats obtenus.

Les dispositifs d'introduction des échantillons sont très précis, il n'est donc pas nécessaire d'introduire des volumes d'échantillons importants.

Des détecteurs (spectrophotomètre) fonctionnent en continu sur des débits très faibles et permettent la détection de quantités très faibles. Ils permettent aussi le tracé de « chromatogrammes » (réponse du détecteur en fonction du temps).

Les appareils sont standardisés et automatisés, et permettent de réaliser des analyses rapides.

Pour synthèse, l'HPLC (Figure 7) se compose essentiellement d'une pompe assurant la propulsion de la phase mobile, d'un dispositif d'injection d'échantillon, d'une colonne renfermant la phase stationnaire et d'un détecteur pour observer la séparation effectuée et fournir des données permettant l'évaluation qualitative et quantitative des résultats. En fin de procédé, un collecteur de fraction peut recueillir les composants séparés par la colonne (Yost *et al.*, 1989).

La séparation des composants va être fonction de leur différence d'affinité par rapport à deux phases : la phase stationnaire et la phase mobile.

La phase stationnaire

La séparation est le résultat d'interactions entre l'échantillon et la phase stationnaire ; son choix est donc important.

Elle peut être constituée de silice microporeuse ou de verres de porosité contrôlée sur lesquels on effectue un greffage de colonnes à C8 ou C18.

Ces « phases greffées » sont extrêmement résistantes et n'exigent aucun conditionnement. Dans la majorité des cas, elles sont apolaires.

Lorsque les phases greffées sont apolaires on parle de chromatographie en phase inversée.

La phase mobile

Cette phase peut être de nature chimique très différente, selon les molécules à séparer.

Le choix des substances constituant cette phase est donc très important pour obtenir une bonne séparation des molécules.

Lorsqu'une seule molécule est à séparer, la phase mobile est constante, c'est à dire que tout au long de la séparation, la composition de cette phase reste la même. On parle alors d'une élution isocratique.

Cependant, si plusieurs molécules doivent être séparées, il est nécessaire de modifier au cours de la séparation les composantes de la phase mobile. Dans ce cas on parle d'un gradient d'élution.

Chromatographie en phase inversée

En phase inversée, la phase stationnaire est apolaire (hydrocarbures par exemple), et la phase mobile est polaire (eau, alcool).

Dans ces conditions, un composé sera retenu d'autant plus longtemps sur la surface de la colonne qu'il sera apolaire car il a peu d'affinités avec la phase mobile. Et inversement, un composé fortement polaire sortira vite de la colonne, car il y aura formation de nombreuses liaisons avec la phase mobile.

La polarité des constituants à séparer joue un grand rôle dans le choix de la colonne ; il devient donc nécessaire de trouver un compromis dans le choix des conditions chromatographiques dans le cas où les différences entre les polarités des constituants seraient importantes.

La séparation des différentes formes hormonales a été faite avec ce type de chromatographie.

2.2.2. Conditions expérimentales nécessaires à la séparation des phytohormones

A/ Caractéristiques et Paramètres de l'HPLC utilisée

L'HPLC (PHILIPS, Royaume Uni) utilisée comprend une colonne C18 à phase inverse (LiChrospher 100 RP-18, MERCK Allemagne), d'une longueur de 25 cm.

Le gradient d'élution, est formé à partir de 2 solutions séparées :

De l'eau avec 0,2% d'acide formique et 0,07% de triéthylamine (TEA), nommée « eau acide » .
Du méthanol avec du TEA 0,07%.

Ce gradient est formé en faisant intervenir à différents temps et à différentes proportions les deux solutions. Il permet ainsi de séparer les hormones étudiées en 50 min avec un débit de 800µl / min.

Le TEA permet une meilleure séparation des formes hormonales en annulant les interactions ioniques entre les molécules éluées et la phase stationnaire de la colonne (Lyakurwa, 1997). Les hormones sont détectées par spectrophotométrie à une longueur d'ondes de 270 nm (DéTECTEUR Pye Unicam PU 4021, PHILIPS). Le tracé d'un chromatogramme (logiciel PU 6000 PHILIPS) permet de connaître le temps de rétention de chaque forme hormonale.

B/ Protocole permettant la séparation des régulateurs de croissance

1^{ère} étape : Equilibrage de l'HPLC

Avant d'injecter un échantillon, la colonne est équilibrée avec de « l'eau acide ». Puis un mélange de témoins non radioactifs (10µl Z + 10µl ZR + 10µl iP + 10µl iPA + 30µl 2,4-D + 430 µl « eau acide » à 100 µM) est injecté pour connaître l'exactitude des temps de rétention de chaque hormone. Cette étape est aussi réalisée à la fin de la manipulation pour vérifier que les conditions externes (notamment température) n'ont pas modifié les temps de séparation de chaque hormone, par rapport au début de la manipulation.

2^{ème} étape : Estimation de la pureté de la solution radioactive

Il a été observé qu'au cours du temps, les solutions hormonales radioactives peuvent se dégrader. Pour calculer le rendement de chaque échantillon, il est donc nécessaire de connaître la pureté de la solution radioactive. Pour cela, il est nécessaire de passer des témoins radioactifs pour chaque hormone dosée. La solution radioactive testée doit être de même origine que celle incorporée dans les échantillons végétaux, lors de l'étape d'extraction.

Les solutions injectées dans l'HPLC sont les suivantes :

100 µl [3H]-ZR + 10 µl ZR (100µM) + 390 µl « eau acide ».

100 µl [14C]-2,4-D + 30 µl 2,4-D (100µM) + 370 µl « eau acide ».

L'éluat est recueillie en 50 fractions de 800µl, qui sont ensuite passées au compteur à scintillation

Passage au compteur à scintillation :

Cette machine détecte dans chaque fraction, la présence ou non de substances radioactives (exprimée en coups par minute), grâce à un produit qui amplifie les rayonnements émis par la radioactivité (liquide scintillant, Beckman, USA).

Les 800 µl de chaque fraction issue de l'HPLC sont chacun dilués avec 2 ml de liquide scintillant.

Parallèlement, 3 tubes témoins, non passés en HPLC, contenant 100 µl de solution radioactive et 2 ml de liquide scintillant sont eux aussi analysés.

Le rapport entre le pic de radioactivité retrouvé après HPLC, et la quantité de radioactivité de la solution de départ, permet d'estimer la pureté de la solution radioactive. C'est cette valeur qui sera utilisée ultérieurement pour calculer le rendement de chaque échantillon.

3^{ème} étape : Passage des échantillons végétaux

Passage à l'HPLC :

Après évaporation de l'éluat méthanolique, le culot comprenant les différentes formes hormonales est repris dans 500µl « d'eau acide ». Les 500µl sont injectés dans l'HPLC (Figure 6), puis des fractions de 1 minute sont collectées de 11 à 50 minutes (intervalle comprenant les hormones étudiées) pour ensuite être séchées par évaporateur rotatif sous vide.

Elles sont ensuite reprises avec 1,5 ml d'eau distillée additionnée d'un antibactérien, l'azoture de sodium (Sigma, Etats-Unis). Les fractions sont conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation en ELISA.

Radiogramme de chaque échantillon : Pour chaque échantillon, 100 µl de chaque fraction collectée additionnée de 2 ml de liquide scintillant sont analysés au compteur à scintillation. Cette étape permet de vérifier la localisation des hormones avec la solution radioactive présente dans l'échantillon. Elle permettra ultérieurement de calculer le rendement de purification, qui interviendra lors des calculs finaux des concentrations de chaque hormone analysée.

2.3. Dosage immunoenzymatique des phytohormones

2.3.1. Généralités

L'introduction d'un antigène (Ag) dans un organisme, permet l'activation des cellules immunitaires qui vont produire des anticorps (Ac) spécifiques.

Certaines régions de l'antigène déclenchent une réaction immunitaire dans l'organisme, qui se traduit par la production d'anticorps protégeant ainsi l'organisme de cette agression.

Un anticorps (protéine de haut poids moléculaire) agit spécifiquement contre un antigène, et pas contre les autres, c'est pourquoi l'immunité correspondante est qualifiée de **spécifique**. Cette faculté de reconnaissance qui est spécifique entre Ag-Ac a été exploitée et divers tests (immuno-essais) ont été mis au point.

Les immuno-tests, regroupent plusieurs techniques qui permettent le dosage d'antigènes de différentes natures chimiques comme les protéines, les polysaccharides, les virus et les bactéries. Ces tests constituent des outils de recherche et de diagnostic dans de nombreux domaines comme la bactériologie, l'hématologie, la virologie, la parasitologie, la biochimie, la pharmacologie et l'immunologie (Zhiri, 1986).

A/ Les différentes techniques appartenant aux immuno-essais

En 1959, Yalow et Berson ont découvert la radioimmunologie, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives en immunochimie. Cette technique est basée sur la détection du complexe Ag-Ac, grâce à un marqueur radioactif. Elle a le grand avantage d'être spécifique et sensible, cependant elle nécessite l'utilisation de composés coûteux et dangereux pour l'homme.

D'autres techniques, utilisant des marqueurs enzymatiques, et ne nécessitant pas d'isotopes radioactifs ont été mises au point quelques années plus tard. Ces techniques sont plus couramment appelées ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

Elles sont subdivisées en 2 concepts selon la modification du marqueur lors de la révélation.

⇒ Les Immuno-tests en phase homogène

Ces techniques sont caractérisées par l'absence d'étape de séparation, c'est à dire que la formation du complexe antigène-anticorps est directement visualisable avec l'ensemble des réactifs qui se trouvent dans un milieu unique. Dans ce cas, le conjugué enzymatique utilisé ne doit pas avoir la même activité selon qu'il soit libre ou qu'il soit combiné à un Ac.

L'utilisation majeure de cette méthode est le dosage de médicaments.

⇒ Les Immuno-tests en phase hétérogène

Dans ce cas, il faut séparer le complexe antigène- anticorps de l'antigène et de l'anticorps libre marqués avant de mesurer le signal. L'antigène ou l'anticorps est alors fixé sur un support solide (plaque de microtitration) tandis que la phase liquide contient la substance à doser.

Les deux principales techniques en phase hétérogène sont : la méthode dite « en sandwich » et celle dite « en compétition ».

La technique sandwich permet le dosage d'antigènes qui doivent obligatoirement posséder deux sites distincts (ou épitopes) pouvant réagir avec les anticorps. Les molécules dosées doivent donc avoir un poids moléculaire relativement important. Le conjugué (anticorps-enzyme) est ajouté après la fixation de l'antigène à doser sur une quantité fixe d'anticorps en excès. L'utilisation de cette technique est très intéressante car elle est très sensible et très spécifique.

La technique par compétition permet, quant à elle, le dosage de petites molécules possédant une seule et même structure d'épitope. L'antigène est sous forme fixée et sous forme libre. Ce principe est surtout utilisé pour doser les haptènes.

Les haptènes sont de petites molécules qui ne peuvent pas induire la synthèse d'anticorps, bien qu'ils soient capables de réagir en leur présence. C'est le cas par exemple des phytohormones.

Pour notre étude, les différentes formes hormonales ont été dosées avec cette technique.

2.3.2. Le dosage par compétition appliquée aux phytohormones

A/ Son principe

Les hormones végétales (qui sont des haptènes) ont un faible poids moléculaire, et sont présentes en faible quantité dans les échantillons végétaux. La technique par compétition est donc la méthode la plus adaptée pour le dosage de ces molécules (Maldiney, 1988).

La compétition est réalisée entre :

- L'hormone végétale (l'antigène), présente sous deux formes : une forme libre (AgL) et une forme liée (AgF).
- L'anticorps (Ac).

L'antigène fixé (AgF) est déposé sur la plaque de microtitration en quantité définie. L'hormone à doser représente l'antigène libre (AgL) dont la quantité est à déterminer.

L'anticorps (Ac) est apporté en quantité connue, et aura la possibilité de se fixer sur les deux formes de l'antigène .

Si on fixe par avance la concentration d'AgF et d'Ac, la seule variable sera la quantité d'AgL (Hoher, 1992).

On obtient alors l'équation suivante :



Selon la quantité d'antigènes libres, l'anticorps ira se fixer de façon plus ou moins importante sur les antigènes fixés.

L'élimination (par lavage) des complexes AgL-Ac permettra de mesurer la quantité d'anticorps fixée sur les AgF. Ainsi, la quantité de complexe AgF-Ac, dépendra de la concentration de l'antigène libre (AgL) présent dans le milieu réactionnel.

Avec cette méthode, c'est l'AgF-Ac, donc ce qui est fixé, qui est révélé.

La quantité d'AgL (à doser) est déduite grâce à la réalisation d'une courbe étalon $\text{AgF-Ac} = f(\text{AgL})$ à partir d'une gamme de concentrations connues d'AgL (Figure 8).

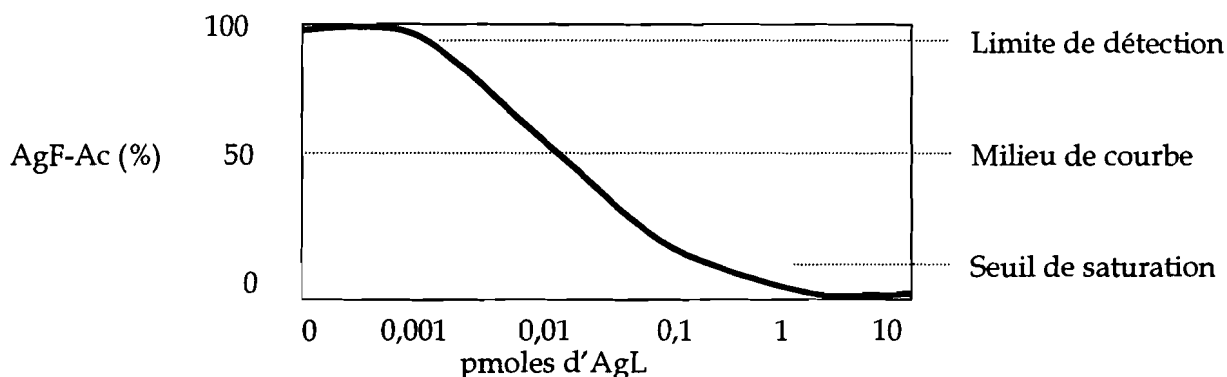


Figure 8 : Représentation schématique d'une courbe standard de dosage d'après Besse, 1992.

Limite de détection

C'est la quantité minimale d'anticorps capable de déplacer l'équilibre de la réaction de compétition. Au delà de cette limite, le dosage n'est plus possible. Les quantités d'AgL sont dites non détectables.

Seuil de saturation

A ce niveau, tous les anticorps sont bloqués quelle que soit la quantité d'AgL. Le dosage n'est donc plus efficace car la quantité d'AgL est trop importante.

Milieu de courbe

Il correspond à la fixation de 50% des Ac par les AgL. C'est de part et d'autre de ce point que le dosage est le plus précis.

B/ En pratique :

La révélation des complexes AgF-Ac est réalisée par un système enzymatique qui va permettre grâce à la dégradation d'un substrat la visualisation de la réaction. Les résultats bruts issus de la lecture au spectrophotomètre sont exprimés par l'absorbance (DO).

Pour pouvoir comparer les résultats obtenus d'une plaque à l'autre, les DO mesurées sont exprimées en pourcentage par rapport à l'amplitude de révélation (DO maximum - DO minimum).

La formule utilisée est la suivante :

$(DO \text{ mesurée} - DO \text{ minimum}) / (DO \text{ maximum} - DO \text{ minimum}) * 100.$

⇒ La DO maximum correspond à la plus faible concentration d'antigène libre apportée, à savoir une concentration nulle puisque l'on apporte de l'eau.

La valeur de la DO obtenue correspond à 100% (car tous les anticorps se fixent sur les antigènes fixés).

⇒ La DO minimum est calculée à partir de la concentration d'antigènes libres la plus forte (tous les Ac sont bloqués par l'AgL ; et sont éliminés lors du lavage précédent la révélation).

⇒ La DO mesurée correspond à une quantité donnée de l'hormone à doser.

Dans ce système, ce qui est révélé sera alors inversement proportionnel à la quantité d'antigène libre (à doser).

De ce fait, si l'échantillon à tester contient une grande quantité d'hormone (AgL), peu d'anticorps iront se fixer sur les AgF : la DO sera alors faible.

Et inversement, s'il y a peu d'antigènes libres, la majorité des anticorps iront se fixer sur les AgF : la DO sera alors élevée.

Utilisation de la plaque de microtitration

La plaque de microtitration (Nunc, Danemark) est constituée de polystyrène comprenant à sa surface 96 microcupules (puits).

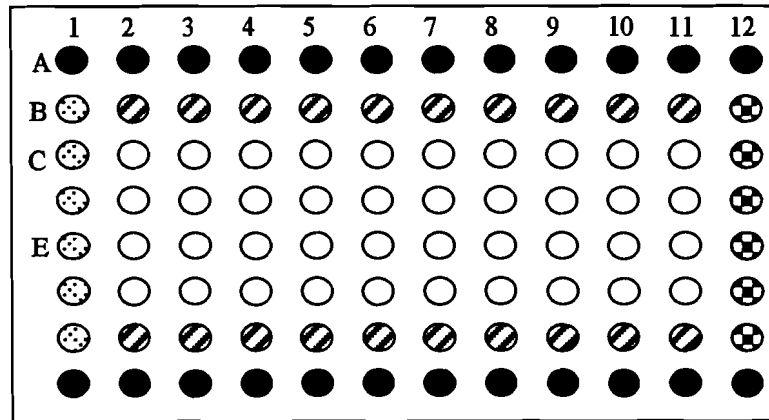
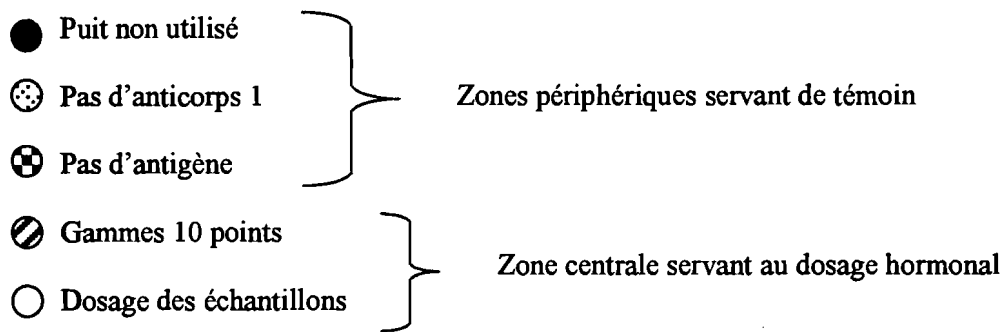


Figure 9 : Plan d'utilisation d'une plaque ELISA selon nos conditions.



Les 96 puits de la plaque n'ont pas tous la même fonction selon leur disposition (Figure 9): Les puits situés en périphérie servent de témoin, à cause de l'existence d'un effet bord (Cardin *et al*, 1984 ; Galli, 1996). En effet, la température optimale est plus vite atteinte dans cette zone, entraînant alors des réactions immunologiques amplifiées.

Pour rendre le test le plus homogène possible, il est donc préférable d'utiliser la zone périphérique non pas pour le dosage mais pour une série de contrôles (dépôt de l'antigène seul ou d'anticorps seul).

Les lignes B et G contiennent chacune une gamme d'antigènes libres qui serviront à réaliser la courbe standard de dosage.

Les 4 lignes centrales restantes serviront au dosage proprement dits.

B/ Les différentes étapes caractérisant le test par compétition

Le dosage a été effectué sur le 2,4-D et sur des cytokinines de 2 formes : Zéatine Riboside (ZR) et Isopentenyladénosine (iPA).

Après avoir exposé les différentes étapes réalisées pour chaque hormone, le Tableau 2 mentionnera les variations intervenant pour chaque hormone (notamment pour la composition des tampons et pour les quantités d'anticorps et d'antigènes fixés).

◆ Le Coating

Les hormones étant des haptènes (molécules de petite taille), elles ont été couplées dans un premier temps à une protéine porteuse (formant ainsi un conjugué) pour permettre leur fixation sur le polystyrène des microcupules (Figure 10).

L'étape de coating consiste à fixer le conjugué sur les parois des microcupules.

Le porteur est préparé dans du tampon Carbonate-Bicarbonate (Annexe 5), est distribué à raison de 100 µl par puit.

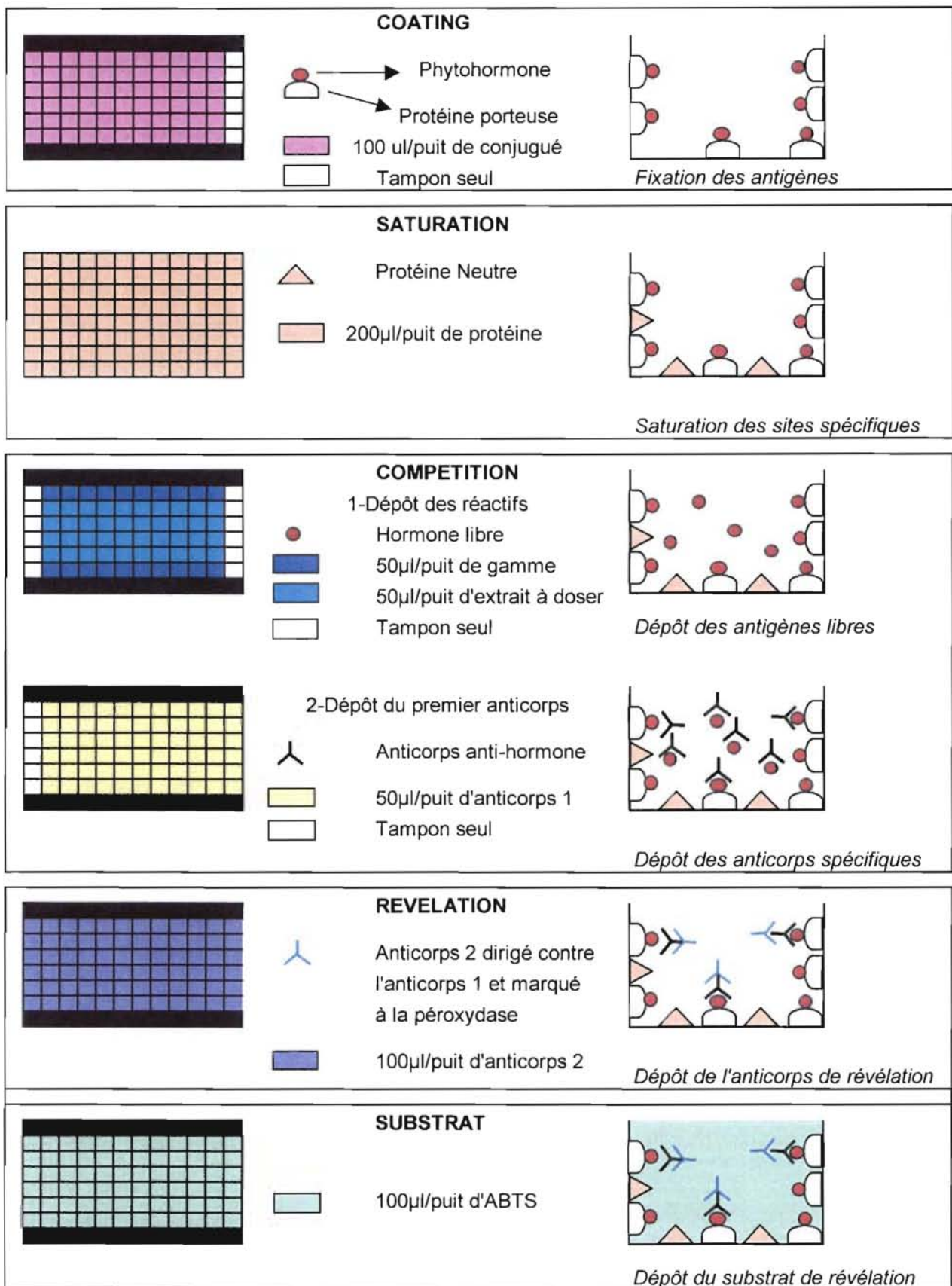


Figure 10 : Les différentes étapes de la procédure ELISA utilisée pour quantifier des phytohormones

L'objectif étant de fixer le maximum de porteur présent dans le tampon, il est important de laisser incuber au minimum 12 heures à 4 degrés. Des tests réalisés sur plusieurs classes d'hormones montrent que les résultats obtenus sur des plaques préparées quelques jours avant le test sont plus sensibles car les antigènes peuvent se fixer progressivement et donc en plus grande quantité (Hoche, communication personnelle). Puis la plaque est rincée 4 fois à l'eau ultrapure additionnée de Tween 20 (0,2%).

◆ La Saturation

Cette phase permet de saturer les sites de la paroi des microcupules non occupés par le porteur avec une autre protéine réputée neutre pour le reste du test (Figure 10).

La saturation des sites non spécifiques est faite en déposant 200 µl par puit de tampon PBS (Annexe 5) contenant du SVF (Serum Veal Foetal) 3%.

Cette étape évite ainsi lors des étapes ultérieures la fixation sur le polystyrène de tout autre composé que le porteur. Après le dépôt dans chaque puit, la plaque est mise à incuber 1h30 à température ambiante. Ensuite la plaque est rincée 4 fois comme précédemment. Cette étape est nécessaire uniquement pour le 2,4-D.

◆ Préparation des Gammes Etalons

La gamme de l'hormone à quantifier (AgL) est préparée à partir d'une solution mère à 100µM. Plusieurs dilutions successives sont effectuées pour obtenir une gamme 10 points (Annexe 2 : Gamme 2,4-D ; Annexe 3 : Gamme Cytokinines).

Sur les courbes, les quantités d'AgL sont exprimées en logarithme (Annexe 4). Les dilutions sont préparées dans de l'eau ultrapure contenant un antibactérien. Chaque point de gamme est distribué dans l'ordre croissant en déposant 50 µl par puit. Après le dépôt de la gamme, les échantillons à doser sont à leur tour déposés.

◆ Dépôt de l'anticorps anti-hormone

A la fin de cette étape, la compétition est déclenchée puisque l'on met en présence les antigènes fixés, les antigènes libres et l'anticorps (Figure 10). L'anticorps est dilué dans du tampon (Annexe 5), puis distribué à raison de 50 µl par puit. A la fin du dépôt la plaque est mise à incuber pendant 1h30 à température ambiante pour le 2,4-D, et 2h00 à 4°C pour les cytokinines. Puis 4 lavages sont effectués à l'eau ultrapure Tween 20 (0,2 %).

◆ Dépôt du deuxième anticorps

Les étapes suivantes ont pour but de révéler les complexes AgF-Ac (Figure 10). Le deuxième anticorps permet d'amplifier la réaction de compétition. L'apport de cet anticorps couplé à l'enzyme peroxydase, va aller se fixer sur l'anticorps 1 pour permettre ensuite la révélation. Les tampons utilisés ne sont pas les mêmes pour les cytokinines et le 2,4-D (Annexe 5). La plaque est mise à incuber pendant 1h à 37°C. Avant la dernière étape, 4 lavages sont réalisés à l'eau ultrapure Tween 20 (0,2%).

◆ Dépôt du Substrat

Le substrat va être dégradé par la peroxydase qui est couplée à l'anticorps 2 (Figure 10). De cette manière il sera possible de connaître la quantité d'anticorps fixée sur le porteur. Le substrat utilisé est l'acide 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS, Sigma, EU) préparé dans du tampon Perborate (Annexe 5). La solution est distribuée à raison de 100 µl par puit à une concentration de 0,5 mg/l. Avant la lecture de la DO, la plaque est mise à incuber 2h00 à température ambiante. Une lecture à 2 heures permet de donner des résultats stables.

Tableau 2 : récapitulation des différences de protocole selon l'hormone dosée

ETAPES	CYTOKININES		2,4-D
	ZR	iPA	
COATING	Dilution : 1/200000	Dilution : 1/500000	Dilutions : 15B5 : 1/6000 11G5 : 1/1000
	Protéine porteuse : Ovalbumine		Protéine porteuse : Myoglobine
SATURATION	Absence de cette étape		SVF 3% dans du tampon PBS
GAMMES	Tampon : Eau +azoture de sodium (200mg/l) Gamme 10 points :de 0 à 30 pmoles		Tampon : Eau+thimérozal (100mg/l) Gamme 10 points : de 0 à 300 pmoles
ANTICORPS 1	Polyclonal (lapin) Tampon : PBS-BSA+azoture de sodium		Monoclonal (souris) Tampon : PBS-BSA + thimérosal
	Dilution : 1/375	Dilution : 1/150	Dilutions : 15B5 : 1/1000000 11G5 : 1/80000
	Commentaire : Le BSA permet de saturer les sites non spécifiques		
REVELATION ANTICORPS 2	Polyclonal (chèvre anti lapin) Tampon : Tris-Hcl Dilution : 1/100000		Polyclonal (chèvre-anti-souris) Tampon : PBS-BSA thimérosal Dilution : 1/100000
COLORATION	Tampon Perborate + 0,5 mg/l d'ABTS		

L'intensité de la réaction enzymatique (DO) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Dynatech MR 7000, EU), à une longueur d'ondes de 405nm. Les données sont enregistrées dans le logiciel BioLinx 2.0.

◆ Traitement des données

Les données ont été analysées différemment selon la nature du test.

- Pour la mise au point de la technique (test des anticorps, des porteurs et des réactions croisées), les données ont été récupérées dans le logiciel Excel et les courbes de dosage répondent à l'équation suivante : $DO(\%) = f(\text{concentration AgL})$ ont été tracées. Ainsi, la DO obtenue, qui est exprimée en pourcentage est fonction de la concentration en hormone libre.
- Pour le dosage des échantillons, une courbe de régression polynomiale d'ordre 4 a été calculée à partir des valeurs de DO obtenues avec la gamme étalon. Puis les quantités d'hormones présentes dans les échantillons sont calculées à partir de l'équation de cette courbe sigmoïde.

Cette courbe de régression va intervenir lors de 2 étapes.

Tout d'abord, les 40 fractions (issues de la purification par HPLC) de chaque échantillon vont être testées vis à vis de chacun des anticorps anti hormone qui nous intéressent (dans notre cas le 2,4-D ; et les cytokinines de type ZR et iPA) pour obtenir un profil immunoréactif.

L'immunohistogramme ainsi obtenu permet de localiser les fractions contenant l'hormone recherchée. Puis les fractions présentant une immunoréactivité sont alors soumises à un redosage ELISA avec 10 répétitions. La valeur de dosage finale considérée est la moyenne des 10 répétitions.

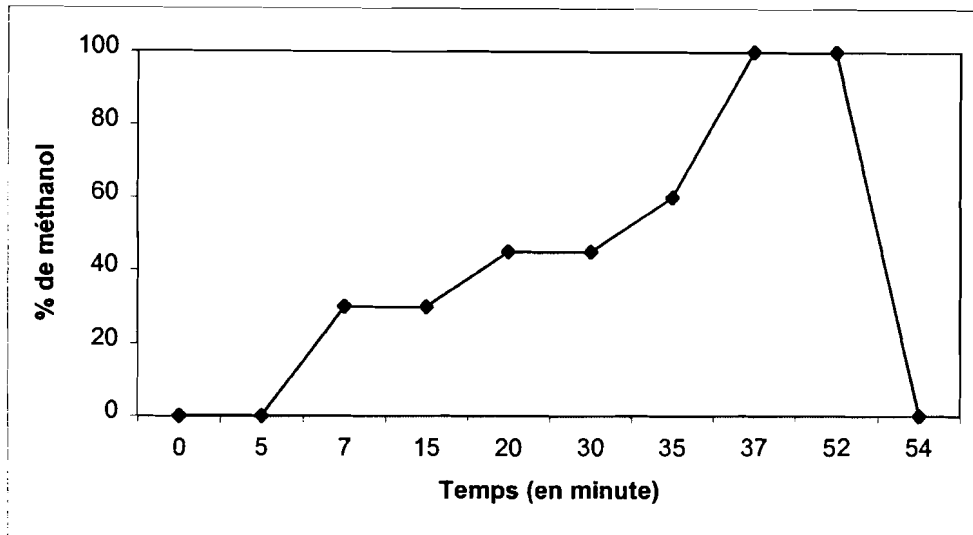
La quantité de phytohormones, exprimée en pmoles / mg Matière Sèche (MS) ou Matière Fraîche (MF) correspond à cette valeur de dosage corrigée du rendement de purification. Celui-ci est déterminé à partir du radiogramme effectué sur les 40 fractions de chaque échantillon après passage au compteur à scintillation.

La méthode de dosage des phytohormones décrite précédemment (voir partie Matériel et Méthodes) est utilisée en routine au laboratoire pour les cytokinines. Cependant pour le 2,4-D, il a été nécessaire de réaliser un certain nombre de mises au point à différentes étapes du protocole, avant d'effectuer le dosage sur les échantillons végétaux.

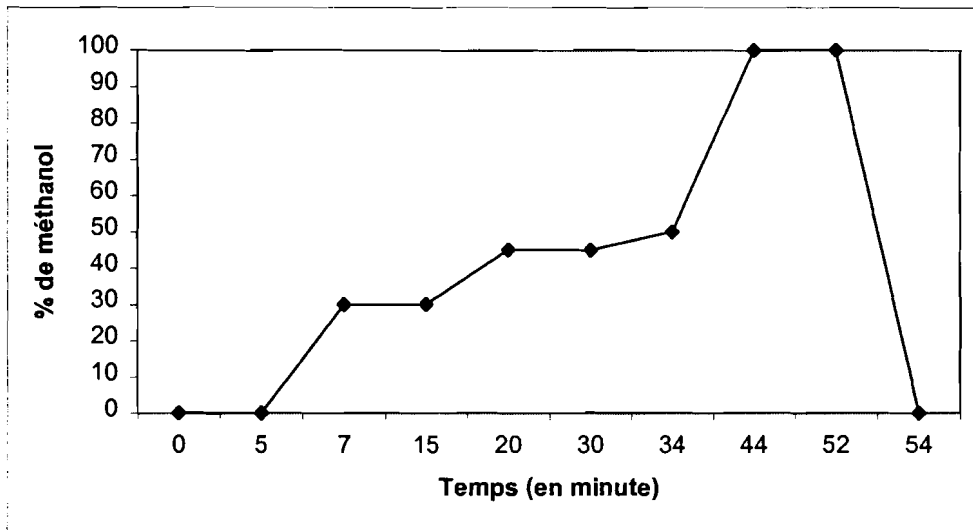
Dans une première partie nous décrirons les modifications apportées pour que le protocole puisse s'adapter à la fois aux cytokinines et au 2,4-D, puis dans une deuxième partie, nous présenterons et discuterons les résultats obtenus après application de la technique de dosage aux échantillons végétaux.

RESULTATS

1) Gradient d'élution n° 1



2) Gradient d'élution n° 2



3) Gradient d'élution n° 3

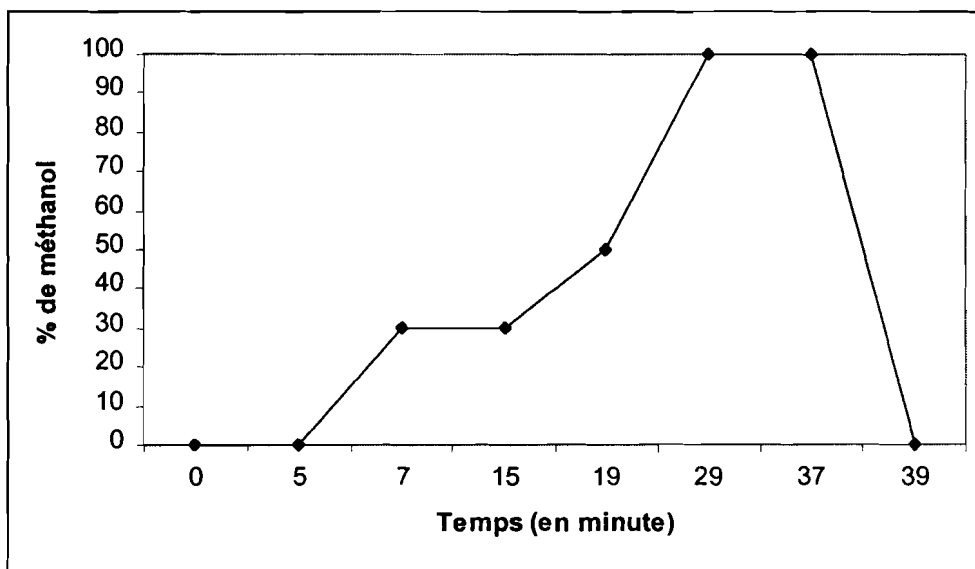


Figure 11 : Gradients d'élutions testés pour obtenir une bonne séparation des différentes formes hormonales.

I MISE AU POINT DE LA METHODE DE DOSAGE DES PHYTOHORMONES

1.1. L'extraction des phytohormones

Cette étape n'a pas été modifiée. Nous avons utilisé la méthode d'extraction méthanolique (Hoher, 1992), qui permet d'extraire plusieurs formes hormonales simultanément.

1.2. La purification par HPLC

1.2.1. Mise au point du gradient d'élution

Cette étape consiste à obtenir un gradient d'élution permettant de séparer les phytohormones étudiées (Z, ZR, iP, iPA, 2,4-D) dans les échantillons, pour ensuite pouvoir les quantifier.

Les paramètres du gradient doivent répondre à un compromis répondant à 2 conditions :

- L'ensemble des hormones présentes au sein d'un même échantillon végétal, doit être séparé en un temps relativement court, afin de rendre cette méthode techniquement réalisable.
- Le temps de séparation entre 2 hormones qui se suivent doit être supérieur ou égal à 1 minute, pour ne pas trouver, si possible, dans une même fraction plusieurs formes hormonales.

Le premier gradient d'élution que nous avons testé (gradient 1 ; Figure 11) est utilisé au laboratoire GeneTrop (Hoher, communication personnelle) pour séparer l'AIA, de l'ABA, et des cytokinines (iP, iPA, Z et ZR) en 54 minutes. Nous l'avons essayé pour séparer Z, ZR, iP, iPA et 2,4-D.

Pour cela, 10µl d'une solution à 100µM de chaque hormone étudiée ont été dilués dans de l'eau contenant 0,2% d'acide formique et 0,07% de triéthylamine pour obtenir un volume final de 500µl, qui a ensuite été injecté dans l'HPLC. Ce gradient d'élution est intéressant car il sépare correctement les 5 formes hormonales étudiées. Cependant dans un premier temps nous avons estimé le temps de rétention du 2,4-D un peu long (environ 7 minutes entre l'iPA et le 2,4-D) (Tableau 3). Nous avons donc essayé de mettre au point un autre gradient qui pourrait séparer les hormones plus rapidement.

Les paramètres du gradient 1 ont servi de base pour élaborer de nouveaux gradients d'élution.

Pour le premier gradient élaboré (gradient 2 ; Figure 11), nous avons conservé pendant les 30 premières minutes les mêmes conditions d'élution que le gradient 1 pour obtenir la séparation des 4 cytokinines. Puis les 24 minutes suivantes, nous avons modifié la composition de l'éluant pour essayer de séparer plus rapidement le 2,4-D. Seul le 2,4-D a été injecté puisque nous connaissions les temps de séparation des cytokinines. Ce gradient n'a pas été retenu car le 2,4-D était élué à 41,5 minutes, c'est à dire plus tard qu'avec le gradient 1 (40,3 minutes).

Nous avons alors testé un nouveau gradient (gradient 3 ; Figure 11) qui s'est révélé intéressant car le 2,4-D sortait plus tôt qu'avec le gradient 1. Cependant le temps de séparation entre les différentes formes hormonales était trop faible, notamment entre iP, iPA et 2,4-D (26,9 min pour iP, 27,1 min pour iPA et 28,3 min pour 2,4-D). En utilisant ce gradient, les 2 cytokinines citées seraient récoltées dans la même fraction, et le dosage respectif de ces 2 hormones serait alors rendu impossible car l'anticorps utilisé pour les doser est le même (voir partie Matériel et Méthodes).

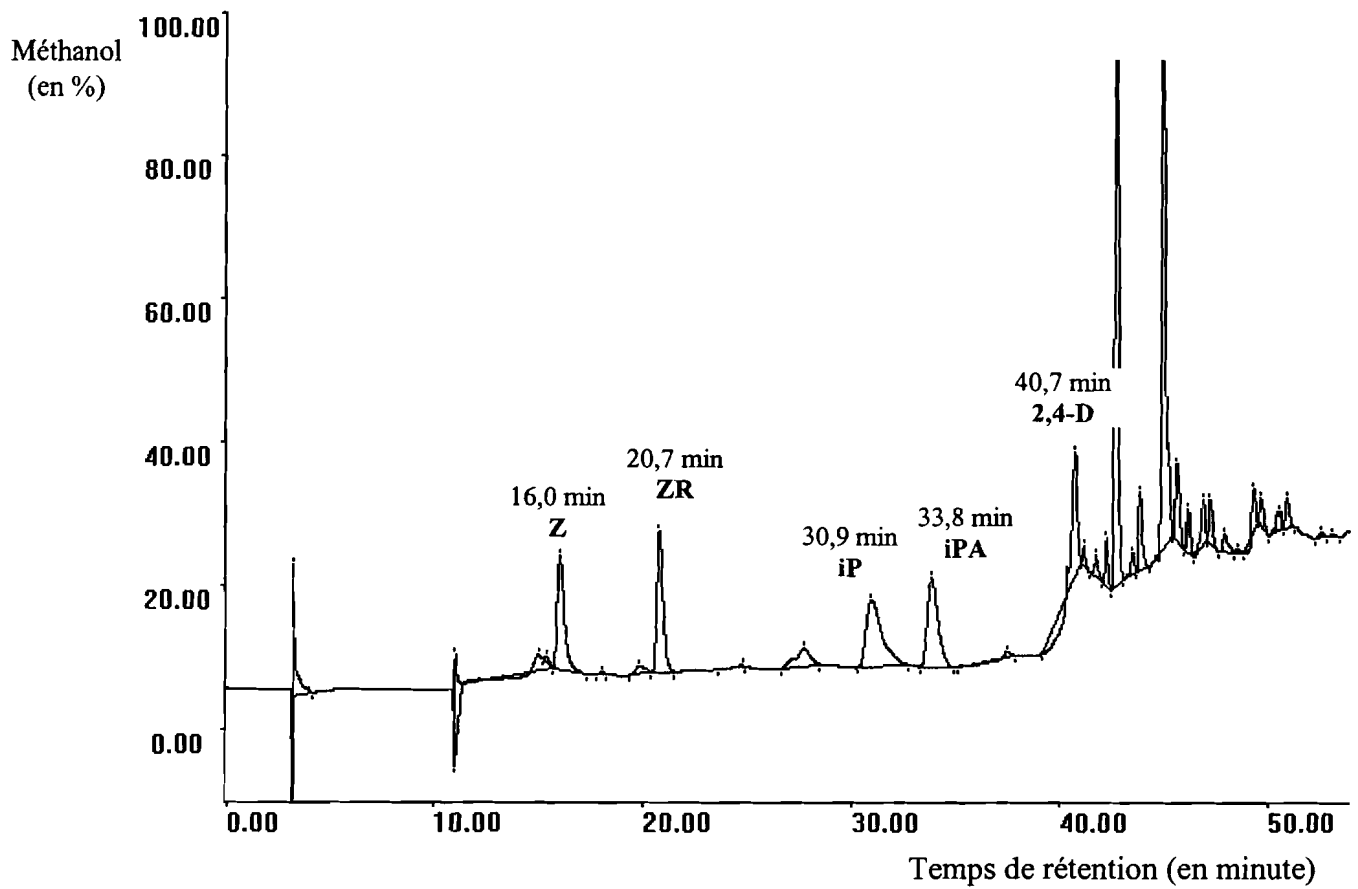


Figure 12 : Chromatogramme d'une solution témoin contenant Z, ZR, iP, iPA et 2,4-D.

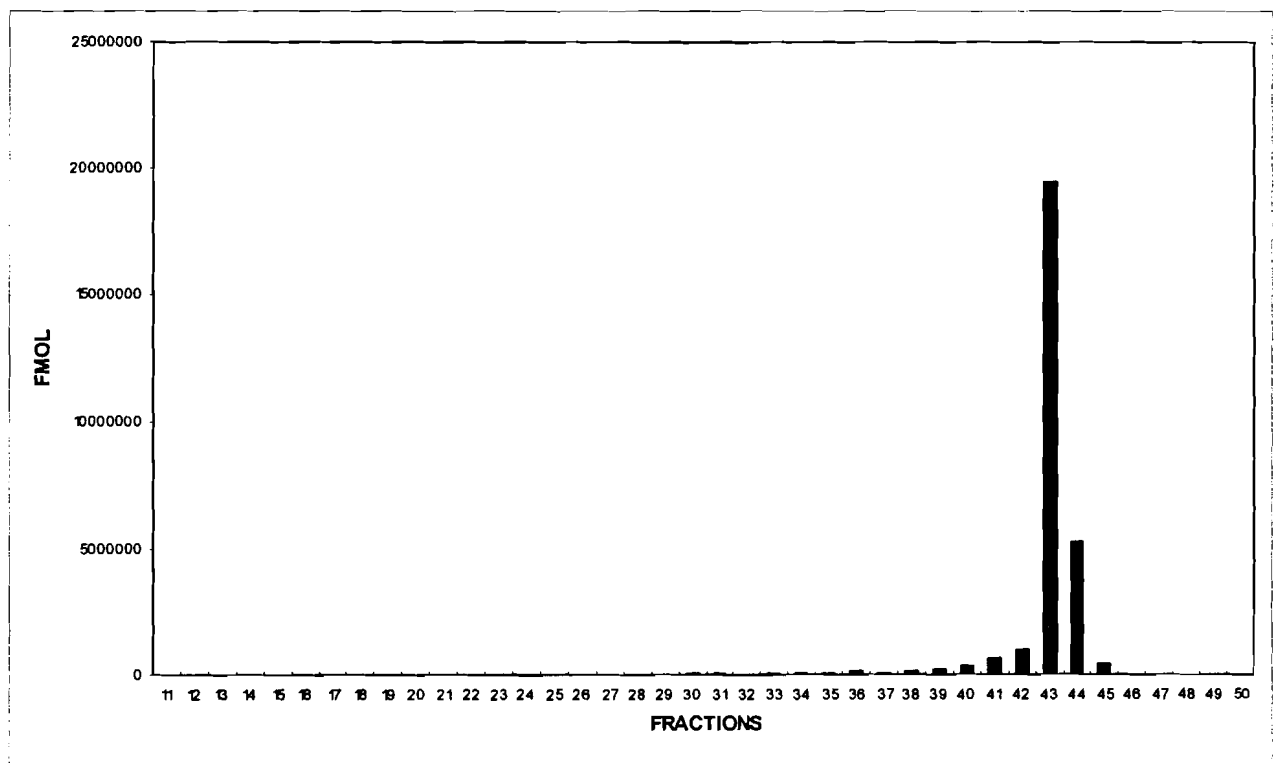


Figure 13 : Mesure de la radioactivité des fractions HPLC après injection d'une solution témoin contenant du 2,4-D radioactif.

Finalement, le gradient 1 correspond donc aux meilleures caractéristiques de séparation pour les hormones étudiées malgré la durée nécessaire à la séparation des différentes formes hormonales (Figure 12 et Tableau 3). Il a donc été retenu pour séparer les hormones dans les échantillons végétaux analysés.

Tableau 3 : Temps de rétention des hormones étudiées avec le gradient 1.

Hormones	Z	ZR	IP	iPA	2,4-D
Temps de séparation (min et millièmes de min)	15,8	20,1	30,5	33,0	40,3

1.2.2. Mise au point des conditions d'utilisation du [14C]-2,4-D

Comme nous l'avons vu dans la partie Matériel et Méthodes, des hormones radioactives sont ajoutées aux échantillons lors de l'étape d'extraction. Ces molécules radioactives permettent d'une part d'estimer le rendement de purification, pour ensuite l'intégrer dans le calcul final des concentrations hormonales des échantillons, et d'autre part de vérifier le bon déroulement de l'étape de séparation par HPLC. En effet, les paramètres de l'HPLC font qu'il y a un décalage de quelques minutes entre la détection de l'hormone par le spectrophotomètre et sa sortie dans le collecteur de fractions (Lyakurwa, 1997). Dans le cas des cytokinines, il est de 3 minutes environ.

Concernant l'auxine de synthèse 2,4-D, aucun test n'avait préalablement été effectué pour quantifier cette différence de temps. Nous avons donc du mesurer ce décalage de temps.

En pratique, nous avons injecté dans l'HPLC une solution comprenant :

- 30 µl de 2,4-D non radioactif à une concentration de 100µM afin de pouvoir détecter le temps de rétention de l'hormone à travers un chromatogramme.
- 1000 Bq de [14C]-2,4-D pour localiser sur le radiogramme les fractions qui contiennent l'hormone. Pour obtenir le radiogramme, les 50 fractions collectées ont été passées au compteur à scintillation

En comparant les pics du chromatogramme (Figure 12) à ceux du radiogramme (Figure 13), nous avons constaté pour le 2,4-D un décalage de 3 minutes entre la détection de l'hormone et sa sortie dans la fraction. Ce témoin joue un rôle important notamment lorsque les conditions externes (par exemple la température) peuvent influencer les temps de rétention de chaque hormone. Il permet alors de certifier ou non si la molécule séparée par HPLC est bien la même que celle détectée par le radiogramme et de réajuster si nécessaire la collection des fractions.

Ce test a été effectué pour chaque échantillon végétal étudié. Au cours de nos dosages des échantillons végétaux, aucun temps de rétention des molécules n'a été décalé par rapport aux conditions initiales de séparation.

1.3. Quantification des phytohormones par méthode ELISA

La technique ELISA est utilisée en routine au laboratoire GeneTrop pour les cytokinines et l'acide abscissique. En ce qui concerne le 2,4-D, des travaux ont déjà été menés pour mettre au point l'ensemble des paramètres permettant d'obtenir des résultats fiables (Jean, 1998). Cependant, nous avons du refaire une série de tests pour valider et/ou compléter les résultats obtenus, pour s'assurer que les paramètres de la technique seraient optimaux pour le dosage des échantillons végétaux étudiés.

1.3.1. Origine des anticorps utilisés pour le dosage du 2,4-D

Le laboratoire BioEnviroTech (Marseille), a été chargé de produire les anticorps monoclonaux spécifiques au 2,4-D.

Les anticorps anti-2,4-D ont pu être produits grâce au couplage préalable de l'hormone avec une protéine porteuse (Sérum Albumine Bovine ; BSA), qui a permis l'induction d'une réaction immunitaire.

Suite à son injection dans des souris, le conjugué a entraîné la production de 8 anticorps monoclonaux. Après plusieurs étapes de « screening » (pour séparer les anticorps dirigés contre l'hormone et ceux réagissant contre la BSA, des tests de sensibilité ont permis de sélectionner 2 anticorps monoclonaux réagissant avec le 2,4-D.

Ils sont identifiés sous les noms 11G5 et 15B5 et chacun d'eux a du être testé au laboratoire GeneTrop pour ensuite sélectionner celui qui présente le plus de qualités pour le dosage des échantillons végétaux.

1.3.2. Mise en place de tests pour homogénéiser le protocole 2,4-D avec celui des autres hormones du laboratoire

Un protocole ELISA a été proposé par BioEnviroTech pour utiliser les anticorps 15B5 et 11G5 dans de bonnes conditions.

Pendant pour des raisons d'homogénéisation de la technique avec celle utilisée au laboratoire pour les cytokinines, quelques modifications ont été apportées.

La technique elle même n'a pas été modifiée, seules les dilutions, les temps d'incubation à certaines étapes et certains tampons ont été modifiés.

Puis pour confirmer et vérifier la répétitivité des résultats obtenus précédemment, il a été nécessaire de reproduire l'ensemble des tests car les lots de porteur et d'anticorps utilisés en 1999 n'étaient pas les mêmes que ceux utilisés en 1998. L'objectif de ces tests étant de mettre au point un système de dosage le plus sensible possible (détectant la plus petite unité possible de 2,4-D dans les échantillons) à travers la recherche des meilleures dilutions de l'antigène et de l'anticorps.

A/ Test sans Compétition

Ce test consiste dans un premier temps à croiser différentes dilutions d'AgF et d'Ac, ce qui permettra de trouver le couple AgF-Ac offrant la meilleure sensibilité lors des tests avec compétition.

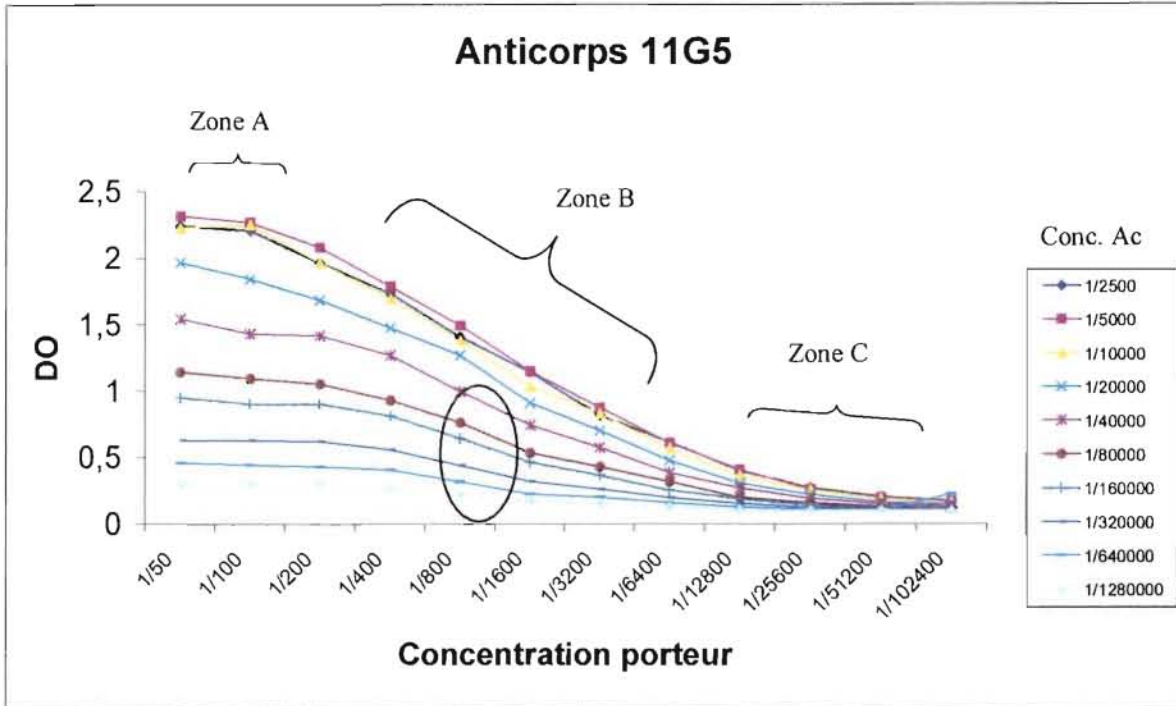
Le choix de l'intervalle comprenant des dilutions intéressantes doit répondre à plusieurs critères :

- La quantité d'anticorps apportée doit être la plus faible possible (pour ne pas être en quantité saturante lors du test avec compétition) mais néanmoins suffisante pour permettre le dosage de deux concentrations d'AgL différentes.

- La DO maximale de la courbe obtenue ne doit pas être supérieure à 1 (au delà de cette valeur, la réaction est trop rapide et non stabilisée).

- Le premier travail a donc consisté à évaluer l'affinité des Ac et des porteurs, en croisant une série de dilutions de porteur et d'anticorps (Tableau 4).

1)



2)

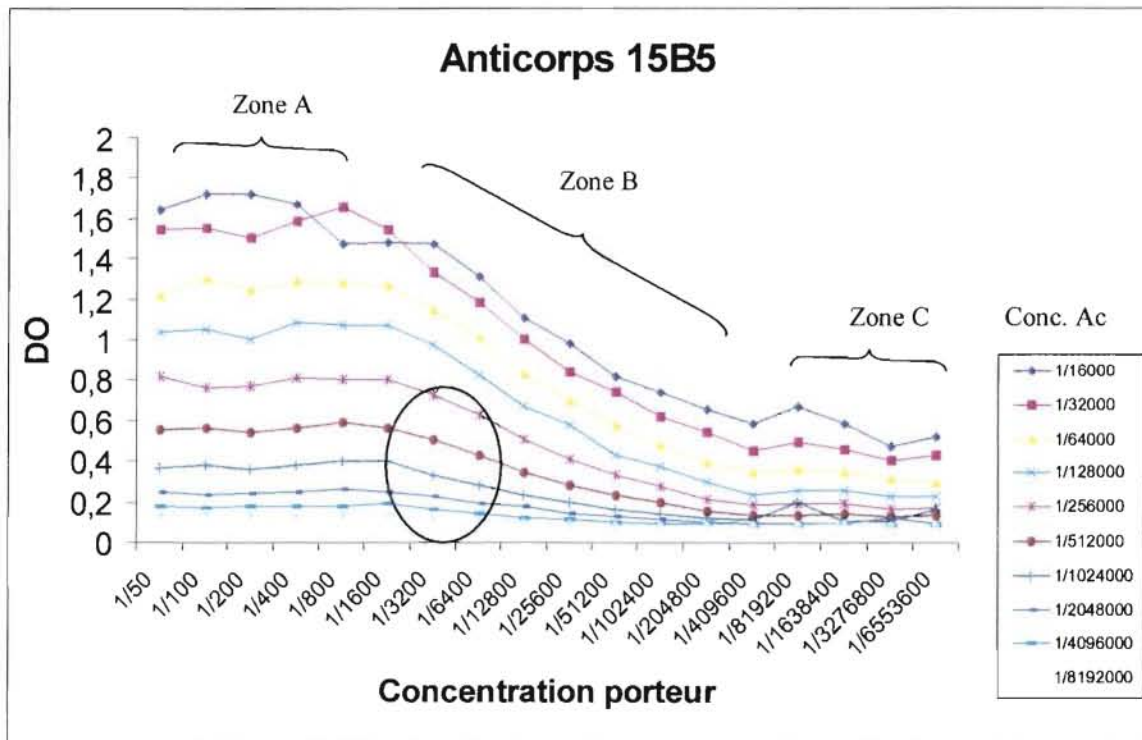


Figure14: Courbes représentant les interactions Porteur-Anticorps, pour les Ac 11G5(1) et 15B5 (2) lors des tests sans compétition. Les zones encadrées représentent les dilutions retenues pour le test avec compétition.

Tableau 4 : Intervalles de dilutions de porteur et d'anticorps testés.

	Dilutions porteur	Dilutions anticorps
	Dilution par 2 à chaque point	
Test 15B5	1/50 à 1/6553600	1/1250 à 1/64000
Test 11G5	1/2 à 1/200	1/2500 à 1/64000

Il faut noter que les premiers tests ont été faits sans l'étape de saturation (pour avoir le même protocole que les autres hormones), mais l'absence de bons résultats (aucune affinité entre les dilutions de l'anticorps et du porteur), nous a amené à rétablir cette étape. Après l'incorporation de cette étape dans le protocole, il a été possible de retenir un ensemble de dilutions. En effet, plusieurs dilutions de porteur et d'anticorps ont été retenues (Tableau 5) pour le test suivant car il n'est pas garanti que la réaction du porteur et de l'anticorps soit la même en incorporant l'antigène libre. L'utilisation de 23 plaques ELISA a été nécessaire pour déterminer les meilleures dilutions.

Les résultats sont présentés sur la Figure 14. Les couples Ac-AgF de la zone A ne doivent pas être retenus car tous les Ac sont fixés sur les AgF (ce qui signifie que la concentration d'AgF est trop forte). Une dilution plus faible d'Ac ne changerait donc pas la forme de la courbe.

Par contre, la zone B regroupe les dilutions qui sont sensibles. Ainsi, la fixation de l'Ac est différente selon la quantité d'AgF. La zone encadrée regroupe l'ensemble des dilutions retenues pour les prochains tests en compétition.

Et enfin, la zone C ne présente pas de dilutions sensibles car la quantité d'AgF est insuffisante par rapport à la quantité d'Ac apportée.

Les dilutions retenues pour le test avec compétition sont mentionnées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Dilutions retenues pour le test avec compétition.

	Dilutions porteur	Dilutions anticorps
Test 15B5	1/3200 ; 1/6400 ; 1/12800	1/250000 ; 1/500000 ; 1/1000000
Test 11G5	1/1000 ; 1/2000 ; 1/3000	1/80000 ; 1/160000 ; 1/320000

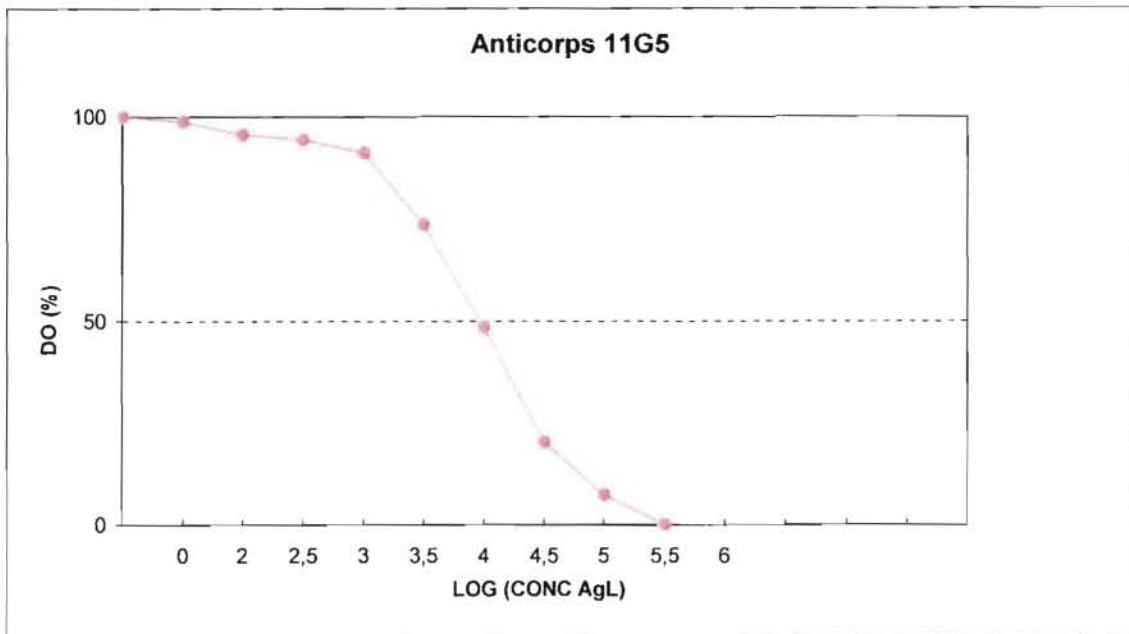
B/ Test avec compétition

L'objectif de ce test est d'utiliser les résultats obtenus lors des tests sans compétition, en incorporant l'antigène libre pour provoquer la compétition. Il permet de vérifier la sensibilité de dosage des dilutions retenues précédemment en intégrant la gamme de 2,4-D.

Le choix des meilleures dilutions repose sur plusieurs critères :

- ⇒ La DO maximale (située au niveau du plateau du seuil de détection) doit se situer entre 0,5 et 0,8 unités après 2 heures de révélations et être stable .
- ⇒ Le couple porteur-anticorps doit pouvoir détecter la plus petite quantité d'hormone possible (avoir une bonne sensibilité).
- ⇒ L'amplitude de révélation entre la DO maximale et la DO minimale doit être la plus grande possible, pour permettre un dosage précis.
- ⇒ La forme de la courbe doit être régulière, en ayant une forme ressemblant le plus possible à la courbe standard de dosage (voir partie Matériel et Méthodes).

1)



2)

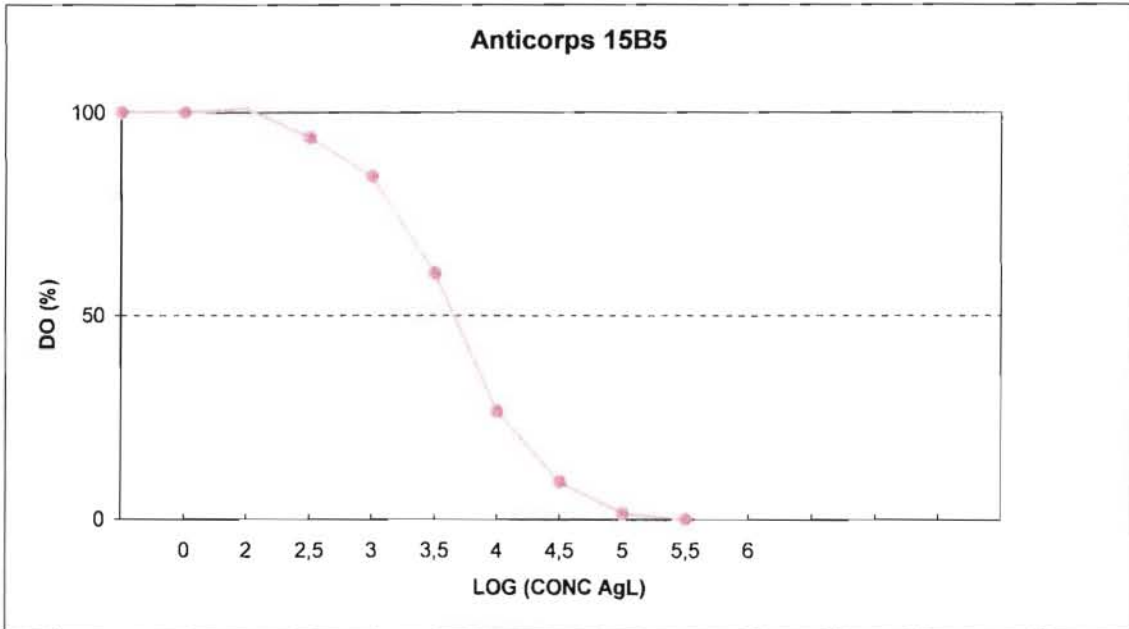


Figure 15 : Courbes de dosage 15B5 (1) et 11G5 (2) obtenues avec les dilutions d'anticorps et de porteur retenues pour le dosage des échantillons végétaux.

Après avoir réalisé des tests sur environ 25 plaques ELISA (comprenant les tests effectués avec l'Ac 11G5 et 15B5), un seul couple porteur-anticorps aura été retenu (Tableau 6, Figure 15), pour ensuite servir aux dosages dans les échantillons végétaux.

Tableau 6 : Dilutions de porteur et d'anticorps retenues en 1999.

	Dilutions Porteur	Dilutions Anticorps
15B5	1/6000	1/1000000
11G5	1/1000	1/30000

C/ Réactions croisées

Une série de tests a ensuite été effectuée sur 14 plaques ELISA pour déterminer la spécificité des anticorps monoclonaux 15B5 et 11G5 (Tableau 7). Théoriquement les anticorps monoclonaux sont plus spécifiques que les anticorps polyclonaux. Cependant, il est possible qu'ils reconnaissent des molécules très proches structurellement de celles contre lesquels ils sont dirigés. Cette faculté de reconnaissance peut dans certains cas être un avantage car elle permet de doser plusieurs molécules en utilisant un seul anticorps, à condition que ces molécules ne soient pas présentes dans un même milieu.

Ce test a donc été utilisé pour évaluer la spécificité des anticorps étudiés, en les mettant en présence de molécules pouvant influencer la quantification du 2,4-D. Ces molécules testées présentent différentes caractéristiques. Elles sont soit très proches structurellement du 2,4-D, soit utilisées dans les milieux de culture, soit naturellement présentes dans les tissus végétaux.

En pratique, 2 lignes (B et G) de la plaque contiennent la gamme de 2,4-D libre en 10 points, qui sert de référence pour obtenir la courbe standard de dosage. Puis les 4 lignes centrales (C, D, E et F) contiennent comme AgL le produit à tester aux mêmes concentrations que la gamme de 2,4-D. La compétition est ensuite déclenchée en apportant l'anticorps qui peut soit se diriger contre le porteur soit se diriger contre la molécule testée. Ainsi, la fixation ou non sur la molécule testée dépend de la spécificité de l'anticorps. Le traçage des courbes, où la DO est fonction de la concentration d'AgL permet, selon leur forme, de connaître le comportement des molécules testées face à l'anticorps. Il est ainsi possible d'obtenir 3 types de réaction (Figure 16) :

- Si l'anticorps reconnaît la molécule, la forme de la courbe est identique à celle où le 2,4-D représente l'antigène libre (courbe 1)
- Si l'anticorps ne reconnaît pas la molécule, il n'y a pas de courbe (courbe 2).
- Si l'anticorps reconnaît la molécule mais ne la dose pas, la forme de la courbe ressemble plus ou moins à celle obtenue avec le 2,4-D, avec une sensibilité moindre qui se traduit par un décalage de la courbe vers la droite (courbe 3).

Le tableau 7 montre que les réactions obtenues avec l'Ac 15B5 sont moins spécifiques qu'avec l'Ac 11G5. En effet, l'Ac 15B5 reconnaît un plus grand nombre de molécules structurellement proches du 2,4-D. Par contre il a le grand avantage de ne pas reconnaître les molécules qui sont naturellement présentes dans les cellules végétales (AIA, ZR, iPA), et apportées dans les milieux de culture (ANA), contrairement à l'Ac 11G5. Par ailleurs il est intéressant de constater qu'il reconnaît et dose l'acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique (avec une sensibilité moindre). Cette molécule est employée comme auxine de synthèse au même titre que le 2,4-D dans certains protocoles d'embryogenèse somatique. Ainsi, l'Ac 15B5 pourrait servir au dosage de cette molécule lors d'autres tests.

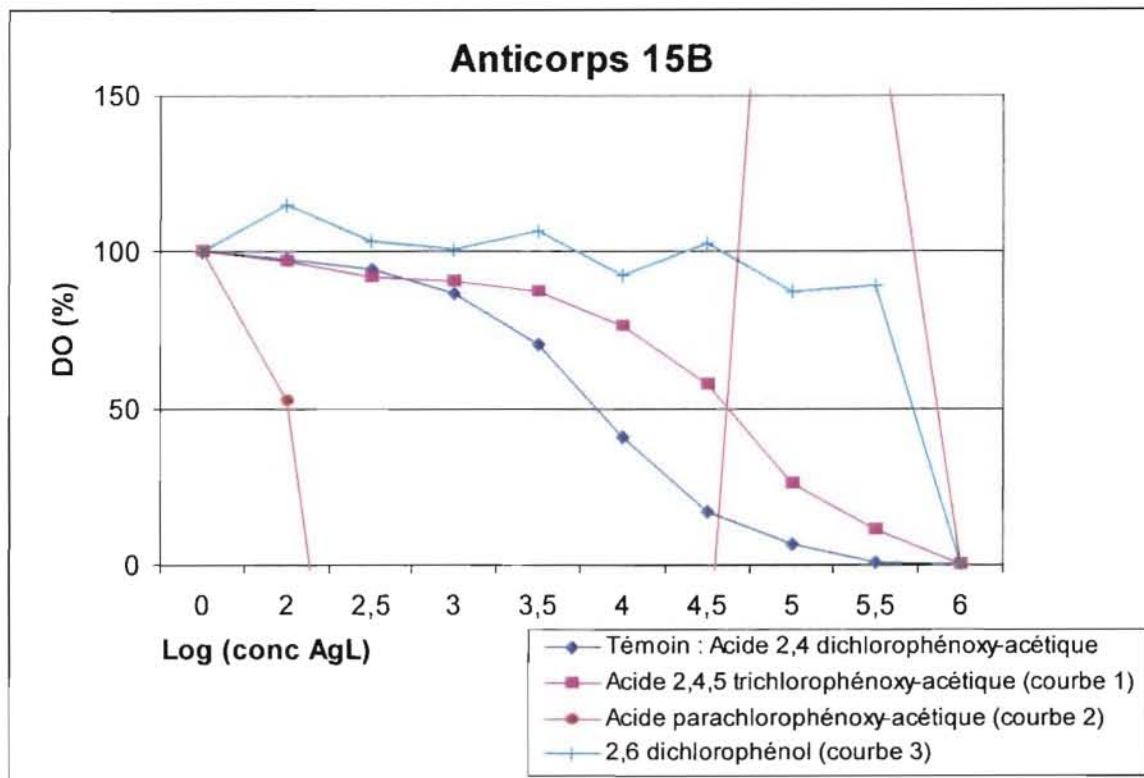


Figure 16 : Exemple de réactions des molécules testées face à l'anticorps.

Tableau 7 : Résultats significatifs des réactions croisées pour l'Ac 15B5 et l'Ac 11G5.

Molécules testées	Anticorps 15B5	Anticorps 11G5
Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique	RD	RD
Acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique	RD	NR
2,4,5-trichlorophénol	NR	NR
Pentachlorophénol	RD	NR
Acide phénoxy-acétique	NR	R
Acide parachlorophénoxyacétique	NR	
2,6-dichlorophénol	R	
2,4,6-trichlorophénol	RD	RD
Acide 3,4- dichlorophénoxyacétique	R	NR
ANA	NR	R
AIA	NR	NR
ZR	NR	RD
iPA	NR	RD

Légende

NR : L'anticorps ne reconnaît pas le molécule testée
R : L'anticorps reconnaît la molécule testée
RD : L'anticorps reconnaît et dose la molécule testée

1.3.2. Récapitulatif des caractéristiques des 2 anticorps

Après avoir réalisé ces tests préliminaires de dosage, nous avons pu évaluer pour chacun des anticorps, leurs qualités et leurs inconvénients.

Le tableau 8 récapitule les caractéristiques de chaque anticorps à prendre en considération pour choisir celui qui servira au dosage des échantillons.

Tableau 8: Récapitulatif des caractéristiques des anticorps 11G5 et 15B5.

Anticorps 11G5	Anticorps 15B5
- Sensibilité : 10 pmoles	- Sensibilité : 3 pmoles
- Reconnaît certaines molécules testées, présentes dans les milieux de culture.	- Il ne dose pas les molécules testées, présentes dans les milieux de culture.
- Reconnaît certaines molécules testées, présentes dans les cellules végétales.	- Il ne dose pas les molécules testées, présentes dans les cellules végétales.
- Les courbes standards de dosages sont plus ou moins variables entre les répétitions.	- Les courbes standards de dosages sont homogènes entre les répétitions.

Suite à ces résultats (Tableau 8), nous avons choisi de travailler avec l'anticorps 15B5 car il semble être le plus adapté pour le dosage du 2,4-D dans les échantillons végétaux.

II ETUDE DES QUANTITES DE PHYTOHORMONES PRESENTES DANS LES TISSUS VEGETAUX

2.1. Phytohormones détectées dans les tissus végétaux

D'après des tests effectués au laboratoire GeneTrop (Lescoul, 1998 ; Lyakurwa, 1997), les anticorps anti-cytokinines que nous avons utilisé (anticorps anti-iPA et anticorps anti-ZR), peuvent reconnaître différentes formes de cytokinines. Il en est de même pour l'anticorps anti-2,4-D (voir partie 1.3-C). Avant d'effectuer le dosage proprement dit des échantillons, nous avons donc réalisé un immunohistogramme. Pour cela, nous avons testé la réactivité de chacune des fractions HPLC (fractions allant de 11 à 50) de chacun des échantillons vis-à-vis des deux anticorps anti-cytokinines et de l'anticorps anti-2,4-D, qui lui contrairement aux 2 anticorps anti-cytokinines n'avait jamais été testé sur des échantillons végétaux..

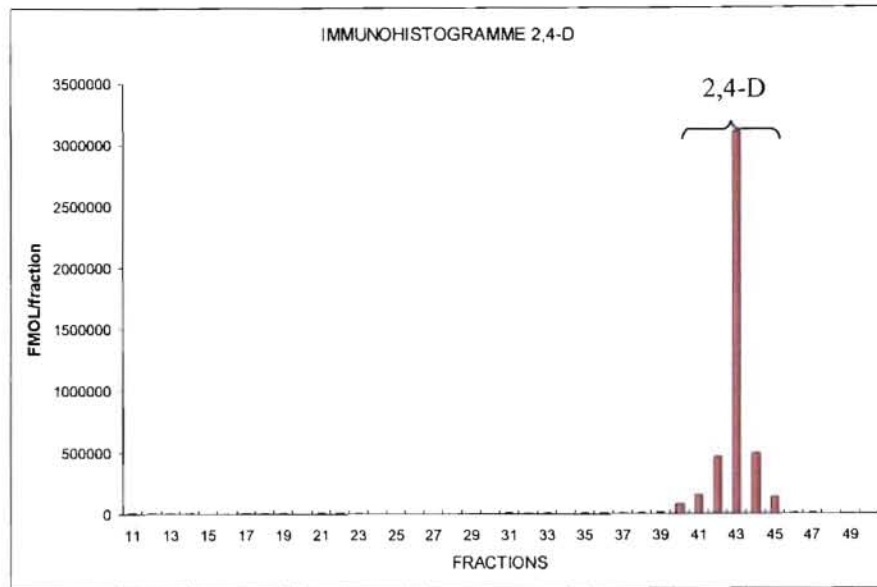
Nous avons ainsi pu tracer des profils immunoréactifs pour chaque hormone, et pour chaque échantillon. Un immunohistogramme type est présenté pour chaque forme hormonale (Figure 17).

Pour ce qui est de l'anticorps anti-2,4-D, un seul pic est détecté. Il correspond aux fractions 42,43,44 (Figure 17-1). Aucune autre forme hormonale n'a été reconnue par l'anticorps anti-2,4-D utilisé pour le dosage dans les échantillons végétaux.

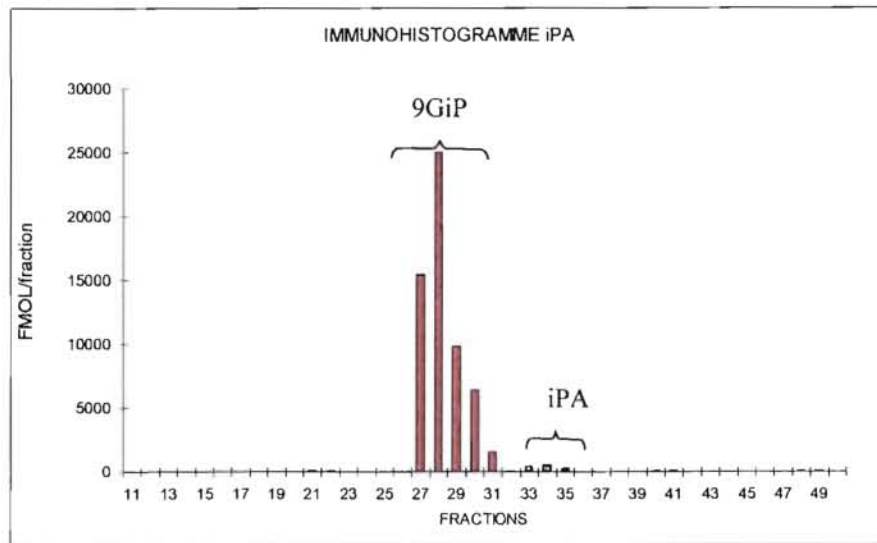
Avec les anticorps anti-cytokinines (ZR et iPA), plusieurs produits ont été détectés dans les échantillons végétaux de palmier à huile.

- Pour l'anticorps anti-ZR, nous avons observé une seule forme hormonale avec le pic correspondant à la zéatine riboside (fractions 22, 23 ; Figure 17-2).
- Concernant l'anticorps anti-iPA, nous avons pu détecter la forme iPA (fraction 36) et une autre forme hormonale (fraction 27, 28, 29, 30 ; Figure 17-3). Il pourrait s'agir de la forme glucosylée (9GiP) de l'isopentenyladénine (Lescoul, 1998).

1)



2)



3)

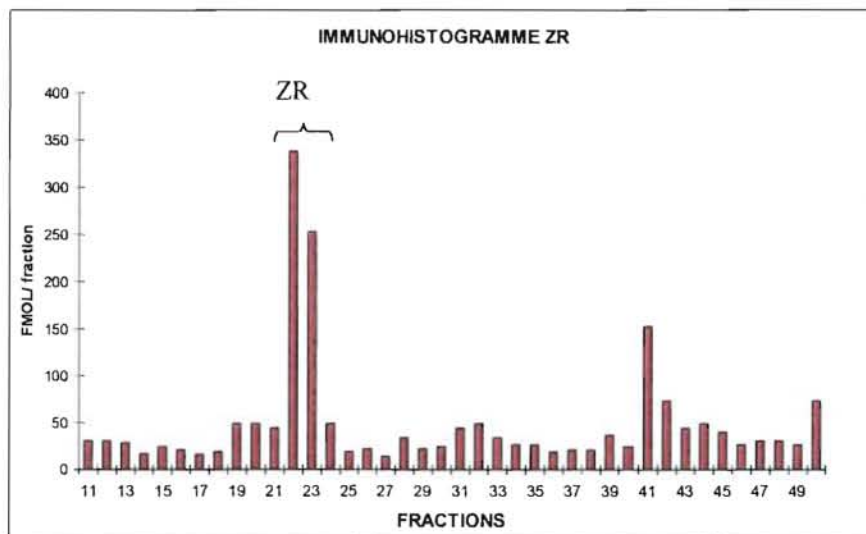


Figure 17 : Profils immunoréactifs des échantillons de palmier traités avec les anticorps :
1) anti-2,4-D
2) anti-iPA
3) anti-ZR

Tableau 9 : Quantités de phytohormones dosées pour chacune des répétitions de chaque échantillons, aux 2 stades de culture étudiés.

ND signifie que la technique de dosage n'a pas détectée de phytohormones.

Les lettres A, B, C et D correspondent aux traitements de 2,4-D appliqués au milieu de culture lors du stade suspensions cellulaires.

	Répétitions	Quantité de 2,4-D (pmol/mg MF)	Quantité de 9GiP (pmol/mg MF)
Suspensions cellulaires A	1	10,9	ND
	2	8,3	ND
Suspensions cellulaires B	1	7,4	ND
	2	2,7	ND
Suspensions cellulaires C	1	3,4	ND
	2	8,1	ND
Suspensions cellulaires D	1	2,6	ND
	2	4,8	ND
Pro-embryons A	1	7,3	0,2
	2	8,1	0,6
Pro-embryons B	1	2,8	0,5
	2	3	0,5
Pro-embryons C	1	1,6	0,2
	2	2,1	0,3
Pro-embryons D	1	4	0,5
	2	4,9	0,4

Toutes ces formes hormonales ont été prises en considération lors du dosage des échantillons végétaux.

2.2. Résultats des dosages sur les échantillons végétaux

2.2.1. Quelques remarques préliminaires des résultats du dosage des phytohormones

Avant de présenter les résultats, il est important de mentionner que nous avons parfois constaté des différences importantes de dosage entre les 2 répétitions du même échantillon végétal (par exemple la première répétition des suspensions cellulaires du traitement B contient 7,4 pmol/mg MF, alors que la deuxième répétition contient 2,7 pmol/mg MF). Le tableau 9 indique pour chaque échantillon végétal, les quantités de phytohormones dosées. Dans la partie discussion nous essayerons d'expliquer quelles peuvent être les causes de ces variations.

Pour l'étude et l'interprétation des résultats, nous avons travaillé avec la moyenne des 2 répétitions de chaque échantillon végétal.

2.2.2. Les suspensions cellulaires

Juste avant l'étape d'extraction des hormones, les suspensions cellulaires ont été rincées avec du Mi52 liquide (sans 2,4-D) pour éliminer le 2,4-D qui pourrait être présent à la surface des cellules, afin d'être certain de doser le 2,4-D présent à l'intérieur des suspensions cellulaires.

Les résultats des dosages sont présentés sur la Figure 18.

Nous avons constaté que la quantité de 2,4-D présente dans les suspensions cultivées sur traitement A est significativement plus importante (9,6 pmol /mg MF) que celles dosées dans les suspensions cellulaires des traitements B, C et D (respectivement : 5 pmol /mg MF ; 5,7 pmol /mg MF et 3,7 pmol /mg MF) au seuil de 5%.

En parallèle, pour les traitements B, C, et D, nous avons observé que les quantités de 2,4-D dosées ne sont pas significativement différentes entre elles.

2.2.3. Les pro-embryons

Les quantités de 2,4-D présentes dans les pro-embryons se comportent comme celles dosées dans les suspensions cellulaires. Ainsi on peut voir que les pro-embryons cultivés sur traitement A ont une teneur en 2,4-D plus importante que les autres traitements (Figure 19). L'analyse de variance montre une différence significative au seuil de 5% entre la valeur obtenue pour le traitement A (7,8 pmol/mg MF) et les valeurs obtenues pour les 3 autres traitements. Là aussi, les traitements B, C et D n'ont pas une quantité de 2,4-D significativement différente (avec une valeur respective de 1,6 pmol /mg MF ; 1,8 pmol /mg MF et 4,4 pmol /mg MF).

En comparant la teneur en 2,4-D entre les stades suspensions cellulaires et pro-embryons, nous constatons que les tissus des pro-embryons ont tendance à avoir moins de 2,4-D que ceux des suspension cellulaires (Figure 20). Cependant, l'analyse de variance indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les teneurs en 2,4-D des deux stades de culture.

Nous avons aussi analysé un témoin « blanc » extrait de feuilles de palmier à huile issu de semis, et n'ayant donc jamais été en culture *in vitro*. Nous n'avons trouvé aucune trace détectable de 2,4-D dans les tissus de ce témoin.

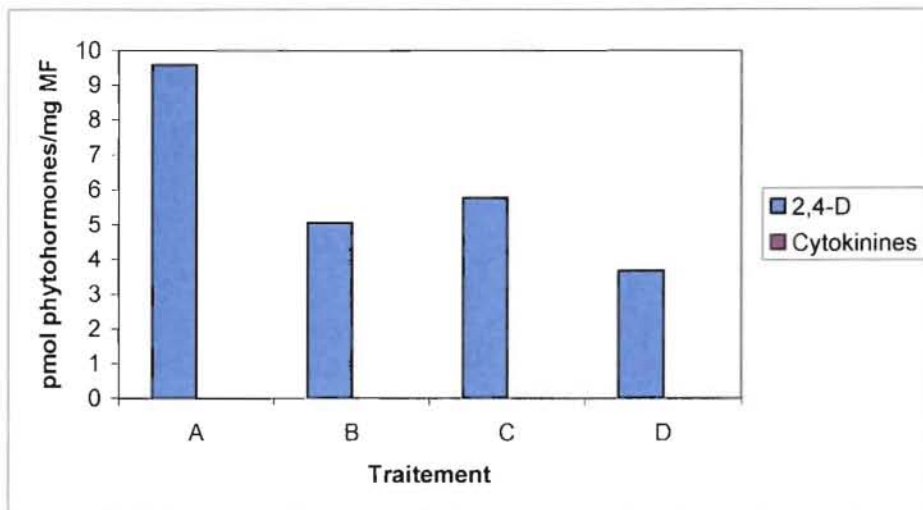


Figure 18 : Quantités de phytohormones détectées dans les tissus végétaux au stade suspensions cellulaires.

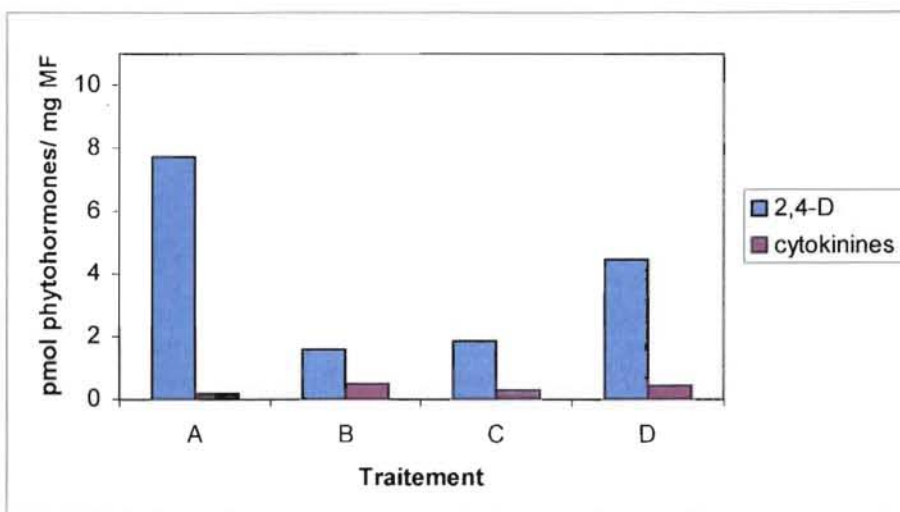


Figure 19 : Quantités de phytohormones détectées dans les tissus végétaux au stade pro-embryons.

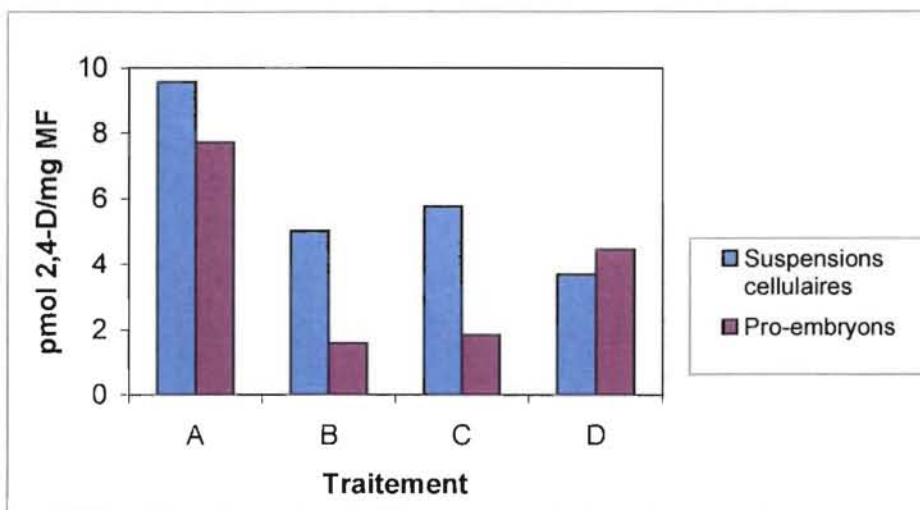


Figure 20 : Comparaison des teneurs en 2,4-D dosées dans les deux stades de culture étudiés.

A, B, C et D correspondent aux traitements de 2,4-D apportés au cours du stade proliférations cellulaires avec comme quantité respective : 0,5 ; 0,75, 1 et 1,2 mg 2,4-D/l.

2.3. Evolution des teneurs en cytokinines endogènes au cours des 2 stades de développement étudiés

2.3.1. Les suspensions cellulaires

Nous n'avons pas détecté la présence de cytokinines (ou les quantités étaient inférieures à la quantité minimum détectable par la méthode de dosage utilisée, à savoir 3fmol pour 50 µl d'échantillon dosé), pour l'ensemble des suspensions cellulaires.

2.3.2. Les pro-embryons

Contrairement aux suspensions cellulaires, les pro-embryons contiennent des cytokinines de type iPA. L'anticorps anti-iPA a reconnu selon les échantillons la forme iPA, ou 9GiP. Cependant, seule la forme 9GiP était en quantité dosable.

La méthode de dosage n'a détecté aucune forme de zéatine (ou les quantités présentes dans les tissus végétaux étaient inférieures à la quantité minimum dosable par la méthode de dosage utilisée).

Entre chaque traitement (A, B, C et D), la quantité de 9GiP varie significativement au seuil de 5% (Figure 20), allant de 0,2 pmol/mg MF pour le traitement A, à 0,5 pmol/mg MF pour le traitement B.

Le témoin « blanc » issu de semis ne présente aucune cytokinine dosable.

Les travaux effectués au cours des 6 mois de stage se sont intégrés dans l'étude de la variation somaclonale du palmier à huile, à travers les dosages des teneurs endogènes en cytokinines et de 2,4-D, à 2 stades clefs du processus d'embryogenèse somatique.

La première étape des travaux a été d'adapter la méthode de dosage au 2,4-D pour ensuite quantifier au sein d'un même échantillon, cette auxine de synthèse et des cytokinines.

Dans un deuxième temps, nous avons appliqué cette méthode à des échantillons végétaux.

DISCUSSION

I. POSSIBILITES ACTUELLES DE DOSAGE DES PHYTOHORMONES ET AMELIORATIONS A APPORTER

L'ensemble des mises au point effectuées à certaines étapes de la méthode de dosage, a permis avec succès de quantifier les phytohormones recherchées (2,4-D et cytokinines) dans les tissus végétaux étudiés. Cette méthode présente l'avantage de doser simultanément ces différentes formes hormonales dans un même extrait végétal (Maldiney, 1988). Actuellement, nous pouvons donc détecter et doser le 2,4-D et les cytokinines de type isopentényladénosine (iPA), et zéatine riboside (ZR) à l'état de traces (de l'ordre des fmol pour les cytokinines et des pmol pour le 2,4-D) dans des tissus de palmier à huile, ce qui n'avait jamais été fait auparavant.

Cependant, certains résultats nous amènent à penser que quelques étapes du protocole devraient être améliorées.

En effet, comme nous l'avons vu dans la partie Résultats, nous avons observé que les 2 répétitions d'un même échantillon présentaient des résultats différents, notamment pour le 2,4-D (Tableau 9). Il est possible que plusieurs paramètres interviennent à différentes étapes du protocole soient la cause de cette variation de résultats.

Tout d'abord, l'étape d'extraction, qui consiste à broyer les tissus dans un mélange de solvants, est sans doute l'étape la plus délicate à réaliser, car il est très difficile de contrôler son efficacité (Maldiney, 1988). Cette difficulté d'extraction est principalement due au fait que les hormones existent sous différentes formes dans les tissus végétaux : les formes dites « libres » (qui sont généralement les plus actives), et les formes dites « liées » (qui sont couplées à des acides aminés, à des sucres ou autre). Il est donc possible que le solvant utilisé lors de l'extraction ne solubilise pas de la même manière les 2 formes hormonales, ni même qu'il extrait toute la quantité hormonale. Ce qui dans ce cas amène une sous estimation de la quantité d'hormone présente dans les tissus.

Par ailleurs, d'autres paramètres peuvent fausser le dosage hormonal même si toutes les formes hormonales sont extraites.

Tout d'abord, il est possible lors de l'étape de séparation par HPLC, que les hormones liées n'aient pas le même temps de rétention que le 2,4-D libre ou que les cytokinines libres et qu'elles ne soient pas collectées avec le protocole employé lors de cette expérimentation. Si ces formes liées sont éluées en dehors de la période que nous avons défini (collecte des fractions allant de 11 min à 50 min), elles ne seront pas décelées.

Par ailleurs, les anticorps utilisés pour doser les phytohormones étudiées ne sont peut être pas dirigés contre les formes hormonales liées. Dans ce cas, même si les formes liées sont extraites et séparées, elles ne pourront ni être détectées, ni être dosées.

Pour tenter de contrôler ces facteurs, qui peuvent intervenir dans la fiabilité des dosages des phytohormone, nous proposons dans la suite de l'étude d'approfondir quelques paramètres du protocole de quantification.

La première démarche serait de modifier légèrement les conditions de séparation des hormones par HPLC. Dans le protocole actuel nous réalisons l'étape de dosage pour les fractions allant de 11 à 50 minutes. Or il est possible que les hormones couplées soient éluées avant la fraction 11, ou après la fraction 50. Pour déceler leur présence il faudrait augmenter l'intervalle de collecte des fractions.

Il serait aussi possible de modifier le gradient d'élution. Par exemple Klems et al. (1998), ont mis au point un gradient d'élution qui permet de séparer correctement du 2,4-D lié (2,4-D-asparate et 2,4-D-ester glucosyl) chez le concombre. Appliquer ce gradient d'élution aux échantillons végétaux étudiés serait très intéressant car il permettrait de savoir si le palmier à huile contient lui aussi ces 2 formes de 2,4-D liées.

Il serait aussi intéressant de tester sur les échantillons végétaux d'autres anticorps qui seraient susceptibles de reconnaître les formes liées. Pour doser le 2,4-D, il serait notamment judicieux de tester l'anticorps monoclonal 11G5, qui d'après les tests préliminaires de dosage est moins spécifique que le 15B5 pour certains types de molécules (Tableau 7).

Par ailleurs, lors de l'étape d'extraction, il serait judicieux dans un premier temps de doser et de comparer au sein d'un même échantillon, des tissus végétaux hydrolysés à l'acide, et des tissus non hydrolysés. En effet, l'hydrolyse devrait séparer les hormones des composés auxquelles elles sont liées. Ainsi, en comparant la quantité d'hormones présentes dans les tissus végétaux hydrolysés et non hydrolysés, nous pourrions connaître l'efficacité du tampon d'extraction : si les tissus hydrolysés contiennent plus d'hormones que les tissus non hydrolysés, cela signifie que 1) l'échantillon contient des formes liées et 2) le solvant utilisé ne dissout pas les hormones couplées à un composé.

Par conséquent, si le tampon d'extraction ne dissout pas les formes liées, il faudrait dans un deuxième temps, tester de nouveaux solvants ou effectuer à chaque extraction une hydrolyse, pour ainsi optimiser le rendement de cette étape.

L'objectif de départ était de parvenir à doser différentes classes hormonales (2,4-D et cytokinines) dans un même échantillon de palmier à huile, ce qui n'avait jamais été fait jusqu'à présent. Pour cela, nous avons utilisé un protocole relativement courant qui est un compromis permettant le dosage simultané de différentes hormones dans un même extrait végétal.

L'application de ce protocole a permis d'obtenir des premiers résultats intéressants qui serviront à mieux comprendre l'origine des variations somaclonales chez le palmier à huile.

Cependant il serait intéressant de réaliser les expérimentations précédemment décrites car elles permettraient de 1) mieux connaître les formes hormonales étudiées (si l'extrait contient des hormones « libre » ou « liée », et à quelle proportion) et de 2) optimiser davantage la précision de dosage.

Les améliorations à apporter au protocole de dosage n'ont pas pu être intégrées dans le cadre de cette étude car nous avons été limité par le temps.

II. QUANTIFICATION DES PHYTOHORMONES

2.1. Dosage des phytohormones au stade suspensions cellulaires

Le dosage hormonal avec l'anticorps anti-2,4-D a permis de révéler des teneurs en 2,4-D dans les échantillons végétaux étudiés. L'accumulation de cette molécule est différente dans les suspensions cellulaires cultivées sur traitement A par rapport aux 3 autres traitements (B, C et D) (Figure 18). Il est à signaler que le phénotype des suspensions cellulaires cultivées sur traitement A était différent (granulométrie des suspensions plus importantes), par rapport aux autres suspensions cellulaires. La quantité de 2,4-D importante présente dans les suspensions cellulaires du traitement A vient peut être du fait que les tissus végétaux ont un comportement différent face au 2,4-D (ce phénotype retient peut être différemment la phytohormone) par rapport aux autres suspensions cellulaires qui présentaient un aspect externe homogène.

Pour les tissus végétaux des traitements B, C et D, l'absence de différence significative peut supposer 2 hypothèses :

- Il y a réellement la même teneur en 2,4-D dans les suspensions cellulaires ayant subi les 3 traitements. Dans ce cas, une augmentation de la teneur en 2,4-D dans les milieux de culture n'influencerait pas la quantité de cette phytohormone dans les tissus végétaux. Cependant, il aurait été mis en évidence qu'une augmentation de la concentration de 2,4-

D dans le milieu de culture entraînerait un accroissement de la teneur en 2,4-D dans les tissus végétaux de carotte (Coutos-Thévenot, 1990) .

Ceci nous amène à proposer la deuxième hypothèse :

- Il y a une différence de teneur en 2,4-D dans les tissus végétaux, en fonction des traitements. Cette différence n'a peut être pas été mise en évidence à cause du dispositif expérimental (2 répétitions), qui n'est pas assez fin pour obtenir des résultats précis.

Pour apporter des éléments de réponse, il serait nécessaire d'augmenter le nombre de répétitions.

Par ailleurs nous avons constaté que les anticorps anti-cytokinines n'ont détecté aucune forme hormonale dans les tissus au cours de ce stade de culture.

Là aussi, deux hypothèses peuvent être émises :

- Soit il y a réellement aucune forme de cytokinines, mais cela semble peu probable car à ce stade de culture les cellules sont très actives et se divisent intensément. De nombreuses études sur le rôle des hormones ont montré que les cytokinines sont directement liées à la division cellulaire (Davies, 1995).
- Soit ces hormones ne sont pas détectées ; c'est à dire que les tissus végétaux contiennent des cytokinines mais elles ne peuvent pas être mises en évidence. En effet, il est possible que la teneur soit inférieure au seuil limite de détection de la technique utilisée. Nous pouvons aussi envisager que lors du dosage, les cytokinines présentes dans les tissus végétaux n'étaient pas accumulées sous formes libres ou bien l'extraction était insuffisante.

2.2. Dosage des phytohormones au stade pro-embryons

Dans les pro-embryons on retrouve du 2,4-D (Figure 19) pour les quatre traitements alors qu'ils ont été cultivés sur un milieu sans 2,4-D pendant un mois. Cette observation montre que du 2,4-D pénètre dans les tissus végétaux lors du stade suspensions cellulaires et qu'il est retenu dans les tissus végétaux.

D'après des expérimentations faites en 1998, aucune trace de 2,4-D n'a été trouvée dans les milieux de culture de prétraitement (Borgel, communication personnelle) ; le 2,4-D ne serait donc pas re-largué dans le milieu de culture au cours de ce stade. Cependant, il faut souligner que la quantification du 2,4-D dans les milieux de culture *in vitro* a été faite par HPLC, et cette technique ne permet pas de détecter des quantités de phytohormones très faibles.

Pour être certain qu'aucune quantité de 2,4-D n'a été re-larguée, il faudrait alors doser les milieux de culture par la méthode ELISA utilisée pour les échantillons végétaux. Il faut aussi mentionner qu'aucun dosage n'a été fait sur les milieux de rinçage des suspensions cellulaires, il serait donc très intéressant d'effectuer aussi des quantifications par ELISA sur ces milieux.

Par ailleurs, comme pour les suspensions cellulaires, les tissus végétaux issus du traitement A contiennent plus de 2,4-D que les 3 autres traitements (B, C et D), pour lesquels les teneurs ne sont pas significativement différents entre elles (Figure 19).

Le fait qu'il n'y ait pas de différence significative entre les traitements B, C et D conduit aussi à 2 hypothèses :

- Les résultats obtenus sont représentatifs des teneurs en 2,4-D contenues réellement dans les pro-embryons. Dans ces conditions, les pro-embryons placés sur traitements B, C et D contiennent la même teneur en 2,4-D.

Si cette hypothèse est confirmée, il serait alors intéressant de faire des études de compartimentation, pour voir si le 2,4-D est stocké dans une zone spécifique de la cellule, et en quantité définie. La mise en place d'une telle expérimentation demanderait l'utilisation de 2,4-D radioactif pour ainsi le localiser dans les tissus végétaux.

- Les résultats obtenus par les 2 répétitions ne sont pas représentatifs de la population globale, et dans ce cas, on peut suggérer que les pro-embryons des traitements B, C et D pourraient avoir une quantité de 2,4-D significativement différente entre eux.

Pour connaître réellement quelle hypothèse est la bonne, il faudrait augmenter le nombre de répétitions.

Toutefois, ces premiers résultats nous indiquent que le 2,4-D est rémanent, et ainsi il est stocké dans les tissus végétaux durant plusieurs semaines.

A l'issue de ce stade de culture, en plus du 2,4-D, nous avons aussi détecté des traces de cytokinines (forme 9GiP), pour chaque traitement.

2.3. Comparaison des phytohormones entre les stades suspensions cellulaires et pro-embryons

Pour chaque traitement, la teneur en 2,4-D contenue dans les suspensions cellulaires n'est pas significativement différente de la teneur présente dans les pro-embryons.

Ces résultats permettent de discuter dans 2 sens différents :

- Soit par traitement, les suspensions cellulaires contiennent la même quantité de 2,4-D que les pro-embryons. Ce résultat permettrait de dire que le 2,4-D qui pénètre dans les suspensions cellulaires est retenu intégralement dans les tissus végétaux pendant au moins 1 mois (durée du prétraitement).
- Soit les résultats obtenus lors de l'expérimentation ne sont pas représentatifs de la population, et dans ce cas on peut supposer que les teneurs en 2,4-D seraient différentes selon les 2 stades. Les pro-embryons auraient alors moins de 2,4-D que les suspensions cellulaires, comme le suggère la Figure 20. Cela voudrait dire que du 2,4-D serait relargué lors du rinçage des suspensions cellulaires, ou dans le milieu de culture des pro-embryons. Nous pouvons aussi penser qu'à l'issue du mois de prétraitement, une partie du 2,4-D est métabolisée.

Cette dernière hypothèse est par ailleurs étayée par les résultats de dosage des cytokinines, qui ne sont pas quantifiées dans les suspensions cellulaires alors qu'au stade pro-embryons la forme 9GiP est dosée.

Il a été montré qu'une teneur élevée en auxine dans les tissus de palmier à huile baisserait la quantité des cytokinines endogènes (Besse, 1992).

Le fait de trouver des cytokinines dans les pro-embryons suggère alors qu'une partie du 2,4-D est éliminée au cours du rinçage et/ ou dans le milieu de culture des pro-embryons. Ainsi, cette baisse en 2,4-D dans les tissus végétaux permettrait d'accumuler certaines formes de cytokinines.

Cette supposition est appuyée par les travaux menés sur la carotte par Coutos-Thevenot (1990). Il a été mis en évidence que le 2,4-D est parfaitement échangeable entre le milieu et les compartiments intracellulaires. Cette propriété met en évidence l'importance des rinçages des suspensions cellulaires dans le protocole de transfert des cellules en conditions d'expression de l'embryogenèse.

Tableau 10 : Composés qui différencient les milieux de culture des suspensions cellulaires et des pro-embryons.

Milieu de culture des suspensions cellulaires	Milieu de culture des pro-embryons
Biotine	
Adénine Sulfate	Hydrolysate de caséine
Glucose	Saccharose

2.4. Synthèse

En se replaçant dans l'hypothèse de départ, les résultats obtenus peuvent suggérer une action du 2,4-D sur la teneur en cytokinines endogènes. En effet, nous avons montré que par rapport aux suspensions cellulaires, la teneur en cytokinines augmente dans les pro-embryons. Nous l'avons relié à une diminution du 2,4-D entre le stade suspensions cellulaires et le stade pro-embryons, mais des dosages supplémentaires devront venir affirmer ces résultats. Cependant, ces résultats supposent qu'une forte concentration en 2,4-D agirait sur le métabolisme des cytokinines endogènes. C'est le cas des suspensions cellulaires qui ont été cultivées dans des milieux de culture comportant des concentrations de 2,4-D allant de 0,5 mg/l à 1,2 mg/l et qui contiennent dans leurs tissus végétaux des quantités de cette phytohormone allant de 2,6 à 10,9 pmol/mg MF. Alors que les pro-embryons ont été cultivé sur un milieu sans 2,4-D, et ils contiennent dans leurs tissus végétaux des quantités de 2,4-D allant de 1,6 à 8,1 pmol/mg MF. Ce qui pourrait correspondre à un signal qui permettrait de diriger les cellules indifférenciées en pro-embryons.

En revanche, si cette hypothèse n'est pas confirmée dans la suite de l'expérimentation, et qu'il s'avère que la teneur en 2,4-D est similaire dans les tissus végétaux lors des stades suspensions cellulaires et pro-embryons, alors un autre mécanisme serait impliqué dans l'apparition des cytokinines. D'autres axes de recherche devraient alors être mis en place.

Par ailleurs, des facteurs autres que le 2,4-D pourraient intervenir dans la régulation de la synthèse des cytokinines. En effet, certains nutriments apportés dans les milieux de culture auraient une action sur les hormones (Krikorian, 1995).

Dans le protocole expérimental utilisé, la composition des milieux de culture n'est pas la même pour les suspensions cellulaires et les pro-embryons (Tableau 10). Il est donc possible que ces composés influencent sur la teneur en cytokinines dans les cellules végétales.

Pour voir si ces composés influencent sur les teneurs en cytokinines endogènes ou en 2,4-D, il faudrait essayer de cultiver les 2 stades de culture sur le même milieu (qui différerait uniquement en 2,4-D).

Les résultats obtenus doivent nous laisser très vigilants quant aux hypothèses émises. En effet, avant d'affirmer ces résultats, il faudrait augmenter le nombre de répétitions d'extraction du même échantillon pour tout d'abord obtenir des résultats significatifs qui permettraient de savoir si les quantités de phytohormones que l'on a observé sont bien fonctions des 2 stades de culture étudiés. Il serait aussi judicieux d'augmenter le nombre de répétitions du même traitement pour le clone 87 pour s'assurer que l'effet « traitement » influence les résultats de dosage.

En parallèle, il faudrait effectuer ces dosages sur différents clones, pour voir si les doses hormonales sont spécifiques au génotype étudié, ou si elles sont seulement dépendantes du stade de culture.

Cependant, les résultats obtenus sont intéressants car ils suggèrent une interaction entre la teneur en cytokinines et en 2,4-D, et ils permettront d'établir des plans expérimentaux pour apporter des éléments complémentaires à ces premiers résultats.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'ensemble des expérimentations effectuées au cours de ces 6 mois de stage a contribué à l'étude des variations somaclonales au cours de l'embryogenèse somatique chez le palmier à huile.

La première partie de ce travail a consisté à optimiser la technique de quantification du 2,4-D et des cytokinines au sein d'un même extrait végétal.

Tout d'abord, nous avons testé plusieurs gradients d'élutions d'HPLC pour séparer correctement dans un même extrait végétal du 2,4-D et différentes formes de cytokinines. Le gradient d'élution déterminé a permis de purifier toutes les phytohormones étudiées.

Ensuite, nous avons amélioré la technique de dosage du 2,4-D par ELISA. Les mises au point ont été effectuées sur 2 anticorps monoclonaux.

A l'issue des tests, le meilleur « couple » de dilutions « AgF-Ac » a été sélectionné, pour chacun des deux anticorps. Nous avons alors pu préciser la spécificité des 2 anticorps vis à vis de molécules étant soit présentes dans les milieux de culture ou dans les tissus végétaux, soit structurellement proches des phytohormones.

Suite à ces tests, nous avons obtenus pour chacun des deux anticorps, des conditions de dosage fiables et précises. Ces tests ont aussi permis de déterminer l'anticorps qui présente le plus de qualités pour doser des extraits végétaux.

Désormais, le 2,4-D peut être détecté à l'état de traces (de l'ordre de 3 pmol) dans les échantillons végétaux. Par contre les paramètres de dosage des cytokinines n'ont pas été modifiés, car cette technique de dosage est couramment utilisée sur ces phytohormones.

Les mises au point effectuées permettent désormais de doser en routine au sein d'un même extrait végétal du 2,4-D et des cytokinines de type iPA et ZR.

Dans une deuxième partie, nous avons appliqué cette technique de dosage pour étudier l'influence du 2,4-D sur la teneur en cytokinines endogènes, qui s'inscrit dans le cadre de l'étude des variations somaclonales au cours du processus d'embryogenèse somatique, chez le palmier à huile. Pour mener à bien cette étude, le génotype analysé a été multiplié par embryogenèse somatique, et quatre concentrations de 2,4-D ont été apportées au cours du cycle de prolifération cellulaire.

Les dosages ont été fait à 2 stades clefs du processus d'embryogenèse somatique : au stade suspensions cellulaires en présence de 2,4-D et au stade pro-embryons (sans 2,4-D ajouté).

L'absence de résultats significatifs ne permet pas pour le moment de conclure s'il y a un effet de la quantité de 2,4-D apportée dans les milieux de culture, sur la teneur en cytokinines endogènes des tissus végétaux. De ce fait, seules des hypothèses ont pu être suggérées. Les données actuelles sur les teneurs en 2,4-D et en cytokinines endogènes ne peuvent donc pas être reliées aux résultats obtenus sur les taux de méthylation de l'ADN en 1998.

A partir de ces premiers résultats, aucune conclusion définitive ne peut être tirée, tant que les autres répétitions de chaque échantillons n'auront pas été analysées. Il faut cependant noter que la technique de dosage employée est très lourde, et que très peu d'échantillons peuvent être travaillés en même temps.

Cette expérimentation s'inscrit dans une étude complexe, et les premiers résultats ainsi obtenus seront confirmés en effectuant des dosages complémentaires grâce à la technique de quantification mise au point.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BESSE I. (1992). Recherche du déterminisme hormonal de l'anomalie de la morphogenèse florale liée à l'embryogenèse somatique chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). Thèse de Doctorat. Université Paris VI. 158p.
- CARDIN L., DEVERGNE JC., PITRAT M., (1984). Dosage immunoenzymatique (ELISA) du virus de la mosaïque du concombre. I. Aspect méthodologique- Agronomie, 4 (2), 125-135.
- CORLEY R.H.V., LEE C.H., LAW L.H. and WONG C.Y. (1986). Abnormal flower development in oil palm clones. Planter, Kuala Lumpur. 62, p. 233 - 240.
- COUTOS-THEVENOT P. (1990). Isolement et caractérisation physiologique et biochimique de lignées cellulaires de *Daucus carota* L. à potentialités embryogènes différentes - Thèse Doctorat Université Paris VI. 107 p.
- CRUDEN R.W. (1988). Temporal dioecism : systematic breadth, associated traits, and temporal patterns. Bot. Gaz. 149,1:1-15.
- DAVIES P.J., (1995)- Plant Hormones, physiology, biochemistry and molecular biology.
- DUVAL Y., AMBLARD P., RIVAL A., KONAN E., GOGOR S. and DURAND-GASSELIN 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.
- DUVAL Y., DURAND-GASSELIN T., KONAN K. et PANNETIER C. (1988). Multiplication végétative du palmier à huile par culture *in vitro*. Stratégie et résultats. Oléagineux 43 (2), p. 39 - 44.
- DUVAL Y., ENGELMANN F. and DURAND-GASSELIN 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, vol 30, 335-352.
- FOURRE J.L., BERGER P., NIQUET L., ANDRE. (1997). Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce : morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches- Theor Appl Genet 94 : 159-169.
- GALLI Y. (1996). Mise au point du dosage des protéines de réserve et de l'acide abscissique dans les embryons de palmier à huile par ELISA. Mémoire de stage, Diplôme d'Assistant Ingénieur en Biotechnologie Végétale, ENFA/UPS Toulouse, 30p.
- HARE P.D., van STADEN J., (1997). The molecular basis of cytokinin action. Plant Growth Regulation 23 : 41-78.
- HIRSCH R. (1990) - Le marché des corps gras d'origine végétale. Annexe spécifique au Rapport de la 1^{ère} revue externe de l'Institut de recherches pour les huiles et oléagineux, IRHO.
- HOCHER V. (1992). Contribution à l'étude du rôle des hormones endogènes (acide abscissique, acide indole-3-acétique et cytokinines) dans le développement de la graine et de l'embryon chez la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Etude de la compartimentation des cytokinines pendant l'embryogenèse. Thèse de Doctorat, Univ. Paris VI, 26/06/92, 157p.
- HOLLIDAY R., (1989). Une nouvelle hérédité. La méthylation de l'ADN. Pour la Science, 142, 22-29.
- JEAN V. (1998). Mise en place méthodologique pour l'étude de la méthylation de l'ADN, au cours de l'embryogenèse somatique du palmier à huile. Mémoire de stage, DUR Biotechnologies Végétales, UPS/ ENFA Toulouse, 30p.

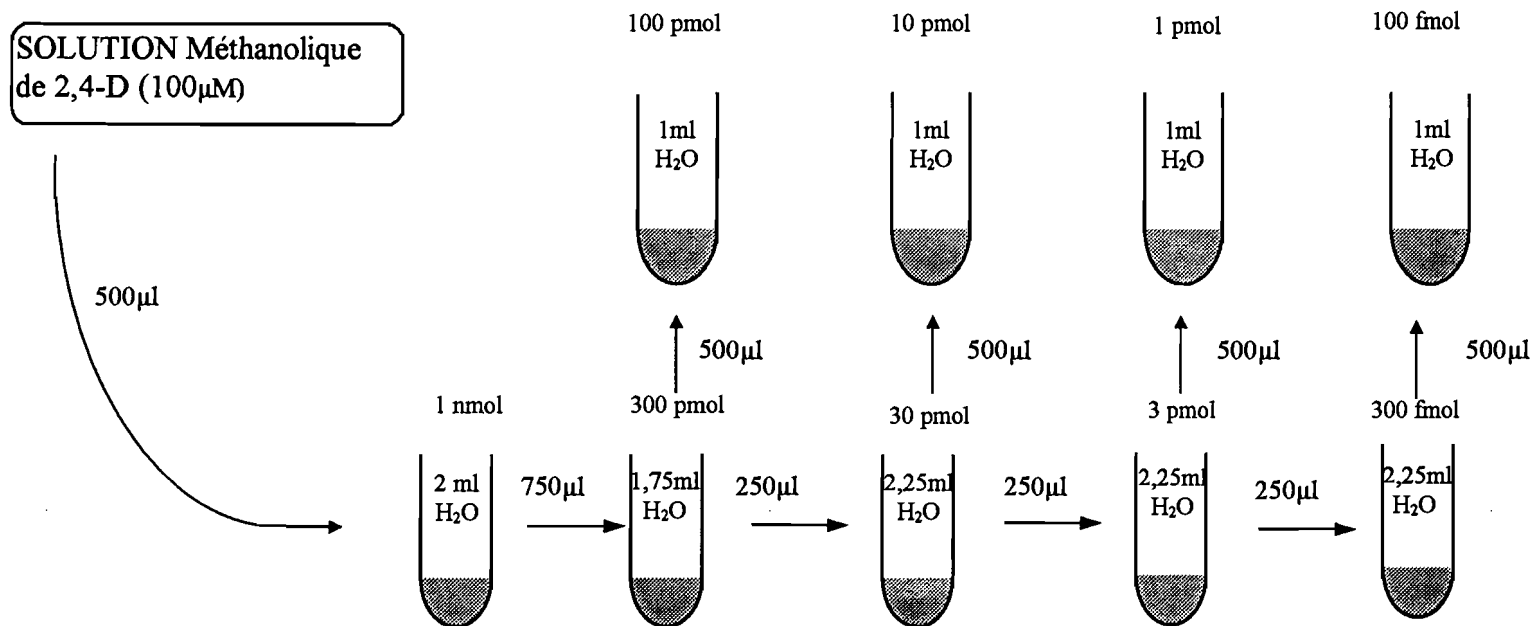
- KAEPLER SM, PHILLIPS RL (1994). Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:8773-8776.
- KARP A. (1994). Origins, Causes and Uses of Variation in Plant Tissue Culture- *Plant Cell and Tissue Culture*, 139-151.
- KLEMS M., TRUKSA M., MACHACKOVA I., EDER J., PROCHAZKA S. (1998). Uptake transport and metabolism of ¹⁴C-2,4-dichlorophénoxyacetic acid in cucumber (*Cucumis sativus* L.) explants*- *Plant Growth Regulation* 26 : 195-202.
- KRIKORIAN A.D., (1995). Hormones in Tissue Culture and Micropropagation- P.J. Davies (ed.), *Plant Hormones*, 774-796.
- LARKIN PJ, SCOWCROFT WR (1981). Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60:197-214.
- LEROUX B. (1984). Recherche méthodologique sur le dosage immunoenzymatique de trois substances de croissance végétale : l'auxine, l'acide abscissique et la zéatine riboside. Thèse de Docteur Ingénieur, INA-Paris Grignon, 110p. Thèse de Doctorat d'Etat, Université P.M. Curie, 147P.
- LO SCHIAVO F., PITTO L., GIULANO G., TORTI G., NUTI-RONCHI V., MARAZZITI D., VERGARA R., ORSELLI S. and TERZI M. (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor. Appl. Genet.*, 77: 325-331.
- LYAKURWA R.P. (1997). Dosage des hormones endogènes : adaptations techniques et contribution à l'étude de l'embryogenèse somatique, zygotique chez le cocotier (*Cocos nucifera* L.). Mémoire de fin d'études, DESS Technologies du Végétal, Université d'Angers, ENSH/ENITHP, 42p.
- MALDINEY R. (1988). Nouvelle approche méthodologique de dosage et de la localisation de phytohormones par des techniques immunologiques. Application à la tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill., cv. Craigella et à un mutant, lateral suppressor. Thèse de Doctorat d'Etat, Université P.M. Curie, Paris, 191p.
- MORCILLO F. (1998). Etude comparée de l'accumulation des protéines de réserve pendant l'embryogenèse zygotique et l'embryogenèse somatique du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 29/01/98.
- NAGL W. (1988). Genome changes induced by auxin-herbicides in seedlings and calli of *Zea mays* L.- *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 28, No. 3, pp.197-206.
- PANNETIER C., ARTHUIS P. et 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, p.119 - 122.
- PHILLIPS R.L., KAEPLER S.M., OLHOFT P. (1994). Genetic instability of plant tissue cultures : Breakdown of normal controls- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.91, pp. 5222-5226.
- RIVAL A., ABERLENC-BERTOSSI F., MORCILLO F., TREGEAR J., VERDEIL J.L., DUVAL Y. (1997). Scaling-up *in vitro* clonal propagation through somatic embryogenesis : the case of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 3(2) : 74-83.
- RIVAL A., L. BERTRAND, T. BEULE, P. TROUSLOT and P. LASHERMES, (1998). Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Plant Breeding* 117, 1 : 73-76.

- RIVAL A., L. BERTRAND, T. BEULE, P. TROUSLOT and P. LASHERMES, (1998). Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). Plant Breeding 117, 1 : 73-76.
- SOTTA, B., (1985). Application de méthodes immunoenzymatiques au dosage et à la localisation histologique de substances de croissance végétales.
- SYED R.A. (1982). Insect pollination of oil palm : Feasibility of introducing *Elaeidobius* spp. into Malaysia. - In : The oil palm in agriculture in the eighties, Vol. I. E. Pushparajah and P.S. Chew (Eds), Kuala Lumpur. p. 263-289.
- TOUCHET (de) B., DUVAL Y. and PANNETIER C. (1991). Plant regeneration from embryogenic suspension culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). Plant Cell Reports 10: 529-532.
- YOST R.W, ETTRE L.S, CONLON R.D (1989). Pratique de la chromatographie liquide. Technique et Documentation.
- ZHIRI A. (1986). Les immuno-essais. Technoscope (supplément Biofutur, juin 1986), 15 pages.

ANNEXES

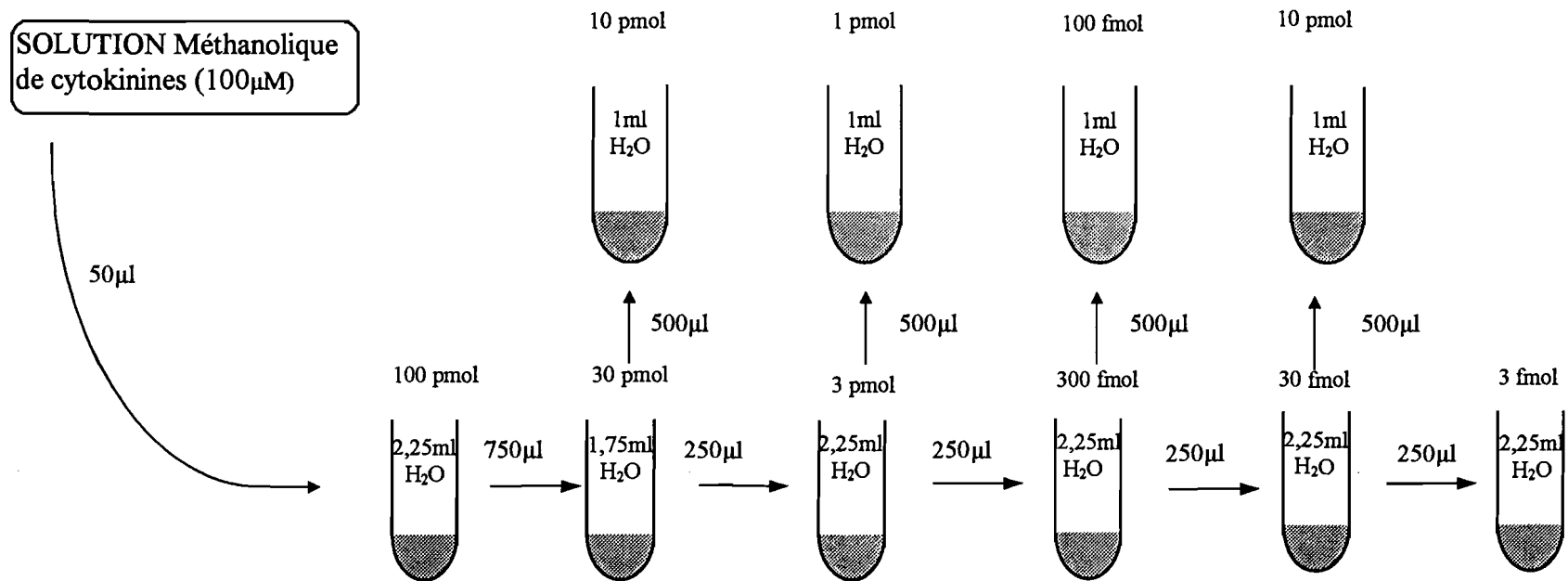
ANNEXE 1

	Milieu de prolifération cellulaire	Milieu MI 52
<u>Macro-éléments</u>		
KNO ₃	1200 mg/l	1200 mg/l
KH ₂ P	700 mg/l	700 mg/l
NH ₄ NO ₃	1300 mg/l	1300 mg/l
Ca Cl ₂ , 2H ₂ O	360 mg/l	360 mg/l
Mg SO ₄ , 7H ₂ O	300 mg/l	300 mg/l
<u>Micro-éléments</u>		
Mn SO ₄ , 2H ₂ O	18,9 mg/l	18,9 mg/l
Zn SO ₄	10 mg/l	10 mg/l
H ₃ BO ₃	10 mg/l	10 mg/l
K I	0,83 mg/l	0,83 mg/l
Cu SO ₄	0,025 mg/l	0,025 mg/l
Na Mo O ₄ , 2H ₂ O	0,25 mg/l	0,25 mg/l
Co Cl ₂ , 6H ₂ O	0,025 mg/l	0,025 mg/l
Fe EDTA *	1 ml/l	1 ml/l
<u>Compléments organiques</u>		
Thiamine	1 mg/l	1 mg/l
Pyridoxine	1 mg/l	1 mg/l
Pantothénate de Ca	1 mg/l	1 mg/l
Acide nicotinique	1 mg/l	1 mg/l
Biotine	0,01 mg/l	0
Acide ascorbique	100 mg/l	100 mg/l
Inositol	100 mg/l	100 mg/l
Adénine sulfate	30 mg/l	0
Hydrolysate de caséine	0	500 mg/l
Glucose	20 g/l	0
Saccharose	0	30 g/l
<u>Hormone de croissance: 2,4-D</u>		
Traitement A:	0,5 mg/l	
Traitement B:	0,75 mg/l	
Traitement C:	1 mg/l	
Traitement D:	1,2 mg/l	
pH5		
<u>* solution de Fe-EDTA</u>		
EDTA	2,61 g	
Fe SO ₄	2,49 g	
H ₂ O	qsp: 100 ml	



ANNEXE 2. Schéma de fabrication de gammes ELISA à 10 points (Protocole Univ. Paris VI) pour le 2,4-D. Les concentrations en pmoles correspondent aux 50µl déposés par puits. 1 DOSE = 3,5 plaques complètes. Les dilutions sont réalisées dans de l'eau additionnée de Thimérozal (100 mg/l).

H₂O = eau Thimérozal



ANNEXE 3. Schéma de fabrication de gammes ELISA à 10 points (Protocole Univ. Paris VI) pour les cytokinines. Les concentrations en pmoles correspondent aux 50µl déposés par puits. 1 DOSE = 3,5 plaques complètes. Les dilutions sont réalisées dans de l'eau additionnée d'azoture de sodium (200 mg/l).
H₂O = eau azide.

ANNEXE 4

Expression des concentrations de la gamme étalon (concentration d'antigène libre) en logarithme. Les valeurs logarithmiques sont utilisées pour la représentation des courbes de dosage.

Concentration	0	100 fmol	300 fmol	1 pmol	3 pmol
Log (conc.)	0	2	2,5	3	3,5

Concentration	10 pmol	30 pmol	100 pmol	300 pmol	1 nmol
Log (conc.)	4	4,5	5	5,5	6

ANNEXE 5

TAMPONS ELISA

COATING

2,4-D et CYTOKININES

(tampon carbonate-bicarbonate)

A : Na H CO ₃	0,05 M	2,52 g /600 ml
B : Na ₂ CO ₃	0,05 M	2,65 g/500 ml
Ajuster le pH à 9,6, en versant B dans A		
NaN ₃		0,2 g/l

SATURATION

2,4-D et CYTOKININES

PBS (solution mère 10 X)

Na H ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	0,019	2,96 g/l
Na ₂ H PO ₄ , 12H ₂ O	0,081 M	29,1 g/l
Na Cl	1,5 M	87,6 g/l

ANTICORPS N°1

2,4-D

PBS solution mère	10 ml/l
BSA	50 mg/l
Thimérosal	100 mg/l

Cytokinines

PBS solution mère	10 ml/l
BSA	50 mg/l
NaN ₃	0,2 g/l
Triton	1 ml/l

ANTICORPS N°2

2,4-D

PBS solution mère	10 ml/l
BSA	50 mg/l
Thimérosal	100 mg/l

Cytokinines

Tris	0,25 M	6,04 g/l
Na Cl	2,5 M	29,2 g/l
Ajuster le pH à 8		
Triton		1 ml/l

SUBSTRAT

2,4-D et CYTOKININES

Na BO ₃ , 3 H ₂ O	3,25 mM	0,55 g/l
Acide citrique	39,8 mM	8,36 g/l
Na ₂ H PO ₄ , 12H ₂ O	60 mM	21,4 g/l
Ajuster si nécessaire le pH à 4,4		

RESUME

L'embryogenèse somatique est utilisée chez le palmier à huile pour multiplier à l'échelle industrielle les meilleurs individus issus de sélection classique. Cependant, après régénération des premiers vitroplants, il a été observé l'apparition d'une anomalie florale qui pourrait être induite par un stress lors de la culture *in vitro*.

Des travaux effectués sur d'autres espèces végétales ont mis en évidence que l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) apporté dans les milieux de culture à certaines étapes du processus d'embryogenèse somatique pourrait être à l'origine de l'apparition de variants somaclonaux. Par ailleurs, d'autres études laissent à supposer que le 2,4-D aurait une action sur le degré de méthylation de façon indirecte *via* la teneur en cytokinines endogènes.

Un protocole expérimental a alors été mis au point au laboratoire GeneTrop afin d'essayer de mettre en évidence un effet du 2,4-D sur les cytokinines endogènes.

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'effet de différentes concentrations de 2,4-D apportées au stade suspensions cellulaires, sur les teneurs en cytokinines endogènes à 2 stades de culture.

Afin de mener à bien cet objectif, une technique de quantification hormonale a été adaptée pour permettre le dosage des différentes formes hormonales (2,4-D et cytokinines de formes zéatine et isopentényladénine) au sein d'un même extrait végétal. Elle est basée sur une séparation des différentes formes hormonales par HPLC, et sur leur dosage par méthode ELISA.

Les mises au point techniques ont constitué la première partie de ce travail.

Cette technique a ensuite été appliquée sur des échantillons de palmier à huile pour doser leurs teneurs en 2,4-D et en cytokinines.

Les premiers résultats obtenus montrent que les cytokinines sont absentes au stade de prolifération cellulaire (qui contient du 2,4-D dans les milieux de culture), alors que des traces allant de 0,2 à 0,6 pmol/mg MF ont été détectées au stade pro-embryons (qui ne contient pas de 2,4-D dans les milieux de culture).

Par ailleurs, il a été constaté que le 2,4-D est accumulé dans les tissus végétaux aux deux stades étudiés (avec des teneurs allant de 1,6 à 10,9 pmol/mg MF).

Enfin, les dosages obtenus indiquent une plus faible accumulation du 2,4-D au stade pro-embryons par rapport au stade suspensions cellulaires, ce qui permet de faire l'hypothèse d'une action du 2,4-D sur la concentration en cytokinines endogènes dans les tissus végétaux.

Les premières observations apportent des éléments de réponse sur un possible rôle du 2,4-D sur la concentration en cytokinines endogènes. Ces expérimentations seront répétées et complétées afin de confirmer ces premiers résultats.

Mots clés : Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, cytokinines, ELISA, HPLC, embryogenèse somatique, variation somaclonale, palmier à huile.