

JEAN-MARC GION  
CIRAD-Forêt

## LA CARTOGRAPHIE DE GÈNES CANDIDATS CHEZ L'EUCALYPTUS

L'EXPLOITATION DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE NATURELLE DE L'EUCALYPTUS, AFIN DE PRODUIRE DES ARBRES À FAIBLE TENEUR EN LIGNINE, POURRAIT FACILITER LA PRODUCTION DE VARIÉTÉS MIEUX ADAPTÉES À LA PRODUCTION DE PÂTE À PAPIER. CES VARIÉTÉS DEVRAIENT PERMETTRE DE RÉDUIRE LES COÛTS ET L'ÉMISSION D'EFFLUENTS POLLUANTS DE L'INDUSTRIE PAPETIÈRE.

L'eucalyptus est un arbre à usages multiples. Ses principales utilisations sont :

- le bois-énergie (bois de chauffage et charbon de bois) ;
- les bois de service ;
- le bois de trituration (pâte à papier et panneau de particules). Ainsi, certains pays ont fondé une partie de leur économie sur l'industrie de la pâte d'eucalyptus à partir de plantations (Brésil, Portugal, Espagne, Maroc, Congo...).

Enfin, d'autres types de produits peuvent être fournis par l'eucalyptus, comme les huiles essentielles, qui sont utilisées en pharmacie et parfumerie.

### LA LIGNINE INDÉSIRABLE POUR L'INDUSTRIE PAPETIÈRE

La lignine est l'un des composés organiques les plus abondants de la planète. C'est un polymère complexe composé de trois sous-unités aromatiques dérivées de la phénylalanine :

- para-hydroxyphényl (H) ;
- guaiacyl (G) ;
- syringyl (S).

La proportion relative de ces trois résidus varie entre les espèces et les individus d'une même espèce. La lignine se dépose au niveau des parois primaires et secondaires des cellules, renforçant les microfibrilles de cellulose. Elle assure chez les plantes vasculaires la rigidité et le transport de l'eau. Elle est induite par la plupart des stress biotiques et abiotiques et joue un rôle important dans la résistance aux maladies et autres adversités (SEDEROFF *et al.*, 1994). Chez les arbres forestiers, la lignine représente un quart de la biomasse totale. Elle existe sous forme de lignocellulose intimement combinée à la cellulose et à l'hémicellulose.

Dans les industries papetières, la lignine est un produit indésirable et son extraction constitue l'un des processus industriels majeurs, polluant et très coûteux. L'efficacité des procédés d'extraction des lignines de la biomasse ligneuse est proportionnelle à la teneur en unité S. Chez les plantes fourragères, la lignine limite la digestibilité du fourrage des herbivores et est très difficilement dégradée par les micro-organismes. Une teneur diminuée ou une composition monomérique modifiée de la lignine est donc recherchée pour ces deux types d'activité, centrée sur l'utilisation ou l'extraction des hydrates de carbone de la paroi végétale. En revanche, une teneur accrue est recherchée lorsque le bois sert de source d'énergie, car la lignine est plus riche en énergie que les polysaccharides.

## CHANGER LES TENEURS EN LIGNINE

Deux stratégies, visant soit à réduire les quantités de lignines soit à modifier leur composition, sont possibles.

- De nombreux travaux rapportent la possibilité de contrôler la composition monomérique des lignines par le génie génétique, en sous-exprimant ou surexprimant des gènes ciblés de la biosynthèse des lignines. Cette stratégie qui consiste à employer des plantes transgéniques fait l'objet de multiples controverses.
- L'autre stratégie consiste en une exploitation et une mise à profit de la variabilité naturelle des « gènes de la lignification ». Elle est utilisée par le CIRAD-Forêt dans le cadre du programme d'amélioration génétique des *Eucalyptus* du Congo (VIGNERON *et al.*, 2000).

Peu d'études rapportent une relation entre des gènes de fonction connue, intervenant dans des voies biochimiques connues, et des locus impliqués dans la variation de caractères quantitatifs (QTL : *quantitative trait loc*).

## EXPLOITER LA VARIABILITÉ NATURELLE POUR PRODUIRE DES VARIÉTÉS D'EUCALYPTUS TRÈS PRODUCTIVES ET MIEUX ADAPTÉES À LA FABRICATION DU PAPIER

Cette démarche consiste à :

- choisir des gènes potentiellement impliqués dans la composition en lignine de l'arbre ;

- rechercher du polymorphisme pour les gènes choisis ;
- relier la variabilité allélique à la variation du caractère mesuré.

Elle devrait permettre d'identifier des gènes candidats à la sélection, utilisables dans les programmes d'amélioration génétique des eucalyptus.

### LE CHOIX DES GÈNES ET LE MATÉRIEL VÉGÉTAL

Six gènes de la lignification potentiellement impliqués dans la variation de la teneur en lignines entre individus ont été étudiés (GION *et al.*, 2000). Parmi ces gènes, quatre sont impliqués dans la voie commune des phénylpropanoïdes, gènes codant pour :

- la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) ;
- la cafféate/5-hydroxyfêrulate O-méthyltransférase (COMT), acide cafféique 3-O-méthyltransférase ;
- la 4-coumarate coenzyme A ligase (4Cl) ;
- la cafféoyl-coenzyme A O-méthyltransférase (CCOAMT).

Les deux derniers sont impliqués dans la voie spécifique des monolignols :

- cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD) ;
- cinnamoyl coenzyme A réductase (CCR).

Le choix des gènes étudiés est conditionné par la possibilité d'accéder à leur séquence dans les banques de gènes. Cinq gènes (CCR, CAD, CCOAMT, COMT et 4Cl) ont été séquencés pour *Eucalyptus gunnii*, des séquences du gène PAL d'espèces n'appartenant pas au genre *Eucalyptus* ont été utilisées pour ce dernier. A par-



Photo 1. Hybrides interspécifiques *E. urophylla* x *E. grandis*.  
*E. urophylla* x *E. grandis* interspecific hybrids.

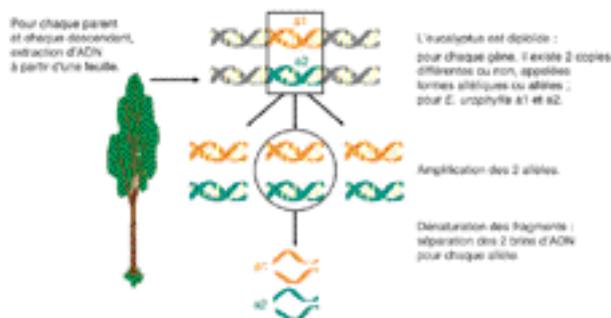
### Principe de la technique SSCP

Lorsque l'ADN double brin est dénaturé par chauffage à 95 °C, puis rapidement refroidi, la renaturation de l'ADN entraîne le repliement des molécules simples brins sur elles-mêmes.

Chaque molécule simple brin prend une conformation en fonction de sa séquence de nucléotides. Ainsi, deux molécules simples brins complémentaires prennent des conformations différentes et un allèle est représenté par deux conformations différentes, autrement dit par deux niveaux de bandes après migration sur un gel d'acrylamide.

Figure 1. Amplification d'un fragment du gène par la technique *polymerase chain reaction* (PCR).  
*Gene amplification by polymerase chain reaction (PCR)*

L'eucalyptus étant diploïde, il existe pour chaque gène deux copies, différentes ou non, appelées formes alléliques ou allèles. Avec la technique SSCP, un individu hétérozygote (avec deux allèles différents) présente quatre niveaux de bandes (figure 1).



tir de ces séquences, on a réalisé des amorces qui permettent d'amplifier une partie ciblée du gène.

Le matériel végétal utilisé est un croisement d'élite entre *E. urophylla* et *E. grandis*, qui totalise 200 hybrides plein-frères. Il est issu du programme d'amélioration génétique à Pointe-Noire (Congo). Ce croisement a été utilisé pour construire des cartes génétiques pour *E. urophylla* et *E. grandis*, à l'aide de marqueurs moléculaires dominants du type RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) (VERHAEGEN, PLOMION, 1996).

### CARTOGRAPHIE GÉNÉTIQUE

Grâce à la technique PCR (*polymerase chain reaction*), il est possible d'amplifier *in vitro*, par une réaction enzymatique cyclique, un fragment donné d'ADN (dans notre cas, un fragment de gène de la lignification). Cela impose de connaître la séquence du fragment ciblé, ou au moins celle de ses extrémités, sur une vingtaine de bases. La recherche de polymorphisme à l'intérieur des fragments amplifiés consiste à révéler, lorsqu'elles existent, les différences alléliques entre les individus pour ce fragment. Différentes techniques existent pour révéler ces différences. Dans cette étude, nous avons utilisé la technique du polymorphisme de conformation des simples brins (SSCP : *single strand conformational polymorphism*) (voir encadré ci-dessus).

La figure 2 donne les profils SSCP obtenus pour le gène CCR. Chaque piste correspond à un individu différent,

les deux premières correspondent aux parents du croisement, les autres à la descendance hybride. Ainsi, pour *E. urophylla*, deux allèles sont amplifiés et identifiés par quatre bandes (13 ; 24). Pour *E. grandis*, un seul allèle est amplifié et il est représenté par deux bandes, l'autre allèle n'ayant pas été amplifié (allèle nul) (56 ; -). On retrouve dans la descendance quatre classes d'individus (13 ; 56), (24 ; 56), (13 ; -) et (24 ; -) ségrégant dans les proportions mendéliennes 1/4, 1/4, 1/4, 1/4. Notons que si *E. grandis* avait été homozygote (56 ; 56), le profil aurait pu être identique, mais seulement deux

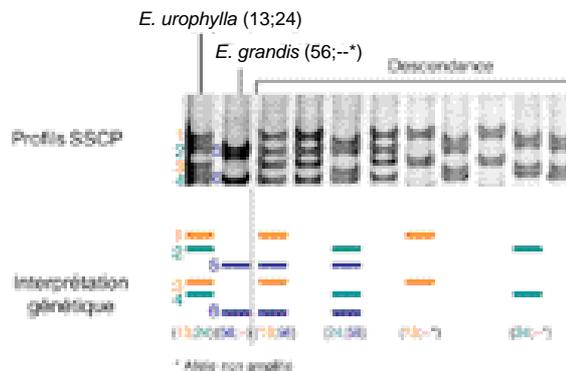


Figure 2. Migration sur gel d'acrylamide des fragments dénaturés du gène CCR.  
*Migration on acrylamide gel of denatured fragments of the CCR gene.*

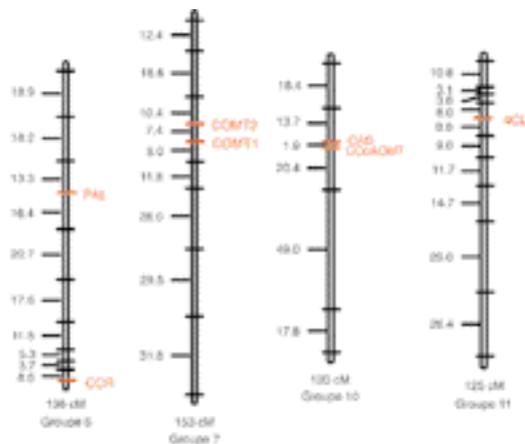


Figure 3. Positionnement des gènes sur les groupes de liaison d'*E. urophylla* (un groupe de liaison représente un chromosome).  
Gene mapping on *E. urophylla* linkage groups (a linkage group represents one chromosome).

classes de descendants auraient été mises en évidence (13 ; 56) et (24 ; 56).

La révélation d'un polymorphisme entre les descendants pour chacun des gènes va permettre de positionner ces gènes sur les cartes génétiques des deux parents du croisement. Grâce à cette technique, il a été possible de placer les six gènes étudiés sur les cartes génétiques dans le cas d'*E. urophylla*, et seulement quatre dans le cas d'*E. grandis*. La cartographie des gènes étudiés suggère l'absence d'un cluster des gènes de la lignification (pas de groupement des gènes sur un même chromosome) (figure 3). C'est un résultat encourageant pour notre approche, car la probabilité de trouver un génotype combinant les allèles favorables des six gènes étudiés, pour le caractère faible teneur en lignines, est plus importante.

### VARIATIONS ALLÉLIQUES ET VARIATIONS DU CARACTÈRE MESURÉ

Après avoir placé ces gènes sur les cartes génétiques, la prochaine étape est de vérifier si on peut mettre en évidence une liaison statistique entre les différences alléliques des gènes cartographiés et les variations des caractères mesurés. On pourrait alors identifier les formes alléliques les plus favorables au caractère faible teneur en lignines.

Pour ce caractère complexe, il est nécessaire d'identifier les régions du génome intervenant dans l'expression de caractères quantitatifs, les QTL. Comment détecter un

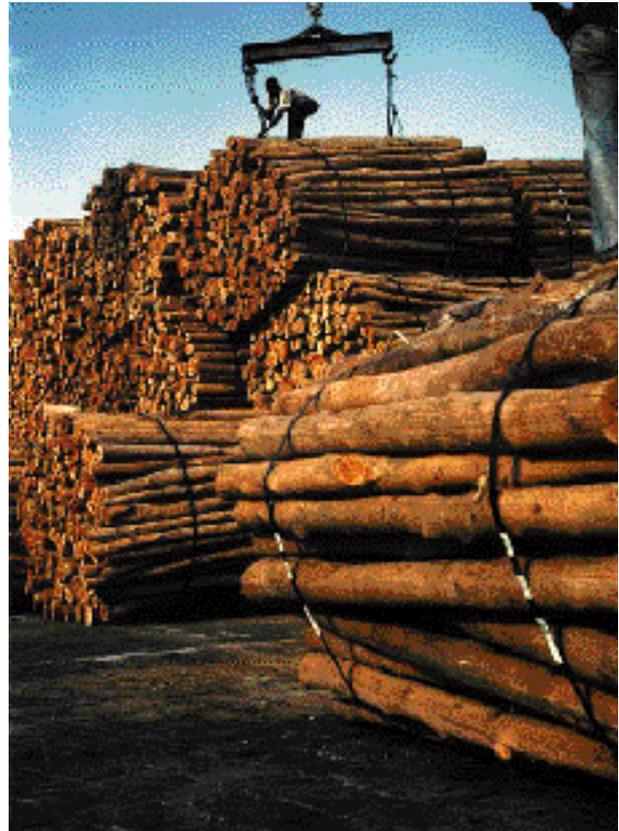


Photo 2 : Stockage du bois au port de Pointe-Noire.  
Wood storage in Pointe-Noire port.

QTL ? Au niveau d'un gène G<sub>j</sub>, chaque génotype possède soit l'allèle a1 soit l'allèle a2. On peut donc différencier les descendants du croisement en deux classes, l'une caractérisée par des individus possédant l'allèle a1, l'autre par des individus possédant l'allèle a2. S'il existe une différence entre les moyennes des deux classes d'individus pour le caractère considéré, alors il existe un QTL au voisinage du gène G<sub>j</sub>. Autrement dit, la variation allélique du gène G<sub>j</sub> est liée à la variation du caractère étudié. Le gène G<sub>j</sub> est un gène candidat potentiel à la sélection pour le caractère X.

### LES PERSPECTIVES

Des travaux similaires sont en cours. Ils concernent, d'une part, les autres gènes de la voie de biosynthèse des lignines et, d'autre part, les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de ces gènes de structure. Les résultats acquis constituent un premier pas vers la sélection assistée par marqueurs d'arbres à faibles teneurs



en lignines ou à teneurs en lignines souhaitées (dans le cas où le bois est destiné à une autre utilisation que la pâte à papier).

La sélection pour la qualité du bois n'a pas été envisagée pour l'instant. Cependant, les enjeux économiques sont énormes. En effet, de multiples expériences de transformation génétique ont démontré qu'une modification de la quantité ou de la qualité (teneurs relatives des trois monomères) de la lignine pouvait améliorer son

extraction de la cellulose (BOUDET, GRIMA PETTENATI, 1996). Cela abaisserait les coûts de production de la pâte à papier et diminuerait les rejets polluants.

---

► Jean-Marc GION  
CIRAD-Forêt  
Programme arbres et plantations  
Campus International de Baillarguet  
34398 MONTPELLIER Cedex 5  
France

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOUDET A.M., GRIMA PETTENATI J., 1996.  
Lignin genetic engineering. *Molecular Breeding* 2 : 25-39.

GION J.-M., RECH P., GRIMA PETTENATI J.,  
VERHAEGEN D., PLOMION C., 2000.  
Mapping candidate genes in eucalyptus with emphasis on lignification gene. *Molecular Breeding*, sous presse.

SEDEROFF R., CAMPBELL M., O'MALLEY D.M.,  
WHETTEN R., 1994.  
Genetic regulation of lignin biosynthesis and the potential modification of wood by genetic engineering in loblolly pine. *In Genetic engi-*

neering of plant secondary metabolism. Ellis B.E., Kuroki G.W.,  
Stafford H.A. (ed.), New York, Etats-Unis, Plenum Press : 313-355.

VERHAEGEN D., PLOMION C., 1996.  
Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *E. grandis* using RAPD  
markers. *Genome* 39 : 1051-1061.

VIGNERON P., BOUVET J.M., GOUMA R., SAYA A.,  
GION J.-M., VERHAEGEN D., 2000.  
Eucalyptus hybrids breeding in Congo. *In Hybrid breeding and genetics of forest trees*. April 2000, Noosa, Queensland, Australie, QFRI/CRC-SPF Symposiums, 14-26.