les dossiers
d'AGROPOLIS
INTERNATIONAL
Compétences de la communauté scientifique

La plate-forme de recherches avancées Agropolis

Génomique & biotechnologie

Numéro 5

Caractérisation des translocations *dans le génome de la banane* par cytogénétique moléculaire

Les études génétiques sur la banane sont peu développées ; elles ont avant tout cherché à préciser les liens de parenté entre les différentes variétés sauvages (variétés ancestrales diploïdes) et les variétés actuelles cultivées (triploïdes).

Faute de connaissances précises sur le mode de transmission des caractères chez le bananier, la création variétale continue de progresser en suivant une démarche phénotypique traditionnelle, reposant essentiellement sur la recherche de caractères complémentaires favorables apportés par les parents dans des constitutions génomiques différentes.

Depuis plus de 15 ans, le Cirad développe une stratégie originale visant à créer de nouveaux triploïdes à partir de diploïdes fertiles naturels ou améliorés : ceci permet d'obtenir de nombreux descendants (contrairement aux stratégies courantes de croisements avec des variétés actuelles largement stériles) permettant une sélection et l'analyse génétique des caractères.

Les problèmes auxquels doit faire face l'amélioration génétique du bananier ont motivé le développement de nouvelles approches basées sur la cartographie génétique et l'analyse du déterminisme génétique de caractères d'intérêt agronomique. Dans ce cadre, une des principales difficultés rencontrées est liée à la présence d'hétérozygoties structurales entre chromosomes homologues (due à des anomalies chromosomiques survenant au cours de la méiose, appelées translocations) et au manque de connaissance concernant leur impact sur la transmission des caractères. Le projet de « cartographie cytogénétique du bananier » s'est ancré dans le champ de la génétique formelle afin de défricher le domaine des translocations mais visait *in fine* à transférer les recherches vers l'amélioration et la sélection des variétés. •••

▷▷ Le chercheur accueilli

Alberto Vilarinhos (EMBRAPA) a été accueilli, dans le cadre de son doctorat pendant trois ans au sein de l'UMR PIA, dans le but de construire une banque BAC pour identifier et localiser les points de translocation chez le bananier.

Montpellier SupAgro, école d'ingénieurs et de recherche agronomiques du ministère français de l'Agriculture et de la Pêche, a encadré la thèse de doctorat d'Alberto Vilarinhos.

© F. Bakry

▶ *Parcelle de bananiers "dessert" au Brésil*

L'objectif du Cirad était d'optimiser le processus d'amélioration variétale. Le projet s'est inscrit dans le cadre du consortium international de la génomique du bananier « *Global Musa Genomic Consortium* », animé par Bioversity International et développé au sein du programme PROMUSA.

La recherche visait à l'identification et la caractérisation des translocations chez le bananier, en vue d'améliorer les analyses génétiques et favoriser la compréhension de l'hérédité de caractères d'intérêt.

Le matériel végétal exploité

Le matériel végétal étudié correspondait à deux cultivars de bananier :

• **le clone « Calcutta 4 » (*Musa acuminata burmannicoides*) :** diploïde (2n=2x=22) appartenant au groupe de translocations « Nord-A », homozygote structural (pas de différence de structure entre chromosomes homologues), différant du groupe Central par deux translocations. Les bananiers ont été classés en différents groupes de variétés en fonction des appariements observés dans les méioses des hybrides entre variétés. L'absence de translocation ou la présence d'une à deux translocations caractérise ces groupes.

• **le clone « Madang » (*Musa acuminata banksii*)** : diploïde (2n=2x=22) homozygote structural, appartenant au groupe de translocations « Central », groupe de référence ne présentant pas de translocation.

Les objectifs retenus

Les objectifs du projet étaient de développer des outils permettant la caractérisation des translocations chez le bananier, puis d'appliquer ces outils à la caractérisation des translocations différenciant les clones Calcutta 4 et Madang.

Ces objectifs ont nécessité le développement et/ou l'adaptation de technologies, essentiellement :
• la construction d'une banque de grands fragments d'ADN de bananier ou Banque BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*),
• la mise au point de la cartographie cytogénétique par hybridation *in situ* fluorescente de clones BACs, permettant la caractérisation des translocations.

Le bananier

© F. Bakry

▶ *Régime de la variété Bluggoe ("à cuire") triploïde interspécifique* (M. acuminata/M. balbisiana)

Les bananiers sont actuellement cultivés dans une centaine de pays des régions tropicales et subtropicales (principaux pays producteurs : l'Inde, l'Ouganda, l'Équateur et le Brésil). Ils servent à l'alimentation (la banane est un aliment riche, à haute teneur en sucre, potassium et vitamines A, B6 et C et faible pourcentage en matière grasse), produisent des fibres utilisées par les industries (papier, carton, cordage) et procurent des revenus intéressants car leur coût de production est bas. Leur exploitation consolide le tissu économique des régions européennes outre-mer (Guadeloupe, Martinique) où l'exportation des bananes (variété *Cavendish* à plus de 80 %) est une importante source de devises.

Les bananiers appartiennent à la famille des *Musacées* : ce sont de hautes plantes herbacées monocotylédones, monocarpiques (qui ne fleurissent qu'une fois) dont le pseudo-tronc résulte de l'enroulement des gaines foliaires les unes autour des autres et porte en son centre l'inflorescence (régime) consommable. Des programmes d'amélioration génétique sont mis en place pour créer de nouvelles variétés de bananiers, en particulier résistantes aux nombreuses attaques parasitaires dont ils sont victimes. La variabilité génétique concerne la taille des plants, la vigueur des rejets, le nombre de mains par régime, la taille des fruits et les sources de résistance aux principaux ravageurs et maladies. Les différentes étapes de création variétale doivent surmonter les difficultés liées aux caractéristiques typiques des bananiers cultivés que sont la stérilité, la triploïdie (nombre de chromosomes triple de celui des plantes communes d'espèces voisines) et une origine plurispécifique.

Chez le bananier, la fertilité a été contre-sélectionnée par l'homme depuis des générations afin d'obtenir des fruits comestibles gorgés de pulpe et sans graines. Les bananiers cultivés sont aussi parthénocarpiques (les fruits, plus gros, se développent sans fécondation des ovules et sans transformation de ceux-ci en graines embryonnées) et les cultivars maintenus par l'homme doivent donc être multipliés végétativement par rejets. Les cultivars sont di- tri- (les plus nombreux car les plus vigoureux) ou tétraploïdes et présentent des génomes différents (notés A et/ou B) : la majorité dérivent des espèces sauvages haploïdes (à 11 chromosomes) *Musa balbisiana* (un génome B) et *Musa acuminata* (un génome A).

Contact : Frédéric Bakry, frederic.bakry@cirad.fr

Le partenariat

Unité Mixte de Recherche : Polymorphismes d'intérêt agronomique (UMR Pia)
Cirad, Montpellier

Responsable du projet (encadrement français) :
Angélique D'Hont, angelique.dhont@cirad.fr
fax : +33 (0)4 67 61 56 05

Unité Recherche Propre : Systèmes de culture bananes, plantains et ananas
Cirad, Montpellier

Responsable du projet (encadrement français) :
Fréderic Bakry, frederic.bakry@cirad.fr
fax : +33 (0)4 67 61 56 66

Bioversity International
Programme PROMUSA
(Global Programme for Musa Improvment)

Responsable du projet :
Nicolas Roux, n.roux@cgiar.org
fax : +33 (0)4 67 61 03 34

Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca et Fruticultura Tropical (CNPMF)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Responsable du projet (encadrement brésilien) :
Jorge Luiz Loyola Dantas, loyola@cnpmf.embrapa.br
fax : +55 (75) 3621 8097

© F.C. Baurens

Régime de bananier sauvage
(M. acuminata malaccensis)

Le projet s'est appuyé par ailleurs sur une carte génétique construite au Cirad à partir d'une population F2 (seconde génération obtenue par autofécondation) issue du croisement [Calcutta 4 x Madang] entre deux variétés sauvages fertiles et largement homozygotes.

Les recherches poursuivies

La construction d'une Banque BAC de l'accession Calcutta 4 (diploïde AA) a constitué la première étape du projet ; les banques BACs sont aujourd'hui un outil essentiel de la recherche génomique. La première banque BAC réalisée a été composée par une collection de grands fragments d'ADN extraits des noyaux de cellules de feuilles du clone *Musa acuminata* Calcutta 4. Elle a compris 55152 clones de fragments d'une taille moyenne de 100 kilobases couvrant 9 fois le génome nucléaire haploïde (par chevauchement virtuel des différents fragments d'ADN).

Bénéficiant des mises au point acquises, deux autres banques BAC ont été construites par l'UMR PIA (rattachée aux institutions Cirad/Inra/Montpellier SupAgro) pour le genre *Musa* : l'une à partir du cultivar « Grande Naine » (triploïde AAA appartenant au sous-groupe Cavendish) ; la seconde à partir de l'accession PKW « Pisang Klutuk Wulung » (diploïde BB appartenant à l'espèce *Musa balbisiana*).

Ces banques BAC sont aujourd'hui des outils performants mis à la disposition de la communauté internationale participant au *Global Musa Genomics Consortium.* Ces banques sont essentielles au développement de différentes applications : clonage de gènes, séquençage du génome, cartographie physique, génomique comparative, etc. L'un des nouveaux projets entrepris grâce à cet outil consistait à comparer l'organisation du génome du bananier à celui du riz, ainsi qu'à évaluer leur colinéarité ; un séquençage partiel du génome de la banane a donc été initié dans ce cadre international.

Un second projet cherchait à étudier et caractériser l'intégration du *Banana Streak Virus* (BSV) dans le génome du bananier et à identifier les mécanismes responsables de l'activation des séquences intégrées.

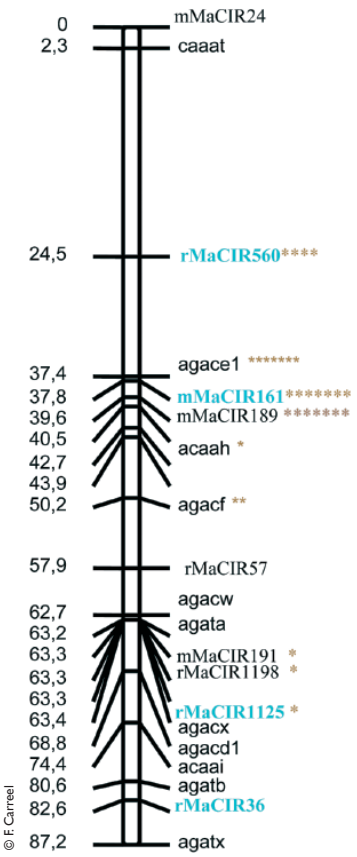
Ces clones BACs constituent en outre de bons intermédiaires pour la recherche de marqueurs microsatellites SSR *(Single Sequence Repeat)* dans des régions particulières du génome.

Une seconde étape des recherches a concerné le développement d'une technique de cartographie cytogénétique par BAC-FISH. Chez la famille *Musa*, les études cytogénétiques sont difficiles à réaliser car les chromosomes sont petits (600 millions de bases pour 11 chromosomes) et morphologiquement très similaires. Une carte cytogénétique par la méthode FISH *(Fluorescent* In Situ *Hybridization)* de clones BACs, ancrés à la carte génétique au moyen de marqueurs génétiques, a été initiée *(cf. Technique d'hybridation FISH)*. •••

▷▷ Publications

Vilarinhos A.D., 2004. Thèse de doctorat de l'Université Montpellier II – Montpellier SupAgro en biologie intégrative. « Cartographie génétique et cytogénétique chez le bananier : caractérisation des translocations ».

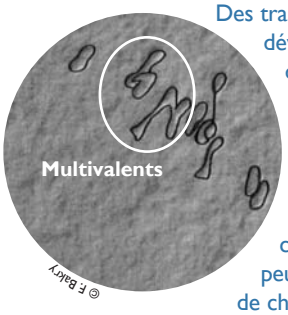
Vilarinhos A.D., Piffanelli P., Lagoda P., Thibivilliers S., Sabau X., Carreel F., D'Hont A., 2003. Construction and charactérization of a bactérial artificial chromosome library of banana (*Musa acuminata* Colla). Theor. Appl. Genet. 106 : 1102-1106.



Groupe de liaison II de la carte génétique issue du croisement Calcutta 4 par Madang

Les translocations

Les translocations sont des remaniements chromosomiques constitués par le déplacement, après clivage, d'un (ou plusieurs) segment(s) de chromosome, suivi de son (leur) intégration sur un site différent.



Des translocations peuvent survenir spontanément lors du développement des gamètes (à la méiose) en raison, par exemple, de l'enchevêtrement accidentel de chromosomes au cours de la première phase de division cellulaire, produisant des anomalies lors de la phase d'appariement des chromosomes. Les translocations les plus courantes, dites « réciproques », correspondent à un échange entre extrémités de chromosomes non homologues (n'appartenant pas à une même paire). Cependant, de nombreuses combinaisons sont possibles et des phénomènes complexes peuvent impliquer plus de trois cassures et/ou plus de deux paires de chromosomes. Les anomalies de recombinaison peuvent conduire à la formation de monovalents, trivalents (appariement de trois chromosomes homologues au lieu des deux dans le bivalent habituel), voire hexavalents, lors de la méiose.

Les translocations constituent un véritable frein à la compréhension du déterminisme génétique des caractéristiques des bananiers : ces anomalies rendent en effet très difficile la modélisation de la transmission des caractères d'intérêt agronomique et la conduite de leur transfert vers la descendance.

En outre, les chromosomes des bananiers sont particulièrement petits. Or, les procédures cytogénétiques classiques ne sont pas suffisamment discriminantes pour identifier les chromosomes impliqués dans une translocation, ni expliciter la nature de cette dernière. C'est pourquoi il est important d'établir une méthodologie pour caractériser ces différences entre structures chromosomiques. Les translocations peuvent notamment être identifiées par les techniques d'hybridation *in situ*.

Contact : Angélique D'Hont, dhont@cirad.fr

Les marqueurs-ancres utilisés étaient des séquences, du type RFLP *(Restriction Fragment Length Polymorphism)*, SSR, etc., associés à un locus.

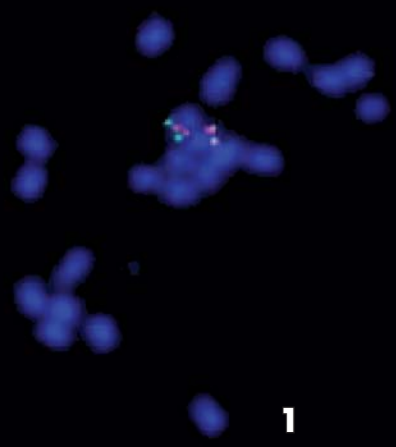
Les loci à cartographier ont été choisis sur la base de la cartographie génétique établie. L'existence d'une distorsion de ségrégation (liée à des perturbations dans la séparation des chromatides au cours de la méiose, en raison probablement de différences structurales entre les génomes des parents), puis l'analyse de la répartition des marqueurs en groupes de liaisons, enfin la comparaison entre cartes génétiques ont conduit à cibler l'étude sur le groupe de liaison II, potentiellement porteur de translocations.

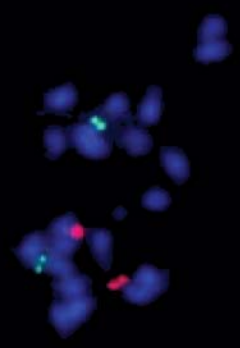
Un certain nombre de marqueurs répartis sur le groupe de liaison II ont été sélectionnés et utilisés pour le criblage de la banque BAC. En effet, les marqueurs de la carte génétique sont trop petits pour être utilisés directement en hybridation *in situ* : il faut donc identifier les fragments BACs les contenant qui, eux, peuvent être exploités. Les résultats du BAC-FISH ont pu démontrer que le groupe de liaison II provenait de la liaison artificielle des marqueurs appartenant à plusieurs chromosomes. Ces liaisons artificielles seraient dues à la présence d'au moins deux translocations chez le clone Calcutta 4 par rapport au clone Madang, translocations impliquant probablement trois chromosomes. Ces résultats ont illustré l'importance du phénomène de translocation dans la structuration du génome du bananier.

Les outils et techniques élaborés ont permis d'établir le lien entre les cartes génétiques et les chromosomes. Ces travaux de caractérisation des translocations et d'analyse de leur conséquence sur la recombinaison et ségrégation des régions impliquées apporteront des informations essentielles quant au choix des géniteurs à utiliser en amélioration variétale.

Transfert, valorisation et suites du projet

Le projet a donné lieu à un transfert de connaissances utile et exploitable puisque le chercheur brésilien a été formé aux différentes techniques de construction de banque et de cartographie génétique et cytogénétique et a mené une recherche théorique sur le bananier concernant l'impact des translocations sur la distribution des allèles dans les descendances. Ces travaux ont déjà donné lieu à la rédaction d'un article (un deuxième est en préparation), à la soutenance d'une thèse de doctorat et sont actuellement poursuivis au Cirad. Ils ont ainsi fait l'objet de la venue pour un mois, courant 2005, d'une chercheuse brésilienne, Claudia Fortes Ferreira. ■





© A. Vilarinhos & A. D'Hont

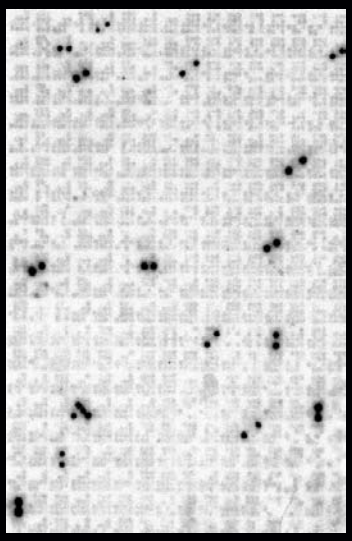
1 2

1. *Chromosomes de l'accession Calcutta 4 (2n = 22) après FISH avec le BAC 52P01 (détecté avec le FITC, vert) et le BAC 54N07 (détecté avec le Texas red, rouge)*

2. *Chromosomes de l'accession Calcutta 4 (2n = 22) après FISH avec le BAC 52P01 (détecté avec le FITC, vert) et BAC 59I20 (détecté avec Texas red, rouge)*

3. *Criblage de la banque de BAC avec des sondes cartographiées*

Technique d'hybridation FISH *in situ* sur clones de banque BAC pour l'identification de séquences « marquées » sur les chromosomes de bananier (BAC-FISH)



© A. Vilarinhos & A. D'Hont

3

La technique appelée FISH « *Fluorescent in situ Hybridization* » permet de localiser une séquence d'ADN directement sur les chromosomes *(in situ)*. Cette technique repose sur la capacité d'association de deux brins d'ADN complémentaires pour former des doubles brins (processus d'appariement). Les séquences à localiser sont marquées avec des fluorochromes et peuvent être visualisées sur les chromosomes à l'aide d'un microscope à fluorescence.

L'hybridation FISH est réalisée en plusieurs étapes :
- marquage des séquences à localiser avec un fluorochrome,
- étalement des chromosomes sur lame de microscope,
- dénaturation des fragments d'ADN (désolidarisation des deux brins d'ADN),
- hybridation de la séquence marquée et des chromosomes,
- détection des signaux d'hybridation et localisation de la séquence sur les chromosomes.

Grâce à l'utilisation de plusieurs sondes marquées avec différents fluorochromes, on peut visualiser simultanément plusieurs séquences sur un ou plusieurs chromosomes.

Contact : Angélique D'Hont, dhont@cirad.fr