

# Étude des caractéristiques du génome du houblon

C. Arnold<sup>1-2</sup>

R. Grosshans<sup>3</sup>

J.-M. Jeltsch<sup>1</sup>

## Introduction

Natif de trois continents, Europe, Asie et Amérique, le houblon tiendrait son nom latin, *Humulus lupulus*, de Pline qui l'aurait ainsi surnommé « petit loup » à cause de sa ténacité à se fixer sur n'importe quel support. Cette plante dioïque grimpante est un membre de la famille des Cannabinacées. Le genre *Humulus* compte deux espèces majeures : *Humulus lupulus*, épice par excellence des brasseurs, et *Humulus japonicus*, planté à des fins ornementales (Neve, 1991).

Les souches pérennes des plants de houblon ont une espérance de vie de 20 à 30 ans. Les variétés européennes possèdent un patrimoine génétique diploïde à 20 chromosomes dont une paire de chromosomes sexuels différenciant les plants mâles des plants femelles (Neve, 1991). Seuls les plants femelles, propagés par multiplication végétative, sont cultivés car ce sont les inflorescences femelles non fécondées aussi appelées cônes ou strobiles qui font l'objet de la récolte. L'intérêt com-

<sup>1</sup> Laboratoire de Phytodiagnostic, EA 1329, ESBS, bd Sébastien Brant, F-67400 Illkirch, France.

<sup>2</sup> CNRS-IBMP, UPR 406, 12, rue du Général Zimmer, F-67084 Strasbourg cedex, France.

<sup>3</sup> Cophoudal, 22 rue des Roses, F-67173 Brumath cedex, France.

mercial de ces cônes réside dans une poudre jaune d'or, la lupuline, qu'ils produisent à la base de leur bractées. La lupuline est un ensemble de résines,  $\alpha$ -acides aux propriétés amérisantes et  $\beta$ -acides au pouvoir bactériostatique, et d'huiles essentielles. La teneur en  $\alpha$ -acides détermine le caractère amer ou aromatique de la variété ainsi que la qualité de la récolte.

La production française de houblon se réalise à plus de 95 % en Alsace, où une variété population de houblon aromatique fin, le Strisselspalt, occupe une place prépondérante. Les premières houblonnières sont apparues en Alsace au début du XIX<sup>e</sup> siècle. Cette culture a connu de nombreux aléas liés à l'Histoire mais aussi des périodes florissantes. Actuellement, les surfaces consacrées aux houblonnières représentent 900 ha environ. On assiste de nos jours à une crise mondiale de surproduction liée à la tendance de diminution du houblonnage de la bière, la brasserie restant le client essentiel, presque exclusif. Avec l'apparition des nouveaux procédés industriels, de précieux agent de conservation qu'il était jadis, le houblon ne sert plus aujourd'hui que par la saveur unique qu'il confère.

Des propriétés sédatives et hypnogènes, antibiotiques et antifongiques (Chaumont et Mandin, 1997), apéritives, spasmolytiques et hormonales sont attribuées au houblon depuis le Moyen-Age (Wurm, 1985). Des recherches récentes menées en santé humaine ont fourni des résultats prometteurs quant à une éventuelle activité anticancéreuse de cer-



1998). Les criblages de banques et les analyses de Southern blot utilisent des sondes marquées à la digoxigénine. Leur mise en œuvre s'appuie sur les matériels et les protocoles de Roche Molecular Biochemicals, avec utilisation de films X-OMAT™ de Kodak pour la détection des émissions de chimioluminescence. Des électrophorèses en gel d'agarose suivies de coloration de l'ADN au bromure d'éthidium sont réalisées selon des conditions standards pour l'obtention et la visualisation des résultats de PCR. L'appareillage d'électrophorèse provient de BioRad. La sauvegarde des résultats s'effectue avec un BioImager de BioRad. Les enzymes de restriction (E.C.3.1.21.4) ainsi que les marqueurs de taille sont fournis par New England Biolabs, MBI Fermentas et Quantum. Les produits chimiques proviennent de Sigma, Merck ou Euromedex. Les réactifs et le matériel plastique pour la PCR viennent de MBI Fermentas et de Corning Costar. Le thermocycleur utilisé pour les réactions de PCR est un GeneAmp 2400 de Perkin-Elmer Biosystems. Les séquences d'ADN sont résolues par un séquenceur ABI PRISM™ de Perkin-Elmer Biosystems.

### *Banque d'ADN génomique de feuilles de houblon Strisselspalt*

Le kit Lambda Fix<sup>R</sup>/Xho I Partial Fill In Vector de Stratagene a été utilisé pour construire la banque, selon les instructions du fournisseur.

### *Isolement et analyse de microsatellites*

Deux sondes, (GA)<sub>10</sub> et (GT)<sub>10</sub>, marquées à la digoxigénine (OliGold, Eurogentec) ont été utilisées pour cribler la banque d'ADN génomique de houblon. Le sous-clonage de fragments porteurs de répétitions, après digestion par *SacI*, a été réalisé dans le vecteur plasmidique pBR322 (MBI Fermentas). Les analyses de séquences des sous-clones ainsi que de recombinants d'origine ont été réalisées. Ces séquences ont permis de dessiner des amorces spécifiques des régions bordant les motifs répétés (OligoExpress).

## Études de type inter-SSR

Huit amorces de PCR ont été dessinées, selon les travaux de Van den Berg (1997) :

(GA)<sub>8</sub>-CT, (GA)<sub>8</sub>-TC, (GA)<sub>8</sub>-TT, (GA)<sub>8</sub>-CC, (GT)<sub>8</sub>-CA, (GT)<sub>8</sub>-AC, (GT)<sub>8</sub>-AA, (GT)<sub>8</sub>-CC (OligoExpress). De l'ADN génomique des variétés de houblon amères Nugget, Magnum et Brewers Gold, et des variétés aromatiques Select, Tradition et Strisselspalt, a été utilisé comme matrice de PCR. Le matériel végétal nous a été aimablement fourni par les producteurs de houblon locaux et collecté dans plusieurs houblonnières. La purification de l'ADN génomique a d'abord été réalisée selon un protocole classique mettant en œuvre un gradient de chlorure de césium. Des kits (DNeasy de Qiagen et Nucleospin Plant de Macherey-Nagel) utilisés en combinaison avec un vibrobroyeur MM2000 (Retsch, GmbH) ont été adoptés ensuite pour permettre le traitement d'un grand nombre d'échantillons en un temps minimum. Des feuilles jeunes et des cônes, séchés ou congelés à -80 °C, ont été utilisés comme matériel végétal de départ.

## Isolement et étude de l'unité ribosomique

Une sonde hétérologue ADN<sub>r</sub> de riz (*Oryza sativa*) marquée à la

blon sauvage japonais, un sauvage nord-américain, un aromatique Hallertau et au Strisselspalt (AB041023, AB041022, AB041021, AF223066).

### ***Banque d'ADNc spécifique de cônes mûres de houblon Strisselspalt***

Les ARN totaux ont été extraits à partir de 30 g de bractées de cônes mûres selon un protocole classique au phénol-SDS. Des ARN polyA<sup>+</sup> ont été purifiés à l'aide du kit PolyATract<sup>R</sup> mRNA Isolation Systems II (Promega). La banque d'ADNc a été construite avec le vecteur ZAP Express<sup>TM</sup> de Stratagene (kits ZAP Express<sup>TM</sup> cDNA Synthesis et ZAP Express<sup>TM</sup> cDNA Gigapack<sup>R</sup> III Gold Cloning), selon les protocoles proposés. L'identité des EST séquencées est recherchée par une session BLAST N sur banque de données non redondantes de séquences d'acides nucléiques ou BLAST P après traduction des séquences d'acides nucléiques (serveur <http://blast.genome.ad.jp>).

## **Résultats**

### ***Banque d'ADN génomique et microsatellites***

#### **Banque d'ADN génomique**

Le titre de la banque d'ADNg à sa constitution était de  $4,7 \cdot 10^6$  pfu.mL<sup>-1</sup>. La taille moyenne des inserts étant de 16 kpb, et sachant que la taille du génome de houblon est de  $10^6$  kpb (Polley *et al.*, 1997), la banque originale représente 75 équivalents génome.

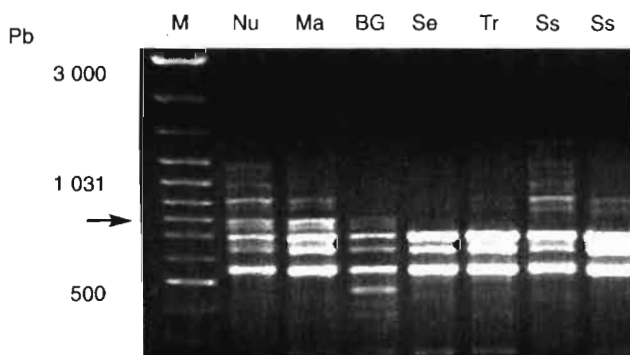
#### **Microsatellites**

$2 \cdot 10^4$  pfu ont été criblées. La fréquence des répétitions de type (GA)<sub>n</sub> ou (GT)<sub>n</sub> (respectivement (TC)<sub>n</sub> ou (AC)<sub>n</sub>) est de l'ordre de

1 séquence microsatellite tous les 80 kpb dans le génome du Strisselspalt, ce qui est en accord avec les données disponibles pour d'autres plantes. Les motifs  $(GA)_n$  sont les plus représentés chez le houblon. Actuellement, 7 couples d'amorces spécifiques ont été déterminés à partir des séquences obtenues et seront introduits dans des expériences de type AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

### Études inter-SSR

Des études inter-SSR, appliquées à différentes variétés de houblon, ont permis de distinguer les variétés amères des variétés aromatiques (fig. 1).



■ Figure 1

Étude inter-SSR, utilisant l'amorce  $(GA)_8$ -TT, appliquée à différentes variétés de houblon : Nugget (Nu), Magnum (Ma), Brewers Gold (BG), Select (Se), Tradition (Tr), Strisselspalt (Ss). La flèche indique le doublet qui distingue les variétés amères des aromatiques.

M : marqueur de taille Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus.

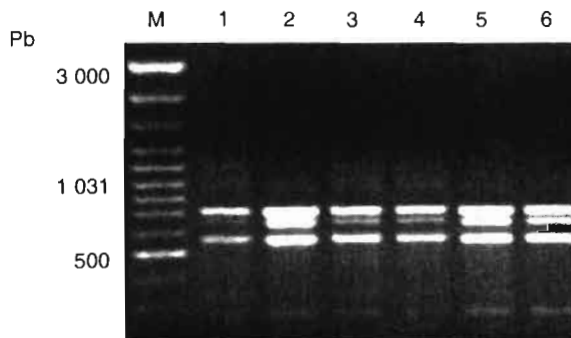
Les profils obtenus avec les variétés amères comportent des bandes supplémentaires et en particulier un doublet entre 700 et 800 pb, qui est absent chez les variétés aromatiques. Il est possible d'attribuer au Strisselspalt un profil spécifique qui est issu de la synthèse des résultats obtenus avec les différentes amorces (tabl. 1).

Amorces 5' > 3'	Fragments (pb)	Ss	Hb	Tt	Sz	Se	Tr
(GA) <sub>8</sub> TT	470	1	1	1	1	1	0
	350	1	0	1	1	0	0
(GT) <sub>8</sub> AA	1 350	0	1	1	1	1	0
	900	0	1	1	1	1	0
	510	0	0	1	1	1	1
(GT) <sub>8</sub> CC	900	1	1	0	0	0	0
(GA) <sub>8</sub> CC	1 500	0	0	0	0	1	0
	1 300	0	1	0	1	0	0
	190	1	0	0	1	1	1
(GA) <sub>8</sub> CT	1 300	0	1	1	1	1	0
	750	1	1	1	1	1	0
	120	1	1	1	1	1	0
(GA) <sub>8</sub> TC	1 200	0	0	1	1	1	1
	310	1	0	0	1	1	0

■ Tableau 1

Clé de discrimination des variétés aromatiques Strisselspalt (Ss), Hersbrucker (Hb), Tettninger (Tt), Saaz (Sz), Select (Se) et Tradition (Tr) obtenues à partir d'une sélection d'amorces de motifs répétés.

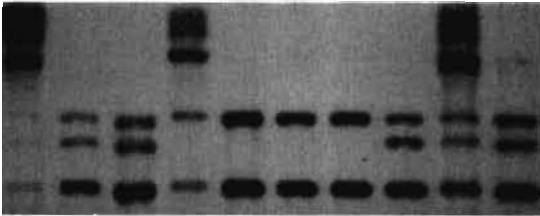
En appliquant cette méthode à différents plants d'une variété donnée (fig. 2), les profils individuels sont identiques et permettent de



■ Figure 2

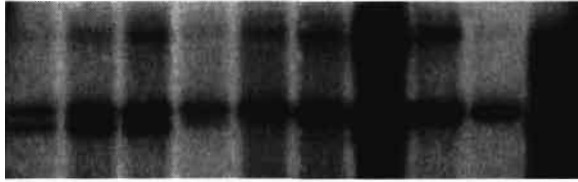
Étude inter-SSR, utilisant l'amorce (GA)<sub>8</sub>-TT, appliquée à des individus Strisselspalt. Les pistes 1 à 3 concernent des plants âgés et les pistes 4 à 6 concernent des plants régénérés. M : marqueur de taille Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus.





différent des deux premiers (2 bandes, dont 1 décalée), et un échantillon de houblon sauvage d'Alsace présente un 4<sup>e</sup> type de profil distinct des autres (1 bande décalée) (fig. 4).

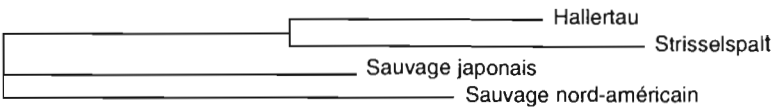
Nu Ma BG Ch Se Tr Ss Ss Ss Wt



■ Figure 4

Analyses RFLP réalisées sur variétés amères : Nugget (Nu), Magnum (Ma), Brewers Gold (BG), sur variétés aromatiques : Select (Se), Tradition (Tr) et Strisselspalt (Ss) ainsi que sur une variété intermédiaire : Chinook (Ch) et sur un houblon sauvage (Wt).

Un alignement a été réalisé entre les 4 séquences d'IGS disponibles dans Genbank correspondant à un houblon sauvage japonais, à un houblon sauvage nord-américain, à deux variétés aromatiques, Hallertau et Strisselspalt. L'arbre de relations phylogénétiques issu de cet alignement est présenté par la figure 5.



■ Figure 5

Arbre de relations phylogénétiques issu des séquences IGS disponibles dans Genbank, correspondant à un houblon sauvage japonais (AB041023), à un houblon sauvage nord-américain (AB041022), à des variétés de houblon aromatiques, Hallertau (AB041021) et Strisselspalt (AF223066).

Des zones de grandes divergence existent entre les houblons natifs de trois continents différents. Les variétés aromatiques présentent des séquences très proches où subsistent cependant des petites régions variables. Il serait intéressant de cibler ces zones remarquables afin d'affiner les profils spécifiques de chaque variété.

## *Banque d'ADNc et analyse d'EST*

### **Banque d'ADNc de cônes mûres de Strisselspalt**

Le nombre de recombinants obtenus à la construction de la banque est de  $8,4 \cdot 10^4$ . Le bruit de fond est de  $3,0 \cdot 10^2$  phages non recombinants. La taille moyenne des inserts est de 650 pb, l'écart-type est de 350 pb. La banque est susceptible de contenir des séquences codant pour des protéines complètes.

### **Collection d'EST**

Une collection de 92 EST est actuellement disponible au laboratoire. Pour la majorité d'entre-elles, l'identification des protéines correspondantes a été possible de façon certaine, tandis que d'autres présentent une forte homologie avec des séquences de protéines de plantes mais de fonction encore indéterminée à ce jour. La présence de protéines ribosomales dans la collection reflète l'activité translationnelle intense qui a lieu dans les strobiles. Nous disposons de séquences d'enzymes, utilisables comme sondes métaboliques, de séquences codant pour des protéines de réponse à un stress, des protéines ubiquitaires, des protéines de structure, des marqueurs de développement floral, de transcription. Une EST particulière contenant une séquence codant pour une protéine du virus latent du houblon pourrait permettre le développement d'un test de diagnostic, simple à mettre en œuvre, utilisable par les planteurs eux-mêmes.

## **Discussion et conclusion**

### *Banque d'ADNg, microsatellites et études inter-SSR*

Les travaux présentés ici avaient pour but de permettre l'identification, par empreinte génétique spécifique, de plants de la variété de houblon aromatique fin, le Strisselspalt. Il s'agissait de développer

une méthode simple, rapide et fiable, basée sur la PCR, permettant une identification fine et précoce des plants de houblon Strisselspalt.

Le choix d'une approche basée sur les microsatellites a été déterminé par des travaux précédents (Brady *et al.*, 1996). L'utilisation

d'amorces spécifiques en combinaison avec la PCR offre un moyen économique de criblage d'un grand nombre d'individus à un stade précoce de leur développement (Poley *et al.*, 1997). Les travaux de criblage de la banque d'ADNg construite, ainsi que le sous-clonage de fragments porteurs de microsatellites sont en accord avec les études menées par Brady *et al.* (1996). Les résultats obtenus quant à la présence, la distribution, le polymorphisme et l'informativité des motifs (GA)<sub>n</sub> et (GT)<sub>n</sub> dans le génome du houblon, corroborent les précédents. Le dessin d'amorces basées sur des séquences exactes du génome est essentiel (Brady *et al.*, 1996 ; Tsuchiya *et al.*, 1997). Ces amorces peuvent être utilisées dans des conditions hautement spécifiques qui permettent d'augmenter la fiabilité et la reproductibilité des résultats. Le sous-clonage des fragments contenant des microsatellites constitue l'étape limitante de ces travaux. Le séquençage direct des inserts portés par les recombinants positifs isolés après criblage de la banque d'ADNg a permis d'obtenir plus rapidement les informations nécessaires au dessin des amorces et de détecter d'autres types de répétition susceptibles d'être polymorphes. Les études AFLP, réalisées par un laboratoire associé, incluant les couples d'amorces spécifiques dessinés au laboratoire, nous renseigneront quant à l'informativité des régions ciblées.

Van den Berg (1997) a inspiré la stratégie inter-SSR développée au laboratoire. Les résultats concernant une éventuelle distinction des variétés de houblon semblent prometteurs. Il est d'ores et déjà possible de distinguer les variétés de houblon amères des aromatiques. Une empreinte génétique spécifique du Strisselspalt a été déterminée. Cette méthode peut confirmer l'appartenance d'un plant à une variété. Bien que ces études doivent encore être validées sur des populations plus larges de plants, il est indéniable que l'avantage de cette méthode est qu'elle ne requiert pas de connaissance préalable du génome, ce qui est le cas du houblon pour lequel moins d'une trentaine de séquences sont disponibles dans les bases de données à ce jour (Tsuchiya *et al.*, 1997). Cependant, le clonage et l'analyse

fine des amplicons générés pourrait peut-être permettre d'affiner les résultats. L'élément essentiel de cette méthode reste la détermination des conditions appropriées de PCR. Ensuite, le choix de la matrice est large, allant de la feuille à la fleur et même à la graine. L'analyse des résultats par électrophorèse en gel d'agarose est facile à mettre en œuvre ; l'utilisation de gels de polyacrylamide peut être envisagée pour affiner la résolution du résultat. Les variations d'intensité de certaines bandes ainsi que la présence de bandes faibles pourront être améliorés par une optimisation plus poussée des conditions réactionnelles.

L'utilisation combinée des marqueurs microsatellites et inter-SSR permet d'identifier les variétés de houblon de façon alternative à d'autres techniques parfois plus lourdes ou moins reproductibles telles que les RAPD (Araki *et al.*, 1998 ; Brady *et al.*, 1996 ; Pillay *et Kennv* 1996 ; Patzak *et al.* 1999 ; Polley *et al.* 1997 ; Sistar



## Bibliographie

- Araki S, Tsuchiya Y, Takashio M, Tamaki T, Shinotsuka K 1998 — Identification of hop cultivars by DNA marker analysis. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56 (3) : 93-98.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K 1998 — *Current Protocols in Molecular Biology.* J Wiley & Sons, New-York.
- Brady JL, Scott NS, Thomas MR 1996 — DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS). *Euphytica* 91 : 277-284.
- Chaumont JP, Mandin D 1997 — Antibacterial and antifungal properties of essential oils of hop upon inauspicious hosts of the skin. *Acta Bot. Gallica* 144 (4) : 469-472.
- De Keukeleire D, Milligan SR, De Cooman L, Heyerick A 1997 — The oestrogenic activity of hops (*Humulus lupulus* L.) revisited. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 7 (2/3) : 83-86.
- Hartl L, Seefelder S 1998 — Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 96 : 112-116.
- Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (6) : 2249-2252
- Miranda CL, Stevens JF, Helmrich A, Henderson MC, Rodriguez RJ, Yang YH, Deinzer ML, Barnes DW, Buhler DR 1999 — Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem. Toxicol.* 37 (4) : 271-285.
- Neve RA 1991 — Hops. Chapman and Hall, London, 266 p.
- Patzak J, Oriniakova P, Matousek J, Svoboda P 1999 — Czech hop characterization using RAPD method and genetic distance analysis of selected genotypes. *Rostl. Vyr.* 45 (4) : 165-172.
- Pillay M, Kenny ST 1996 — Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in hop *Humulus lupulus*: level of genetic variability and segregation in F1 progeny. *Theor. Appl. Genet.* 92 : 334-339
- Pillay M, Kenny ST 1996 — Structure and inheritance of ribosomal DNA variants in cultivated

- Stephan TE, Ngo EO, Nutter LM 1998 — Hexahydrocolupulone and its antitumor cell proliferation activity in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 55 : 505-514.
- Stevens JF, Miranda CL, Buhler DR, Deinzer ML 1998 — Chemistry and biology of hop flavonoids. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56 (4) : 136-145.
- Sustar-Vozlic J, Javornik B 1999 — Genetic relationships in cultivars of hop, *Humulus lupulus* L., determined by RAPD analysis. *Plant Breed.* 118 : 175-181.
- Tobe H, Muraki Y, Kitamura K, Komiyama O, Sato Y, Sugioka T, Maruyama HB, Matsuda E, Nagai M 1997 — Bone resorption inhibitors from hop extract. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61 (1) : 158-159.
- Tsuchiya Y, Araki S, Takashio M, Tamaki T 1997 — Identification of hop varieties using specific primers derived from RAPD markers. *J. Ferm. Bioeng.* 84 : 103-107.
- Van den Berg B 1997 — Horizontal ultrathin-layer multi-zonal electrophoresis of DNA: an efficient tool for large-scale polymerase chain reaction (PCR) fragment analysis. *Electrophoresis* 18 : 2861-2864.
- Wurm G 1985 — Le Houblon : une plante à potentialité thérapeutique. Thèse de Pharmacie, université de Strasbourg.
- Yasukawa K, Takeuchi M, Takido M 1995 — Humulon, a bitter in the hop, inhibits tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* 52 : 156-158.