

CHAPITRE XII

HETEROCHROMATINE, CHROMOSOMES B : IMPLICATION DES FORMES SAUVAGES DU MIL SUR L'UTILISATION DES RESSOURCES GENETIQUES

R. LESPINASSE., E. MARTEL., MT. PEIGNE et A. SARR

Laboratoire d'Evolution et Systématique Végétale, bât. 362

Université Paris-Sud ; 91405 Orsay Cedex.

Les méthodes cytogénétiques sont impliquées dans les différents niveaux d'analyse de la gestion des ressources génétiques. Elles ont permis de caractériser les zones à séquences répétées du génome, constituant l'hétérochromatine. Dans le cas du complexe d'espèces du mil, l'étude de l'hétérochromatine présente un double intérêt :

- appréhender les processus évolutifs du génome grâce à différents marquages chromosomiques permettant de suivre l'introgession d'un génome ;
- observer des corrélations entre la présence d'une surcharge hétérochromatique, telle que la présence de chromosomes B, et une adaptation particulière du génome à certaines conditions environnementales.

I - INTRODUCTION

La recherche de sources de diversité génétique potentielle pour lutter contre l'érosion génétique a engendré un intérêt accru pour les formes sauvages apparentées aux formes cultivées couramment utilisées. Cette gestion des ressources génétiques passe par 4 niveaux d'analyse : collecte et évaluation des prospections ; analyses des échanges au sein d'un complexe d'espèces ; conservation du matériel ; multiplication du matériel. Pour ces 4 niveaux, les méthodes cytogénétiques sont un moyen d'analyse intéressant, au même titre que les méthodes de génétique quantitative, isoenzymatique ou de biologie moléculaire. Elles ont permis de caractériser les zones à séquences répétées du génome, constituant l'hétérochromatine, zones distinctes de celles codantes composées de séquences uniques.

Nous allons voir, sur le cas du mil, que cette étude présente un double intérêt dans la mesure où elle permet :

- d'étudier et de caractériser, au niveau chromosomique, les différents génomes ;
- d'aborder, à travers l'étude d'un certain nombre de corrélations, l'intervention éventuelle de l'hétérochromatine dans les problèmes d'adaptation au milieu.

II - L'HETEROCHROMATINE COMME MARQUEUR CHROMOSOMIQUE

Pour étudier un complexe d'espèces comme celui du mil, il faut être capable de reconnaître les différentes populations, notamment au niveau chromosomique. Les méthodes cytogénétiques permettent déjà de déterminer la ploïdie du matériel ainsi que le nombre chromosomique de base.

Pour les espèces qui nous intéressent (*Pennisetum typhoides* pour les variétés cultivées et *Pennisetum violaceum* pour les populations sauvages, espèces appartenant toutes au pool primaire des mils), $2N = 2X = 14$ chromosomes. Le caryotype est constitué de 6 paires métacentriques très semblables entre elles et d'une paire sub-métacentrique : la lignée tchadienne *Ligui* (Sarr, 1987) se caractérise par une constriction secondaire sur la paire 6 alors que les autres lignées cultivées (*23DB*, originaire des USA, *Tiotandé* du Sénégal et *Massue* de Mauritanie) et la population sauvage *violaceum* du Niger, présentent un satellite sur la paire 7.

Pour l'espèce sauvage *violaceum* du Niger, ces analyses ont mis en évidence l'existence de chromosomes surnuméraires télocentriques (Amouroux-Pezas, 1960 ; Khalfallah, 1990).

La seule analyse morphologique ne permet donc de différencier que peu de chromosomes : ceci est vrai pour le mil comme pour de nombreuses autres espèces. Par des méthodes d'analyse plus fines comme le banding, il est possible d'étudier la structure des chromosomes. C'est ainsi que chez le maïs, des nodosités hétérochromatiques ont été mises en évidence : elles ont permis la caractérisation d'un certain nombre de races et apporté des informations intéressantes sur l'évolution au sein du groupe maïs (Mc Clintock, 1981). Par le C-banding (permettant la caractérisation de l'hétérochromatine) Siljak-Yakovlev et Cartier (1982) ont mis en évidence l'existence d'une surcharge hétérochromatique au sein de certains taxons du complexe *Praemorsa*. Chez le mil, le C-banding marque les régions centromériques ainsi que les télomères terminaux, mais ne révèle pas de bandes intercalaires, celles qui permettraient de différencier les chromosomes. Par cette technique, les chromosomes surnuméraires de *violaceum* sont partiellement marqués (Khalfallah, 1990).

Nous avons donc été amenés à utiliser de nouvelles méthodes de marquage, notamment le fluorochrome-banding (Martel, 1992). Avec la chromomycine A3 (marquant spécifiquement les zones riches en bases G-C de l'hétérochromatine), les premières analyses ne révèlent pas de marquage différentiel des chromosomes. Avec le fluorochrome Hoeschst 33258 (spécifique des zones riches en A-T) certains marquages intercalaires sont observés, sans qu'il soit encore possible de préciser le ou les chromosomes marqués (les spots sont aussi très visibles sur les noyaux interphasiques).

Ces résultats préliminaires sont prometteurs. La mise au point de cette méthode ainsi que l'utilisation d'autres techniques de marquage comme le N-banding (mise en évidence des organisateurs nucléolaires) et surtout l'hybridation *in situ* nous donnent l'espoir de reconnaître cytologiquement chacune des paires chromosomiques et de mieux définir leur structure.

III - ROLE DE L'HETEROCHROMATINE : REVE OU REALITE ?

La présence de l'hétérochromatine dans le génome pose un certain nombre de problèmes dans la mesure où cette partie est non codante. Certaines hypothèses ont été formulées quant à son rôle dans la protection des zones vitales du génome ou dans la

structuration de l'organisation chromosomique en mitose et en méiose (centromère, extrémité des chromosomes, maintien de l'appariement des homologues en méiose). Travailler sur cette partie du génome pose un problème dans la mesure où, sans coloration spécifique, on ne peut pas la distinguer. Il existe cependant un moyen intéressant pour aborder ce problème : la présence de chromosomes surnuméraires (les chromosomes B), totalement ou partiellement hétérochromatiques selon les espèces et facilement détectables par simple examen cytologique.

Les chromosomes B sont des chromosomes qui :

- sont donc hétérochromatiques ;
- ne sont pas indispensables à l'espèce qui les possède ;
- ne présentent pas d'homologie avec les chromosomes A ;
- montrent une variabilité intra- et interindividuelle ;
- se transmettent avec des mécanismes d'accumulation et d'élimination modifiant la distribution mendélienne ;
- sont présents dans de très nombreuses espèces animales et végétales (Jones et Rees, 1982). Ces chromosomes B ont été décrits la première fois par Pantulu (1960) dans une variété cultivée du Soudan. Ils ont été aussi observés dans des populations sauvages du Niger et du Mali ainsi que dans une variété cultivée du Niger, *Ankoutess*, vivant dans une région aride (pluviométrie inférieure à 300 mm) et réputée auprès des paysans locaux comme particulièrement résistante à la sécheresse.

Un certain nombre de corrélations ont été mises en évidence entre surcharge en hétérochromatine d'un génome (ou présence de chromosomes B) et adaptations environnementales :

- chez *Crepis* (Siljak-Yakovlev et Cartier, 1982), les taxons riches en hétérochromatine sont ceux vivant à des altitudes élevées (*dinarica* entre 1600 et 1800 m.). La même observation a été faite chez deux insectes primitifs (Cassagnau, 1974, 1975) et chez un insecte diptère (Wolf, 1973) ;
- chez le criquet migrateur *Locusta migratoria*, la fréquence des chromosomes B est d'autant plus élevée que les populations vivent dans des milieux éloignés de l'optimum cénétique de l'espèce (Lespinasse, 1981).

Par ailleurs, la présence des chromosomes B a été corrélée avec :

- la fréquence de crossing-over, qui augmente chez le seigle (Jones et Rees, 1967) et chez le maïs (Ayonoadu et Rees, 1968) mais diminue chez le ray-grass (Cameron et Rees, 1967) et chez *Aegilops* (Zarchy *et al.*, 1972). Chez le mil, la présence des B ne paraît pas influencer sur cette fréquence de crossing-over (Khalfallah, 1990).
- une diminution de la vigueur générale chez *Allium schoenoprasum* (Bourgourd et Parker, 1979) ;
- une stérilité mâle chez *Plantago coronopus* (Paliwal et Hyde, 1959) ;
- une fertilisation préférentielle : chez le maïs (Roman, 1948 ; Carlson, 1969) et chez le seigle (Puertas et Carmona, 1976), le pollen porteur de chromosomes B étant plus efficace ; chez le seigle, cela est dû à une vitesse de croissance plus grande des tubes

polliniques. Cette dernière observation est importante dans la mesure où l'analyse du complexe d'espèces du mil met en évidence l'existence de distorsion de ségrégation et de compétition pollinique influencée par les conditions de l'environnement, notamment la température (Sarr, 1987 ; Robert, 1989 ; Robert *et al.*, 1991) : or les corrélations mises en évidence portent souvent sur des facteurs ayant une influence dans les échanges entre les éléments d'un complexe d'espèces.

On voit donc tout l'intérêt qu'il y a à s'intéresser à cette partie du génome qui, bien que non codante, joue vraisemblablement un rôle important dans la régulation de l'expression du génome tout entier : chez *Scilla autumnalis* (Ruiz-Réjon *et al.*, 1980 ; Oliver *et al.*, 1982) une corrélation est mise en évidence entre la présence des chromosomes B et une bande supplémentaire dans le profil enzymatique de l'estérase E1 : leurs analyses montrent que le gène en cause est situé sur les chromosomes A (et non sur le B) et que c'est seulement son expression qui est régulée par la présence des chromosomes B. Cette même corrélation entre la modification du profil enzymatique d'un gène estérase et la présence d'un chromosome B a été mise en évidence chez des plantes androgénétiques de mil (Le Thi, 1990). A ce propos, il faut rappeler ici, que c'est la deuxième description de différenciation de chromosomes B dans des plantes d'origine androgénétique : la première description a été faite chez *Nicotiana sylvestris* (Lespinasse *et al.*, 1987), où il a été montré qu'une des premières conséquences de l'androgénèse est une augmentation de la quantité des zones riches en séquences répétées (De Paepe, 1983); existe-t-il une relation entre ces deux observations ?

Chez le seigle (Puertas *et al.*, 1988), la fécondation par le pollen porteur ou non de chromosomes B ne se fait pas au hasard : le pollen provenant de plantes porteuses de chromosomes B est favorisé lorsque la proportion de ces plantes diminue et le pollen provenant de plantes sans B est à son tour favorisé lorsque la proportion de plantes porteuses de B augmente. Ainsi, la fréquence des chromosomes B diminue quand les conditions leur sont favorables et augmente dans le cas contraire. Ces auteurs concluent que les chromosomes B se comportent en "égoïste" et n'apparaissent que lorsque cela les avantage. Ces observations illustrent bien les deux théories qui existent quant au rôle éventuel de l'hétérochromatine dans un génome (Jones, 1985 ; Shaw et Hewitt, 1990) :

- il y a ce que l'on peut appeler "la théorie adaptative" où la surcharge d'un génome en hétérochromatine conférerait un potentiel adaptatif plus grand aux individus ou aux populations, dans certaines conditions environnementales (dans les cas de stress notamment) ;

- et la théorie de "l'ADN égoïste", où cette hétérochromatine ne se maintiendrait dans les populations que grâce à des mécanismes comparables à ceux des parasites (Östergren, 1945). Bien que ces deux théories ne s'excluent pas l'une l'autre, une façon d'aborder ce problème serait de fabriquer deux lignées isogéniques au niveau du background génétique, mais étant différenciées par la présence ou l'absence de chromosomes B, et de tester ces deux lignées dans un certain nombre de conditions expérimentales. Ceci constitue un de nos projets sur le matériel mil dont nous disposons.

IV - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les méthodes cytogénétiques sont donc un moyen simple pour localiser un certain nombre de marqueurs, témoins de l'évolution au sein du complexe d'espèces : tous les exemples cités montrent bien que l'hétérochromatine est l'un de ces marqueurs et que sa présence doit être prise en compte lorsque l'on considère les échanges entre les différents compartiments du complexe. Le cas des chromosomes B décrits dans l'espèce sauvage *violaceum* est un exemple particulier de surcharge en hétérochromatine du génome. L'emploi de méthodes récentes d'investigation, comme l'hybridation *in situ*, devrait apporter des renseignements quant à leur origine et, éventuellement, sur un certain nombre de gènes qu'ils seraient susceptibles de posséder (recherche d'organismes nucléolaires notamment).

L'hétérochromatine est considérée comme une partie du génome qui "bouge" beaucoup : amplification rapide, siège d'insertion de transposons, zones renfermant des points de cassures. Parallèlement, il a été mis en évidence que les télomères terminaux des chromosomes, hétérochromatiques, sont indispensables au maintien de la structure et au fonctionnement de ces chromosomes, que ce soit chez l'homme, la drosophile ou le maïs (Moyzis, 1991) : ils sont composés de 250 à 1500 séquences "TTAGGG", structure identique chez les poissons osseux, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux et les mammifères, soit plus de 100 espèces dont le dernier ancêtre commun connu a plus de 400 millions d'années. Des travaux récents sur *Arabidopsis* (Richards et Ausubel, 1988), sur le seigle (Schwarzacher et Heslop-Harrison, 1991), sur la tomate (Ganal *et al.*, 1991) et sur le maïs (Burr *et al.*, 1992) montrent cette même séquence. Ainsi, l'hétérochromatine est un secteur du génome qui peut être conservé identique pendant des millions d'années ou, au contraire, évoluer très rapidement. Son étude devrait révéler bien des surprises quant à son rôle dans le fonctionnement du génome.

Nos perspectives de travail sont de trois ordres :

- Utiliser les techniques de biologie moléculaire pour caractériser les chromosomes B dans l'optique d'obtenir certaines données quant à leur origine ;
- Fabriquer des lignées isogéniques de mil différentes uniquement par la présence de chromosomes B : cela nous permettra d'apporter de nouveaux éléments relatifs à la place des B dans le génome, notamment en cas de stress ;
- Aborder le problème de la résistance à la sécheresse, en collaboration avec des physiologistes : il serait intéressant de tester les différentes lignées dont nous disposons dans des contextes de stress hydriques, en relation avec l'hétérochromatine et les chromosomes B, bien entendu.

BIBLIOGRAPHIE

- AMOUROUX-PEZAS (C.), 1985. Les chromosomes B du mil : leur gestion dans une forme spontanée *Pennisetum violaceum* et leur transfert dans des lignées cultivées. Thèse docteur 3ème cycle, ORSAY.
- AYONOADU (U.) and REES (H.), 1968. The influence of B chromosomes on chiasma frequencies in black mexican corn. *Genetica* 39 : 75-81.
- BOUGOURD (S.M.) and PARKER (J.S.), 1979. The B chromosomes system of *Allium schoenoprasum*. II. Stability, inheritance and phenotypic effects. *Chromosoma* 75 : 369-383.
- BURR (B.), BURR (F.A.), MATZ (E.C.) and ROMERO-SEVERSON (J.), 1992. Pinning down loose ends : mapping telomeres and factors affecting their length. *Plant Cell* 4 : 953-960.
- CAMERON (F.M.) and REES (H.), 1967. The influence of B chromosomes on meiosis in *Lolium*. *Heredity* 22 : 446-450.
- CARLSON (W.R.), 1969. Factors affecting preferential fertilization in maize. *Genetics* 62 : 543-554.
- CASSAGNAU (P.), 1974. Les chromosomes polytènes de *Neanura monticola* Cass (Collemboles). I. Polymorphisme écologique du chromosome X. *Chromosoma* 46 : 343-363.
- CASSAGNAU (P.), 1975. Le polymorphisme des chromosomes polytènes de *Billobella aurantiaca* Caroli (Collemboles) et sa signification biogéographique écologique. *C.R.Acad. Sci.* 280 : 2777-2780.
- DE PAEPE (R.), 1983. Etude génétique des plantes haploïdes doublées obtenues par culture de pollen isolé chez *Nicotiana sylvestris* : aspects morphogénétique, cellulaire, chromosomique. Thèse doctorat état, ORSAY.
- JONES (R.N.), 1985. Are B chromosomes selfish ? In : The evolution of genome size, 397-425 (Ed. T. Cavalier-Smith).
- JONES (R.N.) and REES (H.), 1982. B chromosomes. Academic press.
- JONES (R.N.) and REES (H.), 1967. Genotypic control of chromosome behaviour in rye. XI. The influence of B chromosomes on meiosis. *Heredity* 22 : 333-347.
- KHALFALLAH (N.), 1990. Les relations génétiques entre formes sauvages et cultivées du pool primaire du mil *Pennisetum typhoides* Stapf et Hubb. Analyses cytogénétiques et biométriques conjointes de l'organisation de la variabilité. Thèse doctorat état, Constantine.
- LESPINASSE (R.), 1981. Les chromosomes B chez *Locusta migratoria* : analyse de leur fréquence et de leur transmission dans des populations d'origines géographiques différentes. *Acrida* 10 (3) : 131-144.

- LESPINASSE (R.), DE PAEPE (R.) and KOULOU (A.), 1987. Induction of B chromosomes formation in androgenetic lines of *Nicotiana sylvestris*. *Caryologia* 40 (4) : 327-338.
- LE THI (K.), 1990. Génétique du gamétophyte mâle du mil (*Pennisetum typhoides* Stapf et Hubb) : relation entre l'overlapping et l'organisation de la variabilité des plantes haploïdes doublées (HD) issues de culture d'anthers. Thèse doctorat en Sciences, ORSAY.
- MARTEL (E.), 1992. Confrontation des génomes sauvages et cultivés du mil : analyse cytologique des chromosomes B et effet du background génétique sur leur gestion. DEA d'Ecologie Générale et Production Végétale, Paris VI.
- MC CLINTOCK (B.), KATO (Y.T.A.) and BLUMENSTEIN (A.), 1981. Chromosome constitution of races of maize. Its significance in the interpretation of relationships between races and varieties in the Americas. Colegio de Postgraduados Chapingo, Mexico.
- MOYZIS (R.), 1991. Le télomère humain. *Pour la Science* 168 : 82-89.
- OLIVER (G.L.), POSSE (F.), MARTINEZ-ZAPATER (J.M.), ENRIQUEZ (A.M.) and RUIZ-REJON (M.), 1982. B chromosomes and E1 isozyme activity in mosaic bulbs of *Scilla autumnalis* (Liliaceae). *Chromosoma* 85 : 399-403.
- ÖSTERGREN (G.), 1945. Parasitic nature of extra chromosomes fragments. *Bot. Notiser (Lund)* 2 : 157-163.
- PALIWAL (R.L.) and HYDE (B.B.), 1959. The association of a single B chromosome with male sterility in *Plantago coronopus*. *Am. J. Bot.* 46 : 460-466.
- PANTULU (J.V.), 1960. Accessory chromosomes in *Pennisetum typhoides*. *Curr. Sci.* 29 : 28-29.
- PUERTAS (M.J.) and CARMONA (R.), 1976. Greater ability of pollen tube growth in rye plants with 2B chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 47 : 41-43.
- PUERTAS (M.J.), VEGA (J.M.), ROMERA (F.) and DIEZ (M.), 1988. Frequency-dependent fertilisation involving rye B chromosomes. *Heredity* 61 : 143-147.
- RICHARDS (E.J.) and AUSUBEL (F.M.), 1988. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53 : 127-136.
- ROBERT (T.) 1989. Dynamique des flux de gènes entre formes sauvages et cultivées du mil (*Pennisetum typhoides* Stapf et Hubb). Impact des sélections gamétophytiques. Thèse doctorat en Sciences, ORSAY.
- ROBERT (T.), LESPINASSE (R.), PERNES (J.) and SARR (A.), 1991. Gametophytic competition as influencing gene flow between wild and cultivated forms of pearl millet (*Pennisetum typhoides*). *Genome* 34 : 195-200.
- ROMAN (H.), 1948. Selective fertilization in maize. *Genetics* 33 : 122-123.

- RUIZ-REJON (M.), POSSE (F.) and OLIVER (J.L.), 1980. The B chromosome system of *Scilla autumnalis* (Liliaceae) : effect at the isozyme level. *Chromosoma* 79 : 341-348.
- SARR (A.), 1987. Analyse génétique de l'organisation reproductive du mil (*Pennisetum typhoides* Stapf et Hubb). Implication pour son amélioration et la gestion des ressources génétiques. Thèse Doctorat état, ORSAY.
- SCHWARZACHER (T.) and HESLOP-HARRISON (J.S.), 1991. *In situ* hybridization to plant telomeres using synthetic oligomers. *Genome* 34 : 317-323.
- SHAW (M.W.) and HEWITT (G.M.), 1990. B chromosomes, selfish DNA and theoretical models : where next ? *In* : Oxford surveys in Evolutionary Biology, (ed D. Futuyma and J. Antonony). 197-223
- SILJAK-YAKOVLEV (S.) et CARTIER (D.), 1982. Comparative analysis of the C-band karyotypes in *Crepis praemorsa* (L) Tausch subsp praemorsa and *C. praemorsa* subsp dinarica (Beck) P.D. Sell. *Plant Systematic and Evolution* 141 : 85-90.
- WOLF (B.E.), 1973. Chromosomal structure and exchange frequency. *Chromosome Today* 4 : 169-180.
- ZARCHY (Y.), SIMCHEN (G.), HILLEL (J.) and SCHAPP (T.), 1972. Chiasmata and the breeding system in wild populations of diploid wheats. *Chromosoma* 38 : 77-94.