



HAL
open science

Marqueurs moléculaires : intérêt et utilisation pour l'amélioration et la conservation de arbres forestiers

Vanina Guérin, Véronique Jorge

► To cite this version:

Vanina Guérin, Véronique Jorge. Marqueurs moléculaires : intérêt et utilisation pour l'amélioration et la conservation de arbres forestiers. Agrosiences, Environnement, Territoires, Paysage, Forêt - Parcours Biologie Intégrative et Changement Globaux (BICG), 2019. hal-02789231

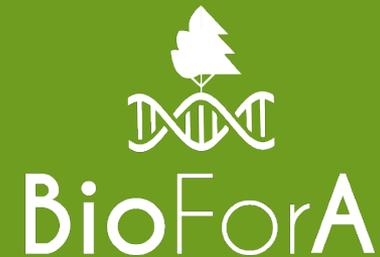
HAL Id: hal-02789231

<https://hal.inrae.fr/hal-02789231>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Marqueurs moléculaires :

Intérêt et utilisation pour l'amélioration et la conservation des arbres forestiers

Vanina GUERIN & Véronique JORGE

Biologie Intégrée pour la valorisation de la diversité des arbres et de la Forêt

UMR 0588 BioforA

2163, avenue de la pomme de pin

CS 40001 ARDON

45075 Orléans Cédex 2

<https://www6.val-de-loire.inra.fr/biofora/>





QUIZ



- 1** Que signifie l'acronyme ADN ?
- A Acide desoxyribonucléique
 - B Acide didesoxyribonucléique
 - C Acide ribonucléique
 - D Accueil des nouveaux arrivants



2 Un organisme polyploïde possède :

- A plusieurs pieds
- B plusieurs génomes
- C plusieurs genres
- D plusieurs espèces



3 Un allèle est :

- A un gène exprimé
- B un gène réprimé
- C une des formes d'un gène
- D un gènes surexprimé



4 Que veut dire PCR ?

- A Polycycle Carbon Run
- B Potential Circle Run
- C Primary Cycle Reaction
- D Polymerase Chain Reaction



5 Un crossing over est :

- A une technique de biologie moléculaire
- B un échange de segment de chromatides entre chromosomes
- C un échange de chromosome
- D un point de broderie



6 Un microsatellite est un :

- A satellite de bactérie
- B marqueur d'étalonnage de faible taille
- C épisode humain
- D marqueur génétique



- 7 Dans une cellule végétale, l'ADN est présent dans :
- A la mitochondrie
 - B le chloroplaste
 - C le cytoplasme
 - D le noyau



- 8 Un individu hétérozygote possède :
- A Deux sexes
 - B Deux allèles différents
 - C Deux génomes
 - D plusieurs descendants

SOMMAIRE

❖ Introduction :

- qu'est-ce qu'un marqueur moléculaire ?
- Exemples d'utilisations

❖ Rappel de quelques notions

❖ Aspects techniques

❖ Exercice

SOMMAIRE

❖ Introduction :

- **qu'est-ce qu'un marqueur moléculaire ?**
- Exemples d'utilisations

❖ Rappel de quelques notions

❖ Aspects techniques

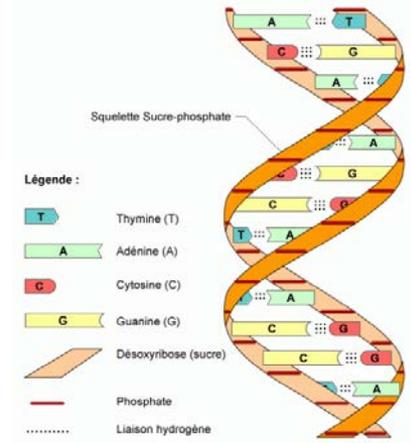
❖ Exercice

INTRODUCTION

Qu'est-ce qu'un marqueur moléculaire ?

Les marqueurs moléculaires d'ADN :

- Correspondent à des **séquences ADN** codantes ou non, ou à sa représentation moléculaire (ARN, protéine).
- est partagé par tous les individus (**universalité**) de la même espèce voire de plusieurs espèces.
- Présentent un **polymorphisme** selon les individus.
- sont **transmis de génération en génération**. Il est préférable que cette transmission des allèles soit **mendélienne**.
- Sont présents dans toutes les cellules d'un organisme.
- Révélés par les techniques de biologie moléculaire.



SOMMAIRE

❖ Introduction :

- qu'est-ce qu'un marqueur moléculaire ?
- **Exemples d'utilisations**

❖ Rappel de quelques notions

❖ Aspects techniques

❖ Exercice

INTRODUCTION

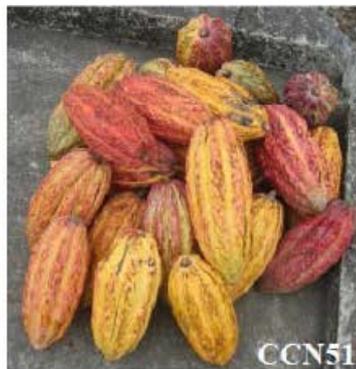
Applications

- Etablir l'**empreinte génétique** d'un individu, c'est-à-dire de décrire et définir des individus et des variétés en vue de leur inscription, de leur protection et de leur classification,
- Mettre en évidence et suivre les gènes impliqués dans l'**expression de caractères d'intérêt** agronomique ou technologique.
- Rechercher des **apparentements**, reconstruire des pedigree.
- La **sélection** assistée par marqueur, la sélection génomique
- Décrire la **diversité naturelle** en vue de programme de conservation

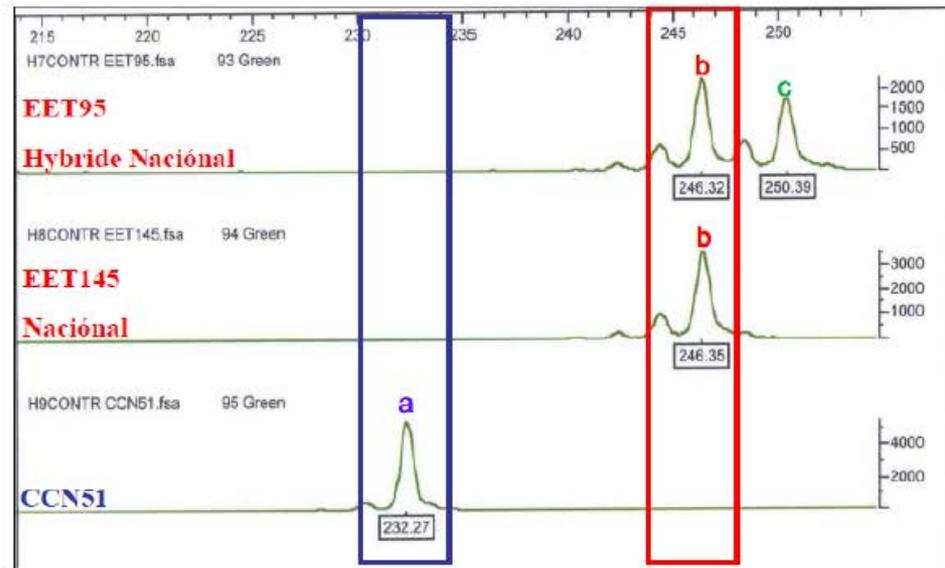
Applications

Diagnostic de variétés

**Situation Actuelle:
Nacional versus CCN51**

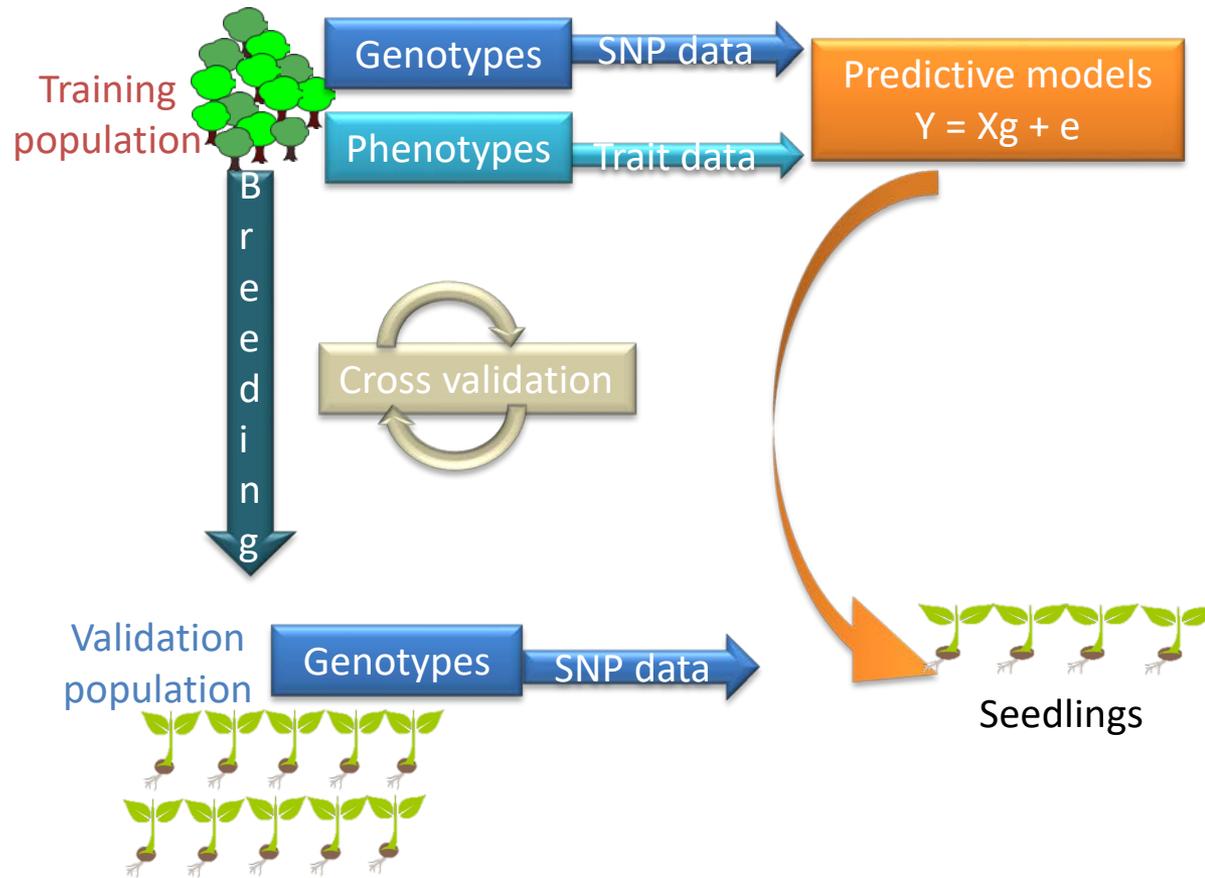


Génotypage des Cacaoyers Equatoriens



Applications

Sélection génomique

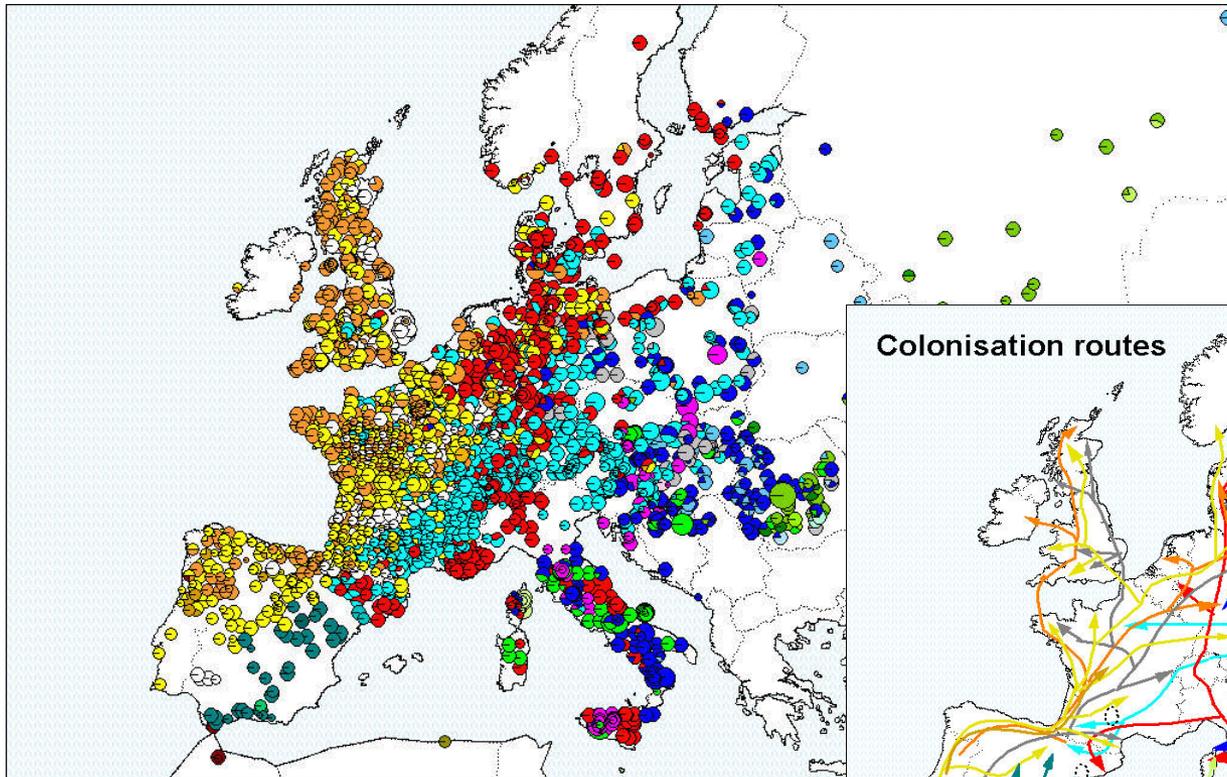


En test chez les arbres forestiers

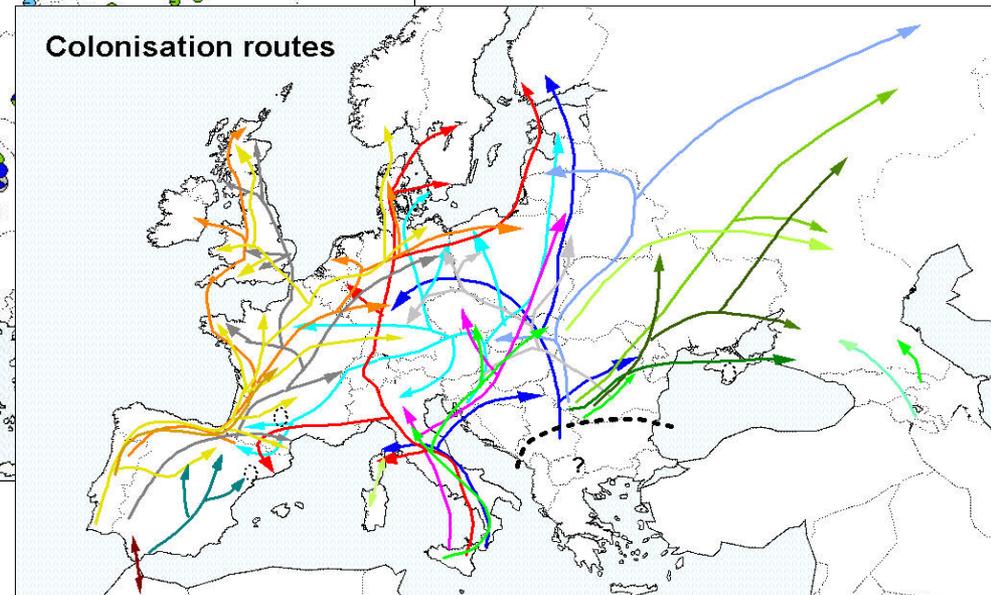
Applications

Reconstruction de la recolonisation post-glaciaire des chênes

Distribution des haplotypes chloroplastiques



2673 populations
42 haplotypes



Aire naturelle chênes blancs

SOMMAIRE

❖ Introduction :

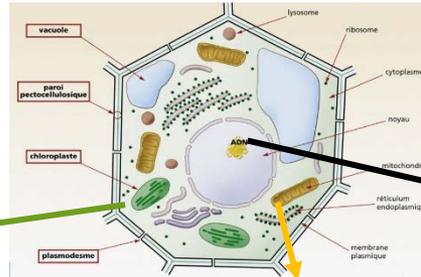
- qu'est-ce qu'un marqueur moléculaire ?
- Exemples d'utilisations

❖ Rappel de quelques notions

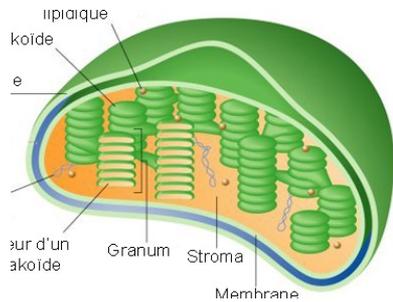
❖ Aspects techniques

❖ Exercice

3 origines d'ADN chez les plantes



Génome chloroplastique 135-160 kb

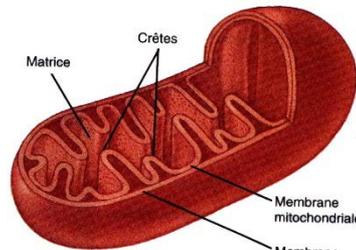


Hérédité uniparentale

**Hérédité paternelle
(Gymnospermes)**

**Hérédité maternelle
(Angiospermes)**

Génome mitochondrial 2500 kb

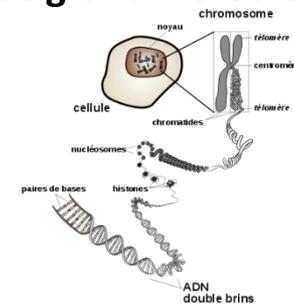


Hérédité uniparentale

**Hérédité maternelle
(Gymnospermes)**

**Hérédité paternelle
(Angiospermes)**

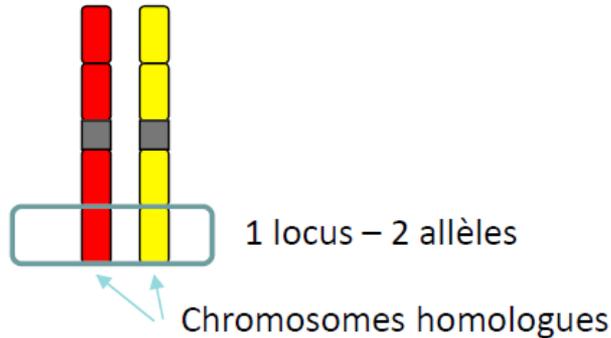
Génome nucléaire Le plus grand: 25-30 000 Mb



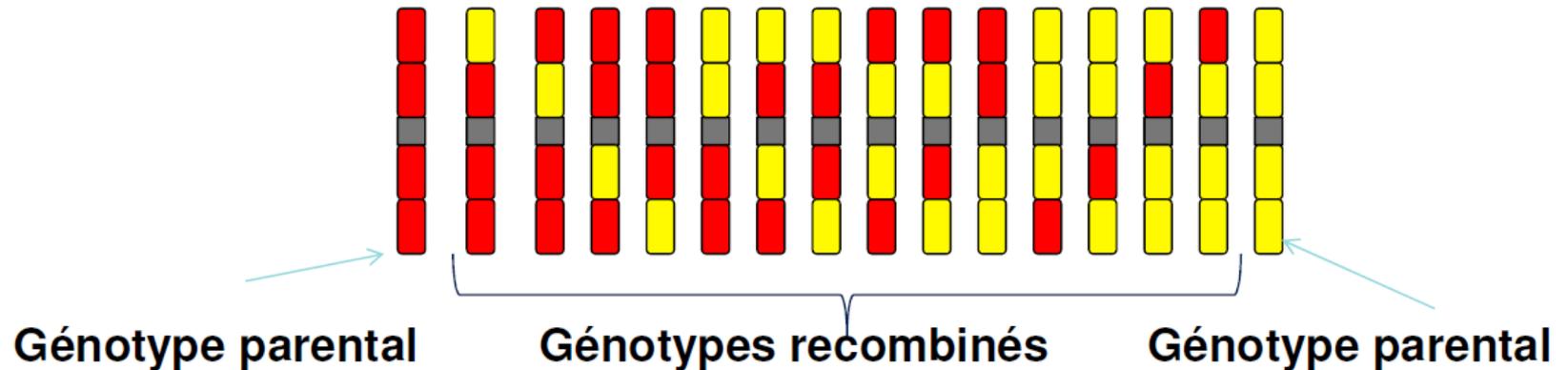
*Hérédité maternelle et
paternelle*

Rappels sur la méiose

Génotype de la mère ($2n$)

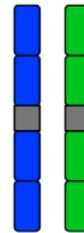


Génotypes possibles des gamètes produits par la mère (n)

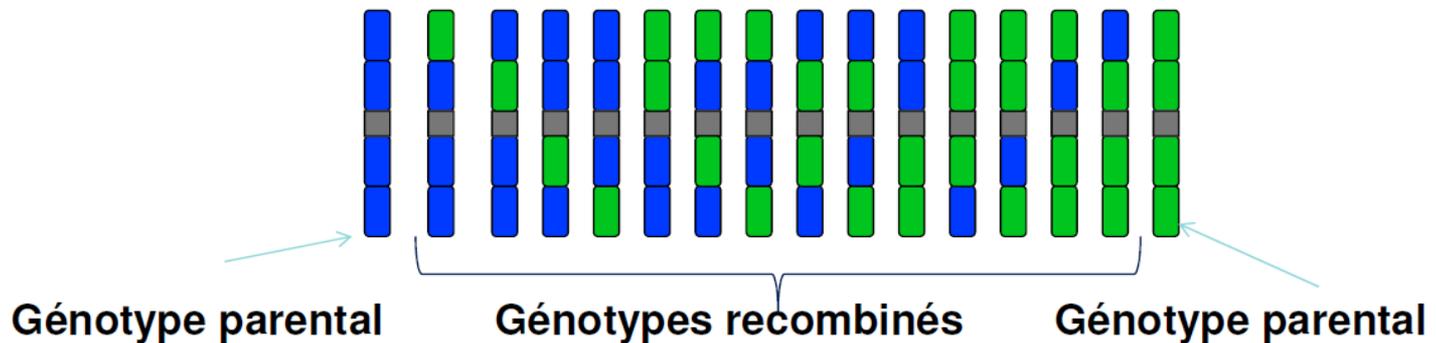


Rappels sur la méiose

Génotype du père (2n)

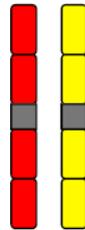


Génotypes possibles des gamètes produits par la mère (n)

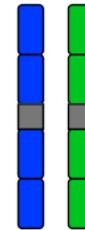


Rappels sur la méiose

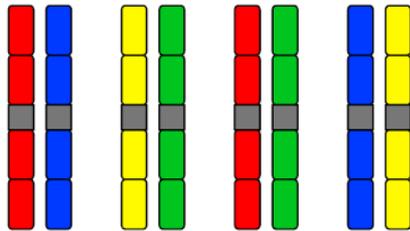
La mère



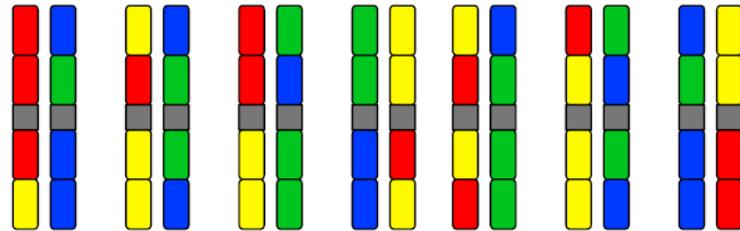
Le père



La descendance



Génotypes parentaux



Génotypes recombinés

...etc

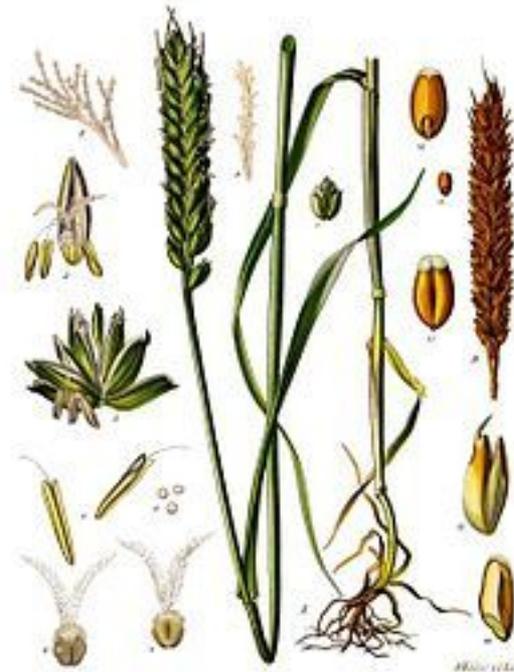
Définitions

Hétérozygotie : Un organisme est hétérozygote pour un gène (marqueur) quand il possède deux allèles différents de ce gène (marqueur) sur un même locus pour chacun de ses chromosomes homologues.



Pl. 305. Peuplier noir. *Populus nigra* L.

Les arbres ont beaucoup de loci hétérozygotes ...



... les plantes cultivées beaucoup moins.

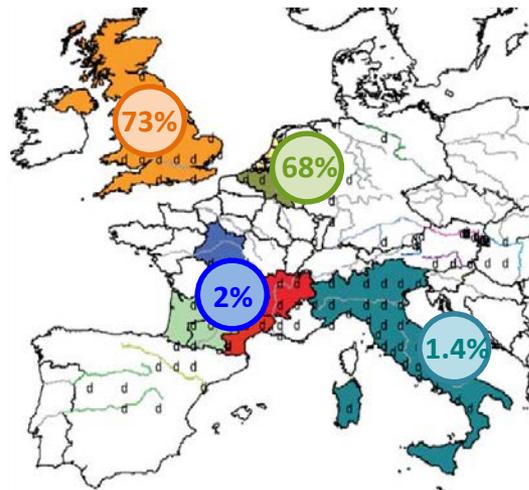
Définitions

Clonalité : Qui se rapporte à un clone ; groupe d'individus ou de cellules contenant les mêmes gènes et obtenu par la reproduction asexuée d'un individu ou d'une cellule

- Les peupliers, des espèces à multiplication végétative aisée.
- En populations naturelles, le taux de clonalité varie de 0% à 97% (proportion d'individus à génotypes identiques ⁽¹⁾).
- Exemple : dans les collections nationales de peuplier noir (Storme et al 2004):



Marqueurs SSR, AFLP

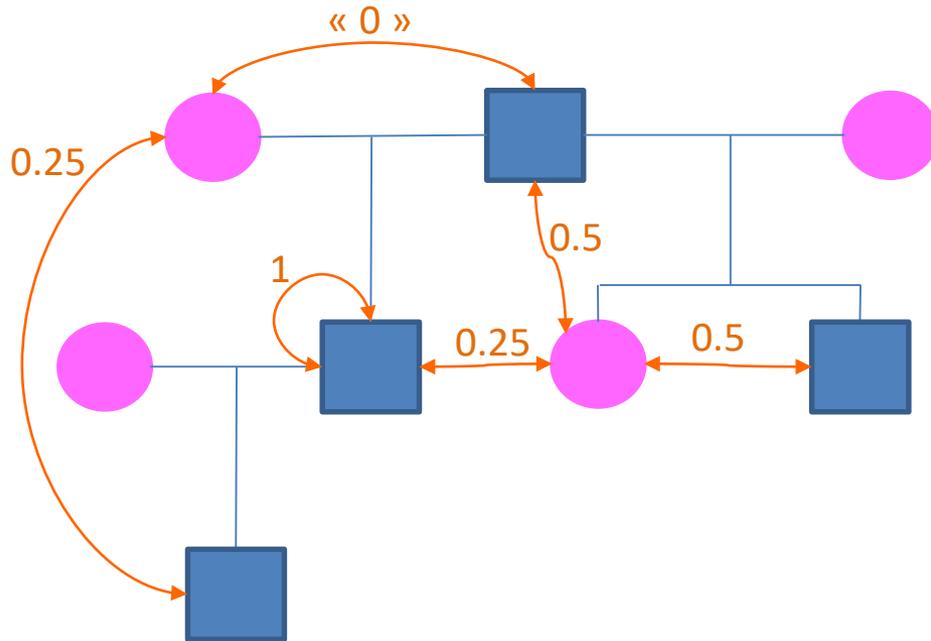


Rejet de souche,
Populus spp., Canada

⁽¹⁾ Arens et al. 1998; Barsoum 2002; Barsoum et al. 2004; Cottrell et al. 1997; Koskela et al. 2004; Legionnet 1997; Pospiskova and Bartakova 2004; Pospiskova and Salkova 2006; Rathmacher et al. 2010; Smulders et al. 2008b; Storme et al. 2004; Winfield et al. 1998

Définitions

Apparentement : L'apparentement entre deux individus est synonyme de degré de parenté et se mesure par le coefficient de parenté. Deux individus sont dits apparentés s'ils ont un ancêtre commun => *apparentement basé sur le pedigree*



Relationship to you	relatedness coefficient
yourself	1
identical twin	1
parent, child	1/2
grandparent, grandchild	1/4
great-grandparent, great-grandchild	1/8
n^{th} level ancestor or descendant	$1/2^n$
sibling (sister or brother)	1/2
half-sibling	1/4
aunt, uncle	1/4
niece, nephew	1/4
great-aunt, great-uncle	1/8
great-niece, great-nephew	1/8
first-cousin	1/8
first-cousin-once-removed	1/16
second-cousin	1/32
second-cousin-once-removed	1/64
third-cousin	1/128
n^{th} cousin	$1/2^{2n+1}$
n^{th} cousin, m times removed	$1/2^{2n+m+1}$
stranger	0

Les marqueurs moléculaires permettent de calculer de valeurs d'apparentement **moléculaire** plus continues.

SOMMAIRE

❖ Introduction :

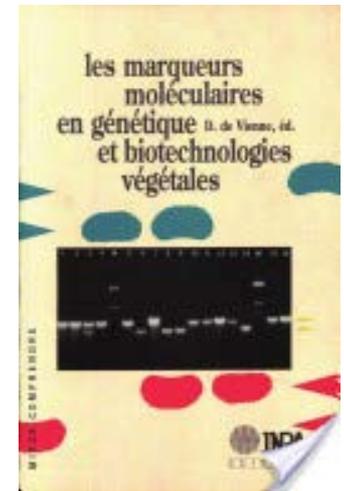
- qu'est-ce qu'un marqueur moléculaire ?
- Exemples d'utilisations

❖ Rappel de quelques notions

❖ Aspects techniques

❖ Exercice

Les types marqueurs moléculaires



(D. de Vienne, 1998)

AFLP, AP-PCR, CAPS, DAF,
 DGGE, ISSR, MAAP,
 tecMAAP, RAPD, RFLP, SCAR,
 SNP, SSR, STS, VNTR
 ZZZZ

Critère moléculaire
 (type de polymorphisme)

Séquence

Nb de répétitions

Marqueurs codominants
 Révélés individuellement

RFLP
 SNP

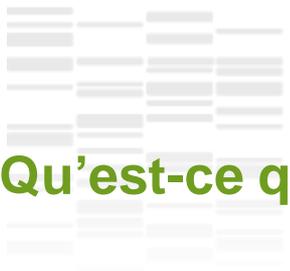
Microsatellites

Critère génétique

Marqueurs dominants
 Révélés en masse

AFLP
 RAPD

ISSR

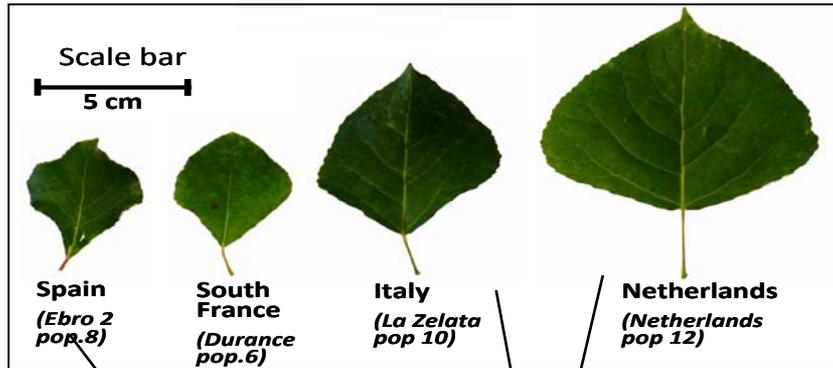


Qu'est-ce qu'un BON marqueur moléculaire ?

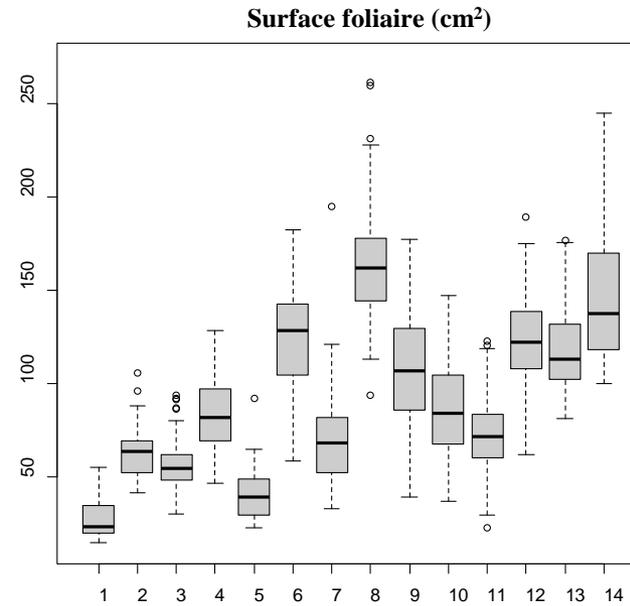
- **neutre*** : ses différents allèles n'ont pas d'effet sur le phénotype de l'individu,
- **polymorphe** : possédant de nombreux **allèles** permettant de caractériser les différents individus (**multiallélique**).
- **codominant** : l'individu *hétérozygote* peut être distingué car il présente simultanément les caractères de ses parents *homozygotes*,
- insensible au milieu.

Neutralité :

Un phénotype peut être soumis à sélection => la surface foliaire chez le peuplier



Peuplier noir

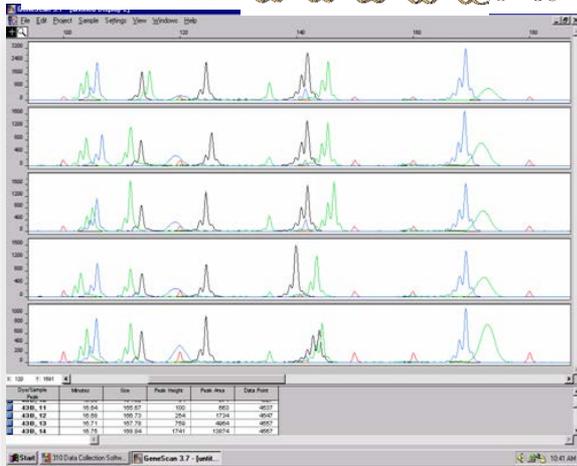
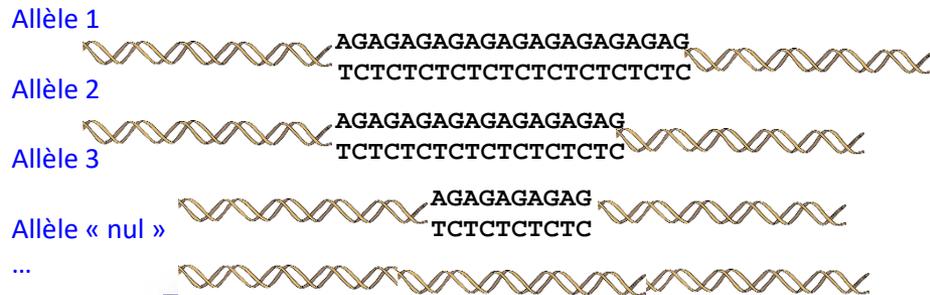


- Une grande variabilité génétique entre populations mais aussi intra-population

Les principaux marqueurs utilisés aujourd'hui

SSR - microsatellites

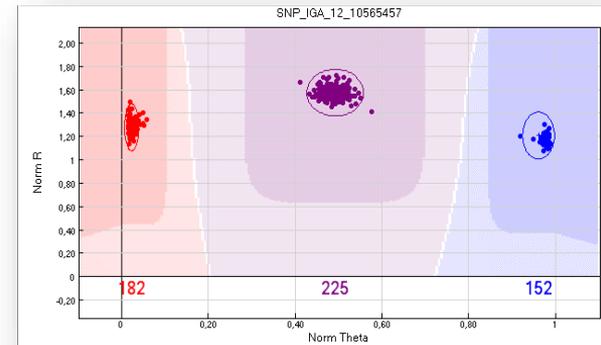
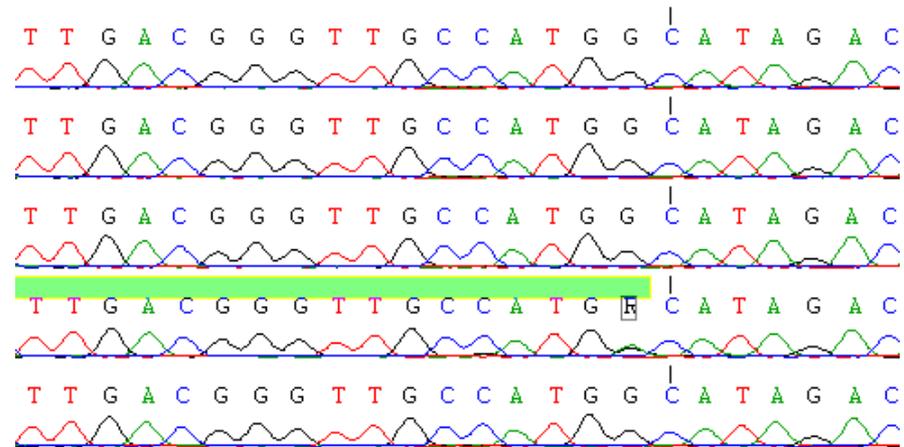
Co-dominant, multiallélique,



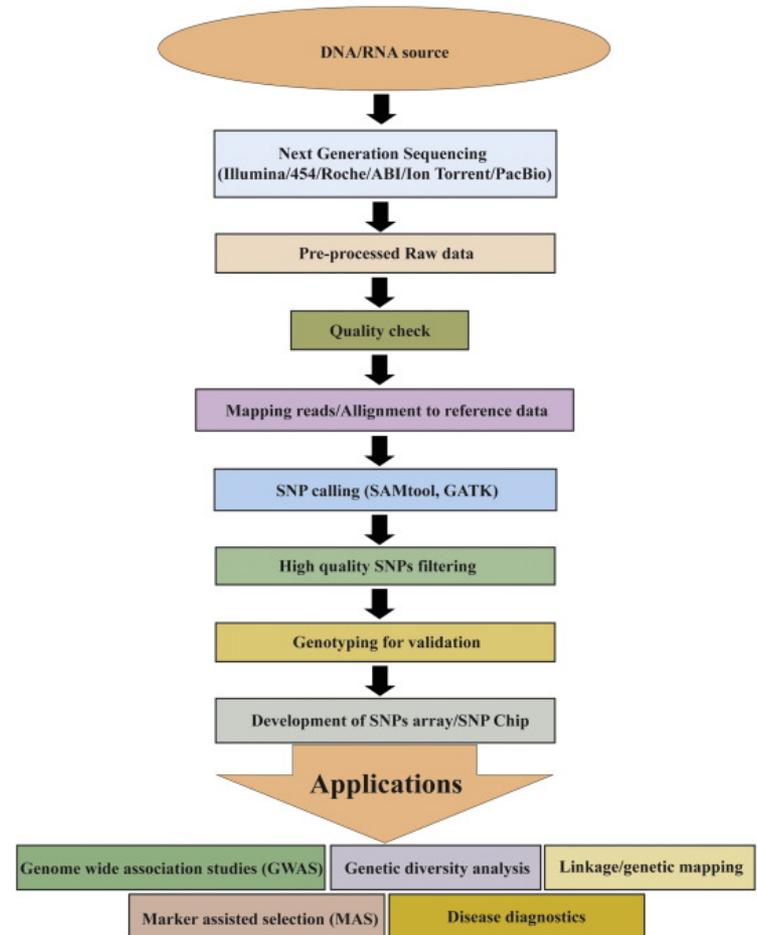
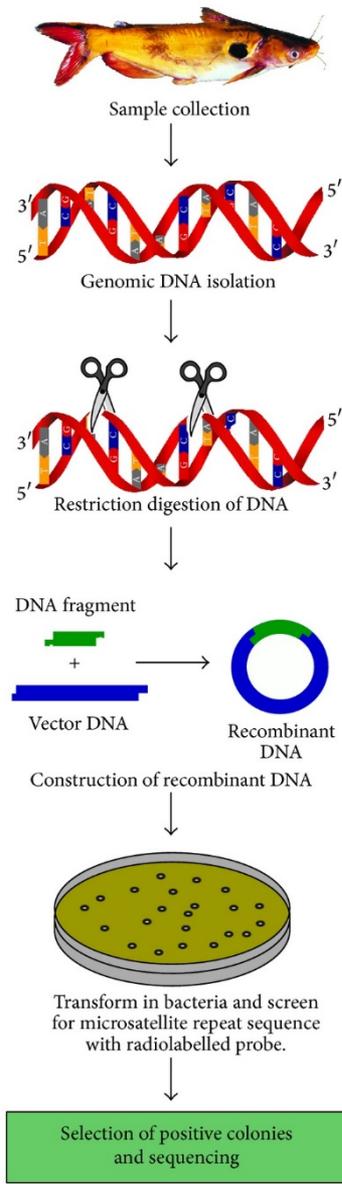
Genotype

SNP

Co-dominant, bi-allélique, potentiellement plusieurs millions (chez le peuplier 1 SNP/ 90 pb)



Mise en évidence par séquençage

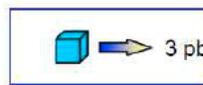
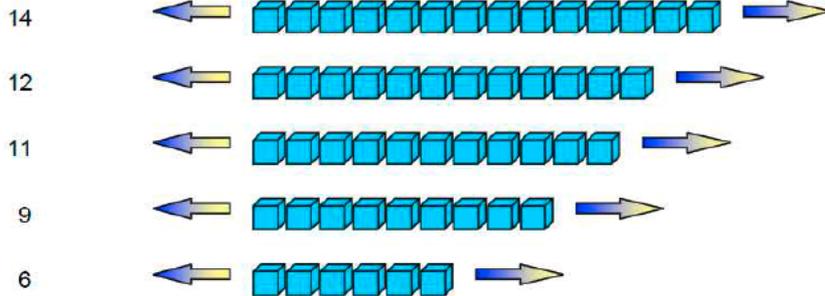


Marqueurs microsatellites

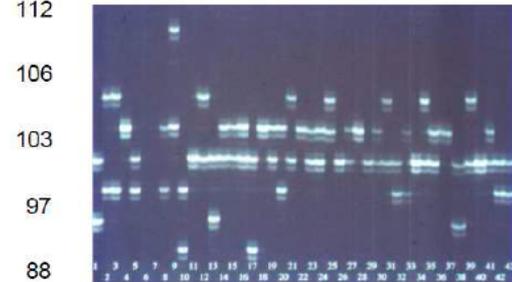
- polymorphisme de répétitions en tandem de 2 à 6 nucléotides

AGTGTCTAGTAGCTAG.....CACACACACACACACA.....CGTGATACATGCA
 Séquence flanquante 8 répétitions Séquence flanquante

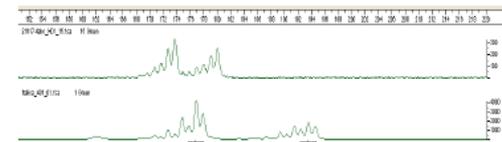
Nombre de répétitions



Longueur du fragment



Ha11 (20)
Ha11 (23)



- marqueurs codominants -> 2 allèles par individu
- polymorphisme très élevé, multiallélique
- régions flanquantes très conservées

Le génotypage

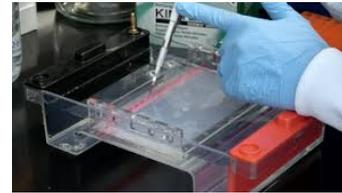


Extraction d'ADN

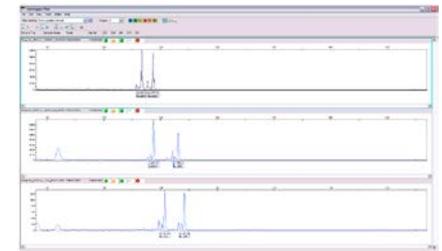
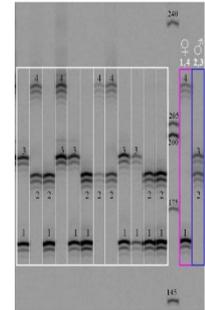
- Broyage
- Lyse
- Précipitation des protéines
- Précipitation ADN + lavage
- Elution ADN



Amplification PCR



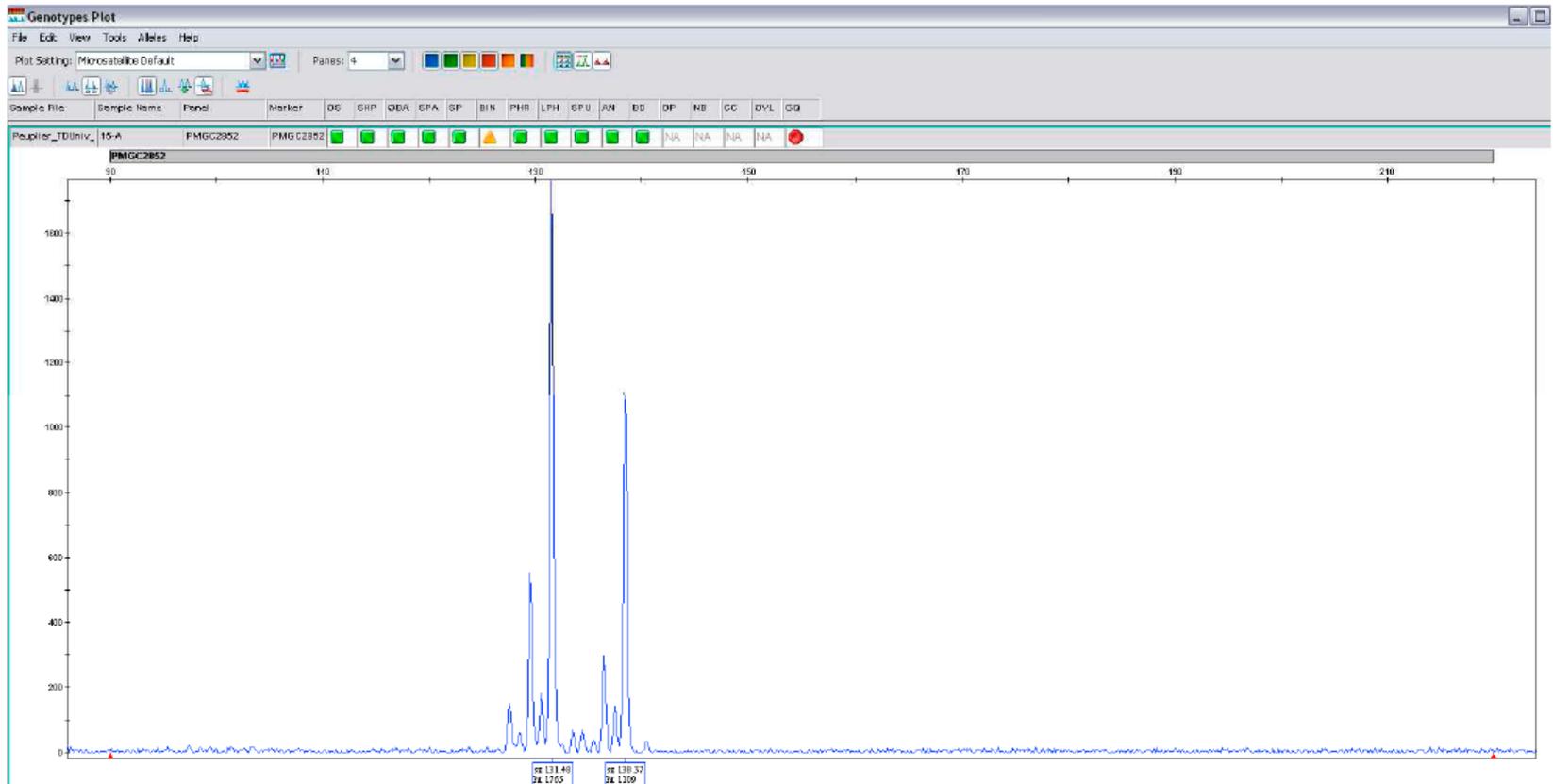
Electrophorèse



Lecture / interprétation

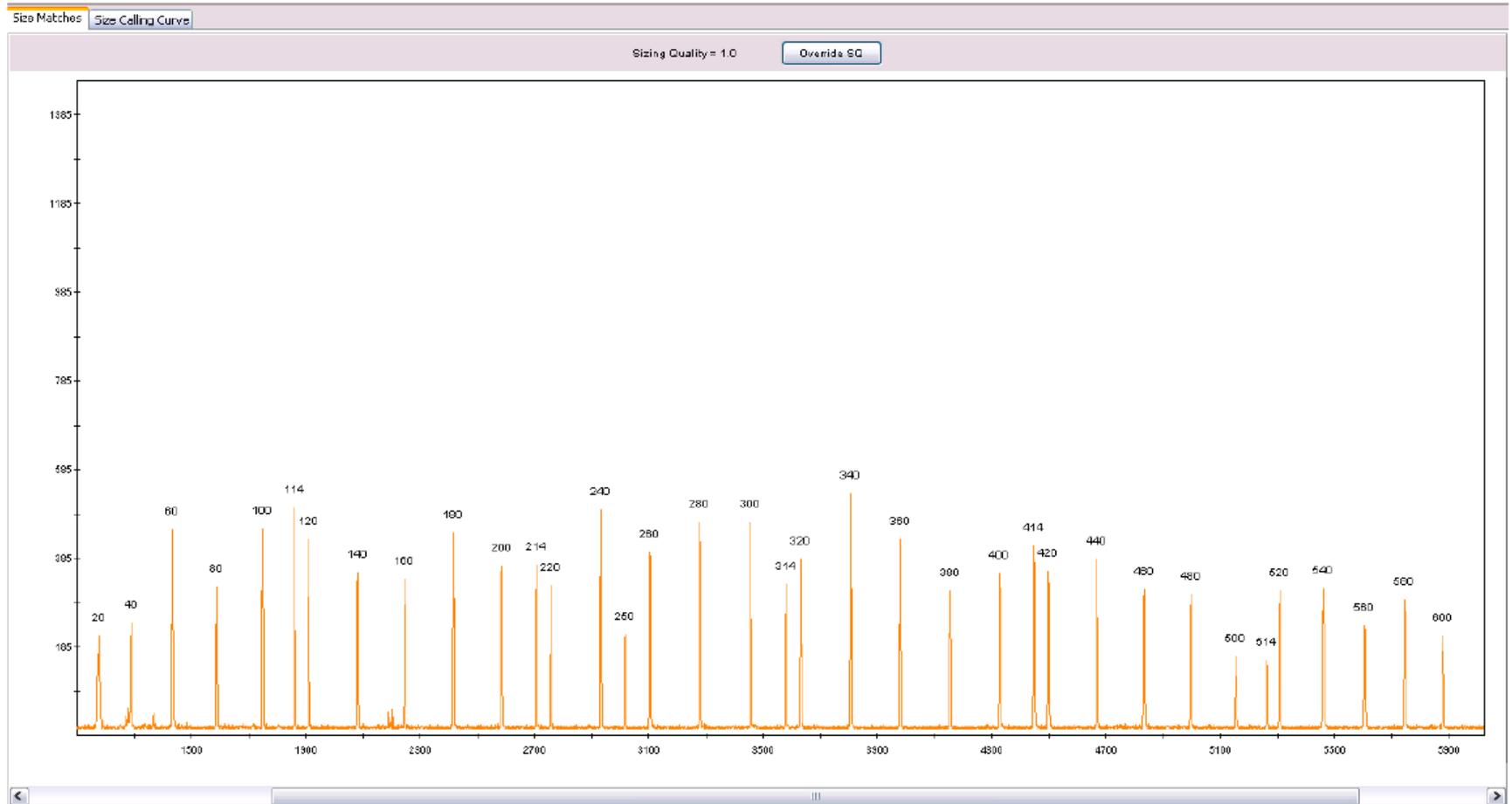
Lecture

Chromatogramme pour un individu x un marqueur (hétérozygote)



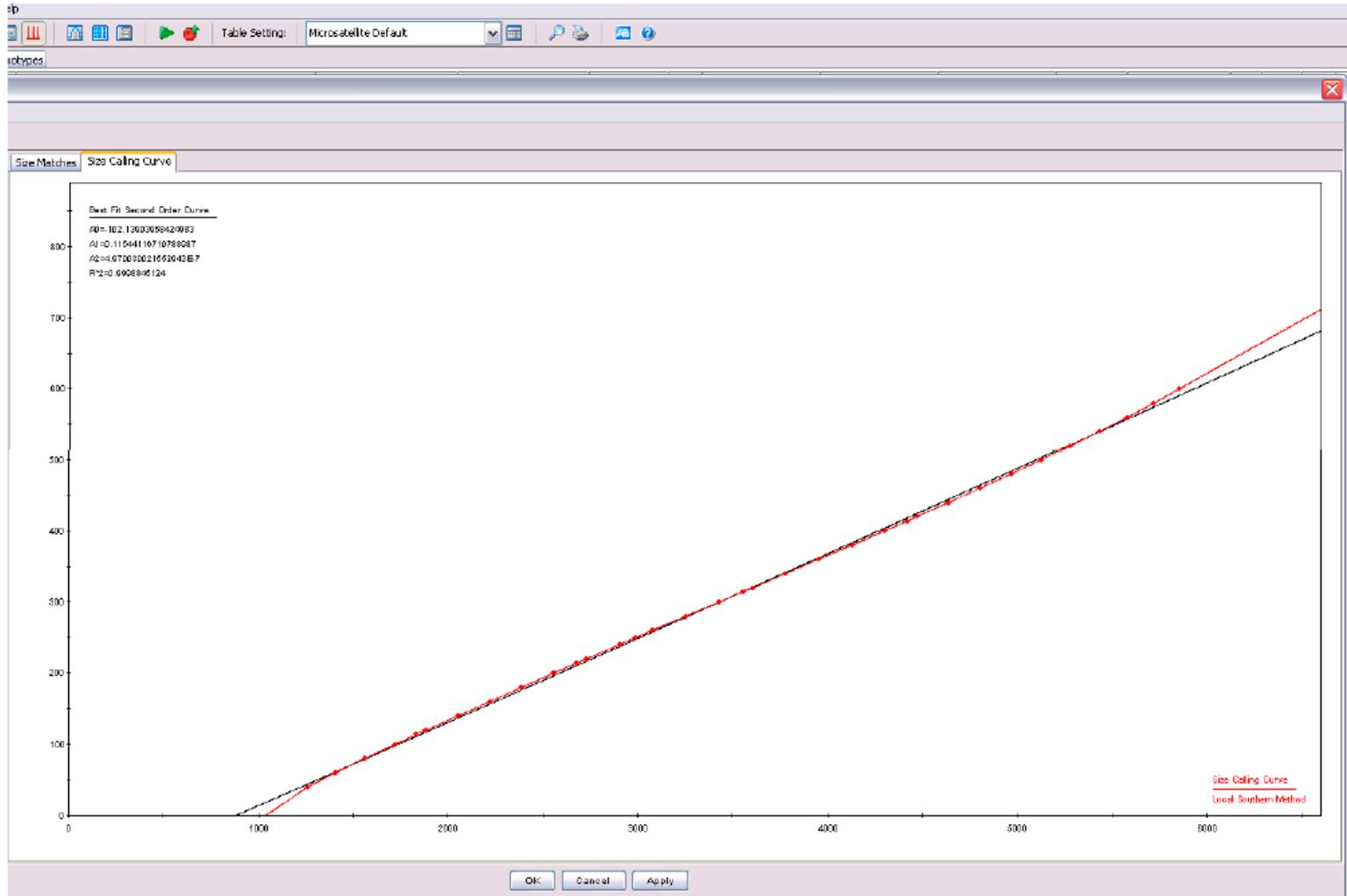
Lecture

Marqueur de taille



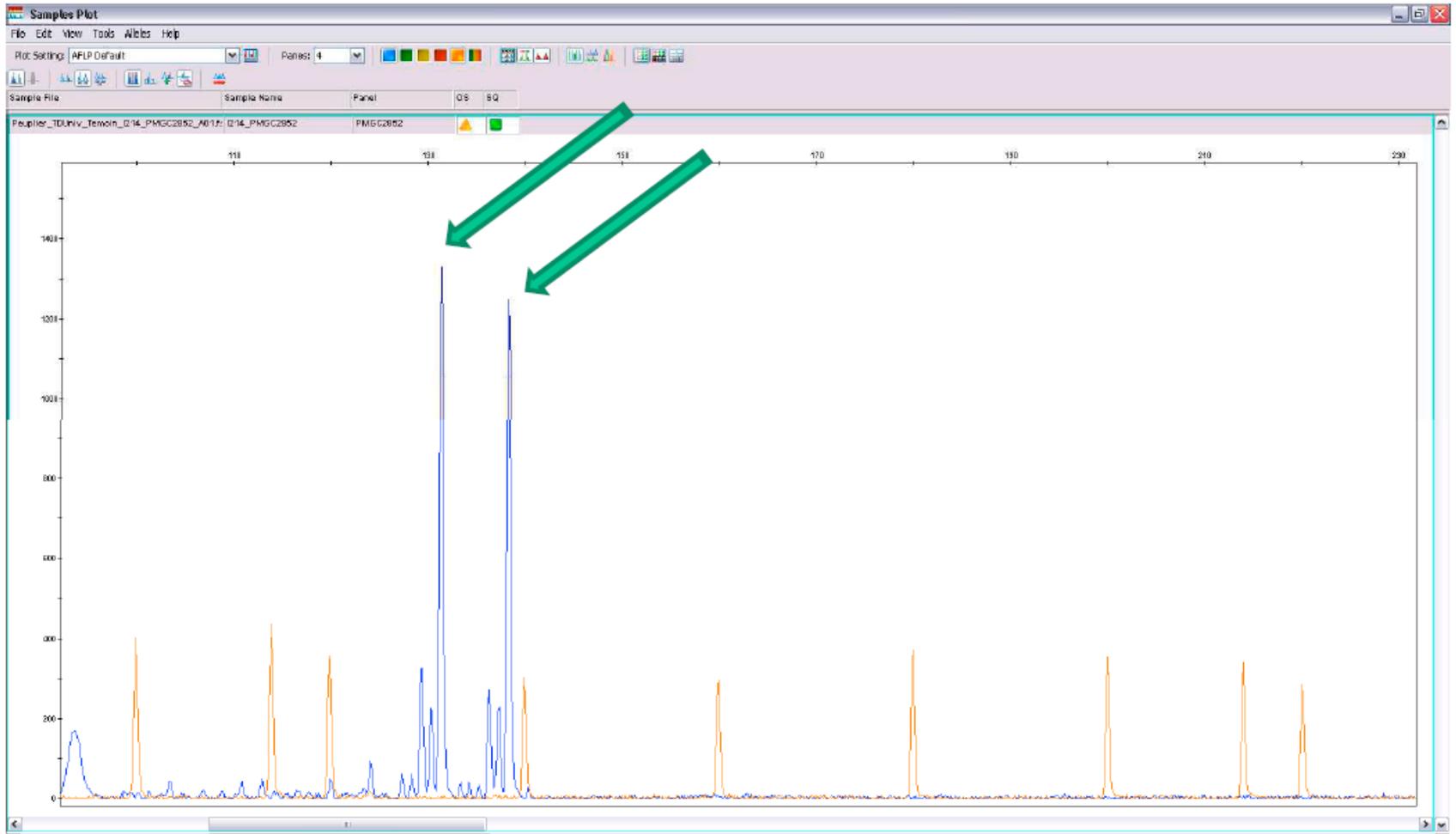
Lecture

Marqueur de taille => calibration entre le temps de migration (injection) et la taille en pb



Lecture

Taille estimée des fragments : valeurs avec décimales



Lecture

Valeurs d'allèles pour 3 individus



SOMMAIRE

❖ Introduction :

- qu'est-ce qu'un marqueur moléculaire ?
- Exemples d'utilisations

❖ Rappel de quelques notions

❖ Aspects techniques

❖ Exercice

Les peupliers (*Populus* spp.)

6 sections et 29 espèces



Populus nigra L.



Populus alba L.



Populus tremula L.



Populus trichocarpa Torr. & A. Gray

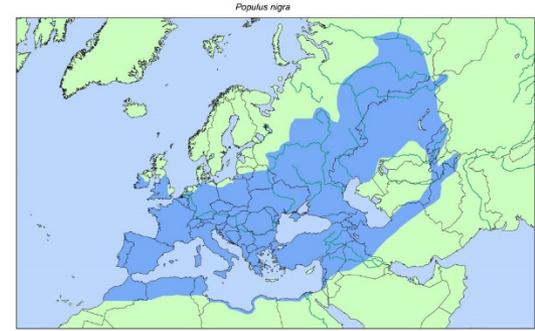


Populus deltoides Bartr. ex Marsh.

Le peuplier noir (*Populus nigra* L.)



Une espèce ligneuse
majeure des ripisylves
européennes

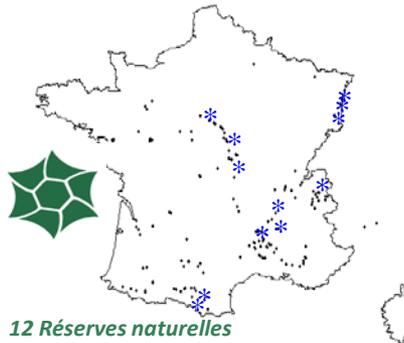


Espèce dioïque à pollinisation
anémothile

dont la **régénération naturelle** est
menacée par la régularisation des
dynamiques fluviales



Conservation *In situ*



qui fait l'objet d'un programme de **conservation de
ressources génétiques** (soutien DGFAR) coordonné au
niveau européen (EUFORGEN)

Le peuplier noir (*Populus nigra* L.)

Wind pollinated dioecious species

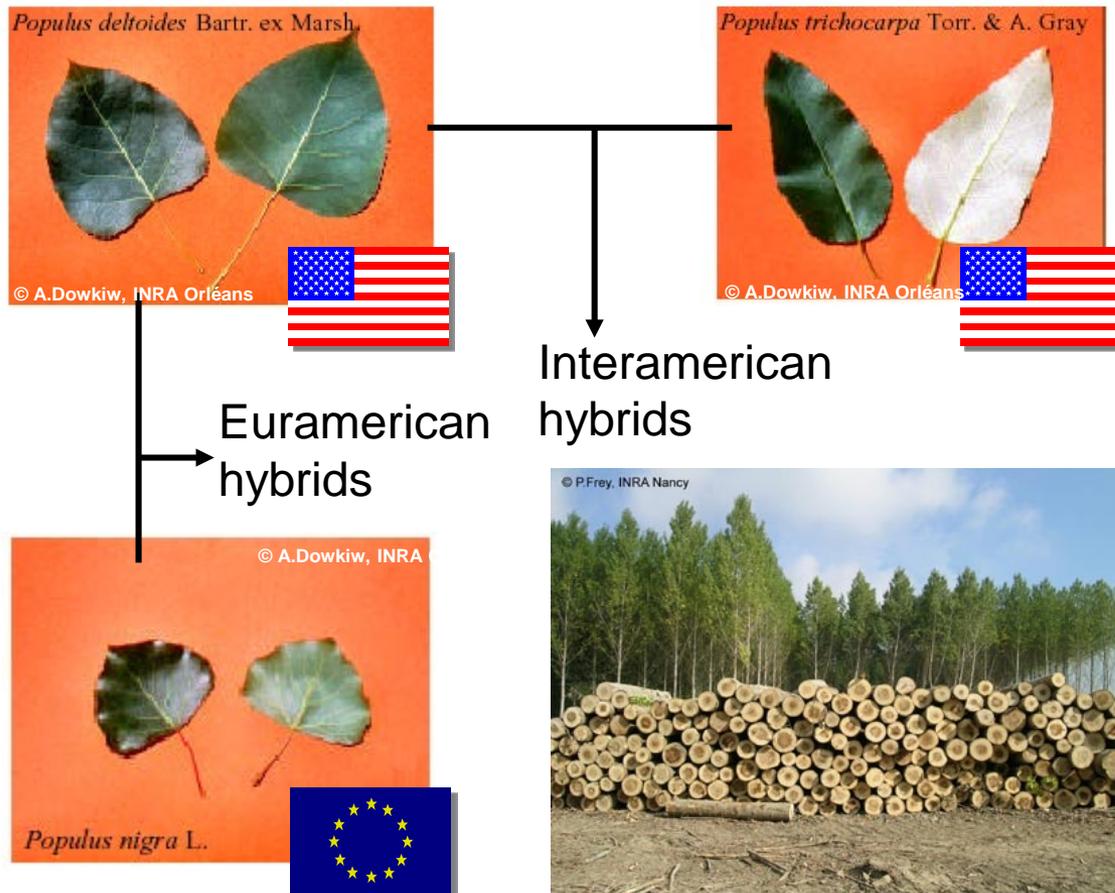


Pl. 305. Peuplier noir. *Populus nigra* L.



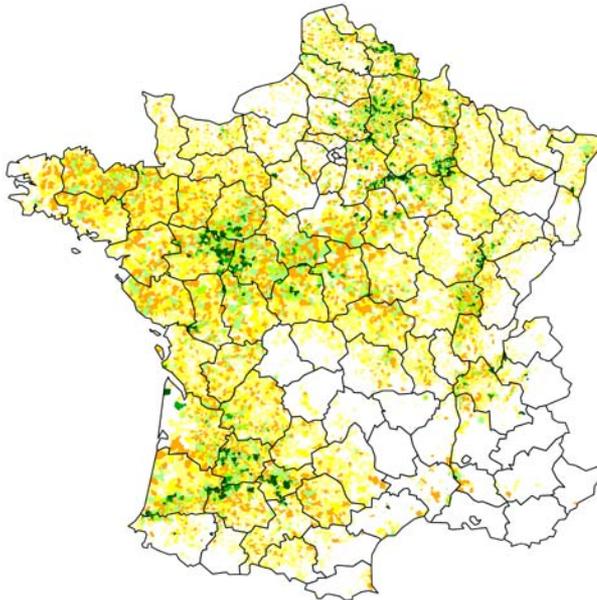
Les peupliers

Les peupliers cultivés sont des hybrides interspécifiques

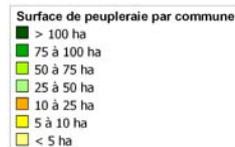


Les peupliers

La populiculture en France, quelques statistiques



Source cadastre 2003



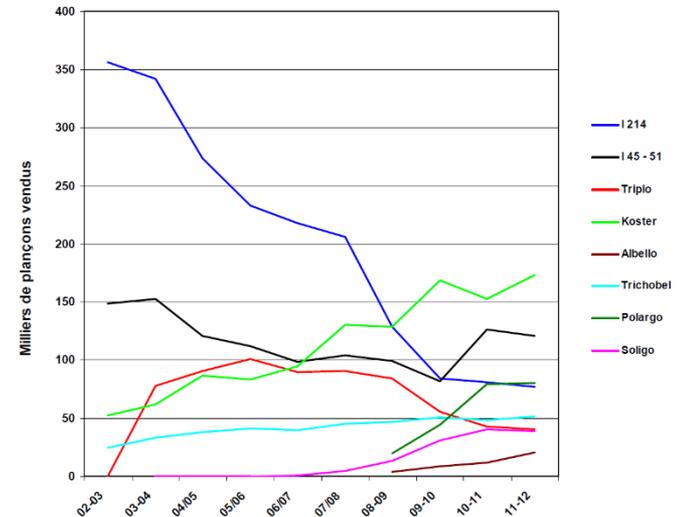
Les grandes régions populicoles:

Nouvelle-Aquitaine /

Hauts-de-France /

Grand-Est / Centre /

Pays-de-la-Loire



(note de service DGPAAT/SDFB/N2013-3028)

- **Ventes : 500 000 plançons/an**
 - **236 000 ha plantés**
 - **1.422.523 m³**
(chiffres CIP 2008)

Les peupliers

Utilisations



Déroutage Emballage léger	Déroutage Contreplaqué	Déroutage Exportation	Sciage Palettes	Sciage Caisserie, litterie	Volume total
32,0 %	7,9 %	24,4 %	24,7 %	11,0 %	1.422.553 m ³

Pâte à papier, bois-énergie ... <http://www.peupliersdefrance.org>



Charpente en peuplier massif de la Salle Polyvalente de Lezennes (59). ARCHITECTE : LAURENT BAILLET, BET : INGÉBOIS STRUCTURES, ENTREPRISE BOIS : AS BOIS

Arbre modèle pour la génomique

➤ **Modèle d'étude** pour de nombreuses raisons :

- croissance rapide
- polymorphisme génétique important
- hybridations interspécifiques possibles
- physiologie moléculaire bien caractérisée
- transformation génétique 'maîtrisée'

➤ **Génome de 480 Mpb ($2n = 38$) séquencé** (Tuskan *et al.* 2006)



Données à analyser

- 5 Parents potentiels (+ 3 témoins)
 - 12 échantillons récoltés sur deux copies de descendants
- X 3 marqueurs microsatellites

Questions

- Valeurs manquantes ? Où ? Pourquoi ?
- Attribuer les valeurs d'allèles (voir tableau dia suivante)
- Identifier les clones. Combien et quels sont les marqueurs qui permettent de mieux distinguer les individus ?
- Rechercher les parentés

Données à analyser

- 5 Parents potentiels (+ 3 témoins)

Espèce	Parent	Marqueur	Taille 1	Taille 2	Taille 3	Marqueur	Taille 1	Taille 2	Taille 3	Marqueur	Taille 1	Taille 2	Taille 3
P. deltoïdes	73028-62	PMGC2879	154	158		PMGC2858	104	108		PMGC2852	155	161	
P. deltoïdes	L155-079	PMGC2879	138	166		PMGC2858	88	116		PMGC2852	132	142	
P. deltoïdes	TNS06-042	PMGC2879	144	164		PMGC2858	94	114		PMGC2852	134	198	
P. nigra	BDG	PMGC2879	166	178		PMGC2858	112	116		PMGC2852	129	168	
P. nigra	92510-1	PMGC2879	180	182		PMGC2858	116	116		PMGC2852	123	127	
P. delto x P. nigra	Triplo	PMGC2879	156	162	178	PMGC2858	106	112		PMGC2852	125	138	167
P. delto x P. nigra	Dorskamp	PMGC2879	166	182		PMGC2858	116	116		PMGC2852	127	136	
P. delto x P. nigra	I-214	PMGC2879	144	184		PMGC2858	94	118		PMGC2852	131	138	

Données à analyser

- 12 échantillons récoltés sur deux copies de descendants

Espèce	Nom du clone	Marqueur	Taille 1	Taille 2	Taille 3	Marqueur	Taille 1	Taille 2	Taille 3	Marqueur	Taille 1	Taille 2	Taille 3
Descendant	661200552_1	PMGC2879	138.59	177.77		PMGC2858	88.13	112.66		PMGC2852	142.39	168.50	
Descendant	661200552_2	PMGC2879	138.42	166.33		PMGC2858	112.12	116.21		PMGC2852	129.12	142.27	
Descendant	661200621_1	PMGC2879	138.45	181.72		PMGC2858	88.11	114.52		PMGC2852	122.99	132.06	
Descendant	661200621_2	PMGC2879	138.50	181.77		PMGC2858	88.02	114.38		PMGC2852	123.11	132.13	
Descendant	661200723_1	PMGC2879	163.88	165.95		PMGC2858	114.08	115.99		PMGC2852	129.01	134.03	
Descendant	661200723_2	PMGC2879	163.92	165.99		PMGC2858	114.16	116.39		PMGC2852	129.52	134.22	
Descendant	661200813_1	PMGC2879	166.33	182.05		PMGC2858	116.21			PMGC2852	0		
Descendant	661200813_2	PMGC2879	0			PMGC2858	0			PMGC2852	0		
Descendant	661200538_1	PMGC2879	166.41			PMGC2858	116.64			PMGC2852	129.49	132.18	
Descendant	661200538_2	PMGC2879	166.06			PMGC2858	116.71			PMGC2852	129.49	132.25	
Descendant	661200090_1	PMGC2879	154.45	181.78		PMGC2858	104.47	116.72		PMGC2852	123.42	161.10	
Descendant	661200090_2	PMGC2879	154.23	181.53		PMGC2858	104.47	116.79		PMGC2852	123.58	160.97	

Tableau d'attribution des allèles

Données obtenues grâce au génotypage de plus de 500 clones de peuplier

PMGC2879			PMGC2858			PMGC2852		
Allèle	Gamme	fréquence %	Allèle	Gamme	fréquence %	Allèle	Gamme	fréquence %
138	138.12 - 138.72	2.3	86	85.65 - 86.12	1.6	123	122.94 - 123.61	0.6
144	143.86 - 144.51	5.8	88	87.74 - 88.28	4.2	125	124.97 - 125.63	1.4
154	153.79 - 154.58	8.9	90	89.72 - 90.06	4.9	127	126.86 - 127.42	1.3
156	155.83 - 156.56	9.6	92	91.66 - 92.15	5.7	129	128.94 - 129.61	3.2
158	157.89 - 158.47	15.8	94	93.81 - 94.25	8.4	131	130.95 - 131.67	7.4
160	159.87 - 160.50	17.8	96	95.76 - 96.34	9.6	132	131.91 - 132.40	8.4
162	161.94 - 162.57	14.3	98	97.72 - 98.31	10.3	134	133.97 - 134.5	11.8
164	163.88 - 164.58	8.2	100	99.82 - 100	12.4	136	135.88 - 136.48	35.4
166	165.92 - 166.61	6.9	102	101.70 - 102.21	9.5	138	137.94 - 138.61	12.4
178	177.58 - 178.02	3.6	104	103.78 - 104.49	8.5	140	139.42 - 140.67	6.3
180	179.50 - 180.02	1.9	106	105.85 - 106.35	6	142	141.97 - 142.53	3.7
182	181.51 - 182.08	2.5	108	107.92 - 108.53	5.9	155	154.63 - 155.32	2.8
184	183.52 - 184.02	2.4	110	109.94 - 110.55	4.6	161	160.72 - 161.40	2.7
			112	111.82 - 112.66	1.8	167	166.84 - 167.51	0.9
			114	113.92 - 114.57	3.4	168	167.98 - 168.70	0.8
			116	115.87 - 116.81	2.4	174	173.78 - 174.36	0.5
			118	117.84 - 118.51	0.8	198	197.72 - 198.30	0.4



Analyse du génome et gestion des ressources génétiques forestières
P. Faivre Rampant, E. Prado, D. Prat
2006 Ed. QUAE

