HAL open science

Génomique de la vigne et applications

Anne-Francoise Adam-Blondon, Sandrine Balzergue, Loic Le Cunff

To cite this version:

Anne-Francoise Adam-Blondon, Sandrine Balzergue, Loic Le Cunff. Génomique de la vigne et applications. M1 Vigne et Terroirs (Génomique de la vigne et applications), 2016. hal-02795207

HAL Id: hal-02795207

https://hal.inrae.fr/hal-02795207

Submitted on 5 Jun 2020

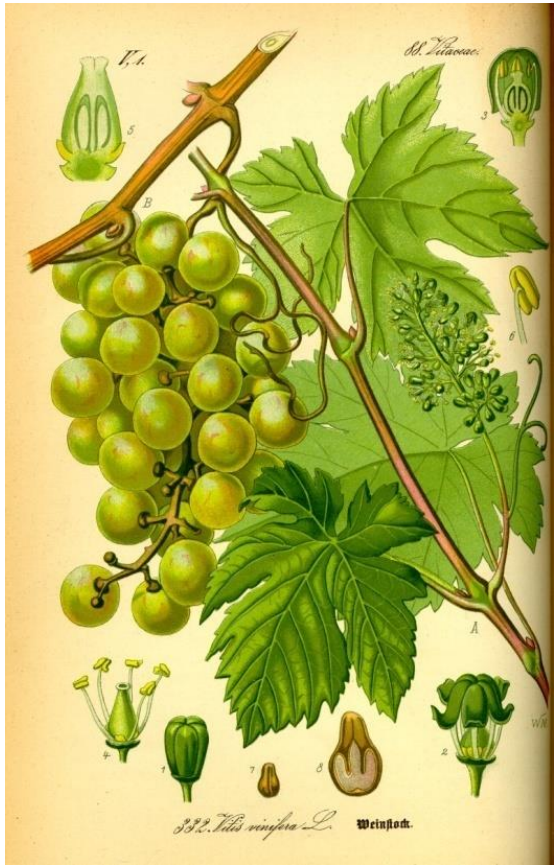
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Génomique de la vigne et applications

A-F Adam-Blondon

Unité de Recherches
Génomique-Info



Master 1 Vigne et Terroirs, Dijon, 09 mai 2016

Sandrine Balzergue, INRA, Angers
Loïc LeCunff, IFV, Montpellier

PLAN

1- GENERALITES SUR LE GENOME DE LA VIGNE

2- CARTE GENETIQUE

3- SEQUENCAGE DU GENOME DE LA VIGNE

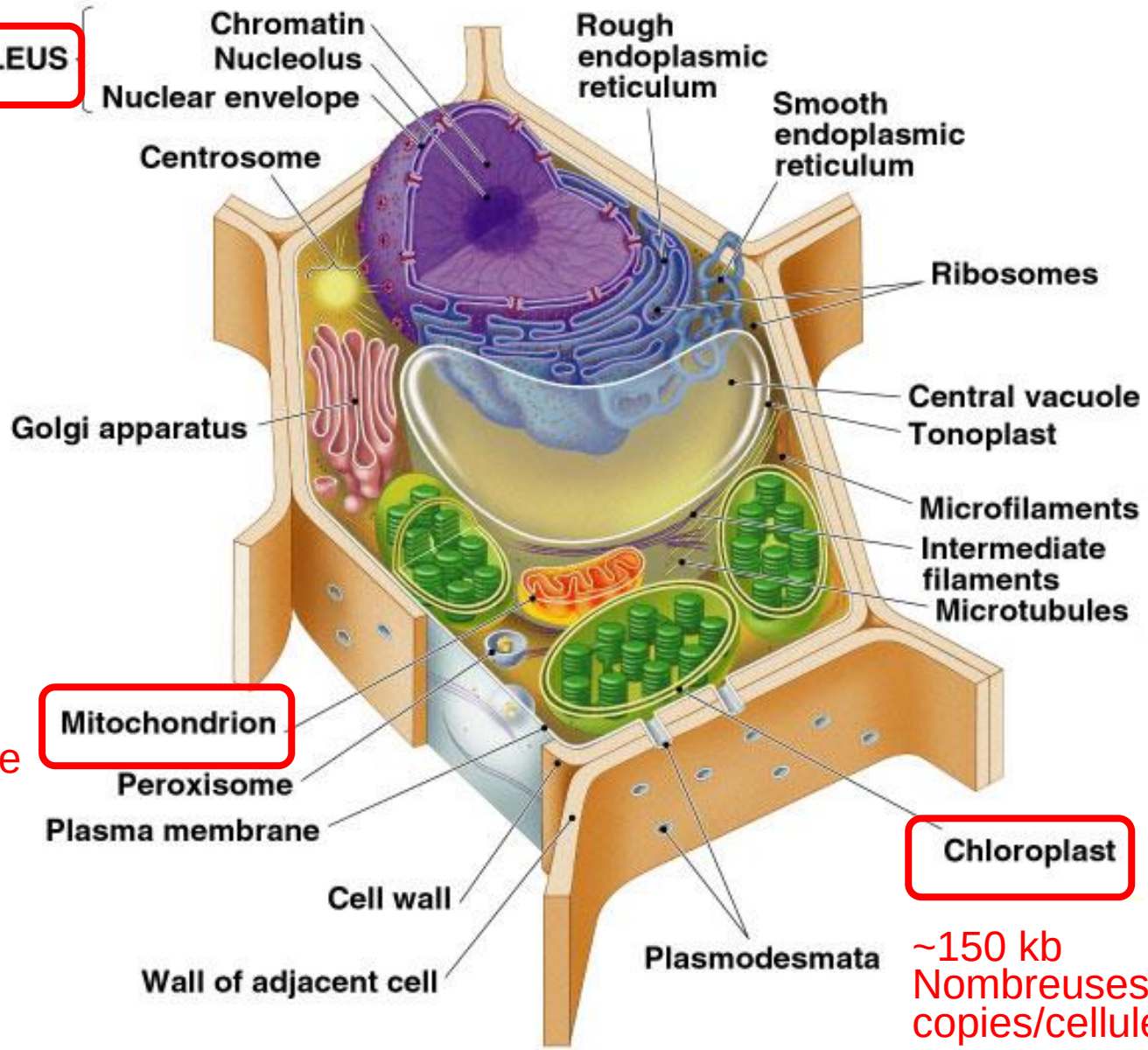
4- GENOMIQUE FONCTIONNELLE

5- CHAMPS D’APPLICATIONS

1
Généralités sur les génomes et le génome de la vigne

La cellule de vigne et l'extraction d'ADN

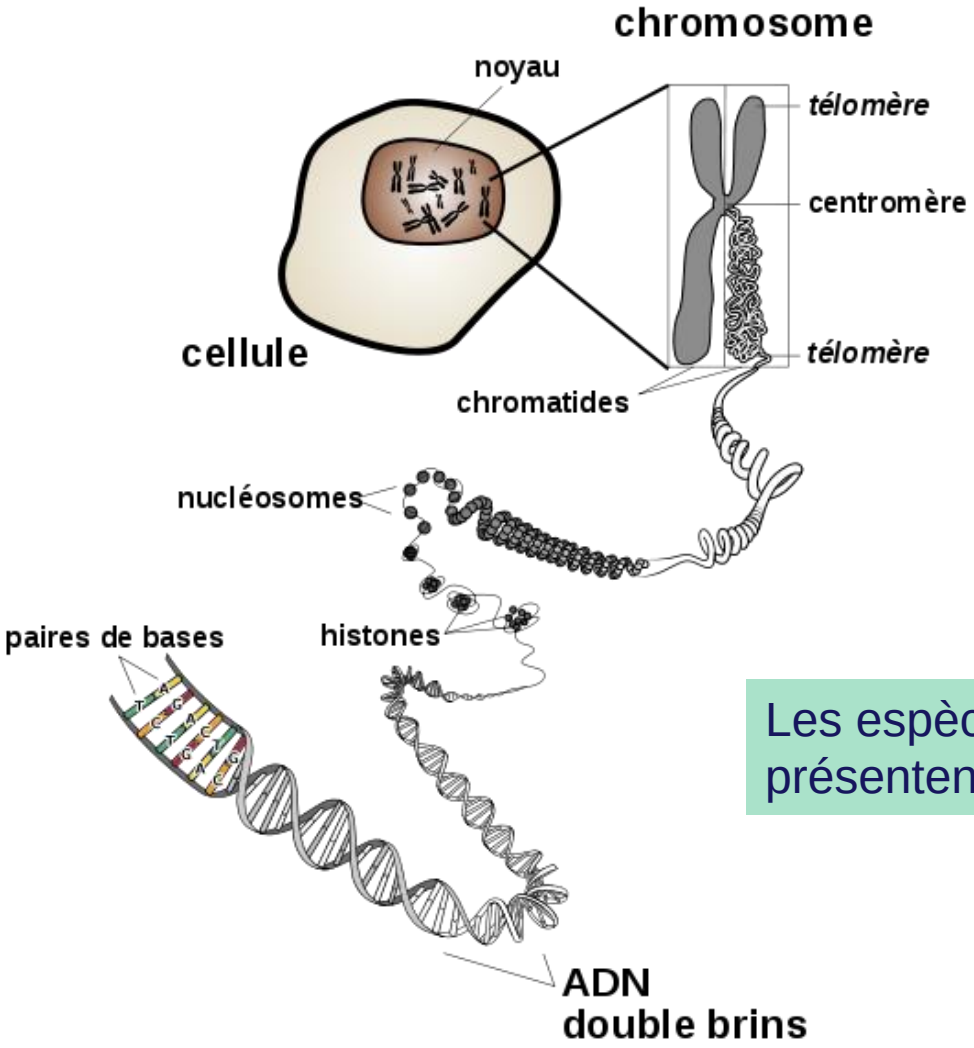
~500 Mb
2n=38

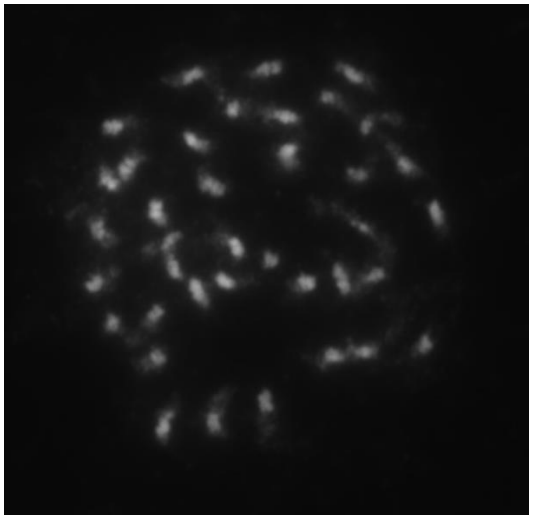


Taille?
Quelques
Copies/cellule

~150 kb
Nombreuses
copies/cellule

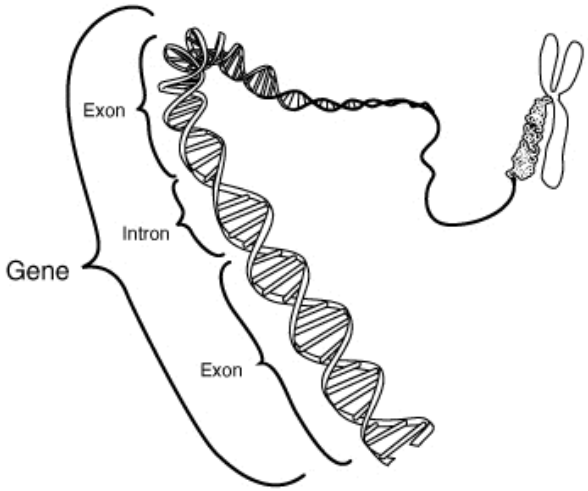
Les espèces du sous-genre *Euvitis* ont 19 paires de chromosomes

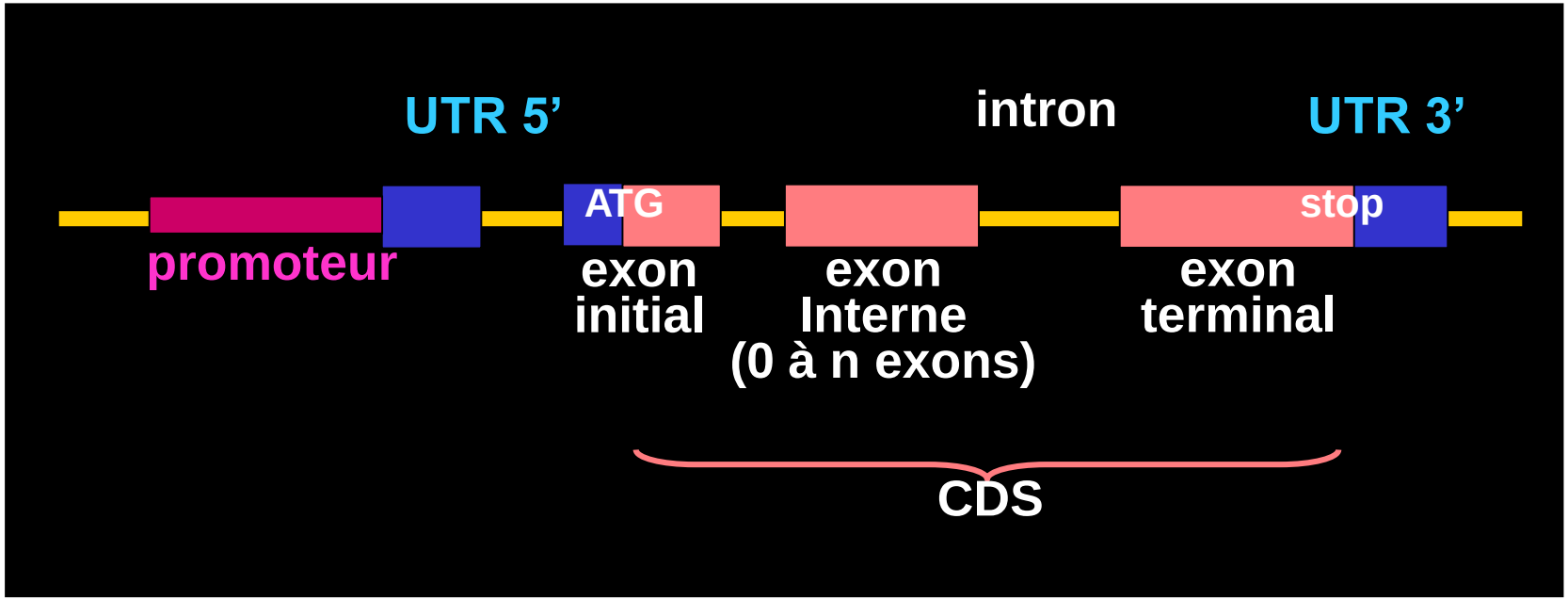




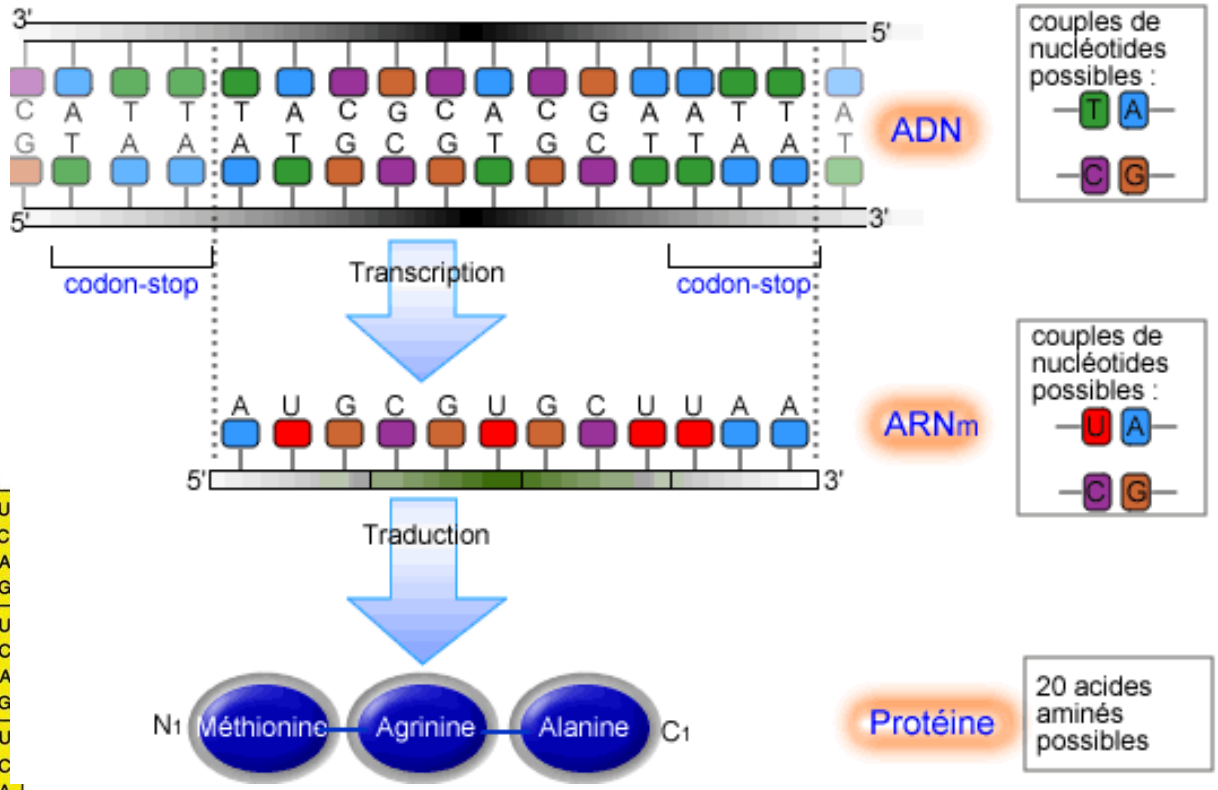
Les espèces du sous genre Muscadinia présentent 20 paires de chromosomes

Structure des gènes des Eucaryotes





De la transcription à la traduction des gènes

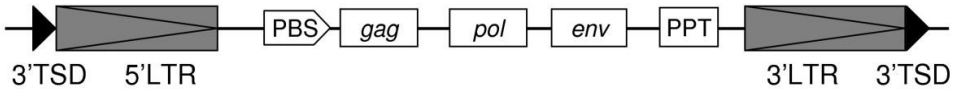


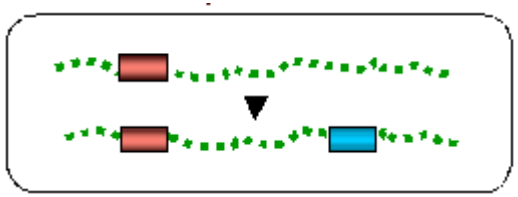
Second letter

First letter	U	C	A	G	
U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC Cys UGA Stop UGG Trp	U C A G
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg	U C A G
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg	U C A G
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly	U C A G

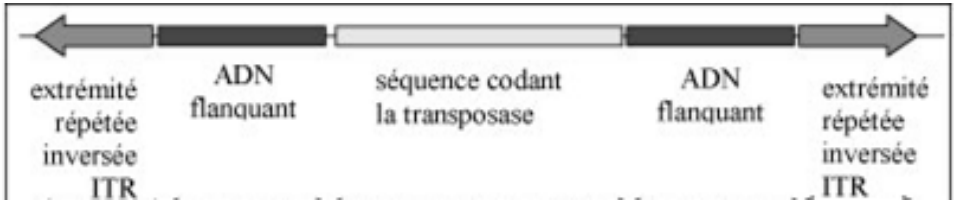
Les génomes contiennent également des séquences répétées: les éléments transposables en majorité

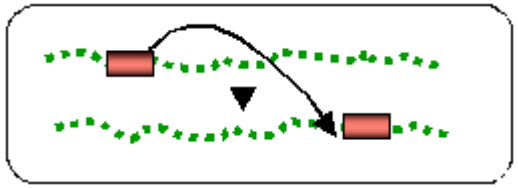
Classe I: rétro-transposons
Intermédiaire ARN/cDNA : « copier-coller »





Classe II: transposons
« Couper-Coller »

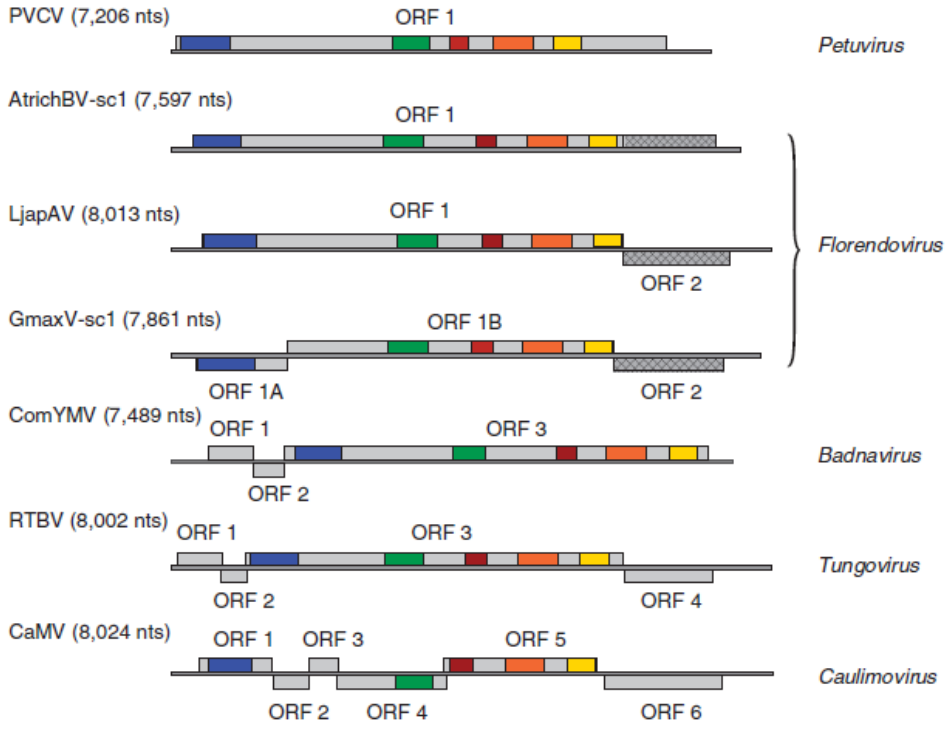




Feshotte et al (2002) Nature reviews, 3: 329-341

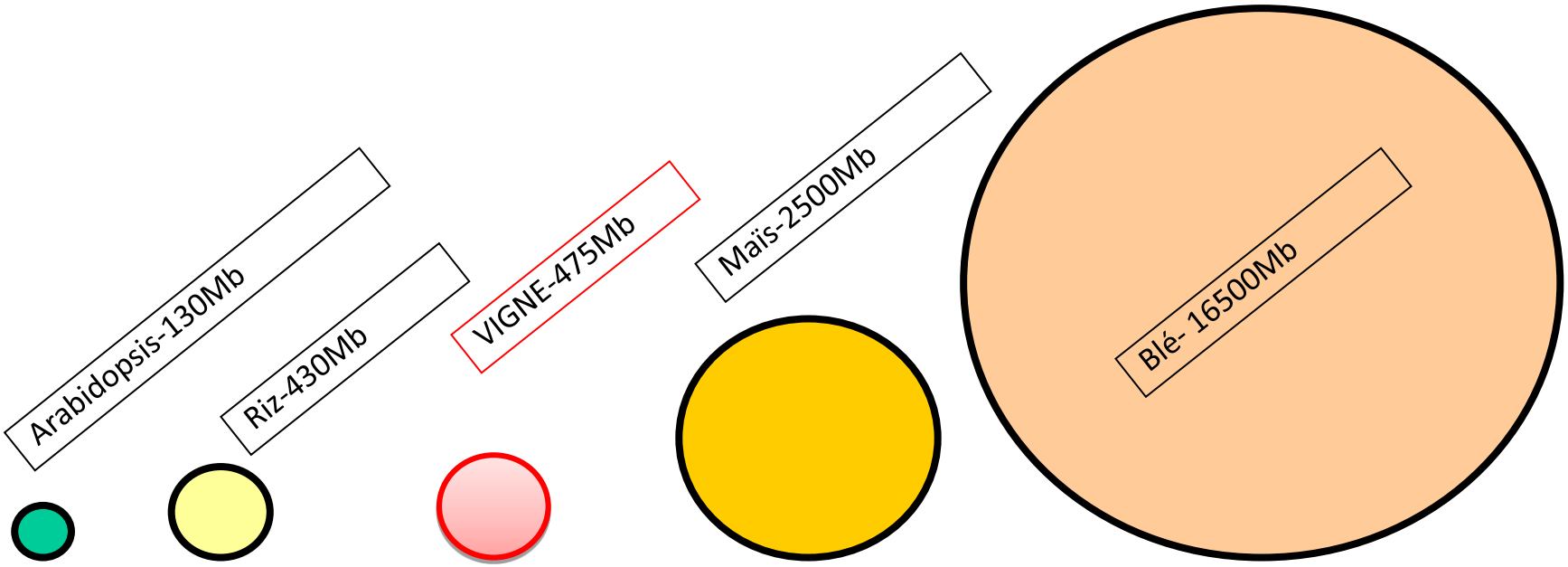
Les génomes contiennent également des séquences répétées: les virus endogènes

- Des séquences de virus sont parfois intégrées dans les génomes des eukaryotes et évoluent comme des séquences répétées (Endogeneous Virus Elements = EVE; Freschotte et Gilbert -2012- Nat Rev Genet, 13: 283-296)
- Ces séquences sont dérivés de la famille des Caulimovirus chez les plantes à fleurs et représentent environ 0.65% du génome de la vigne: Florendovirus (Geering et al -2014- Nature Comm, DOI:10.1038/ncomms6269



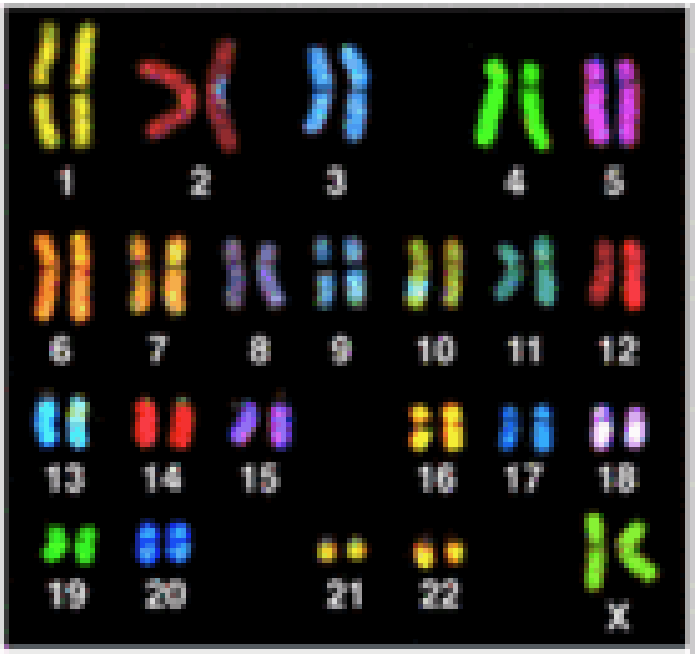
9% des Florendovirus de la vigne sont situés dans des introns => rôle dans la régulation de l'expression des gènes?

La taille des génomes de plante varie considérablement en fonction de leur quantité d'élément transposable et …



Arabidopsis-130Mb	Riz-430Mb	VIGNE-475Mb	Maïs-2500Mb	Blé- 16500Mb
5 paires de chr.	12 paires de chr.	19 paires de chr.	10 paires de chr.	21 paires de chr.
~30 000 Gènes 20% seq Répétées	~37 300 Gènes	~30 000 Gènes 40% de séquences répétées	~45 000 Gènes 85% de séquences répétées	~40 000-50 000 Gènes 90% de séquences répétées

…de leur niveau de ploïdie



Le nombre de chromosomes portant la même information génétique dans une cellule varie en fonction de l'espèce étudiée. Chez la vigne, l'humain, le chien, le chat etc. il est de 2: ces espèces sont dites diploïdes.

Lorsqu'il est supérieur à 2 comme chez la canne à sucre, l'igname ou le blé, ces espèces sont dites polyploïdes

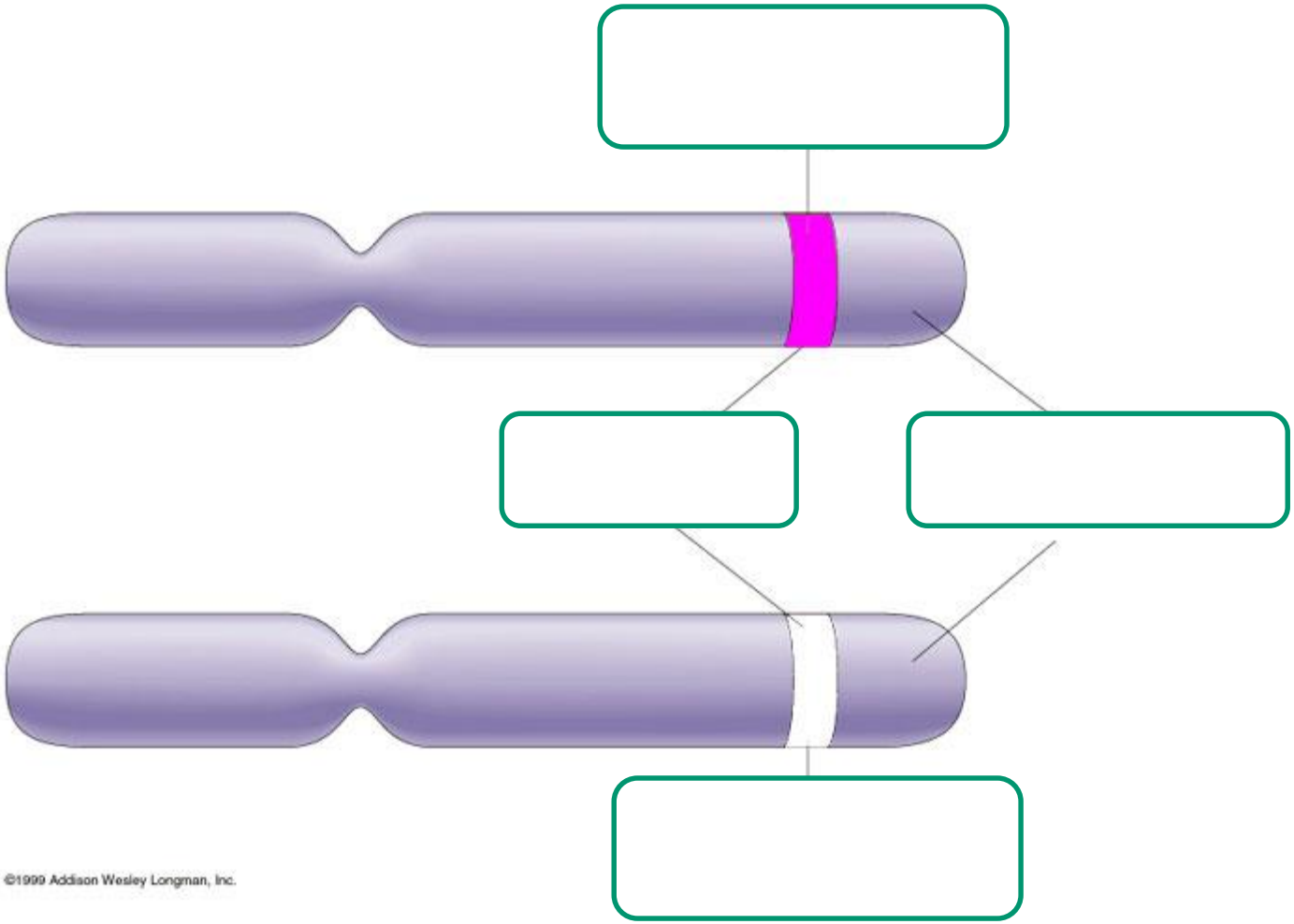
La vigne a un génome de petite taille et diploïde => favorable à des approches génomiques

La génomique

- Etude de la structure, du polymorphisme et du fonctionnement des génomes avec des approches globales
- Notion de haut débit du point de vue technologique
- Importance de l’informatique et de la bio-informatique
- Importance des statistiques

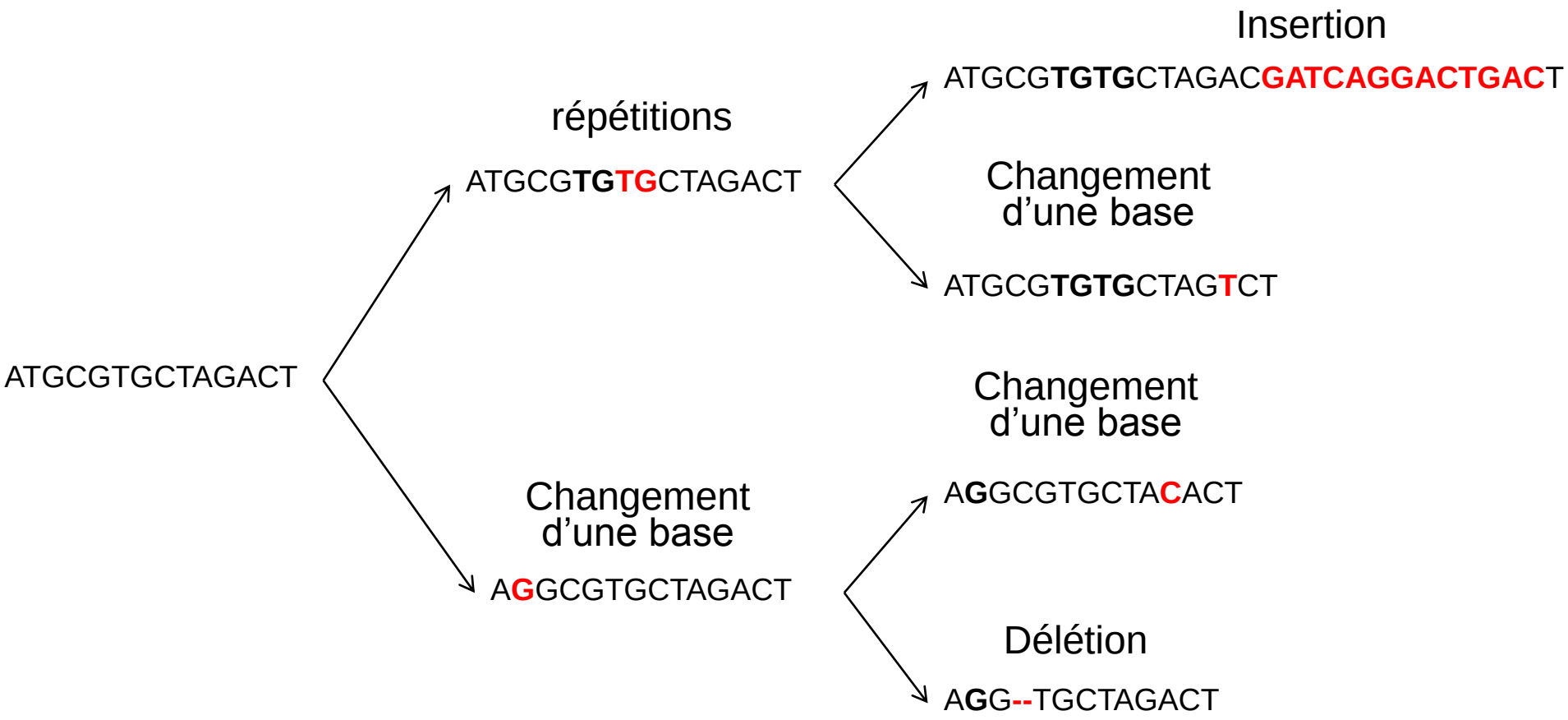
2
Les cartes génétiques

La vigne a un génome très hétérozygote



Replacez les termes : Locus, Allèle, homozygote, hétérozygote

Les différents types de polymorphisme de séquence observables à un locus donné

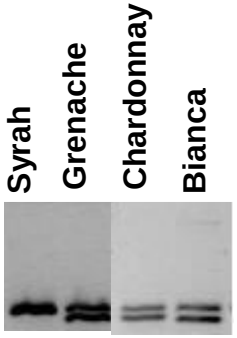


Le polymorphisme de séquence et les marqueurs génétiques

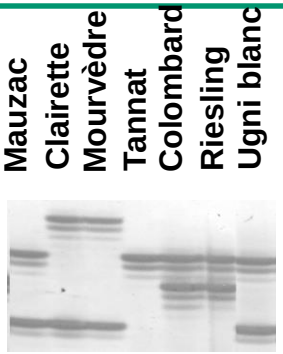
A

ATACGATTTTATAAT**AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG**ATGTGGGATGTG

B



Marqueur SC8_0108_086



Marqueur VVMD5

Quel type de séquence est représenté en encadré A?

Qu’est ce qui est représenté en encadré B?

Y-a-t-il une variété homozygote/hétérozygote?

Utilisation de ce type de marqueurs?

Autres types de marqueurs?

Les marqueurs moléculaires

- Dominant ou co-dominants
- Locus spécifiques ou non

- **Marqueurs codominants spécifiques:** Microsatellites, SNP
- **Marqueurs dominants non locus spécifiques:** AFLP, M-SAP, S-SAP

<u>Microsatellites : variation du nombre de répétitions du motif</u>

individu 1: GGTGGTGGTTC => $(TGG)_2$

individu 2 : GGTGGTTC => $(TGG)_1$

individu 3 : GGTGGTGGTGGTTC => $(TGG)_3$

<u>Polymorphisme Nucléotidique Simple (SNP)</u>

individu 1: GGATCTTC

individu 2 : GGATATTC

Les marqueurs microsatellites vs SNP

Microsatellites

Avantages :

Séquences très polymorphes
Co-dominants
Couverture intéressante du génome
Manipulables par PCR
Automatisables
Haut débit

Inconvénients:

Développement spécifique obligatoire
Séquences non codantes/marqueurs neutres

SNP

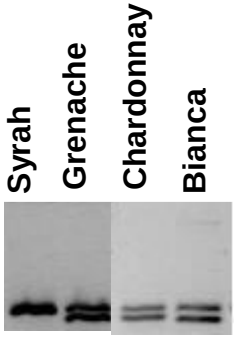
Avantages :

Extrêmement fréquents
Très bien répartis sur le génome
Co-dominants
Manipulables par PCR
Automatisables
Très haut débit

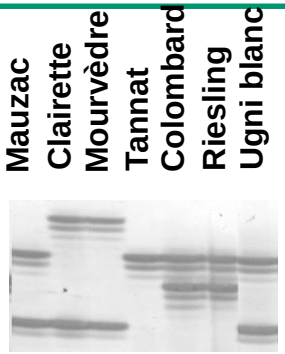
Inconvénients:

Développement spécifique obligatoire
Limité à 4 (2) allèles par locus

Polymorphisme dans les ressources génétiques vigne



Marqueur SC8_0108_086



Marqueur VVMD5

Espèces du genre *Vitis*: *V. riparia, V. rupestris… Muscadinia rotundifolia*

Portabilité, allèles spécifiques des espèces

SNP: 2% de marqueurs transférables =>travail avec des « bouquets » de marqueurs très proches

***Vitis vinifera* cultivés *Vitis vinifera sylvestris* (lambrusques)**

Hétérozygotie et variation allélique importantes

SNP: probablement plusieurs dizaines

Collections de clones des principales variétés de *Vitis vinifera*

Variation allélique très faible

Pas le mécanisme principal de variation clonale

Vezzulli et al 2008; Carrier et al PLOS One2012

Impact d'une mutation / polymorphisme

ADN muté

mutation silencieuse

mutation fonctionnelle

↓

Conséquence fonctionnelle

Substitution d'un nucléotide dans le gène *vvGAI* => changement d'une Leucine en Histidine

Grapevine

I II

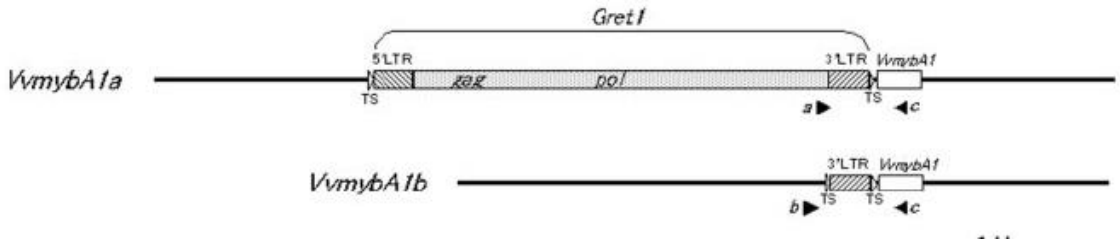
VvGAI1 AGMDELLAVLGYNVKASDMAEVAQKLEQLEEVIVNAQEDGLSHLASETVHYNPSDLSNWLGSMLS

Vvgai1 AGMDELHAVLGYNVKASDMAEVAQKLEQLEEVIVNAQEDGLSHLASETVHYNPSDLSNWLGSMLS

Boss et Thomas, Nature, 2002

Impact d'une mutation / polymorphisme

Gène Myb impliqué dans la variation « on/off » de la couleur de la baie

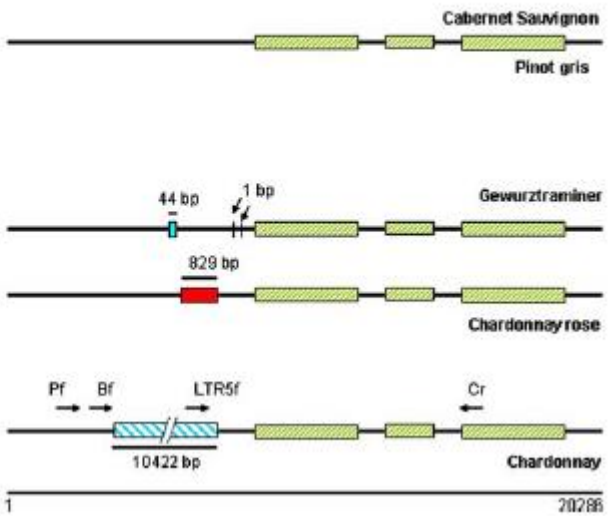


Kobayashi et al , Science, 2004

Walker et al, Plant J, 2007

Dans une collection de 141 variétés de vignes la présence de couleur est toujours associée à l'absence d'un rétrotransposon dans le promoteur du gène *VvMybA1*

Gret1 absent	*Gret1* présent	*total*	
65	0	65	Noir
14	0	14	Gris
17	0	17	Rouge
18	0	18	Rose
3	81	84	Blanc



This et al, TAG, 2007

Recherche d'associations entre le polymorphisme d'ADN et des variations de caractères d'intérêt

Objectifs:

•Disposer de marqueurs prédictifs du phénotype

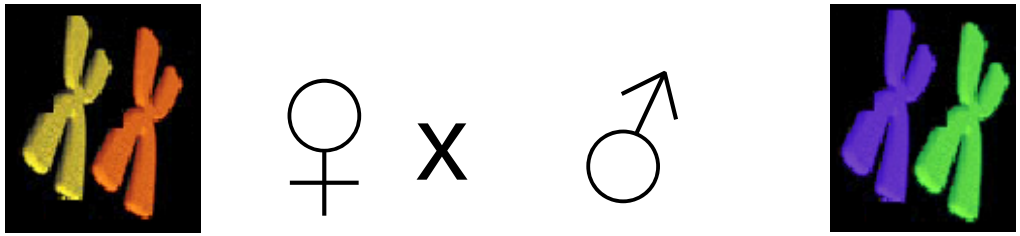
•Identification des polymorphismes responsables de la variation du phénotype => compréhension des mécanismes moléculaires et physiologiques

Approches *de novo*:

•Cartographie génétique

•Génétique d'association

Utilisation des marqueurs moléculaires pour l'établissement de cartes génétiques



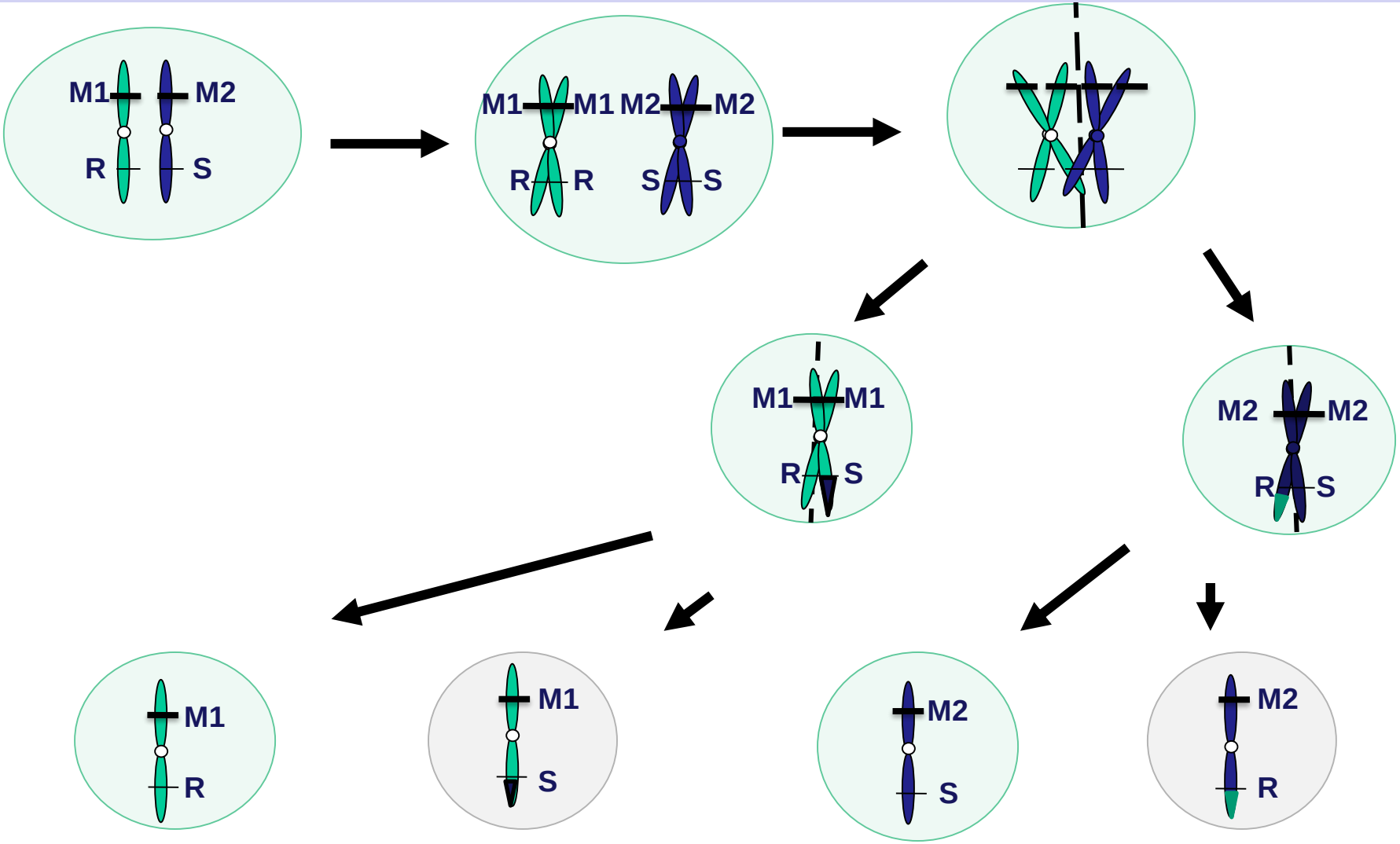
Gamètes femelles \ Gamètes mâles		

Chez les espèces hétérozygotes on travaille en général avec des familles « pleins-frères »

Ségrégation des allèles chez la mère et chez le père

Que peut-il se passer dans le cas d'autofécondations?

Les cartes génétiques sont basées sur l'observation de la ségrégation de marqueurs/caractères polymorphes dans des descendances



Distance génétique entre deux marqueurs = taux de recombinaison « r »

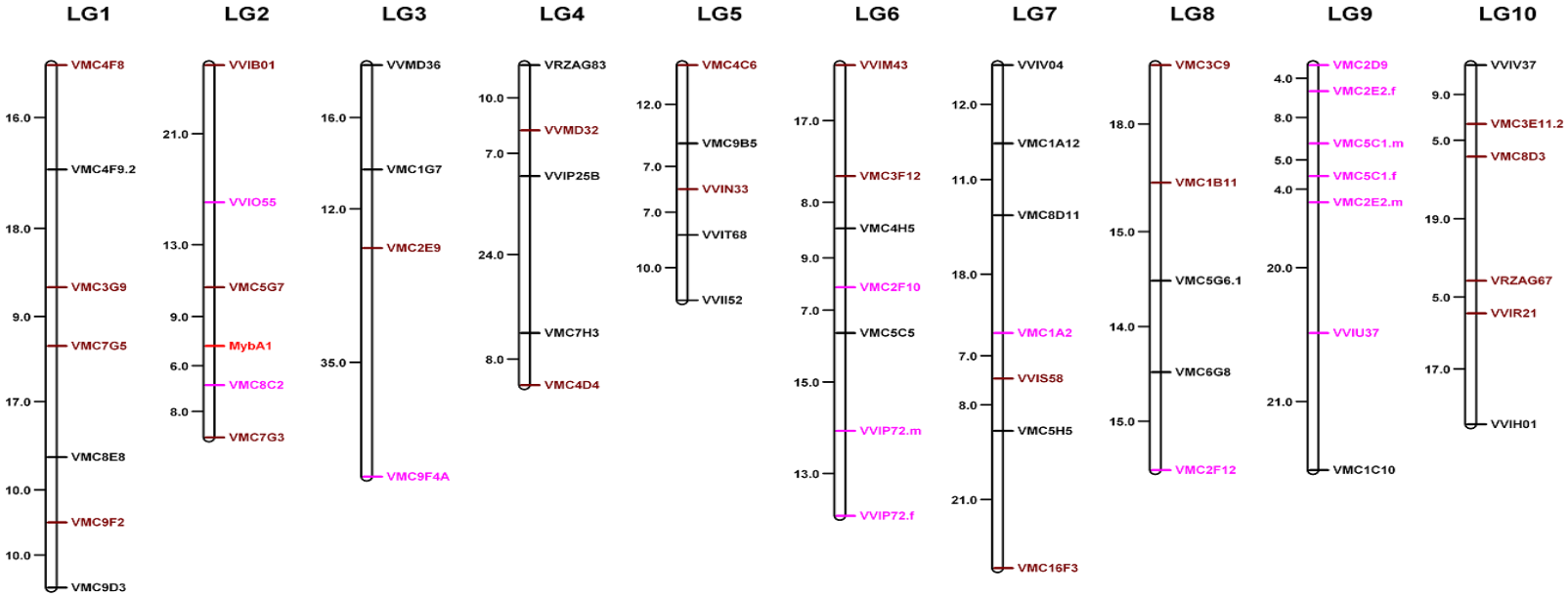
$$r = \frac{\text{Nombre de gamètes recombinants}}{\text{Nombre de gamètes totaux}}$$

$0 < r < 0{,}5$

locus complètement liés: $r = 0$ locus indépendants: $r = 0{,}5$

Plus les marqueurs physiquement éloignés, plus la probabilité d'occurrence d'une recombinaison entre eux est grande => distance élevée

Carte génétique

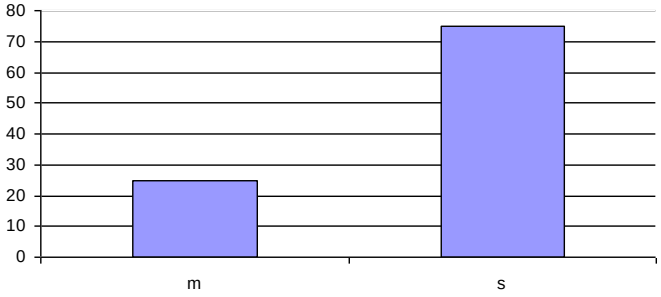


Croisement Syrah X Grenache

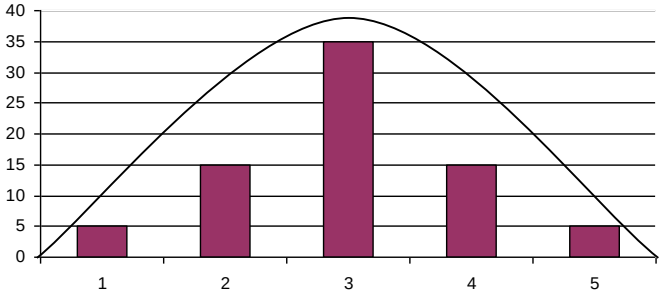
191 individus
Carte génétique ~1500 cM

Localisation des région des génomes impliqués dans la variation de caractères agronomiques par cartographie génétique

Caractère qualitatif



Caractère quantitatif



Localisation d'une région du génome impliquée dans la variation d'un caractère (Quantitative Trait Loci ou QTL):

•pour chaque marqueur de la carte comparaison de la moyenne au caractère des individus portant l'allèle A et de ceux portant l'allèle B

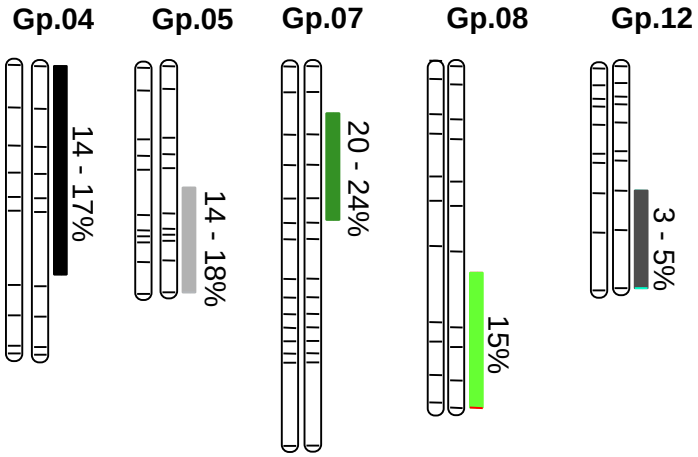
•Si les moyennes sont significativement différentes, le locus est dans une région qui contrôle le caractère

Cartographie génétique: première approche génomique pour faire le lien entre le génotype et le phénotype

génotype → phénotype

Expression des gènes

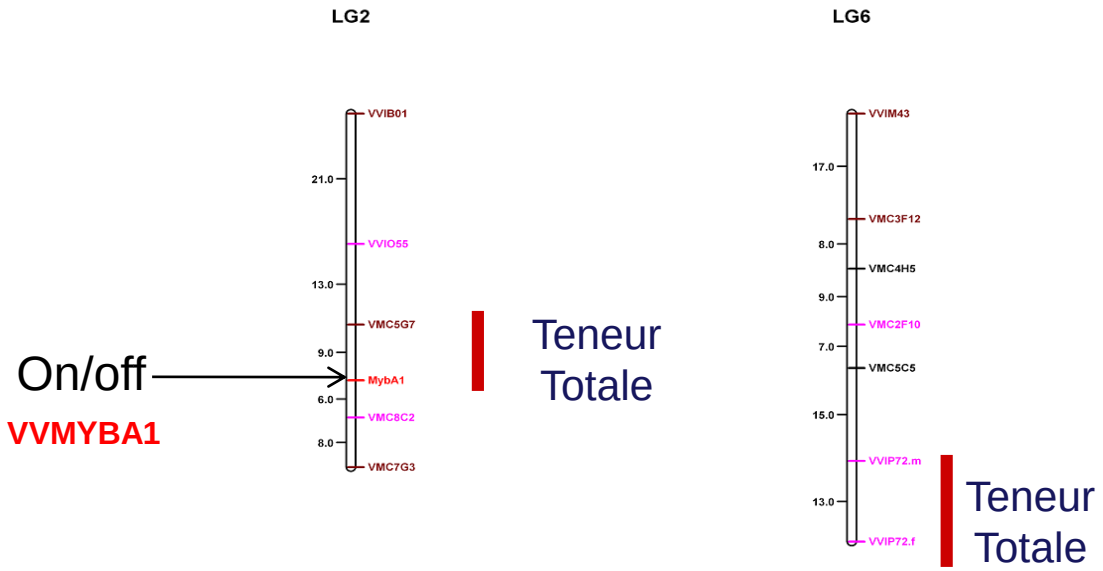
Environnement



Longueur de la grappe, Compacité, Poids baie
Nombre de baies Acidité, Sucres,
Nombre de pépins,
Poids frais total des pépins
Poids frais moyen par pépin
% matière sèche des pépins
…

On ne peut cartographier que ce qui varie (caractère phénotypique => choix des populations) ou que ce qui est polymorphe (marqueurs => problème des cartes incomplètes)

QTLs de teneur en anthocyanes détectés dans la population Syrah X Grenache (thèse A. Fournier-Level)



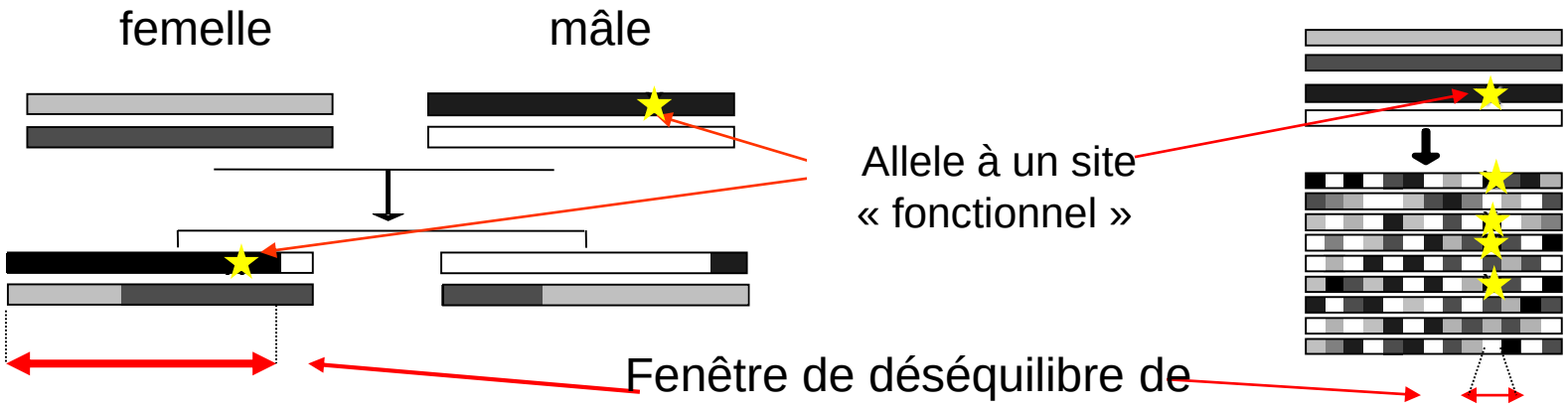
On ne peut détecter que ce qui varie chez les deux parents du croisement = une petite partie de la variabilité existante

Deux forces en action à l'échelle des populations qui expliquent le polymorphisme des génomes des individus qui les composent: **la recombinaison et la mutation**

La génétique d'association

Population en ségrégation

Populations naturelles



Fenêtre de déséquilibre de liaison due aux événements de recombinaison

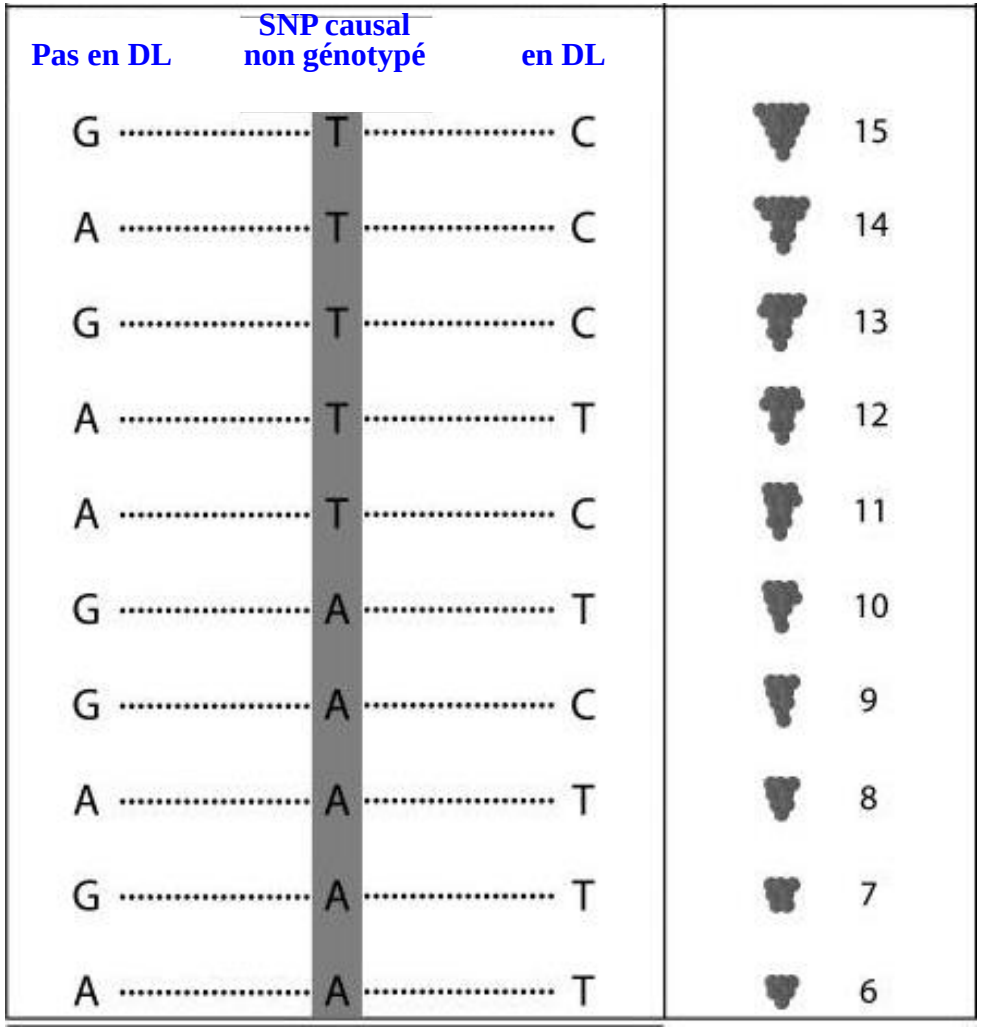
→ Intervalle de confiance large autour du QTL

→Si une association significative est détectée, il y a une plus forte probabilité qu'elle soit proche du site fonctionnel

→ Plus forte résolution pour l'association caractère/marqueur en génétique d'association

Autre intérêt de travailler sur des populations naturelles?
Notion de population naturelles ici

Le déséquilibre de liaison



D'après Myles et al 2009

Génétique d'association

P: Variation phénotypique

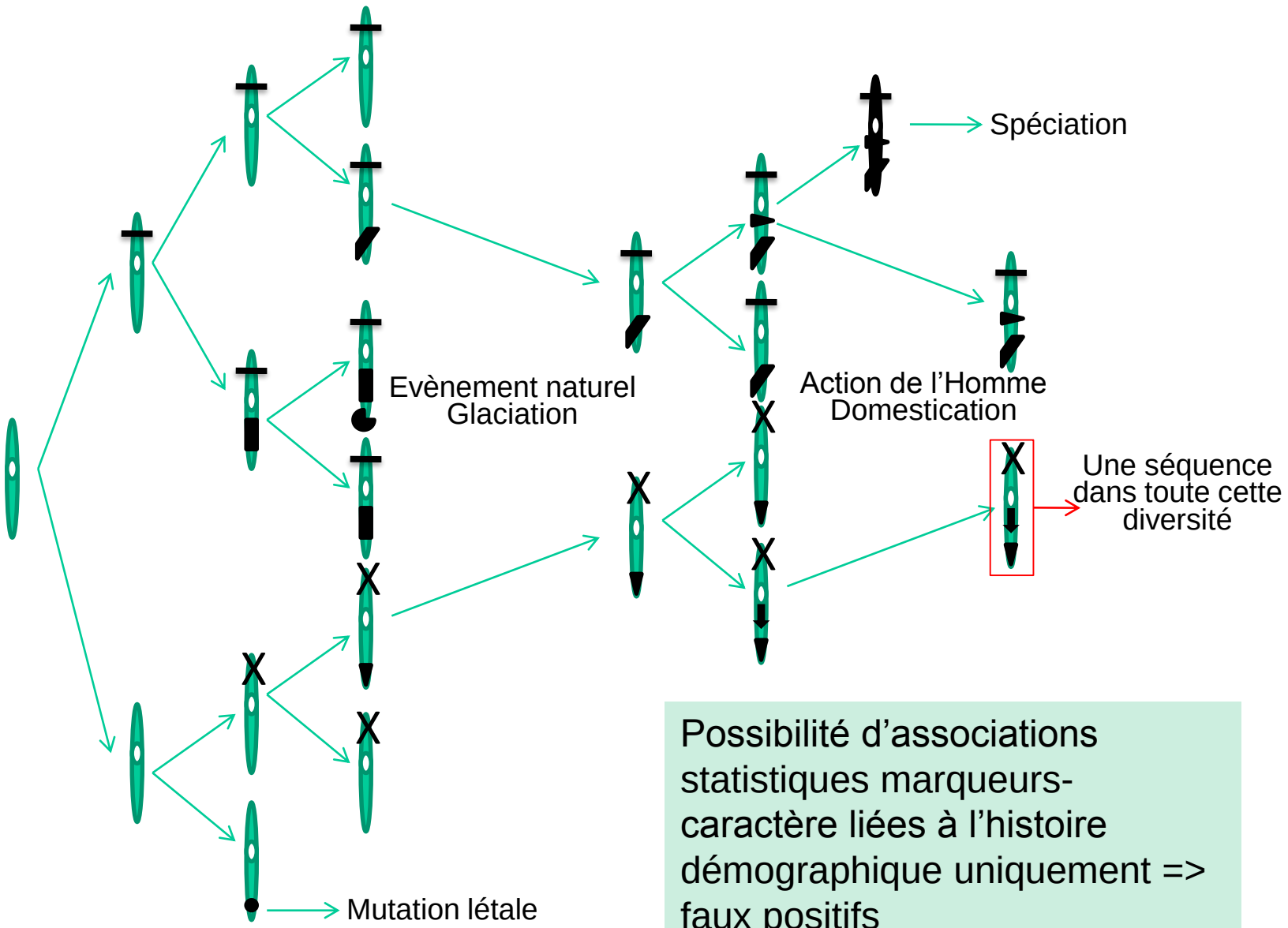
G: Variation génotypique

	Marqueur1	Marqueur2	Marqueur3
ind1	A:A	T:T	T:T
ind2	G:A	T:C	T:C
ind3	G:G	T:C	T:T
ind4	G:G	T:C	T:C
ind5	G:G	T:T	T:C

Modèle statistique:
$P = G + \varepsilon$

Coefficient de corrélation
et la probabilité associée

Dans les populations naturelles: le polymorphisme observé actuellement est le résultat d'histoires démographiques anciennes



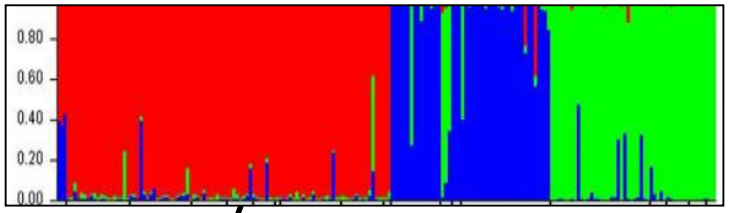
Possibilité d'associations statistiques marqueurs-caractère liées à l'histoire démographique uniquement => faux positifs

Génétique d'association

G: Variation génotypique

	Marqueur1	Marqueur2	Marqueur3
ind1	A:A	T:T	T:T
ind2	G:A	T:C	T:C
ind3	G:G	T:C	T:T
ind4	G:G	T:C	T:C
ind5	G:G	T:T	T:C

Q: Structure de la population



P: Variation phénotypique

K: Matrice d'apparentement des individus 2 à 2

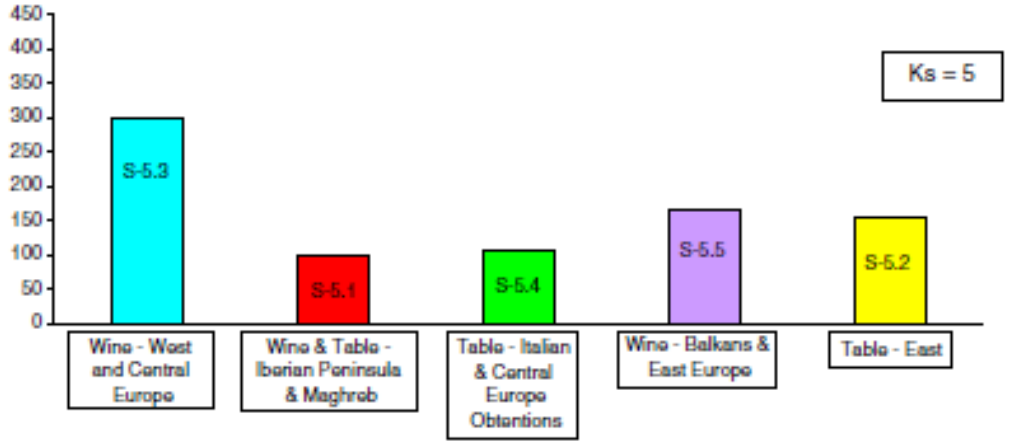
	ind1	ind2	ind3	ind4	ind5	ind6
ind1	_	0,124	0,158	0,149	0,579	0,254
ind2	0,124	_	0,258	0,269	0,697	0,655
ind3	0,158	0,258	_	0,548	0,215	0,156
ind4	0,149	0,269	0,548	_	0,157	0,559
ind5	0,579	0,697	0,215	0,157	_	0,156
ind6	0,254	0,655	0,156	0,559	0,156	_

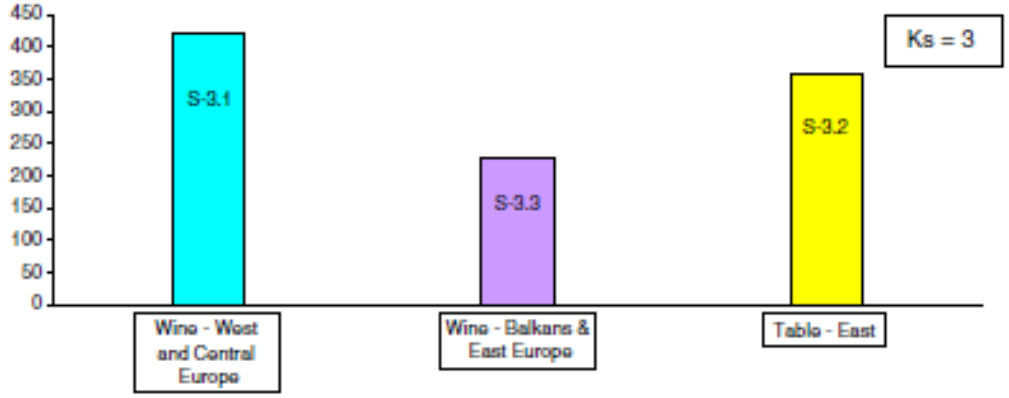
Modèle statistique:
$$P = G + Q + K + \varepsilon$$

Coefficient de corrélation
et la P-value associée

Structuration des ressources génétiques chez la vigne cultivée sur la base de marqueurs moléculaires

Génotypage de 4000 accessions de vigne cultivée (*Vitis vinifera)* avec 20 SSR → 2261 (2096) génotypes non redondants



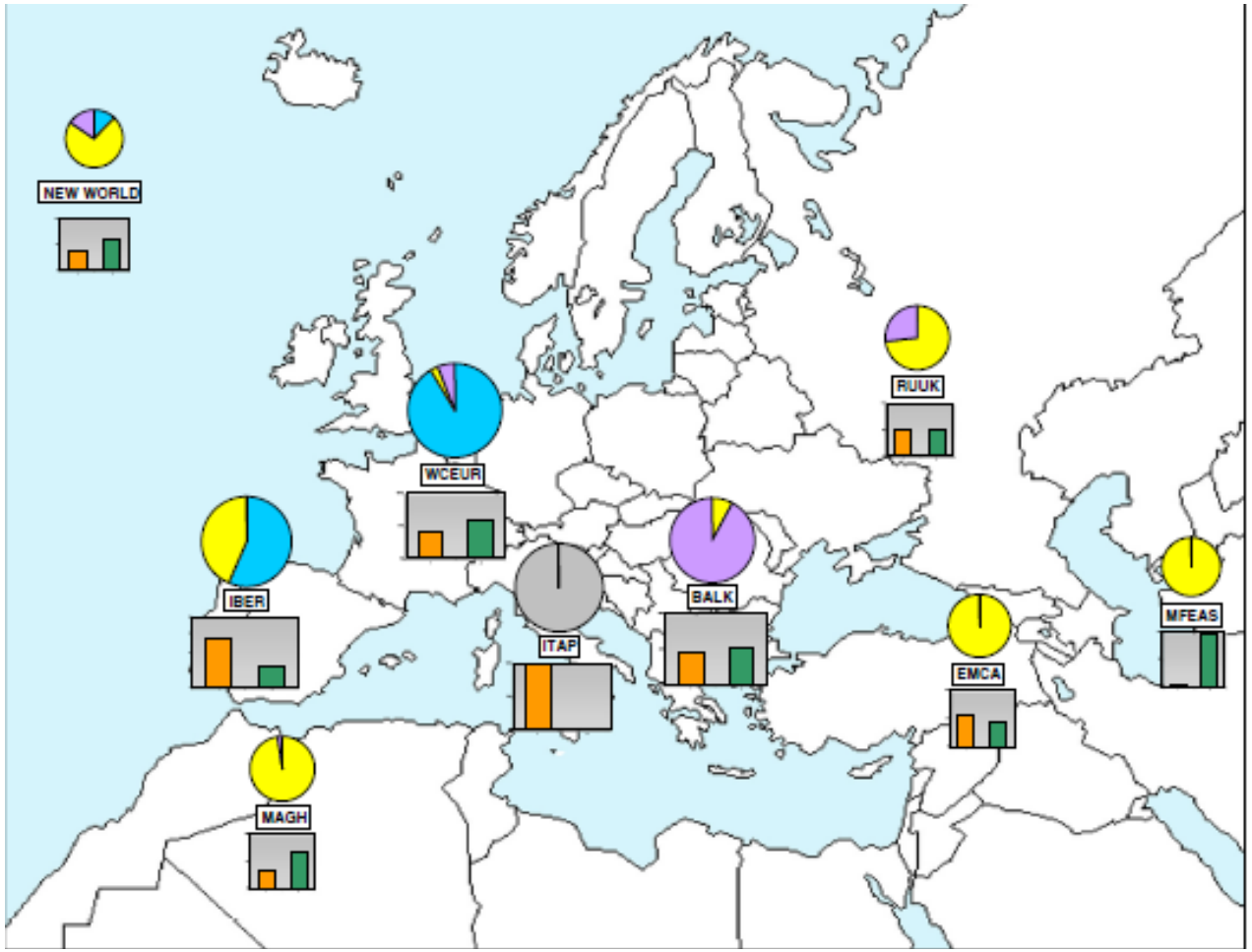


+ deux sous-populations: péninsule Ibérique&Maghreb et tables récents d'italie&eur. centrale

3 sous-populations : Cuves Eur. ouest et centrale; cuve Eur Est et Balkans et table Eur est, Asie, caucase…

Le Cunff et al BMC Plant Biol 2008
Bacilieri et al BMC Plant Biol 2013

Structuration des ressources génétiques chez la vigne cultivée sur la base de marqueurs moléculaires



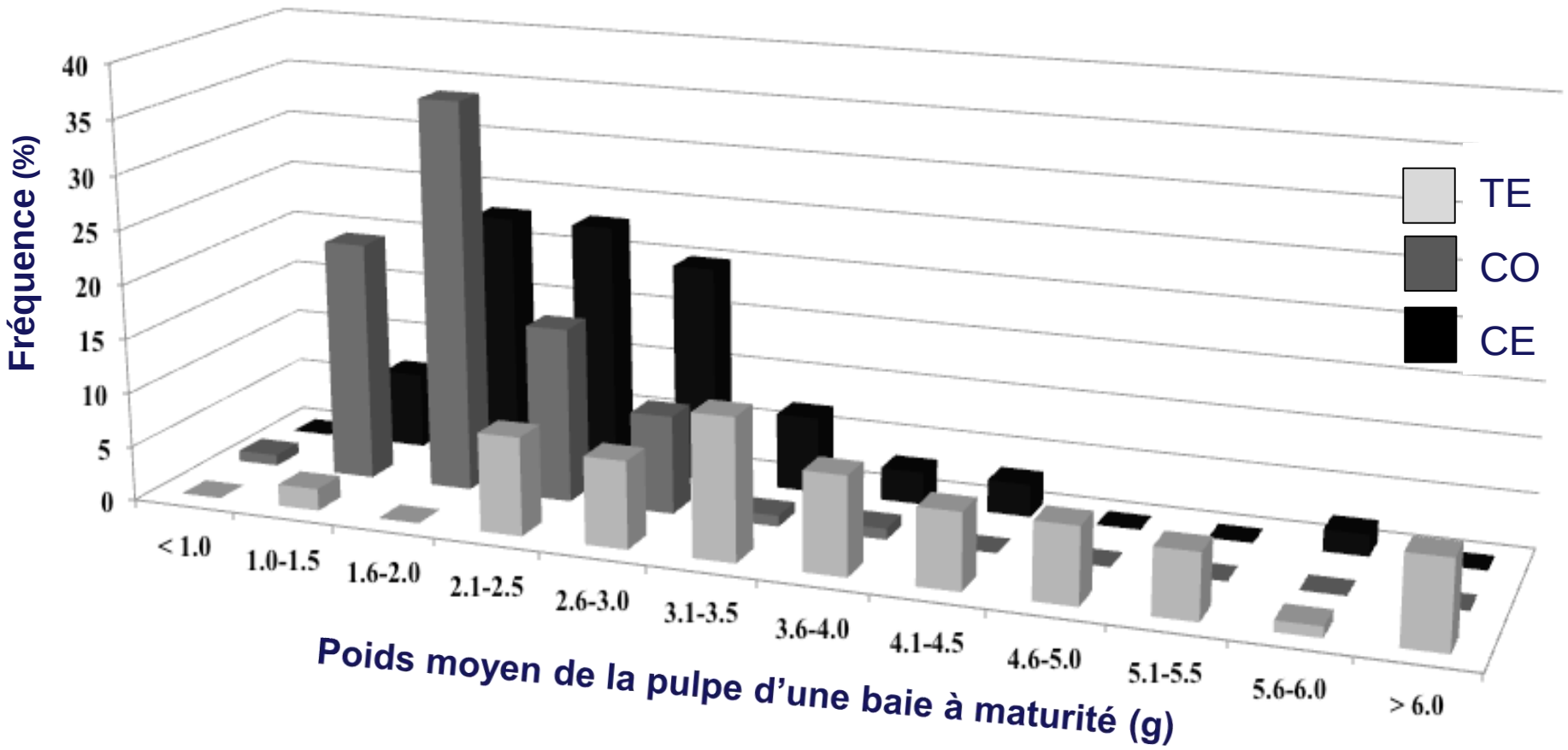
3 sous-populations
- Cuve OUEST ( )
- Cuve EST + Centre ( )
- Table EST ( )

Structure génétique des individus des populations:
- Avec admixture ( )
- Sans admixture ( )

Si on ne tient pas compte de cette structure, on risque de détecter de fausses associations

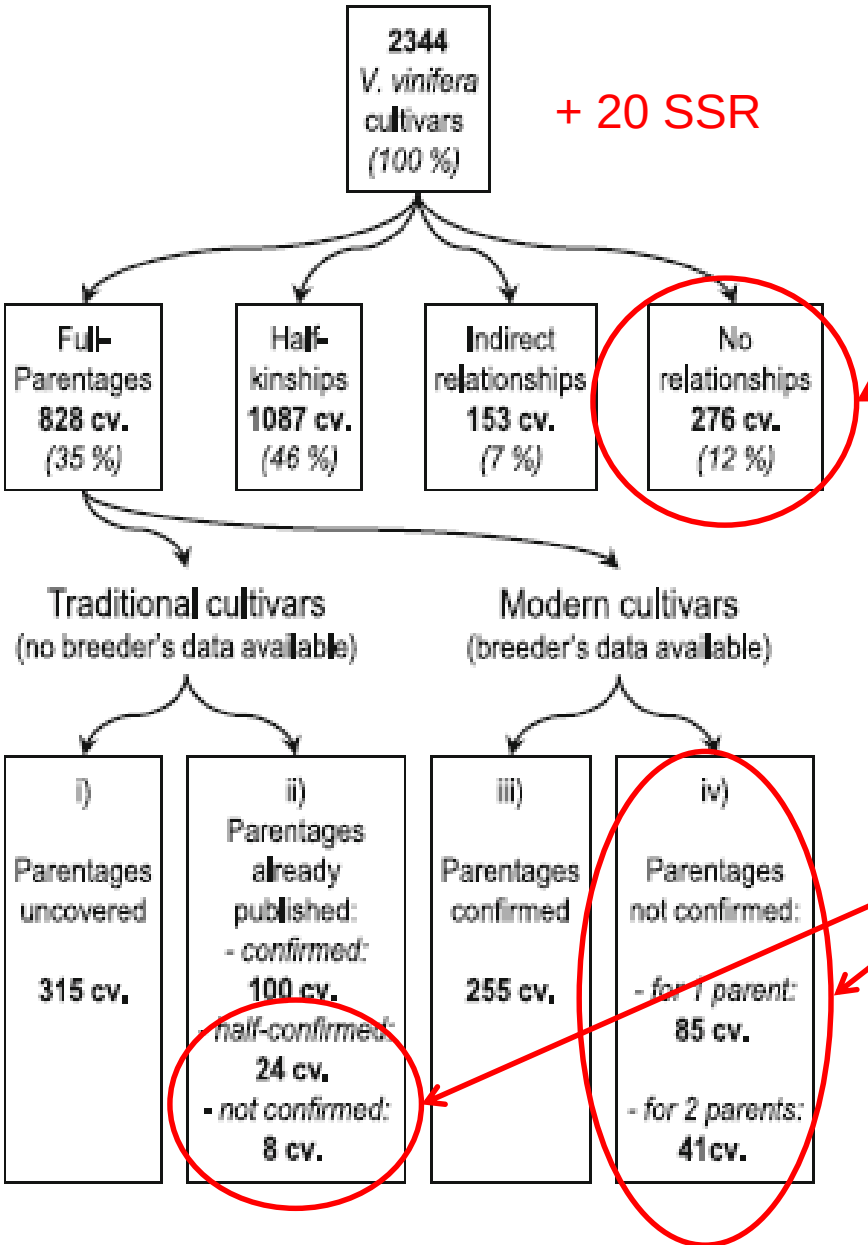
Bacilieri et al BMC Plant Biol 2013

Variation du poids de la baie dans chaque sous-population



Houel et al 2013

Relation de parentées chez la vigne cultivée

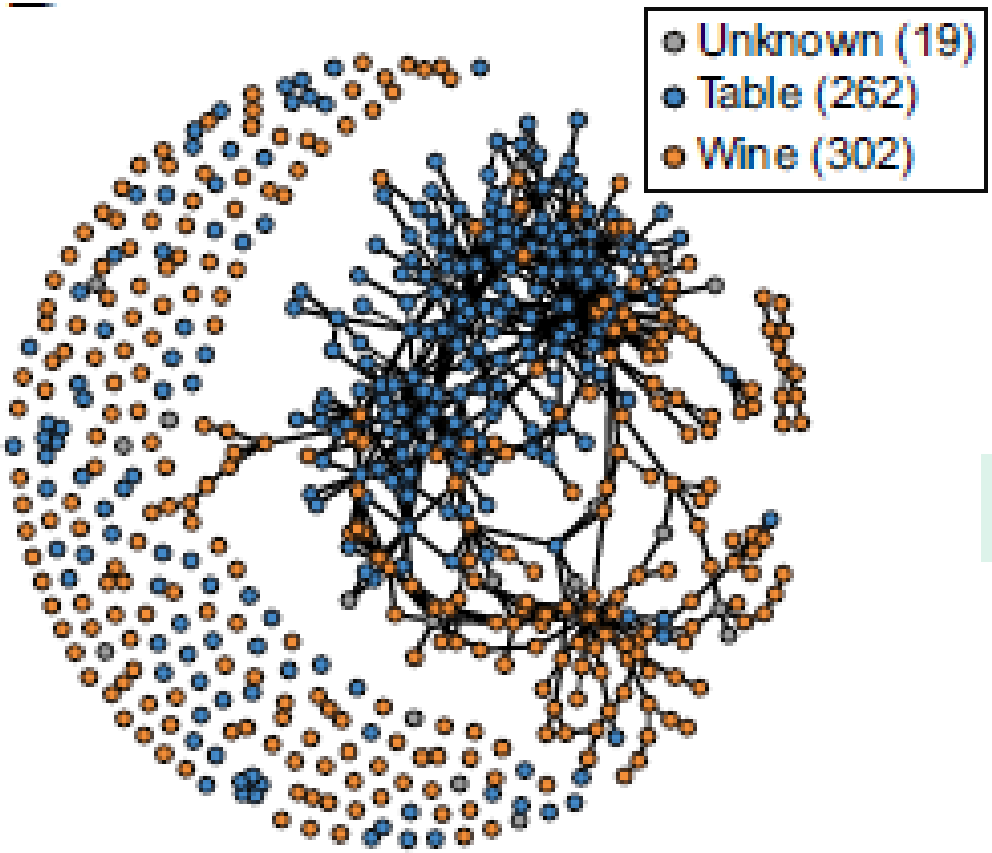


12% seulement des cultivars de la collection de Vassal n'ont **aucune relation de parenté** détectable

De nombreuses relation de parenté publiées fausses

Lacombe et al, TAG, 2013

Relation de parentées chez la vigne cultivée

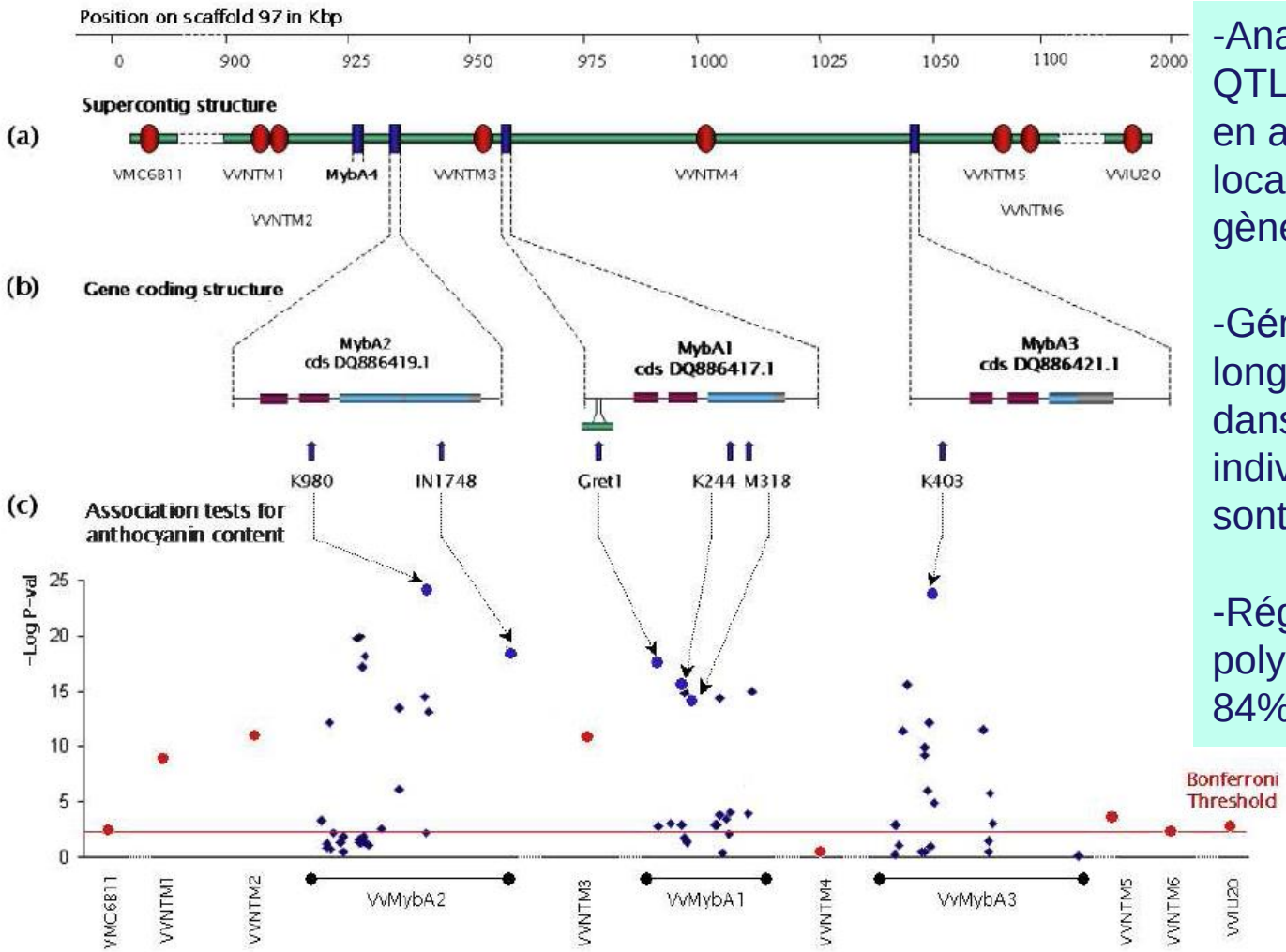


Relations de parenté observées dans 583 cultivars uniques à l'aide de 5387 marqueurs SNP

1 nœud contient 58% des cultivars (384)

Myles et al, PNAS, 2011

Combinaison des deux approches et déterminisme génétique de la variation quantitative de la couleur de la baie (Fournier-Level et al Genetics 2009)



-Analyse QTL classique : 1 QTL explique 62% du contenu en anthocyanes des baies. Co-localise avec le cluster de gènes Myb.

-Génétique d'association le long du cluster de gènes Myb dans une population de 141 individus : 32 polymorphismes sont associés significativement

-Régression multiple: 5 polymorphismes expliquent 84% de la variation observée

28 gènes candidats pour la variation de la taille de la baie (Thèse C. Houel)

Nom du gène	Gène orthologue putatif (espèce)
VvAGL11	*Agamous like 11* (Arabidopsis)
VvPMEI2	*MMI9.1* (Arabidopsis)
VvSPY	*SPINDLY* (Arabidopsis)
VvRPL24	*Ribosomal protein like 24* (Arabidopsis)
VvFw2.2.2 *VvFw2.2.1* *VvFw2.2.3*	*Fw2.2* (Tomate)
VvSUN	*SUN* (Tomate)
VvOvate1 *VvOvate2*	*Ovate* (Tomate)
VvHMGR1 *VvHMGR2* *VvHMGR3*	*HMG1* (Arabidopsis)
VvAP3	*Apetala 3* (Arabidopsis)
VvAGL22.2	*Agamous like 22* (Arabdopsis)
VvAGL17.1	*Agamous like 17* (Arabidopsis)
VvAGL12	*Agamous like 12* (Arabidopsis)
VvAGL8	*Agamous like 8 - Fruitfull* (Arabidopsis)
VvMADS1	*Agamous* (Arabidopsis)
VvMADS6	*Apetala 1* (Arabidopsis)[§]
VvYABBY2	*Fasciated* (Tomato)
VvMADS9	*Pistilata* (Arabidopsis)
VvJMJ	*F2K11.14* (Arabidopsis)
VvMADS4	*Agamous like 9 - Sepallata 3* (Arabidopsis)
VvHB13	*Homeo Box 13* (Arabidopsis)
VvSVP2	_
VvBURP1	*Unknown seed protein like 1* (Arabidopsis)
VvHD2C	*HD2C* (Arabidopsis)

- 4: QTL taille de la baie
  (Mejia et al, 2011)
- 17: bibliographie (Tomate, Arabidopsis) et/ou expression ovaire et baie de vigne
- 7: banque d'ADNc soustractive – puce entre l'Ugni Blanc mutant sans pulpe & sauvage

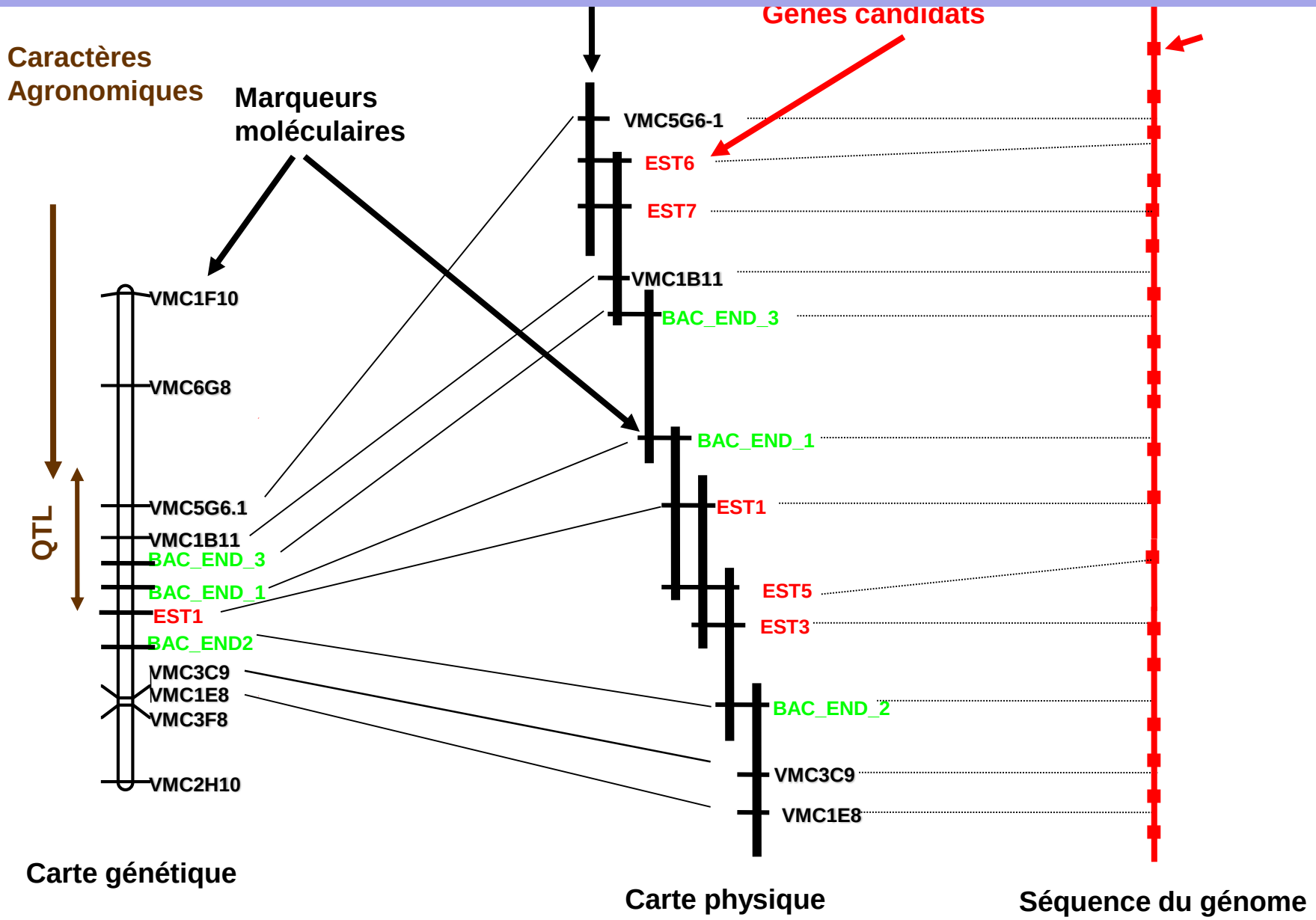
Thèse Houel C, 2011

Gènes présentant des SNP significativement associés à des paramètres de variation de la taille de la baie

Nom du gène	Type de SNP	Localisation	P-value*	Paramètres
VvJMJ	[T/A]	Exon	9,52E-05	Longueur de la baie
			2,51E-05	Poids de la baie
VvHMGR1	[T/C]	Exon	1,56E-05	Longueur de la baie
	[G/A]	Intron	1,87E-05	Longueur de la baie
VvAGL11	[C/T]	Intron	9,22E-07	Nombre de pépins
	[G/T]	Intron	3,07E-06	Nombre de pépins

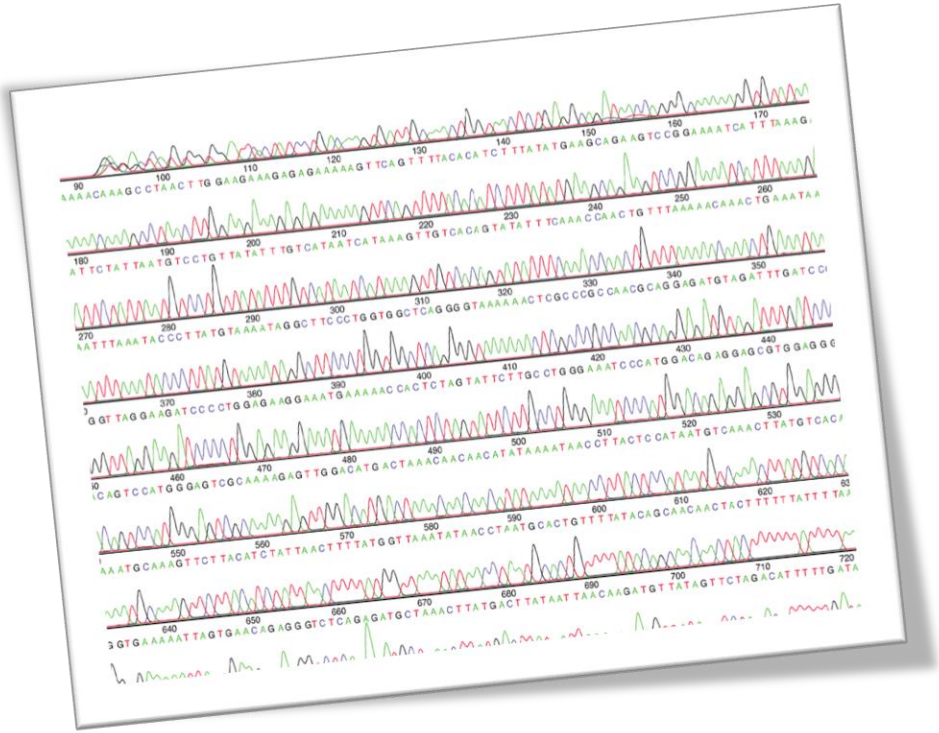
Thèse Houel C, 2011

Comment aller vers l'identification d'un polymorphisme causal?

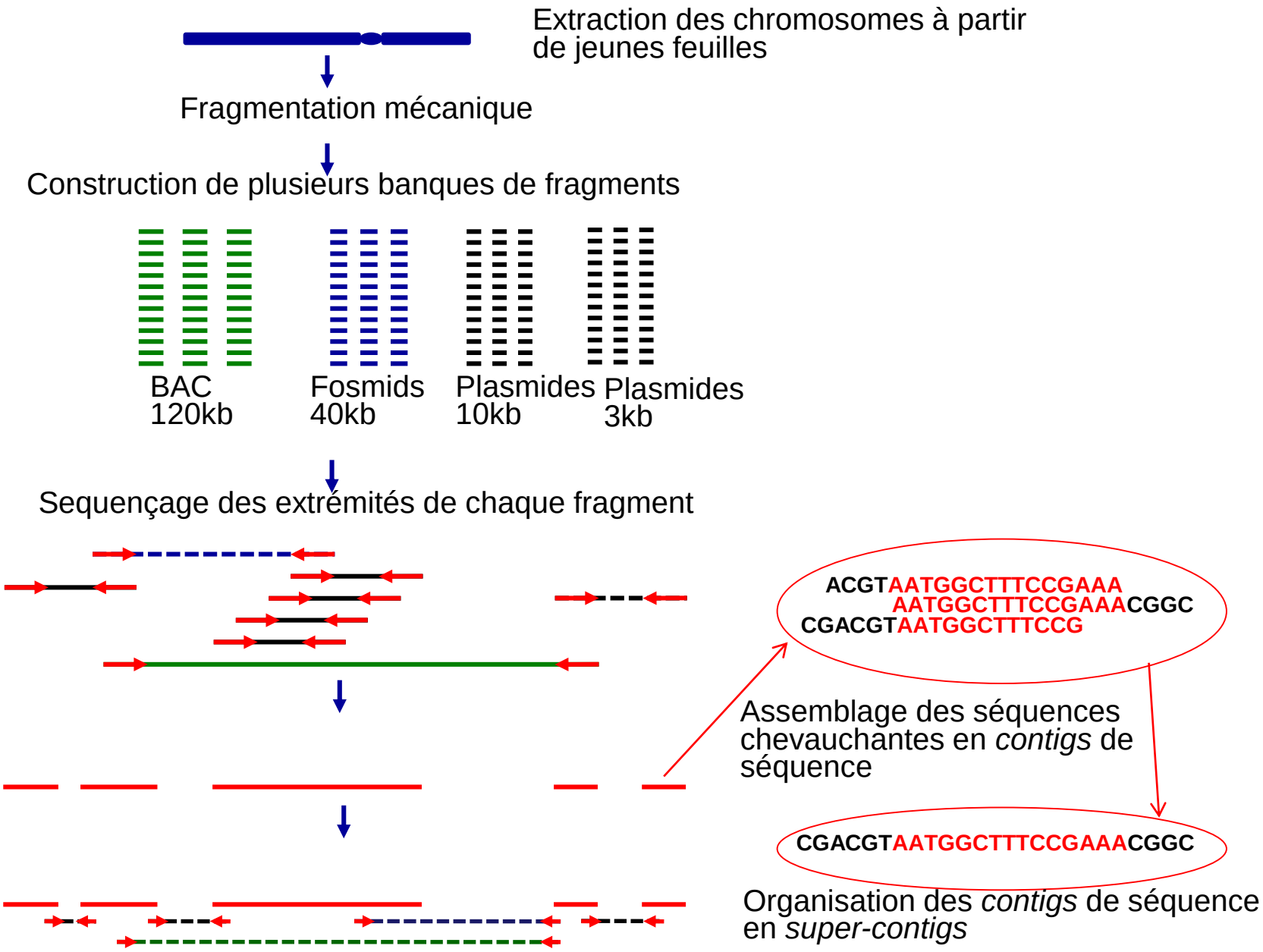


3
Séquençage du génome de la vigne

“**The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla**.”
Jaillon et al. Nature. 2007 Sep 27;449(7161):463-7.



Stratégie de séquençage: Whole Genome Shotgun (WGS)

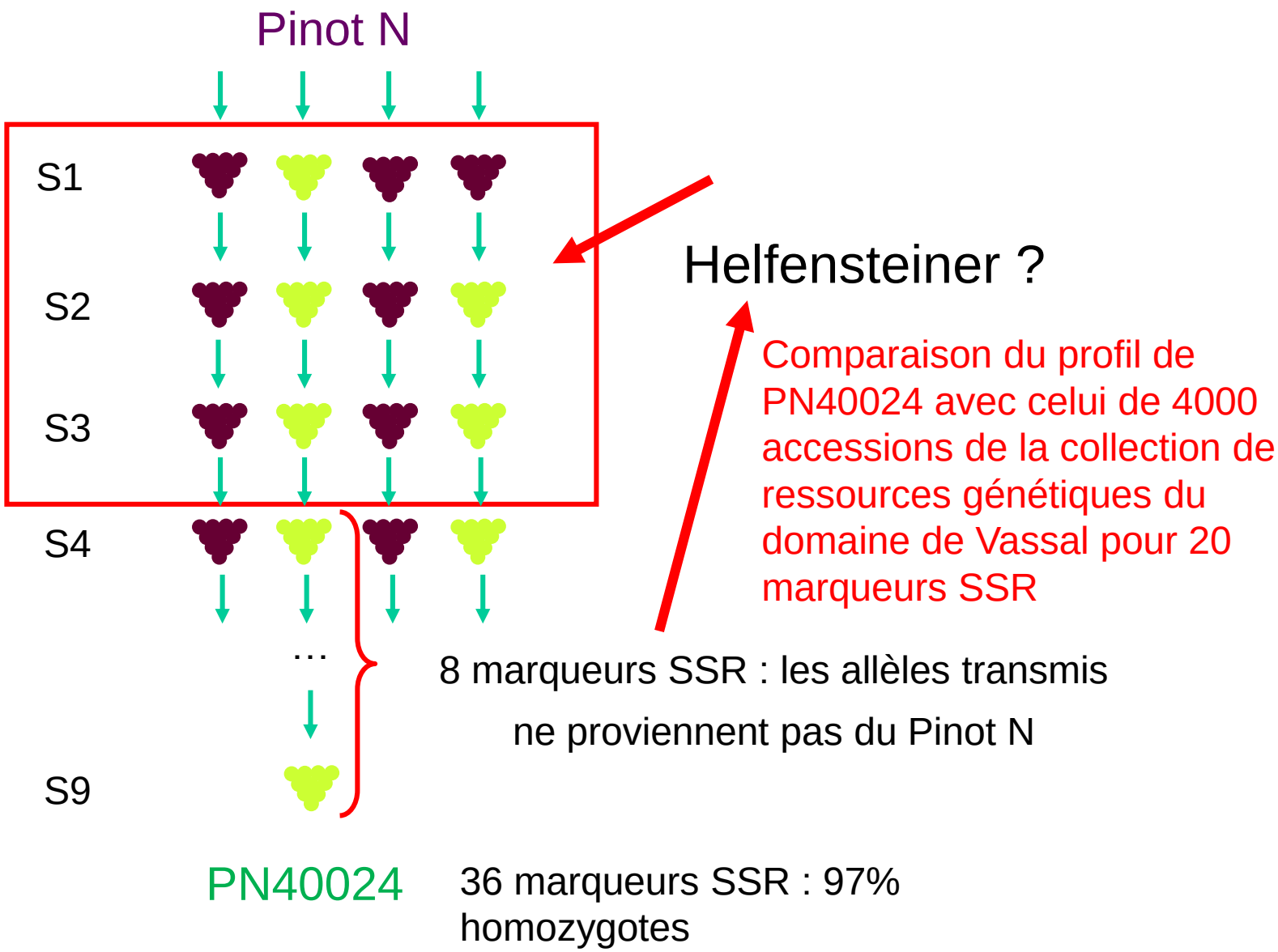


Notion de couverture du génome

Influence de l’hétérozygotie sur une telle stratégie?

Séquençage d'un individu quasi homozygote dérivé du Pinot N par une série d'autofécondations

Bronner et Oliveira 1991



Influence de l'hétérozygotie sur l'assemblage des séquences

- PN40024 (quasi homozygote) Jaillon et al Nature 2007:

  6X

  - Taille totale de l'assemblage: 487 Mb
  - Contigs : Nb= 57 662 N50= 23 Kb

  8X

  - Taille totale de l'assemblage : 487 Mb
  - Contigs : Nb= 19 577 N50= 65.9 Kb

- Pinot Noir (hétérozygote) Velasco et al, PLOSone 2007:

  7X Sanger + 4X pyrosequençage

  - Taille totale de l'assemblage: 550 Mb
  - Contigs : Nb= 66 165 N50= 10 Kb

Critères de qualité d'un assemblage: longueurs des contigs et des super-contigs

Séquençage des génomes: des révolutions technologiques et informatiques qui s'accélèrent

Milieu des années 1990

Séquençage Sanger

Génome humain et de l'arabette publiés en 2000

2007 apparition des méthodes de séquençage de seconde génération

Les prix sont divisés par 100

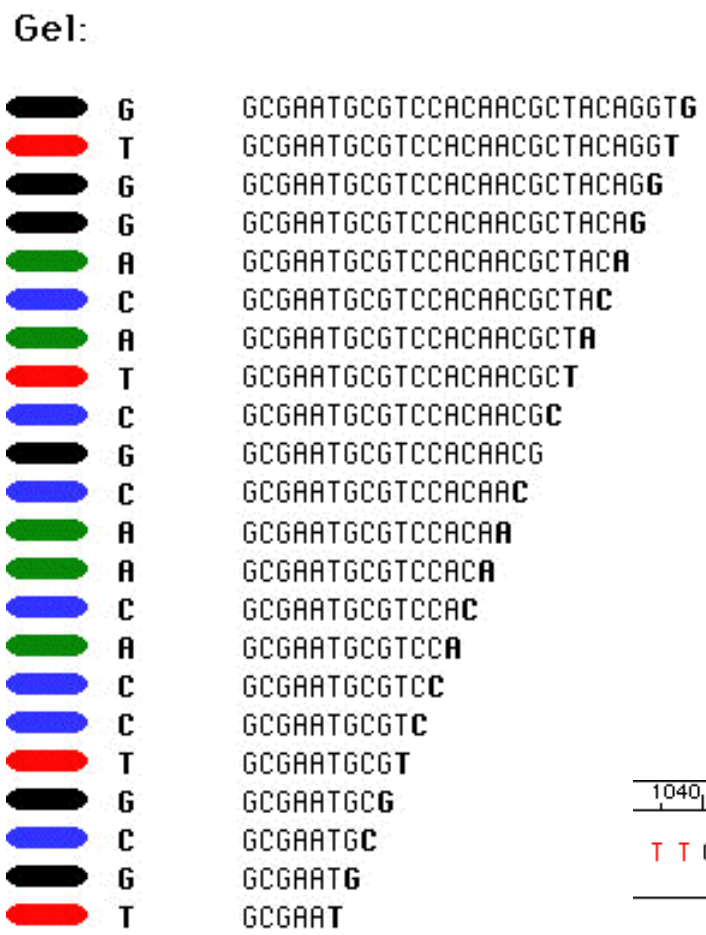
La qualité en assemblage de novo baisse

2016 premiers génomes complexes séquencés de novo avec les séquenceurs de troisième génération

La qualité est à nouveau très bonne

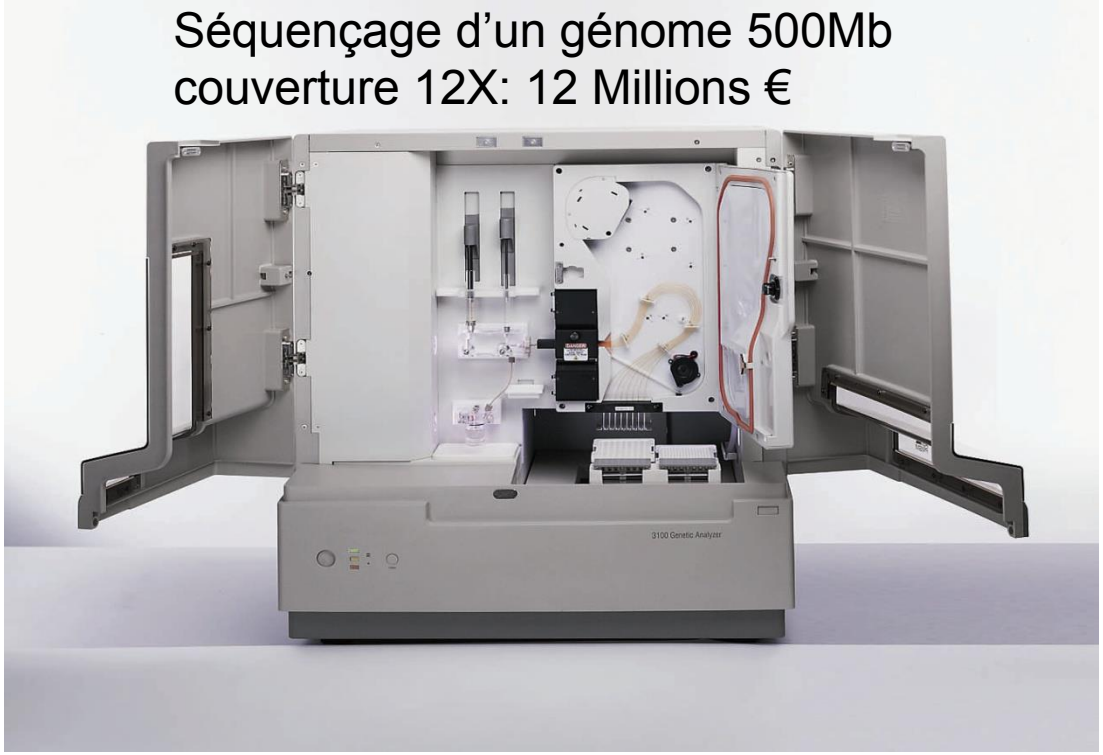
Un saut qualitétif dans les méthodes d'assemblage

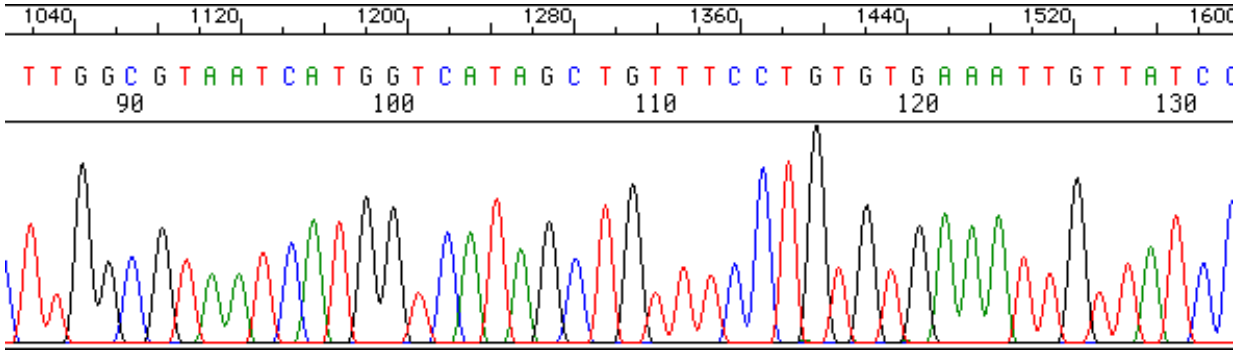
Séquençage d'ADN par la méthode Sanger: méthode de première génération



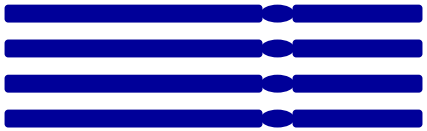
~11Mb/15 jrs

Séquençage d'un génome 500Mb
couverture 12X: 12 Millions €





Séquençage Seconde Génération (Next Generation Sequencer)

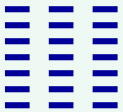


Fragmentation

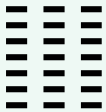
En 2007

Clonage individuel des fragments dans des bactéries

BAC
120kb



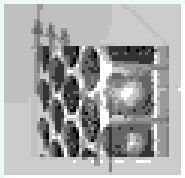
Fosmids
40kb



Plasmids
3kb+10kb

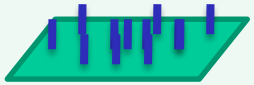
Séquences <u>indépendantes</u> de <u>500-700 bp</u> en moyenne

Fixation de chaque fragment sur une microbille



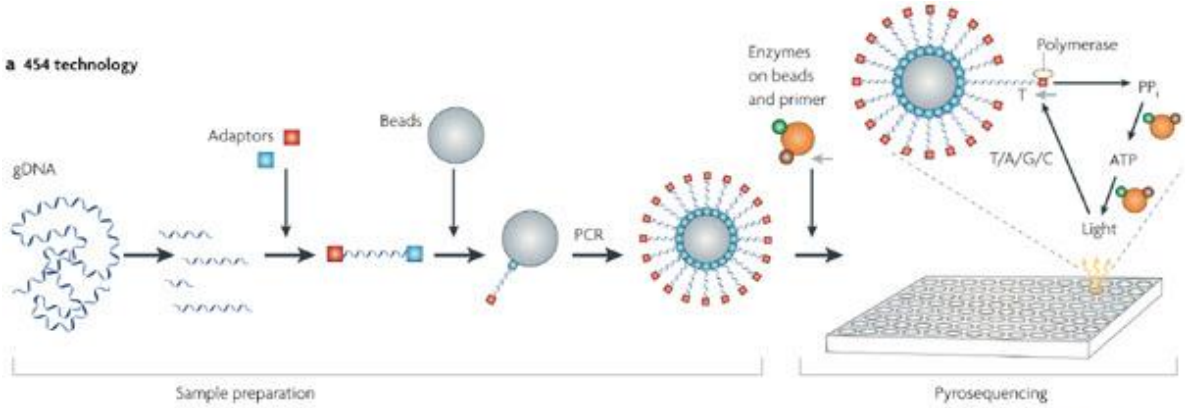
<u>400 000</u> séquences de <u>250 bp</u> en moyenne

Fixation de chaque fragment sur une lame



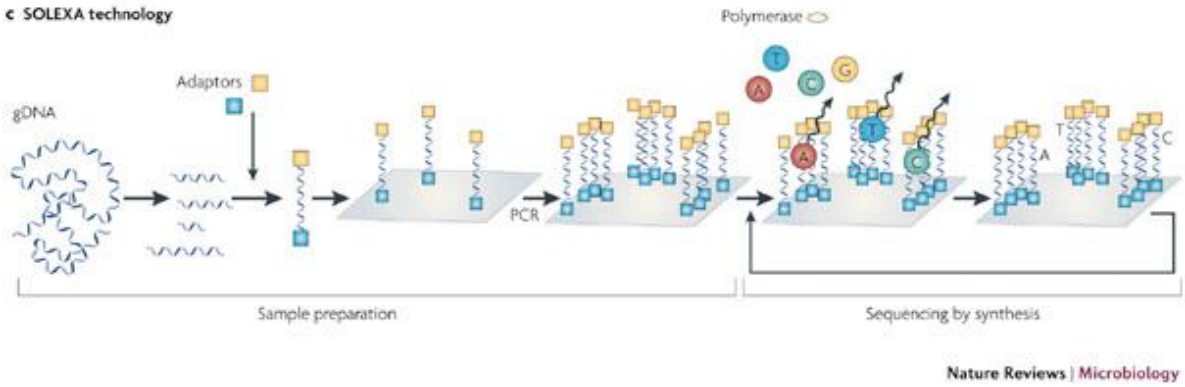
<u>40 millions</u> de séquences de 35 bp en moyenne

Séquençage Seconde Génération (NGS): évolution très rapide



Roche-454: lectures 400 bp
5-6Gb de séquence en 15 jours

Séquençage d'un génome de 500Mb (Vigne par exemple):
15-20X Roche-454 et 50X Illumina-Solexa => ~500k€

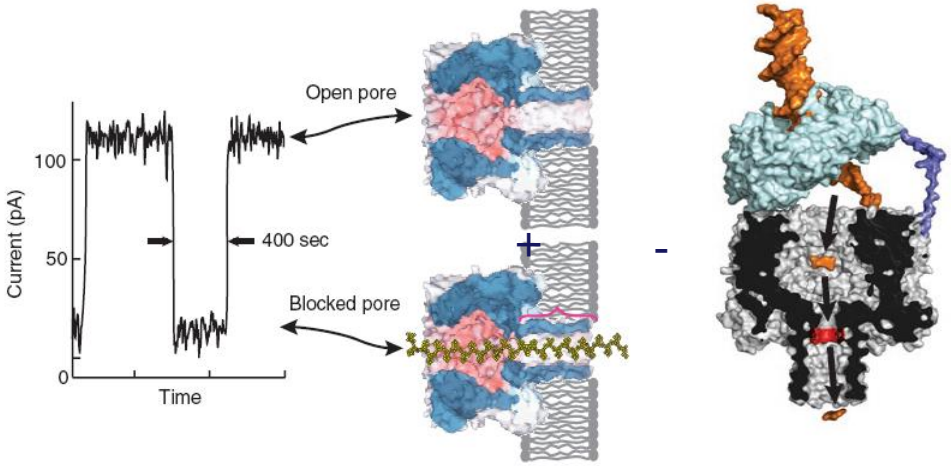


Illumina-Solexa: lectures 100bp des deux extrémités et 20 Gb de séquence en 15 jours

Sequençeurs de troisième génération: objectif augmenter la longueur des lectures

Séquençage en **temps réel** = **3ème génération** de séquenceurs

Séquençage Nanopore



- Séquençage de ssDNA
- Longueur de séquence : 50 000 bp
- Génome mammifère < 1000$ en 24h

Branton et al., 2008 *nat. biotech.*

Mesure en temps réel de l'activité de la polymérase - Single Molecule Real Time SMRT™ DNA Sequencing Technology (Pacific Biosciences) :

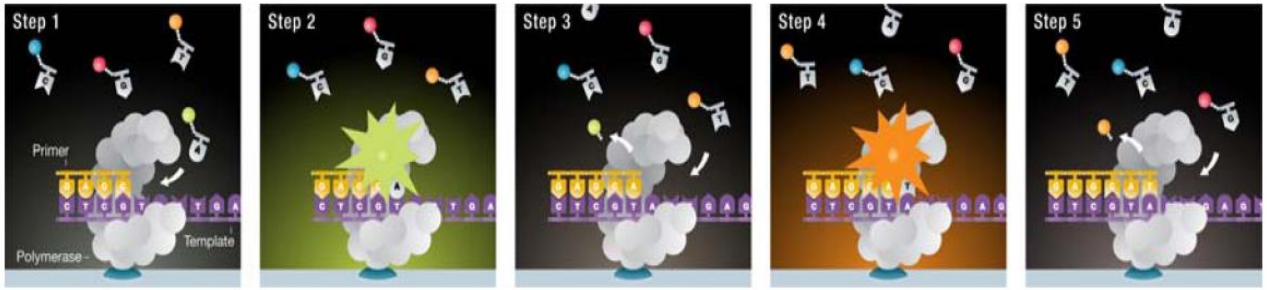


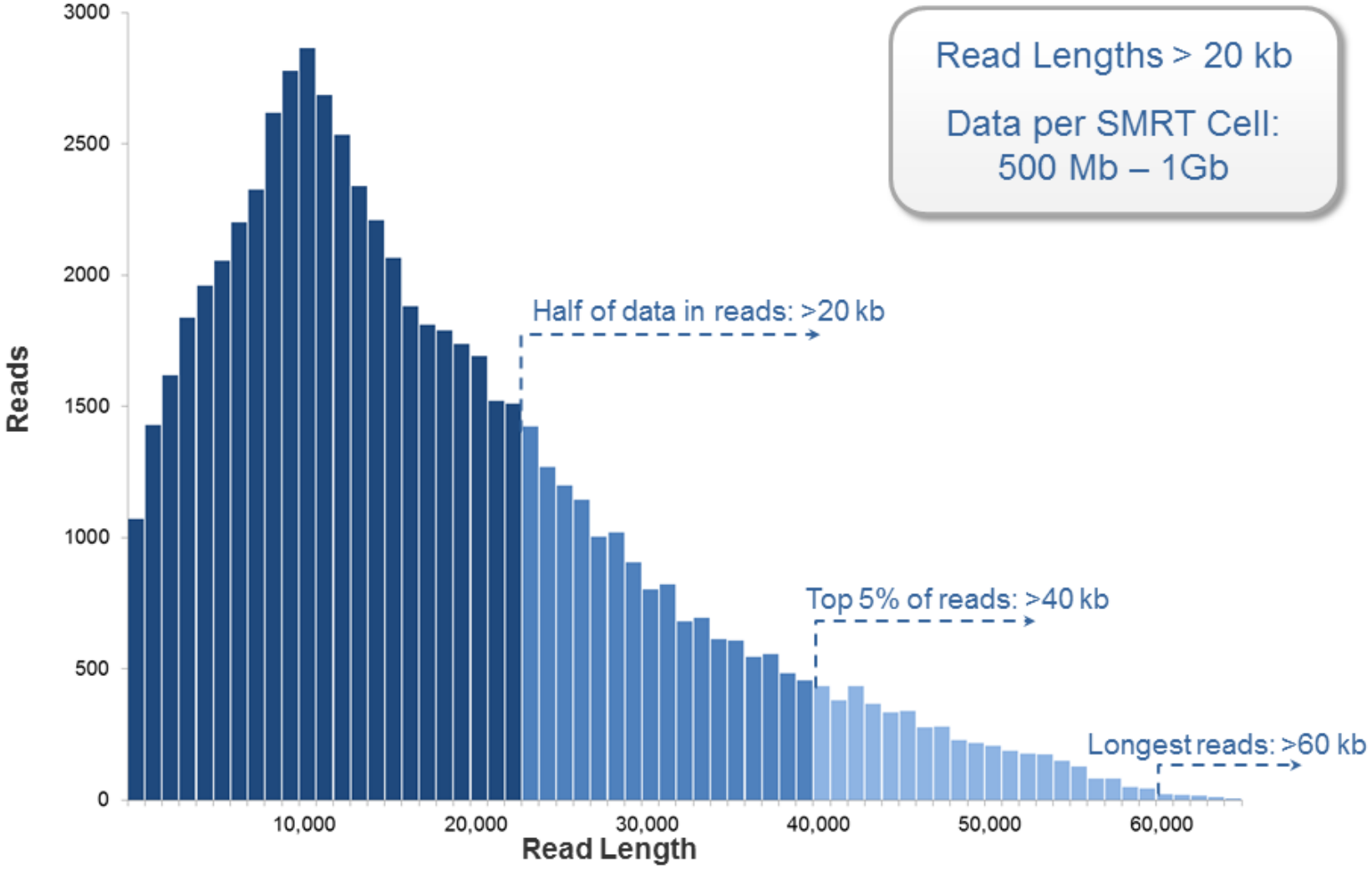
Figure 10. Processive Synthesis with Phospholinked Nucleotides.

Polymearse avec fluorophore nucléotide marqué sur P

Zero-mode waveguides (détection fluo d'une seule mol.)

www.pacificbiosciences.com

Les enjeux majeurs: allonger les séquences, qualité des séquences



Séquenceurs PACBIO

Les enjeux majeurs: améliorer les algorithmes d'assemblage en relation avec les séquences répétées, l'hétérozygotie et la polyploïdie

DeNovoMAGIC™ 2.0

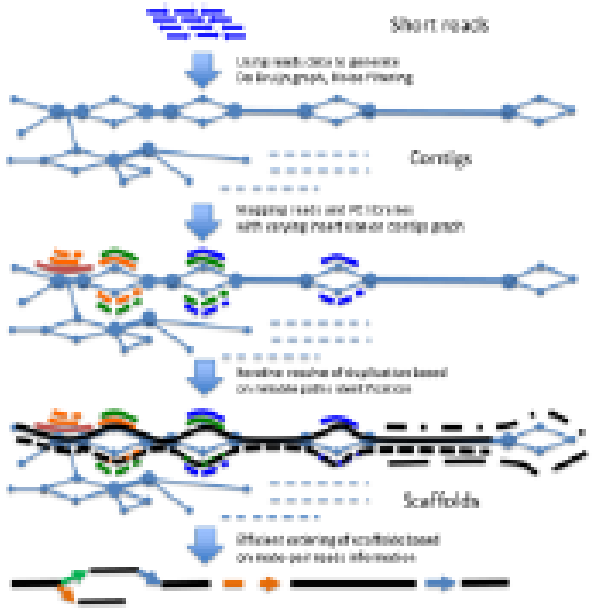
Algorithm Design

DeNovoMAGIC™ algorithm assembles whole genome seq. data of short reads, into long, phased, and accurate scaffolds.

Input data:

PE (2x250), 450bp insert size
PE (2x160), 800bp insert size
MP (2x160), 3Kb, 5-7Kb, 8-10Kb insert size
Illumina's Chemistry- v4, v2 rapid mode

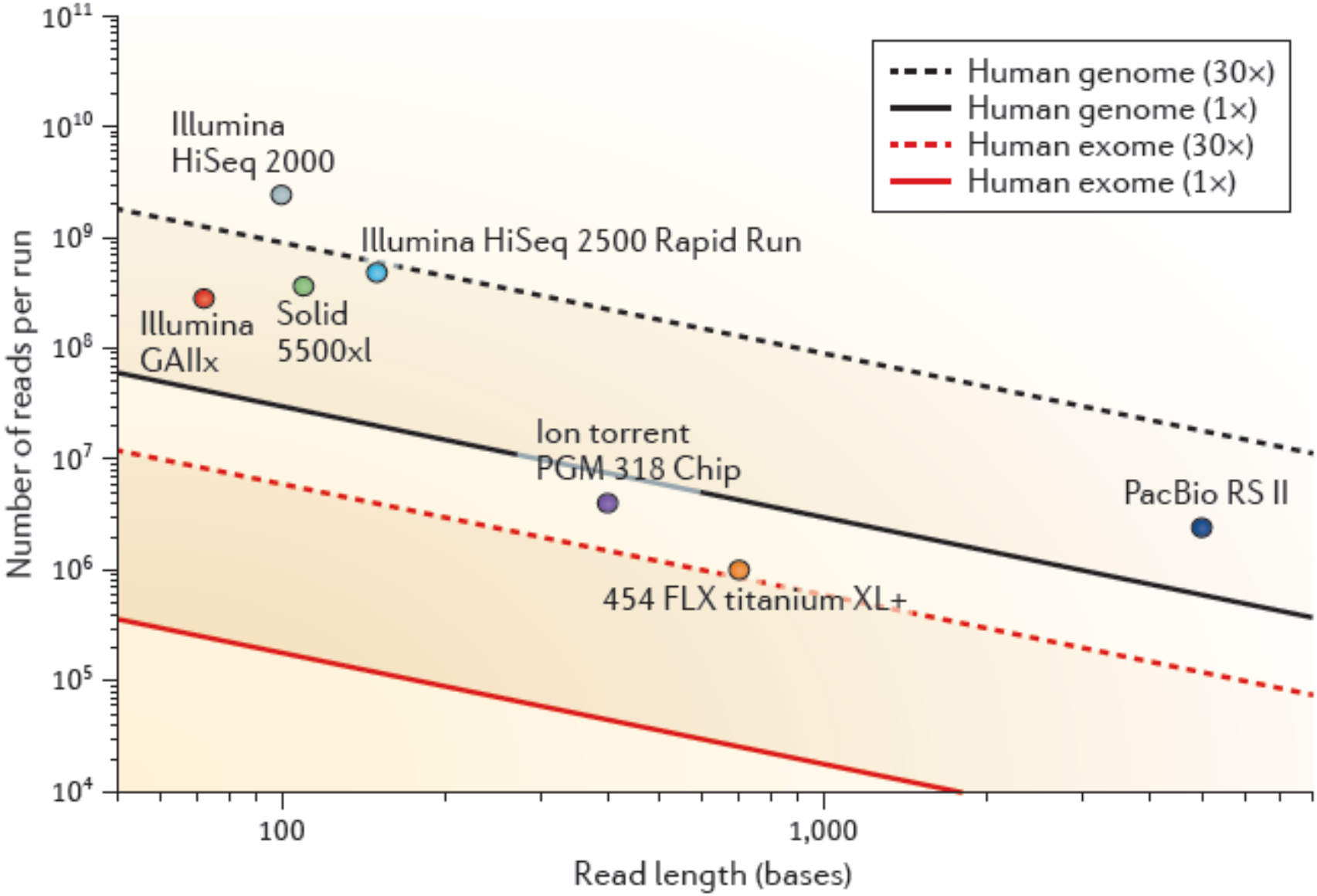
Total 180-200X coverage.



=> Assemblage de Novo de la séquence du blé!!!!

Ronen G (NRGene SA) Plant and Animal Genome Conference XXIV, San Diego, 2016

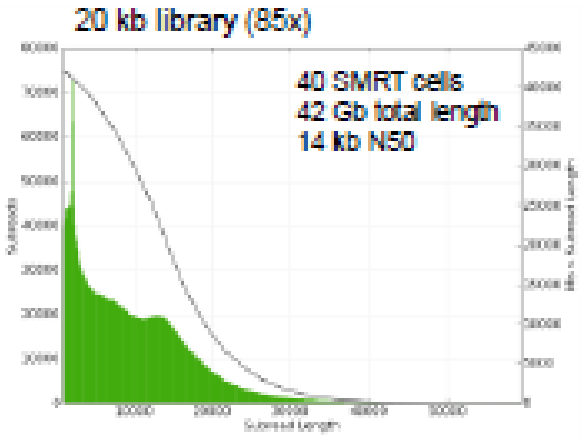
Les enjeux majeurs: allonger les séquences, qualité des séquences



Sims et al, Nature Rev, 2014

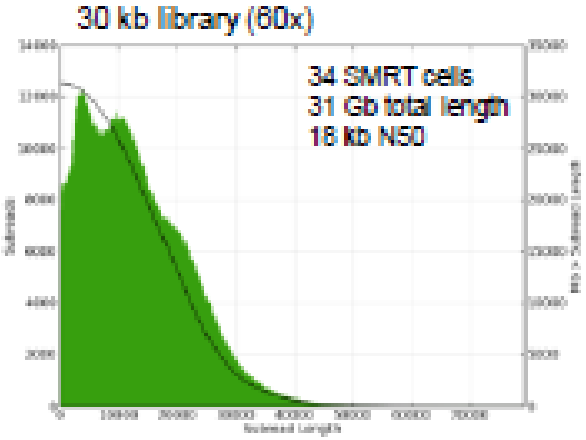
Séquençage du génome du Cabernet Sauvignon en PacBio

- Qualité de l'ADN de départ déterminante
- Cette condition étant remplie: assemblage de très grande qualité d'un génome très hétérozygote



	Falcon-unzip Primary
Assembly Size (Mbp)	605.2
# of Contigs	2,579
Max Contig (Mbp)	3.92
N50 Size (Mbp)	0.436

+

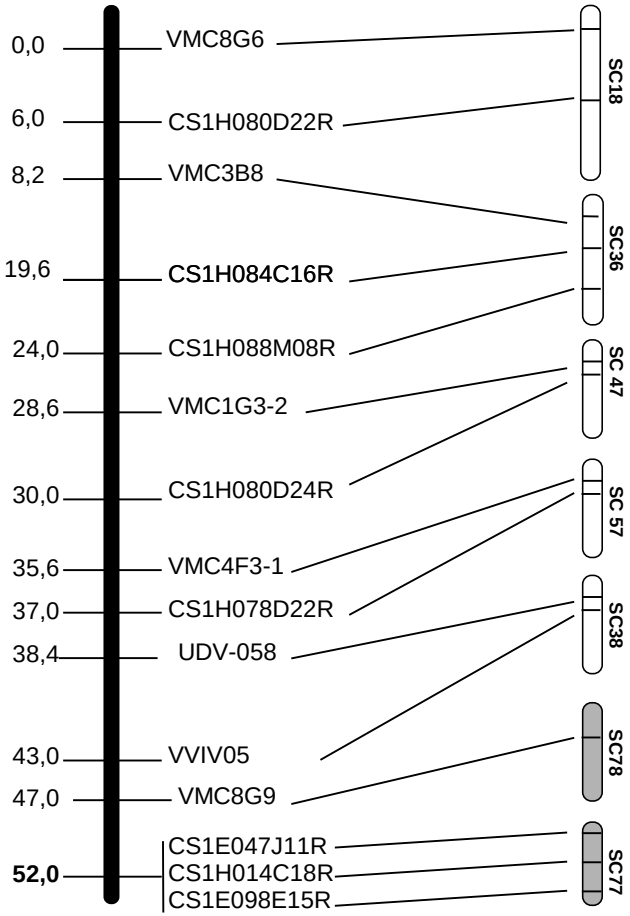


	Falcon-unzip Primary
Assembly Size (Mbp)	591
# of Contigs	788
Max Contig (Mbp)	14.0
N50 Size (Mbp)	2.17

Jason Chin (PacBio) - FALCON-unzip (W092)

Cramer GR et al, Plant and Animal Genome conference XXIV, San Diego, 2016

Ordonnancement des super-contigs le long des chromosomes à l'aide d'une carte génétique

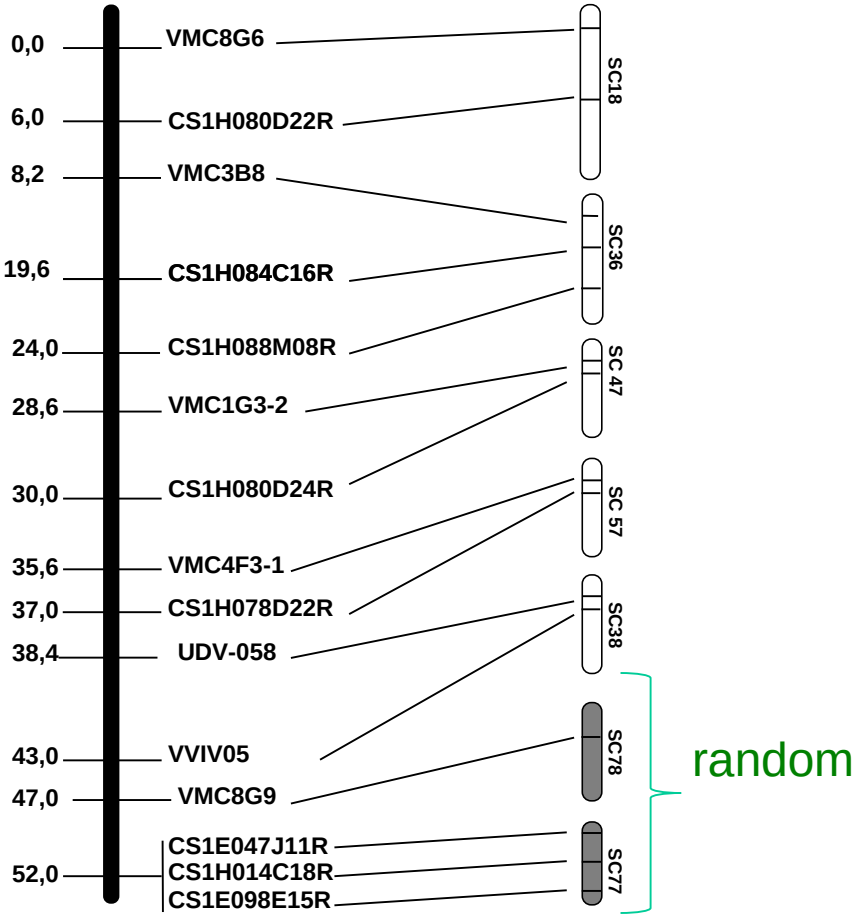


Quels types de marqueurs utiliseriez-vous ? Quelle stratégie mettriez-vous en oeuvre?

Ordonnancement des super-contigs le long des chromosomes à l'aide d'une carte génétique

Carte génétique: chromosome 12

Super-contigs de séquence



Version 8X (carte consensus de 5 petites populations; 409 marqueurs SSR uniques):

- 69% ancrée
- 61% ancrée et orientée

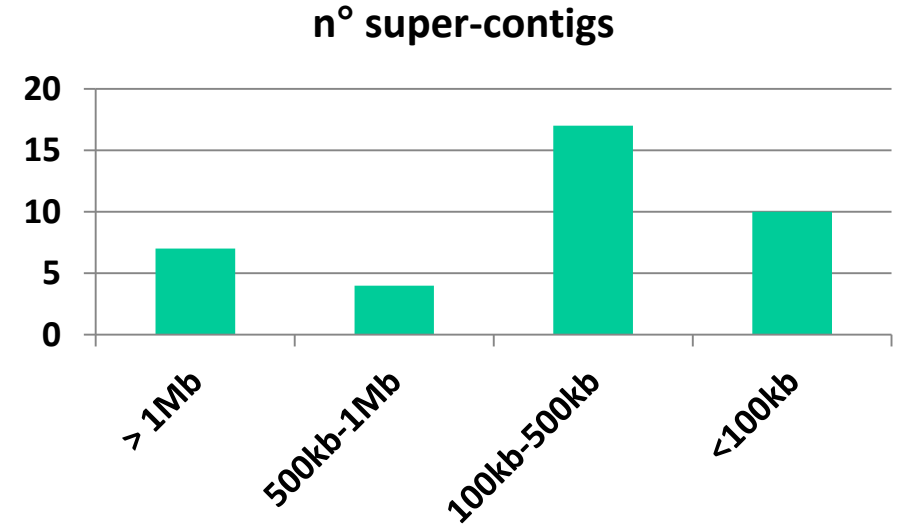
Version 12X (carte consensus de deux grandes populations 2 pop; 514 marqueurs SSR uniques):

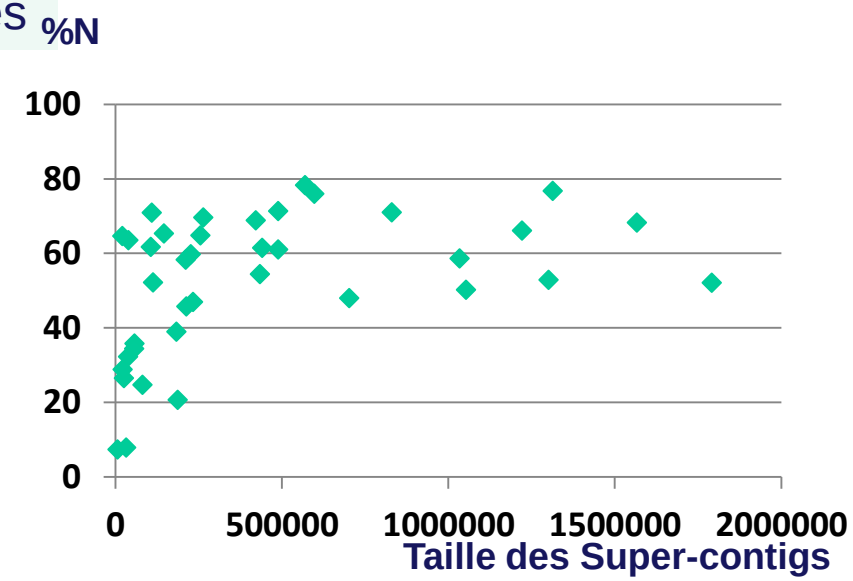
- **85%** ancrée
- **71%** ancrée et orientée

http://urgi.versailles.inra.fr/

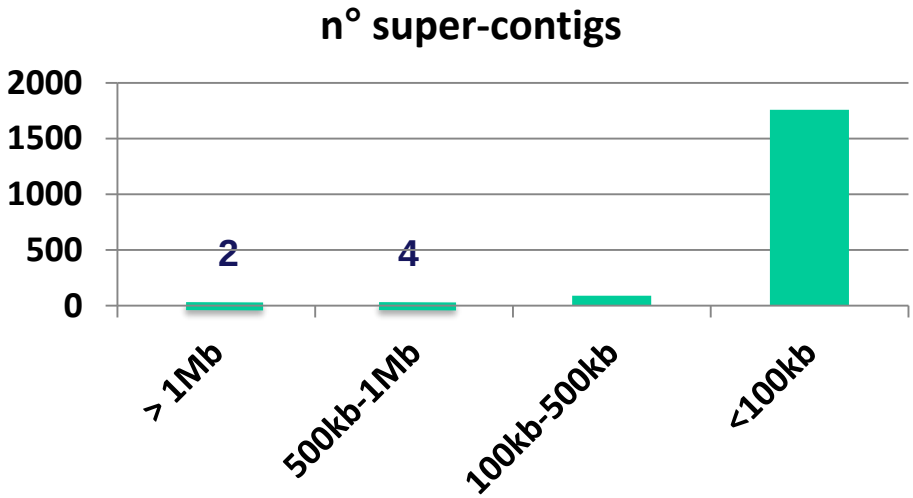
Charactéristiques des séquences non ancrées et/ou non orientées

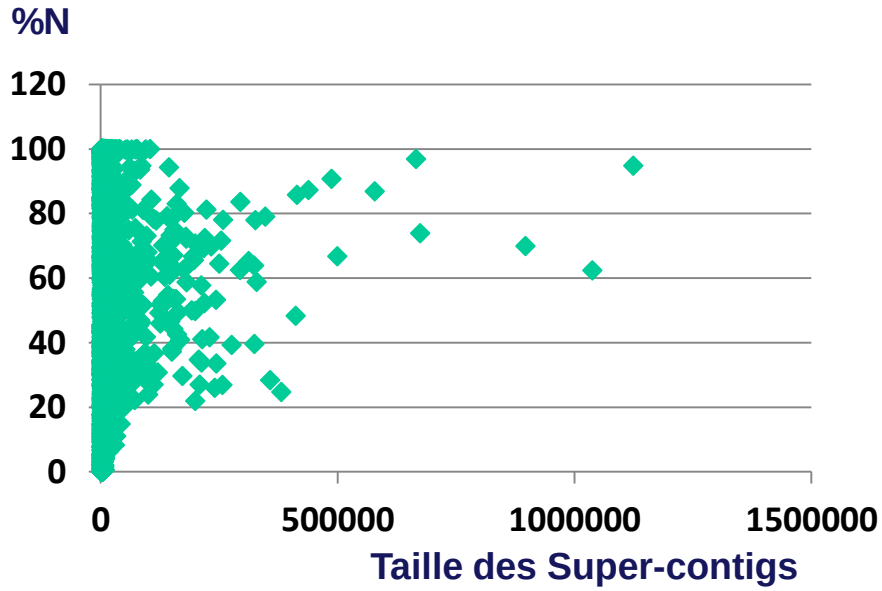
Ancrées sur un chromosome mais non orientées



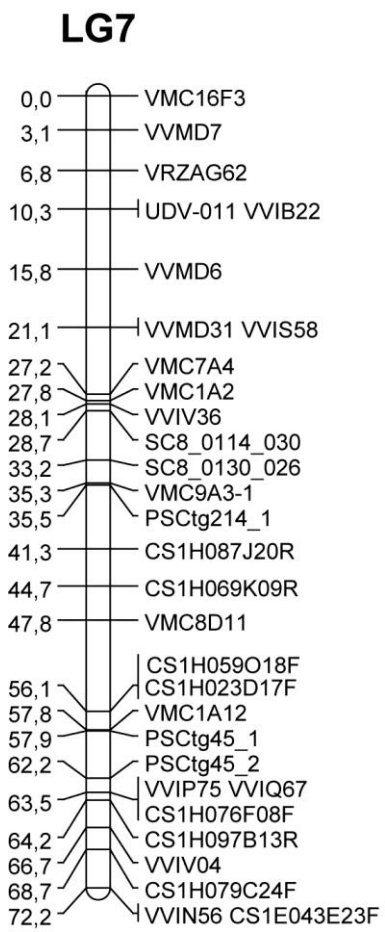


Pas ancrées sur un chromosome

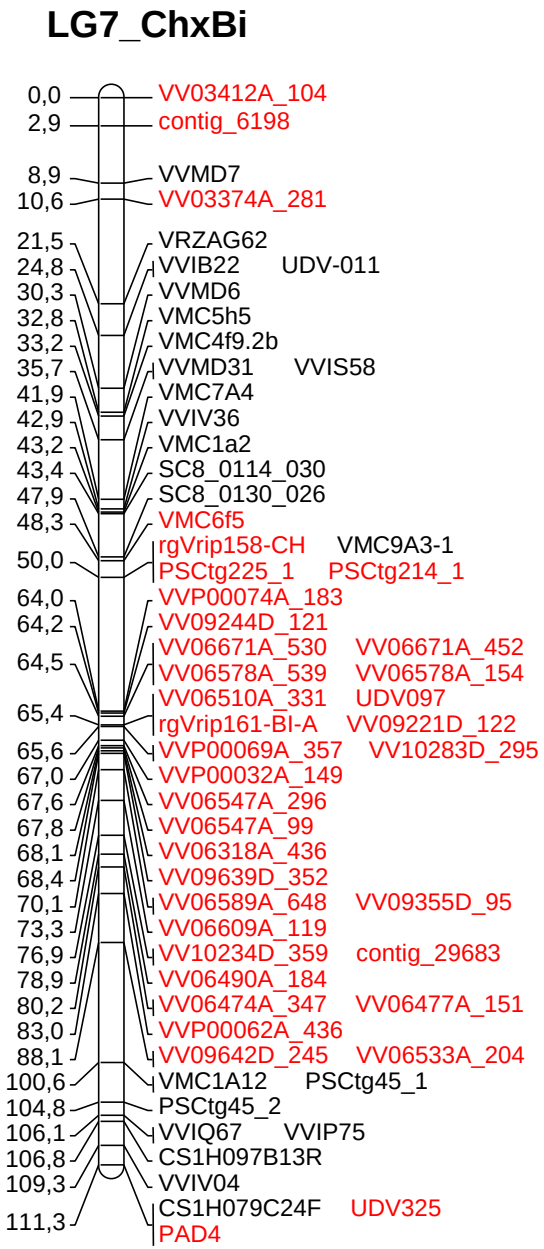




Densification des cartes génétiques



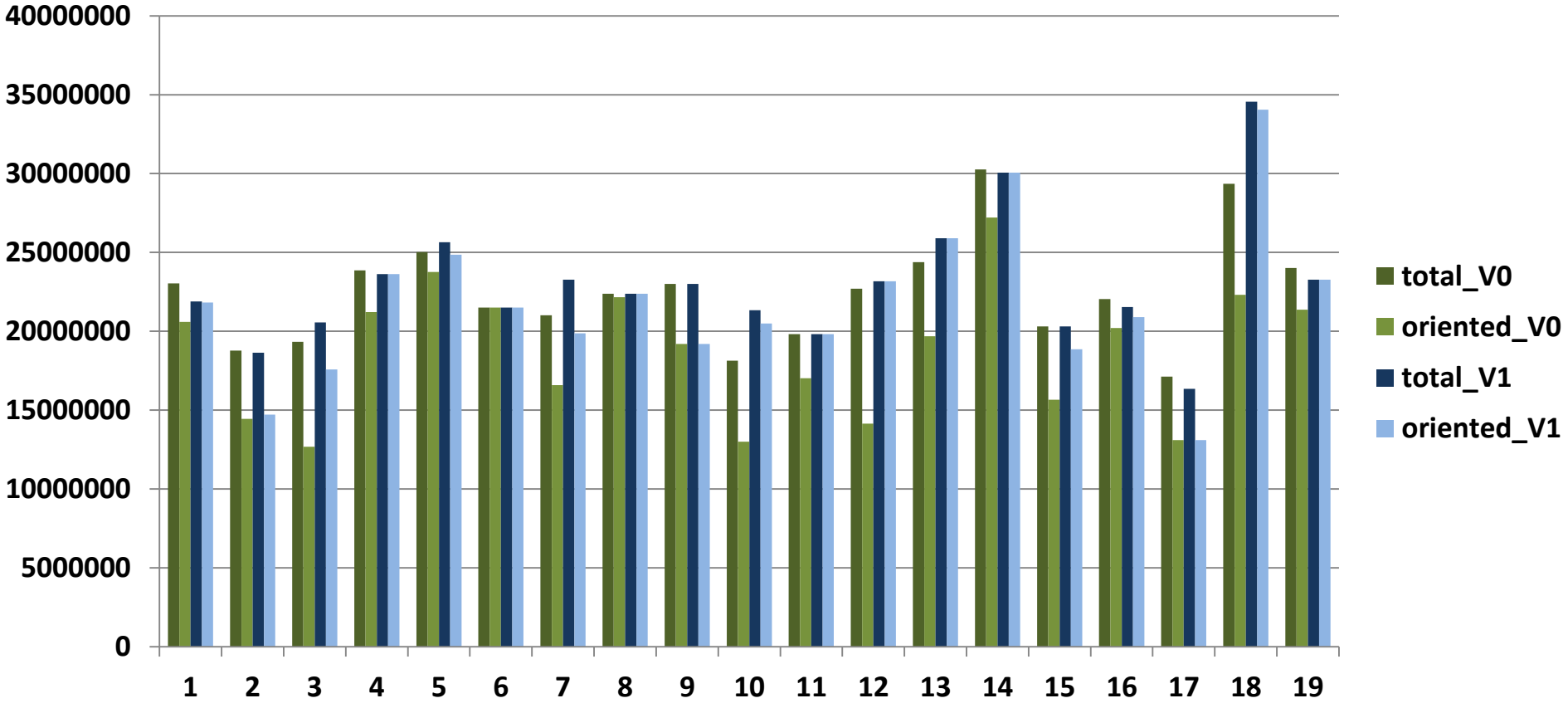
Integrated SxG and ChxBI (Cipriani et al 2011)



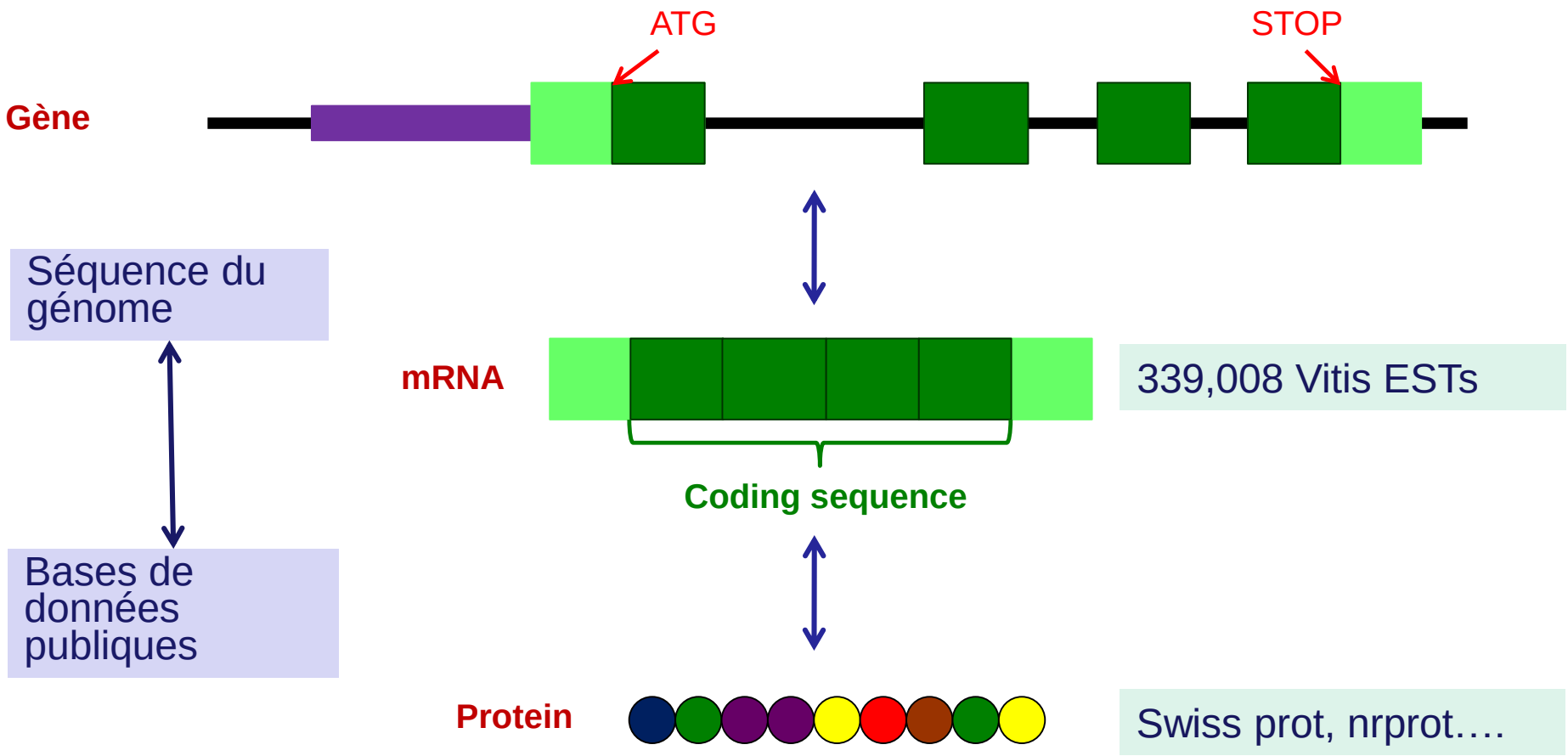
Amélioration de l'assemblage en chromosomes

V0: 426 Mb placée (85% genome) -> V1: 485 Mb placée (97%)

V0: 356 Mb placée et orientée(71% genome) -> V1: 395 Mb placée et orientée (79%)



Annotation : identification de toutes les séquences codantes par annotation automatique



Qu'est-ce qu'un EST?
Comment prédire la fonction d'un gène?

Ressources EST utilisées pour l'annotation automatique de la version 12X du génome de la vigne

1.	Viridiplantae (green plants)	:	11,004,234
2.	Embryophyta (plants)	:	10,775,868
3.	Tracheophyta (vascular plants)	:	10,535,831
4.	Spermatophyta (seed plants)	:	10,516,722
5.	Magnoliophyta (flowering plants)	:	9,839,606
6.	Eudicotyledons	:	5,222,268
7.	Vitaceae (grape family)	:	339,012
8.	Vitis	:	339,008
9.	Vitis vinifera	:	317,348

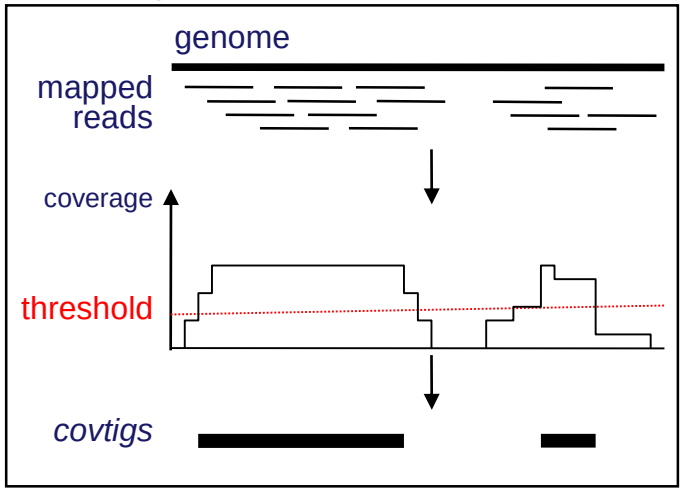
+ cDNA Consortium : 99828 clones **5 banques**

+ RNAseq (Solexa) : ~175 millions reads from 4 tissues **Feuilles, cals, racines, tiges**

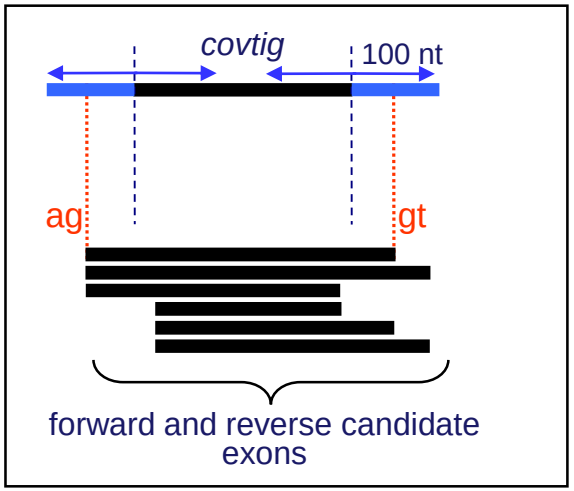
Annotation en utilisant des lectures courtes de séquences EST (Denoeud et al, 2008, Genome Biology)

- 173 millions de lectures Solexa/Illumina GA1 (36 bp)
- Beaucoup s'alignent sur des modèles de gènes
- Mais on trouve aussi des alignements sur des régions non codantes
- Développement d'une méthode pour discriminer le bruit de fond des régions codantes et pour créer des modèles de gènes en connectant des lectures courtes

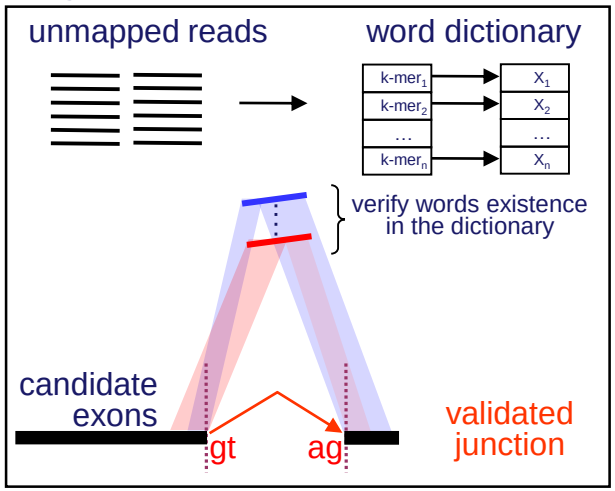
1. *covtigs* construction



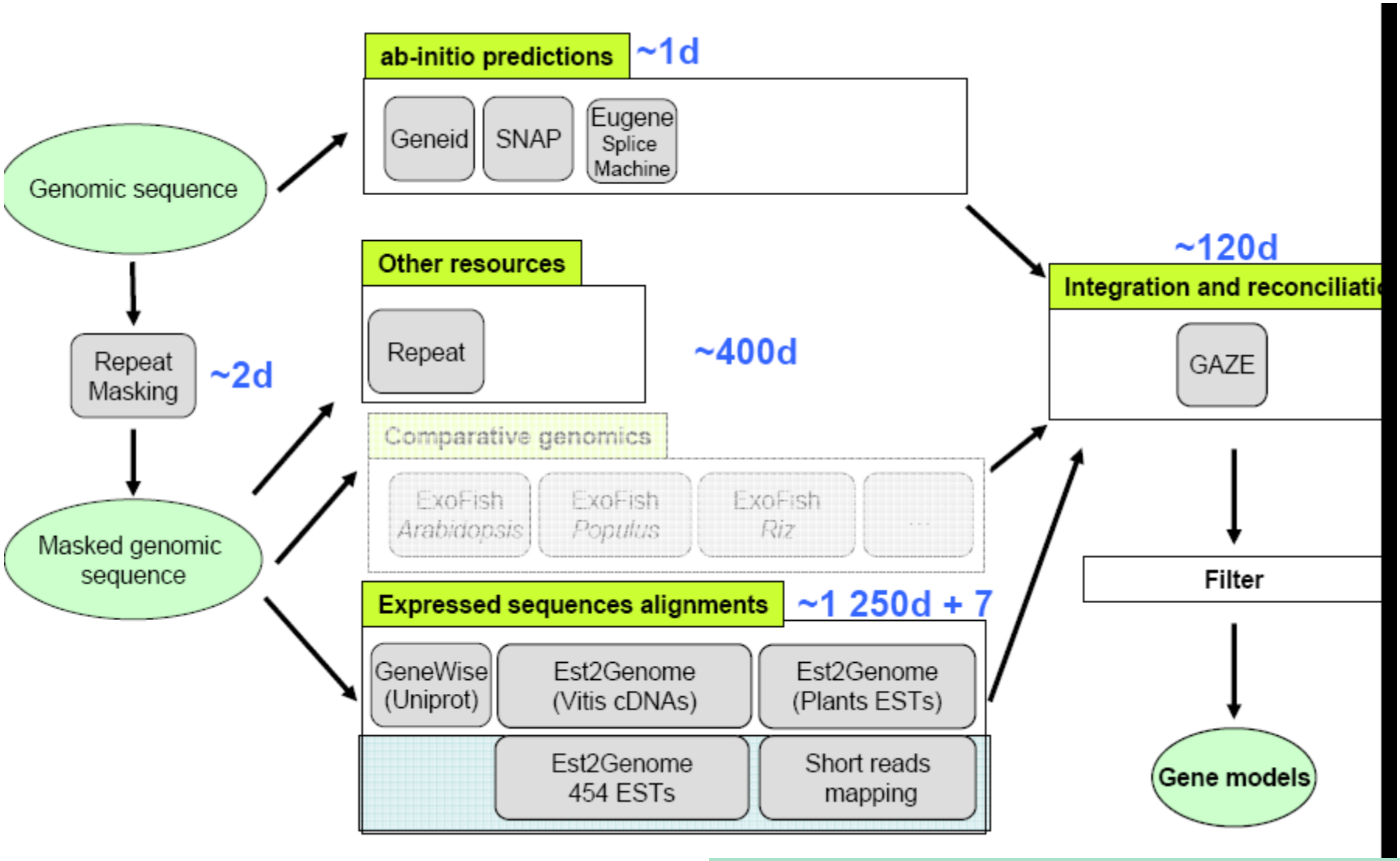
2. candidate exons



3. junction validation

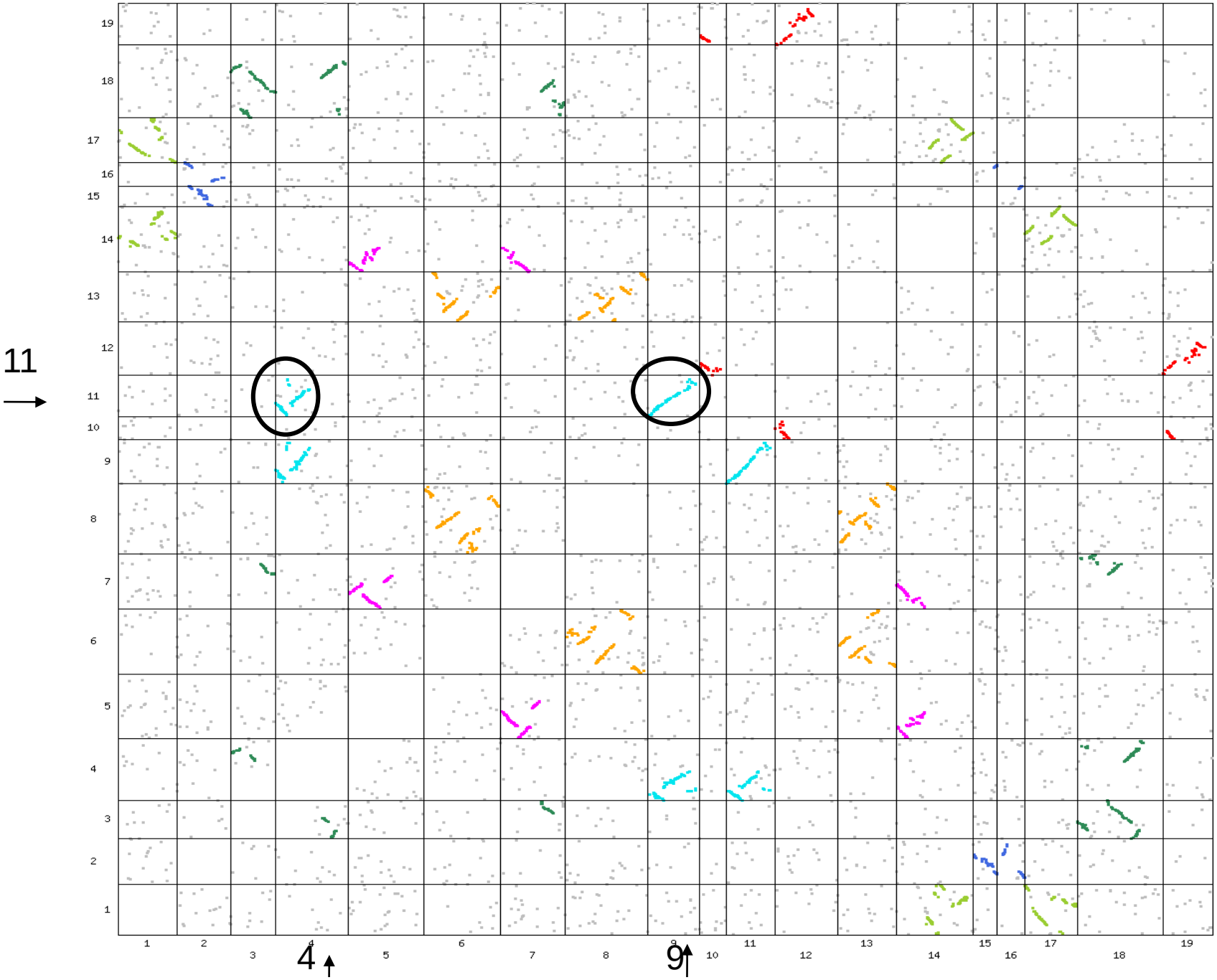


Annotation automatique avec GAZE (Howe et al Genome Res, 2002)

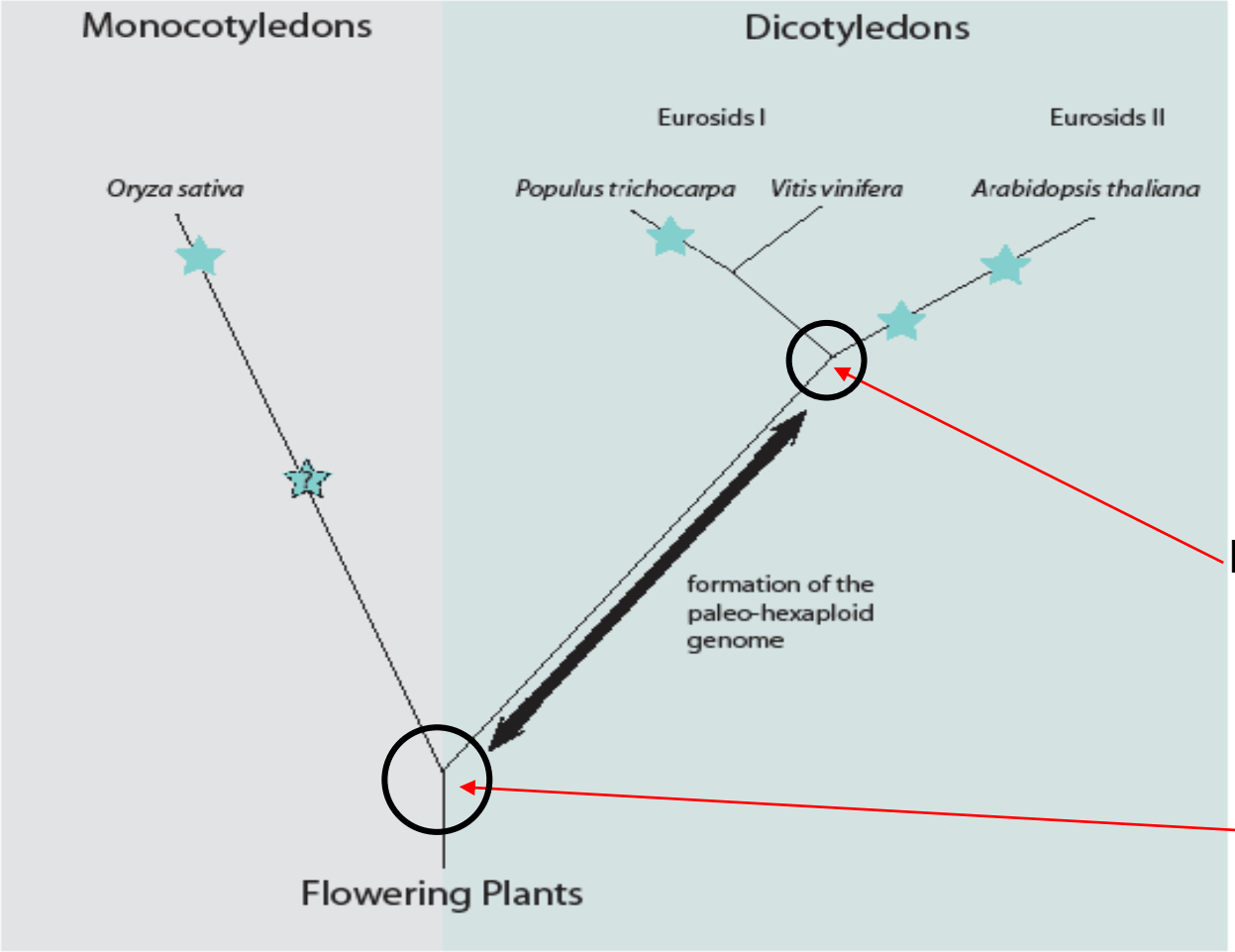


8X	30 434 modèles de gènes
12X-V0:	26 347 modèles de gènes
12X-V1:	29 971 modèles de gènes

Une annotation automatique n'est qu'une prédiction qu'il faut valider et améliorer


11
4
9

L'ancêtre de la vigne, du peuplier et d'arabidopsis mais pas des monocotylédones avait un génome hexaploïde



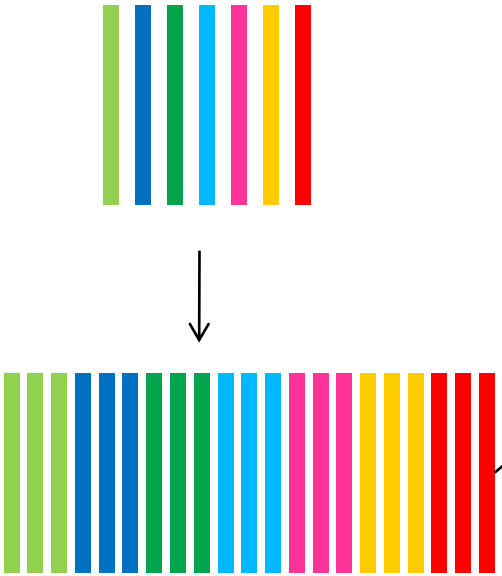
Probably less than100 Myr

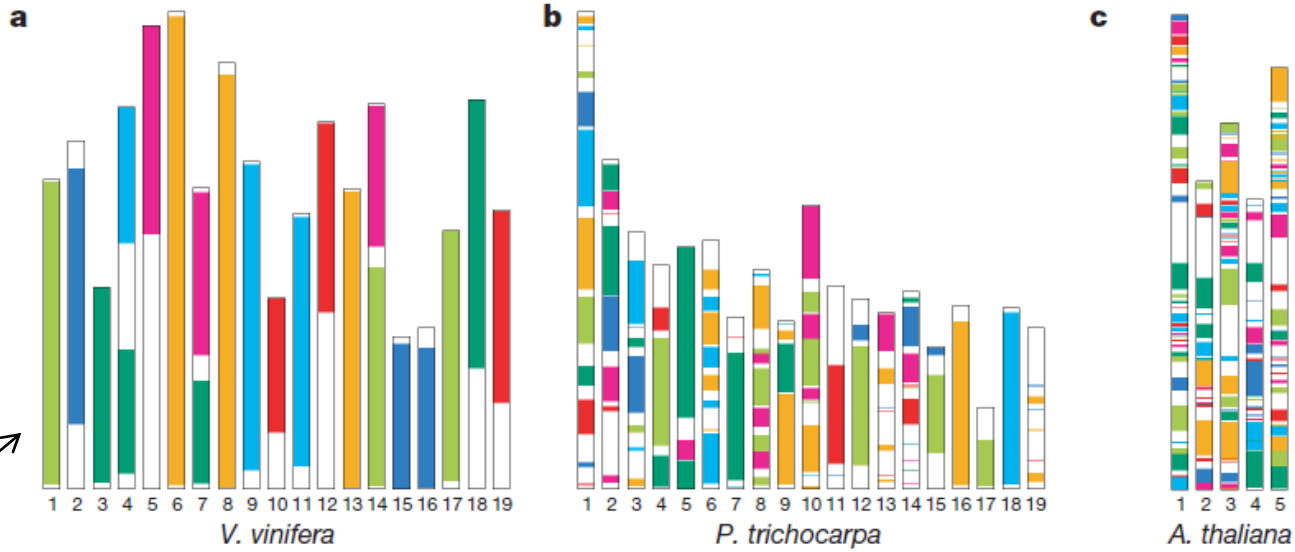
130-240 Myr

Les génomes d'Arabidopsis et du peuplier ont subi une ou deux duplications supplémentaires

Le génome actuel de la vigne a été peu remanié par rapport à celui de son ancêtre hexaploïde

Le génome de la vigne a été peu réarrangé depuis la formation de l'hexaploïde ancestral





Evolution du génome des plantes par:
- Auto ou allo-polyploïdisation suivis de réarrangements chromosomiques
- Duplications locales
- perte d'une partie des gènes dupliqués ou évolution différentielle par accumulation de mutations des différentes copies

Annotation expertisée de familles de gènes

De 30% à plus de 50% des gènes qui n'étaient pas détectés par l'annotation automatique
Jusqu'à 50% d'erreurs dans les structures prédites

Exemple de la famille des Terpène synthases, impliquées notament dans l'élaboration des arômes

- 2x plus de gènes de terpène synthase chez la vigne que dans les génomes connus:
  - **Vigne : 70** (dont 17 de la sous-famille impliquée dans les arômes floraux)
  - Arabidopsis : 32 (dont 1 de la sous famille impliquée dans les arômes floraux)
  - Peuplier : 50
  - Riz : 40

- Famille qui doit évoluer de façon très dynamique chez la vigne

- Caractérisation fonctionnelle de 39 TPS de vigne : substrats et produits très diversifiés

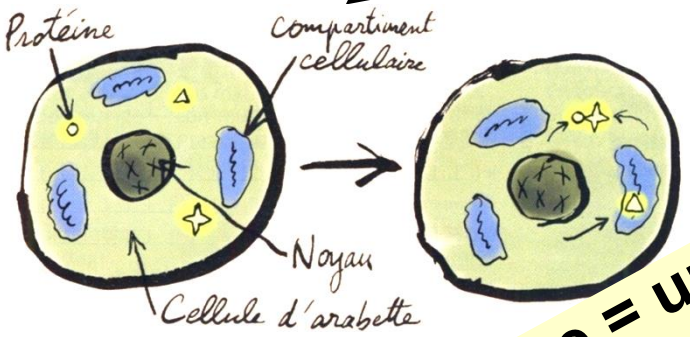
Liens avec la variabilité aromatique des cépages?

Martin et al, BMC Plant Biol 2010

4
Le génomique fonctionnelle : déterminer la fonction des gènes et leur réseaux de régulation

Les outils de la génomique fonctionnelle

Où se trouve la protéine ?
Avec qui interagit-elle ?



Où le gène est-il actif ?
- dans quel tissu ?
- à quel stade ?
- dans quelles conditions ?

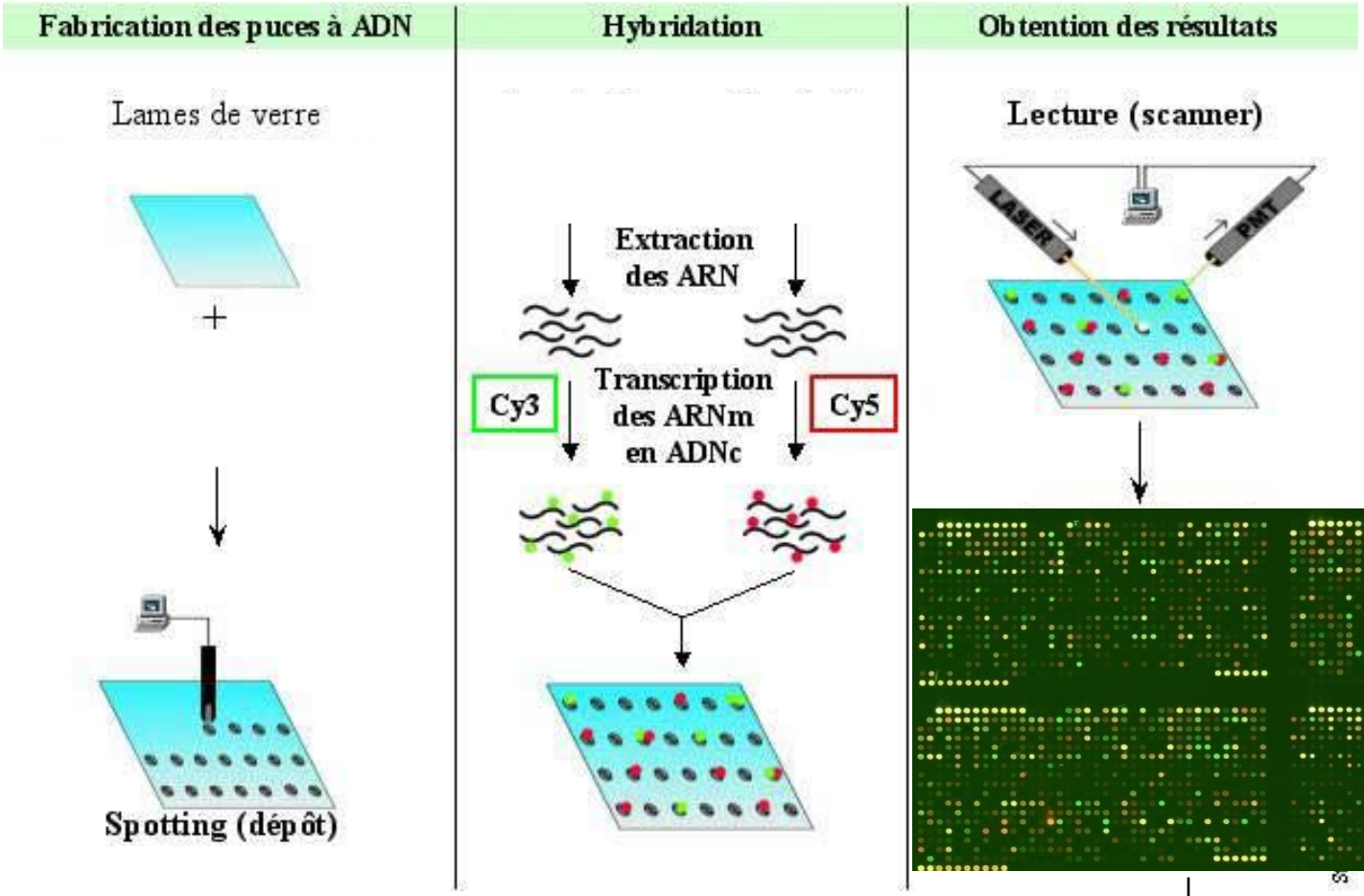
Un gène = une thèse
30000 gènes = 30000 thésards ??!

Que se passe-t-il si le gène est manquant ?

D'après C Lurin

Transcriptomique : où les gènes sont-ils exprimés?

Puces avec des oligonucleotides correspondant à l'ensemble des gènes d'un génome

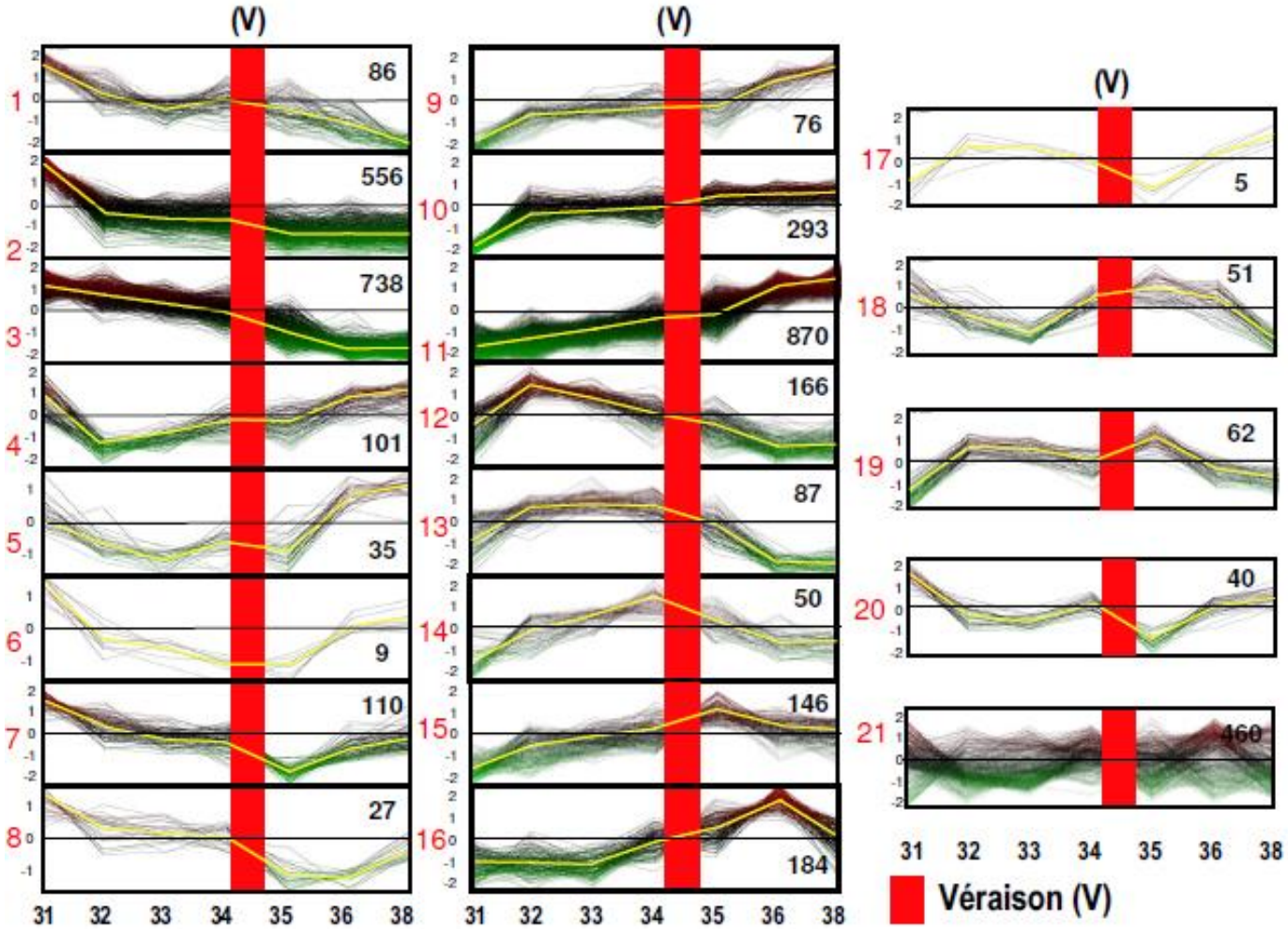


Traitement des données : bioinformatique importante

Possibilité de mettre en évidence de réseaux de gènes co-régulés

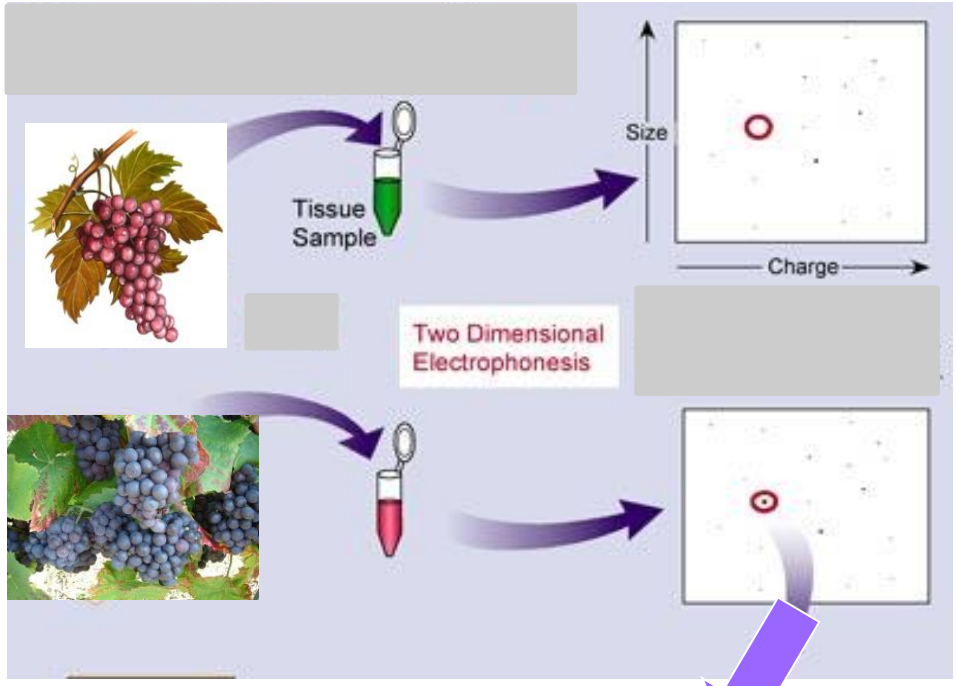
(Deluc et al BMC Genomics 2007)

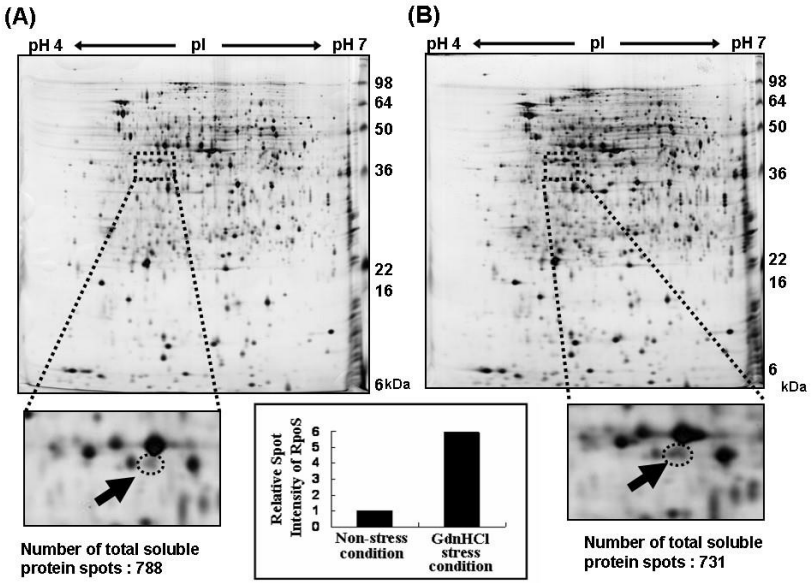
Au cours de la maturation de la baie



Possibilité d'utiliser les nouvelles méthodes de séquençage (Zenoni et al Plant Physiol 2010) : mais encore cher et méthodes statistiques en développement

La protéomique: où les protéines sont-elles produites?

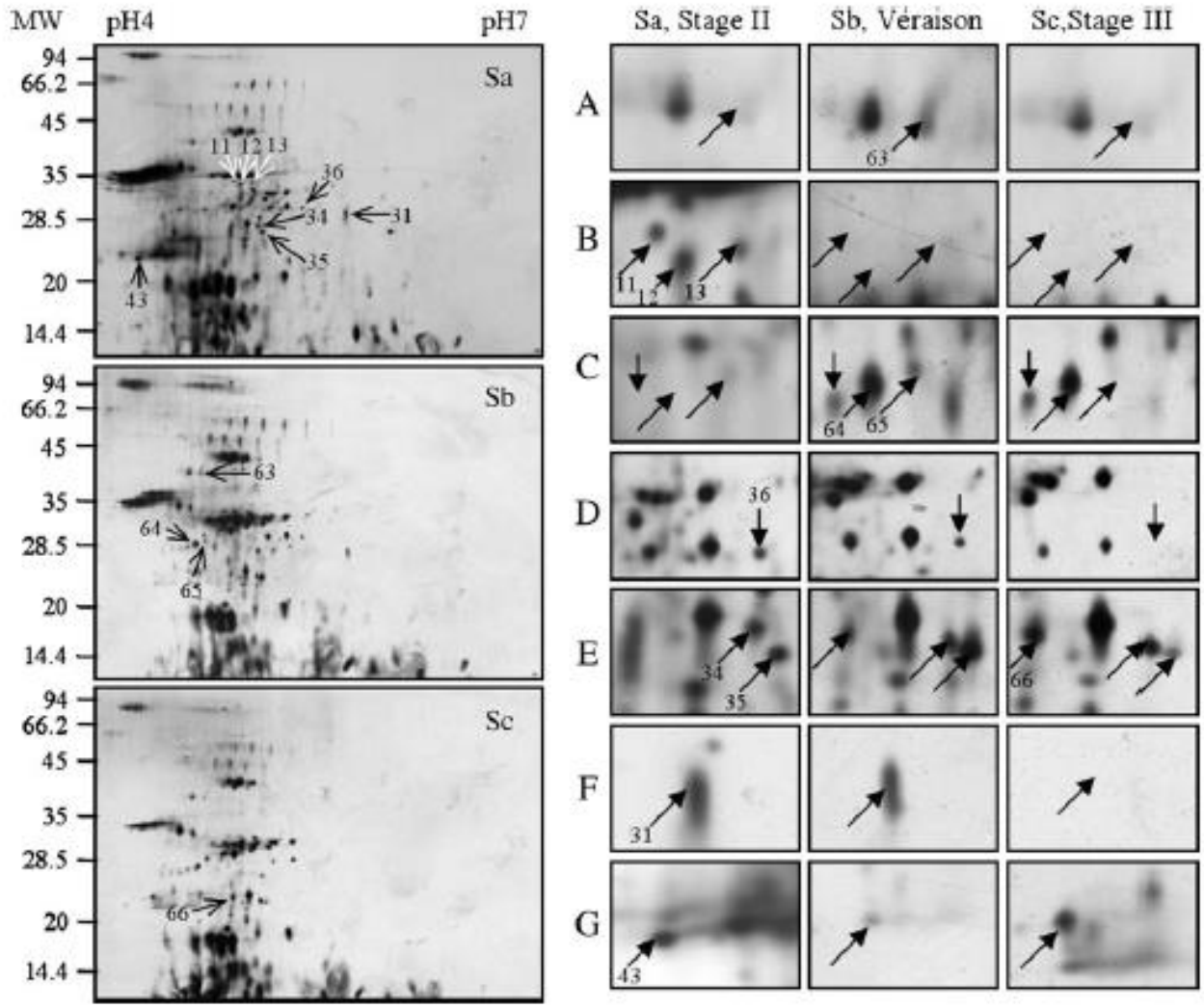




Profil peptidiques par Spectrométrie de Masse
Identification par comparaison à des profils connus

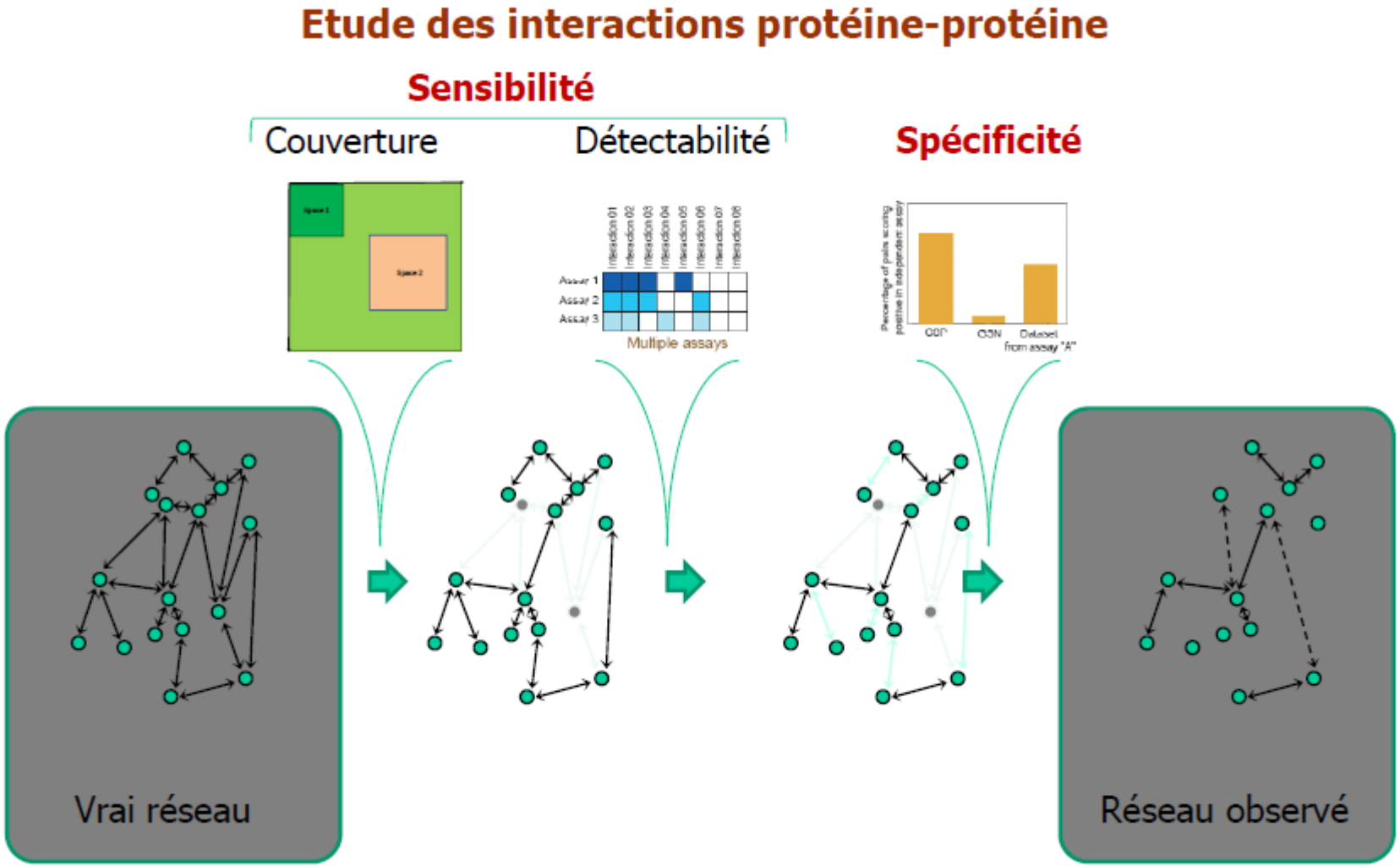
- Extraction des protéines différentes suivant leurs propriétés biochimiques
- Pas encore de méthode d'évaluation quantitative
- Plus problématique quand le génome n'a pas été séquencé
- Détection des modifications post-traductionnelles

Etude du protéome des membranes plasmiques des baies à trois stades de développement (Zhang et al, J Exp Bot, 2008)



Identification de 119 protéines en MALDI-TOFF

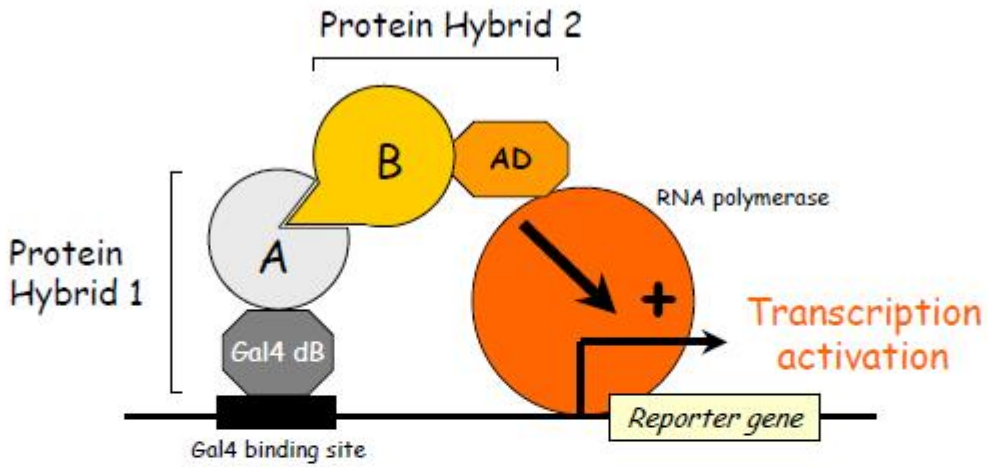
La protéomique: avec qui les protéines interagissent-elles?

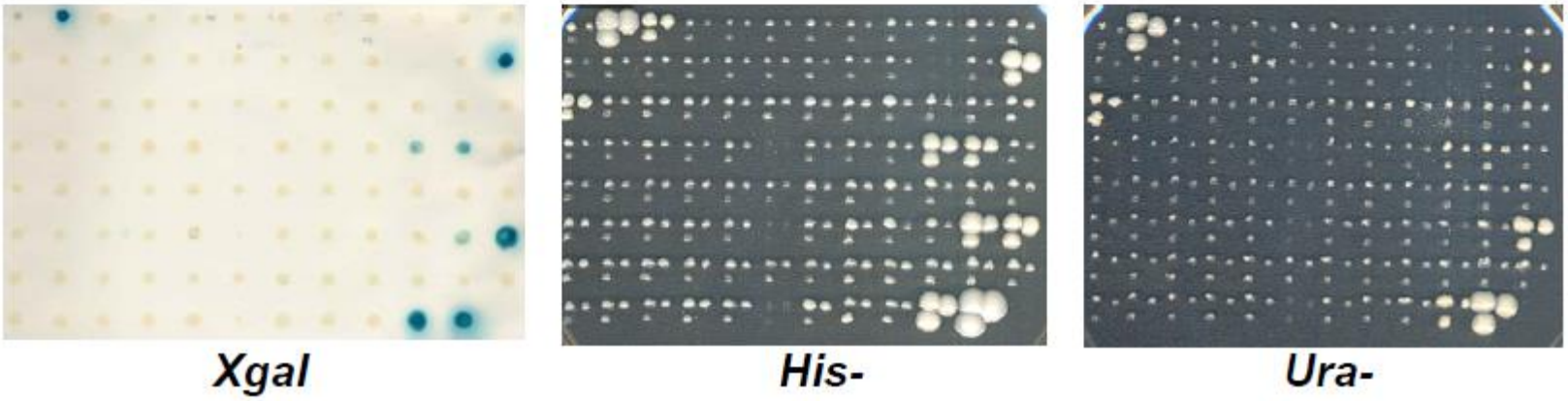


D'après C.Lurin

La protéomique: avec qui les protéines interagissent-elles?

Double hybride chez la levure





30 000 gènes => 9 10^8 interactions deux à deux à tester!

D'après C.Lurin

La génétique inverse : quel est l'effet sur la plante lorsqu'un gène n'est plus fonctionnel?

Mutagénèse chimique/physique: U.V, rayon X, EMS …
substitutions, délétions;
mutations ponctuelles difficiles à localiser dans le génome

Mutagénèse insertionnelle : T-DNA (ou Transposon)

mutants perte de fonction;

Mutants étiquettés

souvent plusieurs T-DNA/transposons dans un transformant

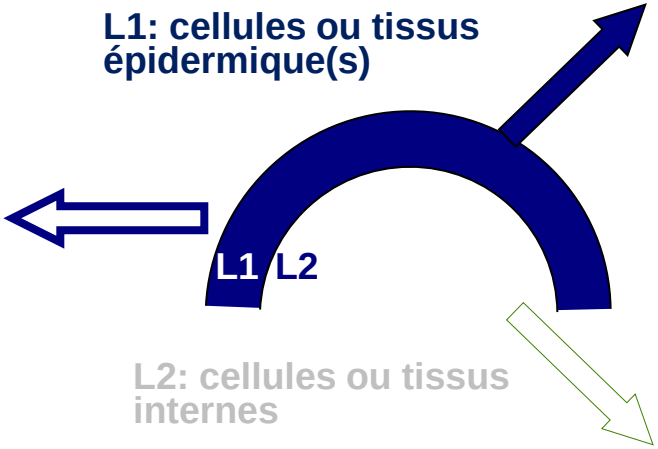
Chez la vigne

✓Essais de collection mutants EMS sans succès

✓ Problème d'efficacité de transformation
✓Collection difficile à maintenir

Il existe des mutants naturels chez la vigne, mais ce sont souvent des chimères

Pinot gris



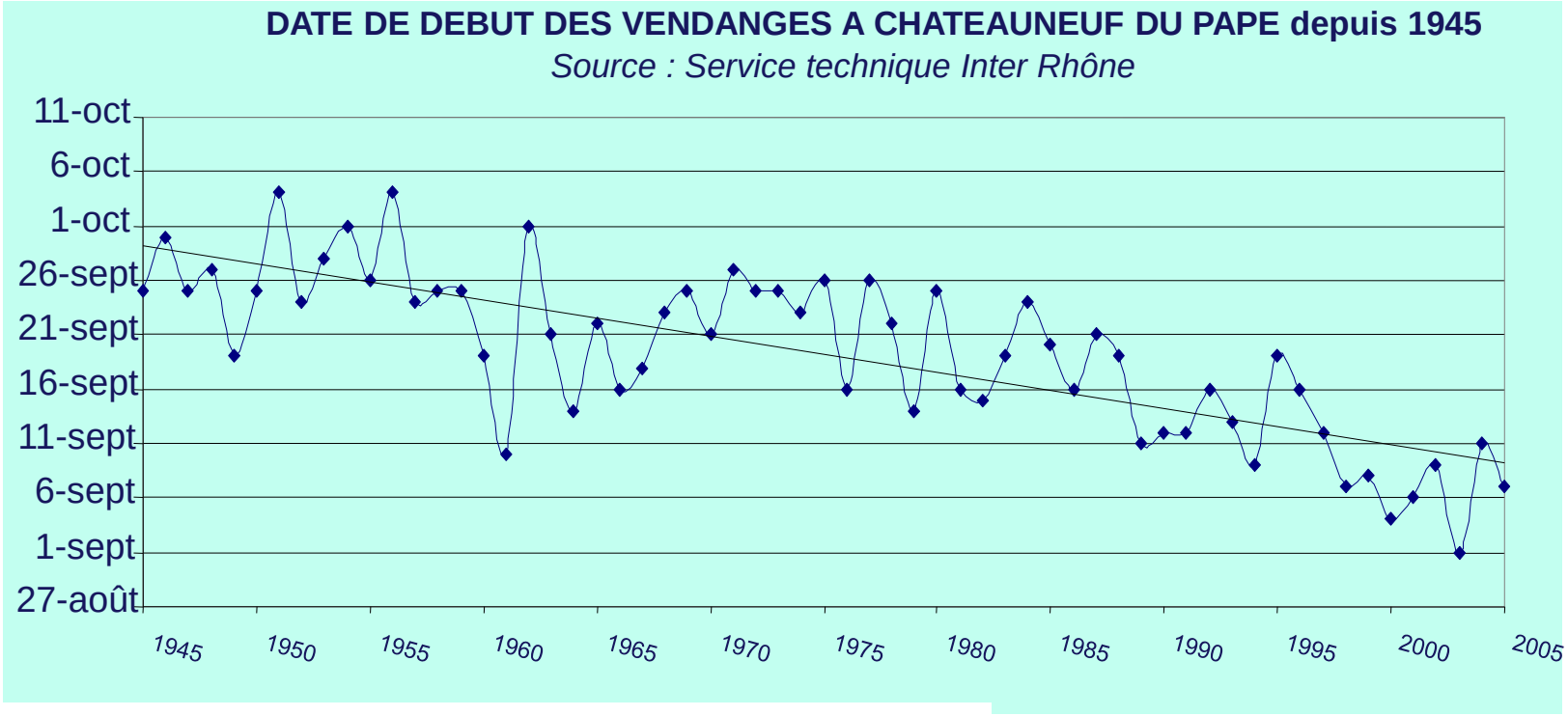
Plante obtenue par régénération d'embryons somatiques L1
Type Pinot noir

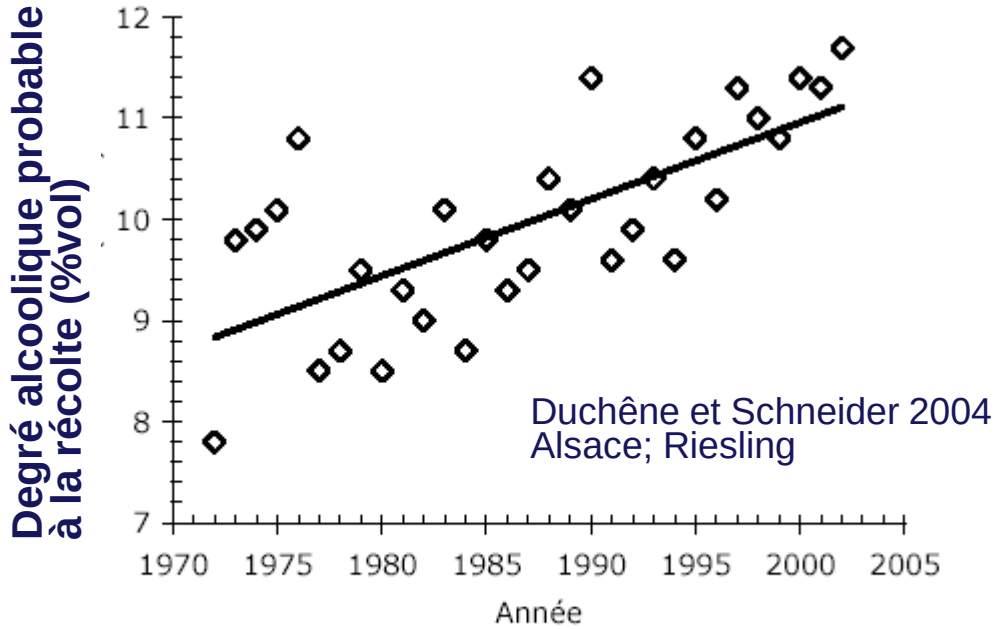
Plante issue d'autofécondation (L2)
Type Pinot blanc

5
Champs d’Applications

Deux problèmes essentiels

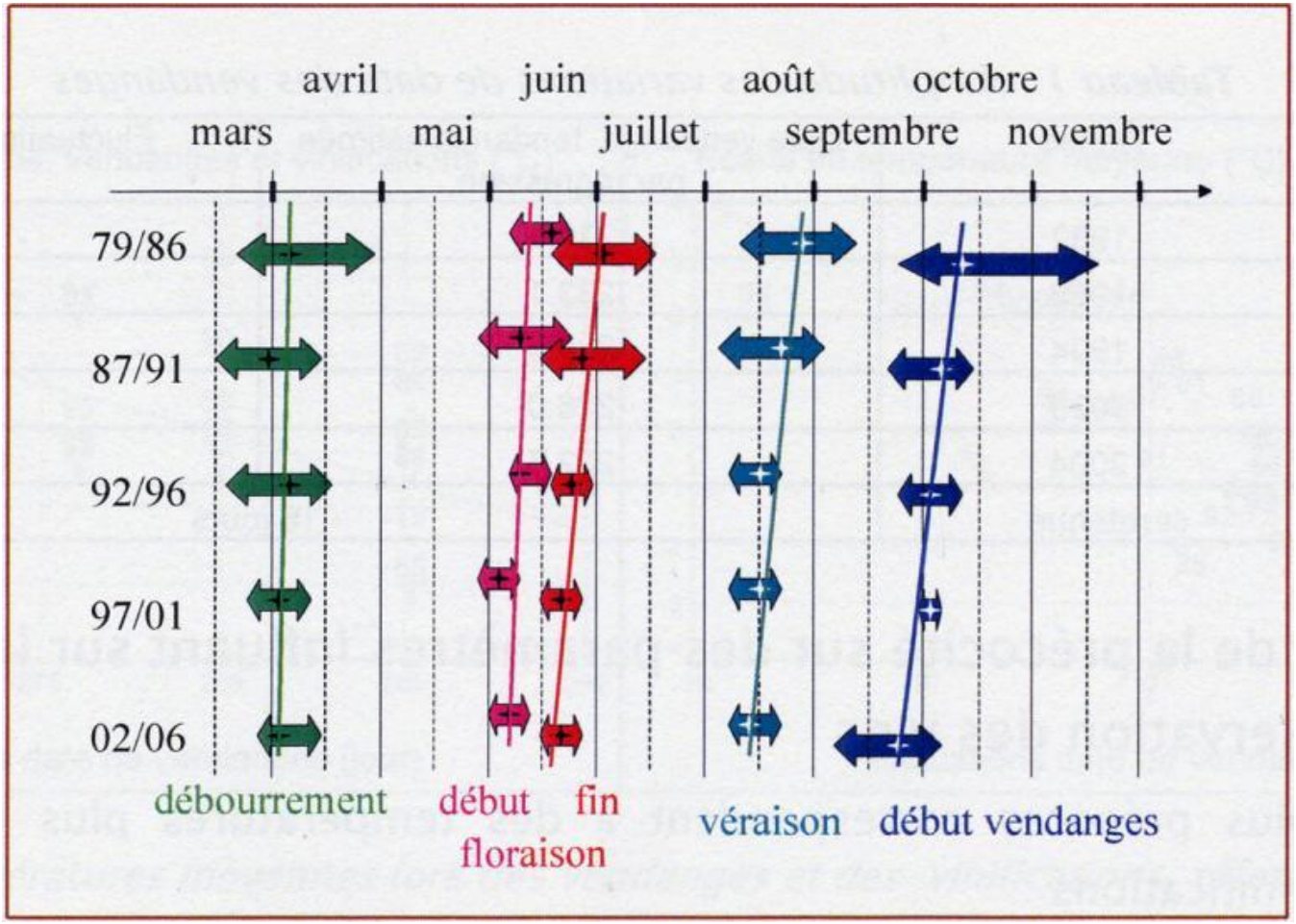
- Qualité en relation avec l’adaptation à l’environnement
- Contrôle des maladies





Synchronisation entre maturité phénolique et maturité alcoolique

J-P Gotouly, ISVV, 2008



- Raccourcissement du cycle végétatif
- Précocité des stades phénologiques
- Décalage du cycle vers les périodes chaudes de l’été

Biologie intégrative

Comment prédire le phénotype à partir des informations disponibles : génotype, environnement ? Comment construire de nouveaux idéotypes variétaux?

Modélisation à différentes échelles

Tardieu&Tuberosa 2010
Marguerit et al 2012

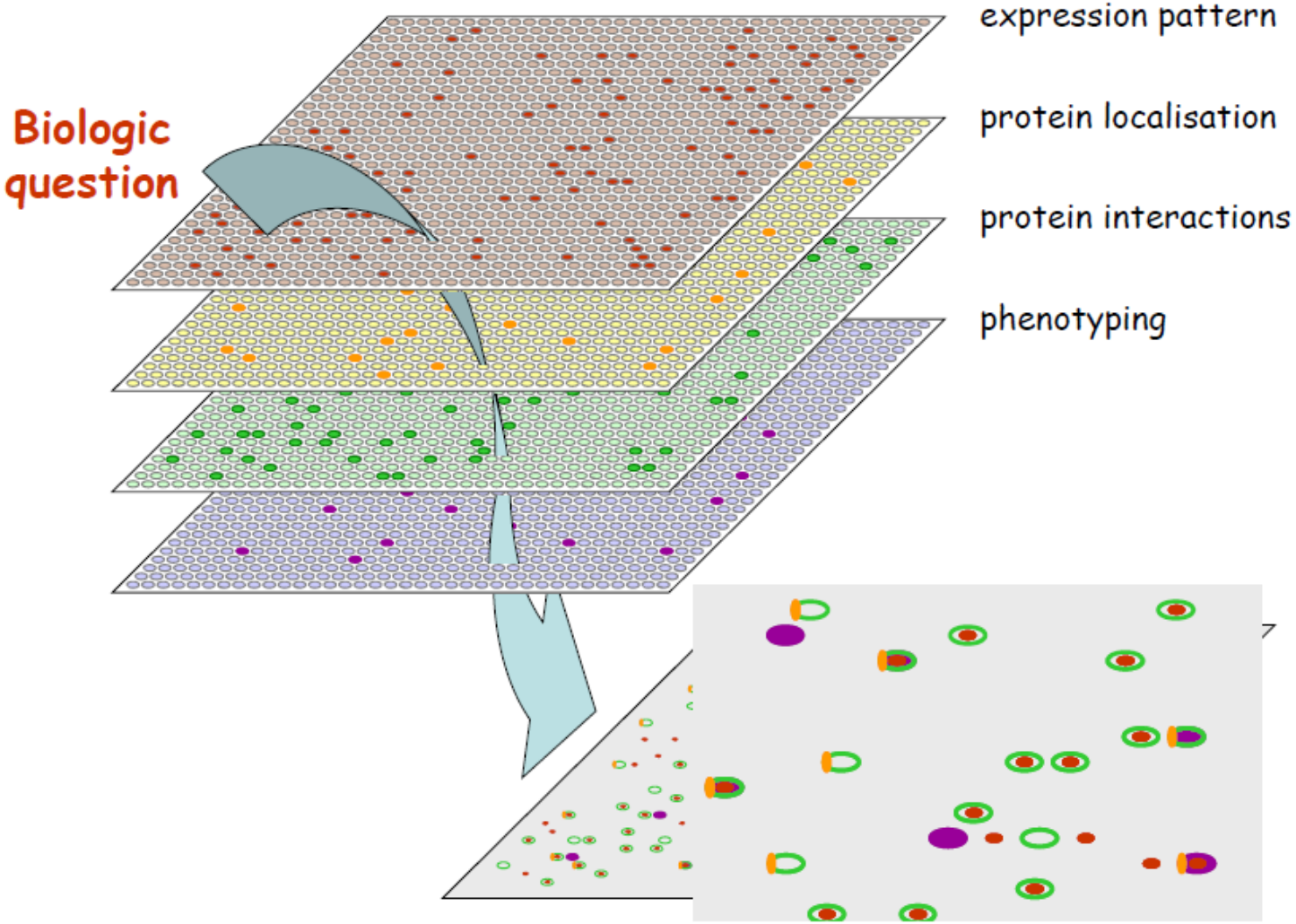
Cell Organ Plant Vineyard Region/landscape

Génomique

From S. Delrot

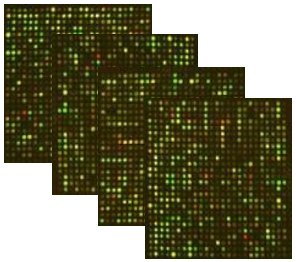
ISVV INSTITUT DES SCIENCES DE LA VIGNE ET DU VIN BORDEAUX AQUITAINE

Intégration de données: vers la génomique prédictive



Intégration de données: vers la génomique prédictive

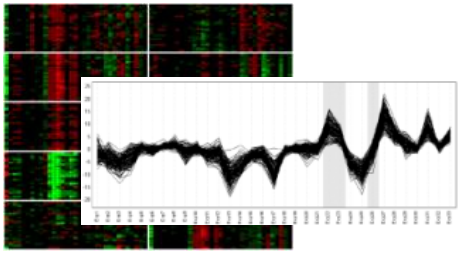
Une ressource
transcriptome
(Ex: 8000 hybridations chez
A. thaliana dans CatDB)



RNA-seq

Modèles statistiques de mélange

interactome

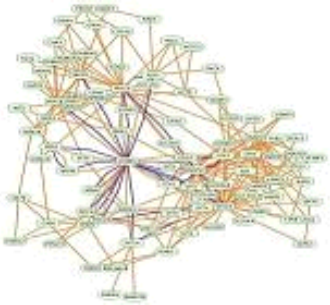


Clusters de gènes co-régulés
dans des conditions données

phosphoprotéome

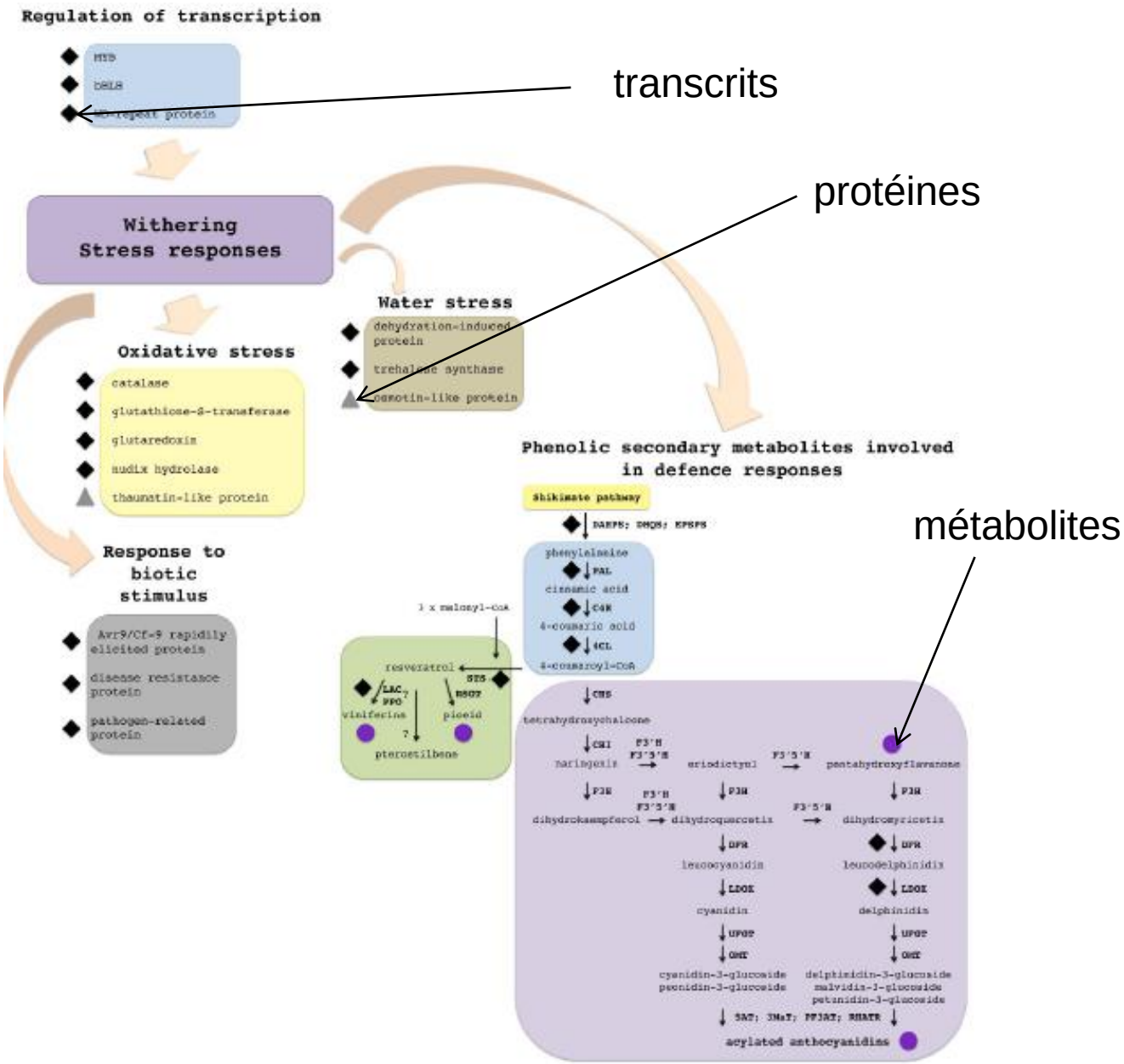
Modèle
Graphique Gaussien

Réseaux fonctionnels

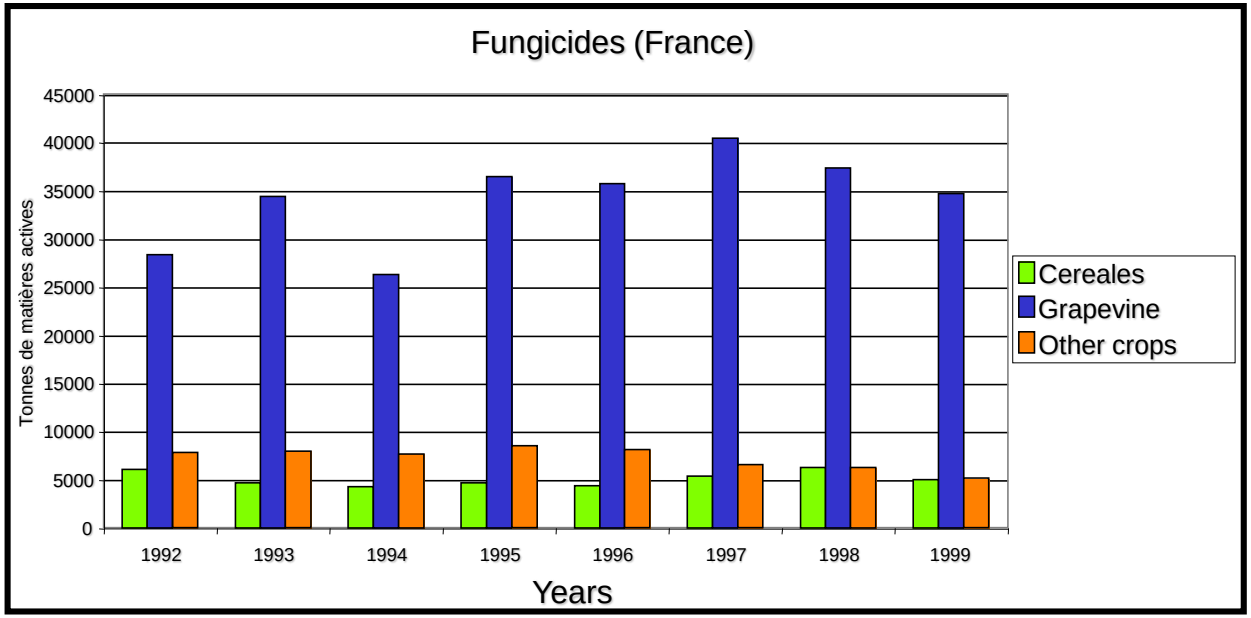


Informatique, mathématiques et bases de données

Intégration de données de transcription de gènes, de protéome et de métabolome au cours de la sur-maturation de la baie (Zamboni et al Plant Physiol 2010)



Intérêt de développer des variétés résistantes aux maladies fongiques



Utilisation de fongicides en agriculture

Ces résistances doivent être durables

⇒combiner plusieurs mécanismes de défense/résistance dans une même variété

⇒Combiner les approches génétiques, agronomiques, phytosanitaires

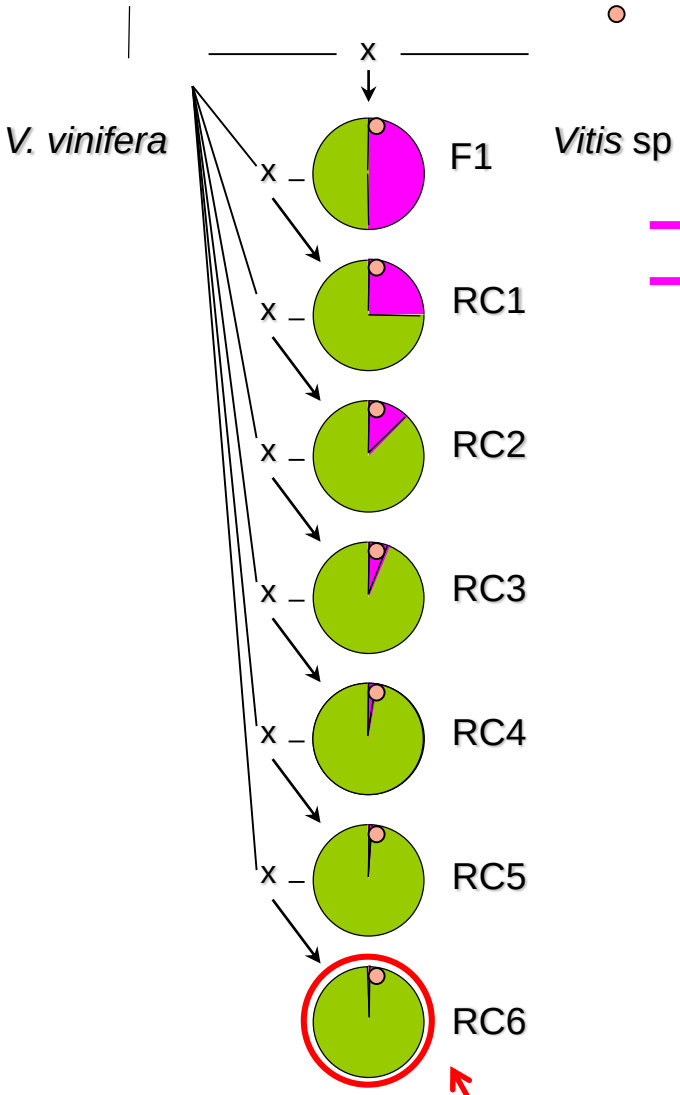
Les sources de résistance sont dans le complexe des Vitaceae

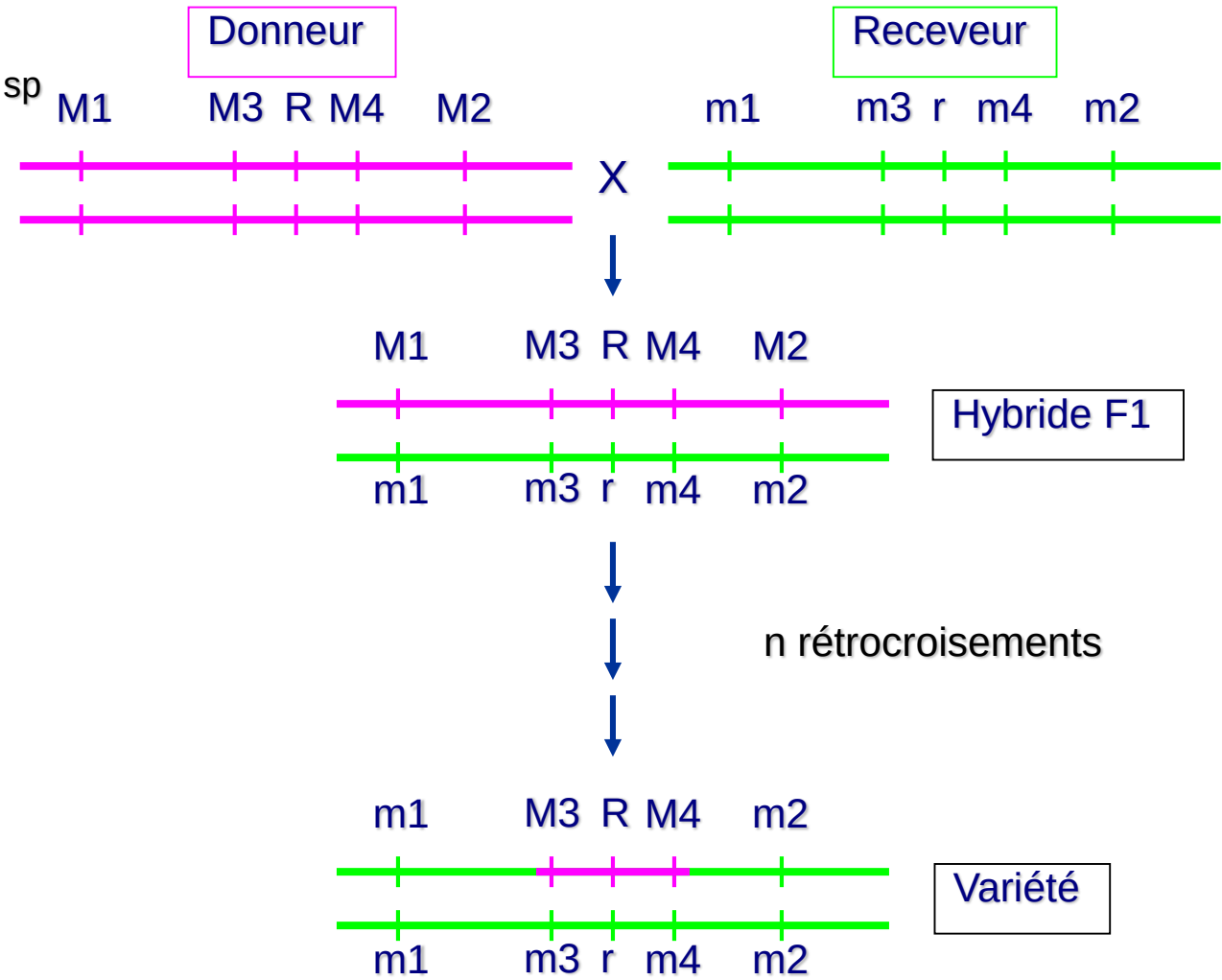
Pathogen	Source of resistance	Reference
P. viticola	*V. riparia*	Marguerit *et al* 2009
		Grando *et al* 2003
	Complex hybrid	Fischer *et al* 2004
E. necator	*M. rotundifolia*	Barker *et al* 2005
	M. rotundifolia	Eibach *et al* 2007
	V. Vinifera	Hoffmann *et al* 2008; Coleman *et al* 2009
X. fastidiosa	*V. arizonica'*	Krivanek *et al* 2006
	V. arizonica × *V. candicans*	Riaz *et al* 2008
D. vitifolia	*V. riparia* × *V. cinerea*	Zhang *et al* 2009

Travail avec des croisements interspécifiques : problèmes?

Aller de la sélection assistée par marqueurs à la sélection génomique

Sélection assistée par marqueurs de nouvelles variétés durablement résistantes aux maladies





D. Merdinoglu, 2006

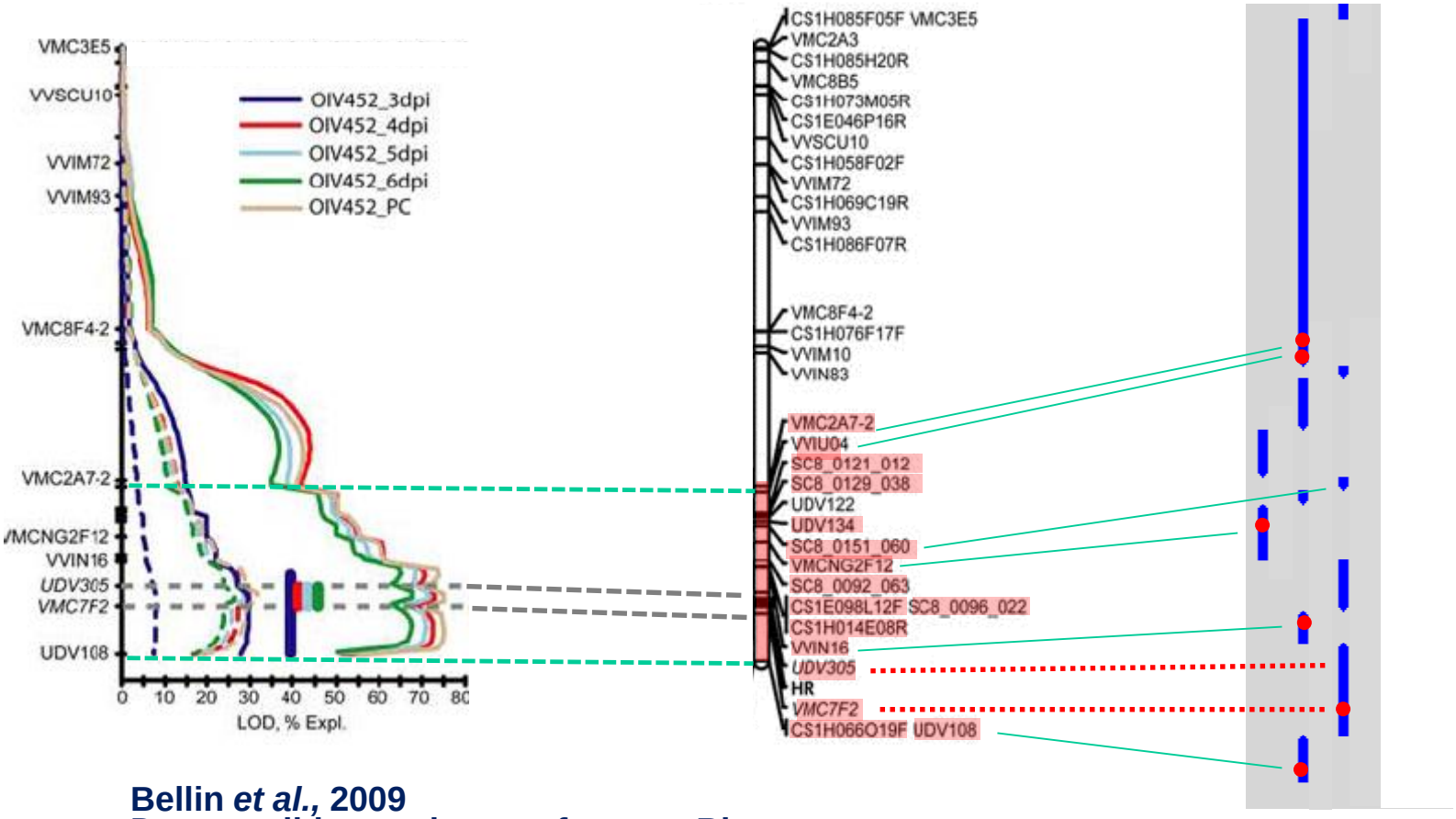
V. vinifera nouvellevariété D

Génomique comparative entre différentes espèces de la famille des Vitaceae

QTL Chromosom 18

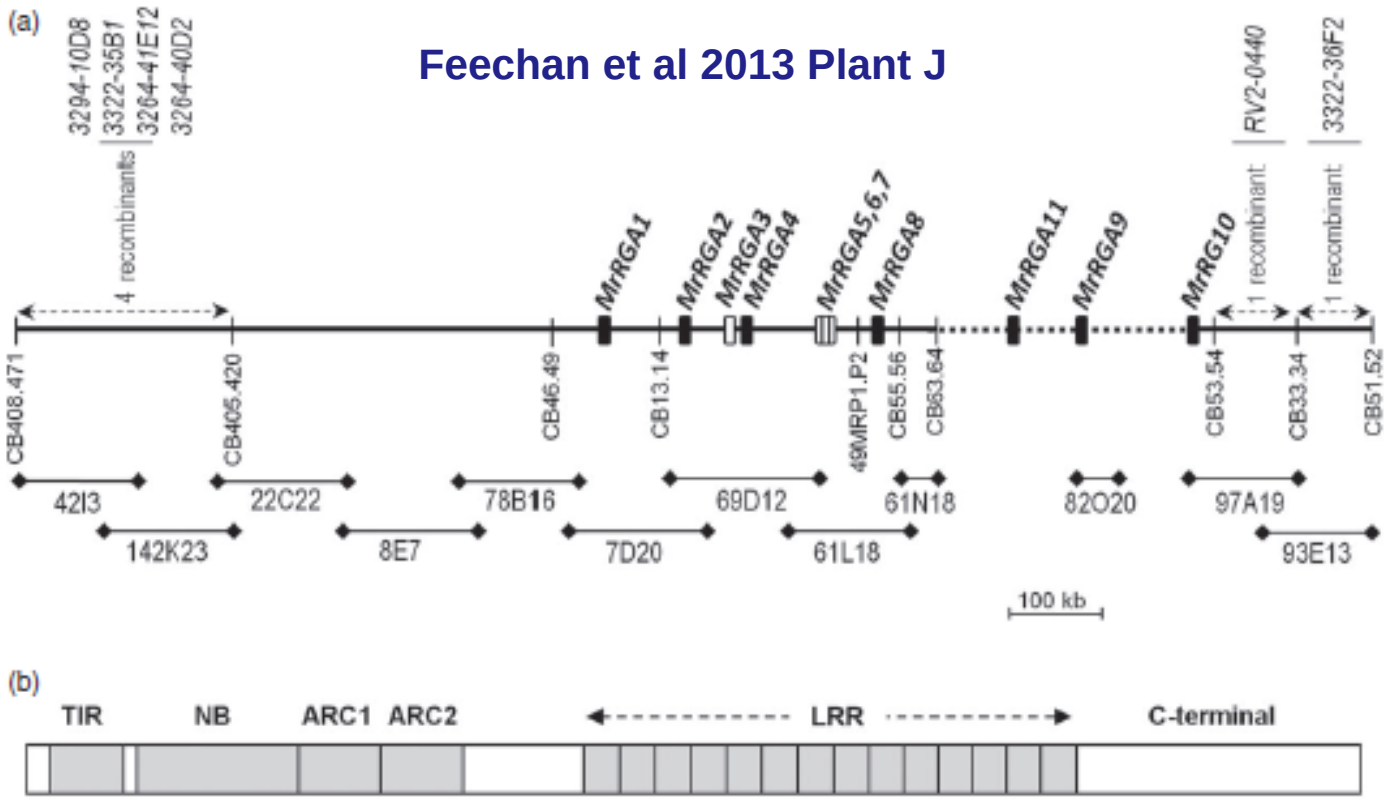
Reference genetic map

Genome sequence



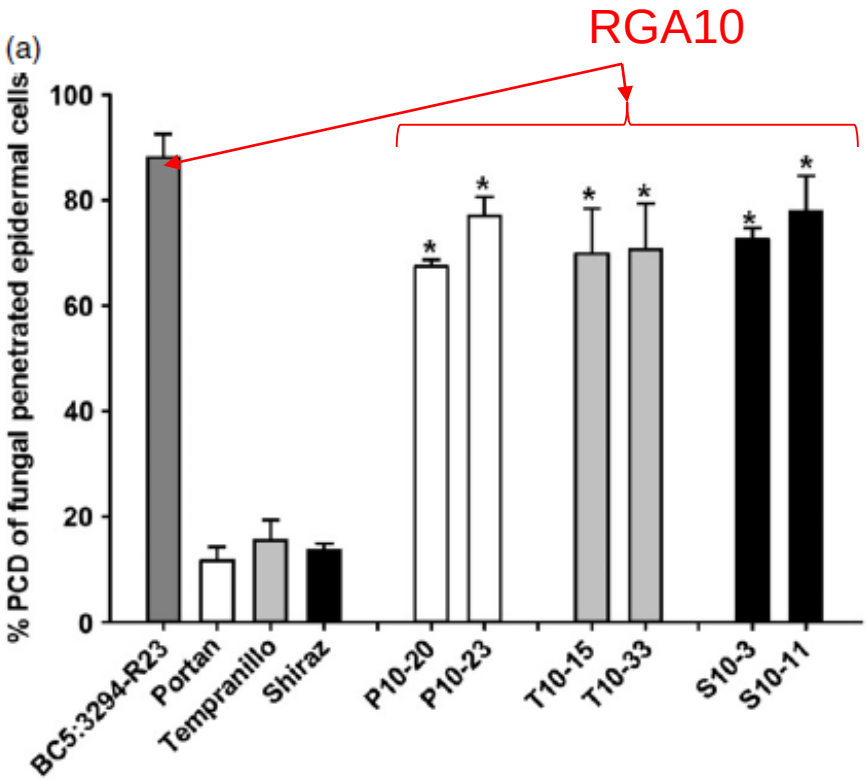
Bellin *et al.*, 2009
Downy mildew resistance from cv. Bianca

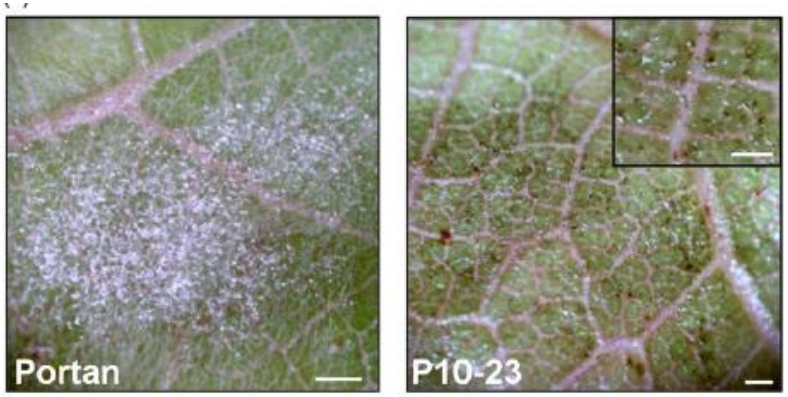
Caractérisation moléculaire d'une source de résistance à l'oïdium et au mildiou (16 ans de collaboration INRA-CSIRO)



- Résistance totale à l'oïdium (Run1) et partielle au mildiou (RpV1) provenant de *Muscadinia rotundifolia* cartographié génétiquement grâce à des populations générées à l'INRA par Alain Bouquet (plus d'un milliers de plantes criblées)
- Une banque de grands fragments d'ADN de muscadine alignée sur la carte génétique et séquencée (CSIRO) => mise ne évidence d'un groupe de gènes candidats

Isolement du gène de résistance à l'oïdium: RGA10 = Run1



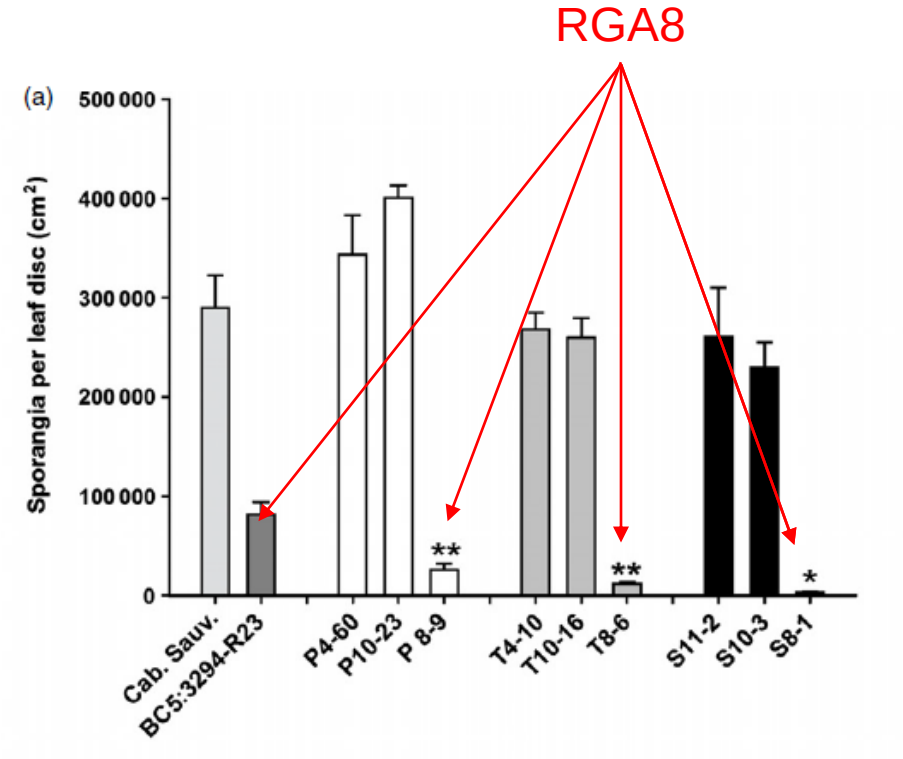


Des plantes sensibles à l'oïdium (e.g. cv Portan) dans lesquelles on a transféré le gène RGA10 provenant de la Muscadine deviennent totalement résistantes à l'oïdium

% de cellules pénétrées par une conidie qui expriment une mort cellulaire programmée similaire avec le témoin résistant (BC5-3294-R23)

Feechan et al 2013 Plant J

Isolement du gène de résistance au mildiou: RGA8 = Rpv1



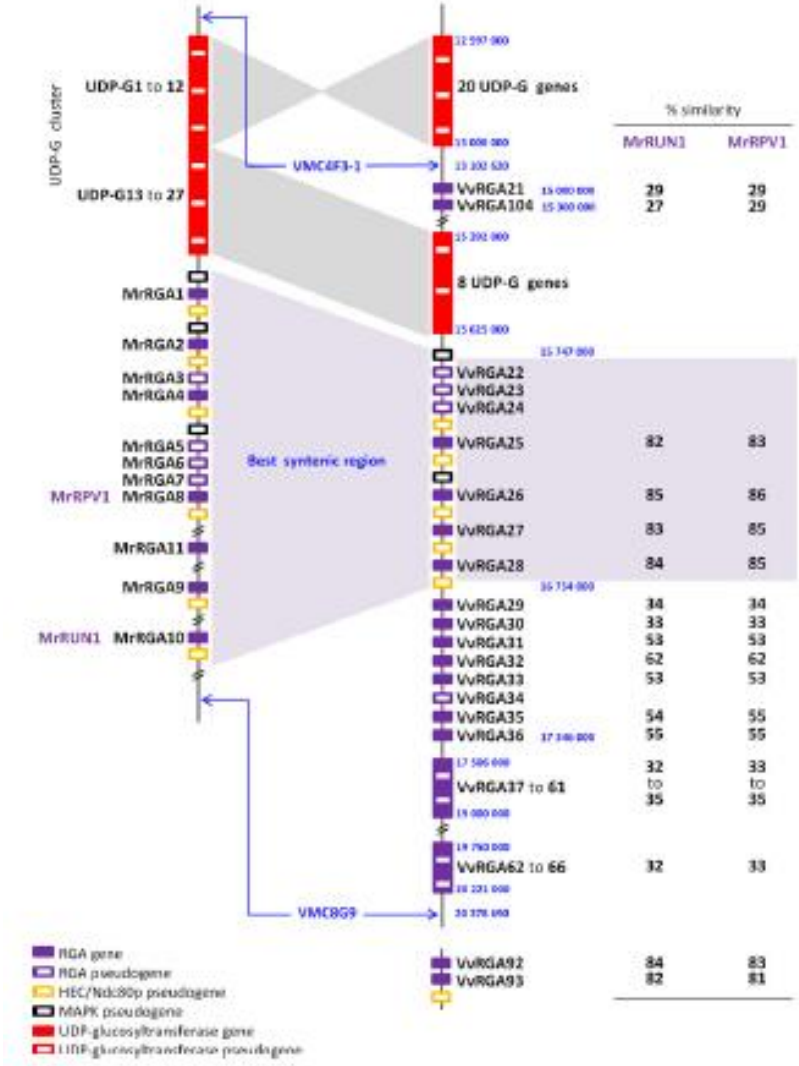
Des plantes sensibles à l'oïdium (e.g. cv Portan) dans lesquelles on a transféré le gène RGA8 provenant de la Muscadine présentent de très hauts niveaux de résistance au midiou

% sporanges similaires voir même plus bas que chez le témoin résistant (BC5-3294-R23)

Feechan et al 2013 Plant J

Les regions homologues chez *V. vinifera* et *M. rotundifolia* sont très différentes

Muscadinia V. vinifera



Une inversion et une évolution différente du cluster de gènes NBS-LRR auquel appartiennent Run1 et Rpv1

Feechan et al 2013 Plant J

Création variétale

Caractères pour lesquels des études génétiques ont été menées

Résistance (Oïdium, Mildiou)
Sexe
Fertilité
Arome Muscat
Taille de la baie
La couleur
La composition en tannins et anthocyanes
L'apyrénie
L'acidité, la compacité, la longueur et la largeur de la grappe…..

•Résistance aux maladies : travail dans un complexe d'espèces => génomique comparative
•Cumul dans une même variété de nombreux critères à déterminisme polygénique => nombreux marqueurs nécessaires et demande du temps!
•Durabilité de la résistance dans le temps => cumul de plusieurs gènes de résistance à un même pathogène nécessaire
•Nouvelles approches à tester pour le choix des marqueurs et le matériel biologique (élargissement des bases génétiques, cycles courts…)

Développement de la sélection génomique chez la vigne?

Concept développé chez les animaux et qui a complètement révolutionné l'organisation de la sélection

Population de calibration → Génotypage dense Phénotypage → Modèle de prédiction du phénotype par le génotype

Population de sélection → Génotypage Application du modèle → Sélection du meilleur individu

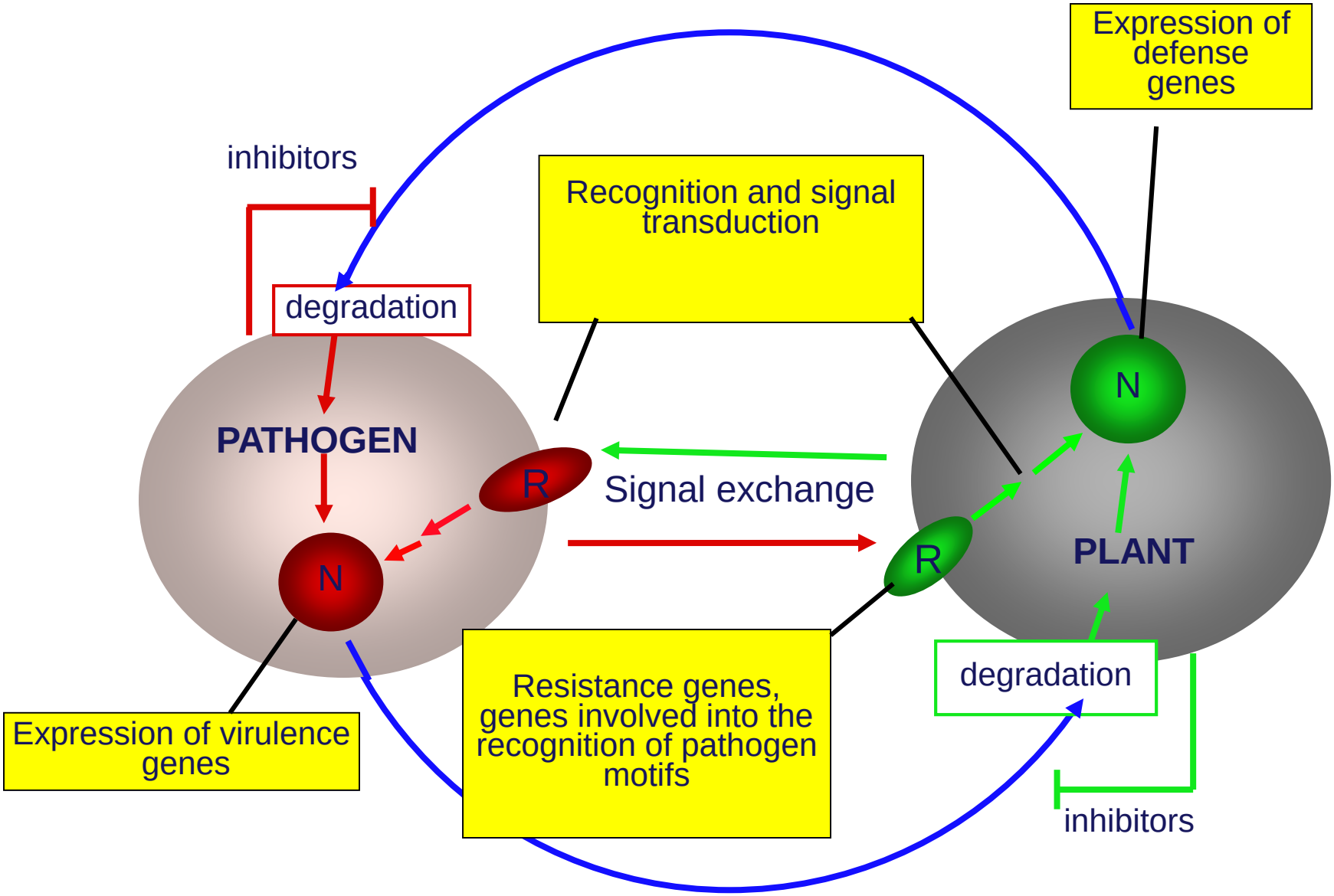
Meuwissen et al, Genetics, 2001

Cela reste à tester chez les plantes en fonction de la structure de leurs populations, le fait qu'on travaille souvent en croisements interspécifiques…

Développement d'outils qui permettent d'analyser en une fois plusieurs dizaines ou centaines de milliers de marqueurs => re-séquençage de variétés/espèces diverses avec les nouvelles générations de séquençage

Etude de l’interaction entre deux organismes : interactions vigne pathogènes (ou auxiliaires!)

L'interaction entre une plante et un agent pathogène

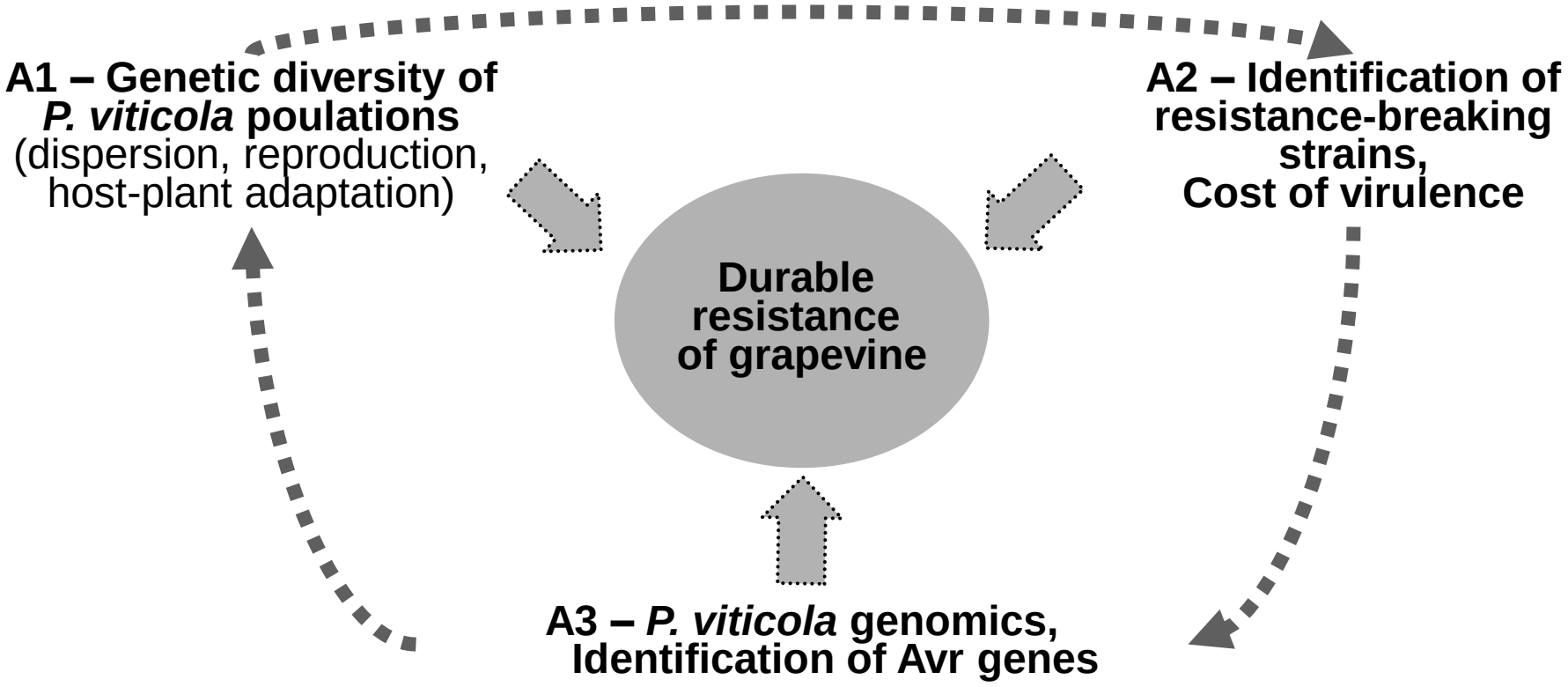


From Mauch-Mani 2005

Pour certaines maladies, il n’y a pas de source de résistance dans les ressources génétiques vigne

Il est important de développer des ressources génomiques pour l’étude des pathogènes :

- Identification des gènes clefs dans leur cycle infectieux



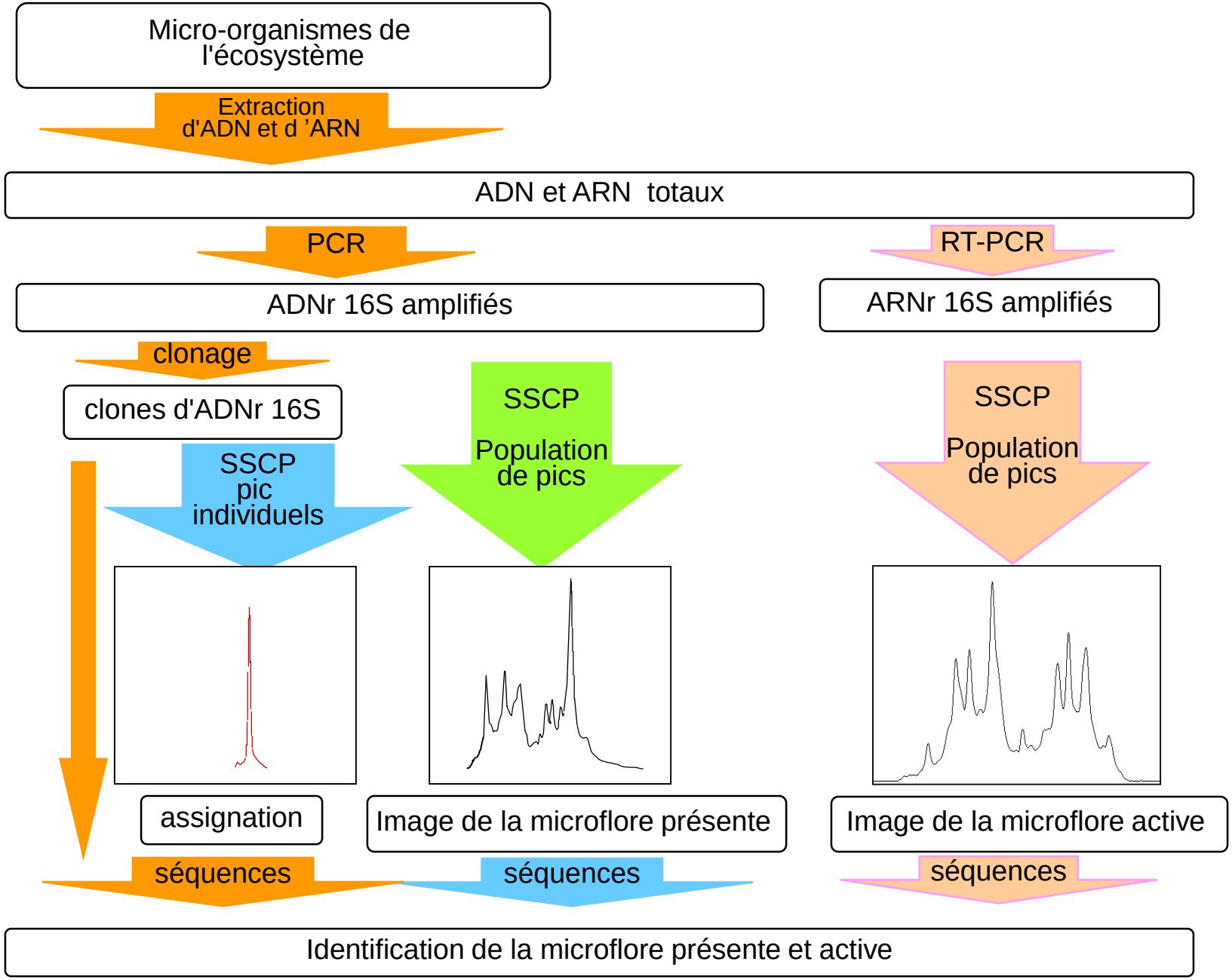
Comparative genomics of pathogens

De P. Mestre et F. Delmotte, 2006

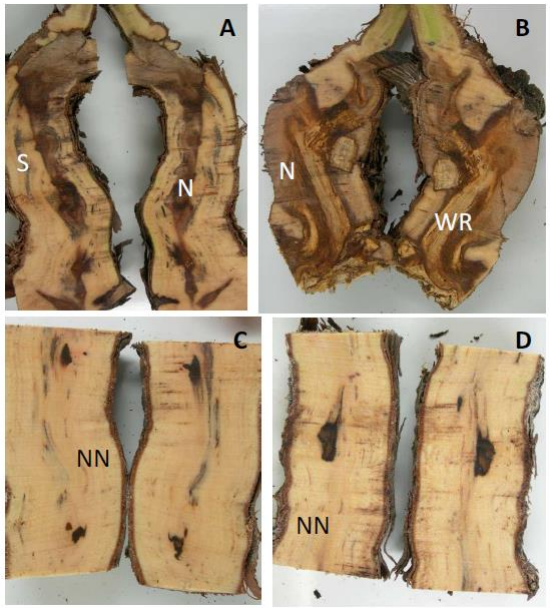
Pour certaines maladies, il n’y a pas de source de résistance dans les ressources génétiques vigne

Il est important de développer des ressources génomiques pour l’étude des pathogènes :

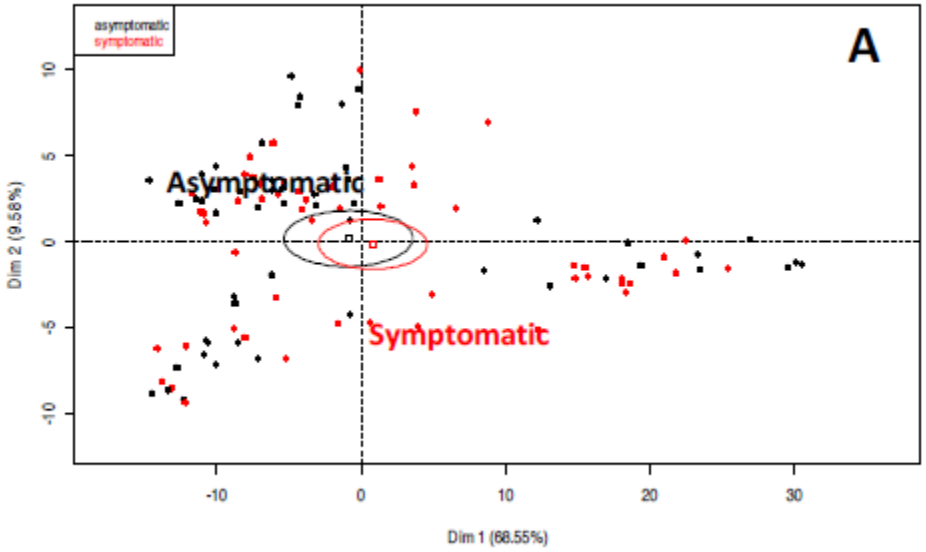
- Identification des gènes clefs dans leur cycle infectieux
- Compréhension des syndromes complexes (approches métagénomiques)

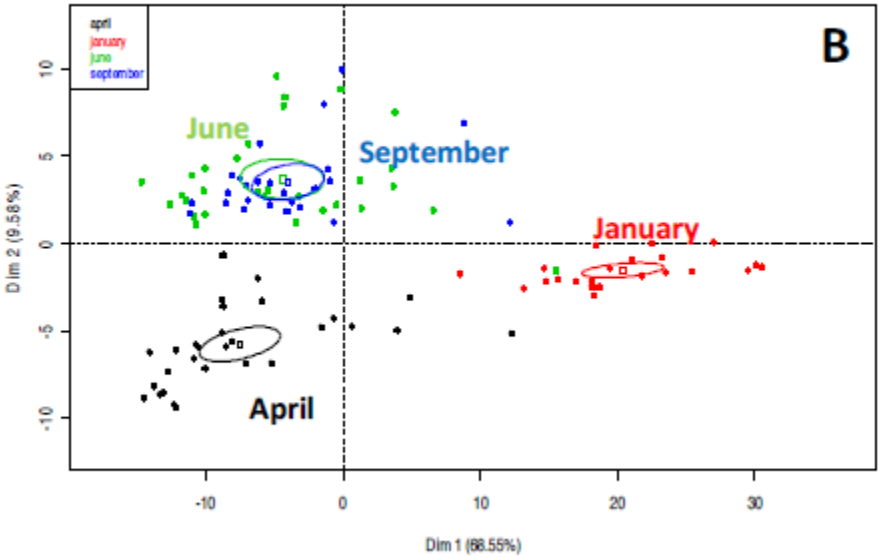

Micro-organismes de l'écosystème
Extraction d'ADN et d 'ARN
ADN et ARN totaux
PCR
RT-PCR
ADNr 16S amplifiés
ARNr 16S amplifiés
clonage
clones d'ADNr 16S
SSCP pic individuels
SSCP Population de pics
SSCP Population de pics
assignation
Image de la microflore présente
Image de la microflore active
séquences
séquences
séquences
Identification de la microflore présente et active

Asymptomatique Symptomatique



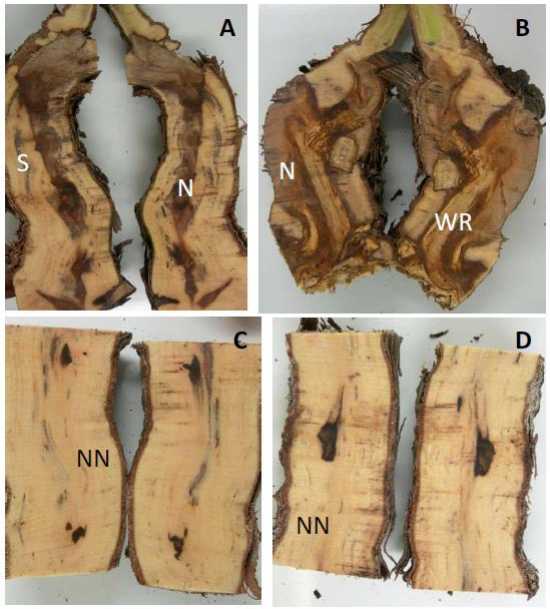
Analyse en composante principale de la distribution des populations fongiques dans des ceps symptomatiques et asymptomatiques



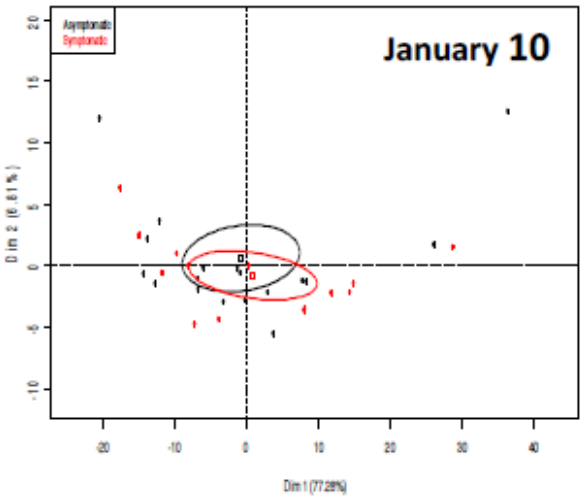


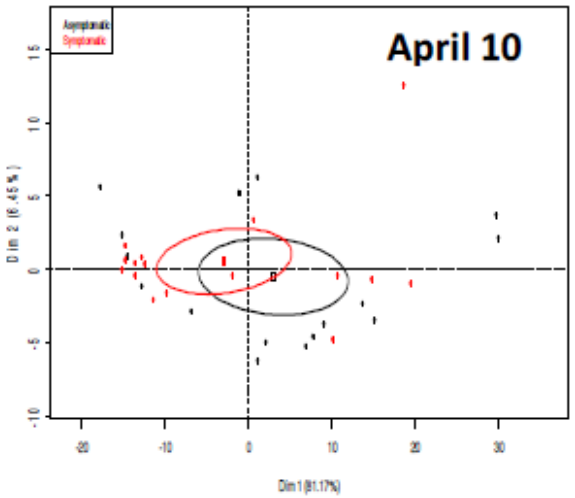
E. Bruez, Thèse de l'Université de Bordeaux 2, 2013

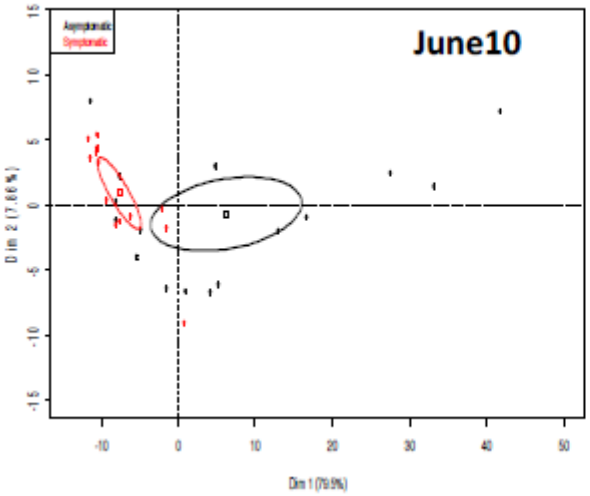
Asymptomatique Symptomatique

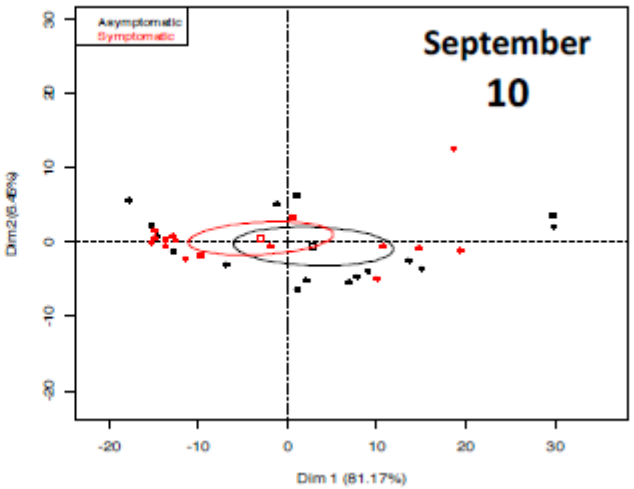


Analyse en composante principale de la distribution des populations bactériennes dans des ceps symptomatiques et asymptomatiques









E. Bruez, Thèse de l'Université de Bordeaux 2, 2013

Comment identifie-t-on les micro-organismes dont on a obtenu la séquence 16S
Avantage de connaitre la séquence du génome de la vigne?

Conclusions

Outils très puissants mais qui déplacent la dépendance vers les outils informatiques, mathématiques et statistiques

Attention à la question biologique et au matériel expérimental

Phénotypage à haut débit? Reste limitant