

Connaitre le génome

Jusqu'à présent, le sélectionneur abordait la diversité génétique en ne tenant compte que des caractères observables. Il est dorénavant possible, grâce à des techniques de biologie moléculaire, de lire partiellement le génotype d'un individu, et d'étudier la diversité génétique au niveau du génome.

Aujourd'hui, avec le marquage moléculaire, de nouvelles perspectives s'ouvrent pour le sélectionneur.

1. LES MARQUEURS MOLÉCULAIRES

1.1. Les balises du génome

- 1.1.1. La technique RFLP
- 1.1.2. Les marqueurs RFLP
- 1.1.3. Les marqueurs microsatellites
- 1.1.4. Les marqueurs RAPD
- 1.1.5. Les marqueurs AFLP
- 1.1.6. Les marqueurs SNP
- 1.1.7. L'analyse d'un profil AFLP
- 1.1.8. Les principaux marqueurs moléculaires

1.2. L'empreinte génétique d'une plante

2. LES CARTES GÉNÉTIQUES

2.1. La cartographie des marqueurs moléculaires

2.2. La cartographie d'un gène majeur

2.3. La cartographie comparée

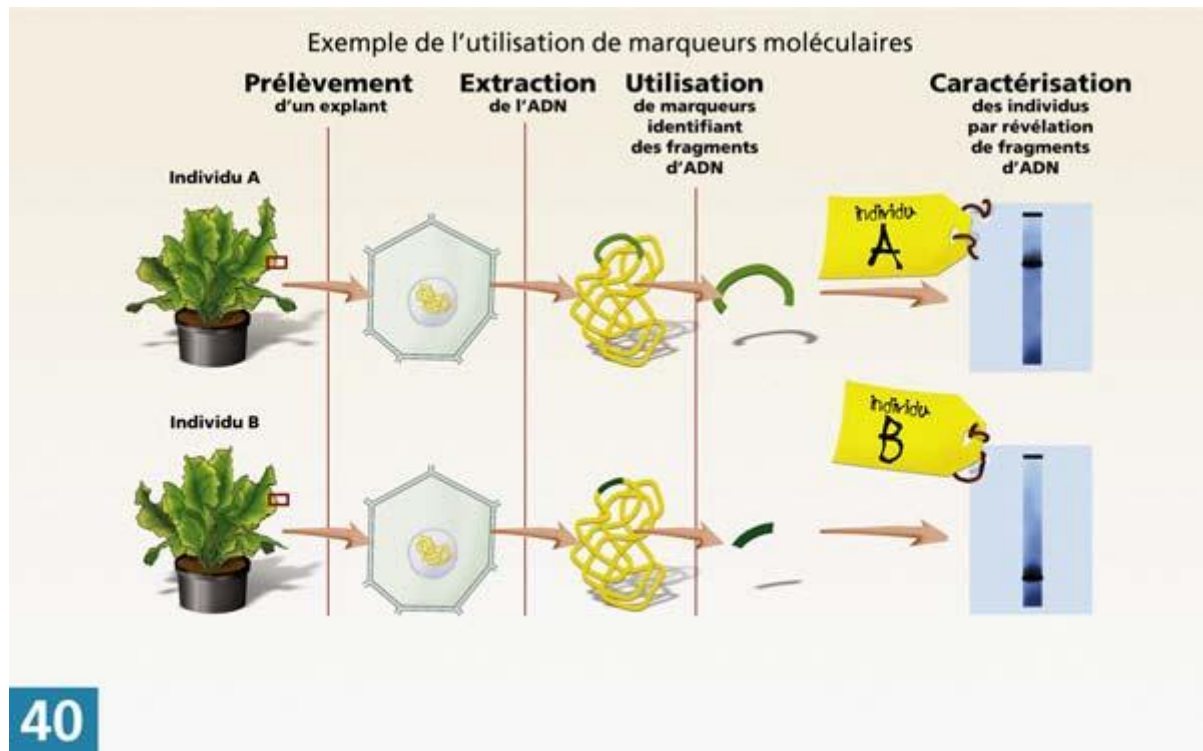
2.4. La cartographie d'un caractère quantitatif

3. LA SÉLECTION ASSISTÉE PAR MARQUEURS

4. LA GÉNOMIQUE

1. LES MARQUEURS MOLÉCULAIRES

1.1. Les balises du génome



Les marqueurs génétiques renseignent sur le génotype d'un individu et ne sont pas modifiés par l'environnement.

Ils peuvent être utilisés tout au long d'une expérimentation et sont observables à n'importe quel stade de développement de la plante et sur n'importe quel organe (l'information génétique de la plante est contenue en totalité dans toutes les cellules).

Les principaux types de marqueurs génétiques utilisés sont :

- **Les marqueurs biochimiques** (isozyme, protéine). Les protéines d'une cellule végétale peuvent facilement être extraites et analysées.

Les marqueurs biochimiques les plus utilisés sont les isozymes. Ils correspondent aux différentes formes d'une même enzyme et permettent de déterminer la présence de l'allèle correspondant à chacune de ces formes. Dans ce sens, ce sont des révélateurs du polymorphisme entre individus pour les séquences codantes du génome.

- **Les marqueurs moléculaires d'ADN**. Ce sont les plus étudiés. Ces marqueurs sont des séquences codantes ou non, présentant un polymorphisme selon les individus. Par les techniques de biologie moléculaire, plusieurs outils ont été développés, permettant

d'obtenir directement à partir des marqueurs polymorphes de l'ADN des plantes. Les plus utilisés sont les marqueurs RFLP, RAPD, AFLP et les microsatellites.

Applications

Grâce aux marqueurs génétiques, il devient possible :

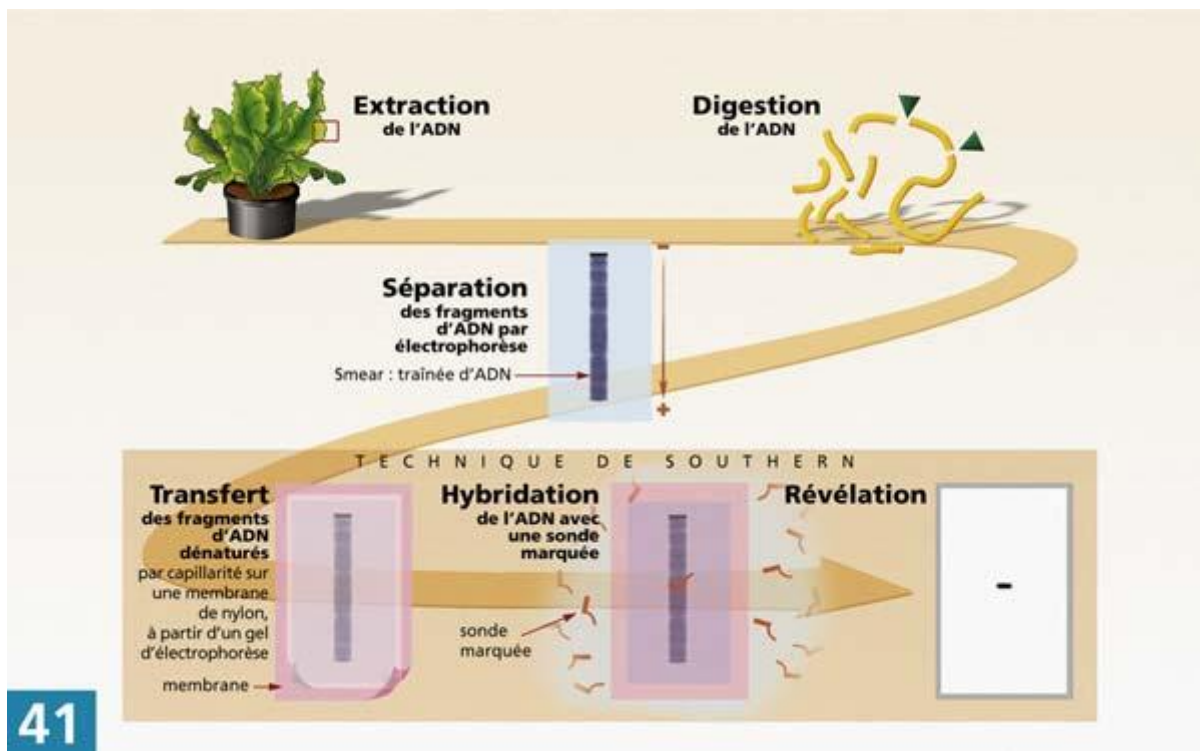
- d'établir l'empreinte génétique d'un individu, c'est-à-dire de décrire et définir des individus et des variétés en vue de leur inscription, de leur protection et de leur classification,
- de mettre en évidence et suivre les gènes impliqués dans l'expression de caractères d'intérêt agronomique ou technologique.

**** Caractéristiques d'un marqueur génétique**

Un bon marqueur doit être :

- **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,
- **codominant** : l'individu hétérozygote peut être distingué car il présente simultanément les caractères de ses parents homozygotes,
- **insensible au milieu**,
- **non épistatique**,
- **multiallélique**.

1.1.1. La technique RELP



Polymorphisme de longueur de fragment de restriction

(Restriction Fragment Length Polymorphism)

Toute modification des séquences d'ADN (mutation, addition, délétion) réorganise fréquemment les sites de restriction. Lors de l'action d'enzymes de restriction, la taille des fragments de restriction est alors modifiée : on observe un polymorphisme.

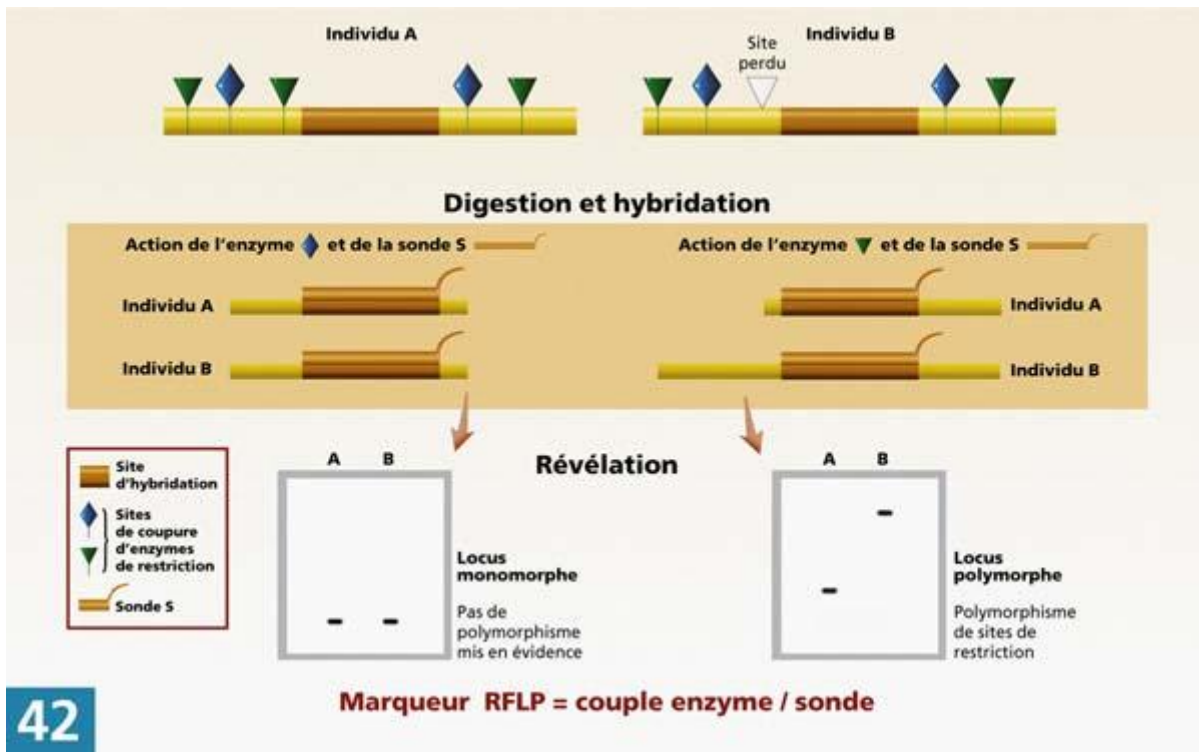
Les étapes de la technique

1. L'ADN de la plante est extrait.
2. Il est soumis à une digestion par une ou plusieurs enzymes de restriction. La taille des fragments obtenus est dépendante des enzymes utilisées.
3. Les fragments sont ensuite séparés selon leur taille par électrophorèse. Lors de la digestion de l'ADN génomique, on visualise sur le gel une traînée appelée « smear », car il y a un grand nombre de fragments impossibles à séparer.
4. L'ADN est transféré par capillarité sous forme dénaturée (simple brin) sur une membrane de nylon. Cette technique de transfert permet de conserver la position relative des fragments d'ADN.
5. Cette membrane est mise en contact avec une solution contenant une sonde marquée soit

par la radioactivité, soit chimiquement. Cette sonde s'hybride alors avec le ou les fragments d'ADN avec lesquels elle présente une homologie.

6. La position de l'hybridation est révélée en plaçant la membrane au contact d'un film sensible, ou en réalisant une réaction enzymatique colorée (selon le type de sonde utilisé). Ces trois dernières étapes de transfert, d'hybridation et de révélation correspondent à la technique de Southern.

1.1.2. Les marqueurs RFLP



Caractéristiques du polymorphisme

Comparons deux individus A et B. Leur ADN sera digéré séparément par des enzymes de restriction données, puis hybridé par une sonde S.

La digestion avec l'enzyme \blacklozenge donne des fragments de restriction identiques pour les deux individus. Les deux profils révélés après électrophorèse ne permettent pas de les distinguer. Avec ce couple enzyme \blacklozenge - sonde S, aucun polymorphisme n'est mis en évidence.

En revanche, pour l'enzyme \blacktriangledown , l'individu B présente une mutation au niveau d'un site de restriction, entraînant la perte de ce site. Ainsi, par digestion, l'individu A donne un fragment plus petit que celui de l'individu B. On révèle le polymorphisme entre les deux individus : un fragment rapide pour A et un plus lent pour B. Ce couple enzyme \blacklozenge - sonde S révèle un

polymorphisme.

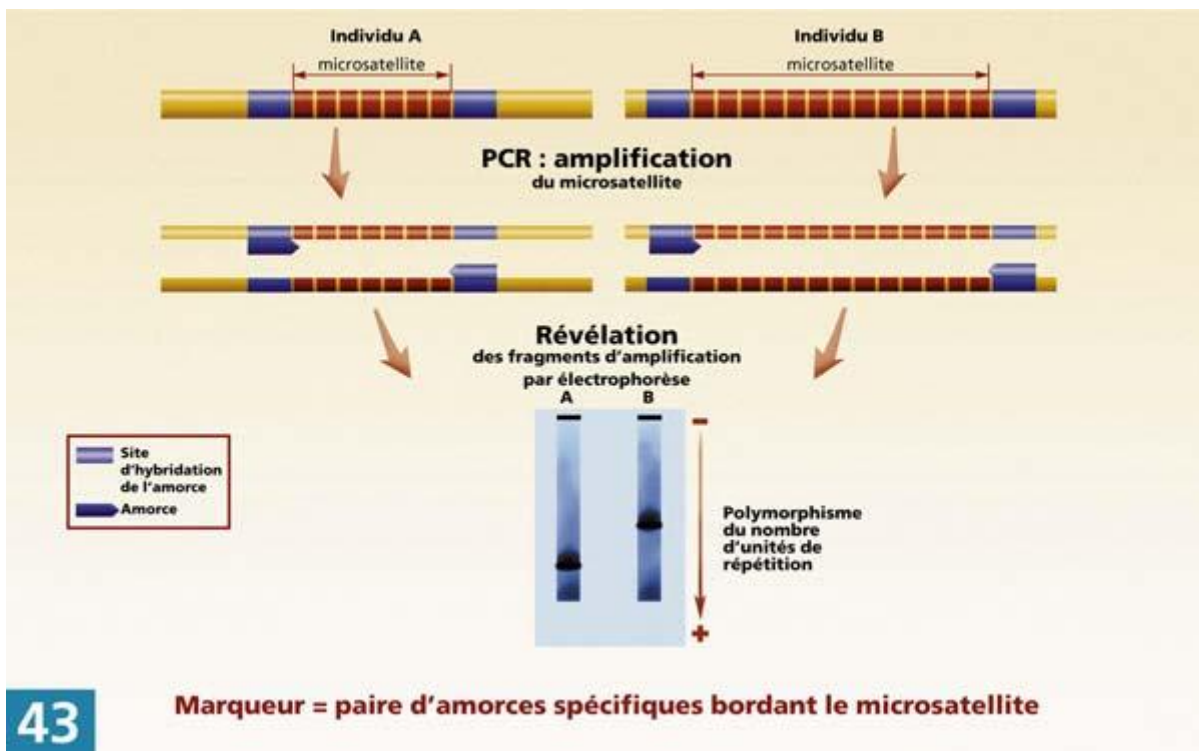
Création de marqueurs

C'est le couple enzyme/sonde qui constitue le marqueur. La sonde révèle un locus polymorphe ou monomorphe. Les enzymes de restriction permettent de visualiser le nombre d'allèles détectables à ce locus dans une population. Chez le maïs, 95 % des sondes utilisées sont polymorphes, alors que chez le blé, plante autogame, 5 à 10 % des sondes seulement sont polymorphes.

Utilisation de la technique

Cette technique de marquage moléculaire est très utilisée, car elle fournit des profils peu complexes permettant de caractériser l'empreinte génétique d'une plante ou de construire une carte génétique. Elle est fiable, les résultats observés peuvent être répétés. Toutefois, elle est lourde à mettre en oeuvre : l'étape de transfert et d'hybridation empêche une automatisation du travail.

1.1.3. Les marqueurs microsatellites



Polymorphisme de nombre d'unités de répétition

Sur le génome, il existe des séquences constituées d'unités répétées de 1 à 4 nucléotides. Ce sont les microsatellites. Les plus courants sont (A)_n, (TC)_n, (TAT)_n et (GATA)_n, les valeurs

de n pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. On parle de séquences répétées en tandem ou SSR (Simple Sequence Repeats). L'intérêt de ces microsatellites réside dans leur polymorphisme. Celui-ci repose sur la variation du nombre d'unités de répétition, constituant le microsatellite.

Les étapes de la technique

C'est la technique de PCR qui est utilisée pour révéler le polymorphisme des microsatellites. Une paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche d'un microsatellite est utilisée pour amplifier le même microsatellite chez différents individus. En effet, chaque microsatellite est bordé par des séquences uniques qui lui sont propres. Les fragments d'amplification sont ensuite révélés par électrophorèse.

Un individu B, possédant plus d'unités de répétition que A, a un produit d'amplification qui migre plus lentement que A.

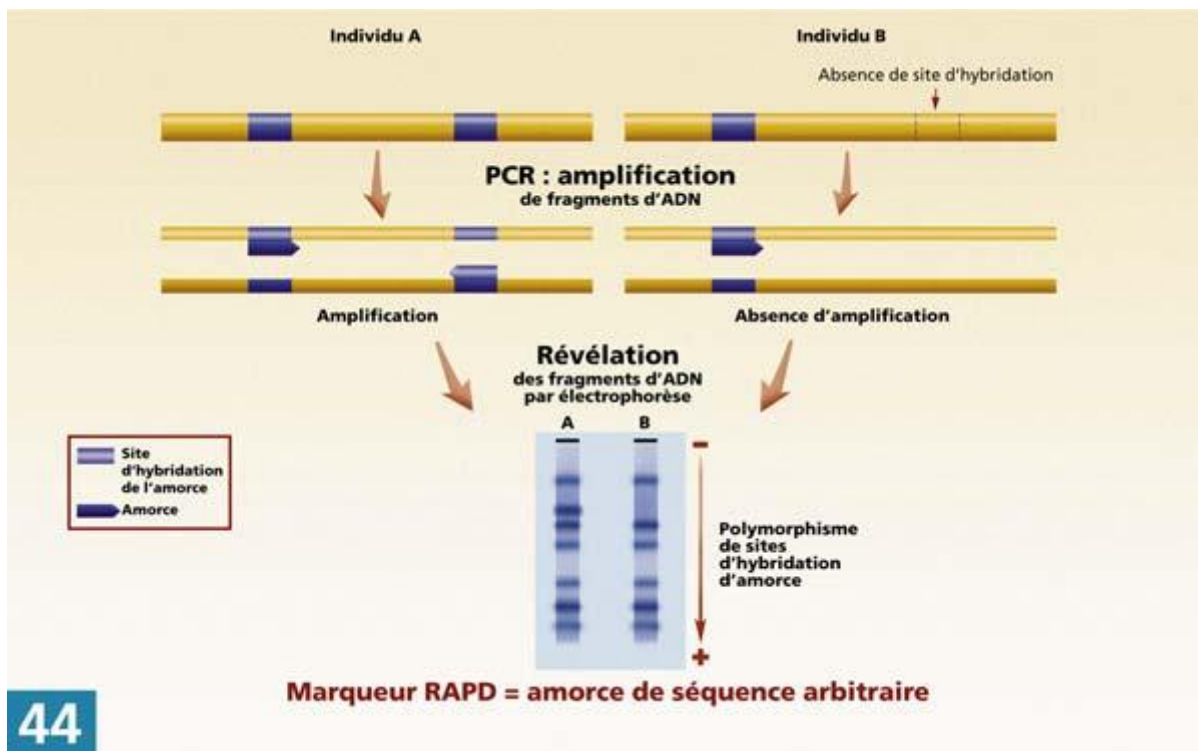
Création de marqueurs

C'est la paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche du microsatellite qui constitue le marqueur.

Utilisation de la technique

C'est une technique qui nécessite une préparation préalable assez lourde. Il faut en effet connaître, synthétiser et tester les amorces bordant le microsatellite. En revanche, elle est simple d'utilisation car reposant simplement sur une PCR. Elle permet de développer de nombreux marqueurs, notamment sur le maïs ou le colza. Toutefois, elle n'est pas applicable à toutes les espèces, la tomate par exemple ne possède pas de polymorphisme pour les microsatellites.

1.1.4. Les marqueurs RAPD



Polymorphisme de nombre d'unités de répétition

Sur le génome, il existe des séquences constituées d'unités répétées de 1 à 4 nucléotides. Ce sont les microsatellites. Les plus courants sont (A)_n, (TC)_n, (TAT)_n et (GATA)_n, les valeurs de n pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. On parle de séquences répétées en tandem ou SSR (Simple Sequence Repeats). L'intérêt de ces microsatellites réside dans leur polymorphisme. Celui-ci repose sur la variation du nombre d'unités de répétition, constituant le microsatellite.

Les étapes de la technique

C'est la technique de PCR qui est utilisée pour révéler le polymorphisme des microsatellites. Une paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche d'un microsatellite est utilisée pour amplifier le même microsatellite chez différents individus. En effet, chaque microsatellite est bordé par des séquences uniques qui lui sont propres. Les fragments d'amplification sont ensuite révélés par électrophorèse.

Un individu B, possédant plus d'unités de répétition que A, a un produit d'amplification qui migre plus lentement que A.

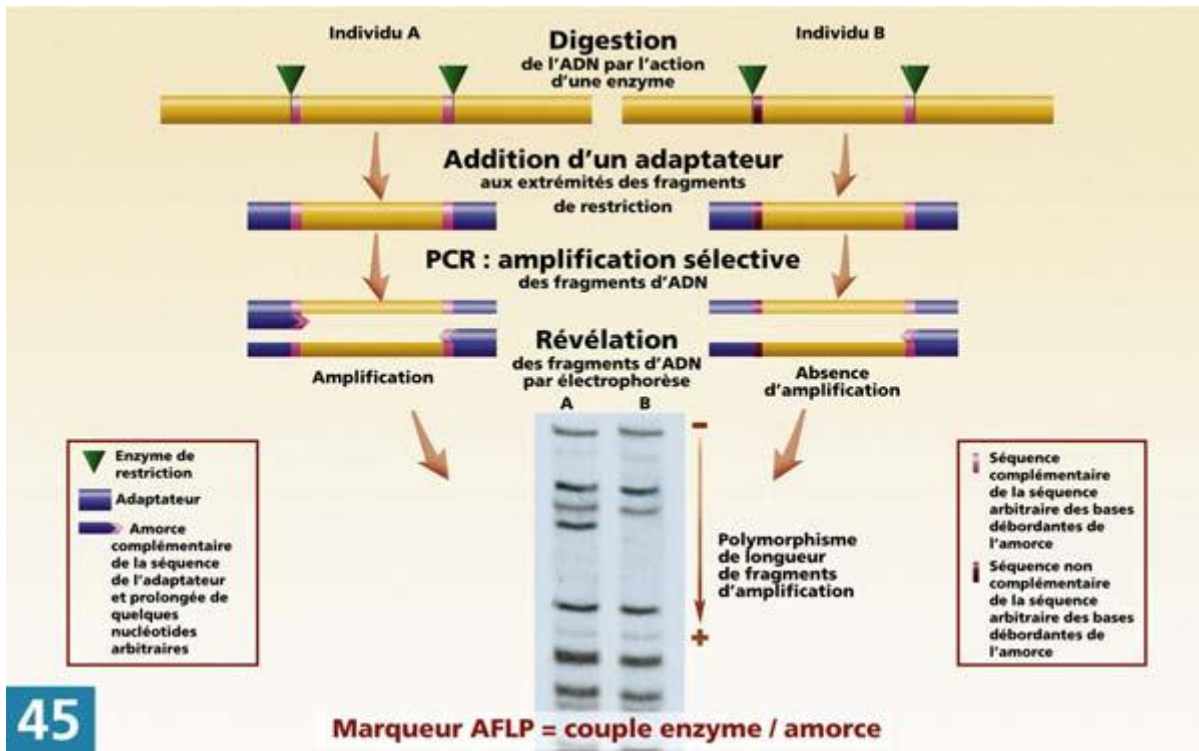
Création de marqueurs

C'est la paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche du microsatellite qui constitue le marqueur.

Utilisation de la technique

C'est une technique qui nécessite une préparation préalable assez lourde. Il faut en effet connaître, synthétiser et tester les amorces bordant le microsatellite. En revanche, elle est simple d'utilisation car reposant simplement sur une PCR. Elle permet de développer de nombreux marqueurs, notamment sur le maïs ou le colza. Toutefois, elle n'est pas applicable à toutes les espèces, la tomate par exemple ne possède pas de polymorphisme pour les microsatellites.

1.1.4. Les marqueurs AFLP



Polymorphisme de longueur des fragments d'amplification

(Amplification Fragment Length Polymorphism)

Cette technique est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de site de restriction et de polymorphisme d'hybridation d'une amorce de séquence arbitraire.

Les étapes de la technique

L'ADN de la plante est soumis à une digestion par des enzymes de restriction. Les tailles des fragments obtenus sont dépendantes des enzymes utilisées.

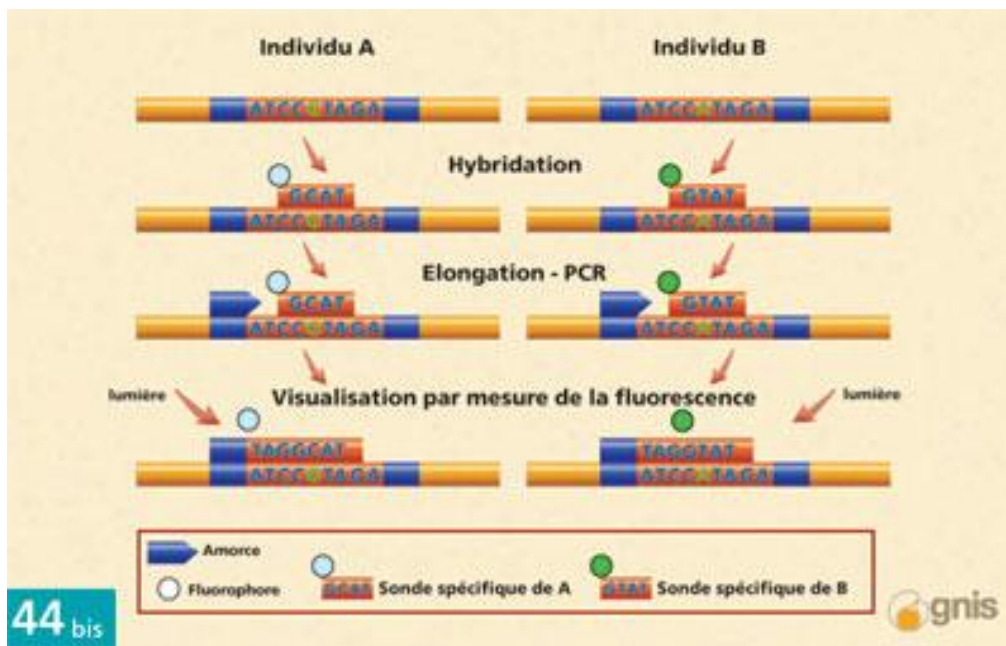
Ensuite, il y a addition aux extrémités des fragments de restriction d'adaptateurs nucléotidiques spécifiques des enzymes de restriction utilisées. Ils sont de séquences connues.

Les fragments sont ensuite amplifiés par PCR. On utilise comme amorce un oligonucléotide complémentaire de la séquence de l'adaptateur, prolongé de quelques nucléotides arbitraires (de 1 à 3) appelés bases débordantes. Seuls sont amplifiés les fragments possédant les bases complémentaires de ces bases arbitraires. Il s'agit donc d'amorces sélectives permettant de réduire le nombre de fragments amplifiés à une centaine : sans ces séquences débordantes, il y aurait amplification de milliers de fragments. Les bandes sont visualisées par électrophorèse.

Création de marqueurs

C'est la combinaison enzyme de restriction/amorce qui permet de révéler le polymorphisme entre les individus. Celle-ci constitue le marqueur AFLP. Le locus mis en évidence dépend de la séquence du site de l'enzyme de restriction et des bases arbitraires. Il existe de très nombreuses combinaisons enzyme/amorce. En effet, on dispose d'une dizaine d'enzymes de restriction et il existe de très nombreuses amorces d'amplification par combinaisons de 3 bases débordantes.

1.1.5. Marqueurs SNP



Polymorphisme mononucléotidique : SNP (Single Nucleotide Polymorphisme)

Les récents progrès en matière d'analyse de séquences d'ADN et la mise au point de méthodologies à haut débit ont rendu possible l'identification et l'analyse de la variation nucléotidique à grande échelle.

Le marquage moléculaire par SNP permet de repérer les différences au niveau d'un nucléotide dans une séquence d'ADN.

Cette technique consiste à hybrider sur l'ADN cible une sonde complémentaire portant une molécule fluorescente (le fluorophore). Chaque sonde est spécifique d'une séquence d'ADN donnée.

La deuxième étape consiste en une élongation par action de la Taq polymérase (PCR). Cette enzyme ajoute à l'extrémité des amorces des oligonucléotides présents dans le milieu de réaction et libère les fluorophores fixés sur les sondes.

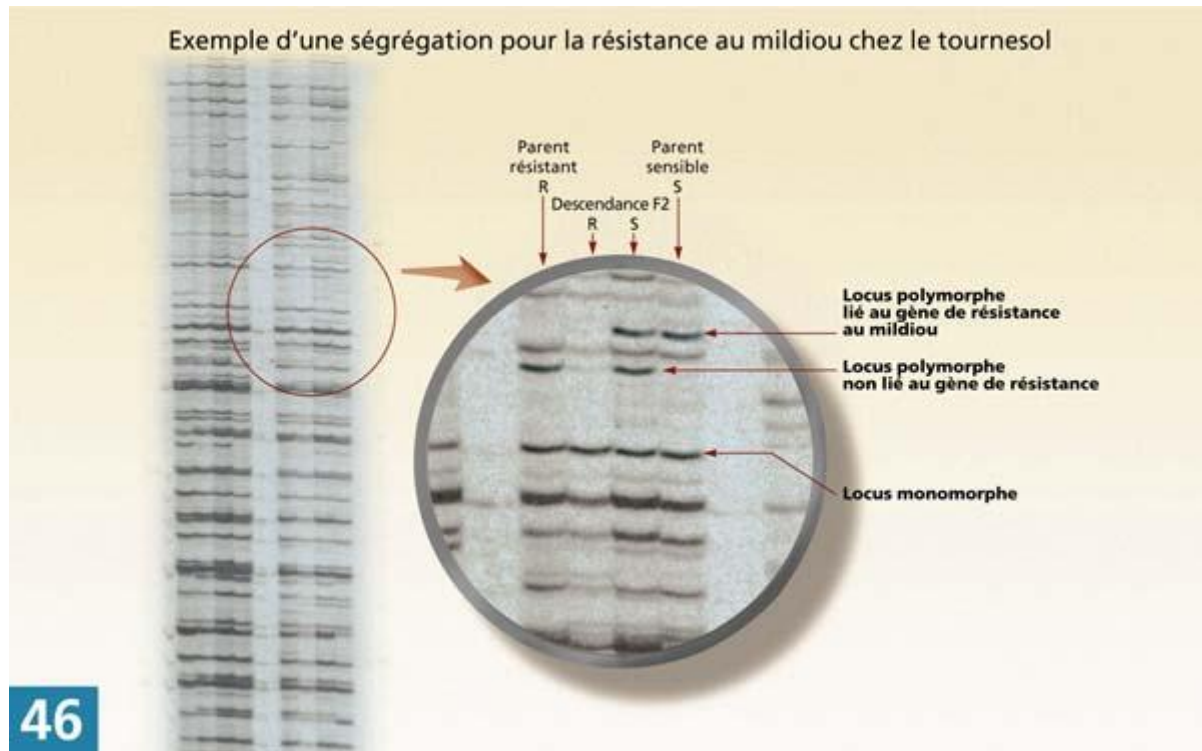
Enfin, une visualisation par excitation et quantification du fluorophore, à une longueur d'onde qui lui est propre, est réalisée. Les individus A et B ne révèlent pas la même fluorescence, ils ont donc un polymorphisme au niveau d'un nucléotide.

- Utilisation de la technique

Cette technologie qui permet d'éliminer entièrement les étapes de séparation de taille par électrophorèse présente un potentiel d'automatisation très supérieur aux technologies

précédentes (RFLP, RAPD, AFLP, SSR...). Elle peut donc être réalisée à très haut débit. Le marquage SNP ou Snip permet d'obtenir des résultats précis pour différencier des allèles entre individus.

1.1.6. L'analyse d'un profil AFLP



Caractéristique du polymorphisme

Sur les quatre pistes est mise en évidence la ségrégation pour la résistance du tournesol au mildiou. Sur la piste de gauche, c'est le parent résistant (R), sur la piste de droite le parent sensible (S).

Sur les deux pistes centrales figurent les individus F2 : la deuxième piste en partant de la gauche correspond à l'ADN en mélange des descendants F2 résistants et la troisième piste à l'ADN en mélange des descendants F2 sensibles.





Parmi la centaine de fragments d'amplification séparés par électrophorèse, on peut visualiser des locus polymorphes. Il est notamment possible de mettre en évidence des bandes présentes chez le parent sensible et absentes chez le résistant, et inversement. Cette distinction se retrouve également dans la descendance. Ces locus sont donc liés au gène de résistance par absence ou présence de bande.

Les autres locus soit ne révèlent pas de polymorphisme, soit révèlent des marqueurs polymorphes mais ne permettent pas de faire la distinction entre les individus sensibles et les individus résistants, ils ne sont donc pas liés à la résistance.

Utilisation de la technique

Elle est utilisée notamment pour la sélection de lignées, et pour la saturation d'une région du génome au voisinage d'un gène en vue de son clonage, c'est-à-dire pour positionner dans cette région un grand nombre de marqueurs.

1.1.7. Les principaux marqueurs moléculaires

	RFLP	Microsatellites	RAPD	AFLP
Type de marqueurs	Enzyme / sonde 	Amorces spécifiques bordant le microsatellite 	Amorce de séquences arbitraires 	Enzyme / amorce 
Nombre de marqueurs	Illimité	Quelques milliers	Illimité	Illimité
Polymorphisme mis en évidence	Élevé	Élevé	Très élevé	Très élevé
Type de polymorphisme	Insertion, délétion, substitution	Insertion	Plutôt substitution, quelquefois insertion	Plutôt substitution
Caractérisation génétique	Locus codominants et révélés individuellement		Locus dominants et révélés en masse	
Principales utilisations	Cartographies, génétiques quantitatives (QTL)		Clonage positionnel, rétrocroisements	
Reproductibilité	Parfaite	Parfaite	Faible	Faible

47

Le tableau reprend les caractéristiques des quatre types de marqueurs moléculaires évoqués précédemment :

- Caractéristiques techniques

Le type et le nombre de tels marqueurs disponibles dans le monde végétal, le polymorphisme révélé par ces techniques.

- Caractéristiques génétiques

Les marqueurs RFLP et microsatellites sont spécifiques de locus : une sonde RFLP révèle un locus (polymorphe ou pas), de même les amorces des microsatellites n'amplifient qu'un seul microsatellite. En revanche, par les techniques de RAPD ou AFLP, il y a amplification aléatoire d'une séquence, et elles révèlent donc conjointement plusieurs locus.

Les marqueurs RFLP et microsatellites sont codominants, c'est-à-dire qu'il est possible de différencier les individus hétérozygotes des deux types homozygotes. En effet, les individus hétérozygotes sont visualisés par deux bandes. En revanche, pour les techniques RAPD ou AFLP, on révèle un polymorphisme de présence ou d'absence de sites d'hybridation et non un polymorphisme de longueur de fragments. Dans ce cas, il y a ou il n'y a pas amplification du fragment.

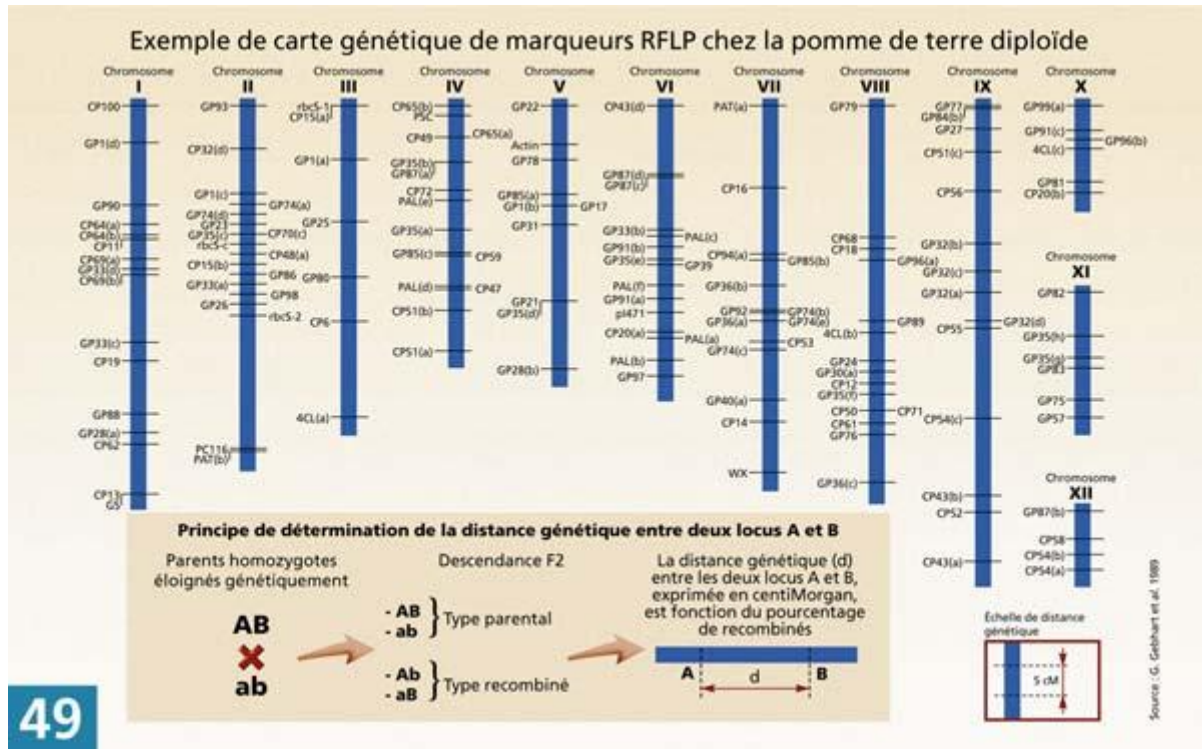
La présence d'une bande signifie que l'individu possède un ou deux allèles "présence de bande", c'est-à-dire que l'on ne peut pas différencier l'hétérozygote de l'homozygote "présence de bande". L'absence de bande signifie par contre sans ambiguïté un individu homozygote pour l'allèle "présence de bande".

- Caractéristiques d'utilisation

Les deux premières techniques RFLP et microsatellites, de par leurs caractéristiques génétiques, sont utilisées pour réaliser les cartographies, et en génétique quantitative pour la détection de QTL. Les techniques de RAPD et AFLP servent à saturer fortement une région particulière du génome. Elles permettent de densifier le marquage au voisinage d'un gène d'intérêt et sont donc utilisées dans le cas de clonage positionnel ou de rétrocroisement.

1.2. Les cartes génétiques

La cartographie des marqueurs moléculaires



49

Les premières cartes génétiques partielles du maïs furent publiées en 1935, et réalisées à l'aide de marqueurs morphologiques.

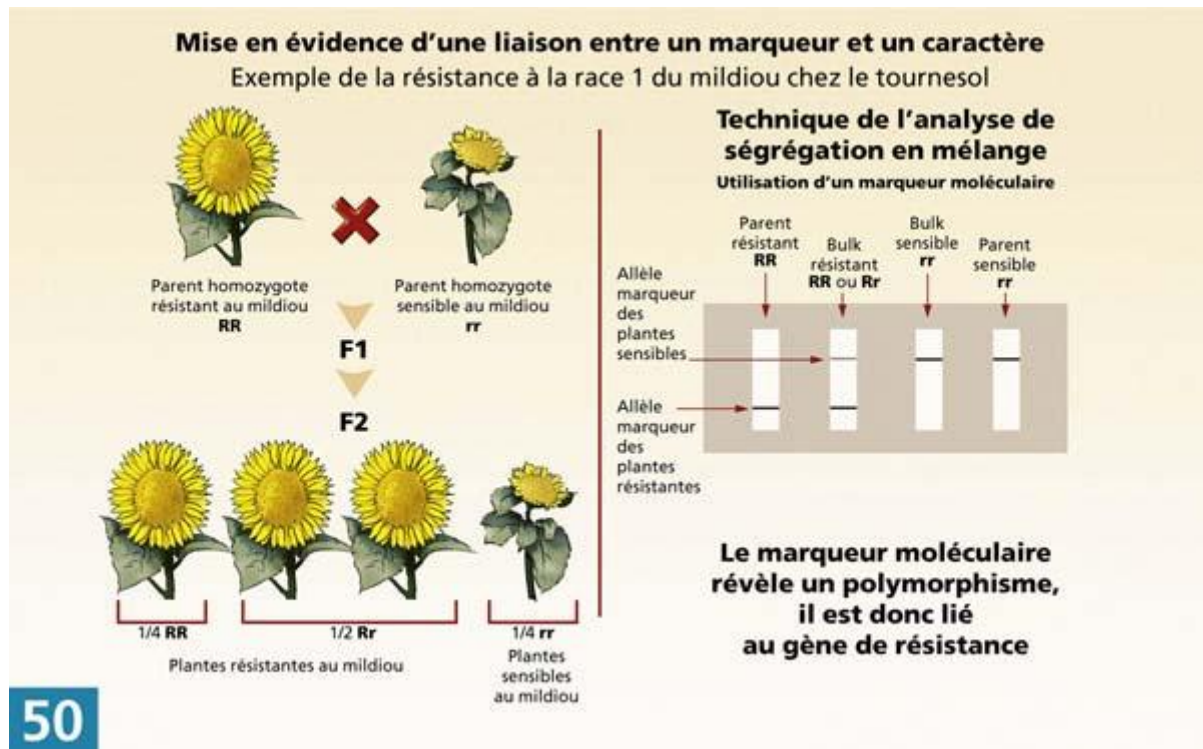
Les cartes génétiques permettent de représenter la disposition des gènes ou des marqueurs sur un chromosome.

La figure représente une carte génétique de la pomme de terre obtenue à partir de marqueurs RFLP. Les 141 marqueurs RLFP utilisés sont répartis sur les 12 chromosomes de la pomme de terre.

Principe d'établissement de cartes génétiques

On utilise les propriétés de la ségrégation des gènes. Le plus couramment, on utilise une descendance issue de deux parents homozygotes. On obtient en génération F2 une descendance en ségrégation, c'est-à-dire où l'on observe une séparation des caractères des deux parents et donc aussi une ségrégation au niveau des marqueurs. En effet, à la méiose, les chromosomes non homologues ségrègent indépendamment. Il en est de même pour les gènes portés par ces chromosomes. En revanche, des gènes portés par un même chromosome ne ségrègent pas indépendamment, et cela d'autant moins qu'ils sont plus proches. Ce sont ces propriétés que l'on met à profit pour estimer la position des marqueurs. Lorsque l'on constate que des marqueurs ne ségrègent pas indépendamment dans une descendance, on dit qu'ils sont liés.

.2.1.La cartographie d'un gène majeur



Localiser les gènes majeurs

Quand un caractère est dû à l'effet d'un gène principal, on parle de gène majeur. L'apparition des marqueurs moléculaires a permis l'élaboration de méthodologies pour localiser ces gènes. Le principe est le même que celui servant à l'élaboration des cartes génétiques. Plus la distance qui sépare un marqueur moléculaire et un gène d'intérêt sur la carte génétique est faible, plus la probabilité qu'ils soient transmis séparément à la descendance est infime.

Exemples

De nombreux gènes majeurs ont déjà été localisés. On peut citer par exemple : des gènes de qualité codants pour une protéine de réserve du blé, codants pour le taux en acide érucique chez des oléagineux, des gènes de nanisme chez le maïs ou le colza, des gènes de résistance aux champignons chez la tomate, la laitue, le blé, le tournesol, dont le gène P11 impliqué dans la résistance à la race 1 du mildiou, des gènes de résistance aux virus chez la pomme de terre, l'orge, des gènes de résistance aux nématodes chez la betterave, des gènes de restauration de la stérilité mâle cytoplasmique chez le colza et le tournesol.

Détection de la liaison

Elle consiste à choisir des parents suffisamment polymorphes pour le caractère agronomique et à observer dans la descendance la ségrégation des caractères phénotypiques et du génotype des marqueurs moléculaires.

Une des populations qui peut être retenue pour l'analyse de la ségrégation pour un gène majeur est une descendance F2 issue de deux parents homozygotes.

Dans le cas d'un gène de résistance, il s'agit du croisement d'un parent sensible et d'un parent résistant. Ainsi en F2, on observe un quart d'individus sensibles et trois quarts de résistants. L'idée qui a été émise par Michelmore et al. en 1991 est de regrouper l'ADN des individus F2 sensibles et l'ADN des individus F2 résistants. Cette technique est appelée BSA, Bulk Segregant Analysis, c'est l'analyse de ségrégation en mélange.

Le génotype du marqueur est ensuite déterminé. Si le marqueur testé est lié au gène de résistance, les plantes sensibles portent l'allèle marqueur caractéristique des plantes sensibles. En revanche, les individus résistants sont soit homozygotes pour le gène de résistance, soit hétérozygotes, il en va donc de même pour leur génotype du marqueur. Ainsi, en mélange, les individus résistants présentent au moins l'allèle marqueur caractéristique des plantes résistantes.

Apport à la sélection

La mise en évidence d'une liaison entre un marqueur moléculaire et un gène majeur est une aide précieuse pour le sélectionneur. Comme un fragment de feuille suffit à obtenir l'ADN nécessaire pour établir l'empreinte génétique d'une plante, un tri précoce et précis peut être envisagé dès le début de la croissance des plantes. Ceci permet un gain de temps, il n'est pas nécessaire d'attendre la visualisation phénotypique du gène.

On peut ainsi cribler une collection de géniteurs et déterminer si par exemple des plantes possèdent une source de résistance.

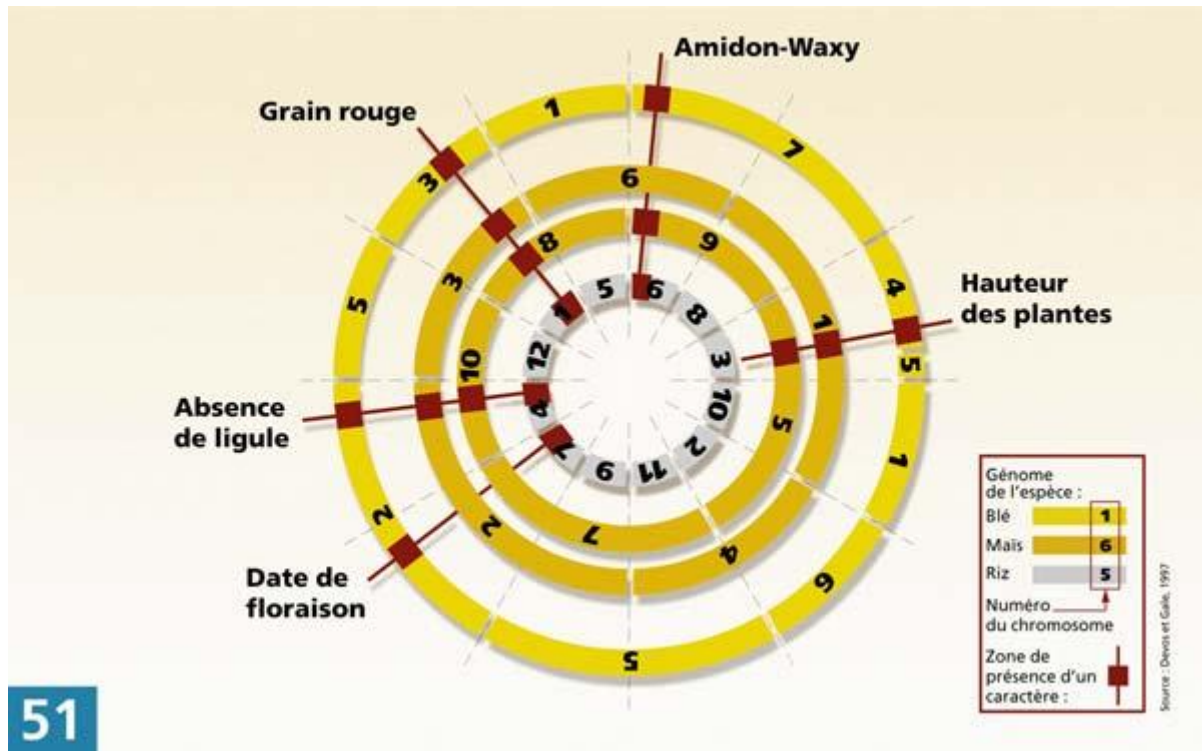
D'autre part, par le biais de marqueurs moléculaires, il est possible d'identifier les plantes hétérozygotes, donc porteuses d'un gène récessif dont le phénotype n'est pas observable.

Analyse fine de la structure du gène

L'objectif final est le clonage du gène et l'analyse de son mode d'action. Ceci fait appel à des techniques de biologie moléculaire, appelées clonage positionnel. Cette caractérisation fine de la structure du gène permet également de faciliter une sélection précoce. L'isolement de ce gène rend

aussi possible son transfert par génie génétique vers d'autres espèces.

1.2.2. La cartographie comparée



Lorsque, entre des espèces, il y a conservation des relations de proximité entre des marqueurs sur les chromosomes, on parle de synténie. Il existe donc des similitudes de séquences codant pour une même protéine et même une similitude de localisation chromosomique de ces gènes semblables entre espèces différentes.

Exemples

Une bonne conservation des groupes de liaisons et de l'ordre des marqueurs a été observée entre le riz, la canne à sucre, le sorgho, le maïs, et les céréales à paille comme le blé, l'orge, le seigle et l'avoine. La figure montre la conservation de quelques gènes sur les trois espèces riz, maïs et blé. Par exemple, le gène waxy, responsable de la synthèse d'amidon à chaîne linéaire, se trouve sur le chromosome

6 du riz, 9 du maïs, et 7 du blé. Il s'agit donc de régions homologues.

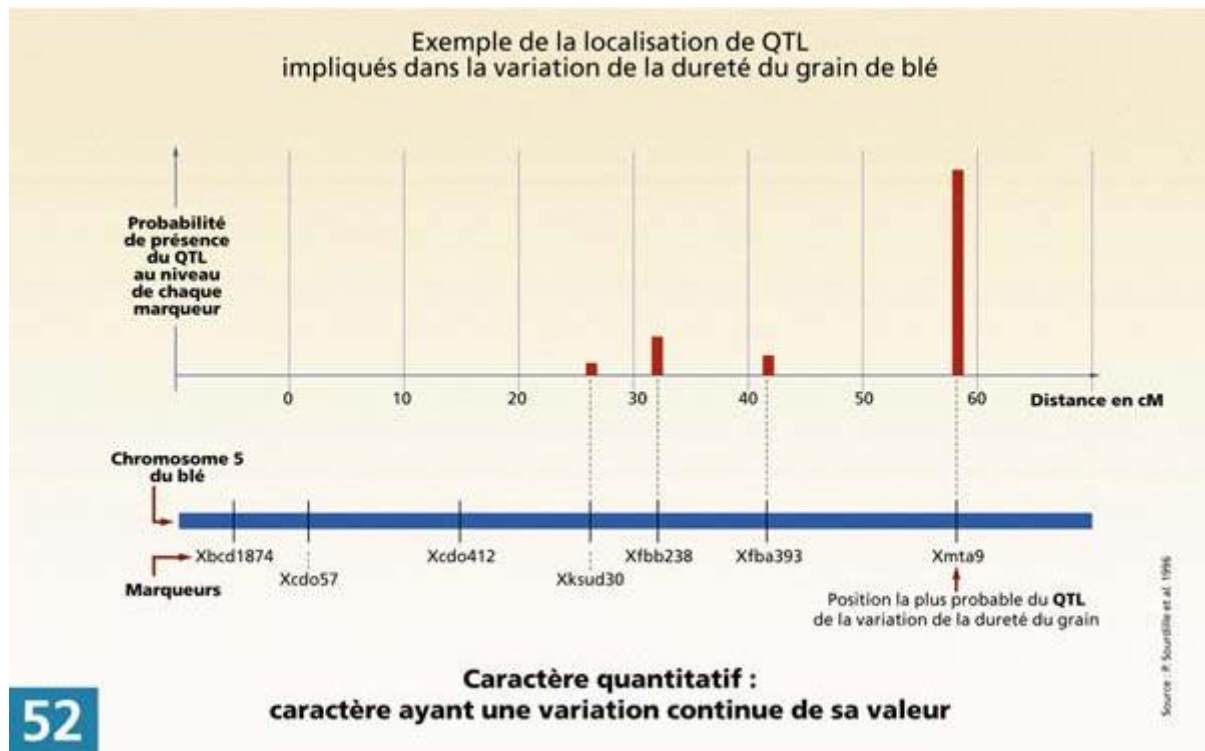
On constate également au sein du génome du maïs des homologies. Le chromosome 5 par exemple a une homologie avec le chromosome 1.

On a montré également que le génome de la tomate et de la pomme de terre sont colinéaires. Il n'y a aucune inversion de l'ordre des gènes de 9 des 12 chromosomes. Seule une inversion paracentrique des 3 derniers chromosomes est observée. Cette synténie se retrouve aussi avec le piment, toutefois les remaniements sont plus nombreux.

Décloisonnement

Cette constatation fait de la cartographie comparée un outil majeur pour décloisonner les programmes de recherche. Un travail réalisé sur une espèce peut ainsi trouver une application rapide et directe sur de nombreuses espèces.

1.2.3. La cartographie d'un caractère quantitatif



Qu'est-ce qu'un caractère quantitatif ?

De très nombreux caractères sont des caractères mesurables comme le rendement, la précocité, la taille, la qualité des fruits. On observe une variation continue de leur valeur. Dans ce cas, il n'y a plus d'opposition absolue entre deux phénotypes comme, par exemple : résistant/sensible. On admet que plusieurs secteurs chromosomiques, portant un ou plusieurs gènes, sont impliqués dans le contrôle de ces caractères dits quantitatifs, et que de nombreux allèles sont responsables de la variabilité. Ces locus sont appelés QTL : Quantitative Trait Loci (Locus de

Caractères Quantitatifs).

Exemple de la localisation de QTL impliqués dans la variation de la dureté du grain de blé

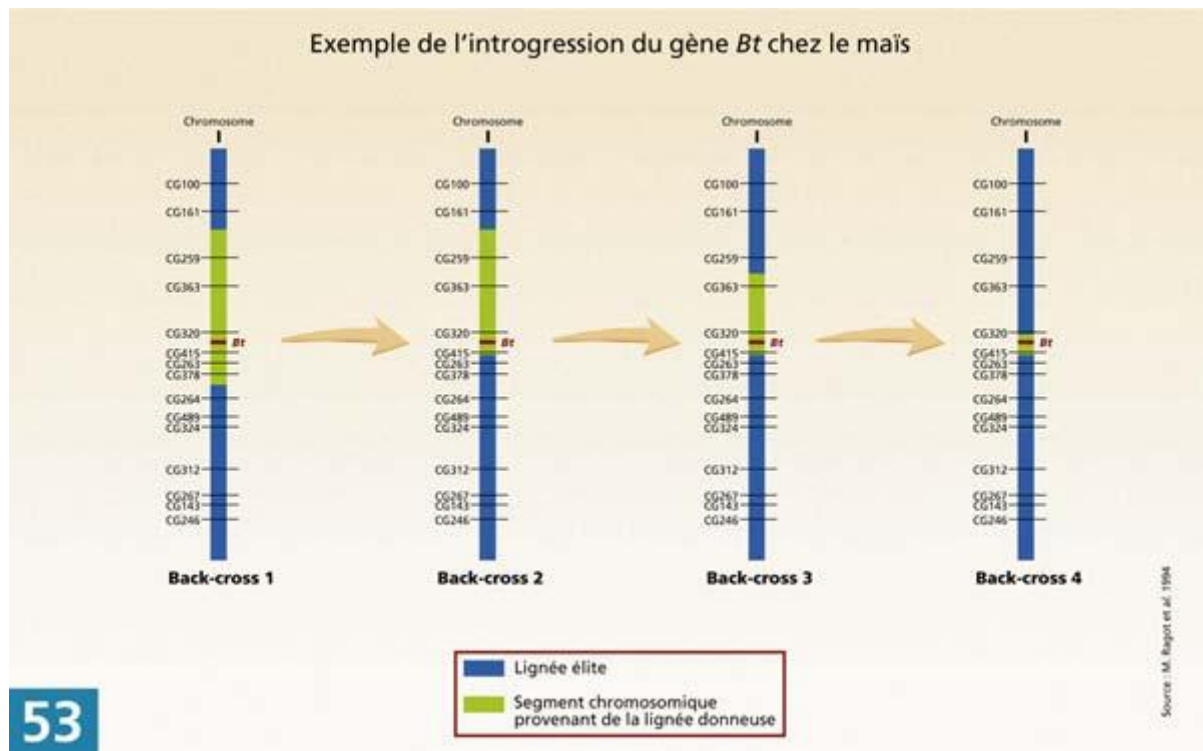
Un des facteurs affectant la qualité boulangère des blés cultivés est la dureté des grains. L'établissement de cartes génétiques sur le blé a permis d'identifier plusieurs QTL impliqués dans la variation de la dureté du grain. Un des QTL majeurs est situé sur le chromosome 5. La figure représente une carte génétique d'une partie du chromosome 5. En abscisse sont données les distances entre les marqueurs RFLP le long de ce bras de chromosome. A la taille des barres est associé un test de présence du QTL : la barre la plus grande correspond à la position statistique la plus probable du QTL. Ainsi, un QTL de la dureté du grain a été trouvé à proximité du marqueur Xmta9. C'est un marqueur du QTL.

Les apports à la sélection

Avec les QTL, il devient possible pour chaque individu d'associer une valeur à un segment chromosomique sur la base de la valeur génétique du QTL. Ainsi, une des premières applications est donc de prédire la valeur génétique d'une descendance, d'un croisement, grâce à la corrélation entre les marqueurs et le caractère quantitatif. On évalue donc plus précisément la valeur des individus candidats à la sélection.

Une autre application repose sur la mise en évidence d'allèles favorables au QTL. Il est alors possible de cumuler ces allèles dans un individu par rétrocroisement notamment. On parle alors de construction de génotypes.

3. La sélection assistée par marqueurs



Conversion assistée par marqueurs

Les rétrocroisements sont utilisés pour réaliser l'introgression d'un gène dans une variété élite. Cette opération est appelée également conversion. Mais en dépit d'un grand nombre de rétrocroisements, il reste toujours dans la lignée receveuse un plus ou moins grand segment du parent donneur autour du gène d'intérêt. Les marqueurs moléculaires sont souvent utilisés pour conduire la conversion car ils permettent de réduire les temps de sélection. En effet, par sélection classique, un minimum de 7 back-cross est nécessaire afin d'obtenir un retour vers le parent récurrent de 97 %. Avec l'aide des marqueurs moléculaires, quatre rétrocroisements suffisent pour arriver au même résultat car on peut à chaque génération choisir les plantes ayant recombiné le plus petit segment chromosomique.

Les marqueurs moléculaires sont ainsi beaucoup utilisés pour les conversions de lignées pour un transgène. A chaque génération, les plantes ayant récupéré le transgène sont sélectionnées sur la base de caractérisation à l'aide de marqueurs moléculaires.

Exemple de l'introgression du gène *Bt* chez le maïs

On réalise une série de back-cross entre la lignée élite et la lignée transformée génétiquement. Cette dernière est caractérisée par une insertion unique du gène *Bt* (transgène de résistance à la

pyrale) sur le chromosome 1.

Au cours des rétrocroisements, on peut sélectionner les individus porteurs du gène Bt, et ayant recombiné le plus petit fragment de la lignée donneuse autour du gène Bt. En effet, grâce aux marqueurs moléculaires, on sélectionne les individus ayant pour les marqueurs proches du gène, le génotype de la lignée élite.

De plus, il est également possible d'accélérer le retour vers le parent élite grâce aux marqueurs moléculaires répartis sur l'ensemble du génome. A chaque rétrocroisement, seront choisis les individus ayant le plus de fragments issus du parent élite récurrent.

A la quatrième génération, on obtient une lignée quasi isogénique de la lignée élite, c'est-à-dire identique à la lignée élite de départ, mais ayant intégré le gène Bt. Il y a donc bien gain de temps, donc d'efficacité.

4. La génomique

Les espèces modèles

Arabette
Riz

Les objectifs

- Localiser et séquencer les gènes
- Étudier la fonction des gènes

Les applications

Construction de génotypes élites

Par :

- la fourniture d'une grande quantité de marqueurs moléculaires
- un meilleur contrôle de la régulation des gènes
- l'identification de gènes candidats pour l'analyse des QTL de caractères majeurs
- l'identification d'allèles favorables

54

La nécessité de disposer de cartes de gènes et l'apparition des cartes à haute densité de marqueurs moléculaires ont fait naître des travaux de séquençage systématique du génome. On disposerait ainsi d'une représentation physique des chromosomes avec le positionnement des marqueurs et des gènes.

Le terme génomique regroupe les analyses qui consistent à localiser, isoler et séquencer les

gènes, puis à étudier leur fonction. Signalons que cette approche ne concerne pas uniquement les végétaux.

Les espèces modèles

L'Arabette ou *Arabidopsis thaliana* a été choisie comme espèce modèle pour les programmes de séquençage, car elle cumule un certain nombre de caractéristiques : un génome de taille réduite (100 à 130 mégabases), un cycle de développement rapide (2 mois), une reproduction autogame. Sur cette espèce, de nombreuses techniques sont facilement mises en œuvre comme la transgénèse. De plus, la structure de son génome est conservée dans les espèces apparentées. Les découvertes seront donc directement transposables sur le colza, notamment.

Le riz est également la plante modèle des graminées cultivées, car c'est la graminée cultivée au plus petit génome. De plus, elle possède une bonne synténie avec l'ensemble des autres espèces de ce genre.

Chez le maïs, il s'agit là d'un programme de grande ampleur car la taille du génome est plus importante. On estime que le nombre de gènes est environ 5 fois supérieur à celui d'*Arabidopsis*.

Le catalogue des gènes

Pour pouvoir accéder à la connaissance du génome des plantes modèles, un inventaire exhaustif des gènes a débuté selon deux approches :

- La première approche est basée sur l'inventaire des gènes exprimés. Les séquences caractérisées sont nommées EST (Expressed Sequence Tags).

Toutefois, cette approche a ses limites. En effet, un gène n'est pas toujours actif dans une cellule. Chez *Arabidopsis*, on estime que 50 % seulement des gènes ont pu être répertoriés par cette méthode.

- La seconde approche s'intéresse au séquençage direct du génome. Ce travail est plus long, mais peut donner la séquence complète des gènes et leurs positions.

Vers la construction de génotypes élités

La génomique devrait permettre d'accroître les connaissances dans le domaine végétal et donc d'identifier de nombreux gènes de plantes. Ainsi, les applications sont dans trois domaines :

- La fourniture d'une grande quantité de marqueurs moléculaires liés à des fonctions ou à des phénotypes. Ceci permet la réalisation de sélection assistée par marqueurs pour des caractères de qualité ou de valeur agronomique.

- Un meilleur contrôle de la régulation des gènes.
- L'identification d'un réservoir de gènes candidats pour l'analyse des QTL de caractères agronomiques majeurs.
- L'identification d'allèles favorables.