

Cour 05 construction des cartes génétique de marqueurs polymorphes

1. LES MARQUEURS MOLÉCULAIRES

1.1. Les balise du génome

- 1.1.1. Les marqueurs RFLP
- 1.1.2. Les marqueurs microsatellites
- 1.1.3. Les marqueurs RAPD
- 1.1.4. Les marqueurs AFLP
- 1.1.5. Les marqueurs SNP
- 1.1.6. Les principaux marqueurs moléculaires

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

Introduction :

En cartographie génétique, un **marqueur génétique** définit une séquence d'ADN particulière utilisée pour *baliser* les chromosomes. Ce marqueur moléculaire est un segment d'ADN ayant un emplacement physique identifiable (locus) sur un chromosome et dont le patrimoine génétique peut être tracé.

Un marqueur peut être un gène ou une section d'ADN sans fonction connue. Étant donné que les segments d'ADN sur un chromosome tendent à être hérités ensemble, les marqueurs sont souvent utilisés comme moyens indirects de suivre le schéma d'héritage d'un gène qui n'a pas encore été identifié, mais dont l'emplacement approximatif est connu. Les marqueurs sont utilisés pour la cartographie génétique en tant que première étape dans la recherche de la position et de l'identité d'un gène.

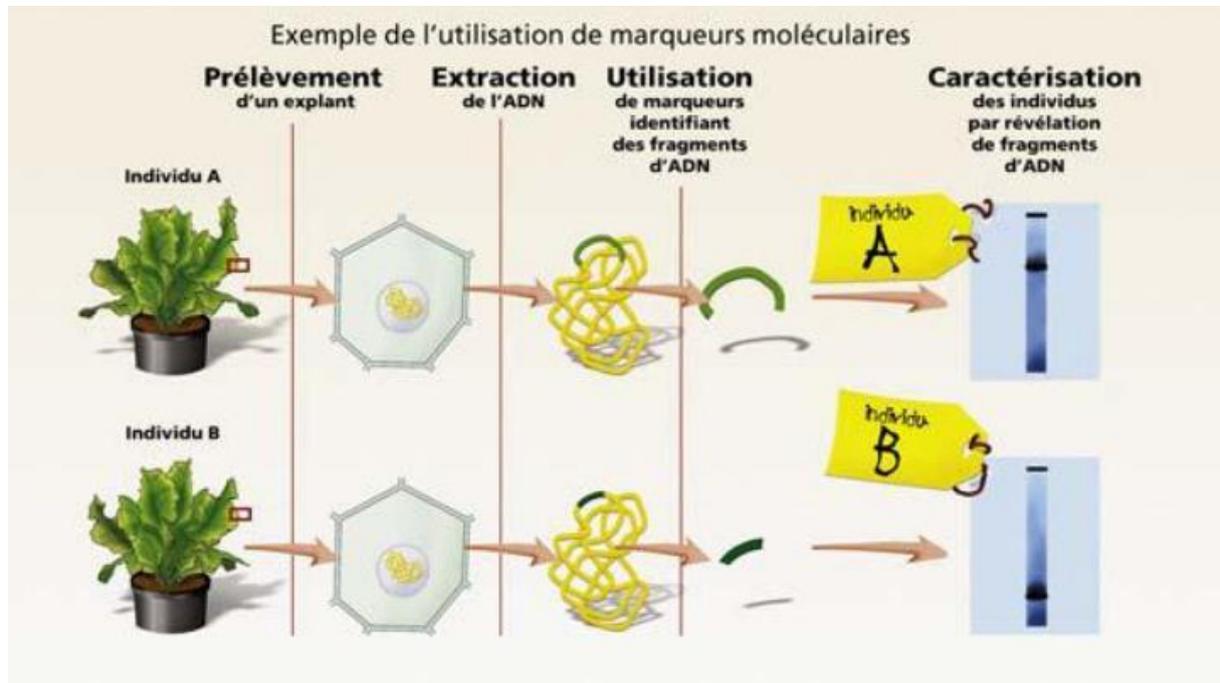
Les premiers marqueurs connus étaient des allozymes. Ils sont largement utilisés en génétique humaine, végétale, animale et microbienne. Ils permettent de montrer des variations (polymorphismes) de la séquence d'ADN entre deux individus, de modifier ou non leur phénotype. Ils fonctionnent comme des marqueurs pour différentes régions du génome.

Au cours du contrôle du transfert de gène : gène associé au gène d'intérêt, codant une caractéristique détectable facilement et précocement, facilitant le repérage des cellules au sein

desquelles la transgénèse a réussi. La détection d'un marqueur génétique peut s'effectuer par hybridation avec une sonde complémentaire, ou par son expression phénotypique.

1. LES MARQUEURS MOLÉCULAIRES

1.1. Les balise du génome



➤ Qu'est-ce qu'un marqueur moléculaire

La découverte des marqueurs moléculaires du génome remonte aux années 1985-1990, un marqueur moléculaire peut être défini comme une étiquette au niveau de la molécule d'ADN, étiquette qui va ségréger comme un gène, avec différents allèles.

Un marqueur moléculaire est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte. Les marqueurs moléculaires correspondent donc au polymorphisme révélé au niveau de l'ADN. L'analyse de ce polymorphisme par les techniques de biologie moléculaire s'adresse à l'ensemble du génome, qu'il soit ou non traduit en protéines, et est indépendante des conditions de l'environnement.

En outre, le nombre de marqueurs observables est théoriquement illimité et le génotype d'une plante peut être déterminé à un stade très précoce. Ces marqueurs seront d'une grande importance dans l'amélioration des cultures à valeur agronomique et dans les programmes de sélection assistée par marqueurs chez les plantes.

Les marqueurs moléculaires correspondent à des différences nucléotidiques existant au niveau de la molécule d'ADN, des techniques de biologie moléculaire permettent de révéler ce

polymorphisme de séquences. Ces différences entre allèles peuvent correspondre à des mutations ponctuelles, des réarrangements chromosomiques ou des mutations silencieuses, elles peuvent se trouver dans des régions codantes ou non codantes.

➤ **Caractéristiques d'un marqueur génétique**

Selon De vienne (1999) un marqueur génétique idéal doit être :

- **Polymorphe** : la matière première du généticien est la variabilité,
- **Multi-allélique** : c'est-à-dire possédant plusieurs allèles (donc des séquences d'ADN différentes) sur un même locus.
- **Co-dominant** : l'hétérozygote présente simultanément les caractères des deux parents homozygotes, il peut être distingué de chacun des homozygotes parentaux.
- **Non épistatique** : son génotype peut être "lu" à partir de son phénotype quel que soit le génotype aux autres locus. La codominance et le non épistasie peuvent être respectivement définis comme l'absence d'interaction intra et inter locus.
- **Neutre** : les substitutions alléliques au locus marqueur n'ont pas d'autres effets phénotypiques (et donc éventuellement sélectifs) ceux qui permettent de déterminer son génotype. Dans leur très grande majorité les polymorphismes moléculaires sont neutres.

➤ **Les types de marqueurs génétiques**

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.

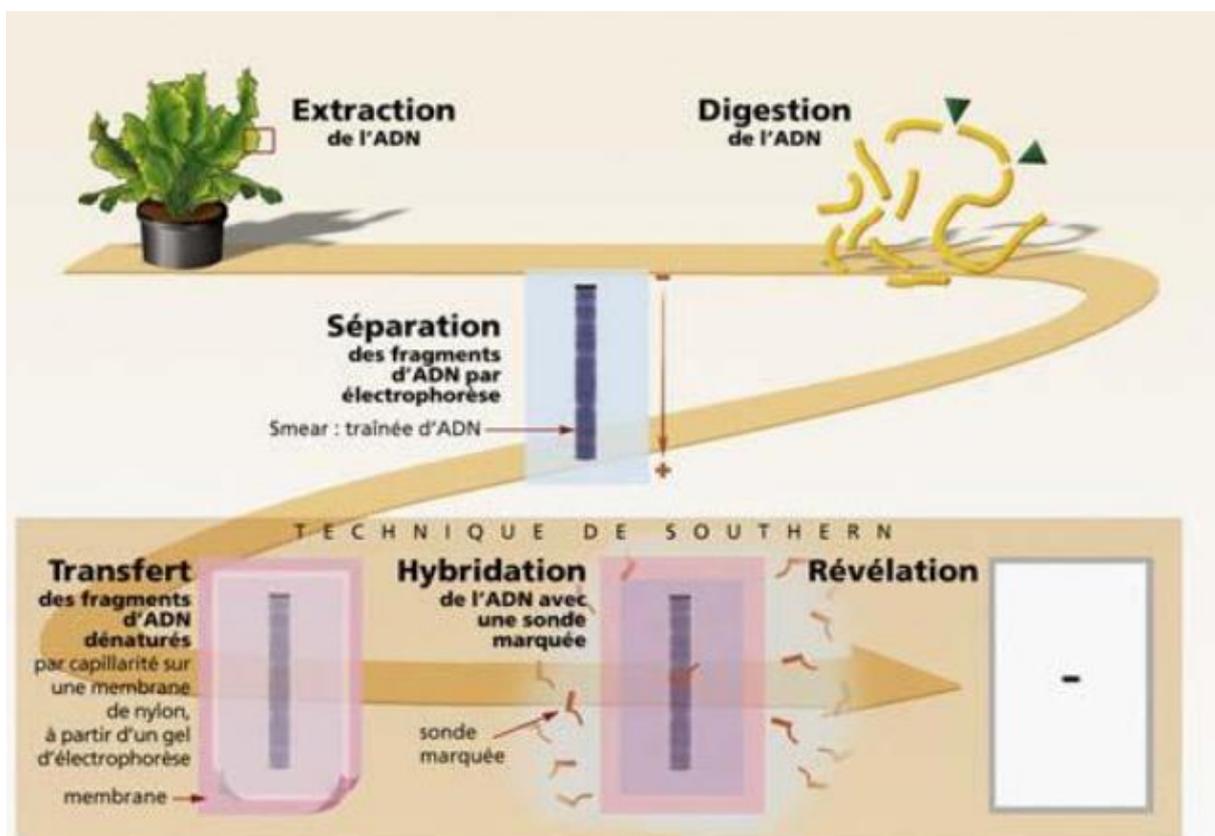
- **Les marqueurs moléculaires d'ADN**. Ce sont les plus étudiés. Ces marqueurs sont des séquences codantes ou non, présentant un polymorphisme selon les individus. Par les techniques de biologie moléculaire, plusieurs outils ont été développés, permettant d'obtenir directement à partir des marqueurs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

1.1.1. Les marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)



La technique RFLP développée par Botstein et al. (1980) repose sur la mise en évidence de la variabilité de la séquence nucléotidique de l'ADN génomique après digestion par des enzymes de restriction, les marqueurs RFLP combinent l'utilisation d'enzymes de restriction et de sondes génétiques et permet de révéler des mutations présentes au niveau de l'ADN.

- **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.

Le principe du RFLP consiste à soumettre l'ADN d'un individu à l'action d'enzymes qui coupent l'ADN à des sites très précis. Une multitude de fragments d'ADN de tailles variables est générée par digestion enzymatique, puis séparée sur gel d'agarose et transférée par capillarité sous forme dénaturée sur une membrane de nylon. S'il survient un changement de la séquence dans un site de restriction, l'enzyme ne le reconnaît pas et elle ira couper le site suivant. Donc, le polymorphisme observé entre deux individus est basé sur la différence qui existe dans la longueur des fragments obtenus après la digestion enzymatique.

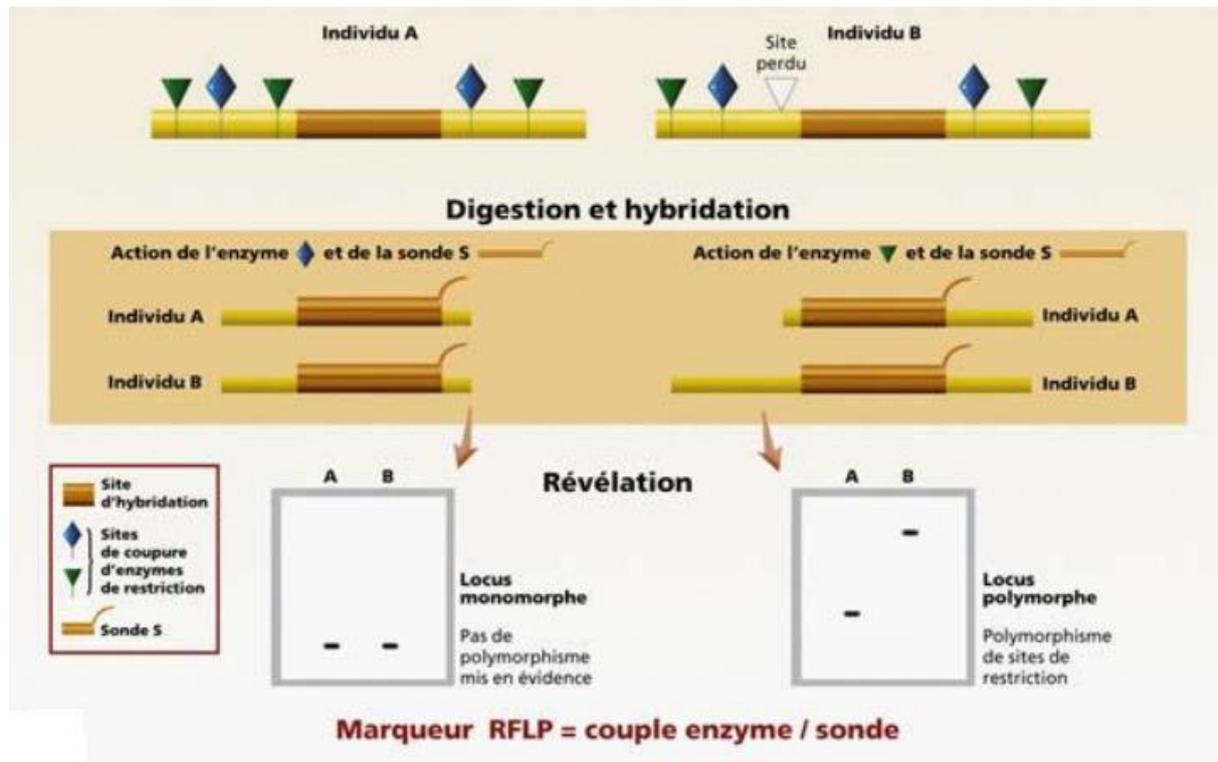
Le polymorphisme détecté est dû à des mutations au niveau des sites de restriction de l'enzyme (polymorphisme de site de restriction) et/ou à des délétions/insertions d'un fragment d'ADN au voisinage de la zone génomique reconnue par la sonde. **C'est le couple enzyme/sonde qui constitue le marqueur.**

Les RFLP sont dits co-dominants parce qu'ils distinguent entre les organismes hétérozygotes et homozygotes. Un organisme hétérozygote à un locus (Aa) présentera deux fragments de tailles différentes alors qu'un seul fragment ne sera visible pour organisme homozygote (AA ou aa). Bien que cette technique soit co-dominante et permet une analyse génétique complète, elle est

lente et laborieuse. Les étapes de transfert et d'hybridation empêchent une automatisation du travail.

- **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.



1.1.2. Les marqueurs de type SSRs (Simple Sequence Repeats) ou microsatellites

Le terme microsatellite a été inventé par Litt et Luty (1989), également appelé séquences simples répétées (SSR). C'est un polymorphisme de nombre d'unités de répétition.

Ce sont des éléments d'ADN qui se répètent plusieurs fois à différents endroits (séquences de di-, tri- ou tétra- nucléotides répétés en tandem) chez tous les organismes, à la fois les eucaryotes et les procaryotes. Les séquences répétées sont souvent simples, de taille de 1 à 6 paires de bases et ils sont présents dans les deux régions codantes et non codantes (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). Ces régions flanquantes tendent à être conservées à l'intérieur de l'espèce.

Les microsatellites présentent un taux de polymorphisme élevé, qui repose sur la variation du nombre d'unités de répétition constituant ces derniers.

- **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.

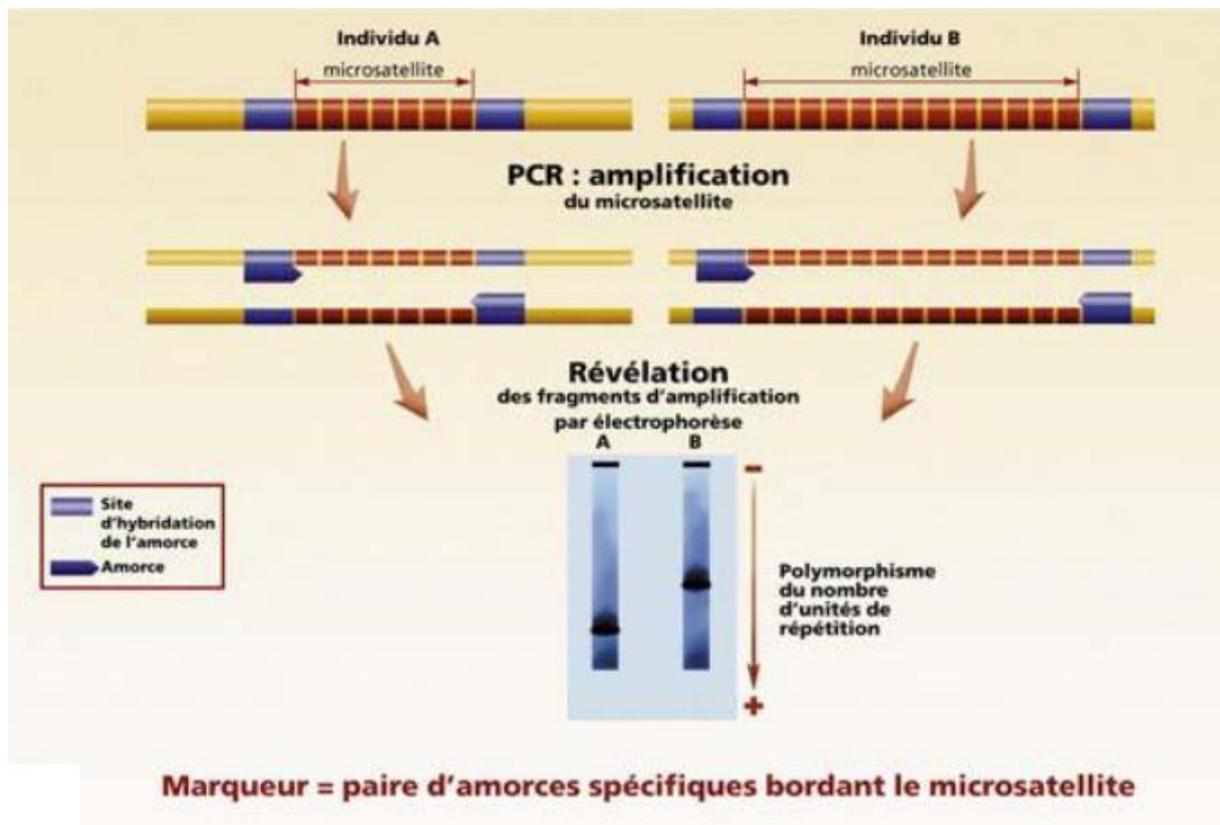
Un individu B, possédant plus d'unités de répétition que A, a un produit d'amplification qui migre plus lentement que A.

- **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.



1.1.3. Les marqueurs RAPD

La technique RAPD-PCR a été mise au point en 1990 par William et al. Welsh et Mc Clelland. Elle est basée sur la réaction d'amplification en chaîne (PCR) de séquences prises au hasard d'ADN génomique. Cette technique repose sur l'utilisation de courtes paires d'amorces arbitraires généralement de 5 à 15 Pb de longueur. Une amorce RAPD permet généralement l'amplification d'une dizaine de fragments correspondant à des locus dominants. Les produits d'amplification sont généralement visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose.

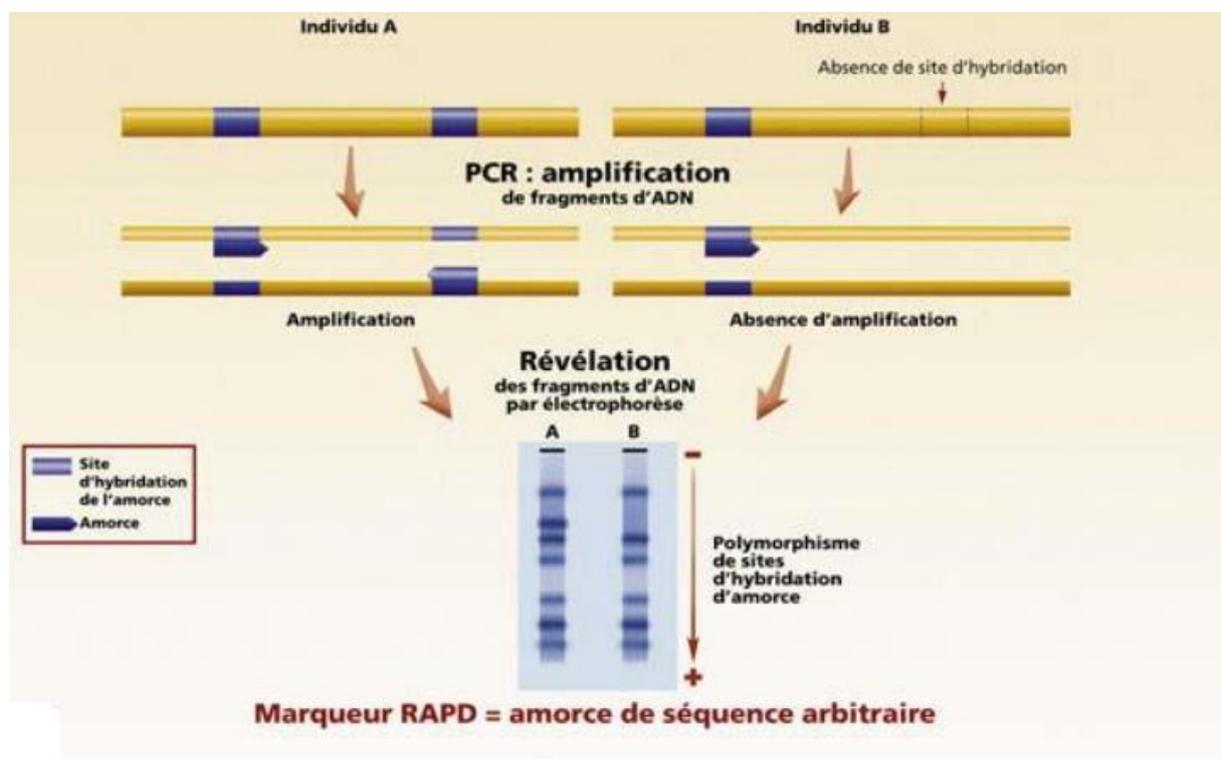
Le polymorphisme détecté en RAPD se situe au niveau des sites d'appariement d'une amorce sur le brin d'ADN. Lors de la réaction PCR, les amorces mises en présence de l'ADN dénaturé d'un organisme, vont s'apparier à deux sites différents situés sur les deux brins complémentaires. Dans cette réaction, les amorces oligo-nucléotides de séquence aléatoire fonctionnent dans les deux sens (forward / reverse) de génome à une température constante d'hybridation. Le polymorphisme observé se traduit par la présence ou l'absence de bande chez les différents génotypes.

Le polymorphisme décelé est dû à des mutations (un changement nucléotidique qui empêche l'appariement de l'amorce) soit une délétion du site d'appariement de celle-ci ou encore d'une insertion de nucléotides qui fait en sorte d'augmenter la longueur du segment entre les deux

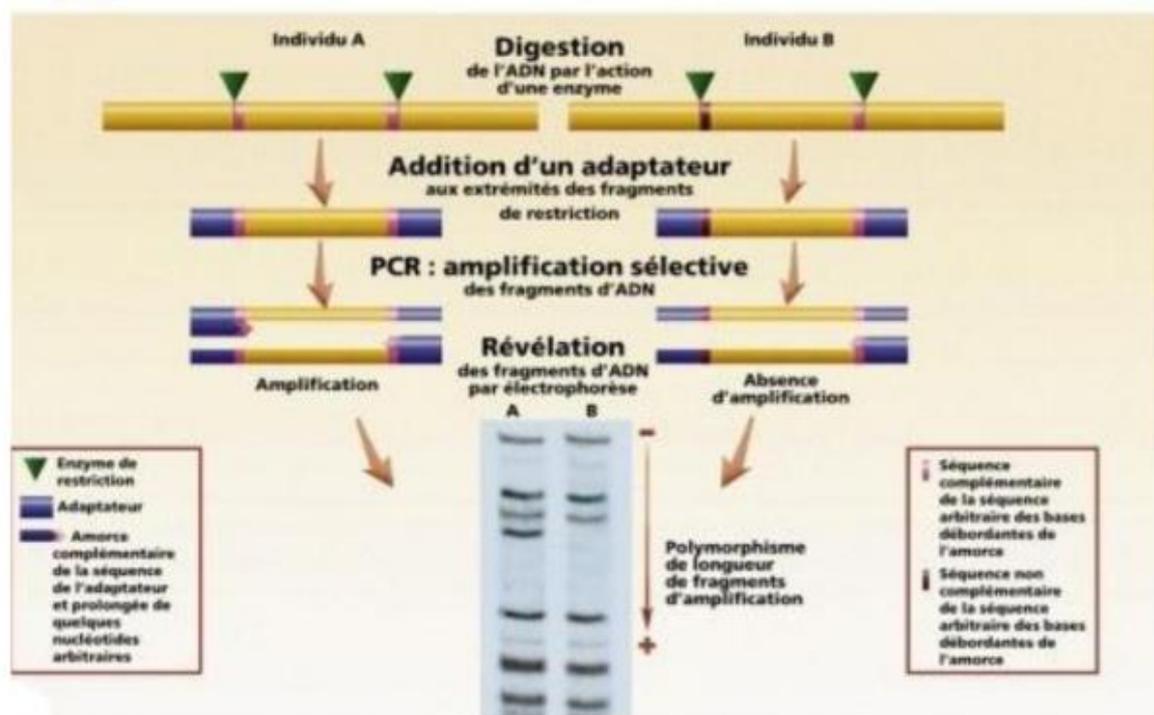
sites d'appariement ne permettant pas l'amplification. En conséquence, un polymorphisme de présence/absence sera observé. Dans certains cas on peut observer un manque de reproductibilité de ces marqueurs. Toutefois, lorsqu'un marqueur RAPD a été identifié il est aisé de le transformer en un marqueur SCAR (Sequence characterized amplified region) qui est spécifique à une région de l'ADN.

Les marqueurs RAPD ont été utilisés chez plusieurs espèces pour l'analyse de la diversité génétique, la caractérisation de ressources génétiques, l'identification de cultivars et la cartographie des génomes. Cette technique est simple, rapide et ne nécessite ni un marquage radioactif ni une connaissance préalable de la séquence nucléotidique. Elle constitue un moyen rapide et efficace pour réaliser des screening en génétique moléculaire en s'appuyant sur la technique PCR.

Comme la PCR, la RAPD est basée sur la réplication d'ADN double brin. Alors que la PCR classique nécessite deux amorces oligonucléotidiques dont les séquences sont complémentaires des segments encadrant le fragment, la RAPD-PCR nécessite seulement la présence d'une amorce unique choisie au hasard (random). Cette amorce joue à la fois le rôle d'amorce sens et antisens, Il existe donc un nombre très important d'amorces qui peuvent être utilisées en RAPD, et permettant d'amplifier simultanément différentes parties d'un génome.



1.1.4. Les marqueurs AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism)



La technique AFLP (Amplified fragments length polymorphism) développée par Vos et al. (1995) combine à la fois l'utilisation des enzymes de restriction de l'ADN génomique et la technologie PCR. 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.

Après la digestion de l'ADN génomique, des adaptateurs de séquence connue et spécifiques des deux sites de restriction sont ajoutés aux extrémités des fragments de restriction. Une première amplification, dite pré-amplification, est réalisée à l'aide d'amorces de séquences complémentaires à la séquence des adaptateurs et des sites de restriction. La deuxième amplification, dite sélective, utilise des amorces identiques aux premières mais prolongées à l'extrémité 3' de quelques nucléotides arbitraires (de 1 à 3 nucléotides). Ainsi, seuls sont

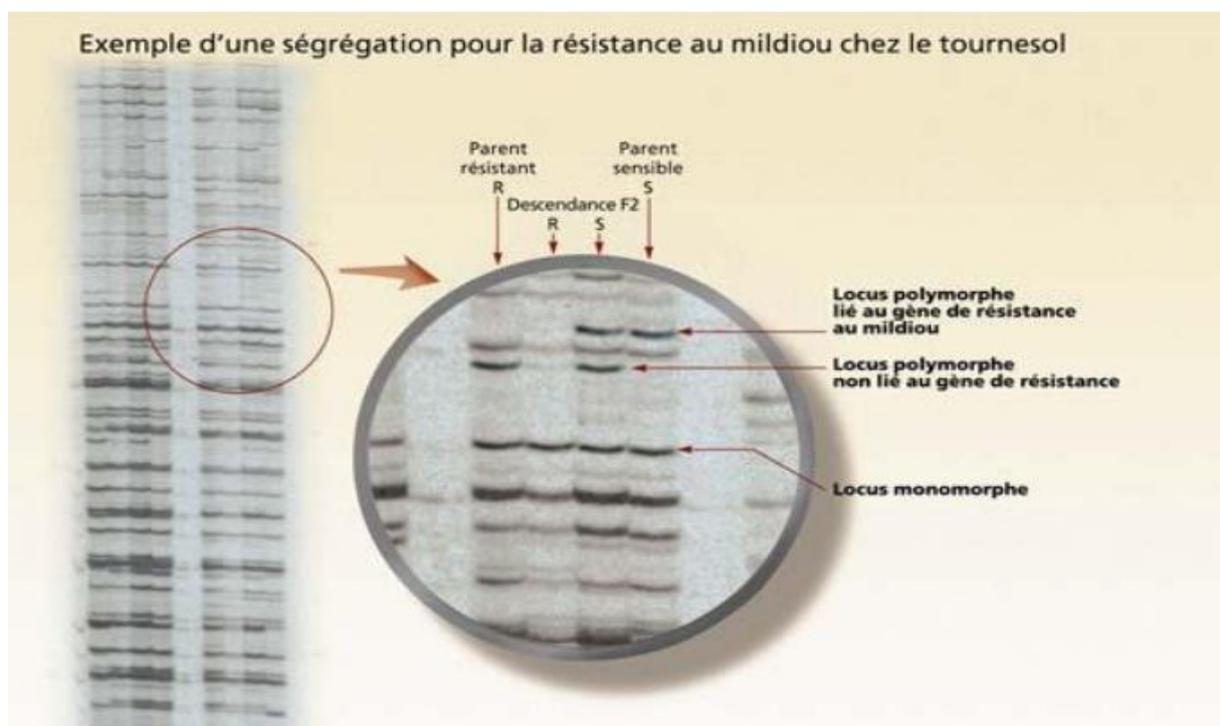
amplifiés les fragments possédant les bases complémentaires de ces bases arbitraires. Les produits de la PCR sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturé et révélés par radiographie. C'est la combinaison enzyme de restriction/amorce qui permet de révéler le polymorphisme entre les organismes et constitue donc le marqueur AFLP.

Les AFLP ont été largement utilisés pour l'identification des cultivars et la détermination de leurs relations phylogénétiques, la cartographie des génomes, elles sont utilisées aussi pour l'analyse de la diversité génétique des agents pathogènes des plantes en raison du nombre élevé de loci qui peuvent être détectés simultanément.

Cependant, parmi les limites des marqueurs AFLP est qu'ils sont techniquement difficiles et coûteux. D'autre part, les AFLP sont notés comme marqueurs dominants, ce qui a réduit leur contenu informatif, car ils ne permettent pas de faire la distinction entre les individus hétérozygotes et homozygotes.

En résumé, les marqueurs RFLP et microsatellites sont spécifiques de locus, codominants et sont utilisés généralement pour la cartographie et la détection de QTL (Quantitative Trait Loci) tandis que les marqueurs RAPD et AFLP sont dominants, non spécifiques de locus et servent essentiellement à la saturation d'une région du génome au voisinage d'un gène d'intérêt en vue de son clonage.

- **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.

La comparaison des principales techniques de marquage moléculaire est illustrée dans le tableau suivant, chaque technique de marquage moléculaire présente des avantages et des inconvénients.

Marqueur	Avantages	Inconvénients
RFLP	<ul style="list-style-type: none"> -La RFLP est une méthode fiable et facilement transférable entre laboratoire. -Il s'agit d'un marqueur codominant. -Aucune information sur la séquence n'est requise. -Elle est utilisable pour faire des cartes génétiques de liaisons. 	<ul style="list-style-type: none"> -La RFLP nécessite une grande quantité d'ADN. -Elle n'est pas automatisable, vue les étapes de transfert et d'hybridation. -Certaines espèces possèdent un taux peu élevé de polymorphisme. -Un faible nombre de locus sont détectés par expérience.
RAPD	<ul style="list-style-type: none"> -L'AFLP permet un survol rapide de l'ensemble du polymorphisme du génome. -Elle est hautement reproductible. -Il n'y a pas besoin de connaître une séquence et de créer des sondes spécifiques. -Elle permet la création facile et rapide de cartes génétiques. 	<ul style="list-style-type: none"> -La génération d'une grande quantité d'information. -nécessite une analyse automatisée et la technologie informatique. -Ce sont des marqueurs dominants. - Les marqueurs AFLP sont souvent localisés aux centromères et aux télomères.
SSR	<ul style="list-style-type: none"> -Les microsatellites sont des marqueurs codominant. -Ils sont très largement utilisés. -Ils y a une grande fréquence de SSR dans le génome. -Les microsatellites sont bien répartis à travers tout le génome. 	<ul style="list-style-type: none"> -La préparation des microsatellites est assez lourde car il faut « cribler une banque génomique enrichie avec une sonde du microsatellite, séquencer les clones positifs, synthétiser les amorces oligonucléotidiques et tester les paires d'amorces dans un échantillon d'individus ».

1.1.5. Marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphisme)

Les SNP sont des variations naturelles qui ne concernent qu'un seul nucléotide dans une séquence donnée. Comparés aux autres marqueurs moléculaires, les SNP présentent l'avantage d'une répartition homogène dans tout le génome et d'être excessivement nombreux.

Ce nombre élevé permet donc potentiellement la création de cartes génétiques à très haute densité.

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

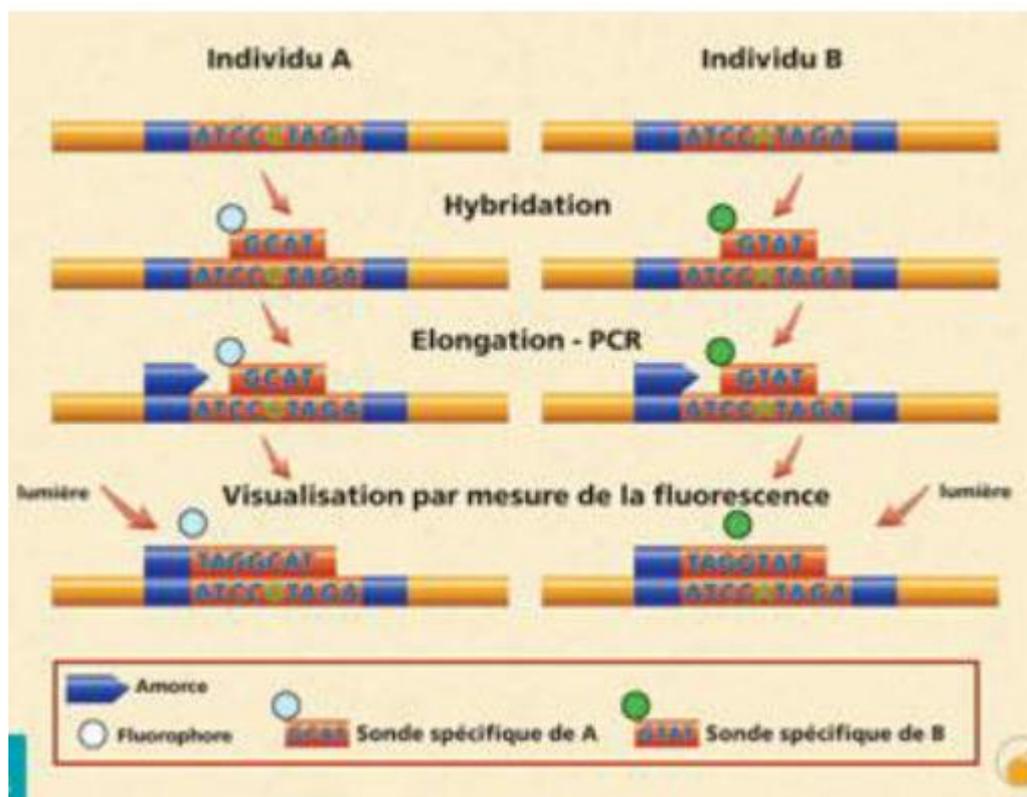
Cette technique consiste à hybrider sur l'ADN cible une sonde complémentaire portant une molécule fluorescente (le fluorophore). Chaque sonde est spécifique d'une séquence d'ADN donnée.

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.

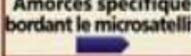
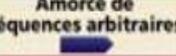
Enfin, une visualisation par excitation et quantification du fluorophore, à une longueur d'onde qui lui est propre, est réalisée. Les individus A et B ne révèlent pas la même fluorescence, ils ont donc un polymorphisme au niveau d'un nucléotide.

- **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. 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

- **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.

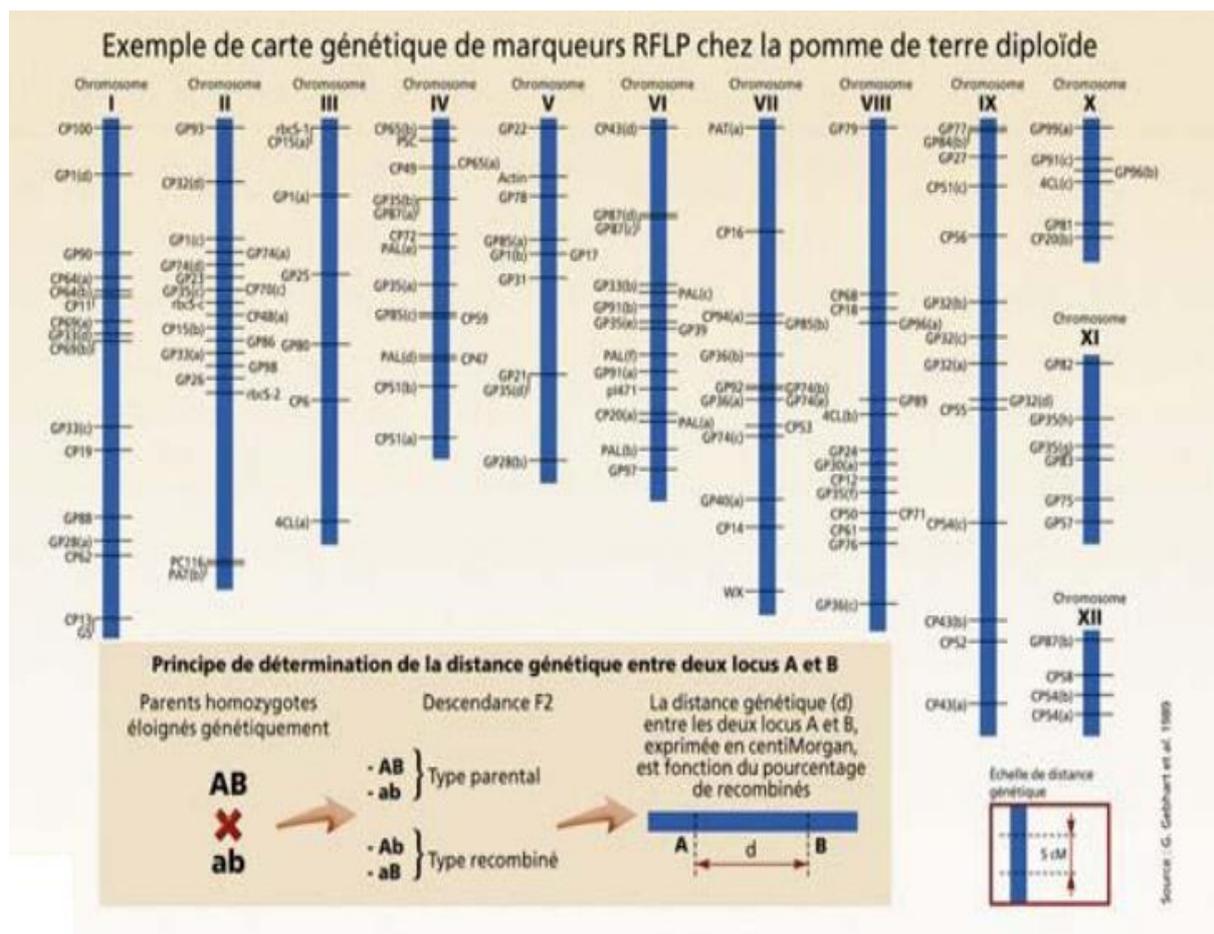
La présence d'une bande signifie que l'individu possède un ou deux allèles "présence de bande", c'est-à-dire que l'on ne peut pas différencier l'hétérozygote de l'homozygote "présence de bande". L'absence de bande signifie par contre sans ambiguïté un individu homozygote pour l'allèle "présence de bande".

- **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.

2. Les cartes génétiques

2.1. La cartographie des marqueurs moléculaires



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

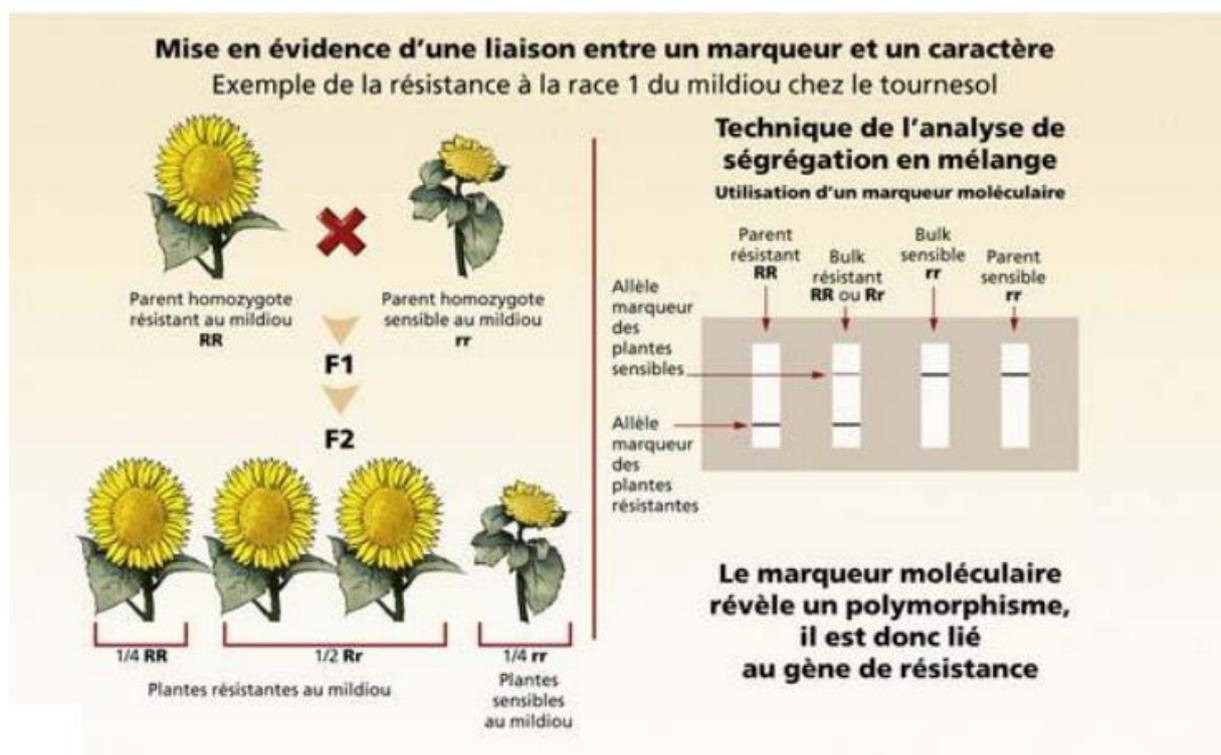
Les cartes génétiques permettent de représenter la disposition des gènes ou des marqueurs sur un chromosome.

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.

2.2. 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.

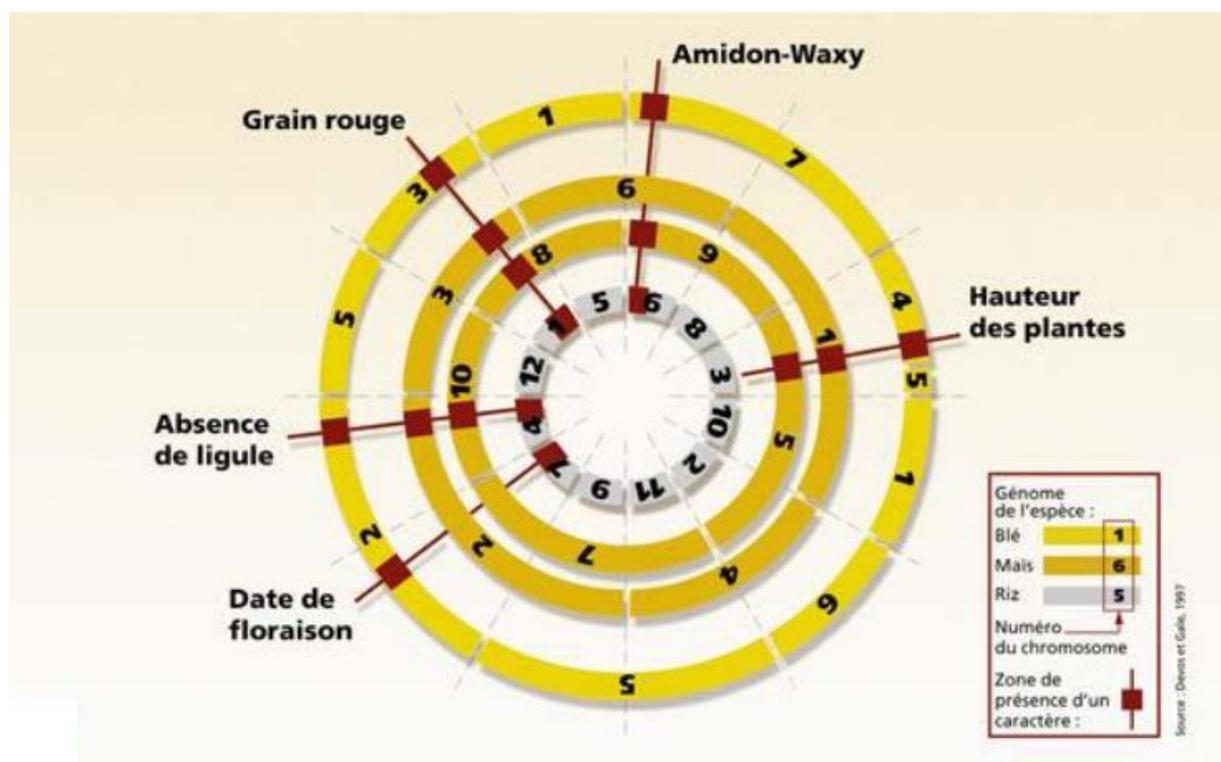
On peut ainsi cribler une collection de géniteurs et déterminer si par exemple des plantes possèdent une source de résistance.

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.

2.3. 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.

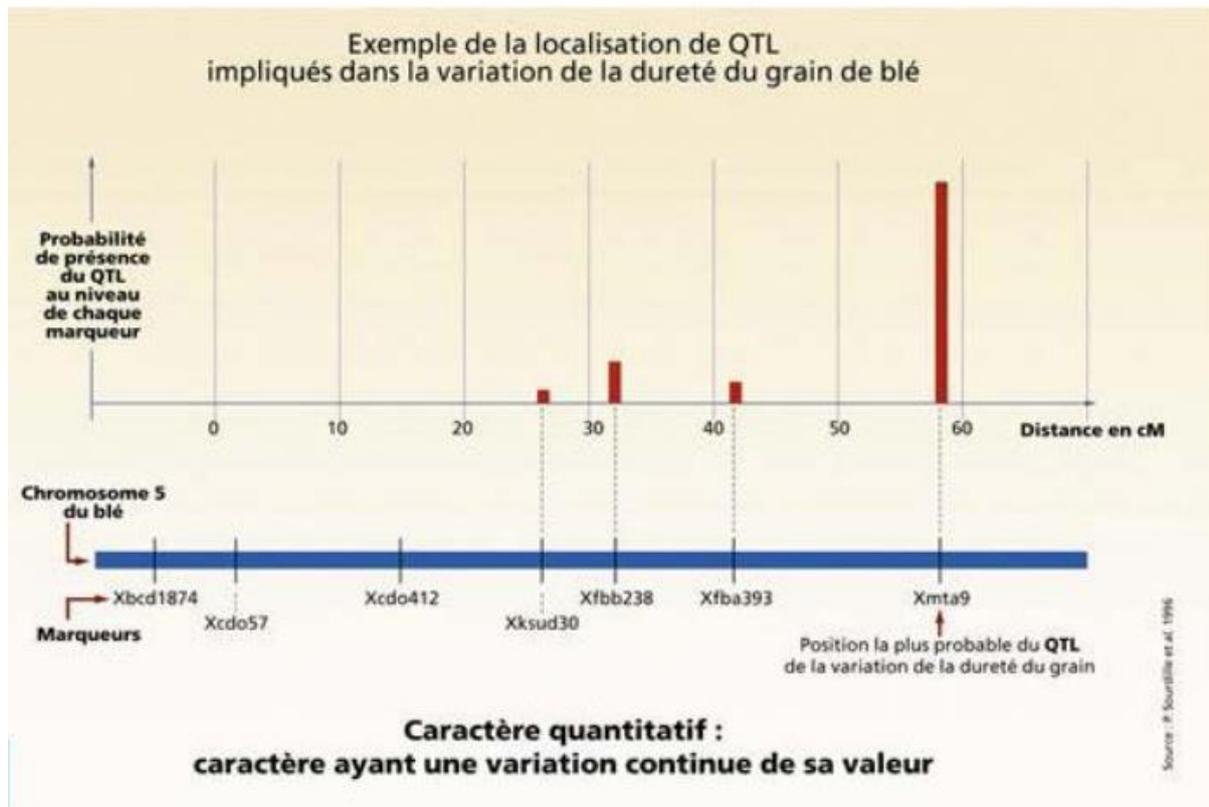
On constate également au sein du génome du maïs des homologies. Le chromosome 5 par exemple a une homologie avec le chromosome 1.

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 décroisonner les programmes de recherche. Un travail réalisé sur une espèce peut ainsi trouver une application rapide et directe sur de nombreuses espèces.

2.4. La cartographie d'un caractère quantitatif



- **Qu'est-ce qu'un caractère quantitatif ?**

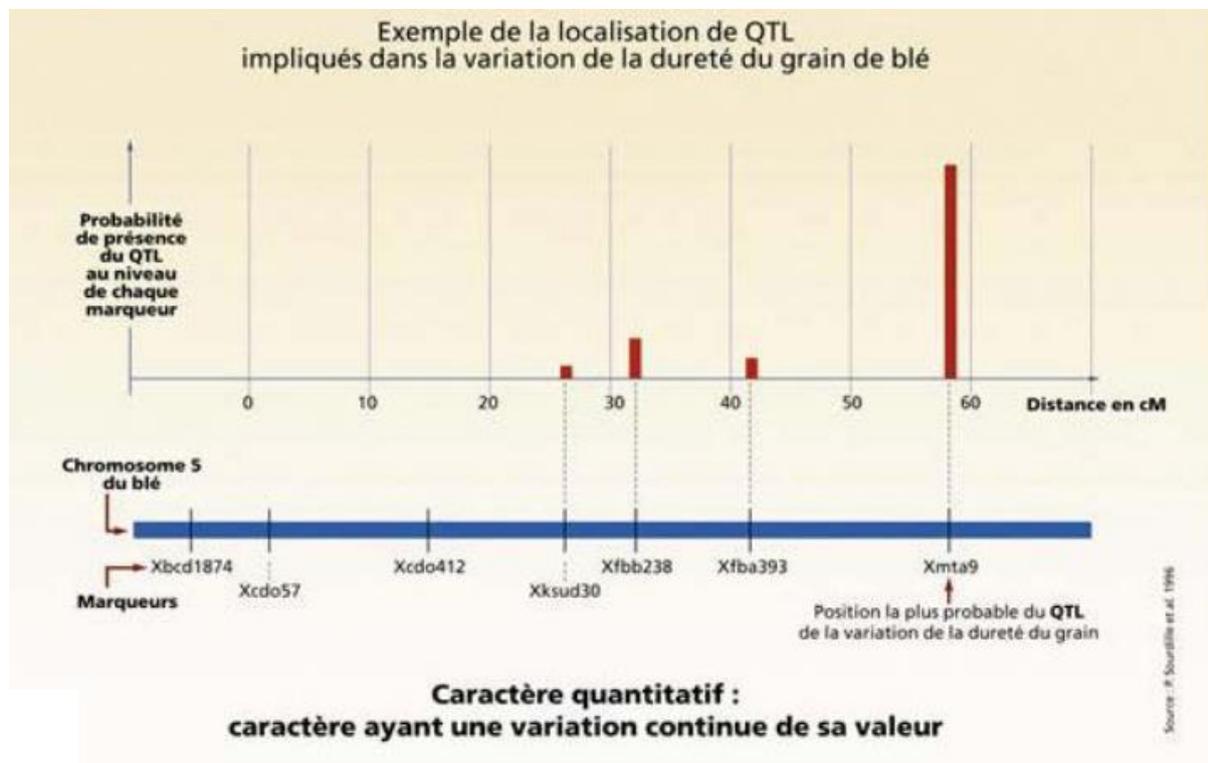
De très nombreux caractères sont des caractères mesurables comme le rendement, la précocité, la taille, la qualité des fruits. On observe une variation continue de leur valeur. Dans ce cas, il n'y a plus d'opposition absolue entre deux phénotypes comme, par exemple : résistant/sensible.

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.