

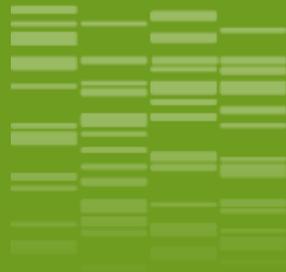
Déterminisme génétique de caractères complexes chez les arbres forestiers

Un exemple chez les peupliers



SOMMAIRE

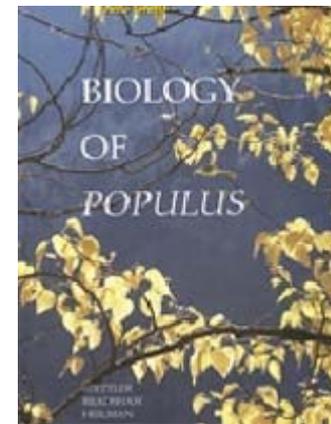
- ❖ Les peupliers
- ❖ L'amélioration génétique chez les peupliers.
- ❖ La cartographie génétique.
- ❖ La sélection assistée par marqueurs.
- ❖ Le déséquilibre de liaison
- ❖ Le clonage de gènes
- ❖ La génétique d'association



01 LES PEUPLIERS

Le genre *Populus*

6 sections et 29 espèces



Bradshaw et al. 1996
doi: 10.1139/9780660165066



Populus nigra var 'Italica'



Populus nigra L.



Populus alba L.



Populus tremula L.

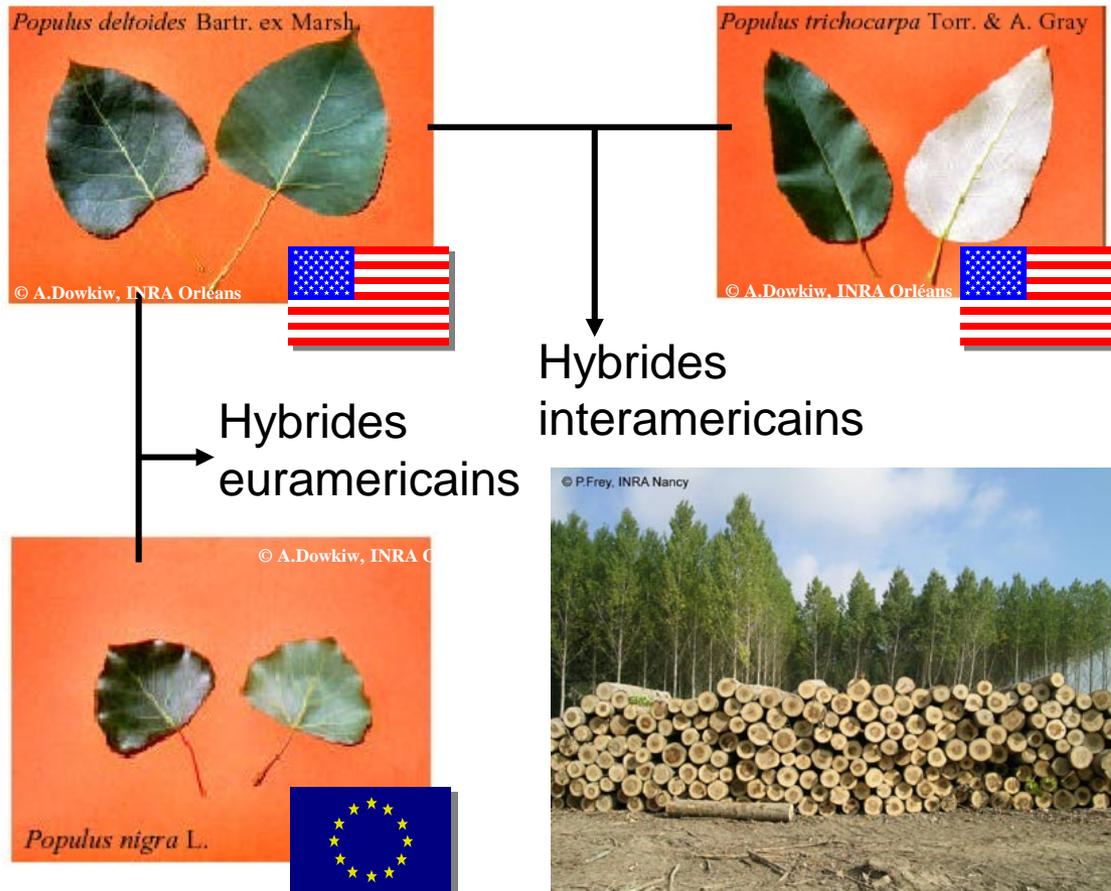


Populus trichocarpa Torr. & A. Gray

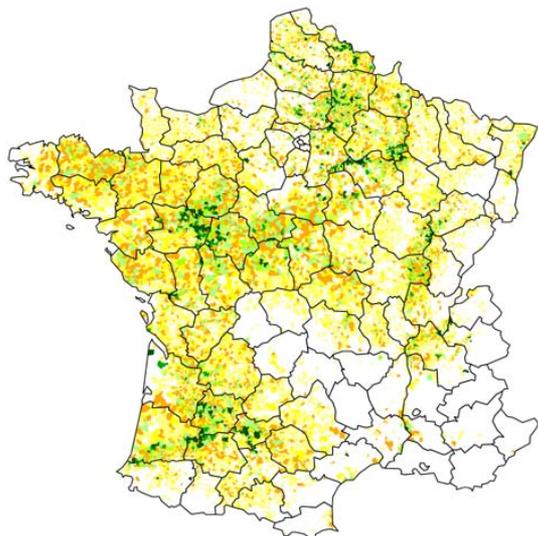


Populus deltoides Bartr. ex Marsh.

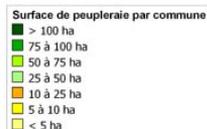
Les peupliers cultivés sont des hybrides interspécifiques



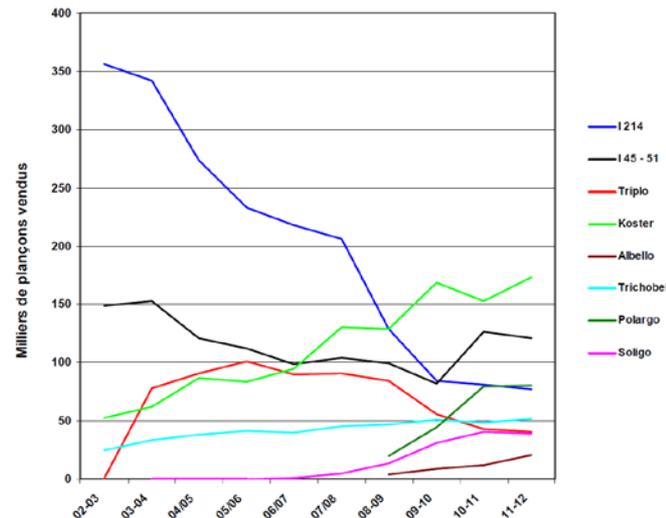
La populiculture en France, quelques statistiques



Source cadastre 2003



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



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



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

Pâte à papier, bois-énergie ...

<http://www.peupliersdefrance.org>

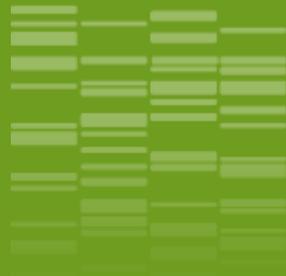
Arbre modèle pour la génomique

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

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

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

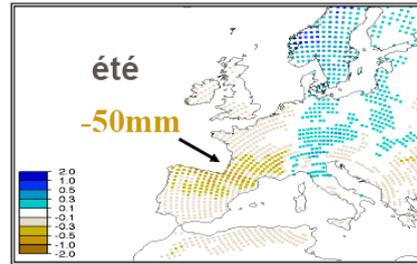




_02

L'amélioration génétique chez les peupliers

Un programme d'amélioration innovant pour des besoins environnementaux et sociétaux changeants



Gains génétiques continus
pour la production de bois

Stabilité
des performances dans un environnement changeant

Valeur ajoutée spécifique

Gestion durable
ressources génétiques

Stratégies d'amélioration innovantes

Gestion de la diversité génétique

Nouveau critères de sélection

Déploiement spatial temporel

Interactions Ressources Nat. /Cult.

Critères de sélection

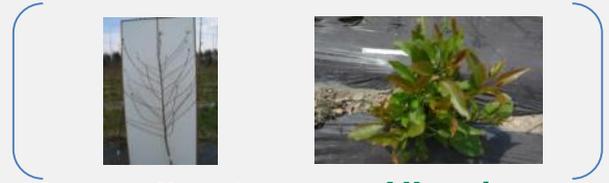
Croissance



Hauteur



Diamètre



Branches sylleptiques

Nb rejets

Phénologie

Débourrement



Arrêt de croissance



Résistances aux ravageurs



Rouille (Mlp)

Marssonina brunnea



Chancre bactérien



Résistances aux insectes

Forme de la tige

Rectitude



Angle de branche



Propriétés du bois

Bois de tension

Densité du bois

Couleur

Contenus en lignin/cellulose

Efficiency de l'utilisation de l'eau (C¹³)

Tolérance à la sécheresse

Estimer la variabilité génétique

Ressources naturelles

P. deltoides



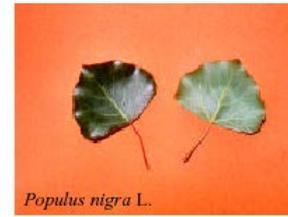
$n \cong 650$ clones

P. trichocarpa



$n \cong 600$ clones

P. nigra



$n \cong 880$ clones

Populus ...

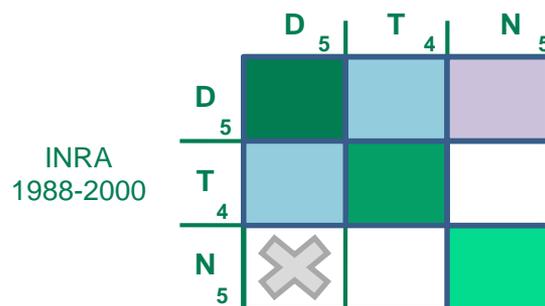


$n > 500$ clones

➤ Evaluation de populations d'amélioration pour les caractères d'intérêt

Hybridation Inter-spécifique (h^2 , AGC, ASC, intra vs inter, V_F , V_{ind})

- 14 x 14 factorial mating design



118 familles PF, **3480** clones

- Single-pair matings

DxN : **28** FS families - **1480** clones

DxT : **21** FS families - **830** clones

- Backcrosses D x (DxT)

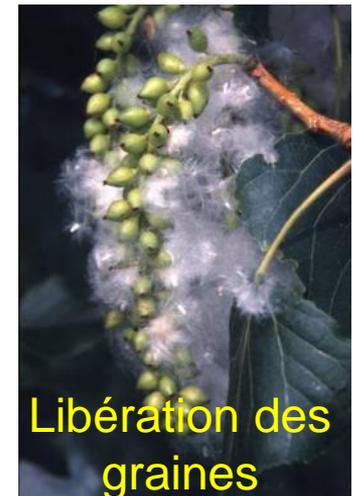
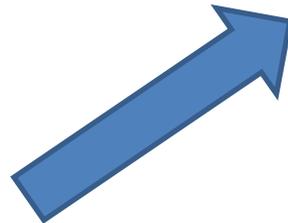
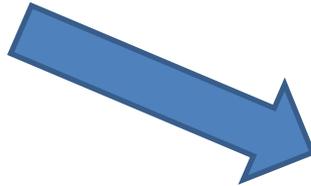
6x4 factorial mating design

14 FS families - **1078** clones

Croisements



Rameaux florifères mâles en cage ...



Crédits photos : M. Villar, M. Juteau, A. Dowkiw, N. Chenault (INRA Orléans)

Décomposition des caractères

Exemple de la résistance à la rouille (1)

En chambre de culture ...



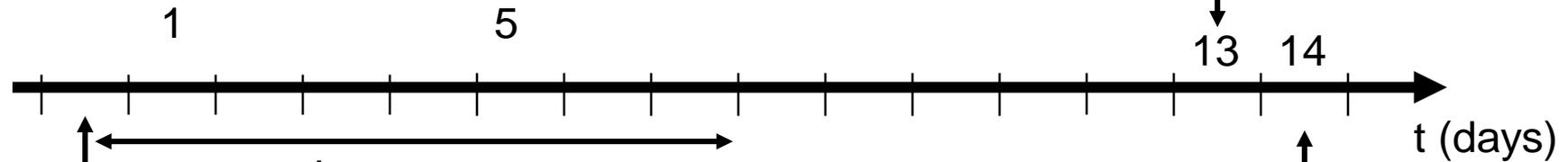
(Dowkiw, 2003)



(Dowkiw, 2003)

Nombre d'urédies

13 14



Latence

Taille des urédies



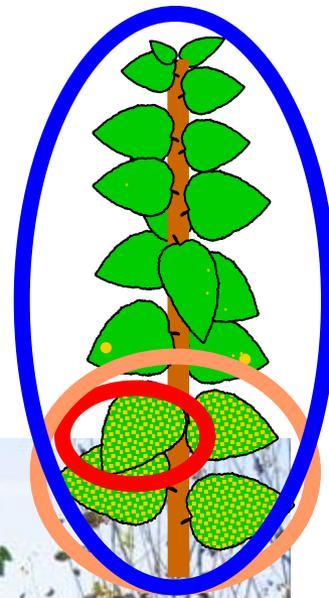
(Dowkiw, 2003)

Inoculation

Décomposition des caractères

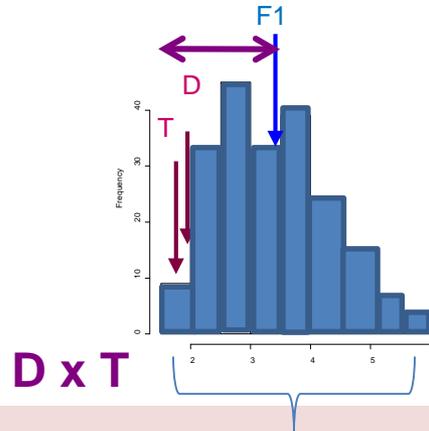
Exemple de la résistance à la rouille (2)

... en champ



Composantes de la variation génétique chez les hybrides interspécifiques

Hétérosis et transgressions...



D x N

	Hétérosis moyenne	Gamme familiale
Hauteur	46%	+21% - +61%
Diamètre	61%	+43% - +73%
Angle de branche	0 ns	- 3% - +5%
Rouille resistance	- 28%	- 35% - -15%

	Hétérosis moyenne	Gamme familiale
Hauteur	32%	+23% - +41%
Diamètre	53%	+35% - +68%
Angle de branche	0 ns	- 7% - +11%
Rouille resistance	-12%	- 18% - -6%

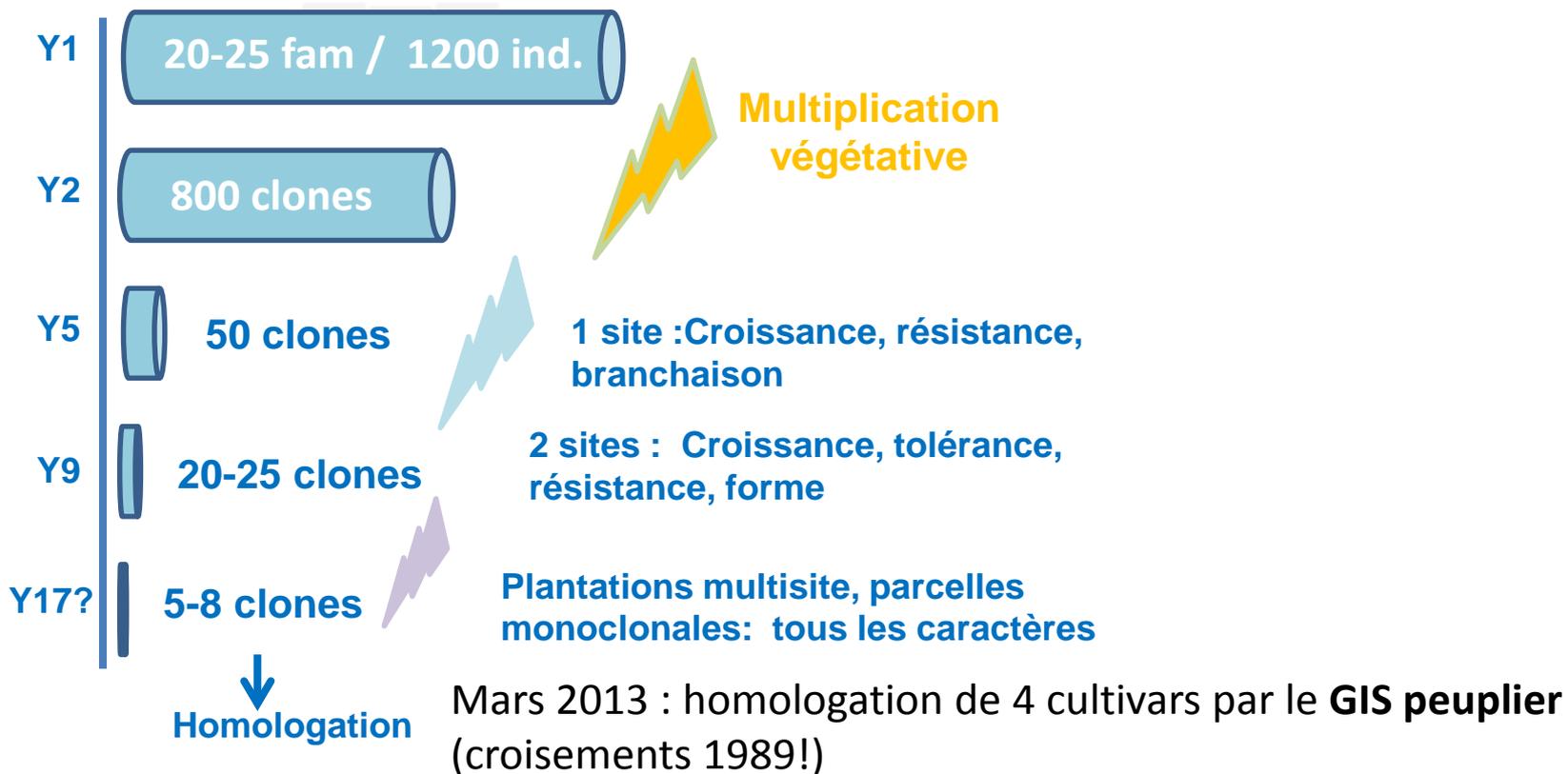
Ages optimaux de sélection



- (1) Longueur du cycle de sélection
- (2) Capacités limitées pour une sélection en conditions multisites
- (3) Contrôle des corrélations défavorables dans schéma à plusieurs étapes

Sélection clonale à plusieurs étapes

1 série



Delrive



Delvignac



Dellinois



Delgas

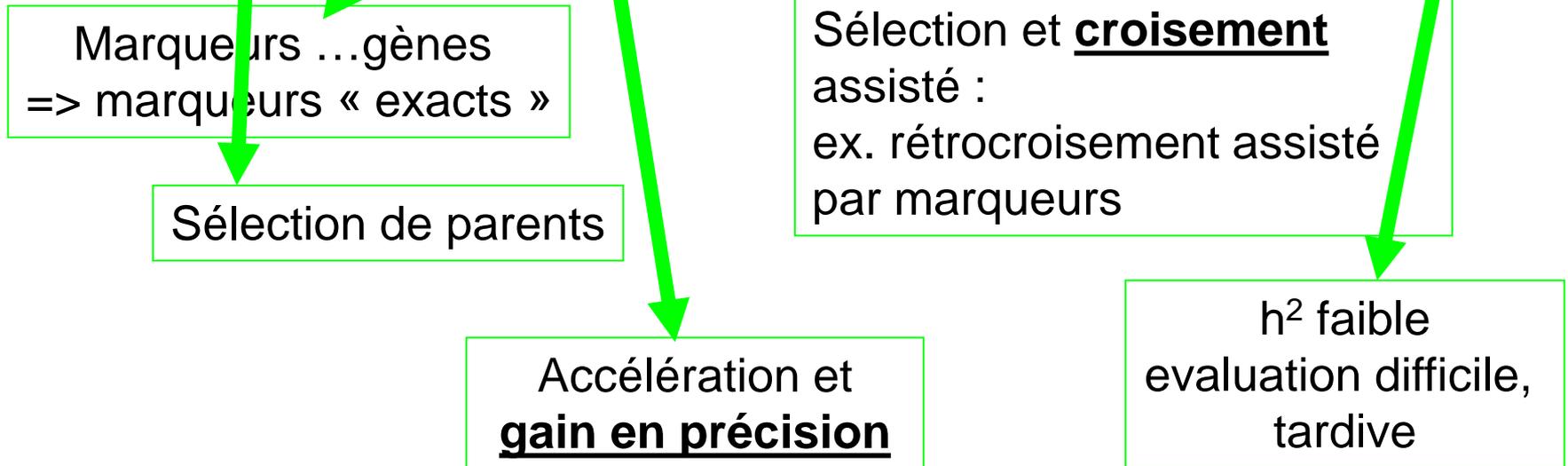
Crédit photos : V. Bourlon, Irstea

Utilisation des marqueurs moléculaires pour une sélection précoce

La Sélection Assistée par Marqueurs: Une définition

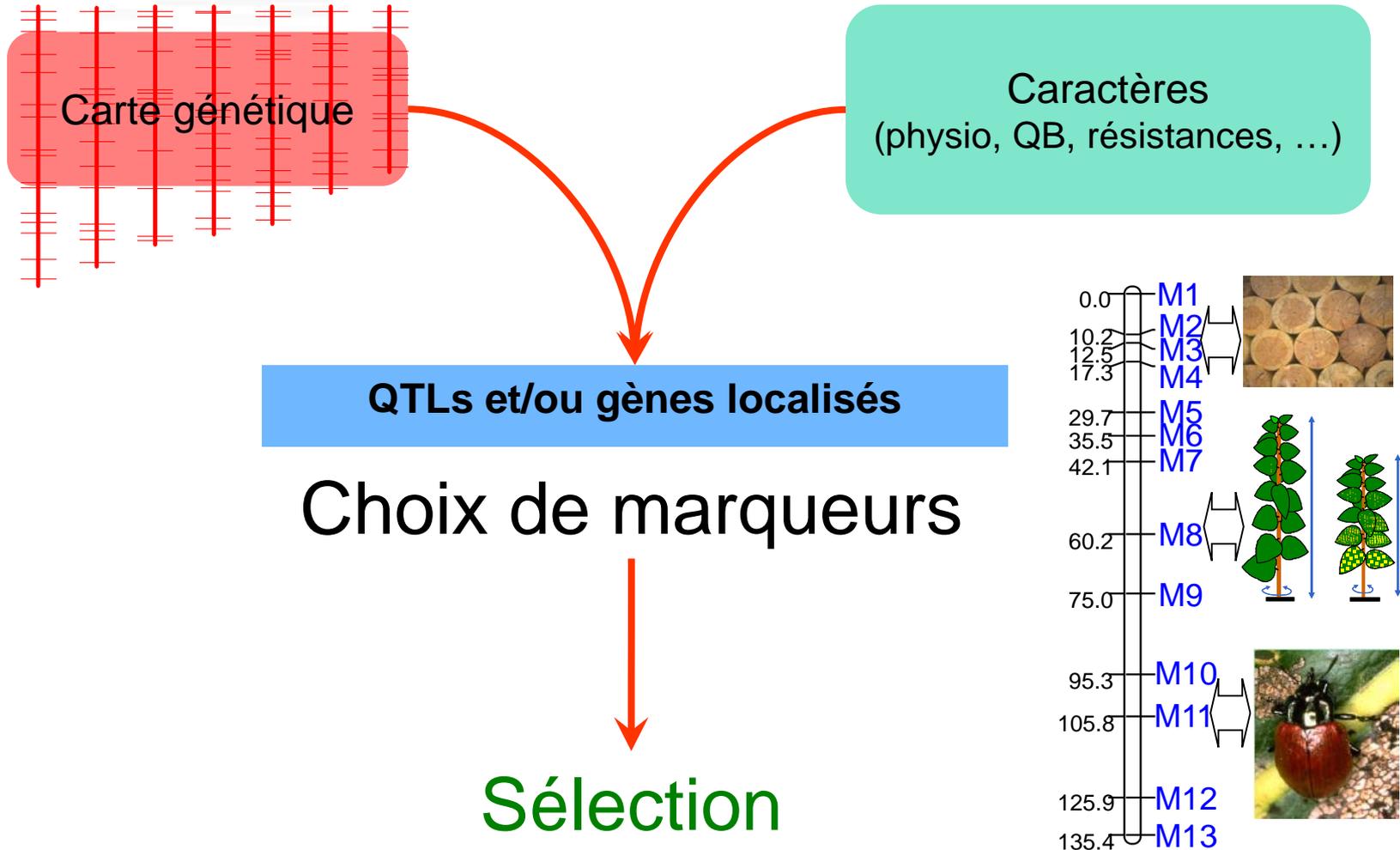
« a method that uses **molecular markers** for indirect **selection** of **difficult traits** at the **seedling stage**, **speeding** up the process of conventional plant breeding and facilitating the improvement of traits that cannot be easily selected using conventional methods »

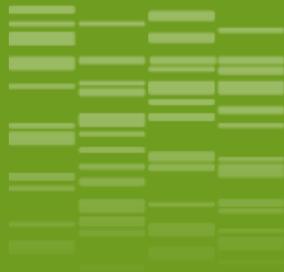
Varshney *et al.* 2003 Trends in Pl. Sc. 10(12) : 621-630



Postulat initial :

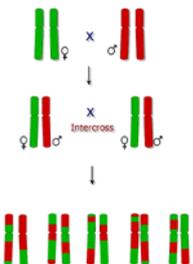
Quantitative Trait Loci (QTL), gènes majeurs localisés sur une carte





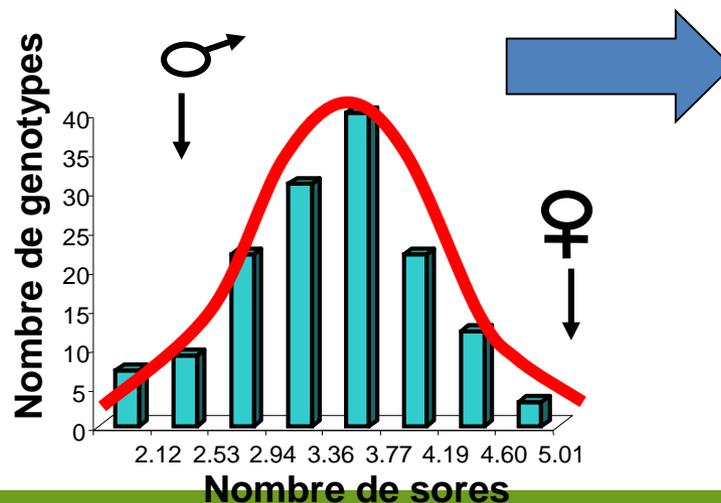
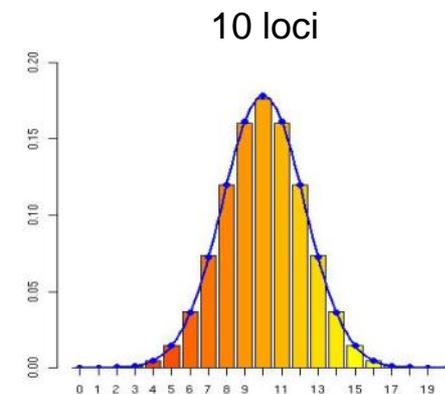
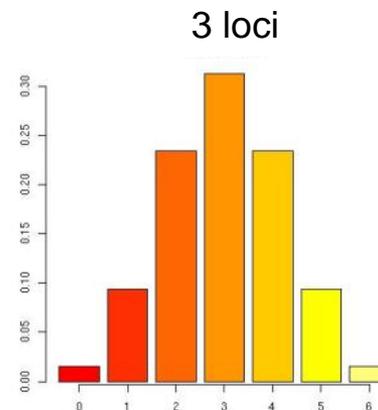
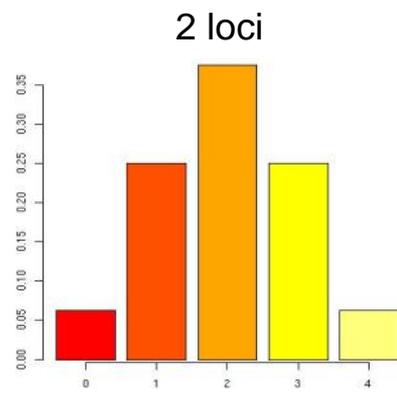
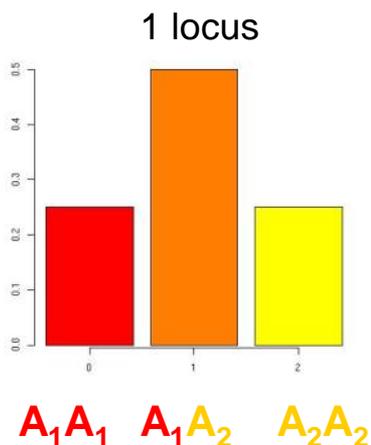
_03

La cartographie génétique.



Déterminisme génétique d'un caractère complexe dont la variabilité est continue

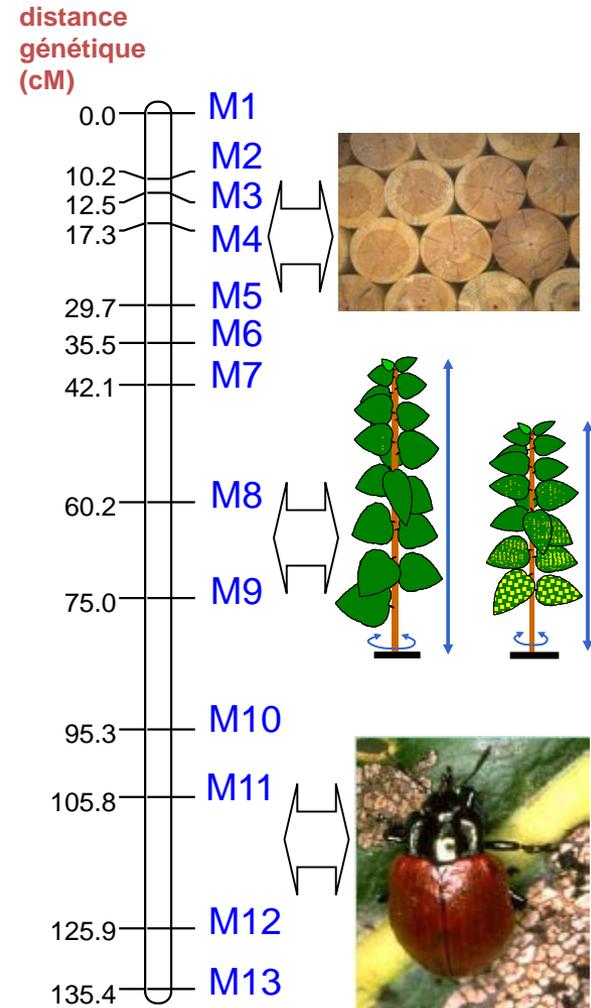
Exemple de distribution théorique dans une descendance F2



Nombre de loci ?
 Localisation ?

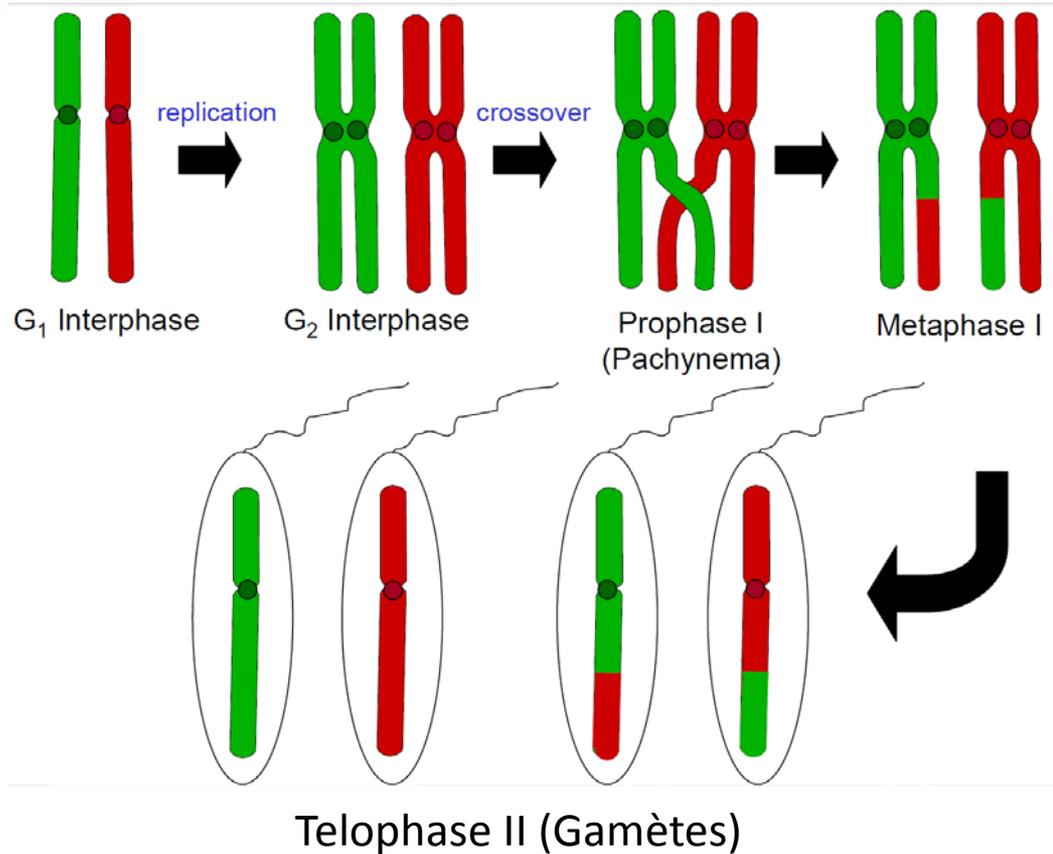
Construction d'une carte génétique

- Ensemble de repères (marqueurs) disposés le long de chaque chromosome.
- Ces repères permettent de **localiser** et de **dénombrer** les gènes contrôlant le caractère d'intérêt.
= Relier le polymorphisme des marqueurs aux variations d'un caractère quantitatif



Construction d'une carte génétique

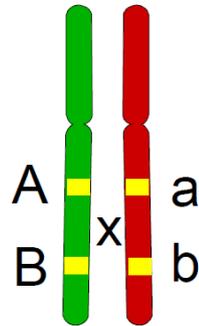
Petit rappel de la méiose



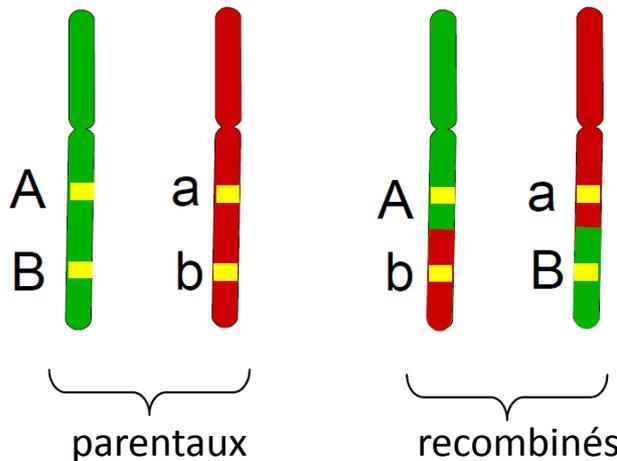
Construction d'une carte génétique

Soit 2 loci (A et B) à 2 allèles :

Chromosomes parentaux



Postulat de départ: La fréquence des crossing-over entre deux sites dépend de la distance chromosomique physique entre les deux sites.



Carte génétique

= Carte de recombinaison méiotique

Unité de distance génétique : % de recombinaison / centiMorgan (cM)

Gamètes de type :

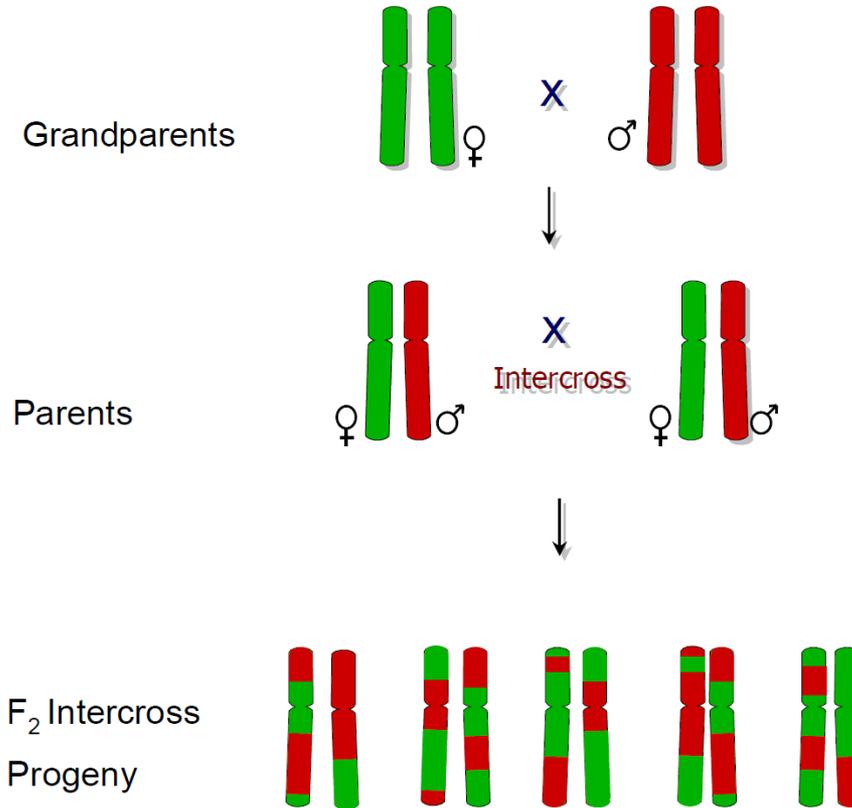
parentaux

recombinés

Construction d'une carte génétique

Comment accéder aux gamètes ?

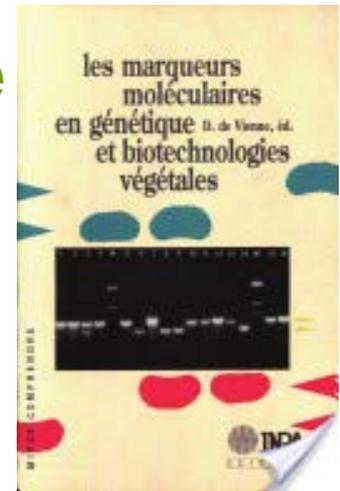
→ Croisement



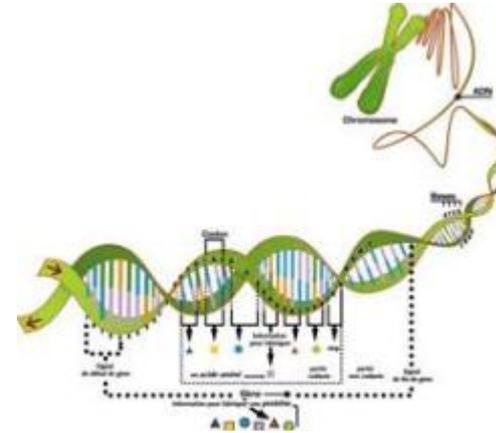
Comment suivre les fragments chromosomiques ?

Construction d'une carte génétique

Les marqueurs moléculaires



(D. de Vienne, 1998)



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

Critère moléculaire
 (type de polymorphisme)

Séquence

Nb de répétitions

RFLP
SNP

Microsatellites

AFLP
RAPD

ISSR

**Critère
 génétique**

Marqueurs codominants
 Révélés individuellement

Marqueurs dominants
 Révélés en masse

Les marqueurs moléculaires

Exemples

→ Polymorphisme de séquence



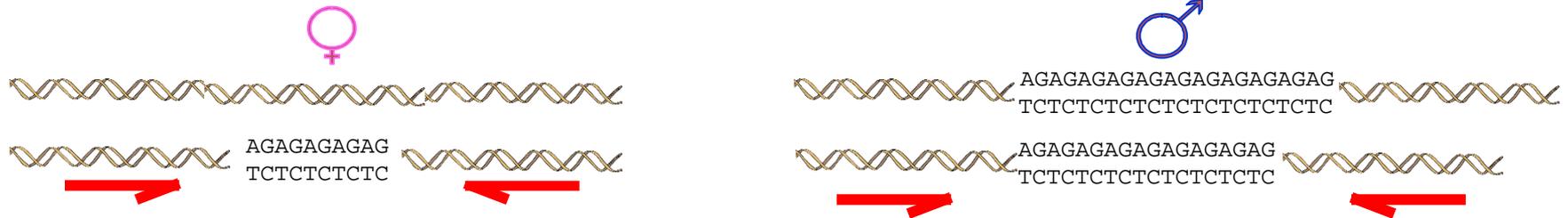
→ Polymorphisme de nombre d'unités de répétition

(AG)_n

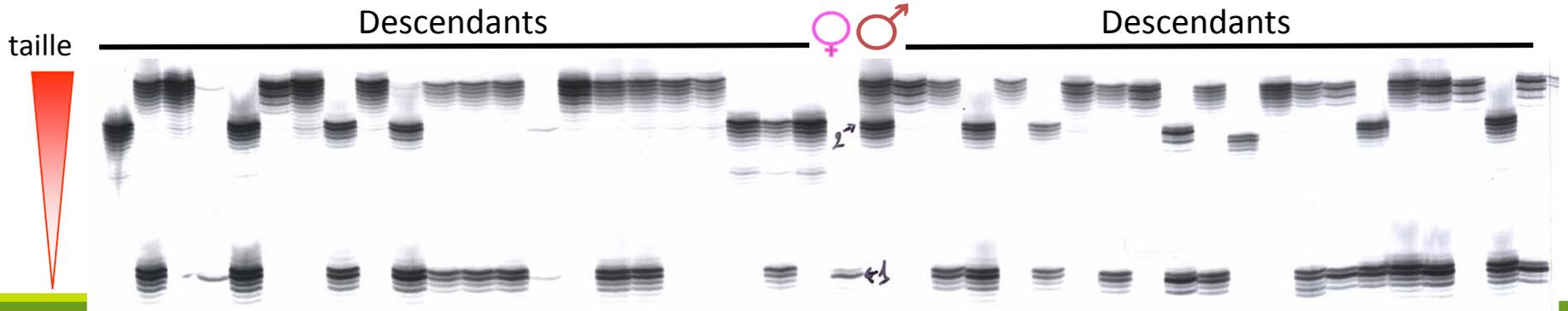


Les marqueurs moléculaires

Microsatellites



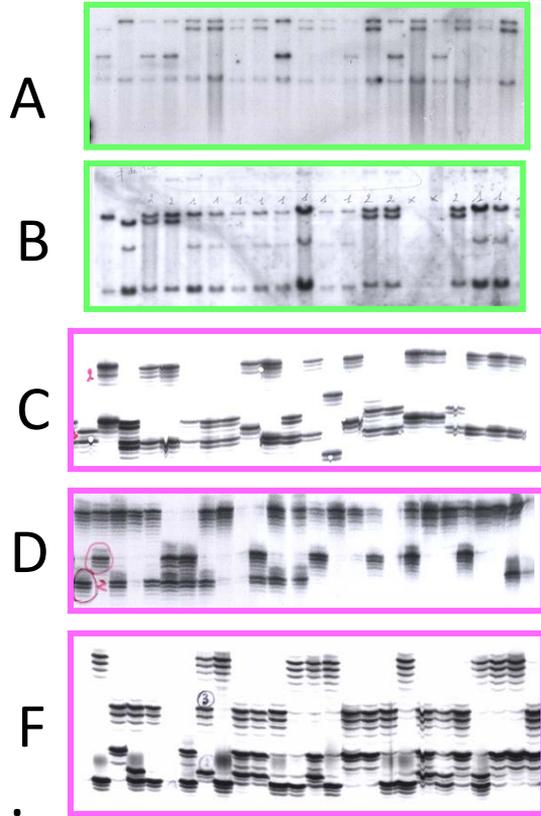
Amplification PCR
Séparation par électrophorèse



(PMGC576, Faivre-Rampant et al.)

Construction d'une carte génétique

Lecture
codage 0/1



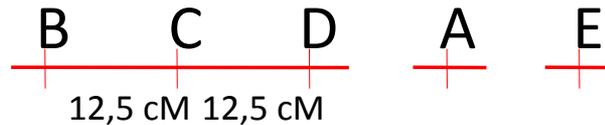
~300 marqueurs

Calcul du taux de recombinaison

% recombines => distance entre marqueurs

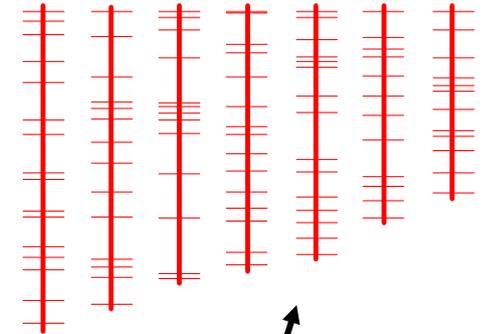
	A	B	C	D
B	0.50			
C	0.50	0.125		
D	0.50	0.25	0.125	
E	0.50	0.50	0.50	0.50

Groupes



Ordre

Carte
génétique

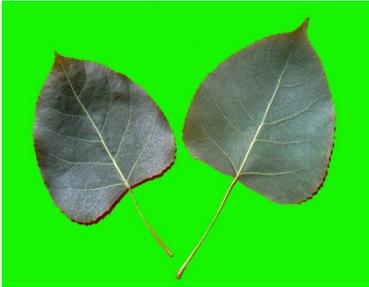


En théorie, nb de groupes de liaison = nb de chromosomes

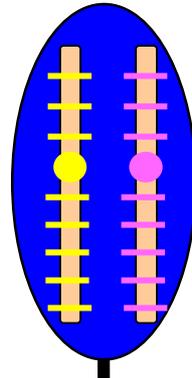
Construction d'une carte génétique

Chez les peupliers

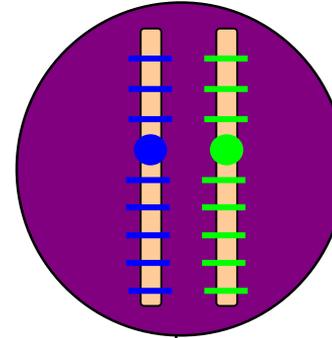
♀
Populus deltoides
73028-62



♂
P. trichocarpa
101-74



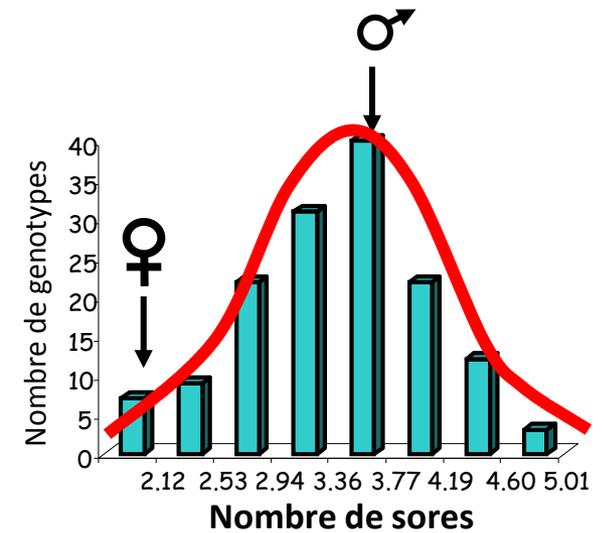
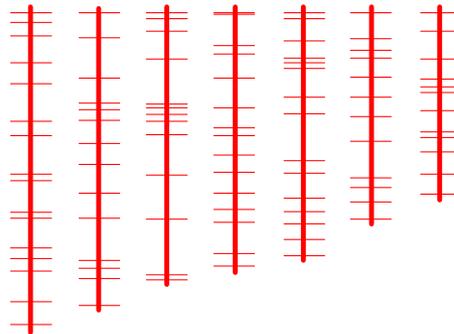
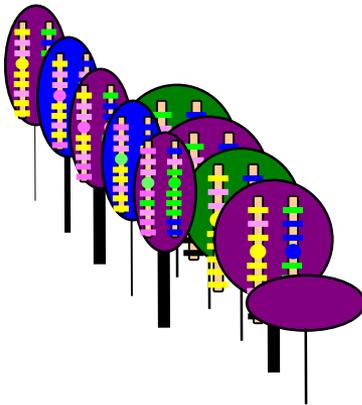
Résistance
complète R_1



Résistance
Partielle

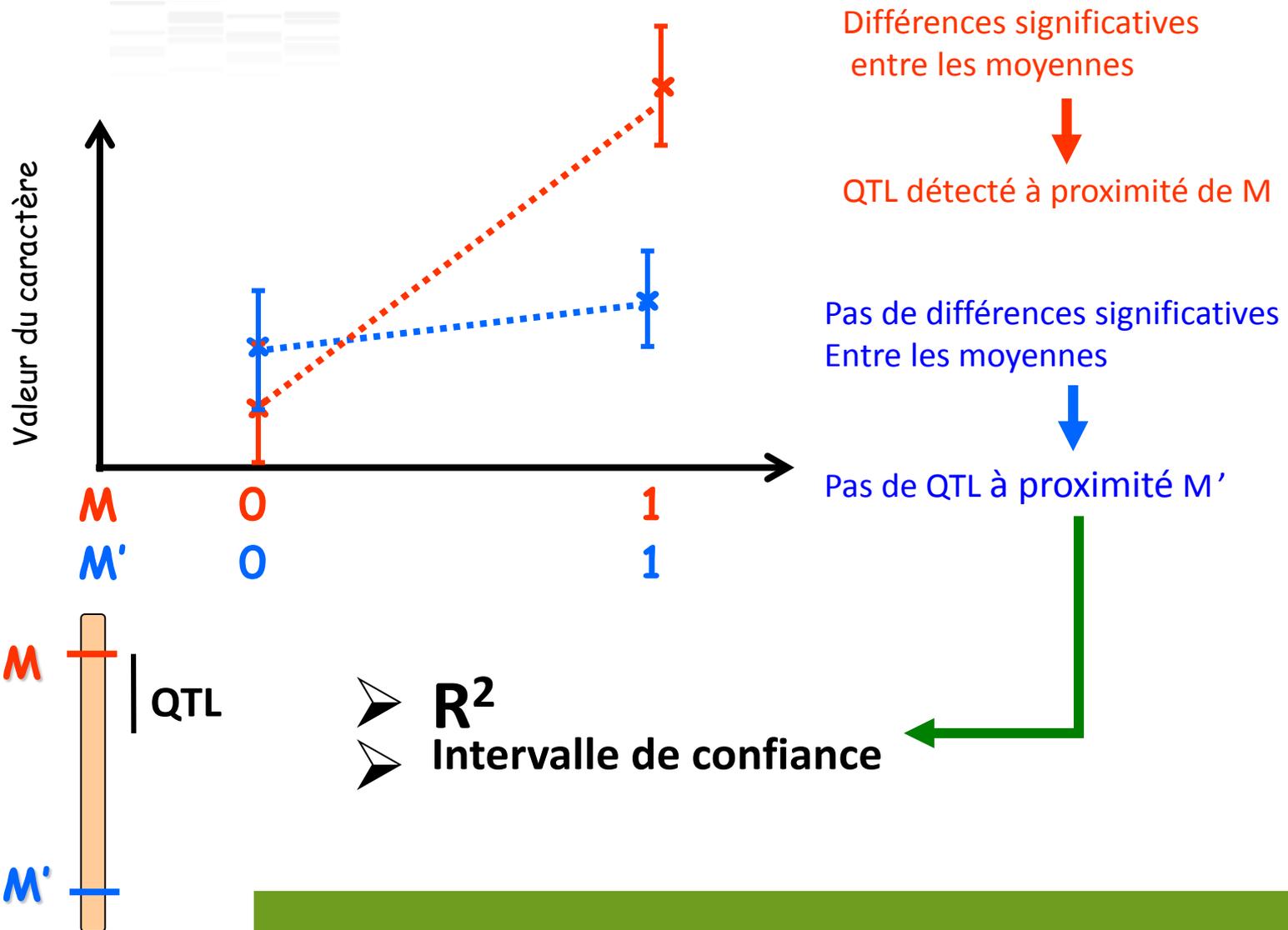


336 descendants



QTL (Quantitative Trait Loci)

Loci contrôlant des caractères quantitatifs



QTL (Quantitative Trait Loci)

Exemples QTL/gènes cartographiés

P. deltooides

R_1



r_1



P. trichocarpa

R_{us}



r_{us}



LG XIX

3% - 76%

0.0 — E4M1-10
13.4 — R_1
16.0 — ORPM277
24.7 — M03/M04_480



60.1 — E1M2-8

12% - 73%

98.1 — rE7M6-8
109.0 — rE2M4-8
118.8 — E7M6-4
130.6 — E1M7-6
154.9 — L2-1050
174.1 — P1221



3 sites

LG?

5% - 81%

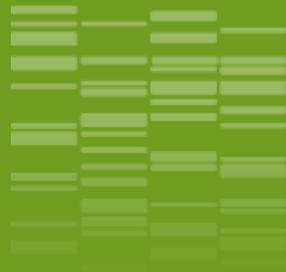
0.0 — E4M2-7
8.2 — E5M5-7
11.1 — R_{us}
28.3 — PMGC667-2



17% - 35%



3 sites



_04

La Sélection Assistée par Marqueurs.

La Sélection Assistée par Marqueurs

A- Choix des marqueurs associés à **plusieurs caractères, plusieurs composantes**

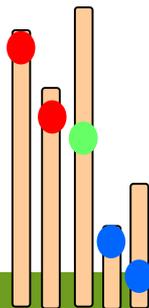


B- Sélection rapide à l'aide de ces marqueurs des géotypes combinant le plus de caractères favorables

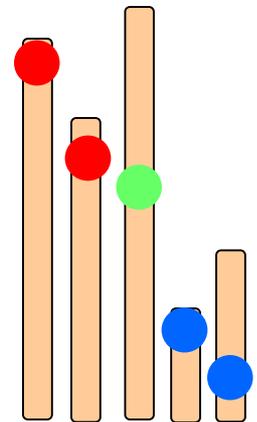
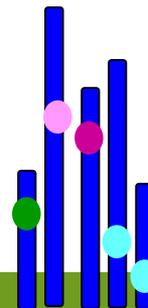
=

idéotype

C- Croisements et S.A.M. supplémentaires pour combiner l'ensemble des caractères



X



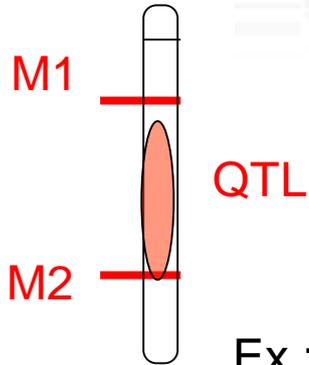
La SAM : méthodes

Sélection et Recombinaison
assistés par marqueurs

Appliqué
aux esp.
autogames
(lignées)

- Utilisation de marqueurs aux QTLs
- Introgression par retrocroisement
- Pyramidage

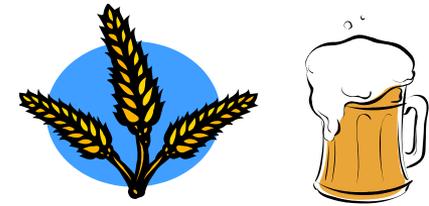
Utilisation de marqueurs aux QTLs



Prérequis : Cartographie de loci contrôlant des caractères quantitatifs

Ex.:

Han et al. 1997 Mol. Breed. 3: 427-437
Orge, qualité brassage



Comparaison de différentes stratégies: SAM, phénotypique
Sélection sur 2 QTLs : QTL1, QTL2.

Résultats :

QTL1 SAM > Phénotypique

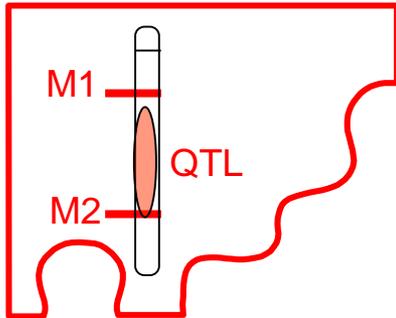
QTL2 pb d'expression dans un fond génétique différent.

+ Liaison marqueur-caractère spécifique du croisement utilisé

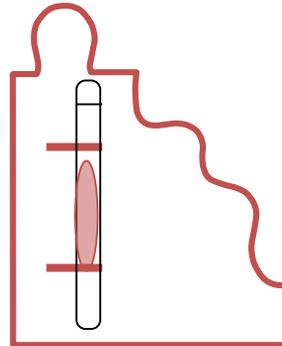
Décomposition du caractère complexe et SAM

Ex: Tolérance aux stress hydrique

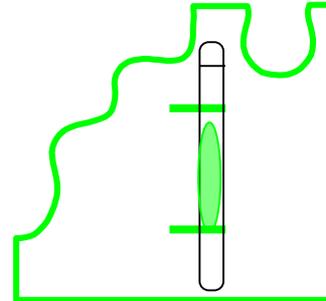
Évitement
(décalage phase
de croissance)
géotype 1



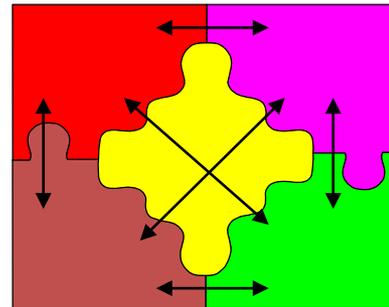
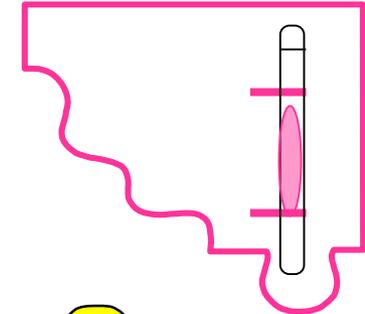
Résistance à la
perte d'eau
(fermeture stomates...)
géotype 2



Mécanisme
de tolérance
(ajustement
osmotique...)
géotype 3



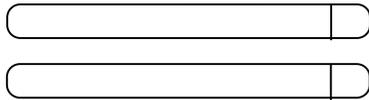
Mécanisme de tolérance
« a posteriori »
(résistance
à la dessiccation...)
géotype 4



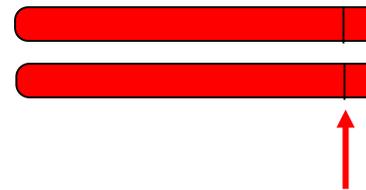
- Antagonisme pour la SAM : Conserver association marq/QTL + recombinaison entre QTLs.
- QTL non identifiés
- interactions non additives ?

Introgression par rétrocroisement

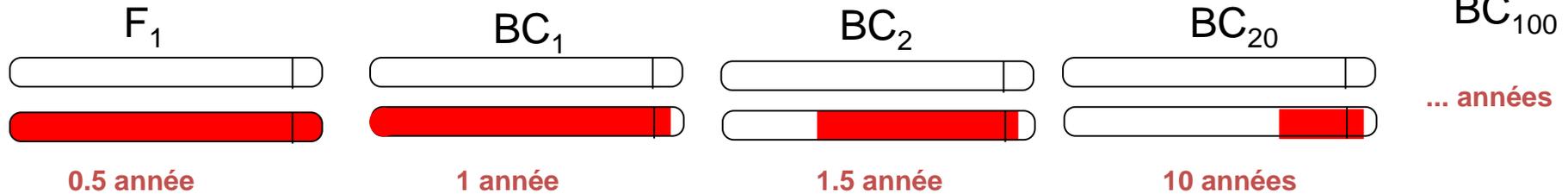
Parent récurrent
(qualités agronomiques)



Parent donneur
(pas de qualités agronomiques mais porteur d'un caractère recherché)



Méthode traditionnelle



Rétrocroisement assisté par marqueurs



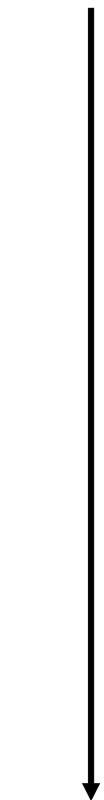
AB-QTL Analysis Tanksley et Nelson 1996 TAG 92 : 191-203

Tomate, mais résultats mitigés orge, blé, riz

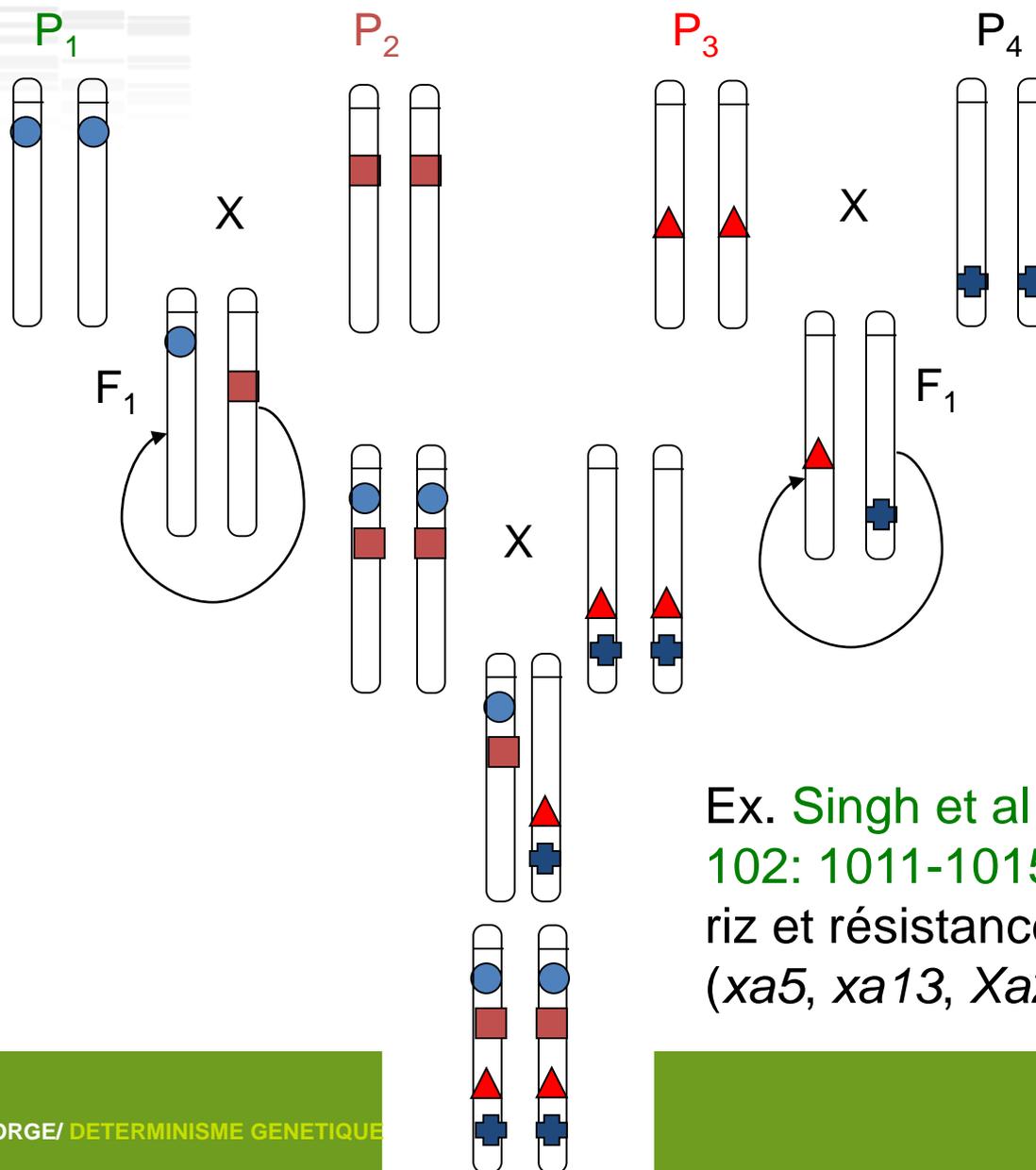
Pyramidage assisté par marqueurs

Pour des loci à effet majeur, très bien localisés

Départ



Arrivée



Ex. Singh et al . (2001) TAG
102: 1011-1015
riz et résistance à la bactériose
(*xa5*, *xa13*, *Xa21*)

Application de la Sélection Assistée par Marqueurs chez les arbres forestiers ?

Verrous biologiques, socioéconomiques, techniques

Tree Genetics & Genomes
DOI 10.1007/s11295-014-0790-5

REVIEW

**Potential for marker-assisted selection for forest tree breeding:
lessons from 20 years of MAS in crops**

H. Muranty • V. Jorge • C. Bastien • C. Lepoittevin •
L. Bouffier • L. Sanchez

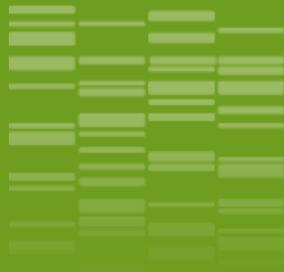
Un verrou biologique / technique : la liaison marqueur-caractère

- spécifique du croisement utilisé
- peut être rompue au cours de la sélection

Deux outils pour lever le verrou



**Le clonage de gènes
La génétique d'association**



_05

Le déséquilibre de liaison.

Le déséquilibre de liaison

Il décrit les associations préférentielles entre allèles de deux locus

Haplotypes

or gametes	Locus 1	Locus 2	Locus 3
1	<u>A</u> AATGCCTAAGTGCC <u>T</u> CCATACTAAGCGATTAAC <u>G</u>		
2	<u>A</u> AATGCCTAAGTGCC <u>T</u> CCATACTAAGCGATTAAC <u>G</u>		
3	<u>A</u> AATGCCTAAGTGCC <u>T</u> CCATACTAAGCGATTAAC <u>G</u>		
4	<u>A</u> AATGCCTAAGTGCC <u>T</u> CCATACTAAGCGATTAAC <u>C</u>		
5	<u>A</u> AATGCCTAAGTGCC <u>T</u> CCATACTAAGCGATTAAC <u>C</u>		
6	<u>A</u> AATGCCTAAGTGCC <u>T</u> CCATACTAAGCGATTAAC <u>C</u>		
7	<u>T</u> AATGCCTAAGTGCC <u>C</u> CCATACTAAGCGATTAAC <u>G</u>		
8	<u>T</u> AATGCCTAAGTGCC <u>C</u> CCATACTAAGCGATTAAC <u>G</u>		
9	<u>T</u> AATGCCTAAGTGCC <u>C</u> CCATACTAAGCGATTAAC <u>G</u>		
10	<u>T</u> AATGCCTAAGTGCC <u>C</u> CCATACTAAGCGATTAAC <u>C</u>		
11	<u>T</u> AATGCCTAAGTGCC <u>C</u> CCATACTAAGCGATTAAC <u>C</u>		
12	<u>T</u> AATGCCTAAGTGCC <u>C</u> CCATACTAAGCGATTAAC <u>C</u>		

Contingency tables

		Locus 1	
		A	T
Locus 2	T	6	
	C		6

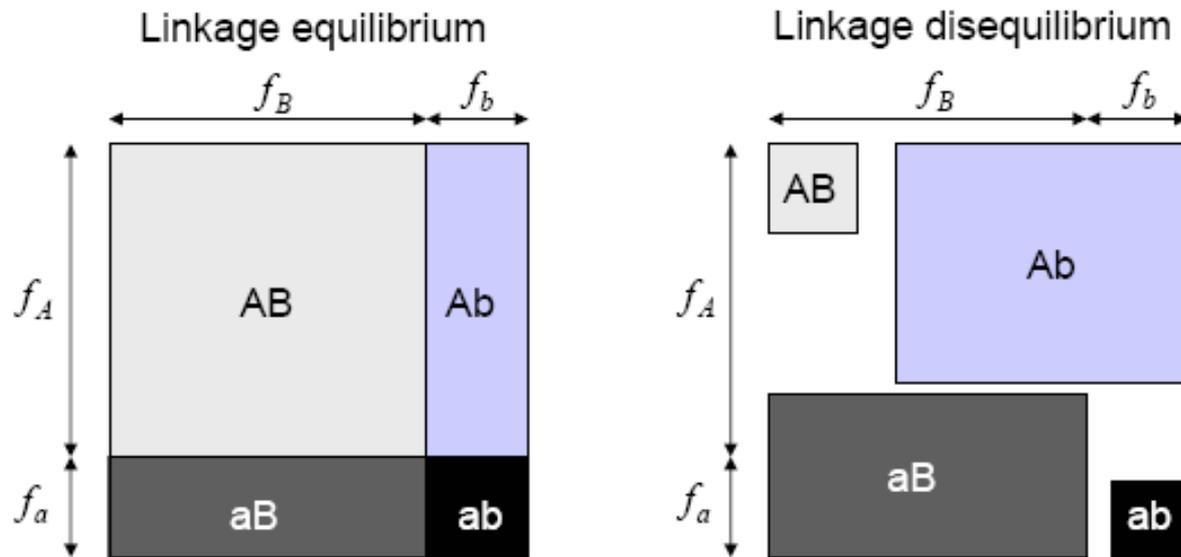
		Locus 2	
		T	C
Locus 3	G	3	3
	C	3	3

En déséquilibre complet = 1

À l'équilibre = 0

Une mesure du DL

Allelic associations and linkage disequilibrium



$$D_{AB} = f_{AB} - f_A f_B$$

$$= -D_{Ab} = -D_{aB} = D_{ab}$$

r^2 (Hill & Robertson, 1968)

$$r^2 = \frac{(D_{AB})^2}{p_A p_a p_B p_b}$$

McVean, 2001

Variation du déséquilibre de liaison

La mutation

La mutation est le phénomène évolutif qui va créer le polymorphisme qui pourra être en déséquilibre, c'est donc le moteur de la création du DL

La sélection

La sélection sur un locus va pouvoir entraîner une augmentation locale du déséquilibre de liaison

Les **facteurs démographiques**, la dérive génétique, les goulots d'étranglement

La **recombinaison** est le facteur majeur de dissipation du déséquilibre de liaison

Chez les arbres forestiers, le déséquilibre de liaison est faible et décroît rapidement

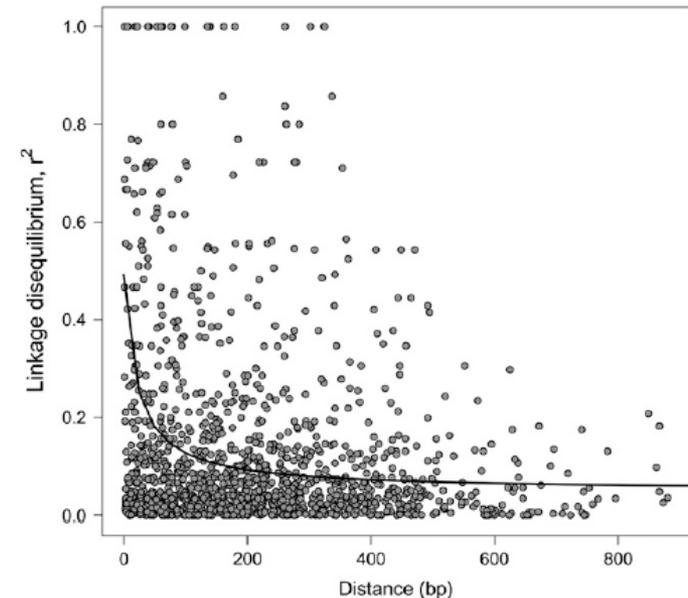
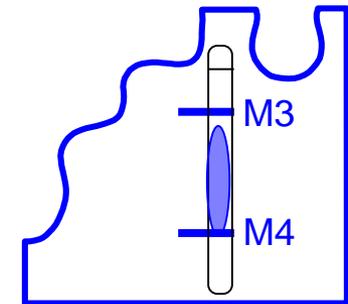
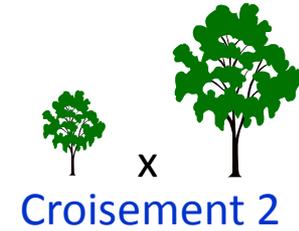
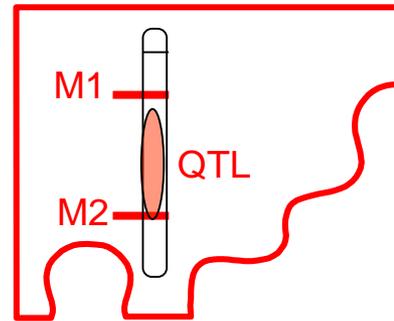
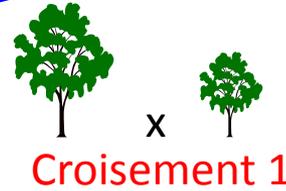
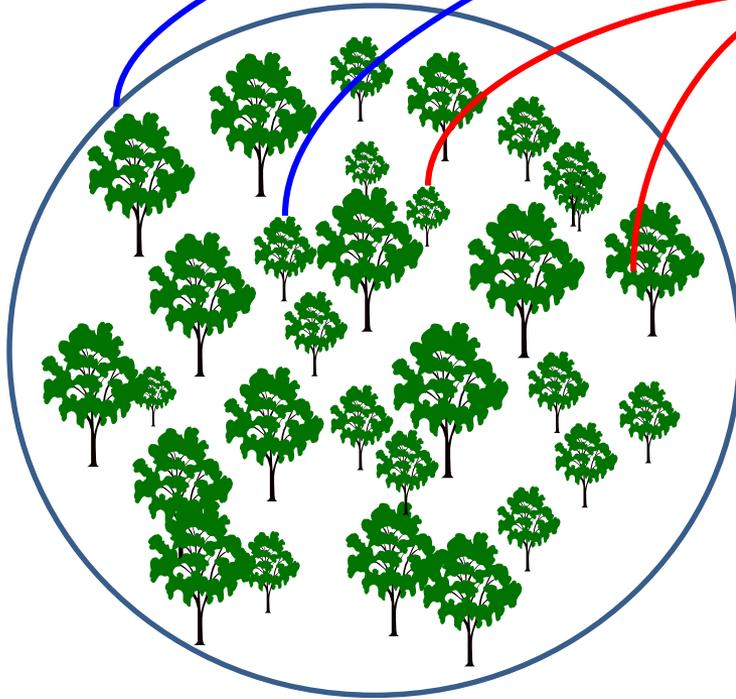


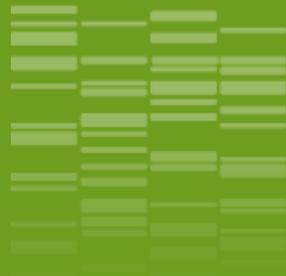
FIGURE 2.—Linkage disequilibrium (within genes) as a function of the distance between sites pooled across the 77 genes. The solid line is the theoretical expectation of r^2 (from Equation 1 in INGVARSSON 2005b). Only mutations with frequencies exceeding 10% are included.

Ingvarson 2008

Le DL et la liaison marqueur-caractère

Populations naturelles
D'arbres forestiers

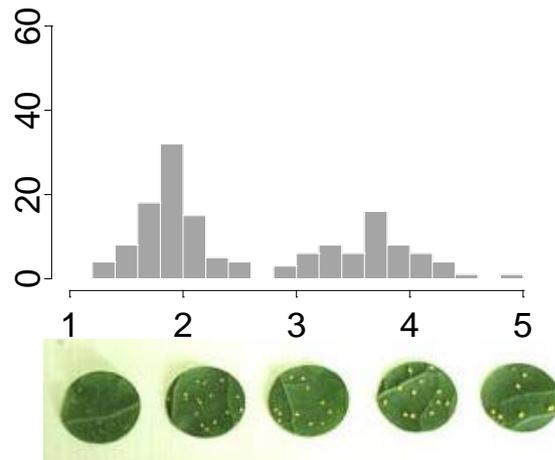
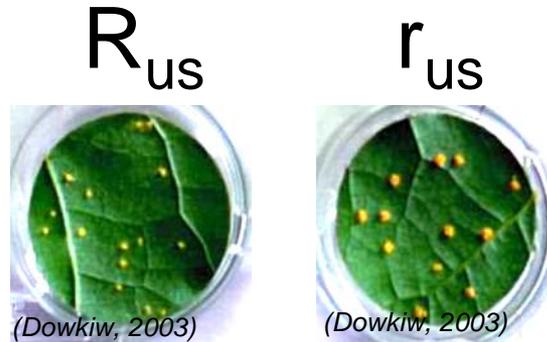




_06

Le clonage de gènes.

Clonage d'un facteur majeur de résistance partielle

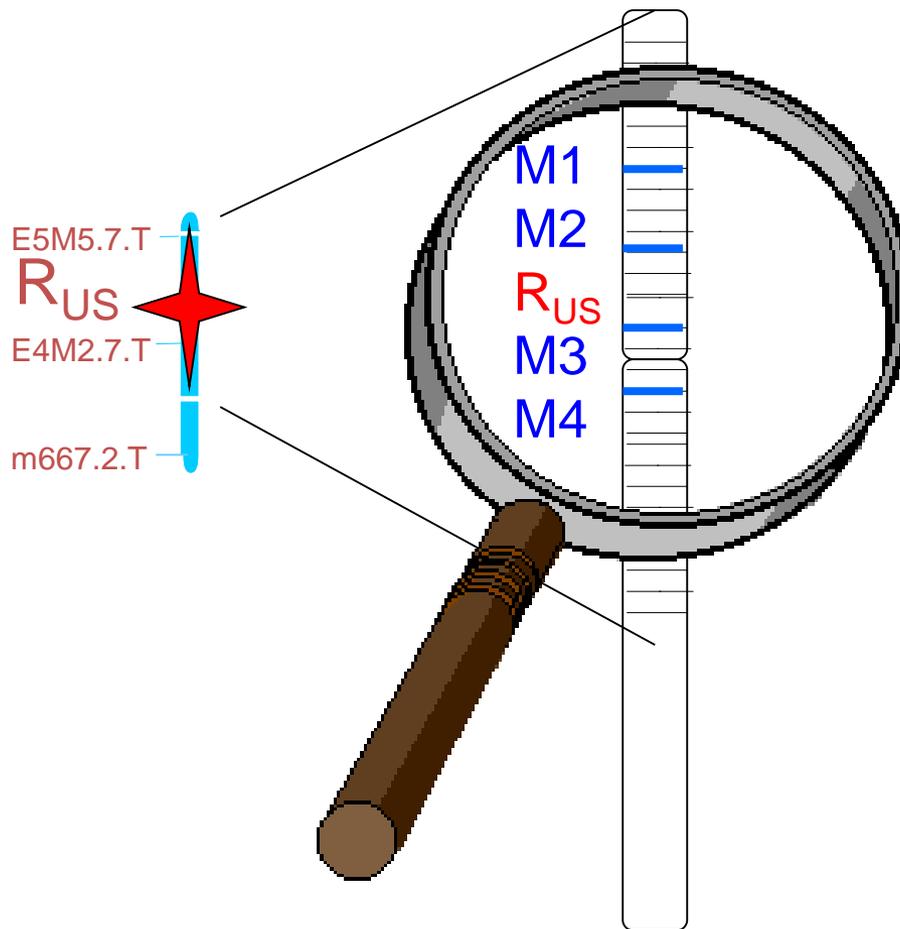


Quelle est la localisation précise et la nature de R_{US} ?

1- Préciser la localisation

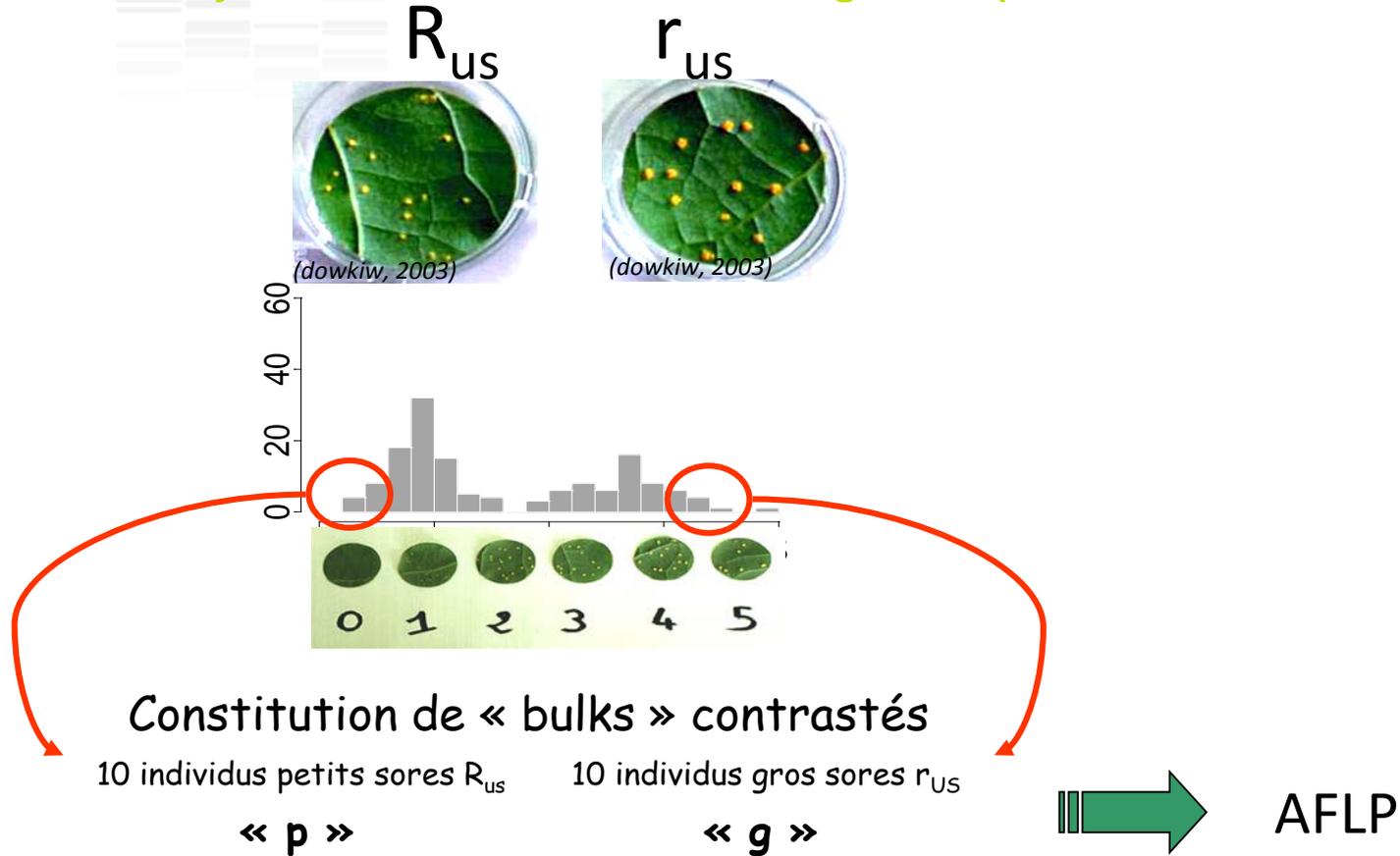
En ajoutant des repères (marqueurs) sur la carte génétique
En augmentant le nombre d'individus dans la descendance

Analyse des descendants en mélange
Cartographie fine



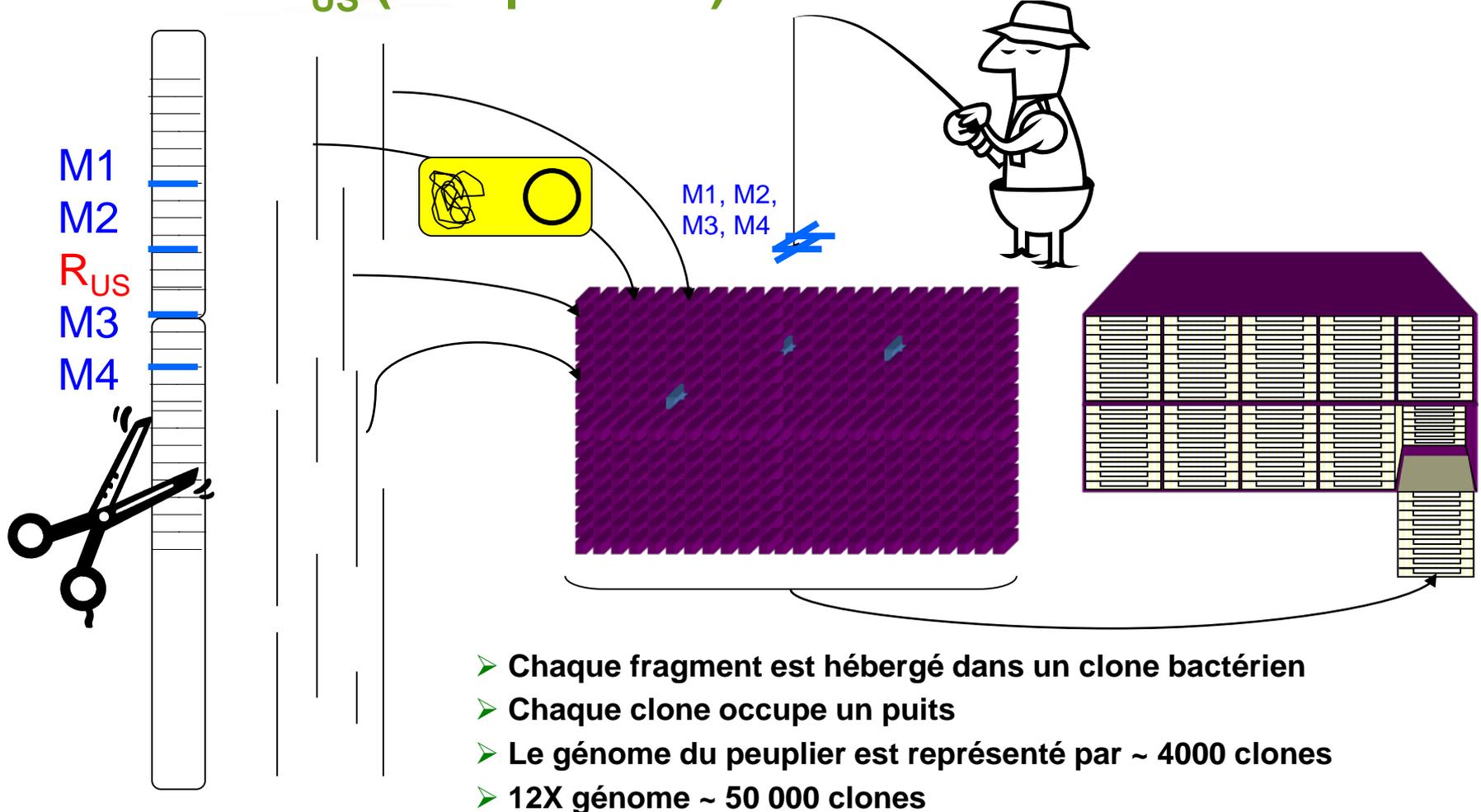
1- Préciser la localisation

Analyse des descendants en mélange BSA (Michelmore et al 1991)

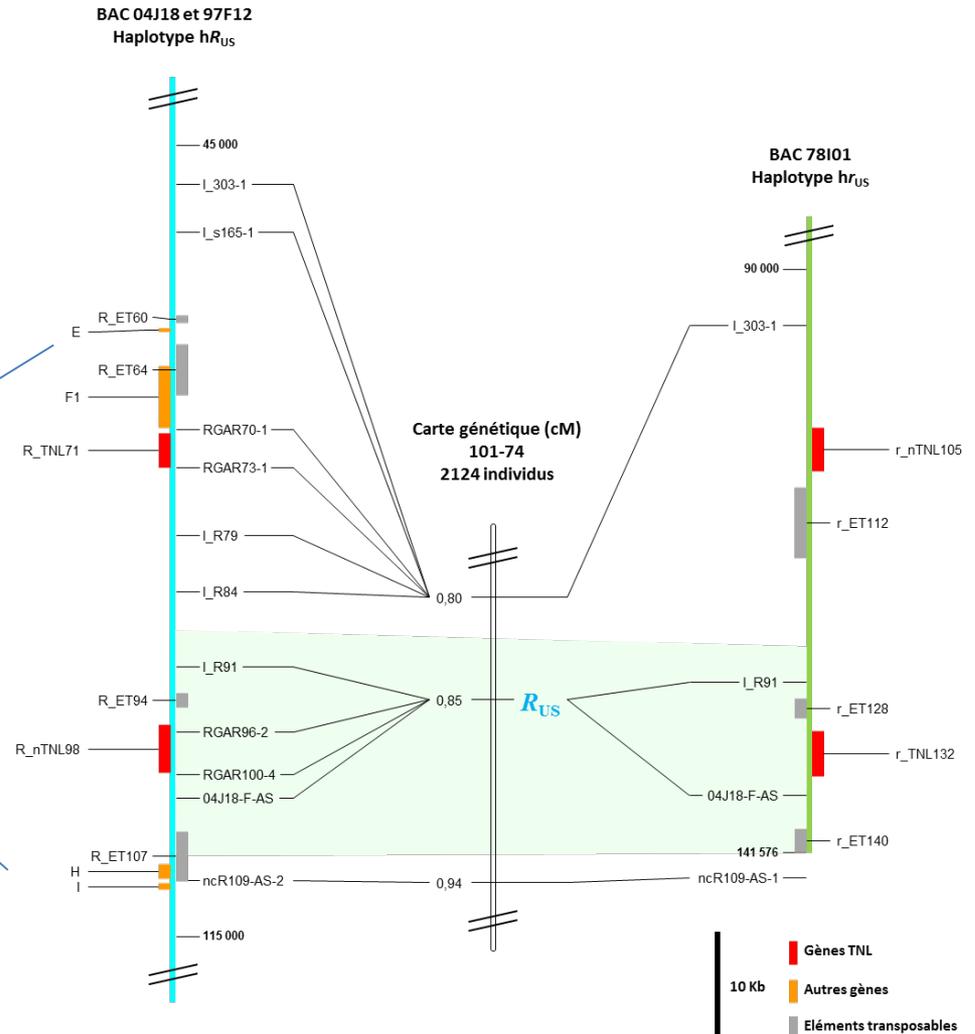
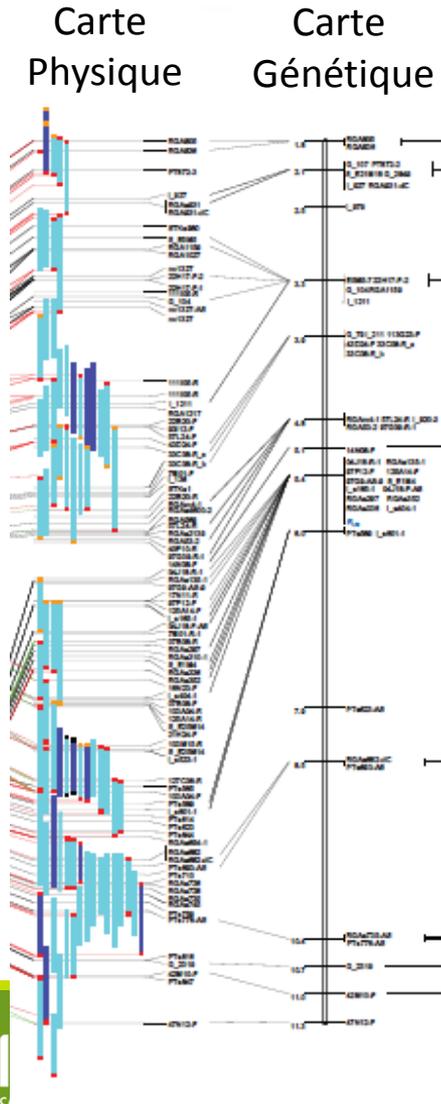


> Identification rapide de marqueurs liés à une région du génome

2 - Construction d'une collection de grands fragments du génome de l'individu porteur de R_{US} (banque BAC)

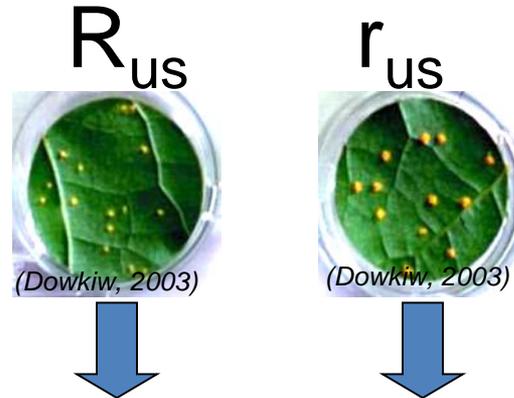


3- Identification et séquençage des fragments portant R_{US}



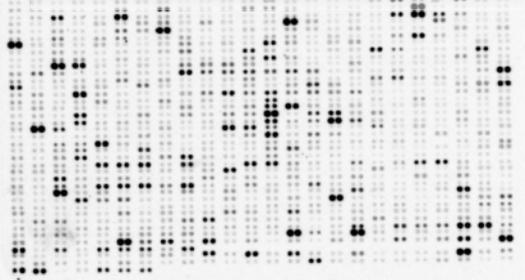
Quelle est la fonction réelle de RUS ?

- Etude de l'expression des gènes



Extraction des ARN messagers et des protéines

Transcriptomique

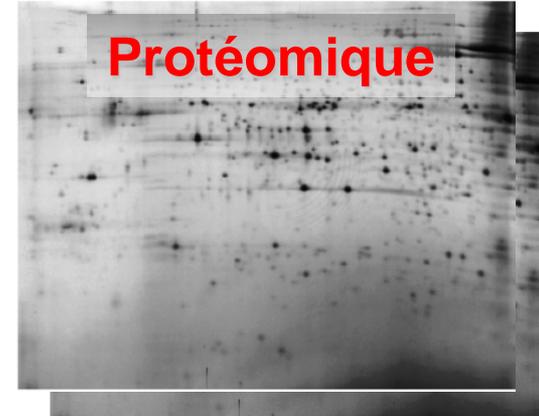


High density filter (Kholer et al 2003)

Analyse différentielle

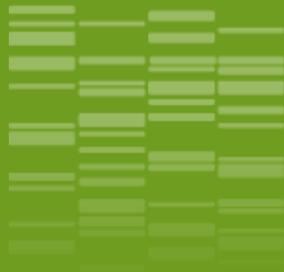
« Gène candidats »

Protéomique



2D Electrophoresis, Poplar xylem
(Pionneau et al 1998)

- Validation fonctionnelle par transgènesè ...

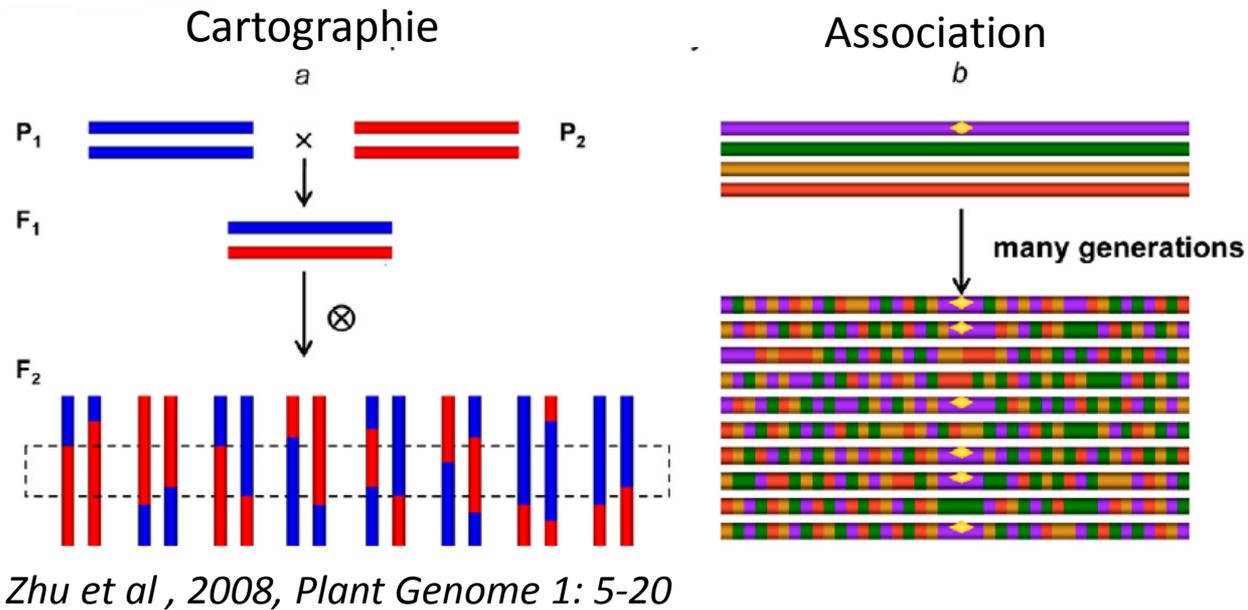


_07

La génétique d'association.

La génétique d'association

Tester la liaison marqueur-caractère dans des populations naturelles



- Cribler plus d'allèles
- Plus de précision

- De nombreux marqueurs nécessaires
- Sensible à la structure/apparentement

La génétique d'association

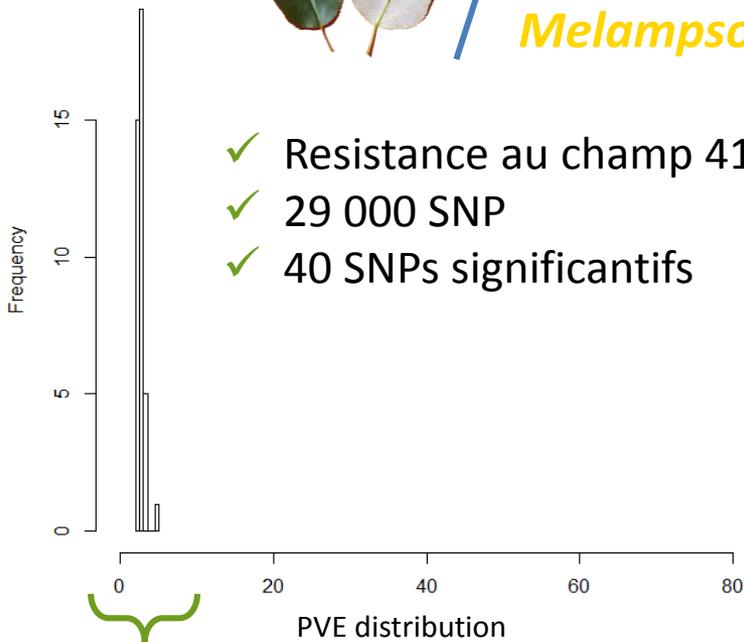
Chez les peupliers



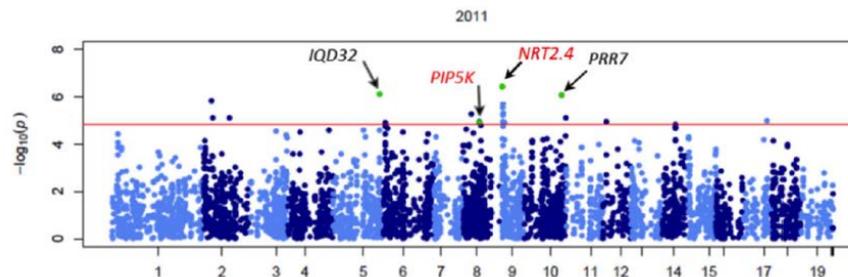
Resistance à *Melampsora x columbiana*

LaMantia et al. PlosONE 2013

- ✓ Resistance au champ 412 *P. trichocarpa*
- ✓ 29 000 SNP
- ✓ 40 SNPs significatifs



! Pourcentage de
variation expliquée (R2)



Application de la Sélection Assistée par Marqueurs chez les arbres forestiers ?

Tree Genetics & Genomes
DOI 10.1007/s11295-014-0790-5

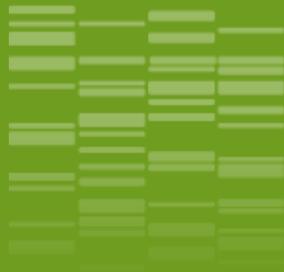
REVIEW

Potential for marker-assisted selection for forest tree breeding: lessons from 20 years of MAS in crops

H. Muranty · V. Jorge · C. Bastien · C. Lepoittevin ·
L. Bouffier · L. Sanchez

Perspectives ouvertes par la **sélection génomique** ...

<http://www.inra.fr/Chercheurs-etudiants/Dossiers/les-rencontres-du-SIA-2014/Rencontre-SIA-2014-selection-genomique>



Demain ...



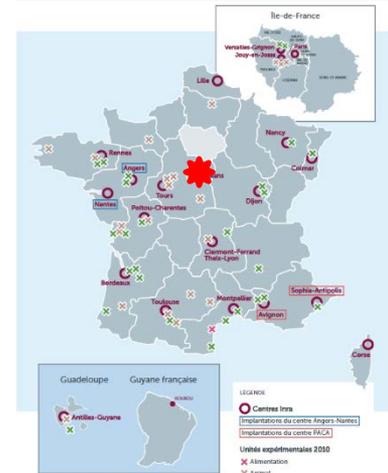
Marqueurs moléculaires chez les arbres forestiers

Utilisation pour la caractérisation des ressources génétiques du peuplier noir



Unité Amélioration Génétique et Physiologie Forestières

Dir. Gilles PILATE



3 équipes

Physiologie Moléculaire
de la Formation du Bois

Prédiction et Gestion de la Diversité
des Génomes et des Populations

Génétique et Physiologie
de l'Adaptation

Plateforme Régionale Génobois



Pôle Amélioration

2 axes de recherche

Amélioration des connaissances sur l'élaboration du phénotype de l'arbre

Valorisation des ressources génétiques forestières

<http://www6.val-de-loire.inra.fr/uragpf>