



Utilisation des marqueurs moléculaires dans les études de diversité génétique des plantes : Module d'enseignement

Avant-propos

Les ressources génétiques végétales sont les composantes clés du développement durable de l'agriculture et la foresterie. Elles contribuent au développement en aidant à améliorer la production alimentaire, éradiquer la pauvreté et protéger l'environnement. La perte des ressources génétiques et, par conséquent, la diversité génétique qu'elles représentent, est une réalité largement répandue. Il est pour cela extrêmement important de développer des stratégies adéquates et efficaces pour conserver ces ressources génétiques. Il nous faut poursuivre notre connaissance de la diversité génétique et introduire des approches nouvelles et puissantes qui pourront conduire à une identification acceptable financièrement des gènes utiles présents dans le germplasma. Une utilisation efficace des ressources génétiques sera un prérequis important pour leur conservation durable.

Les technologies des marqueurs moléculaires sont les plus avancées et, probablement, le moyen le plus efficace pour comprendre les bases de la diversité génétique. Ce sont des outils efficaces et précis avec lesquels on peut identifier la variation génétique finale et la mesurer de façon rapide et minutieuse. En appliquant les technologies moléculaires pour approcher les questions biologiques sous-tendant la diversité génétique, on peut faire des progrès significatifs dans la vitesse et la profondeur avec lesquelles on peut atteindre une conservation efficace et appropriée, et ainsi rendre les ressources génétiques disponibles pour leur utilisation en amélioration des plantes. Cependant, l'utilisation des marqueurs moléculaires est coûteuse et la limitation des ressources financières signifie qu'elles doivent être utilisées de façon la plus judicieuse possible.

Cet ensemble de modules d'enseignement se propose de faciliter l'acquisition de compétences dans l'utilisation des technologies des marqueurs moléculaires, puisqu'il est admis que des ressources humaines compétentes et des institutions capables de "suivre le rythme des progrès scientifiques" sont des éléments clés dans la conservation des ressources génétiques. Les auteurs sont parfaitement conscients de ce besoin. Ils ont pour se faire développé cet ensemble de modules d'enseignement, dont "*Utilisation des technologies des marqueurs moléculaires dans les études de diversité génétique végétale: module d'enseignement*" est le premier, pour aider à l'acquisition de compétences dans l'utilisation des technologies des marqueurs moléculaires. Avec ce module, les personnes travaillant sur les ressources génétiques végétales devraient être capable de prendre des décisions en toute connaissance de cause sur les méthodes à utiliser, de façon à comprendre plus facilement et ainsi protéger plus efficacement les ressources génétiques qui sous-tendent notre propre existence.

Jan Engels
Directeur
Genetic Resources Science and Technology Group
IPGRI

Préface

L'utilisation et la conservation de la biodiversité peuvent être rendues plus facile et plus efficaces avec l'utilisation des marqueurs moléculaires. Des relations phylogénétiques peuvent être déterminées, on peut identifier des redondances dans une banque de germplasma, et de nouveaux gènes peuvent être découverts. Bien que "*Utilisation des technologies des marqueurs moléculaires dans les études de diversité génétique végétale: module d'enseignement*" se propose de promouvoir l'acquisition de compétences et la recherche sur les ressources génétiques dans le monde entier, il est plus particulièrement dédié aux pays avec un accès limité à la littérature scientifique la plus récente et aux technologies de recherche.

L'utilisation des marqueurs moléculaires est coûteuse, et les ressources financières doivent être utilisées de la façon la plus judicieuse possible. Pour cela, il est vital que les scientifiques n'utilisent pas cette technologie simplement parce qu'ils le peuvent ou parce que c'est la technologie la plus récente, mais parce qu'ils ont choisi méticuleusement la technologie la plus appropriée pour les questions biologiques auxquelles ils s'attaquent.

Nous espérons que ce module en ligne vous donnera, en tant qu'utilisateur, le contexte, le savoir et les outils pour prendre les bonnes décisions dans l'utilisation de vos ressources.

Ce que vous devez savoir sur le module

Nous sommes intimement persuadés que quand vous étudiez la diversité génétique végétale, vous devez savoir quels sont vos objectifs, quelles sont vos limitations, et ce que vous devez accomplir.

Nous avons pour cela pris soin de discuter:

- les principes fondamentaux de la diversité génétique,
- les qualités des marqueurs utilisés pour la mesurer et
- Les technologies utilisées les plus largement, incluant celles basées sur les protéines, l'ADN et l'amplification en chaîne par la polymérase.

Des schémas d'explication et des photographies illustrent les procédures expérimentales clés, et des exemples concrets d'applications sont donnés pour des cas particuliers d'études de diversité génétique et/ou gestion du germplasma. Ils doivent aider dans l'utilisation du module comme une ressource éducative utile, soit comme auto-enseignement, ou incorporés dans un curriculum universitaire.

Nous comparons aussi les différentes techniques – leurs avantages et inconvénients, et les coûts relatifs de chaque procédure, pour aider le scientifique débutant à comprendre les éléments clés pour la sélection des procédures les plus appropriées pour une recherche particulière.

Comme ce module est destiné à une utilisation comme aide expérimentale ou outil de référence, les listes des références clés, des références à d'autres applications ou des listes d'équipements sont également proposées.

Ce module est conçu pour des scientifiques avec un bagage minimal en génétique et biologie moléculaire des plantes, mais avec une connaissance claire, de part leur travail, sur les ressources génétiques végétales et les problèmes qui concernent leur conservation et leur gestion. Nous espérons que ce module sera particulièrement utile aux scientifiques des pays en voie de développement, pour qui du matériel écrit ne serait pas disponible, cher, ou trop rapidement obsolète. Nous espérons aussi qu'il sera utile pour les éducateurs en sciences qui veulent avoir accès à une présentation générale des technologies ADN actuelles et leurs utilisations potentielles dans la conservation et l'utilisation de la biodiversité.

Pour que les utilisateurs puissent sélectionner seulement les sections pertinentes ou intéressantes pour eux, nous avons organisé le module en sous-modules complémentaires mais indépendants. La seule exception est l'introduction, qui concerne toutes les sections et devrait toujours être incluse. En ce sens, le module, dans son ensemble, peut être utilisé comme référence pour des protocoles particuliers, comme un rappel ou une mise à jour pour le scientifique devant prendre de nouvelles décisions de recherche ou comme guide pour de courtes séances de travail techniques.

La mise à jour et les commentaires en retour sont de très grande importance dans le domaine à rapide évolution de la génétique moléculaire (et les technologies qui leurs sont associées), et les ressources génétiques végétales. Pour répondre efficacement à nos partenaires et aux besoins des autres utilisateurs, nous apprécierions grandement vos commentaires en retour sur l'organisation, le contenu et l'utilité de cet outil. Vous pouvez nous écrire à cdevicente@cgiar.org; tf12@cornell.edu ou à nos adresses:

**International Plant Genetic
Resources Institute**
Via dei Tre Denari 472/a
00057 Maccarese
Rome, Italy

Institute for Genomic Diversity
130 Biotechnology Building
Cornell University
Ithaca, NY 14853

Nous souhaitons vivement que le module sera utilisé de façon diverse et qu'il apportera, conjointement avec un module compagnon sur l'analyse des données de marquage pour la diversité génétique: "*Analyse de la diversité génétique avec des données moléculaires: module d'enseignement*", pour un grand nombre de lecteurs, spécialement pour ceux des pays en voie de développement avec un accès limité aux technologies les plus actuelles, une possibilité de conduire des recherches avancées sur la diversité génétique végétale, contribuant ainsi à la connaissance mondiale de ces ressources de valeur.

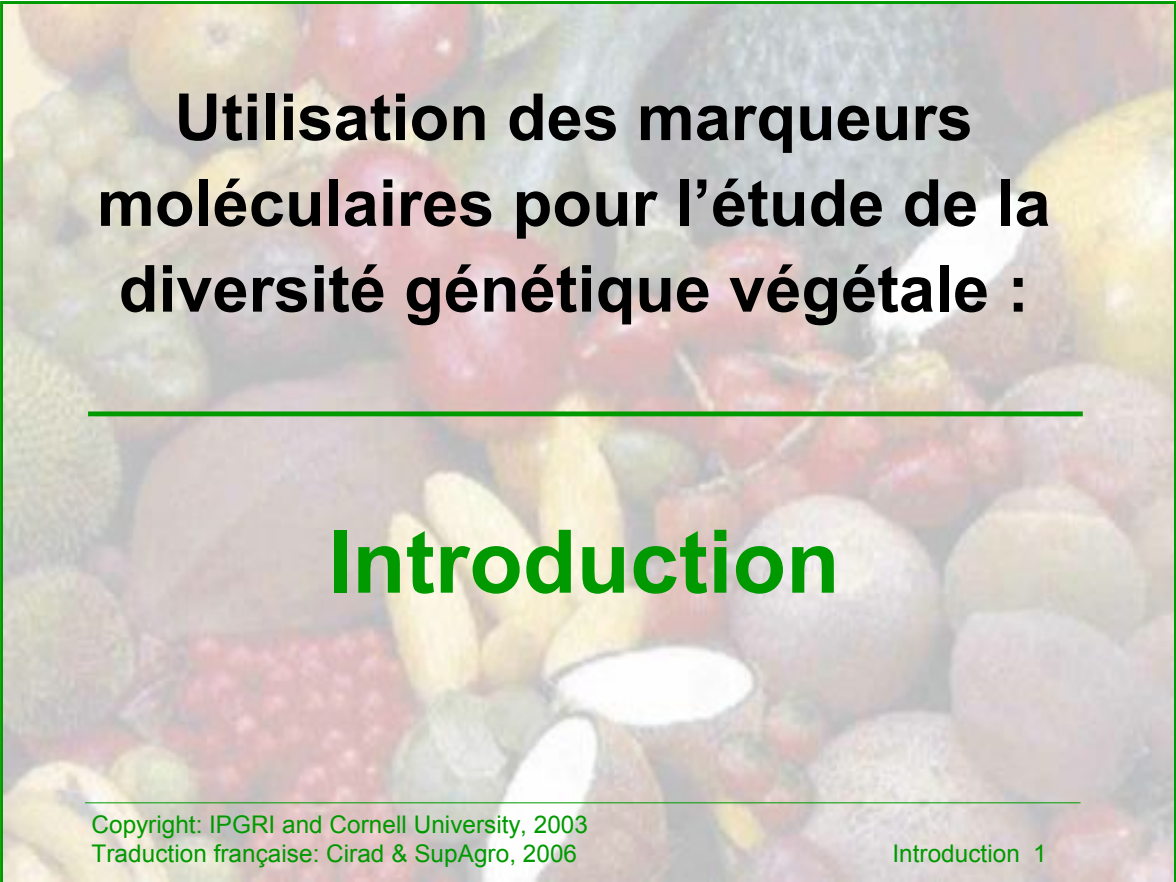
M. Carmen de Vicente
IPGRI

Theresa Fulton
IGD, Cornell University

Objectifs du module

Nos objectifs pour ce module sont que les utilisateurs:

- Comprennent les concepts scientifiques de base soustendant les technologies des marqueurs moléculaires et de la séquence d'ADN, et leur utilisation dans le domaine des ressources génétiques végétales
- Développent des compétences pour comparer et mettre en balance les avantages et limitations de chaque technologie, afin de prendre les décisions les plus appropriées face aux situations de recherche spécifiques de chaque utilisateur
- Aient à disposition une liste actuelle de ressources bibliographiques pour chaque technologie



Utilisation des marqueurs moléculaires pour l'étude de la diversité génétique végétale :

Introduction

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 1



Sommaire

- ▶ Diversité génétique
- ▶ Les ressources génétiques végétales
- ▶ Mesurer la variation génétique
- ▶ Les marqueurs génétiques:
 - Description
 - Types
 - Propriétés recherchées
- ▶ Comparaison des principales techniques:
 - Technologies
 - Coûts

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 2

La diversité génétique

- ▶ La diversité génétique se réfère aux variations dans:
 - La séquence d'ADN
 - La quantité d'ADN par cellule, ou
 - Le nombre et la structure des chromosomes
- ▶ La diversité génétique est la résultante de la sélection, la mutation, la migration, la dérive génétique et/ou la recombinaison. Tous ces phénomènes provoquent des changements dans les fréquences de gènes et d'allèles, conduisant à l'évolution des populations

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 3

La diversité génétique se réfère à la variation des gènes au sein des espèces, c'est à dire la variation héritable dans et entre les populations d'organismes. Au final, toute variation réside dans la séquence des quatre paires de bases qui composent la molécule d'ADN, et comme tels constituent le code génétique. D'autres types de diversité génétique peuvent être également identifiés à tous les niveaux d'organisation dans le noyau, y compris la quantité d'ADN par cellule, le nombre de chromosomes et la structure de l'ADN. Des nouvelles variations génétiques se créent continuellement dans les individus par des mutations chromosomiques ou géniques, qui se propagent par recombinaison chez les organismes à reproduction sexuée. La variation génétique est aussi influencée par la sélection. Les conséquences de ces phénomènes sont des changements dans les fréquences de gènes et d'allèles qui jouent sur l'évolution des populations. Des situations semblables peuvent se produire par sélection artificielle comme l'amélioration des plantes.

Les ressources génétiques végétales

- ▶ Les ressources génétiques végétales contiennent la variation génétique potentiellement utile pour l'avenir de l'humanité
- ▶ Les ressources génétiques végétales comprennent:
 - Des espèces sauvages apparentées aux espèces cultivées
 - Des espèces sauvages non apparentées
 - Des variétés traditionnelles et/ou des variétés de pays
 - Des variétés commerciales, hybrides ou lignées sélectionnées
- ▶ nous devons conserver les ressources génétiques végétales pour pouvoir éventuellement les utiliser.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 4

Les ressources génétiques végétales comprennent la variation génétique actuelle potentiellement utile pour l'avenir de l'humanité. Ces ressources incluent des variétés traditionnelles, des variétés de pays, des cultivars commerciaux, des hybrides et autre matériel végétal développé par amélioration; des espèces sauvages apparentées aux espèces cultivées; et d'autres qui pourraient être utilisés à l'avenir pour leur effet bénéfique sur l'agriculture ou l'environnement. De ce fait, les ressources génétiques doivent être conservées, dans le but ultime de pouvoir les utiliser le cas échéant comme source de variation génétique potentiellement utile.

Mesurer la variation génétique

- ▶ La conservation et l'utilisation efficaces des ressources génétiques végétales requièrent une évaluation précise de la variation génétique qu'elles comportent.
- ▶ La variation génétique peut être mesurée à deux niveaux:
 - Le phénotype – la combinaison de caractères individuels résultant d'un génotype et son interaction avec l'environnement
 - Le génotype – la composition génétique particulière d'un organisme

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 5

Pour conserver et utiliser la variation génétique, il faut d'abord la caractériser, c'est à dire mesurer son étendue et sa distribution. La variation peut être évaluée au niveau phénotypique et génotypique. L'évaluation de la variation phénotypique se concentre sur les caractères morphologiques- ces caractéristiques qui définissent la forme et l'apparence d'un ensemble d'individus. Certains de ces caractères peuvent être considérés comme "génétiques" si leur présence dans des individus apparentés est héritable et ne dépend pas de l'environnement, indiquant qu'ils sont associés à une séquence particulière d'ADN.

L'évaluation de la variation génotypique se fait au niveau de la molécule d'ADN responsable de la transmission de l'information génétique. La molécule d'ADN est composée de nucléotides, qui sont organisés selon une configuration en double hélice avec des niveaux de complexité croissants, jusqu'aux unités chromosomiques



Les marqueurs génétiques: description

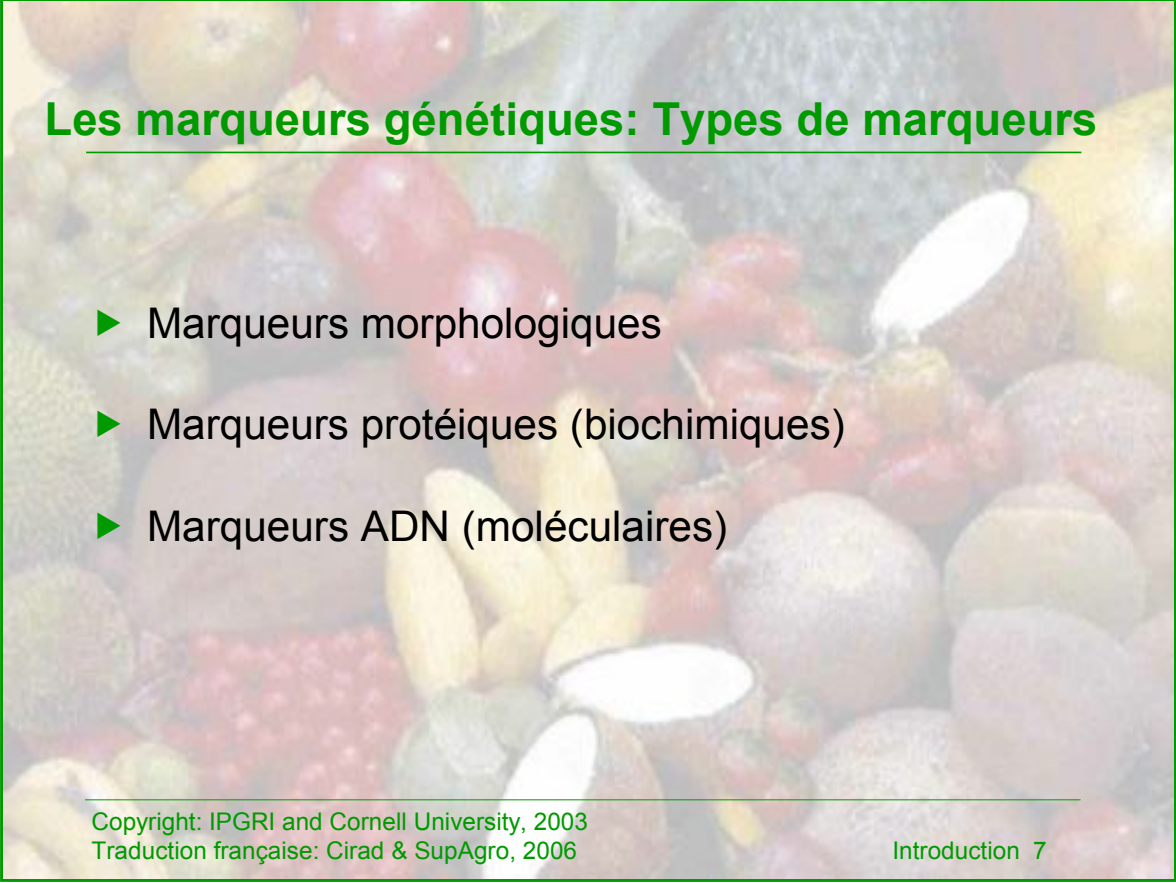
- ▶ Les marqueurs génétiques montrent des caractéristiques du phénotype et/ou du génotype d'un individu
- ▶ Leur transmission héréditaire peut être suivie au cours des générations

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 6

Un marqueur génétique est un caractère mesurable qui peut détecter une variation dans la séquence soit protéique, soit nucléique. Une différence, phénotypique ou génotypique, peut se comporter comme un marqueur génétique si elle identifie des caractéristiques du génotype ou du phénotype d'un individu, et si sa transmission héréditaire peut être suivie au cours de générations successives.

Un caractère génétique peut ne pas avoir des conséquences forcément observables sur la performance d'un individu. Parfois, cependant, ce caractère peut être lié, ou corrélé avec d'autres caractères plus difficiles à mesurer et qui affectent, eux, la performance d'un individu. Dans ce cas, ces caractères génétiques non observables peuvent être utilisés comme marqueurs génétiques pour des caractères liés, parce qu'ils indiquent la présence du caractère d'intérêt. Les deux mesures peuvent être corrélées, par l'analyse de leur transmission héréditaire et l'étude de la distribution des caractéristiques chez les deux parents et leur descendance.

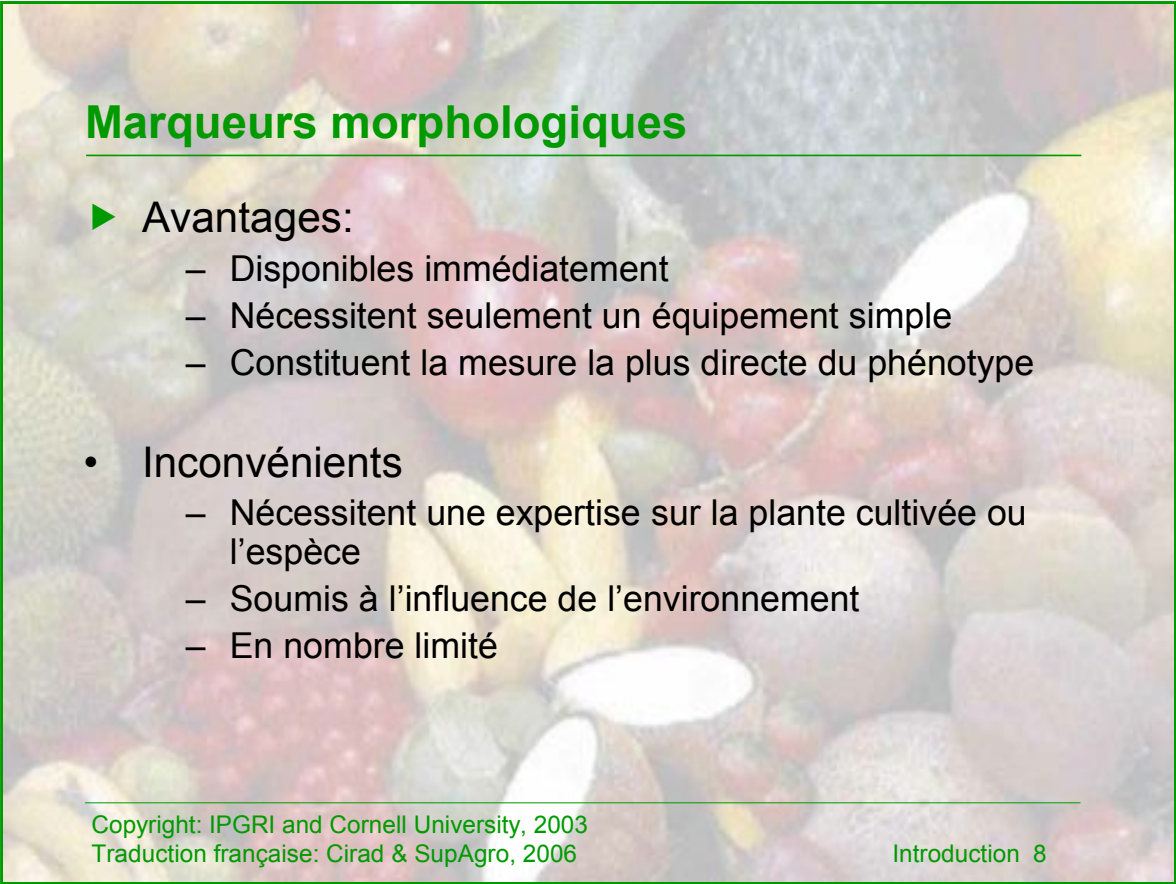


Les marqueurs génétiques: Types de marqueurs

- ▶ Marqueurs morphologiques
- ▶ Marqueurs protéiques (biochimiques)
- ▶ Marqueurs ADN (moléculaires)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 7



Marqueurs morphologiques

► Avantages:

- Disponibles immédiatement
- Nécessitent seulement un équipement simple
- Constituent la mesure la plus directe du phénotype

• Inconvénients

- Nécessitent une expertise sur la plante cultivée ou l'espèce
- Soumis à l'influence de l'environnement
- En nombre limité

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 8

Traditionnellement, la diversité dans et entre les populations était déterminée en évaluant des différences morphologiques. Ces mesures ont l'avantage d'être immédiatement disponibles, de ne pas nécessiter d'équipement sophistiqué et d'être la mesure la plus directe du phénotype, donc être disponibles pour une utilisation immédiate, ce qui est un atout important. Cependant, les déterminations morphologiques doivent être réalisées par un expert de l'espèce, elles sont sujettes à des changements dus à des facteurs environnementaux, peuvent varier selon les stades de développement et leur nombre est limité.

Marqueurs protéiques (biochimiques)

- ▶ Basés sur les propriétés de migration des protéines, qui permet leur séparation par électrophorèse
- ▶ Détectés par des dosages histochimiques spécifiques
- ▶ Avantages:
 - ▶ Nécessitent un équipement relativement simple
 - ▶ Complément robuste de l'évaluation morphologique de la variation
- ▶ Inconvénients:
 - ▶ Soumis à l'influence de l'environnement
 - ▶ En nombre limité

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 9

Pour dépasser la limite du nombre de caractères morphologiques, d'autres marqueurs ont été développés aussi bien au niveau protéique (phénotype) qu'au niveau ADN (génotype). Les marqueurs protéiques sont généralement appelés "marqueurs biochimiques" mais, de plus en plus, ils sont considérés à tort comme une classe commune sous la dénomination "marqueurs moléculaires".

Les marqueurs protéiques (protéines de réserve des graines et isozymes) sont générés par électrophorèse, utilisant l'avantage des propriétés de migration des protéines et enzymes, et révélés par la coloration histochimique spécifique des enzymes qui sont analysées.

Détecter des polymorphismes - des différences visibles à un marqueur donné entre individus - est une technique qui, pour des marqueurs protéiques, partage certains des avantages des marqueurs morphologiques. Cependant, les marqueurs protéiques sont aussi limités car ils peuvent être influencés par l'environnement et des modifications au cours des différents stades de développement. Malgré tout, les isozymes constituent un complément robuste à la simple analyse morphométrique de la variation.

Les marqueurs ADN (moléculaires)

- ▶ Polymorphismes détectés dans la séquence de l'ADN du noyau ou des organites
- ▶ Avantages:
 - ▶ non soumis à l'influence de l'environnement
 - ▶ Potentiellement en nombre illimité
 - ▶ Mesure objective de la variation
- ▶ Inconvénient majeur: nécessitent un équipement technique plus complexe

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 10

Les polymorphismes ADN peuvent être détectés dans l'ADN nucléaire et l'ADN d'organites, trouvé dans les mitochondries et les chloroplastes. Les marqueurs moléculaires concernent la molécule d'ADN elle-même, et, comme tels, sont considérés comme des mesures objectives de la variation. Ils ne sont pas soumis aux influences de l'environnement; des tests peuvent être réalisés tout au long du développement de la plante, et, mieux encore, ils ont le potentiel d'exister en nombre illimité, couvrant le génome entier.

Il existe de nombreux types de marqueurs moléculaires avec des propriétés différentes, comme nous allons le montrer plus loin.

Marqueurs génétiques: propriétés recherchées

- ▶ Très polymorphes
- ▶ Reproductibles
- ▶ Codominants
- ▶ Distribués régulièrement le long du génome
- ▶ Discriminants
- ▶ Non soumis à l'influence de l'environnement
- ▶ Neutres
- ▶ Peu coûteux
- ▶ Faciles à mesurer

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 11

Un bon marqueur est:

- *Polymorphe*, c'est à dire variable entre individus. Le degré de polymorphisme détecté dépend de la technologie utilisée pour le mesurer.
- *Reproductible dans toute expérience de laboratoire*, aussi bien entre expériences dans le même laboratoire qu'entre différents laboratoires réalisant des expériences identiques.
- *Codominant*. Selon le type d'application, la technique choisie doit être en mesure de détecter les différentes formes du marqueur, en distinguant homozygotes et hétérozygotes (hérédité codominante). Un individu hétérozygote montre simultanément le génotype combiné des deux parents homozygotes
- *Distribué régulièrement le long du génome*. Plus la couverture du génome est dense et bien répartie, meilleure sera l'évaluation du polymorphisme.
- *Discriminant*, c'est à dire capable de détecter des différences entre individus proches apparentés.
- *Non sujet aux influences environnementales*. La révélation du génotype d'un marqueur doit être indépendante de l'environnement dans lequel l'individu vit ou son stade de développement.
- *Neutre*. L'allèle présent au locus marqueur est indépendant de, et n'a pas d'effet sur la pression de sélection exercée sur l'individu. Ceci est généralement une supposition, car généralement aucune donnée n'est disponible pour confirmer ou infirmer cette propriété.
- *Economique*. Facile, rapide et peu coûteuse pour sa détection sur un grand nombre d'individus. Si possible, l'équipement doit être à usage multiple dans l'expérience.

Comparaison des principales techniques

Marqueurs	nombre	Codominant	Polymorphisme	Spécificité de locus	Technicité	Coût
Isozymes	< 90	oui	faible	oui	faible	faible
RFLP	illimité	oui	moyen	oui	élevée	moyen
RAPD	illimité	non	moyen	non	faible	faible
DAF	illimité	non	très élevé	non	faible	faible
AP-PCR	illimité	non	très élevé	non	faible	faible
Microsatellites	illimité	oui	très élevé	oui	faible ^a	faible ^a
SCAR	illimité ^b	oui/non	faible/moyen	oui	moyenne	faible
CAPS	illimité ^b	oui	faible/moyen	oui	moyenne	faible
ISSR	illimité	non	élevé	oui	faible/moyenne	faible/moyen
AFLP	illimité	non	élevé	non	moyenne	moyen
Séquençage	illimité	oui	élevé	oui/non	élevée	élevé
EST	illimité	oui	faible/moyen	oui	moyenne	moyen
SNP	illimité	oui	très élevé	oui	élevée	élevé

^a Quand les microsatellites ont déjà été identifiés et les amorces définies

^b Fonction des autres marqueurs disponibles

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003

Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 12

Ici nous comparons les techniques principales qui utilisent des marqueurs biochimiques et moléculaires pour identifier la diversité génétique. Les critères utilisés pour assigner une gradation dans chaque colonne (oui/non, faible/moyen/élevé, etc.) sont basés sur l'expérience et les résultats décrits dans la littérature. Nous ne pouvons pas donner un nombre, ou même un classement, pour chaque élément et ses technologies car les résultats dépendent fortement de l'espèce étudiée. Cependant, le tableau donne une notion objective de la façon dont les techniques peuvent être comparées entre elles pour une espèce donnée et les éléments dans les colonnes.

Les sigles indiqués sont les sigles en anglais, communément utilisés, dont nous donnons ici une traduction en français

RFLP	Restriction fragment length polymorphism (polymorphisme de longueur des fragments de restriction)
RAPD	Random amplified polymorphic DNA (ADN polymorphe amplifié au hasard)
DAF	DNA amplification fingerprinting (empreinte ADN de produits d'amplification)
AP-PCR	Arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR avec des amorces arbitraires)
SCAR	Sequence-characterised amplified region (Caractérisation de produits d'amplification par séquence)
CAPS	Cleaved amplified polymorphic sequence (Digestion de produit d'amplification)
ISSR	Inter-simple sequence repeat (Amplification intermicrosatellite)
AFLP	Amplified fragment length polymorphism (Polymorphisme de longueur des produits d'amplification)
EST	Expressed sequence tag (Étiquettes de séquences exprimées)
SNP	Single nucleotide polymorphism (polymorphisme nucléotidique simple)

Coûts: en quoi les techniques principales diffèrent:

Procédure	Élément	Coût estimé (USD,2002), 96 échantillons	RFLP	SSR	RAPD	AFLP	Commentaires
extractions d'ADN			5.40-101.40	5.40	5.40	5.40	96 micropreps vs. 96 larges preps
	Tubes de centrifugeuse et/ou microcentrifugeuse	2.40					
	Ou, plaque 96 puits	3.50					
	Ou, tubes 50 ml (large preparation)	24.00					
	Tampon d'extraction	2.00-50.00					96 micropreps vs. 96 large preps
	Fournitures diverses (alcool, tampon de lyse, cones, etc.)	1.00-25.00					
Electrophorèse en gel d'agarose			23.00	[23.00]	23.00	[23.00]	[] = facultatif, contrôle de qualité
	Agarose	10.00 (2 gels)					
	Tampon de migration	13.00 (2 gels)					
Electrophorèse en gel d'acrylamide				1.50	1.50		
	Acrylamide	0.75 (1 gel)					
	Urée	0.75 (1 gel)					
	Tampon de migration	— ^a					
Electrophoresis en gel de séquençage				4.06		4.06	
	Amorces fluorescentes	2.56					
	Gel (cf Electrophorèse en gel d'acrylamide)	1.50					
Visualisation au bromure d'éthidium			0.20-2.00	0.20-2.00	0.20-2.00		
	Bromure d'éthidium						
	Photographie du gel	0.20-2.00 (2 gels)					élevé-papier hte densité vs. polaroid

^a — = coût négligeable

(suite diapositive suivante)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 13

Coûts: en quoi les techniques principales diffèrent (2):

Procédure	Élément	Coût estimé (USD, 2002), 96 échantillons	RFLP ^a	SSR	RAPD	AFLP	Commentaires
PCR				74.30	74.30	74.30	
	Taq polymérase	50					1.5 U/ron. Moins cher quand plus de licences
	dNTPs	24					
	Amorces	0.30-0.40					
	Tampon PCR avec MgCl ₂						
Digestions par enzyme de restriction			0.30-30.00				
	Enzymes	0.30-30.00					~10 u/échantillon, Prix très variables
Southern blotting			30.50				
	Tampons (HCl, NaOH)	4 (2 gels)					
	Membrane nylon	24 (2 gels)					Coût réduit en réutilisant les filtres
	papier Whatman	2.50 (2 gels)					
Hybridation			3.35				Hybridation d'1 sonde sur 96 échantillons
	Tampon	— ^b					
	ADN ST (ou autre ADN de blocage)	0.30					
	Mélange pour marquage LS	0.30					
	Radioisotope (³² P)	2.50					
	Réactifs divers, tubes	0.25					
TOTAL			62.75-190.25	85.16-110.26	104.40-106.20	83.76-106.76	
(pour 96 échantillons)			(SAM vs. cartographie)				

^a = pas de PCR nécessaire pour la technique RFLP. Les sondes peuvent être amplifiées par PCR pour gagner du temps à un coût minimal

^b — = coût négligeable

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 14

Coûts: Estimation des coûts généraux

Procédure	Element	Coût (USD, 2002, est.)	coût approx. Par éch. (USD, 2002, est.)	Commentaires
Extractions d'ADN	Tubes de centrifugeuse et/ou microcentrifugeuse	\$25/1000	0.075	
	Ou, plaque 96 puits	\$3.50	0.04	
	Tampon d' extraction	(\$2/litre)	0.02-0.50	Microprep vs. large prep
	Tris	\$270/5 kg		
	Sorbitol	\$70/5 kg		
	Divers (EDTA, etc.)			
	Produits divers (alcool, tampon de lyse, cones, etc.)		0.01-0.25	
	Mortier et pilon (facultatif)	\$100		
	Genongrinder (facultatif)	\$8000		
	Broyeur de feuilles (facultatif)	\$500		
Electrophorèse sur Agarose	Agarose	\$365/500 g	0.11	6 g/gel, ~40 éch/gel
	Tampon de migration (Tris, EDTA, NaAc)	\$6.50/litre	0.05	
	Système de gel horizontal	\$400		
	Générateur	\$400 (2 sorties)		
Electrophorèse sur gel d'acrylamide				~96 éch/gel
	Acrylamide	\$30/100 ml		
	Urée	\$42/500 g		
	Système de gel vertical	\$1000		
	Générateur	\$400 (2 sorties)		
	Sécheur de gel	\$1500		
Electrophorèse sur gel de séquence	Amorces fluorescentes	\$40/1500 échantillons	0.03	
	Gel	\$3		
	Marqueurs de taille standard	\$12/gel		
	Programme d'analyse de gel	< \$100,000		
	Equipelement pour gel de séquence	\$100,000		

(suite diapo suivante)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 15

Les Coûts présentés ici supposent qu'un laboratoire de base est disponible et équipé en verrerie, consommable plastique, plaques chauffantes et agitateurs, pHmètre, balances, réfrigérateur, congélateur, eau distillée, pipettes et cones, centrifugeuse.

Ces coûts varient entre pays, et ont été calculés en fonction des prix aux USA. Comme les coûts dans beaucoup de pays seront plus élevés, ceux là doivent être considérés comme indicatifs et utilisés pour comparer les différentes technologies et équipement alternatif.

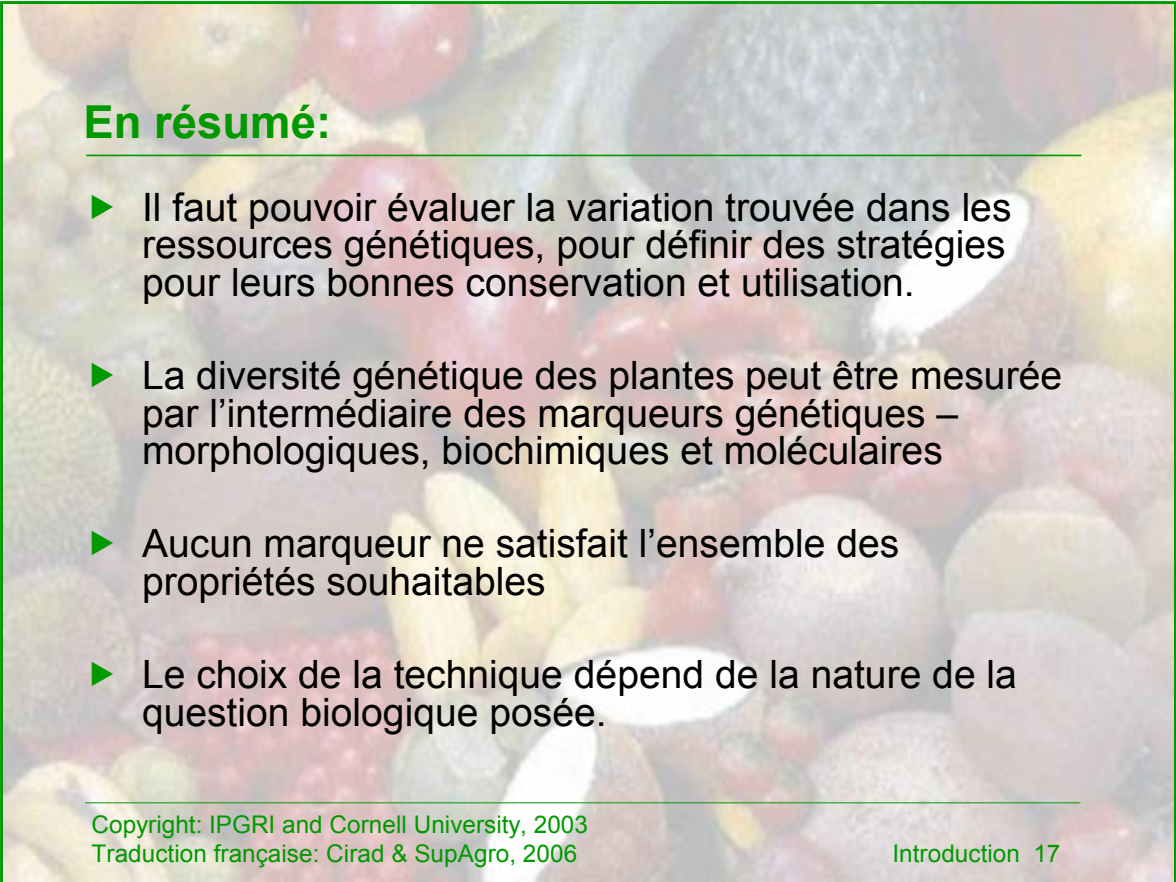
Coûts: Estimation des coûts généraux(suite)

Procédure	Élément	Coût (USD, 2002, est.)	coût approx. par éch. (USD, 2002, est.)	Commentaires
visualisation au bromide d'Ethidium	Bromure d'Ethidium	\$100/10 g	— ^a	Peut être réutilisé longtemps
	Transilluminateur	\$1000-\$2000		
	Équipement photographique	\$3000-\$12.000		systèmes très variables
	Photographie du gel	\$0.10-\$1.00	0.0025-0.025	élevé papiers haute densité vs. polaroid; -40 éch./gel
PCR	Thermocycleur	\$7000-\$23.000		96-puits – tétrade (quatre plaques de 96 puits)
	Taq polymérase	\$170/500 u	0.51	1.5 U/ron. Les prix devraient baisser sans licence
	dNTPs	\$250/seet de 4	0.25	
	Amorces	\$15-\$25	0.0025-0.0042	
	Tampon PCR avec MgCl ₂			
digestions par des enzymes de restriction	Enzymes	\$0.003-\$0.30/u	0.03-3.00	~10 u/éch., prix très variable
	Incubateur	\$500-\$1000		
Southern blotting	Tampons (HCl, NaOH)	\$1.00/litre (appr.)		
	Membrane de Nylon	\$180/rouleau	6.00/filtre (20x10 cm)	
	Papier Whatman	\$124/pack 100 feuilles larges		
	Système de transfert (éponges, bac...)	\$15		
Hybridation	Tampon			
	ADN ST (ou autre blocant)	\$306/10 g	0.30	0.15/ml. 1 ml pour 50 ml de tampon d'hybridation
	Mélange pour marque LS	\$125/50 u	0.30	
	Incubateur à agitation	\$2500		
	Radioisotope (³² P)	\$120/100 µl	2.40	
	Réactifs divers			
	Dépenses liées à l'environnement			
	Élimination des déchets	\$500/mois		
	Protection par écrans	\$300/station		

^a — = coût négligeable

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 16



En résumé:

- ▶ Il faut pouvoir évaluer la variation trouvée dans les ressources génétiques, pour définir des stratégies pour leurs bonnes conservation et utilisation.
- ▶ La diversité génétique des plantes peut être mesurée par l'intermédiaire des marqueurs génétiques – morphologiques, biochimiques et moléculaires
- ▶ Aucun marqueur ne satisfait l'ensemble des propriétés souhaitables
- ▶ Le choix de la technique dépend de la nature de la question biologique posée.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 17



A ce stade vous devez savoir:

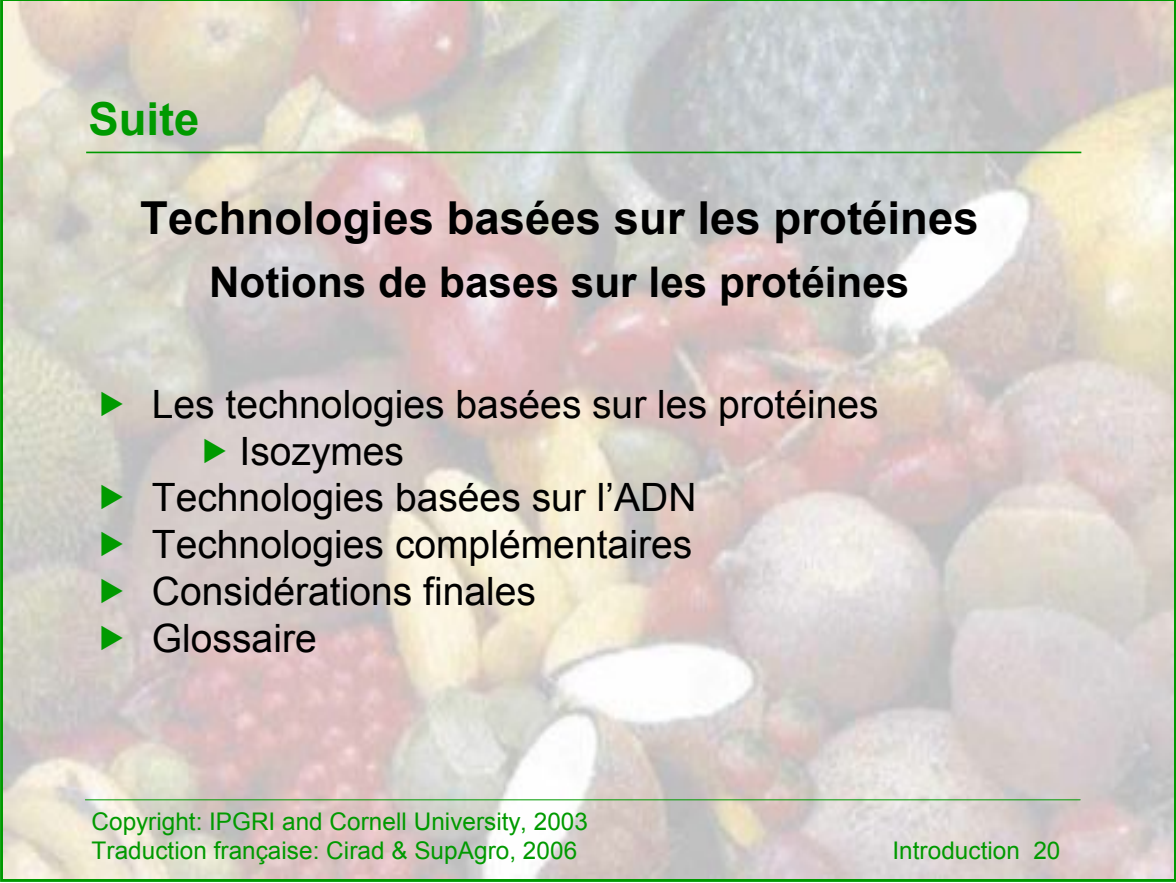
- ▶ Ce qu'est la variation génétique et comment elle peut être mesurée
- ▶ Les principaux avantages et inconvénients des différents types de marqueurs génétiques
- ▶ Ce qui constitue les propriétés souhaitables des marqueurs génétiques

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 18

Références de base

- Ayad, W.G., T. Hodgkin, A. Jaradat and V. Ramanatha Rao. 1997. Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report of an IPGRI workshop, 9-11 October 1995, Rome. IPGRI, Rome.
- Brown, S.M. and S. Kresovich. 1996. Molecular characterization for plant genetic resources conservation. Pp. 85-93 in *Genome Mapping in Plants* (H. Paterson, ed.). R.G. Landes Company, Georgetown, TX.
- Karp, A., K.J. Edwards, M. Bruford, S. Funk, B. Vosman, M. Morgante, O. Seberg, A. Kremer, P. Boursot, P. Arctander, D. Tautz and G.M. Hewitt. 1997. Molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges. *Nature Biotechnol.* 15:625-628.
- Karp, A., S. Kresovich, K.V. Bhat, W.G. Ayad and T. Hodgkin. 1997. Molecular tools in plant genetics resources conservation: a guide to the technologies. Technical Bulletin non. 2. IPGRI, Rome.



Suite

Technologies basées sur les protéines

Notions de bases sur les protéines

- ▶ Les technologies basées sur les protéines
 - ▶ Isozymes
- ▶ Technologies basées sur l'ADN
- ▶ Technologies complémentaires
- ▶ Considérations finales
- ▶ Glossaire

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Introduction 20

Utilisation des marqueurs moléculaires dans les études de diversité des plantes Module d'enseignement

Les technologies basées sur les protéines Notions de base sur les protéines

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Protein basics 1

Sommaire

- ▶ Notions de base sur les protéines
- ▶ Les structures protéiques:
 - ▶ Primaire
 - ▶ Secondaire
 - ▶ Tertiaire
 - ▶ Quaternaire
- ▶ Les fonctions des protéines
- ▶ Enzymes
 - ▶ Description
 - ▶ Allozymes et isozymes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Protein basics 2

Notions de base sur les protéines

- ▶ La séquence des bases azotées de l'ADN renseigne la cellule sur la synthèse des différentes protéines qu'elle doit réaliser pour fonctionner comme partie de l'organisme dans lequel elle existe
- ▶ Les protéines ont de nombreuses fonctions différentes, à la fois structurales et fonctionnelles
- ▶ Les protéines sont des molécules complexes faites de l'assemblage de blocs de construction (les acides aminés) formant ensemble une chaîne (chaîne polypeptidique)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Protein basics 3

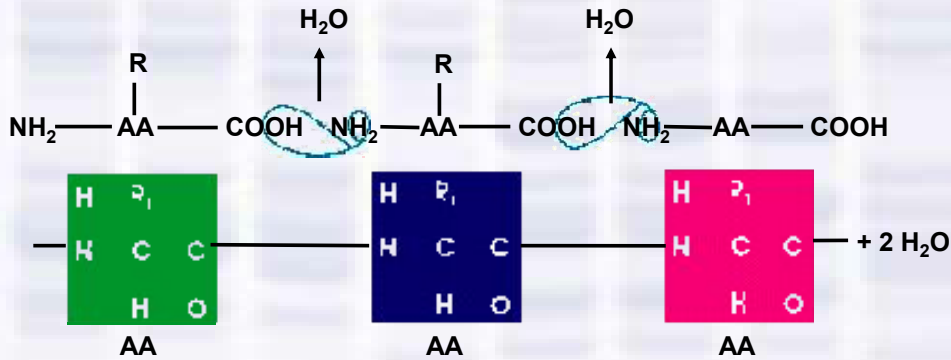
L'information portée par les bases de l'ADN est traduite en protéines. La molécule d'ADN est copiée en un acide nucléique différent- l'ARN ou acide ribonucléique. L'ARN se déplace au niveau du "ribosome", un organe en charge de la fabrication des protéines. Chaque ensemble de 3 bases dans l'ARN détermine quel acide aminé est ajouté à la molécule protéique ou cours de synthèse. La chaîne d'ARN se déplace au travers du ribosome jusqu'à ce que la protéine soit complète.

Ce processus a été appelé le "dogme central", base de toute vie biologique. Les acides aminés sont des composés organiques bi-fonctionnels qui contiennent un groupe amine basique ($-NH_2$) et un acide carboxylique ($-COOH$). Dans les protéines, on trouve communément 20 acides aminés, de fonctions et propriétés diverses en fonction de la nature de la chaîne latérale -R. Par exemple, dans l'alanine, la chaîne latérale -R est ($-CH_3$), alors que, dans la cystéine, elle est ($-CH_2-SH$).

Les structures protéiques: structure primaire

La structure primaire d'une protéine est l'ordre des acides aminés dans la chaîne polypeptidique

AA = Acide aminé



D'après Griffiths *et al.* 1996

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

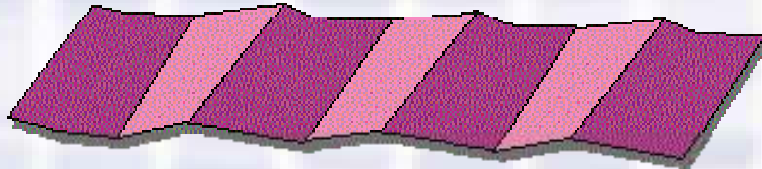
Protein basics 4

Dans les protéines, les acides aminés sont assemblés en chaînes par des liaisons peptidiques (fonction amide) qui forment le squelette de la molécule. Une liaison peptidique se forme entre le groupe amine (-NH₂) d'un acide aminé et le groupe carboxylique (-COOH) d'un autre. La formule générale d'un acide aminé est H₂N-CHR-COOH. Le groupe latéral -R peut être n'importe quoi depuis un simple atome jusqu'à une molécule complexe. Le terme "polypeptide" se réfère simplement à une longue chaîne d'acides aminés.

Une fois la chaîne protéique assemblée, elle doit être repliée correctement pour assurer sa fonction. La structure et la conformation de chaque protéine est spécifique. On ne comprend pas encore complètement la façon dont la séquence en acides aminés détermine la conformation de la protéine. Une "protéine" peut être constituée d'un ou plusieurs polypeptides séparés; elle peut être constituée de feuillettes (des chaînes d'acides aminés alignées ensemble) qui contiennent des structures en spirales. Très clairement, les propriétés des polypeptides et protéines dépendent de leur composition en acides aminés.

Les structures protéiques: structure secondaire

La structure secondaire est le résultat de liaisons hydrogène locales, créées le long du squelette polypeptidique



D'après Griffiths *et al.* 1996

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

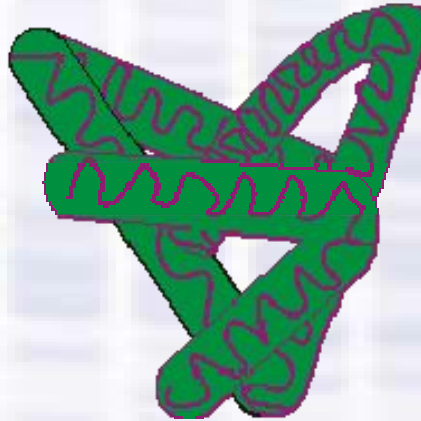
Protein basics 5

La structure secondaire est le résultat de liaisons hydrogène locales créées le long du squelette polypeptidique. Elle donne à la protéine force et flexibilité. Les structures rencontrées communément sont:

- *L'hélice alpha*, causée par des liaisons hydrogène à l'intérieur de la chaîne polypeptidique, par exemple dans les protéines musculaires.
- *Les feuillets bêta*, causés par des liaisons hydrogène entre des chaînes polypeptidiques adjacentes, par exemple les fibres de soie.

Les structures protéiques: structure tertiaire

La structure tertiaire résulte dans un polypeptide d'interactions entre des groupes R: des liaisons covalentes et non covalentes



D'après Griffiths *et al.* 1996

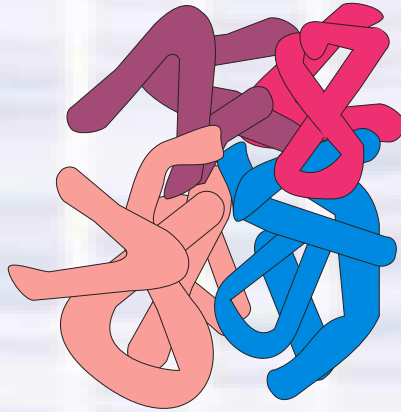
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Protein basics 6

La structure tertiaire résulte d'interactions entre les chaînes latérales d'un polypeptide, comme des liaisons non covalentes (liaisons hydrogène, liaisons ioniques, interactions hydrophobes) et de faibles liaisons covalentes (ponts disulfure entre des résidus cystéine).

Les structures protéiques: structure quaternaire

La structure quaternaire résulte d'interactions entre deux ou plusieurs chaînes polypeptidiques pour former des dimères, trimères, tétramères etc



D'après Griffiths *et al.* 1996

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Protein basics 7

Parfois un seul polypeptide est suffisant pour obtenir une protéine active; on parle alors d'une protéine agissant comme un monomère. Souvent, cependant, deux ou plusieurs polypeptides doivent interagir pour permettre à la protéine d'exercer sa fonction particulière. Dans ce cas, on parle de dimère; trimères et ainsi de suite...

La structure quaternaire résulte d'interactions entre deux chaînes polypeptidiques ou plus pour former des dimères, trimères, tétramères etc. Elles sont reliées entre elles par des liaisons hydrogène, des ponts ioniques et, moins fréquemment, des interfaces hydrophobes et des liaisons di-sulfures inter-chaînes.

Fonctions des protéines

- ▶ La structure tridimensionnelle des protéines est la résultante directe d'interactions avec leur environnement interne
- ▶ La diversité des fonctions des protéines résulte de la complexité de la structure protéique.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Protein basics 8

La structure tridimensionnelle des protéines est la résultante directe d'interactions avec son environnement interne. En conséquence, connaître comment les protéines sont structurées nous renseigne grandement sur les fonctions qu'elles assurent dans la cellule.

Ainsi, dans un environnement aqueux, les chaînes $-R$ hydrophobes se positionnent vers l'intérieur de la protéine. Des changements de température ou pH peuvent interférer avec les liaisons non covalentes, provoquant la rupture de la structure tri-dimensionnelle et une perte d'activité. Ce processus est appelé "dénaturation". Les protéines dénaturées peuvent également se regrouper ensemble pour devenir insolubles au cours d'un processus appelé coagulation.

La diversité des fonctions protéiques, facilitée par la complexité de la structure protéique, inclut (avec exemples):

- *Structure* (collagène, fibres musculaires)
- *Stockage* (gliadines du blé, hordéines de l'orge)
- *Enzymes* (hydrolases, transférases, isomérases, polymérases, ligases)
- *Transport* (transfer d'oxygène avec l'hémoglobine)
- *Messagers* (insuline et certaines autres hormones)
- *Anticorps* (protéines se liant à des particules étrangères spécifiques)
- *Régulation* (protéines impliquées dans la régulation de la synthèse d'ADN)

Enzymes: Description

- ▶ Les enzymes sont des protéines d'un type particulier qui agissent comme catalyseurs
- ▶ Chaque enzyme est hautement spécifique pour ce qui concerne le type de réaction chimique qu'elle catalyse et les substances (appelées substrats) sur lesquels elle agit.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Protein basics 9

Enzymes: Allozymes et isozymes

Les multiples formes que peuvent prendre les enzymes se classent en deux groupes selon la façon dont elles sont codées

- Allozymes - enzymes codées par différents allèles à un locus génique
- Isozymes – enzymes codées par des allèles à plus d'un locus génique

Habituellement le terme « isozymes » se rapporte aux deux classes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Protein basics 10

Les polymorphismes sont générés par des changements en acides aminés qui peuvent se répercuter en changements dans la structure primaire de l'enzyme.

En résumé:

- ▶ Les protéines sont les produits primaires des gènes
- ▶ Les protéines peuvent avoir différentes structures, qui sont intimement liées aux tâches qu'elles assurent dans la cellule
- ▶ Les enzymes sont des types particuliers de protéines qui agissent comme catalyseurs
- ▶ Les enzymes peuvent avoir des formes multiples, appartenant soit aux allozymes, soient aux isozymes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Protein basics 11

A ce stade vous devez savoir:

- ▶ Ce qu'est une protéine
- ▶ Les mécanismes impliqués dans la mise en forme des protéines en différentes structures
- ▶ Ce qu'est une enzyme
- ▶ La différence entre allozymes et isozymes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Protein basics 12

Référence de base

Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin and W.M. Gelbart. 1996. The nature of the gene. Pp. 345-358 *in* An Introduction to Genetic Analysis (6th edn.). W.H. Freeman and Co., NY.

Suite:

Technologies basées sur les protéines Isozymes

- ▶ Technologies basées sur l'ADN
- ▶ Technologies complémentaires
- ▶ Considérations finales
- ▶ Glossaire

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Protein basics 14

Utilisation des marqueurs moléculaires dans les études de diversité des plantes Module d'enseignement

Les technologies basées sur les protéines Isozymes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 1

Sommaire

- ▶ Détection des isozymes
 - Méthodologie
 - Électrophorèse sur gel
- ▶ Équipement
- ▶ Isozymes en images
- ▶ Interprétation des profils de bandes
- ▶ Avantages et inconvénients
- ▶ Applications
 - *Lysimachia* sp.
 - Haricot de Lima
 - Oignon

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 2

Détection des isozymes: Méthodologie

- ▶ Pré-traitement du matériel végétal
- ▶ Electrophorèse sur amidon ou acrylamide
- ▶ Coloration histochimique
- ▶ Analyse des profils de bandes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 3

Les extraits bruts de tissus sont soumis à une électrophorèse sur gel et marqués avec des colorations spécifiques d'enzymes, résultant en un profil de bandes simple.

La variation dans les profils de bandes entre les individus peut être interprétée génétiquement, comme avec tout autre marqueur phénotypique.

Detection des isozymes: électrophorèse (1)

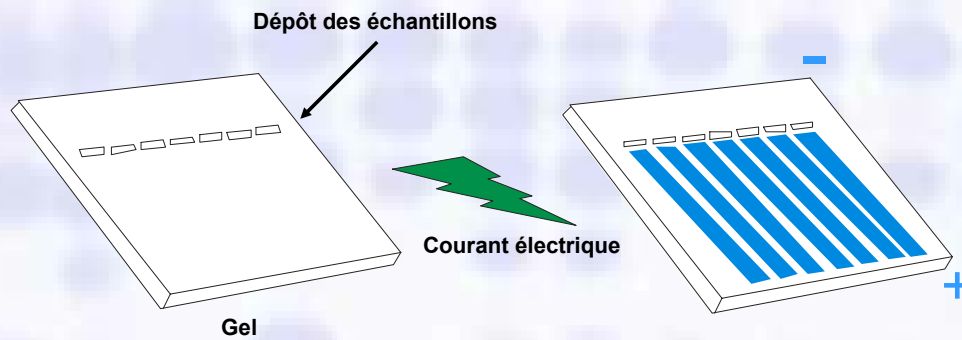
- ▶ Ce processus combine, par l'application d'un champ électrique, la séparation des molécules suivant leur charge et leur taille
- ▶ Le courant électrique déplace les molécules entre les pores d'une couche de gel
- ▶ Le constituant du gel est choisi pour que ses pores aient une taille adaptée à la séparation d'une gamme de tailles et formes de molécules spécifiques

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 4

L'électrophorèse est une technique chromatographique pour séparer des mélanges de composés ioniques. Elle a été adaptée comme outil commun d'analyse biochimique.

Detection des isozymes: électrophorèse (2)



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 5

Les protéines sont les produits primaires des gènes. Quand la séquence nucléotidique de l'ADN change, les profils de bande des protéines changent également. L'électrophorèse enzymatique peut révéler directement du polymorphisme génétique en révélant de multiples formes d'une enzyme spécifique.

Equipement

► Ressources:

- Eau distillée et/ou désionisée
- Réactifs

► Equipement:

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| • Réfrigérateur et congélateur | • pH mètre |
| • Générateurs | • Balances |
| • Plaque chauffante ou micro-onde | • Unités d'électrophorèse sur gel |
| • Gants de coton épais | • Verrerie graduée et pompes à vide |

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 6

Les isozymes en images

Les images suivantes illustrent les étapes des techniques de laboratoire impliquées dans la détection des isozymes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 7



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 8

Le technicien de laboratoire pipette du tampon d'extraction sur une section de feuille. Chaque échantillon est placé dans une coupelle plastique typiquement utilisée pour peser des produits chimiques. D'autres ustensiles peuvent être utilisés alternativement, mais ils doivent être très propres et ne pas absorber les tissus macérés.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 9

Une fois le tampon d'extraction placé sur l'échantillon de feuille, la feuille est écrasée avec un pilon en plastique pour s'assurer que le tissu est bien broyé et homogénéisé avec le tampon. Cela doit être fait le plus rapidement possible pour éviter une augmentation de température. Quand les échantillons ont été écrasés, les coupelles plastiques peuvent séjourner un moment dans la glace.



Courtesy of Dr. Pere Arús, IRTA, Spain

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 10

Un petit rectangle de papier, coupé dans un papier poreux, est placé dans l'homogénat, jusqu'à ce que le papier absorbe l'échantillon.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 11

La solution d'amidon chauffée est coulée dans le moule du gel. Quand le gel se refroidit il prend la consistance d'une gelée. Il sera alors prêt pour le dépôt des échantillons. Jusqu'à son utilisation, le gel peut être stocké dans un réfrigérateur.



Courtesy of Dr. Pere Arús, IRTA, Spain

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 12

Un gel d'amidon, préparé à l'avance, a été coupé avec un scalpel à un tiers à peu près du bord du moule. Les rectangles de papier sont maintenant placés verticalement contre l'une des bordures de la fente à l'aide de pinces.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 13

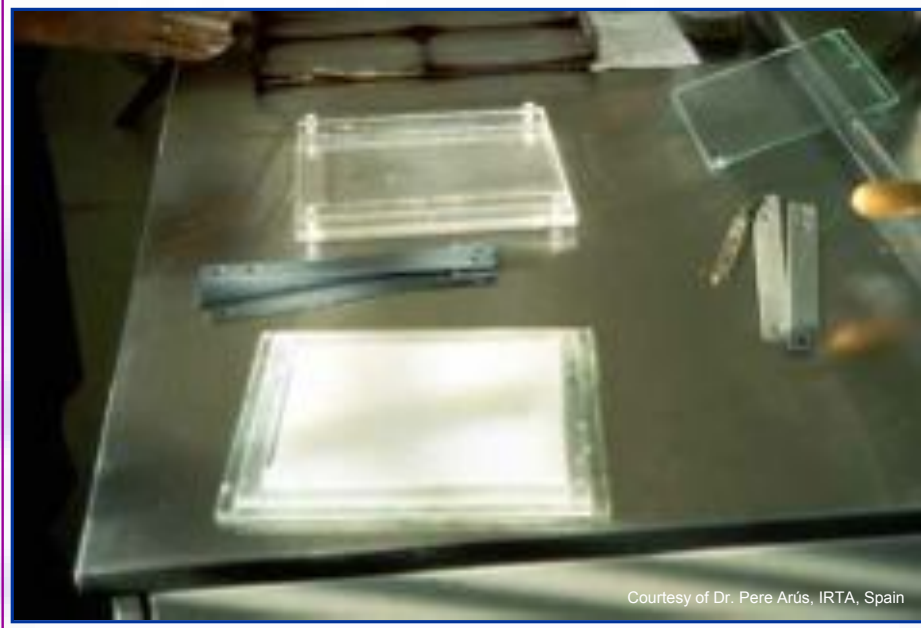
Un générateur de courant doit être utilisé pour contrôler le voltage et l'intensité du courant pendant l'électrophorèse. Plusieurs modèles sont disponibles dans le commerce, et ont des propriétés et capacités comparables. Dans notre exemple, deux unités d'électrophorèse peuvent être branchées simultanément. Un minuteur peut être inclus pour stopper l'électrophorèse à un temps donné.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 14

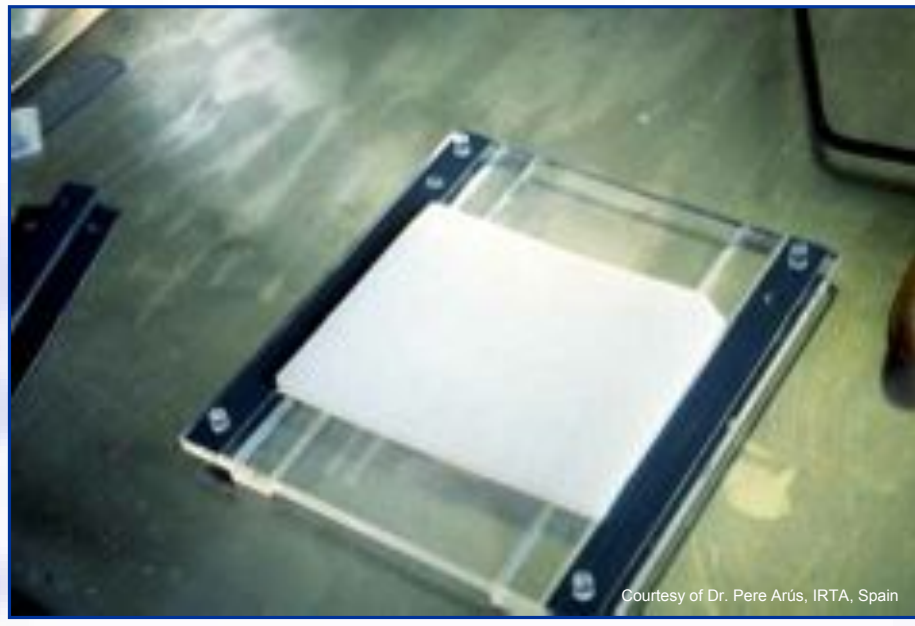
Le gel est placé dans une unité d'électrophorèse à l'intérieur d'une chambre froide ou d'un réfrigérateur. L'unité contient une cuve remplie de tampon de chaque côté (cathode et anode) et le contact entre le tampon et le gel se fait par une éponge ou une mèche de tissu. Un film plastique est placé par dessus pour éviter le dessèchement du système pendant le processus et assurer un bon transfert du tampon. Les échantillons sont déposés et leur trace suivie par un colorant bleu qui marque la migration dans le gel.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 15

Quand la migration est complète (généralement une ombre jaunâtre peut être observée du côté opposé à la face de dépôt du gel), le gel peut être coupé en tranches. Le premier plan montre le gel prêt à être coupé, avec une plaque de plexiglass en attente pour le transfert du gel (centre). On peut voir en haut de la photographie un récipient où les coupes vont être placées.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 16

Le gel est maintenant sur le portoir et des espaceurs fins, noirs, sont placés de chaque côté pour contrôler l'épaisseur des coupes. Une entaille est faite sur un coin (en haut à droite) comme repère pour localiser correctement les échantillons après coloration du gel.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 17

Une plaque de verre est placée sur le gel pour excercer une pression pendant la coupure, assurant ainsi des tranches égales. Un coupe-fromage, garni d'une corde de guitare, est utilisé pour couper le gel en tranches.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 18

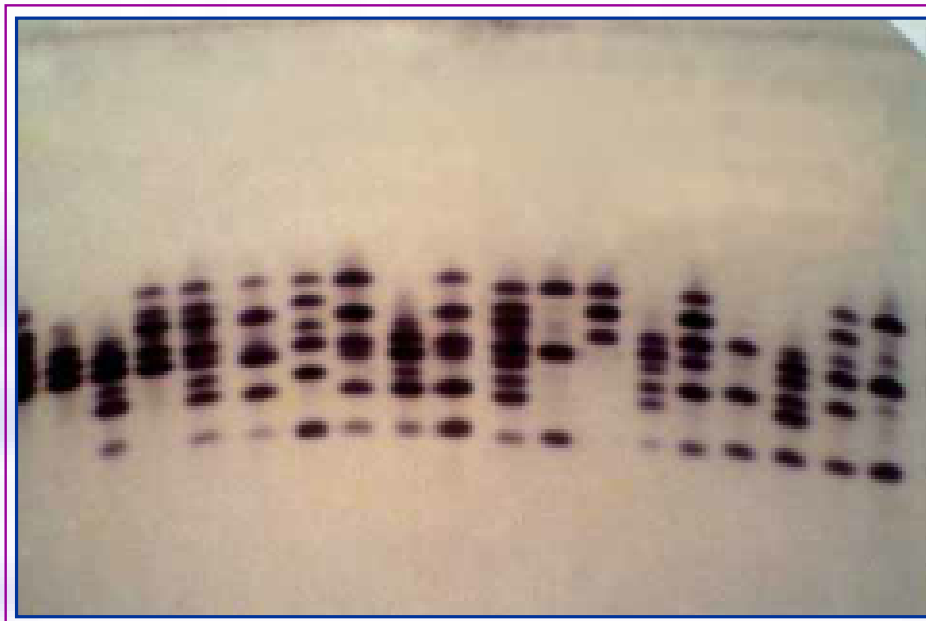
Différentes solutions de colorations permettent de visualiser différentes enzymes. Ici, une solution de coloration jaunâtre est versée dans le récipient en plexiglass avant que la tranche de gel n'y soit transférée.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 19

Une tranche de gel est transférée dans le bac contenant la solution de coloration désirée. Il faut faire attention lors du transfert du gel à cause de sa fragilité. Si la tranche se casse, les morceaux peuvent souvent être réarrangés pour visualiser malgré tout les enzymes sur le gel.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 20

Après une certaine période d'incubation, la tranche de gel colorée apparaît comme sur la photographie, qui montre l'alcool deshydrogénase foliaire de sainfoin (*Onobrychis viciaefolia*), une espèce fourragère.

Interprétation des profils de bandes

Les sorties de l'analyse sont:

- ▶ La structure quaternaire des enzymes (monomérique, dimérique, etc.)
- ▶ Savoir si la plante est homozygote ou hétérozygote à chaque locus génique
- ▶ Le nombre de locus géniques (isozymes)
- ▶ Le nombre d'allèles par locus
- ▶ La transmission héréditaire des gènes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 21

Les allozymes sont contrôlés par des allèles codominants, ce qui signifie que les homozygotes (tous les allèles d'un locus sont similaires) peuvent être distingués des hétérozygotes (les parents de l'individu ont apporté différents allèles à ce locus).

Pour les enzymes monomériques (c.a.d. constituées d'un seul polypeptide), les plantes homozygotes pour un locus donné vont produire une bande, alors que les individus hétérozygotes vont en produire deux. Pour les enzymes dimériques (c.a.d. constituées de deux polypeptides), les plantes homozygotes pour ce locus vont produire une bande, alors que les individus hétérozygotes en produiront trois à cause de l'association aléatoire des polypeptides.

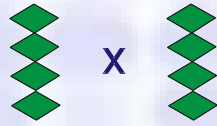
Il existe aussi des enzymes multimériques, où les polypeptides sont spécifiés par différents locus. La formation d'hétéromères peut ainsi compliquer considérablement le profil de bande.

Ces complexités et l'importance d'une bonne interprétation du profil de bandes rendent l'analyse génétique souhaitable, voire nécessaire, en utilisant une analyse de descendance (F1, F2 et rétrocroisements) d'un croisement artificiel entre des individus avec un profil de bande connu.

Exemple 1: Formation d'homomères

- ▶ Allozyme monomérique :

Homozygote



x

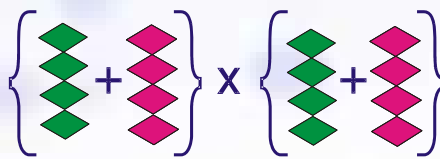


F₁

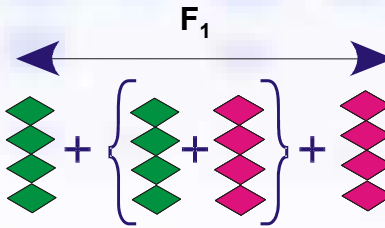


- ▶ Allozyme monomérique :

Hétérozygote



x



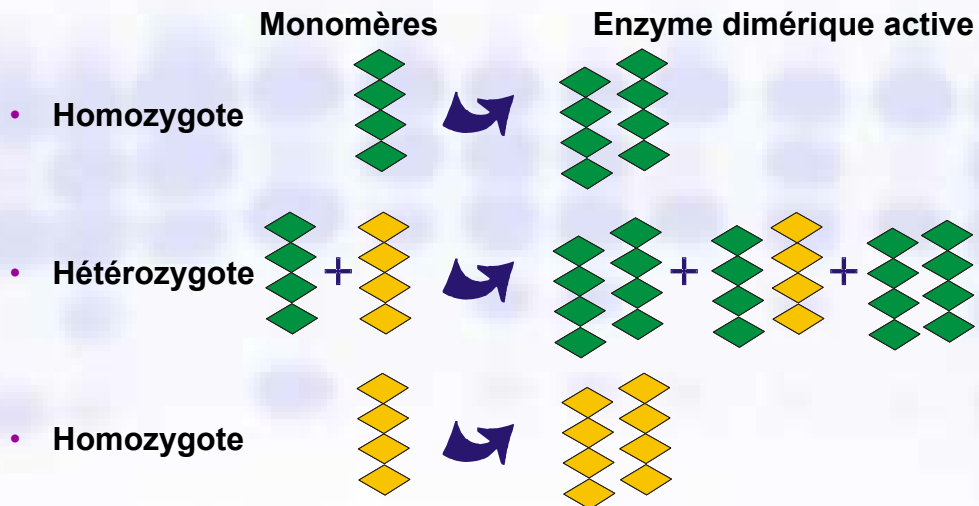
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 22

Cet exemple montre le comportement d'enzymes monomériques dans des croisements. Les parents sont homozygotes pour le même allèle au même locus ou hétérozygotes. Dans le premier cas, toute la descendance F1 sera homozygote et de ce fait on observera une seule bande. Si les parents sont hétérozygotes, on obtiendra trois phénotypes F1 possibles.

Exemple 2: Formation d' hétéromères

Allozyme dimérique : un gène avec deux allèles



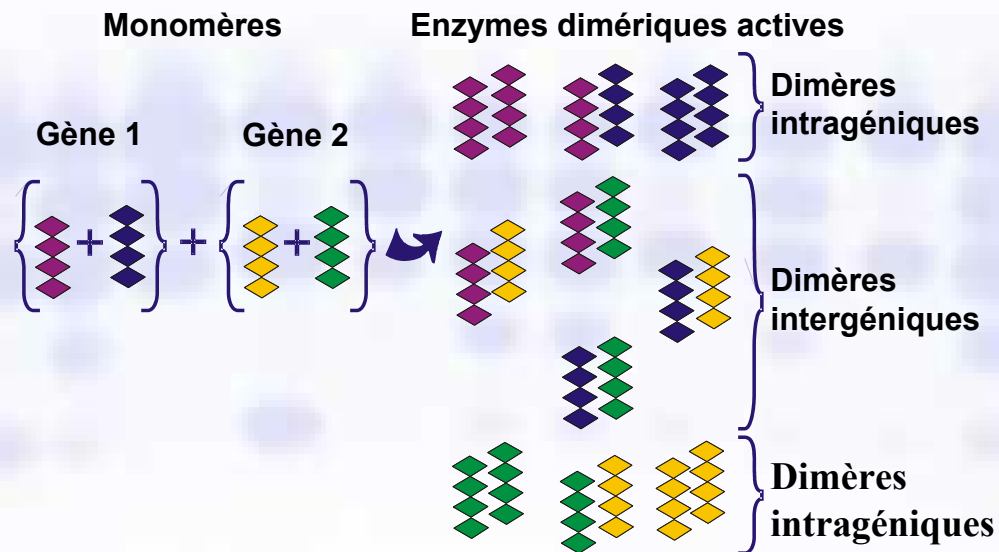
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 23

Dans les croisements, les enzymes dimériques peuvent se comporter de trois façons différentes. Si les deux parents sont homozygotes pour différents allèles au même locus, toute la descendance sera hétérozygote, mais à cause de l'association aléatoire des polypeptides, trois combinaisons sont possibles et pour cela trois bandes seront révélées par coloration du gel d'électrophorèse.

Exemple 3: Formation d'hétéromères (suite)

Allozymes dimériques : deux gènes avec deux allèles



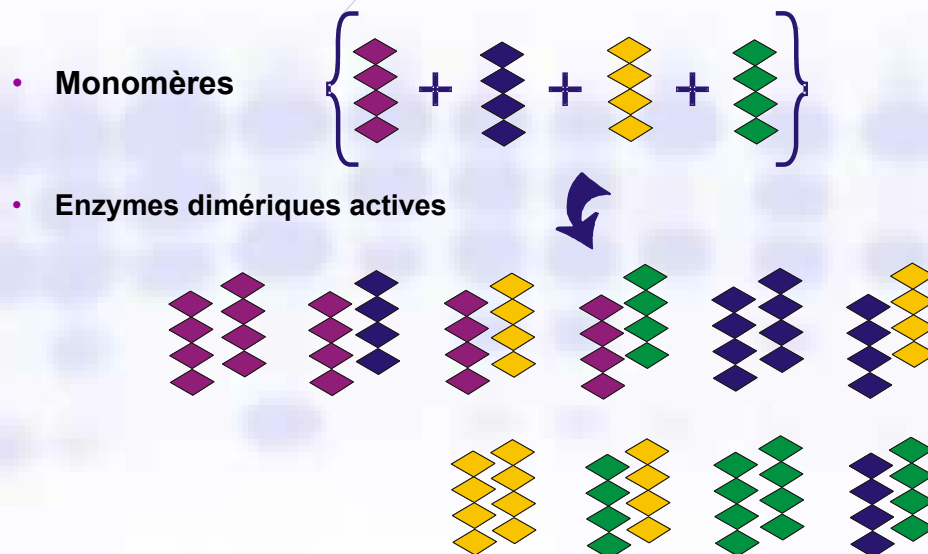
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 24

Dans le second exemple sur les allozymes dimériques, les deux polypeptides sont encodés par des locus séparés. Les parents ne partagent aucun allèle commun. L'association au hasard des polypeptides peut conduire à un total de 10 dimères, car aussi bien des dimères intragéniques (allèles au même locus) que des dimères intergéniques (allèles de différents locus) peuvent se former.

Exemple 4: Formation d'hétéromères (suite)

Tétraploïdes hétérozygotes (un locus, quatre allèles)



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 25

Dans cet exemple, un tétraploïde hétérozygote, avec quatre allèles sur un locus, forment 10 enzymes dimériques actives à cause de l'association aléatoire parmi les quatre monomères.

Avantages et inconvénients

► Avantages

- Robuste et très reproductible
- Codominants, c.a.d. utilisables pour estimer une panoplie de paramètres en génétique des populations et pour la cartographie génétique

► Inconvénients

- Relativement peu d'essais biochimiques disponibles pour détecter des enzymes
- Analyse basée sur le phénotype

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 26

L'analyse d'isozymes est, en principe, une méthode robuste et reproductible. De plus, les isozymes sont des marqueurs codominants et sont utilisables pour estimer tous les paramètres de génétique des populations et pour la cartographie génétique.

Environ 90 systèmes d'isozymes ont été utilisés pour les plantes, des locus d'isozymes ayant été cartographiés dans beaucoup de cas.

La limitation majeure de l'analyse d'isozymes est le faible nombre de marqueurs qu'elle génère, car le nombre de tests biochimiques disponibles pour les détecter est faible. En conséquence, le degré de couverture du génome est inadéquat pour une étude de diversité génétique extensive.

Un autre inconvénient des isozymes réside dans le fait que les marqueurs sont basés sur un phénotype. De ce fait, ils peuvent être influencés par des facteurs environnementaux, des différences d'expression pouvant apporter de la confusion dans l'interprétation des résultats.

Comme les gènes peuvent être exprimés différemment au cours des différents stades de développement ou dans différents tissus, le même type de matériel doit être utilisé pour toutes les expériences.

Applications

- ▶ Flux de gènes et/ou introgression
- ▶ Génétique des populations
- ▶ Stratégies pour la conservation *ex situ*
- ▶ Evolution des espèces cultivées
- ▶ Evaluation et caractérisation des ressources génétiques
- ▶ Erosion génétique
- ▶ Stabilité génétique du matériel conservé

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 27

Les références précédées de * sont expliquées en détail dans les diapositives suivantes.

- Bartsch, D., M. Lehen, J. Clegg, M. Pohl-Orf, I. Schuphan and N.C. Ellstrand. 1999. Impact of gene flow from cultivated beet on genetic diversity of wild sea beet populations. *Mol. Ecol.* 8:1733-1741.
- Finkeldey, R. and O. Murillo. 1999. Contributions of subpopulations to total gene diversity. *Theor. Appl. Genet.* 98:664-668.
- * Ibáñez, O., C. Calero, M. Mayol and A. Rosello. 1999. Isozyme uniformity in a wild extinct insular plant, *Lysimachia minoricensis* J.J. Rodr. (Primulaceae). *Mol. Ecol.* 8:813-817.
- Ledig, F.T. 2000. Founder effects and the genetic structure of Coulter pine. *J. Hered.* 91(4): 307-315.
- Li, Z. and J.N. Rutger. 2000. Geographic distribution and multilocus organization of isozyme variation of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101:379-387.
- Liu, F., R. Von Bothmer and B. Salomon. 1999. Genetic diversity among East Asian accessions of the barley core collection as revealed by six isozyme loci. *Theor. Appl. Genet.* 98: 1226-1233.
- * Maquet, A., I. Zoro Bi, M. Delvaux, B. Wathelet and J.P. Baudoin. 1997. Genetic structure of a Lima bean base collection using allozyme markers. *Theor. Appl. Genet.* 95:980-991.
- Ortiz, R. and Z. Huaman. 2001. Allozyme polymorphisms in tetraploid potato gene pools and the effect on human selection. *Theor. Appl. Genet.* 103:792-796.
- * Rouamba, A., M. Sandmeier, A. Sarr and A. Ricoch. 2001. Allozyme variation within and among populations of onion (*Allium cepa* L.) from West Africa. *Theor. Appl. Genet.* 103:855-861.
- Shapcott, A. 1998. The patterns of genetic diversity in *Carpentaria acuminata* (Arecaceae) and rainforest history in northern Australia. *Mol. Ecol.* 7:833-847.

Exemple: *Lysimachia* sp.

► Titre:

Isozyme uniformity in a wild extinct insular plant,
Lysimachia minoricensis J.J. Rodr. (Primulaceae).
Mol. Ecol. 1999. 8:813-817

► Objectif:

Evaluer la diversité génétique d'accessions de
semences de *Lysimachia minoricensis* conservées et
distribuées par 10 jardins botaniques européens.

► Matériel et méthodes:

Un total de 158 plantes ont été analysées pour 13
enzymes (22 locus)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 28

(cf diapositive suivante)

Exemple: *Lysimachia* sp. (continued)

► Résultats:

Aucune variation électrophorétique n'a été détectée par aucune des enzymes testées (22 locus)

► Discussion sur le manque de variation:

- Les techniques électrophorétiques ne révèlent qu'une faible portion de la variation génétique
- Faible taille de l'échantillon? L'échantillon offre une probabilité de 95.6% de détecter un variant allélique qui existe à une fréquence moyenne d'au moins 1%
- Ce manque de variation détectable est-il inattendu? Les résultats posent plus le problème de la part de variation génétique conservée *ex situ* que celui de son niveau avant l'extinction.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 29

(cf diapositive suivante)

Exemple: *Lysimachia* sp. (suite)

Conclusions:

Le système d'échanges entre jardins botaniques n'est pas approprié pour la conservation effective si la variation génétique de l'espèce est sous-représentée dans les collections de plantes.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 30

Exemple: Haricot de Lima (pois du Cap)

- ▶ **Titre:**
Genetic structure of a Lima bean base collection using allozyme markers. Theor. Appl. Genet. 1997. 95:980-991
- ▶ **Objectif:**
Evaluer la diversité et la structure génétiques dans une collection de base de haricot de Lima (*Phaseolus lunatus* L.), impliquant plusieurs accessions largement réparties, des accessions sauvages et des variétés de pays
- ▶ **Matériel et méthodes:**
Dix systèmes enzymatiques ont été utilisés pour analyser 235 accessions de haricot de Lima (1-5 graines chaque) collectées en Amérique latine et dans les Caraïbes.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 31

(cf diapositive suivante)

Exemple: Haricot de Lima (suite)

Résultats et discussion:

- Treize locus (32 allèles) ont été identifiés pour 10 systèmes enzymatiques
- Des allèles spécifiques ont été identifiés dans chaque pool génique. Le dendrogramme montre clairement deux regroupements principaux:
 - Les accessions des Andes avec un profil "Andéen" des protéines des graines
 - Les accessions Mésoaméricaines et Andéennes avec un profil Mésoaméricain des protéines de graines
- Les variétés de pays à la fois Andéennes et Mésoaméricaines ont été groupées avec leurs apparentés respectifs
- En moyenne, le haricot de Lima montre entre et à l'intérieur des accessions respectivement 76% et 24% de la diversité totale. Les raisons en sont l'autofécondation, l'occurrence de petites populations, et un faible flux de gènes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 32

(cf diapositive suivante)

Exemple: Haricot de Lima (suite)

Conclusions:

- Un programme de conservation de *P. lunatus* doit inclure des formes sauvages et cultivées des deux pools géniques
- Comme la diversité génétique est distribuée principalement entre les accessions, d'avantage de populations ou accessions devraient être préservées pour assurer la rétention de la diversité allélique et génotypique pour les deux pools géniques et formes botaniques.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 33

Exemple: Oignon

- ▶ **Titre:**
Allozyme variation within and among populations of onion (*Allium cepa* L.) from West Africa. Theor. Appl. Genet. 2001. 103:855-861
- ▶ **Objectif:**
Evaluer la diversité génétique dans des populations locales d'oignon, en utilisant les isozymes
- ▶ **Materiel et méthodes:**
 - Seize populations cultivées locales, échantillonnées dans cinq pays d'Afrique de l'Ouest, ont été étudiées
 - Neuf systèmes enzymatiques ont été testés

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 34

(cf diapositive suivante)

Exemple: Oignon (suite)

Résultats:

- Quatre systèmes étaient polymorphes (ADH, MDH, 6-PGDH, PGI), avec un total de neuf allèles
- Le nombre moyen d'allèles par locus polymorphe était de 2,25. De plus, 66.6% des allèles étaient présents dans toutes les populations
- L'allèle *adh-a2* était absent dans les 5 populations originaires du Burkina Faso. L'allèle *6-pgdh-a2* était présent seulement dans deux populations, l'une du Sud- Niger et l'autre du Nord- Nigéria

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 35

(cf diapositive suivante)

Exemple: Oignon (suite)

► Discussion:

- La faible différenciation géographique entre les populations peut résulter d'échanges commerciaux entre pays de même langue.
- Globalement, les hétérozygotes sont peu nombreux, peut-être à cause de l'autogamie dans les populations échantillonnées, ou de dérives génétiques suite à la production de graines impliquant de très faibles quantités de bulbes comme progéniteurs

► Conclusions:

Des études similaires à l'échelle du continent Africain seraient souhaitables pour mieux comprendre la variabilité de l'espèce

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 36

En résumé

- ▶ La technologie des isozymes est basée sur l'extraction de protéines, la séparation en gel d'électrophorèse et la coloration histo-chimique.
- ▶ L'équipement nécessaire est simple
- ▶ L'interprétation du profil de bandes est typiquement codominant et, à cause de sa complexité, peut nécessiter une analyse génétique
- ▶ Les isozymes sont des marqueurs génétiques extrêmement reproductibles.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 37

A ce stade vous devez savoir:

- ▶ Les principales étapes de la technologie des isozymes
- ▶ Les principaux points à prendre en considération dans l'interprétation des profils de bandes
- ▶ Les avantages et inconvénients des isozymes comme marqueurs génétiques dans des études de diversité.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 38

Références de base

- Hamrick, J.L. and M.J. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. Pp. 43-63 in Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources (A.H.D. Brown, M.T. Cleg, A.L. Kahler and B.S. Weir, eds.). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Manchenko, G.P. 1994. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Murphy, R.W., J.W. Sites, D.G. Buth and C.H. Haufler. 1996. Proteins: isozyme electrophoresis. Pp. 51-20 in Molecular Systematics (2nd edn.). (D.M. Hillis, C. Moritz and B.K. Mable, eds.). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Soltis, D.E. and P. Soltis (eds.). 1989. Isozymes in plant biology. Dioscorides Press, Portland, OR.
- Tanksley, S.D. and T.J. Orton (eds.). 1983. Isozymes in plant genetics and breeding, parts A and B. Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands.

Suite

Les technologies basées sur l'ADN

Notions de base sur l'ADN

- ▶ Technologies basées sur l'ADN
 - Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLPs)
 - technologies basées sur la PCR
- ▶ Autres technologies
- ▶ Considérations finales
- ▶ Glossaire

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Isozymes 40

Utilisation des marqueurs moléculaires dans les études de diversité des plantes **module d'enseignement**

Les technologies basées sur l'ADN Notions de base sur l'ADN

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 1

Sommaire

- ▶ La molécule d'ADN
 - Structure et caractéristiques
 - Réplication
 - Condensation dans les chromosomes
 - Organisation de séquence
 - ADN cytoplasmique
- ▶ Technologies de l'ADN
 - Enzymes de restriction
 - Electrophorèse des acides nucléiques
 - Polymorphisme ADN
- ▶ Procédures d'extraction de l'ADN en images

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

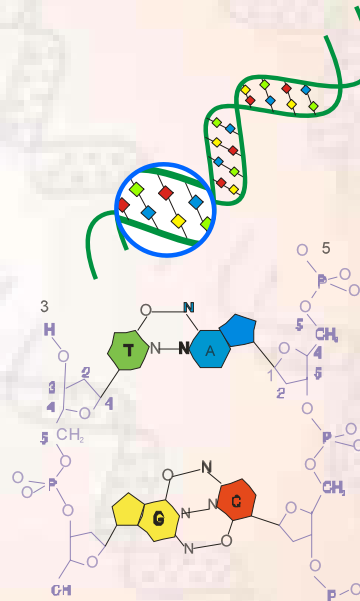
DNA basics 2

La molécule d'ADN: structure et caractéristiques

ADN et ARN sont des molécules faites de suites de nucléotides

Un nucléotide consiste en:

- Un sucre de type pentose
- Un groupement phosphate
- Une base azotée



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 3

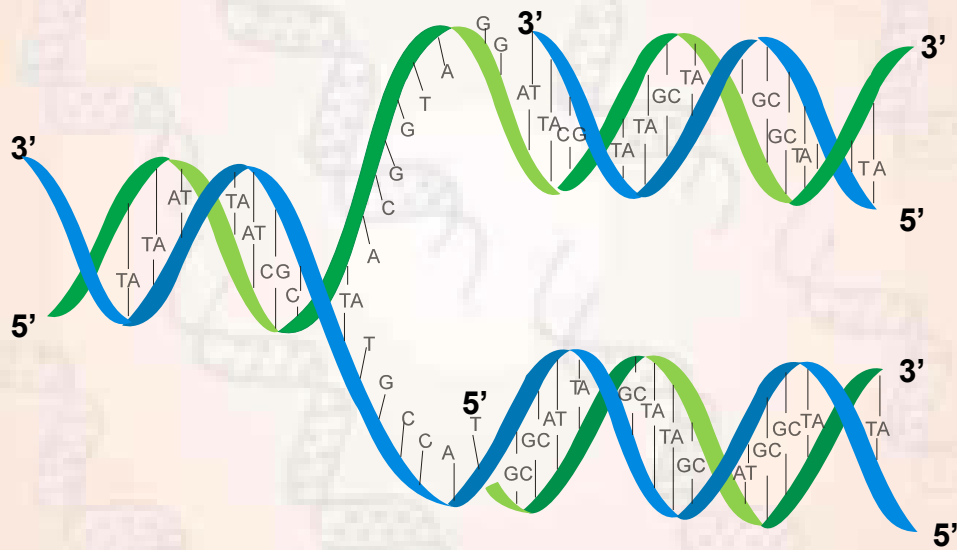
Les éléments de construction de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et de l'acide ribonucléique (ARN) sont des nucléotides. Un nucléotide consiste en:

- Un sucre de type pentose; dans l'ADN, c'est le désoxyribose et, dans l'ARN, le ribose
- Un groupe phosphate
- Une base azotée, qui peut être:
 - Une base purique —adénine (A), guanine (G).
 - Une base pyrimidique —cytosine (C), thymine (T). Dans l'ARN, l'uracile (U) remplace la thymine

La molécule d'ADN est constituée d'une chaîne construite à partir de quatre éléments de construction simples (A, G, C et T) assemblés pour former une double hélice. L'hélice consiste en deux brins, chacun avec un squelette sucre – phosphate, maintenues ensemble par des liaisons hydrogènes faibles entre les bases adénine-thymine (deux liaisons hydrogène) et cytosine-guanine (trois liaisons hydrogène).

Les configurations de A et T, et de C et G sont "complémentaires", raison pour laquelle l'ADN peut se copier lui-même. Les deux chaînes du squelette et les bases, de polarité inverse (antiparallèle) forment la structure en double hélice. L'ordre ou "séquence" de ces bases le long de la chaîne forme le code génétique qui porte les instructions génétiques précises nécessaires au fonctionnement de l'organisme.

La molécule d'ADN : Réplication



D'après Griffiths *et al.* 1996

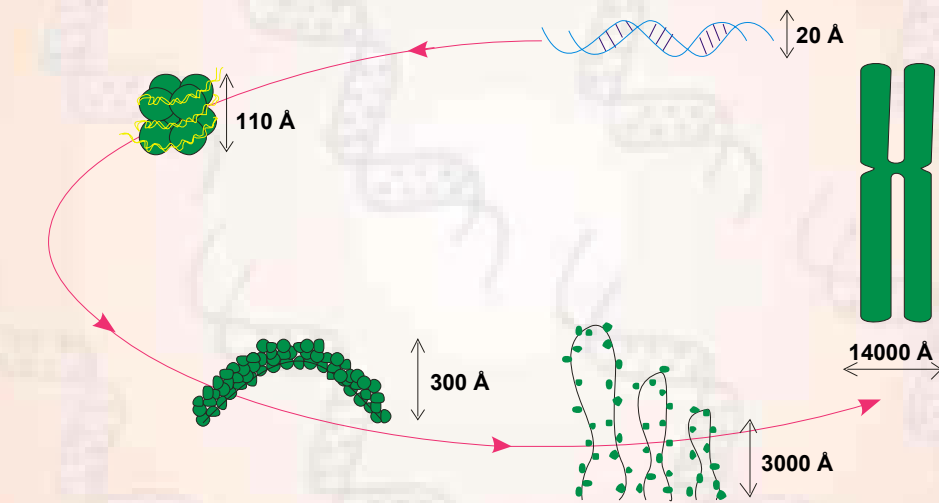
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 4

Sous certaines circonstances (pendant la réplication cellulaire de l'ADN), les deux chaînes de la molécule d'ADN se séparent, L'ARN polymérase synthétise une courte chaîne d'ARN complémentaire de l'un des brins d'ADN à un site particulier, connu comme l'origine de réplication.

Ce petit fragment d'ARN agit comme une amorce pour initier le début de la réplication. De nouvelles bases d'ADN arrivent à l'extrémité 3' et adhèrent à leur paire complémentaire sur la matrice d'ADN. Les nouvelles bases sont ensuite ajoutées par une ADN polymérase pour créer une molécule "fille" d'ADN. Comme les nucléotides sont toujours ajoutés à l'extrémité 3', la synthèse d'ADN se déroule dans la direction 5' vers 3'. Ce processus se produit pour chacune des chaînes d'origine de la molécule d'ADN mère.

La molécule d'ADN : Compactage en un chromosome



Å = angstrom, unité de longueur égale à $1/10^9$ m

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 5

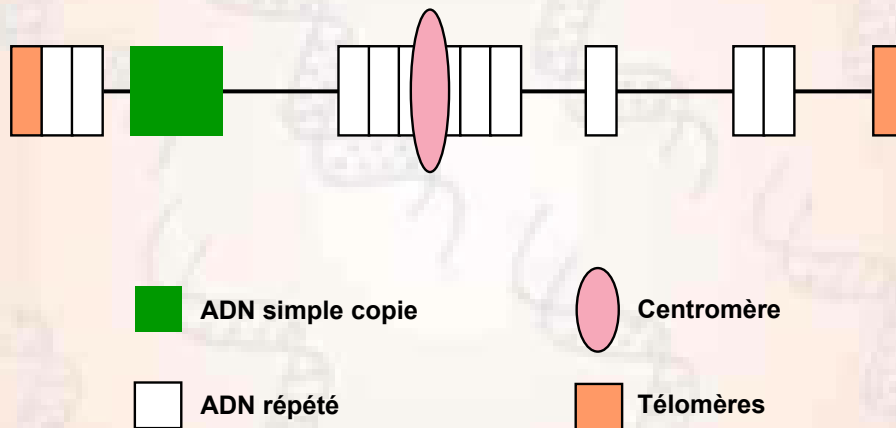
Une molécule d'ADN est bien plus longue qu'un chromosome, ce qui requiert un mécanisme pour replier fortement et emballer la fibre d'ADN.

L'ensemble du matériel constitutif du chromosome est appelé chromatine, somme d'une molécule d'ADN et de quelques protéines. Chez les eucaryotes, l'ADN est condensé avec des protéines histones et non-histones, et un peu d'ARN. Les histones sont organisés en nucléosomes et donnent à l'ADN enroulé une apparence en collier de perles. Un enroulement supplémentaire des nucléosomes donne lieu à une conformation en solénoïde, et un autre niveau d'enroulement conduira à la structure chromosomique.

Les chromosomes sont constitués de régions euchromatiques, faiblement condensées et contenant la plupart des gènes actifs, et de régions hétérochromatiques, fortement condensées et apparemment capables d'inactiver les gènes en les entourant. L'hétérochromatine est fréquemment trouvée autour des centromères.

La définition de l'angstrom est modifiée à partir du site Merriam-Webster (<http://www.m-w.com>)

La molécule d'ADN : organisation de séquence



D'après Flavell and Moore (1996)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 6

Eukaryotic DNA may be grouped in different types or classes:
L'ADN eucaryote peut être groupé en différents types ou classes:

- Single-copy, protein-coding genes
. Simples copies, gènes codant pour des protéines
- DNA present in multiple copies:
. ADN présent en multiples copies
- Sequences with known function
. Séquences avec des fonctions connues
 - Coding
. Codantes
 - Non-coding
. Non-codantes
- Sequences with unknown function
. Séquences avec des fonctions inconnues
 - Repeats (dispersed or in tandem)
. Répétitions (dispersées ou en tandem)
 - Transposons
- Spacer DNA
. ADN espaceur
 - Numerous repeats can be found in spacer DNA. They consist of the same sequence found at many locations, especially at centromeres and telomeres.
De nombreuses répétitions peuvent être trouvées dans l'ADN espaceur. Elles consistent en la même séquence trouvées en de nombreux emplacements, spécialement au niveau des centromères et des télomères. Les répétitions varient en taille, nombre et distribution le long du génome, les rendant ainsi des candidats de choix comme marqueurs moléculaires.

Reference:

Flavell, R.B. and G. Moore. 1996. Plant genome constituents and their organization. *in* Plant Genome Isolation: Principles and Practice (Foster, G.D. and D. Twell, eds.). John Wiley & Sons, Chichester, NY.
Flavell, R.B. and G. Moore. 1996. Plant genome constituents and their organization. *in* Plant Genome Isolation: Principles and practice (Foster, G.D. and D. Twell, eds). John Wiley & Sons, Chichester, NY.

La molécule d'ADN : L'ADN cytoplasmique

- ▶ L'ADN cytoplasmique
 - ADN chloroplastique (ADNcp)
 - ADN mitochondrial (ADNmt)
- ▶ Caractéristiques:
 - Héritabilité maternelle
 - Vitesses d'évolution différentes (ordre des gènes vs. séquence nucléotidique)
 - Accumulation lente de mutations

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 7

De faibles quantités d'ADN sont trouvées dans le cytoplasme en dehors du noyau cellulaire – dans les chloroplastes (ADNcp) et les mitochondries (ADNmt). Chloroplastes et mitochondries ont chacun leur propre “chromosome” unique, avec plusieurs copies. Ces gènes codent également pour leur propre transcription et la traduction des composés d'organites, et jouent un rôle très spécialisé dans l'expression du phénotype de l'organisme dont ils dépendent.

L'ADN des organites est souvent, mais pas toujours, hérité uniquement du parent maternel, processus connu comme l'héritabilité maternelle.

Les séquences de l'ADNcp et l'ADNmt ont leurs propres particularités. L'ADNmt végétal semble évoluer rapidement par rapport à l'ordre des gènes, mais lentement au niveau de la séquence nucléotidique. La raison de l'accumulation lente de mutations n'est pas bien connue, mais elle pourrait être le résultat de la présence de mécanismes de réparation des erreurs de l'ADN très efficaces ou un système de réplication de l'ADN relativement sans erreur. A l'inverse, la vitesse d'évolution de l'ADNcp est généralement lente, à la fois au niveau de la séquence nucléotidique primaire et du réarrangement des gènes.

La technologie de l'ADN

La technologie de l'ADN intègre des concepts sur:

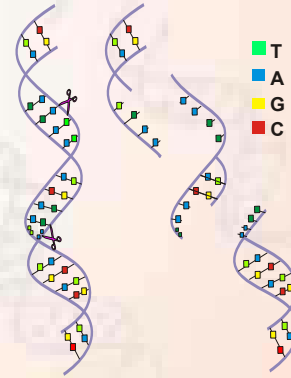
- ▶ Enzymes de restriction
- ▶ Electrophorèse des acides nucléiques
- ▶ Polymorphisme de l'ADN

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 8

Enzymes de restriction

- ▶ Chaque enzyme de restriction coupe l'ADN en fragments de taille définie en agissant au niveau de séquences spécifiques
- ▶ Elles forment des extrémités collantes ou des bouts francs
- ▶ Types d'enzymes de restriction:
 - Types I et III: coupent l'ADN double brin en dehors de la séquence cible
 - Type II: identifient des séquences de 4, 5 ou 6 pb et coupent à l'intérieur de ces séquences



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 9

Les bactéries produisent des enzymes de restriction comme mécanisme de défense contre les bactériophages. Ces enzymes appartiennent à une classe de protéines qui clivent (ou coupent) l'ADN à site interne spécifique et unique sur sa longueur. On les appelle de ce fait des endonucléases. Ces enzymes agissent comme des ciseaux, en coupant l'ADN des phages et les inactivant ainsi.

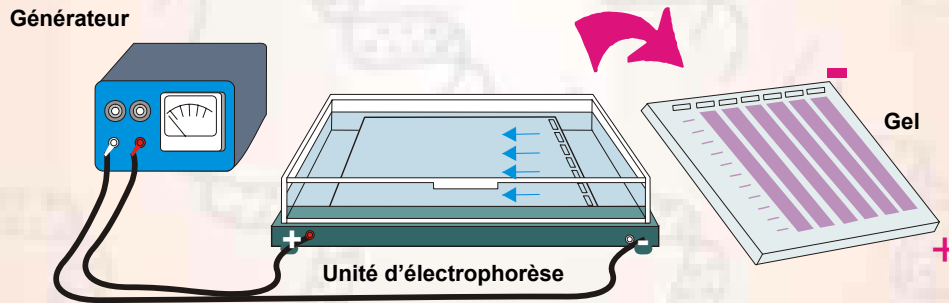
Parmi les trois types d'enzymes de restrictions, les types I et III coupent l'ADN double brin en dehors de la séquence cible. Au contraire les enzymes de restriction de type II identifient des séquences spécifiques de 4, 5 ou 6 paires de bases et coupent à l'intérieur de cette séquence. Du fait de leurs propriétés, les trois types sont devenus des éléments essentiels dans les technologies de l'ADN recombinant.

Les enzymes peuvent couper une séquence donnée d'ADN en laissant des extrémités sortantes (ou collantes) qui permettent de réaliser des liaisons hydrogènes avec des séquences complémentaires, ou des extrémités franches. Si deux fragments d'ADN sont coupés avec la même enzyme, des fragments avec les bouts collants complémentaires vont être produits et des fragments alternatifs peuvent s'y attacher.

Les enzymes de restriction sont disponibles dans le commerce, généralement fournies avec un tampon de réaction approprié et des informations sur les conditions de réaction et températures à utiliser.

Electrophorèse des acides nucléiques

Une méthode pour séparer des fragments d'ADN et permettre leur visualisation et/ou leur identification



D'après Griffiths *et al.* 1996

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 10

Après digestion par une enzyme de restriction, la molécule d'ADN est convertie en une collection de fragments de restriction. Ces fragments peuvent être séparés par leur taille en les faisant migrer dans un gel d'agarose ou d'acrylamide.

Pour obtenir leur séparation, le mélange des fragments d'ADN et des enzymes de restriction restantes est placé dans des puits formés à une extrémité du gel. Le gel est ensuite soumis à un champ électrique, entraînant la migration des fragments d'ADN en fonction de leur taille, les gros fragments migrant plus lentement que les petits. Les molécules d'ADN, chargées négativement à un pH neutre, migrent vers l'anode. Les gels d'agarose (0,8% à 2,0% d'agarose) sont les plus utiles pour séparer des fragments d'ADN compris entre 300 et 10000 pb. Les gels d'acrylamide (3,5% à 20% d'acrylamide) sont plutôt utilisés pour des fragments compris entre 20 et 1000 pb.

La visualisation des fragments d'ADN après l'électrophorèse se fait par coloration au bromure d'éthidium, une molécule qui se positionne au niveau des bases de l'ADN et peut fluorescer avec une couleur orangée sous lumière UV.

La distance de migration est proportionnelle au logarithme du nombre de bases. La taille effective des fragments obtenus peut ainsi être calculée en relation avec la mobilité de fragments d'ADN de taille connue.

Polymorphisme de l'ADN

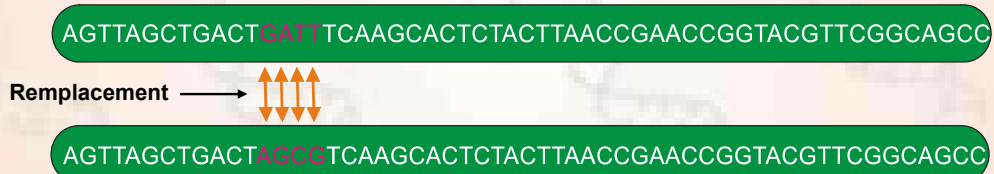
- ▶ Divers événements ont pu produire des variants, plus ou moins complexes, dans la séquence de l'ADN. Ces variants sont généralement décrits comme des polymorphismes
- ▶ Le polymorphisme se traduit par des différences dans le génotype – mises en évidence par des profils de bandes différents quand on les détecte selon une procédure adaptée – et parfois dans le phénotype
- ▶ Plusieurs événements peuvent produire des polymorphismes:
 - Des mutations ponctuelles
 - Des insertions ou délétions
 - Des réarrangements

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 11

Les mutations ponctuelles

Des mutations ponctuelles ont lieu quand une base azotée de la séquence d'ADN est remplacée par une autre. La longueur de la séquence d'ADN ne change pas



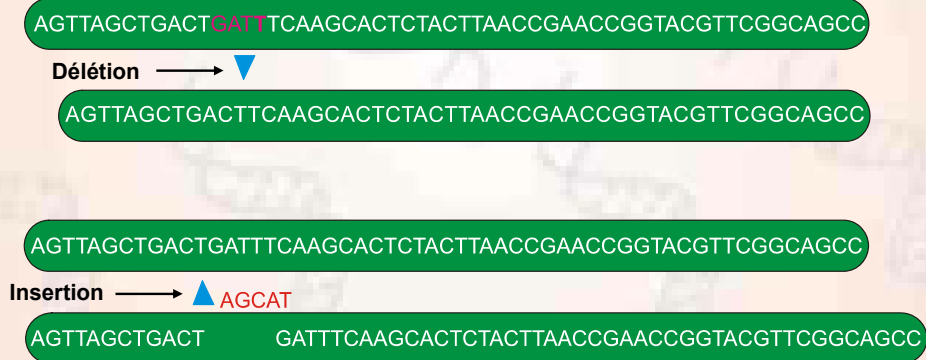
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 12

Des mutations ponctuelles peuvent se produire sur une seule base ou quelques bases dans la même région. Dans le diagramme ci-dessus, quatre bases de la séquence originelle d'ADN (en haut) sont remplacées par quatre bases alternatives. Comme le nombre de bases d'origine ne change pas, la longueur totale de la séquence n'est pas modifiée.

Insertions ou délétions

Les insertions et délétions sont l'addition ou la disparition de plusieurs bases dans la séquence d'ADN. La taille de la molécule change.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

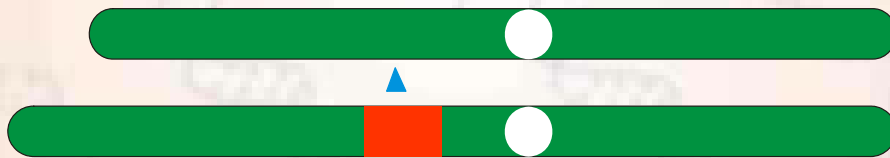
DNA basics 13

La moitié supérieure du diagramme illustre une délétion: certaines bases sont perdues et le fragment d'ADN qui en résulte devient plus court.

La moitié inférieure du diagramme illustre une insertion: certaines bases sont introduites dans une portion de la séquence d'ADN. La séquence d'origine devient ainsi plus grande en fonction du nombre de bases qui sont insérées.

Réarrangements

Des réarrangements chromosomiques ont lieu grâce à la recombinaison génétique ou l'insertion d'éléments transposables. La taille de la molécule peut changer ou ne pas changer



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 14

Des changements dans la séquence d'ADN peuvent aussi se produire par l'intermédiaire de réarrangements, tels que des sauts de fragments d'ADN. Dans ce cas, bien que la longueur de la séquence ne change pas obligatoirement, sa composition peut être suffisamment modifiée pour être observée comme un polymorphisme.

La procédure d'extraction de l'ADN en images

Les photographies suivantes illustrent différentes étapes de la procédure d'extraction de l'ADN

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 15



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 16

Le technicien de laboratoire récolte quelques très jeunes feuilles de tomate pour une micro-extraction d'ADN. Pour une large extraction d'ADN, il faut récolter sur des plantes plus âgées une plus grande quantité de feuilles, plus vieilles (environ 10 g).



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 17

Le tissu foliaire (pour une micro-extraction d'ADN) et le tampon sont homogénéisés dans un tube de micro-centrifugeuse de 1,5 ml, en utilisant une perceuse prolongée d'un pilon en plastique. Pour augmenter l'efficacité du système, deux perceuses peuvent être utilisées simultanément. Elles peuvent être actionnées par une pédale à pied, comme celles utilisées pour les machines à coudre.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 18

Pour les larges extractions d'ADN, le tissu foliaire est homogénéisé avec du tampon d'extraction d'ADN dans des mixers de cuisine classiques. Il est recommandé de porter des gants et une blouse de laboratoire pour protéger vêtements et peau. Ce n'est pas une mesure de protection, mais la procédure peut être un peu sale.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 19

Le mélange de tissu foliaire et de tampon est versé depuis le mixer jusqu'à des tubes de centrifugeuse placés dans la glace, au travers de filtres en tissu. Le filtre en tissu est essoré pour récupérer le plus de liquide possible tout en filtrant les gros morceaux de tissus foliaires qui seront alors éliminés avec le filtre.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 20

Après centrifugation et après avoir resuspendu le culot d'ADN (qui est encore vert et contient encore un peu de tissu foliaire), le mélange est transféré dans un nouveau tube de centrifugation et le chloroforme est ajouté. Cette étape doit être réalisée sous une hotte aspirante, en portant des gants de protection et une blouse.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 21

Après avoir retourné les tubes pour mélanger doucement le chloroforme, les tubes sont centrifugés pour séparer l'ADN.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 22

La phase la plus claire contenant l'ADN est maintenant dans la partie supérieure du tube, et peut être transférée dans un tube propre. La phase inférieure contient le tissu foliaire, les parois cellulaires et autres résidus non désirés, elle peut être éliminée.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 23

On rajoute de l'alcool pour précipiter l'ADN, qui, par inversion douce du tube, se rassemble en une pelote lâche. L'ADN peut alors être enlevé du tube avec un crochet ou après l'avoir fait sédimenter au fond du tube par centrifugation. Il est alors lavé et resuspendu.

En résumé:

- ▶ Les briques de l'ADN sont des nucléotides, assemblés en un double hélice pour former une chaîne d'ADN
- ▶ La molécule d'ADN devient de plus en plus enroulée lorsque la séquence nucléotidique forme un chromosome
- ▶ L'ADN est organisé en différentes classes: simples copies, copies multiples et espaceurs
- ▶ Mitochondries et chloroplastes ont leur propre molécule d'ADN
- ▶ Plusieurs événements donnent lieu à des polymorphismes dans la molécule d'ADN: mutations ponctuelles, insertions, délétions et réarrangements

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 24

A ce stade vous devez savoir:

- ▶ Les composantes d'un nucléotide
- ▶ Comment les nucléotides forment la double hélice
- ▶ Les différentes classes d'ADN
- ▶ Les principales caractéristiques de l'ADN cytoplasmique
- ▶ Ce qu'est une enzyme de restriction
- ▶ Comment sont produits des polymorphismes dans la chaîne d'ADN

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 25

Références de base

- Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin and W.M. Gelbart. 1996. An introduction to genetic analysis (6th edn.). W.H. Freeman and Co., NY.
- Lewin, B. 1994. Genes V. Oxford University Press.
- Schleif, R. 1993. Genetics and molecular biology (2nd edn.). Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Singer, M. and P. Berg. 1991. Genes and genomes. University Science Books, Mill Valley, CA.
- Watson, J.D., N.H. Hopkins, J.W. Roberts, J.A. Steitz and A.M. Weiner. 1987. Molecular biology of the gene (4th edn.), vol. I: General principles. Benjamin/Cummings Publishing, Menlo Park, CA.

Suite:

Les technologies basées sur l'ADN Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLPs)

- ▶ Technologies basées sur l'ADN
 - Technologies basées sur la PCR
- ▶ Technologies complémentaires
- ▶ Considérations finales
- ▶ Glossaire

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003,
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

DNA basics 27

Utilisation des marqueurs moléculaires dans les études de diversité des plantes **module d'enseignement**

Les technologies basées sur l'ADN **Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou RFLP**

(RFLP pour restriction fragment length polymorphism)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 1

Sommaire

- ▶ La technologie RFLP
 - Extraction de l'ADN
 - Digestion par des enzymes de restriction et électrophorèse
 - Transfert de l'ADN selon la méthode Southern
 - Hybridation de l'ADN
 - Équipement
- ▶ La technologie RFLP en images
- ▶ Interprétation des profils RFLP
- ▶ Avantages et inconvénients des RFLPs
- ▶ Applications
 - Maïs
 - Blé
 - Pin sylvestre

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 2

La technologie RFLP

La détection de RFLP repose sur la possibilité de comparer des profils de bandes, générées après digestion d'un ADN cible par des enzymes de restriction. Les étapes expérimentales sont les suivantes:

- ▶ Extraction de l'ADN
- ▶ Digestion par enzyme de restriction et électrophorèse sur gel
- ▶ Transfert d'ADN selon la méthode de Southern
- ▶ Hybridation d'ADN
 - La procédure
 - La sonde ADN
 - Les sources de sondes
- ▶ Équipement

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 3

L'analyse de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP pour Restriction fragment length polymorphism) a été l'une des premières techniques à être largement utilisée pour détecter de la variation au niveau de la séquence d'ADN. Le principe sous-jacent de cette technologie réside dans la possibilité de comparer des profils de bandes, générées après digestion de molécules d'ADN d'individus différents par des enzymes de restriction. Diverses mutations peuvent avoir affecté de façon variable les molécules d'ADN, produisant des fragments de longueurs variables. Ces différences dans les longueurs de fragments peuvent être vues après électrophorèse sur gel, hybridation et visualisation.

Extraction d'ADN

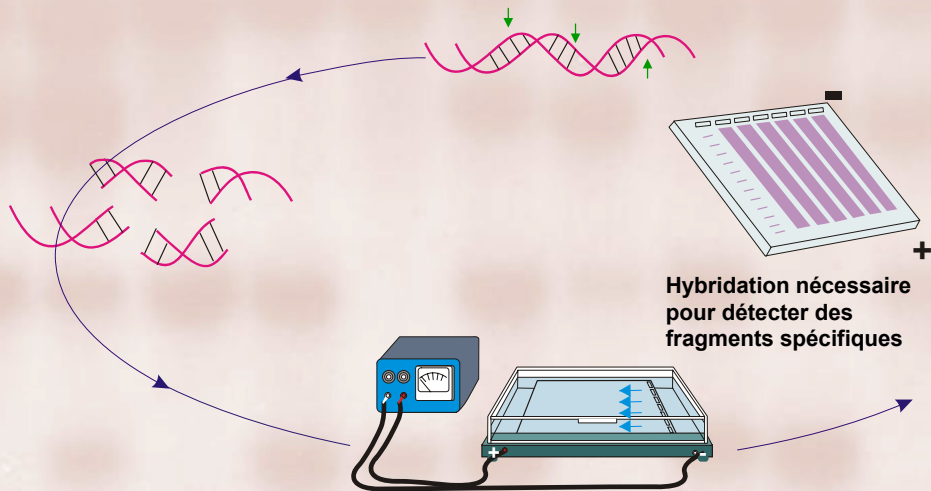
- ▶ L'ADN génomique total est extrait des cellules végétales
- ▶ Alternativement, l'ADN des chloroplastes ou mitochondries peut être utilisé
- ▶ L'ADN doit être propre et de haut poids moléculaire
- ▶ Complications:
 - Cassures pendant l'extraction
 - Dégradation de l'ADN par des nucléases
 - Extraction conjointe de polysaccharides
 - Extraction de métabolites secondaires végétaux

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 4

L'extraction d'ADN est la première étape pour beaucoup de technologies basées sur l'ADN. L'ADN se trouve soit dans les chromosomes nucléaires, soit dans les organites (mitochondries et chloroplastes). Pour extraire l'ADN de son emplacement, plusieurs techniques de laboratoire sont requises pour casser les parois cellulaires et les enveloppes nucléaires, et également séparer de façon adéquate l'ADN des autres composantes de la cellule. Quand on fait cela, il faut prendre soin de ne pas endommager la molécule d'ADN que l'on doit récupérer sous la forme d'un long filament.

Digestion par enzyme de restriction et électrophorèse sur gel



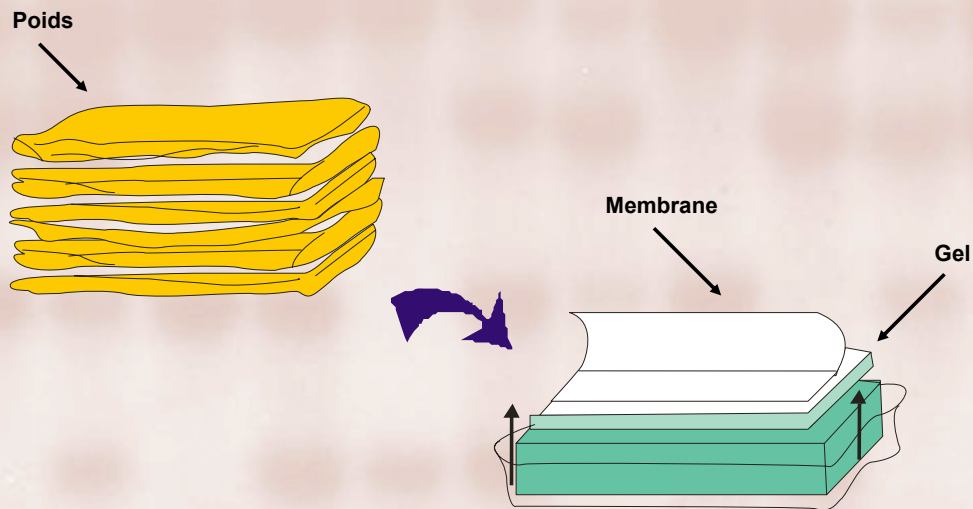
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 5

L'ADN extrait est digéré avec des enzymes de restriction spécifiques, soigneusement choisies. Chaque enzyme de restriction, dans des conditions appropriées, va reconnaître et couper l'ADN de façon prédictible, produisant ainsi un ensemble de fragments d'ADN (les fragments de restriction) de différentes longueurs.

Les millions de fragments de restriction produits sont généralement séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Comme les fragments seraient vus comme une traînée continue par coloration au bromure d'éthidium, la coloration seule ne permet pas de détecter des polymorphismes. L'hybridation doit pour cela être utilisée pour détecter des fragments spécifiques.

Transfert d' ADN par “Southern blotting”



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

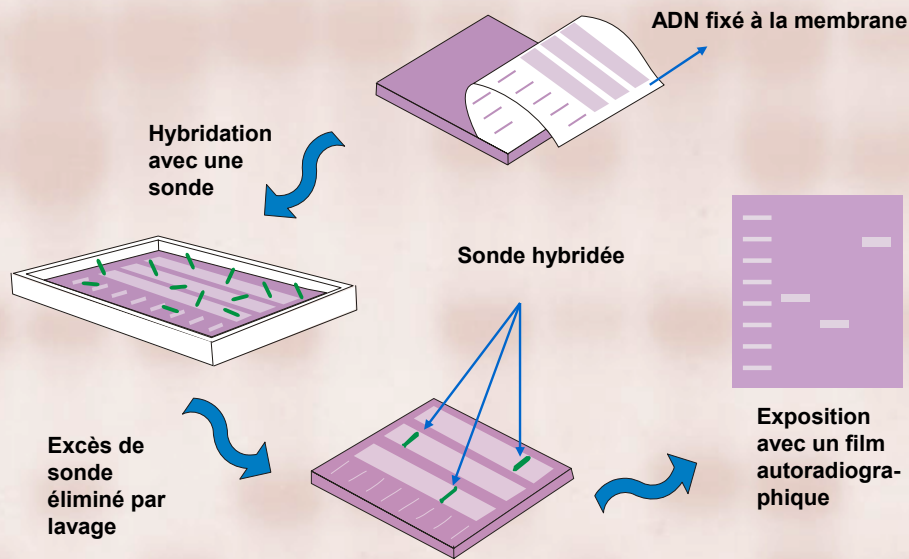
RFLPs 6

Le transfert d'ADN est appelé 'Southern blotting', en référence à E.M. Southern (1975), qui inventa la technique. Dans cette méthode, le gel est tout d'abord dénaturé dans une solution basique et placé dans un bac. Une membrane poreuse de nylon ou de nitrocellulose est étalée sur le gel, et un poids posé sur l'ensemble. Tous les fragments de restriction présents dans le gel se transfèrent sur la membrane sous forme simple brin par capillarité.

Référence

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.

Hybridation d'ADN : La procédure



D'après Griffiths *et al.* 1996

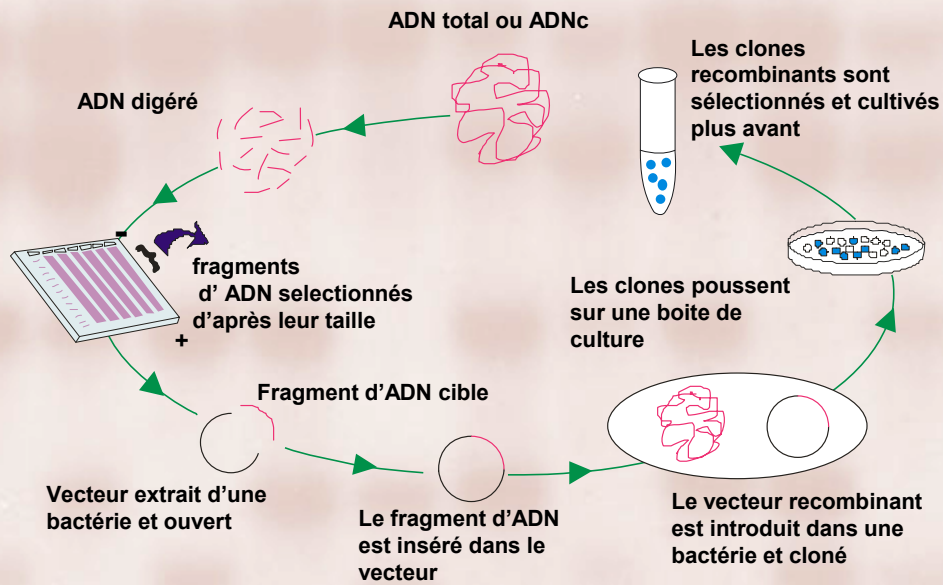
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 7

La membrane avec l'ADN cible est incubée avec la sonde ADN. Les conditions d'hybridation sont telles que si des brins sur la membrane sont complémentaires de ceux de la sonde, l'hybridation se produira et des duplex marqués se formeront. Quand les conditions sont très stringentes, l'hybridation avec des ADN très distants ou non homologues ne se produit pas. Ainsi donc, la sonde ADN accroche des séquences qui sont complémentaires et "idéalement" homologues à elle-même, parmi les milliers ou millions de fragments non détectés qui migrent dans le gel.

Les fragments désirés peuvent être détectés après exposition simultanée de la membrane hybridée et d'un film autoradiographique.

Hybridation d'ADN : La sonde ADN



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 8

Pour détecter un sous-ensemble de fragments d'ADN d'intérêt parmi tous les fragments générés par digestion enzymatique, il faut une sonde. La sonde ADN généralement provient d'une banque d'ADN (génomique ou ADNc), collection de vecteurs (par exemple des plasmides) qui contiennent une représentation d'une molécule d'ADN originale coupée en morceaux. Les vecteurs peuvent être transformés dans des bactéries et peuvent multiplier le morceau d'ADN qu'ils contiennent plusieurs fois.

La sonde ADN est également convertie en une molécule simple brin, convenablement marquée, en utilisant une méthode standard (p.e. un radioisotope ou la digoxigénine), et hybridée avec l'ADN cible, qui est fixé sur la membrane.

Hybridation d'ADN: les sources de sondes (1)

- ▶ ADN nucléaire:
 - Banques génomiques
 - ADNc
- ▶ ADN cytoplasmique
- ▶ La spécificité d'espèce de beaucoup de sondes simple-copie nécessite qu'une banque soit construite quand on étudie une nouvelle espèce. Cependant, des sondes issues de taxons voisins peuvent souvent être utilisées.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 9

Les sources de sondes ADN comprennent:

- *Des banques génomiques* — l'ADN total de la plante est digéré par des enzymes de restriction et les fragments individuels clonés dans un vecteur bactérien ou viral. Les sondes convenables sont sélectionnées à partir de cette banque "anonyme" pour l'analyse RFLP.
- *Des banques d'ADNc (ADN complémentaires)* — L'ARNm est isolé et "transcrit" en ADN, en utilisant l'enzyme transcriptase reverse. L'ADNc ainsi obtenu est cloné dans des vecteurs et utilisé comme une banque de sondes dans l'analyse RFLP.
- *De l'ADN cytoplasmique* — des banques d'ADN mitochondrial et chloroplastique

Du fait de la spécificité d'espèce montrée par beaucoup de sondes simple-copie, des banques génomiques ou d'ADNc doivent souvent être construites pour les études portant sur de nouvelles espèces. Cela peut être très consommateur en temps. Cependant, vu les connaissances actuelles sur des séquences et gènes communs, on peut souvent utiliser des genres proches.

Hybridation d'ADN: les sources de sondes (2)

Séquences répétitives ou de type minisatellite:

- « Motif » de base de 10 à 60 pb en tandem
- Très variables entre êtres humains
- Des polymorphismes dans le nombre d'unités de répétition (VNTR pour « variable number of tandem repeat »)

Chez les plantes, des sondes issues d'une répétition interne du gène de la protéine III du bactériophage M13 ont été utilisées pour révéler des séquences de type minisatellite

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 10

Des séquences répétitives de type minisatellite ont également une application particulière dans l'analyse RFLP. Ce sont des séquences répétées d'un "motif" de base. Ces motifs mesurent de 10 à 60 pb, se trouvent en tandem (c.a.d. à la queue leu leu) et se produisent en de nombreux locus du génome.

Le travail sur les marqueurs minisatellites végétaux résulte d'études pionnières sur le génome humain par Jeffreys *et al.* (1985a, b), montrant que les marqueurs minisatellites étaient très variables chez les hommes. Comme les polymorphismes sont liés au nombre d'unités répétées, les séquences sont aussi appelées VNTR pour "variable number of tandem repeats" (Nakamura *et al.*, 1987). Une sonde soigneusement sélectionnée peut détecter des fragments de restriction qui représentent un grand nombre de locus. Les profils des fragments de restriction portant des minisatellites (encore appelées empreintes génétiques, ou "DNA fingerprint" en anglais) permettent de discriminer clairement différents individus.

References

- Jeffreys, A.J., V. Wilson and S.L. Thein. 1985a. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314:67-73.
- Jeffreys, A.J., V. Wilson and S.L. Thein. 1985b. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 316:76-79.
- Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell, R. Wolff, T. Holm, M. Culver, C. Martin, E. Fujimoto, M. Hoff, E. Kumlin and R. White. 1987. Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235:1616-1622.
- Rogstad, S.H., J.C. Patton, II and B.A. Schaal. 1988. M13 repeat probe detects DNA minisatellite-like sequences in gymnosperms and angiosperms. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 85:9176-9178.
- Ryskov, A.P., A.G. Jincharadze, M.I. Prosnjak, P.L. Ivanov and S.A. Limborska. 1988. M13 phage DNA as a universal marker for DNA fingerprinting of animals, plants and microorganisms. *FEBS Lett.* 233:388-392.

Equipement

► Ressources:

- Eau distillée et/ou désionisée
- Réactifs

► Equipement:

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| • Réfrigérateur et congélateur | • pH mètre |
| • Hotte à flux laminaire | • Balance standard |
| • Centrifugeuse | • unités d'électrophorèse sur gel |
| • Générateurs | • Chambre noire |
| • Plaque chauffante ou micro-onde | • Transilluminateur UV |

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 11

La technologie RFLP en images

Les diapositives suivantes illustrent les procédures de la technique RFLP

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

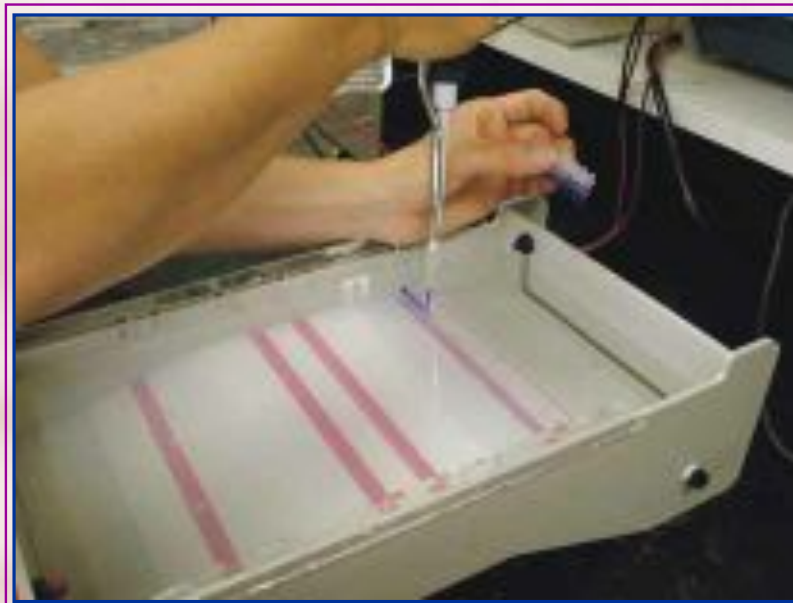
RFLPs 12



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 13

Après avoir coulé la solution d'agarose dans le portoir de gel, on insère immédiatement des peignes, pour former des puits, et on laisse le gel se durcir. Les peignes sont alors enlevés et le gel est placé dans une chambre d'électrophorèse.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 14

Les échantillons d'ADN digéré, additionnés de bleu de Bromophénol, sont chargés dans les puits avec une pipette automatique.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 15

Après l'électrophorèse, le gel est traité avec du NaOH pour rompre les ponts de la double hélice et la rendre simple-brin. Cela permet par la suite l'hybridation avec une sonde simple-brin.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 16

Le bac de transfert est d'abord préparé en saturant les éponges avec du NaOH. Il est indispensable de porter des lunettes de sécurité et une blouse de laboratoire est fortement recommandée. Les règles de sécurité du laboratoire doivent être suivies.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 17

Du papier absorbant est placé au dessus des éponges pour éviter le contact direct avec le gel.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 18

On élimine les bulles entre le papier absorbant et les éponges en roulant une pipette ou une baguette de verre sur la surface du papier. Cela permet le transfert complet de la solution sur la totalité du gel.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 19

Les espaces restant entre les éponges et le bac sont couverts avec des bandes de feuilles plastiques pour éviter l'évaporation, ce qui réduirait l'efficacité du transfert.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 20

Le gel d'agarose traité est placé au dessus du papier absorbant.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 21

On déplace les bulles entre le gel et le papier avec une baguette de verre.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 22

La membrane est coupée à la taille appropriée.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 23

La membrane est placée à la surface du gel, puis couverte avec un feuillet de papier absorbant.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 24

Une couche de papier poreux tel que des serviettes en papier ou du papier journal est placée sur le papier absorbant protégeant la membrane.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 25

L'ensemble du dispositif est surmonté d'une charge (ici, une bouteille d'eau posée sur une plaque de verre) pour favoriser un bon transfert. Le transfert est complet au bout de quelques heures, le papier de transfert est éliminé, et la membrane stockée jusqu'à son utilisation avec la sonde.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 26

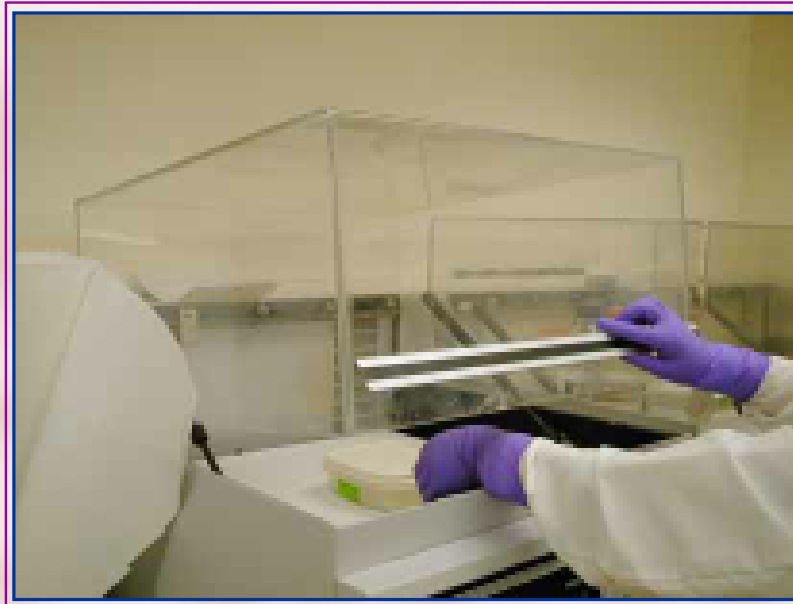
Le processus d'hybridation commence. Un ADN de blocage (qui minimise l'hybridation de fond avec la membrane) est porté à ébullition pour le dénaturer sous forme simple brin.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 27

La membrane est placée dans un récipient plastique avec une solution d'hybridation appropriée et l'ADN de blocage, puis pré-incubée.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 28

La sonde marquée est ajoutée dans le récipient avec la solution d'hybridation et la membrane, et incubée toute la nuit dans un four à hybridation. Le jour suivant, la membrane est sortie du dispositif d'hybridation, et lavée avec une solution de stringence appropriée.

(*Note:* Les institutions peuvent différer pour ce qui concerne les règles de sécurité requises; veuillez vérifier avec votre institution hôte.)



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 29

La membrane est ensuite séchée sur une feuille de papier et placée dans une cassette d'autoradiographie.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 30

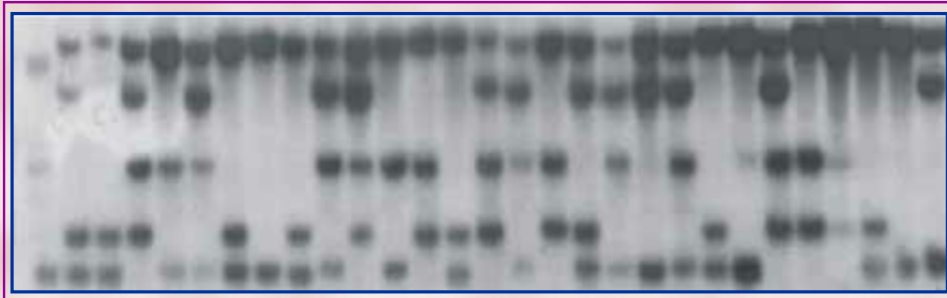
Dans une chambre noire, un film autoradiographique est inséré dans la cassette.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 31

La cassette est enveloppée, ou scellée avec de l'adhésif, et stockée dans un congélateur jusqu'à ce que le film soit suffisamment exposé, généralement de un à quatre jours.

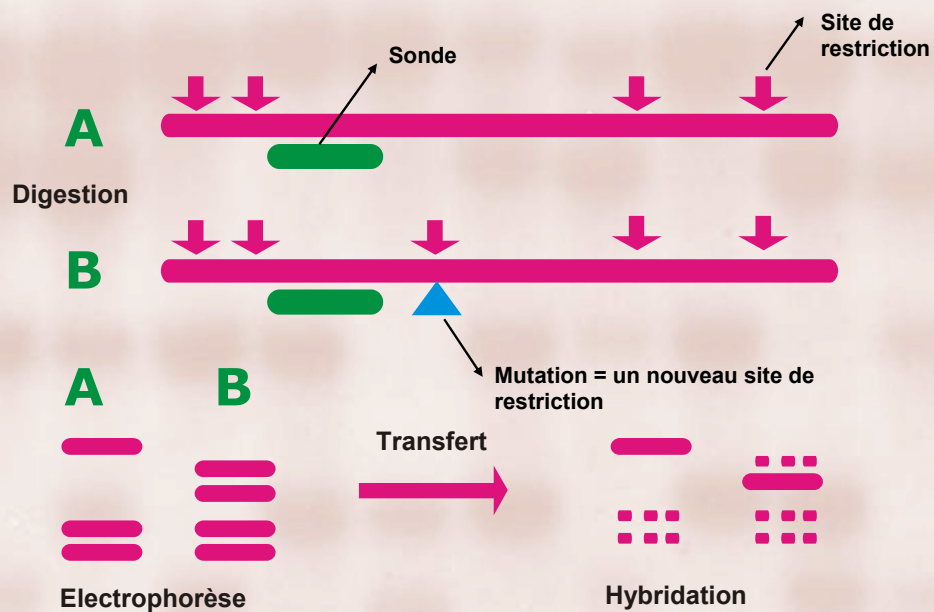


Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 32

Ceci est un autoradiogramme de RFLP.

Le RFLP en images: Résumé

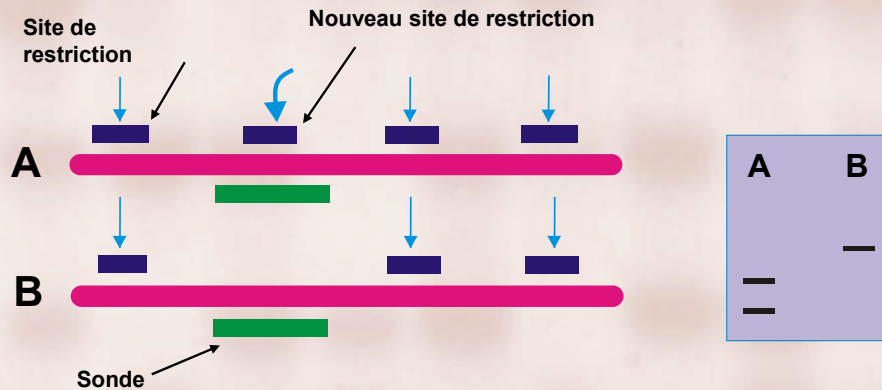


Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 33

Interprétation des profils RFLP (1)

Une mutation crée un nouveau site de restriction dans la région cible. Deux bandes plus courtes sont alors détectées sur le film autoradiographique



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 34

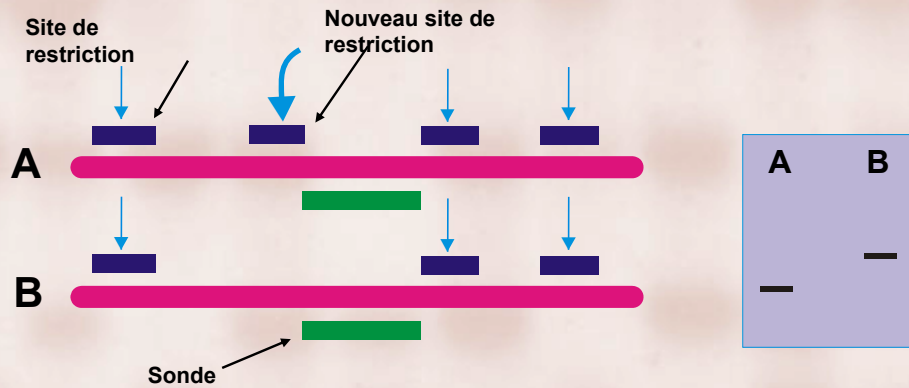
La technologie RFLP, idéalement, produit à partir d'un gel une série de bandes qui vont pouvoir être criblées soit pour la présence ou l'absence de bandes particulières, soit comme des marqueurs codominants. Les différences entre les génotypes sont généralement visualisées comme des profils de fragments de restriction différents.

Cette diapositive et les suivantes présentent les différents événements mutationnels responsables de polymorphismes détectés par l'analyse RFLP.

Dans ce diagramme, une mutation crée un nouveau site de restriction dans le segment A, exactement au niveau du site de reconnaissance de la sonde. En conséquence, la sonde va hybrider simultanément les deux segments créés par l'enzyme. Dans le segment B, où aucune mutation ne s'est produite, un seul segment s'hybride avec la sonde. Pendant l'électrophorèse, les deux segments de A vont migrer plus vite dans le gel que le segment hybridé en B et, de ce fait, le polymorphisme sera observé sur le gel comme montré dans l'encart (à droite).

Interprétation des profils RFLP (2)

Une mutation crée un nouveau site de restriction entre deux sites de restrictions flanquants, produisant ainsi un fragment de restriction plus court.



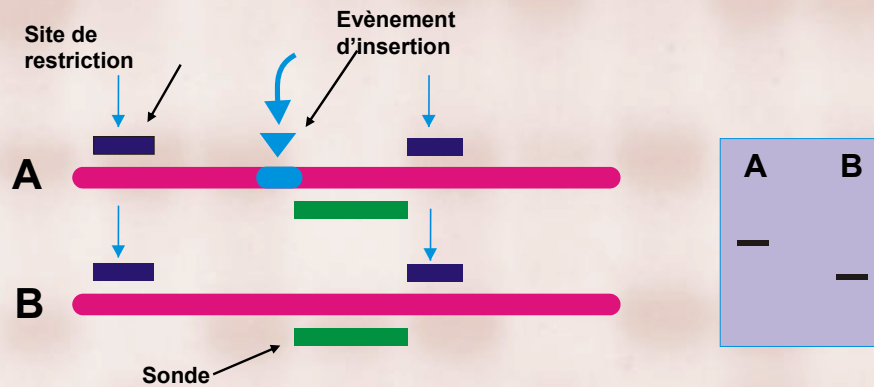
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 35

Dans ce cas, un nouveau site de restriction est encore créé par mutation dans le segment A. Cependant, le nouveau site apparaît sur un côté du site de reconnaissance de la sonde. En conséquence, un seul fragment va s'hybrider dans le segment A et un seul dans le segment B. Le polymorphisme se manifeste par un fragment plus court en A qu'en B. Le fragment le plus court migrera aussi plus vite dans le gel (voir encart).

Interprétation des profils RFLP (3)

Une insertion d'une séquence d'ADN entre deux sites de restrictions flanquants produit un fragment de restriction plus grand



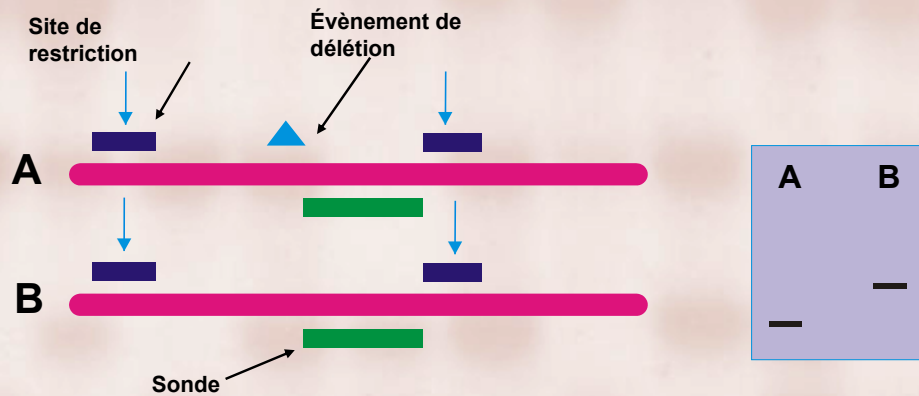
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 36

Si un évènement insertionnel se produit entre deux sites de restriction (segment A), le fragment hybridé sera plus long. De ce fait, on pourra observer un polymorphisme entre les individus A et B: le fait que le fragment hybridé en A sera plus long qu'en B et sa distance de migration plus courte (voir encart).

Interprétation des profils RFLP (4)

Une délétion d'une séquence d'ADN entre deux sites de restrictions flanquants produit un fragment de restriction plus court



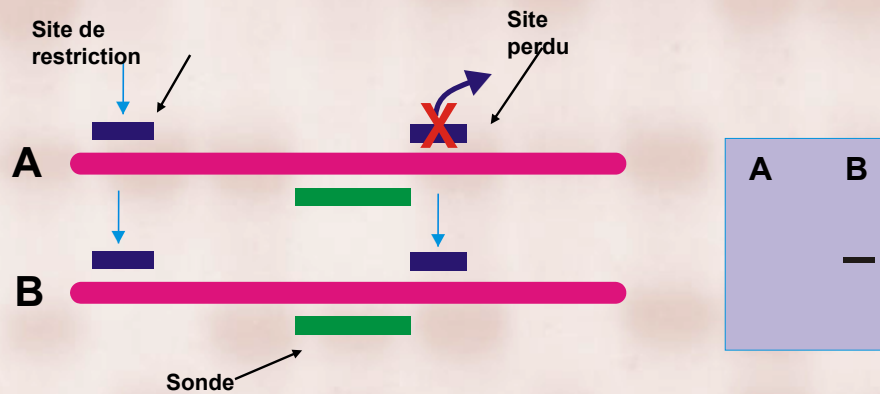
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 37

Si une délétion se produit entre des sites de restriction, la sonde s'hybridera à un fragment plus court. On observera ceci comme un polymorphisme dans le gel avec un fragment qui migre d'avantage dans le gel pour l'individu A (voir encart).

Interprétation des profils RFLP (5)

Un des sites de restriction flanquants est changé ou perdu par mutation ou délétion. En conséquence, le fragment de restriction est modifié



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 38

S'il reste un seul site de restriction, aucun fragment de restriction n'est généré, et l'hybridation ne peut avoir lieu dans cette gamme de taille. Si un nouveau site a été créé par le changement, le nouveau fragment s'hybridera et montrera un profil de bandes différent d'un individu n'ayant pas subi le changement.

Avantages des RFLP

- ▶ Méthodologie très robuste, bien transférable entre laboratoires
- ▶ Hérité de façon codominante et, de ce fait, permet d'estimer l'hétérozygotie
- ▶ Pas d'information de séquence requise
- ▶ Puisque basée sur une homologie de séquence, fortement recommandée pour des analyses phylogénétiques entre espèces apparentées
- ▶ Bien adaptée pour la construction de cartes de liaison génétique
- ▶ Marqueurs spécifiques de locus, ce qui permet des études de synténie
- ▶ Pouvoir discriminant – au niveau de l'espèce ou de la population (sondes simple copie), ou au niveau individuel (sondes multi-copies)
- ▶ Simplicité – à condition d'avoir des sondes adaptées disponibles, la technique peut facilement être appliquée à n'importe quelle plante

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 39

Inconvénients des RFLP

- ▶ Grandes quantités d'ADN nécessaires
- ▶ Automatisation impossible
- ▶ Faible niveau de polymorphisme chez certaines espèces
- ▶ Peu de locus sont détectés par expérimentation
- ▶ Nécessite une banque de sondes appropriée
- ▶ Consommateur en temps, spécialement avec des sondes simple-copie
- ▶ Coûteux
- ▶ Nécessite la distribution de sondes entre des laboratoires en collaboration
- ▶ Technicité demandée modérée
- ▶ Peut nécessiter différentes combinaisons sonde / enzyme

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 40

Applications

- ▶ Diversité génétique
- ▶ Apparentements génétiques
- ▶ Histoire de la domestication
- ▶ Origine et évolution des espèces
- ▶ Dérive génétique et sélection
- ▶ Cartographie du génome et cartographie comparée
- ▶ Étiquetage de gènes
- ▶ Révélation de gènes intéressants dans des espèces sauvages
- ▶ Construction de banques exotiques

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 41

Les références précédées de * sont discutées en détail dans les diapositives suivantes.

- Ahn, S. and S.D. Tanksley. 1993. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 90(17):7980-7984.
- Autrique, E., R.P. Singh, S.D. Tanksley and M.E. Sorrells. 1995. Molecular markers for four leaf rust resistance genes introgressed into wheat from wild relatives. *Genome* 38(1):75-83.
- de Vicente, M.C. and S.D. Tanksley. 1993. QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. *Genetics* 134(2):585-596.
- de Vicente, M.C., M.J. Truco, J. Truco, J. Egea, L. Burgos and P. Arús. 1998. RFLP variability in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Breed.* 117:153-158.
- * Dubreuil, P. and A. Charcosset. 1999. Relationships among maize inbred lines and populations from European and North American origins as estimated using RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 99:473-480.
- * Enjalbert, J., I. Goldringer, S. Paillard and P. Brabant. 1999. Molecular markers to study genetic drift and selection in wheat populations. *J. Expl Bot.* 50(332):283-290.
- Lagercrantz, U. and D.J. Lydiate. 1996. Comparative genome mapping in *Brassica*. *Genetics* 144(4):1903-1910.
- * Sinclair, W.T., J.D. Morman and R.A. Ennos. 1999. The postglacial history of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in western Europe: evidence from mitochondrial DNA variation. *Mol. Ecol.* 8:83-88.
- Sun, C.Q., X.K. Wang, Z.C. Li, A. Yoshimura and N. Iwata. 2001. Comparison of the genetic diversity of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and cultivated rice (*O. sativa* L.) using RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 102:157-162.
- Tanksley, S.D., M.W. Ganai, J.P. Prince, M.C. de Vicente, M.W. Bonierbale, P. Broun, T.M. Fulton, J.J. Giovannoni, S. Grandillo, G.B. Martin, R. Messeguer, J.C. Miller, L. Miller, A.H. Paterson, O. Pineda, M.S. Röder, R.A. Wing, W. Wu and N.D. Young. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132:1141-1160.
- Tanksley, S.D. and S.R. McCouch. 1997. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277:1063-1066.
- Zamir, D. 2001. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Genetics* 2:983-989.

Exemple: Maïs

- ▶ **Titre:**
Relationships among maize inbred lines and populations from European and North American origins as estimated using RFLP markers. Theor. Appl. Genet. 1999. 99:473-480
- ▶ **Objectif:**
Examiner les relations génétiques entre des lignées fixées de groupes hétérotiques connus et des variétés de pays d'une grande importance historique dans le développement du matériel élite
- ▶ **Matériel et méthodes:**
62 lignées fixées de groupes hétérotiques connus et 10 populations de maïs (environ 30 individus par population) sont génotypées à 28 locus RFLP (29 combinaisons sonde / enzyme)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 42

(suite diapositive suivante)

Exemple: Maïs (suite)

Résultats:

La comparaison des allèles spécifiques de chaque type de ressource génétique montre un déficit d'allèles dans les lignées, qui représente environ 22% de la richesse allélique de la population:

- Les associations entre lignées et populations sont consistantes avec les données de pedigree des lignées et donnent de nouvelles informations sur les bases des groupes hétérotiques
- Les lignées dentées européennes se révèlent aussi proches des populations dentées du NE des États Unis étudiées que les populations européennes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 43

(suite diapositive suivante)

Exemple: Maïs (suite)

► **Discussion:**

Les populations représentent des réservoirs de diversité significatifs, et le pool génétique élite ne peut contenir à lui seul les allèles utiles

Question: Comment le groupe hétérotique européen peut-il être plus proche des populations dentées du NE des États-unis 'compton's early' que des autres populations?

► **Conclusions:**

Les résultats suggèrent qu'un ensemble plus large de populations devrait être étudié avec l'aide des marqueurs moléculaires, afin de développer des stratégies appropriées pour l'utilisation efficace de ces ressources génétiques dans les programmes de sélection.

Exemple: Blé

- ▶ **Titre:**
Molecular markers to study genetic drift and selection in wheat populations. J. Exp. Bot. 1999. 50(332): 283-290
- ▶ **Objectif:**
Comparer des fréquences alléliques dans des populations de blé qui ont été soumises à la sélection naturelle
- ▶ **Matériel et méthodes:**
Deux populations initiales et six sous-populations dérivées, cultivées pendant 10 ans dans des sites à environnement contrasté, sont étudiées sur 30 locus

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 45

(suite diapositive suivante)

Exemple: Blé (suite)

► Résultats et discussion:

La différenciation entre sous-populations basée sur la diversité RFLP est hautement significative

- La variation de fréquence allélique identifiée est bien plus grande que celle attendue sous la seule dérive génétique. La sélection influence considérablement l'évolution des populations
- Certains locus révèlent une différenciation plus grande que les autres. Cela pourrait indiquer qu'ils sont liés génétiquement à d'autres locus polymorphes impliqués dans l'adaptation

► Conclusions:

Les variations de fréquences alléliques observées pour les marqueurs RFLP ne peuvent s'expliquer par l'évolution sous la seule dérive génétique, mais par une influence directe ou indirecte des effets de sélection.

Exemple: Pin sylvestre

- ▶ **Titre:**
The postglacial history of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in western Europe: evidence from mitochondrial DNA variation. Mol. Ecol. 1999. 8:83-88
- ▶ **Objectif:**
Explorer la structuration géographique des variants de l'ADN mitochondrial dans des populations de pin sylvestre de l'Europe de l'Ouest.
- ▶ **Matériel et méthodes:**
Vingt populations de pin sylvestre d'Ecosse et 18 d'Europe continentale (en moyenne 21 individus par population) sont étudiées en utilisant des analyses RFLP de l'ADN total.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 47

(suite diapositive suivante))

Exemple: Pin sylvestre (suite)

Trois profils RFLP de l'ADN mitochondrial (mitotypes a, b et d) ont été détectés

- En Espagne, les 3 mitotypes ont été détectés. La diversité génétique est élevée, distribuée principalement 'entre' plutôt que 'dans' les populations. Le mitotype d était présent seulement dans la population située le plus au sud (Sierra Nevada, Espagne)
- Les populations italiennes sont fixées pour le mitotype b. Les populations du nord de la France, de l'Allemagne, de la Russie et le sud de la Suède sont fixées pour le mitotype a. Les populations de Fennoscandie (Norvège, Suède et Finlande) sont fixées pour le mitotype b
- En Écosse, le mitotype a a été fixé largement. Le mitotype b était présent dans quelques populations polymorphes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 48

(suite diapositive suivante)

Exemple: Pin sylvestre (suite)

► Discussion:

- La détection de différents mitotypes constitue une preuve irrévocable de différences génétiques dans le génome mitochondrial. La diversité des mitotypes dans les populations espagnoles indique que ces individus i) soit descendent de pins ayant survécu dans des zones refuge lors de la dernière glaciation ii) soit représentent des reliques tertiaires qui ont survécu dans des populations isolées
- En Europe, après la glaciation, *P. sylvestris* a apparemment commencé à développer trois directions évolutives, chacune avec une origine différente – Espagne, Europe centrale du Nord et Fennoscandie du Nord

► Conclusions:

Les études de marqueurs moléculaires hérités de façon maternelle peuvent fournir un aperçu utile de l'histoire des espèces et aider à définir des régions géographiques présentant un pool de ressources génétiques à conserver.

En résumé:

- ▶ La technologie RFLP détecte des changements de longueur dans des molécules d'ADN cibles après digestion par une enzyme de restriction
- ▶ Les bandes RFLP sont détectées en hybridant l'ADN cible par une sonde ADN
- ▶ Les profils de bandes RFLP reflètent différents événements mutationnels au site d'hybridation de la sonde ou sa région avoisinante
- ▶ Le RFLP est une technique très robuste, mais consommatrice en temps et qui demande un investissement technique

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 50

A ce stade vous devez savoir:

- ▶ Les principales étapes nécessaires pour détecter des RFLPs
- ▶ Les différentes sources de sondes
- ▶ L'effet de différents événements mutationnels dans la détection de profils de bandes RFLP
- ▶ Les avantages et inconvénients de la technologie RFLP pour les analyses de diversité génétique

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 51

Références de base

- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Human Genet.* 32:314-331.
- Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin and W.M. Gelbart. 1996. An introduction to genetic analysis (6th edn.). W.H. Freeman and Co., NY.
- Jeffreys, A.J., V. Wilson and S.L. Thein. 1985a. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314:67-73.
- Jeffreys, A.J., V. Wilson and S.L. Thein. 1985b. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 316:76-79.
- Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell, R. Wolff, T. Holm, M. Culver, C. Martin, E. Fujimoto, M. Hoff, E. Kumlin and R. White. 1987. Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235:1616-1622.
- Rogstad, S.H., J.C. Patton, II and B.A. Schaal. 1988. M13 repeat probe detects DNA minisatellite-like sequences in gymnosperms and angiosperms. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 85:9176-9178.
- Ryskov, A.P., A.G. Jincharadze, M.I. Prosnyak, P.L. Ivanov and S.A. Limborska. 1988. M13 phage DNA as a universal marker for DNA fingerprinting of animals, plants and microorganisms. *FEBS Lett.* 233:388-392.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

Suite

Les technologies basées sur l'ADN

Les technologies basées sur la PCR

Notions de base sur la PCR

- ▶ Technologies basées sur l'ADN
 - Technologies basées sur la PCR
 - PCR avec des amorces aléatoires
 - Amplified fragment length polymorphism (AFLP)
 - Sequences-tagged sites (STS)
 - Les stratégies les plus récentes
- ▶ Technologies complémentaires
- ▶ Considérations finales
- ▶ Glossaire

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

RFLPs 53

**Utilisation des marqueurs
moléculaires dans les études de
diversité des plantes :
Module d'enseignement
Technologies basées sur l'ADN**

**Technologies basées sur la PCR
Notions de base sur la PCR**

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 1

Sommaire

- ▶ L'amplification en chaîne par la polymérase (PCR)
- ▶ Le protocole de la PCR
 - Les étapes
 - Cycle 1
 - Cycle 2
 - Cycle 3
 - Les conditions du processus cyclique
 - Les conditions du mélange réactionnel
 - Les composantes
 - Équipement
- ▶ La technologie PCR en image

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 2

L'amplification en chaîne par la polymérase (PCR pour polymerase chain reaction)

La PCR est un moyen rapide, peu coûteux et simple pour copier des fragments d'ADN spécifiques à partir de quantités minimales d'un matériel ADN source

- Elle ne nécessite pas forcément l'utilisation d'isotopes radioactifs ou de produits chimiques toxiques
- Elle implique de préparer l'échantillon d'ADN et un mélange réactionnel avec des amorces, puis la détection des produits de la réaction

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 3

L'amplification en chaîne par la polymérase, ou en anglais "polymerase chain reaction" (PCR; Erlich, 1989) est une technique puissante qui est rapidement devenue l'une des plus largement utilisées en biologie moléculaire, parce qu'elle est rapide, économique et simple. La technique amplifie des fragments spécifiques d'ADN à partir de quantités infimes de matériel ADN source, même si cet ADN source est de qualité relativement mauvaise.

Référence

Erlich, H.A. 1989. PCR technology: principles and applications for DNA amplifications. Stockton Press, NY.

Les procédures de la PCR: Etapes

- ▶ **Dénaturation:** Les fragments d'ADN sont chauffés à haute température, ce qui réduit la double hélice d'ADN en de simple brins. Ces brins deviennent accessibles aux amorces
- ▶ **Appariement des amorces:** Le mélange réactionnel est refroidi. Les amorces s'apparient à leurs régions complémentaires dans les brins d'ADN source, et des doubles brins sont reformés entre les amorces et les séquences complémentaires
- ▶ **Extension:** L'ADN polymérase synthétise un brin complémentaire. L'enzyme lit la séquence du brin opposé et étend l'amorce en ajoutant des nucléotides dans l'ordre avec lequel ils peuvent s'apparier. Le processus dans son ensemble est répété un grand nombre de fois.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

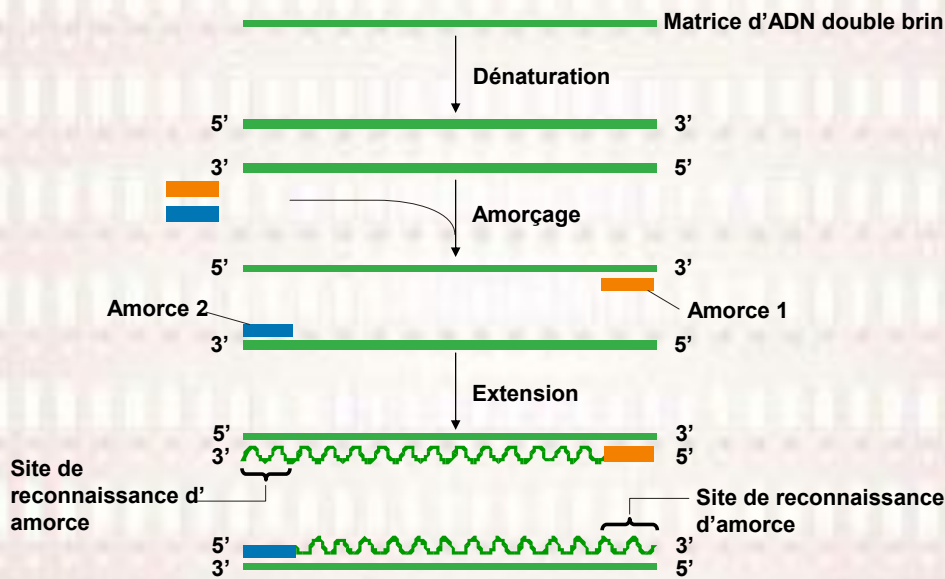
PCR basics 4

L'ADN polymérase, connue comme 'Taq polymerase', tire son nom de la bactérie des eaux chaudes *Thermophilus aquaticus* dont il a été isolé initialement. L'enzyme peut supporter les hautes températures requises pour la séparation des brins d'ADN, et peut être laissée dans le tube de réaction.

Le cycle de chauffage et de refroidissement est répété un grand nombre de fois, stimulant la fixation des amorces sur les séquences originales et les séquences nouvellement synthétisées. Ces cycles de température permettent de copier, puis copier les copies et ainsi de suite, conduisant à une augmentation exponentielle du nombre de copies d'une séquence spécifique. Comme la quantité d'ADN placé dans le tube au début est très faible, pratiquement tout l'ADN obtenu à la fin du cycle correspond à des séquences copiées.

Les produits de réaction sont séparés par électrophorèse sur gel. En fonction de la quantité produite et la taille du fragment amplifié, les produits de réaction peuvent être visualisés directement par coloration au bromure d'éthidium ou nitrate d'argent, ou au moyen de radioisotopes et autoradiographie.

Les procédures de la PCR: Cycle 1



D'après Griffiths *et al.* 1996

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003

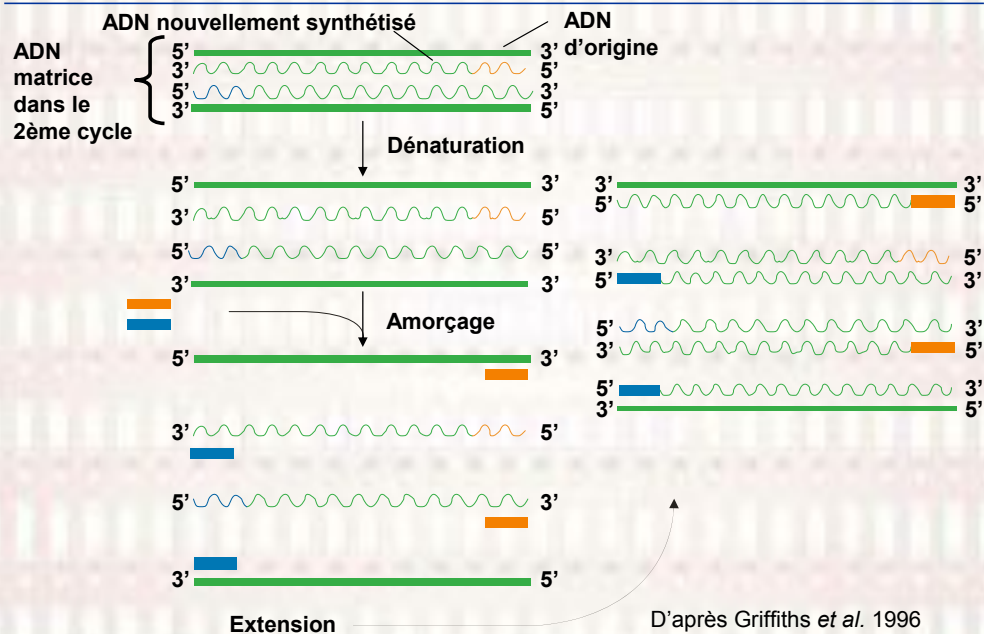
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 5

Les étapes de la PCR sont toutes menées l'une après l'autre, en cycles successifs. Le cycle 1 est comme suit:

- Pendant la dénaturation (environ 1 min à 95°C), les brins d'ADN se séparent pour former des simples brins.
- Pendant l'amorçage (environ 1 min à des températures comprises entre 45°C et 60°C), une amorce se lie à l'un des brins d'ADN et l'autre sur le brin complémentaire. Les sites de reconnaissance des amorces sont choisis pour initier la synthèse d'ADN dans la région d'intérêt pendant l'extension.
- Pendant l'extension (environ 1 min à 72°C), la synthèse d'ADN se produit dans la région cible et sur des distances variables dans la région flanquante, générant ainsi de "longs" fragments de longueurs variables.

Les procédures de la PCR : Cycle 2

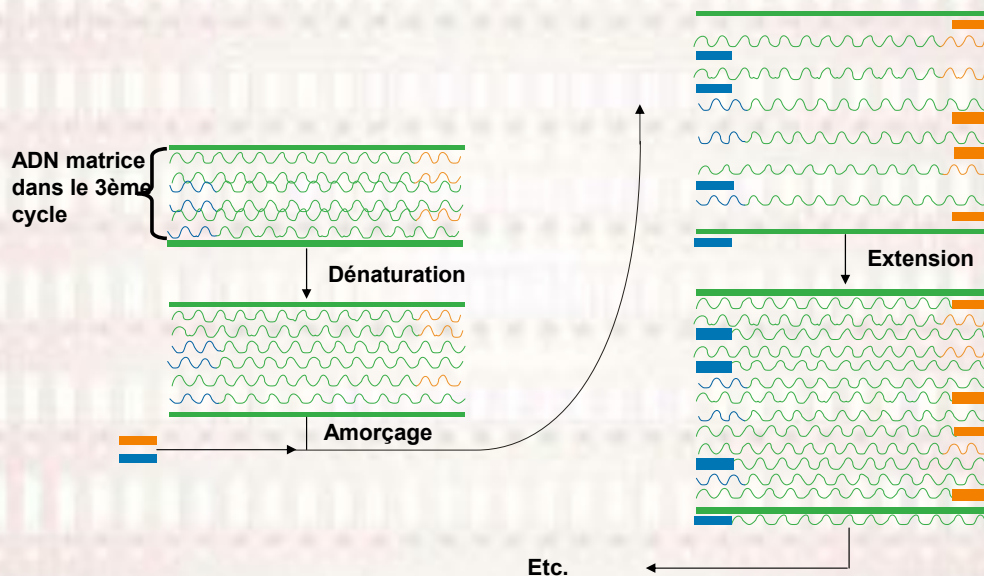


Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 6

Quand le deuxième cycle commence, il y a effectivement deux types de matrices: (1) les brins d'ADN d'origine; et (2) les brins d'ADN nouvellement synthétisés, qui consistent en la région cible et des longueurs variables des régions flanquantes aux extrémités 3'. Quand cette dernière matrice est utilisée dans ce cycle, seule la région cible est répliquée.

Les procédures de la PCR : Cycle 3



D'après Griffiths *et al.* 1996

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003

Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 7

Dans le troisième cycle, la région cible d'ADN nouvellement synthétisée (c.a.d. sans régions flanquantes) se comporte comme une matrice. La molécule originale d'ADN est toujours présente, et le restera jusqu'à la fin de la réaction. Cependant, après quelques cycles, le fragment d'ADN nouvellement synthétisé se comporte rapidement comme la matrice dominante.

Les cycles sont usuellement répétés de 25 à 45 fois.

La standardisation des conditions de fonctionnement du thermocycleur est essentielle pour la reproductibilité des résultats.

Les procédures de la PCR : Conditions de cycles

- ▶ Dénaturation complète de l'ADN matrice
- ▶ Température optimale d'amorçage
- ▶ Température optimale d'extension
- ▶ Nombre de cycles PCR
- ▶ Étape finale d'extension

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 8

Dans l'étape initiale de dénaturation, il est essentiel que la dénaturation de l'ADN amorce soit complète. Une dénaturation incomplète de l'ADN va rendre inefficace l'utilisation de la matrice dans le premier cycle d'amplification, et en conséquence un faible rendement en produit PCR.

La température d'amorçage peut être estimée à 5°C de moins que la température de fusion du duplexe amorce-ADN matrice.

Si des produits PCR non spécifiques sont obtenus en plus du produit attendu, la température d'amorçage peut être optimisée en l'augmentant progressivement de 1-2°C.

Généralement l'étape d'extension est réalisée à 72°C et 1 min d'extension est suffisante pour synthétiser des fragments PCR jusqu'à 2 kb (kb = kilobase = 1000 pb). Quand des fragments d'ADN plus longs sont amplifiés, le temps est généralement augmenté d'1 min pour 1000 pb.

Le nombre de cycles de PCR est fonction à la base du rendement souhaité du produit PCR.

Après le dernier cycle, les échantillons sont généralement incubés à 72°C pendant 5 min pour remplir les extrémités saillantes des produits PCR synthétisés.

Les procédures de la PCR : Conditions du mélange réactionnel

La contamination de l'ADN doit être évitée par

- ▶ Séparation des aires de laboratoire pour l'extraction d'ADN et la PCR
- ▶ Utilisation d'un équipement de laboratoire dédié
- ▶ Autoclavage et aliquotage
- ▶ Ajout d'une réaction témoin

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 9

Quelques trucs utiles:

- L'extraction d'ADN et le mélange de la réaction PCR doivent être réalisés dans des pièces séparées.
- L'utilisation de récipients à usage unique et de pipettes à déplacement positif pour la préparation des échantillons ADN et du mélange réactionnel sont fortement recommandés.
- Toutes les solutions, à l'exception des dNTPs, des amorces et de la Taq polymérase doivent être autoclavées. Quand cela est possible, les solutions doivent être aliquotées en petites quantités et stockées dans des zones dédiées à la PCR.
- Une bonne pratique consiste à ajouter un témoin de réaction sans ADN matrice pour vérifier l'absence de contamination.

Les procédures de la PCR : Composantes

Composantes:

- Eau stérile désionisée
- Tampon PCR 10x
- Mélange de dNTPs
- Amorces
- ADN polymérase Taq
- $MgCl_2$
- ADN matrice

Considérations:

- ADN matrice
- Amorces
- concentration en $MgCl_2$
- Taq polymérase
- dNTPs

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 10

Beaucoup de thermocycleurs sont maintenant disponibles au format 48, 96 ou 384 puits.

Considérations:

ADN matrice. On peut utiliser à peu près toute méthode standard pour la purification de l'ADN matrice. La quantité d'ADN matrice adéquate se situe entre 0,1 et 1 µg d'ADN génomique pour un mélange réactionnel de 100 µl. Des quantités supérieures d'ADN augmentent généralement le rendement de produits PCR non spécifiques.

Amorces. (1) Les amorces PCR doivent avoir une longueur de 10 à 24 nucléotides. (2) le contenu en GC doit être compris entre 40% et 60%. (3) Les amorces ne doivent pas présenter de complémentarité sur elles mêmes ou tout autre amorce dans le mélange réactionnel, pour éviter la formation de dimères d'amorce ou de structures en épingle à cheveu. (4) Les températures de fusion des paires d'amorces ne doivent pas différer de plus de 5°C, le contenu en GC et la longueur doivent être choisis en fonction. (5) Les températures de fusion et d'amorçage d'une amorce sont estimés comme suit: si l'amorce est inférieure à 25 nucléotides, une approximation de la température de fusion est calculée avec la formule: $T_f = 4 (G + C) + 2 (A + T)$. (6) La température d'amorçage doit être inférieure d'environ 5°C à la température de fusion.

Concentration en $MgCl_2$. Les ions Mg^{2+} formant des complexes avec les dNTPs, les amorces et l'ADN matrice, la concentration optimale en Mg^{2+} doit être sélectionnée pour chaque expérimentation. Trop peu d'ions Mg^{2+} conduiraient à un faible rendement de produits PCR, et une trop grande quantité augmenterait le rendement de produits non spécifiques. La concentration recommandée en $MgCl_2$ est de 1 à 3 mM, dans les conditions spécifiées d'une réaction standard.

ADN polymérase Taq. Des concentrations en ADN polymérase Taq supérieures à ce qui est requis peuvent provoquer la synthèse de produits non spécifiques.

dNTPs. La concentration de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) dans le mélange réactionnel est généralement de 200 µM. L'égalité de ces concentrations doit être vérifiée, car des erreurs peuvent augmenter le degré de mauvaise incorporation.

Les procédures de la PCR : Equipement

- ▶ Micropipettes
- ▶ Thermocycleur
- ▶ Unités d'électrophorèse
- ▶ Générateurs
- ▶ Equipement photographique

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 11

La technologie PCR en images

Les photographies suivantes démontrent comment la technologie PCR est réalisée

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 12



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 13

Le mélange PCR est préparé sur la glace. Des vêtements de laboratoire ne sont pas requis, mais conseillés, à moins que de bonnes techniques de stérilité ne soient effectuées.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 14

Les réactions PCR sont chargées dans le thermocycleur.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 15

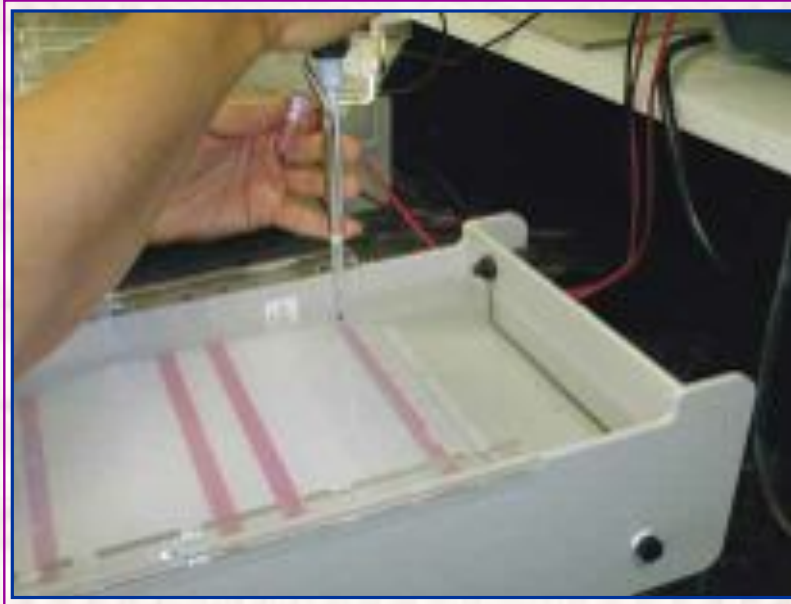
Le thermocycleur est refermé soigneusement et programmé.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 16

Il existe différents types de thermocycleurs: le noir est une tétrade, dans laquelle 4 ensembles de 96 échantillons peuvent être menés simultanément. Les quatre plus petits ont chacun une capacité de 96 puits.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 17

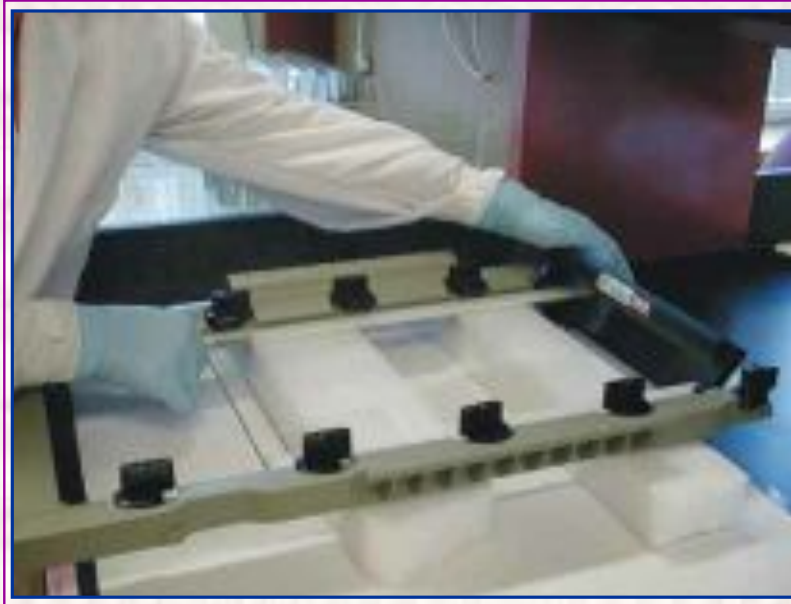
En fonction de la taille des fragments PCR produits et de la résolution nécessaire, la visualisation des bandes peut se faire sur un gel d'agarose classique, horizontal, ou un gel de séquence en acrylamide (voir diapositive suivante). Ici, les produits sont mis à migrer dans un gel d'agarose.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 18

Le gel d'acrylamide peut être soumis à migration dans une unité d'électrophorèse indépendante ou un séquenceur automatique. La préparation du gel de séquence, bien qu'assez compliquée à mettre en place, est similaire dans les deux cas. Ici, la plaque de verre est nettoyée et essuyée avant de préparer le gel pour le séquenceur automatique.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 19

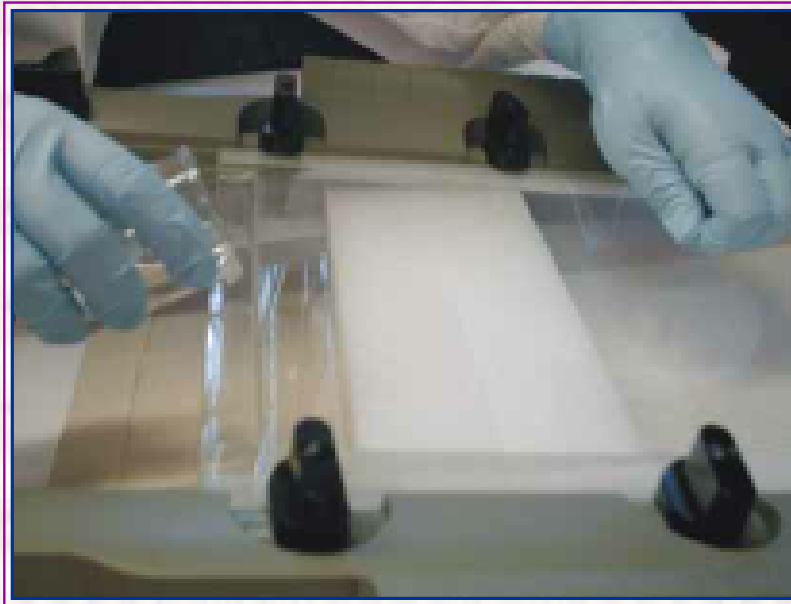
Les plaques de verre sont insérées dans le cadre, qui sera ajusté dans le séquenceur.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 20

Les plaques de verre sont reliées l'une à l'autre par des pinces, et l'ensemble du dispositif prêt pour couler le gel.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 21

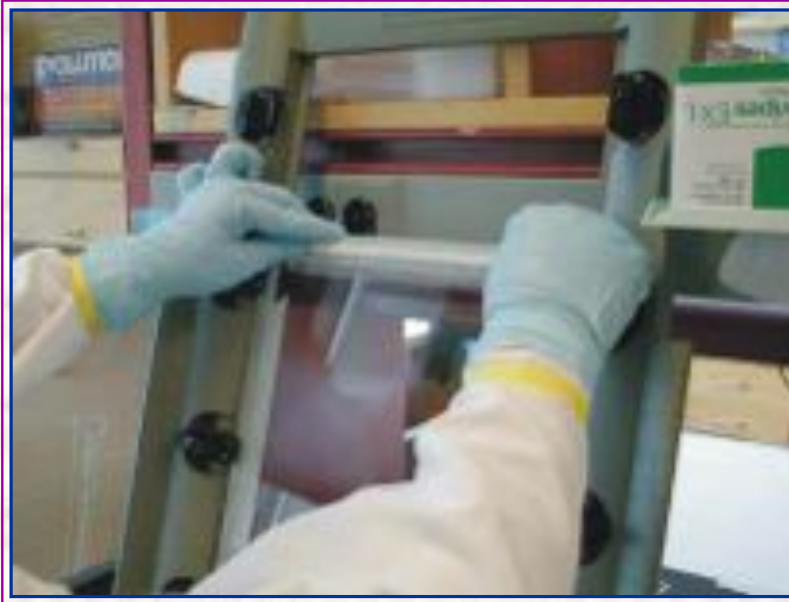
Le gel d'acrylamide liquide est versé dans le moule. L'acrylamide étant carcinogène, des vêtements de protection doivent être portés.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 22

Des pinces retiennent fortement le bas du dispositif pour éviter au gel de fuir.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 23

Un peigne est inséré au sommet du gel pour créer les puits dans lesquels les échantillons vont être déposés.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 24

Une fois le gel prêt, l'unité est placée dans le séquenceur.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 25

Les échantillons sont prélevés avec une multi-pipette...



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 26

et chargés dans les puits du gel.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 27

Voici un agrandissement de la photographie précédente. Notez la faible taille des puits et la pipette, qui permet le chargement d'un grand nombre d'échantillons dans chaque gel.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 28

Une plaque chauffante est placée contre le gel pour assurer une température constante pendant la migration.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 29

Le tampon du gel est versé dans le compartiment supérieur



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 30

et dans le compartiment inférieur.



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 31

Vision finale, la porte est ensuite refermée et le programme lancé.

En résumé:

- ▶ La PCR est une technique simple pour obtenir beaucoup de copies de fragments d'ADN spécifiques
- ▶ Trois étapes sont impliquées dans la PCR: dénaturation, appariement des amorces et extension
- ▶ Pour assurer son succès, il faut mener avec soin la préparation du mélange réactionnel et la définition des conditions du processus cyclique

A ce stade vous devez savoir:

- ▶ Ce qu'est le principe de la PCR
- ▶ Ce qui peut affecter la performance de la PCR, étape par étape, et les effets possibles sur les résultats de la PCR.

Références de base

- Erlich, H.A. 1989. PCR technology: principles and applications for DNA amplifications. Stockton Press, NY.
- Erlich, H.A. and N. Arnheim. 1992. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Ann. Rev. Genet.* 26:479-506.
- Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin and W.M. Gelbart. 1996. An introduction to genetic analysis (6th edn.). W.H. Freeman and Co., NY.
- Newton, C.R. and A. Graham. 1994. PCR, part 1: Basic principles and methods. EngBios Scientific Publishers, Oxford.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

Suite

Les technologies basées sur l'ADN **Les technologies basées sur la PCR** **PCR avec amorces aléatoires**

- ▶ Les technologies basées sur 'ADN
 - Les technologies basées sur la PCR
 - Le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (Amplified fragment length polymorphisms ou AFLPs)
 - L'amplification de séquences ciblées (Sequences-tagged sites ou STS)
 - Les toutes dernières stratégies
- ▶ Technologies complémentaires
- ▶ Considérations finales
- ▶ Glossaire

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR basics 35

**Utilisation des marqueurs
moléculaires dans les études de
diversité des plantes :
Module d'enseignement
Technologies basées sur l'ADN**

**Technologies basées sur la PCR
PCR avec amorces aléatoires
(RAPD, DAF, AP-PCR)**

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 1

Sommaire

- ▶ PCR avec des amorces aléatoires
- ▶ La technologie RAPD, étape par étape
 - Extraction d' ADN
 - réaction PCR
 - détection des produits RAPD
 - Schéma résumé
- ▶ Equipement
- ▶ Interprétation des profils RAPD
- ▶ Avantages et inconvénients des RAPDs
- ▶ Applications
 - Fétuque des prés
 - Poivron
 - Rosier moderne
- ▶ Différences: technologies DAF et AP-PCR

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 2

PCR with arbitrary primers

MAAP (multiple arbitrary amplicon profiling, *profils d'amplifications arbitraires multiples*) est l'acronyme anglais qui recouvre les trois principales technologies qui tombent dans cette catégorie:

- Random amplified polymorphic DNA (RAPD): *ADN polymorphe amplifié au hasard*
- DNA amplification fingerprinting (DAF): *Empreintes génétiques de produits d'amplification*
- Arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR): *PCR avec des amorces aléatoires*

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 3

Trois principales techniques tombent dans la catégorie des marqueurs PCR avec amorces aléatoires: RAPD, DAF and AP-PCR. MAAP est l'acronyme proposé, par Caetano-Anollés *et al.* (1992) pour englober toutes ces techniques voisines, mais il n'est pas couramment utilisé. Dans ce sous-module, nous porterons une attention particulière aux RAPD, et concluerons par une comparaison des RAPD avec les DAF et AP-PCR.

Référence

Caetano-Anollés, G., B.J. Bassam and P.M. Gresshoff. 1992. DNA fingerprinting: MAAPing out a RAPD redefinition? *Bio/Technology* 10 (9):937.

La technologie RAPD, étape par étape

- ▶ Principales caractéristiques
 - Utilise une courte amorce aléatoire (généralement 10 bases)
 - Amplifie des fragments d'ADN anonymes
- ▶ Les étapes de laboratoire sont:
 - L'extraction d'ADN
 - La réaction PCR avec une amorce
 - La séparation des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel
 - La visualisation des fragments d'ADN, par le bromure d'éthidium.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 4

La technique RAPD (random amplified polymorphic DNA, *ADN polymorphe amplifié au hasard*) est une méthode basée sur la PCR qui utilise une petite amorce (généralement 10 bases) pour amplifier des fragments anonymes d'ADN. Avec cette technique, il n'y a pas d'ADN cible spécifique, alors chaque amorce particulière va adhérer à l'ADN matrice au hasard. De ce fait, on ne connaît pas la nature des produits obtenus. Les fragments d'ADN générés sont alors séparés et détectés par électrophorèse sur gel.

Extraction d'ADN

On peut utiliser de l'ADN total, chloroplastique ou mitochondrial

- De faibles quantités d'ADN sont suffisantes
- L'ADN doit être propre et de haut poids moléculaire

Si l'on n'obtient pas une qualité minimale d'ADN, la reproductibilité des résultats risque d'être difficile à assurer.

Réaction PCR

- ▶ Composantes d'une PCR
- ▶ Les amorces (longues de 10 bases) sont proposées par différents distributeurs
- ▶ On ajoute généralement du $MgCl_2$
- ▶ Les cycles d'amorçage sont réalisés à faible température (environ 35°C)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

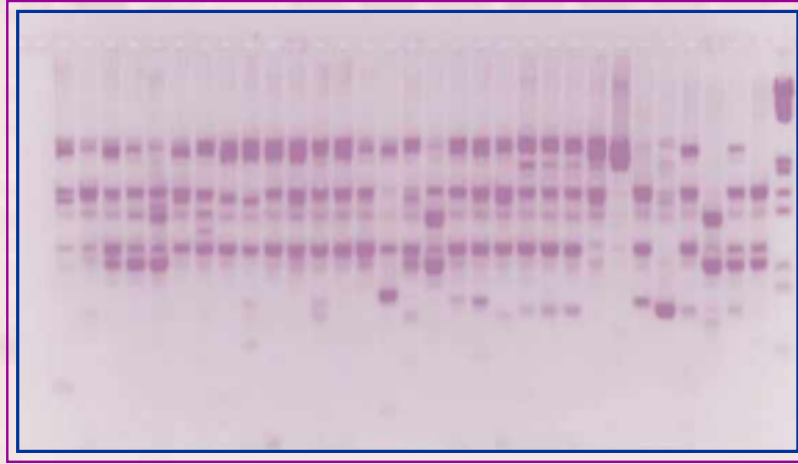
PCR with arbitrary primers 6

Les composantes de la PCR nécessaires ont déjà été discutées dans le sous-module "notions de base sur la PCR". On utilise une seule amorce courte (généralement longue de 10 pb). Les amorces possédant ces caractéristiques sont disponibles dans le commerce sous différentes marques. Une certaine concentration en $MgCl_2$ est souvent utilisée pour promouvoir l'amplification d'un plus grand nombre de bandes au cours de la réaction. Cependant il faut prendre soin de trouver la concentration adéquate dans chaque cas, pour éviter l'apparition de produits non spécifiques.

Les conditions de PCR habituelles comprennent un cycle d'amorçage à faible température (environ 40°C), qui favorise la liaison entre amorces et ADN. Là encore, il faut éviter l'apparition de produits non spécifiques. Cela peut être fait en déterminant la température appropriée à laquelle les bandes parasites n'apparaîtront pas.

Détection des produits RAPD

Electrophorèse sur gel d'agarose ou acrylamide
et visualisation avec le bromure d'éthidium



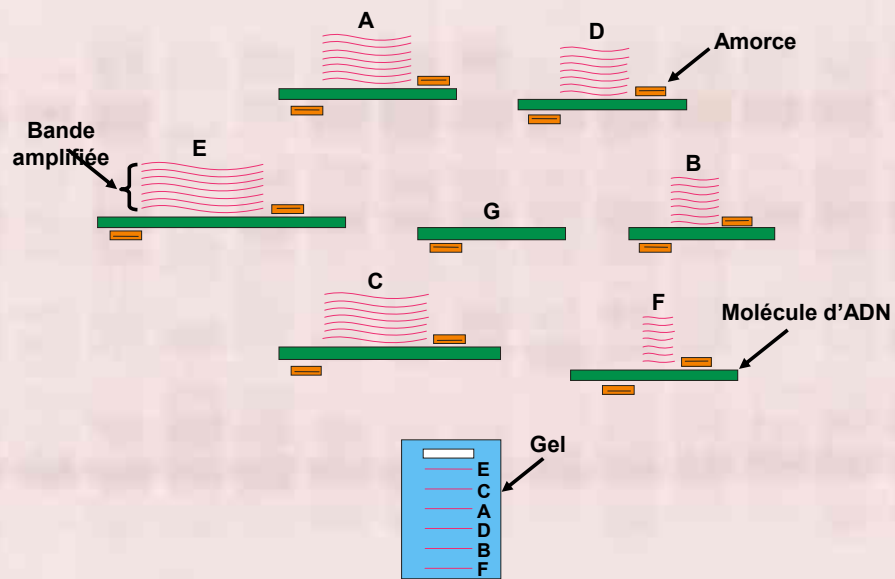
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 7

Les RAPD peuvent être détectés en faisant migrer les produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose ou d'acrylamide. Dans les deux cas, le gel est coloré au bromure d'éthidium.

La différence obtenue en faisant migrer les produits RAPD dans un gel d'acrylamide par rapport à un gel d'agarose réside dans le degré de résolution des bandes. Dans la plupart des cas, une électrophorèse sur gel d'agarose donne une résolution suffisante.

Résumé schématique



D'après Griffiths *et al.* 1996

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 8

Equipement

► Ressources:

- Eau distillée et/ou désionisée
- Réactifs

► Equipement:

- | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| • Réfrigérateur et congélateur | • Plaque chauffante ou microonde |
| • Hotte à flux laminaire | • pH mètre |
| • Centrifugeuse | • Balance standard |
| • Thermocycleur | • Unités d'électrophorèse sur gel |
| • Générateurs | • Transilluminateur UV |

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 9

Interprétation des profils RAPD (1)

Le polymorphisme ADN parmi les individus peut être dû à:

- ▶ Des mésappariements au niveau du site d'amorçage
- ▶ L'apparition d'un nouveau site d'amorçage
- ▶ La longueur de la région amplifiée entre les sites d'amorçage

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 10

Interprétation des profils RAPD (2)

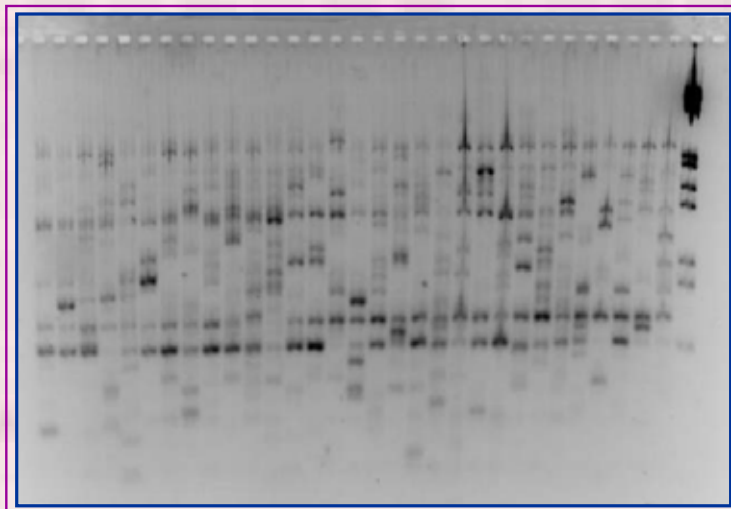
Du fait de la nature des marqueurs RAPD, on peut seulement caractériser la présence ou l'absence d'une bande particulière. Les critères de sélection des bandes interprétables sont les suivants:

- ▶ Reproductibilité—doit être répétable entre expériences
- ▶ Largeur des bandes
- ▶ Taille
- ▶ Ségrégation attendue dans une population de cartographie.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 11

Interprétation des profils RAPD : Exemple d'un mauvais gel RAPD

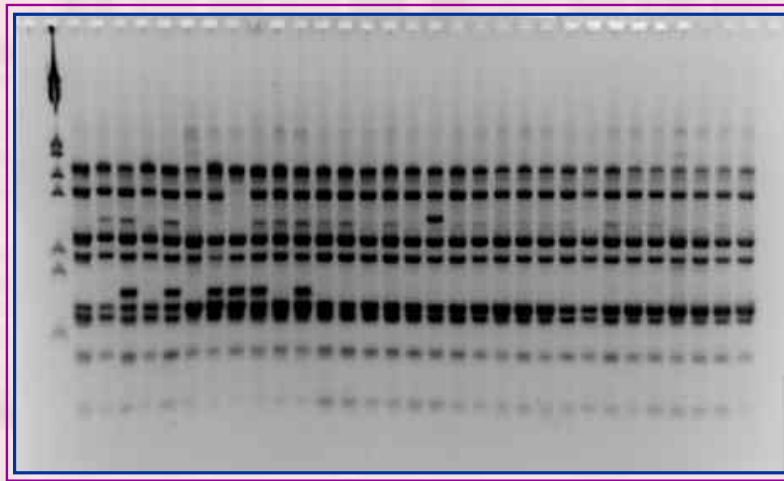


Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 12

Cette figure montre une image d'un gel RAPD de mauvaise qualité. Les bandes sont floues. Celles au sommet du gel présentent une trainée qui démarre du puit où le produit de la PCR a été chargé, et plusieurs bandes s'observent difficilement. Le bruit de fond brumeux permet difficilement de savoir dans certains cas s'il s'agit d'une bande ou deux côte à côte. Certaines bandes sont claires et peuvent être analysées, mais beaucoup d'autres bandes sont douteuses et leur interprétation sera très risquée. De telles difficultés posent le problème de la confiance à accorder aux collections de données.

Interprétation des profils RAPD : Exemple d'un bon gel RAPD



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 13

Cette figure montre l'image d'un gel RAPD de très bonne qualité. La présence ou l'absence de la plupart des bandes est très claire et le fond est transparent. Les chercheurs ne peuvent avoir aucun doute dans la sélection des bandes et la collecte des données de ce gel. En conséquence, l'interprétation des résultats peut être faite en toute confiance.

Avantages des RAPD

- ▶ Grand nombre de fragments
- ▶ Simple
- ▶ Les amorces aléatoires peuvent être achetées facilement, sans nécessiter plus d'information génétique ou génomique
- ▶ Seules de faibles quantités d'ADN sont nécessaires
- ▶ Le coût unitaire par analyse est très faible

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 14

Quelques commentaires:

- Plusieurs fragments différents (correspondant à de multiples locus dispersés dans le génome) sont normalement amplifiés, en utilisant chaque amorce unique. La technique est en cela rapide pour la détection de polymorphismes. Bien que la plupart des amorces produites dans le commerce permettent l'observation de plusieurs fragments, certaines amorces peuvent échouer dans l'amplification de fragments sur certains matériels végétaux.
- La technique est simple. L'analyse RAPD ne requiert pas d'expertise pour manier l'hybridation d'ADN ou d'autres activités très techniques.

Inconvénients des RAPD

- ▶ Dominants
- ▶ Manque d'information *a priori* sur l'identité des produits d'amplification
- ▶ Problèmes de reproductibilité
- ▶ Problèmes de co-migration

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 15

Les marqueurs RAPD sont dominants. L'amplification soit se produit à un certain locus, soit ne se produit pas, conduisant à un marquage des bandes de type présence ou absence. Cela signifie que les homozygotes et les hétérozygotes ne peuvent être distingués. De plus, l'absence d'une bande par manque de séquence cible ne peut pas être distinguée de l'absence se produisant par manque d'amplification lié à d'autres raisons (p.e. La mauvaise qualité de l'ADN), ce qui contribue à des ambiguïtés dans l'interprétation des résultats.

On ne sait rien sur l'identité des produits d'amplification à moins que les études soient adossées à une analyse génétique.

Les problèmes de reproductibilité viennent de ce que la RAPD souffre de sa sensibilité aux changements de qualité de l'ADN, composantes et conditions de la PCR, résultant en des changements des fragments amplifiés. Des résultats reproductibles peuvent être obtenus si l'on prend soin de standardiser les conditions utilisées (Munthali *et al.*, 1992; Lowe *et al.*, 1996).

Les problèmes de co-migration posent des questions telles que: "Des bandes de même tailles correspondent-elles au même fragment d'ADN?"

- La présence d'une bande de même poids moléculaire chez des individus différents n'est pas une preuve en soi que les individus partagent le même fragment d'ADN (homologue).
- Une bande détectée sur un gel comme unique peut comprendre différents produits d'amplification: le type de gel d'électrophorèse utilisé, s'il est capable de séparer l'ADN quantitativement (c.a.d. par sa taille), ne peut séparer des fragments de même taille qualitativement (c.a.d. selon leur séquence nucléotidique).

References

- Lowe, A.J., O. Hanotte and L. Guarino. 1996. Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germplasm collections: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genet. Resour. Newsl.* 107:50-54.
- Munthali, M., B.V. Ford-Lloyd and H.J. Newbury. 1992. The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. *PCR Methods Appl.* 1(4):274-276.

Applications

- ▶ Diversité génétique
- ▶ Caractérisation de ressources génétiques
- ▶ Structure génétique des populations
- ▶ Domestication
- ▶ Détection de variation somaclonale
- ▶ Identification de cultivars
- ▶ Pureté hybride
- ▶ Cartographie des génomes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 16

Les références précédées de * sont expliquées en détail dans les diapositives suivantes

- Cattan-Toupance, I., Y. Michalakakis and C. Neema. 1998. Genetic structure of wild bean populations in their South Andean centre of origin. *Theor. Appl. Genet.* 96:844-851.
- Cristofani, M., M.A. Machado and D. Grattapaglia. 1999. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. Ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus resistance gene. *Euphytica* 109(1):25-32.
- Hashmi, G., R. Huettel, R. Meyer, L. Krusberg and F. Hammerschlag. 1997. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Rep* 16(9): 624-627.
- * Kölliker, R., F.J. Stadelmann, B. Breidy and J. Nösberger. 1998. Fertilization and defoliation frequency affect genetic diversity of *Festuca pratensis* Huds. in permanent grasslands. *Mol. Ecol.* 7:1557-1567.
- Martelli, G., F. Sunseri, I. Greco, M.R. Sabina, P. Porreca and A. Levi. 1999. Strawberry cultivars genetic relationship using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Adv. Hortic. Sci.* 13(3):99-104.
- * Martin, M., F. Piola, D. Chessel, M. Jay and P. Heizmann. 2001. The domestication process of the Modern Rose: genetic structure and allelic composition of the rose complex. *Theor. Appl. Genet.* 102:398-404.
- Morden, C.W. and W. Loeffler. 1999. Fragmentation and genetic differentiation among subpopulations of the endangered Hawaiian mint *Haplostachys haplostachya* (Lamiaceae). *Mol. Ecol.* 8:617-625.
- Nebauer, S.G., L. del Castillo-Agudo and J. Segura. 1999. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow-leaved foxglove (*Digitalis obscura* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98:985-994.
- * Rodríguez, J.M., T. Berke, L. Engle and J. Nienhuis. 1999. Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 99:147-156.
- Rom, M., M. Bar, A. Rom, M. Pilowsky and D. Gidoni. 1995. Purity control of F₁-hybrid tomato cultivars by RAPD markers. *Plant Breed.* 114(2):188-190.

Exemple: Fétuque des prés

► Titre:

Fertilization and defoliation frequency affect genetic diversity of *Festuca pratensis* Huds. in permanent grasslands. Mol. Ecol. 1998. 7:1557-1567

► Objectif:

Évaluer la variabilité génétique de la fétuque des prés, et déterminer si la fréquence de fertilisation et de défoliation influence la variabilité génétique dans des populations naturelles.

► Matériel et méthodes:

- Six populations naturelles et 3 cultivars de *Festuca pratensis* ont été étudiés, en utilisant 69 marqueurs RAPD (13 primers) et 7 caractères agronomiques
- Des échantillons de populations naturelles ont été pris dans deux expériences à long terme, où les traitements avaient été appliqués de 11 à 38 ans.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 17

(suite sur la diapositive suivante)

Exemple: Fétuque des prés (suite)

Résultats:

- L'analyse factorielle des caractères agronomiques ne permet pas de séparer les cultivars des autres populations
- L'analyse de groupement des données de RAPD a permis une distinction claire entre les cultivars et les populations naturelles
- La variabilité génétique au sein des cultivars était plus faible que celle observée dans les populations naturelles
- L'analyse de variance moléculaire (AMOVA) a montré un effet significatif de l'effet traitement sur la variation génétique

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 18

(suite sur la diapositive suivante)

Exemple: Fétuque des prés (suite)

► Discussion:

Une variation génétique significative existe entre les cultivars et les populations naturelles de *Festuca pratensis*. Cependant la fertilisation et une fréquence élevée de coupe peut la réduire.

► Conclusions:

Des populations non fertilisées et non coupées de fétuque des prés doivent être conservées comme pool génétique. Des études plus poussées sur d'autres espèces sont requises pour mieux comprendre comment les systèmes de gestion influencent la diversité des communautés végétales et l'architecture génétique des espèces.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 19

Exemple: Poivron

- ▶ Titre:
Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 1999. 99:147-156
- ▶ Objectif:
Caractériser le patrimoine naturel des espèces de *Capsicum*
- ▶ Matériel et méthodes:
Un total de 134 accessions de six espèces de *Capsicum*, maintenues dans la banque de gènes de l'Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC) ont été caractérisés avec 110 marqueurs RAPD (25 amorces)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 20

(suite sur la diapositive suivante)

Exemple: Poivron (suite)

Résultats et discussion:

- Dix paires d'accessions potentiellement dupliquées ont été documentées
- Des RAPD diagnostics ont été identifiés et employés pour améliorer l'identification taxonomique. Ils peuvent aussi être utilisés pour contrôler l'hybridation naturelle et artificielle.
- Trois accessions de *Capsicum*, mal classées d'après des caractères morphologiques, ont été ré-identifiées par des RAPD diagnostics.
- Trois accessions, précédemment non classées, ont été assignées à une espèce sur la base des RAPD diagnostics
- Les accessions de *Capsicum annuum* de la banque de gènes ne diffèrent pas des lignées dans les programmes d'amélioration, pour ce qui concerne la variation des RAPD ou la diversité.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 21

(suite sur la diapositive suivante)

Exemple: Poivron (suite)

Conclusions:

Le programme d'amélioration du poivron de l'AVRDC semble fonctionner avec une diversité représentative de sa collection de poivron dans la banque de gènes. Les marqueurs moléculaires peuvent être utiles pour rationaliser la gestion d'une collection *ex situ* (c.a.d. identifier des duplications ou des erreurs taxonomiques)

Exemple: Rose moderne

- ▶ **Titre:**
The domestication process of the Modern Rose: genetic structure and allelic composition of the rose complex. Theor. Appl. Genet. 2001. 102:398-404
- ▶ **Objectifs:**
Evaluer la variabilité génétique parmi des variétés de roses cultivées et enquêter sur l'historique de l'amélioration des rosiers.
- ▶ **Matériel et méthodes:**
Parmi 13 groupes horticulturaux, 100 variétés anciennes de roses cultivées ont été sélectionnées pour leur apport dans les étapes successives de domestication. Elles ont été étudiées avec la technique AP-PCR, en utilisant cinq longues amorces (20 nucléotides)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 23

(suite sur la diapositive suivante)

Exemple: Rose moderne (suite)

Résultats et discussion:

- Cinquante huit fragments d'ADN polymorphes ont été produits, 55 étant informatifs et discriminants, permettant la différenciation entre pratiquement tous les 100 cultivars
- Un dendrogramme a montré des relations entre les variétés fondatrices chinoises et européennes, des groupes hybrides de première et deuxième génération, et les hybrides de thé produites pendant la domestication
- L'analyse en composantes principales a montré l'incidence d'un gradient continu du ratio d'allèles européens/chinois, et une réduction considérable de la variabilité génétique tout au long de la domestication.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 24

(suite sur la diapositive suivante)

Exemple: Rose moderne (suite)

Conclusions:

L'effet de la sélection sur un ensemble limité de caractères morphologiques résulte en la rétention d'un faible nombre d'allèles pendant la domestication de la rose. La rose possède bien plus de variation génétique que celle utilisée jusqu'à présent. Il serait possible de sélectionner pour des variants différents, afin de générer des variétés avec des caractères esthétiques intéressants.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 25

Différences: technologies DAF et RAPD

Pour la technique DAF (*empreintes génétiques de produits d'amplification*):

- ▶ Les concentrations en amorces sont supérieures
- ▶ On utilise des amorces plus courtes (5 à 8 nucléotides)
- ▶ cycle de deux températures par rapport au cycle en 3 températures utilisé pour les RAPD
- ▶ Profils de bandes extrêmement complexes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 26

Références

Caetano-Anollés, G., B.J. Bassam and P.M. Gresshoff. 1991a. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9(4):294-307.

Caetano-Anollés, G., B.J. Bassam and P.M. Gresshoff. 1991b. DNA amplification using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology* 9:553-557.

Différences: technologies AP- PCR et RAPD

Pour l'AP-PCR (*PCR avec des amorces arbitraires*):

- ▶ L'amplification se fait en trois parties, chacune avec ses propres conditions de stringence et concentrations en constituants
- ▶ Des concentrations plus élevées en amorces sont utilisées dans les premiers cycles de PCR
- ▶ Des amorces de taille variable, souvent dessinées pour d'autres objectifs, sont choisies arbitrairement (p.e. L'amorce universelle de séquençage M13)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 27

Référence

Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18(24):7213-7218.

En résumé:

- ▶ La technologie RAPD est basée sur une simple PCR avec une amorce courte aléatoire
- ▶ La RAPD produit facilement un nombre significatif de bandes, mais les marqueurs sont dominants et les problèmes de reproductibilité sont fréquents
- ▶ DAF and AP-PCR sont des technologies alternatives des RAPD, bien plus complexes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 28

A ce stade vous devez savoir:

- ▶ Les principales caractéristiques de la procédure RAPD
- ▶ Les causes des polymorphismes dans la molécule d'ADN qui peuvent être détectés avec les RAPD
- ▶ Les critères de sélection des bandes RAPD pour les analyses de diversité génétique
- ▶ Les avantages et inconvénients de la technologie RAPD
- ▶ Les différences principales entre DAF, AP-PCR et la technologie RAPD

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 29

Références de base

- Caetano-Anollés, G., B.J. Bassam and P.M. Gresshoff. 1991a. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9(4):294-307.
- Caetano-Anollés, G., B.J. Bassam and P.M. Gresshoff. 1991b. DNA amplification using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology* 9:553-557.
- Caetano-Anollés, G., B.J. Bassam and P.M. Gresshoff. 1992. DNA fingerprinting: MAAPing out a RAPD redefinition? *Bio/Technology* 10(9):937.
- Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin and W.M. Gelbart. 1996. An introduction to genetic analysis (6th edn.). W.H. Freeman and Co., NY.
- Lowe, A.J., O. Hanotte and L. Guarino. 1996. Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germplasm collections: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genet. Resour. Newsl.* 107:50-54.
- Munthali, M., B.V. Ford-Lloyd and H.J. Newbury. 1992. The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. *PCR Methods Appl.* 1(4):274-276.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18(24):7213-7218.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18(22):6531-6535.

Suite

Les technologies basées sur l'ADN **Les technologies basées sur la PCR** **Polymorphisme des fragments d'amplification**

- ▶ Les technologies basées sur 'ADN
 - Les technologies basées sur la PCR
 - L'amplification de séquences ciblées (Sequences-tagged sites ou STS)
 - Les stratégies les plus récentes
- ▶ Technologies complémentaires
- ▶ Considérations finales
- ▶ Glossaire

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

PCR with arbitrary primers 31

**Utilisation des marqueurs
moléculaires dans les études de
diversité des plantes :
Module d'enseignement
Technologies basées sur l'ADN**

**Technologies basées sur la PCR
Polymorphisme de longueur des fragments
amplifiés (AFLP)**

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 1

Sommaire

- ▶ La technologie AFLP, étape par étape
 - Quatre étapes
 - Digestion d'ADN et ligation
 - PCR et détection
 - Résumé de la technologie
- ▶ Equipement
- ▶ Interprétation des bandes AFLP
- ▶ Avantages and inconvénients des AFLPs
- ▶ Applications
 - *Limonium* sp.
 - *Stylosanthes* spp.
 - Moutarde brune

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 2

La technologie AFLP*, étape par étape

Principales caractéristiques:

- ▶ Une combinaison des technologies RFLP et PCR
- ▶ Basée sur l'amplification sélective par PCR de fragments de restriction d'un ADN digéré
- ▶ Méthode extrêmement sensible pour réaliser une empreinte génétique sur un ADN de n'importe quelle origine et complexité.
- ▶ Peut être réalisée avec de l'ADN génomique total ou des ADNc ('transcript profiling')

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 3

*La technique AFLP a été développée par KeyGene (Hollande), une compagnie privée de biotechnologies qui a posé des droits de propriété sur la technologie. Pour plus d'informations, voir le site internet de Keygene; <http://www.keygene.com>

Reference

Zabeau, M. and P. Vos. 1993. Selective restriction amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Publication 92402629 (Publication No. EP0534858A1).

Quatre étapes

- ▶ L'ADN est digéré par deux enzymes de restriction différentes
- ▶ Des adaptateurs oligonucléotidiques sont liés aux extrémités des fragments d'ADN
- ▶ Des sous-ensembles spécifiques des produits de digestion de l'ADN sont amplifiés, en utilisant des combinaisons d'amorces sélectives
- ▶ La détection du polymorphisme se fait avec des radioisotopes, des sondes fluorescentes ou une coloration à l'argent.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 4

Digestion de l'ADN et ligation

- ▶ L'une des enzymes de restriction coupe fréquemment l'ADN (site de reconnaissance de 4 bases, p.e. MseI)
- ▶ La seconde enzyme de restriction coupe peu fréquemment l'ADN (site de reconnaissance de 6 bases, p.e. EcoRI)
- ▶ Des adaptateurs double-brin synthétiques, spécifiques de chaque site de restriction, sont attachés aux fragments d'ADN générés

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 5

L'ADN étudié est digéré avec deux enzymes de restriction différentes, l'une coupant fréquemment (enzymes de restriction reconnaissant 4 bases) et l'autre coupant plus rarement (enzymes de restriction reconnaissant 6 bases). Différentes combinaisons enzymes/amorces peuvent être utilisées. MseI et EcoRI sont mieux utilisées pour des génomes riches en AT; elles donnent moins de fragments dans les génomes riches en GC.

Des adaptateurs synthétiques, spécifiques de chaque site de restriction, sont ensuite attachés ("ligués") à l'ADN digéré. Les deux étapes de restriction et de ligation peuvent être réalisées en une seule réaction.

PCR et détection

- ▶ Une première PCR (pré-sélective) est réalisée, en utilisant des amorces oligonucléotidiques complémentaires des adaptateurs et sites de restriction. Un nucléotide est ajouté aux amorces pour sélectionner seulement un sous-ensemble de fragments.
- ▶ Les produits d'amplification pré-sélective sont soumis à une autre PCR, et ainsi un sous-ensemble de ces fragments est sélectionné. Généralement, pour la seconde amplification sélective, deux nucléotides supplémentaires sont ajoutés aux amorces.
- ▶ Les fragments sont séparés par électrophorèse sur polyacrylamide ("gels de séquence") ou électrophorèse capillaire

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 6

Disons qu'un nucléotide A est ajouté aux amorces présélectives. De ce fait, seul un sous-ensemble des fragments du mélange (c.a.d. Ceux pour lesquels le site de restriction est suivi d'un A) est amplifié. Les amorces ont généralement une longueur de 17 à 21 nucléotides, et s'hybrident parfaitement à leur séquence cible.

Une seconde amplification est alors réalisée, en utilisant le même type d'amorces, mais avec deux bases supplémentaires (p.e. AC). De ce fait, seul un sous-ensemble de la première réaction d'amplification va être amplifié à son tour pendant la deuxième PCR (c.a.d. Ceux pour lesquels le site de restriction est suivi de la séquence AC).

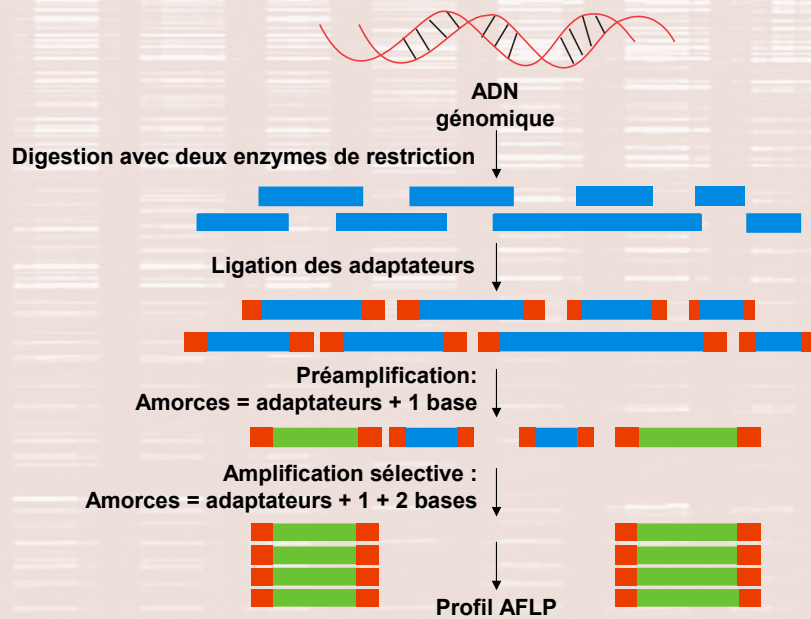
Le sous-ensemble de fragments est analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant pour générer une empreinte génétique et les bandes ADN peuvent être détectées selon différentes méthodes.

En plus de l'avantage de ne pas nécessiter des radioisotopes, les amorces fluorescentes peuvent être chargées par groupes de trois, chacune marquée avec un colorant différent, dans la même piste du gel, maximisant ainsi le nombre de données par gel (Zhao *et al.*, 2000).

Reference

Zhao, S., S.E. Mitchell, J. Meng, S. Kresovich, M.P. Doyle, R.E. Dean, A.M. Casa and J.W. Weller. 2000. Genomic typing of *Escherichia coli* 0157:H7 by semi-automated fluorescent AFLP analysis. *Microbes Infect.* 2:107-113.

Résumé de la technologie*



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 7

*D'après le site internet de KeyGene: <http://www.keygene.com>

Equipement

► Ressources:

- Eau distillée et/ou désionisée
- Réactifs

► Equipement:

- | | |
|-----------------------------------|--|
| • Réfrigérateur et congélateur | • pH mètre |
| • Hotte à flux laminaire | • Balance standard |
| • Centrifugeuse | • Unités d'électrophorèse sur gel vertical |
| • Thermocycleur | • Transilluminateur UV |
| • Générateurs | • Séquenceur automatique |
| • Plaque chauffante ou micro-onde | |

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 8

Interprétation des bandes AFLP

La technique AFLP détecte des polymorphismes qui résultent de changements (présence ou taille) dans les sites de restriction ou adjacents à ces sites

- ▶ Différentes enzymes de restriction peuvent être utilisées, et différentes combinaisons de nucléotides pré-sélectifs et sélectifs vont augmenter la probabilité de trouver des polymorphismes utiles
- ▶ Plus on ajoute de bases sélectives, moins on détectera de polymorphisme
- ▶ Les bandes sont généralement codées comme présentes ou absentes
- ▶ Des bandes hétérozygotes peuvent être détectées comparativement à des homozygotes, sur la base de l'épaisseur du signal, mais c'est un peu compliqué

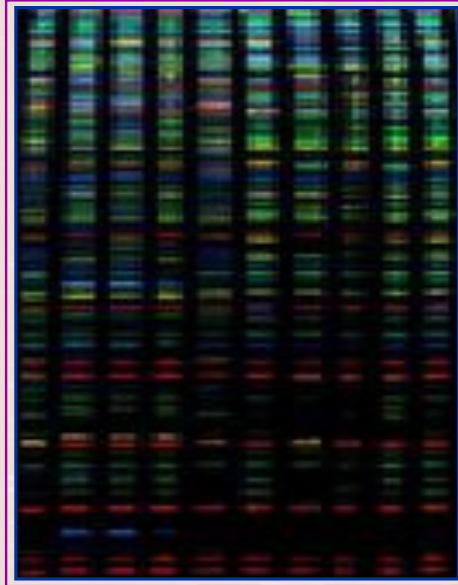
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 9

La base moléculaire des polymorphismes AFLP se trouve généralement au niveau nucléotidique. Des changements nucléotidiques uniques sont détectés quand (1) les sites de restrictions actuels sont affectés; et (2) les nucléotides adjacents aux amorces sont affectés, ce qui provoque des mésappariements à l'extrémité 3' et empêchent l'amplification.

La plupart des marqueurs AFLP sont mono-alléliques, c'est à dire qu'un seul allèle peut être codé et l'allèle correspondant n'est pas détecté. Peu fréquemment, des marqueurs bi-alléliques sont identifiés, résultant de petites insertions ou délétions dans les fragments de restriction.

Un profil AFLP avec marqueurs fluorescents

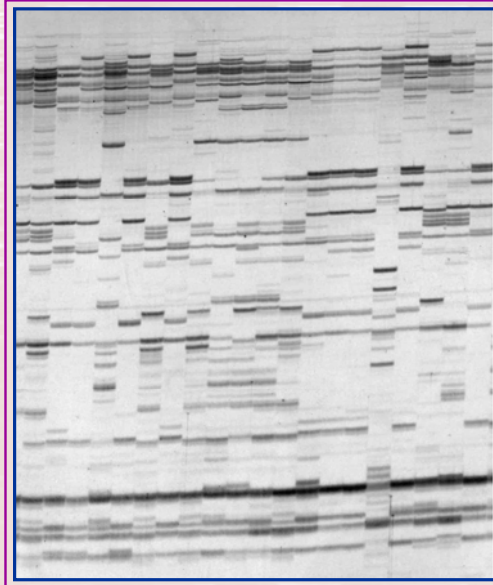


Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 10

Cette image montre le résultat d'un profil AFLP obtenu dans un séquenceur automatique. Avant de charger le gel, les échantillons sont marqués avec l'une des trois couleurs fluorescentes (jaune, bleu ou vert). Le rouge représente un échantillon témoin qui a été inclus avec les autres échantillons pour tester la performance de l'électrophorèse. Repérer la présence ou l'absence d'une bande particulière directement du gel est pratiquement impossible à cause du grand nombre de bandes obtenues normalement par la procédure AFLP, et parce que les traceurs fluorescents ne peuvent être vus à l'oeil. Les bandes sont repérées avec un laser, et la collecte des données est assistée d'un logiciel spécialisé.

AFLP détectés par coloration à l'argent



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 11

Cette image montre le résultat d'un gel AFLP dans un système manuel (unité d'électrophorèse verticale), marqué au nitrate d'argent. La figure montre que certaines régions du gel sont très chargées en bandes, alors que d'autres sont moins remplies. La collection des données de gels colorés à l'argent peut être faite à l'oeil, ou à l'aide d'un ordinateur après que le gel ait été scanné de façon appropriée.

Avantages des AFLP

- ▶ Les AFLP permettent le balayage rapide du génome complet pour identifier des polymorphismes
- ▶ A cause du grand nombre de bandes générées, chaque marqueur donne une empreinte génétique très informative
- ▶ Ils sont aussi extrêmement reproductibles
- ▶ Aucune information préalable de séquence ou génération de sonde ne sont nécessaires
- ▶ Extrêmement utile pour créer rapidement des cartes génétiques
- ▶ Il est possible d'obtenir des profils de transcrits ("Transcript profiling")

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 12

La technologie AFLP peut être appliquée à tout échantillon d'ADN, y compris ADN d'homme, animal, plante ou microorganisme, lui donnant le potentiel de devenir un système d'empreinte génétique universel.

A cause de la nature des amorces AFLP, les marqueurs obtenus sont très fiables et robustes, non affectés par de petites variations dans le processus d'amplification.

Un profil AFLP type contient entre 50 et 100 fragments amplifiés, beaucoup d'entre eux, sinon la plupart, pouvant servir de marqueurs génétiques.

La génération de profils de transcrits en utilisant les AFLP avec des ADNc est un moyen efficace pour identifier des ARNm exprimés différemment. Cet outil a plusieurs avantages qui peuvent être utiles pour découvrir des gènes dans les ressources génétiques.

Inconvénients des AFLP

- ▶ Les AFLP génèrent des quantités énormes d'informations qui peuvent nécessiter des analyses automatisées, et pour cela des technologies informatiques.
- ▶ Les marqueurs AFLP sont des marqueurs dominants
- ▶ En cartographie génétique, les marqueurs AFLP se regroupent souvent au niveau des centromères et télomères
- ▶ Ils demandent une technicité élevée dans le laboratoire, et tout particulièrement dans l'analyse des résultats

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 13

Un autre inconvénient de la technologie AFLP est peut-être le manque de garantie d'homologie entre bandes de poids moléculaires similaires, créant ainsi des difficultés pour certaines études comme les analyses phylogénétiques. Cependant, alors que des bandes non homologues avec des poids similaires sont également trouvés avec d'autres marqueurs comme les RAPD, ils sont en fait moins fréquents avec la technologie AFLP, parce que la résolution du gel est très élevée et, de ce fait, la probabilité que des bandes non homologues aient par coïncidence le même poids moléculaire est très faible.

Applications

- ▶ Evaluation de la diversité génétique
- ▶ Analyse de distances génétiques
- ▶ Empreintes génétiques
- ▶ Analyse de collections de ressources génétiques
- ▶ Cartographie des génomes
- ▶ Marqueurs diagnostics de contrôle

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 14

Les références précédées d'un * sont expliquées en détail dans les diapositives suivantes.

Badr, A., K. Müller, R. Schäfer-Pregl, H. El Rabey, S. Effgen, H.H. Ibrahim, C. Pozzi, W. Rohde and F. Salamini. 2000. On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Mol. Biol. Evol.* 17(4):499-510.

Barret, B.A. and K.K. Kidwell. 1998. AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the Pacific Northwest. *Crop Sci.* 38:1261-1271.

Beebe, S., J. Rengifo, E. Gaitán, M.C. Duque and J. Tohme. 2001. Diversity and origin of Andean landraces of common bean. *Crop Sci.* 41:854-862.

Gilbert, K.G., S. Garton, M.A. Karam, G.M. Arnold, A. Karp, K.J. Edwards, D.T. Cooke and J.H.A. Barker. 2002. A high degree of genetic diversity is revealed in *Isatis* spp. (dyer's woad) by amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Theor. Appl. Genet.* 104:1150-1156.

Miyashita, N.T., A. Kawabe and H. Innan. 1999. DNA variation in the wild plant *Arabidopsis thaliana* revealed by amplified fragment length polymorphism analysis. *Genetics* 152: 1273-1731.

* Palacios, C. and F. González-Candelas. 1999. AFLP analysis of the critically endangered *Limonium cavanillesii* (Plumbaginaceae). *J. Hered.* 90(4):485-489.

Rouf-Mian, M.A., A.A. Hopkins and J.C. Zwonitzer. 2002. Determination of genetic diversity in Tall Fescue with AFLP markers. *Crop Sci.* 42:944-950.

Sawkins, M.C., B.L. Maass, B.C. Pengelly, H.J. Newbury, B.V. Ford-Lloyd, N. Maxted and * R. Smith. 2001. Geographical patterns of genetic variation in two species of *Stylosanthes* Sw. using amplified fragment length polymorphism. *Mol. Ecol.* 10:1947-1958.

* Srivastava, A., V. Gupta, D. Pental and A.K. Pradhan. 2001. AFLP-based genetic diversity assessment amongst agronomically important natural and some newly synthesized lines of *Brassica juncea*. *Theor. Appl. Genet.* 102:193-199.

Vuylsteke, M., R. Mank, B. Brugmans, P. Stam and M. Kuiper. 2000. Further characterization of AFLP (R) data as a tool in genetic diversity assessment among maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Mol. Breed.* 6(3):265-276.

Exemple: *Limonium* sp.

- ▶ **Titre:**
AFLP analysis of the critically endangered *Limonium cavanillesii* (Plumbaginaceae). J. Hered. 1999. 90(4):485-489
- ▶ **Objectif:**
Comparer la performance des AFLP pour l'analyse de la diversité génétique de *L. cavanillesii* et leur efficacité par rapport à une étude précédente utilisant des RAPD
- ▶ **Matériel et méthodes:**
L'ADN a été extrait de 29 individus sauvages. Ces individus étaient les mêmes que ceux utilisés dans une étude RAPD précédente*. Trois combinaisons d'amorces ont été sélectionnées.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 15

(suite diapositive suivante)

*Palacios, C and F. González-Candelas. 1997. Lack of genetic variability in the rare and endangered *Limonium cavanillesii* (Plumbaginaceae) using RAPD markers. Mol. Ecol. 6:671-675.

Exemple: *Limonium* sp. (suite)

► Résultats:

un total de 231 fragments ont été générés: en moyenne, 223 par individu et 77 par combinaison d'amorce. seulement 6% des marqueurs AFLP étaient polymorphes. Parmi ceux-ci, 11 profils AFLP différents peuvent être distingués dans l'espèce, alors que dans une étude RAPD précédente*, aucun marqueur polymorphe n'avait été obtenu.

► Discussion:

Les AFLP s'avèrent être un type de marqueur utile pour rassembler des informations critiques pour l'identification des populations naturelles à risque et prévoir des stratégies de sauvetage pour *L. cavanillesii*. Le faible niveau de variabilité génétique peut s'expliquer comme la conséquence soit du système de reproduction apomictique, soit d'un événement de goulot d'étranglement récent et sévère.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 16

* Palacios, C and F. González-Candelas. 1997. Lack of genetic variability in the rare and endangered *Limonium cavanillesii* (Plumbaginaceae) using RAPD markers. Mol. Ecol. 6:671-675.

Exemple: *Stylosanthes* spp.

- ▶ **Titre:**
Geographical patterns of genetic variation in two species of *Stylosanthes* Sw. using amplified fragment length polymorphism. Mol.Ecol. 2001. 10:1947-1958
- ▶ **Objectif:**
Analyser la variation génétique dans deux espèces du genre tropical *Stylosanthes* Sw.
- ▶ **Matériel et méthodes:**
Pour l'analyse, 111 accessions ont été sélectionnées: 59 *S. viscosa* et 52 *S. humilis*, représentant la distribution géographique des deux espèces. Cinq combinaisons d'amorces ont été utilisées pour *S. humilis* et quatre pour *S. viscosa*

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 17

(suite diapositive suivante)

Exemple: *Stylosanthes* spp. (suite)

Résultats:

- *S. humilis*: 316 des 417 bandes totales étaient polymorphes (75%). Le taux de similarité moyen parmi les accessions était de 0.71, et la distance génétique était de 0.17 (coefficient de Jaccard)
- *S. viscosa*: 312 des 373 bandes totales étaient polymorphes (83%). Le taux de similarité moyen parmi les accessions était de 0.67, et la distance génétique était de 0.20
- L'analyse en groupement et les ACP ont regroupé les accessions par leur origine géographique, avec quelques exceptions. Une explication peut être l'incidence d'événements de dispersion à vaste échelle, ou des introductions de génotypes d'une aire à l'autre par intervention humaine.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 18

(suite diapositive suivante)

Exemple: *Stylosanthes* spp. (suite)

► Discussion:

Ces résultats démontrent l'utilité de la technique AFLP, non seulement pour détecter la diversité génétique de *Stylosanthes*, mais aussi pour identifier des individus qui auraient pu être mal classés.

► Conclusions:

Cette étude montre la capacité des AFLP à détecter des profils géographiques dans la variation génétique, cette information étant nécessaire pour développer une stratégie pour une conservation optimale des ressources génétiques

Exemple: moutarde brune

► **Titre:**

AFLP-based genetic diversity assessment amongst agronomically important natural and some newly synthesized lines of *Brassica juncea*. Theor. Appl. Genet. 2001. 102: 193-199

► **Objectifs:**

- Etudier la variation génétique parmi des accessions de *B. juncea*
- Identifier des combinaisons d' amorces AFLP informatives pour l'identification variétale
- Chercher des marqueurs polymorphes pour le ciblage de caractères agronomiques dans la diversité étudiée

► **Matériel et méthodes:**

L'étude utilise 30 accessions de *B. juncea*, représentant 21 populations naturelles établies et 9 variétés synthétiques et lignées. L'amplification sélective a été réalisée avec 21 combinaisons d'amorces EcoRI/MseI

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 20

(suite diapositive suivante)

Exemple: moutarde brune (suite)

Résultats:

- Pour les 30 génotypes, 1251 fragments ont été analysés. En moyenne, 37 bandes par combinaison d'amorce étaient polymorphes
- Aucune paire d'amorces n'a pu distinguer à elle seule les 30 génotypes sur la base de la présence ou l'absence de bandes spécifiques de variété
- Quatre paires d'amorces ont été les plus informatives avec un pouvoir de discrimination de 100%
- L'analyse en groupements basée sur ces quatre paires d'amorces informatives confirme les résultats d'études précédentes basées sur des caractères morphologiques* et des données RAPD**

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 21

(continued on next slide)

**Jain, A., S. Bhatia, S.S. Banga, S. Prakash and M. Lakshmikumaran. 1994. Potential use of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis. Theor. Appl. Genet. 88:116-122.

*Pradhan, A.K., Y.S. Sodhi, A. Mukhopadhyay and D. Pental. 1993. Heterosis breeding in Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern. & Cross): analysis of component characters contributing to heterosis for yield. Euphytica 69:219-229.

Exemple: moutarde brune (suite)

► Discussion et conclusions:

Dans une précédente étude RAPD menée avec 32 amorces, une moyenne de 12 locus polymorphes par amorce avaient été obtenus. De ce fait, la technique AFLP a apporté une meilleure résolution que les RAPD pour discriminer parmi des ressources génétiques proches. L'analyse AFLP a donc le potentiel de compléter à la fois les données conventionnelles et les autres types de marqueurs moléculaires.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 22

*Jain, A., S. Bhatia, S.S. Banga, S. Prakash and M. Lakshmikumaran. 1994. Potential use of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis. Theor. Appl. Genet. 88:116-122.

En résumé:

- ▶ La technologie AFLP est basée sur l'amplification sélective de fragments de restriction après digestion d'ADN.
- ▶ Elle détecte des polymorphismes provoqués par des changements dans les sites de restriction ou leurs régions flanquantes.
- ▶ Cette technologie produit un grand nombre de bandes par gel, mais ils sont dominants et cette méthode est techniquement exigeante.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 23

A ce stade vous devez savoir:

- ▶ Les différentes étapes impliquées dans la génération des AFLP
- ▶ Les principales considérations pour l'interprétation des bandes AFLP
- ▶ Les avantages et les inconvénients des AFLP pour l'analyse de la diversité génétique

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 24

Références de base

- Brown, S.M. and S. Kresovich. 1996. Molecular characterization for plant genetic resources conservation. Pp. 85-93 in *Genome Mapping in Plants* (H. Paterson, ed.). RG Landes Company and Academic Press, Austin, TX.
- KeyGene, N.V. 2001. Empowering genomics. <http://www.keygene.com> (30 June 2002)
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- Zabeau, M. and P. Vos. 1993. Selective restriction amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Publication 92402629 (Publication No. EP0534858A1).
- Zhao, S., S.E. Mitchell, J. Meng, S. Kresovich, M.P. Doyle, R.E. Dean, A.M. Casa and J.W. Weller. 2000. Genomic typing of *Escherichia coli* 0157:H7 by semi-automated fluorescent AFLP analysis. *Microbes Infect.* 2:107-113.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 25

Suite

Les technologies basées sur l'ADN **Les technologies basées sur la PCR** **Les séquences ciblées** **(STS: sequences-tagged sites)**

- ▶ Les technologies basées sur 'ADN
 - Les technologies basées sur la PCR
 - Les stratégies les plus récentes
- ▶ Technologies complémentaires
- ▶ Considérations finales
- ▶ Glossaire

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 26

**Utilisation des marqueurs
moléculaires dans les études de
diversité des plantes :
Module d'enseignement
Technologies basées sur l'ADN**

**Technologies basées sur la PCR
Séquences ciblées
(microsatellites, SCAR, CAPS, ISSR)**

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 1

Sommaire

- ▶ Les séquences ciblées (STS) comme marqueurs
- ▶ Microsatellites (SSR, STMS ou SSRP)
 - Identification des régions microsatellites
 - Structure
 - Sélection des amorces
 - Méthodologie et visualisation
 - Equipement
 - Avantages et inconvénients
 - Applications des SSR et exemples
- ▶ SCAR
- ▶ CAPS
- ▶ ISSR

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 2

Les séquences ciblées (Sequence-tagged sites: STS) comme marqueurs

- ▶ Contrairement aux amorces arbitraires, les STS reposent sur un certain degré de connaissance au niveau des séquences
- ▶ Les marqueurs basés sur les STS sont codominants
- ▶ Ils tendent à être plus reproductibles à cause des séquences d'amorces plus longues utilisées
- ▶ Ils requièrent les mêmes protocoles de laboratoire de base et équipements que la PCR standard

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 3

Contrairement aux PCR réalisées avec des amorces arbitraires, les amorces STS reposent sur un certain degré de connaissance au niveau des séquences. Ces amorces uniques, spécifiques de séquence, détectent de la variation allélique dans l'ADN génomique. Les STS ont l'avantage particulier par rapport aux RAPD d'être codominants, c'est à dire qu'ils peuvent distinguer des homozygotes des hétérozygotes. Ils tendent aussi à être plus reproductibles, à cause des séquences d'amorces plus longues utilisées.

Cependant, ils ont l'inconvénient de nécessiter des connaissances préalables sur la séquence d'ADN de la région, même partielles. L'investissement en efforts et coûts nécessaires pour développer les paires d'amorces spécifiques pour chaque locus est leur inconvénient principal.

Comme avec les RAPD, l'utilisation de la PCR permet une génération rapide de données est requiert peu d'ADN. Toutes les méthodes STS utilisent les mêmes protocoles de base que les RAPD (extraction d'ADN et PCR) et requièrent le même équipement.

Microsatellites (SSR, STMS ou SSRP)

- ▶ Les microsatellites sont de courtes répétitions (1-10 pb) en tandem
- ▶ Pour être utilisés comme marqueurs, leur localisation dans le génome d'intérêt doit être préalablement identifiée.
- ▶ Les polymorphismes dans la région répétée peuvent être détectés en réalisant une PCR avec des amorces déterminées dans la région flanquante

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 4

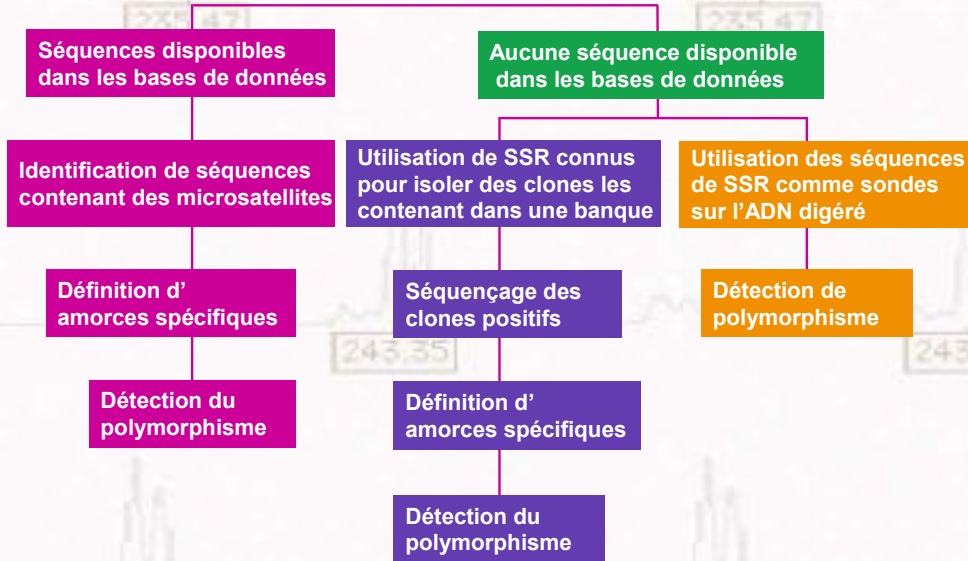
Les microsatellites sont aussi appelés sequence repeats (SSRs) et, occasionnellement, sequence-tagged microsatellite sites (STMS) ou simple sequence repeat polymorphisms (SSRPs). Ils sont de loin le type de marqueurs STS les plus utilisés.

Les SSR sont de courtes répétitions en tandem, de longueur entre 1 et 10 pb, typiquement 2 ou 3 pb. Les SSR sont très variables et distribués régulièrement le long du génome. Ce type d'ADN répété est commun chez les eucaryotes, le nombre d'unités répétées variant largement parmi les organismes, allant jusqu'à 50 copies de l'unité répétée. Ces polymorphismes sont identifiés en construisant des amorces PCR dans la région adjacente de la région microsatellite. Ces régions flanquantes tendent à être conservées à l'intérieur de l'espèce, bien que parfois ils puissent être conservés entre groupes taxonomiques plus distants.

Reference

Hajeer, A., J. Worthington and S. John (eds.). 2000. SNP and Microsatellite Genotyping: Markers for Genetic Analysis. Biotechniques: Molecular Laboratory Methods Series. Eaton Publishing, Manchester, UK.

Identification des régions microsatellites



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

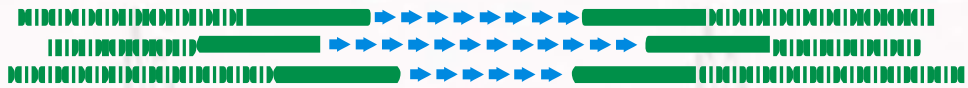
STS 5

Comme le font les régions du génome riches en répétitions, les SSR tendent à se regrouper au niveau des centromères et télomères. Cependant, ce problème peut être résolu en développant des SSR à partir de banques d'EST, riches en gènes et mieux répartis sur le génome.

Structure



- Le nombre de répétitions est très variable entre individus



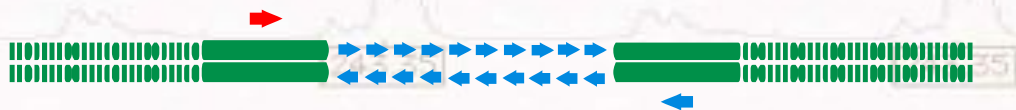
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

233.36

STS 6

Sélection des amorces

- On définit des amorces ( ) complémentaires des régions flanquantes



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

233.36

STS 7

Methodologie et visualisation

► Méthodologie:

- Extraction d'ADN
- PCR avec des amorces spécifiques des régions flanquantes
- Séparation des fragments

► Visualisation:

- Par électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium et lumière UV, ou
- Gels d'acrylamide et coloration à l'argent ou utilisation de radioisotopes, ou
- Par l'intermédiaire de séquenceurs automatiques, en utilisant des amorces marquées préalablement avec des fluorophores

► Analyse des données

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 8

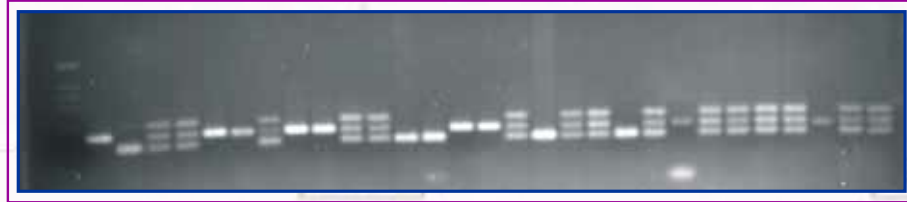
La variation de taille des produits PCR est causée par des différences dans le nombre d'unités de répétition du microsatellite. Les polymorphismes SSR peuvent être visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose ou de polyacrylamide. Les allèles microsatellites peuvent être détectés en utilisant diverses méthodes: bromure d'éthidium, coloration à l'argent, radioisotopes ou fluorescence.

Si on utilise des amorces marquées par fluorescence, et si les produits sont suffisamment différents en taille et non chevauchants, alors on peut réaliser un multiplexage des produits de réaction - c'est à dire charger plus d'un échantillon par piste – et augmenter encore la forte efficacité de ces marqueurs (Dean *et al.*, 1999, en donnent un bon exemple).

Reference

Dean, R.E., J.A. Dahlberg, M.S. Hopkins, S.E. Mitchell and S. Kresovich. 1999. Genetic redundancy and diversity among 'Orange' accessions in the U.S. national sorghum collection as assessed with Simple Sequence Repeat (SSR) markers. *Crop Sci.* 39:1215-1221.

Coloration au bromure d'éthidium



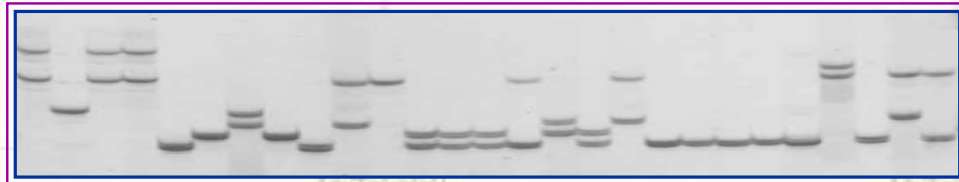
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 9

Comme mentionné plus tôt, une façon de visualiser des microsatellites est d'utiliser une électrophorèse sur gel d'agarose. Cette méthode est appropriée quand les allèles sont suffisamment longs, c'est à dire, de plus de 200-300 pb, et les différences entre allèles également significatives (c.a.d. plus de 10-20 pb).

Cette figure montre un microsatellite qu'on a fait migrer dans un gel d'agarose et coloré au bromure d'éthidium. Les deuxième et troisième pistes (la première, très faible, est la piste qui marque les poids moléculaires) correspondent aux parents, l'un des deux ayant une seule bande, l'autre deux. L'hétérozygote, de ce fait, en a trois. Chez le second parent, l'une des bandes est d'intensité plus faible. On la retrouve. Comme les deux co-ségrègent (chez les individus hétérozygotes essentiellement), elles résultent de deux locus en des endroits différents, mais les deux copies des répétitions microsatellites sont séparées par une insertion ou une délétion, ou sont localisées proches l'une de l'autre.

Coloration au nitrate d'argent



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 10

Les microsatellites peuvent aussi être analysés après avoir fait migrer les produits de la PCR dans un gel d'acrylamide et l'avoir coloré avec du nitrate d'argent. Dans cette figure, des échantillons d'individus appartiennent à une espèce diploïde, et de ce fait ont deux allèles au maximum.

Equipement

► Ressources:

- Eau distillée et/ou désionisée
- Réactifs

► Equipement:

- Réfrigérateur et congélateur
- Hotte à flux laminaire
- Centrifugeuse
- Thermocycleur
- Générateurs
- Plaque chauffante ou microonde
- pH mètre
- Balance standard
- Unités d'électrophorèse sur gel vertical
- Transilluminateur UV
- Séquenceur automatique

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 11

Avantages et inconvénients

► Avantages:

- Requièrent très peu d'ADN et pas forcément de bonne qualité
- Extrêmement polymorphes
- Répartis régulièrement dans le génome
- Interprétation des résultats simple
- Facilement automatisé, permettant le multiplexage
- Bonne résolution analytique et forte reproductibilité

► Inconvénients:

- Procédure de découverte complexe
- Coûteux

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 12

Les locus identifiés sont généralement multi-alléliques et codominants. Les bandes peuvent être codées de façon codominante, ou comme présente ou absente

Comme l'ADN flanquant est très susceptible d'être conservé, les amorces dérivées des microsatellites peuvent souvent être utilisées avec de nombreuses variétés, et même d'autres espèces. Ces marqueurs sont facilement automatisables, extrêmement polymorphes, et présentent une bonne résolution analytique, ce qui en fait des marqueurs de premier choix (Matsuoka *et al.*, 2002).

Reference

Matsuoka, Y., S.E. Mitchell, S. Kresovich, M. Goodman and J. Doebley. 2002. Microsatellites in *Zea* - variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.* 104:436-450.

Applications des microsatellites

- ▶ Génotypage des individus
- ▶ Evaluation des ressources génétiques
- ▶ Diversité génétique
- ▶ Cartographie des génomes
- ▶ Etudes phylogénétiques
- ▶ Etudes d'évolution

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 13

Les références précédées de * sont expliquées en détail dans les diapositives suivantes.

* Cipriani, G., M.T. Marrazzo, R. Marconi, A. Cimato and R. Testolin. 2002. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 104:223-228.

Dean, R.E., J.A. Dahlberg, M.S. Hopkins, S.E. Mitchell and S. Kresovich. 1999. Genetic redundancy and diversity among 'Orange' accessions in the U.S. national sorghum collection as assessed with Simple Sequence Repeat (SSR) markers. *Crop Sci.* 39:1215-1221.

Matsuoka, Y., S.E. Mitchell, S. Kresovich, M. Goodman and J. Doebley. 2002. Microsatellites in *Zea* - variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.* 104:436-450.

* Smith, J.S.C., S. Kresovich, M.S. Hopkins, S.E. Mitchell, R.E. Dean, W.L. Woodman, M. Lee and K. Porter. 2000. Genetic diversity among elite sorghum inbred lines assessed with simple sequence repeats. *Crop Sci.* 40:226-232.

* Westman, A.L. and S. Kresovich. 1999. Simple sequence repeats (SSR)-based marker variation in *Brassica nigra* genebank accessions and weed populations. *Euphytica* 109:85-92.

Applications: Exemple du sorgho

- ▶ **Titre:**
Genetic diversity among elite sorghum inbred lines assessed with simple sequence repeats. Crop Sci. 2000. 40:226-232
- ▶ **Objectif:**
Caractériser le niveau de redondance génétique dans les accessions de sorgho maintenues par le National Plant Germplasm System des Etats Unis
- ▶ **Matériel et méthodes:**
96 individus (5 plantes pour chacune des 19 accessions de la lignée "Orange" et une variété recombinante élite) ont été caractérisés avec 15 marqueurs SSR

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 14

(suite diapositive suivante)

Applications: Exemple du sorgho (suite)

Résultats et discussion:

- ▶ La plupart des accessions étaient génétiquement distinctes, mais deux groupes redondants (impliquant un total de 5 entrées) ont été trouvés
- ▶ Les valeurs moyennes d'hétérozygotie étaient très faibles (comme attendu pour une espèce autogame). Une accession contenait un mélange de génotypes, indiquant une sorte de contamination
- ▶ L'analyse de variance moléculaire (AMOVA) a montré que 90% de la variation génétique totale était due à des différences entre accessions, alors que 10% résultait de différences génétiques entre individus au sein des accessions.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 15

(suite diapositive suivante)

Applications: Exemple du sorgho (suite)

Conclusions:

- ▶ 15 marqueurs SSR apportaient une résolution génétique substantielle
- ▶ Le nombre d'accessions 'Orange' à maintenir peut être réduit presque de moitié sans perte substantielle de la variation génétique globale, ce qui réduirait considérablement les coûts de maintenance
- ▶ La possibilité de réaliser des réactions multiplexées a permis d'économiser 1152 pistes de gel, c.a.d. 80% des réactifs et du temps.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 16

Applications: Exemple de l'olive

- ▶ **Titre:**
Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. Theor. Appl. Genet. 104:223-228
- ▶ **Objectif:**
Déterminer l'efficacité des marqueurs SSR pour identifier du polymorphisme parmi les cultivars d'olivier
- ▶ **Matériel et méthodes:**
36 SSR ont été utilisés pour caractériser 12 cultivars d'olivier (4 très connus et 8 variétés anciennes)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 17

(suite diapositive suivante)

Applications: Exemple de l'olive (suite)

► Résultats et discussion:

Tous les marqueurs SSR à l'exception de deux ont montré du polymorphisme, identifiant entre 1 et 5 allèles. Tous les cultivars ont été facilement séparés les uns des autres.

- Cinq paires d'amorces amplifiaient deux locus différents
- Six paires d'amorces ont été éliminées car elles donnaient des profils illisibles
- Deux variétés, que l'on suspectait d'être identiques, ont été confirmées comme telles en montrant des profils de bandes identiques à tous les locus. Un autre couple de variétés, également suspectées d'être identiques, se sont avérées ne pas l'être.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 18

(suite diapositive suivante)

Applications: Exemple de l'olive (suite)

Conclusions:

Les SSR ont pu facilement différencier toutes les variétés, et ainsi représentent un bon outil pour réaliser des empreintes génétiques. De la variabilité génétique entre les cultivars d'olivier a également été identifiée, en utilisant un très petit nombre de marqueurs. Des études précédentes utilisant les AFLP nécessitaient beaucoup plus de marqueurs.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 19

Applications: Exemple de la moutarde noire

- ▶ **Titre:**
Simple sequence repeats (SSR)-based marker variation in *Brassica nigra* genebank accessions and weed populations. Euphytica. 1999. 109:85-92
- ▶ **Objectif:**
Déterminer l'étendue et la distribution de la variation génétique de *B. nigra* ou moutarde noire.
- ▶ **Matériel et méthodes:**
Cinq marqueurs SSR ont été utilisés pour analyser 32 accessions de *B. nigra* (incluant des accessions de la banque de gènes et des populations sauvages) issues de quatre régions: Europe/Afrique du Nord, Inde, Ethiopie et Amérique du Nord

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 20

(suite diapositive suivante)

Applications: Exemple de la moutarde noire (suite)

Résultats et discussion:

- ▶ Les entrées d’Ethiopie ont formé le groupe le plus distinct
- ▶ Plus de la moitié de la variation se trouvait entre plantes parmi les entrées
- ▶ Les accessions Européennes et Nord- Américaines étaient celles qui contenaient le plus de variation, et étaient généralement groupées entre elles.
- ▶ Des variants uniques étaient présents dans les populations sauvages Nord- Américaines mais la variation entre populations n’était pas corrélée à la distance géographique

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 21

(suite diapositive suivante)

Applications: Exemple de la moutarde noire (suite)

Conclusions:

Malgré le sentiment qu'il existe peu de variation génétique au sein de *B. nigra*, les marqueurs SSR ont démontré que les profils de variation de l'espèce sont en accord avec l'histoire de son développement agricole.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

233.36

STS 22

Caractérisation de produits d'amplification: Sequence characterized amplified regions (SCARs)

- ▶ Les SCAR utilisent les avantages de la génération de bandes par une expérimentation de type RAPD
- ▶ Ils utilisent des amorces de 16-24 pb déterminées à partir des extrémités des marqueurs RAPD
- ▶ Cette technique convertit une bande —sujette à des difficultés d'interprétation et/ou de reproductibilité— en un marqueur très fiable

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 23

Référence

Paran, I. and R.W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor. Appl. Genet. 85:985-993.

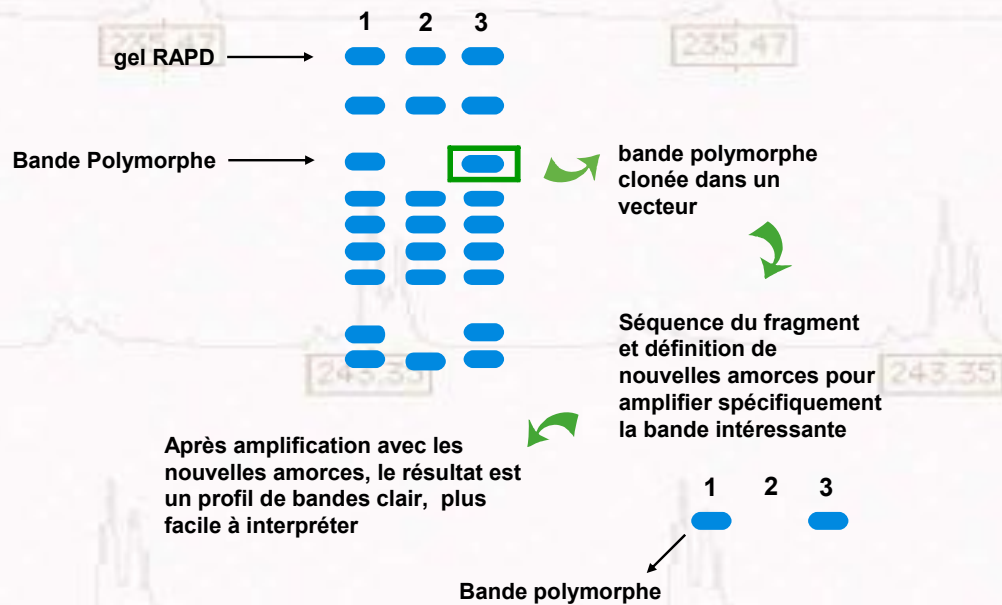
Etapes pour obtenir des polymorphismes SCAR

- ▶ Une bande potentiellement intéressante est identifiée dans un gel RAPD
- ▶ La bande est excisée du gel
- ▶ Le fragment d'ADN est cloné dans un vecteur et séquencé
- ▶ Des amorces spécifiques (16-24 pb) sont déterminées pour ce fragment d'ADN.
- ▶ La ré-amplification de l'ADN cible avec ces nouvelles amorces montrera un nouveau profil PCR plus simple.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 24

Schéma de la procédure SCAR



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 25

Avantages et inconvénients

► Avantages:

- Profils plus simples que les RAPD
- Analyse plus robuste due à la définition de longues amorces spécifiques
- Hérité mendélienne. Parfois convertible en marqueurs co-dominants.

► Inconvénients:

- Requiert un minimum d'information de séquence
- Requiert un effort et des dépenses supplémentaires pour la définition d'amorces spécifiques à chaque locus

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 26

Comme les amorces utilisées sont plus longues que celles utilisées normalement pour les RAPD, les SCAR sont typiquement plus reproductibles que les RAPD dont ils sont dérivés. Les SCAR habituellement sont co-dominants, bien que ce ne soit pas le cas si l'une des amorces ou les deux chevauchent le site de variation de séquence.

La digestion de produits d'amplification: Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS)

- ▶ Cette méthode est basée sur la définition d'amorces spécifiques, l'amplification de fragments d'ADN, et la génération de fragments plus petits, potentiellement variables, au moyen d'une enzyme de restriction.
- ▶ Cette technique vise à convertir un fragment amplifié qui ne montre pas de variation en une bande qui en présente

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 27

Cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) are like SCARs, but with an additional step of a restriction digest to help identify polymorphisms that may not be identifiable from whole PCR products. Both SCARs and CAPS are based on the presence of nucleotide changes or insertions and/or deletions causing differences between the test sequences. One drawback of both is that they detect polymorphism only over a small range of the genome, the area between the primers being typically less than 5 kb.

Référence

Konieczny, A. and F.M. Ausubel. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. Plant J. 4(2):403-410.

Etapes pour générer des CAPS

- ▶ Une bande, ADN, séquence génique ou autre type de marqueur est identifiée comme importante
- ▶ Soit la bande est détectée par PCR (elle est alors excisée du gel, clonée et séquencée), soit la séquence du fragment est déjà disponible.
- ▶ Des amorces spécifiques sont définies à partir de la séquence du fragment
- ▶ Les nouvelles amorces définies sont utilisées pour amplifier l'ADN matrice
- ▶ Le produit PCR est digéré par une palette d'enzymes de restriction
- ▶ Du polymorphisme peut être identifié avec quelques unes de ces enzymes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 28

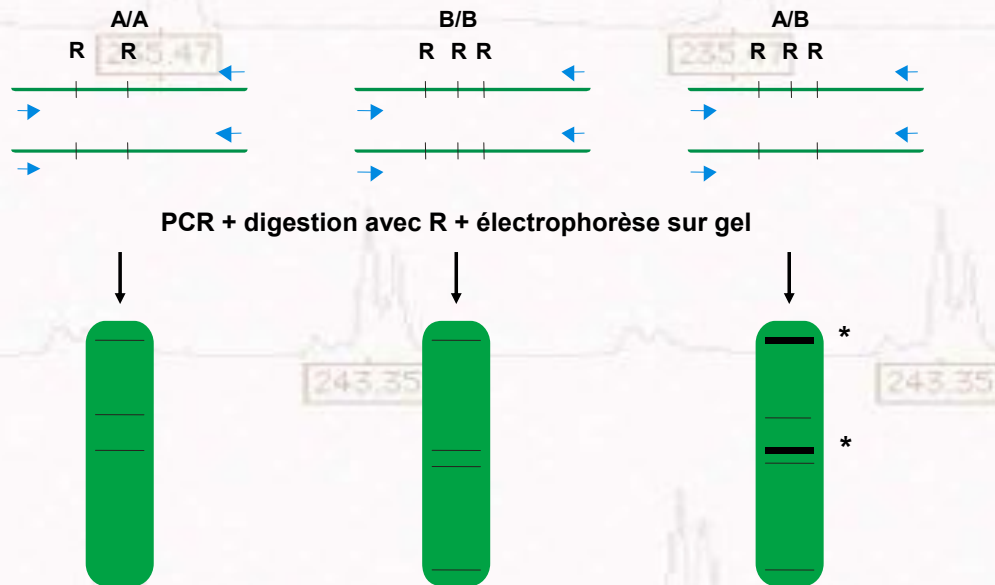
Once a polymorphism is identified with a particular restriction enzyme, the primers may be redesigned, based on the newly generated fragments, to optimise the detection and visualisation of the polymorphism.

Primers, when possible, should be chosen so that the PCR products are likely to include introns. This will increase the chances of obtaining polymorphisms.

Une fois un polymorphisme identifié avec une enzyme de restriction particulière, les amorces peuvent être redéfinies, sur la base des nouveaux fragments générés, afin d'optimiser la détection et la visualisation du polymorphisme.

Les amorces, quand c'est possible, doivent être choisies de façon à ce que les produits PCR incluent des introns. Cela va augmenter la probabilité d'obtenir des polymorphismes.

Générer des CAPS



D'après: Konieczny, A. and F.M. Ausubel. 1993. Plant J. 4(2):403-410.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 29

Dans cet exemple, des CAPS sont générés pour deux écotypes d'*Arabidopsis*.

En haut du schéma sont montrés les trois génotypes possibles: les deux écotypes homozygotes (A/A et B/B) et l'hétérozygote (A/B).

Si on réalise une PCR standard avec les amorces telles que celles dessinées (en bleu), aucun polymorphisme ne peut être détecté entre les trois génotypes.

On a pu identifier une enzyme de restriction susceptible de couper le fragment A deux fois et le fragment B trois fois. En conséquence, l'hétérozygote A/B devrait avoir une copie du fragment digéré deux fois et du fragment digérés trois fois.

Une PCR est alors réalisée et les produits digérés par l'enzyme de restriction spécifique mentionnée plus haut. La visualisation sur un gel d'agarose a montré trois fragments pour le génotype A/A, quatre fragments pour le génotype B/B, et sept fragments pour l'hétérozygote A/B. Le schéma montre seulement 5 fragments comme observé pour A/B, parce que deux des sept fragments (montrés par *) migrent à des distances similaires de celles des autres fragments.

Avantages et inconvénients

► Avantages:

- Technique robuste parce que l'on définit des amorces spécifiques longues
- Marqueurs co-dominants
- Bénéficie de marqueurs qui ont déjà été cartographiés
- Identifie du polymorphisme sur des marqueurs qui n'étaient pas informatifs jusqu'à présent

► Inconvénients:

- Requiert un minimum d'informations de séquence
- Requiert un effort et des dépenses supplémentaires pour définir des amorces spécifiques pour chaque locus

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 30

Amplification intermicrosatellite (Inter-simple sequence repeats: ISSRs)

- ▶ Ce sont les régions présentes entre les répétitions microsatellites
- ▶ La technique est basée sur l'amplification par PCR des séquences intermicrosatellite
- ▶ Du fait de l'abondance connue des séquences répétées réparties sur tout le génome, elle cible de multiples locus

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 31

Reference

Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.

Identification des polymorphismes ISSR

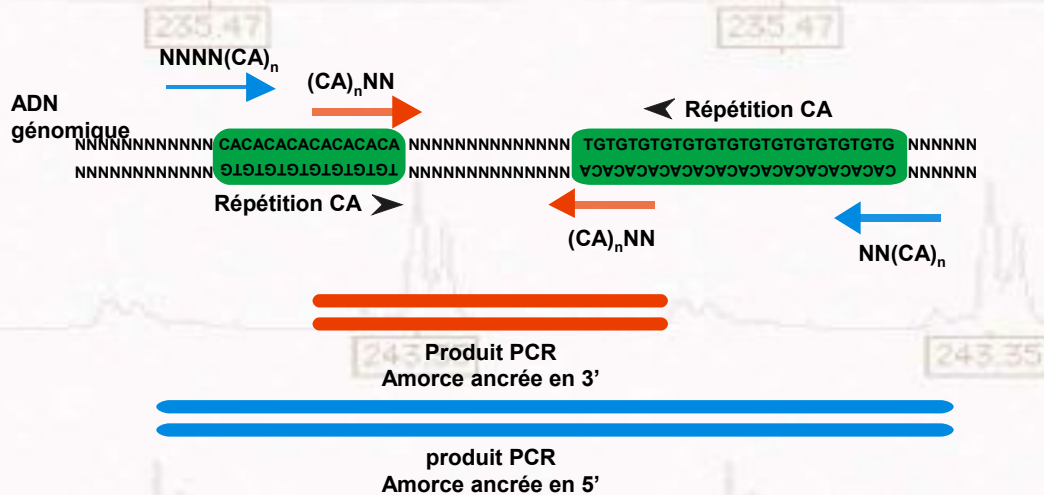
On réalise une PCR type, dans laquelle les amorces ont été définies à partir des séquences répétées des microsatellites, augmentées d'une ou plusieurs bases dans la séquence flanquante comme point d'ancrage. Différentes alternatives sont possibles:

- ▶ Une seule amorce est utilisée
- ▶ Deux amorces avec des caractéristiques similaires sont utilisées
- ▶ Des combinaisons de séquences microsatellite ancrées avec une amorce aléatoire (p.e. Celles utilisées pour les RAPD)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 32

Définition des amorces pour identifier du polymorphisme ISSR



D'après: Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genomics 20:176-183

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003

Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 33

Ce schéma représente trois aspects différents:

- La séquence d'ADN originale, dans laquelle deux séquences répétées différentes, (CA) en ordre inversé, sont identifiées. Les deux sections répétées sont, de plus, rapprochées l'une de l'autre
- Si les amorces étaient définies à partir des seules régions répétées, la région entre les répétitions serait amplifiée mais la spécificité de locus ne serait pas garantie. La seconde ligne montre un produit de PCR résultant de l'amplification à partir d'amorces ancrées en 3', (CA)_nNN à chaque extrémité de la région inter-répétitions. CA est la séquence répétée qui a été augmentée par NN, deux nucléotides présents dans la région inter-répétitions.
- Alternativement, l'ancrage peut être choisi dans la région 5'. Le produit PCR de la troisième ligne résulte de l'utilisation d'amorces basées sur la répétition CA mais avec des extensions à l'extrémité 5', respectivement NNN et NN.

Avantages et inconvénients

► Avantages:

- Ne requiert pas d'information de séquence préalable
- On peut trouver simultanément de la variation à plusieurs locus, dans des régions uniques du génome
- Tend à identifier des niveaux de variation significatifs
- Spécifique des séquences microsatellites
- Très utile pour caractériser des profils d'ADN, surtout pour des espèces très proches

► Inconvénients:

- Marqueurs dominants
- Peut nécessiter une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et une détection avec coloration à l'argent ou des radioisotopes.

En résumé

- ▶ L'utilisation des STS comme marqueurs repose sur une certaine connaissance de séquence. Les STS sont généralement codominants et très reproductibles
- ▶ Les SSR sont les types de STS les plus largement utilisés. Les SCAR, CAPS et ISSR en sont d'autres
- ▶ Les SSR sont de courtes répétitions en tandem, très variables et uniformément répartis sur le génome. Ces caractéristiques font des SSR un marqueur de choix pour les analyses de diversité génétique.
- ▶ Les polymorphismes dans les SSR sont causées par des différences dans le nombre d'unités répétées.

A ce stade vous devez savoir:

- ▶ Les caractéristiques des STS comme marqueurs
- ▶ Les différents types de marqueurs STS et leurs contrastes
- ▶ Les étapes impliquées dans l'identification de microsatellites, la définition d'amorces et la détection des polymorphismes
- ▶ Les propriétés des microsatellites pour les analyses de diversité génétique

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 36

Références de base

- Ajay, J., C. Apparanda and P.L. Bhalla. 1999. Evaluation of genetic diversity and genome fingerprinting of *Pandorea* (Bignoniaceae) by RAPD and inter-SSR PCR. *Genome* 42:714-719.
- Blair, M.W., O. Panaud and S.R. McCouch. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98:780-792.
- Brown, S.M. and S. Kresovich. 1996. Molecular characterization for plant genetic resources conservation. Pp. 85-93 in *Genome Mapping in Plants* (H. Paterson, ed.). RG Landes Company, Georgetown, TX.
- Buso, G.S.C., P.H.N. Rangel and M.E. Ferreira. 2001. Analysis of random and specific sequences of nuclear and cytoplasmic DNA in diploid and tetraploid American wild rice species (*Oryza* sp.). *Genome* 44:476-494.
- Hajeer, A., J. Worthington and S. John (eds.). 2000. *SNP and Microsatellite Genotyping: Markers for Genetic Analysis*. Biotechniques Molecular Laboratory Methods Series. Eaton Publishing, Manchester, UK.
- Joshi, S.P., V.S. Gupta, R.K. Aggarwal, P.K. Ranjekar and D.S. Brar. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.* 100:1311-1320.
- Kantety, R.V., X.P. Zeng, J.L. Bennetzen and B.E. Zehr. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Mol. Breed.* 1:365-373.
- Konieczny, A. and F.M. Ausubel. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 4(2):403-410.
- Lowe, A.J., J.R. Russell, W. Powell and I.K. Dawson. 1998. Identification and characterization of nuclear, cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) loci in *Irvingia gabonensis* and *I. wombolu*, indigenous fruit trees of west and central Africa. *Mol. Ecol.* 7(12):1786-1788.
- Morgante, M. and A.M. Olivieri. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3(1):175-182.
- Paran, I. and R.W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003

Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 37

Suite

Les technologies basées sur l'ADN **Les technologies basées sur la PCR** **Les stratégies les plus récentes**

- ▶ Technologies complémentaires
- ▶ Considérations finales
- ▶ Glossaire

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

STS 38

**Utilisation des marqueurs
moléculaires dans les études de
diversité des plantes :**

Module d'enseignement

Technologies basées sur l'ADN

Technologies basées sur la PCR

Les stratégies les plus récentes

(Séquençage d'ADN, EST, puces à ADN, DArT, SNP)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

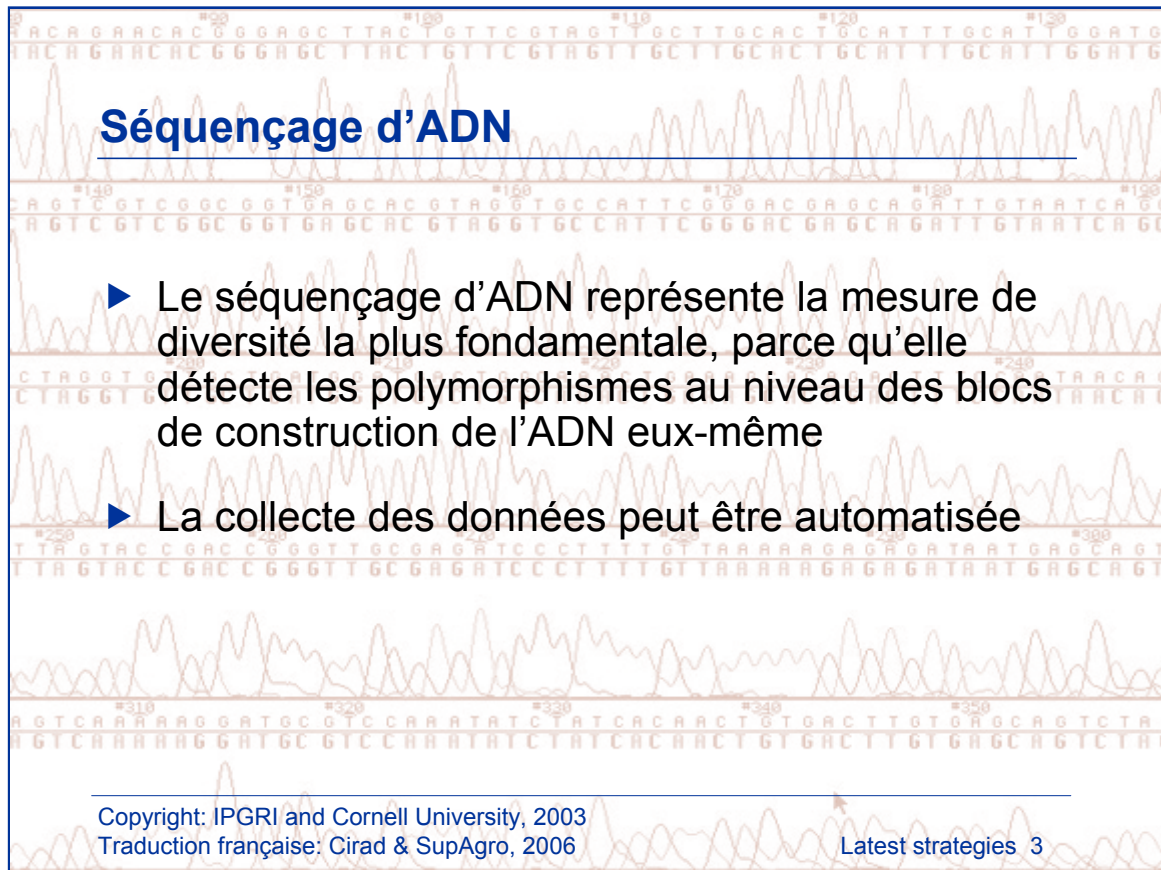
Latest strategies 1

Sommaire

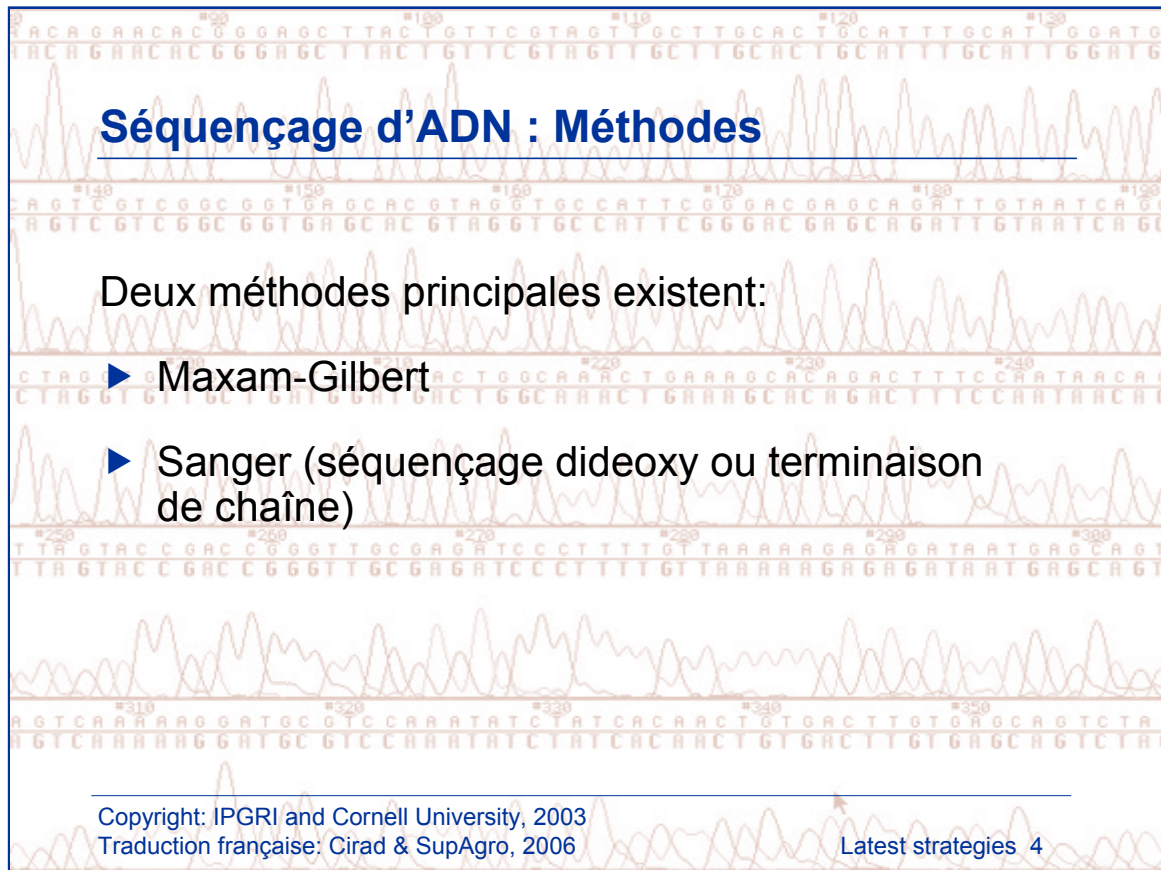
- ▶ Séquençage d'ADN
- ▶ Etiquettes de séquences exprimées (Expressed sequence tags: ESTs)
- ▶ Technologie des puces à ADN
- ▶ Les puces de diversité (Diversity array technology : DArT)
- ▶ Les polymorphismes de simple base (Single nucleotide polymorphisms: SNP)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 2



Le séquençage d'ADN permet la mesure de diversité la plus fondamentale possible, car tous les marqueurs sont dérivés de polymorphismes dans les blocs de construction de l'ADN, c'est à dire la séquence des nucléotides d'un segment particulier d'ADN. La technologie de séquençage a été grandement améliorée dans les dernières années, et maintenant des produits PCR (une région d'ADN amplifiée en quantité suffisante) peuvent être séquencés directement et cibler toute région génomique d'intérêt. La collecte des données peut être automatisée.



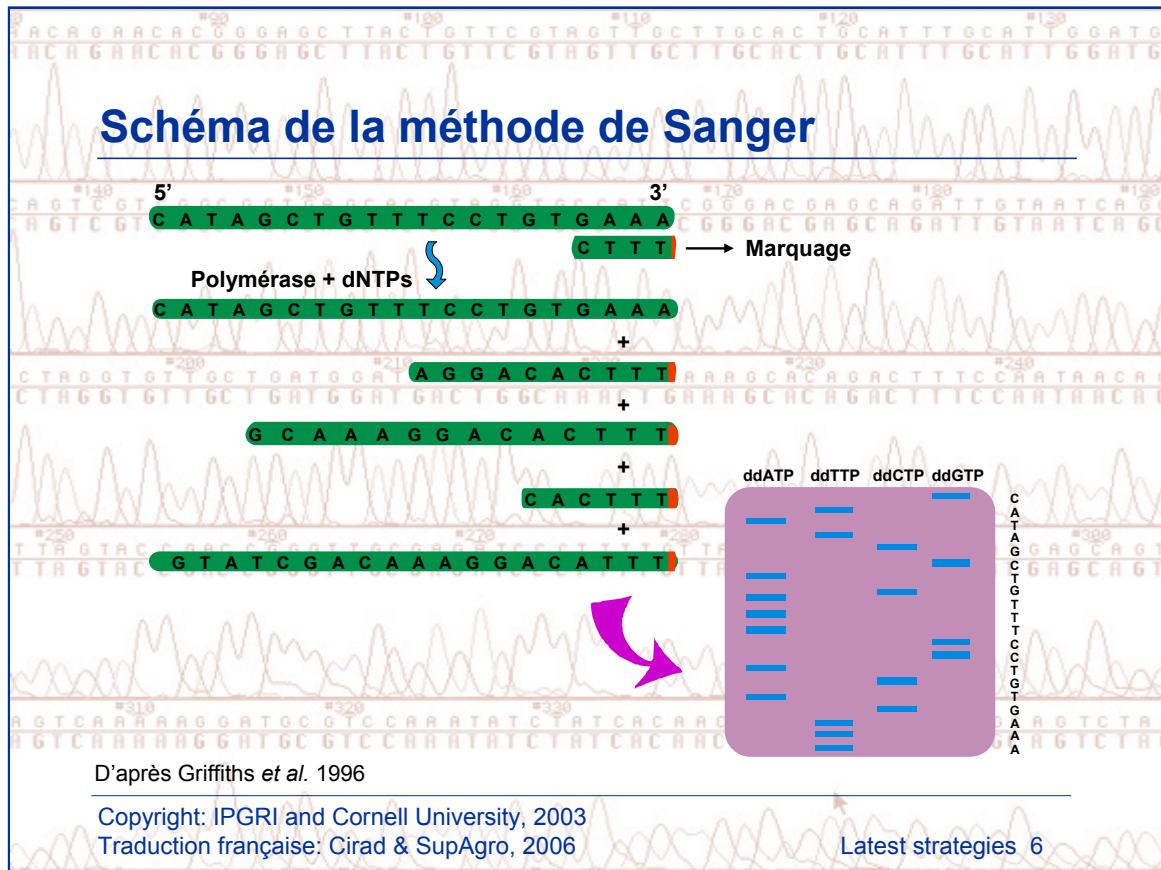
Les deux méthodes diffèrent légèrement, la méthode de Sanger (décrite dans la diapositive 6) étant plus facile à automatiser, et de ce fait plus largement utilisée.

Séquençage d'ADN : Procédures

- ▶ L'ADN est coupé en fragments, qui sont ensuite sous-clonés
- ▶ Chaque petit morceau est utilisé comme matrice pour générer un ensemble de fragments qui diffèrent en longueur l'un de l'autre par une seule base.
- ▶ Les fragments sont séparés par gel d'électrophorèse
- ▶ La base terminant chaque fragment est identifiée ('base-calling'). La séquence originale des A, T, C et G est recrée pour chaque petit morceau généré dans la première étape
- ▶ Les petites séquences sont assemblées en une séquence plus longue.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 5



Des marqueurs fluorescents de différentes couleurs peuvent être utilisés, permettant la séparation des fragments terminés par chacune des quatre bases dans une seule piste du gel et augmentant grandement l'efficacité du système. Des séquenceurs automatiques peuvent analyser les électrophorégrammes correspondant pour produire un chromatogramme en quatre couleurs qui montre les pics représentant chacune des quatre bases de l'ADN.

Séquençage d'ADN : Avantages et inconvénients

► Avantages:

- Les résultats sont très reproductibles
- Un contenu informatif maximal

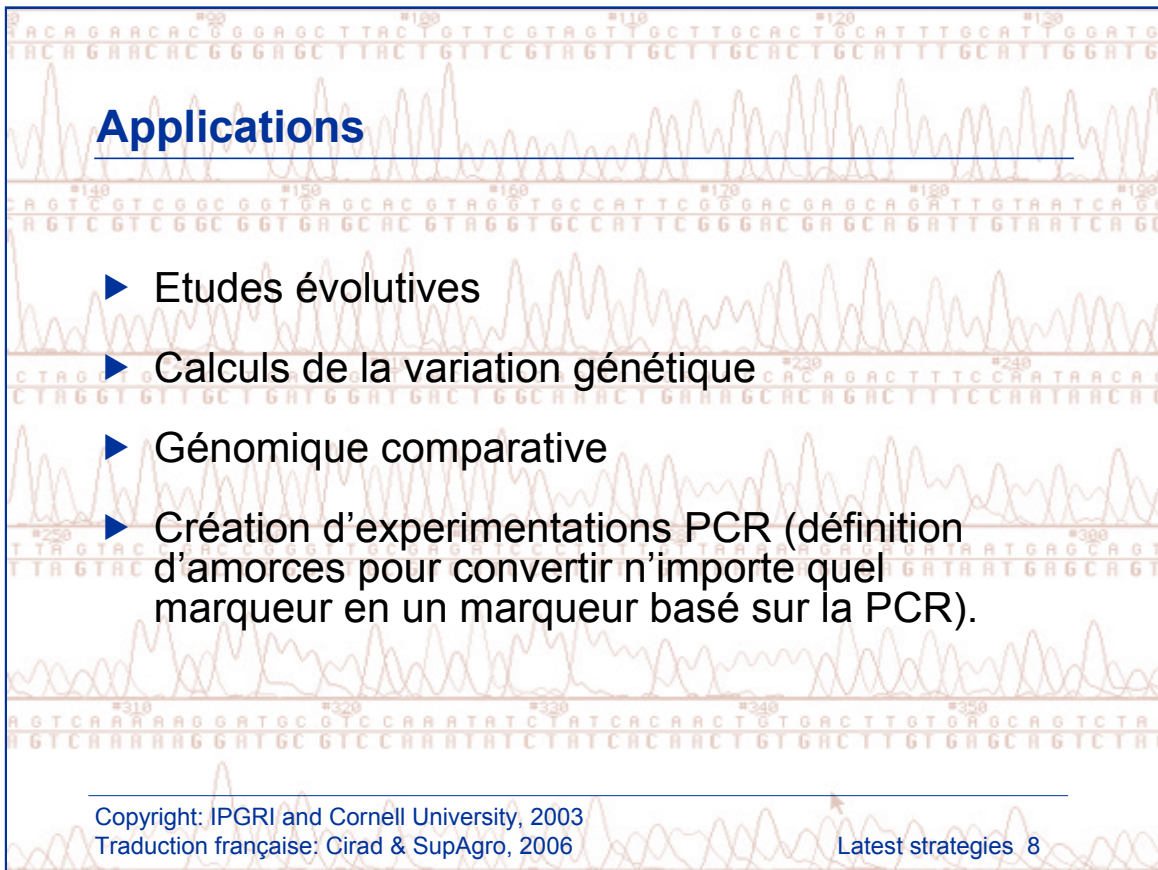
► Inconvénients:

- Un coût toujours élevé
- Demande une technicité élevée

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 7

Les résultats sont, bien sûr, très hautement reproductibles et informatifs. Les coûts sont cependant élevés, et cette technique requiert un haut niveau d'expertise technique, la rendant inaccessible pour beaucoup de chercheurs. L'utilisation de la PCR pour cibler des régions particulières d'ADN et la disponibilité de séquenceurs automatiques ont réduit les difficultés techniques, mais le processus est toujours coûteux, particulièrement dans sa partie développement.



Applications

- ▶ Etudes évolutives
- ▶ Calculs de la variation génétique
- ▶ Génomique comparative
- ▶ Création d'experimentations PCR (définition d'amorces pour convertir n'importe quel marqueur en un marqueur basé sur la PCR).

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 8

Reference

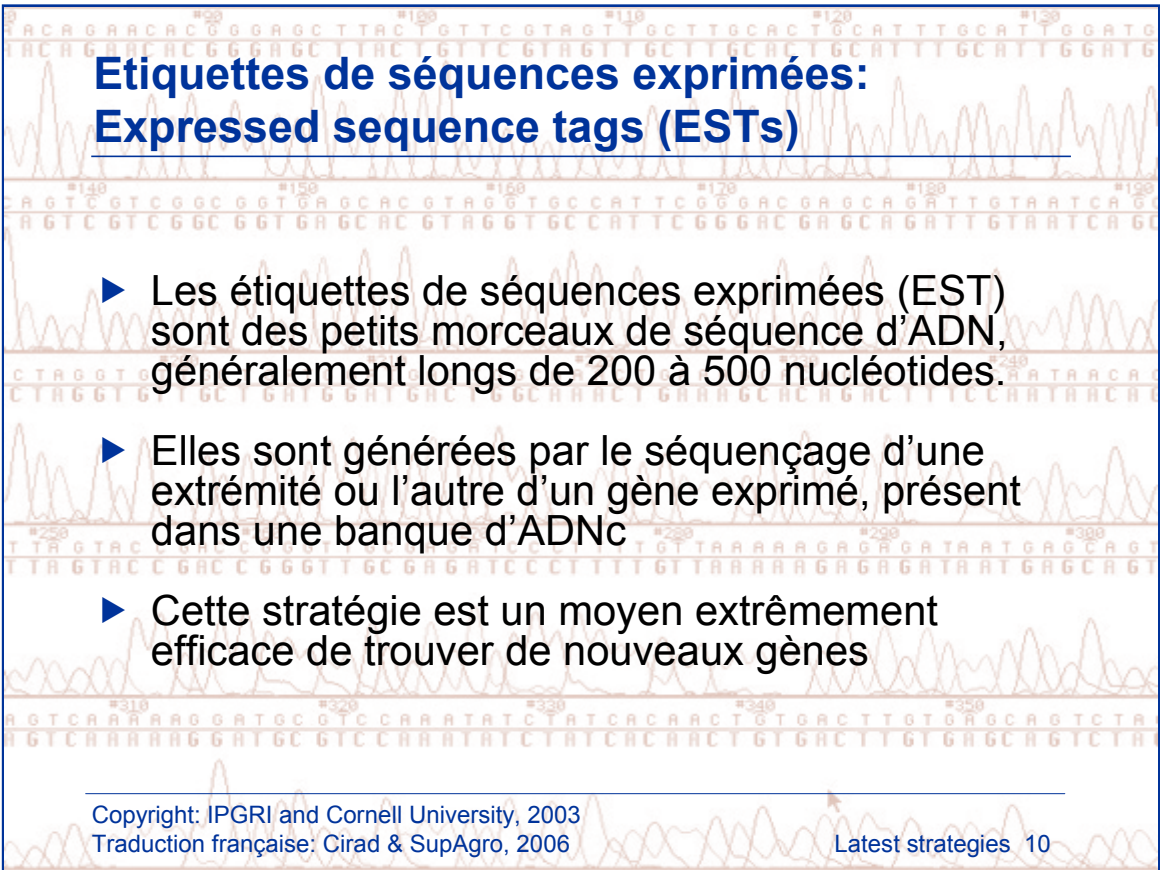
8

Références de base

Maxam, A.M. and W. Gilbert. 1977. A new method for sequencing DNA. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 74:560-564.

Sanger, F. 1988. Sequences, sequences and sequences. Annu. Rev. Biochem. 57:1-28.

Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 74:5463-5468.



Étiquettes de séquences exprimées: Expressed sequence tags (ESTs)

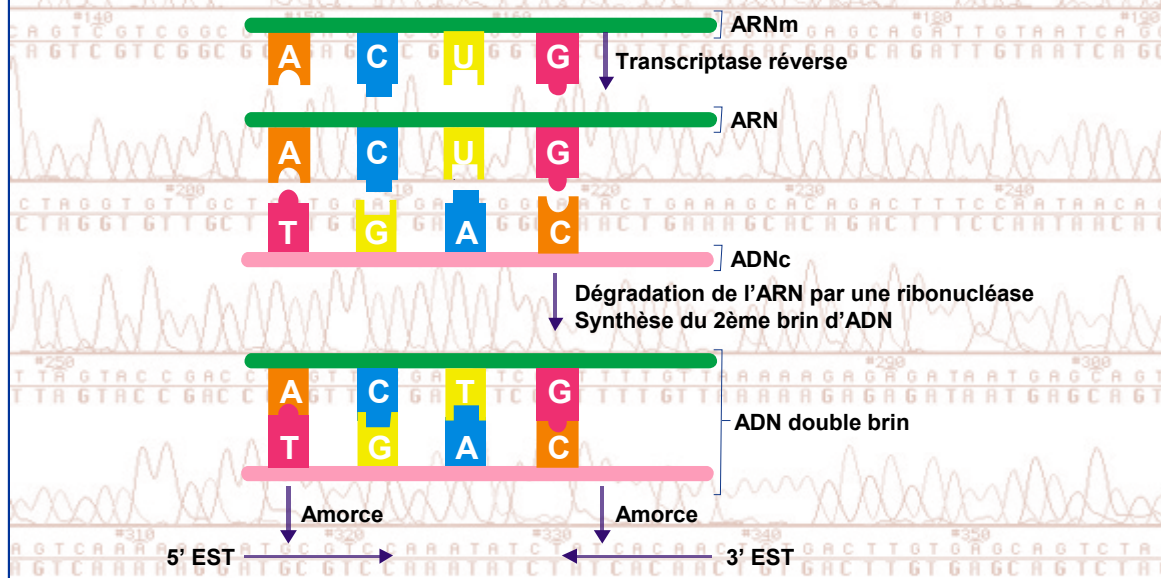
- ▶ Les étiquettes de séquences exprimées (EST) sont des petits morceaux de séquence d'ADN, généralement longs de 200 à 500 nucléotides.
- ▶ Elles sont générées par le séquençage d'une extrémité ou l'autre d'un gène exprimé, présent dans une banque d'ADNc
- ▶ Cette stratégie est un moyen extrêmement efficace de trouver de nouveaux gènes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 10

Le nombre d'EST de plantes disponibles publiquement a augmenté de façon dramatique dans les dernières années jusqu'à plus de 1.000.000 fin 2001 (Rapport du National Plant Genome Initiative Progress, Décembre 2001). Une liste des bases de données d'EST pour de nombreuses plantes peut être trouvée à l'adresse:
<http://www.ostp.gov/NSTC/html/mpgi2001/building.htm>

Définition des amorces d'EST



<http://www.ostp.gov/NSTC/html/mpgi2001/building.htm>

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003

Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 11

EST: Avantages et inconvénients

► Avantages:

- Très bons marqueurs génétiques
- Codominants
- Les séquences peuvent être générées rapidement
- Source efficace de séquences dont on peut dériver des amorces pour des SSR

► Inconvénients:

- L'extraction d'ARNm peut être difficile
- Les introns, qui peuvent contenir des informations importantes, ne font pas partie de l'ADNc

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 12

ESTs: Applications

Les applications des EST sont toutes basées sur le fait qu'elles proviennent de segments de séquences de gènes

- ▶ Comparaison de la diversité des gènes dans différents organismes
- ▶ Etudes d'évolution de gènes
- ▶ Recherche d'orthologues potentiels dans les bases de données
- ▶ Sondes pour des études d'expression
- ▶ Détection de SNPs*

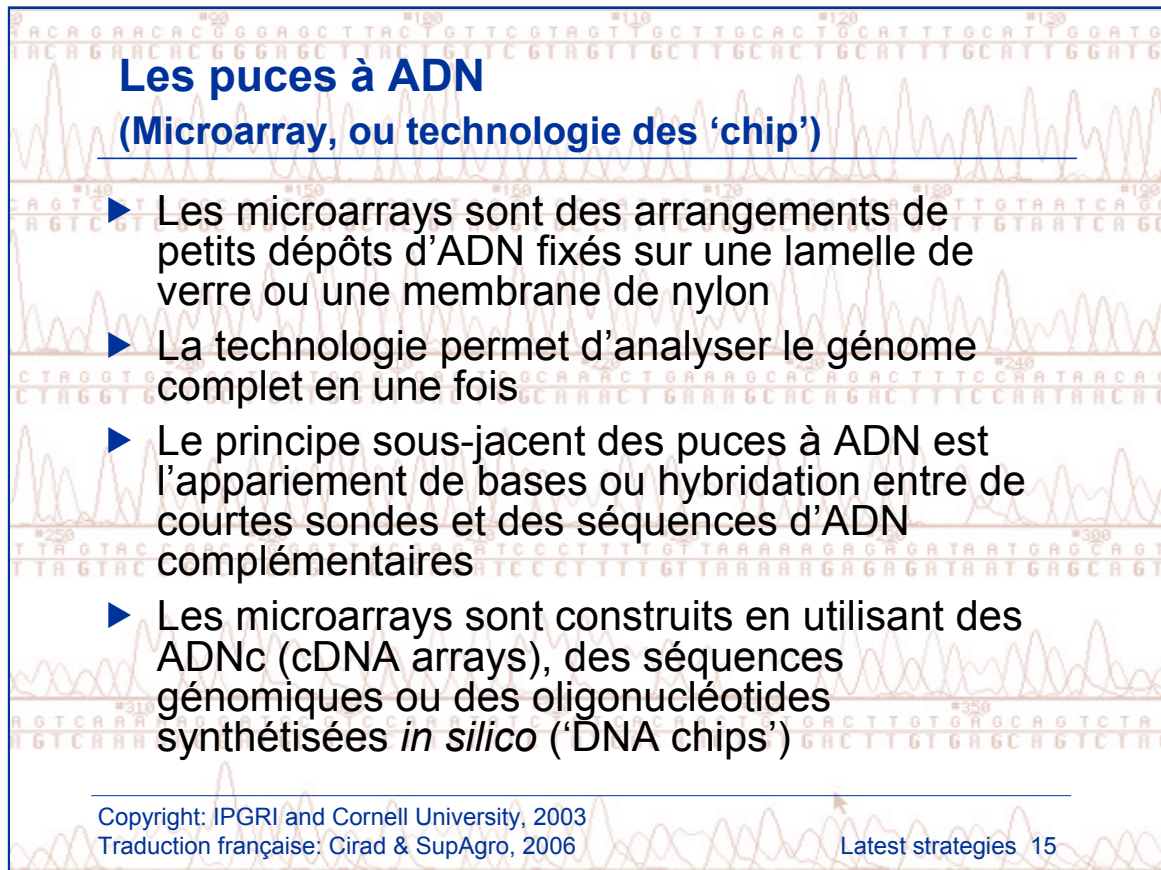
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 13

*Voir la section qui commence diapositive 29.

Référence de base

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2001. ESTs:
gene discovery made easier.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/est.html>



Les puces à ADN (Microarray, ou technologie des 'chip')

- ▶ Les microarrays sont des arrangements de petits dépôts d'ADN fixés sur une lamelle de verre ou une membrane de nylon
- ▶ La technologie permet d'analyser le génome complet en une fois
- ▶ Le principe sous-jacent des puces à ADN est l'appariement de bases ou hybridation entre de courtes sondes et des séquences d'ADN complémentaires
- ▶ Les microarrays sont construits en utilisant des ADNc (cDNA arrays), des séquences génomiques ou des oligonucléotides synthétisées *in silico* ('DNA chips')

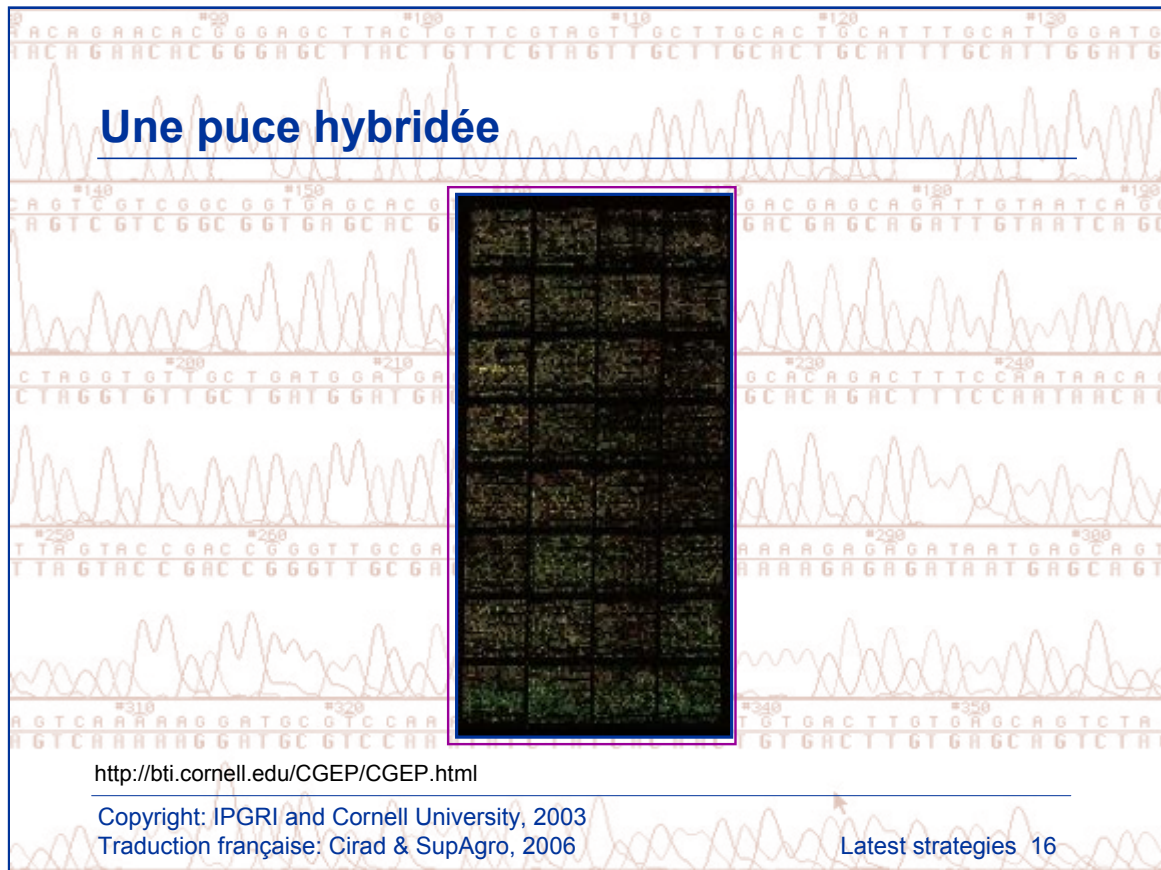
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 15

Les génomes peuvent être maintenant analysés à l'échelle du génome dans sa globalité, en utilisant la technologie des puces à ADN (également appelés microarrays, ou "chip"). Cette technologie est basée sur l'hybridation entre des petites sondes oligonucléotidiques et des séquences d'ADN complémentaires. Des dizaines de milliers d'échantillons peuvent être immobilisés sur une petite plaque de verre (plus fréquemment) ou une petite surface de nylon (chip), et peuvent être hybridés plus d'une fois avec différentes sondes ou cibles (la terminologie n'est pas très cohérente et l'ADN immobilisé sur la puce est appelé soit cible, soit sonde). Plus d'une sonde peut être hybridée dans la même expérience, par exemple pour comparer des différences d'expression, en les marquant avec des fluorophores de couleurs différentes.

Des logiciels spécifiques génèrent les données automatiquement. Les puces à ADN peuvent être utilisées pour des diagnostics, pour étudier l'expression des gènes et pour la cartographie génétique, entre autres choses. Cependant, la technologie est encore relativement chère, spécialement à mettre au point, et la quantité de données générées peut être impressionnante.

Comme références utiles, voir Richmond and Somerville (2000) et Brown and Botstein (1999) à la fin de ce sous-module (diapositive 19).



Par courtoisie de Mark D'Ascenzo, Boyce Thompson Institute for Plant Research, Center for Gene Expression Profiling, Cornell University.

Puces à ADN: Avantages et inconvénients

► Avantages:

- Technologie haut-débit
- Balayage du génome complet
- Permet la découverte de relations génotype-phénotype

► Inconvénients:

- La séquence des gènes doit être disponible
- Coûteuse
- Exigente techniquement
- La quantité et le type de données produites requièrent une expertise et un investissement informatique importants

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 17

Puces à ADN: Applications

- ▶ Identification de séquence (gène ou mutation de gène)
- ▶ Détermination du niveau d'expression de gènes
 - Analyse de l'abondance de séquences d'ADN génomique spécifiques
 - Analyse de l'expression de très grandes quantités de gènes (cDNA arrays)
 - Identification d'un grand nombre de marqueurs ADN spécifiques (p.e. single nucleotide polymorphisms ou SNP) par hybridation moléculaire (puces d'oligonucléotides synthétiques)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

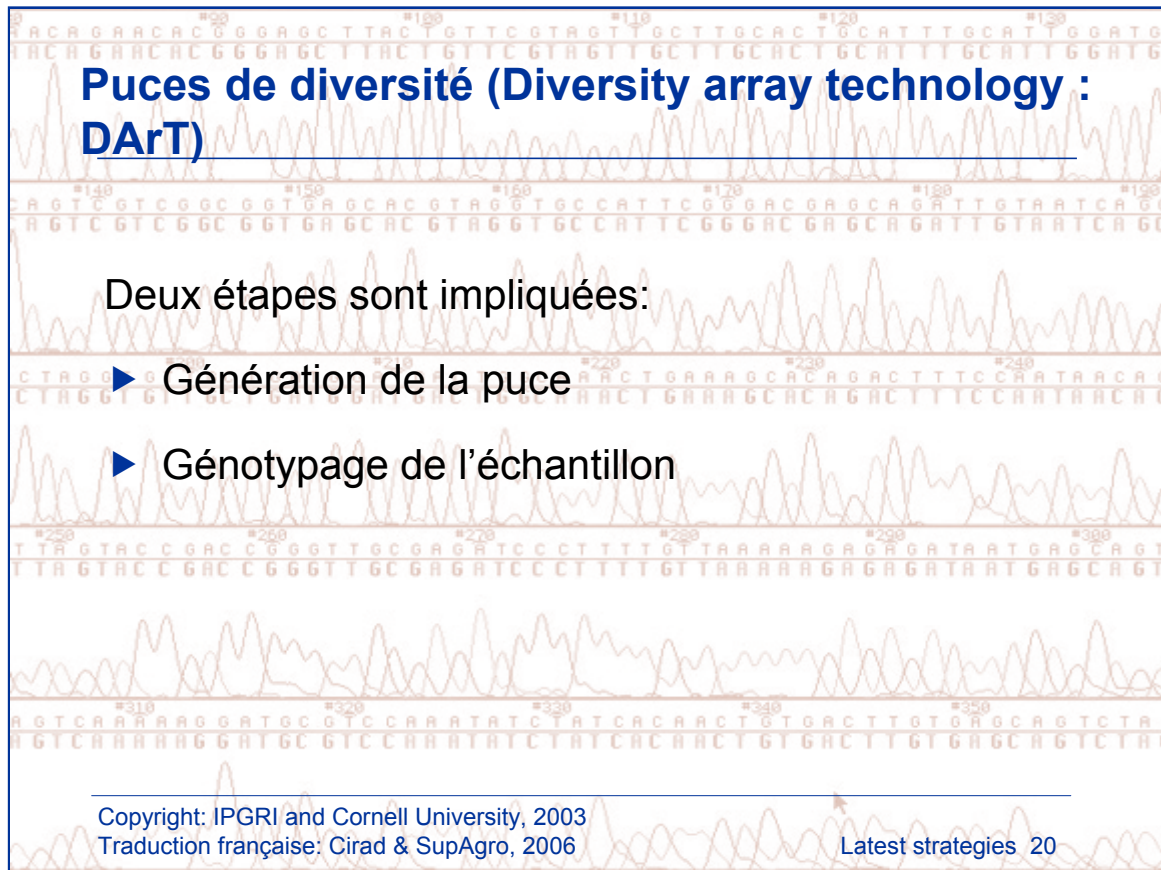
Latest strategies 18

Références de base

Alscher, R. 2001. Grid it: resources for microarray research.
<http://www.bsi.vt.edu/ralscher/gridit/>

Brown, P.O. and D. Botstein. 1999. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genet.* 21(supp):33-37.

Richmond, T. and S. Somerville. 2000. Chasing the dream: plant EST microarrays. *Current Opinion Plant Biol.* 3(2):108-116.



Les puces de diversité, aussi appelées DArT (Diversity arrays), ont été développées par DArT technology (CAMBIA). Cette technologie implique une nouvelle utilisation des puces à ADN qui ne requiert pas de connaissance de séquence, et en cela peut devenir très utile pour les chercheurs dans le domaine de la sélection.

Les diapositives qui suivent sur les DArT ont été prises, avec autorisation préalable, du site internet de CAMBIA: <http://www.cambia.org.au/>

Référence

CAMBIA. 2000. Enabling innovation. <http://www.cambia.org/>

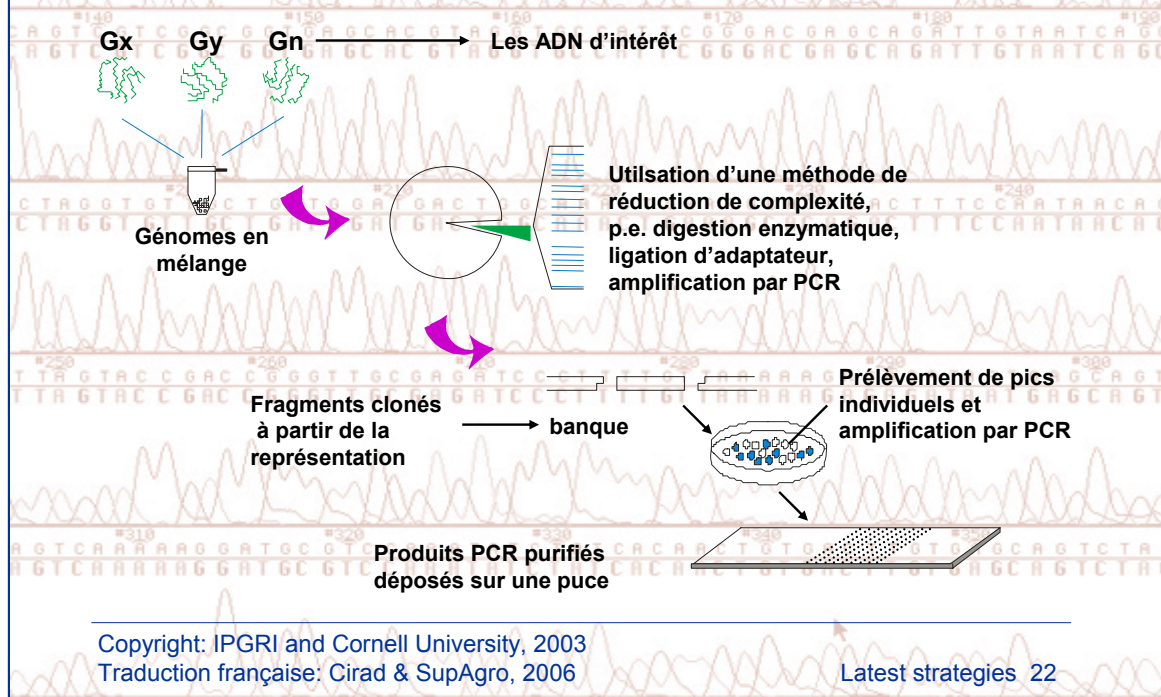
DArT: Préparation de la puce (1)

- ▶ Des fragments générés par restriction et représentant la diversité d'un groupe de diversité sont clonés. Cette sortie est appelée 'représentation' (typiquement 0.1% à 10% du génome)
- ▶ Les clones polymorphes dans la banque sont identifiés en placant sur une puce des inserts d'un ensemble aléatoire de clones et en hybridant la puce avec différents échantillons
- ▶ Les inserts des clones polymorphes sont immobilisés sur une puce

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 21

DArT: Préparation de la puce (2)



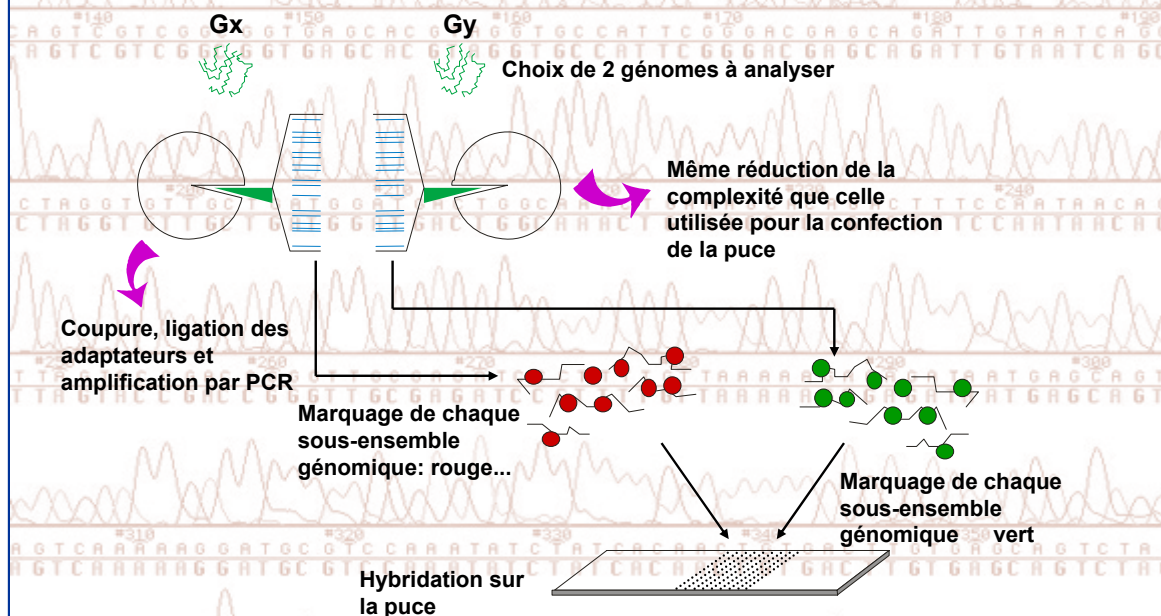
DArT: Génotypage d'un échantillon (1)

- ▶ On marque la représentation (ADN) de l'échantillon par fluorescence et on l'hybride contre la puce
- ▶ On scanne la puce et on mesure, pour chaque dépôt de la puce, la quantité du signal d'hybridation
- ▶ En utilisant des marquages multiples, on compare la représentation d'un échantillon avec la représentation d'un autre, ou avec une sonde de contrôle

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 23

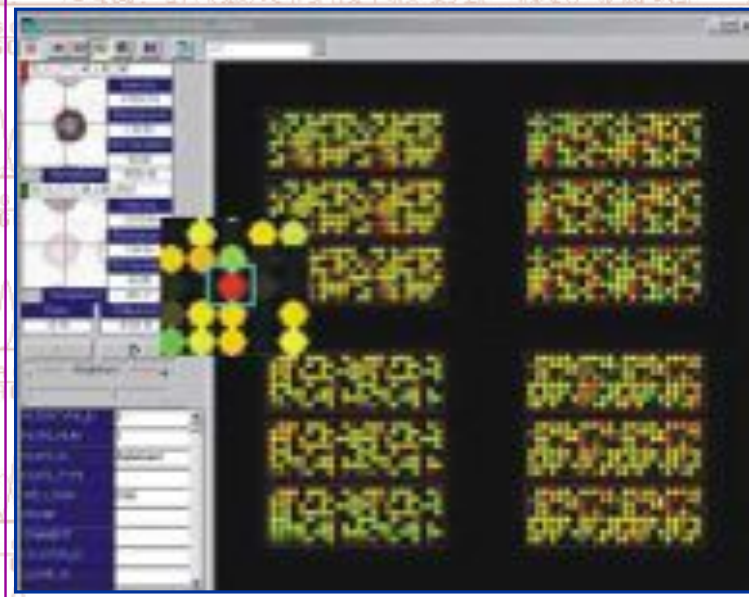
DArT: Génotypage d'un échantillon (2)



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 24

Une puce DArT hybridée



Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 25

DArT: Avantages et inconvénients

► Avantages:

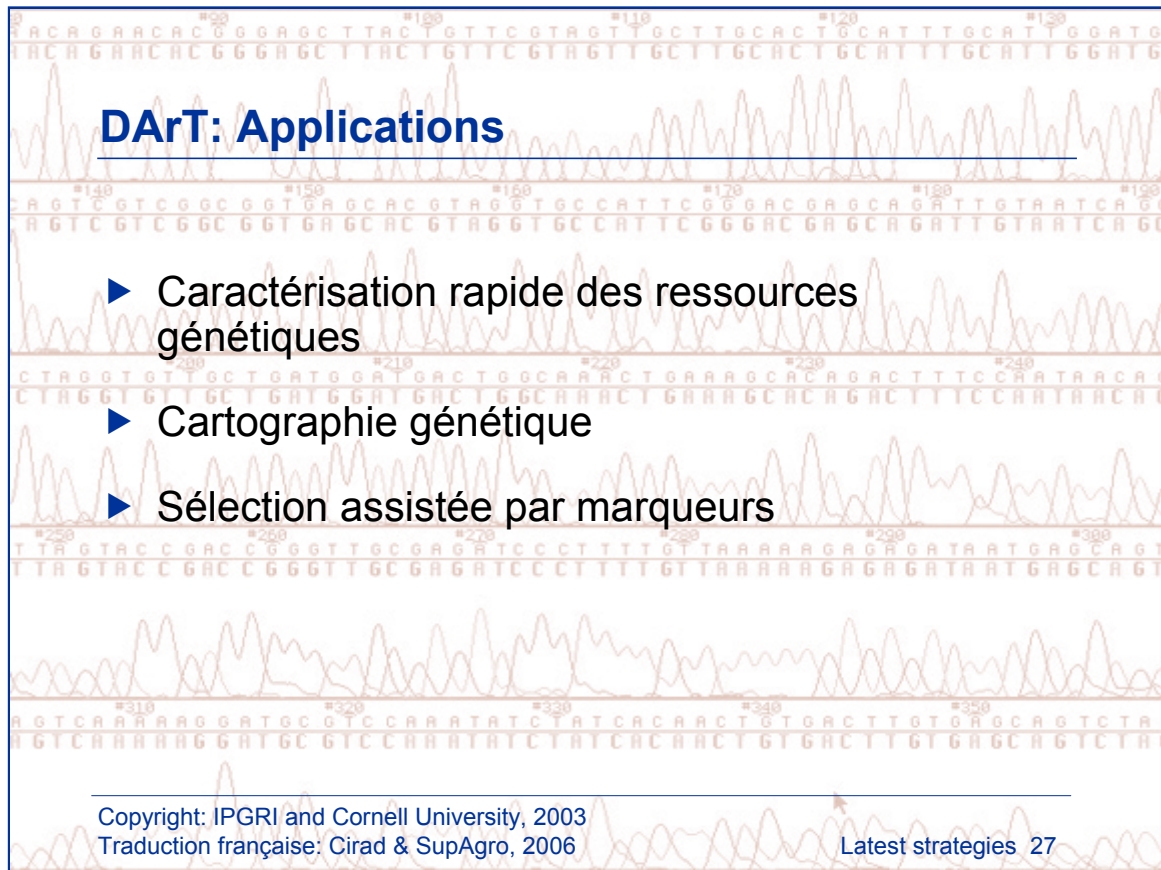
- Ne requiert pas d'information de séquence
- Haut débit
- Acquisition des données et analyse rapides
- Détecte des changements de base simple de même que des insertions ou des délétions
- Détecte des différences dans la méthylation de l'ADN, en fonction de l'enzyme utilisée pour générer des fragments
- Génère des clones prêts à séquencer
- Requiert une faible quantité d'ADN
- Bonne transférabilité des marqueurs dans des populations de sélection
- Possibilité d'automatisation complète

► Inconvénients:

- Dominance des marqueurs
- Exigence technique

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 26



Référence

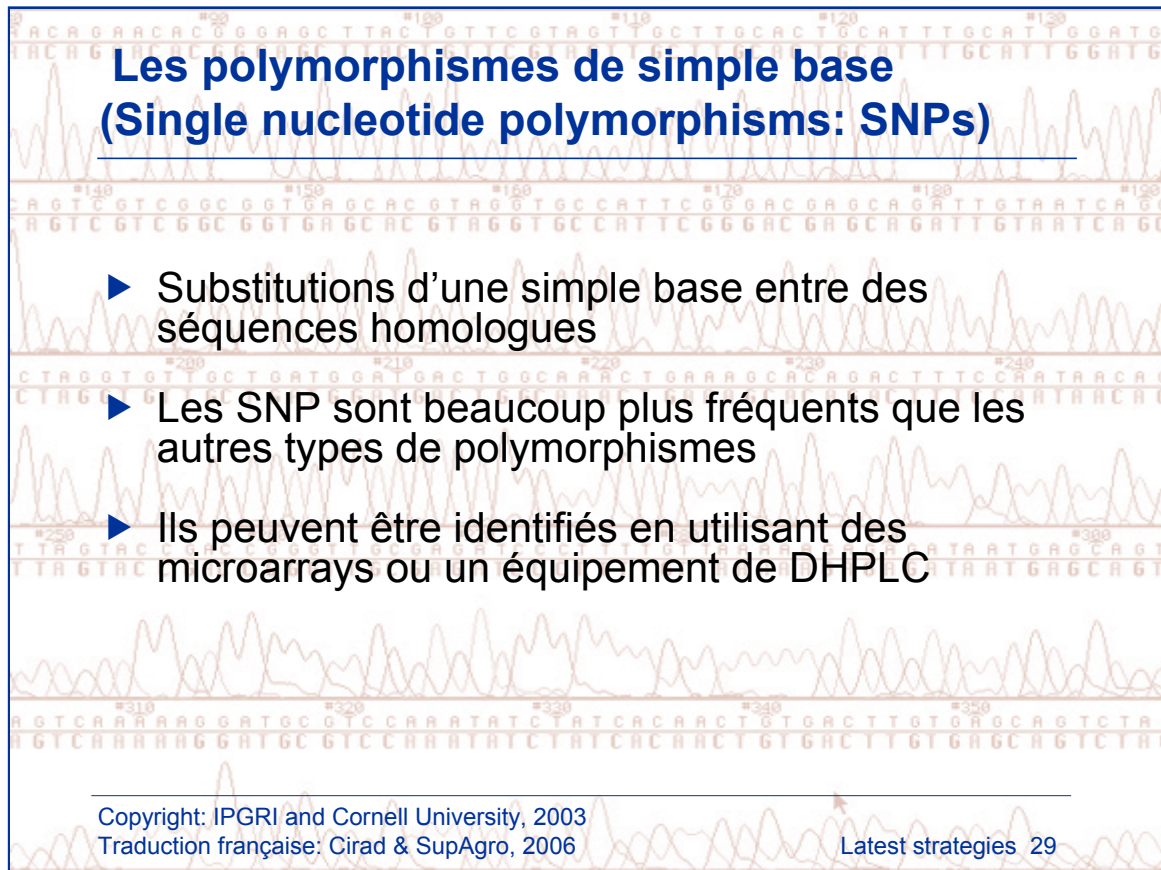
Jaccoud, D., K. Peng, D. Feinstein and A. Kilian. 2001. Diversity arrays: a solid-state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res.* 29(4):E25.

Références de base

CAMBIA. 2000. Enabling innovation. <http://www.cambia.org/>

Jaccoud, D., K. Peng, D. Feinstein and A. Kilian. 2001. Diversity arrays: a solid-state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research* 29 (4):E25.

Site internet présentant les DArT: www.diversityarrays.com



A newer type of marker that has now been made available through new sequencing technologies is single nucleotide polymorphisms (SNPs). These polymorphisms are single-base substitutions between sequences. SNPs occur more frequently than any other type of marker, and are very near to or even within the gene of interest.

SNPs can be identified by either using microarrays or DHPLC machines.

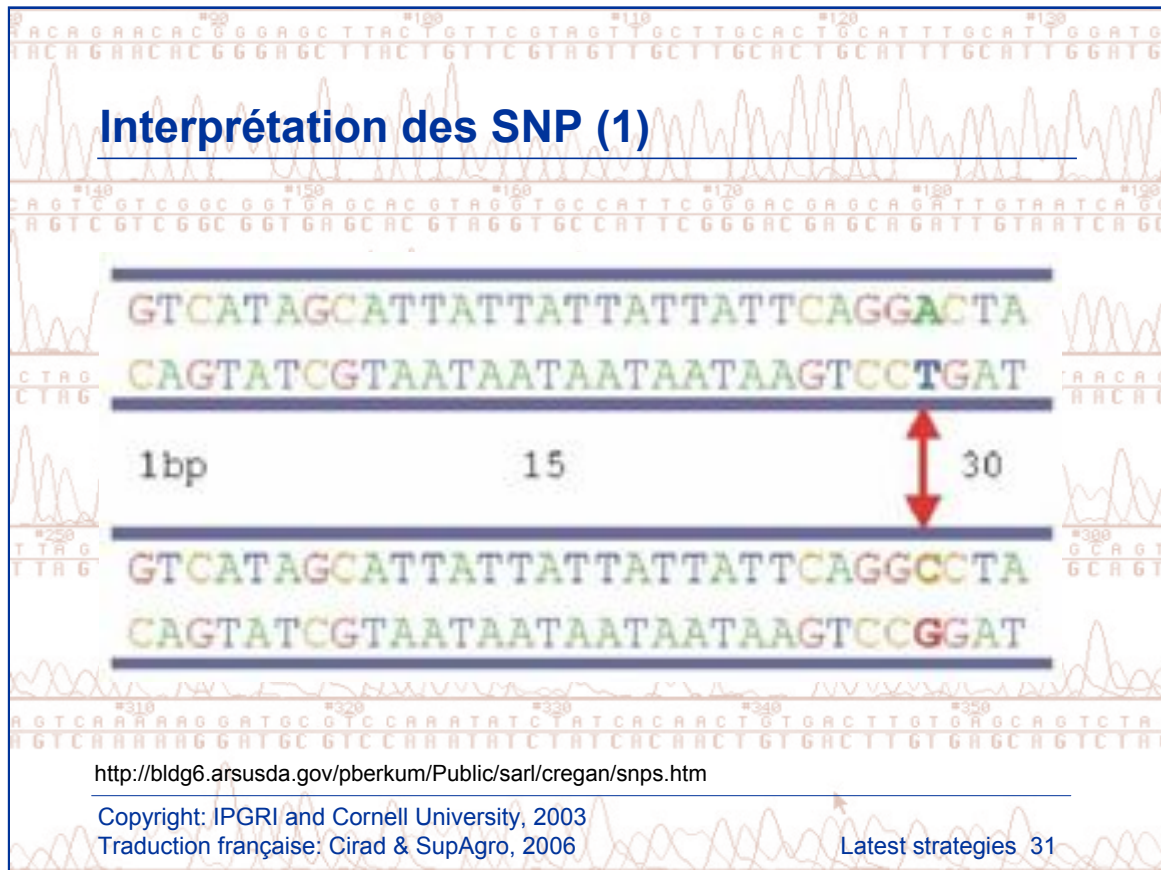
Equipement DHPLC



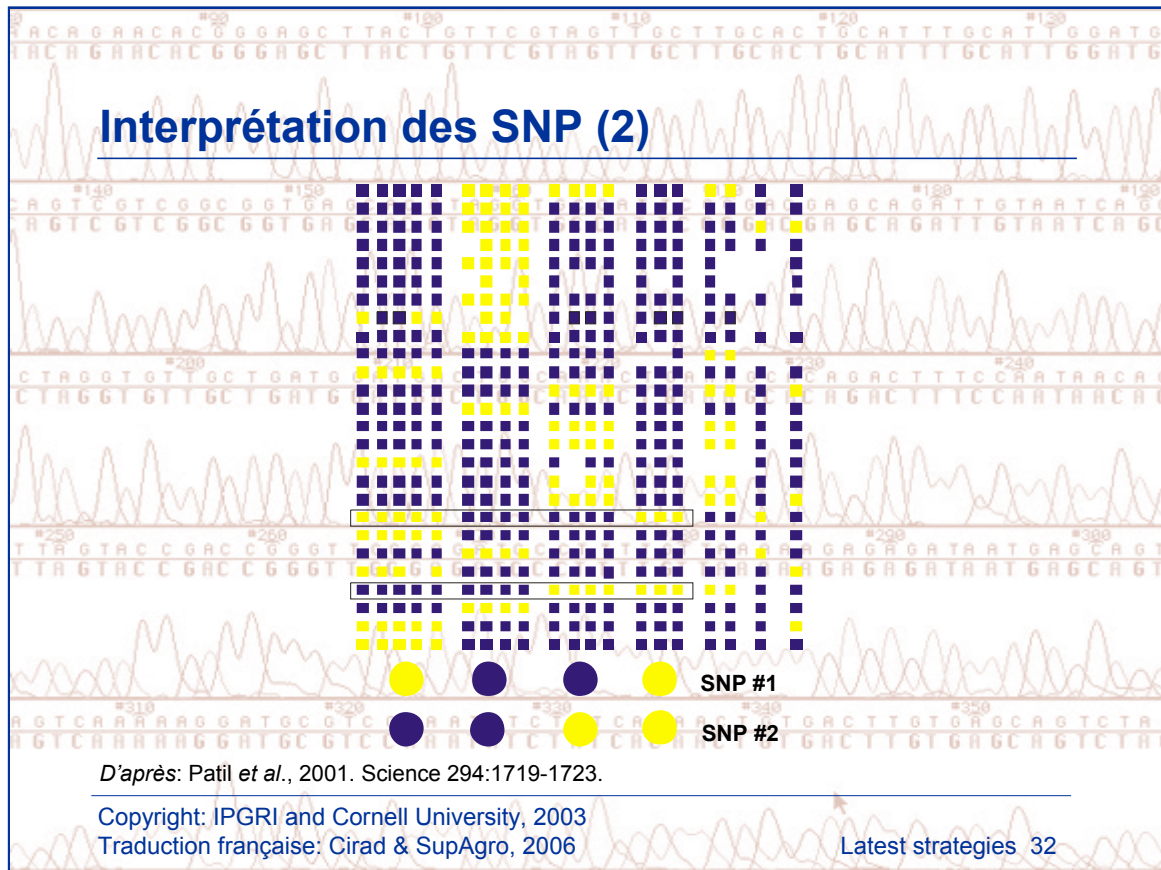
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 30

DHPLC signifie “denaturing high-performance liquid chromatography”, chromatographie liquide dénaturante haute performance, utilisée pour visualiser les SNP.



Le schéma montrant un polymorphisme de simple base présente deux fragments d'ADN (en haut et en bas) qui partagent la même séquence pour 31 paires de base, à l'exception d'une seule. En position 28, un A-T (en haut) s'est transformé en C-G (en bas)



La hauteur du bloc représente une fibre d'ADN dans un chromosome. Chaque colonne de petits carrés représente la même section d'ADN dans un individu génotypé différent. Chaque ligne de carrés jaunes ou bleus représente un SNP. Les carrés bleus dans chaque ligne représentent l'allèle majeur pour ce SNP, et les carrés jaunes représentent l'allèle mineur. L'absence d'un carré à n'importe quelle position dans une ligne indique une donnée manquante.

Dans ce bloc, 26 SNP communs peuvent être identifiés. Ils peuvent être arrangés en sept profils d'haplotype différents (5, 4, 4, 3, 2, 1 et 1 génotypes). Les quatre profils les plus communs incluent 16 des 20 chromosomes échantillonnés. Les ronds bleus et jaunes indiquent le profil allélique de deux SNP (entourés d'une ligne), qui distinguent sans ambiguïté les quatre haplotypes communs dans le bloc.

Reference

Patil, N., A.J. Berno, D.A. Hinds, W.A. Barret, J.M. Doshi, C.R. Hacker, and others. 2001. Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. *Science* 294:1719-1723.

En résumé

- ▶ Des stratégies sont développées continuellement pour améliorer la détection des polymorphismes
- ▶ Le séquençage de l'ADN permet la détection de variation à l'échelle du nucléotide elle-même
- ▶ Les EST sont des outils puissants pour détecter de la diversité dans des régions codantes
- ▶ Les puces à ADN (microarrays) et les DArT permettent l'analyse simultanée de nombreux locus
- ▶ Les SNP sont des substitutions d'une simple base entre séquences, et représentent le variant d'ADN le plus fréquent

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 33

A ce stade vous devez savoir:

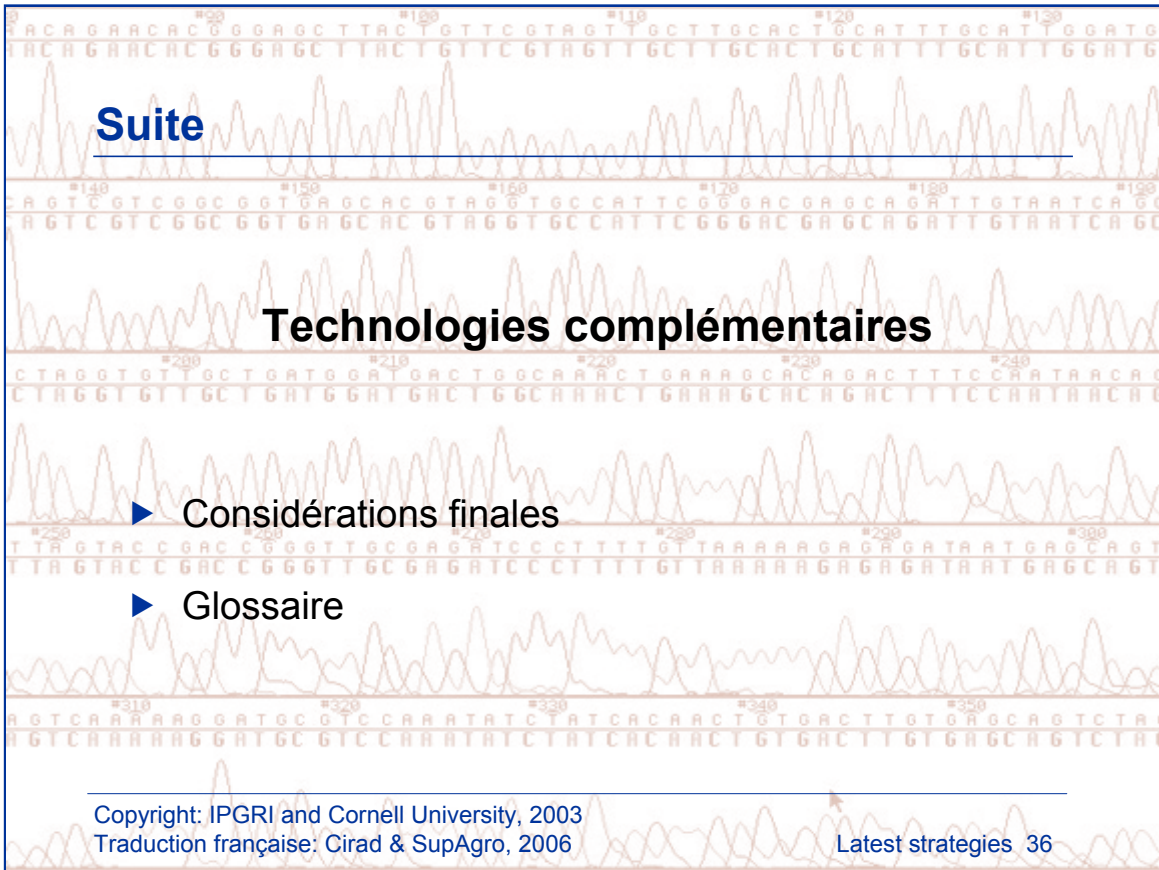
- ▶ Les différents types de variation d'ADN qui peuvent être détectés par séquençage, EST et SNP
- ▶ Le principe sous-jacent des puces à ADN et DArT
- ▶ Les avantages et inconvénients des technologies les plus récentes pour l'analyse de la diversité génétique.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 34

Références de base

- Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin and W.M. Gelbart. 1996. An introduction to genetic analysis (6th edn.). W.H. Freeman and Co., NY.
- Hajeer, A., J. Worthington and S. John (eds.). 2000. SNP and Microsatellite Genotyping: Markers for Genetic Analysis. Biotechniques Molecular Laboratory Methods Series. Eaton Publishing, Manchester, UK.
- USDA-ARS. 1999. The Cregan lab.
<http://bldg6.arsusda.gov/pberkum/Public/sarl/cregan/snps.htm>
- Wang, D.G., J.B. Fan, C.J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, and others. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280(5366):1077-1082.



Suite

Technologies complémentaires

- Considérations finales
- Glossaire

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Latest strategies 36

**Utilisation des marqueurs
moléculaires dans les études de
diversité des plantes :
Module d'enseignement**

**Technologies
complémentaires**

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Complementary technologies 1

Sommaire

- ▶ Introduction
- ▶ Electrophorèse en gel de gradient dénaturant (Denaturing gradient gel electrophoresis:DGGE)
- ▶ Electrophorèse en gel à gradient de température (Thermal gradient gel electrophoresis:TGGE)
- ▶ Polymorphisme de conformation simple brin (Single-stranded conformational polymorphism: SSCP)
- ▶ Analyse en hétéroduplex
- ▶ Chromatographie liquide dénaturante haute performance (Denaturing high-performance liquid chromatography: DHPLC)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Complementary technologies 2

Introduction

- ▶ Diverses technologies servent à montrer la présence de différences de séquence
- ▶ Elles aident à restreindre les possibilités de ce qu'il est nécessaire de séquencer (Y a-t'il un polymorphisme qui mérite d'être séquencé?)
- ▶ Mais elles n'identifient pas ce que sont ces différences de séquence.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Complementary technologies 3

Quand on regarde les différences dans la séquence d'ADN, on doit pouvoir séparer des segments d'ADN spécifiques d'un mélange tel que le génome complet.

L'électrophorèse sépare les molécules dans un champ électrique sur la base de la charge, de la taille et de la forme. Si une molécule d'ADN est coupée en petites sections et placée dans un puit à une extrémité (cathode) d'un gel d'agarose, les fragments vont migrer dans le gel vers l'anode. Leur vitesse va dépendre de leurs tailles individuelles, et de ce fait ils finiront par former des bandes localisées en différentes positions dans le gel. La bande peut alors être visualisée par le bromure d'éthidium qui permet à l'ADN de fluorescer sous lumière UV.

Le même résultat peut être obtenu par électrophorèse dans un gel d'acrylamide, la différence résidant dans la résolution. L'acrylamide est capable de discriminer de plus petites différences dans la taille des fragments.

L'électrophorèse est une procédure diagnostic qui nous permet d'identifier des molécules de différentes tailles. Quand elle est utilisée comme telle, l'électrophorèse en elle même représente un moyen de montrer des polymorphismes et, en conséquence, de la variation génétique entre des génotypes.

Mais l'électrophorèse peut aussi être utile comme première étape dans l'identification et l'isolement de molécules d'ADN spécifiques, qui, même si elles ont la même taille, diffèrent dans la composition de séquence.

Electrophorèse en gel de gradient dénaturant (Denaturing gradient gel electrophoresis = DGGE) (1)

- ▶ Permet de détecter des polymorphismes ou des mutations sur de l'ADN de très petite taille
- ▶ Peut être appliqué à de longs fragments d'ADN, mesurant des centaines de paires de bases
- ▶ Ne requiert pas de connaissance préalable sur l'existence de polymorphisme
- ▶ Est basée sur les propriétés de renaturation des brins d'ADN
- ▶ La dénaturation se fait pendant l'électrophorèse

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Complementary technologies 4

Electrophorèse en gel de gradient dénaturant (Denaturing gradient gel electrophoresis = DGGE) (2)

- ▶ Les petits fragments d'ADN sont soumis à une électrophorèse dans un gel de polyacrylamide sous des conditions de dénaturation croissante (concentrations en formamide/urée)
- ▶ L'ADN "fond" et devient simple brin
- ▶ Les molécules d'ADN changent leur forme et cessent de migrer
- ▶ Des différences dans la séquence d'ADN sont identifiées.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Complementary technologies 5

Les fragments d'ADN migrent d'abord comme des molécules double brin. Plus tard, le gel changeant de composition, les molécules se dénaturent et deviennent simple brin, formant une structure avec des branchements. Ce changement de structure conduit à des molécules qui ont une capacité de migration dans le gel diminuée.

Le point auquel l'ADN fond dépend de la séquence nucléotidique dans la région en fusion. La localisation finale de la molécule dans le gel dépend de ce fait de la séquence nucléotidique des fragments.

Electrophorèse en gel de gradient dénaturant (Denaturing gradient gel electrophoresis = DGGE) (3)

LA DGGE peut être réalisée comme un processus en deux étapes:

- ▶ Les échantillons migrent en fragments séparés selon leur taille
- ▶ Les fragments sont séparés sous les conditions de la DGGE selon le processus du "point de fusion"

Quand les échantillons sont mélangés, les bandes doubles indiquent des différences entre bandes de même taille

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Complementary technologies 6

On estime qu'au moins 95% des différences dans la composition de séquence peut être détectée avec cette procédure

La DGGE sert également à distinguer les génotypes homozygotes des hétérozygotes pour un fragment particulier d'ADN. Pour bénéficier de cette possibilité, il faut mener un cycle de dénaturation et renaturation après le dernier cycle de la PCR. Les homoduplexes et hétéroduplexes sont formés quand les allèles se réassocient. Dans le gel DGGE, les combinaisons d'homoduplexes migrant rapidement vont indiquer les génotypes homozygotes. Les génotypes hétérozygotes sont formés par mésappariement et dénaturation rapide dans le gel, ce qui stoppe le cheminement migratoire de ces molécules.

Electrophorèse en gel à gradient de température (Thermal gradient gel electrophoresis: TGGE)

- ▶ Similaire de la DGGE
- ▶ Des conditions de dénaturation croissantes sont réalisées par un gradient de température au lieu d'un changement dans les concentrations des réactifs
- ▶ Peut aussi être utilisée pour analyser des ARN simple brin et des protéines

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Complementary technologies 7

Référence de base

Myers, R.M., N. Lumelsky, L.S. Lerman and T. Maniatis. 1985.
Detection of single base substitutions in total genomic DNA.
Nature 313:495-498.

Polymorphisme de conformation simple brin

(Single-stranded conformational polymorphism (SSCP) (1))

- ▶ La SSCP est basée sur le comportement électrophorétique de molécules d'ADN simple brin dans un gel d'acrylamide non dénaturant
 - Une molécule simple brin présente la propriété de former des structures secondaires par des appariements internes de bases
 - Ces structures secondaires sont dépendantes des séquences et produisent des formes particulières pour chaque molécule simple brin
- ▶ Les différences dans les structures secondaires conduisent les brins d'ADN à migrer de façon différentielle dans le gel

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Complementary technologies 9

Les SSCP peuvent distinguer deux séquences d'ADN très similaires, uniquement sur la base de la forme particulière de leurs structures simple brin. En principe, même deux allèles du même gène peuvent alors être discriminés.

SSCP (2)

- ▶ La séquence d'intérêt est amplifiée par PCR
- ▶ Ensuite, le produit de la PCR est dénaturé à 94°C et rapidement refroidi dans la glace. Les molécules simple brin ne s'apparient pas mais forment des structures secondaires simples
- ▶ Les fragments réassociés sont ensuite soumis à une électrophorèse:
 - Dans le cas d'un homozygote, on peut observer deux bandes, chacune correspondant à une structure secondaire légèrement différente
 - Dans le cas d'un hétérozygote, au moins quatre bandes peuvent être observées

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Complementary technologies 10

Le SSCP est une technique simple, mais elle a au moins deux inconvénients majeurs:

- Le comportement électrophorétique des molécules simple brin ne peut pas être prédit, il dépend beaucoup des conditions de température et de migration.
- Dans le cas de longs fragments d'ADN (>200 pb), la méthode devient insensible à certaines mutations. En principe, le SSCP semble mieux fonctionner pour de petites insertions et/ou délétions.

Référence de base

Hayashi, K. 1992. A method for the detection of mutations. Genet. Anal. Tech. Appl. 9:73-79.

Analyse hétéroduplexe

- ▶ Deux produits amplifiés par PCR sont mélangés en quantités égales, dénaturés à 95°C et mis à refroidir
- ▶ Pendant le refroidissement, les brins d'ADN se réassocient pour former de l'ADN hétéroduplex
- ▶ Tout mésappariement dans l'hétéroduplex va produire une structure tri-dimensionnelle différente, avec une mobilité réduite proportionnelle au degré de divergence des séquences

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Complementary technologies 12

Référence de base

Delwart, E.L., E.G. Shpaer, J. Louwagie, F. McCutchan, M. Grez, H. Rübsamen Waigmann and J.I. Mullins. 1993. Genetic relationships determined by a heteroduplex mobility assay: analysis of HIV env genes. *Science* 262:1257-1261.

Chromatographie liquide dénaturante haute performance (Denaturing high-performance liquid chromatography: DHPLC). Méthodologie

- ▶ Cette méthode peut détecter des différences de séquence d'une seule paire de base aussi bien que des insertions et/ou des délétions
- ▶ Elle fonctionne avec des produits PCR bruts et ne requiert pas de séquençage préalable de l'ADN.
- ▶ Elle est basée sur l'élution différentielle d'ADN homoduplexes et hétéroduplexes quand ils migrent dans une colonne.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Complementary technologies 14

La DHPLC est une méthode de chromatographie liquide haute performance dans laquelle les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille et/ou la présence d'hétéroduplexes (brins d'ADN réassociés) pendant leur passage dans le gradient d'une colonne chromatographique.

Dans un ADN double brin amplifié, les nucléotides qui sont mésappariés par des mutations et polymorphismes deviennent évidents après la formation d'hétéroduplexes. La présence de ces polymorphismes crée une population mélangée d'hétéroduplexes et homoduplexes pendant la réassociation de l'ADN sauvage et mutant. Si ce mélange de fragments est soumis à une migration par HPLC sous des conditions partiellement dénaturantes, les hétéroduplexes sont élués de la colonne plus tôt que les homoduplexes à cause de leur plus faible température de fusion.

Une analyse peut permettre de détecter de la variation de séquence entre individus ou déterminer de l'hétérozygotie.

DHPLC: Applications

- ▶ Trouver de nouvelles mutations et des polymorphismes dans tout fragment d'ADN ou une séquence génique particulière.
- ▶ Cribler des clones et identifier des fragments candidats pour être séquencés
- ▶ Evaluer la fidélité de fragments amplifiés
- ▶ Diagnostiquer la présence de mutations connues

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Complementary technologies 15

Référence de base

Oefner, P.J. and P.A. Underhill. 1998. DNA Mutation Detection Using Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC). Current Protocols in Human Genetics, supplement 19, 7.10.1-7.10.12. Wiley & Sons, NY.

En résumé

- ▶ Plusieurs technologies peuvent aider l'identification de différences de séquences
- ▶ Bien qu'elles ne puissent dire quel est le variant, elles peuvent aider à restreindre la panoplie de stratégies à adopter pour l'identifier

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Complementary technologies 17

A ce stade vous devez savoir:

Les principes de base de:

- ▶ L'électrophorèse en gradient de dénaturation (DGGE)
- ▶ L'électrophorèse en gradient de température (TGGE)
- ▶ Le polymorphisme de conformation simple brin (SSCP)
- ▶ L'analyse hétéroduplexe
- ▶ La chromatographie liquide dénaturante haute performance (DHPLC)

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Complementary technologies 18

Suite

Considérations finales

► **Glossaire**

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Complementary technologies 19

**Utilisation des marqueurs
moléculaires dans les études de
diversité des plantes :
Module d'enseignement**

Considérations finales

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Final considerations 1



Sommaire

- ▶ Choisir une technique...
- ▶ Applications pratiques

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Final considerations 2

Choisir une technique...

Poser la question biologique en premier:

- ▶ Quel est le problème?
- ▶ Combien de locus et/ou d'allèles vont-ils être nécessaires?
- ▶ A quel niveau faut-il discriminer?
- ▶ Le mode d'hérédité des marqueurs est-il important?

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Final considerations 3

(suite diapositive suivante)

Quel est le problème posé?

C'est la question la plus importante. La première étape est de savoir exactement quelle est la question biologique à laquelle on veut répondre par cette recherche. C'est essentiel pour choisir la bonne technique. Par exemple, pour donner des informations sur l'histoire de populations ou des relations phylogénétiques, il faut utiliser des données de séquence ou des données liées aux sites de restriction.

Le nombre de locus et/ou allèles requis

Une information à un petit nombre de locus est-elle suffisante ou bien une plus grande couverture du génome est-elle nécessaire? Les allozymes sont limitées. L'AFLP détecte un grand nombre de locus. Lorsque de l'hypervariabilité est nécessaire, les meilleures techniques sont celles qui sont basées sur des répétitions de séquences à locus unique (p.e. SSR)

Niveau de discrimination

A quel niveau taxonomique la variation génétique est-elle mesurée: au sein des populations, entre espèces ou entre genres? La méthode sélectionnée est-elle appropriée pour détecter le niveau de variation désiré?

Mode d'hérédité

Doit-on pouvoir identifier à la fois des homozygotes et des hétérozygotes? Requièrent-ils des marqueurs codominants (RFLP simple locus, allozymes, microsatellites amplifiés par PCR) ou des marqueurs dominants (RAPD, AFLP) suffisent-ils? Si la seule information de présence vs absence est suffisante, alors n'importe quelle technologie de marqueur peut être utilisée; mais s'il faut pouvoir identifier des hétérozygotes (p.e. Structure de population et de la diversité, connaissance du mode d'hérédité), alors seuls des marqueurs codominants comme les isozymes ou les microsatellites devront être utilisés.

Choisir une technique... (suite)

Ressources:

- ▶ Une bonne qualité d'ADN est-elle importante?
- ▶ Dispose t'on de l'expertise requise?
- ▶ Un laboratoire bien équipé
- ▶ Coûts:
 - Equipement
 - Consommables
- ▶ Rapidité

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Final considerations 4

(suite diapositive suivante)

Disponibilité de l'ADN

L'analyse RFLP requiert de grandes quantités d'ADN. La plupart des méthodes basées sur la PCR requièrent seulement de faibles quantités d'ADN préparées facilement. Dans beaucoup de cas, une PCR est réalisée dans le seul but d'amplifier l'ADN cible original.

Expertise requise

Les techniques qui demandent une hybridation ou du séquençage manuel sont plus exigeantes techniquement. Les RAPDs ou les SSR (une fois les amorces disponibles) sont les moins exigeantes.

Disponibilité de facilités de laboratoire et d'équipement

Une fois les questions biologiques posées, les critères techniques et organisationnels deviennent importants pour décider du choix des technologies. Par exemple, avoir (1) accès à un laboratoire dûment équipé; (2) l'argent pour acheter l'équipement et les consommables supplémentaires quand cela est nécessaire; (3) avoir une bonne maîtrise de plusieurs techniques de laboratoire de base; et (4) des connaissances de bases sur la mise en oeuvre d'une expérimentation.

Coûts

En terme de coûts, les allozymes sont les moins chères; RAPD, RFLP et même les AFLP sont intermédiaires, le séquençage étant le plus coûteux. Il faut considérer les coûts de tous les types d'expérience, car le manque de reproductibilité de certains marqueurs peuvent conduire, au bout du compte, à des coûts plus élevés.

Pour ce qui concerne la maîtrise technique, une visite de quelques jours dans un autre laboratoire où les techniques adéquates sont souvent utilisées peut apporter des informations de valeur pour mettre en oeuvre la recherche envisagée. Il peut s'avérer très profitable également de disposer des contacts pertinents pour assister ses premières étapes.

Rapidité

A quelle vitesse les données sont-elles requises, et combien de temps l'équipement les permettra-t-elle? Les méthodes basées sur la PCR donnent très certainement des résultats rapides quand les amorces sont disponibles. Les méthodes basées sur l'hybridation sont plus lentes. Le séquençage conventionnel de l'ADN est lent, mais le séquençage automatique est bien plus rapide.

Choisir une technique... (suite)

Autres éléments:

- ▶ Reproductibilité
- ▶ Techniques PCR versus non-PCR
- ▶ Les stratégies les plus récentes

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Final considerations 5

Reproductibilité

Des méthodes robustes sont-elles requises? Par exemple, les marqueurs vont-ils être échangés? Plus d'un laboratoire est-il impliqué? Si c'est le cas, les allozymes, RFLP, SSR et séquençage sont robustes, alors que les RAPD ne le sont pas.

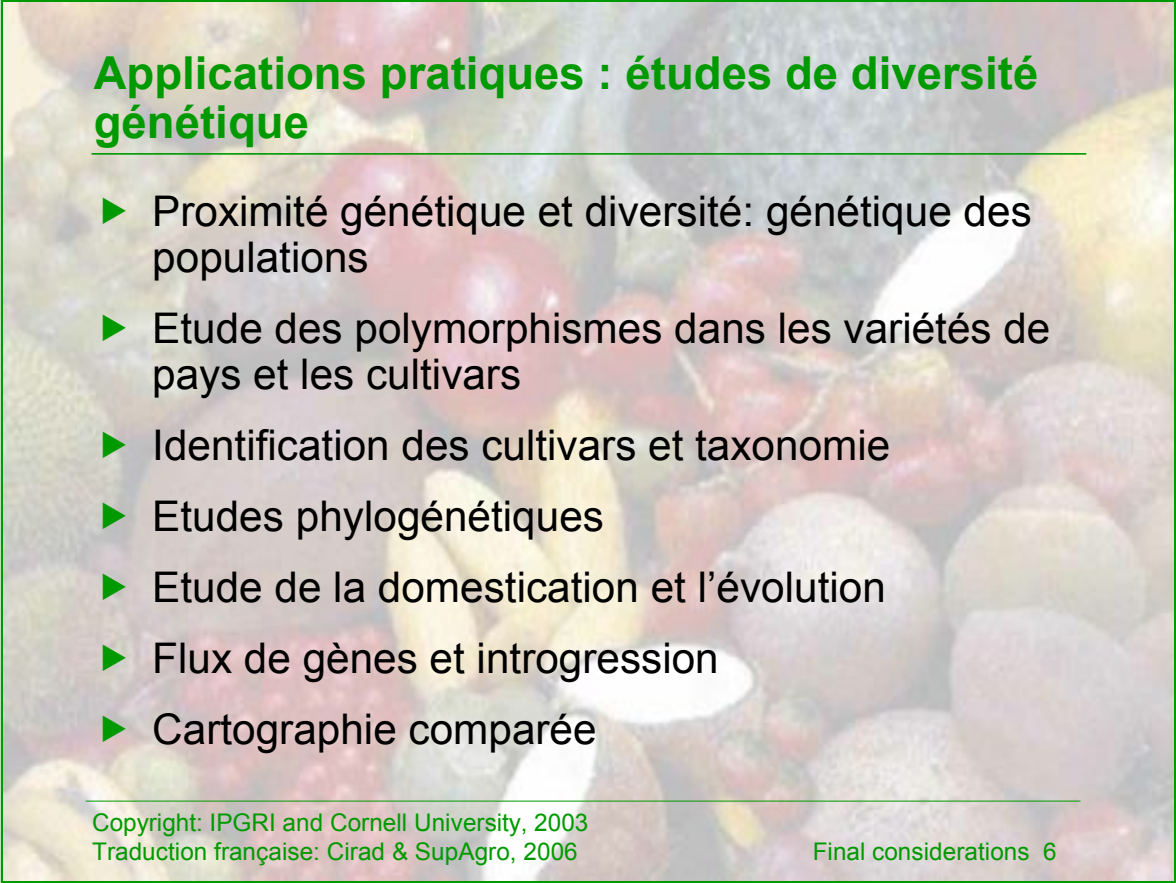
Techniques PCR versus non-PCR

Les techniques de marquage moléculaire basées sur la PCR ouvrent de nombreuses possibilités et doivent être considérées en premier, à cause de leur simplicité. Les techniques basées sur l'hybridation sont plus laborieuses, plus exigeantes techniquement et requièrent un équipement différent.

- La RAPD est une excellente technique pour se familiariser avec la PCR. Elle permet l'examen rapide des polymorphismes dans la plupart, sinon toutes les espèces d'intérêt, et les amorces sont déjà disponibles.
- Les autres marqueurs basés sur la PCR comme les SSR peuvent être appliqués facilement si les amorces sont déjà disponibles. De plus en plus, c'est le cas pour beaucoup d'espèces. Les stratégies pour rechercher des amorces appropriées s'améliorent également, quelques approches pour rechercher des microsatellites potentiels s'appuient sur les bases de données de séquence, court-circuitant le problème d'avoir à réaliser et cribler des banques dans le laboratoire.
- Les AFLP sont devenus une option très populaire, bien que leur demande pour une double PCR et une électrophorèse sur gel vertical les rende plus coûteux et plus exigeants techniquement.

Les stratégies les plus récentes

Les coûts des expérimentations de séquençage ont sensiblement diminué. Beaucoup d'EST sont disponibles pour plusieurs espèces. Les puces à ADN, basées soit sur la caractérisation génomique anonyme ou l'expression de gènes, deviennent communes. La technologie des microarrays est toujours très exigeante, techniquement et en terme d'équipement. Avant de vous y lancer, tenez vous au courant des techniques, des conditions et des résultats. Une meilleure option pourrait être de sous-traiter l'analyse des échantillons et se concentrer plutôt sur l'interprétation des résultats et les choix d'action qui en résultent. Les SNPs sont utilisés en routine dans les études sur l'homme. Ils sont encore trop coûteux pour des applications standards dans les études de diversité chez les plantes. Néanmoins, ils apparaissent comme le niveau ultime de variation dans la séquence nucléotidique de l'ADN, et pourraient bien devenir le meilleur marqueur moléculaire dans le futur, quand le coût de leur découverte et leur application aura diminué.



Applications pratiques : études de diversité génétique

- ▶ Proximité génétique et diversité: génétique des populations
- ▶ Etude des polymorphismes dans les variétés de pays et les cultivars
- ▶ Identification des cultivars et taxonomie
- ▶ Etudes phylogénétiques
- ▶ Etude de la domestication et l'évolution
- ▶ Flux de gènes et introgression
- ▶ Cartographie comparée

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Final considerations 6

Certains des sous-modules précédents décrivaient des expérimentations réelles où les techniques moléculaires ont été appliquées pour répondre à des questions de diversité génétique. Des listes de références étaient également données pour les technologies correspondantes.

Applications pratiques : Gestion des ressources génétiques

- ▶ Caractérisation taxonomique du germplasma
- ▶ Maintenance des collections:
 - Identification des manques
 - Identification des duplications
 - Développement de collections de référence
 - Surveillance de la stabilité du matériel conservé
 - Mesure de l'érosion génétique
- ▶ Développement de stratégies de conservation

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Final considerations 7

Les marqueurs moléculaires peuvent être utilisés dans la gestion des ressources génétiques pour:

- Identifier précisément le germplasma
- Cribler les ressources génétiques pour leur utilisation par les sélectionneurs et autres chercheurs
- Permettre la maintenance en routine d'une banque de gènes, qui sera rationalisée en identifiant les duplications, en surveillant sa stabilité au cours des différents cycles de régénération ou multiplication et en mesurant l'érosion génétique
- Identifier des manques dans la collection pour planifier les activités futures de conservation et de collecte, et pour développer des collections de référence où d'autres données seront complétées pour assurer que la richesse allélique de ce noyau soit maximisée.

De la même façon, les données moléculaires peuvent être utilisées pour définir les stratégies de conservation, à la fois *ex situ* (p.e. des stratégies de collection) et *in situ*.

Applications pratiques : Utilisation des ressources génétiques

- ▶ Cartographie génique et identification
- ▶ Sélection assistée par marqueurs en amélioration des plantes
- ▶ Détection de la variation somaclonale
- ▶ Evaluation du germplasma pour des gènes utiles
- ▶ Analyse de filiations
- ▶ Identification des hybrides

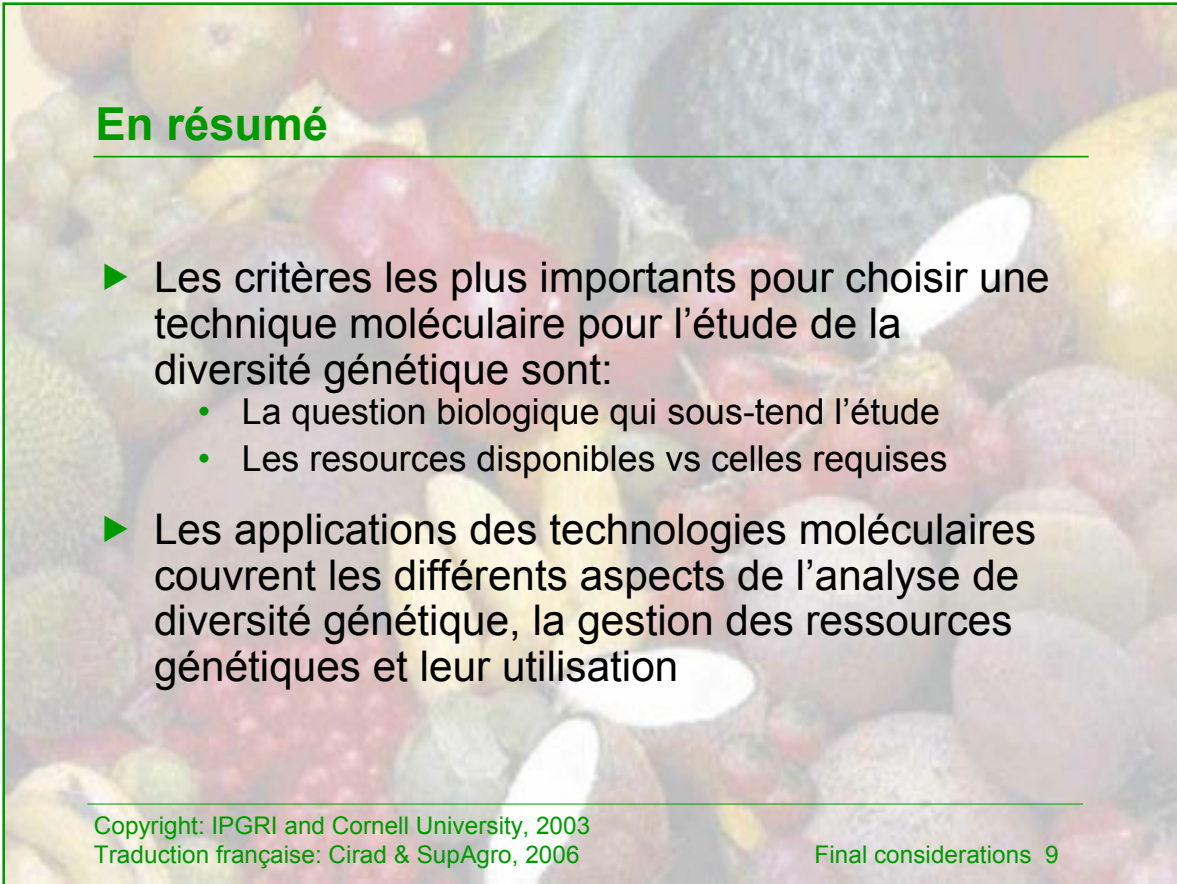
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Final considerations 8

Les technologies moléculaires peuvent aider à promouvoir l'utilisation des ressources génétiques en fournissant des données précises sur les attributs génétiques des plantes, y compris les espèces cultivées. La caractérisation du germplasma donne des informations sur la composition génomique de chaque individu et, comme telle, permet au sélectionneur de sélectionner un matériel prometteur sur la base de son génotype, aussi bien que de son phénotype. La construction de cartes de liaison moléculaires a ouvert la possibilité de localiser les caractères d'intérêt agronomique dans les génomes des espèces cultivées et, par conséquent, de sélectionner les ressources génétiques sur la présence d'un gène d'intérêt particulier. L'introgession de gènes d'un germplasma "donneur" peut alors être suivi au cours des générations suivantes, en utilisant ce qu'on appelle la "sélection assistée par marqueurs", facilitant et accélérant ainsi les essais de sélection traditionnels.

Les technologies des marqueurs moléculaires sont aussi utilisées pour détecter de la variation somaclonale – parfois utile pour l'amélioration des plantes – qui se produit parfois après régénération en culture de tissus. Ils peuvent aussi aider les activités de ménage de routine dans un programme de sélection, comme garder la trace de descendance en analyse de filiation, identifier les hors-type dans un lot de semences et confirmer ou infirmer la pureté hybride.

Les outils les plus récents de la génétique moléculaire vont, espérons-le, accélérer les procédures d'amélioration au cours d'activités comme celle de permettre la découverte rapide de gènes utiles dans les collections de ressources génétiques ou pouvoir corréler un génotype avec un phénotype.



En résumé

- ▶ Les critères les plus importants pour choisir une technique moléculaire pour l'étude de la diversité génétique sont:
 - La question biologique qui sous-tend l'étude
 - Les ressources disponibles vs celles requises
- ▶ Les applications des technologies moléculaires couvrent les différents aspects de l'analyse de diversité génétique, la gestion des ressources génétiques et leur utilisation

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Final considerations 9



A ce stade vous devez savoir

- Les critères qui vous aideront à réussir la sélection et l'utilisation de technologies moléculaires pour les ressources génétiques végétales d'intérêt.

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Final considerations 10



Suite

Glossaire

Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

Final considerations 11

Utilisation des marqueurs moléculaires dans les études de diversité des plantes : Module d'enseignement

Glossaire

Accession: Un échantillon de la variété de l'espèce collectionnée en un lieu spécifique et un moment donné. Peut être de n'importe quelle taille.

Acides aminés: Composés organiques bi-fonctionnels qui contiennent un groupe aminé basique ($-NH_2$) et un groupe carboxyle acide ($-COOH$).

ADN: Acide désoxyribonuclease, une double chaîne de nucléotides liés entre eux (ayant comme sucre constituant un désoxyribose), molécule fondamentale dont sont constitués les gènes.

ADN polymérase: Toute enzyme capable de synthétiser de nouveaux brins d'ADN, en utilisant un ADN matrice.

ADN répété: une portion d'ADN qui consiste en la répétition multiple d'un motif. *Voir aussi* microsatellite, minisatellite et ADN satellite.

ADN satellite: grand nombre de répétitions (1000 jusqu'à 100.000 copies) d'un motif de base ou unité de répétition (souvent de 100 à 300 paires de base) qui se produit à certaines régions du génome. *Voir aussi* ADN répété.

ADNc ou ADN complémentaire: ADN transcrit d'une molécule d'ARN par une enzyme appelée transcriptase inverse.

ADNcp: ADN chloroplastique.

ADNmt: ADN mitochondrial.

AFLP: *Amplified fragment length polymorphism*: polymorphisme de longueur de fragments amplifiés. Méthode très sensible pour détecter des polymorphismes dans l'ADN. L'ADN est d'abord digéré par une enzyme de restriction, puis un sous-ensemble de fragments d'ADN est sélectionné pour amplification par PCR et visualisation.

Allèle: Une des formes alternatives d'un gène qui peut exister à un locus unique.

Allozyme: une isozyme dont la synthèse est contrôlée par des allèles codominants d'un gène.

Amorce: Un petit fragment d'ADN ou d'ARN qui se lie sur un ADN simple-brin et auquel d'autres nucléotides peuvent être ajoutés par l'ADN polymérase.

Amorce arbitraire: une petite amorce oligonucléotidique utilisée dans certaines méthodes PCR pour initier la synthèse de l'ADN à des emplacements aléatoires sur l'ADN cible.

Analyse hétéroduplexe : L'étude de la mobilité d'ADN hétéroduplexe sous électrophorèse en gel de polyacrylamide. La mobilité réduite de l'ADN hétéroduplexe comparée à celle de l'ADN homoduplexe est proportionnelle au degré de divergence des séquences. *Voir aussi* DGGE, SSCP et TGGE.

Apomixie: La production d'un embryon en absence de méiose. Les plantes supérieures apomictiques produisent des semences asexuées, dérivées du tissu maternel.

Appariement: Alignement spontané de deux brins d'ADN simple brin pour former une double hélice.

AP-PCR: *Arbitrarily primed polymerase chain reaction*. PCR avec des amorces arbitraires. Une technique pour amplifier des fragments anonymes d'ADN en utilisant la PCR. En relation avec la technique RAPD.

ARN: Un acide organique qui contient des unités répétées de nucléotides: adénine (A), guanine (G), cytosine (C) et uracile (U), et dont les composés ribose sont liés par des liaisons phosphodiester.

Autogamie: Transfert de pollen de l'anthere d'une fleur vers le stigmate de la même fleur ou, parfois, celui d'une fleur génétiquement identique (comme la même plante ou un clone). Permet à de nombreuses espèces végétales une fertilisation efficace naturelle au sein d'un individu. Aussi appelé auto-pollinisation.

Autoradiographie: Technique où les molécules marquées radioactivement sont visualisées par exposition à une pellicule à rayons X.

Bactériophage: Virus qui infecte une bactérie. Des formes modifiées génétiquement sont utilisées comme vecteurs dans le clonage de l'ADN.

Banque (Library): Une collection de clones d'ADN obtenus d'un ADN donneur.

Banque de gènes (Genebank): Installation établie pour la conservation *ex situ* d'individus (semences), de tissus ou de cellules reproductrices de plantes ou d'animaux.

Base: l'unité chimique qui caractérise un nucléotide. Dans l'ADN les bases présentes sont l'adénine (A), la guanine (G), la thymine (T) et la cytosine (C). Dans l'ARN, les bases sont l'adénine, la guanine, l'uracile (U) and la cytosine.

Bases azotées: Molécules qui sont des composantes importantes des acides nucléiques, composées de structures fermées contenant de l'azote. Des liaisons hydrogène entre les bases lient les deux brins de la double hélice d'ADN.

CAPS: *Cleaved amplified polymorphic sequence*, digestion de produits d'amplification, aussi appelée PCR-RFLP, une technique pour détecter des polymorphismes à un locus particulier. Un locus est soumis à une amplification par PCR, et des polymorphismes sont détectés par des différences dans les tailles des fragments de restriction entre individus.

Caractère: Ou trait, Un attribut des individus dans une espèce pour lequel peuvent être définies des différences héréditaires.

Cartographie de gènes: La détermination des positions relatives de gènes sur un chromosome ou un plasmide et leur distance entre eux.

Centromère: Région étroite d'un chromosome à laquelle les fibres du fuseau chromatique se lient pendant la division cellulaire.

Chromatine: Complexe d'ADN et de protéines dans la cellule en interphase.

Chromosome: Un arrangement linéaire continu de gènes et autre ADN, avec des protéines et de l'ARN associés.

Clonage: En biologie moléculaire, le processus d'utilisation des procédures de manipulation de l'ADN pour produire des copies multiples d'un gène unique ou un segment d'ADN.

Codominance: La situation dans laquelle un individu hétérozygote montre les phénotypes des deux allèles d'un gène particulier.

Conservation *ex situ* : (1) Une méthode de conservation qui entraîne la sortie des ressources génétiques (semences, pollen, sperme, organisme individuel) de leur habitat original ou environnement naturel. (2) Maintenir les composantes de la biodiversité vivantes en dehors de leur habitat ou environnement naturel. *Cf.* conservation *in situ*.

Conservation *in situ* : Une méthode de conservation qui tend à conserver l'intégrité des ressources génétiques en les conservant dans les écosystèmes à évolution dynamique de l'habitat d'origine ou l'environnement naturel. *Cf.* conservation *ex situ*

DAF: *DNA amplification fingerprinting*. Empreintes génétiques de produits d'amplification. Une technique pour amplifier des portions anonymes d'ADN en utilisant la PCR. En lien avec la technique RAPD

DArT: *Diversity array technology*. Technologie des puces de diversité.

Délétion: Type particulier de mutation impliquant la perte d'une partie d'ADN d'un chromosome.

Dénaturation: La séparation des deux brins de la double hélice d'ADN, ou la rupture sévère d'une molécule complexe sans briser les liaisons majeures de ces chaînes.

Dendrogramme: Tout diagramme sous forme d'arbre qui montre, au moyen de lignes reliées en forme de U, une hiérarchie de catégories ou d'objets basée sur le degré de similarité ou le nombre de caractères partagés. Souvent, la longueur de chaque U représente la distance entre les deux objets connectés.

Dérive génétique: Changement dans la fréquence allélique d'une génération à l'autre à l'intérieur d'une population, due à l'échantillonnage d'un nombre limité de gènes, ce qui est inévitable dans des populations de taille finie. Plus petite est la population, plus grande est la dérive génétique, avec comme conséquence la perte de certains allèles, et la réduction de la diversité génétique.

DGGE: *Denaturing gradient gel electrophoresis*. Electrophorèse en gel à gradient de dénaturation. Une méthode pour séparer des fragments d'ADN en fonction de leur mobilité sous des conditions de dénaturation croissantes (généralement l'augmentation des concentrations en formamide/urée); *Voir aussi* analyse hétéroduplexe, SSCP and TGGE.

DHPLC: *Denaturing high-performance liquid chromatography*. Chromatographie liquide haute performance dénaturante. Cette méthode permet de détecter des variations de séquence au niveau d'une seule paire de bases.

Dominance (d'allèle): Un allèle dominant est un allèle qui exprime son phénotype même à l'état hétérozygote avec un allèle récessif. C'est à dire, si A est dominant sur a, alors AA et Aa ont le même phénotype.

Double hélice: La structure de l'ADN proposée en premier par Watson et Crick, avec deux hélices liées par des liaisons hydrogènes entre paires de bases.

Ecotype: Une population ou lignée d'un organisme adaptée à un habitat particulier.

Electrophorèse: Une technique pour séparer les composantes d'un mélange de molécules (protéines, ADN ou ARN) par leur taille et/ou leur charge, sous l'action d'un champ électrique au niveau d'un gel support.

Elément transposable : Un élément génétique qui a la capacité de se déplacer d'un site à un autre sur un chromosome. Certains ressemblent à des rétrovirus, et beaucoup en étaient, à l'origine.

Empreinte génétique (d'ADN): Un profil unique de fragments d'ADN révélé par hybridation Southern ou par PCR.

Enzyme: Une protéine qui fonctionne comme catalyseur de réactions biochimiques.

Enzyme de restriction : Une endonucléase qui va reconnaître une séquence cible spécifique et couper la chaîne d'ADN en ce point.

EST: *Expressed sequence tag*. Etiquettes de séquences exprimées. Une petite partie de la portion codante du gène, séquencée à partir d'un ADNc. Peut être utilisée comme marqueur, pour identifier le reste du gène ou pour la localiser dans un plus large segment d'ADN.

Eucaryote: une cellule ou organisme avec un noyau distinct, entouré d'une membrane, et autres composantes sub-cellulaires différenciées.

F₁, F₂, F₃, ... : Une notation abrégée utilisée pour indiquer les différentes générations impliquées dans les expériences de sélection. F₁ représente la première génération filiale, F₂ est la seconde, c.a.d. la descendance par autopolinisation ou intercroisement d'individus F₁, et ainsi de suite.

Flux de gènes: Echange de gènes entre des populations différentes mais (généralement) apparentées.

Fragment de restriction : Un fragment d'ADN qui a été coupé par une enzyme de restriction.

Fréquence allélique: une mesure de la fréquence à laquelle un allèle est trouvé dans une population, ou sa part dans l'ensemble des allèles d'un gène.

Gène: L'unité physique et fonctionnelle de l'hérédité, qui transmet l'information d'une génération à l'autre. C'est un segment d'ADN qui inclue une section transcrite et des éléments régulateurs qui permettent sa transcription.

Gène structural : Tout gène qui code pour une protéine.

Génome: L'effectif complet du matériel génétique d'un organisme.

Génotype: La composition allélique spécifique soit de la cellule entière ou, plus souvent, d'un certain gène ou ensemble de gènes.

Germplasma: La variabilité génétique totale disponible pour une population d'organismes, représentée par des cellules sexuelles, des semences, etc.

Goulot d'étranglement (*bottleneck*): Réduction brutale de la taille de la population qui conduit généralement à un dérive génétique aléatoire.

Haplotype: Une constitution allélique spécifique à un certain nombre de locus, dans un bloc de liaison défini.

Hérédité: Le processus par lequel les caractères génétiques sont transmis des parents à leur descendance.

Hétéroduplexe: Une molécule d'ADN double brin, ou un hybride ADN/ARN dans lequel chaque brin est d'origine différente.

Hétérozygotie: Une paire de gènes hétérozygote possède deux allèles différents sur les deux ensembles chromosomiques d'un individu diploïde, par exemple Aa ou A1A2.

Héritabilité cytoplasmique: hérédité des gènes trouvée dans les organites cytoplasmiques (chloroplastes et mitochondries)

Homoduplexe (ADN) : Molécule d'ADN double brin dans laquelle les deux brins ont la même origine.

Homologue: Correspondant ou semblable dans sa structure, sa position ou son origine.

Homozygotie: Une paire de gènes homozygotes possède des allèles identiques sur les deux ensembles chromosomiques d'un individu diploïde, par exemple AA or aa.

Hybride: Soit (1) un individu hétérozygote, ou (2) un individu de la descendance d'un croisement entre parents avec des génotypes différents.

Hybridation: En biologie moléculaire, la liaison de séquences complémentaires d'ADN et/ou ARN pour former une structure double brin.

Insertion: Un type d'anomalie chromosomique dans laquelle une séquence d'ADN est insérée dans un gène, perturbant ainsi la structure normale et la fonction de ce gène.

Isozyme: Formes multiples d'une enzyme dont la synthèse est contrôlée par plus d'un gène.

ISSR: *Inter-simple sequence repeat*. Amplification intermicrosatellite. Les amorces des ISSR sont ancrées à leur extrémité 3' pour diriger l'amplification de segments génomiques compris entre des microsatellites.

Liaison génétique: Proximité de deux gènes ou plus sur un chromosome telle qu'ils tendent à être hérités ensemble.

Ligase: Un type d'enzyme capable de reconstituer une liaison phosphodiester rompue dans un acide nucléique.

Ligation: Le processus qui conduit à joindre deux fragments d'ADN ou plus ensemble.

Locus (pl. Locus, loci en anglais): L'emplacement spécifique sur un chromosome où est localisé un gène ou un segment d'ADN particulier.

MAAP: *Multiple arbitrary amplicon profiling*. Profils d'amplification arbitraires multiples. Terme collectif pour les techniques PCR utilisant des amorces arbitraires.

Marqueur: Un emplacement physiquement identifiable sur un chromosome dont l'hérédité peut être suivie (p.e. Un gène, site d'enzyme de restriction ou marqueur RFLP).

Marqueur génétique: Un allèle, une bande dans un gel ou un caractère qui sert expérimentalement de preuve pour identifier un individu ou l'une de ses caractéristiques.

Matrice: Une molécule qui sert de modèle pour synthétiser une autre molécule, p.e. un ADN simple brin peut être utilisé comme matrice pour synthétiser le brin d'ADN complémentaire.

Microsatellite (ADN): Un type d'ADN répété basé sur de très courtes séquences comme des dinucléotides, des trinucléotides ou des tétranucléotides. *Voir aussi* ADN répété.

Minisatellite (ADN): Un type de séquence d'ADN répété basé que de courtes répétitions avec un noyau commun unique. *Voir aussi* ADN répété.

Multiplexage: Réalisation simultanée de plusieurs réactions différentes dans le même tube de réaction pour en augmenter l'efficacité.

Mutation: Une altération structurale permanente dans l'ADN. Dans la plupart des cas, les modifications de l'ADN soit n'ont aucun effet, soit causent des dommages, mais occasionnellement une mutation peut améliorer les chances de survie d'un organisme et transmettre ces modifications bénéfiques à sa descendance.

Mutation ponctuelle : Un changement dans une seule paire de base de l'ADN.

Nucléase: Une enzyme qui coupe les ponts phosphodiester, qui lient les nucléotides adjacents dans l'ADN et/ou l'ARN. Une exonucléase coupe progressivement en partant de la fin de la molécule substrat; une endonucléase coupe au niveau de sites internes dans la molécule substrat.

Nucléotide: Une molécule composée d'une base azotée, d'un sucre et un groupement phosphate. Les nucléotides sont les briques de construction des acides nucléiques.

Oligonucléotide: Un petit segment d'ADN synthétisé artificiellement.

Paire de bases : Deux bases nucléotidiques sur les différents brins d'une molécule d'acide nucléique maintenues ensemble par des liaisons hydrogène: l'adénine avec la thymine (ADN) ou l'uracile (ARN), et la guanine avec la cytosine (ADN et ARN). *Voir aussi* Séquence complémentaire.

Patrimoine génétique: *Genepool:* La somme totale des gènes, avec toutes leurs variations, possédée par une espèce particulière à un moment donné.

PCR: *Polymerase chain reaction.* Amplification en chaîne par la polymérase. Une méthode pour amplifier une séquence d'ADN en grande quantité, en utilisant une polymérase thermostable et des amorces adéquates pour diriger l'amplification sur la région désirée de l'ADN.

PCR-RFLP: autre nom pour la technique connue sous le nom de *CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence)*: digestion de produits d'amplification

Pedigree: Un schéma simplifié de la généalogie d'une famille qui montre les relations des membres de la famille entre eux et la manière dont un caractère particulier a été hérité.

Peptide: Deux acides aminés ou plus reliés par une liaison peptidique.

Phénotype: Soit (1) la forme prise par un caractère (ou ensemble de caractères) chez un individu particulier; ou (2) l'apparence externe détectable d'un génotype spécifique.

Plasmide: Une molécule d'ADN extrachromosomique qui est capable de se répliquer de façon autonome.

Polymérase: Terme général pour les enzymes qui permettent la synthèse d'un acide nucléique, en utilisant une matrice d'acide nucléique pré-existante et des nucléotides appropriés (ribonucleotides pour l'ARN et désoxyribonucleotides pour l'ADN).

Polymère: Une molécule possédant des sous-unités répétées.

Polymorphisme: L'apparition de différentes formes associées avec des allèles variés d'un gène ou homologues d'un chromosome.

Polypeptide: Une protéine, qui est une chaîne d'acides aminés liés entre eux.

Protéine: Un polymère d'acide aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques et qui peut comprendre deux chaînes polypeptidiques ou plus.

Puce à ADN (*Microarray*): Petits dépôts d'ADN fixés sur un support, lamelle de verre ou membrane de nylon. Cette technologie est basée sur l'hybridation entre de petites sondes oligonucléotidiques (p.e.) et les séquences d'ADN complémentaires.

RAPD: *Random amplified polymorphic DNA*. ADN polymorphe amplifié au hasard. Une technique pour amplifier des fractions d'ADN anonymes en utilisant la PCR avec des amorces arbitraires.

Récessivité: Un allèle récessif est un allèle dont l'effet phénotypique n'est pas exprimé à l'état hétérozygote, mais est masqué par l'allèle dominant (*voir aussi* dominance).

Recombinaison: aussi connue sous le nom de *crossing over*. La production d'une molécule d'ADN avec des segments dérivés de plus d'une des molécules d'ADN parentales. Chez les eucaryotes, elle se produit par l'échange réciproque d'ADN entre chromatides non-soeurs à l'intérieur d'une paire de chromosomes homologues, pendant la prophase de la première division méiotique. La recombinaison permet le réarrangement du matériel génétique des chromosomes, augmentant ainsi le potentiel de diversité génétique.

Régions flanquantes: Les séquences d'ADN qui s'étendent de part et d'autre d'un gène ou un locus spécifique.

Répétition en tandem: Copies multiples de la même séquence de base sur un chromosome.

Ressources génétiques: Les gènes trouvés dans les plantes ou les animaux qui sont de valeur actuelle ou potentielle pour l'humanité.

RFLP: *Restriction fragment length polymorphism*. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction. Variation entre des individus détectée par des différences dans les tailles de fragments après digestion par une enzyme de restriction.

Site de restriction : La séquence de nucléotides spécifique au niveau de laquelle une enzyme de restriction particulière coupe l'ADN.

SCAR: *Sequence characterized amplified region*. Caractérisation de produit d'amplification. Un SCAR est un locus représentant un fragment RAPD unique, qui a été séquencé. Des amorces spécifiques de ce locus peuvent être définies et utilisées dans l'amplification PCR.

Ségrégation: En génétique, se réfère à la production de deux phénotypes séparés correspondant aux deux allèles d'un gène.

Séquençage: La détermination de l'ordre des nucléotides dans une molécule d'ADN ou ARN, ou l'ordre des acides aminés dans une protéine.

Séquence complémentaire: La séquence d'un brin d'ADN ou d'ARN à laquelle une séquence nucléotidique donnée peut se lier pour former une structure double brin, p.e TAGGAT est la séquence complémentaire de ATCCTA avec A = adénine, C = cytosine, G = guanine et T = thymine. *Voir aussi* Paire de bases.

Séquence d'ADN: L'ordre des bases nucléotidiques dans la séquence d'ADN.

Séquence des bases : L'ordre des bases nucléotidiques dans l'ADN ou l'ARN.

SNP: *Single nucleotide polymorphism*. Polymorphisme d'un nucléotide unique. Polymorphismes résultant de substitutions d'une seule base entre des séquences homologues.

Sonde: Un morceau d'acide nucléique de taille finie qui peut être utilisé pour identifier des segments d'ADN ou d'ARN qui portent sa séquence complémentaire.

Transfert Southern: *Southern blotting*: Une procédure dans laquelle des fragments d'ADN, séparés par électrophorèse, sont transférés sur un filtre membranaire pour détecter des séquences de base spécifiques par l'intermédiaire de sondes complémentaires marquées radioactivement. Aussi appelé hybridation Southern.

SSCP: *Single-stranded conformational polymorphism*. Polymorphisme de conformation simple brin. Une méthode permettant de distinguer des fragments d'ADN de même taille en fonction de la mobilité de l'ADN simple brin dans un gel d'électrophorèse en polyacrylamide. *Voir aussi* DGGE, analyse hétéroduplexe, et TGGE.

SSR: *Simple-sequence repeats*. Répétition de séquences simples. *Voir* Microsatellite (ADN)

SSRP: *Simple-sequence repeat polymorphism*. Polymorphisme de répétition de séquences simples. *voir* Microsatellite (ADN).

STMS: *Sequence-tagged microsatellite sites*. Sites étiquettes de microsatellites. Amorces construites à partir des régions flanquantes des ADN microsatellites, et qui peuvent être utilisées pour amplifier la région répétée.

STS: *Sequence-tagged site*. Séquence ciblée. Terme général donné à un marqueur défini par la localisation exacte de ses amorces et l'ordre des bases.

Synténie: Est dite se produire quand tous les locus sont positionnés sur le même chromosome. Des locus peuvent ne pas sembler liés selon les tests génétiques conventionnels de liaison, mais peuvent quand même être synténiques.

Télomère: L'extrémité distale de chaque bras chromosomique, impliquée dans la réplication et la stabilité des molécules d'ADN linéaires.

Température de fusion (Tf, Tm en anglais): Gamme de température à laquelle la moitié de l'ADN est dénaturé.

TGGE: *Thermal gel gradient electrophoresis*. Electrophorèse en gel à gradient de température. Une méthode pour séparer des fragments d'ADN en fonction de leur mobilité sous des conditions de dénaturation par la chaleur croissantes. *Voir aussi* DGGE, analyse hétéroduplexe et SSCP.

Transcriptase reverse : Une enzyme, qui requiert une amorce ADN, et catalyse la synthèse d'un brin complémentaire d'ADN à partir d'une matrice ARN.

Transcription: La synthèse de l'ARN complémentaire, en utilisant une matrice ADN.

Type sauvage: Le type ou la forme d'un organisme ou gène qui se produit le plus fréquemment dans la nature. Indique souvent comment les organismes ou gènes sont trouvés à l'état naturel, à l'état sauvage, avant que les chercheurs n'induisent des mutations.

Variation somaclonale : Variation trouvée dans les cellules végétatives qui se divisent par mitoses en culture.

Variété de pays: *Landrace*: Un cultivar de plante cultivée ou d'animal d'élevage qui a évolué de façon groupée et a été amélioré par des agriculteurs traditionnels sans influence des pratiques de sélection modernes.

Vecteur: l'agent (p.e. Plasmide ou virus) utilisé pour porter un segment d'ADN.

VNTR: *Variable number of tandem repeat*. Répétitions en tandem de nombre variable. Une classe de polymorphisme caractérisée par le nombre de copies extrêmement variable de séquences identiques ou très proches.

Fiche d'évaluation

Le sujet de ce module évolue continuellement, rendant une mise à jour périodique souhaitable. Pour cette raison, nous proposons le module sous un format électronique. Pour nous aider dans la tâche de mise à jour, nous apprécierions de recevoir des commentaires pertinents et des demandes de la part des utilisateurs pour améliorer le module. Vos commentaires sur l'utilité de cet outil nous seront également très précieuses.

Nous avons ci-dessous posé quelques questions pour vous guider dans votre réponse. Vous pouvez nous envoyer vos réponses directement en cliquant sur le bouton "soumettre" à la fin de cette page, par fax (no.: 57-2 445 0096), par courrier à votre contact à l' IPGRI ou par courrier électronique à cdevicente@cgiar.org ou tf12@cornell.edu

Questions:

1. Dites nous comment vous avez utilisé cet outil...
2. Pensez-vous que le module:
 - a. Apporte une vision d'ensemble des concepts scientifiques de base sous-tendant les marqueurs moléculaires et les technologies de séquençage de l'ADN, ainsi que leur utilisation pour les ressources génétiques végétales ?

Oui

Non

Pourquoi?
 - b. Donne des informations sur la façon de comparer et distinguer les avantages et inconvénients de chaque technologie afin de prendre les décisions les plus pertinentes dans une situation de recherche spécifique?

Oui

Non

Pourquoi?
 - c. Met à disposition une liste des ressources bibliographiques actuelles pour chacune des technologies discutées?

Oui

Non

Pourquoi?

3. Dites-nous ce que vous avez aimé et ce que vous auriez changé dans les rubriques suivantes:
- a. Contenu
 - b. Spectre des technologies proposées
 - c. Critères pour sélectionner les techniques
 - d. Structure dans les sous-modules
 - e. Dessins, diagrammes, photographies
 - f. Autre
4. Qu'aimeriez vous ajouter dans le module pour le rendre plus utile dans votre situation particulière?
- a. Références de base
 - b. Exemples d'applications
 - c. Informations supplémentaires sur des concepts de base
 - d. Des technologies supplémentaires:
 - i. Anciennes
 - ii. Nouvelles
5. Quels autres sujets voudriez-vous voir dans ce module?
6. Ce module, ou une partie de celui-ci, a t'il été difficile à charger? Pourquoi?

Soumettre

Remerciements

La production de *Utilisation des technologies des marqueurs moléculaires dans les études de diversité génétique végétale: module d'enseignement* a été possible grâce à un effort de collaboration entre l'institut international des ressources génétiques végétales (IPGRI) et l'institut de la diversité génomique (IGD) de l'université de Cornell. Les auteurs remercient spécialement les contributeurs suivants:

L' IPGRI-Asia, Office régional Pacifique et Océanie, qui, au travers de son projet sur les arbres fruitiers tropicaux, lui même financé par la banque de développement de l'Asie (ADB), a financé partiellement cet ouvrage.

Félix Alberto Guzmán (IPGRI- Office Regional des Amériques), pour son aide dans la collection de l'information pour les modules, spécialement pour le choix de bons exemples d'application des technologies à des études réelles de diversité génétique, et aussi pour son discernement dans la réalisation de modules clairs et compréhensibles.

Brian V. Ford-Lloyd (Université de Birmingham, UK), auteur du module précédent produit par l'IPGRI en 1996 (*"Mesure de la variation génétique par l'utilisation des marqueurs moléculaires"*), qui a aidé à la préparation de ce module plus large et actualisé. Nous avons en fait conservé son texte dans les endroits appropriés.

Pere Arús (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, IRTA, Spain), pour son aide avec les diapositives sur l'interprétation des isozymes, et sa volonté de prêter une série d'images sur les procédures pour la détection des isozymes. Ces images ont été incluses dans le sous-module correspondant.

Andrzej Kilian (Centre for the Application of Molecular Biology to International Agriculture, CAMBIA, Australia), pour nous avoir permis d'utiliser les illustrations schématiques des Dart telles qu'elles apparaissent sur la page web de CAMBIA.

Steve Tanksley (Université de Cornell, NY), pour le prêt de diapositives sur les microsatellites de sa collection d'enseignement pour que nous l'utilisions dans nos modules; et Rebecca Nelson, également de l'université de Cornell, pour avoir partagé des informations sur les protocoles AFLP simplifiés.

Humberto Gómez Paniagua (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT-Colombia and International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, ICRISAT-Colombia), pour avoir partagé des images de profils RAPD à usage d'exemple de bons et mauvais résultats avec cette technologie; et pour nous avoir donné de nombreuses idées sur la façon d'améliorer la présentation didactique de ce produit.

Helmer Ayala (Universidad de San Carlos, Guatemala), pour les exemples sur la détection d'AFLP avec coloration à l'argent; Xiaoming Pang (Guizhou University, China), pour une image sur les microsatellites avec coloration à l'argent; and Kamel Chabane (International Center for Agricultural Research in Dry Areas, ICARDA, Syria) et Martin Fregene (CIAT, Colombia), pour avoir partagé des images sur l'application des différents marqueurs moléculaires pour utilisation comme image de fond dans différents sous-modules.

Le personnel de l'unité des ressources génétiques au CIAT (Colombie), pour nous avoir permis de prendre des images d'isozymes dans leur laboratoire.

Le professeur Heiber Cárdenas (Biology Department, Universidad del Valle, Cali, Colombia), pour avoir testé le module d'enseignement avec cinq de ses étudiants (Iván Andrés González, Olga Lucía Agudelo Henao, Martha Nora Moyano, Fernando Rondón González et Diego Mauricio Villamarín Miranda), et pour avoir donné des commentaires de valeur pour l'amélioration des modules.

Luigi Guarino, Ramanatha Rao, Issiaka Zoungrana, Margarita Baena, Toby Hodgkin, Jan Engels et Elisabeth Goldberg (différents bureaux de l' IPGRI), pour leurs commentaires et suggestions sur la façon d'améliorer le produit et, espérons-le, le rendre plus utile pour nos partenaires.

W. H. Freeman and Company/Worth Publishers (New York) pour la permission de reproduire des versions modifiées des figures 4-3, 11-12, 12-3 (a), 12-6, 12-7 (c), 12-7 (d), 14-20, 14-24, 14-29 et 17-10 (a) de l'ouvrage publié par eux en 1996 sous le titre *Introduction to Genetic Analysis* (écrit par Griffiths *et al.*).

Elizabeth L. McAdam pour son aide dans l'édition du manuscrit et ses bonnes suggestions pour améliorer le format de ce produit.

IPGRI - L'institut international des ressources génétiques végétales (International Plant Genetic Resources Institute , IPGRI) est une organisation scientifique internationale et autonome, financée par le groupe consultatif sur la recherche agricole internationale (CGIAR). Le mandat de l'IPGRI est de favoriser la conservation et l'utilisation de la diversité génétique pour le bien-être des générations présente et à venir. L'IPGRI a ses quartiers généraux à Rome (Italie), et des bureaux répartis dans 22 pays du monde. Il fonctionne en trois programmes: (1) Le programme des ressources génétiques végétales; (2) Le programme support des ressources génétique du CGIAR; et (3) Le réseau international pour l'amélioration de la banane et du plantain (INIBAP).

IGD - L'institut pour la diversité du génome (Institute for Genomic Diversity) est situé à l'université de Cornell à Ithaca, New York (USA). Les missions de l'IGD sont de développer, transférer et fournir des technologies et ressources éducatives pour résoudre les problèmes affectant la conservation de la biodiversité et la sécurité alimentaire. De façon spécifique, nos objectifs sont: d'utiliser la génomique évolutive et comparative pour résoudre des problèmes appliqués; de développer et transférer des technologies appliquées en génomique et bioinformatique; de proposer un support continu pour des efforts nationaux et internationaux de conservation, d'agriculture et d'amélioration des plantes; enfin d'éduquer et former par la recherche à tous les niveaux (inclus mais non limité à ce niveau des étudiants avant ou après le niveau master, des scientifiques invités, des enseignants du supérieur, des professeurs).

Copyright © 2003 by the International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) and Institute for Genomic Diversity (IGD), Cornell University.

A l'exception d'une autorisation spécifique, les droits de copie et autres droits liés à ce travail reviennent à l'IPGRI et l'université de Cornell. Toute personne peut copier et imprimer gratuitement ce matériel pour des objectifs d'enseignement ou autres propos non commerciaux, sans avoir à en demander l'autorisation préalable des détenteurs des droits de copie. La reconnaissance de l'origine du matériel est requise pour cela.

Citation

de Vicente, M.C. and Fulton, T. (eds.). 2003. Using Molecular Marker Technology in Studies on Plant Genetic Diversity Studies: Learning Module. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy.

M. Carmen de Vicente, PhD, est généticienne moléculaire végétale à l'IPGRI Ameriques—Bureau Regional, Cali, Colombie; et Theresa Fulton, PhD, est directrice des activités de vulgarisation à l'institut de diversité génomique de l'université de Cornell, Ithaca, NY, USA.