

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude par EcoTILLING du polymorphisme intervariétal de gènes candidats impliqués dans l'allocation du carbone chez *Cichorium intybus*L.

CUVELIER, Gaëlle

Award date:
2006

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**Etude par Eco-TILLING du polymorphisme de gènes candidats impliqués dans
l'allocation du carbone chez la chicorée *Cichorium intybus***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

CUVELIER gaëlle

Juin 2006

Etude par Eco-Tilling du polymorphisme intervariétal de gènes candidats impliqués dans l'allocation du carbone chez *Cichorium intybus*

Cuvelier gaëlle

Résumé

Les fructanes, dont l'inuline constitue la forme la plus simple, sont des polysaccharides de réserve accumulés au niveau de la racine de nombreux végétaux tels que la chicorée. L'inuline, présentant de nombreuses propriétés d'intérêt agro-alimentaire, est produite à un niveau industriel à partir de racines de chicorée *Cichorium intybus*. Les propriétés de cette molécule sont liées à la longueur de la chaîne de fructose qui la compose. Celle-ci est définie par la taille des chaînes initialement produites mais elle peut également varier suite à des modifications environnementales comme la température. En effet, lors de la chute de température survenant en fin de saison, on observe une diminution significative de la longueur des chaînes, due à l'activation des enzymes de dégradation : les 1-fructane exohydrolases (1-FEH), les invertases et les sucrose synthases.

Durant ce mémoire, une étude du polymorphisme ponctuel (SNP) de gènes candidats impliqués dans la dégradation de l'inuline a été réalisée. L'objectif était de mettre en évidence de la diversité allélique au sein des différentes séquences étudiées. Dans un premier temps, un criblage du polymorphisme, visant à sélectionner les séquences potentiellement polymorphes, a été réalisé grâce à la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), technique simple et peu coûteuse. L'étude du polymorphisme a ensuite été poursuivie sur les gènes candidats sélectionnés par une méthode plus sensible et utilisant la fluorescence, l'Eco-Tilling.

L'étude réalisée dans le cadre de ce mémoire a permis d'appliquer l'approche Ecotilling à la recherche de polymorphismes ayant une implication dans le métabolisme du carbone et trouve ses applications dans la caractérisation et la sélection de la chicorée industrielle.

Premièrement, je remercierais Monsieur Van Cutsem de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour les quelques mois nécessaires à la réalisation de mon mémoire.

Je remercierais ensuite l'ensemble des membres de mon jury pour le temps et l'attention qu'ils ont consacré à la lecture de mon mémoire.

Je remercierais et je tirerais particulièrement mon chapeau à mon tuteur, Nicolas Dauchot, qui a su malgré une absence de don d'ubiquité et de multiplication, superviser pratiquement l'ensemble des femmes du laboratoire et mener à bien un doctorat, tout en nous apportant à moi et Delphine les conseils et l'aide dont nous avions grandement besoin.

Je remercierai également l'ensemble des membres du laboratoire pour leur aide apportée et l'ambiance chaleureuse qui a régné durant ces quelques mois.

Un grand merci à Delphine pour m'avoir supportée si longtemps malgré ma « lenteur » de manipulation et mes handicaps informatiques. Un grand merci aussi à tous mes amis pour les moments passés avec eux.

Je remercierai également Che pour avoir réussi à me changer les idées quand j'en avais besoin, pour sa patience et pour toute son attention.

Un merci tout spécial également à mes parents et à ma famille qui m'ont permis de réaliser à bien les études de mon choix tout en me soutenant et en me réconfortant dans les moments les plus difficiles.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
Dnase	Désoxyribonucléase
Rnase	Ribonucléase
pb	Paire de base
M	Molaire
mM	Millimolaire
PCR	Polymérase chain reaction
DP	Degré de polymérisation
°C	Degré Celcius
N°	Numéro
EST	Expressed sequence tag
1-FEH	1-fructane exohydrolase
1-SST	sucrose : sucrose 1-fructosyle transférase
1-FFT	fructane : fructane 1-fructosyle transférase
SSCP	Single strand conformation polymorphism
TBE	Tris-borate EDTA
rfu	Unité relative de fluorescence
SNP	Single Nucléotide polymorphism
SSS	Single strand specific
RT-PCR	Real time PCR
DHPLC	Denaturing high performance liquid chromatography
Kb	Kilobase
ATP	Adénosine triphosphate
FRET	Fluorescence resonance energy transfert
EMS	Ethylméthyle sulfonate
QTL	Quantitative trait loci
GC	Gène candidat
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CTAB	Cethylmethyl ammonium bromide
p/v	Poids/volume
PVP	Polyvinylpyrrolidone
Ref	Référence
nm	nanomètre
Tilling	targeting induced local lesions in genomes

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
1. La chicorée <i>Cichorium intybus</i> L. : Fiche signalétique	1
2. Les fructanes et l'inuline	2
2.1 Quelques généralités.....	2
2.2 Importance physiologique des fructanes chez les végétaux	3
2.3 Les diverses utilités de l'inuline pour l'homme.....	6
3. La synthèse et la dégradation des fructanes chez les végétaux.....	6
3.1 Les fructosyltransférases : origine et particularités	6
3.1.1 Fructane exohydrolases	8
3.1.2 Les invertases et les sucrose synthases.....	10
3.2 Les voies de biosynthèse des fructanes	12
3.3 Les voies de dégradation des fructanes	14
3.4 Distribution spatiale et temporelle des enzymes du métabolisme des fructanes..	14
3.5 Contrôle et induction du métabolisme des fructanes.....	15
4. Les SNPs, le déséquilibre de liaison et les haplotypes	16
4.1 Les SNPs : définition et fréquence	16
4.2 Applications des SNPs : les notions d'haplotype et de déséquilibre de liaison	17
5. Les différentes techniques de détection des SNPs	19
5.1 Le pyroséquençage	19
5.2 Les micro-arrays	20
5.3 La DHPLC	21
5.4 La real-time PCR	21
5.5 La technologie Luminex® xMAP™	23
5.6 La spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS.....	23
5.7 L'extension d'amorces.....	24
5.8 La chromatographie d'affinité utilisant un gradient de température et une colonne couplée à un oligonucléotide simple brin.....	25
6. L'approche Eco-tilling.....	25
6.1 Le Tilling	25
6.2 L'Eco-tilling	28
6.3 L'enzyme CEL 1	29
7. La technique SSCP (Single-Strand conformation polymorphism)	30
8. L'approche gènes candidats.....	31
9. Objectif du travail de mémoire	33

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Extraction d'ADN génomique	36
1.1. Extraction d'ADN génomique par la méthode CTAB	36
1.2. Extraction d'ADN génomique par la méthode Phytopure22	

(Amersham Biosciences).....	37
2. Polymérase Chain Reaction (PCR)	38
3. Vérification d'amplification sur gel d'agarose 1%	39
4. Technique single strand conformation polymorphism (SSCP).....	40
5. Ecotilling.....	43
6. Purification de l'ADN par la méthode glycogène.	44
7. Purification des produits PCR par Microcon Amiconbioseparation Centrifugal Filter Devices	44
8. Méthode du séquençage	45
 RÉSULTATS ET DISCUSSION	
1. Description du matériel génétique utilisé.....	48
2. Choix des gènes candidats impliqués dans l'allocation du carbone	50
3. La technique Single Strand Conformation Polymorphism : réalisation d'un criblage du polymorphisme préalable à une étude par Ecotilling.....	53
3.1. Positionnement des sites de restriction et choix des enzymes de restriction.....	53
3.2. Résultats des gels SSCP	56
4. Étude du polymorphisme par Ecotilling	61
5. Réalisation d'un gradient de température : choix d'une température spécifique pour l'amplification des quatre gènes candidats avec les amorces fluorescentes et réalisation des premiers tests Ecotilling.....	63
6. Détermination du polymorphisme par hybridation sur eux-mêmes38 des différents produits d'amplification	69
7. Hybridation sur référence et détermination du polymorphisme entre les homozygotes	69
8. Résumé et analyse des résultats obtenus en Ecotilling	70
8.1. Analyse des fréquences alléliques trouvées.....	70
8.2. Comparaison du phénotype et des profils Ecotilling obtenus pour les cinq variétés.....	72
8.3. Liaison des gènes CiFr03 et Eco5	74
9. Comparaison des résultats obtenus par SSCP et par Ecotilling	75
 DISCUSSION GÉNÉRALE	79
PERSPECTIVES.....	82
BIBLIOGRAPHIE	84

Introduction

INTRODUCTION

1. La chicorée *Cichorium intybus* L. : Fiche signalétique

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Cichorium</i> L
Espèce	<i>Cichorium intybus</i>

La chicorée (*Cichorium intybus*) fait partie de la famille des Astéracées (ou composées) tout comme le pissenlit, la laitue, le chardon, l'artichaut, le chrysanthème, la marguerite ou l'edelweiss. Cette grande famille très variée de dicotylédones compte 13.000 espèces réparties en 1500 genres, regroupées par la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules.

La chicorée existe à l'état sauvage sous la forme d'une plante herbacée robuste plus ou moins pubescente et vivace de 40 cm à 1 m de haut très commune dans les prés, les champs incultes et au bord des chemins (voir [figure 1](#)). Cette plante est originaire d'Europe, d'Asie et d'Afrique du Nord. Elle présente des feuilles basales très fortement découpées, des feuilles entières lancéolées à mi-hauteur et des feuilles supérieures réduites à des bractées. Les inflorescences sont des capitules ligulées, bleues qui s'étalent par temps ensoleillé et se rapprochent la nuit ou par temps couvert. Les fruits (akènes) sont recouverts d'une couronne de poils (pappus). La chicorée sauvage a de tous temps été ramassée pour être consommée en salade ou comme plante médicinale pour ses propriétés stomacales, puratives et légèrement laxatives. C'est principalement la racine qui est utilisée en pharmacie.

La chicorée sauvage (*Cichorium intybus* L) est à l'origine des variétés cultivées telles que la chicorée à café (*Cichorium intybus* subsp. *intybus* convar. *Sativum*) ou l'endive (*Cichorium endivia* L). Il existe ainsi différentes variétés de chicorée cultivées soit pour leurs feuilles (salades, endives) soit pour leurs racines (succédané de café) : Chicorée sauvage améliorée, Barbe de capucin, Chicorée à café (ou chicorée industrielle), Chicorée de Bruxelles, Chicorées italiennes, Chicorée scarole, Chicorée frisée. La culture de la chicorée à café a fait appel à des variétés sélectionnées pour le développement du volume de la racine, ayant considérablement augmenté par rapport à la variété sauvage. Les variétés cultivées actuellement pour la chicorée industrielle sont des hybrides F1 issus de deux lignées : la chicorée de Magdebourg, à feuilles larges et entières et la chicorée Brunswick à feuilles découpées et frisées. On compte actuellement 38 variétés différentes de chicorée industrielle.

La chicorée cultivée est une plante bisannuelle. D'abord cultivée pour la torréfaction de sa racine, la chicorée à café est, depuis les années 1970, également utilisée pour la production d'inuline, substitut du saccharose dans l'industrie alimentaire. La racine de la chicorée contient 20% d'inuline, qui peut être utilisée en tant que telle ou convertie par hydrolyse en fructose et en glucose. D'autres plantes, comme le dahlia ou le topinambour, utilisent également l'inuline en glucose. D'autres plantes, comme le dahlia ou le topinambour, utilisent également l'inuline comme substance de réserve. Néanmoins, la chicorée reste à ce jour la seule à être utilisée dans le cadre d'une extraction commerciale des fructanes. Ces dernières années, la production annuelle d'inuline à partir de racine de chicorée a augmenté de 1000 à plus de 100.000 tonnes. (www. wikipedia.fr)



Figure 1 : Représentation de la forme sauvage de la chicorée *Cichorium intybus* L.

2. Les fructanes et l'inuline

2.1 Quelques généralités

Bien que la plupart des plantes utilisent l'amidon ou le saccharose pour le stockage des hydrates de carbone, près de 15% des plantes à fleurs stockent le carbone sous forme de fructanes. La plupart de ces espèces appartiennent à la famille des Astéraceae, des Campanulaceae ou des Boraginaceae (dans le cas des dicotylédones) ou à la famille des Poaceae ou des Liliaceae (dans le cas des monocotylédones). On trouve parmi ces espèces des végétaux aussi divers que la tulipe (*Tulipa gesneriana*), le dahlia (*Dahlia variabilis*), l'oignon (*Allium cepa*), la laitue, l'orge, la chicorée (*Cichorium intybus*) ou des herbes de fourrage (tel que *Lolium perenne*).

Les fructanes constituent à eux seuls 80% du poids sec et près de 20% du poids frais des plantes qui les produisent et sont souvent stockés dans des organes spécialisés tels que les tubercules de dahlia, les bulbes de tulipe et d'oignon ainsi que la racine de chicorée. Contrairement à l'amidon qui est stocké dans des organelles spécialisées telles que l'amyloplaste, les fructanes sont synthétisés et accumulés dans la vacuole des cellules végétales (Cette affirmation n'a jamais été clairement démontrée. Seule la présence des enzymes de synthèse et de dégradation des fructanes a jusqu'à présent été mise en évidence dans la vacuole de protoplastes (Darwen, 1989)). Néanmoins, des études réalisées sur des apex d'avoine ont démontré la présence possible de fructanes dans l'apoplaste lors de la seconde phase de congélation d'un choc au froid (D.P. Livingston & C.A. Henson, 1998). Cette localisation extracellulaire reflèterait une fonction de cryoprotectant des fructanes, la congélation cellulaire débutant par l'apoplaste. La présence de fructanes de faible degré de polymérisation a également pu être mise en évidence dans le phloème de la monocotylédone *Agave deserti* (W. Van den Ende, 2000) ainsi que dans les feuilles de chicorée (Van den Ende & Van Laere, 2002). Le mécanisme par lequel les fructanes, supposés synthétisés et stockés dans la vacuole, parviennent jusqu'à la paroi cellulaire reste obscur. Néanmoins, certains auteurs ont proposé que ce transport des fructanes pourrait se réaliser selon un mécanisme d'exocytose (Crafts-Brandner, 2005).

Les fructanes sont des polymères linéaires ou branchés de fructose. Ce type de molécule est caractérisé par la présence de minimum deux résidus fructose adjacents. Bien que la plupart des fructanes possèdent également une molécule de glucose à l'intérieur, ou plus couramment en position terminale de la chaîne de polysaccharide, la présence de ce glucose ne constitue pas une règle. En effet, un nouveau type de fructane constitué exclusivement de résidus fructose a récemment été découvert dans des racines de chicorée (Timmermans et al, 2001). Cette chaîne de fructose aurait pour origine une molécule de levanbiose, produit de dégradation des levanes par une levansucrase (Daguer, 2004).

Les fructanes ne sont cependant pas spécifiques au monde végétal : un grand nombre de champignons et de bactéries (dont des bactéries phytopathogènes ou de la flore intestinale telles que celles du genre *Streptococcus*, *Bacillus* ou *Pseudomonas*) sont également capables de les synthétiser. Le plus souvent, les bactéries utilisent des voies de biosynthèse plus simple que celle des végétaux, impliquant généralement une seule enzyme de biosynthèse, la levansucrase. Les molécules de fructanes produites sont principalement des résidus fructosyles liés en $\beta(2-6)$, occasionnellement branchées en $\beta(2-1)$ et sont appelées les levanes. Ces molécules peuvent atteindre un degré de polymérisation de plus de 100.000 unités de fructose, ce qui est donc considérablement plus long que tout ce qui peut être trouvé dans le règne végétal. Dans ce cas, le fructane est généralement synthétisé de manière extracellulaire directement à partir de saccharose. Pour la dégradation des levanes, les bactéries possèdent des enzymes spécifiques appelées levanases, subdivisées en exo- et endo-levanases. Les premières libèrent une unité di-fructosyle terminale, les secondes hydrolysent les molécules de levane de plus de trois unités fructose.

A l'inverse des fructanes bactériens, les fructanes des végétaux montrent une grande diversité structurale. La longueur des chaînes est en moyenne plus petite et varie nettement plus que chez les bactéries. En général, le degré de polymérisation tourne autour de 30 à 50 résidus fructosyles chez les végétaux, bien que le degré de polymérisation (DP) puisse occasionnellement dépasser 200 unités (l'inuline stockée par la chicorée présente un DP moyen relativement faible avoisinant 10 à 15 unités seulement). Les fructanes végétaux présentent également une plus grande variété de liaisons entre les résidus fructosyles.

On distingue chez les végétaux supérieurs cinq grands types de fructane classés en fonction de leur structure : l'inuline, les levanes, les graminanes ou levanes mixtes, les néo-séries d'inuline et les néo-séries de levane.

- L'inuline (G1-2F1-Fn), le fructane le plus simple, est constituée d'une chaîne linéaire de résidus de fructose liés en β (2,1) terminée par une unité de glucose et est synthétisée par les végétaux de l'ordre des Asteraceae tels que la chicorée. (voir [figure 2](#))

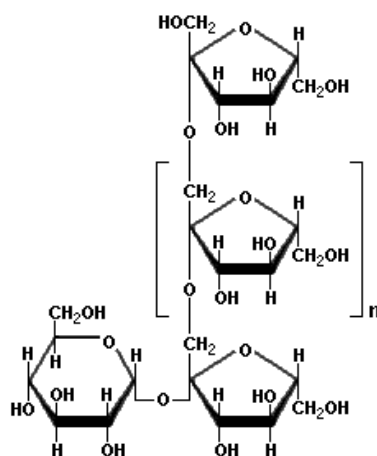


Figure 2 : Formule moléculaire du fructane le plus simple, l'inuline.

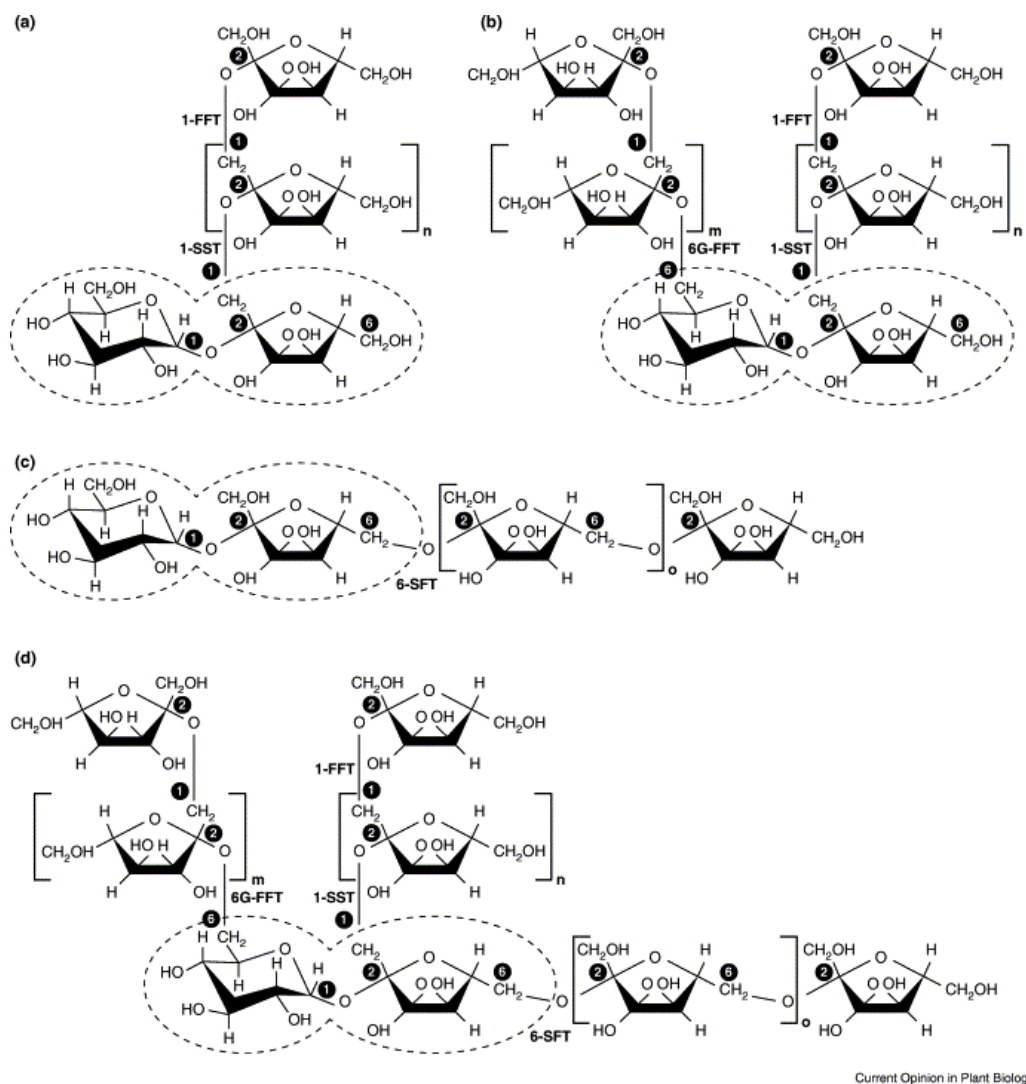
L'inuline est constituée d'une chaîne de fructoses liés en β (2,1) terminée par un résidu glucose. Le degré de polymérisation de cette chaîne est assez variable. Chez la chicorée industrielle (*Cichorium intybus* L.), celui-ci atteint 10 à 15 unités fructosyles.

- Le levane (G1-2F6-2Fn) est une chaîne de résidus fructose liés en β (2,6) et est synthétisé par certaines graminées et par la plupart des bactéries.
- Les levanes mixtes, appelés aussi graminanes, quant à eux sont composés d'unités fructosyle tant en liaisons (2,1) qu'en liaison (2,6) et sont synthétisés par l'ordre des Poaceae, comprenant entre autre le blé et l'orge.
- Les néoséries d'inuline (mF2-1F2-6G1-2F1-2Fn) consistent en deux chaînes de fructose liées en β (2,1) et greffées l'une sur le C1 du résidu fructose et l'autre sur le C6 du glucose d'une molécule de saccharose. Ce type de fructane est synthétisé par l'ordre de Liliacées comme l'oignon *Allium cepa*.

Enfin, les néoséries de levane sont des polymères de fructose en β (2,6) également greffés sur les extrémités du glucose d'un saccharose. Ce dernier type de fructane est synthétisé par des espèces appartenant à l'ordre des Liliacées et des Poacées (voir [figure 3](#)).

2.2 Importance physiologique des fructanes chez les végétaux

La distribution globale des plantes accumulant des fructanes comme molécule de réserve montre que ces espèces sont particulièrement abondantes dans les zones à climat tempéré présentant des sécheresses ou gelées saisonnières, alors qu'elles sont quasi inexistantes dans les régions tropicales. La raison de cette répartition est que, contrairement à la synthèse de l'amidon qui décroît brutalement lorsque la température chute en dessous de 10°C, la production des fructanes semble moins sensible aux basses températures. Pour exemple, la 1-SST de l'artichaut Jérusalem maintient 50% de son activité à 5°C par rapport à la température optimale comprise entre 20 et 25°C (Vijn & Smeekens, 1999). En plus de leur fonction de réserve, ce type de molécule serait donc impliqué dans la protection de la plante contre les stress tels que la sécheresse et les chocs au froid. En effet, il a été démontré que suite à une exposition à un de ces stress hydriques, les fructanes sont dépolymérisés en fructose par des enzymes de dégradation spécifiques, les fructane exohydrolases ou FEH, ce qui a pour conséquence d'augmenter la pression osmotique et de diminuer le point de



Current Opinion in Plant Biology

Figure 3 : Représentation des principaux types de fructanes

(a) L'inuline (b) les néoséries d'inuline (c) les levanes (d) les graminanes (Ritsema , 2003).

congélation des liquides intracellulaires (Livingston, 1998). On pense que les fructanes préviendraient également les dommages membranaires pouvant être causés par ce type de stress. Il est probable que ces dommages aux membranes in vivo soient causés par un changement de phase de lipides. Ils joueraient ainsi le rôle de protecteurs des membranes en modifiant la température à laquelle se produit la transition de la phase liquide vers la phase gel (Vereyken, 2000). Des expériences in vitro ont démontré la capacité des fructanes à interagir avec la tête des phospholipides, tant dans les bicouches que dans les monocouches phospholipidiques (Ristema, 2003 ; Vereyken, 2000). La réalisation de plantes transgéniques de *Lolium perenne* exprimant des gènes de fructosyltransférases a pu démontrer une augmentation de la résistance à la congélation au niveau cellulaire suite à une accumulation de fructanes (Hisano, 2004).

Il semble que la dégradation des fructanes intervienne donc dans plusieurs phénomènes physiologiques, allant de l'apport énergétique en fructose lorsque les demandes en énergie sont accrues, comme dans le cas d'une défoliation (De Roover, 1999) à la protection contre les chocs hydriques. La dépolymérisation des fructanes aurait également pour fonction d'augmenter la pression osmotique, ce qui jouerait notamment un rôle dans l'ouverture des pièces florales chez certaines fleurs telles que *Campanula* (Van den Ende, 2004).

2.3 Les diverses utilités de l'inuline pour l'homme

Les fructanes possèdent des propriétés diverses et trouvent des applications dans des domaines aussi variés que l'agroalimentaire ou la santé. Leurs différentes propriétés sont souvent liées à leur structure.

Ainsi, les fructanes à courte chaîne (DP compris entre 3 et 6), appelés fructooligosaccharides, présentent généralement un goût sucré alors que ceux à plus longue chaîne ont un goût neutre et possèdent la propriété de former des émulsions à texture grasse. Pour cette raison, de par leur émulsion avec de l'eau, ils sont de plus en plus utilisés dans certains produits alimentaires (comme par exemple, les yaourts ou les crèmes glacées) comme substituts aux graisses.

Un autre atout des fructanes est que le système digestif humain ne possède pas les enzymes nécessaires pour la dégradation de leurs liens glycosydiques mais qu'ils peuvent cependant être utilisés comme source de carbone par les bifidobactéries du colon, ce qui est de grand intérêt dans l'industrie alimentaire, notamment dans le secteur des produits à faible teneur en calories (Ritsema, 2003).

Les fructanes sont également connus pour leur capacité à résorber le calcium, ce qui peut être d'intérêt dans la prévention de l'ostéoporose. On leur attribue d'autres qualités telles que celles de diminuer le cholestérol, l'insuline, les triacylglycérols et les phospholipides sanguins ainsi que certaines propriétés anti-tumorales.

3. La synthèse et la dégradation des fructanes chez les végétaux

3.1 Les fructosyltransférases : origine et particularités

Toutes les enzymes intervenant dans les voies de biosynthèse et de dégradation des fructanes sont des glycosyltransférases. En effet, malgré la diversité des substrats que chacune utilise comme donneur (saccharose, 1-kestose ou fructane) et accepteur (H_2O , saccharose ou fructane), toutes réalisent un transfert de fructose d'une molécule à une autre. Pour la plupart de ces enzymes, la spécificité de substrat est relativement faible, ce qui leur permet d'accomplir des réactions différentes en fonction des conditions. Les fructosyltransférases présentant la plus grande spécificité de substrat sont les 1-FEH.

Des analyses biochimiques ont montré que certaines de ces enzymes présentaient une activité hydrolytique du sucrose (activité typiquement invertase). Il a, de même, été observé que, dans le cas de fortes concentrations en saccharose, la plupart des invertases pouvaient présenter une activité de type 1-SST (Vijn et al, 1998). Ces observations, supportées par un haut degré d'identité entre les séquences d'acides aminés d'invertases végétales et de fructosyltransférases, tendent à proposer une relation étroite entre ces deux types d'enzymes.

Toutes les enzymes associées au métabolisme des fructanes présentent donc une forte homologie de séquence entre elles (voir figure 4) et sont toutes connues comme des glycoprotéines. Ces enzymes appartiennent, au vu de ces caractéristiques, à la famille des glycosyle hydrolases (GH) 32, regroupant des invertases, des levanases, des inulinases et des levansucrases. Cette famille est elle-même souvent regroupée avec la famille GH 68 comprenant des invertases et des levansucrases bactériennes, formant ainsi la famille GH-J. L'ensemble des membres de cette famille partagent trois résidus critiques dans leur site actif et travaillent probablement toutes selon un mécanisme de ping-pong (Verhaest & Van den Ende, 2004). Ces résidus font partie de trois régions conservées dans cette même famille GH 32 : NDPNG, FRDP et WECPD. Peu de choses sont encore connues sur le mécanisme catalytique et les résidus impliqués dans la liaison et l'hydrolyse du substrat de ces enzymes.

La réalisation d'un modèle 3D pour cette famille (Pons, 1998) a permis de montrer que le repliement le plus probable donnait lieu à un domaine β -propeller ainsi que l'implication de 4 résidus essentiels dans le mécanisme catalytique (E232, C233, D6 et D162).

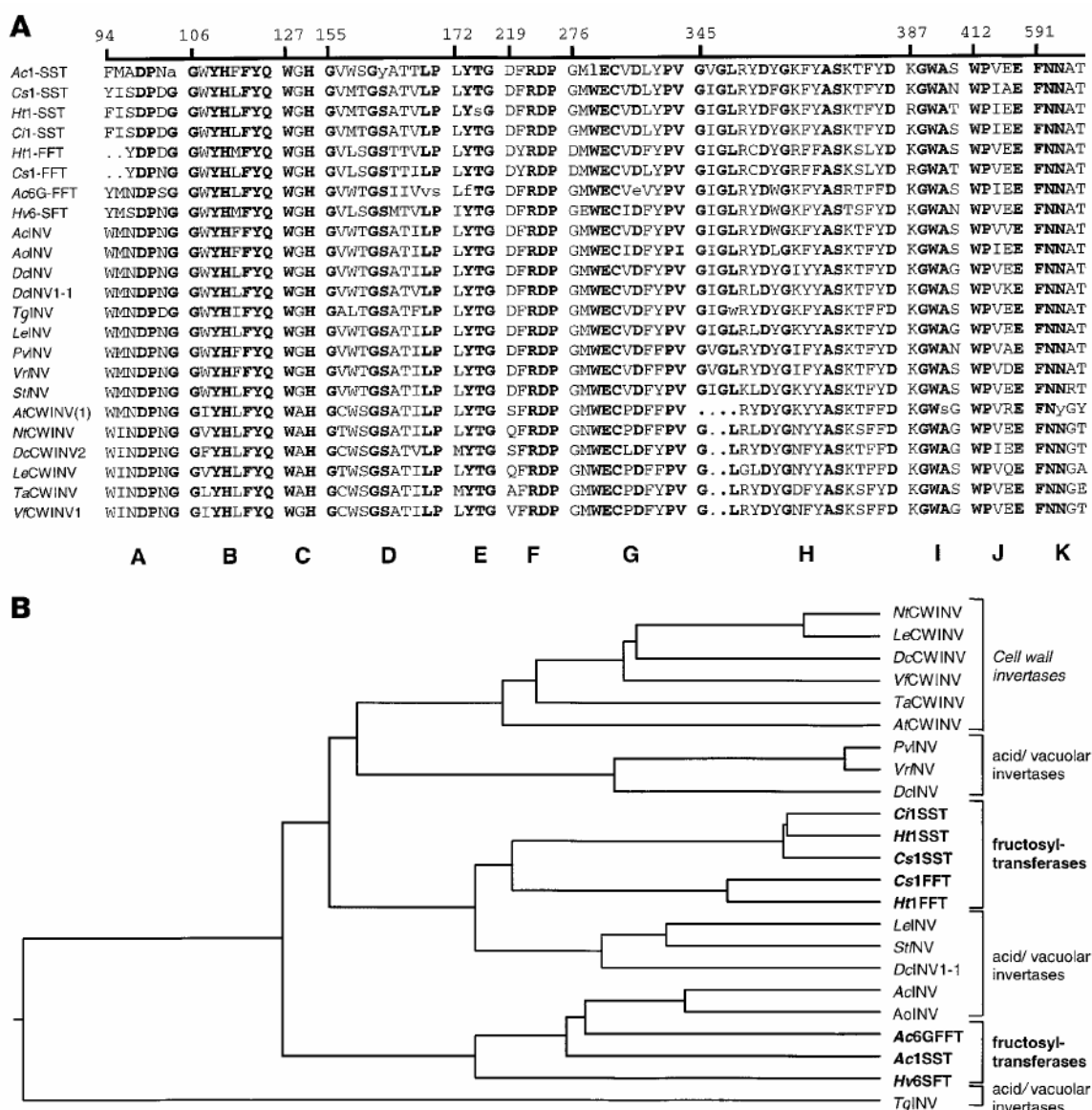


Figure 4 : (a) Alignement de séquences de différentes fructosyltransférases et (b) arbre phylogénétique de ces séquences révélant le degré d'homologie entre les différentes enzymes.

L'alignement des séquences de nombreuses fructosyltransférases de la famille GH 32 révèle non seulement un haut degré d'homologie mais également la présence de motifs conservés (WECP/VD, NDPNG, FRDP). Au sein de cette famille, l'étude du degré d'homologie a également démontré que la plupart des fructosyltransférases présentaient une très forte homologie avec les invertases vacuolaires, ce qui constitue un des arguments préconisant une origine possible de ce groupe d'enzymes à partir des invertases vacuolaires. Seules les fructane exohydrolases seraient issues d'une évolution des invertases pariétales. (Vijn, 1999)

Toutes ces observations tendent à démontrer que les fructosyltransférases auraient évolué à partir d'invertases par relativement peu de changements mutationnels. La plupart des fructosyltransférases seraient issues d'une invertase vacuolaire tandis que les fructane exohydrolases auraient évolué à partir d'une invertase de la paroi cellulaire ayant par la suite acquis un signal d'adressage vers la vacuole (voir [figure 4](#)). En effet, les Fructane exohydrolases (FEHs) semblent partager une plus grande homologie avec les invertases pariétales (43-59% acides aminés identiques) qu'avec les invertases vacuolaires (40-41%) ou les autres fructosyltransférases (33-39%). Les invertases pariétales peuvent être subdivisées en 4 sous-groupes, ceci suggérant une duplication multiple à partir du gène d'une invertase pariétale ancestrale. L'un de ces sous-groupes contient les FEHs (groupe IV), qui se discerne clairement des autres groupes par son point isoélectrique acide et la présence de signaux d'adressage vacuolaire en position N-terminale (Van den Ende et al, 2000). De plus, on a récemment démontré que la différence de spécificité de substrat entre les invertases pariétales (contenant le motif WECPD) et vacuolaires (contenant le motif WECVD) était totalement déterminé par la substitution de ce simple acide aminé (V/P). Tous les membres du groupe IV possèdent un P dans ce motif conservé.

3.1.1 Les Fructane exohydrolases

Plusieurs types de fructane exohydrolases (FEH) peuvent être distingués en fonction du type de liaison qu'elles clivent. Les 6-FEH (ou levanases) clivent spécifiquement les liaisons $\beta(2,6)$ tandis que les 1-FEH (ou inulinases) clivent les liaisons $\beta(2,1)$. Une FEH présentant les deux types d'activité a également pu être isolée chez *Hordeum vulgare* (Henson, 1998). Chez la chicorée *Cichorium intybus*, seules des FEHs de type inulinase sont présentes. Contrairement aux bactéries et aux champignons pour lesquels tant des exo- que des fructane endohydrolases ont pu être mises en évidence, les végétaux semblent être totalement dépourvus d'enzymes endolytiques des fructanes.

Jusqu'à présent, trois formes différentes de fructane exohydrolases ont été décrites à ce jour chez la plante modèle *Cichorium intybus* : La 1-FEH I, la 1-FEH IIa et la 1-FEH IIb. Ces deux dernières FEHs partagent entre elles 94% d'homologie, alors que celles-ci ne partagent que 50% d'homologie avec la 1-FEH I. Des études réalisées sur la chicorée ont démontré que les deux types de FEH (1-FEH I et 1-FEH II) étaient induites pour des raisons physiologiques totalement différentes : les 1-FEH II sont généralement considérées comme des « enzymes de survie ». En effet, ces deux enzymes sont induites lors d'une chute brutale dans l'arrivée du sucrose à la racine. Elles sont donc particulièrement actives lorsque de grosses demandes en énergie sont nécessaires, par exemple suite à une défoliation. Le temps de réaction de ces enzymes suite au stress de défoliation a été estimé à 24 heures (De Roover & Van den Ende, 1999). La 1-FEH I, elle, est induite, comme cela a précédemment été démontré, suite à une baisse brutale de la température. Celle-ci survient généralement aux alentours d'octobre : durant cette période, de grands besoins énergétiques ne sont pas nécessaires, ce qui tend à confirmer l'hypothèse du rôle de cryoprotectant des fructanes, ainsi que l'implication de cette dernière fructane exohydrolase dans la réponse au stress thermique (Van den Ende, 2001).

La purification d'une 1-FEH de *Cichorium intybus* a permis de mettre en évidence certaines propriétés de l'enzyme (De Roover & Van den Ende, 1999) : elle présente d'abord un optimum de température tournant autour de 35°C. Ensuite, bien que son activité soit directement proportionnelle à la concentration en 1-kestose et en inuline, l'enzyme semble inhibée par le sucrose. Cette particularité permet au végétal de réaliser un feed-back finement régulé de la dégradation de ses fructanes, la dégradation par les fructane exohydrolases ne se produisant que dans le cas de faibles concentrations en sucrose dans la vacuole, ce qui peut être lié soit à sa dégradation soit à son exportation.

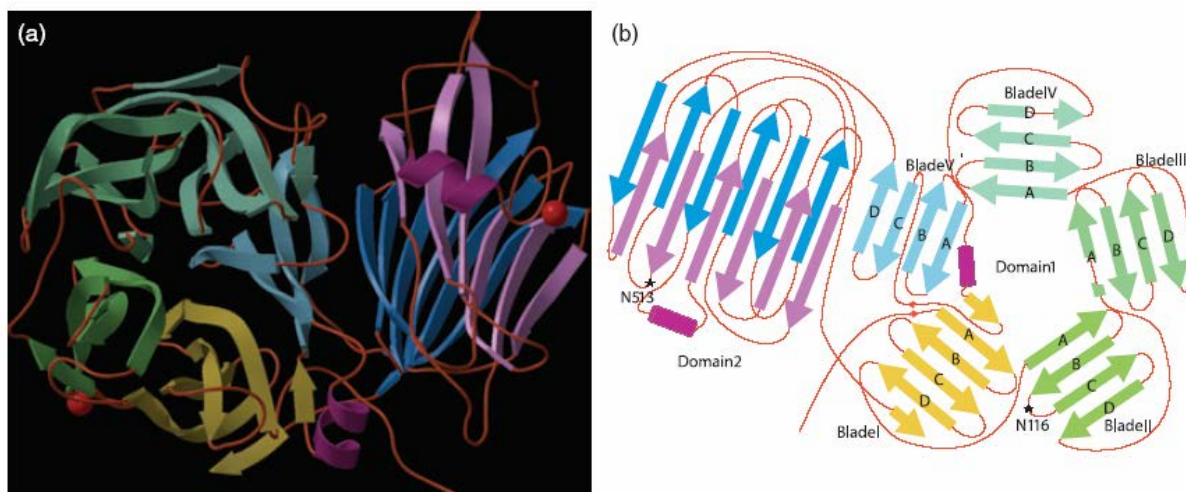


Figure 5 : Représentation de la structure de la 1-fructane exohydroase II a.

La structure cristalline des Fructane exohydrolases (FEHs) est constituée d'un domaine β -propeller du côté N-term, composé d'une répétition de cinq lames, suivi du côté C-term par un domaine formé de deux plans β (Verhaest & Van den Ende, 2004).

Bien que la localisation vacuolaire des fructanes et des enzymes intervenant dans leur métabolisme ait depuis longtemps été considérée comme acquise (quoique ceci n'ait jamais vraiment été démontré), des études ont rapporté la présence de FEHs à l'extérieur de la cellule dans certaines circonstances (Livingston, 1998). En effet, il a déjà été dit que les fructanes peuvent s'accumuler dans l'espace apoplastique suite à un choc au froid, jouant ainsi un rôle dans la protection des membranes. On a donc pensé que ces FEHs pourraient être impliquées dans la dégradation des fructanes suite à un choc au froid. Des hypothèses ont également été formulées, suite à la présence de quantités minimales d'invertases chez *Arabidopsis thaliana*, sur le fait que ces enzymes de dégradation puissent intervenir dans la production de signaux de type saccharidique pouvant être détectés par des senseurs spécifiques (Van den Ende & Van Laere, 2004). Des fructanes exohydrolases (principalement des 6-FEHs) ont également été trouvées chez certaines plantes n'accumulant pas de fructanes telles que *Beta vulgaris* et *Arabidopsis thaliana* (Van den Ende & Van Laere, 2004). La présence de ces enzymes dans de tels végétaux ne possédant pourtant pas de fructanes peut être expliquée par une éventuelle fonction de défense et de signalisation : les 6-FEHs auraient ici pour rôle de dégrader les fructanes exogènes d'origine bactérienne (de type levans).

La structure cristalline des FEHs, et notamment de la 1-FEH IIa, a été décrite et consiste en un domaine β -propeller en position N-terminale suivi par un domaine C-terminal formé par deux plans β (voir [figure 5](#)). Ce dernier domaine serait impliqué dans la reconnaissance des fructanes de différentes longueurs (Verhaest & Van den Ende, 2004). Le domaine β -propeller est quant à lui constitué d'une quintuple répétition de lames, chacune composée de quatre plans β antiparallèles groupés autour d'un axe central. Le site actif de l'enzyme présente trois acides aminés conservés dans la famille GH 32 : Asp22, Asp147 et Glu201, tous trois compris dans les trois domaines typiques à cette même famille GH 32. Des expériences de mutagenèse ont démontré l'importance de ces trois résidus dans l'hydrolyse des liens glycosidiques (voir [figure 6](#)).

Les 1-FEHs, en plus de partager avec les invertases le motif WEC(V/P)D, présentent une structure introns/exons très similaire à celle des invertases (entre 6 et 8 exons), notamment de par la présence d'un mini-exon de 9 nucléotides (exon II) encodant un tripeptide DPN extrêmement conservé dans le domaine bien connu W(I/M)NDPNG (ce mini-exon est l'un des exons les plus petits jamais publié). Chez les invertases pariétales, celui-ci est généralement suivi par un intron très court alors que chez les invertases vacuolaires, il précède des introns beaucoup plus longs, pouvant excéder 1500 nucléotides. La 1-Fructane exohydrolase II présente un intron long, ce qui la rapproche des invertases vacuolaires (Michiels, 2004).

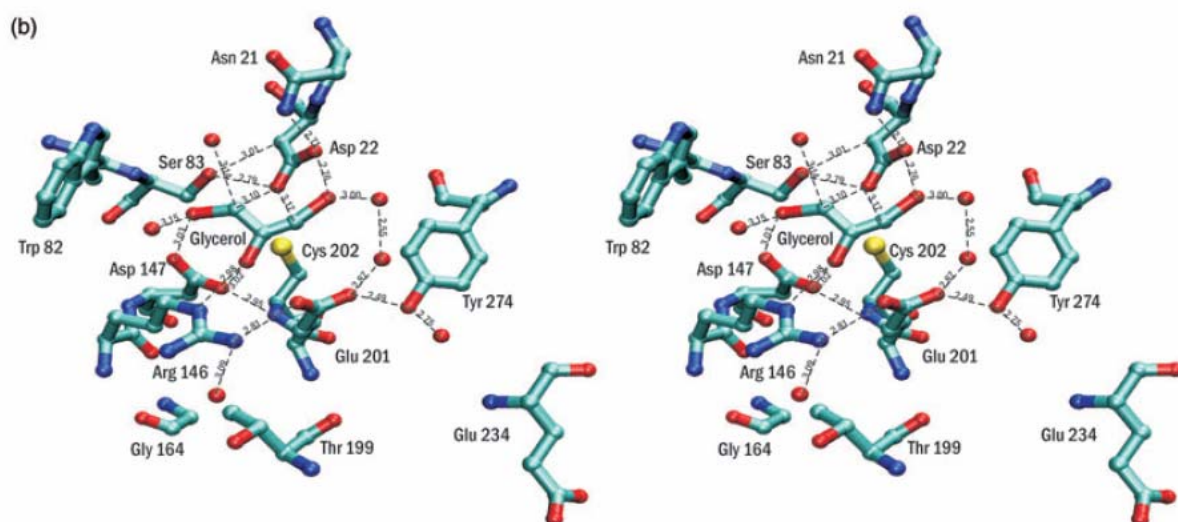


Figure 6 : Représentation du site actif de la 1-fructane exohydrolase IIa.

Le site actif de l'enzyme est caractérisé par trois acides aminés conservés (Asp22, Asp147 et Glu201) compris dans les domaines conservés à travers la famille GH 32. (Verhaest & Van den Ende, 2004)

3.1.2 Les invertases et les sucrose synthases

Les sucrose synthases et les invertases sont les seules enzymes réalisant le catabolisme du sucrose *in vivo*. Les sucrose synthases, en libérant des molécules d'UDP-glucose et de fructose, contribuent à la synthèse de polysaccharides tels que l'amidon ou la callose, à la formation de la paroi cellulaire ainsi qu'à la respiration. De leur côté, les invertases, produisant du glucose au lieu d'UDP-glucose, forment deux fois plus d'hexoses que les sucrose synthases. Cette caractéristique leur donnerait une plus grande capacité à stimuler certains récepteurs spécifiques au sucre, aboutissant ainsi à la modification de l'expression de nombreux gènes. De cette façon, les invertases pourraient jouer le rôle d'effecteurs dans de nombreux processus, incluant par exemple la synthèse et la perception d'hormones telles que l'acide abscissique (Koch, 2004).

Les enzymes de clivage du saccharose sont capables d'altérer le développement des végétaux de par leur activité. De manière générale, on a observé que les hexoses favorisaient la division et l'expansion cellulaire tandis que le sucrose favorisait la différenciation et la maturation. Ces observations ont mené à l'hypothèse que ces deux types d'enzyme contrôleraient les transitions entre les premiers stades de développement des végétaux. Ainsi, les invertases contrôleraient l'initiation et l'expansion de nombreuses structures de réserve, l'activité des invertases vacuolaires précédant souvent celle des invertases pariétales. La transition plus tardive vers les stades de maturation et de stockage serait facilitée par des changements dans le ratio hexose/saccharose et par le passage des voies de clivage des invertases vers celle des sucrose synthases (Koch, 2004) (voir [figure 7](#)).

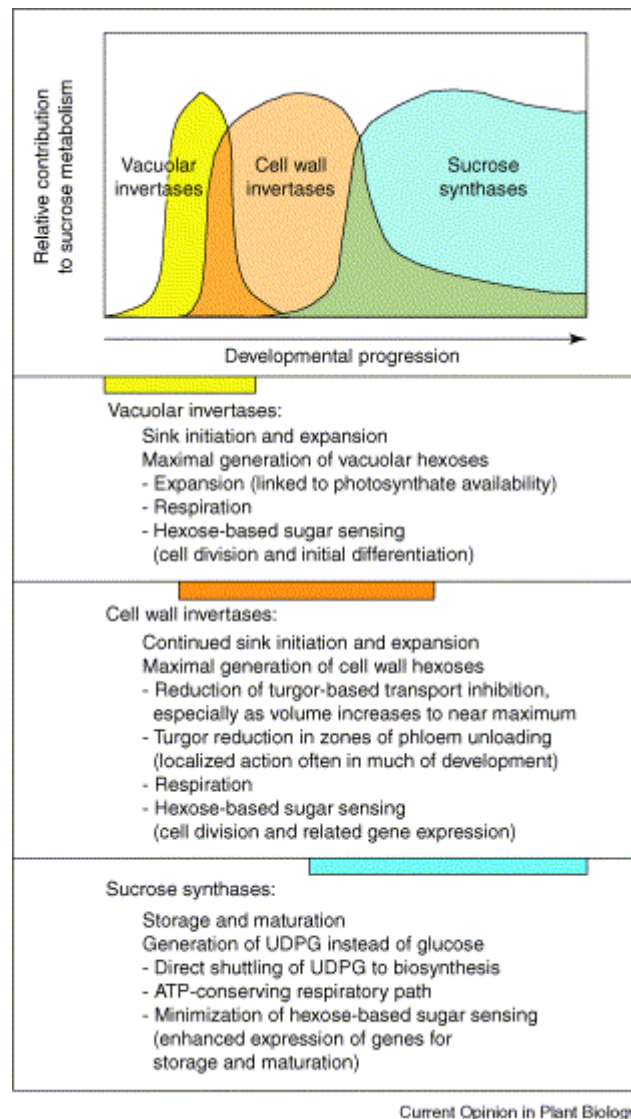


Figure 7 : Représentation de l'activité des sucrose synthases et des invertases au cours du développement du végétal.

Les sucrose synthases et les invertases contrôlent la transition entre les premiers stades de développement chez les végétaux. Les invertases vacuolaires seraient les premières à intervenir pour l'initiation et l'expansion de certaines structures, directement suivies par les invertases pariétales. Plus tardivement, les sucrose synthases faciliteraient la transition vers les stades de maturation et de stockage par le changement du ratio hexose/ sucrose. (Koch, 2004)

Les invertases sont des β -fructosidases dont la structure est constituée d'un domaine β -propeller possédant l'activité catalytique et connecté à un module β -sandwich, tout comme les autres enzymes de la famille GH32. Trois carboxylates (appartenant aux trois acides aminés conservés dans la famille GH32), situés à l'extrémité d'un tunnel chargé négativement dans le domaine β -propeller, sont essentiels pour la catalyse et fonctionnent respectivement comme nucléophile, acide général et stabilisateur de l'état de transition. La machinerie de clivage des invertases est parfaitement superposable avec celle des enzymes des familles GH43 et GH68, la variation de position de l'anneau furanose au niveau du site de clivage expliquant les différences de mécanismes entre les familles GH32 et GH68 (maintenant une configuration anomérique) et GH43 (inversant la configuration) (Alberto & Czjzek, 2004). Les invertases existent sous forme monomérique et multimérique chez les végétaux. Ces enzymes sont trouvées dans trois localisations possibles : la paroi, la vacuole et le cytoplasme (ces dernières présentant une activité très faible). Ces invertases peuvent être « alcalines » ou « acides » en fonction de leur optimum de pH. Certaines isoformes acides sont extracellulaires, soit solubles soit fermement liées à la paroi (Obenland, 1993).

Les invertases présentent des fonctions différentes en fonction de leur localisation : les invertases vacuolaires contribuent principalement à l'importation de saccharose et à la production de signaux de type sucre ainsi qu'à la régulation de la turgescence et au contrôle de l'équilibre des sucres dans les tissus des fruits et des tubercules matures. Les invertases pariétales jouent un rôle central dans le déchargement du phloème. Elles interviennent également dans le développement du pollen et des racines ainsi que dans la réponse à certains signaux provenant des stress biotiques ou abiotiques (Koch, 2004).

La plupart des espèces végétales possèdent plusieurs isoformes de sucrose synthase. Ces différentes isoformes présentent généralement des différences notables tant au niveau de leur régulation, que de leur expression et peuvent intervenir dans différentes fonctions métaboliques. Ainsi, chez la betterave (*Beta vulgaris*), deux isoformes de cette enzyme ont pu être mises en évidence, différant par leur charge et leur expression (Klotz, 2002).

3.2 Les voies de biosynthèse des fructanes

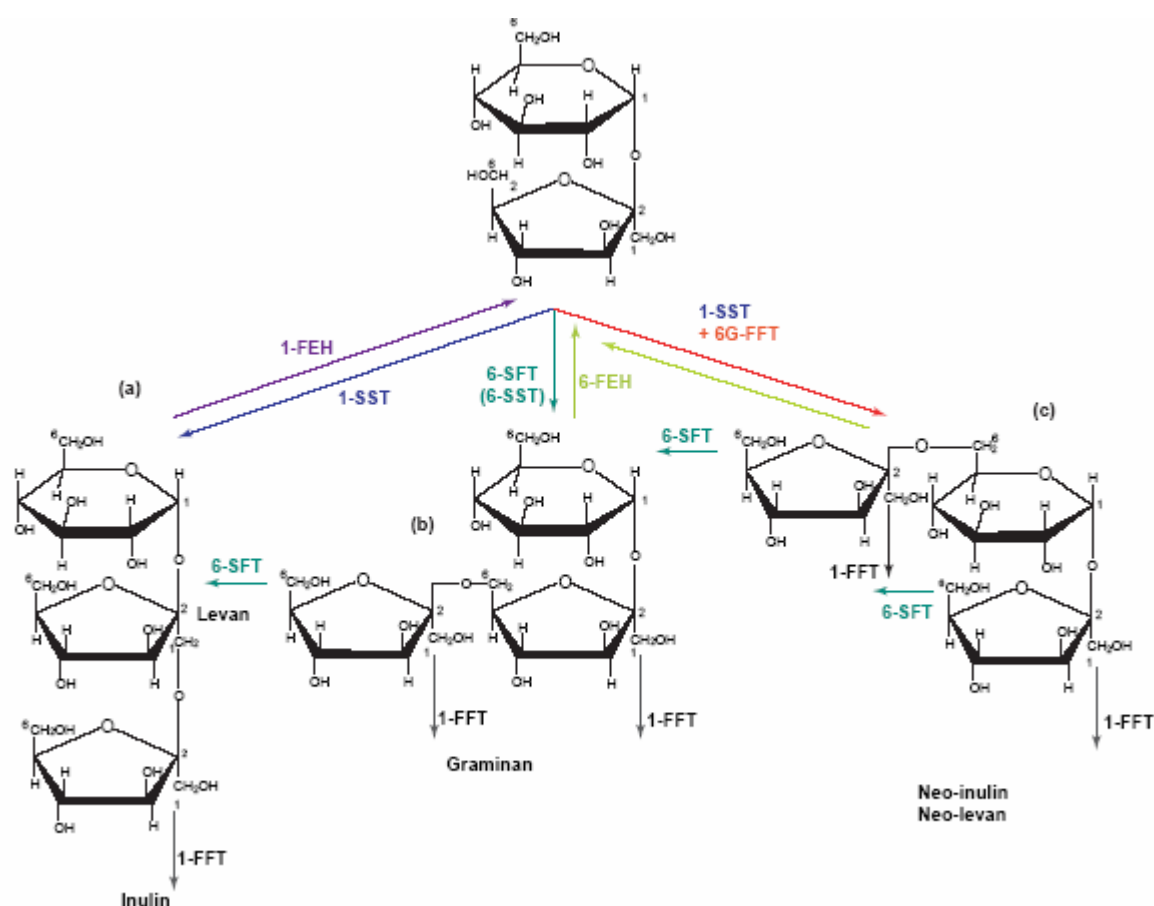
Le substrat pour la synthèse des fructanes est le saccharose, produit final de l'activité photosynthétique.

Deux enzymes sont nécessaires pour la synthèse de l'inuline : la sucrose : sucrose 1-fructosyltransférase (1-SST) et la fructane : fructane 1-fructosyltransférase (1-FFT). La première enzyme intervenant dans la voie de synthèse, la 1-SST, réalise le transfert du fructose d'une molécule de sucrose sur un autre sucrose formant ainsi le trisaccharide 1-kestose ou isokestose (G1-2F1-2F). La 1-FFT utilise alors ce 1-kestose ou un fructane de plus grand degré de polymérisation comme donneur de fructoses, pouvant alors être transférés sur une grande variété de fructanes ou sur du saccharose. L'action combinée de la 1-SST et de la 1-FFT résulte en la formation d'un mélange de molécules de fructanes présentant différentes longueurs de chaînes. Il semble que la longueur des chaînes soit principalement liée à l'activité de la 1-FFT, bien qu'un rôle des fructane exohydrolases soit possible.

Tant la 1-SST que la 1-FFT sont des enzymes inhabituelles : elles ne présentent pas une cinétique enzymatique de type Michaelis-Menten. L'activité de ces enzymes dépend en effet tant de la concentration en substrat que de celle en enzyme et n'est pas saturable (Vijn & Smeeckens, 1999).

Ce modèle de biosynthèse des fructanes, proposé en 1968 par Edelman et Jefford et impliquant les enzymes 1-SST et 1-FFT, a été confirmé par la synthèse de novo de fructanes in vitro (Lüscher, 1996) ainsi que par l'expression de ces enzymes chez des espèces ne produisant pas de fructanes naturellement (Sprenger, 1997). Néanmoins, il reste encore sujet à certaines critiques prenant pour argument que les quantités de fructanes ainsi que l'activité des enzymes intervenant dans leur métabolisme seraient toujours inférieures chez les plantes transgéniques que chez les plantes naturellement productrices de fructanes. Cette différence pourrait s'expliquer par une plus grande instabilité de ces enzymes dans un milieu « étranger » (Van Laere & Van Den Ende, 2002).

Lors de la synthèse de fructanes plus complexes, d'autres enzymes de synthèse sont alors nécessaires. La synthèse des néo-séries d'inuline requiert la fructane : fructane 6G-fructosyltransférase (6G-FFT) qui utilise le 1-kestose comme donneur de fructose et transfère ce dernier sur le résidu glucose d'un saccharose via un lien $\beta(2,6)$ pour former un néokestose. Cette molécule de néokestose peut alors servir de substrat pour son élongation à deux enzymes, la 1-FFT ou la 6-SFT, aboutissant respectivement à la formation de néo-séries d'inuline ou de néo-séries de levane. La 6G-FFT est probablement également nécessaire pour la synthèse des graminans complexes. Une autre enzyme pouvant intervenir est la sucrose : fructane 6-fructosyltransférase (6-SFT). Celle-ci utilise le 1-kestose pour synthétiser du bifurcose, un tétrasaccharide présentant un fructose additionnel lié en $\beta(2,6)$. Cette molécule, tout comme le néokestose peut être utilisée comme substrat par la 1-FFT et la 6-SFT, aboutissant dans ce cas à la formation de levane mixte (voir [figure 8](#)).



TRENDS in Plant Science

Figure 8 : Représentation simplifiée des voies de biosynthèse et de dégradation des fructanes.

Tous les fructanes sont synthétisés à partir de saccharose. La synthèse des fructanes les plus simples (ex : inuline) nécessite uniquement l'action de deux enzymes, la 1-SST et la 1-FFT. Pour les fructanes plus complexes (ex : graminanes, levanes, néoséries), l'intervention d'autres enzymes comme la 6-SFT ou la 6G-FFT peut être nécessaire. La dégradation des fructanes est réalisée uniquement par des fructane exohydrolases (1-FEH ou 6-FEH en fonction des liaisons). (Van den Ende & Van Laere, 2004)

3.3 Les voies de dégradation des fructanes

A l'heure de mobiliser ses réserves en fructanes, les plantes font appel pour leur dégradation aux fructane exohydrolases (FEH). Ces enzymes libèrent les monomères de fructose à partir de l'extrémité de la chaîne du polysaccharide. Jusqu'à présent seules des FEH spécifiques de liens β (1,2) ont été clonées chez la chicorée et le blé (*Triticum aestivum*). Il est possible que la 1-FFT intervienne également lors de la mobilisation des réserves en fructanes. En effet, la 1-FFT pourrait raccourcir l'inuline en transférant un résidu fructosyle de l'inuline vers le saccharose, créant ainsi du 1-kestose et une molécule d'inuline raccourcie. L'hydrolyse successive des résidus fructosyles terminaux par la FEH aboutit à la formation d'une molécule de saccharose. Celle-ci peut alors être clivée par deux types d'enzymes, les invertases et les sucrose synthases. Les premières réalisent le transfert du fructose de la molécule sur une molécule d'eau libérant ainsi un glucose. Les secondes réalisent la même réaction mais transfèrent par la même occasion un UDP sur le glucose, libérant ainsi un UDP glucose (voir [figure 8](#)).

Des enzymes de dégradation beaucoup plus spécifiques, telles que la 6-KEH (6-kestose hydrolase) dégradant le 6-kestose en fructose et en glucose, ont récemment été découvertes dans le fluide apoplastique des tissus accumulant des fructanes (Crafts-Brandner, 2005).

3.4 Distribution spatiale et temporelle des enzymes du métabolisme des fructanes

Une étude réalisée sur le métabolisme des fructanes dans les rhizophores de l'Astéracée *Veronia herbacea* (vell.) a révélé la distribution spatiale et temporelle de ces enzymes dans les différents stades de développement du végétal (Portes & Carvalho, 2006).

Cette étude a donc démontré, premièrement, une distribution temporelle pendant les différents stades de développement : pendant la phase végétative, l'activité de la 1-SST est grande tandis que celle de la 1-FEH est faible. Cette situation est cependant totalement inversée pendant la période de croissance (pousse). Les activités de la 1-FFT et des invertases sont quant à elles plus constantes. Ensuite, il a également pu être démontré une répartition spatiale des fructosyltransférases dans le rhizophore : Les activités de la fructane exohydrolase et des invertases sont particulièrement élevées dans la partie proximale tandis que la 1-SST et la 1-FFT sont surtout actives dans la partie distale. Ces résultats confirment que la biosynthèse des fructanes se réalise préférentiellement dans les tissus jeunes (région distale) pendant la croissance végétative, alors que leur mobilisation se produit surtout dans la période de croissance, dans la partie proximale, à la base des tiges (voir [figure 9](#)).

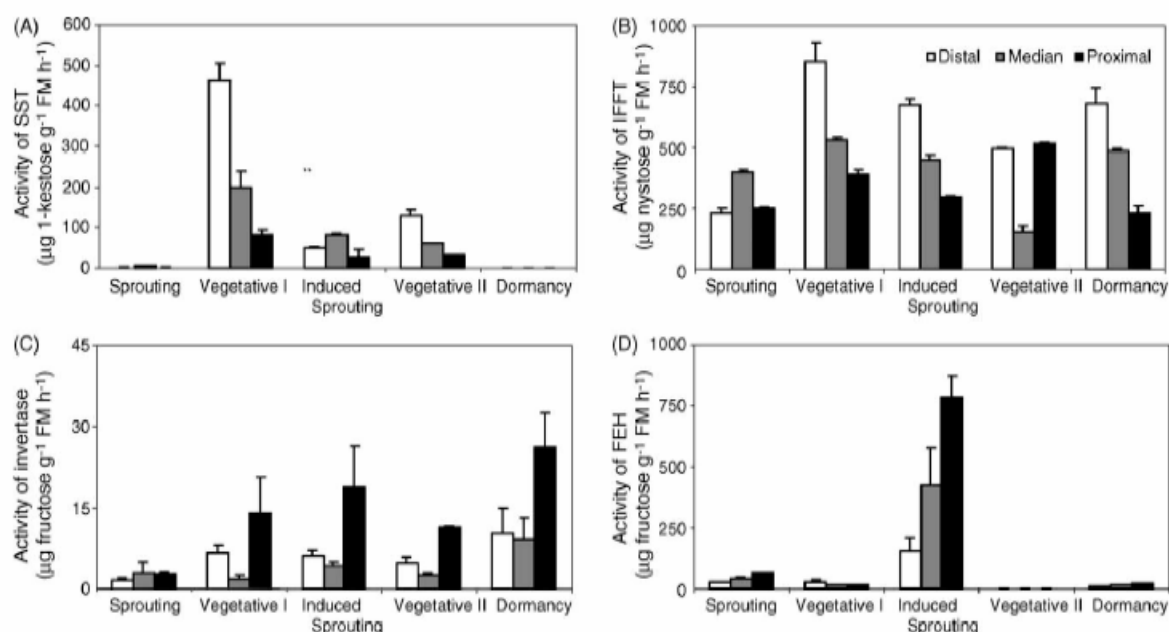


Figure 9 : Représentation schématique de l'activité des enzymes 1-SST, 1-FFT, invertase et fructane exohydrolase en fonction du stade de développement et de la distribution spatiale (position proximale, médiane et distale) dans la racine de l'Astéracée *Veronica herbacea* (vell.)

Les activités de la 1-SST et de la 1-FEH sont temporellement opposées : pendant le période végétative, l'activité de la 1-SST est élevée tandis que celle de la 1-FEH est très faible. Lorsque vient la période de la pousse, quand la demande en énergie de la plante augmente, la tendance s'inverse. L'activité de la 1-FFT reste elle plus constante, assez élevée et suit plus ou la même profil que la 1-SST.

La répartition spatiale montre que les enzymes de synthèse sont surtout actives vers la partie distale alors que les enzymes de dégradation sont plutôt actives dans la partie proximale de la racine. (Portes, 2006)

3.5 Contrôle et induction du métabolisme des fructanes

L'accumulation des fructanes se produit tant dans la croissance normale des plantes que lors d'une induction par certains stress tels que la sécheresse, le gel ou un déficit en azote. Les chicorées commencent déjà à accumuler des fructanes à un stade très précoce par l'induction de l'activité des enzymes 1-SST et 1-FFT. Il semble que l'activité de la 1-SST, ainsi que sa transcription, dépendent de nombreux stress : la sécheresse ainsi qu'un déficit en azote tendent à induire son activité alors qu'une défoliation ou un traitement au froid tendent à la diminuer (Van den Ende, 1996; Savitch, 1999). De même, de fortes quantités de saccharose et de lumière tendent à induire le gène 1-SST. Les variations dans les teneurs en sucrose dans les cellules semblent donc avoir un impact important sur les enzymes du métabolisme des fructanes.

Les différentes enzymes intervenant dans le métabolisme des fructanes sont principalement contrôlées au niveau transcriptionnel (Van Laere & Van den Ende, 2002). Néanmoins, d'autres niveaux de contrôle pourraient exister : certains articles indiquent un rôle possible des protéines kinases et des phosphatases dans l'induction des fructosyltransférases (Martinez, 2001) ainsi que l'intervention possible d'inhibiteurs notamment dans le cas des invertases (Raush & Greiner, 2003 ; Pressey & Shaw, 1966 ; Pressey, 1967). Un autre niveau possible régulation pourrait être l'épissage alternatif des ARN pré-messagers. Les invertases possèdent, par exemple, un petit exon encodant trois acides aminés (motif NDP ; voir plus haut « Fructane exohydrolases ») dans la boîte très conservée impliquée dans la liaison au saccharose. Suite à un stress au froid, certains gènes d'invertases chez la pomme de terre perdent cet exon par épissage alternatif, donnant ainsi lieu à une invertase non fonctionnelle. Cette observation confirmerait un rôle physiologique important pour ce motif NDP, notamment dans la régulation post-transcriptionnelle du gène (Bournay, 1996). Il a également été rapporté que l'action d'hormones telles que les gibbérellines pouvaient influencer le métabolisme des fructanes : certains inhibiteurs de leur synthèse diminuent l'induction des FEHs suite à une défoliation. De plus, l'addition de ces inhibiteurs amène chez l'ail (*Alium cepa*) une augmentation du contenu en fructanes des organes (Morvan, 2001 ; Le guen-Le saos, 2002). De même, l'étude du promoteur du gène de la 1-FEH IIa a révélé l'existence de boîtes comme l'ABRE box, ce qui suggère un rôle de l'acide abscissique dans la régulation du gène (Michiels, 2004).

4. Les SNPs, le déséquilibre de liaison et les haplotypes

4.1 Les SNPs : définition et fréquence

Les marqueurs moléculaires sont utilisés pour mettre en évidence du polymorphisme entre individus. Dans le cadre de ce mémoire, la mise en évidence de la diversité allélique chez des gènes impliqués dans l'hydrolyse de l'inuline nécessitait l'utilisation de l'un de ces marqueurs. Ceux utilisés ici sont les SNPs, appréciés pour leur présence en assez forte densité sur l'ensemble du génome, tant dans les exons que dans les introns.

Les SNPs (single nucleotide polymorphism) ou mutations ponctuelles sont les variations génétiques les plus courantes dans les populations naturelles (à titre d'exemple, les SNPs constituent 90% de tous les polymorphismes chez l'homme). Les SNPs consistent en une substitution d'une seule paire de base dans une séquence donnée, pouvant donner lieu à un changement d'acide aminé. Ils sont principalement bialléliques et constituent des marqueurs moléculaires codominants.

La fréquence des SNPs dans le génome peut varier énormément en fonction des espèces ou de la région considérée. Généralement, on considère que la fréquence du polymorphisme augmente de plus de trois fois dans les régions non codantes (comme les introns ou les régions 3' non traduites) par rapport aux régions codantes (Rafalski, 2002). La fréquence des SNPs chez les végétaux a fait le sujet de moins d'études que chez l'humain, pour lequel une fréquence moyenne d'une mutation ponctuelle toutes les 1000 à 2000 pb a été déterminée (Batley, 2003). Néanmoins, certaines études ont montré que l'occurrence de ces mutations chez les végétaux était beaucoup plus grande. A titre d'exemple, la fréquence des SNPs chez le maïs est de un tous les 48 pb dans les 3'UTRs et de un tous les 130 pb dans les régions codantes. Chez le soja, on dénombre 1,64 SNPs par Kb dans les régions codantes alors que ce chiffre passe à 4,85 dans les régions non codantes. Une étude réalisée chez la betterave *Beta vulgaris* (Schneider, 2001) a révélé, suite à l'alignement de 37 régions codantes homologues, une fréquence de SNP de un tous les 130 pb. La plupart de ces SNPs avaient lieu en troisième

position des codons. Il a également été observé que 65% des SNPs étaient localisés dans les introns. Ce type de polymorphisme, bien qu'il ne modifie pas le produit du gène, peut cependant influencer le taux de transcription ou la stabilité de l'ARN messager et donc induire un effet sur le phénotype. La forte densité des SNPs dans le génome végétal en fait un marqueur de choix pour les études génétiques.

Contrairement à l'humain, peu de recherches de cartographie à l'échelle du génome à l'aide de SNPs ont été réalisées chez les végétaux. Une première cartographie génomique utilisant les marqueurs de type SNP a été décrite chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Cho, 1999).

4.2 Applications des SNPs : les notions d'haplotype et de déséquilibre de liaison

Le polymorphisme SNP peut être utilisé en tant que simple marqueur génétique ou peut être utilisé lors d'études d'associations entre les formes alléliques d'un gène et les phénotypes. De nombreux autres types de marqueurs moléculaires existent. Les plus couramment utilisés sont les marqueurs AFLP et les microsatellites.

Les SNPs peuvent aussi être utilisés pour l'identification d'haplotypes. Un haplotype est une région de l'ADN dans laquelle un déséquilibre de liaison est observé, par exemple entre plusieurs SNPs. Cette région doit donc être analysée au niveau de son polymorphisme de manière à mettre en évidence des associations entre les différents allèles. L'intérêt d'un haplotype est que, une fois les associations définies, la connaissance de quelques-uns de ces SNPs suffit pour caractériser entièrement l'haplotype en question. De tels SNPs définissant des haplotypes sont appelés « haplotype tags ». Les haplotypes peuvent chevaucher un ou plusieurs gènes, ce qui permet de mettre en relation les différents allèles de deux gènes (voir [figure 10](#)). Ainsi, lors de la transmission d'un allèle particulier d'un locus, l'allèle du second locus associé peut être directement inféré. Des associations entre les différents allèles des gènes de 1-SST et de 1-FFT ont ainsi été mises en évidence au laboratoire (URBV, FUNDP, Namur).

5. Les différentes techniques de détection des SNPs

Différentes méthodes sont disponibles pour le génotypage des SNPs. Le choix de l'une d'elles dépend de nombreux facteurs, dont notamment le prix, la possibilité de travailler en haut débit, l'équipement nécessaire et/ou la capacité de multiplexer les échantillons. Les activités de développement et d'amélioration de ces techniques restent intenses et jusqu'à présent, aucune méthode dominante ne semble encore avoir émergé de l'ensemble.

La voie la plus directe pour la détection des SNPs reste encore à l'heure actuelle le séquençage direct. Dans ce cas, une PCR est réalisée sur un groupe d'individus les plus diversifiés possibles, de manière à représenter au mieux la diversité de la population d'intérêt. Les différentes séquences obtenues sont alignées et les divers polymorphismes peuvent alors être identifiés, en distinguant bien les erreurs de séquençage des vrais polymorphismes (Rafalski, 2002). Ce travail peut également être réalisé à partir de séquences déjà disponibles dans les banques de données, comme les banques d'EST. Des programmes spécialisés d'analyse des alignements de séquences, basés sur une approche tenant compte de la redondance des mutations permettent de distinguer les SNPs véritables des erreurs de séquençage, facilitant ainsi le travail des chercheurs (Batley, 2003).

Le séquençage, bien que considéré comme une des techniques les plus efficaces pour la détection de mutations, est long et coûteux. C'est pour cette raison et parce que malgré la constante augmentation des séquences disponibles dans les bases de données, la fonction de nombreux gènes reste inconnue, qu'ont vu le jour de nombreuses stratégies alternatives de détection des SNPs, permettant ainsi de mettre en évidence des relations génotype/phénotype plus rapidement et à plus faible coût.

Les méthodes permettant de détecter et de génotyper de petites variations de séquences telles que les SNPs (single nucleotide polymorphisms) et éventuellement les insertions-délétions (indels) peuvent être catégorisées en deux grands groupes :

Le premier groupe nécessite une PCR préalable dont les produits seront utilisés comme matrice lors d'une seconde réaction et regroupe des méthodes telles que les microarrays.

Le second groupe comporte une réaction unique et homogène. Ce deuxième type de technique implique souvent de la fluorescence et présente souvent beaucoup d'avantages par rapport au premier groupe en termes tant de rapidité et d'automatisation que de simplicité. On retrouve parmi ces techniques la real-time PCR, l'extension d'amorces ou le pyroséquençage.

Beaucoup des techniques utilisées pour le génotypage des SNPs nécessitent plusieurs étapes et doivent encore être optimisées en termes de coût et d'analyse à haut débit. Un échantillon de ces techniques de génotypage est présenté ci-dessous. De nombreuses autres que celles-ci peuvent évidemment être utilisées pour la détection des SNPs.

5.1 Le pyroséquençage

Le pyroséquençage est une méthode particulière de séquençage basée sur la détection du pyrophosphate libéré lors de la réaction de polymérisation de l'ADN. Ce pyrophosphate est utilisé comme substrat de départ pour une série de réactions aboutissant à la production d'un signal lumineux. Le principe, très simple, est basé sur le fait que ce signal lumineux ne sera émis que lorsque le nucléotide en présence est complémentaire du template (voir [figure 11](#)). La technique implique l'utilisation de quatre enzymes indispensables à la production de ce signal : une Klenow ADN polymérase I, une ATP sulfurylase, une luciférase et une apyrase. Les nucléotides sont ajoutés individuellement et de manière cyclique afin de pouvoir identifier le nucléotide ajouté.

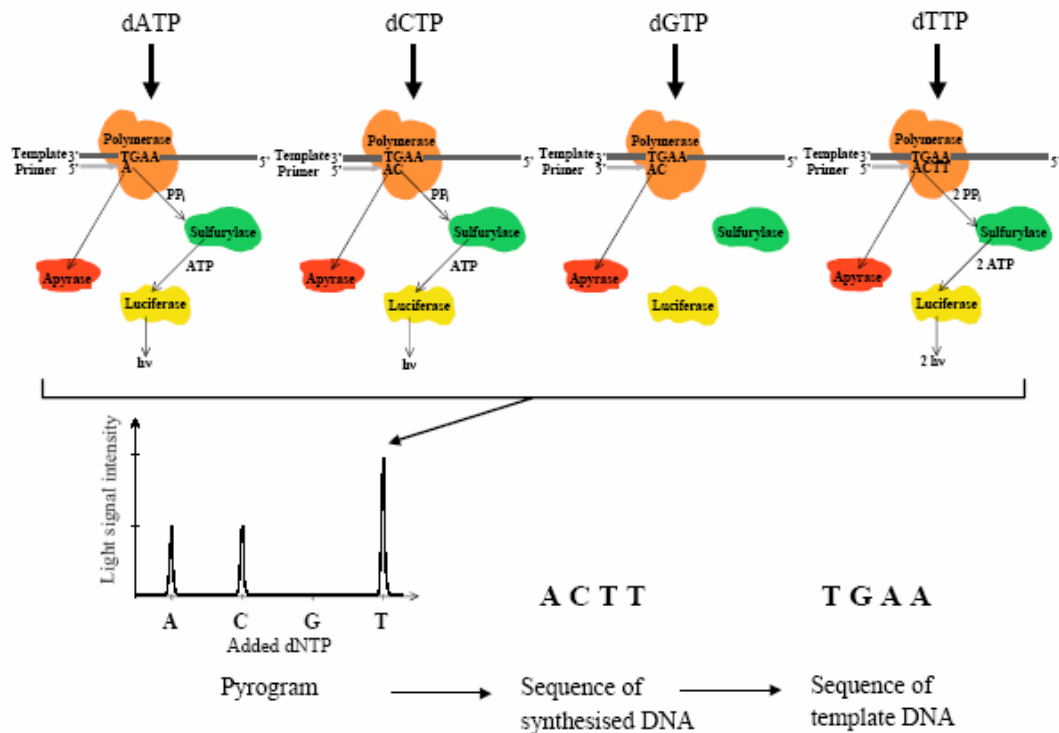


Figure 11 : Principe du pyroséquençage.

L'ajout du dntp complémentaire au template provoque la production d'un signal lumineux par l'action d'une luciférase. Dans le cas où le nucléotide ajouté ne correspondrait pas, aucun signal lumineux n'est produit. Entre chaque ajout de dntp, un traitement à l'apyrase est réalisé, permettant de se débarrasser des résidus de dntp entre chaque cycle (Ahmadian, 2006).

La technique présente l'avantage de se réaliser dans un tube unique et d'être totalement automatisée. Cependant, la nécessité de connaître la position de la mutation limite son application au domaine clinique, dans la détection de mutations responsables d'une maladie génétique déjà bien caractérisée. Une autre remarque adressée au pyroséquençage est que la taille de lecture obtenue est généralement très limitée. Les facteurs limitant principalement cette taille sont le background de la séquence, ainsi que les frameshifts positifs ou négatifs. Ce problème peut cependant être résolu par l'utilisation de protéines SSB (single strand binding protéine) (Ahmadian, 2005).

5.2 Les micro-arrays

Cette technologie se base sur la comparaison directe de l'hybridation de produits PCR issus d'ADN mutant et wild-type et marqués de manière fluorescente sur des sondes oligonucléotidiques fixées sur des lames de verre. La grande spécificité de ces tests permettent de détecter la légère différence entre une hybridation parfaite des séquences et une hybridation contenant un mismatch grâce au signal lumineux émis.

Dans des approches inverses, comme l'approche TAM (tagged microarray marker), ce sont les produits d'amplification qui sont fixés sur la lame puis testés par hybridation avec des sondes marquées spécifiques de chacun des allèles afin de déterminer l'état allélique du locus (Flavell, 2003).

D'autres techniques permettant une analyse quantitative et multiplexée de la fréquence de chacun des allèles, basées sur essai de mini-séquençage à quatre couleurs et réalisées sur des micro-arrays ont également été développées (Lindroos, 2002).

Bien que la plupart des techniques d'hybridation « array » se pratiquent sur milieu solide, des techniques de génotypage de SNPs en suspension sont également possibles. Dans ce cas, les sondes sont fixées de manière covalente sur des microsphères marquées de façon fluorescente puis mises en présence du produit PCR marqué à la fluorescéine. Les résultats sont alors analysés par cytométrie de flux (Amstrong, 2000).

La technologie des microarrays est souvent fort appréciée pour sa simplicité, sa robustesse et sa capacité de travail à haut débit (des dizaines de milliers de tests peuvent être réalisés sur une seule lame). Néanmoins, la technique reste très cher et seulement 50% des polymorphismes potentiellement détectables peuvent être identifiés.

5.3 La DHPLC

La DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) est une technique semi-automatisée permettant de détecter des variations de séquences par rétention différentielle des homo- et des hétéroduplexes sous des conditions de températures partiellement dénaturantes. Elle nécessite une étape préalable d'amplification du gène chez différents individus. Les produits d'amplification sont mis en présence avec un ADN de référence, dénaturés puis lentement réhybridés de manière à former des homo- et des hétéroduplexes. Ceux-ci sont alors élués selon un gradient de deux solutions tampons différentes sur un support chromatographique puis détectés par spectrophotométrie (absorption UV à 260 nm) (Shigemura, 2004 ; Posteraro et al, 2005).

Cette technique convient parfaitement pour l'analyse d'un grand nombre d'amplicons en peu de temps. Elle garantit une bonne sensibilité (97% des mutations sont détectées) couplée à un coût relativement bas (Posteraro et al, 2005). La DHPLC présente aussi l'avantage de pouvoir détecter des mutations multiples, bien que sa capacité à détecter des mutations situées vers la fin du fragment d'ADN soit faible (Shigemura, 2004).

Cette technique a déjà été utilisée dans des domaines aussi divers que l'étude de la résistance de certains parasites de l'homme (Shigemura, 2004), la détection de maladies génétiques humaines rares (Posteraro, 2005) ou l'étude de l'histoire évolutive humaine (Underhill, 1997).

5.4 La real-time PCR

La détection de mutations de type SNP par la real-time PCR est basée sur la détection de fluorescence, soit issue de molécules s'intercalant dans la double hélice d'ADN (ex : SYBR green I, LC green, BEPO) soit issue de sondes oligonuléotidiques fluorescentes séquence spécifiques ou non. La détection séquence-spécifique peut être réalisée soit par la séparation d'un fluorophore et d'un quencher soit par l'utilisation de deux fluorophores générant un signal de fluorescence de par le transfert d'énergie entre un donneur et un accepteur (FRET).

Des méthodes très différents utilisent la RT-PCR pour réaliser de la discrimination moléculaire :

La **méthode TaqMan** exploite l'activité 5' endonucléolytique de la Taq polymérase pour cliver une sonde portant à l'extrémité 5' un fluorochrome "éteint" par un quencher. Lors de l'amplification, cette extrémité est clivée, libérant le fluorochrome et émettent ainsi un signal lumineux (voir [figure 12](#)). Pour la détection de SNPs, plusieurs de ces sondes doivent être designées, chacune étant complémentaire de la séquence d'un des allèles étudiés et marquée avec une fluorescence différente.

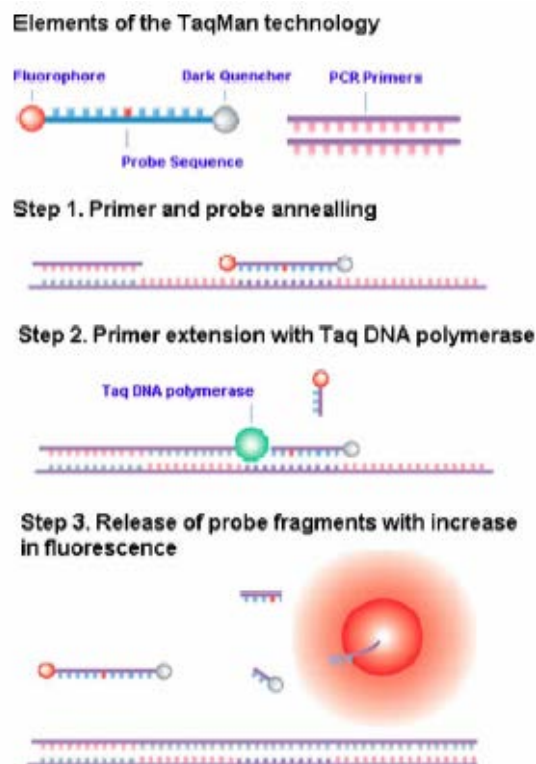


Figure 12 : Étapes principales de la technologie Taqman.

Les sondes utilisées sont séquences spécifiques de la région portant la mutation et portent à leur extrémité 5' un fluorophore dont la fluorescence est éteinte par la présence à l'extrémité 3' de cette même sonde d'un quencher. La présence de ce quencher empêche toute polymérisation de la sonde. Cette sonde est placée en aval d'une amorce à partir de laquelle se réalise la réaction de polymérisation. Arrivée à hauteur de la sonde, la Taq polymérase clive l'extrémité 5' de la sonde, libérant par la même occasion le fluorophore séparément du reste de la sonde (Gibson, 2006).

La **technologie AllGlo** utilise des sondes doublement marquées réalisant le phénomène de FRET. Le clivage de ce type de sondes libère deux fluorophores au lieu d'un, ce qui rend en principe le signal deux fois plus fort.

La **méthode Scorpions**, elle, utilise une molécule hybride entre une amorce et une sonde double brin spécifique portant un fluorochrome et un quencher. Lors de l'étape de dénaturation, la sonde devenue simple s'hybride spécifiquement en aval de la partie amorce libérant ainsi un signal lumineux.

D'autres techniques basées la perturbation de la température de melting ou sur des sondes oligonucléotidiques chimériques dont les domaines 5' et 3' sont séparés par un ou plusieurs ribonucléotides (système CataCleave) existent également (Gibson, 2006).

5.5 La technologie Luminex® xMAP™

Dans cette technique, des microsphères de polystyrène sont marquées de façon interne avec deux fluorochromes différents. Chaque microsphère diffère par la quantité relative de ces deux fluorochromes et possède donc une adresse spectrale qui lui est propre. Un troisième fluorochrome couplé à une molécule rapporteur quantifie l'interaction se produisant à la surface des microsphères. Chaque microsphère est analysée individuellement en passant devant deux lasers. Le premier excite les fluorochromes internes aux sphères alors que le second excite le fluorochrome de surface. Les signaux lumineux fournis permettent ainsi de classer les microsphères tout en quantifiant la réaction se produisant en surface.

Des milliers de microsphères peuvent ainsi être analysées par seconde permettant une analyse à très haut débit. Cette technique est également appréciée pour des raisons de facilité, de faible coût d'utilisation, de flexibilité ainsi que pour sa rapidité.

Pour l'analyse des SNPs, quatre oligonucléotides spécifiques de chacun des allèles (ASO) sont nécessaires. Les produits PCR devant être marqués à la fluorescéine sont alors capturés de façon allèle spécifique par ces ASO couplés aux microbilles (Dunbar, 2005).

5.6 La spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS

La Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) dépend d'une propriété physique des séquences cibles, le « ratio masse / charge ».

Le principe de cette technique consiste en une irradiation des cristaux d'acide nucléiques (appelés « matrice ») par un laser pulsé. Cette irradiation induit un transfert d'énergie et une évaporation de la matrice en molécules chargées vers dans la phase gazeuse. Ces charges sont alors accélérées dans un champ électrique et séparées selon leur « temps de vol » puis guidées dans un tube dépourvu de champ électrique où elles seront séparées selon leur ratio masse/charge avant d'atteindre le détecteur (voir [figure 13](#)).

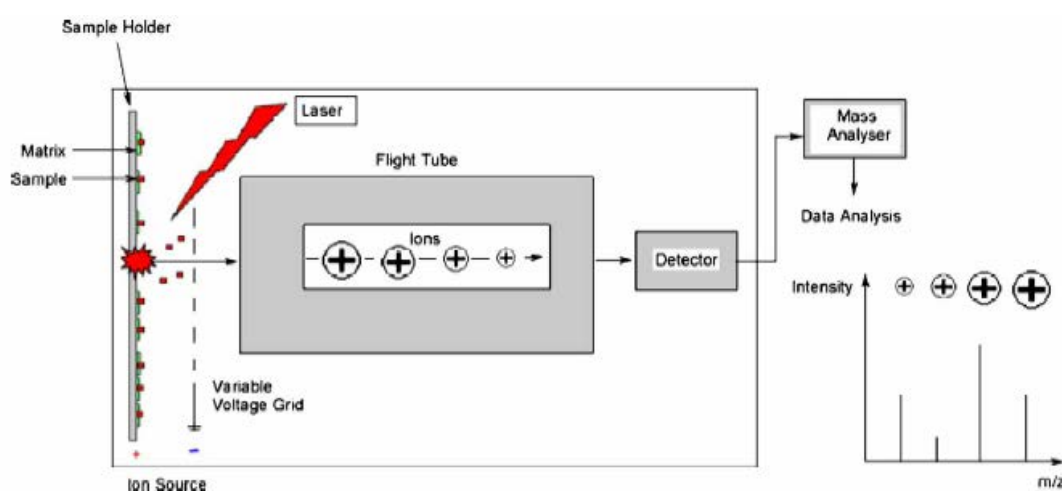


Figure 13 : Principe du MALDI-TOF-MS

La « matrice », constituée des cristaux d'acides nucléiques à analyser, est soumise à un laser pulsé. Cette irradiation résulte en un transfert d'énergie, une évaporation de la matrice et une libération de molécules chargées dans la phase gazeuse. Ces dernières sont accélérées dans un champ électrique et séparées selon leur « temps de vol » puis amenés dans un tube dépourvu de champ électrique où ils seront séparés selon leur ratio « masse / charge » avant d'atteindre un détecteur (Sauer, 2006).

Cette technique, très efficace, permet d'analyser plusieurs SNPs en même temps. Cependant, cette technique est limitée par son coût et son temps d'opération assez long. Le principal problème dans la détection d'acides nucléiques par cette technique est lié à la charge négative du squelette phosphaté de l'ADN. Les ions peuvent ainsi interférer avec les acides nucléiques, réduisant ainsi l'intensité du signal obtenu. De plus, cette technique, très sensible aux impuretés, nécessite généralement une étape de purification des produits analysés, étape souvent coûteuse et lourde (Sauer, 2005).

De nouvelles méthodes basées sur la spectrométrie de masse, comme le simplified GOOD assay, ont été développées visant à simplifier l'analyse et à éliminer cette étape de purification contraignante (Sauer, 2002).

5.7 L'extension d'amorces

Cette technique consiste en l'hybridation d'une amorce immédiatement en amont (en 5') de la position potentielle de la mutation sur l'ADN template. Cette amorce pourra alors, lors de l'ajout du nucléotide marqué adéquat, être allongée par la polymérase. Lorsque l'amorce est marquée avec de la biotine, celle-ci peut être immobilisée par de l'avidine fixée sur une colonne. Dans ce cas, la méthode est appelée miniséquençage. Lorsque la réaction d'extension d'amorces se déroule en solution, la méthode porte le nom de SNUPE (Single Nucleotide Primer Extension) (Piggee, 1997; Paris 2002) (voir [figure 14](#)).

L'extension d'amorce allèle spécifique est basée sur une différence de vitesse d'extension des amorces par la DNA polymérase. Lorsque l'extrémité 3' de l'amorce est correctement hybridée, l'extension est rapide, tandis que lorsque celle-ci n'est pas bien appariée, l'extension est fortement ralentie. Un SNP peut donc être aisément identifié en plaçant l'extrémité 3' de l'amorce sur la position variable. Différentes techniques utilisant cette particularité cinétique de l'extension d'amorce existent (Russom, 2003; Zhou, 2001).

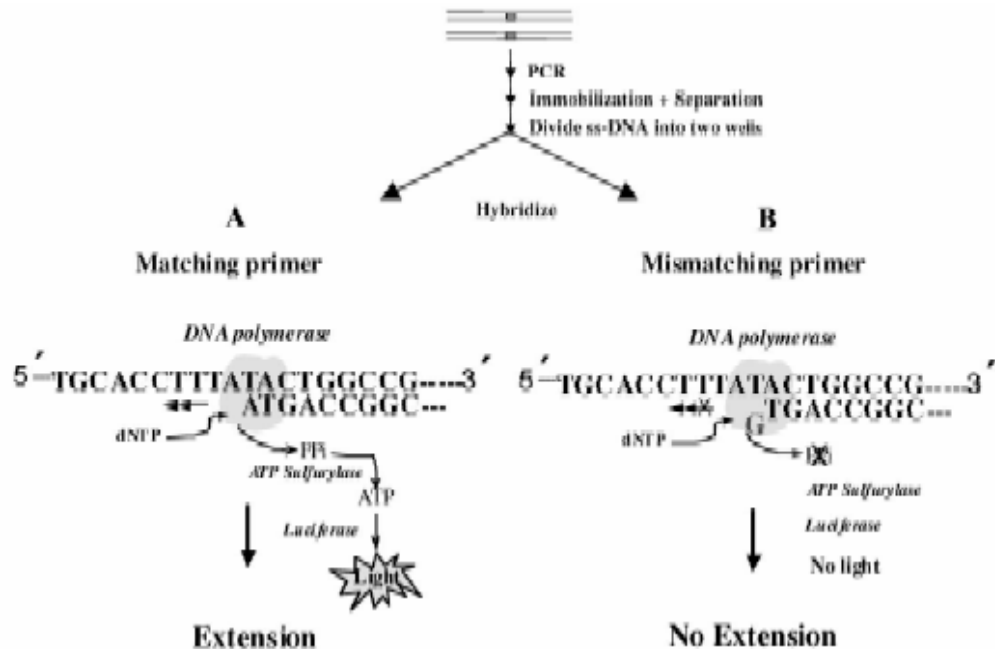


Figure 14 : Principe de l'extension d'amorces en solution SNUPE (Single Nucleotide Primer Extension) pour la détection de mutations ponctuelles.

Une amorce est hybridée sur l'ADN template immédiatement en amont (du côté 5') de la position d'un SNP potentiel. Dans le cas où le dntp adéquat est ajouté, elle peut donc être prolongée du côté 3' par la polymérase, libérant par cette réaction de polymérisation un

pyrophosphate (PPi) pouvant être par la suite transformé en ATP et utilisé par la luciférase pour produire un signal lumineux. Le cas échéant, le dntp ne s'appariant pas avec le template, ce signal lumineux n'est pas produit (Piggee, 1997).

Cette technique d'extension d'amorces souffre néanmoins de plusieurs défauts : pour le design des amorces, la séquence de la région du génome analysée doit être connue ainsi que la position du SNP. Une amorce spécifique doit donc être designée pour chaque SNP. De plus, l'ADN polymérase discrimine peu certains mismatches comme par exemple les associations G/T ou C/A. Différentes solutions ont été proposées pour augmenter la discrimination de la polymérase mais ces précautions nécessitent de nombreuses étapes d'optimisation et sont donc peu réalisables (Russom, 2003).

5.8 La chromatographie d'affinité utilisant un gradient de température et une colonne couplée à un oligonucléotide simple brin

En cas de mismatches dans un double brin d'ADN, la stabilité thermique de cet ADN diminue. Ceci a pour conséquence que les doubles brins avec mismatches sont dissociés à plus basse température que ceux sans mismatches. C'est cette différence de dissociation qui est utilisée dans la chromatographie d'affinité utilisant un gradient de température. Pour la détection de SNPs, un ligand d'ADN simple brin dirigé contre une région spécifique de l'ADN cible est fixé sur une colonne de Sépharose.

La position des mismatches semble ici avoir un impact important sur la température de melting de l'ADN double brin : plus le mismatch est proche du centre de la molécule, plus la variation de cette température est grande. Cette température peut également être influencée par la longueur des brins d'ADN ainsi que de leur contenu en GC (Katsuda, 2006).

6. L'approche Eco-tilling

6.1 Le Tilling

Un grand nombre de techniques permettant l'identification des SNPs ont été développées ces dernières années mais toutes présentent des limitations. Les méthodes basées sur la mobilité sur gel, comme la SSCP, ne permettent pas de mettre en évidence la position ou le type de polymorphisme présent dans le fragment d'ADN étudié. Les techniques fondées sur la cinétique de dénaturation et la PCR fonctionnent seulement pour les petits fragments d'ADN et les techniques de micro-arrays ne sont capables de mettre en évidence que 50% des SNPs. Le séquençage restait jusqu'à ce jour la meilleure alternative à ces méthodes mais son coût relativement élevé limitait son application dans le cadre de l'étude de plusieurs gènes et chez un grand nombre d'individus. C'est pour résoudre ces nombreux problèmes que la technique du Tilling a été mise sur pied, permettant une analyse moléculaire d'un grand nombre d'individus à plus faible coût.

La technique du Tilling (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) est une approche de génétique inverse développée par l'université de Washington et le centre de recherche contre le cancer Fred Hutchinson. Elle combine une forte densité de mutations ponctuelles fournies par les techniques de mutagenèse chimique traditionnelles avec un instrument de détection très sensible des mutations. Le Tilling permet ainsi de fournir des séries alléliques pour un ou plusieurs gènes, ce qui est de grand intérêt pour l'analyse de la fonction de protéines (Feng & Mundy, 2006 ; Till, 2006 ; McCallum, 2000 ; Till, 2003).

Le principe du Tilling est simple : la méthode débute par une mutagenèse chimique à l'EMS (éthylméthyle sulfonate) des différents individus. Les ADNs sont extraits, purifiés puis sont soumis à une amplification en utilisant des amorces fluorescentes spécifiques du gène d'intérêt. Les produits d'amplification sont alors mis en présence d'un ADN de référence. Le mélange obtenu est dénaturé à 95°C puis réhybridé en diminuant progressivement la température. Cet abaissement lent et progressif de la température permet la formation d'hétéroduplexes, constitués d'un des deux brins de l'ADN testé associé au brin complémentaire de la référence. Les différences de séquences entre ces deux ADN vont se traduire par la formation de mismatches qui pourront alors être digérés de façon partielle par une SSS (Single Strand Specific) nucléase, clivant un des deux brins de l'hétéroduplexe à l'extrémité 3' du mismatch. Le clivage est stoppé à la fin des deux heures de digestion puis les produits sont migrés sur gels de polyacrylamide dénaturant, ce qui permet d'identifier les individus présentant une mutation au niveau du gène d'intérêt (voir [figure 15](#)).

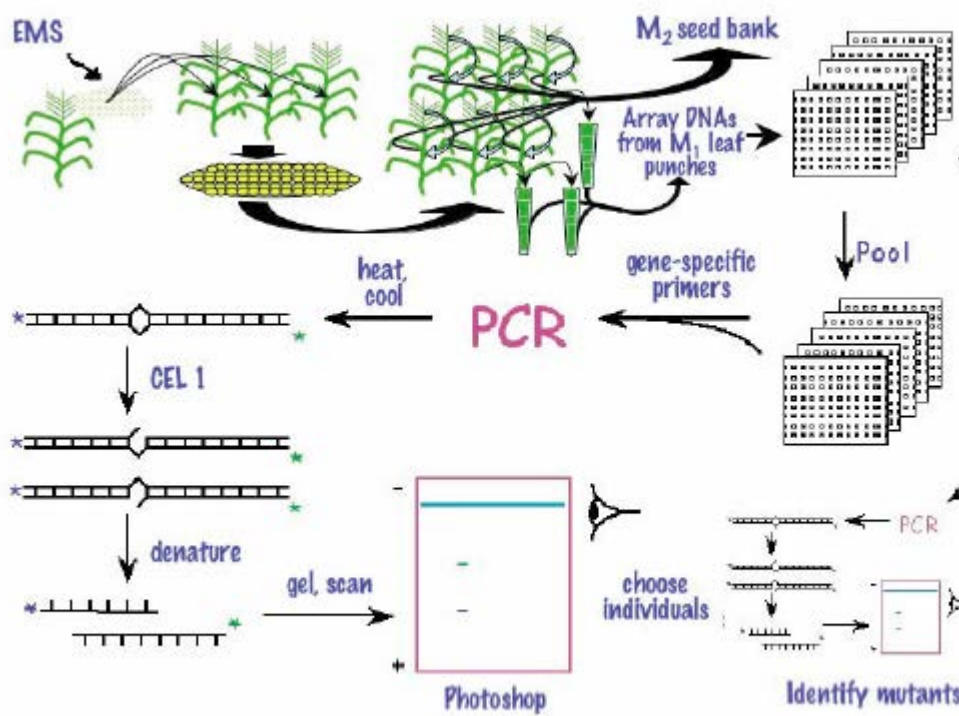


Figure 15 : Grandes étapes de l'approche du Tilling

Des plants mutagénisés grâce à l'EMS sont reproduits. Les ADNs des individus de la troisième génération sont extraits et poolés. Une PCR est alors réalisée sur ces ADNs en utilisant des amorces spécifiques marquées de manière fluorescente. Cette PCR est suivie par une étape d'hybridation et de digestion par l'enzyme CEL I. Les produits de digestion sont alors passés sur gel afin d'analyser le polymorphisme (Colbert, 2001).

Dans l'expérience pilote de cette technique, une collection d'ADN d'*Arabidopsis* mutagenisés chimiquement par de l'EMS (ethylméthyle sulfonate) fut soumise à une amplification PCR suivie d'une HPLC dénaturante (DHPLC) afin de réaliser un criblage des mutations. L'utilisation de la DHPLC présentait un seul désavantage : elle était difficilement automatisable. Ce problème a pu être résolu par l'utilisation de programmes d'analyse de gels très perfectionnés, comme le LI-COR gel analyser system (Henikoff, 2004). Actuellement, des programmes d'analyse de gels, comme GelBuddy, permettent de cartographier des nouveaux SNPs en utilisant la position de SNPs déjà cartographiés (Zerr, 2005).

La réalisation d'un Tilling facile et efficace dépend principalement de la disponibilité de deux ressources : une population mutagenisée et de l'information génomique. La mutagenèse chimique est généralement très facile d'utilisation et de nombreux protocoles sont disponibles pour les divers organismes considérés comme des modèles génétiques dont la drosophile, *Arabidopsis* ou *C. elegans*. Normalement, lorsqu'une densité de mutations satisfaisantes a été atteinte, la taille de la population de mutants nécessaire dans une étude par Tilling est relativement petite (moins de 10.000 individus). En effet, ce nombre donne plus de 95% de chance de détecter une mutation dans un gène cible (si le taux de mutation est indépendant de la taille du génome, comme c'est le cas pour l'EMS)(Caldwell, 2004). Les informations génomiques sont utiles mais pas indispensables au Tilling. Une fois que les amorces spécifiques ont été définies, toute cette approche est possible. En pratique, la connaissance de la séquence du génome améliore les chances de succès (Henikoff, 2004).

Cette technique a d'abord été appliquée aux végétaux pour leur grande capacité de multiplication et pour la possibilité de stockage des semences. Néanmoins, elle peut également être appliquée à des cellules animales telles que les cellules ES de souris, pouvant être mutagenisées à l'EMS et stockées par congélation (Henikoff, 2004).

De nombreux projets de Tilling sont actuellement réalisés sur différentes espèces végétales (avec un intérêt croissant pour les plantes de culture) comme *Arabidopsis thaliana*, le maïs (Till, 2004), le lotus (*Lotus japonicus*) ou *Brassica oleracea* ainsi que sur quelques espèces animales. Le premier et le plus connu des projets de Tilling, le projet ATP (*Arabidopsis* Tilling Project), faisant intervenir plusieurs laboratoires travaillant en collaboration, débuta en 2001 avec l'équipe de Till (Gilchrist, 2005).

Un avantage du Tilling est que la probabilité de découvrir une mutation peut être estimée à l'avance par l'utilisation de l'EMS qui produit principalement des transitions de type C/G vers T/A (Le EMS alkyle les résidus G à la position O⁶, les forçant ainsi à s'apparier avec les T (Till, 2006 ; Ashburner, 1990)). De plus, la position de la mutation peut être facilement inférée de par la connaissance de la taille du fragment entier, ce qui facilite un éventuel séquençage postérieur (Henikoff, 2004 ; Colbert, 2001). Une étude a révélé que cette méthode de détection haut-débit basée sur le clivage est de très grande efficacité : au moins trois quarts des mutations sont détectées et pratiquement toutes les mutations sont confirmées lors d'un séquençage (Till, 2004). A l'inverse, un des principaux problèmes est de maintenir une bonne viabilité et fertilité des individus (pouvant être diminuées par la mutagenèse) tout en assurant un bon niveau de mutagenèse.

6.2 L'Eco-tilling

La technique moléculaire de l'Ecotilling (Comai et al, 2004) est une variante de la technique moléculaire Tilling, mise au point par Claire MacCallum, doctorante dans le laboratoire de Bradley J. Till. Dans ce cas, la technologie du Tilling, au lieu d'étudier une variation induite, est utilisée pour détecter du polymorphisme naturel existant entre les différents allèles d'un même gène. L'identification de variants naturels au sein d'un même gène fournit des informations importantes quant à sa fonction et peut se révéler de grande utilité pour l'étude des déséquilibres de liaison. De plus, la variation de SNPs permet de fournir des clés quant à l'évolution des populations.

Dans la technique, les ADN des différentes accessions sont poolés avec une référence de séquence connue, de façon à permettre la formation d'hétéroduplexes. La digestion partielle avec CEL I ainsi que son analyse révèle le nombre et la position des sites polymorphiques. L'Ecotilling est une manière rapide et efficace de rechercher des variations génétiques chez une espèce pour laquelle la mutagenèse et les analyses génétiques classiques sont très difficiles voire impossible. Elle peut donc constituer une alternative très intéressante au séquençage, surtout lorsque le nombre d'échantillons considéré est grand (voir [figure 16](#)).

Un grand avantage de la technique est qu'elle réduit considérablement le nombre de séquençages, ce qui constitue un gain de temps et d'argent (Gilchrist, 2005). L'Ecotilling pourrait être une méthode de choix dans plusieurs cas : Premièrement, quand seul un haplotypage suffit et que la connaissance de la séquence n'est pas nécessaire, deuxièmement, lorsque l'on étudie des individus polyploïdes, et troisièmement, quand des indels hétérozygotes surviennent dans le gène d'intérêt (Comai, 2004).

L'approche Ecotilling a déjà été appliquée pour de nombreuses espèces végétales et notamment dans le cas du peuplier *Populus trichocarpa* (Gilchrist, 2006). Ceci est de grand intérêt puisque c'est la première fois que l'approche Ecotilling est appliquée à une espèce de longue durée de vie, dioïque et génétiquement hétérogène.

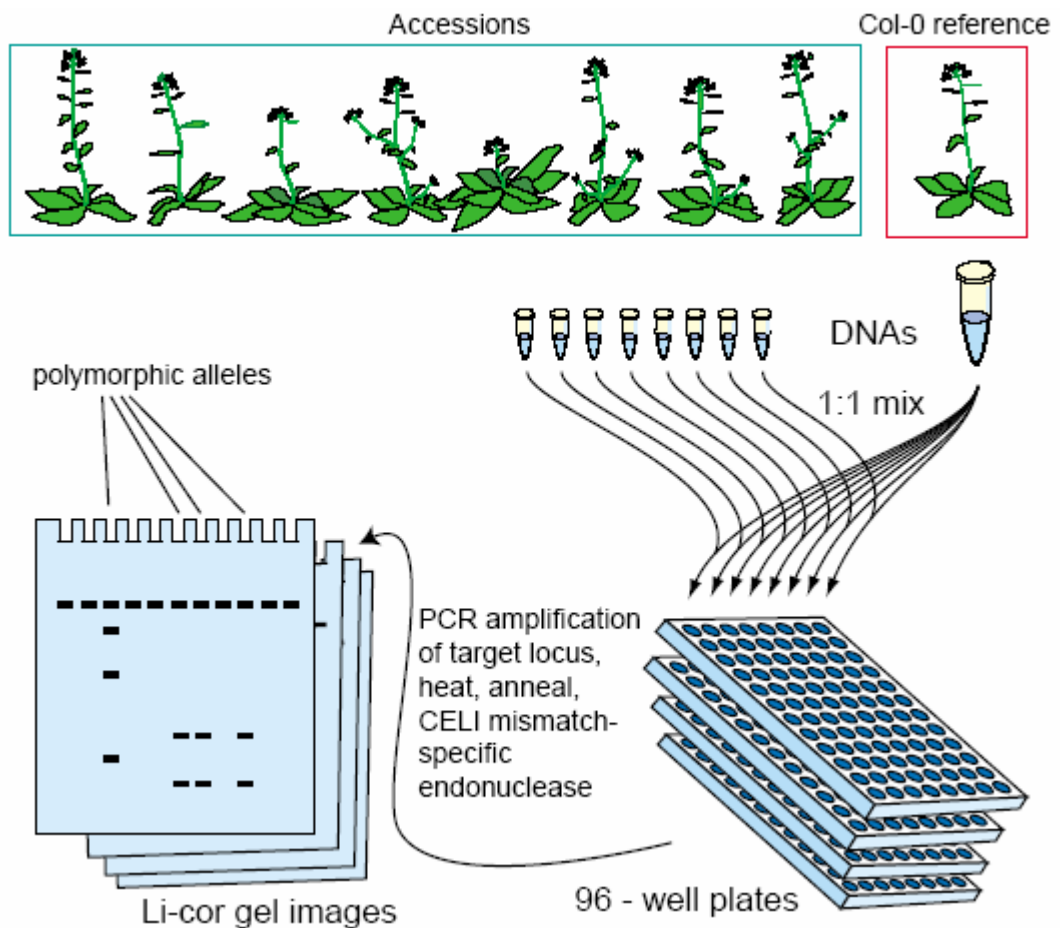


Figure 16 : Principe de l'Ecotilling

Les ADNs à tester après avoir subi une amplification sont poolés avec une référence. Le mélange est dénaturé puis réhybridés en réduisant progressivement la température, ce qui permet la formation d'hétéroduplexes pouvant contenir des mismatches si les séquences des deux ADNs présentaient des différences. Cette étape d'hybridation est suivie par une étape de digestion partielle par une SSS (single strand spécifique) nucléase, comme CEL I. Les produits de digestion sont ensuite séparés sur un gel d'acrylamide dénaturant (Comai, 2004).

6.3 L'enzyme CEL 1

CEL I est une SSS (single strand specific) nucléase extraite du céleri, de qui elle tire son nom. De nombreuses nucléases CEL I-like existent chez d'autres végétaux, comprenant des légumes courants et cela dans une grande variété de tissus (racine, tige, feuille, fleur et fruit). Cette enzyme a été sélectionnée vu sa capacité à détecter les variations de séquence dans l'ADN, ne faisant pas de distinction entre les SNPs, les délétions ou les insertions. CEL I clive uniquement un brin de l'ADN dans un hétéroduplexe au site du mismatch. Il n'y a pas de seconde coupure sur le brin complémentaire de la molécule d'ADN après le premier clivage.

La technique de détection de mutation par CEL I possède plusieurs atouts : sa simplicité ainsi que sa spécificité. En effet, la fréquence de clivage non spécifique de l'ADN est très faible (Oleykowski, 1998).

Cette enzyme possède une grande spécificité dans une gamme d'optimum de pH allant de 6 à 9, clivant à l'extrémité 3' du site de mismatch de l'un des deux brins d'un hétéroduplexe. CEL I montre une préférence en fonction du nucléotide en présence ($C/C > C/A \sim C/T > G/G > A/C \sim A/A \sim T/C > T/G \sim G/T \sim G/A \sim A/G > T/T$). Il semble également que l'activité de cette enzyme soit stimulée par la présence de Taq polymérase bien que le mécanisme reste jusqu'à présent inconnu. Une possibilité est que, la DNA polymérase ayant une forte affinité pour le groupe 3'-OH produit par la nucléase CEL I, celle-ci déplace simplement CEL I par compétition pour le site. Une autre hypothèse serait basée sur le fait que les SSS nucléases possèdent la caractéristique de rogner les extrémités des amorces, ceux-ci perdant ainsi l'extrémité marquée et diminuant donc l'intensité du signal. L'addition de Taq polymérase permettrait dans ce cas de stabiliser les duplexes d'ADN en se fixant sur les extrémités et permettant d'améliorer la détection des mismatches (Till, 2004). Des alternatives, comme par exemple l'utilisation de sondes fluorescentes intercalantes après la digestion, permettent de garder une bonne intensité de signal malgré cette activité exonucléotidique (Caldwell, 2004). Les régions flanquant le mismatch ne perturbent apparemment pas considérablement la capacité de détection des mismatches de CEL I.

D'autres single-strand specific nucléases (SSS nucléases) telles que la S1, la P1 (produites par certains champignons) ou la mung bean nucléase sont capables de réaliser ce clivage spécifique avec la même efficacité. Néanmoins, l'optimum de pH acide de ces enzymes rend leur utilisation dans les techniques de génotypage peu pratique : en effet, lorsque celui-ci est bas, les ponts hydrogène de l'ADN se brisent particulièrement dans les régions riches en AT, ce qui provoque le déroulement de l'ADN et un clivage non spécifique de l'ADN par les nucléases.

Toutes ces enzymes sont des glycoprotéines extracellulaires. Le séquençage des gènes encodant ces différentes enzymes a révélé un haut degré d'homologie ainsi que l'existence d'un site actif commun comportant trois ions zinc indispensables à la fonction de catalyse.

7. La technique SSCP (Single-Strand conformation polymorphism)

La technique SSCP est une méthode relativement sensible, peu coûteuse, rapide et simple permettant de mettre en évidence une variation de séquence d'un gène d'intérêt dans un ensemble d'échantillons. Ce type d'information peut constituer un sérieux avantage notamment lorsque l'analyse SSCP précède un séquençage. La technique SSCP a largement trouvé des applications dans des domaines aussi variés que ceux du diagnostic médical ou de la génétique des populations.

A la base, la technique comportait, pour la détection des fragments ADN, l'utilisation d'un marquage radioactif des fragments. Néanmoins, pour des raisons de possibilités d'applications dans le domaine biomédical ou parce que tous les laboratoires n'ont pas accès aux radio-isotopes, des techniques alternatives pour la mise en évidence des fragments ont été mises en place : coloration à l'argent, sondes fluorescentes, SYBR gold ou bromure d'éthidium (Gasser, 2005). Bien que la plupart des protocoles font référence à l'utilisation de gels non dénaturants, la SSCP a récemment été développée pour une électrophorèse capillaire automatisée (Mogensen, 2003).

La SSCP est capable de détecter une grande majorité (typiquement plus de 90%) des variations de séquence dans les produits PCR. La sensibilité de la technique est optimale pour les fragments compris entre 80 et 350 pb (Sheffield et al, 1993). La technique ne fait aucune discrimination entre les mutations d'une seule paire de bases et les mutations insertionnelles ou de délétion (indels).

La technique consiste en plusieurs étapes :

(a) Une amplification PCR est d'abord réalisée en utilisant des amorces spécifiques non marquées pour chacun des gènes d'intérêt.

(b) Une restriction enzymatique est ensuite réalisée de manière à obtenir de fragments de taille compatible avec une analyse du polymorphisme par SSCP.

(c) Les fragments obtenus sont alors dénaturés à haute température puis rapidement réhybridés à basse température, formant ainsi par des interactions intramoléculaires des structures secondaires dans l'ADN simple brin.

(d) Les fragments sont par la suite séparés sur un gel d'acrylamide non dénaturant, leurs différences de conformation, liées à leur divergence de séquence, se reflétant par une différence de mobilité dans le gel.

(e) Les résultats du gel sont alors analysés.

Plusieurs paramètres sont susceptibles d'affecter la conformation de l'ADN simple brin : la température, le pourcentage d'acrylamide, la force ionique du tampon électrophorétique ou la concentration en glycérol du gel (Spinardi, 1991).

De récentes études ont montré que les différences de mobilité des fragments ne seraient pas liées principalement à la structure secondaire mais à la structure tertiaire (Liu, 1998 ; Sunnucks & Beheregaray, 2000).

Trois paramètres influencent la sensibilité de la technique : le pourcentage d'acrylamide, la température de migration ainsi que le temps de migration (Quaranta, 2005). Cette sensibilité est souvent inversement proportionnelle à la taille des fragments analysés. Par exemple, des différences d'une seule paire de base se détectent dans 99% des cas pour les fragments de taille comprise entre 100 et 300 pb, alors que pour ceux de 400pb, ce chiffre tombe à 80% (Orti, 1997).

Une étude a montré une utilisation possible d'une SSCP à deux dimensions pour l'étude de produits d'amplification de plus grande taille (par exemple 2,7 Kb) : cette SSCP réalisée sur gel non dénaturant sépare les fragments obtenus après restriction selon leur taille dans la première dimension et selon leur conformation dans la seconde dimension (Kovar, 1991).

Il semble également qu'un excès d'amorces utilisées lors de la PCR puisse interférer avec les brins d'ADN simple brin en changeant leur conformation (et par conséquent leur profil SSCP) de par leur fixation sur leurs extrémités (Cai & Touitou, 1993). Ce type d'inconvénients peut être évité par une simple étape de purification du produit PCR ou par l'utilisation d'une concentration plus faible en amorces lors de l'amplification.

8. L'approche gènes candidats

Différents paramètres peuvent intervenir dans un trait phénotypique mesurable. Par exemple, chez la chicorée, dans le déterminisme de longueur de chaîne d'inuline, tant des enzymes de synthèse que de dégradation interviennent.

Un gène candidat peut être défini comme tout gène partiellement responsable ou marqueur de la variation d'un trait phénotypique, soit de par sa fonction biologique soit de par sa localisation sur une carte génétique. On distingue ainsi les gènes candidats fonctionnels des gènes candidats positionnels. Les premiers sont des gènes connus pour être impliqués dans une voie physiologique et/ou biochimique déjà bien caractérisée et connue pour intervenir dans le trait phénotypique d'intérêt. Les seconds sont choisis en évaluant la distance de liaison et donc l'association avec un QTL associé au phénotype d'intérêt.

L'idée de l'approche gènes candidats est de proposer des gènes séquencés de fonction connue pouvant correspondre à des QTL (quantitative trait loci). L'approche gènes candidats a été utilisée avec succès dans des approches génétiques sur l'humain et les animaux, et depuis les années 90, chez les plantes. On distingue trois grandes étapes chronologiques dans cette approche. Premièrement, des gènes candidats fonctionnels ou positionnels sont proposés. Dans un second temps, soit une recherche du polymorphisme moléculaire est réalisée de façon à localiser les gènes candidats (GC) sur une carte génétique afin de mettre en évidence un lien génétique entre les marqueurs GC et les loci étudiés, soit un calcul statistique de la corrélation entre le polymorphisme des GC et la variation des traits phénotypiques est réalisé. Enfin, si une co-ségrégation ou une corrélation statistique a pu être mise en évidence, une dernière étape de validation est nécessaire afin de confirmer l'implication du gène candidat dans la variation phénotypique (voir [figure 17](#)).

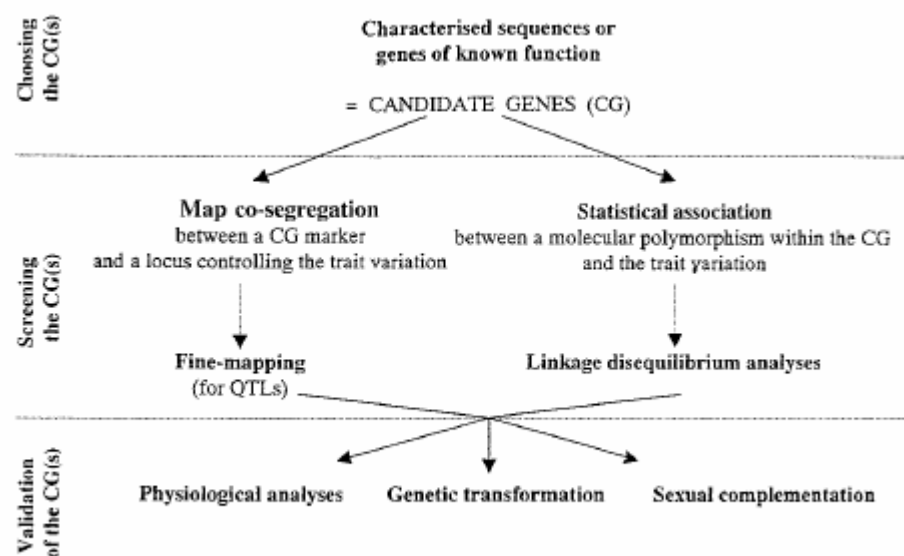


Figure 1. A synopsis of the candidate gene methodology.

Figure 17 : Représentation de la méthodologie générale de l'approche gène candidat (Pflieger, 2001)

La première étape (le choix des gènes candidats) est souvent limitée par le nombre de séquences disponibles pour l'espèce étudiée dans les banques de données. Dans ce cas, les séquences génomiques ou d'ADNc issues d'autres espèces peuvent être d'une grande utilité pour la détermination de séquence consensus et le design d'amorces dégénérées. Ainsi les séquences de gènes isolés chez des espèces modèles telles que *Arabidopsis* constituent des GCs potentiels chez les espèces agronomiques d'intérêt. Il en est de même dans le choix des gènes candidats positionnels : il a ainsi été démontré que des espèces proches présentaient souvent entre elles une organisation conservée du génome.

Dans la seconde étape, une fois les gènes candidats choisis, des études d'association sont réalisées afin de sélectionner les GCs les plus pertinents. Que l'on choisisse de mettre en évidence une co-ségrégation entre un gène candidat et un QTL ou une association statistique entre une variation phénotypique et un polymorphisme du gène candidat, les résultats obtenus ne permettent pas de démontrer clairement un lien causal entre les deux phénomènes. En effet, le gène candidat polymorphe peut simplement être en déséquilibre de liaison avec le vrai polymorphisme responsable de la variation phénotypique. C'est pourquoi des analyses complémentaires de validation doivent être réalisées.

La complexité de cette dernière étape de validation dépend de la nature du trait phénotypique étudié (mono- ou polygénique). Elle peut être réalisée soit par des analyses physiologiques (ex : mesure de l'expression du gène candidat, soit au niveau de l'ARNm par Northern Blot ou RT-PCR quantitative, soit au niveau protéique par Western Blot ou par analyse de l'activité enzymatique) soit par transformation génétique pour les traits monogéniques (complémentation d'un individu déficient ou transformation avec une construction anti-sens) (Pflieger, 2000).

L'approche gènes candidats a depuis longtemps trouvé ses applications dans le domaine de la biologie végétale, notamment dans la problématique de l'allocation du carbone. Ainsi, des études de polymorphisme ont été réalisées pour plus de 100 gènes impliqués dans certaines voies liées à la qualité ou au métabolisme du sucre chez la betterave *Beta vulgaris* L. Elles ont permis de positionner plus de 20 QTLs dans le génome et de leur associer des gènes candidats potentiels (Schneider, 2002). Chez la tomate, un gène codant pour une invertase apoplastique a été validé comme gène candidat pour un QTL impliqué dans le contenu en sucre et a été démontré comme contribuant à l'accumulation du sucre dans le fruit (Fridman et al, 2000). De la même façon, *Ivr2* un gène candidat pour un QTL lié à l'activité d'une invertase vacuolaire induite suite à un stress hydrique a été mis en évidence (Pelleschi, 1999).

9. Objectif du travail de mémoire

Des différences de longueur de chaîne d'inuline (DP moyen) existent entre les divers cultivars de chicorée. Ce degré de polymérisation (DP) moyen, mesuré après arrachage, est fonction de la variété mais dépend également de la dégradation des chaînes suite à l'exposition au choc au froid, survenant généralement au cours du mois d'octobre. Cette dégradation des fructanes est provoquée par l'activation des fructane exohydrolases et des invertases et aurait pour rôle de protéger les membranes par changement de phase des lipides des membranes, en diminuant le point de congélation et en augmentant la pression osmotique. Il semble donc que les différences phénotypiques existant entre variétés dépendent en partie de cette sensibilité au choc au froid.

Le travail réalisé lors de ce mémoire s'inscrit dans le cadre du projet Phytomol, pendant lequel ont été produites 12.000 séquences EST. Parmi ces séquences ont été choisies une série de gènes candidats pouvant être impliqués dans le métabolisme du carbone, et plus précisément dans la synthèse et la dégradation de l'inuline. Il a été démontré, lors de tests *in vitro* et de transformation, que le transfert d'une séquence de 1-FFT d'un organisme présentant des inulines longue chaîne chez une espèce non accumulatrice de fructane permettait d'obtenir des inulines de propriété semblable. L'analyse du polymorphisme de la 1-SST et de la 1-FFT est actuellement en cours au laboratoire. Seule la partie dégradation a été traitée dans le cadre de ce mémoire.

L'objectif était ici de mettre en évidence de la diversité allélique chez les enzymes impliquées dans cette dégradation de l'inuline (1-FEH, invertases et sucrose synthases). Pour la réalisation de cette étude, les marqueurs SNP furent choisis de par leur forte densité dans le génome végétal tant dans les régions codantes que non codantes. La détection de ses SNPs s'est articulée en deux volets : Premièrement, une analyse par une technique bon marché mais peu sensible, la SSCP, a été faite permettant la réalisation d'un premier criblage du polymorphisme. Ensuite, une étude par une technique récente et très sensible, l'Ecotilling a permis une étude plus poussée.

Un autre objectif serait à plus long terme de tester un lien possible entre certaines combinaisons alléliques et le phénotype de chaque variété (longueur des polysaccharides, rendement). Ceci peut être réalisé par comparaison des profils obtenus selon la méthodologie mise au point lors de ce mémoire avec les données phénotypiques à disposition.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Extraction d'ADN génomique

Principe

Différentes techniques d'extraction d'ADN génomique ont été mises au moins pour les tissus végétaux, comme par exemple le protocole Phytopure modifié ou la méthode CTAB adaptée de Murray et Thompson 1981. Ces deux protocoles sont décrits ci-dessous. Les deux protocoles sont réalisés sur des racines de chicorée *Cichorium intybus* ayant été préalablement congelées et broyées à l'aide d'un pilon dans l'azote liquide.

1.1 Extraction d'ADN génomique par la méthode CTAB

Protocole

Matériel

- Tampon de lavage : T 76% (v/v) éthanol (Reidel-de Haën ; Ref : 24103)
 - 10 mM ammonium acétate (Merck,
- CTAB 2x :
 - Tris 100mM (PH 8) (Sigma ; Ref : T-6066)
 - EDTA 20 mM (Sigma ; Ref : E-7889)
 - NaCl 1,4 M (Acros organics ; Ref : 207790010)
 - CTAB (cethylmethyl ammonium bromide) 2% p/v (ICN ; Ref : 195029)
 - PVP-40 soluble (polyvinylpyrrolidone) 1% p/v (Sigma ; Ref P-5288)
- Isopropanol (Prolabo ; Ref : 20.842.298)
- 2β-mercaptoéthanol (Sigma ; Ref : M-6250)
- Centrifugeuse Biofuge 13 Hereus Sepatech
- Centrifugeuse X-22R centrifuge, Beckman Coulter Allegra
- Phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1) (Sigma ; ref : P-2069)
- Résine (kit Nucleon Phytopure ; Ref : 4IO11A)
- Phénolchloroforme (Sigma, Ref : P-2069)
- RNase ADNase-free(Sigma, Ref : R-5503)
- TriS 10 mM pH 8 (Sigma ; Ref : T-6066)
- Acétate d'ammonium 7,5 M (Fluka, Ref : 71179)
- Ethanol 96% (Riedel-de Haën ; Ref : 24103)

Protocole

- Préchauffer à 60°C la solution de CTAB 2×
- Mettre l'isopropanol au congélateur (-20°C)
- Refroidir le mortier et le pilon à l'azote liquide. Peser 3g de racine de chicorée et broyer l'échantillon en une fine poudre dans le mortier en présence d'azote liquide.
- Ajouter aux tissus broyés 22,5 ml de CTAB 2× dans lequel a été ajouté 15 µl (0,2% v/v) de 2β-mercaptoéthanol (à ajouter uniquement au moment de l'utilisation et vortexer le mélange). Incuber sous agitation pendant 1 heure à 60°C. Mélanger de temps en temps et laisser refroidir à température ambiante.
- Extraire avec un volume de mélange Phénol : chlorophorme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1) en agitant vigoureusement pendant dix minutes à température ambiante. Centrifuger à 3300 rpm (2000g) pendant dix minutes à température ambiante et récupérer la phase aqueuse.
- Refaire l'étape d'extraction une deuxième fois.

- Précipiter en ajoutant 2/3 de volume d'isopropanol froid (-20°C). Homogénéiser, laisser une heure à température ambiante et centrifuger 4000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante.
- Éliminer le surnageant et ajouter 10 ml de tampon de lavage et laisser incuber 1 heure sous agitation à 4°C.
- Centrifuger à 2400 rpm (1000g) pendant dix minutes à température ambiante puis éliminer le surnageant, sécher le culot pendant environ 25 minutes et resuspendre dans 1 ml d'eau stérile milli-Q.
- Ajouter 2 µl de RNase ADNse-free et incuber 30 minutes à 37°C.
- Ajouter 200 µl de résine (attention bien homogénéiser la solution) et placer sur un agitateur mécanique pendant 15 minutes.
- Centrifuger à 4000 rpm pendant dix minutes.
- Ajouter au surnageant 1 volume de phénolchloroforme et mélanger par inversion.
- Précipiter en ajoutant 2 ml de Tris (10 mM pH 8), 1,1 ml d'acétate d'ammonium (7,5M) et 8,4 ml d'éthanol froid (96%). Homogénéiser par inversion et incuber à -70°C pendant 30 minutes.
- Centrifuger pendant 20 minutes à 3500 rpm, éliminer le surnageant et ajouter 15 ml d'éthanol 70% froid. Réaliser cette étape 3 fois.
- Sécher le culot, resuspendre dans 1 ml d'eau milli-Q et stocker à -20°C.

1.2 Extraction d'ADN génomique par la méthode Phytopure (Amersham Biosciences)

Protocole

Matériel

- Centrifugeuse Biofuge 13 Heraeus Sepatech
- Isopropanol (Prolabo ; 20.842.298)
- SpeedVac Heto Lab Equipment VR-1
- Kit Nucleon Phytopure plant DNA extraction (Amersham Biosciences) (Ref : 4I011A)
- RNase A 10 mg/ml (Sigma, Ref : R-5503)
- Bain à 65°C
- Phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1) (Sigma ; P-2069)
- Chloroforme (stocké à -20°C) (Acros Organics ; Ref : 232090025)
- Ethanol 70% (Riedel-de Haën ; Ref : 24103)
- Tampon TE :
 - Tris 10 mM (Sigma ; Ref : T-6066)
 - EDTA 0,1mM (Sigma ; Ref : E-7889)

Protocole

- Placer 100 mg d'une racine de chicorée finement broyée dans un tube eppendorf.
- Ajouter 600 µl de réactif 1 et homogénéiser.
- Ajouter 1µl de RNase A 10mg/ml.
- Incuber 30 minutes à 37°C.
- Ajouter 200 µl de réactif 2.
- Inverser plusieurs fois pour homogénéiser.
- Incuber 10 minutes à 65°C.
- Faire successivement deux extractions au phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25: 24: 1).
- Placer sur glace pendant 20 minutes.
- Retirer l'échantillon de la glace et ajouter 500 µl de chloroforme (stocké à -20°C).
- Ajouter 100 µl de résine nucléon phytopure.

- Placer sur un agitateur rotatif pendant 10 minutes.
- Centrifuger 10 minutes à 1300 g.
- Récupérer la phase supérieure sans toucher l'interface (constituée de la résine) et la placer dans un nouveau tube.
- Ajouter un volume d'isopropanol et mélanger par inversion.
- Laisser 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant dix minutes à 4°C.
- Éliminer le surnageant.
- Laver deux fois avec de l'éthanol 70%.
- Sécher le culot au SpeedVac.
- Resuspendre dans 30 µl de TE (Tris 10 mM EDTA 0,1 mM)(Sigma ; Ref : T-6066)

2. Polymérase Chain Reaction (PCR)

Principe

L'amplification PCR est une technique omniprésente en biologie moléculaire. En effet, elle permet d'obtenir, à partir de très peu de matériel génétique de base, une quantité d'ADN suffisante pour une étude moléculaire en biologie.

Protocole

Matériel

- Machine PCR Biorad iCycler
- Taq polymérase (5 unités/µl)(Proméga) (Ref : M830B)
- PCR nucléotide mix (dntp) (10 mM pour chaque dntp) (Roche ; Ref : 11814362001)
- Tampon Taq polymérase 5x (Proméga)
 - vert (Ref : M791A)
 - blanc (Ref : M792A)
- Amorce 5' (stock à 100 pmol/µl) (amorces 5' marquées : stock à 10 pmol/µl)
- Amorce 3' (stock à 100 pmol/µl)
- Eau stérile milli-Q
- ADN template (concentration 100 ng/µl)

Protocole

- Chaque tube PCR est rempli avec le mélange suivant :

<i>Réactif</i>	<i>Quantité</i>
Taq polymérase (5 unités/µl)	0,2 µl
Tampon 5x	5 µl
Amorce 5' (10 pmol/µl)	1 µl
Amorce 3' (10 pmol/µl)	1 µl
ADN template	2 µl
dntp	1 µl
Eau stérile (milli-Q)	39,8 µl

<i>Réactif</i>	<i>Quantité</i>
Volume final	50 µl

- Souvent, ces mélanges sont réalisés en grande quantité puis répartis dans chacun des tubes; dans ce cas, veiller à bien homogénéiser le mélange.
- Programme d'amplification :
 - 10 minutes à 95°C
 - 45 secondes à 95°C
 - 45 secondes à la température de melting (T_m) (à adapter selon les cas)
 - 1 minute 30 à 72°C
 - Répéter ces trois dernières étapes 35x
 - 10 minutes à 72°C
 - 4°C à l'infini

3. Vérification d'amplification sur gel d'agarose 1%

Principe

La migration sur gel d'agarose permet de vérifier et de quantifier rapidement les produits d'amplification obtenus lors d'une PCR.

Protocole

Matériel

- Agarose, for routine use (Sigma) (Ref : 065K0067)
- Tampon TAE 50x(Tris-acétate 4mM, EDTA Sigma Ref : E-5134 1mM pH 8,0)
- Eau stérile désionisée
- Agitateur rotatif RET basic C IKA®-WERKE
- Bromure d'éthidium (10 mM)(Sigma, Ref : E-8751)
- Tampon TAE 1x (Tris-acétate 4mM, EDTA Sigma Ref : E-5134 1mM pH 8,0)
- Standard de taille Smart ladder (Eurogentec, Ref : MW-1700-10) (voir [figure 1](#))
-
- Bleu de chargement (bleu de bromophénol)(Sigma Ref : B-8026)

Protocole

- Peser 3 gr d'agarose.
- Placer dans une bouteille de 500 ml.
- Ajouter 200 ml d'eau stérile et homogénéiser avec un agitateur rotatif.
- Ajouter 6 ml de TAE 50x.
- Porter à un volume de 300 ml.
- Monter les peignes sur le support.
- Aux micro-ondes, dissoudre l'agarose jusqu'à obtention d'un mélange homogène (mélanger souvent).
- Placer 50 ml du gel (35 ml pour un minigel) dans un tube falcon et y ajouter 3 µl de bromure d'éthidium. Homogénéiser par inversion.
- Remplir le cuve d'électrophorèse de tampon TAE 10x.
- Lorsque le gel a durci, placer le dans la cuve d'électrophorèse et charger les échantillons et le Smart Ladder.
- Faire migrer 45 minutes (20 minutes pour un minigel).

4. Technique single strand conformation polymorphism (SSCP)

Principe

La technique SSCP est une technique relativement simple, rapide et peu coûteuse permettant de mettre en évidence du polymorphisme inter- ou intravariétal dans un gène choisi. Elle permet ainsi de réaliser un screening préalable à une analyse du polymorphisme par EcoTilling, souvent plus coûteuse de part l'utilisation des amorces marquées de façon fluorescentes.

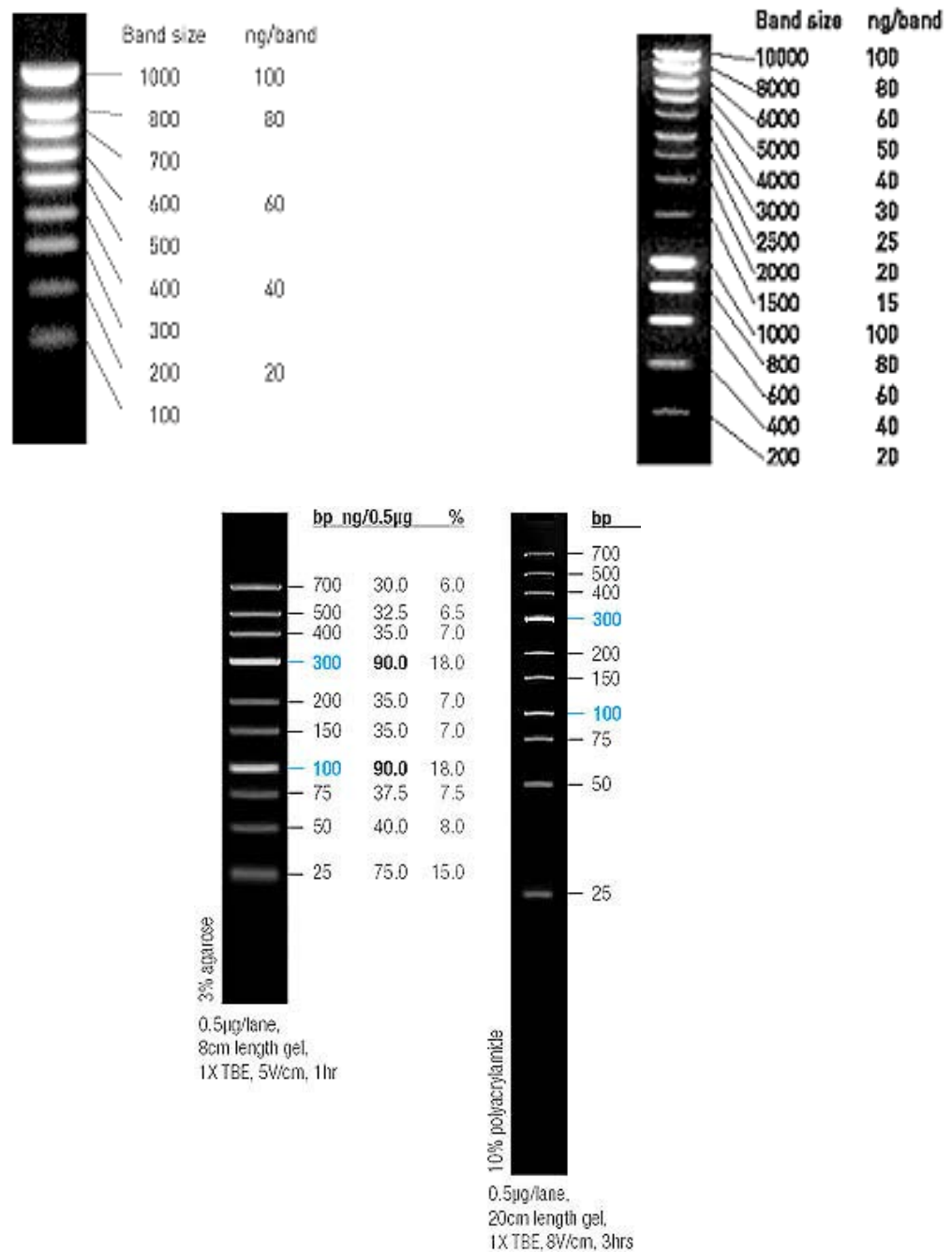


Figure 1 : Représentation des trois standard de taille utilisés au cours de ce mémoire.

(a) A gauche, Smart Ladder SL (b) à droite, Smart ladder Small fragment et (c) en bas, Smart ladder Gene ruler Low range.

Protocole

Matériel

- Tampon de dénaturation SSRP (96% formamide, 0,1% bleu de bromophénol, 0,2% xylène cyanol, 20 mM EDTA) (stockage à -20°C)
- Kit Silver Stain Plus (Biorad) comprenant :
 - Development Accelerator Reagent (Ref : 161-0448)
 - Silver Complex Solution (Ref : 161-0462)
 - Reduction Moderator Solution (Ref : 161-0463)
 - Image Development Reagent (Ref : 161-0464)
- Support et cuve pour migration de protéines Biorad
- Eau stérile
- Acrylamide/bis 30% (Biorad ; Ref : 101-01-58)
- TBE 5x (Tris base, EDTA 5 M pH 8, acide phosphorique 85%)
- glycérol 87% (Sigma ; Ref : G-7757)
- Temed (N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine (Sigma ; Ref : T-8133)
- APS (ammonium persulfate) 10%
- TBE 0,5x (Tris base, EDTA 5 M pH 8, acide phosphorique 85%)
- Enzymes de restriction et le tampon adapté
- Smart Ladder.
- Bleu de chargement 2x
- Acide acétique (Normapure ; Ref : 20-104.323)
- Solution de fixation (méthanol 50%V/V, Acide acétique 10% V/V, Fixative Enhancer Concentrate (Ref : 161-0461) 10% V/V, Eau distillée désionisée 30% V/V)

Protocole

Étape n°1: réalisation du gel de polyacrylamide

(gel 6% d'acrylamide 20 cm × 20 cm × 0,75 mm; 5% de glycérol en TBE 0,5×)

- S'assurer de la propreté des plaques en verre, des peignes et des spacers en les passant à l'eau de ville, l'eau désionisée puis à l'alcool.
- Assembler les plaques et les spacers sur le support
- Vérifier l'étanchéité du montage avec de l'eau stérile puis éliminer toute trace résiduelle d'eau entre les plaques à l'aide de papier absorbant.
- Réaliser le mélange suivant (volume final de 50 ml pour la réalisation de deux gels) :
 - 26,635 ml d'eau stérile
 - 10 ml d'acrylamide / bis 30%
 - 10 ml de TBE 5×
 - 2,87 ml de glycérol 87%

Bien homogénéiser puis ajouter à la dernière minute 45 µl de Temed et 450 µl d'APS 10%. Homogénéiser rapidement.

- Couler les gels, insérer les peignes et laisser polymériser approximativement 45 minutes.
- Placer les gels dans la cuve remplie de TBE 0,5× (température de l'eau de refroidissement en circulation 5°C, température du tampon TBE 15°C). NB: veiller à siphonner une partie du tampon TBE avant de placer les gels dans la cuve afin d'éviter un débordement du tampon.
- Laisser les gels se mettre à température du tampon pendant approximativement 10 minutes;

Étape n° 2 : Préparation des échantillons

- Réaliser le mélange suivant pour chaque échantillon :
 - 1,5 µl de l'enzyme de restriction adaptée
 - 1,5 µl de tampon adapté
 - 5 µl de produit PCR

- porter à un volume de 15 µl avec de l'eau stérile

Placer les mélanges 1h30 à la température adaptée pour une restriction optimale.

- Placer 10 µl de chacun des produits de digestion dans un volume identique de tampon de dénaturation.
- Placer les échantillons 10 minutes à 95°C afin de dénaturer les fragments d'ADN.
- Immédiatement à la fin des 10 minutes placer sur glace.
- Pour la préparation du standard de taille, mélanger un tube de SL gene lower Smart Ruler avec 50 µl de bleu de chargement 2×.

Étape n°3 : Chargement et migration des échantillons

- Charger 20 µl d'échantillon par puits (le Smart Ladder sera chargé à 15 µl)
- Conditions de migration des gels :
 - température de migration : 12 à 15 °C
 - temps de migration : 3 heures
 - voltage : 250 mV pour deux gels, 200 mV pour un seul gel

Étape n°4 : Coloration au nitrate d'argent (solutions à préparer le jour même)

- Sortir les support du tampon de migration, démouler le gel très délicatement afin de ne pas l'endommager et placer le gel dans un bac de verre propre.
- Placer les gels dans les solutions suivantes successivement, en respectant les temps d'incubation, les volumes (donnés ici pour deux gels) et de préférence sous une légère agitation:

- Solution de fixation :
 - volume : 400 ml
 - temps d'incubation : 20 minutes
 - composants : acide acétique glacial 10%
- Rinçages à l'eau stérile désionisée (3×) :
 - volume : 700 ml
 - temps d'incubation:10 minutes chacun
- Solution de coloration au nitrate d'argent :
 - volume: 300 ml
 - temps d'incubation : 20 minutes
 - composants (attention: à ajouter dans cet ordre bien précis !!!!) :
 - 105 ml d'eau désionisée
 - 15 ml de Silver complex solution
 - 15 ml de Reduction moderator solution
 - 15 ml de Image development reagent

(Ce mélange est à réaliser 5 minutes avant utilisation)

+ Au dernier moment, ajouter 150 ml de development solution accelerator (solution préparée à partir de 7,5 gr du réactif en poudre mis en solution dans de l'eau stérile)
- Solution stop :
 - volume: 400 ml
 - temps d'incubation : 15 minutes
 - composants : acide acétique 5%

Le gel peut alors être placé entre deux feuilles plastiques, séchées au four (1h30) puis scanné.

5. Ecotilling

Principe

La technique de L'Ecotilling constitue une technique de choix pour l'analyse du polymorphisme SNP. En effet, elle permet de déterminer la présence mais également de quantifier et de positionner à la base près les mutations ponctuelles.

Protocole

Matériel

- Machine PCR Biorad iCycler
- Eau stérile milli-Q
- Tampon de dilution
- Tampon de digestion
- Enzyme ENDO I (500 unités/ μ L)
- Solution Stop (1 μ L de glycogène, 0,4 d'EDTA 0,5 M, 2 μ l d'acétate de sodium 3M, 1,6 μ l d'eau stérile)
- SLS (sample loading solution) (formamide désionisé) (GenomeLab)(Ref : S506001)
- Standard de taille SS600 (Beckman Coulter GenomeLab)
- Huile minérale Beckman Coulter TM (ref : S505019)
- Tampon de séparation Beckman Coulter TM (ref : S51105)
- Séquenceur Beckman Coulter CEQ 8000 Genetic Analysis System

Protocole

Étape n°1 : Hybridation

- Dans une plaque multipuits, placer dans chaque tube 200 ng de produit d'amplification (référence et individu à tester compris)(NB: les individus peuvent être hybridés sur eux-mêmes pour la détection des individus homozygotes et hétérozygotes)
- Chauffer dix minutes à 95°C et laisser refroidir graduellement jusqu'à température ambiante.

Étape n°2 : Digestion

- Ajouter le mélange suivant dans chaque tube PCR : 2 μ l d'eau stérile, 1,5 μ l de tampon de digestion et 1,5 μ l de l'enzyme Endo I.
- Placer à 37 °C pendant deux heures.
- Stopper la réaction immédiatement à la fin de ces deux heures en ajoutant 3 μ l de « tampon Stop » dans chacun des tubes PCR.

Étape n°3 : Préparation des échantillons pour l'analyse Ecotilling

- Prévoir un tube de SLS par colonne (équivalent 8 tubes PCR).
- Ajouter 2 μ l de standard de taille (SS600) dans chaque tube de SLS (contenu approximatif 340 μ l) et vortexer.
- Placer 38 μ l du mélange dans chacun des tubes d'une plaque 96 puits pour séquenceur.
- Placer dans ces mêmes puits 6 μ l du produit de digestion.
- Déposer au dessus de tous les puits une goutte d'huile minérale.
- Dans la plaque correspondante, placer 8 gouttes de tampon de séparation.
- Placer les deux plaques en séquenceur et lancer l'analyse.

6. Purification de l'ADN par la méthode glycogène

Principe

La purification des fragments d'ADN suite à la digestion enzymatique par ENDO I permet de diminuer le bruit de fond et les pics parasites. En effet, le glycogène, de part sa capacité à retenir les petits fragments d'acides nucléiques, permet de séparer les fragments de digestion des molécules pouvant créer du bruit de fond lors de l'analyse sur séquenceur.

Matériel et méthodes

Matériel

- Glycogène 20 mg/ml (stocké à -20°C) (Roche ; Ref : 901 393)
- EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 0,5 M (Sigma ; Ref : E-7889)
- Acétate de sodium (3M) (Sigma ; Ref : S-7899)
- Eau stérile milli-Q
- Éthanol 96% (stocké à -20°C) (Riedel-de Haën® ; Ref : 24103)
- Centrifugeuse ALC refrigerated centrifuge PK 120R
- SpeedVac Heto lab Equipment VR-1
- SLS (Sample Loading Solution) (formamide désionisé) (GenomeLab) (Ref : S506001)

Protocole

- Réaliser le mélange suivant (quantité pour 8 tubes PCR) :
 - 9 µl de glycogène
 - 18 µl d'acétate de sodium
 - 14,4 µl d'eau stérile milliQ
 - 3,6 µl d'EDTA
- Ajouter 5 µl de ce mélange dans chacun de tubes PCR.
- Ajouter 60 µl d'éthanol 96% dans chacun des tubes PCR.
- Bien homogénéiser.
- Centrifuger une heure à 3500 rpm à une température de 4°C.
- Éliminer l'éthanol.
- Ajouter 200 µl d'éthanol 96% dans chaque tube PCR.
- Centrifuger 10 minutes à 3500 rpm à 4°C.
- Répéter ces trois dernières étapes une seconde fois.
- Éliminer l'éthanol et placer les tubes dans le SpeedVac pour sécher le culot.
- Resuspendre le culot dans 20 µl de SLS.

7. Purification des produits PCR par Microcon Amiconbioseparation Centrifugal Filter Devices

Principe

Cette étape permet de se débarrasser des restants d'amorces et des produits de synthèse incomplète, dans nos produits PCR afin d'obtenir un produit d'amplification le plus pur possible pour la réaction de séquençage.

Matériel et méthodes

Matériel

- Filtres Micron (Kit Microcon® Micon Bioseparations Centrifugal Filter Devices; Ref : 42413)
- Tubes Eppendorf stériles (Kit Microcon® ; Ref : 42413)
- Produit PCR

- Eau stérile milliQ
- Tampon TE 10 mM(Sigma ; Ref : T-6066)

Protocole

- Insérer un filtre Microcon dans le tube Eppendorf
- Y placer 25 µl de produit PCR et 400 µl d'eau stérile, sans toucher la membrane
- Centrifuger 12 minutes à 13.000 rpm à température ambiante
- Retourner le filtre et le placer dans un nouveau tube stérile
- Placer 25 µl de TE dans le filtre, en plaçant la goutte bien au centre
- Récupérer ce qui est passé à travers le filtre

8. Méthode de séquençage

Principe

Le séquençage est la méthode la plus directe pour la détection des mutations ponctuelles ou des indels. Néanmoins, son coût élevé limite souvent son utilisation en génomique fonctionnelle. Ici, cette méthode est utilisée non seulement pour confirmer les résultats obtenus par la méthode Ecotilling mais également pour positionner les mutations découvertes à l'intérieur du fragment amplifié.

Matériel et méthodes

Matériel

- Eau stérile milliQ
- Produit d'amplification (sans marquage fluorescent) purifié par la Microcon[®]
- Amorce 5' portant un IR dye (10 pmole)
- Amorce 3' portant un IR dye (10 pmole)
- CEQ sequencing reaction buffer (Ref : 608074)
- Mélange séquençage avec Ddntp marqués fluorescent (CEQ DTCS Quick Start Kit ; Ref: 608120 Beckman Coulter)
- Machine PCR Biorad i Cyclor
- Séquenceur Beckman Coulter CEQ 8000 Genetic Analysis System
- Solution de purification au glycogène (2 µl d'acétate de sodium (PH 5,2 ; 3 M), 0,4 µl d'EDTA (PH 8 ; 0,5 M), 1 µl de glycogène 20 mg/ml (Roche, Ref : 901393), eau stérile 1,6 µl)
- Éthanol 96%

Protocole

- Dans une plaque PCR multipuits, placer 100 ng de produit PCR, 1 µl d'amorce 5' ou 3' (à 10 pmole) et porter à un volume de 10 µl avec de l'eau stérile
- Dénaturer le mélange à 95°C pendant 15 minutes
- Ajouter 4 µl du mélange de séquençage et 1 µl du tampon de réaction. Porter à un volume total de 20 µl avec de l'eau stérile.
- Placer dans le i-Cycler de Biorad et réaliser le programme suivant :

<i>Étape</i>	<i>Température</i>	<i>Durée</i>	<i>Nombre de répétitions</i>
Dénaturation longue	92°C	1 minute 30 sec	1x
Dénaturation	96°C	20 secondes	40x
Hybridation	50°C	20 secondes	
Élongation	60°C	4 minutes	
Stockage	4°C	infini	1x

- A la fin du programme, le mélange est purifié par la méthode au glycogène puis resuspendu dans 40 µl de SLS afin d'être transférée dans une plaque de séquençage Beckman et d'être analysée.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Description du matériel génétique utilisé

Les ADN génomiques utilisés au cours de ce travail sont issus de 5 variétés différentes de chicorée (Nausica, Arancha, Madona, Melci et Vivace) fournies par la société Warcoing. Ces variétés se distinguent par la différence de longueur des chaînes d'inuline qu'elles produisent et leur sensibilité au choc au froid. Les ADN génomiques sont issus de morceaux de racine de chicorée broyés à l'azote liquide puis extraits grâce à la méthode CTAB. Pour chacune des variétés, trois prélèvements de racine ont été réalisés à trois dates différentes (30/08/2006, 29/11/2006 et 16/12/2006) (voir [figure 1](#)). Les deux premières dates correspondent à celles précédant la première forte chute de température de l'année, la dernière correspond à celle lui succédant. Au total, ce sont 45 ADN génomiques qui ont été analysés.

La longueur moyenne de chaîne d'inuline de départ et la sensibilité au choc au froid caractéristiques à chaque variété étudiée sont illustrée dans la [figure 2](#). On peut ainsi observer que la variété Nausica produit une inuline de haut degré de polymérisation (DP 11,91) mais semble très sensible à la chute brutale de température (perte de 4 unités de fructosyles lorsque la température passe en-dessous de 0°C). À l'inverse, la variété Arancha, produisant des chaînes d'inuline plus courtes au départ (DP 9,87), est beaucoup moins sensible au choc au froid (perte de seulement 1,5 unités fructosyles).

Chacun des 45 ADN est caractérisé par trois chiffres correspondant à la variété, la date de prélèvement et un numéro d'échantillonnage. Un tableau reprenant la dénomination complète de chacun des échantillons est présentée dans la [tableau 1](#). Pour plus de simplicité, un numéro a été attribué à chacun des individus. C'est ce numéro qui sera utilisé pour décrire chacun des individus dans le reste du manuscrit.

Variété	Prélèvement 30/08/2006		Prélèvement 29/11/2006		Prélèvement 16/12/2006	
	N° individu	Dénomination complète	N° individu	Dénomination complète	N° individu	Dénomination complète
Nausica	1	1.04.1	16	1.10.1	31	1.11.1
	2	1.04.2	17	1.10.2	32	1.11.2
	3	1.04.3	18	1.10.3	33	1.11.3
Melci	4	2.04.1	19	2.10.1	34	2.11.1
	5	2.04.2	20	2.10.2	35	2.11.2
	6	2.04.3	21	2.10.3	36	2.11.3
Arancha	7	3.04.1	22	3.10.1	37	3.11.1
	8	3.04.2	23	3.10.2	38	3.11.2
	9	3.04.3	24	3.10.3	39	3.11.3
Madona	10	4.04.1	25	4.10.1	40	4.11.1
	11	4.04.2	26	4.10.2	41	4.11.2
	12	4.04.3	27	4.10.3	42	4.11.3
Vivace	13	5.04.1	28	5.10.1	43	5.11.1
	14	5.04.2	29	5.10.2	44	5.11.2
	15	5.04.3	30	5.10.3	45	5.11.3

Tableau 1 : Indication de la date de prélèvement, la variété et l'échantillon pour chacun des ADN génomiques analysés. Pour raison de simplicité, la terminologie qui sera utilisée par la suite de ce manuscrit sera celle reprenant le numéro de chaque individu.

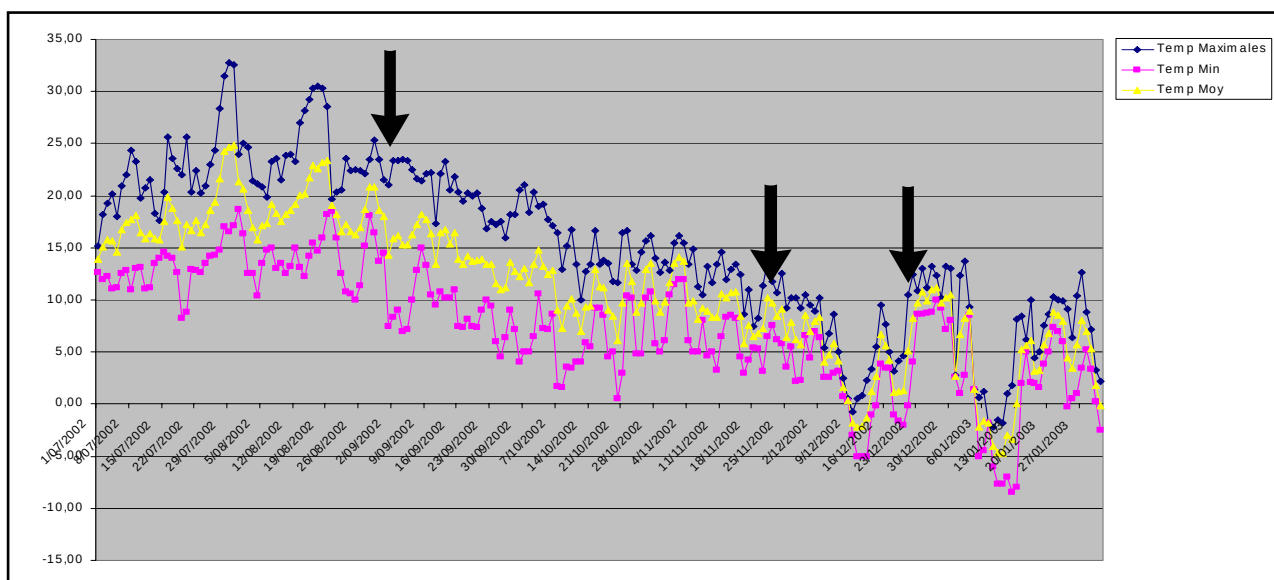


Figure 1 : Diagramme présentant l'évolution de la température au cours de l'année 2002-2003. Les températures maximales sont présentées en bleu, les températures minimales sont en rose et la moyenne de température est en jaune. Les flèches indiquent les trois dates de prélèvement des échantillons de racine de chicorée (30/08/2002, 29/11/2002 et 16/12/2002).

Evolution de la longueur de la chaîne d'inuline moyenne pour chacune des cinq variétés étudiées en fonction du temps.

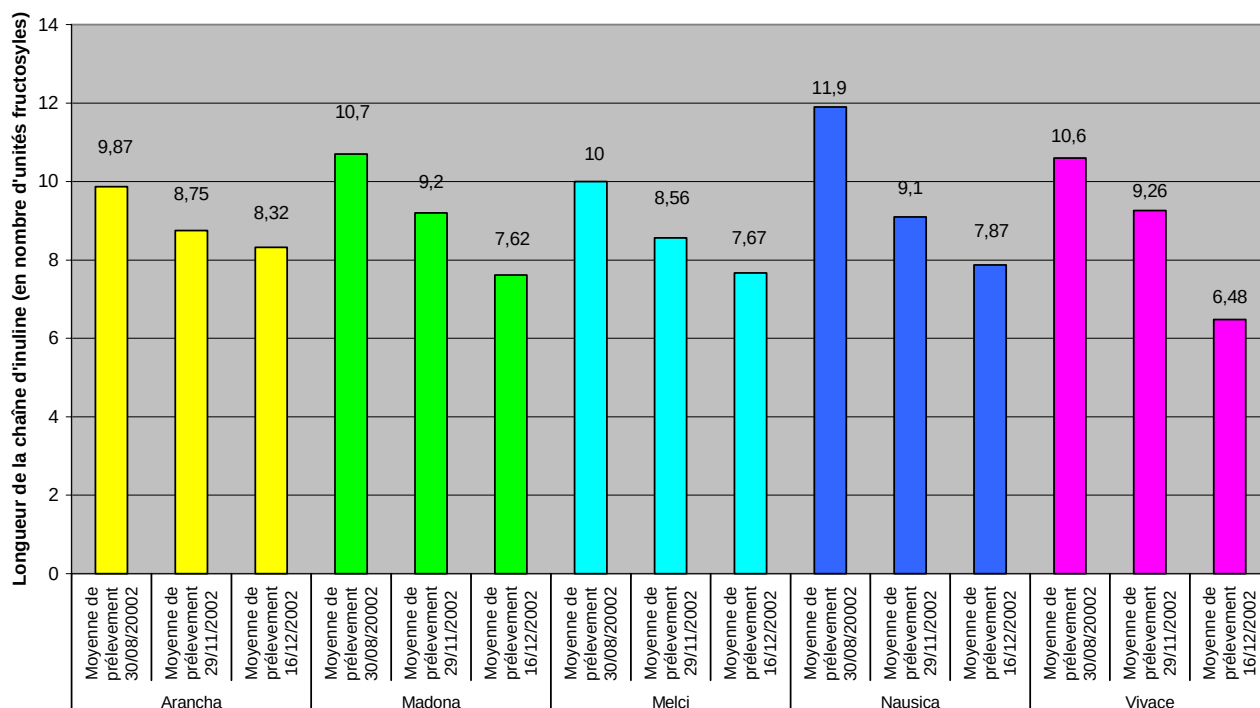


Figure 2 : Diagramme présentant l'évolution du degré de polymérisation de l'inuline en fonction du temps pour les cinq variétés de chicorée étudiées. Pour chacune des cinq variétés (Arancha, Madona, Melci, Vivace et Nausica), trois échantillons ont été prélevés aux trois différentes dates. Les valeurs reprises dans ce tableau correspondent aux moyennes de longueur des chaînes d'inuline obtenues pour chacune des variétés aux trois dates de prélèvement. Chacune des variétés est caractérisée par une longueur de chaîne de départ et une sensibilité au choc au froid qui lui est propre.

2. Choix des gènes candidats impliqués dans l'allocation du carbone

Nous disposons au début de notre étude d'une série de gènes candidats impliqués dans le métabolisme du carbone, et plus précisément dans la biosynthèse et la dégradation de l'inuline. Les deux gènes clés responsables respectivement de l'étape de d'initiation et d'élongation des chaînes d'inuline sont la 1-SST et la 1-FFT. Les principales enzymes de dégradation sont les fructane exohydrolases, les invertases et les sucrose synthases, ces deux dernières dégradant le saccharose, ultime produit de dégradation de l'inuline.

La liste de séquences à analyser (tableau 2) a été constituée à partir de séquences provenant des banques EST obtenues dans le cadre du projet Phytomol (génomique et protéomique de la chicorée 2003-2007) mais aussi à partir de séquences publiées dans les banques de données et à partir de transcrits isolés au laboratoire (séquences CiFr). Pour la réalisation de ce travail d'isolement de séquences CiFr, une paire d'amorces dégénérées a été définie à partir de deux des domaines conservés à travers la famille des fructosyltransférases (NDPNG et YASKTF) (voir figure 3 voir fin de fichier). Ces amorces ont permis d'amplifier simultanément plusieurs classes de fructosyltransférases (1-SST, 1-FFT, invertases et 1-FEH) à partir d'ADN complémentaire. Des amorces spécifiques à chacune des séquences partielles obtenues ont ensuite été définies, testées et utilisées lors d'études en RT-PCR semi-quantitative réalisées au sein du laboratoire (N.Dauchot). Ces sont ces amorces spécifiques qui ont été utilisées dans notre travail pour les Séquences CiFr.

Gène candidat	Taille de l'amplicon sur ADNc	Amplification sur ADN génomique	Fonction	Nom de l'amorce 5'	Nom de l'amorce 3'
Csusy1	324 bp	oui	sucrose synthase	cisusyle51	cisusyle31
Csusy7	320 bp	oui	sucrose synthase	cisusy7e51	cisusy7e31
CIPut (Eco5)	350 bp	oui	putative invertase	RtPutInVe51	PutInVe31-RDB
CFr3-8-12	351 bp	oui	CFr03-08-12 proche put inv	RtCFr03e05-2	RTCFr03e3-2
CFr07 (Eco11)	279 bp	oui	CFr07	RtCFr07e5-2-FD2	RTCFr07e3-2
CFr1-2-9-1 FEHIIa	150 bp	oui	RtCFr01-2-9-1FEH2a	RTCFr01e5-2	RTGwOutCFr1e3-2
CFr05	186 bp	oui	CFr05	RTCFr05e5-2	RTCFr05e3-2
CFr10-11-13 FEHIIb	398 bp	oui	1FEH2B	RTCFr11e5-1	RTCl1FEH2be3
1FEHI (Eco12)	185 bp	oui	1FEHI	RT1FEH1e5-1	RT1FEH1e3-1
CFr04-06	223 bp	oui	CFr04-06	RTCFr04-06-e5	RTCFr06e3

Tableau 2 : Présentation des dix gènes candidats étudiés et des amorces correspondantes.

Les dix gènes candidats sélectionnés ont subi une étude préliminaire en SSCP, pour être ensuite analysés par Ecotilling dans le cadre de ce mémoire. Ces dix gènes sont présentés dans la tableau 2 et correspondent aux trois types d'enzymes impliquées dans la dégradation de l'inuline : des invertases, des sucrose synthases et des 1-fructane exohydrolases. Certaines séquences isolées au laboratoire présentent une forte homologie avec des séquences publiées dans les banques de données : les séquence des gènes CiFr3-8-12 et Eco5 sont par exemple identiques à quelques nucléotides près. Comme nous le verrons plus tard, les résultats obtenus semblent indiquer qu'il s'agit bien de locus distincts. Un tableau récapitulatif reprend la fonction présumée et le numéro d'accension éventuel des dix gènes candidats sur lesquels a été réalisé le travail de ce mémoire (voir tableau 3).

Nom du gène	Fonction présumée	Numéro d'accension
Eco5 (CiPutative invertase)	1-Fructane exohydrolase I	Y11124
Eco12	1-Fructane exohydrolase I	/
Eco11 (CiFr07)	Invertase acide vacuolaire	/
CiFr3-8-12 (proche put inv)	1-Fructane exohydrolase I	/
Cifr05	1-Fructane exohydrolase I	/
CiFr1-2-9	1-Fructane exohydrolase II a	/
CiFr10-11-13	1-Fructane exohydrolase II b	/
CiFr04-06	Invertase	/
CiSusy1	Sucrose synthase	/
CiSusy7	Sucrose synthase	/

Tableau 3 : Récapitulatif des fonctions des différents gènes étudiés.

Des amplifications ont été réalisées sur chacun des ADN génomiques en utilisant les amorces spécifiques. La température d'hybridation utilisée était de 55°C, température pour laquelle on obtenait des très bonnes amplifications pour la plupart des gènes candidats (voir figure 4a et 4b).

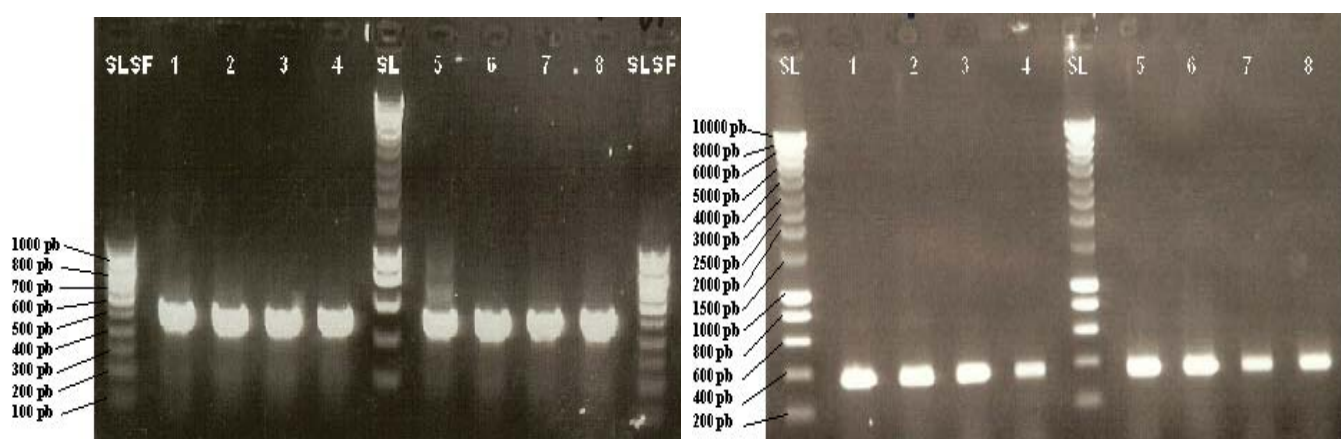


Figure 4 : Gels montrant les amplifications obtenues à 55°C pour les gènes candidats Susy7 (à droite)(a) et Eco5 (à gauche)(b) pour les 8 premiers individus.

On peut observer que pour certains gènes, comme ici Susy7, la taille de l'amplicon (ici à peu près 450 pb) ne correspond pas aux tailles attendues sur base des séquences EST du projet Phytomol (320 pb (tableau 2)). Ceci est lié au fait que l'amplification est ici réalisée sur de l'ADN génomique et non plus de l'ADN complémentaire, ce qui implique la présence possible d'un ou plusieurs introns.

Le fait que l'amplification soit réalisée sur du matériel génétique de type génomique est de grand intérêt dans notre problématique : la présence potentielle d'introns à l'intérieur des produits d'amplification permet d'augmenter le nombre potentiel de polymorphismes pouvant être observés, ces régions étant soumises à une pression de sélection nettement plus faible. Même si les mutations situées dans ces régions ne se traduisent pas par un changement d'acide aminé, elles permettent en tant que marqueur moléculaire de servir d'indicateur de la présence d'une variation de séquence, et donc de la présence potentielle d'un allèle différent, soit dans la région codante, soit dans la région régulatrice du gène, voir même chez un autre gène à proximité.

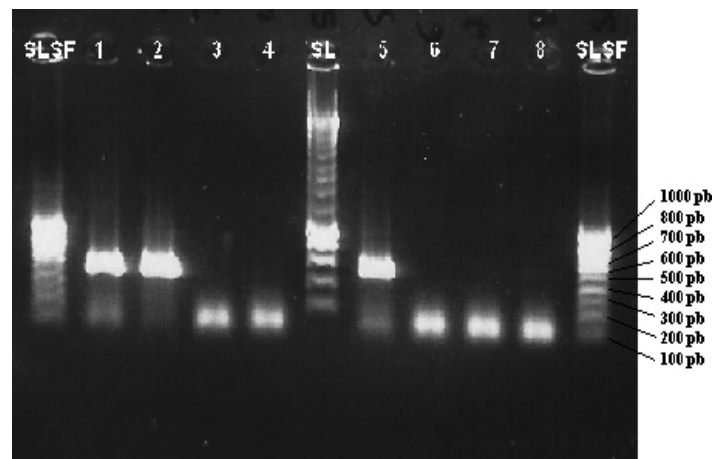


Figure 5 : Amplification du gène candidat Susy1 à la température de 55°C pour les 8 premiers individus. L'amplification du gène Susy1 à 55°C ne semble possible que pour certains individus.

Pour d'autres gènes, comme Susy1, une partie des ADN semblait être réticente à toute amplification (voir [figure 5](#)). Des essais d'amplification à d'autres températures ne furent pas plus fructueux et donnèrent exactement les mêmes résultats. Les séquences partielles sur bases desquelles les amorces Susy ont été définies proviennent des banques de données EST générées lors du projet Phytomol. Pour chaque banque, environ 1000 clones ont été séquencés au départ de l'extrémité 3'. Après comparaison, huit séquences différentes présentant un score significatif d'homologie avec des sucroses synthases déjà décrites ont pu être isolées. Il a été constaté que chaque isoforme n'avait pas pu être isolée au départ de chaque banque, laissant supposer une absence possible de celle-ci chez certains individus (chaque banque EST étant produite au départ d'un individu différent issu d'une variété identique). Le phénomène avait également été observé pour la 1-FEH I où cette isoforme semblait beaucoup moins fréquente chez des individus récemment sélectionnés par rapport à des individus plus anciens (N.Dauchot). Cette "disparition" pourrait résulter de la pression exercée par les sélectionneurs sur des allèles influençant négativement les phénotypes analysés classiquement en sélection. Cependant, ces observations peuvent également résulter d'un échantillonnage trop faible lors du séquençage des banques.

Pour d'autres gènes, comme CiFr1-2-9 ou CiFr10-11-13, l'amplification à 55°C fournissaient une ou plusieurs bandes parasites dues à un manque de spécificité (voir [figure 6](#)).

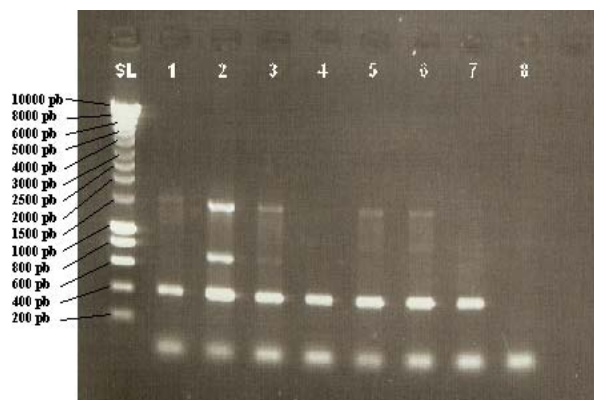


Figure 6 : Amplification du gène candidat CiFr10-11-13 à la température de 55°C pour les 8 premiers individus. Chez certains gènes candidats comme CiFr1-2-9 et CiFr10-11-13, l'utilisation d'une température de 55°C générait des amplifications parasites. Pour faire disparaître ces bandes parasites et obtenir une amplification plus spécifique, la température fut augmentée à 60°C.

Pour pallier à ce problème de bandes parasites, la température fut remontée à 60°C pour ces deux gènes. Les amplifications obtenues étaient de moins bonne intensité mais semblaient plus spécifiques, un grand nombre des amplifications parasites ayant disparu. C'est donc à ces températures qu'ont été réalisées les amplifications ayant servi de base pour la technique SSCP.

3. La technique Single Strand Conformation Polymorphism : réalisation d'un criblage du polymorphisme préalable à une étude par Ecotilling

La technique SSCP est ici utilisée comme criblage préalable à une étude plus poussée par Ecotilling. En effet, cette dernière requiert l'utilisation de matériel et d'amorces marquées coûteuses. La réalisation d'un premier test du polymorphisme par une méthode moins coûteuse, mais également moins sensible, permet de réaliser une sélection des gènes les plus polymorphes et de limiter ainsi les coûts d'analyse.

3.1. Positionnement des sites de restriction et choix des enzymes de restriction

Comme évoqué dans l'introduction, la technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) nécessite de travailler sur des fragments compris entre 50 et 200 pb. Pour cette raison, la plupart des produits d'amplification des gènes étudiés ont été soumis à une restriction enzymatique avant de pouvoir être analysés par SSCP.

Les paramètres qui ont particulièrement été pris en compte dans le choix de l'enzyme de restriction à utiliser étaient :

- (a) la longueur des fragments obtenus après restriction.
- (b) la température optimale pour l'activité de l'enzyme, de préférence commune à plusieurs enzymes de manière à pouvoir restreindre un plus grand nombre d'amplicons en même temps.
- (c) la disponibilité de l'enzyme au laboratoire.
- (d) la possibilité d'inactiver les enzymes de restriction par la chaleur.

Aucune des enzymes dont nous disposons au laboratoire et pouvant fournir des fragments de taille adéquate dans le cadre de cette étude ne semblait pouvoir être inactivée par la chaleur. Pour cette raison, ce paramètre a été mis de côté.

Les sites de restriction des enzymes dont nous disposons ont donc été positionnés sur la séquence de nos dix gènes candidats. Les enzymes clivant au mieux le produit d'amplification en fragments compatibles avec la taille recherchée ont été sélectionnées (voir [figure 7 à 10](#)). Ci-dessous, un tableau présentant les différentes enzymes de restriction sélectionnées, la température et le tampon à utiliser pour une activité optimale de cette enzyme et la taille des fragments obtenus après restriction (voir [tableau 4](#)).

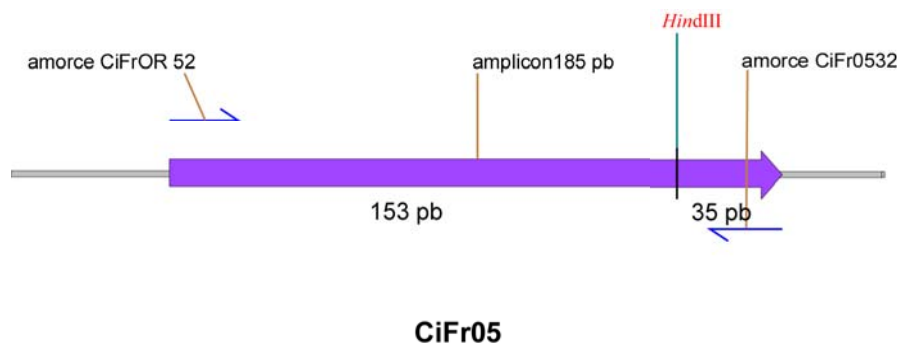


Figure 7 : Positionnement des sites de restriction correspondant aux enzymes à disposition pour le gène CiFr05. Les sites de restriction des enzymes à disposition au laboratoire ont été positionnés sur les différentes séquences partielles. L'enzyme restreignant le produit PCR de façon optimale pour une analyse par la technique SSCP a été sélectionnée. Dans le cas du gène CiFr05, cette enzyme fut Hind III.

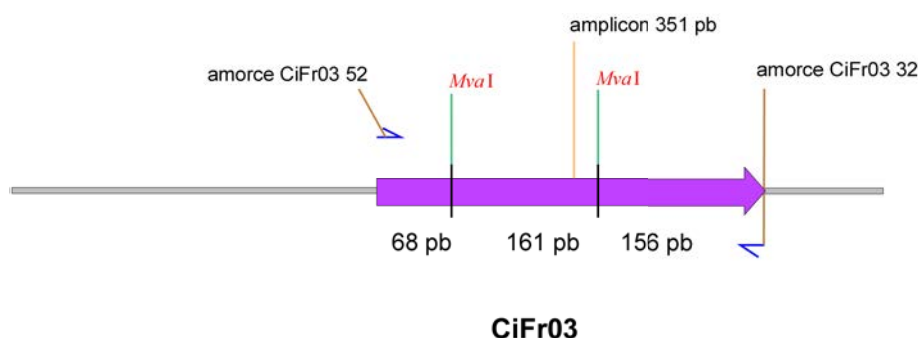


Figure 8 : Positionnement des sites de restriction correspondant aux enzymes à disposition pour le gène CiFr03. Pour le gène candidat CiFr03, l'enzyme de restriction choisie est MvaI clivant le produit d'amplification en trois fragments de 68, 161 et 156 pb.

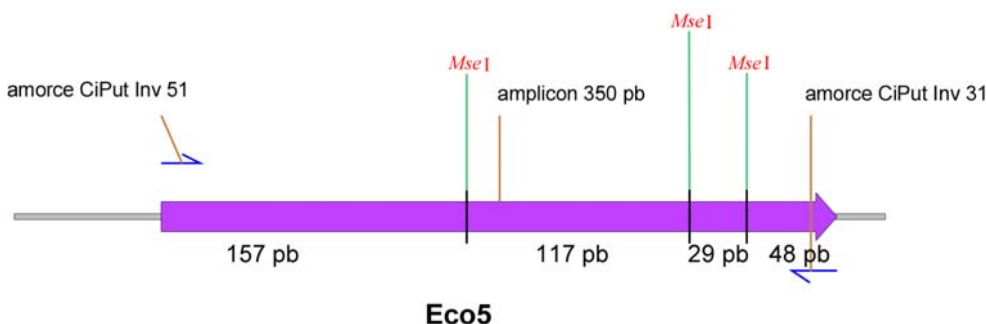
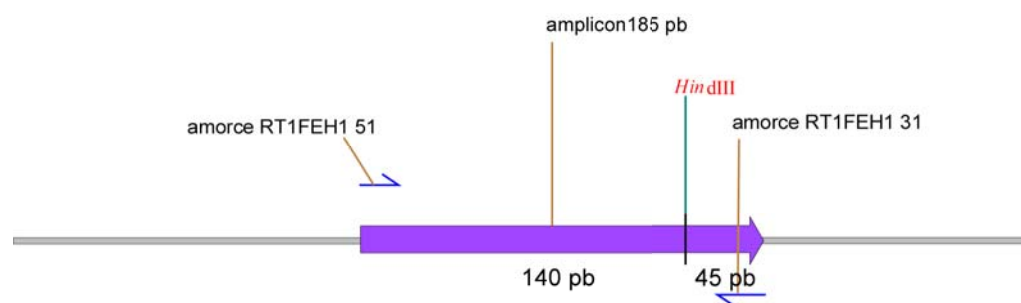


Figure 9 : Positionnement des sites de restriction correspondant aux enzymes à disposition pour le gène ECO 5. L'enzyme utilisée pour le clivage de Eco5 est Mse I produisant des fragments compris entre 157 et 29 pb.



1-FEH I

Figure 10 : Positionnement des sites de restriction correspondant aux enzymes à disposition pour le gène 1-FEH I. La seule enzyme clivant dans l'amplicon de la 1-FEH I est Hind III.

Gène candidat	Taille de l'amplicon	Enzyme de restriction	Température de restriction	Tampon	Taille des fragments attendus
Cisusy1	324 pb	Taq I	65°C	Tampon 2 (Invitrogen)	120 + 200 + 4
Cisusy7	320 pb	Taq I	65°C	Tampon 2 (Invitrogen)	120 + 191 + 10
Eco5	350 pb	Mse I	65°C	Tampon 2 (Invitrogen)	157 + 117 + 29 + 48
Eco11	279 pb	Sau 3A I	37°C	Tampon 4 (gibco BRL)	137 + 50 + 90 + 10
Eco12	185 pb	Hind III	37°C	Tampon 2 (Invitrogen)	140 + 45
CiFr1-2-9	150 pb	Taq I	65°C	Tampon 2 (Invitrogen)	83 + 68
CiFr3-8-12	351 pb	Mva I	37°C	Tampon H (Roche)	68 + 131 + 156
CiFr 04-06	223 pb	Mse I	37°C	Tampon 2 (Invitrogen)	121 + 102
CiFr 05	186 pb	Hind III	37°C	Tampon 2 (Invitrogen)	153 + 35
CiFr10-11-13	398 pb	Mva I	37°C	Tampon H (Roche)	191 + 119 + 88

Tableau 4 : Présentation des enzymes de restriction choisies pour chacun des gènes candidats ainsi que quelques caractéristiques de la réaction de digestion. Afin de pouvoir être analysés par la technique SSCP, les différents produits d'amplification ont été soumis à une restriction enzymatique permettant d'obtenir des fragments de taille comprise entre 50 et 200 pb.

Certains gènes pour lesquels la taille de l'amplicon était très petite, comme CiFr1-2-9 (150 pb), n'ont pas été restreints. L'efficacité d'une partie des restrictions a été testée sur gels

d'agarose 3% (permettant de mieux séparer les fragments de petite taille) avant d'être analysées par SSCP (voir [figure 11 a et b](#)).

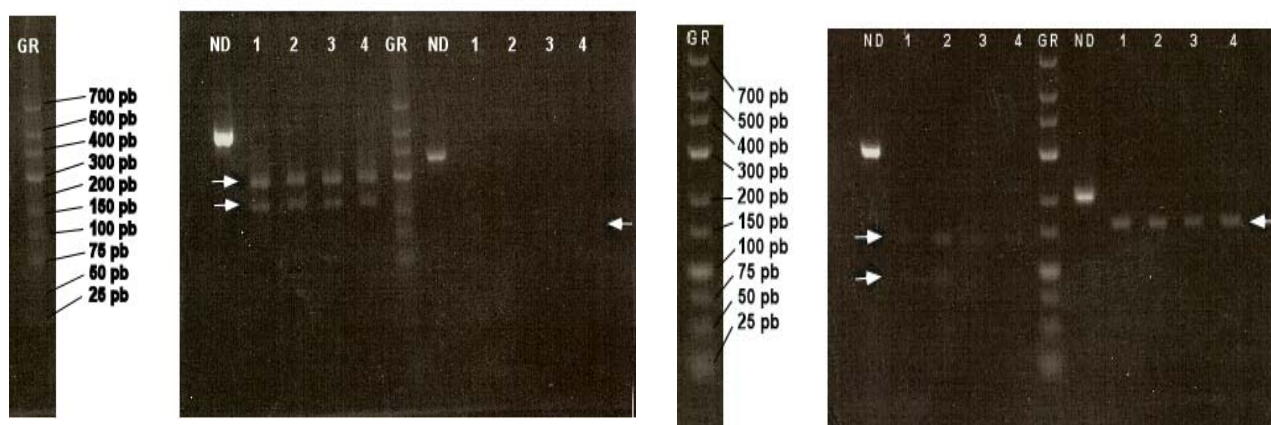


Figure 11 : Gel montrant l'efficacité de digestion des enzymes de restriction utilisées (a) pour les gènes Susy7 et Eco5 et (b) pour les gènes Eco11 et Eco12. Les produits de digestion des amplicons pour quatre individus sont ici comparés à un produit d'amplification non restreint (ND). (a) L'efficacité et la spécificité de digestion des enzymes est démontrée par l'obtention de bandes de la taille attendue tant pour le gène Susy7 (à gauche) que Eco5 (à droite). Les fragments de petite taille (moins de 50 pb) sont généralement peu distinguables. (b) Les mêmes observations sont faites pour les gènes Eco11 (à gauche) et Eco12 (à droite).

On peut observer que la taille des produits de digestion correspond bien à celle attendue. Il a été observé que dans certains cas, même après les deux heures de digestion, on pouvait toujours observer un peu de produit d'amplification non digéré (ex : CiFr05).

3.2. Résultats des gels SSCP

On l'a vu, la SSCP est basée sur une différence de mobilité liée à une différence dans la structure secondaire formée lors d'une renaturation de fragments d'ADN simple brin. La formation de cette structure secondaire est elle-même influencée par la séquence et donc la présence de polymorphismes entre les différents allèles d'un même gène.

L'étude du polymorphisme par SSCP a d'abord été réalisée pour chacun des dix gènes candidats sur les huit premiers individus (1.04.1 à 3.04.08). Lorsque du polymorphisme a pu être mis en évidence sur ces ADN, l'analyse a été poursuivie. Ainsi, certains gènes (ex : CiFr1-2-9, CiF04-06 ou CiFr10) ne révélant aucun polymorphisme particulier, n'ont été testés que sur ces quelques individus. D'autres, comme Eco5, ont été testés sur l'ensemble des ADN génomiques à disposition. Pour certains gènes, comme Susy 1, seuls les individus pour lesquels des amplifications ont pu être obtenues ont été testés par SSCP.

Sur les dix gènes candidats testés par SSCP, seuls cinq ont révélé du polymorphisme : Eco5, CiFr3-8-12, CiFr05, Eco12 et Susy7. Le gène présentant le polymorphisme le plus marqué est Eco5, pour qui deux profils SSCP différents sont clairement observables ([voir figure 12](#)). Les quatre autres gènes présentent un polymorphisme moins net, souvent lié à la présence ou à l'absence de bandes en haut des pistes de migration ([voir figure 13 à 16](#)).

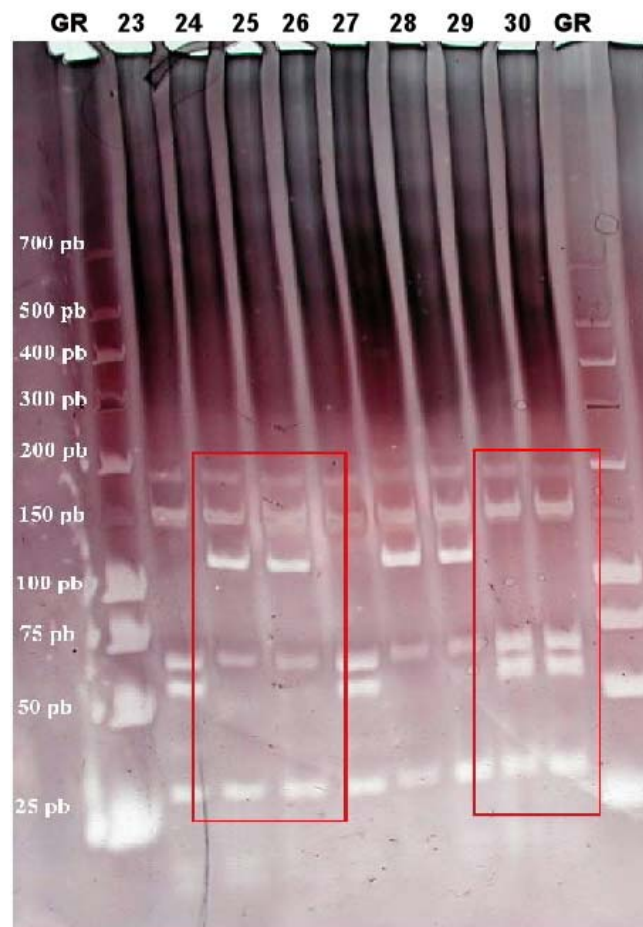


Figure 12 : Gel SSCP montrant du polymorphisme dans le cas du gène Eco5.

Le gène candidat Eco5 est celui montrant les plus beaux profils en SSCP. Deux profils différents sont clairement observables (mis en évidence en rouge). L'utilisation du standard de taille est ici plutôt donnée à titre indicatif, la migration des fragments étant ici plus influencée par leur structure en deux dimensions que par leur taille.

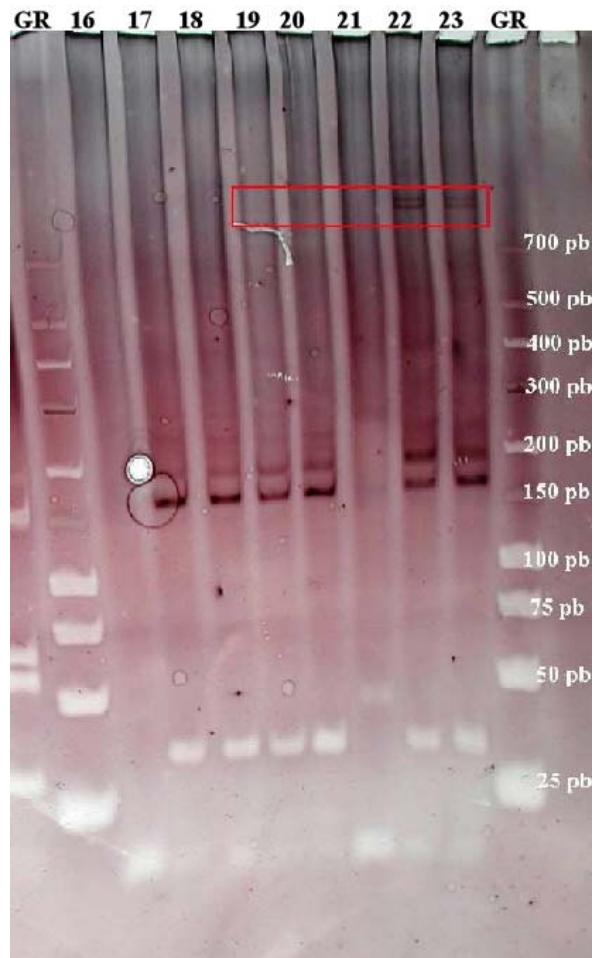


Figure 13 : Gel SSCP montrant du polymorphisme dans le cas du gène CiFr05. Le polymorphisme chez le gène CiFr05 est caractérisé par la présence ou l'absence de deux bandes dans la partie supérieure des pistes. Les pistes ne présentant pas de bandes ont dues à une absence d'amplification

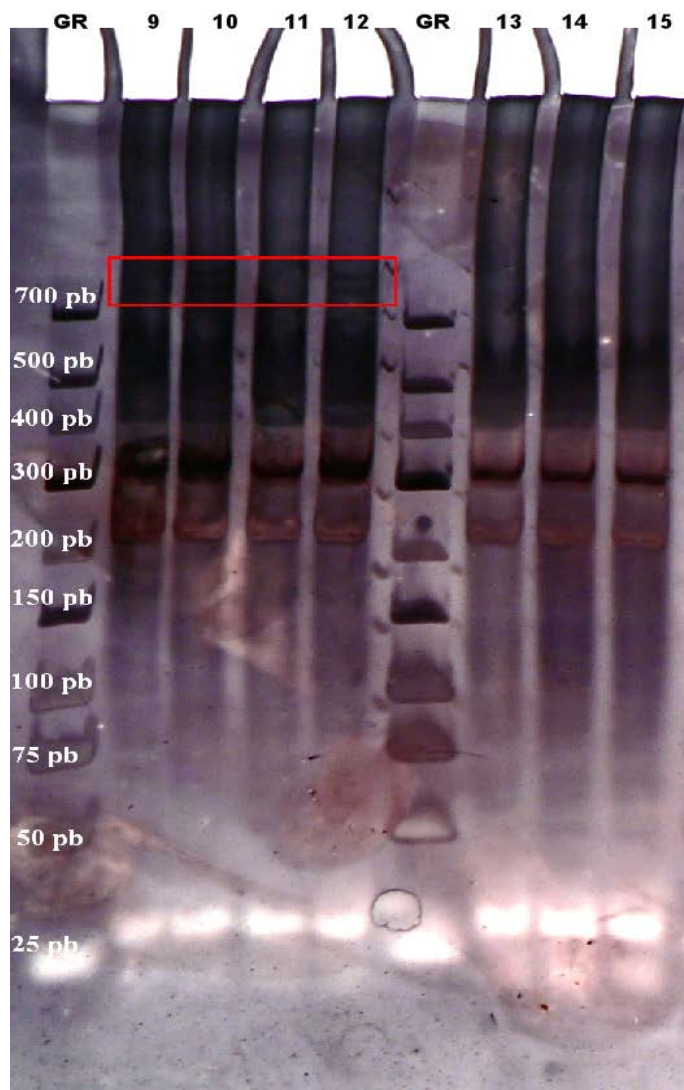


Figure 14 : Gel SSCP montrant du polymorphisme dans le cas du gène Susy7.
 Le gène Susy7 a également révélé du polymorphisme durant l'analyse SSCP : certaines bandes en haut des pistes ne se retrouvent que chez certains individus.

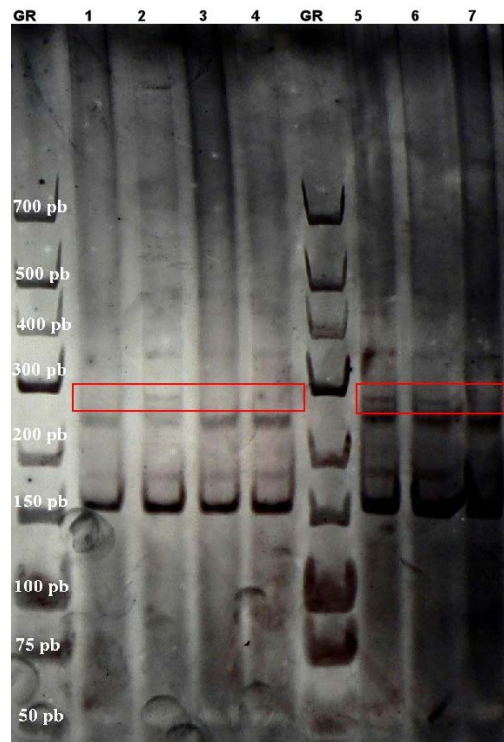


Figure 15 : Gel SSCP montrant du polymorphisme dans le cas du gène 1-FEH

I. Un léger polymorphisme a également été détecté pour le gène 1-FEH I sous la forme de la présence d'une bande supplémentaire chez certains individus.

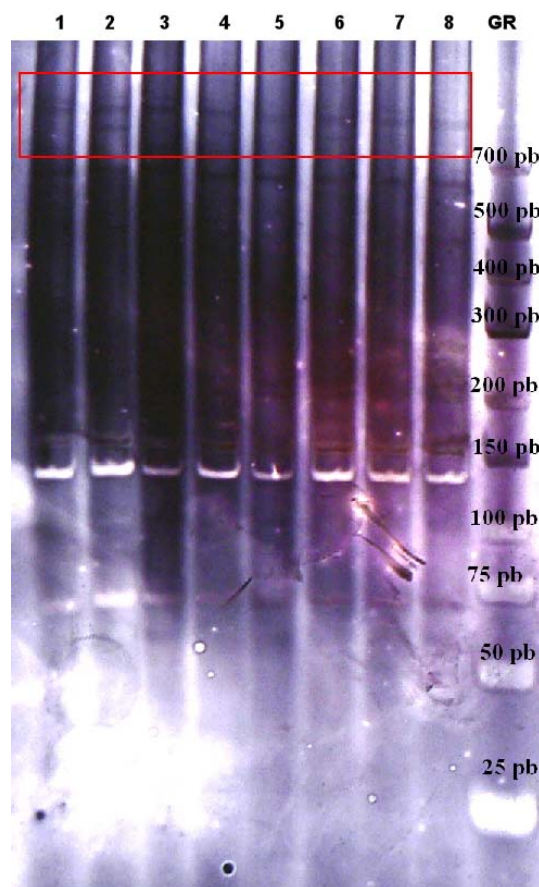


Figure 16 : Gel SSCP montrant du polymorphisme dans le cas du gène

CiFr03. Dans le cas du gène CiFr03, le polymorphisme SSCP se présente au niveau d'un ensemble de bandes en haut des pistes.

La principale difficulté rencontrée lors de la réalisation des gels SSCP est liée à l'importance du bruit de fond qui rendait souvent l'analyse des résultats très difficile. Une coloration à l'argent normale n'est censée marquer que les fragments d'ADN en laissant le reste du gel presque transparent. Ici, au contraire, le fond des gels se colorait avant que n'apparaissent la plupart des bandes intéressantes. Certains gels ont ainsi dû être recommencés plusieurs fois avant de pouvoir fournir des résultats analysables. Les causes de ce bruit de fond sont assez obscures : d'autres manipulations utilisant cette même coloration et le même protocole ont été réalisées au laboratoire et ne présentaient pas cette différence de coloration. Les seules différences entre les deux manipulations pouvant constituer une voie d'explication sont la présence de glycérol dans le gel d'acrylamide et les conditions différentes de migration (ex : tampon TBE 0,5x). Sur la plupart des gels, on peut également observer que certaines bandes apparaissent par coloration négative. Ceci peut s'expliquer par la très grande quantité d'ADN chargé pour certains des gènes.

Il est à noter que les conditions de migration ont été optimisées au cours du temps : au début, la température de l'eau de circulation avait été choisie à 12°C, ce qui permettait une température de 17°C pour le tampon TBE baignant les gels. Par après, suite à la lecture d'un protocole (Sea 2000), la température de l'eau de circulation fut descendue à 5°C, ce qui correspond à une température de 12°C pour le tampon TBE. De plus, l'ensemble des gels ont été réalisés en chambre thermostatée de manière à garantir la reproductibilité des résultats. L'impact de la température sur la sensibilité de la technique SSCP a déjà été traité dans l'introduction.

4. Étude du polymorphisme par Ecotilling

Suite aux résultats obtenus par la méthode SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), l'étude du polymorphisme des gènes candidats a été poursuivie en Ecotilling, technique permettant de mettre en évidence rapidement le nombre et la position des SNPs en présence. Quatre amorces 5' (forward) fluorescentes correspondant à quatre des cinq gènes pour lesquels du polymorphisme SSCP avait été observé ont été commandées (voir [tableau 5](#)). Ces amorces possèdent exactement la même séquence que les amorces forward non marquées utilisées pour la réalisation de la SSCP. Les fluorochromes portés en 5' par ces amorces ont été choisis soit vert soit noir : en effet, ces deux fluorochromes n'interfèrent pas au niveau de leur longueur d'onde d'émission et d'excitation, ce qui permet le multiplexage en détection des produits de digestion de deux gènes candidats.

Oligo#	Nom	Taille (pb)	Couleur du fluorochrome
3331824	RtPutInVe51	21	Noir
3331825	RT1FEH1e51	20	Vert
3331826	RTCiFr05e5-2	21	Vert
3331827	RtCiFr03e05-2	21	Noir

Tableau 5 : Caractéristiques principales des amorces fluorescentes utilisées pour l'analyse Ecotilling. L'utilisation d'amorces portant des fluorochromes de deux couleurs différentes permet un multiplexage des produits d'amplification. Ainsi, les produits d'amplification des gènes 1-FEH I et Eco5 ont été analysés en multiplex tout comme les gènes CiFr03 et CiFr05. Les choix de la longueur d'onde d'émission des fluorochromes a été conditionné par la volonté que ceux-ci n'interfèrent pas entre eux.

Toutes les amplifications utilisées pour l'Ecotilling ont donc été réalisées en utilisant une amorce forward marquée en 5' et une amorce 3' (reverse) non marquée. De manière générale, l'amplification était à peu près inchangée par l'utilisation des amorces 5' fluorescentes : l'efficacité d'amplification, même si elle diminuait un peu, restait largement suffisante pour réaliser une analyse à l'aide du séquenceur, sachant la très grande sensibilité des systèmes de détection de la fluorescence.

Nous avons vu précédemment que la technique de l'Ecotilling consistait, dans une première étape, en l'hybridation de l'ADN des individus étudiés avec une référence. Cependant, nous ne disposions ici d'aucune référence. Les individus ont donc été hybridés sur eux-mêmes, ce qui a permis non seulement de distinguer les homozygotes et les hétérozygotes, mais également de déjà mettre en lumière un certain nombre de SNPs. Ce test nous a également permis de sélectionner une référence pour chacun des deux gènes parmi les individus identifiés comme homozygotes. Celle-ci a par la suite été hybridée contre tous les autres homozygotes.

5. Réalisation d'un gradient de température : choix d'une température spécifique pour l'amplification des quatre gènes candidats avec les amorces fluorescentes et réalisation des premiers tests Ecotilling

Afin de trouver la meilleure température d'amplification permettant d'obtenir le rapport signal/ bruit de fond optimal avec les enzymes fluorescentes, différentes températures d'hybridation dans un gradient de température, allant de 55°C à 70°C ont été utilisées puis testées en multiplexage (Eco5 avec 1-FEH et CiFr03 avec CiFr05) sur séquenceur. Lors de ce test, les paramètres pris en compte étaient l'importance de l'amplification (intensité de fluorescence supérieure à 100.000 rfu) et l'absence de pics parasites. La température fournissant ce rapport optimal était de 57,9°C pour ECO 5 et 1-FEH I et de 60,5°C pour CiFr03 et CiFr05.

Des amplifications pour les gènes Eco5, CiFr05, CiFr3-8-12 et Eco12 ont ensuite été réalisées sur les 15 premiers individus aux températures spécifiques déterminées puis testées sur gels d'agarose 1%. Toutes les amplifications semblaient avoir correctement fonctionné. On a pu également observer que pour la 1-FEH I (= ECO12), on n'obtenait pas d'amplification pour certains ADN génomiques (ex : individus 8, 11 et 12). Ce phénomène avait déjà été observé pour Susy1 précédemment et on l'avait expliqué par l'absence de cette forme du gène chez certains individus. Le fait que les SNPs découverts se situent dans une région codante peut être également suspecté ici. En effet, la taille des amplicons obtenus sur ADN génomique pour la plupart des gènes candidats sur gel d'agarose et sur les sorties Ecotilling correspondent généralement à peu près à la taille du attendu sur bases des séquences d'ADN complémentaire (voir [tableau 2](#)).

Les produits d'amplification obtenus ont donc été hybridés sur eux-mêmes puis digérés afin d'être analysés sur séquenceur. L'enzyme de digestion utilisée ici n'était pas Cel I : d'autres enzymes, présentant la même activité et tout aussi efficaces, ont été découvertes. C'est une de ces enzymes, EndoI, qui a été utilisée pour réaliser toutes les digestions. Les résultats obtenus pour cette analyse du polymorphisme ont été décevants : Quelque soit le gène candidat, toutes les sorties présentaient le même profil, comportant tous les mêmes pics (voir [figure 1 en annexe](#)). De telles sorties ne pourraient être expliquées que par certaines hypothèses :

- Soit tous les individus testés étaient hétérozygotes pour ces gènes candidats, ce qui est peu probable.

- Soit il est survenu un problème lors de la digestion (aucune digestion).
- Soit il y a eu un problème d'amplification (la température d'amplification sélectionnée donne encore trop de bruit de fond).

Suite à ces résultats, les températures d'amplification ont donc été changées : 60,5°C pour Eco5 et 1-FEH I et 64,3°C pour CiFr3-8-12 et CiFr05 et les échantillons multiplexés. Pour ces températures, les amplifications restaient toujours de bonne intensité sauf pour Eco5 pour qui le signal obtenu était très faible. De plus, pour certains gènes, des pics parasites ont disparus. Après hybridation sur eux-mêmes et digestion, des pics de digestion ont enfin pu être observés. Néanmoins, ces pics semblaient peu crédibles : premièrement, ceux-ci étaient souvent noyés dans une forêt de pics parasites. Deuxièmement, les pics qui semblaient se retrouver chez plusieurs individus étaient souvent de si petite taille que le séquenceur refusait de leur assigner une taille, ce qui rendait le travail d'analyse très difficile. Les résultats obtenus semblaient donc difficilement analysables.

Plusieurs problèmes restaient donc en suspens : premièrement, les pics de digestion obtenus pour l'Ecotilling aux températures spécifiques étaient très faibles par rapport au signal de départ et donc difficilement distinguables du bruit de fond (pics noyés dans une forêt de pics). Deuxièmement, la température d'amplification utilisée pour réaliser l'Ecotilling et la SSCP étant différentes, il était possible que les amplicons produits soient légèrement différents et que donc les résultats Ecotilling et SSCP ne soient pas comparables.

Pour ces raisons, des amplifications à 55°C (température d'amplification utilisée lors de la SSCP pour les quatre gènes) furent réalisées afin d'être testées par Ecotilling pour pouvoir par la suite comparer ces résultats à ceux obtenus pour la SSCP.

Un test de EndoI fut également réalisé en utilisant le gène contrôle DREB, gène déjà bien caractérisé au laboratoire au niveau de son polymorphisme SNP pour l'ensemble des 45 ADN génomiques lors d'une précédente analyse utilisant Cel I. L'objectif de ce test était non seulement de vérifier que l'enzyme possédait bien sa capacité catalytique, mais également que l'endonucléase SSS était utilisée à la bonne dilution (jusqu'à présent la dilution de 50x avait toujours été utilisée conformément aux recommandations du fournisseur). Dans cette optique, trois dilutions furent testées sur le gène contrôle : 5x, 10x et 50x. Les résultats révélèrent que ni l'enzyme, ni la dilution n'étaient en cause : les pics obtenus étaient bien nets et correspondaient parfaitement à ceux attendus.

6. Détermination du polymorphisme par hybridation sur eux-mêmes des différents produits d'amplification

Ce test est réalisé de manière à mettre en évidence les individus hétérozygotes pour les séquences analysées. Les amplifications pour les quatre gènes candidats ont donc dans un premier temps été réalisées seulement sur les 15 premiers individus (= première date de prélèvements) afin de voir si les sorties Ecotilling obtenues présentaient des pics de digestion valables. De façon à améliorer la qualité des sorties, les produits d'amplification hybridés sur eux-mêmes puis digérés, ont subi une étape supplémentaire de purification à l'aide d'une méthode de purification au glycogène. Les résultats obtenus furent étonnants : Une grande partie des pics parasites avaient disparu, laissant apparaître clairement les pics de digestion (voir les sorties Ecotilling en annexe). Les produits d'amplification correspondant aux quatre gènes candidats pour les 45 individus furent donc tous purifiés grâce à cette méthode, après la réaction de digestion. Quelques exemples de ces sorties Ecotilling sont illustrés dans la figure 2 en annexe.

L'analyse des sorties Ecotilling obtenues pour les quatre gènes candidats est résumée dans les tableaux 6 à 9. On peut donc considérer au vu de ces résultats que seuls les gènes candidats CiFr03 et Eco5 présentent des pics intéressants et susceptibles de correspondre à des mutations ponctuelles. Les pics observés pour les gènes 1-FEH I et CiFR05 n'étaient vraisemblablement que des artefacts générés par le séquenceur. Seules les études sur les gènes Eco5 et CiFr03 seront poussées plus loin.

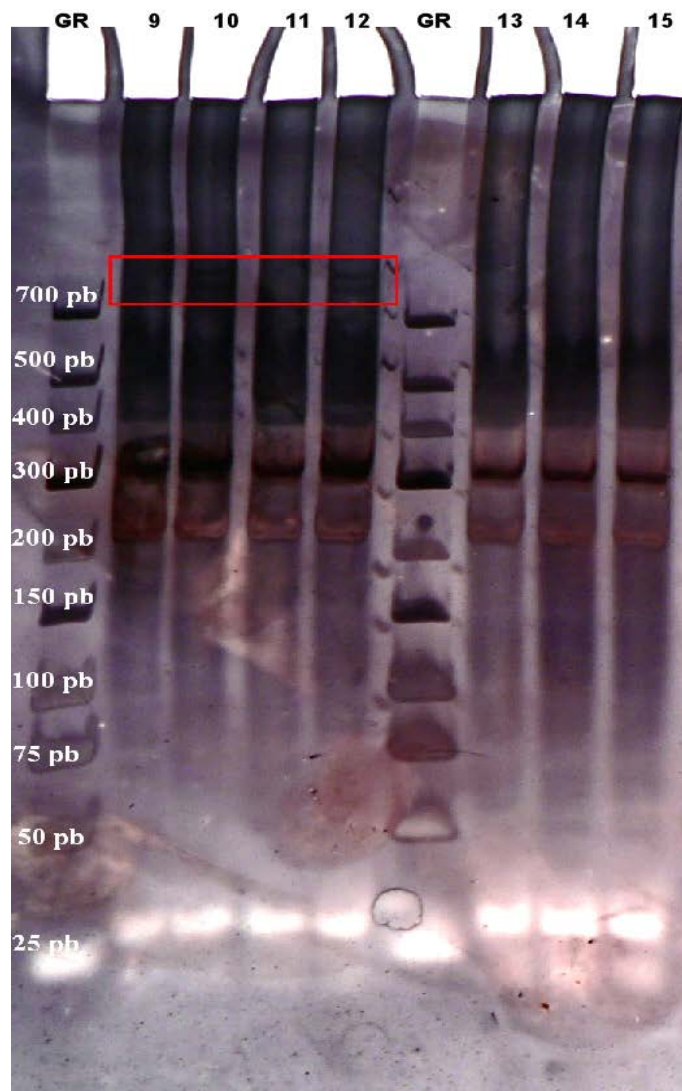


Figure 14 : Gel SSCP montrant du polymorphisme dans le cas du gène Susy7.

Le gène Susy7 a également révélé du polymorphisme durant l'analyse SSCP : certaines bandes en haut des pistes ne se retrouvent que chez certains individus.

		62	68	72	80	85	92	97	105	222	300
Nausica	1		A/B			A/B				A/B	
	2	A/B	A/B								
	3										
	16		A/B			A/B				A/B	
	17		A/B								
	18										
	31	A/B	A/B			A/B					
	32										
Melci	33		A/B			A/B					
	4		A/B			A/B				A/B	
	5		A/B								
	6	A/B	A/B								
	19		A/B	A/B	A/B	A/B		A/B		A/B	
	20		A/B		A/B	A/B		A/B		A/B	
	21		A/B		A/B	A/B		A/B		A/B	
	34										
Arancha	35	A/B	A/B								A/B
	36		A/B								
	7	A/B	A/B		A/B	A/B				A/B	
	8		A/B			A/B				A/B	
	9										
	22		A/B			A/B		A/B		A/B	
	23		A/B								
	24										
Madona	37		A/B			A/B				A/B	
	38		A/B			A/B				A/B	
	39		A/B								
	10		A/B			A/B					
	11		A/B			A/B					
	12		A/B			A/B				A/B	
	40										A/B
	41										
Vivace	42										A/B
	25		A/B			A/B				A/B	
	26		A/B								
	27										
	13		A/B			A/B				A/B	
	14										
	15	A/B	A/B								
	28					A/B				A/B	
	29		A/B								
	30										
	43		A/B	A/B	A/B		A/B		A/B	A/B	
	44	A/B	A/B					A/B			
	45	A/B	A/B			A/B		A/B			

Tableau 6 : Résultats Ecotilling obtenus après hybridation des 45 individus sur eux-mêmes pour le gène Eco5. Une case bleue représente une absence de pic. Les cases vertes foncées représentent les pics ayant été observés. Les individus marqués de vert clair sont ceux n'ayant pas pu être analysés. Les pics les plus susceptibles de correspondre à des mutations ponctuelles sont indiqués en bleu foncé. Les pics moins évidents sont indiqués en bleu clair. La cohérence des pics est évaluée en fonction de plusieurs paramètres : intensité de fluorescence et aspect général du pic de digestion ainsi que sa fréquence de représentation.

		56	67	253	277	291
Nausica	1	A/B			A/B	
	2			A/B		
	3				A/B	
	16					
	17					
	18					
	31					
	32					
	33					
Melci	4	A/B				
	5	A/B				
	6	A/B				
	19					
	20					
	21					
	34					
	35				A/B	
Arancha	7				A/B	
	8					
	9					
	22				A/B	
	23					
	24				A/B	
	37					
	38				A/B	
Madona	10					
	11					
	12					
	40				A/B	
	41					
	42				A/B	
	25				A/B	
	26					
Vivace	27				A/B	
	13		A/B			
	14					
	15					A/B
	28					
	29					
	30					
	43					
	44					
	45					

Tableau 7 : Résultats Ecotilling obtenus après hybridation des 45 individus sur eux-mêmes pour le gène CiFr03. Pour le gène candidat CiFr03, seuls deux pics pourraient correspondre à des SNPs (56 et 276). Les autres pics observés sont sans doute seulement des artéfacts.

		62	68	75	80	88	95	124
Nausica	1	A/B						
	2			A/B				
	3			A/B				
	16							
	17							
	18							
	31							
	32							
	33							
Melci	4			A/B				
	5	A/B				A/B		
	6			A/B				
	19							
	20							
	21							
	34							
	35							
	36							
Arancha	7			A/B				
	8			A/B				
	9	A/B				A/B		
	22							
	23							
	24							
	37							
	38							
	39							
Madona	10							
	11							
	12	A/B				A/B		
	25							
	26							
	27							
	40		A/B			A/B	A/B	
	41							
	42							
Vivace	13	A/B				A/B		A/B
	14	A/B				A/B		A/B
	15	A/B				A/B		A/B
	28							
	29							
	30							
	43							
	44	A/B	A/B		A/B	A/B	A/B	
	45							

Tableau 8 : Résultats Ecotilling obtenus après hybridation des 45 individus sur eux-mêmes pour le gène CiFr05. L'analyse Ecotilling pour le gène CiFr05 a permis d'observer plusieurs pics. Néanmoins, aucun de ceux-ci ne semblent se démarquer et tous restent suspects.

		40	42	48	68	105	117
Nausica	1						
	2						
	3						
	16						
	17						
	18				A/B	A/B	
	31						
	32				A/B	A/B	
	33				A/B	A/B	
Melci	4		A/B		A/B		
	5						
	6						
	19				A/B	A/B	
	20				A/B	A/B	
	21				A/B	A/B	
	34						
	35				A/B	A/B	
	36				A/B	A/B	
Arancha	7		A/B		A/B	A/B	
	8		A/B		A/B	A/B	
	9						
	22				A/B	A/B	
	23				A/B	A/B	
	24				A/B	A/B	
	37				A/B	A/B	
	38				A/B	A/B	
	39				A/B	A/B	
Madona	10		A/B		A/B	A/B	
	11		A/B	A/B	A/B	A/B	
	12	A/B	A/B				A/B
	25				A/B	A/B	
	26				A/B	A/B	
	27				A/B	A/B	
	40				A/B	A/B	
	41						
	42				A/B	A/B	
Vivace	13						
	14		A/B		A/B	A/B	
	15		A/B		A/B	A/B	
	28				A/B	A/B	
	29				A/B	A/B	
	30				A/B	A/B	
	43				A/B	A/B	
	44					A/B	
	45				A/B	A/B	

Tableau 9 : Résultats Ecotilling obtenus après hybridation des 45 individus sur eux-mêmes pour le gène 1-FEH I (= Eco12). Comme pour le gène CiFr05, l'analyse Ecotilling de Eco12 ne permet pas d'affirmer la présence d'un SNP particulier : soit la fréquence de représentation des pics est trop grande soit elle est trop faible pour pouvoir constituer une mutation ponctuelle.

7. Hybridation sur référence et détermination du polymorphisme entre les homozygotes

L'hybridation sur eux-mêmes des individus homozygotes nous a, on l'a vu, permis de mettre en évidence plusieurs mutations ponctuelles chez les gènes Eco5 et CiFr3-8-12. Néanmoins, nous disposions également de toute une série d'individus homozygotes devant sans aucun doute présenter des divergences de séquence entre eux. Pour détecter les différences entre ces individus, chacun de ces homozygotes a été hybridé contre une référence homozygote. Cette référence a été choisie aléatoirement parmi les différents homozygotes ayant été identifiés lors des précédents tests pour chacun des gènes et amplifiée en grande quantité. Après digestion par Endo I, les produits de digestion ont également été purifiés par la méthode au glycogène.

Les résultats de ces hybridations ont confirmé ceux déjà obtenus lors de l'hybridation des individus sur eux-mêmes et ont permis de mettre en lumière les SNPs pour les deux gènes (voir [tableaux 10 et 11](#)) : certains pics de petite taille n'étaient plus présents, ce qui indique que ceux-ci étaient bien des artéfacts. Il est probable que ces pics parasites en début de sortie aient été induits par des produits d'amplification inachevés. Pour le gène Eco5, on a donc pu affirmer la présence de deux SNPs situés à 222 et 303 pb. Chez son gène homologue CiFr03, un seul pic situé à 277 pb a été retrouvé lors de l'hybridation contre référence.

		62	85	222	303
Nusica	2			B	A
	3			A	A
	17			B	A
	18			A	A
	32			B	A
Midi	5			B	A
	6			B	A
	36			B	A
Aantha	23			B	A
	39			A	A
Madra	26			B	A
	40			A	AB
	41			A	A
	42			A	AB
Vlace	29			B	A
	30			B	A

Tableau 10 : Résultats de l'hybridation de chacun des homozygotes ECO5 contre une référence homozygote choisie pour le gène candidat ECO5. La référence choisie pour le gène Eco5 est l'individu 18, un des homozygotes ayant été identifié lors de l'hybridation sur eux-mêmes des différents ADN génomiques. Cette référence a été hybridée contre elle-même à titre de contrôle et contre l'ensemble des autres homozygotes pour ce même gène (dont les individus présentant des pics suspects). Ce test a permis de confirmer que les seuls SNPs véritables parmi ceux détectés précédemment étaient ceux situés à 222 et 303 pb.

		277
Nausica	16	A
	17	A
	18	B
	31	B
	32	B
	33	B
Melci	4	A
	5	A
	6	A
	19	A
	20	A
	21	A
	34	A
	36	A
Arancha	23	A
	37	A
	39	A

		277
Madona	11	A
	12	A
	26	A
	41	B
Vivace	13	A
	14	A
	28	A
	29	A
	30	A
	43	A
	44	A
	45	A

Tableau 11 : Résultats de l'hybridation de chacun des homozygotes CiFr03 contre une référence homozygote choisie pour ce même gène candidat. De la même façon, une référence (l'individu 11) a été sélectionnée pour le gène CiFr03. Ici aussi un contrôle et une hybridation contre chacun des homozygotes a été réalisé. Le seul SNP véritable parmi ceux détectés précédemment semble être celui situé à 277 pb.

8. Résumé et analyse des résultats obtenus en Ecotilling

La mise en commun des résultats obtenus par l'hybridation sur eux-mêmes et par l'hybridation contre référence permet d'adresser un profil allélique final à la plupart des individus pour les deux gènes d'intérêt (voir [tableaux 12 et 13](#)). On peut ainsi distinguer les individus hétérozygotes (A/B) des individus homozygotes (A ou B) pour chaque locus. Les individus pour lesquels aucun profil n'est donné sont ceux pour lesquels aucun résultat n'a été obtenu lors de l'analyse. A priori, aucun profil ne semble être associé à une variété particulière, la plupart des profils étant présents plusieurs fois chez différents variétés.

8.1. Analyse des fréquences alléliques trouvées

- Dans le cas d'Eco5 :

Les résultats obtenus pour Eco5 ont permis de mettre en évidence trois allèles différents possibles :

Allèle	222	300
Allèle 1	A	A
Allèle 2	A	B
Allèle 3	B	A

Tableau 14 : Présentation des deux bases possibles pour chacune des positions.

L'allèle B B n'a pas été observée lors de notre étude, aucun des individus testés ne présentant un des trois profils pouvant être généré par sa combinaison avec les autres allèles (A/B A/B, A/B BB et BB A/B). Ceci pourrait être expliqué par une raison évolutive : les combinaisons A B et B A pourraient avoir évolué à partir de la combinaison A A, plus ancienne, par une simple mutation ponctuelle au niveau de l'un des deux positions de SNPs. Ceci expliquerait pourquoi la combinaison B B n'est pas représentée ici : pour l'obtenir, il aurait fallu que l'une des combinaisons A B ou B A ait subi une deuxième mutation sur l'autre position de SNP ou qu'un crossing-over survienne entre les deux sites distants seulement de 78 pb.

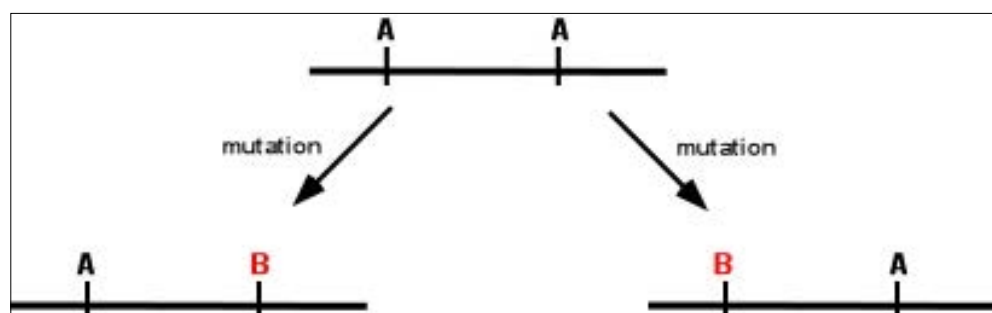


Figure 17 : **Hypothèse du schéma évolutif concernant l'apparition des différents allèles.**

La diploïdie de la chicorée permet d'obtenir au total six combinaisons. Six profils sont donc possibles pour Eco5:

Profil	Combinaison allélique	Représentation
Profil 1	AA AA	
Profil 2	AA A/B	
Profil 3	A/B AA	
Profil 4	A/B B/A	
Profil 5	AA BB	
Profil 6	BB AA	

Tableau 15 : **Présentation des différentes combinaisons alléliques possibles pour le gène Eco5.**

Les deux combinaisons A/B B/A et AA BB (profils 4 et 5) n'ont jamais été observées parmi les 45 individus testés. Pourtant, l'association des chromosomes parentaux étant aléatoire, elles devraient logiquement être observées. Il est possible que l'absence de ces deux profils soit due à un nombre trop faible d'échantillons.

- Dans le cas de CiFr3-8-12:

Pour le gène CiFr03, les deux allèles sont observés au locus 277. Ceci permet d'obtenir, chez des espèces diploïdes telles que la chicorée, trois profils différents AA, BB et A/B. Les trois profils sont observés.

8.2 Comparaison du phénotype et des profils Ecotilling obtenus pour les cinq variétés

Une comparaison des différents profils obtenus pour chacune des variétés et des phénotypes de celles-ci a été réalisée pour les deux gènes :

- Dans le cas du gène Eco5 :

Seuls trois individus parmi les 45 étaient hétérozygotes au niveau du site situé à 300 pb (le reste des individus étaient tous homozygotes à cette position et présentaient tous le même allèle). Ces trois individus correspondaient tous les trois à la dernière date de prélèvement et appartenaient aux deux variétés Madona et Melci. Ces deux variétés ne sont ni caractérisées par une chaîne d'inuline longue ou courte, ni par une sensibilité particulière au froid.

		277
Nausica	1	A/B
	2	homozygote
	3	A/B
	16	A
	17	A
	18	B
	31	B
	32	B
	33	B
Melci	4	A
	5	A
	6	A
	19	A
	20	A
	21	A
	34	A
	35	A/B
Arancha	36	A
	7	A/B
	8	homozygote
	9	homozygote
	22	A/B
	23	A
	24	A/B
	37	A
	38	A/B
	39	A

		277
Madona	10	A
	11	A
	12	A
	25	A/B
	26	A
	27	A/B
	40	A/B
	41	B
	42	A/B
Vivace	13	A
	14	A
	15	homozygote
	28	A
	29	A
	30	A
	43	A
	44	A
	45	A

Tableau 12 : Synthèse des profils observés avec l'approche Ecotilling pour le gène candidat CiFr03 pour chaque individu. Les cases "homozygotes" indiquent que l'individu est homozygote pour ce SNP, mais que l'allèle en présence n'a pas pu être analysé.

		222	300
Nausica	1	AB	homozygote
	2	B	A
	3	A	A
	16	AB	homozygote
	17	B	A
	18	A	A
	31		
	32	B	A
	33		
Midi	4	AB	homozygote
	5	B	A
	6	B	A
	19	AB	homozygote
	20	AB	homozygote
	21	AB	homozygote
	34		
	35	homozygote	AB
	36	B	A
Arancha	7	AB	homozygote
	8	AB	homozygote
	9		
	22	AB	homozygote
	23	B	A
	24		
	37	AB	homozygote
	38	AB	homozygote
	39	B	A

		222	300
Madona	10		
	11		
	12	AB	homozygote
	25	AB	homozygote
	26	B	A
	27		
	40	A	AB
	41	A	A
	42	A	AB
Vivace	13	AB	homozygote
	14		
	15		
	28	AB	homozygote
	29	B	A
	30	B	A
	43	AB	homozygote
	44		
	45		

présentant le plus grand nombre plus sensible au choc au froid

et Vivace) présentent presque situé à 277 pb. Néanmoins, cette atypique que les autres formes

Tableau 13 : Synthèse des profils observés avec l'approche Ecotilling pour le gène candidat Eco5 pour chaque individu. Les individus marqués de jaune pâle sont ceux n'ayant pas fourni de résultats.

Les quelques corrélations établies ici doivent évidemment être replacées dans leur contexte et prises avec la plus grande précaution. La mise en évidence d'une association entre un marqueur moléculaire et un phénotype peut être réalisée soit par une étude en génétique d'association soit encore via une étude par QTL. Typiquement, en génétique d'association, un grand nombre de génotypes caractérisés au niveau du phénotype recherché sont analysés par comparaison statistique des différents allèles observés. Le terme de génétique d'associations regroupe généralement plusieurs approches : La première utilise les gènes candidats et consiste en une recherche d'associations entre le polymorphisme révélé dans le gène candidat et le phénotype. Une seconde approche est basée sur un balisage entier du génome sans ciblage vers un locus particulier et tire avantage du déséquilibre de liaison. Celui-ci est responsable d'associations entre plusieurs polymorphismes, définissant ainsi des haplotypes (David, 2006). Les termes d'approches gènes candidats et de "génétique d'association" sont généralement confondus en raison de leur approches identiques. La distinction est purement historique : Anciennement, l'approche gènes candidats était réalisée par des expériences de knock out ou d'expression de gènes rapporteurs. C'est cette ancienne approche fait la distinction des deux termes. A l'heure actuelle, seuls les gènes candidats positionnels et fonctionnels sont utilisés Lors d'une étude par QTL, un croisement entre deux individus parentaux est réalisé. Des études statistiques sont ensuite réalisées sur la descendance obtenue. Dans cette approche, la variabilité allélique obtenue est limitée par les génotypes parentaux. Ici, c'est une approche gènes candidats dans le cadre d'une étude en génétique d'association qui a été utilisée.

L'établissement d'un lien entre des marqueurs moléculaires et un trait phénotypique est ici irréalisable dans le cadre d'un mémoire : Le nombre d'individus par variété et d'haplotypes révélés lors de cette étude sont largement insuffisants pour pouvoir établir une analyse statistique significative entre les phénotypes et les génotypes. Certaines recherches ont ainsi estimé qu'une étude statistique d'association nécessitait un échantillonnage de minimum 500 individus pour établir un lien causal valable (Long, 2006). De plus, un nombre inférieur d'individus diminuerait considérablement la reproductibilité des résultats. Des conclusions basées sur des résultats issus de neuf individus par variété et de trois marqueurs SNP seraient donc plus que hâtives.

8.3. Liaison des gènes CiFr03 et Eco5

Comme nous l'avons vu lors de la définition de la notion d'haplotype (page 10 de l'introduction), un déséquilibre de liaison entre plusieurs loci de gènes impliqués dans une même voie métabolique peut être observée. Dans ce cas, la connaissance de l'allèle à un locus d'un des deux gènes entraîne presque automatiquement la connaissance de la forme allélique présente pour l'autre gène. Ceci avait été observé au laboratoire dans le cas de la 1-FFT et de la 1-SST, pour lesquelles une corrélation pouvait être identifiée dans 98% des cas.

Les profils obtenus pour chacun des individus pour les deux gènes candidats Eco5 et CiFr03 ont été comparés visuellement (voir [tableau 16](#)). Aucune corrélation entre les allèles obtenus pour chacune des positions n'a pu être établie. Un plus grand nombre d'échantillons et un plus grand nombre d'allèles auraient permis un test statistique, sans doute plus informatif que l'observation ici réalisée.

		222	300	277
Nausica	1	AB	homozygote	AB
	2	B	A	homozygote
	3	A	A	AB
	16	AB	homozygote	A
	17	B	A	A
	18	A	A	B
	31			B
	32	B	A	B
	33			B
Méli	4	AB	homozygote	A
	5	B	A	A
	6	B	A	A
	19	AB	homozygote	A
	20	AB	homozygote	A
	21	AB	homozygote	A
	34			A
	35	homozygote	AB	AB
	36	B	A	A
Aandra	7	AB	homozygote	AB
	8	AB	homozygote	homozygote
	9			homozygote
	22	AB	homozygote	AB
	23	B	A	A
	24			AB
	37	AB	homozygote	A
	38	AB	homozygote	AB
	39	B	A	A
Madra	10			A
	11			A
	12	AB	homozygote	A
	25	AB	homozygote	AB
	26	B	A	A
	27			AB
	40	A	AB	AB
	41	A	A	B
	42	A	AB	AB
Vivace	13	AB	homozygote	A
	14			A
	15			homozygote
	28	AB	homozygote	A
	29	B	A	A
	30	B	A	A
	43	AB	homozygote	A
	44			A
	45			A

Tableau 16 : Comparaison des allèles obtenus en Ecotilling pour les gènes candidats Eco5 et CiFr03.

9. Comparaison des résultats obtenus par SSCP et par Ecotilling

Les deux techniques (SSCP et Ecotilling) révèlent du polymorphisme chacune à leur niveau. Comme cela a été traité auparavant, la SSCP permet seulement de mettre en évidence des différences de séquences entre individus. Elle ne donne cependant aucune information quant au positionnement de cette divergence. L'Ecotilling permet, lui, de répondre à cette question.

Dans notre étude, le nombre de profils observés en SSCP pour un même gène candidat n'excède jamais deux. Pour cette raison, nous appellerons ces deux profils : profil SSCP 1 et profil SSCP 2. Les résultats obtenus en SSCP pour les deux gènes candidats ont été comparés avec ceux obtenus en Ecotilling. Un tableau illustrant cette comparaison est présentée dans les tableaux 17 et 18.

- Pour le gène *Eco5* :

Les 45 ADNs génomiques ont été testés en SSCP, ce qui a permis d'associer un profil SSCP à la plupart des individus (l'absence de profil SSCP pour certains est lié à un problème d'amplification). On peut voir clairement un lien entre les résultats obtenus pour les deux techniques : l'ensemble des individus présentant le profil 1 en SSCP semble posséder la combinaison allélique BB AA. Cependant, il est intéressant de noter que d'autres individus présentant le même allèle (BB AA) en Ecotilling présente le profil 2 en SSCP. Les autres combinaisons correspondent toutes sans distinction au profil SSCP 2, ce qui confirme le manque de sensibilité de la technique SSCP (tableau 17).

	222	300	SSCP
16	A/B	homozygote	/
17	B	A	/
23	B	A	Profil 1
5	B	A	Profil 1
6	B	A	Profil 1
36	B	A	Profil 1
26	B	A	Profil 1
34			Profil 1
29	B	A	Profil 1
11			Profil 1
2	B	A	Profil 1
30	B	A	Profil 1
12	A/B	homozygote	Profil 2
40	A	A/B	Profil 2
39	B	A	Profil 2
25	A/B	homozygote	Profil 2
10			Profil 2
27			Profil 2
45			Profil 2
28	A/B	homozygote	Profil 2
15			Profil 2
44			Profil 2
43	A/B	homozygote	Profil 2
42	A	A/B	Profil 2
41	A	A	Profil 2

	222	300	SSCP
14			Profil 2
13	A/B	homozygote	Profil 2
4	A/B	homozygote	Profil 2
33			Profil 2
20	A/B	homozygote	Profil 2
19	A/B	homozygote	Profil 2
32	B	homozygote	Profil 2
3	A	A	Profil 2
1	A/B	homozygote	Profil 2
31			Profil 2
18	A	A	Profil 2
24			Profil 2
22	A/B	homozygote	Profil 2
38	A/B	homozygote	Profil 2
37	A/B	homozygote	Profil 2
9			Profil 2
35	homozygote	A/B	Profil 2
21	A/B	homozygote	Profil 2
8	A/B	homozygote	Profil 2
7	A/B	homozygote	Profil 2

Tableau 17 : Comparaison des résultats obtenus en SSCP et en Ecotilling pour le gène *Eco5*.



Profil SSCP 1
Profil Ecotiling
associé :
 B A



Profil SSCP 2
Profil Ecotiling
associé : A B, B A,
 A A, A/B -, - A/B

Figure 18 : Représentation des deux profils SSCP observés dans le cas du gène candidat Eco5.

	277	SSCP
22	A/B	/
9	homozygote	/
27	A/B	/
37	A	/
24	A/B	/
23	A	/
26	A	/
25	A/B	/
42	A/B	/
41	B	/
40	A/B	/
30	A	/
29	A	/
13	A	/
45	A	/
44	A	/
43	A	/
39	A	/
38	A/B	/
28	A	/
15	homozygote	/
21	A	/
33	B	/
32	B	/
20	A	/

	277	SSCP
19	A	/
17	A	/
16	A	/
31	B	/
18	B	/
10	A	/
36	A	/
35	A/B	/
14	A	/
12	A	/
11	A	/
34	A	/
2	homozygote	Profil 1
1	A/B	Profil 1
4	A	Profil 1
6	A	Profil 1
7	A/B	Profil 2
5	A	Profil 2
3	A/B	Profil 2
8	homozygote	Profil 2

Tableau 18 : Comparaison des résultats obtenus en SSCP et en Ecotiling pour le gène Cifr03.

Pour le gène CiFr03 :

Seuls 23 ADN génomiques ont été testés en SSCP (les 8 premiers de la première date de prélèvement et les 15 de la deuxième date de prélèvement). Parmi ceux-ci, la plupart ont donné des résultats de mauvaise qualité, ce qui a beaucoup réduit le nombre de profils pouvant être comparés. Au final, seuls les 8 premiers ADNs fournissaient des résultats corrects. Ce nombre réduit de résultats SSCP ne permet pas de faire une corrélation significative avec ceux obtenus en Ecotilling (tableau 18).

Il faut noter que la comparaison des deux techniques pose encore souvent problème. De nombreux cas ont révélé que l'observation de polymorphisme à l'aide de l'une des deux techniques n'assurait pas automatiquement l'observation de polymorphisme par l'autre méthode. Ainsi, la SSCP peut produire des faux positifs. A l'inverse, il est possible que la SSCP ne révèle pas de polymorphisme alors que l'Ecotilling montre clairement une différence entre les individus. Ces observations remettent en partie en question les résultats obtenus lors du choix des gènes candidats à tester par Ecotilling.

Le séquençage d'amplicons représentant l'ensemble des profils observés par Ecotilling aurait dû être réalisé de manière à confirmer les résultats obtenus lors de cette étude. Par un concours de circonstances, aucun résultat de séquençage n'a pu être obtenu pour être intégré à ce mémoire. Ces analyses sont toujours en cours au laboratoire.

Discussion générale

Discussion générale

Nous avons expliqué dans l'introduction que la longueur des chaînes d'inuline produites par une variété de chicorée dépendait de deux facteurs : la taille des chaînes initialement produites par cette variété et sa sensibilité au choc au froid. Cette sensibilité se traduit par une dépolymérisation des chaînes due à l'activation de certaines enzymes de dégradation, les 1-FEHs (1-fructane exohydrolases). Ce mémoire s'inscrit dans le cadre du projet Phytomol (2003-2007), s'intéressant à la génomique et à la protéomique de la chicorée.

L'objectif était ici de mettre en évidence de la diversité allélique au sein de gènes candidats impliqués dans la voie de dégradation de l'inuline chez la chicorée *Cichorium intybus*. Afin de mettre en évidence cette diversité, une approche en deux volets impliquant deux méthodes de détection des marqueurs SNP, la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) et l'Ecotilling, a été réalisée. La SSCP, technique relativement peu coûteuse, a été ici utilisée comme méthode de criblage préalable à une étude plus poussée du polymorphisme en Ecotilling.

L'analyse a été réalisée sur dix gènes candidats correspondant à des gènes de fructane exohydrolases, d'invertases et de sucrose synthases. Une petite partie de ces gènes est issue des banques de données, d'autres de banques EST ou d'études antérieures en RT-PCR. Ces dernières ont été obtenues précédemment en utilisant des amorces définies à partir des domaines conservés à travers la famille des fructosyltransférases, donnant ainsi lieu à une série de séquences partielles pour lesquelles des amorces spécifiques ont été définies.

Dans un premiers temps, les produits d'amplification obtenus grâce à chacune de ces paires d'amorces spécifiques ont été analysés par SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). Cette technique, choisie pour sa simplicité de réalisation et son faible coût, nous a permis de réaliser un premier criblage du polymorphisme. Les résultats obtenus en SSCP ont permis de distinguer du polymorphisme chez cinq gènes candidats (Cifr03, CiFR05, Eco5, Susy7 et Eco12). Cependant, l'importance du bruit de fond et le manque de sensibilité de la technique SSCP remettent partiellement en cause les résultats obtenus. En effet, certains articles accusent cette méthode de ne pas toujours mettre en évidence tout le polymorphisme et de donner lieu à des faux positifs et des faux négatifs (pouvant constituer jusqu'à 20% des résultats). Le problème du bruit de fond est apparemment lié aux conditions de migration et/ou à la composition du gel interférant avec la coloration à l'argent. Ce problème pourrait éventuellement être résolu en utilisant d'autres méthodes de mise en évidence de l'ADN, telles que des sondes fluorescentes, du bromure d'éthidium et des agents intercalants comme le Sybr Gold, ou en changeant les conditions de migration. Pour s'assurer de la cohérence du choix des gènes candidats à analyser en Ecotilling, une autre technique, plus sensible, comme la DHPLC, pourrait être utilisée.

Les produits d'amplification de quatre gènes candidats ayant montré des profils polymorphes en SSCP ont ensuite été analysés par Ecotilling, technique plus sensible. De manière à choisir les températures de PCR fournissant les meilleures sorties sur séquenceur, un gradient de température a été réalisé. Une fois la température sélectionnée pour chacun des quatre gènes, les amplicons obtenus ont été testés en Ecotilling. Les résultats n'ont mis en évidence aucun polymorphisme, ce qui nous a poussé à changer la température d'amplification. Les résultats pour cette nouvelle température ne fournissant pas beaucoup plus d'informations que pour la première et dans un souci de concordance avec les résultats obtenus par SSCP, les amplifications ont été recommencées à 55°C. Suite à la digestion par Endo I, les produits ont été purifiés de manière à diminuer le bruit de fond. Une analyse de l'ensemble des individus par hybridation sur eux-mêmes a ainsi été réalisée de manière à distinguer les homozygotes des hétérozygotes et à mettre en évidence des premiers polymorphismes. Cette étape a été suivie par une étape d'hybridation de chacun des homozygotes contre une référence afin de distinguer des différences alléliques entre les homozygotes. Les résultats n'ont révélé du polymorphisme que chez deux des quatre gènes (CiFr03 et Eco5). Trois SNPs ont été mis en évidence (respectivement deux et un pour les gènes Eco5 et CiFr03). Ceux-ci se situent généralement vers la fin du fragment amplifié (entre 200 et 300 pb). Il est possible que d'autres SNPs soient présents au début de l'amplicon mais que ceux-ci n'aient pas pu être mis en évidence en raison du bruit de fond causé par les fragments résultant d'amplifications incomplètes.

La technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), utilisée dans le cadre de ce mémoire, a fourni des résultats mitigés. Sur les dix gènes candidats étudiés (des séquences partielles de taille comprise entre 150 et 400 pb), seuls cinq ont montré du polymorphisme. Parmi ces cinq gènes, quatre ont été sélectionnés et ont été analysés par Ecotilling en travaillant dans les mêmes conditions PCR. Seulement deux de ces quatre gènes se sont avérés être effectivement polymorphes:

Le gène Eco5 (Putative Invertase), pour lequel deux SNPs ont été détectés, nous a révélé trois allèles générant six combinaisons alléliques possibles dont seulement quatre ont été effectivement détectées.

Le gène CiFr03 (homologue Putative invertase) n'a révélé qu'un seul SNP pour lequel deux allèles différents ont été observés. Ces deux allèles permettent trois combinaisons alléliques différentes.

En conclusion, bien que nécessitant encore une mise au point de la méthode de criblage SSCP, cette étude de la diversité allélique chez dix gènes candidats impliqués dans la dégradation de l'inuline nous a permis de mettre en évidence une série de mutations ponctuelles à différentes positions. L'analyse réalisée à partir de ces différents marqueurs n'a pas permis de révéler de relations claires entre les phénotypes et les génotypes en raison du nombre limité d'échantillons à disposition. Une perspective serait donc d'optimiser cette approche par une augmentation du nombre de prélèvements.

Perspectives

Perspectives

La SSCP a été décrite comme une technique pouvant générer des faux négatifs (la proportion de ces derniers pouvant atteindre 20 % des résultats). Lors de ce travail, l'utilisation de l'Ecotilling nous a également permis de mettre en évidence des faux positifs (chez les gènes 1-FEH et CiFR05). L'origine des faux positifs peut s'expliquer par l'existence d'amplifications non spécifiques révélées grâce à la sensibilité de la coloration à l'argent. Les faux négatifs peuvent quant à eux être liés aux conditions de migration utilisées, comme par exemple la température.

Une première perspective serait donc de trouver une technique alternative à la SSCP pour la réalisation du criblage des individus. De nombreuses techniques permettant la détection des SNPs ont été décrites. Cependant, pratiquement aucune d'entre elles ne répond aux critères qui étaient recherchés ici : une possibilité de travail à haut débit, sans connaissance préalable de la position du polymorphisme, couplée à une absence d'utilisation d'amorces fluorescentes et de support techniques onéreux. Une technique nouvelle de marquage universel des produits PCR, utilisant une amorce universelle M13 marquée et deux amorces séquence spécifiques non marquées, peut cependant être envisagée pour contourner le problème du coût de la technique, principalement lié au prix des amorces fluorescentes (Schuelke, 2000).

Une deuxième perspective consisterait en une optimisation de la recherche de la diversité allélique. Les gènes n'ayant pas révélé de polymorphisme en SSCP devraient dans un premier temps être réanalysés par Ecotilling. Si nécessaire, une augmentation de la taille des fragments analysés serait à envisager. Ceci impliquerait de définir de nouvelles amorces à partir des banques EST à disposition. Le séquençage de clones au départ de l'extrémité 5', nous permettrait également d'augmenter la longueur de nos séquences et de définir de nouvelles amorces spécifiques de manière à approfondir la recherche du polymorphisme de ces gènes. Un des principaux paramètres limitants à régler résidait également dans le nombre trop faible d'individus testés pour chacune des variétés. En effet, neuf ADN génomiques seulement sont disponibles pour chacune des variétés. L'augmentation du nombre d'échantillons devrait permettre de donner plus de précision aux résultats obtenus. Une étude sur les gènes candidats utilisant 24 ADN génomiques par variété est actuellement en cours au laboratoire.

Enfin, une perspective évidente serait le développement de marqueurs utilisables en sélection. Comme nous l'avons vu, deux approches permettent de mettre en évidence des relations entre le phénotype et le génotype : l'étude en génétique d'association et l'étude par QTL (Quantitative Trait Loci). Une étude par cette dernière approche peut donc être envisagée. Ainsi l'évaluation de l'implication potentielle de certains allèles dans le phénotype pourrait être réalisée par une étude statistique de l'impact des allèles sur les performances de la plante à partir des descendants de croisements.

Bibliographie

BILIOGRAPHIE

- Ahmadian, A., Ehn, M. & Hober, S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta* **363**, 83-94 (2006).
- Alberto, F., Bignon, C., Sulzenbacher, G., Henrissat, B. & Czjzek, M. The three-dimensional structure of invertase (beta-fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *J Biol Chem* **279**, 18903-10 (2004).
- Armstrong, B., Stewart, M. & Mazumder, A. Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping. *Cytometry* **40**, 102-108 (2000).
- Batley, J., Barker, G., O'Sullivan, H., Edwards, K. J. & Edwards, D. Mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in maize expressed sequence tag data. *Plant Physiol* **132**, 84-91 (2003).
- Beier, D. R. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for genetic mapping. *Mamm Genome* **4**, 627-31 (1993).
- Cai, Q. Q. & Touitou, I. Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency. *Nucleic Acids Res* **21**, 3909-10 (1993).
- Caldwell, D. G. et al. A structured mutant population for forward and reverse genetics in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant J* **40**, 143-50 (2004).
- Causse, M. et al. A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *J Exp Bot* **55**, 1671-85 (2004).
- Ching, A. et al. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genet* **3**, 19 (2002).
- Cho, R. J. et al. Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* **23**, 203-7 (1999).
- Colbert, T. et al. High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol* **126**, 480-4 (2001).
- Comai, L. & Henikoff, S. TILLING: practical single-nucleotide mutation discovery. *Plant J* **45**, 684-94 (2006).
- Comai, L. et al. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant J* **37**, 778-86 (2004).
- Conway, G. S. et al. Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* **51**, 97-9 (1999).
- Conway, G. S. et al. Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* **51**, 97-9 (1999).
- Crafts-Brandner, S. J. Fructans and freezing tolerance. *New Phytol* **166**, 708-9 (2005).
- Darwen, C. W. & John, P. Localization of the Enzymes of Fructan Metabolism in Vacuoles Isolated by a Mechanical Method from Tubers of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Plant Physiol* **89**, 658-663 (1989).
- David, J., Loudet, O. & Glaszmann, J. Le regard de la génomique sur la diversité naturelle des plantes cultivées. *Biofutur* **25**, 22-27 (2006).
- De Roover, J., Van Laere, A., De Winter, M., Timmermans, J. W. & Van den Ende, W. Purification and properties of a second fructana exohydrolase from the roots of *Chicorium intybus*. *Physiologia Plantarum* **160**, 28-34 (1999).

- De Roover, J., Van Laere, A. & Van den Ende, W. Effect of defoliation on fructan pattern and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* **106**, 158-163 (1999).
- Dunbar, S. A. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clin Chim Acta* **363**, 71-82 (2006).
- Feng, C. P. & Mundy, J. Gene discovery and functional analyses in the model plant *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology* **48**, 5-14 (2006).
- Fixe, F., Chu, V., Prazeres, D. M. & Conde, J. P. Single base mismatch detection by microsecond voltage pulses. *Biosens Bioelectron* **21**, 888-93 (2005).
- Flavell, A. J. et al. A microarray-based high throughput molecular marker genotyping method: the tagged microarray marker (TAM) approach. *Nucleic Acids Res* **31**, e115 (2003).
- Fridman, E., Pleban, T. & Zamir, D. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4718-23 (2000).
- Gasser, R. B., Hu, M., El-Osta, Y. A., Zarlenga, D. S. & Pozio, E. Genetic analysis of *Trichinella* populations by 'cold' single-strand conformation polymorphism analysis. *Vet Parasitol* **132**, 23-6 (2005).
- Gibson, N. J. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta* **363**, 32-47 (2006).
- Gilchrist, E. J. & Haughn, G. W. TILLING without a plough: a new method with applications for reverse genetics. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 211-5 (2005).
- Gilchrist, E. J. et al. Use of Ecotilling as an efficient SNP discovery tool to survey genetic variation in wild populations of *Populus trichocarpa*. *Mol Ecol* **15**, 1367-78 (2006).
- Halushka, M. K. et al. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet* **22**, 239-47 (1999).
- Henikoff, S., Till, B. J. & Comai, L. TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics. *Plant Physiol* **135**, 630-6 (2004).
- Hisano, H. et al. Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyltransferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing. *Plant Science* **167**, 861-868 (2004).
- Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M. & Igarashi, Y. Direct comparison of single-strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rRNA gene fragments. *J Microbiol Methods* (2005).
- Katsuda, T., Nishijima, K., Kamura, M., Nishiwada, Y. & Katoh, S. Single nucleotide polymorphism detection method by temperature-gradient affinity chromatography using a single-stranded oligo-DNA coupled column. *J Chromatogr A* (2006).
- Kearsey, M. J. & Farquhar, A. G. QTL analysis in plants; where are we now? *Heredity* **80** (Pt 2), 137-42 (1998).
- Klotz, K. L., Finger, F. L. & Shelver, W. L. Characterization of two sucrose synthase isoforms in sugarbeet root. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 107-115 (2003).
- Koch, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 235-46 (2004).
- Kovar, H., Jug, G., Auer, H., Skern, T. & Blaas, D. Two dimensional single-strand conformation polymorphism analysis: a useful tool for the detection of mutations in long DNA fragments. *Nucleic Acids Res* **19**, 3507-10 (1991).
- Lindroos, K., Sigurdsson, S., Johansson, K., Ronnblom, L. & Syvanen, A. C. Multiplex SNP genotyping in pooled DNA samples by a four-colour microarray system. *Nucleic Acids Res* **30**, e70 (2002).

- Livingston, D. P. & Henson, C. A. Apoplastic sugars, frutans, fructans exohydrolases, and invertase in winter oat: response to second-phase cold hardening. *Plant Physiol.* **116**, 403-408 (1998).
- Long, A. D. & Langley, C. H. The power of association studies to detect the contribution of candidate genetic loci to variation in complex traits. *Genome Research* **9**, 720-731 (1999).
- Luhken, G., Stamm, I., Menge, C. & Erhardt, G. Functional analysis of a single nucleotide polymorphism in a potential binding site for GATA transcription factors in the ovine interleukin 2 gene. *Vet Immunol Immunopathol* **107**, 51-6 (2005).
- Luscher, M. et al. Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferases from tubers of *Helianthus tuberosus*. *FEBS Lett* **385**, 39-42 (1996).
- McCallum, C. M., Comai, L., Greene, E. A. & Henikoff, S. Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol* **123**, 439-42 (2000).
- Michiels, A., Van Laere, A., Van den Ende, W. & Tucker, M. Expression analysis of a chicory fructan 1-exohydrolase gene reveals complex regulation by cold. *J Exp Bot* **55**, 1325-33 (2004).
- Mogensen, J. et al. Comparison of fluorescent SSCP and denaturing HPLC analysis with direct sequencing for mutation screening in hypertrophic cardiomyopathy. *J Med Genet* **40**, e59 (2003).
- Mohabeer, A. J., Hiti, A. L. & Martin, W. J. Non-radioactive single strand conformation polymorphism (SSCP) using the Pharmacia 'PhastSystem'. *Nucleic Acids Res* **19**, 3154 (1991).
- Obenland, D. M., Simmen, U., Boller, T. & Wiemken, A. Purification and characterization of three soluble invertases from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Plant Physiol* **101**, 1331-9 (1993).
- Oleykowski, C. A., Bronson Mullins, C. R., Godwin, A. K. & Yeung, A. T. Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Res* **26**, 4597-602 (1998).
- Orti, G., Hare, M. P. & Avise, J. C. Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. *Mol Ecol* **6**, 575-80 (1997).
- Paris, M., Jones, M. G. K. & Eglinton, J. K. Genotyping single nucleotide polymorphisms for selection of barley beta-amylase alleles. *Plant Molecular Biology Reporter* **20**, 149-159 (2002).
- Pelleschi, S. et al. Ivr2, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Gene-specific expression under water stress. *Plant Mol Biol* **39**, 373-80 (1999).
- Pflieger, S., Lefebvre, V. & Causse, M. The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular Breeding* **7**, 275-291 (2001).
- Piggee, C. A., Muth, J., Carrilho, E. & Karger, B. L. Capillary electrophoresis for the detection of known point mutations by single-nucleotide primer extension and laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A* **781**, 367-75 (1997).
- Pons, T. et al. Structural model for family 32 of glycosyl-hydrolase enzymes. *Proteins* **33**, 383-95 (1998).
- Portes, M. T. & Carvalho, M. A. M. Spatial distribution of fructans and fructan metabolizing enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae) in different developmental phases. *Plant Science* **170**, 624-633 (2006).
- Posteraro, P. et al. Denaturing HPLC-based approach for detection of COL7A1 gene mutations causing dystrophic epidermolysis bullosa. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 1391-401 (2005).
- Pressey, R. Invertase Inhibitor from Potatoes: Purification, Characterization, and Reactivity with Plant Invertases. *Plant Physiol* **42**, 1780-1786 (1967).

- Pressey, R. & Shaw, R. Effect of Temperature on Invertase, Invertase Inhibitor, and Sugars in Potato Tubers. *Plant Physiol* **41**, 1657-1661 (1966).
- Prioul, J. L. et al. From QTLs for enzyme activity to candidate genes in maize. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1281-1288 (1999).
- Purushothaman, S., Toumazou, C. & Ou, C. P. Protons and single nucleotide polymorphism detection: A simple use for the ion sensitive field effect transistor. *Sensors and Actuators B-Chemical* **114**, 964-968 (2006).
- Quaranta, S. et al. Identification by single-strand conformational polymorphism analysis of known and new mutations of the CYP3A5 gene in a French population. *Toxicol Lett* **164**, 177-184 (2006).
- Rafalski, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 94-100 (2002).
- Rausch, T. & Greiner, S. Plant protein inhibitors of invertases. *Biochim Biophys Acta* **1696**, 253-61 (2004).
- Ritsema, T. & Smeekens, S. Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 223-30 (2003).
- Rungis, D. et al. Efficient genetic mapping of single nucleotide polymorphisms based upon DNA mismatch digestion. *Molecular Breeding* **16**, 261-270 (2005).
- Russom, A., Tooke, N., Andersson, H. & Stemme, G. Single nucleotide polymorphism analysis by allele-specific primer extension with real-time bioluminescence detection in a microfluidic device. *J Chromatogr A* **1014**, 37-45 (2003).
- Sauer, S. Typing of single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry: principles and diagnostic applications. *Clin Chim Acta* **363**, 95-105 (2006).
- Sauer, S. et al. Facile method for automated genotyping of single nucleotide polymorphisms by mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* **30**, e22 (2002).
- Savitch, L. V., Harney, T. & Huner, N. P. A. Sucrose metabolism in spring and winter wheat in response to high irradiance, cold stress and cold acclimation. *Physiologia Plantarum* **108**, 270-278 (2000).
- Schneider, K., Schafer-Pregl, R., Borchardt, C. & Salamini, F. Mapping QTLs for sucrose content, yield and quality in a sugar beet population fingerprinted by EST-related markers. *Theor Appl Genet* **104**, 1107-1113 (2002).
- Schneider, K., Weisshaar, B., Borchardt, D. C. & Salamini, F. SNP frequency and allelic haplotype structure of Beta vulgaris expressed genes. *Molecular Breeding* **8**, 63-74 (2001).
- Schuelke, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* **18**, 233-4 (2000).
- Shigemura, K. et al. Rapid detection of gyrA and parC mutations in fluoroquinolone-resistant Neisseria gonorrhoeae by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Microbiol Methods* **59**, 415-21 (2004).
- Spinardi, L., Mazars, R. & Theillet, C. Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res* **19**, 4009 (1991).
- Sunnucks, P. et al. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol* **9**, 1699-710 (2000).
- Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Schmidheini, T. & Bodmer, T. Direct, automated detection of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 2054-8 (1993).
- Till, B. J., Burtner, C., Comai, L. & Henikoff, S. Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. *Nucleic Acids Res* **32**, 2632-41 (2004).

- Till, B. J. et al. Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res* **13**, 524-30 (2003).
- Till, B. J. et al. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biol* **4**, 12 (2004).
- Underhill, P. A. et al. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res* **7**, 996-1005 (1997).
- Van den Ende, W. Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant J* **25**, 803-813 (2002).
- Van den Ende, W., De Coninck, B. & Van Laere, A. Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? *Trends Plant Sci* **9**, 523-8 (2004).
- Van den Ende, W., Michiels, A., Le Roy, K. & Van Laere, A. Cloning of a vacuolar invertase from Belgian endive leaves (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* **115**, 504-512 (2002).
- Van den Ende, W. et al. Defoliation induces Fructan 1-Exohydrolase II in Witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms, Fructan 1-Exohydrolase IIa and Fructan 1-Exohydrolase IIb. Mass fingerprint of the fructan 1-exohydrolase II enzymes. *Plant physiology* **126**, 1186-1195 (2001).
- Van den Ende, W., Michiels, A., Van Wouterghem, D., Vergauwen, R. & Van Laere, A. Cloning, developmental, and tissue-specific expression of sucrose:sucrose 1-fructosyl transferase from *Taraxacum officinale*. Fructan localization in roots. *Plant Physiol* **123**, 71-80 (2000).
- Van den Ende, W., Mintiens, a., Speleers, H., Onuoha, A. A. & Van Laere, A. The metabolism of fructans in roots of *Cichorium intybus* during growth, storage and forcing. *New Phytol* **132**, 555-563 (1996).
- Vereyken, I. J., Chupin, V., Demel, R. A., Smeekens, S. C. & De Kruijff, B. Fructans insert between the headgroups of phospholipids. *Biochim Biophys Acta* **1510**, 307-20 (2001).
- Vergauwen, R., Van Laere, A. & Van den Ende, W. Properties of fructan:fructan 1-fructosyltransferases from chicory and globe thistle, two Asteracean plants storing greatly different types of inulin. *Plant Physiol* **133**, 391-401 (2003).
- Verhaest, M. et al. X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*. *Plant J* **41**, 400-11 (2005).
- Vijn, I. & Smeekens, S. Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol* **120**, 351-60 (1999).
- Vijn, I. et al. Cloning of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from onion and synthesis of structurally defined fructan molecules from sucrose. *Plant Physiol* **117**, 1507-13 (1998).
- Zhou, G. et al. Quantitative detection of single nucleotide polymorphisms for a pooled sample by a bioluminometric assay coupled with modified primer extension reactions (BAMPER). *Nucleic Acids Res* **29**, E93 (2001).

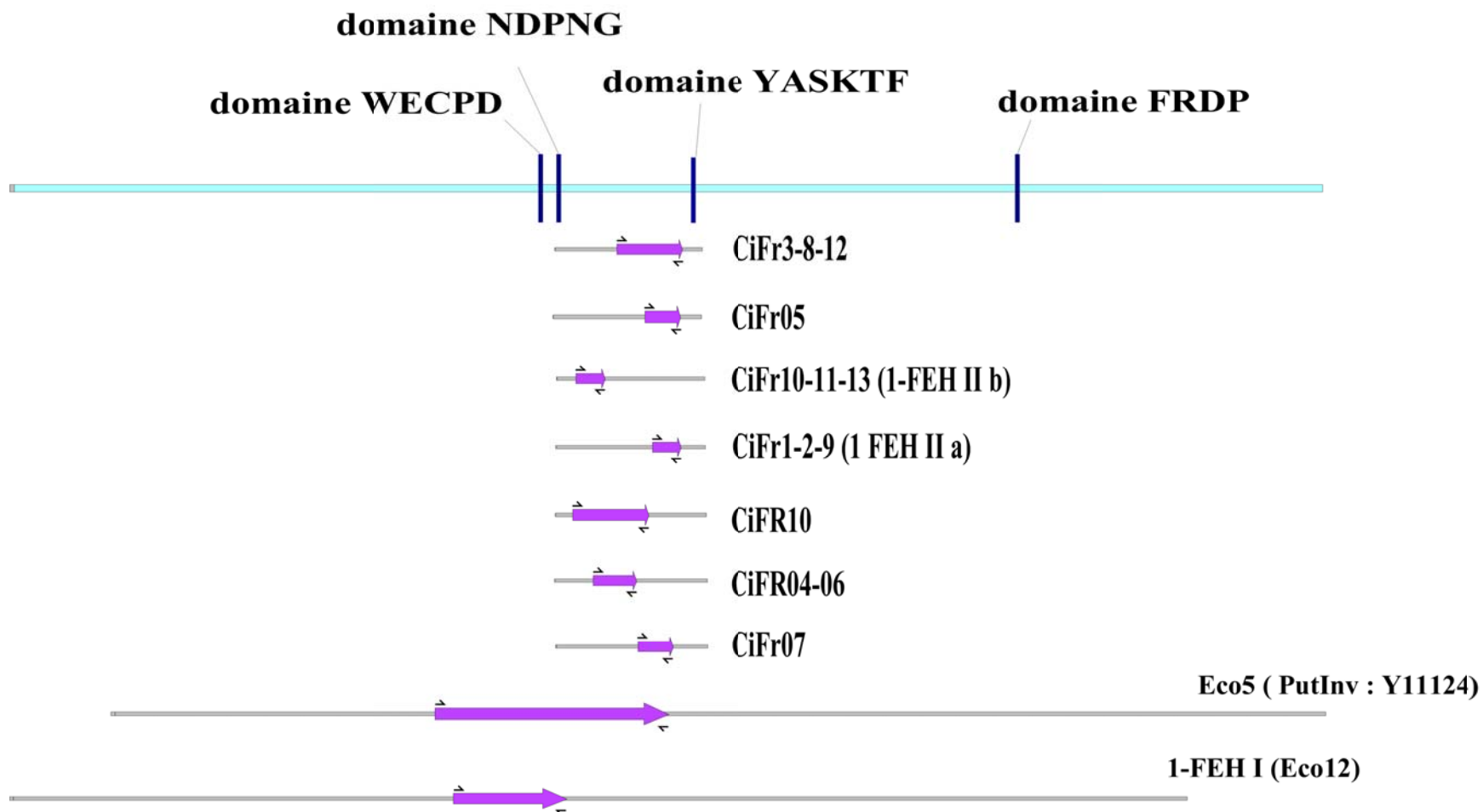


Figure 3 : Représentation de la méthode utilisée pour l'obtention des séquences partielles à partir desquelles ont été déterminées les amorces spécifiques.

Les amorces spécifiques à chacun des gènes candidats ont été définies à partir de séquences partielles. Ces mêmes séquences ont obtenues en utilisant des amorces complémentaires de domaines conservés à travers la famille des fructosyltransférases. Les deux amorces choisies pour amplifier les séquences partielles correspondent ici aux domaines WECPD et YASKTF. Les amorces spécifiques à chaque gène candidat sont indiquées en vert.