

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

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

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

AFLPs 1

Sommaire

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

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

AFLPs 2

La technologie AFLP*, étape par étape

Principales caractéristiques:

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

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

AFLPs 3

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

Reference

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

Quatre étapes

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

Digestion de l'ADN et ligation

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

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

AFLPs 5

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

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

PCR et détection

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

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

AFLPs 6

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

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

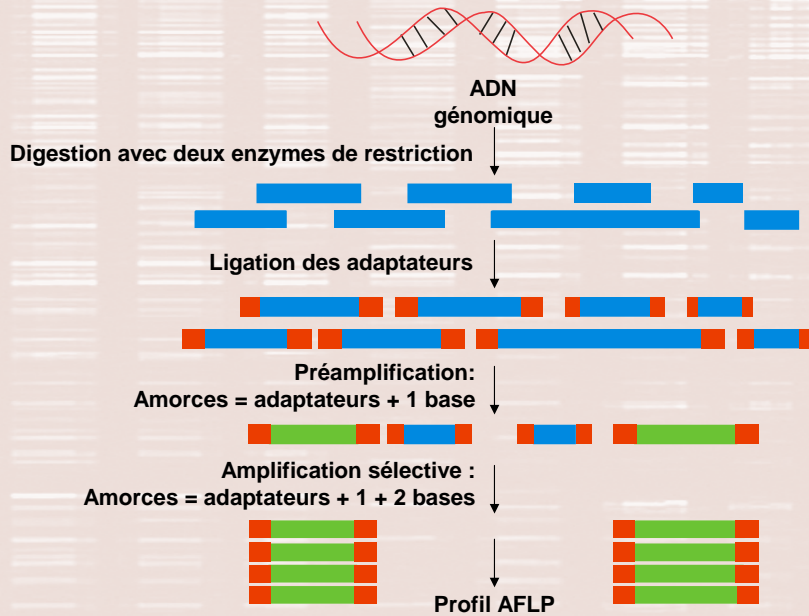
Le sous-ensemble de fragments est analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant pour générer une empreinte génétique et les bandes ADN peuvent être détectées selon différentes méthodes.

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

Reference

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

Résumé de la technologie*



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

AFLPs 7

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

Equipement

▶ Ressources:

- Eau distillée et/ou désionisée
- Réactifs

▶ Equipement:

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

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

AFLPs 8

Interprétation des bandes AFLP

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

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

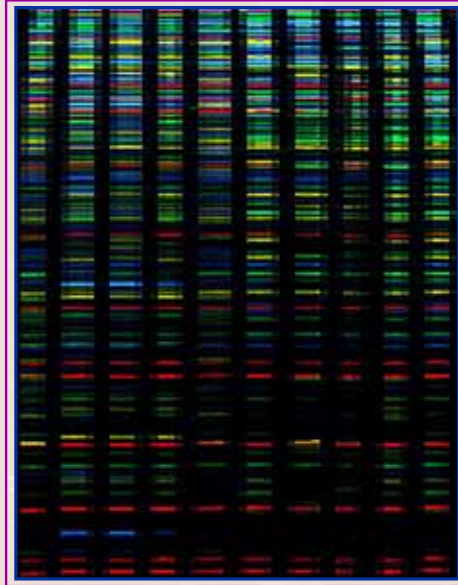
Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 9

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

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

Un profil AFLP avec marqueurs fluorescents

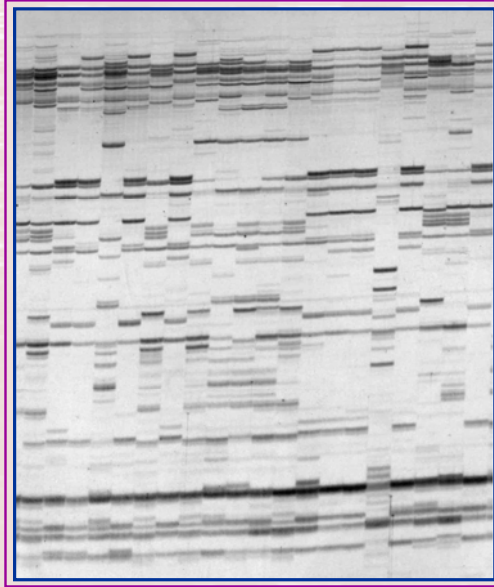


Copyright: IPGRI and Cornell University, 2003
Traduction française: Cirad & SupAgro, 2006

AFLPs 10

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

AFLP détectés par coloration à l'argent



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

AFLPs 11

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

Avantages des AFLP

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

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

AFLPs 12

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

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

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

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

Inconvénients des AFLP

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

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

AFLPs 13

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

Applications

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

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

AFLPs 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Exemple: *Limonium* sp.

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

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

AFLPs 15

(suite diapositive suivante)

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

Exemple: *Limonium* sp. (suite)

▶ **Résultats:**

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

▶ **Discussion:**

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

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

AFLPs 16

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

Exemple: *Stylosanthes* spp.

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

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

AFLPs 17

(suite diapositive suivante)

Exemple: *Stylosanthes* spp. (suite)

Résultats:

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

(suite diapositive suivante)

Exemple: *Stylosanthes* spp. (suite)

▶ Discussion:

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

▶ Conclusions:

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

Exemple: moutarde brune

- ▶ **Titre:**
AFLP-based genetic diversity assessment amongst agronomically important natural and some newly synthesized lines of *Brassica juncea*. Theor. Appl. Genet. 2001. 102: 193-199
- ▶ **Objectifs:**
 - Etudier la variation génétique parmi des accessions de *B. juncea*
 - Identifier des combinaisons d' amorces AFLP informatives pour l'identification variétale
 - Chercher des marqueurs polymorphes pour le ciblage de caractères agronomiques dans la diversité étudiée
- ▶ **Matériel et méthodes:**
L'étude utilise 30 accessions de *B. juncea*, représentant 21 populations naturelles établies et 9 variétés synthétiques et lignées. L'amplification sélective a été réalisée avec 21 combinaisons d'amorces EcoRI/MseI

(suite diapositive suivante)

Exemple: moutarde brune (suite)

Résultats:

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

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

AFLPs 21

(continued on next slide)

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

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

Exemple: moutarde brune (suite)

► Discussion et conclusions:

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

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

AFLPs 22

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

En résumé:

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

A ce stade vous devez savoir:

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

Références de base

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

Suite

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

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

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

AFLPs 26