



**ÉTUDE DE LA RECOMBIANISON GÉNÉTIQUE CHEZ
*ARABIDOPSIS THALIANA***

Abdourahamane H. Alou¹, Martine Jean², François Belzile²,

1. Université Boubacar Bâ, Tillabery, Niger 2. Université Laval, Québec, Canada
Corresponding author (1) abdoual@gmail.com, Université Tillabery BP 175.

RÉSUMÉ

La recombinaison génétique est un mécanisme déterminant dans l'évolution des espèces. Elle consiste en l'échange d'information génétique entre chromosomes homologues ou parfois homéologues. Dans ce dernier contexte, une réduction de la fréquence de recombinaison est souvent observée et il est postulé que des gènes du système MMR seraient impliqués dans un tel phénomène. En vue de vérifier cette hypothèse et en l'absence d'espèces sauvages apparentées compatibles, nous avons cherché à mesurer les effets de l'homéologie sur la fréquence de recombinaison au niveau intra-spécifique chez *Arabidopsis thaliana*. Dans cette étude, nous avons comparé la recombinaison génétique entre les écotypes Niederzenz et Landsberg *erecta*, deux écotypes supposés parmi les plus distants chez cette espèce. Nos résultats indiquent qu'aux locus étudiés aucune différence significative n'a pu être observée. Une explication possible est que l'homéologie entre les séquences nucléotidiques des deux (2) écotypes n'est pas suffisamment grande pour engendrer un abaissement du taux de recombinaison génétique.

Mots clés : Recombinaison génétique, Mismatch Repair (MMR), homéologie, *Arabidopsis thaliana*, écotype, Landsberg, Niederzenz, cellules méiotiques, hétéroduplexe, croisement.

ABSTRACT

Genetic recombination is a determining mechanism in the evolution of species. It consists of the exchange of genetic information between homologs or sometimes homoeologous chromosomes. In this latter context, a reduction in the frequency of recombination is often observed and it is postulated that genes of the MMR system would be involved in such a phenomenon. In order to verify this hypothesis and in the absence of compatible wild relatives, we sought to measure the effects of homeology on the recombination frequency at the intra-specific level in *Arabidopsis thaliana*. In this study, we compared the genetic recombination between the Niederzenz and Landsberg erecta ecotypes, two ecotypes believed to be among the most distant in this species. Our results indicate that at the studied loci no significant difference could be observed. A possible explanation is that the homeology between the nucleotide sequences of the two (2) ecotypes is not great enough to cause a lowering of the rate of genetic recombination.

Keywords: Genetic recombination, Mismatch Repair (MMR), homoeologous, *Arabidopsis thaliana*, ecotype, Landsberg, Niederzenz, meiotic cells, heteroduplexe, crossing.

A.1. INTRODUCTION

Le succès des différents organismes sur Terre repose sur leur capacité évolutive de s'adapter à de nouvelles situations d'adversité environnementale. L'adaptation génétique à diverses niches écologiques nécessite l'émergence chez les organismes de nouvelles formes alléliques qui confèrent un avantage adaptatif aux individus porteurs. Un des moteurs de diversification génétique est la recombinaison génétique qui engendre des échanges de segments chromosomiques parentaux lors de la méiose. Ces échanges méiotiques donnent naissance à des chromosomes recombinés ayant des segments de chacun des parents (Petes *et al.*, 1991).

La recombinaison génétique correspond à un échange réciproque de parties de chromosomes parentaux suite à la réplication de l'ADN. L'échange d'information se fait entre chromosomes homologues, homéologues, ou non-homologues des cellules somatiques, ou germinales (Kaplan et Delpech, 1993). La recombinaison génétique entre deux séquences chromosomiques similaires mais non identiques en tout point est appelée recombinaison homéologue. La recombinaison génétique chez les cellules somatiques est sans conséquence sur l'évolution des espèces, car elle n'altère ni le génotype, ni le phénotype de la descendance. Son rôle principal est d'assurer la stabilisation du génome par la réparation des chromosomes détériorés (Puchta *et al.*, 1996). Toutefois, on a observé chez certaines plantes que des éléments issus de recombinaison somatique peuvent être transmis à la descendance. En effet il a été montré qu'au locus *Zein* de *Zea mays*, des réarrangements chromosomiques issus d'événements mitotiques pouvaient être transmis à la méiose à la descendance (Das *et al.*, 1990).

Par contre, la recombinaison méiotique, c'est-à-dire celle qui se produit dans les cellules germinales pour donner naissance aux gamètes, est un facteur déterminant dans le processus d'évolution des espèces. En effet, elle contribue à la réorganisation du génome par l'introduction et le maintien chez les espèces, de variabilité génétique à travers le réassortiment aléatoire des chromosomes recombinés. Ces chromosomes recombinés étant le fruit d'échange entre les chromosomes d'origine maternelle et ceux d'origine paternelle. L'inhibition de ce mécanisme d'échange entre organismes apparentés contribue à l'isolement génétique des espèces et à la spéciation (Vulic *et al.*, 1997). Les mécanismes gouvernant la re-

combinaison génétique chez les organismes supérieurs sont mal connus. L'essentiel des informations relatives à la recombinaison génétique provient des études sur les bactéries et sur la levure. Différents modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme général de la recombinaison génétique.

L'archétype des modèles de recombinaison est celui proposé par Robin Holliday (1964) qui repose sur la formation de molécules hybrides symétriques. Les événements menant à la recombinaison impliquent l'appariement des homologues (Fig. 1A) (Holliday, 1964.). La recombinaison est alors initiée par des coupures simple brin à des positions homologues sur chacun des brins du duplex constitué par les chromatides non-sœurs (Fig. 1B). Les brins ainsi coupés interagissent avec la partie restante de l'autre duplex (Fig. 1D), et les coupures sont reliées en formant un hétéroduplexe et une jonction dite de Holliday (Fig. 1C). Cette jonction représente le point d'échange des brins interconnectés, et elle migre le long des molécules hybrides (Fig. 1D) jusqu'à ce que ce complexe de brins inter-liés soit résolu par la coupure du chiasma formé (Fig. 1D). Selon le point de coupure, des séquences recombinées sont générées (Fig. 1E). Finalement, l'intervention du système de réparation des bases mésappariées représente l'élément clef de tout le processus (Kaplan et Delpech, 1993). Le modèle de Holliday explique plusieurs caractéristiques générales de la recombinaison génétique, mais il existe également d'autres modèles de recombinaison génétique. Les modèles alternatifs s'inspirent tous du modèle de Holliday mais ils traitent le cas de cassure brin unique, ou de cassures double brins (Staddler et Towe, 1971; Fogel *et al.*, 1979; Szostak, 1983; Griffiths *et al.*, 1996).

Lorsqu'il existe une hétérologie de séquence entre les chromosomes homologues, les mésappariements de base qui en résultent mobilisent le système de correction des bases mésappariées (MMR). Comme il en a été question auparavant, ce système est particulièrement impliqué dans des fonctions de réparation. Il est intéressant de noter que certains des gènes MMR assurent également des fonctions dans le processus de recombinaison génétique. L'action de ceux-ci, peut inhiber la recombinaison lorsque la divergence entre les chromosomes homologues est très grande (Rayssiguier *et al.*, 1989). L'importance des différences de séquences entre les partenaires en interaction pour l'issue de la recombinaison a été rapportée par de nombreux auteurs, et sur de nombreux organismes comprenant aussi bien les

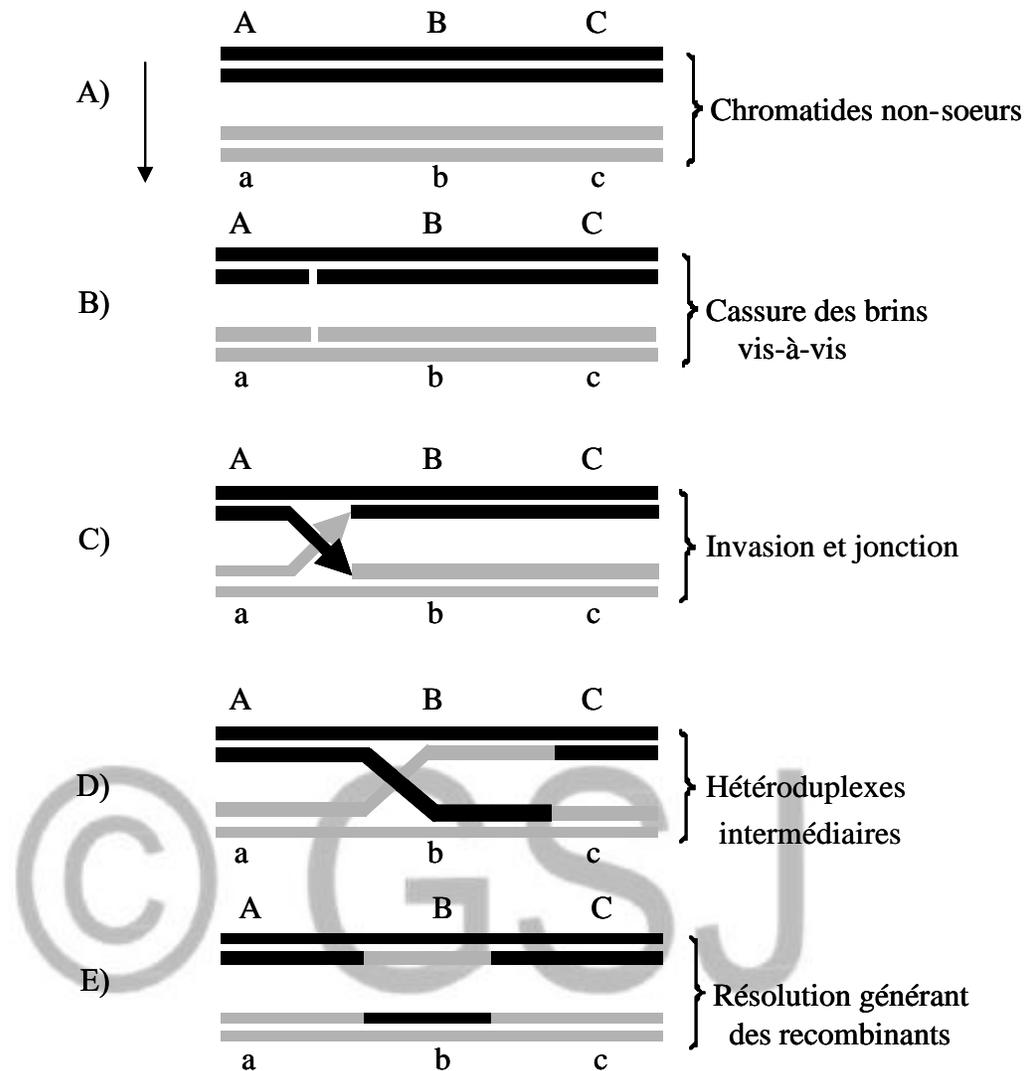


Figure A-1: Prototypé d'échange d'informations entre homéologues

A la méiose les chromatides non-sœurs des chromosomes homéologues s'apparient. Une endonucléase coupe les brins des homéologues en vis-à-vis. Les extrémités libres envahissent leur brin complémentaire dans la double hélice homologue et il s'en suit une ligation des extrémités. Cette ligature crée des doubles hélices partiellement hétérologues, représentant un hétéroduplexe intermédiaire (Structure de Holliday). L'ADN hétéroduplexe transitoire peut comprendre une ou plusieurs zones d'enjambements chromosomiques et la jonction ainsi créée se déplace le long des chromosomes jusqu'à sa résolution qui engendrera des chromosomes recombinés (adapté de Griffiths *et al.*, 1996).

procaryotes que les eucaryotes (Borts et Haber, 1987; Lichten *et al.*, 1987; Rayssiguier *et al.*, 1989; te Riele *et al.*, 1992; Fishel et Kolodner, 1995; Hunter *et al.*, 1996). Ainsi, on note une diminution de 1000 fois dans le taux de recombinaison génétique entre *E. coli* et *S. typhimurium* dont les génomes ne présentent qu'environ 15 % de divergence nucléotidique (Rayssiguier *et al.*, 1989). A l'autre extrême, chez la levure, une divergence d'une seule base au sein d'une région de 350 pb (soit 0,3 % de divergence) est suffisante pour réduire le taux de recombinaison de 3 à 6 fois (Datta *et al.*, 1997; Chen et Jinks-Robertson, 1999).

Bien que les mécanismes moléculaires à la base des difficultés de succès des croisements inter spécifiques ne soient pas tous connus, on invoque souvent l'implication des composants du système MMR dans ces difficultés (Datta *et al.*, 1997; Chen et Jinks-Robertson, 1999). En effet, dans les croisements interspécifiques entre *S. cerevisiae* et *S. paradoxus* dont les génomes diffèrent de 8 à 20 % (Adjiri *et al.*, 1994), la suppression des gènes *PMS1* et *MSH2* a eu plusieurs conséquences sur l'issue du croisement. Ainsi, dans les cellules germinales des hybrides, il y a eu une augmentation de la viabilité des spores par un facteur de 6 et 9 fois pour les hybrides n'ayant pas un gène *PMS1* fonctionnel, et ceux n'ayant pas le gène *MSH2* fonctionnel respectivement (Hunter *et al.*, 1996). En outre, on a constaté que dans les souches *MMR*⁻, la fréquence des enjambements méiotiques a connu un accroissement de 10 et 17 fois respectivement.

Toujours chez la levure, une étude intra spécifique portant sur différentes souches sauvages de *S. cerevisiae* détenues par différents laboratoires a fait ressortir que même à l'intérieur de la même espèce, l'origine de la souche a un effet sur l'issue du croisement. Ainsi, le croisement des souches sauvages *S. cerevisiae* (YP1) x *S. cerevisiae* (YP55) provenant de différents laboratoires, a montré que la fertilité était plus élevée pour des souches de même origine. La fertilité des hybrides YP1 x YP1 était de 96,2 %, et celle des l'hybrides YP55 x YP55 était de 98.1 % (Greig *et al.*, 2003). Lorsque ces mêmes auteurs ont croisé des souches d'origines différentes (YP1 x YP55), le pourcentage de fertilité n'était plus que 82.5 %. La délétion du gène *MSH2* a augmenté la fertilité relative de l'hybride intra spécifique (YP1 x YP55) de 93.5 % par rapport à l'hybride sauvage (84.5 %) (Greig *et al.*, 2003). Lorsque la même étude a porté sur l'effet de l'origine géographique de différentes souches de *S. paradoxus* sur la fertilité, Greig et collègues (2003) ont constaté que le taux de fertilité

n'était pas le même selon que les souches proviennent de la même région géographique ou pas. Ainsi, les hybrides intra géographiques ont une fertilité supérieure (d'environ 20 à 40 %) à celle des hybrides inter géographique. Dans les mêmes conditions, les hybrides ayant la mutation *MSH2* montrent une augmentation de fertilité relative d'environ 15 à 19 % par rapport aux hybrides des souches sauvages (Greig *et al.*, 2003).

Bien que les études de recombinaison génétique n'abondent pas chez les plantes, on a noté chez la tomate, que l'introgession d'un segment de chromatine étrangère dans le génome, réduit de façon considérable la recombinaison génétique au locus concerné (Liharska *et al.*, 1996). La réduction de recombinaison est d'autant plus importante que le segment introduit est grand, et elle peut-être six fois inférieure à celle du sauvage. Chez *A. thaliana*, les difficultés inter spécifiques précédemment indiquées rendent impossibles ce genre d'étude. Toutefois, la littérature sur cette plante fait état de l'existence d'une variabilité génétique naturelle au sein de ses différents écotypes (Chang *et al.*, 1988; King *et al.*, 1993). Les premières caractérisations génétiques des différents écotypes d'*A. thaliana* laissaient croire que l'écotype Niederzenz (Nd) était celui qui présentait le plus de variabilité par rapport aux autres. En effet, la divergence nucléotidique entre Landsberg *erecta* (Ler) et Nd est estimée à environ 1,4 % (Chang *et al.*, 1988). Dans une étude regroupant 28 écotypes, King et collègues (1993) ont estimé que Nd est l'écotype le plus distant des autres avec une moyenne de similarité génétique d'environ 0,55 comparativement à la moyenne du groupe de 0,69. Koornneef et Hanhart (1988) avaient croisé les écotypes Nd et Ler pour étudier la distance génétique sur plusieurs intervalles génétiques. Dans environ 63 % des intervalles étudiés, cette étude limitée à une petite population F_2 (200 à 500 individus) a mis en évidence l'existence d'une tendance à un abaissement de recombinaison dans le croisement inter écotype Ler X Nd, par rapport au croisement intra écotype Ler X Ler (Koornneef et Hanhart, 1988). Il est possible que cette tendance observée n'a pas été confirmée par les tests statistiques, du fait de la faiblesse de la population étudiée.

Dans le contexte de nos efforts visant à explorer la fonction du gène *AtPMS1*, nous avons cherché à mettre au point un système expérimental permettant d'étudier l'impact de ce gène sur la recombinaison. Nous avons postulé qu'une divergence nucléotidique entre écotypes d'*Arabidopsis* se traduirait par une réduction mesurable de la recombinaison. À supposer

qu'une telle réduction soit documentée, l'impact du système MMR sur l'ampleur de cette réduction pourrait être étudiée. Cela contribuerait ainsi à une meilleure compréhension de l'implication du gène *AtPMS1* et des autres gènes MMR dans le processus de recombinaison.

A.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

A.2.1. Matériel végétal et culture des plantes

Dans cette étude, nous avons utilisé trois lignées distinctes d'*Arabidopsis thaliana*. Une première lignée était de type sauvage et de l'écotype Landsberg *erecta* (Ler). Une seconde lignée, également de type sauvage, était de l'écotype Niederzenz (Nd). La troisième lignée, de l'écotype Ler, était homozygote pour les allèles mutants récessifs aux locus *ABI3* et *GL1* (génotype = *abi3abi3 gl1gl1* ; phénotype = *abi3/gl1*). La mutation *abi3* (pour «abscisic acid insensitive») confère à la graine la capacité de germer en présence d'acide abscissique exogène alors qu'une plante sauvage à ce locus en est incapable. La mutation *gl1* (pour «glabra») se manifeste par l'absence de trichomes à la surface des vraies feuilles, ce qui leur donne un aspect glabre. Les locus *ABI3* et *GL1* sont tous deux situés sur le chromosome III à 8 cM l'un de l'autre (Fig. 2).

Les plantes ont été cultivées dans un phytotron avec un contrôle sur l'humidité relative et la luminosité sous un régime de 16 h d'éclairage et 8 h de nuit à une température constante de 25 °C. Un terreau (Pro-Mix) a été utilisé comme substrat de culture. Les plantes ont été cultivées dans des barquettes en aluminium pour les semis en vrac, ou dans des pots en plastique pour les semis individualisés. Les graines ont passé 3 jours à 4 °C afin de briser leur dormance et uniformiser la germination.

A.2.2. Les croisements

Dans un premier croisement, le double mutant *abi3/gl1* a été utilisé comme plante femelle et son pendant sauvage, également de l'écotype Ler, a été utilisé comme mâle [*abi3/gl1* (Ler) X *ABI3/GL1* (Ler)]. Comme les deux lignées croisées sont du même écotype, nous dirons qu'il s'agit d'un croisement intra écotype. Dans un second croisement, le même mu-

tant *abi3 gl1* (Ler) a été croisé avec une lignée sauvage de l'écotype Niederzenz [*abi3/gl1* (Ler) X *ABI3/GL1* (Nd)]. Dans ce cas-ci, nous parlerons d'un croisement inter écotypes puisque les deux parents ne sont pas du même écotype. Un schéma illustrant les croisements réalisés et l'analyse subséquente est présenté à la Figure 3.

A.2.3. Phénotypage de la population F2

Les siliques portant les graines F₁ issues des croisements [*abi3/gl1* (Ler) X *ABI3/GL1* (Ler)] et [*abi3/gl1* (Ler) X *ABI3/GL1* (Nd)] ont été récoltées individuellement. Des graines F₁ ont été semées et ces plantes F₁ ont été autofécondées. Les graines F₂ obtenues de ces autofécondations ont été récoltées et nettoyées à l'aide d'un tamis (Tyler, 425 microns). Finalement les graines ont été stérilisées en surface pendant 15 min dans une solution contenant 5 % d'eau de javel (6 % d'hypochlorite de sodium), et une goutte de Tween 20 (Valvekens *et al.*, 1988). Après stérilisation, les graines (200-300 par tube eppendorf) ont été lavées cinq fois avec de l'eau déionisée stérile, puis étalées dans des boîtes de Pétri (100 X 15 mm) contenant un milieu de germination (GM) décrit par Valvekens et collègues (1988).

Pour effectuer le phénotypage de cette population environ 30000 graines F₂ ont été étalées sur milieu GM supplémenté de 6 µM d'acide abscissique. Environ deux semaines après la germination, les plantes insensibles à l'ABA exogène (celles qui ont germé normalement) ont été repiquées sur un milieu GM sans ABA. Le repiquage des plantules a été fait dans des boîtes de Pétri carrées (100 X 15 mm) afin de faciliter l'identification et le dénombrement des plantules. Après la reprise des plantules repiquées, et suite au développement des trois premières vraies feuilles, nous avons procédé à l'aide d'une loupe binoculaire au dénombrement des plantes à feuilles glabres (*gl1*) ou porteuses de trichomes (*GL1*). Puisque seules les plantes de phénotype *abi3* (ayant germé en présence d'ABA) ont été examinées pour la présence ou l'absence de trichomes, nous parlerons dans ce cas d'un phénotypage incomplet. Sur une population de taille plus limitée (~2200), nous avons effectué un dénombrement complet de tous les phénotypes observables (quatre classes phénotypiques). Ainsi après le repiquage des plantules insensibles sur milieu GM ne contenant pas d'ABA,

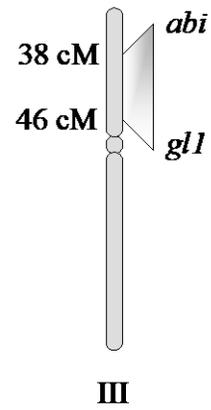


Figure A-2: Localisation des marqueurs sur le chromosome III d'*A. thaliana*.

© GSJ

Analyse de la population F₂

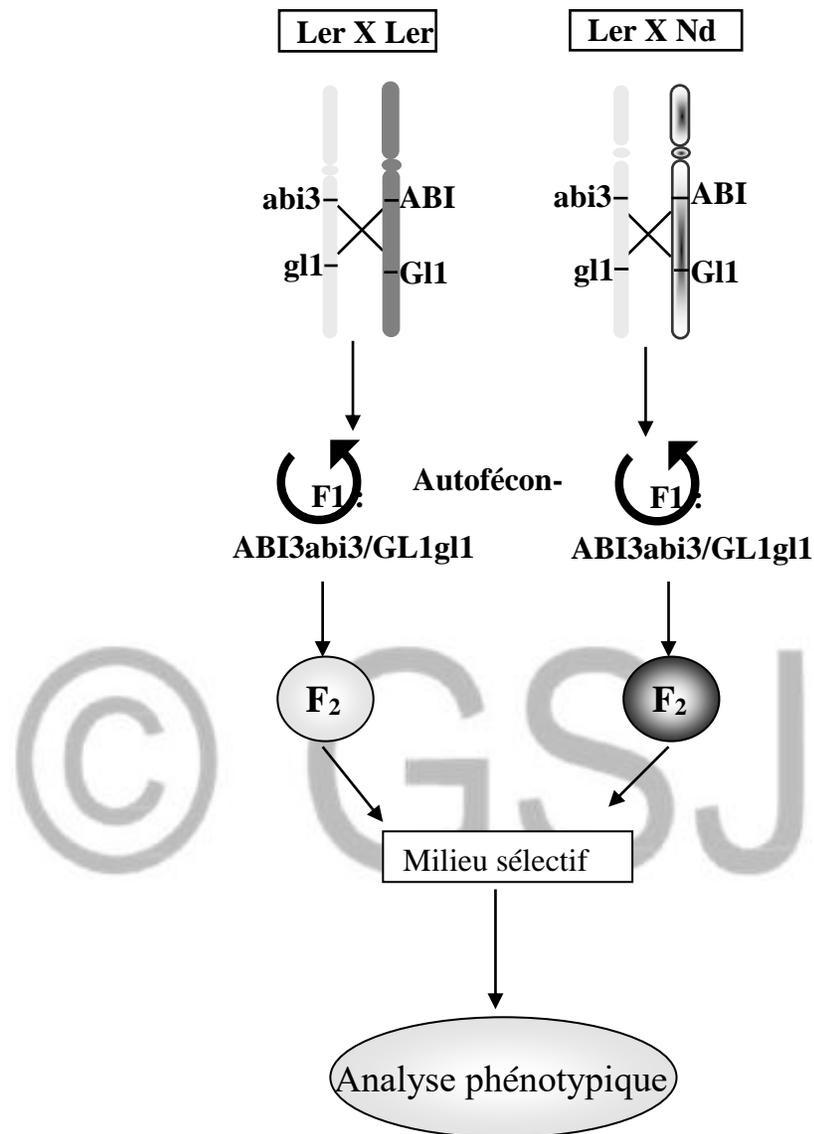


Figure A-3: Schéma général des croisements effectués

Un double mutant (*abi3abi3gl1gl1*) a été utilisé comme plante femelle dans des croisements avec des plantes Ler et Nd ayant l'allèle normal. Les plantes F₁ ont été autofécondé et la population F₂ a été sélectionnée sur milieu contenant 6 μ M d'acide abscissique.

nous avons également repiqué sur ce même milieu les graines sensibles à l'ABA (celles qui n'avaient pas encore germé). Pour que les graines sensibles ne perdent pas leur pouvoir germinatif suite à une exposition prolongée à ABA, nous avons effectué ces deux repiquages 5 jours après le semis au lieu de deux semaines comme d'habitude. Les plantules glabres ou à trichomes ont ensuite été dénombrées à la loupe binoculaire au sein des deux groupes (ABI3 et abi3).

A.2.4. Calculs du taux de recombinaison

4.2.4.1. Phénotypage complet

Pour un phénotypage complet (basé sur le décompte du nombre d'individus pour chacune des quatre classes phénotypiques) d'une population F_2 , les équations utilisées pour déterminer le taux de recombinaison génétique sont les suivantes (Allard, 1956).

$$a \cdot \frac{(p-1)}{3-2p+p^2} + (b+c) \cdot \frac{(1-p)}{p(2-p)} + d \cdot \frac{1}{p-1} = 0 \quad (1)$$

Les coefficients a, b, c, et d représentent le nombre des individus observés pour les plantules de phénotype ABI3/G11, ABI3/g11, abi3/G11 et abi3/g11 respectivement. Et p est le taux de recombinaison génétique. L'information fournie par un seul individu F_2 est donnée par l'équation :

$$i_p = 2 \cdot \frac{(2p^2 - 4p + 3)}{p(2-p)(p^2 - 2p + 3)} \quad (2)$$

L'information fournie par l'ensemble des individus d'une famille F_2 est le produit du nombre total d'individus dans la famille (n) par l'information procurée par chaque individu de la même famille (i_p). Donc $I_p = n \cdot i_p$ et la variance sur une famille F_2 est définie comme la réciproque de l'information totale. En conséquence $v_p = \frac{1}{I_p}$ d'où l'on déduit l'écart type

sur p (S_p):

$$s_p = \sqrt{\frac{1}{I_p}} \quad (2a)$$

L'erreur commise dans l'estimation de p se calcule à partir de la formule (2).

$$s_p = \sqrt{V_p} \Rightarrow s_p = \sqrt{\frac{1}{n \cdot i_p}} \Leftrightarrow s_p = \sqrt{\frac{p(2-p)(p^2 - 2p + 3)}{n \cdot 2 \cdot (2p^2 - 4p + 3)}} \quad (2b)$$

4.2.4.2. Phénotypage incomplet

Pour calculer le taux de recombinaison génétique lorsque seul un sous-ensemble des phénotypes était examiné, nous avons utilisé les équations du maximum de vraisemblance, ajustées à une famille F_2 avec des données de classification incomplètes pour deux gènes en ségrégation (Allard, 1956). L'équation utilisée est :

$$c \cdot \frac{-2+2p}{2p-p^2} + d \cdot \frac{2}{1-p} = 0 \quad (3)$$

Les coefficients c et d représentent le nombre des individus observés pour les plantules de phénotype $abi3/G11$ et $abi3/gl1$ respectivement. Et p est le taux de recombinaison génétique.

Pour estimer la distance génétique entre les deux marqueurs, il faut résoudre mathématiquement l'équation (1). Ainsi on en déduit le quotient des coefficients c et d , ce qui permet de connaître le taux de recombinaison génétique (p).

$$\frac{d}{c} = \frac{1-p^2}{2p-p^2} \Leftrightarrow \left(1 + \frac{d}{c}\right)p^2 - 2\left(1 + \frac{d}{c}\right)p + 1 = 0 \quad (3a)$$

En faisant les substitutions appropriées on déduit que

$$p = 1 - \sqrt{\frac{d}{d+c}} \quad (3b)$$

Le taux de recombinaison est: $r = 100 \cdot p$ et l'information fournie par un seul individu F_2 est donnée par l'équation :

$$i_p = \frac{1}{2p-p^2} \quad (4)$$

L'information fournie par l'ensemble des individus d'une famille F_2 est le produit du nombre total d'individus dans la famille (n) par l'information procurée par chaque individu de la même famille (i_p). Donc $I_p = n \cdot i_p$ et la variance sur une famille F_2 est définie comme la réciproque de l'information totale. En conséquence $v_p = \frac{1}{I_p}$ d'où l'on déduit l'écart type sur p :

$$s_p = \sqrt{\frac{1}{I_p}} \quad (4a)$$

L'erreur commise dans l'estimation de p se calcule à partir de l'équation (4).

$$s_p = \sqrt{v_p} \Rightarrow s_p = \sqrt{\frac{1}{n \cdot i_p}} \Leftrightarrow s_p = \sqrt{\frac{2p-p^2}{n}} \quad (4b)$$

A.3. RÉSULTAT

4.3.1. Les marqueurs utilisés

L'objectif de ce travail était de vérifier si la divergence nucléotidique qui existe entre deux écotypes d'*A. thaliana* est suffisamment importante pour entraîner une réduction détectable de la fréquence de recombinaison génétique dans un intervalle donné. Nous avons utilisé deux marqueurs morphologiques, lesquels définissent un intervalle génétique localisé sur le chromosome III d'*A. thaliana*. L'intervalle à l'étude est délimité par le couple de marqueurs *ABI3-GL1*, deux marqueurs qui se prêtent bien à un examen phénotypique rapide sur un grand nombre de jeunes plantules.

4.3.2. Fréquence de recombinaison dans l'intervalle *ABI3-GL1*

4.3.2.1. Phénotypage complet

En vue d'estimer les effets d'une divergence nucléotidique sur la distance génétique entre les locus marqueurs *ABI3* et *GL1*, nous avons procédé au phénotypage incomplet d'une première population F₂ issue d'un croisement intra-écotype [*abi3/g11* (Ler) X *ABI3/GL1* (Ler)] et d'une seconde population F₂ issue d'un croisement inter-écotype [*abi3/g11* (Ler) X *ABI3/GL1* (Nd)]. Nous avons analysé un total de 2055 individus, dont 1072 individus pour le croisement intra-écotype et 983 pour le croisement inter-écotype (Tableau 1). Les 4 classes phénotypiques ont été notées; et les valeurs observées ont été comparées à celles attendues dans le cas d'une ségrégation Mendélienne des deux gènes. Comme on s'y attendait, les proportions observées pour chacune des quatre classes phénotypiques sont très différentes de celles prédites par le modèle Mendélien. En effet, les attentes générées par le modèle mendélien s'appuient sur l'hypothèse nulle selon laquelle les deux locus ne sont pas liés et ségrégent donc indépendamment. Les valeurs très élevées de la statistique χ^2 viennent simplement confirmer que les gènes sont en effet liés.

Ce qui importe davantage, cependant, est de déterminer si la distance génétique entre les deux locus est différente selon qu'elle est mesurée dans un croisement intra-écotype ou inter-écotypes. A l'aide des équations (1) et (2), nous avons estimé la distance génétique *ABI3-GL1* dans les deux croisements. Dans le croisement Ler X Ler, la distance estimée entre les deux locus est de 12,2 cM avec un écart-type de 1,1 cM. Cela permet de définir un intervalle de confiance pour la distance génétique compris entre 10,0 et 14,4 cM (à $\alpha=0,05$) (Tableau 1). Dans le croisement Ler X Nd, la distance génétique estimée est de 11,1 cM \pm 1,1 cM, ce qui produit un intervalle de confiance de 8,9 à 13,3 cM. Comme on peut le voir, il y a un abaissement apparent d'environ 1 cM (12,2 vs 11,1 cM) dans la distance génétique estimée selon qu'il s'agit d'un croisement intra-écotype ou inter-écotypes. Cet abaissement n'est toutefois pas statistiquement significatif et on ne peut donc pas conclure qu'il existe une différence significative entre la mesure de distance obtenue dans les deux populations.

Tableau 1. Phénotypage complet de la population F2 sur l'intervalle *abi3/gll* en présence 6 μ M d'ABA exogène. La taille de la population (N), fréquence des phénotypes attendus en absence de liaison génétique (FA), fréquence des phénotypes observés (FO), la valeur du test de liaison (Khi²), la distance génétique (D), et l'intervalle de confiance de la distance génétique (IC).

CROISEMENTS	N	FA	FO	Khi ²	D	IC
Dm X Ler	1072				12,2±1,1	10,0-14,4
<i>ABI3_GLI_</i>		603	713 (A)	20		
<i>ABI3_gllgll</i>		201	92 (B)	59		
<i>abi3abi3GLI_</i>		201	36 (C)	135		
<i>abi3abi3gllgll</i>		67	231 (D)	401		
		1072	1072	616		
Dm X Nd	983				11,1±1,1	8,9-13,3
<i>ABI3_GLI_</i>		553	668 (A)	24		
<i>ABI3_gllgll</i>		184	73 (B)	67		
<i>abi3abi3GLI_</i>		184	33 (C)	124		
<i>abi3abi3gllgll</i>		61	209 (D)	354		
Total	2055	983	983	570		

Les coefficients utilisés dans les équations d'estimation du taux de recombinaison génétique sont représentés par les lettres entre parenthèses à côté du nombre d'individu observé pour chaque classe phénotypique. Les classes phénotypiques sont indiquées dans la première colonne sous croisements. Les valeurs attendues sont basées sur une ségrégation Mendélienne (9:3:3:1) pour une population total indiquée sous N par croisement.

4.3.2.2. Phénotypage incomplet

Nous avons procédé à une analyse à une échelle plus grande mais en pratiquant un phénotypage incomplet pour diminuer l'erreur associée à la mesure de la distance entre les deux locus. Dans ce travail, seules les graines ayant germé en présence d'ABA exogène ont été examinées pour la présence de trichomes (les autres graines n'ayant pas germé). Ainsi, les seuls phénotypes notés étaient *abi3/GL1* et *abi3/g11*. Au total, nous avons utilisé 28 002 graines F_2 dont 14 263 pour le croisement intra-écotype et 13 739 pour le croisement inter-écotypes (Tableau 2). Comme on peut le voir dans ce tableau, la distance entre les locus *ABI3* et *GL1* est estimée à $8,4 \pm 0,34$ cM (intervalle de confiance à $\alpha = 0,05$: 7,7 à 9,1 cM) au sein du croisement intra-écotype. La distance entre ces deux mêmes locus dans le croisement inter-écotypes est estimée à $7,84 \pm 0,33$ cM (intervalle de confiance à $\alpha = 0,05$: 7,1 à 8,5 cM). Ainsi, on observe encore une fois une plus faible distance dans le contexte du croisement inter-écotype, mais l'ampleur de cette différence est trop faible pour conclure qu'il s'agit là d'une différence significative.

A.4. DISCUSSION

Chez *Arabidopsis thaliana* les croisements inter spécifiques ne produisent pas de descendance viable. Ainsi, afin d'évaluer l'effet de l'homéologie sur la fréquence de recombinaison, nous avons croisé les écotypes Nd et Ler et généré une population F_2 . Le choix de ces deux écotypes résulte d'études antérieures faisant ressortir Nd comme l'écotype le plus génétiquement distant des autres (King *et al.*, 1993). Pour faciliter l'étude, nous avons choisi des marqueurs morphologiques qui permettent la différenciation des classes phénotypiques très tôt dans le développement végétatif des plantes.

Pour cette étude nous avons utilisé deux types de données. Dans un premier temps, nous avons obtenu des données par suite d'un phénotypage complet dans lequel les 4 classes phénotypiques sont identifiées, et portant sur environ 2 000 individus. Ultérieurement, nous avons approfondi en obtenant des données issues du phénotypage partiel pour lequel seulement deux classes phénotypiques sont identifiées, et portant sur une population de près de

Tableau 2. Phénotypage partiel de la population F2 sur l'intervalle *abi3/gll* en présence de 6 μ M d'ABA exogène. La taille de la population (N), fréquence des phénotypes attendus en absence de liaison génétique (FA), fréquence des phénotypes observés (FO), la valeur du test de liaison (Khi²), la distance génétique (D), et l'intervalle de confiance de la distance génétique (IC).

CROISEMENTS	N	FA	FO	Khi ²	D	IC
Dm X Ler	14263				8,4±0,34	7,7-8,5
<i>abi3abi3GL1_</i>		2674.3	595 (C)	1617		
<i>abi3abi3gllgll</i>		891.4	2971 (D)	4852		
Total		3566	3566	6468		
Dm X Nd	13739				7,8±0,33	7,1-8,5
<i>abi3abi3GL1_</i>		2576	546 (C)	1600		
<i>abi3abi3gllgll</i>		859	2889 (D)	4797		
Total	28002	3435	3435	6397		

Les coefficients utilisés dans les équations d'estimation du taux de recombinaison génétique sont représentés par les lettres entre parenthèses à côté du nombre d'individu observé pour chaque classe phénotypique. Les classes phénotypiques sont indiquées dans la première colonne sous croisements. Les valeurs attendues sont basées sur une ségrégation Mendélienne (9:3:3:1) pour une population total indiquée sous N par croisement.

30 000 individus au total. Avec chacune de ces deux types de données, nous n'avons observé aucune différence significative quant à la distance génétique (et donc la fréquence de recombinaison) entre ces deux locus. La distance mesurée à l'aide du phénotypage complet d'environ 1 000 individus par croisement (11,1 à 12,2 cM) est différente de l'estimé obtenu avec la plus grande population (~15000) dont seule deux classes phénotypiques ont été analysées (7,8 à 8,4 cM). Ces deux estimations sont en accord avec la distance génétique rapportée pour cet intervalle sur les cartes génétiques consensus d'*Arabidopsis* (Koncz et Rédei, 1994).

Une des motivations de cette étude était l'existence d'une tendance nette à l'abaissement du taux de recombinaison génétique observée dans l'environnement génétique Nd par rapport à Ler. En effet, à l'échelle de petites populations (200-500 individus), Koornneef et Hanhart (1988) avaient observé une tendance à la baisse du taux de recombinaison génétique dans le bagage génétique Nd. Bien qu'aucune de ces différences n'était statistiquement significative, une tendance très nette était évidente puisque la distance génétique mesurée dans un bagage génétique Nd était plus faible dans 10 intervalles sur 16 examinés par ces auteurs. Cette tendance majoritaire de l'abaissement de la recombinaison dans le bagage Nd à l'échelle de petites populations laissait supposer qu'à une plus grande échelle, les différences pourraient devenir significatives. Au cours de ce travail à grande échelle, nous n'avons pu observé que les mêmes tendances qui sont statistiquement non significatives. La différence en valeur absolue de 0,6 à 1,1 % observée entre le bagage génétique de Ler vs de celui Nd, se traduit en valeur relative par une distance génétique mesurée chez Ler de 7 à 10 % supérieure à celle mesurée chez Nd.

Ces résultats chez *A. thaliana* contrastent avec ceux rapportés chez le *S. cerevisiae* où il a été montré qu'une seule base divergente sur un segment de 350 pb (c'est-à-dire 0,3 %) était suffisante pour réduire significativement (3 à 6 fois) le taux de recombinaison (Datta *et al.*, 1997; Chen et Jinks-Robertson, 1999). Par comparaison, Chang et collaborateurs (1988) ont évalué à 1,4 % la divergence nucléotidique entre Ler et Nd. Une telle divergence engendre, chez la levure, une baisse d'environ 20 fois du taux de recombinaison (Chen et Jinks-Robertson, 1999). On peut donc se demander si la divergence nucléotidique de 1,4 % estimée par Chang et collègues (1988) est bien fondée. En effet, dans une étude plus récente,

Bergelson et collègues (1998) arrivent à des divergences beaucoup plus modestes entre écotypes. En utilisant 115 écotypes, ils ont trouvé pour trois locus marqueurs (*Adh*, *Dhs1*, et *Gpa1*) une divergence intra-écotype moyenne de 0,04 % et une divergence inter-écotype moyenne 0,14 %. Plus récemment encore, la disponibilité de la séquence des écotypes Columbia (Col) et Landsberg *erecta* a permis d'obtenir un estimé basé sur la comparaison de 95 Mb de séquence génomique entre Col et Ler (Jander *et al.*, 2002). Celle-ci fait ressortir l'existence de 37 344 SNP (différences d'un nucléotide) et de 67 730 bp d'insertions/délétions de bases, soit une divergence globale autour de 0,11 %. Une étude en cours dans notre laboratoire, examinant le polymorphisme pour la présence/absence d'éléments transposables à des locus précis, a établi que les écotypes Col et Nd sont très proches sur le plan phylogénétique (M. Jean, comm. personnelle). Si on accepte que la divergence nucléotidique entre Col et Ler ne soit que de 0,11 %, et que l'écotype Nd est très proche de l'écotype Col, on pourrait penser que la divergence nucléotidique entre Nd et Ler voisine 0,1 %. Une telle divergence nucléotidique peut être trop modeste pour affecter la fréquence de recombinaison.

A.5. CONCLUSIONS

Sur la base des travaux d'autres laboratoires, nous avons choisi d'utiliser Nd comme parent éloigné, et nous avons généré des populations en ségrégations dans un environnement Ler. L'étude a porté sur 2 locus marqueurs (ABI3, GL1) situés sur le chromosome III d'*A. thaliana*. Nous avons utilisé aussi bien un phénotypage partiel qu'un phénotypage complet pour comparer la recombinaison génétique intra-écotype et inter-écotype. Nos résultats ne révèlent pas de différence significative dans le taux de recombinaison génétique sur l'intervalle génétique *ABI3-GL1*. Les plus récentes études sur la divergence nucléotidique entre écotypes indiquent que celle-ci est inférieure aux estimations antérieures. Cette faible divergence pourrait expliquer pourquoi aucune différence significative n'est observée au niveau de la distance génétique entre deux marqueurs dans deux bagages génétiques différents.

RÉFÉRENCES

- Adjiri A, Chanet R, Mezard C, Fabre F** (1994) Sequence comparison of the ARG4 chromosomal regions from the two related yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces douglasii*. *Yeast* **10**: 309-317
- Allard RW** (1956) Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia* **24**: 235-278
- Borts RH, Haber JE** (1987) Meiotic recombination in yeast: alteration by multiple heterozygosities. *Science* **237**: 1459-1465
- Chang C, Bowman JL, DeJohn AW, Lander ES, Meyerowitz EM** (1988) Restriction fragment length polymorphism linkage map for *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 6856-6860
- Chen W, Jinks-Robertson S** (1999) The role of the mismatch repair machinery in regulating mitotic and meiotic recombination between diverged sequences in yeast. *Genetics* **151**: 1299-1313
- Das OP, Levi-Minzi S, Koury M, Benner M, Messing J** (1990) A somatic gene rearrangement contributing to genetic diversity in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7809-7813
- Datta A, Hendrix M, Lipsitch M, Jinks-Robertson S** (1997) Dual roles for DNA sequence identity and the mismatch repair system in the regulation of mitotic crossing-over in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9757-9762
- Fishel R, Kolodner RD** (1995) Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Curr Opin Genet Dev* **5**: 382-395
- Fogel S, Mortimer R, Lusnak K, Tavares F** (1979) Meiotic gene conversion: a signal of the basic recombination event in yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **43 Pt 2**: 1325-1341
- Greig D, Travisano M, Louis EJ, Borts RH** (2003) A role for the mismatch repair system during incipient speciation in *Saccharomyces*. *J Evolution Biol* **16**: 429-437
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Leowontin rc, Gelbart wm** (1996) An introduction to genetic analysis, Ed sixth. Freeman, W. H and company, Madison
- Holliday R** (1964.) A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* **5**: 282-304.

- Hunter N, Chambers SR, Louis EJ, Borts RH** (1996) The mismatch repair system contributes to meiotic sterility in an interspecific yeast hybrid. *Embo J* **15**: 1726-1733
- Jander G, Norris SR, Rounsley SD, Bush DF, Levin IM, Last RL** (2002) Arabidopsis map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiol* **129**: 440-450
- Kaplan JC, Delpech M** (1993) *Biologie moléculaire et médecine*, Ed 2e éd. Flammarion Médecine Sciences, Paris
- King G, Nienhuis J, Hussey C** (1993) Genetic similarity among ecotype of Arabidopsis thalian estimated by analysis of restriction fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet* **86**: 1028-1032
- Koncz C, Rédei G** (1994) Genetic studies with Arabidopsis: A historical view. *In* EM Meyerowitz, CR Somerville, eds, Arabidopsis. CSHLP, New York, USA, pp 223-252
- Koorneef M, Hanhart C** (1988) The effect of genetic background on recombination in Arabidopsis. *EASIS* **26**: 73-77
- Lichten M, Borts RH, Haber JE** (1987) Meiotic gene conversion and crossing over between dispersed homologous sequences occurs frequently in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **115**: 233-246
- Liharska T, Koorneef M, van Wordragen M, van Kammen A, Zabel P** (1996) Tomato chromosome 6 : effect of alien chromosomal segments on recombinant frequencies. *Genome* **39**: 485-491
- Petes TD, Malone RE, Symington LS** (1991) *Recombination in yeast*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N. Y.
- Puchta H, Dujon B, Hohn B** (1996) Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5055-5060
- Rayssiguier C, Thaler D, Radman M** (1989) The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* **342**: 396-401
- Staddler DR, Towe AM** (1971) Evidence for meiotic recombination in *Ascobolus* involving onlu one member of a tetrad. **68**: 404-413
- Szostak JW, T. L. Orr-Weaver, R. Rothstein and F. W. Stahl** (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**: 25-35

te Riele H, Maandag ER, Berns A (1992) Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. Proc Natl Acad Sci U S A **89**: 5128-5132

Valvekens D, Van Montagu M, Van Lijsebettens M (1988) Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation of Arabidopsis thaliana Root Explants by Using Kanamycin Selection. Proc.Natl. Acad. Sci. **85**: 5536-5540.

Vulic M, Dionisio F, Taddei F, Radman M (1997) Molecular keys to speciation: DNA polymorphism and the control of genetic exchange in enterobacteria. Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 9763-9767

© GSJ