



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

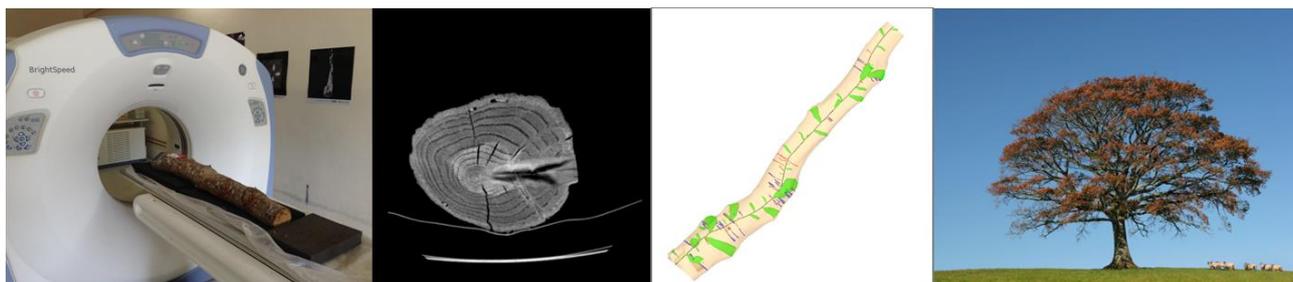
<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



2012-2013

Master 2 FAGE BIPE
Biologie et Ecologie pour la Forêt,
l'Agronomie et l'Environnement
BIPE

Analyse QTL de la ramification du chêne
pédonculé, observée par tomographie à rayon X



Jialin SONG

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 03/09/2013

Encadrants : Francis COLIN
Antoine KREMER
Oliver BRENDEL

Laboratoire d'accueil: Laboratoire d'Etude des Ressources Forêt Bois (LERFoB)
UMR 1092 INRA / AgroParisTech Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux FRANCE



Remerciement

Je tiens à remercier mes maîtres de stage, Francis COLIN, Antoine KREMER, Oliver BRENDEL pour m’avoir permis de réaliser ce stage et qui m’ont aidé tout au long de cette étude.

Un grand merci également à Jean-Baptiste Morisset pour ses conseils concernant l’interprétation des images scanner, Catherine Bodénès pour la fourniture des cartes génétiques, Charline Freyburger pour le passage des billons au scanner, Bruno Garnier, Alain Mercanti, Emmanuel Cornu et Pierre Gelhaye, pour l’organisation du transport et du stockage, ainsi que Frédéric Danjon pour son accueil à Pessac.

Je tiens à remercier à Pierre-Alexandre Dherouville pour sa participation active au travail d’interprétation des images scanner pendant son stage de M1.

En fin je voudrais remercier tout le personnel du laboratoire pour son accueil et sa sympathie.

Sommaire

1.	Introduction.....	2
1.1	Chêne pédonculé.....	2
1.2	Le classement du bois sur pied.....	2
1.3	La ramification.....	3
1.4	QTL.....	4
1.5	Objectif.....	5
2.	Matériels et méthodes.....	5
2.1	Présentation du site et des plants.....	5
2.2	Observation par tomographie à rayon X.....	6
2.3	Interprétation des images.....	7
2.4	Acquisition des données quantitatives.....	9
2.5	Cartographie de QTL.....	9
3.	Résultats.....	11
3.1	Variance phénotypique.....	11
3.2	Détection de QTL.....	12
3.2.1	la ramification.....	12
3.2.2	la croissance et l’architecture.....	12
4.	Discussion.....	14
4.1	Bourgeon adventif.....	14
4.2	Détection des QTLs.....	15
4.3	Co-localisation de QTLs.....	15
5.	Conclusion.....	16
6.	Perspectives.....	16
7.	Bibliographie.....	17
8.	Annexe.....	20

1. Introduction

1.1 Chêne pédonculé

Le chêne pédonculé (*Quercus robur L.*) est une essence feuillue de la famille des Fagacées. C'est une essence dominante de la forêt française. En termes de surface, 2 millions hectares soit 13% de la forêt française sont couverts par le chêne pédonculé. En terme de volume de bois vivant sur pied, le chêne pédonculé représente 291 millions m³ (tableau 1) ; il occupe donc la première place dans la forêt de production en France (IFN, 2012). Ces intérêts économiques sont ainsi très importants et indispensables pour la sylviculture française.

<i>Essence</i>	Total <i>Mm³</i>
Chêne pédonculé	291 ± 10
Chêne rouvre	281 ± 11
Chêne pubescent	99 ± 5
Chêne vert	27 ± 3
Hêtre	260 ± 11
Châtaignier	122 ± 8
Charme	96 ± 4
Frêne	90 ± 5
Autres feuillus	300 ± 9
Tous feuillus	1 565 ± 29
Pin maritime	138 ± 10
Pin sylvestre	143 ± 8
Sapin pectiné	182 ± 14
Épicéa commun	186 ± 14
Douglas	97 ± 12
Autres conifères	129 ± 11
Tous conifères	875 ± 27
France	2 440 ± 37

Tableau 1. Volume de bois en forêt de production par essence en France

1.2 Le classement du bois sur pied

Le prix du bois sur pied est présenté par qualité de bois, selon la longueur, le diamètre, le nombre de défauts ... (tableau 2). La qualité du bois est classée en 4 niveaux A, B, C et D, et le prix de ces 4 niveaux peut varier de 5 jusqu'à 460 euro/m³. Le classement dépend notamment du nombre de défauts ; par exemple un billon de 3m tout droit et sans défauts peut être considéré comme de qualité A ; au contraire un billon de 1,5m avec une courbure et beaucoup de nœuds pourrait diminuer son prix jusqu'à 5 euros. En plus, l'augmentation du prix de bois de bonne qualité est non négligeable depuis 10 ans (Forêts de France, 2004) ; il y a par conséquent un grand intérêt économique pour étudier la qualité du bois. L'étude de la ramification du chêne pédonculé est donc une thématique très actuelle.

Qualité	L	∅	Défaut	Utilisation	Prix sur pied en €/m ³	Evolution par rapport à décembre 2012
A	3m	55 et +	○	Tranchage 1 ^{er} choix	460 et plus	↗
A	3m	50 et +	○	Tranchage 2 ^e choix	340 et plus	↗
B	3m	50 et +	●	Plot ébénisterie	340 et plus	↗
B	1,2m	50 et +	●	Merrain	125 à 245	↗
B	3m	50 et +	●(Courbures, nœuds)	Plot menuiserie	275	↗
C	3m	45 et +	●●	Plot dépareillé	145	↗
C	2m	35 et +	●●	Avivés	55 à 75	→
C	3m	40 et +	●●	Charpente	62 à 75	↗
C	3m	40 et +	●●	Châssis	35	→
D	2m	30 et +	●●●	Traverse	17	→
D	1,5m		●●●	Palette	5	→

Tableau 2. Prix moyens par qualité relevés en forêt (en €/m³) - avril 2013. L=longueur minimum, ∅=diamètre(en centimètre), ○=défauts exclus, ●=légers défauts tolérés, ●●=quelques défauts acceptés, ●●●=nombreux défauts acceptés. (Source : Forêts de France N ° 565 juillet-Août 2013 page 8)

1.3 La ramification

Chez le chêne, un bourgeon axillaire est placé à l'aisselle d'un organe foliaire (Fontaine, 1999), ce type de bourgeon proventif primaire (Fig. 1b) est la base d'autres ramifications (Morisset 2012). Trois types de ramifications peuvent apparaître :

- le bourgeon secondaire (Fig. 1c) : un bourgeon secondaire peut être mis en place lors de la transformation des bourgeons en d'autres types de rameaux (Fink 1980 ; Fontaine et al., 1999 ; Colin et al., 2008) ;
- la branche séquentielle (Fig. 1a) : pousse feuillée développée à partir d'un bourgeon l'année suivante et souvent en haut d'unité de la croissance (Nicolini et al., 2000) ;
- La branche épicornique (gourmand) (Fig. 1d) : branche développée à partir d'un bourgeon plusieurs années après ; la moelle de la branche n'est pas directement connectée sur la moelle du tronc mais indirectement via la trace d'un bourgeon (Morisset 2012).

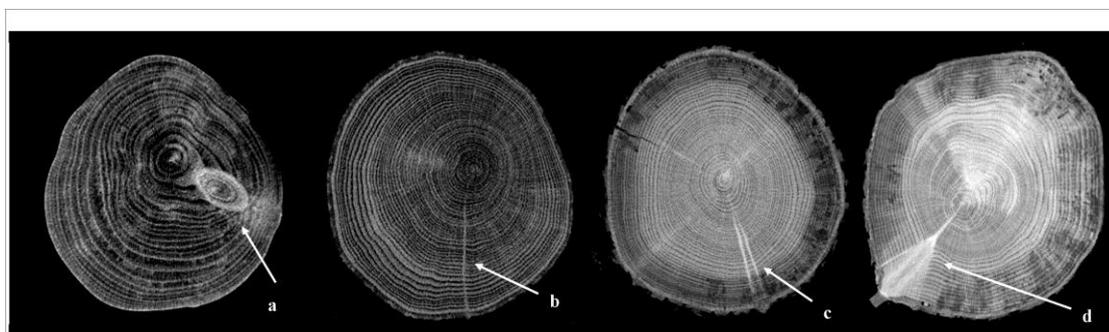


Fig.1. Image transversale d'un billon de chêne sessile montrant la trace raméale (a) d'une branche séquentielle, (b) d'un bourgeon primaire, (c) d'un bourgeon divisé en deux bourgeons secondaires, (d) d'un gourmand (Morisset 2012).

Pour étudier la ramification épicornique, différentes méthodes ont été développées. Les traces épicornique ont été observées grâce à la dissection au moyen de machines à bois, dans le plan transversal et par tranche de 1 à 2 mm d'épaisseur, du billon de bois à la hauteur du défaut (Fontaine et al., 2004). Cette méthode est longue à réaliser et ne permet d'observer que des ramifications épicorniques présentes à l'extérieur de tronc. Une nouvelle méthode a été développée avec la tomographie à rayon-X (Colin et al., 2010a ; Morisset 2012). Cette méthodologie ex-situ donne une vision de l'intérieur du bois avec une quantification très précise des épicorniques.

Dans le cadre d'une étude quantitative des épicorniques du chêne sessile (Morisset et al., 2012a), une forte corrélation a été mise en évidence entre le nombre d'épicorniques présents près de la moelle et ceux présents sur l'écorce (Fig. 2). Cela confirme que la mise en place des épicorniques ne dépend pas seulement de l'ontogénèse, de l'environnement (l'eau et la lumière par exemple), mais aussi de la croissance, contrôlée par la sylviculture et la génétique (Colin et al., 2010b). Ce déterminisme génétique est confirmé sur des descendance de chêne blanc *Quercus alba L.* âgées de 25 ans (Meier et Saunders 2013) : fort effet sur la croissance et le développement et faible effet sur les épicorniques. Certaines familles présentent plus de gourmands et de bourgeons dormants par branche séquentielle. Jensen (2000) a montré que la production de gourmands chez des provenances de chênes pédonculés de 24 ans est sous déterminisme génétique, probablement en combinaison avec l'effet de l'environnement.

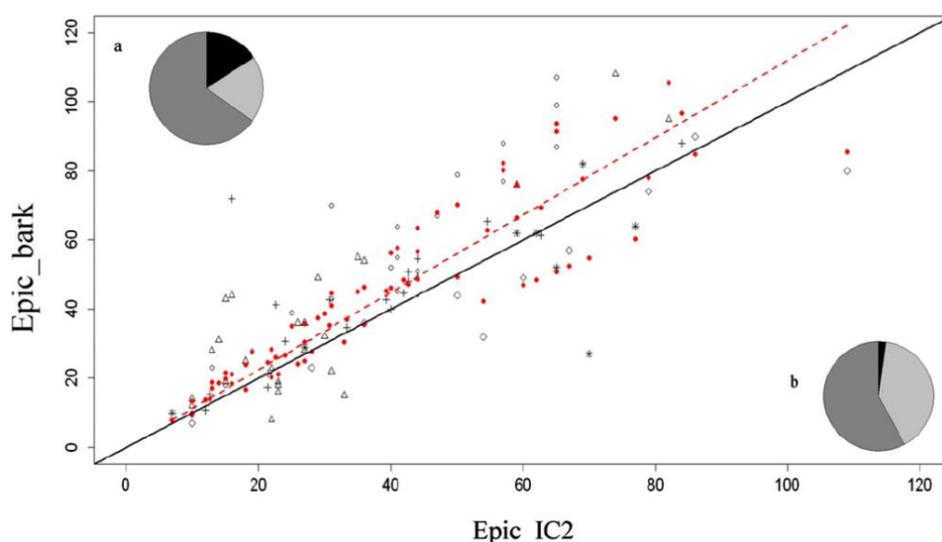


Fig.2. La corrélation entre les épicorniques près de la moelle et ceux sur près de l'écorce, les points rouges représentent les prédictions par le modèle (Morisset et al., 2012a).

1.4 QTL

Un QTL (qualitative trait loci) est une région chromosomique qui contient un ou plusieurs gènes qui affectent des caractères quantitatifs. Beaucoup de caractères varient de manière continue ; ils présentent un grand intérêt économique dans le domaine de l'agriculture, par exemple la durée de vie et la qualité des tomates (Pereira da Costa et al., 2013), la tolérance au métal du blé (Dai et al., 2013). Ils sont présents

aussi chez les arbres : plusieurs études ont montré la présence des QTLs de l'architecture et de la ramification chez certaines essences (pommier : Segura et al., 2009 ; prunier : Socquet-Juglard et al., 2013 ; peuplier : Wu 1998, Zhang et al., 2006 ; jatropha : Sun et al., 2012 ; pin : Shepherd et al., 2002 ; châtaigner : Casasoli et al., 2004). Mais les QTLs qui correspondent à la ramification du chêne pédonculé sont encore inconnus.

1.5 Objectif

L'objectif de ce travail de 6 mois a été de déterminer l'effet génétique sur les épicorniques et la ramification séquentielle du chêne pédonculé.

Pour atteindre cet objectif plusieurs étapes ont été franchies :

- l'interprétation des images de billon scannés,
- l'acquisition des données quantitatives de ramification,
- l'analyse statistique pour repérer des QTLs (Qualitative Trait Loci).

2. Matériels et méthodes

2.1 Préparation du site et des plants

Une hybridation intra-spécifique contrôlée du chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) a été faite par croisement de deux arbres adultes (Fig. 3). Ce croisement a été réalisé par l'équipe Ecologie et Génomique Fonctionnelles BioGeCo (UMR 1202 INRA-Université Bordeaux 1) en 1992. Le parent mâle (nommé A4) provient d'une forêt près d'Arcachon, le parent femelle (nommé 3P) provient de la station de recherche forestière à Pierroton. 278 clones ont été obtenus parmi plus de 400 graines après le croisement, une carte génétique a été construite par suite d'un génotypage de ces 278 clones (Barreneche et al., 1998 ; Saintagne et al., 2004). Les 278 plantes de génotypes différents ont été ensuite plantées et recepées régulièrement dans le domaine expérimental de Pierroton.

Une multiplication végétative des 278 clones a été réalisée par bouturage. Ensuite les boutures ont été plantées aléatoirement sur un site à Bourran dans le Sud-ouest de la France en 2000. Le site a été éclairci en 2012, 400 billons de 1 mètre (dont 2 individus par clone) ont été obtenus et transportés à l'INRA Nancy pour analyse.



Fig.3. Les différentes étapes de création du matériel échantillonné

2.2 Observation par tomographie à rayon X

Un tomographe à rayons X destiné à une utilisation médicale a été acquis par le LERFoB en 2008. Pour scanner les billons, l'objet à scanner est limité à un poids maximum de 180kg, un diamètre de 0.5m, une longueur de 1.5m. La rapidité d'acquisition est de 150 images par minute. La machine explore l'échantillon par tranches de 2.5mm. Les rayons X sont émis par la machine et traversent l'échantillon (Fig. 4). Captés par des détecteurs, les rayons sortis du matériau analysé sont transformés en signaux électriques transformés à leur tour en différents niveaux de gris sur les images. Le matériau présente une atténuation de rayons X selon sa densité et son humidité (Freyburger et al., 2009). Moins le matériel est dense ou humide, plus l'image est sombre.



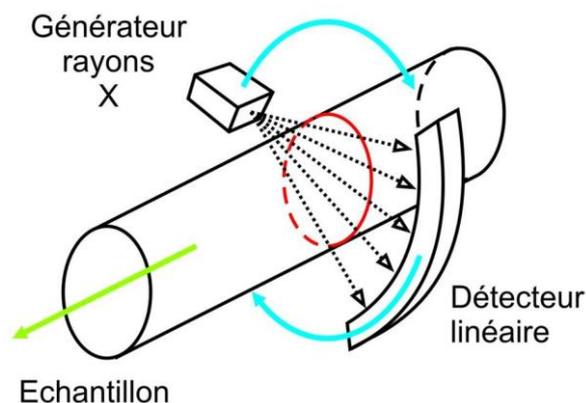


Fig.4. Le principe de fonctionnement du scanner à rayons X

Les images sont ensuite collectées et exploitées par le logiciel libre « ImageJ » (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), un logiciel qui permet de lire des images séquentielles.

2.3 Interprétation des images

Sur les images scannées (Fig. 5), quatre grands types de traces de ramification peuvent être repérés :

- les nœuds de branche séquentielle, branche ayant comme origine la moelle du tronc,
- les traces de bourgeons primaires, traces fines ayant comme origine la moelle du tronc,
- les traces de bourgeons secondaires, traces fines ayant comme origine d'autres axes que le tronc (bourgeons primaires, branches séquentielles ou gourmands),
- les branches épïcormiques (ou gourmands), ayant comme origine une trace de bourgeon épïcormique.

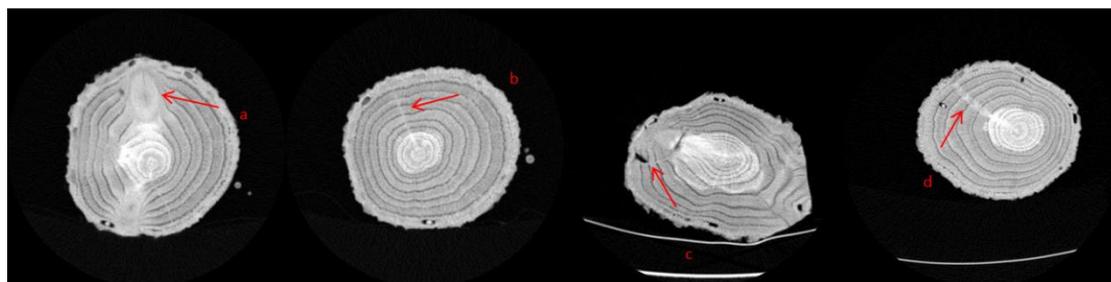


Fig. 5. Images transversales d'un billons de chêne pédonculé montrant la trace raméale (a) d'une branche séquentielle, (b) d'un bourgeon primaire, (c) d'un bourgeon produit par une branche, (d) d'un gourmand.

Avec le plugin « Gourmands » qui a été développé par le LERFoB (Fig. 6) (<https://www2.nancy.inra.fr/unites/lerfob/plateforme/pdf/analyse-images-scanner.pdf>), chaque élément est décrit en cliquant ses positions successives ; tous les types de ramification seront marqués en différent couleur (Freyburger et al., 2007).

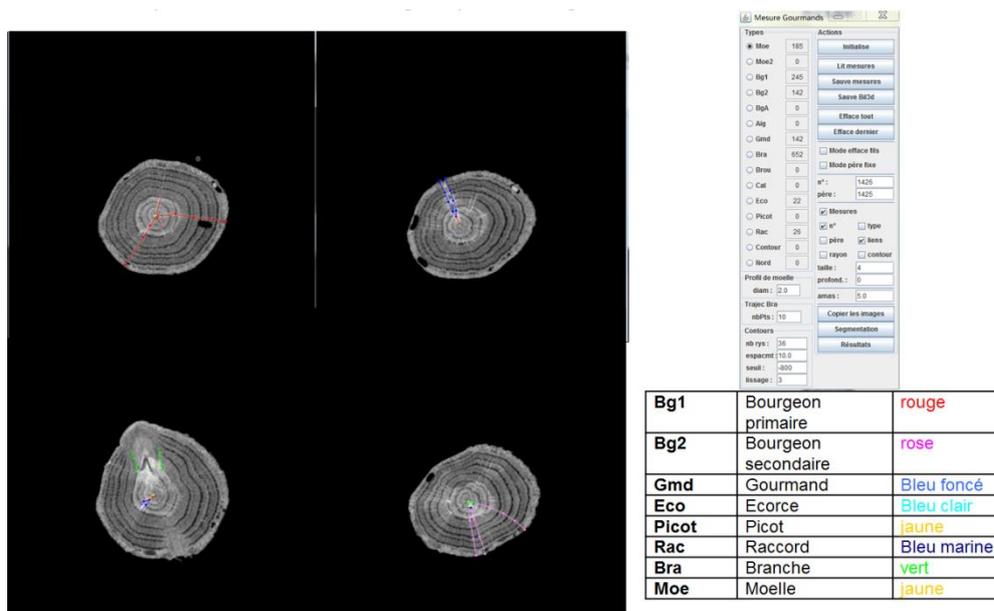


Fig. 6 interprétation des images par le plugin « Gourmands »

Une visualisation en trois dimensions peut être réalisée avec les mesures via un logiciel « Bil3D » qui a aussi été développé par le LERFoB (Fig. 7).



Fig.7. Visualisation des billons en 3D sous Bil3D.

2.4 Acquisition des données quantitatives

Les données quantitatives seront aussi acquises par les mesures. Tous les nombres (sauf le nombre de fourches) et les volumes seront calculés par 1 mètre. L'angle de branches est mesuré par une inclinaison entre la surface horizontale et la branche. 17 variables (traits) sont choisies ci-dessous:

- « Nvoie » : le nombre de voies (bourgeons primaires et branches),
- « Nbra » : le nombre de branches,
- « Nbg1 » : le nombre de bourgeons primaires
- « Nbg1d » : le nombre de bourgeons primaires débouchant
- « Nbg2 » : le nombre de bourgeons secondaires
- « Nbgd » : le nombre de bourgeons (primaires et secondaire) débouchant
- « Ngmd » : le nombre de gourmands
- « Rbg1dt » : le rapport entre le nombre de bourgeons primaires débouchant et de bourgeons primaires totaux (en pourcentage)
- « Rbgdt » : le rapport entre bourgeons débouchant et bourgeons totaux (en pourcentage)
- « Rgmdvoie » : le rapport entre le nombre de gourmands et de voies (en pourcentage)
- « Fourche » : le nombre de fourches (toutes les branches avec un angle >45°)
- « VB » : le volume de branches (cm³)
- « VG » : le volume de gourmands (cm³)
- « VT » : le volume de tronc (cm³)
- « RVBT » : le rapport entre le volume de branches et de tronc
- « Abra » : l'angle moyen des branches
- « dLC » : la différence entre la longueur exacte de moelle de tronc et la distance directe la plus courte du début à la fin de la moelle (cm).

Un nœud ou une trace de bourgeon est dit débouchant(e) quand il (elle) atteint l'écorce.

2.5 Cartographie de QTL

La cartographie de QTL est une technique pour étudier la localisation de QTL sur les chromosomes. Quatre choses peuvent être mises en évidence, i) la probabilité d'avoir un QTL sur le chromosome, ii) le nombre et la position de QTL de chaque trait, iii) l'importance ou la part de la variabilité expliquée par le QTL, iv) l'effet quantitatif des QTL.

Il y a deux grandes étapes pour faire la cartographie de QTL (Liu 1998).

- a) Une carte génétique de l'ensemble du génome doit être construite basée sur la fréquence de recombinaison entre les marqueurs (Annexe 1).

Selon les modalités de la recombinaison génétique, plus la distance physique entre deux gènes est grande, plus les possibilités d'avoir une recombinaison sont grandes. Cette fréquence de recombinaison est présentée en centimorgan (cM), 1cM = 1% de recombinaison. Le repérage moléculaire du polymorphisme a été beaucoup développé

comme les RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) depuis 1980 (Botstein et al., 1980). Aujourd'hui plusieurs méthodes beaucoup plus puissantes sont disponibles, par exemple les Microsatellites, les SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Si le nombre de groupes de liaison (linkage group ou LG) détectés par la cartographie génétique est égale au nombre de chromosomes, on parle d'une carte saturée et donc chaque LG correspond à un chromosome. Dans la carte génétique du chêne pédonculé 3PxA4, 12 groupes de liaison ont été identifiés pour la carte mâle (A4) et 12 pour la carte femelle (3P), représentant les 12 chromosomes de l'espèce *Quercus*. 345 marqueurs ont été repérés sur la carte femelle et 341 marqueurs ont été repérés sur la carte mâle, ce qui fait 28 marqueurs en moyenne par groupe de liaison.

- b) La recherche par analyse statistique de la corrélation significative entre les valeurs phénotypique du trait et l'état allélique de chaque marqueur moléculaire.

Si l'absence ou la présence du marqueur sur l'ensemble des génotypes est lié à des valeurs faibles ou fortes (ou inversement) d'un trait, le marqueur est lié au trait et on parle d'un QTL (Fig. 8). Le calcul statistique a été réalisé par le logiciel MultiQTL (University of Haifa <http://www.multiqtl.com/>).

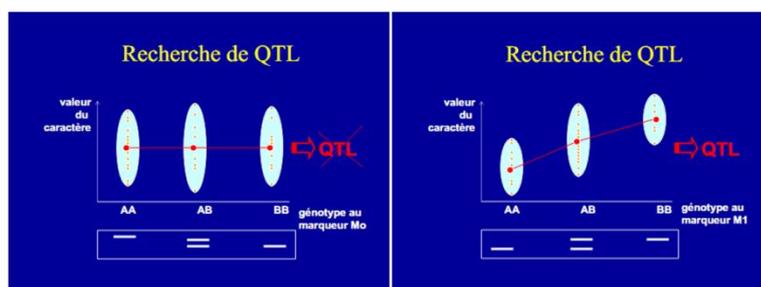


Fig.8. Principe de l'analyse statistique menée pour repérer les QTL.

La méthode CIM (composite interval mapping) a été utilisée pour identifier la probabilité d'existence de QTLs et estimer leurs effets phénotypiques (Zeng 1994). Le bootstrap (Visscher et al., 1996) a été utilisé pour estimer l'écart-type de la position de QTLs avec 25-1000 ré-échantillonnages. La probabilité génétique est calculée selon la formule suivante : $P_{gen} = 1 - (1 - P_{cim})^{M/m}$, « P_{cim} » est donnée par CIM, « M » est le nombre de marqueurs dans la carte génétique, « m » est le nombre de marqueurs dans le groupe de liaison. Pendant le stage, seulement les QTLs avec un $P_{gen} < 0.05$ ont été traités.

La cartographie de groupe de liaison et de QTLs a été réalisée avec le logiciel MapChart (<http://www.wageningenur.nl/en/show/Mapchart.htm>). Les QTLs sont localisés en positionnant 4 valeurs, qui sont, depuis la plus petite vers la plus grande : L_{est} = position du QTL en cM estimée par l'analyse CIM, L_{BS} = position de QTL calculée par l'analyse bootstrap, ICb = la position estimée la plus basse obtenue par l'analyse bootstrap, ICb = la position estimée la plus haute obtenue par l'analyse bootstrap (les valeurs sont fournies en annexe 2).

3. Résultats

3.1 Variance phénotypique

Une grande variation a été observée sur tous les caractères parmi ces 179 génotypes (tableau 3). En moyenne, il y a environ 30 branches, 30 bourgeons primaires par mètre. Le bourgeon secondaire peut être absente ou pratiquement deux fois plus que le bourgeon primaire. Le nombre de gourmands peut varier entre 0 et environ 50, on trouve aussi une diversité sur le volume de bois ($1300\text{cm}^3 \sim 14700\text{cm}^3$) et l'angle moyen de branche ($9^\circ \sim 33^\circ$).

	N	Moyenne	Minimum	Maximum	SD	CV
Nvoie	179	61,94	31,21	103,54	13,88	22,42
Nbra	179	33,38	14,48	54,55	7,59	22,75
Nbg1	179	30,53	3,39	68,14	13,87	45,42
Nbg1d	179	21,88	1,69	59,29	11,19	51,13
Nbg2	179	18,74	0,00	118,22	16,45	87,74
Nbgd	179	36,47	1,69	148,03	22,09	60,57
Ngm	179	11,29	0,00	48,88	7,80	69,14
Rbg1dt	179	0,71	0,18	1,00	0,15	20,99
Rbgdt	179	0,73	0,27	0,98	0,14	18,86
Rgmdvoie	179	0,18	0,00	0,71	0,11	62,89
fourche	179	2,17	0,00	8,00	1,64	75,84
VB	179	243,05	9,90	765,65	140,29	57,72
VG	179	3,89	0,00	27,80	4,04	103,73
VT	179	6175,69	1350,08	14731,51	2782,50	45,06
RVBT	179	2,08	0,00	10,07	2,36	113,35
Abra	179	20,71	9,47	33,41	4,85	23,40
dLC	179	3,39	0,72	11,76	1,85	54,47

Tableau 3. Statistique descriptive des traits. N, nombre d'individu ; SD, écart-type ; CV, coefficient de variation en pourcentage ($\text{SD}/\text{moyenne} \times 100$).

La matrice de corrélation entre les traits est présentée dans le tableau 4. Les corrélations ont été trouvées surtout dans le bourgeon; le nombre de voies est corrélé positivement avec le nombre de bourgeons primaires, le volume de branche est corrélé avec le nombre de branche, ce qui apparaît logique.

	Nv	Nb	N1	N1d	N2	Nbgd	Ng	R1	Rb	Rg	f	VB	VG	VT	RVBT	A	d
Nvoie	1																
Nbra		1															
Nbg1	**		1														
Nbg1d	**		***	1													
Nbg2					1												
Nbgd	*		*	**	**	1											
Ngmd							1										
Rbg1								1									
Rbgdt								**	1								
Rg							***	*	*	1							
Fourche											1						
VB												1					
VG						*			*				1				
VT											*			1			
RVBT															1		
Abra																1	
dLC																	1

Tableau 4. Coefficients de corrélation entre traits. $r > 0.6$, « * »; $r > 0.8$, « ** »; $r > 0.9$, « *** »

3.2 Détection de QTL

17 QTLs sont détectés dans la carte femelle et 21 QTLs ont été détectés dans la carte mâle. Ces QTLs sont localisés sur la plupart des chromosomes (Fig. 9), et les LG (linkage groups) 6M, 7M, 8F, 11M ont au moins 4 QTLs détectés.

3.2.1 La ramification

Pour le trait « Nbg1 » (le nombre de bourgeons primaires), 6 QTLs ont été détectés sur 6 chromosomes différents, au total ils expliquent 45,6% de la variabilité de ce trait. Les 2 QTLs qui correspondent à « Nbg2 » (le nombre de bourgeons secondaires) expliquent 14% de la variation ; ils sont très proches de 2 QTLs de Nbg1 sur le LG 6M et 8F. Les 3 QTLs du trait « Nbg1d » (le nombre de bourgeons primaires débouchant) sont superposés ou très proche des QTLs de Nbg1. Ces trois traits se concentrent sur LG 6M, 7M, 8F, 11M. Ces zones “sensibles” montrent une grande capacité de contrôler le développement des bourgeons chez le chêne pédonculé.

Par contre les 4 QTLs de « Nbgd » (le nombre de bourgeons débouchant) ne sont pas tous co-localisés avec d’autres QTLs de bourgeon. Par exemple sur LG 12F, ce QTL a un effet négatif à -11,52, cela signifie qu’il y aura moins de 11 bourgeons débouchant par mètre en présence de ce QTL. C’est la même chose pour le trait « Rbgdt » (le rapport entre bourgeons débouchant et bourgeons totaux) sur LG 12M.

Pour la ramification séquentielle « Nbra » (le nombre de branches), un seul QTL significatif a été trouvé sur LG 1M, avec un effet positif de 4, 68 et 8,7% de variation expliquée. Au contraire pour la ramification épécormique « Ngmd » (le nombre de gourmands), 5 QTLs qui expliquent 31,1% de la variation ont été détectés. Et pour la variable « Nvoie » (le nombre de bourgeons primaires et de branches), il y a 4 QTLs qui expliquent 32% de variation de ce trait. Vu que les gourmands sont développés sur des bourgeons, et que les voies contiennent des bourgeons primaires, ce n’est pas une surprise que certains QTLs soient trouvés dans les zones “sensibles” pour les QTLs de bourgeonnement comme LG 6M, 7M, 8F, 11M. Mais il y a aussi des QTLs de gourmands qui sont assez indépendants sur LG 3M, 4M et 10F.

3.2.2 La croissance et l’architecture

Il y a moins de QTLs significatifs trouvés pour la croissance et l’architecture par rapport à la ramification. 2 QTLs avec un effet négatif de 70 cm³ sont détectés sur LG 4F et 10M pour le trait « VB » (le volume de branches par mètre), ils expliquent 12,4% de variation. Pour « VT », le volume de tronc, un seul QTL avec 5,6% de variation expliqué est détecté sur LG 3M. En présence de ce QTL, l’arbre pourrait avoir 1327cm³ de volume de tronc en plus par mètre.

2QTLs sont trouvés pour le trait « fourche » (le nombre de branches avec un angle >45°), et aucun QTL significatif est trouvé pour la variable « Abra » (angle moyen des branches) et « dLC » (la différence entre la longueur et la corde de tronc).

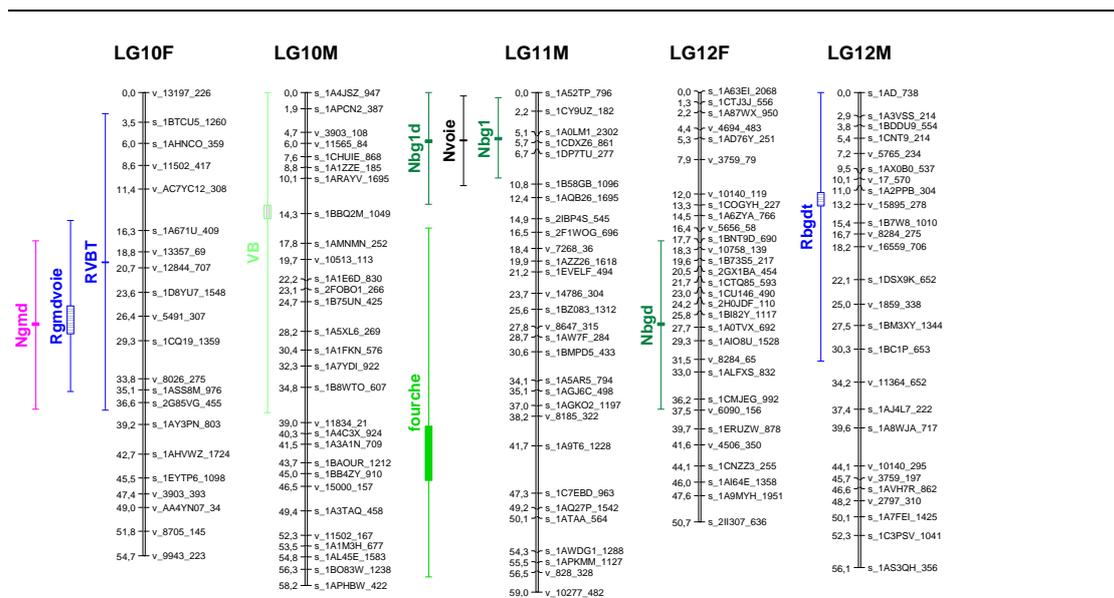


Fig.9. Localisation des QTLs détectés. La position de chaque QTL est quantifiée par 4 valeurs, qui sont, depuis la plus petite vers la plus grande : L_est = position du QTL en cM estimée par l'analyse CIM , L_BS = position de QTL calculée par l'analyse bootstrap , ICb = la position estimée la plus basse obtenue par l'analyse bootstrap, ICh = la position estimée la plus haute obtenue par l'analyse bootstrap. Les valeurs sont en annexe 2.

4. Discussion

4.1 Bourgeon adventif

La comparaison des images scanners du chêne pédonculé et celles du chêne sessile montre que les deux essences ont des ramifications similaires. Dans la littérature ancienne, pour le genre *Quercus*, il a été montré que certaines espèces comme *Q. alba* et *Q. nigra* (Kormanik et Brown, 1967) sont capables de produire des bourgeons adventifs, c'est-à-dire des bourgeons qui n'émergent pas de la moelle d'une position axillaire (souvent suite aux blessures). D'autres comme *Q. robur* et *Q. petraea* ne semblent pas avoir cette capacité (Wignall et al., 1987 ; Fontaine, 1999). Mais pendant l'interprétation des images scanner, au moins 5 billons ont été trouvés avec 1 ou 2 bourgeons adventifs (Fig. 10).

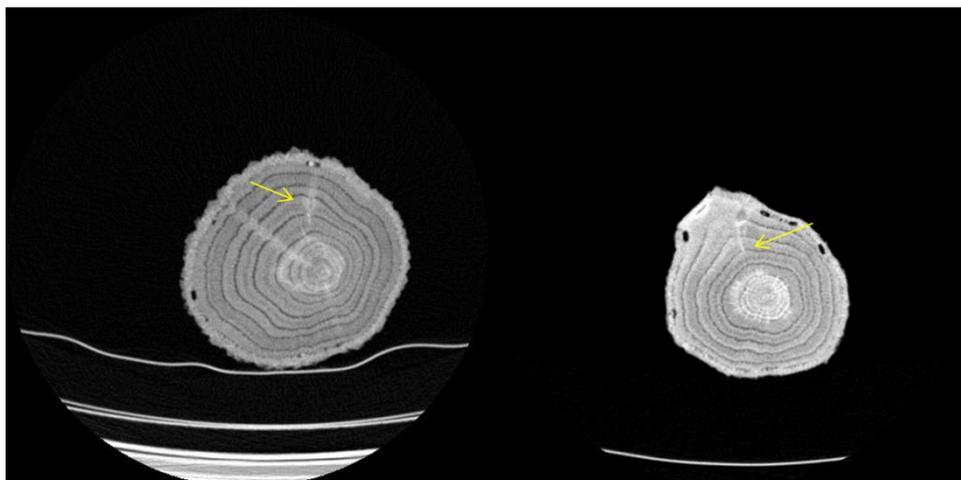


Fig.10. Bourgeon adventif sur l'image scannée

4.2 Détection des QTLs

L'analyse QTL a été effectuée sur 179 individus sans répétition, donc ni une héritabilité ni un effet additif ne pouvait être calculé. Le nombre de QTLs est sous-estimé et l'effet phénotypique de chaque QTL surestimé (Beavis 1995). Dans cette étude, 38 QTLs ont été détectés et un pourcentage de 4% à 11.7% selon les traits a été expliqué par les QTLs : 32 QTLs de 8 traits pour la ramification, 4 QTLs de 3 traits pour la croissance, 2 QTLs de 1 trait pour l'architecture. Dans ce mémoire je n'ai présenté que les QTLs significatifs. Mais il y a encore des QTLs supposés ($P_{CIM} < 0.05$, $P_{gen} > 0.05$) qui ne sont pas présentés (21 QTLs chez la carte mâle et 26 QTLs chez la carte femelle).

Les QTLs détectés de Nbg1 expliquent 3 fois plus de variation que ceux de Nbg2, donc il semble qu'il existe un déterminisme génétique plus fort pour les bourgeons primaires que pour les bourgeons secondaires. La co-localisation de QTLs de Nbg1d et Nbg1 est logique car plus il y a de bourgeons primaires, plus il y en a qui débouchent. L'indépendance de QTL de Nbgd sur LG 12F et de Rbgdt sur LG 12M a été observée ; ces QTLs ont donc très probablement une fonction de conditionner l'état feuillé de l'arbre en contrôlant le maintien des bourgeons latents jusqu'à l'extérieur du tronc.

Les QTLs de Ngmd et de Nvoie ont environ 32% de variation expliquée ; ils ont un déterminisme génétique similaire, mais moins fort que Nbg1. Ceci confirme que comme un caractère adaptatif, l'effet génétique de la production de gourmands est moins important que l'effet environnemental (Jensen 2000 ; Meier et Saunders, 2013). L'effet génétique sur les nombres de bourgeons secondaires est faible ; les nombres semblent être influencés plutôt par l'environnement.

Pour les traits de l'architecture, on n'a pas trouvé de QTL pour Abra et dLC, donc il existe un fort impact environnemental pour ces traits. Pour détecter un éventuel effet génétique, il faudrait disposer soit de plus d'individus, soit de plus de répétitions par individu.

4.3 Co-localisation de QTLs

La carte génétique a été mise à jour plusieurs fois par les chercheurs de l'équipe Ecologie et Génomique Fonctionnelles BIOGECO (UMR 1202 INRA-Université Bordeaux 1) depuis 2004. Ainsi les positions exactes de QTLs détectés dans les anciennes études sur chêne pédonculé 3PxA4 à partir d'anciennes cartes, ne sont pas comparables avec celles trouvées dans notre étude. Par contre l'appartenance des QTLs à certains chromosomes reste valable. Par exemple dans notre étude on a trouvé sur le chromosome 11M des QTLs de fourche, de bourgeon primaire et de voies. Sur ce même chromosome avaient été détectés plusieurs QTLs qui correspondent à la composition carbone isotopique, au LMA (Leaf mass per surface area) par Brendel et al., (2008) et au nombre de jours nécessaires jusqu'au débourrement des bourgeons par Scotti-Saintagne et al., (2004). De plus d'après Antoine Kremer (communication personnelle) le chêne et le châtaigner sont génétiquement très proches. Or chez le châtaignier, on retrouve aussi des QTLs du débourrement des bourgeons sur le chromosome 11M. Un autre exemple est le QTL de croissance. Dans notre étude, 2 QTLs de volume de branche et de tronc sont trouvés sur les chromosomes 3M et 10M. Or les QTLs de croissance en hauteur ont été détectés sur ces chromosomes par Scotti-Saintagne et al., (2004). Tous ces résultats démontrent qu'il serait très intéressant d'aller plus loin dans l'étude de l'organisation de ces chromosomes pour trouver des vraies co-localisations de QTLs de traits différents.

5. Conclusion

La tomographie à rayons X nous permet d'observer l'intérieur de billons sans les découper ; à l'aide de cette nouvelle technologie, certains caractères sont maintenant facilement observables. Pour plusieurs des caractères ainsi observés, plusieurs QTLs ont été détectés sur la carte génétique du chêne pédonculé. Ces QTLs correspondent à plusieurs variables quantifiant des phénomènes importants comme la ramification (le développement de bourgeons latents, de gourmands et de branches), la croissance (le volume de branche et de tronc) et la présence de fourche. Selon ces QTLs, un effet génétique important sur les effectifs et le débourrement des bourgeons primaires est démontré avec 45,6% de variation expliquée. L'effet environnemental semble plus considérable pour les bourgeons secondaires. L'importance de l'effet génétique sur les gourmands est confirmée. Un déterminisme génétique pour l'instant non trouvé pour certains traits d'architecture, pourrait être détecté avec un échantillonnage amélioré. Sur la base des QTLs détectés, une amélioration génétique pourrait être menée, ce qui présenterait un grand intérêt pour l'amélioration de la qualité du bois de chêne pédonculé.

6. Perspectives

Les prochaines études seront menées dans le cadre d'une thèse AgroParisTech que je démarrerai en octobre 2013, encadrée conjointement par le LERFoB, BIOGECO et

EEF. Le titre provisoire est : décoder l'architecture génétique des traits de qualité du bois et de ramification en combinant l'utilisation des informations génomiques et la tomographie à rayons X. Pour affiner l'analyse de QTL avec une valeur phénotypique moyenne sur plusieurs répétitions, nous analyserons une répétition déjà disponible des 179 billons pas encore scannée et interprétée. Davantage de QTLs pourront ainsi être détectés et davantage de variance sera très probablement expliquée par les QTLs repérés. Une analyse d'ACP est prévue pour regrouper les traits très corrélés statistiquement, expliquer ainsi pourquoi certains QTLs sont très proches et ensuite simplifier l'analyse des QTLs. La co-localisation de QTLs, tenant compte de QTLs identifiés dans des études anciennes portant sur la composition en carbone isotopique, l'efficacité d'utilisation de l'eau, la croissance et tenant compte des nouvelles cartes génétique 3PxA4 sera également étudiée en détail. De nouveaux traits relatifs à la qualité du bois et aux extractibles des nœuds seront étudiés.

7. Bibliographie

- Barreneche T, Bodénès C, Lexer C, Trontin J-F, Fluch S, Streiff R, Plomion C, Roussel G, Steinkellner H, Burg K, Favre J-M, Glössl J, Kremer A.** 1998. A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, micro-satellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theor Appl Genet.* 97:1090–1103.
- Beavis WD.** 1995. The power and deceit of QTL experiments: lessons from comparative QTL studies. *Proc 49th Annu Corn and Sorghum Industry Res Conf* 1994:304–312.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW.** 1980. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet* 32:314-331.
- Brendel O, Le Thiec D, Scotti-Saintagne C, Bodénès C, Kremer A, Guehl J-M.** 2008. Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L.. *Tree Genetics & Genomes.* 4:263-278.
- Casoli M, Pot D, Plomion C, Monteverdi MC, Barreneche T, Lauteri M, Villani F.** 2004. Identification of QTLs affecting adaptive traits in *Castanea sativa* Mill. *Plant Cell Environ.* 27:1088-1101.
- Colin F, Robert N, Druelle JL, Fontaine F.** 2008. Initial spacing has little influence on transient epicormic shoots in a 20-year-old sessile oak plantation. *Ann For Sci* 65:508–517.
- Colin F, Mothe F, Freyburger C, Morisset JB, Fontaine F, Leban JM.** 2010a. Tracking rameal traces in sessile oak trunks with X-ray computer tomography: biological bases, preliminary results and perspectives. *Trees.* 24:953-967.
- Colin F, Ducouso A, Fontaine F.** 2010b. Epicormics on 13-year-old *Quercus petraea*: low effect of provenance and high influence of branches and growth unit limits. *Ann.*

For. Sci. 67:312-323.

Dai J, Bai GH, Zhang DD, Hong DL. 2012. Validation of quantitative trait loci for aluminum tolerance in Chinese wheat landrace FSW. *Euphytica*. 192: 171-179.

Fink S. 1980. Anatomische Untersuchungen über das Vorkommen von Spross- und Wurzelanlagen im Stammbereich von Laub und NadelBäumen. *Allg Forst-u J-Ztg*, 151, Jg. 9, 160–182.

Fontaine F. 1999. Les bourgeons épïcormiques chez le chêne sessile (*Quercus petraea*): établissement des bases en vue de l'évaluation dynamique d'un potentiel épïcormique. Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne, Volume I, & Volume II.

Fontaine F, Kiefer E, Clément C, Burrus M, Druelle JL. 1999. Ontogeny of proventitious epicormic buds in *Quercus petraea*. II. From 6 to 40 years of the tree's life. *Tree Struct Funct* 14:83–90.

Fontaine F, Mothe F, Colin F, Duplat P. 2004. Structural relationships between the epicormic formations on trunk surface and defects induced in the wood of *Quercus petraea*. *Tree Struct Funct* 18:295–306.

Freyburger C, Mothe F, Colin F, Fontaine F. 2007. Exploitation d'images tomographiques RX pour l'analyse de la structure interne des gourmands de chêne. Procédure d'utilisation du plugin « Gourmands » avec IMAGEJ.

<https://www2.nancy.inra.fr/unites/lerfob/plateforme/pdf/analyse-images-scanner.pdf>

Freyburger C, Longuetaud F, Mothe F, Constant T, LEBAN J-M. 2009. Measuring wood density by means of X-rays computer tomography. *Annals of forest science*. 66:804.

IFN. 2012. <http://inventaire-forestier.ign.fr/spip/spip.php?article583>

Jensen JS. 2000. Provenance variation in phenotypic traits in *Quercus robur* and *Quercus petraea* in Danish provenance trials. *Scand J For Res*. 15:297–308.

Kormanik PP, Brown CL. 1967. Origin and development of epicormic branches in sweetgum. USDA Forest Service, Research Paper. SE-54:1–17.

Liu BH. 1998. Genomics, Linkage Mapping and QTL Analysis. CRC Press, Boca Raton, FL.

Meier A, Saunders MR. 2013. Assessing internal epicormic dynamics in *Quercus alba* L. using CT scanning: the strong effect of shoot development and tree growth relative to progeny level genetic variation. 27:865-877

Morisset JB. 2012. Tomographie à rayons X ; analyse et modélisation de l'ontogénèse des épïcormiques du chêne sessile (*Quercus petraea* (L.) Matt.). Thèse de doctorant en sciences forestières. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech).

Morisset JB, Mothe F, Colin F. 2012a. Observation of *Quercus petraea* epicormics with X-ray CT reveals strong pith to bark correlations: Silvicultural and ecological implications. *Forest ecology and management* 278:127-137.

Nicolini E, Barthélémy D, heuret P. 2000. Influence de la densité du couvert forestier sur le développement architectural de jeunes chênes sessiles, *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. (Fagaceaea), en régénération forestière. *Canadian journal of botany*

78:1531-1544.

Pereira da Costa JH, Rodriguez GR, Pratta GR, Picardi LA, Zorzoli R. 2013. QTL detection for fruit shelf life and quality traits across segregating populations of tomato. *Scientia Horticulturae*. 156:47-53.

Scotti-Saintagne C, Bodenes C, Barreneche T, Pot D, Plomion C, Kremer A. 2004. Distribution of genomic regions differentiating oak species assessed by QTL detection. *Heredity*. 92:20–30.

Scotti-Saintagne C, Bodenes C, Barreneche T, Bertocchi E, Plomion C, Kremer A. 2004. Detection of quantitative trait loci controlling bud burst and height growth in *Quercus robur* L.. *Theor Appl Genet* 109:1648–1659.

Segura V, Durel CE, Costes E. 2009. Dissecting apple tree architecture into genetic, ontogenetic and environmental effects: QTL mapping. *Tree Genetics & Genomes*. 5:165-179.

Shepherd M, Cross M, J.Dieters M, Henry R. 2002. Branch architecture QTL for *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *Pinus caribaea* var. *hondurensis* hybrids. *Ann. For. Sci.* 59:617-625.

Socquet-Juglard D, Christen D, Devenes G, Gessler C, Duffy B, Patocchi A. Mapping Architectural, Phenological, and Fruit Quality QTLs in Apricot. *PLANT MOLECULAR BIOLOGY REPORTER*. 31:387-397.

Sun F, Liu P, Ye J, Lo LC, Cao S, Li L, Yue GH, Wang CM. 2012. An approach for *Jatropha* improvement using pleiotropic QTLs regulating plant growth and seed yield. *Biotechnology for Biofuels*. 5:42.

Visser PM, Thompson R, Haley CS. 1996. Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics*. 143:1013–1020.

Wignall TA, Browning G, Mackenzie KAD. 1987. The physiology of epicormic emergence in pedunculate oak (*Quercus robur* L.): responses to partial notch girdling in thinned and unthinned stands. *Forestry*. 60:45–56.

WU RL. 1998. Genetic mapping of QTLs affecting tree growth and architecture in *Populus*: implication for ideotype breeding. *Theor Appl Genet*. 96:447-457.

Zeng ZB. 1994. Precise mapping of quantitative trait loci. *Genetics*. 136:1457–1468.

Zhang DQ, ZHANG ZY, Yang K. 2006. Genetic mapping of QTLs affecting tree growth and architecture in *Populus*: implication for ideotype breeding. *Can. J. For. Res.* 36:2015-2023.

Annexe 2. QTLs significatifs détectés

trait	sex	chr	NrMQ	L_est	PEV_est	N	L_BS	ICb	ICb	BSeff
Nvoie	femelle	3	22	12,67	0,04	179	22,28	0	45,8	-6,05
Nvoie	femelle	8	30	29,25	0,088	179	21,98	2,6	41,3	8,966
Nvoie	male	7	24	7,764	0,075	179	7,486	0,98	13,99	-8,11
Nvoie	male	11	29	5,566	0,117	179	5,715	0,44	10,99	-9,78
Nbra	male	1	26	38,94	0,087	179	39,73	29,5	50	4,678
Nbg1	femelle	6	27	44,45	0,081	179	41,23	25,6	51	8,286
Nbg1	femelle	8	30	29,79	0,083	179	24,7	5,2	44,2	8,766
Nbg1	male	6	30	28,74	0,077	179	26,58	6,5	46,7	8,009
Nbg1	male	7	24	7,687	0,091	179	8,308	0	16,94	-8,818
Nbg1	male	9	26	28,14	0,048	179	36,57	5,3	54,8	7,165
Nbg1	male	11	29	5,566	0,076	179	5,332	0,56	10,11	-7,753
Nbg1d	femelle	8	30	18,1	0,089	179	18,61	8,3	29	6,948
Nbg1d	male	7	24	8,493	0,065	179	12,08	0	26,6	-6,383
Nbg1d	male	11	29	5,566	0,07	179	5,873	0	13,19	-6,166
Nbg2	femelle	8	30	21,45	0,063	179	20,89	2,7	39,1	8,922
Nbg2	male	6	30	23,8	0,077	179	22,23	0	48,1	9,909
Nbgd	femelle	8	30	18,52	0,086	179	17,93	4,6	31,2	13,71
Nbgd	femelle	9	26	40,16	0,047	179	35,88	19,9	51,9	-10,34
Nbgd	femelle	12	30	27,18	0,066	179	27,45	17,5	37,4	-11,14
Nbgd	male	6	30	28,74	0,07	179	17,97	0	46	12,65
Ngmd	femelle	10	21	28,5	0,05	179	27,12	15,7	38,5	-3,451
Ngmd	male	3	25	19,51	0,05	179	24,86	3,6	46,2	3,853
Ngmd	male	4	17	44,28	0,066	179	45,15	34,9	55,4	4,09
Ngmd	male	6	30	25,34	0,066	179	23,05	5,7	40,4	4,271
Ngmd	male	7	24	7,121	0,079	179	7,492	3,21	11,77	-4,528
Rbgdt	femelle	3	22	33,5	0,05	177	28,86	12,1	45,6	-6,622
Rbgdt	male	1	26	25,08	0,059	179	28,67	4,7	52,6	7,271
Rbgdt	male	12	26	11,82	0,044	179	13,38	0	31,7	5,78
Rgmdvoie	femelle	3	22	33,71	0,058	177	33,58	14	51,9	5,796
Rgmdvoie	femelle	8	30	56,18	0,045	179	46,59	19,7	60,2	4,948
Rgmdvoie	femelle	10	21	28,5	0,055	179	25,21	15,1	35,3	-5,469
Rgmdvoie	male	4	17	44,28	0,074	179	45,75	35,6	55,9	6,424
fourche	femelle	4	26	25,96	0,071	179	26,73	14,9	38,6	-0,929
fourche	male	11	29	45,76	0,063	179	39,43	16	57,2	0,843
RVBT	femelle	10	21	20,14	0,085	176	19,98	2,5	37,5	-1,413
VB	femelle	4	26	6,535	0,068	179	7,931	0	20,53	-75,41
VB	male	10	29	13,25	0,056	177	14,9	0	37,8	-72,3
VT	male	3	25	38,37	0,056	179	38,79	22,9	54,7	1327,07

chr : chromosome, NrMQ : le nombre de marqueurs, L_est : position du QTL en cM estimée par l'analyse CIM, PEV_est : pourcentage de variation expliquée, N : nombre d'individus dans l'analyse, L_BS : position de QTL calculée par l'analyse bootstrap, ICb et ICb : la position estimée la plus basse et plus haute obtenue par l'analyse bootstrap, BSeff : l'effet de remplacement allélique. Les 4 valeurs qui permettent de quantifier la position des QTLs dans les chromosomes sont: L_est, L_BS, ICb et ICb.

Titre : Analyse QTL de la ramification du chêne pédonculé, observée par tomographie à rayon X

Résumé :

Dans cette étude, une analyse de Quantitative Trait Loci (QTL) a été réalisée à partir d'une carte génétique comportant 686 marqueurs et un jeu de 179 individus de *Quercus robur* L. provenant d'un croisement intra-spécifique. Les données quantitatives sont mesurées par l'interprétation d'images scannées, obtenues par tomographie à rayon X. 38 QTLs ont été détectés et une variation de 4% à 11.7% estimée sur 16 de 24 chromosomes. Ces QTLs correspondent : 1) au développement de bourgeons latents, de gourmands et de branches; 2) au volume de tronc et de nœud de branche ; 3) à la présence de fourche. Cette étude démontre un effet génétique fort pour les nombres et le débourrement des bourgeons primaires ; l'effet environnemental est plus considérable pour le bourgeon secondaire. L'importance du déterminisme génétique des gourmands est confirmée. Peu de QTL correspondant à l'architecture ont été trouvés, mais il serait possible de les détecter avec plus d'individus ou plus de répétitions.

Mots clés : Quantitative Trait Loci, scanner, épïcormiques, *Quercus robur*

Title : Analysis of QTL for branching traits on *Quercus robur*, observed by X-ray tomography

Summary:

In this study, an analysis of Quantitative Trait Loci (QTL) was undertaken based on a genetic map with 686 markers and 179 sample individuals of *Quercus robur*, produced by an intra-specific crossing. Quantitative data were measured by interpreting scanned images, obtained by X-ray tomography. 38 QTLs were detected with an explained variation of 4% to 11.7% on 16 of the 24 chromosomes. These QTLs corresponded to: 1) the numbers of suppressed buds, epicormic shoots and sequential branches; 2) the volume of trunk and branch knots; 3) the presence of forks. This study evidenced a strong genetic effect on the production and the bud break of primary buds; the environmental effect is much more considerable for secondary buds. The importance of a genetic determinism for the epicormic shoots was confirmed. Few QTLs related to architecture were found. More individuals or more repetitions may probably allow their detection.