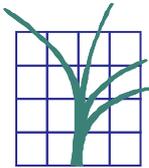


Ctifl



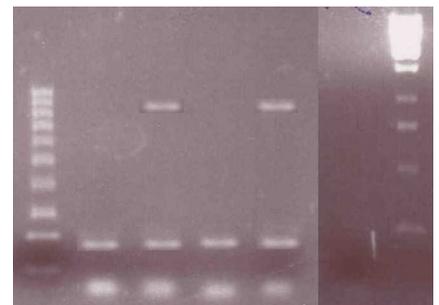
INH

*De la science du végétal
à la culture du paysage*

Stage ENSHAP 2^{ème} année



**Développement d'un test de sexage
d'*Actinidia chinensis*
à l'aide de marqueurs moléculaires**



Liste des livrables remis au CTIFL

A mon arrivée au CTIFL, je n'avais aucune idée des livrables que j'allais pouvoir rendre à mon maître de stage à la fin de ces trois mois, sinon celle d'un rapport sur les démarches et résultats éventuels. Je me suis cependant aperçue que je pouvais créer des outils utiles au test de sexage des plants de kiwi, qui pourront être réutilisés par ceux qui effectueront la manipulation après mon départ. Ils font partie des livrables que j'ai remis au CTIFL sous la forme d'un CD. J'ai également jugé utile de rendre mon cahier de manipulations, dans lequel j'ai noté tous mes travaux et résultats jour après jour depuis mon arrivée. Voici donc la liste des livrables qui accompagnent ce rapport :

- ✓ Calendrier de manipulations (dossier imprimé et son original informatique : Word « **Calendrier manipulations.doc** ») ;
- ✓ Protocole détaillé de réalisation du test (dossier imprimé et son original informatique : Word « **Protocole détaillé.doc** ») ;
- ✓ Feuille de calcul Excel permettant d'obtenir la composition du mélange réactionnel (mix) en fonction du nombre d'extraits à tester (Fichier « **Préparation mix.xls** ») ;
- ✓ Feuille de calcul Excel permettant de calculer la dilution nécessaire des extraits d'ADN après le passage au spectrophotomètre (Fichier « **Spectrophotomètre kiwi.xls** ») ;
- ✓ Une feuille Excel présentant les résultats du test et permettant d'obtenir le nombre de mâles, de femelles, le taux d'échec du test (Fichier « **Tests Hort 16 A.xls** ») ; Elle pourra servir à la saisie des prochains résultats.
- ✓ Un fichier Excel contenant toutes les informations nécessaires pour effectuer un calcul de coût du test (« **Evaluation du coût.xls** ») ;
- ✓ Une présentation Power Point expliquant les premiers résultats utilisés lors de la conférence des stagiaires du 18/07/2003 (« **Kiwi 18-07.ppt** »).

Remerciements

Avant de plonger dans l'univers vitaminé du kiwi, je tiens vivement à remercier quelques personnes qui ont fait de mon stage au CTIFL de Lanxade une période très enrichissante, de nombreuses manières...

Tout d'abord mon maître de stage, M. Hennion, pour la liberté qu'il m'a laissée dans l'organisation de mon travail, l'aide qu'il m'a apportée chaque fois que j'en ai eu besoin et l'intérêt qu'il a porté à mes résultats. Sa motivation et sa confiance ont été très appréciables, elles m'ont donné du cœur à l'ouvrage.

Je tiens aussi à remercier Pascal Gentit, qui, malgré le peu de temps dont il dispose, a suivi mes travaux et m'a guidée lorsque j'en avais besoin.

Un grand merci à Nathalie Grasseau, la technicienne du laboratoire de biologie moléculaire, qui m'a appris tout ce qui me manquait de connaissances pratiques et bien plus ; ses conseils, sa disponibilité et sa bonne humeur ont été inestimables.

Merci à M. Jourdain, directeur du CTIFL de Lanxade, pour l'intérêt qu'il porte aux stagiaires et la confiance qu'il nous donne.

Enfin, un grand merci à tous les résidents de la maison des stagiaires du CTIFL, avec qui j'ai passé des moments inoubliables : Audrey, Aurélie, Caroline, Cécile, Charles, Charlotte, Delphine, Flavie, Fred, Guillaume, Loïc, Lucile, Mélanie, Paul, Rodolphe, Sam et Sophie. J'espère que j'aurai la chance de retrouver quelques-uns d'entre vous dans le monde professionnel...

Liste des abréviations

✓ ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
✓ AFLP	Amplification Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur des fragments d'amplification).
✓ B	Base
✓ BEt	Bromure d'éthidium
✓ CTAB	Cétyl triméthyl ammonium bromide
✓ CTIFL	Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes
✓ DNTP	Désoxy Nucléoside 5' TriPhosphate (dATP, dCTP, dGTP et dTTP)
✓ DO α	Densité optique à α nm
✓ EDTA	Acide Ethylène diamine Tétracétique
✓ F	Femelle
✓ INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
✓ M	Mâle
✓ PCR	Polymerase Chain Reaction
✓ pH	Potentiel hydrogène
✓ RAPD	Random-Amplified Polymorphic DNA (ADN polymorphe amplifié au hasard)
✓ RNase A	Ribonucléase A
✓ SCAR	Sequence-Characterized Amplified Region (Caractérisation de produit d'amplification)
✓ Taq	Thermus aquaticus polymérase
✓ TBE	Tampon Tris Borate EDTA
✓ TE1	Tampon d'extraction CTAB
✓ Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
✓ UV	Lumière ultraviolette

Unités de mesure :

✓ cM	Centimorgan
✓ cm	Centimètres
✓ pb	Paire(s) de bases
✓ kpb	Kilo-paire(s) de bases
✓ mA	Milli-Ampère
✓ °C	Degré Celsius
✓ g	Gramme
✓ h	Heure
✓ L	Litre
✓ M	Mole par litre
✓ min	Minute
✓ ml	Millilitre
✓ mol	Mole
✓ nm	Nanomètres
✓ rpm	Rotations par minute
✓ s	Secondes
✓ V	Volt



Sommaire

I. PRESENTATION DU CTIFL, CENTRE TECHNIQUE INTERPROFESSIONNEL DES FRUITS ET LEGUMES	4
A. LA STRUCTURE DU CTIFL.....	4
B. LE CENTRE DE LANXADE	5
II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
A. TEST DE SEXAGE PAR DOSAGE DE LA PEROXYDASE (HIRSCH ET AL., 1997).....	6
B. TESTS DE SEXAGE DEVELOPPES A L'AIDE D'OUTILS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	6
1. Recherche de marqueurs moléculaires liés au sexe chez <i>Actinidia chinensis</i> (Harvey et al. 1997 a et b).....	7
2. Développement d'un test de sexage rapide et efficace (Gill et al. 1998).....	7
C. ETUDES PLUS RECENTES ET CONCLUSION	9
III. MATERIEL ET MISE AU POINT DU PROTOCOLE.....	10
A. MATERIEL	10
B. MISE AU POINT DU PROTOCOLE	10
1. Prélèvement des échantillons	10
2. Extraction.....	10
a) Le broyage à l'azote est remplacé par un broyage à la perceuse	11
b) Problèmes dus aux polysaccharides	11
c) Tampon d'extraction sans β -mercaptoéthanol	11
3. Dilution des extraits	12
4. Préparation du mélange réactionnel, PCR et révélation.....	13
a) Concentration en dNTP	13
b) Concentration en d'ADN	13
c) Différentes Taq polymérases.....	14
d) Pour une meilleure lisibilité	15
IV. VERIFICATION DE LA FIABILITE DU TEST ET APPLICATION A UNE POPULATION	16
A. VERIFICATION DE LA FIABILITE DU TEST SUR DES INDIVIDUS DE GENRE DETERMINE	16
B. APPLICATION DU TEST A GRANDE ECHELLE.....	16
v. COUT DU TEST DE SEXAGE DES PLANTS D'ACTINIDIA CHINENSIS.....	18
A. LES CONSOMMABLES ET LA MAIN D'ŒUVRE.....	18
B. LE MATERIEL ET SON AMORTISSEMENT	18
C. ESTIMATION FINALE DU COUT	19



Introduction

Le genre *Actinidia* contient plus de 60 espèces ligneuses originaires de Chine et des pays avoisinants. A l'état sauvage, il s'agit de lianes capables de grimper à la cime des arbres et d'étouffer de leurs larges feuilles la végétation avoisinante. Toutes les espèces portent des fruits, mais les plus connues sont *A. chinensis*, *A. deliciosa*, à partir desquelles ont été développées la plupart des variétés commerciales de kiwi. La domestication a commencé en 1904, avec la première introduction de l'espèce *A. deliciosa* en Nouvelle Zélande. Puis le premier verger commercial a vu le jour dans ce pays dès 1930.

Depuis les années 80, la production mondiale de kiwi s'est énormément développée pour atteindre aujourd'hui plus de 1,2 millions de tonnes par an. La France, 5^{ème} producteur mondial derrière l'Italie, la Nouvelle Zélande, la Chine et le Chili, possède un verger non négligeable : 4400 hectares produisant chaque année de 60 000 à 80 000 tonnes de kiwis (Hennion, 2003). Les 2/3 de la production nationale proviennent du Sud Ouest, c'est pourquoi le Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes de Lanxade s'intéresse particulièrement à ce fruit.

La base génétique des variétés commerciales de kiwi est très étroite à côté de l'immense diversité que l'on peut trouver dans le compartiment sauvage, principalement à cause de la domestication qui s'est réalisée à partir d'un faible nombre d'individus.

A. deliciosa Hayward a longtemps été la seule variété commercialisée, mais des programmes d'amélioration sont en cours. Des espèces jusque là délaissées présentent un potentiel économique important, et pourraient donner naissance à de nouvelles variétés aux caractères plus diversifiés (couleur du fruit et de sa chair, saveur, texture de la peau, taille du fruit, résistance aux bio-agresseurs, durée de la période de récolte...). Les néo-zélandais ont par exemple créé en 1991 une variété d'*Actinidia chinensis* qui vient tout juste d'arriver sur le marché français : Hort 16 A, dont les fruits commercialisés sous le nom de Zespri Gold® ont une saveur plus douce et plus parfumée que celle de Hayward, séduisant de nouveaux consommateurs.

Le kiwi a jusqu'à maintenant reçu très peu d'attention de la part des généticiens, principalement parce qu'il s'agit d'une culture récente (l'expansion des vergers d'*Actinidia* n'a commencé que dans les années 80). Il existe d'autre part dans le Genre *Actinidia* de grandes variations du niveau de ploïdie qui le rendent difficile à étudier: l'espèce *Actinidia chinensis* est généralement diploïde ($2n = 58$, bien qu'il existe certains individus tétraploïdes avec $2n = 116$), alors qu'*Actinidia deliciosa* est hexaploïde ($2n = 174$). On trouve même occasionnellement des individus octaploïdes.

La dernière difficulté génétique liée au Genre se situe au niveau du mode de reproduction : toutes les plantes du Genre *Actinidia* sont dioïques, et rien ne permet de distinguer les plants mâles des plants femelles d'un point de vue cytologique ou morphologique avant le stade de maturité reproductive qui a lieu 3 à 5 ans après semis. Quand un programme d'amélioration fruitière est mis en place, le nécessaire pour mener les semis à maturité avant d'éliminer les mâles représente un coût d'entretien considérable, ceux-ci constituant généralement 50% des populations. Pour les sélectionneurs, l'élimination précoce des mâles serait un gain de temps et de place, ainsi qu'une économie financière appréciable. Le CTIFL de Lanxade m'a donc offert la possibilité d'étudier durant trois mois ce sujet :

Camille LEPOITTEVIN
Stage 2003, ENSHAP 2

ayant à disposition une collection d'*Actinidia chinensis* ainsi qu'un laboratoire de biologie moléculaire, mon travail a été d'effectuer des recherches bibliographiques afin de trouver des tests de sexage au stade plantule, puis de mettre en œuvre le ou les plus judicieux afin de vérifier leur faisabilité et leur fiabilité.

Je vais donc d'abord brièvement présenter le CTIFL, qui a été le cadre de ce stage, puis j'effectuerai une synthèse des publications trouvées sur le sexage des plantules d'*Actinidia chinensis* pour expliquer ce qui a motivé le choix du test mis en place. Ensuite, je décrirai le protocole et les résultats obtenus, en terminant par une évaluation du coût des manipulations pour une mise en place éventuelle d'un test à grande échelle.

I. Présentation du CTIFL, Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes

Le CTIFL a été créé en 1952 suite à la loi de 1948 sur les Centres Techniques Industriels. C'est un organisme d'utilité publique sans but lucratif qui est soumis à un contrôle par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, ainsi que par le Ministère de l'Economie et des Finances.

Son champ d'action est très large et recouvre de nombreux domaines de la filière fruits et légumes : de la production à la distribution en passant par l'expérimentation ou la diffusion de l'information, le CTIFL constitue un point de veille technologique et économique permanent pour les professionnels du secteur.



A. La structure du CTIFL

Il existe en France 4 centres d'expérimentation CTIFL (Balandran (30), Lanxade (24), Carquefou (44) et St Rémy-de-Provence (13)) ainsi qu'une antenne de vente à Rungis. Ces centres travaillent en réseau avec 36 stations régionales d'expérimentation et en partenariat avec les organismes français impliqués dans le développement du secteur fruits et légumes (ONIFLHOR, INRA, SPV...). Le siège social se trouve à Paris.



Les centres CTIFL en France

Le CTIFL s'organise en six départements :

- Département Fruits et Technologie
- Département Légumes et Technologie
- Département Produits et Marchés
- Département Formation et Animation
- Département Informatique et Documentation

Le CTIFL dispose d'un budget annuel de 21,6 millions d'euros, dont 60% proviennent d'une taxe parafiscale sur la vente des fruits et légumes. La plus grande part de ce financement est destinée à la rémunération des employés.

B. Le Centre de Lanxade

Le centre de Lanxade est situé à proximité de la Dordogne au cœur du Bassin de production de fruits et légumes du Sud-Ouest. Il emploie 64 personnes, dont 39 ingénieurs et techniciens, sur un domaine de 70 hectares. Les travaux du centre sont principalement consacrés aux cultures fruitières, à l'arboriculture, aux techniques d'irrigation et de fertilisation, ainsi qu'à la protection intégrée des cultures.

Les premiers laboratoires du CTIFL de Lanxade, créés dans les années 60, sont des laboratoires de virologie : ils ont permis la mise en place, en coopération avec l'INRA, d'un système de certification fruitière très performant et toujours d'actualité (vérification de l'authenticité variétale et de l'absence de maladies de dégénérescence, guérison par thérapie thermique et par micro-greffage des cultivars infectés, production et diffusion de porte-greffe et de greffons certifiés...). Les techniques évoluant, le centre s'est diversifié et s'intéresse maintenant à d'autres aspects de la qualité des fruits et légumes, en amont comme en aval de la filière. Le CTIFL de Lanxade a ainsi créé de nouveaux espaces d'analyses et de mesures :

- laboratoire d'analyses de solutions nutritives
- laboratoire de phytopathologie et d'entomologie
- laboratoire de mesure de qualité
- laboratoire d'analyse sensorielle
- laboratoire d'analyses bio-moléculaires

C'est dans ce laboratoire que s'est déroulé mon stage, sous la tutelle de M. Hennion, Ingénieur horticulteur travaillant sur la châtaigne et le kiwi, et avec la collaboration de M. Gentit, Ingénieur responsable du laboratoire de virologie fruitière et de biologie moléculaire.

Bien que le centre n'ait pas une vocation de création variétale, ses expérimentations le conduisent à observer de nombreuses variétés. M. Hennion a mis en place sur le domaine une collection d'*Actinidia* de diverses provenances. Il travaille avec des producteurs, pépiniéristes ou organismes tels que l'INRA de Bordeaux ou le Lycée agricole de Montauban qui lui ont confié des plants, parfois issus de programmes d'amélioration, pour observations.

Face aux nouvelles variétés telles que la néo-zélandaise Hort 16 A, les producteurs français doivent s'attendre à une nouvelle demande de la part des consommateurs, mais sauront-ils y répondre ? Pour l'instant, aucun pays n'a pu mettre au point une variété capable d'égaliser celle des néo-zélandais, qui reste l'exclusivité de la compagnie KNZ (Kiwifruit New Zealand), mais les programmes d'amélioration sont lancés, avec beaucoup de retard sur les « pionniers du kiwi ».

C'est au début de ces programmes d'amélioration qu'un test de sexage de l'*Actinidia* au stade plantule s'avérera précieux, permettant de grandes économies de temps et d'espace, donc une minimisation des coûts d'entretien. D'où l'idée de M. Hennion de proposer un stage sur ce thème, dans l'idée de fournir aux organismes sélectionneurs équipés du matériel adapté un test « clé en main » pour la détermination du sexe avant floraison. C'est pourquoi je me propose d'étudier non seulement la faisabilité d'un tel test, mais aussi le coût qu'il représente afin d'en informer les possibles utilisateurs.

Le CTIFL possède en ce moment 400 plants de 2 ans issus d'un croisement de Hort 16 A et d'une variété mâle non connue. Il faudra encore attendre un ou deux ans avant l'apparition des premières fleurs, mais cette ressource représente un terrain d'expérimentation idéal, qui permettra d'ici peu de calculer la fiabilité du test, nécessaire à une étude de ce genre.



II. Synthèse bibliographique

Une dizaine d'articles ont déjà été publiés sur le test de sexage des plantules d'*Actinidia*, principalement par des néo-zélandais et par des italiens. Ils constituent le matériau de base de mon étude : après les avoir comparés, il a fallu choisir le protocole le plus simple à mettre en œuvre pour un résultat optimal.

La quasi totalité des articles publiés sur le thème du sexage d'*Actinidia* font appel aux techniques de biologie moléculaire, mais un article sort de ce lot : il propose un test de sexage par dosage de l'activité de la peroxydase dans des tissus issus de culture *in vitro* (Hirsch *et al.*, 1997).

A. Test de sexage par dosage de la peroxydase (Hirsch *et al.*, 1997)

Dans cette expérience, le protocole utilisé consiste à cultiver *in vitro* des segments de pétiole de l'individu à sexer. Sur les cals ainsi obtenus, on effectue un dosage de l'activité spécifique de la peroxydase. Celle-ci s'est révélée environ 2 fois plus importante dans les cals issus d'individus femelles que dans les cals issus d'individus mâles (entre 3,12 et 3,33 unités d'activité de peroxydase par mg de protéines pour les mâles, alors que les femelles présentent entre 5,8 et 7,13 unités d'activité de peroxydase par mg de protéines).

Ce test a montré une bonne répétitivité : il a été réalisé 2 années de suite sur les 25 mêmes plantules. Seules 3 de ces plantules ont été diagnostiquées différemment au deuxième test. Cependant, il faut noter que cette étude n'a pas été validée car lors de la publication de l'article, les plants n'étaient pas assez matures pour une vérification du sexe. Aucune autre publication n'a suivi celle-ci.

D'autre part, le protocole montre une certaine lourdeur :

- seuls des cals de plus de 3 g, obtenus après 6 semaines de culture, permettent un bon diagnostic ;
- la culture *in vitro* des pétioles s'est révélée beaucoup plus réussie quand la mise en culture avait lieu dans la période d'avril à mai (35% d'échecs seulement alors qu'on atteint un taux de 63% si la mise en culture a lieu en juillet) ;
- d'après les auteurs, 12 cals par plant à sexer sont nécessaires pour une bonne estimation de l'activité de la peroxydase, ce qui est non négligeable.

B. Tests de sexage développés à l'aide d'outils de biologie moléculaire

Les principaux auteurs ayant travaillé avec des marqueurs moléculaires pour l'élaboration d'un test de sexage d'*Actinidia chinensis* font partie d'une équipe néo-zélandaise de l'Horticulture and Food Research Institute of New Zealand.

1. Recherche de marqueurs moléculaires liés au sexe chez *Actinidia chinensis* (Harvey et al. 1997 a et b)

Harvey *et al.* (1997 a) ont d'abord testé 500 amorces RAPD sur deux mélanges d'ADN : le premier contenait l'ADN de 24 mâles, le second celui de 20 femelles. Les différences de bandes remarquées entre les deux lots étaient ainsi possiblement liées au sexe. Ils ont ainsi mis en évidence l'existence de deux marqueurs RAPD liés au sexe chez *Actinidia chinensis*. Ces deux marqueurs ont été appelés SmX et SmY :

- SmX est un fragment de 850 kpb qui a été identifié chez la quasi-totalité des femelles et est absent chez tous les mâles. Seules 2 femelles sur 20 n'ont pas présenté ce marqueur, ce qui a permis de calculer une distance de 4,5 cM entre SmX et le locus déterminant pour le sexe. SmX a été obtenu grâce à l'amorce RAPD OPAL-20.
- SmY est un fragment de 800 kpb qui a été identifié chez tous les mâles et chez une seule femelle, la distance entre SmY et le locus déterminant pour le sexe a été calculée à 2,28 cM. SmY a été obtenu grâce à l'amorce OPAI-12.

Les modalités d'héritage des marqueurs SmX et SmY laissent penser qu'*Actinidia chinensis* possède un système de chromosomes X Y. Cependant, ceux-ci sont très différents de ceux que l'on peut trouver chez les mammifères : ils sont homomorphes et peuvent échanger certains segments, excepté bien sûr ceux qui contiennent les gènes déterminants pour le sexe.

La même année, l'équipe néo-zélandaise a confirmé cette hypothèse, et montré que SmX était lié au chromosome X alors que SmY était lié au chromosome Y (Harvey *et al.*, 1997 b). Elle a calculé plus précisément les distances génétiques éloignant ces marqueurs du locus déterminant pour le sexe, grâce à une population plus importante d'*Actinidia chinensis* (plus de 60 individus):

- SmX est situé à 3,30 cM du locus déterminant pour le sexe
- SmY est situé à 2,86 cM du locus déterminant pour le sexe.

Ces deux premières études ont permis de trouver deux marqueurs fiables liés au sexe chez *Actinidia chinensis*, mais il faut noter que la technique des marqueurs RAPD est très difficile à reproduire. Il était donc d'un grand intérêt de poursuivre les recherches afin de produire des SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region), grâce à des amorces plus longues permettant d'amplifier spécifiquement les marqueurs SmX et SmY. C'est ce qui a été réalisé par Gill *et al.* (1998).

2. Développement d'un test de sexage rapide et efficace (Gill *et al.* 1998)

Dans le protocole de Gill *et al.* (1998), les bandes correspondantes aux marqueurs SmX et SmY ont été découpées, leur ADN a été séquencé sur 250 bases dans les régions flanquantes, et de nouvelles amorces comprenant les amorces originelles OPAL-20 et OPAI-12 ont été conçues :

- SmXf et SmXr (23 bases chacune) destinées à amplifier spécifiquement le marqueur SmX.
- SmYf et SmYr (23 bases chacune) destinées à amplifier spécifiquement le marqueur SmY.

Les amorces SmXf et SmXr ont permis l'amplification d'un fragment chez les femelles, mais les amorces SmYf et SmYr n'ont rien amplifié spécifiquement : elles ont donné un fragment de même taille chez les individus mâles et femelles. Le séquençage des SCAR de SmY a montré qu'il n'existait que 9 différences nucléotidiques entre mâles et femelles. L'équipe a donc choisi deux nouvelles amorces d'une vingtaine de bases, SmYf1 et SmYr1, correspondant aux segments montrant le plus de différences nucléotidiques entre mâles et femelles :

- l'amorce SmYf1 a été choisie sur un segment où mâles et femelles diffèrent de 2 nucléotides, et un de ces nucléotides est placé sur son extrémité 3'
- l'amorce SmYr1 a été choisie sur un segment où mâles et femelles diffèrent de 4 nucléotides, et un de ces nucléotides est placé sur son extrémité 3'.

Le fait de placer le nucléotide différent en extrémité 3' de l'amorce permet de minimiser l'erreur lors de son appariement avec l'ADN, d'augmenter la spécificité des amorces lorsque les individus à distinguer ne diffèrent pour ce segment que de quelques bases (Wintzenboer *et al.*, 1995).

Résultats :

Les marqueurs SmX et SmY ne peuvent être utilisés simultanément car les protocoles de PCR sont différents ; SmY semble cependant plus fiable, car il est situé plus près du locus déterminant pour le sexe, il existe donc moins de recombinants pour ce caractère. Une amorce microsatellite (amorce 721) peut être utilisée en complément de SmYf1 et SmYr1, pour servir de témoin et confirmer la réussite de la PCR : elle sert à identifier les femelles qui ne montrent normalement aucune bande avec SmY. Cette amorce a été choisie d'après une étude de Weising *et al.* (1996).

Les nouvelles amorces SmYf1 et SmYr1 ont été testées sur une population de 120 individus d'*Actinidia chinensis* dont le genre a été confirmé à la floraison. A la 1^{ère} application du test, le genre de 92 individus a été déterminé, soit 77% de la population. Parmi les 28 ambiguïtés restantes, 13 ont été résolues par une deuxième application du test, ce qui fait passer le taux de réussite à 88%. Parmi les 12% d'échec, 9% sont dus à une mauvaise extraction d'ADN et 3% sont dus à des plantes recombinantes.

SmXf, SmXr, SmYf1 et SmYr1 ont été testées sur d'autres espèces du genre *Actinidia*. Le marqueur SmX n'a pas montré de polymorphisme chez *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*. En revanche, les amorces SmYf1 et SmYr1 ont amplifié des fragments chez quelques mâles mais chez aucune femelle cette espèce. Quelque soit le marqueur utilisé, aucun produit d'amplification n'a été obtenu avec les autres espèces (*A. eriantha*, *A. arguta*, *A. latifolia*, *A. setosa* et *A. rufa*).

Les 88% de réussite de ce test à la deuxième application sont très concluants, et l'utilisation des SCAR permet une reproductibilité plus importante que la technique RAPD. Les auteurs nous font cependant remarquer que le matériel âgé peut poser des problèmes

d'extraction (difficultés liées aux phénols), et que cette étape est délicate car les feuilles d'*Actinidia* sont très riches en polysaccharides co-précipitant avec l'ADN.

Il n'existe pas de publication plus récente faisant part d'innovations dans le sexage d'*Actinidia chinensis* grâce à des marqueurs moléculaires. On peut cependant signaler l'article de Shirkot *et al.* (2002), qui met en évidence des marqueurs RAPD liés au sexe sur *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*. ou l'article de Testolin *et al.* (2001) qui mentionne 6 marqueurs AFLP liés au sexe chez les mâles d'*Actinidia callosa*.

C. Etudes plus récentes et conclusion

Shirkot *et al.* (2002), suivant le même schéma qu'Harvey *et al.* (1997 a), ont testé 34 amorces RAPD sur 7 plants d'*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* (5 femelles et 2 mâles). Sur ces 34 amorces, 21 ont révélé des locus polymorphes et 8 ont donné des marqueurs liés au sexe. Ces amorces étaient différentes d'OPAL-20 et d'OPAI-12. Cette étude, bien que très intéressante, reste tout à fait préliminaire. 7 individus n'ont pas permis de déterminer des marqueurs fiables, surtout quand il s'agit de la technique RAPD. D'autre part, elle est inutilisable pour notre test car il s'agit de marqueurs pour l'espèce *A. deliciosa* et non pour l'espèce *A. chinensis*. Bien qu'elles soient très proches, on a vu précédemment que les marqueurs liés au sexe n'étaient pas forcément les mêmes pour ces deux espèces. Il serait tout de même intéressant de connaître la suite de cette étude, les auteurs ayant prévu d'isoler des marqueurs très utiles pour la détermination du sexe dans l'espèce *A. deliciosa*.

Testolin *et al.* (2001) ont quant à eux établi une carte génétique du genre *Actinidia* grâce à des marqueurs AFLP et microsatellites. Ils se sont basés sur une population F1 obtenue par croisement d'une femelle diploïde d'*A. chinensis* et d'un mâle d'*A. callosa*. Le gène déterminant le sexe a pu être cartographié chez le mâle à l'aide de 6 marqueurs AFLP mais d'aucun marqueur microsatellite. Malheureusement, il a été impossible de cartographier ce gène chez la femelle *A. chinensis*. Cette étude reste donc inutilisable pour un test de sexage sur cette espèce.

CONCLUSION :

Il semble que le travail de l'équipe de Gill *et al.* soit le plus complet et le plus facile à mettre en œuvre sur une période de 3 mois : les amorces SmYf1 et SmYr1, dessinées d'après des SCAR, donnent un taux de réussite optimal et une bonne reproductibilité au test, ce sont donc celles que nous allons employer. Nous nous servirons également de l'amorce microsatellite 721 comme « témoin » d'amplification.

Nous testerons d'abord ces deux amorces sur des individus adultes d'*Actinidia chinensis*, pour éventuellement ensuite réaliser un test à grande échelle sur une population de jeunes plants issus d'un semis de Hort 16 A et d'une variété mâle non connue.



III. Matériel et mise au point du protocole

A. Matériel

Le CTIFL de Lanxade dispose d'une collection d'*Actinidia* parmi lesquels on dénombre 10 plants d'*Actinidia chinensis* adultes de différentes origines (Lycée agricole de Montauban, INRA de Bordeaux, pépiniéristes...). Ce sont les seuls individus de sexe déterminé : certains sont matures et installés en verger, alors que d'autres sont en pépinière, ce sont des boutures (cf. [annexe 1](#)). Ils vont servir à valider le test de Gill *et al.* (1998).

Une fois le test validé, il pourra être appliqué à 400 plants de deux ans issus d'un croisement de la variété femelle Hort 16 A et d'une variété mâle inconnue. Ces semis, en conteneur et actuellement sous tunnel, seront plantés en plein champ pour observation dans l'année à venir.

B. Mise au point du protocole

Le protocole utilisé est celui de Gill *et al.* (1998) décrit en [annexe 2](#). Il a été modifié au cours des manipulations, c'est pourquoi il va entièrement être expliqué, du prélèvement des échantillons à la lecture du test, car l'objectif de ce stage est de remettre aux futurs utilisateurs un protocole clair et reproductible.

1. Prélèvement des échantillons

Pour chaque individu à tester, on a prélevé deux jeunes feuilles dont la nervure principale mesurait entre 1 et 2 cm de long. Ces feuilles ont été placées dans des sachets plastiques portant le numéro du plant dont elles provenaient. Elles peuvent ainsi être conservées au réfrigérateur pendant au moins une semaine.

2. Extraction

Le procédé d'extraction employé par Gill *et al.* (1998) est un procédé CTAB avec broyage des échantillons à l'azote auquel quelques étapes ont été ajoutées : la manipulation s'étale sur deux jours, car elle inclue une re-dissolution du culot d'ADN dans une solution à 1M de NaCl pendant une nuit, avant une nouvelle purification (cf. [annexe 2](#)).

a) Le broyage à l'azote est remplacé par un broyage à la perceuse

Une alternative au broyage à l'azote liquide a été essayée. Il s'agit du broyage à la perceuse, déjà utilisé en laboratoire pour le test ELISA. Les deux feuilles prélevées sur l'individu à tester sont découpées afin d'ôter leur nervure principale, qui contient plus de composés nuisant à l'extraction que le limbe. Les morceaux de feuille sont ensuite placés dans des sachets de broyage (Bioreba) avec 6 ml de tampon d'extraction (méthode CTAB, cf. [annexe 2](#)), où ils seront broyés à l'aide d'une perceuse équipée d'un broyeur à billes. Environ 0,5 ml du liquide dans le sachet de broyage sont récupérés, placés dans des tubes de 2 ml et le protocole CTAB se poursuit avec l'ajout d'un volume égal de chloroforme-octanol.

b) Problèmes dus aux polysaccharides

La mise au point de l'extraction a été l'étape la plus difficile du point de vue technique : au broyage, les feuilles donnaient un liquide très visqueux et difficile à récupérer, dans lequel l'ajout d'isopropanol ne permettait pas d'obtenir un ADN de qualité pour la suite de la manipulation. Ce problème de polysaccharides a été mentionné dans la publication de Harvey *et al.* (1995).

Pour contourner cette difficulté due à la viscosité des extraits, le plus simple a été de travailler avec des volumes plus grands, et de n'utiliser que des feuilles très jeunes, sensées contenir moins de polysaccharides que les feuilles âgées. Seules deux feuilles de 2 cm de long suffisent pour récupérer de l'ADN en grande quantité. 6 ml de tampon d'extraction sont nécessaires pour obtenir des extraits de viscosité acceptable. La qualité des échantillons a été vérifiée par spectrophotométrie.

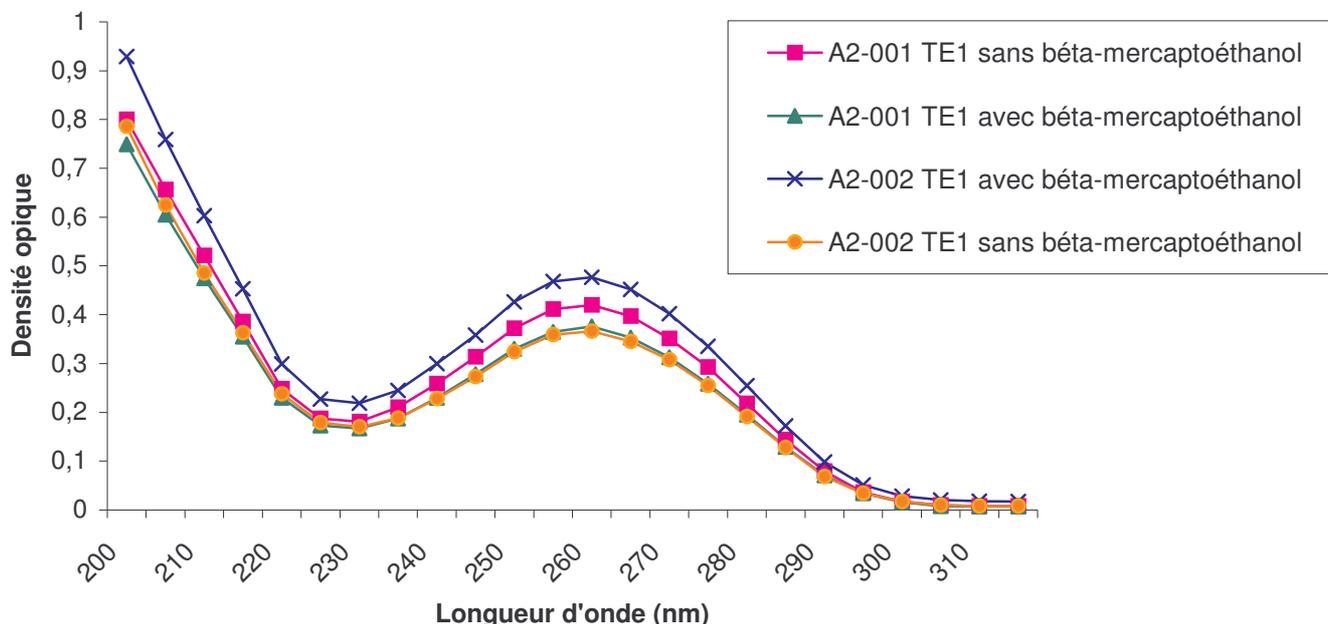
c) Tampon d'extraction sans β -mercaptoéthanol

Dans le protocole de Gill *et al.* (1998), le tampon d'extraction utilisé est un tampon CTAB classique contenant 2% de β -mercaptoéthanol (cf. [annexe 3](#)). Ce composé, très nauséabond, oblige le manipulateur à effectuer toutes les opérations sous une hotte. Pour éviter cet inconvénient, on a comparé l'efficacité de ce tampon d'extraction avec ou sans β -mercaptoéthanol.

Des feuilles ont été prélevées sur deux individus d'*A. chinensis* (A2-001 femelle et A2-002 mâle, cf. [annexe 1](#)). Chaque feuille a été divisée en deux parties égales dont l'ADN a été extrait à l'aide des deux tampons préparés (cf. [annexe 3](#)). Une fois les extractions terminées, chaque extrait a été dosé au spectrophotomètre.

Voici le graphique obtenu, représentant la densité optique (DO) des extraits à différentes longueurs d'onde :

Densité optique en fonction de la longueur d'onde, comparaison de deux tampons d'extraction



Rapport des densités optiques à 260 nm et 280 nm et concentration d'ADN*

	DO 260 / DO 280	Concentration d'ADN en ng/μl
A2-001 TE1 sans β-mercaptoéthanol	1,93	210
A2-001 TE1 avec β-mercaptoéthanol	1,93	188
A2-002 TE1 sans β-mercaptoéthanol	1,92	183
A2-002 TE1 avec β-mercaptoéthanol	1,87	238,5

On ne remarque pas de différence significative entre les différents modes d'extraction, on peut donc considérer que le β-mercaptoéthanol n'est pas un composé indispensable au tampon d'extraction.

3. Dilution des extraits

Après extraction, les échantillons ont été dosés au spectrophotomètre afin de vérifier si le rapport DO_{260} / DO_{280} était acceptable et de calculer leur concentration en ADN*. Ensuite, chaque échantillon a été dilué dans de l'eau ultra-pure stérile afin d'obtenir 100 μl d'une solution à 5 ng / μl d'ADN. Le protocole employé par Gill *et al.* (1998) préconise en effet d'employer 5 à 25 ng d'ADN pour un volume réactionnel de 25μl. Une solution d'ADN à 5ng / μl permet donc un pipetage facile lors de la préparation des mélanges réactionnels, la quantité à prélever étant supérieure à 1 μl.

* On considère généralement que l'extraction est acceptable pour un rapport DO_{260} / DO_{280} compris entre 1,8 et 2. Le test a cependant été appliqué avec succès à des extraits dont le rapport DO_{260} / DO_{280} était compris entre 1,5 et 2,1. La concentration d'ADN est calculée à l'aide de la formule suivante : $[ADN]$ en ng/μl = 50 x dilution de l'échantillon x DO_{260}

4. Préparation du mélange réactionnel, PCR et révélation

a) Concentration en dNTP

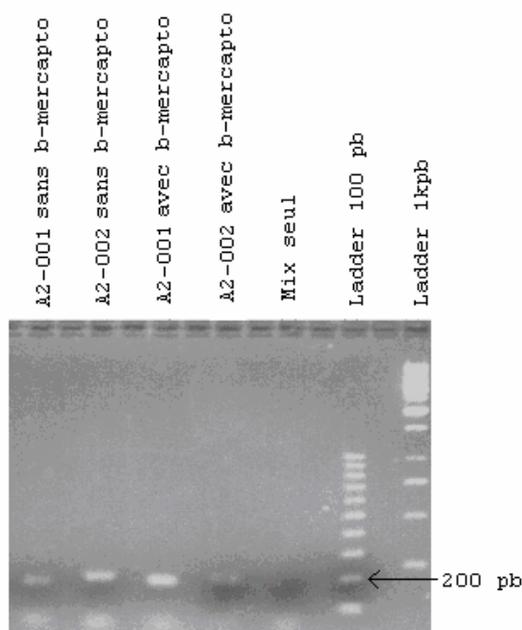
La publication de Gill *et al.* (1998) fait référence à l'article de Harvey *et al.* (1995) pour la composition du mélange réactionnel. Cependant, cette dernière mentionne une concentration de 0,2 μM de dNTP pour chaque échantillon, ce qui est 1000 fois moins que la concentration habituellement utilisée au laboratoire pour des tests de contrôle sanitaire par PCR. Il a semblé préférable d'utiliser la concentration usuelle, soit 200 μM de dNTP. Ceci n'a pas eu d'incidence sur le test.

La séquence des amorces 721 et SmY1 se trouve en [annexe 4](#). Le programme du thermocycleur utilisé tout au long des manipulations est le programme rapide décrit dans le protocole de Gill *et al.* (1998) (cf. [annexe 2](#)). Toutes les révélations ont eu lieu sur gels d'agarose à 1,5% colorés au Bet.

b) Concentration en d'ADN

Comme mentionné précédemment, la quantité d'ADN recommandée pour un volume réactionnel de 25 μl est de 5 à 25ng. Quatre mélanges réactionnels ont été réalisés, contenant 5, 15, 20 et 25ng d'ADN / 25 μl . Ils ont servi à amplifier les extraits des individus A2-001(femelle) et de A2-002 (mâle). La Taq utilisée était l'EUROBIOTAQ® II ADN POLYMERASE.

Lors de la révélation, les mélanges réactionnels les moins concentrés en ADN (5, 15 et 20ng / 25 μl) n'ont pas permis la visualisation de produits d'amplification. En revanche, le mélange réactionnel le plus concentré en ADN (25ng d'ADN / 25 μl) a permis l'amplification d'un fragment d'environ 200pb, correspondant au marqueur 721. La quantité optimale d'ADN semble donc être supérieure ou égale à 25ng / 25 μl de volume réactionnel.



Gel d'agarose révélant le résultat de la PCR multiplex avec un mix à 25 ng d'ADN par échantillon

D'autre part, aucun produit d'amplification n'a été obtenu à partir d'individus mâles par le marqueur SmY1. Il semble que l'amplification en multiplex n'ait pas fonctionné, peut-être à cause d'un phénomène de concurrence entre les amorces SmY1 et 721.

Puit 1 : A2-001 TE1 sans β -mercaptoéthanol ;
Puit 2 : A2-001 TE1 avec β -mercaptoéthanol ;
Puit 3 : A2-002 TE1 sans β -mercaptoéthanol ;
Puit 4 : A2-002 TE1 avec β -mercaptoéthanol ;
Puit 5 : Ladder 100pb Eurobio ;
Puit 6 : GeneRuler™ Ladder 1kb ;
(Les références des ladders sont données en [annexe 5](#))

c) Différentes Taq polymérase

Parmi tous les tests réalisés jusqu'ici, seul le marqueur «témoin» 721 permettait d'obtenir un produit d'amplification, tandis que le fragment SmY1, spécifique aux plantes mâles, n'avait encore jamais été détecté.

La totalité de ces tests ayant été réalisée en multiplex, les deux couples d'amorces ont été testés séparément. Dans le même temps, différentes Taq polymérase ont été essayées sur les extraits de A2-001 et A2-002 à 30 ng d'ADN pour 25 µl de volume réactionnel.

Trois Taq polymérase ont été employées, avec trois modalités pour chacune (sachant que l'EUROBIOTAQ® II ADN POLYMERASE n'avait pas fonctionné précédemment) :

- PCR avec les amorces 721 seules
- PCR avec les amorces SmY1 seules
- PCR en multiplex avec les amorces 721 et SmY1

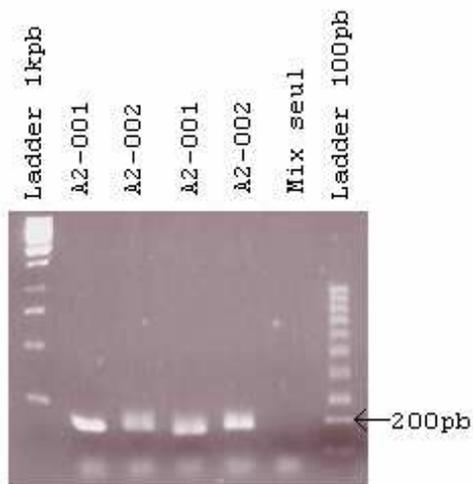
Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

	Taq EXTRAPOL® I EUROBIO*	Taq SIGMA*	Taq EPPENDORF*
Amorces 721 seules	Fragment 721 amplifié	Fragment 721 amplifié	Fragment 721 amplifié
Amorces SmY1 seules	Rien n'a été amplifié	Fragment SmY1 amplifié chez le mâle	Fragment SmY1 amplifié chez le mâle
Amplification multiplex avec les amorces 721 et SmY1	Fragment 721 amplifié	Fragment 721 amplifié	Fragment 721 amplifié chez le mâle et la femelle + Fragment SmY1 amplifié chez le mâle

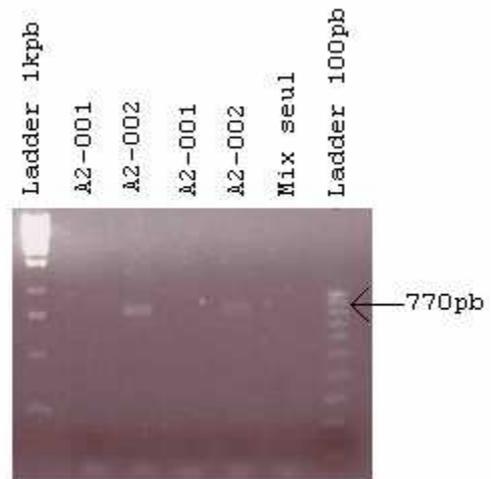
*Les références de ces Taq sont données en [annexe 6](#).

- ✓ La Taq EXTRAPOL® I n'a pas permis d'amplifier le fragment spécifique aux mâles.
- ✓ La Taq SIGMA a permis d'amplifier le fragment spécifique aux mâles lorsque les amorces SmY1 ont été utilisées seules. En revanche, seul le marqueur 721 est détectable en multiplex.
- ✓ La Taq EPPENDORF est celle qui a donné les meilleurs résultats : 721 et SmY1 sont bien présents quand les amorces sont employées seules, et les deux marqueurs ont été amplifiés simultanément en multiplex. Les bandes manquent toutefois de lisibilité.

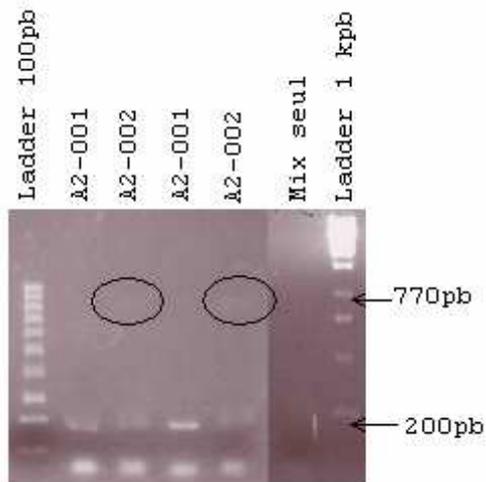
Le résultat de l'amplification avec la Taq Eppendorf est présenté ci-dessous :



Amorces 721 seules : les bandes sont bien lisibles, tous les individus amplifient le fragment 721.



Amorces SmY1 seules : le fragment d'environ 770 pb a été amplifié uniquement chez le mâle, avec une répétition



Le marqueur 721 est bien visible, représenté par la bande d'environ 200 pb ; le marqueur SmY1 est présent chez le mâle, sous la forme d'une bande très ténue à environ 770 pb (entourées sur la photo). On peut noter que la bande à 200 pb est bien moins visible lorsque la PCR se fait en multiplex que lorsque les amorces 721 sont seules : il y a sûrement un phénomène de compétition entre les amorces 721 et SmY1.

PCR multiplex avec les amorces 721 et SmY1

d) Pour une meilleure lisibilité

Pour trouver une composition de mélange réactionnel permettant une meilleure amplification et donc une meilleure lisibilité lors de la révélation, j'ai d'abord fait varier la quantité de Taq polymérase : je n'ai pas remarqué de différences à la révélation entre les échantillons traités avec 1 unité de Taq et les échantillons traités avec 1,25 ou 2 unités de Taq pour 25µl de volume réactionnel. De même, il n'y a pas eu de différence notable entre les échantillons traités avec 200µM et 400µM de dNTP.

Sur tous ces essais les bandes étaient clairement lisibles. On a cependant noté la présence d'importants dimères en bas des colonnes de migration.

Pour permettre un test à coût réduit, on a conservé les concentrations en dNTP et en Taq polymérase les plus faibles.

Le test étant dorénavant lisible, on a considéré que le protocole pouvait être appliqué à tous les individus *Actinidia chinensis* adultes afin de vérifier sa fiabilité pour le sexage des semis. La totalité du protocole mis au point, de l'extraction à la révélation, constitue un livret qui a été remis au CTIFL et qui est présenté en [annexe 7](#).



IV. Vérification de la fiabilité du test et application à une population

A. Vérification de la fiabilité du test sur des individus de genre déterminé

Le CTIFL de Lanxade ne dispose que de 10 individus *Actinidia chinensis* de sexe déterminé : 6 femelles et 4 mâles de différentes origines (cf. [annexe 1](#)). Le protocole précédemment décrit a été testé sur deux de ces plants (A2-001 femelle et A2-002 mâle) et nous avons pu constater qu'il a permis de distinguer le mâle de la femelle. Nous savons d'après Gill *et al.* (1998) qu'il existe des femelles recombinantes présentant le marqueur SmY1, mais elles sont assez rares.

Avant d'appliquer le test à une population importante de jeunes plants de sexe indéterminé, il a paru nécessaire de vérifier son bon fonctionnement sur les 10 individus de genre déterminé disponibles, même si leur faible nombre ne peut donner un indice satisfaisant de fiabilité.

Le protocole décrit précédemment a été appliqué. Tous les mâles ont été clairement identifiés le marqueur SmY1 ayant été mis en évidence de façon systématique. Aucune des femelles n'a présenté ce marqueur, et tous les individus, mâles ou femelles, ont présenté un produit d'amplification à environ 200pb correspondant au marqueur « témoin » 721. Ceci a permis de vérifier que l'extraction avait donné de l'ADN d'une qualité et quantité satisfaisantes, permettant une bonne amplification.

On peut maintenant considérer que la mise au point du test de sexage de jeunes plants d'*Actinidia chinensis* est validée, et nous allons l'appliquer à plus grande échelle.

B. Application du test à grande échelle

Depuis deux ans, le CTIFL observe des jeunes semis de kiwi issus d'un croisement entre des femelles *A. chinensis* de la variété Hort 16 A et des mâles *A. chinensis* de variété inconnue. Ils sont environ 400, en pots et sous tunnel, mais ils seront plantés en plein champ dans l'année à venir. Pour les identifier, chacun d'eux porte une étiquette numérotée. La première floraison, qui permettra de vérifier les résultats du test, devrait arriver avant 3 ans.

J'ai appliqué le test avec succès à 219 semis Hort 16 A pendant mon stage, ce qui m'a permis de calculer un premier taux d'échec à l'extraction d'environ 5%. Dans la deuxième phase de la manipulation, après avoir laissé les extraits d'ADN une nuit dans une solution de NaCl à 1M, l'ajout d'isopropanol constitue une « phase de contrôle » : pour certains échantillons on n'observe pas la formation de la pelote d'ADN qui précipite au fond du tube, et il est par la suite impossible de récupérer de l'ADN. L'extraction doit alors être recommencée. Les autres problèmes d'extraction ont pu être détectés par spectrophotométrie.

Pour les individus ne présentant pas le marqueur 721 lors de la révélation, il est difficile de conclure entre une mauvaise extraction et une mauvaise amplification. Une deuxième application du test depuis l'extraction a dans chaque cas permis d'obtenir un résultat. Voici un exemple où l'utilité du marqueur 721 est démontrée :

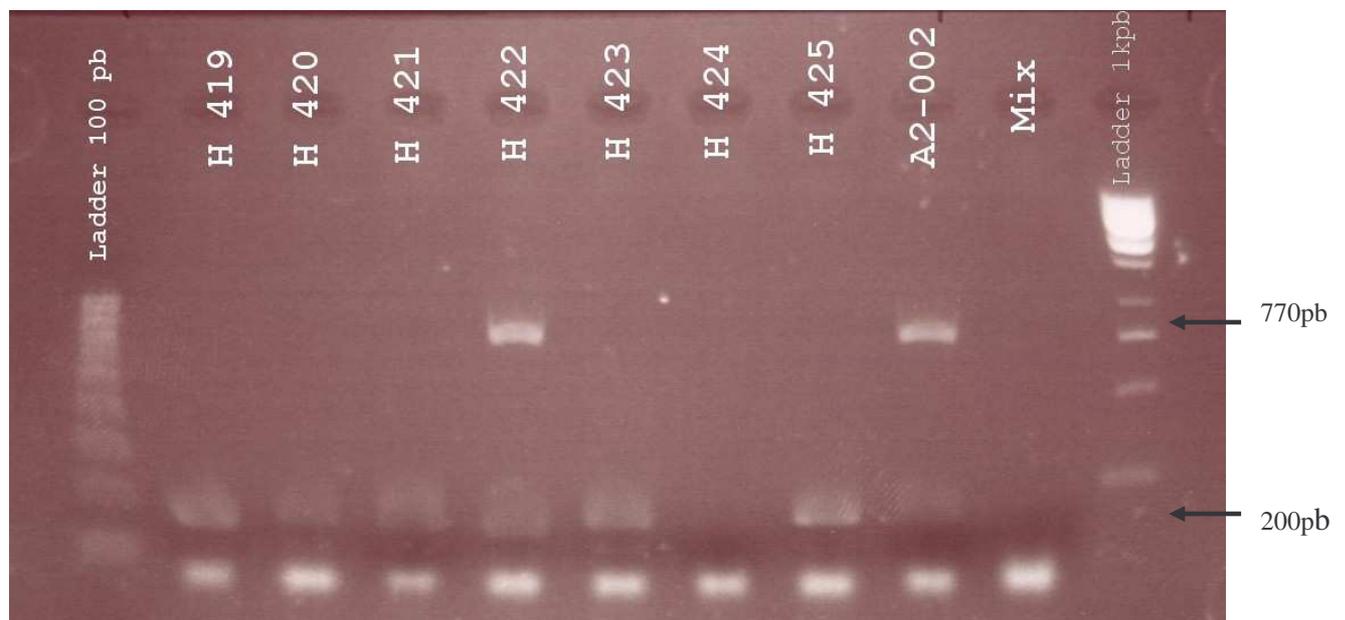


Photo réalisée le 31/07/2003, présentant le résultat du test pour 7 individus Hort 16 A en phase juvénile (H 419 à H 425) et un individu *Pollichina* mâle adulte (A2-002).

- ✓ On note l'absence du marqueur 721 chez l'individu H 424 : l'amplification PCR ou l'extraction n'a pas fonctionné pour ce plant. L'absence du marqueur évite de faire un mauvais diagnostic et de placer ce plant parmi les plants femelles.
- ✓ H 422 et A2-002 sont des mâles car ils présentent une bande à environ 770 pb.
- ✓ H 419, H 420, H 421, H 423 et H 425 sont des femelles car elles ne présentent pas de bande à 770 pb.
- ✓ Le mix est normal, il ne présente aucune des bandes à 200 pb ou à 770 pb. On note juste la présence de dimères, comme dans toutes les colonnes de migration.

Afin de rassembler les résultats du test pour tous les semis, une feuille de calcul Excel a été créée. Elle permet de calculer le taux d'échec à l'extraction, et donnera un pourcentage de réussite du test lorsque le sexe des plants sera confirmé.



V. Coût du test de sexage des plants d'*Actinidia chinensis*

La mise au point du test était l'objectif principal de ce stage, mais il m'a paru intéressant de calculer son coût pour un laboratoire qui désirerait le mettre en place. L'évaluation du coût d'un tel test est quelque chose de difficile lorsqu'on ne dispose pas de toutes les factures nécessaires et que le laboratoire effectue de nombreuses manipulations concernant d'autres projets. Prenons l'exemple d'un congélateur, matériel classique de laboratoire qui est utilisé par tous les manipulateurs pour le stockage des extraits d'ADN et autres solutions. Il est nécessaire à la réalisation du test, mais comment imputer son coût (investissement de départ et consommation d'énergie) sur une manipulation ?

Je tiens à faire remarquer que l'évaluation que je propose ici reste une estimation : ne disposant pas des informations nécessaires pour calculer le coût des fluides, je baserai mon étude sur le matériel, les consommables et les moyens humains. L'estimation donnée ne comprend pas le coût de la structure (mobilier et construction). On formera l'hypothèse que le matériel de laboratoire suit un amortissement linéaire sur 10 ans.

L'étude du coût a été séparée en trois parties : la première permet d'évaluer le coût des consommables et de la main d'œuvre pour chaque test, la deuxième s'intéresse au matériel et à son amortissement et la dernière donne un bilan global ainsi que l'estimation totale du coût.

A. Les consommables et la main d'œuvre

Lorsque le test a été appliqué sur la population de semis Hort 16 A, j'étais limitée à ne traiter que 24 plants par manipulation, principalement à cause du nombre de places dans la centrifugeuse au moment de l'extraction. On m'a également conseillé de ne pas amplifier trop d'échantillons à la fois car la Taq polymérase est une enzyme très coûteuse, et je ne devais pas prendre le risque de d'effectuer une mauvaise manipulation pour un grand nombre de tests. Toutes les étapes du test ont été réalisées avec un nombre maximum de 48 échantillons.

Pendant les manipulations, tout le matériel et les consommables utilisés ont été listés et les heures de travail ont été comptabilisées pour chaque étape. L'étape suivante a consisté à chercher les prix des consommables grâce aux factures du laboratoire et à calculer le coût en consommables d'un seul test. Ce coût est de 6,22 €. Toutes les données qui ont permis le calcul ont été rassemblées dans l'[annexe 8](#).

De même, aux heures de travail comptabilisées a été appliqué le coût d'une heure de travail d'un technicien spécialisé, soit 24,99 € charges sur salaire comprises (source : M. Jourdain, chef de centre). Le coût de la main d'œuvre s'élève donc à 8,85 € par test effectué (cf. données en [annexe 9](#)).

B. Le matériel et son amortissement

Comme les consommables, le matériel a été listé et son prix a été relevé dans les catalogues actuels de fournisseurs ou dans les factures du laboratoire. L'amortissement annuel a été calculé, il est de 7009,4 €. Il a ensuite été divisé par le nombre d'échantillons traités annuellement par le laboratoire, soit 12000 (ce nombre a été calculé à raison de 1 échantillon

par unité de Taq polymérase consommée dans l'année). On a ainsi obtenu l'amortissement du matériel pour chaque test effectué, c'est-à-dire 0,584 € (cf. [annexe 10](#)).

C. Estimation finale du coût

Afin d'estimer le coût total d'un test, il faut sommer les coûts précédemment calculés (consommables, main d'œuvre, matériel et amortissement) sans oublier de tenir compte du pourcentage de tests non réussis. On a vu précédemment que sur les 219 plants testés, 10 ont du subir le test une deuxième fois à cause d'une mauvaise extraction ou d'une mauvaise amplification. Ceci représente 4,5% de tests supplémentaires, qu'il faut imputer au coût du test à l'unité. On arrive ainsi à un coût final de 16,37 € par plant (cf. [annexe 11](#)).

CONCLUSION

Le test a été mis au point de manière assez rapide (2 mois), ce qui m'a permis de l'appliquer à grande échelle sur des semis de Hort 16 A. Le taux de réussite pourra ainsi être calculé dès leur maturité reproductive. Cette partie de mon stage a été très enrichissante : la recherche bibliographique m'a permis de me familiariser avec les outils de documentation scientifique et d'acquérir de nouvelles connaissances dans le domaine de la biologie moléculaire. Les manipulations en laboratoire m'ont d'autre part donné une certaine pratique dont je manquais.

J'ai également pu faire une évaluation de coût, ce à quoi je n'aurai jamais pensé au début du stage. C'est en analysant les besoins à l'origine de ce stage que j'en ai eu l'idée. Cette estimation pourra éventuellement servir à calculer la rentabilité d'un tel test: il serait intéressant de comparer son coût au coût d'élevage des plants mâles jusqu'au stade reproductif. Cette étude pourrait mettre en évidence l'utilité de la biologie moléculaire dans le domaine horticole.

J'espère avoir laissé tous les outils nécessaires à ceux qui voudront effectuer le test, et je joint à ce rapport les coordonnées des personnes ayant participé à ce projet. J'offre un dernier remerciement à Sophie Riol, qui me remplacera sur ce programme, et j'espère que M. Hennion m'enverra dans quelque temps la confirmation que mon travail a porté ses fruits et que le test est fiable et efficace...

Bibliographie

Articles:

Ainsworth C. ; 2000; Boys and girls come out to play : the molecular biology of dioecious plants; *Annals of Botany* 86: 211-221.

Ferguson A.R., O'Brien I.E.W., Yan G.J. ; 1997; Ploidy in *Actinidia* ; *Acta Horticulturae* 444 (1): 67-71.

Gill G.P., Harvey C.F., Gardner R.C., Fraser L.G.; 1998; Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia*; *Theor Appl Genet* 97: 439-445.

Harvey C.F., Fraser L.G., Gill G.P.; 1997 a; Sex determination in *Actinidia*; *Acta Horticulturae* 444 (1): 85-88.

Harvey C.F., Gill G.P., Fraser L.G., Mc Neilage M.A.; 1997 b; Sex determination in *Actinidia*. 1. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*; *Sex Plant Reprod* 10: 149-154.

Hirsch A.M., Fortune D., Chalak L., Legave J.M., Chat J., Monet R.; 1997; Peroxidase test: a test for sex screening in kiwifruit seedlings; *Acta Horticulturae* 444 (1): 89-95.

Huang H., Li Z., Li J., Kubisiak T.L., Layne D.R.; 2002; Phylogenetic relationships in *Actinidia* as revealed by RAPD analysis; *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127 (5): 759-766.

Mc Neilage M.A. ; 1997; Progress in breeding hermaphrodite kiwifruit cultivars and understanding the genetics of sex determination; *Acta Horticulturae* 444 (1): 73-77.

Shirkot P., Sharma D.R., Mohapatra T.; 2002; Molecular identification of sex in *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* by RAPD markers; *Scientia Horticulturae* 94: 33-39.

Testolin R., Huang W.G., Lain O., Messina R., Vecchione A., Cipriani G.; 2001; A kiwifruit (*Actinidia* spp.) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers; *Theor Appl Genet* 103: 30-36.

Weising K., Fung R.W.M., Keeling D.J, Atkinson R.G., Gardner R.C.; 1996; Characterisation of microsatellites from *Actinidia chinensis*; *Molecular breeding* 2: 117-131.

Wintsenboer H., Kesseli R.V., Fortin M.G., Stanghellini M., Michelmore R.W.; 1995; Sources and genetic structure of a cluster of genes for resistance to three pathogens in lettuce; *Theor Appl Genet* 91: 178-188.

Ouvrages :

CTIFL, Hennion B. ; 2003 ; Monographie : Le kiwi ; Editions CTIFL.

Coordonnées et adresses utiles

- ✓ CTIFL de Lanxade, BP 21 – La Force
Tel : 05 53 58 00 05
Fax : 05 53 58 17 42
 - Bernard Hennion, maître de stage : hennion@ctifl.fr
 - Pascal Gentit, contact biologie moléculaire : gentit@ctifl.fr

- ✓ Institut National d'Horticulture, 2, rue Le Nôtre, 49045 Angers
www.inh.fr

- ✓ Camille Lepoittevin, 8, rue Abbé de l'Épée, 37000 Tours
02 47 66 37 55
camille.lepoittevin@free.fr

ANNEXE 1

Plants adultes de la collection du CTIFL de Lanxade

N° introduction sur le domaine de Lanxade	Espèce	Dénomination variétale	N° Clone d'origine	Sexe déclaré	Parcelle sur le domaine de Lanxade	Coordonnées dans la collection de Lanxade
A2-001	A chinensis	Chinabelle		F	Lx Pj	R1 c
A2-002	A chinensis	Pollichina		M	Lx Pj	R2 f
A2-003	A chinensis		K2 (3.49 C)	F	Lx Pj	R3 b
A2-004	A chinensis		13-04	F	Lx Pk pépinière	
A2-005	A chinensis		13-11	M	Lx Pk	R4 h
A2-006	A chinensis		3-42	F	Lx Pk	R4 b
A2-007	A chinensis	Jintao		F	Lx Pk	R4 p
A2-008	A chinensis		W 17	M	Lx Pk pépinière	
A2-009	A chinensis		W 60	M	Lx Pk pépinière	
A2-010	A chinensis		W 24	F	Lx Pk pépinière	

Les plants en pépinière ne sont pas numérotés et les prélèvements de feuilles ont eu lieu sur plusieurs individus sans repérage particulier. En revanche, quand il existe des coordonnées, c'est toujours le même arbre qui a subi le test.

ANNEXE 2

Protocole de Gill *et al.* (1998)

Extraction

Trois méthodes différentes d'extraction d'ADN à partir de feuilles sont utilisées dans la publication :

- ✓ la première est une adaptation de la méthode de Langridge *et al.* (1991). Elle permet de réaliser 96 extractions simultanément dans une micro plaque ELISA dont les puits contiennent une membrane de nylon chargée positivement. Cette méthode n'a pas été expérimentée. La publication proposait par ailleurs deux autres méthodes d'extraction plus classiques, sensées donner de plus fortes concentrations et une meilleure qualité d'ADN.

- ✓ La deuxième méthode est une extraction à l'aide d'un kit DNeasy™ de Qiagen.

- ✓ La dernière méthode est une méthode CTAB utilisée par Harvey *et al.* (1995).
 - Les feuilles sont broyées dans l'azote liquide et extraites dans un tampon à 55°C contenant 2% de CTAB, 2% de β-mercaptoéthanol, 100mM de tampon Tris à pH 8, 20mM d'EDTA et 1,4 M de NaCl.
 - la phase liquide est ensuite séparée des débris végétaux dans un mélange chloroforme / alcool-isoamylique (24 :1)
 - les acides nucléiques sont précipités par l'ajout d'un volume d'isopropanol
 - pour réduire les polysaccharides co-précipitant avec l'ADN, le précipité est redissout dans une solution à 1 M de NaCl pendant une nuit, pour être re-précipité ensuite.
 - La préparation est enfin dissoute dans un tampon et traitée à l'ARNase A à 65°C pendant 1 à 2 heures.

L'amplification PCR

L'amplification a lieu dans un volume de 25 µl contenant du tampon d'amplification, 1,25 mM de MgCl₂, 0,2 µM de dNTP*, 0,2 µM de chaque amorce SMY, 0,5 µM de chaque amorce 721, 5 à 25 ng d'ADN et 1 unité de Taq polymérase (Cetus). Deux programmes de thermocycleur ont été mis au point, un programme standard et un programme rapide. Ils sont décrits ci-après :

* Cette concentration est 1000 fois moins importante que la concentration usuellement employée pour les dNTP (200µM) au laboratoire du CTIFL.

Programme standard : 38 cycles

1 ^{ère} dénaturation :	95°C pendant 10 minutes	
Cycles 1 et 2 :	Dénaturation 95°C pendant 1 minute	
	Hybridation 58°C pendant 1 minute	2 Cycles
	Elongation 72°C pendant 2 minutes	
Cycles 3 et 4 :	Dénaturation 95°C pendant 1 minute	
	Hybridation 57°C pendant 1 minute	2 Cycles
	Elongation 72°C pendant 2 minutes	
Cycles 5 et 6 :	Dénaturation 95°C pendant 1 minute	
	Hybridation 56°C pendant 1 minute	2 Cycles
	Elongation 72°C pendant 2 minutes	
Cycles 7 et 8 :	Dénaturation 95°C pendant 1 minute	
	Hybridation 55°C pendant 1 minute	2 Cycles
	Elongation 72°C pendant 2 minutes	
Cycles 9 à 38 inclus:	Dénaturation 95°C pendant 1 minute	
	Hybridation 54°C pendant 1 minute	30 Cycles
	Elongation 72°C pendant 2 minutes	
Elongation finale :	72°C pendant 10 minutes	

Programme rapide : 38 cycles

1 ^{ère} dénaturation :	95°C pendant 10 minutes	
Cycles 1 et 2 :	Dénaturation 94°C pendant 5 secondes	
	Hybridation 58°C pendant 30 secondes	2 Cycles
	Elongation 72°C pendant 1 minute	
Cycles 3 et 4 :	Dénaturation 94°C pendant 5 secondes	
	Hybridation 57°C pendant 30 secondes	2 Cycles
	Elongation 72°C pendant 1 minute	
Cycles 5 et 6 :	Dénaturation 94°C pendant 5 secondes	
	Hybridation 56°C pendant 30 secondes	2 Cycles
	Elongation 72°C pendant 1 minute	
Cycles 7 et 8 :	Dénaturation 94°C pendant 5 secondes	
	Hybridation 55°C pendant 30 secondes	2 Cycles
	Elongation 72°C pendant 1 minute	
Cycles 9 à 38 inclus:	Dénaturation 94°C pendant 5 secondes	
	Hybridation 54°C pendant 30 secondes	30 Cycles
	Elongation 72°C pendant 1 minute	
Elongation finale :	72°C pendant 10 minutes	

Révélation

La révélation a lieu par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% contenant du bromure d'éthidium. Le gel est photographié sous lumière ultra-violette par un appareil polaroid.

ANNEXE 3

Composition des deux tampons d'extraction

Tampon d'extraction de la méthode CTAB classique (utilisé par Gill *et al.* (1998)) :

- ✓ 2% de CTAB
- ✓ 2% de β -mercaptoéthanol
- ✓ 100mM de tampon Tris à pH 8
- ✓ 20mM d'EDTA
- ✓ 1,4 M de NaCl

Tampon d'extraction de la méthode CTAB sans β -mercaptoéthanol :

- ✓ 2% de CTAB
- ✓ 100mM de tampon Tris à pH 8
- ✓ 20mM d'EDTA
- ✓ 1,4 M de NaCl

ANNEXE 4

Séquences des amorces utilisées



RAPPORT DE SYNTHÈSE A FACON D'OLIGONUCLEOTIDES

Oligonucléotide **721 F1** **7,30 D.O.** **20** mers.

Utilisateur : **M. GRASSEAU** Numéro de synthèse : **72898**
 Nom du Laboratoire : **CTIFL** Date de commande: **29/04/2003**

Séquence (5' > 3')

		10		20					
1-	TAC	CCA	TTT	ATG	GAA	AAA	GC		-30
31-									-60
61-									-90
91-									-120
121-									-150

8 A 4 C 3 G 5 T 0 I 0 Wooble

Détails de la synthèse

Echelle de synthèse :	50nmoles	Masse molaire :	6 108 g.mol ⁻¹
Modification :		Coefficient d'extinction molaire :	230 800 l / mol x cm
Phosphorothioates :	0 liaison(s)	Soit :	231,99 µg
Purification :	Cartouche <input type="checkbox"/>	Soit :	37,98 nmoles
	H.P.L.C. <input type="checkbox"/>	Volume de reprise pour 100µM :	380 µl

Calculs

Pourcentage de GC :	35,00%	Rendement par couplage :	99,95 %
Tm selon Wallace :	54,00 °C	Rendement de la synthèse :	99,00 %
Tm selon Breslauser :	44,25 °C	<small>Calculé pour NaCl = 50mM et Oligo = 250pmoles</small>	

Rapport édité le : lundi 5 mai 2003 Contrôlé par : **AI**

Service technique et commercial : 01.69.07.94.77
 Email commercial : adv@eurobio.fr
 Email technique : oligo@eurobio.fr

Commandez vos oligonucléotides
 par Internet à l'adresse <http://www.eurobio.fr>

721 F1	7,30 D.O.
Notes	
eurobio	Store at -20°C
721 F1	7,30 D.O.
Notes	
eurobio	Store at -20°C

LABORATOIRES EURO BIO

7, av. de Scandinavie - 91953 Les Ulis Cedex B - Tél. : 01 69 07 94 77 - Fax : 01 69 07 95 34

S.A. au capital de 926 128 € - RC Corbeil Essonnes B 622 018 554 - Siret 622 018 554 00031 - APE 244 D - CCP Paris 18896 62



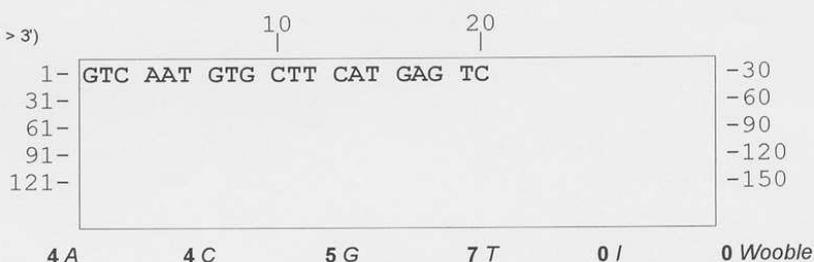
RAPPORT DE SYNTHÈSE A FACON D'OLIGONUCLEOTIDES

Oligonucléotide **721 R1** 7,40 D.O. 20 mers.

Utilisateur : **M. GRASSEAU**
Nom du Laboratoire : **CTIFL**

Numéro de synthèse : **72899**
Date de commande : **29/04/2003**

Séquence (5' > 3')



Détails de la synthèse

Echelle de synthèse :	50nmoles	Masse molaire :	6 122 g.mol ⁻¹
Modification :		Coefficient d'extinction molaire :	209 600 l / mol x cm
Phosphorothioates :	0 liaison(s)	Soit :	235,17 µg
Purification :	Cartouche <input type="checkbox"/>	Soit :	38,41 nmoles
	H.P.L.C. <input type="checkbox"/>	Volume de reprise pour 100µM :	384 µl

Calculs

Pourcentage de GC :	45,00%	Rendement par couplage :	99,95 %
Tm selon Wallace :	58,00 °C	Rendement de la synthèse :	99,00 %
Tm selon Breslaueur :	48,35 °C	<i>Calculé pour NaCl = 50mM et Oligo = 250pmoles</i>	

Rapport édité le : lundi 5 mai 2003

Contrôlé par : **AI**

Service technique et commercial : 01.69.07.94.77
Email commercial : adv@eurobio.fr
Email technique : oligo@eurobio.fr

Commandez vos oligonucléotides
par Internet à l'adresse <http://www.eurobio.fr>

721 R1	7,40 D.O.	
Notes		
eurobio	Store at -20°C	
721 R1	7,40 D.O.	
Notes		
eurobio	Store at -20°C	

LABORATOIRES EUROBIO

7, av. de Scandinavie - 91953 Les Ulis Cedex B - Tél. : 01 69 07 94 77 - Fax : 01 69 07 95 34

S.A. au capital de 926 128 € - RC Corbeil Essonnes B 622 018 554 - Siret 622 018 554 00031 - APE 244 D - CCP Paris 18896 62



RAPPORT DE SYNTHÈSE A FACON D'OLIGONUCLEOTIDES

Oligonucléotide **SMY F1** **11,00 D.O.** **24** mers.

Utilisateur : **M. GRASSEAU** Numéro de synthèse : **72900**
 Nom du Laboratoire : **CTIFL** Date de commande : **29/04/2003**

Séquence (5' > 3')

			10		20				
1-	TCG	CAA	TTC	GTT	AGG	GAT	GAT	GCG	-30
31-									-60
61-									-90
91-									-120
121-									-150

5 A 4 C 8 G 7 T 0 I 0 Wobble

Détails de la synthèse

Echelle de synthèse :	50nmoles	Masse molaire :	7 423 g.mol ⁻¹
Modification :		Coefficient d'extinction molaire :	259 500 l / mol x cm
Phosphorothioates :	0 liaison(s)	Soit :	349,58 µg
Purification :	Cartouche <input type="checkbox"/>	Soit :	47,09 nmoles
	H.P.L.C. <input type="checkbox"/>	Volume de reprise pour 100µM :	471 µl

Calculs

Pourcentage de GC :	50,00%	Rendement par couplage :	99,96 %
Tm selon Wallace :	72,00 °C	Rendement de la synthèse :	99,04 %
Tm selon Breslauer :	55,40 °C	<small>Calculé pour NaCl = 50mM et Oligo = 250pmoles</small>	

Rapport édité le : **lundi 5 mai 2003**

Contrôlé par : **AI**

Service technique et commercial : 01.69.07.94.77
 Email commercial : adv@eurobio.fr
 Email technique : oligo@eurobio.fr

Commandez vos oligonucléotides
 par Internet à l'adresse <http://www.eurobio.fr>

SMY F1	11,00 D.O.
Notes	
eurobio	Store at -20°C
SMY F1	11,00 D.O.
Notes	
eurobio	Store at -20°C

LABORATOIRES EUROBIO

7, av. de Scandinavie - 91953 Les Ulis Cedex B - Tél. : 01 69 07 94 77 - Fax : 01 69 07 95 34

S.A. au capital de 926 128 € - RC Corbeil Essonnes B 622 018 554 - Siret 622 018 554 00031 - APE 244 D - CCP Paris 18896 62



RAPPORT DE SYNTHÈSE A FACON D'OLIGONUCLEOTIDES

Oligonucléotide **SMY R1** **13,50 D.O.** **26** mers.

Utilisateur : **M. GRASSEAU**
Nom du Laboratoire : **CTIFL**

Numéro de synthèse : **72901**
Date de commande : **29/04/2003**

Séquence (5' > 3')

			10			20				
1-	CAT	AAT	CAA	CCA	TCC	ATA	AAA	ACC	AT	-30
31-										-60
61-										-90
91-										-120
121-										-150
	13 A	8 C	0 G	5 T	0 I	0	Wooble			

Détails de la synthèse

Echelle de synthèse :	50nmoles	Masse molaire :	7 843 g.mol ⁻¹
Modification :		Coefficient d'extinction molaire :	302 900 l / mol x cm
Phosphorothioates :	0 liaison(s)	Soit :	429,03 µg
Purification :	Cartouche <input type="checkbox"/>	Soit :	54,70 nmoles
	H.P.L.C. <input type="checkbox"/>	Volume de reprise pour 100µM :	547 µl

Calculs

Pourcentage de GC :	30,77%	Rendement par couplage :	99,96 %
Tm selon Wallace :	68,00 °C	Rendement de la synthèse :	98,97 %
Tm selon Breslauer :	49,44 °C		

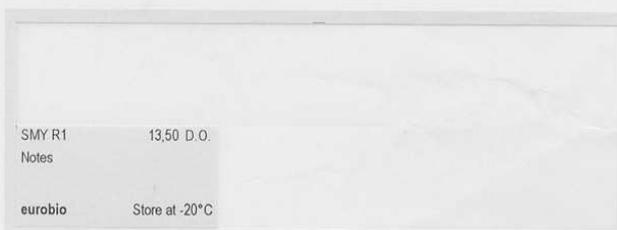
Calculé pour NaCl = 50mM et Oligo = 250pmoles

Rapport édité le : **lundi 5 mai 2003**

Contrôlé par : **AE**

Service technique et commercial : 01.69.07.94.77
Email commercial : adv@eurobio.fr
Email technique : oligo@eurobio.fr

Commandez vos oligonucléotides
par Internet à l'adresse <http://www.eurobio.fr>



LABORATOIRES EUROBIO

7, av. de Scandinavie - 91953 Les Ulis Cedex B - Tél. : 01 69 07 94 77 - Fax : 01 69 07 95 34

S.A. au capital de 926 128 € - RC Corbeil Essonnes B 622 018 554 - Siret 622 018 554 00031 - APE 244 D - CCP Paris 18896 62

ANNEXE 5

Références des marqueurs de poids moléculaire

MBI
Fermentas

**GeneRuler™
1kb DNA Ladder**

SM0311 5x0.05 mg

Concentration 0.5 mg DNA/ml

Lot# VA19

Supplied with 1ml 6x Loading solution

Store at -20°C

Description

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder is prepared from six different plasmids, containing pUC, λ, phage and yeast genome sequences, which were individually digested with appropriate restriction endonucleases, phenol extracted, ethanol precipitated, dissolved in 10mM Tris-HCl (pH 7.6) and 1mM EDTA.

The DNA Ladder contains the following 14 discrete fragments (in base pairs): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250.

Supplied in Storage Buffer
10mM Tris-HCl (pH 7.6), 1mM EDTA.

6x Loading Dye Solution
0.2% bromophenol blue, 0.2% xylene cyanol FF, 60% glycerol and 60mM EDTA.

Quality Control Assay Data
Agarose gel electrophoretic analysis of homogeneity of restriction endonucleases fragmentation patterns.

RECOMMENDATIONS FOR USE

- Prepare GeneRuler™ 1kb DNA Ladder before loading as following:
1µl (0.5µg) of GeneRuler™ 1kb DNA Ladder
1µl of 6x Loading Dye Solution
4µl of deionised water
- Vortex gently just prior to use.
- Do not heat before loading.
- Apply 0.1µg (0.2µl) of DNA Ladder per 1mm of agarose gel lane width.
- Following electrophoretic separation on agarose gel the DNA bands can be visualised by ethidium bromide staining.
- 1µg of the GeneRuler™ 1kb DNA Ladder contains 310ng (31% of the 3000bp fragment).

PRODUCT USE LIMITATION
This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes, and is not for clinical use. The product is not to be used in diagnostic or for drug development use. It is suitable for administration to humans or animals.

Updated October 25, 1998

GeneRuler™
1kb DNA Ladder

Fragment Sizes

Nouveau

100 pb LADDER

Référence	Conditionnement
018209	20 µg (120 tests)
018213	40 µg (240 tests)
018214	150 µg (900 tests)

Le marqueur de poids moléculaire 100 pb LADDER est un ADN double brin.

La taille et la répartition des fragments sont les suivants : 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 et 1000 pb.

Les bandes gardent la même intensité après coloration par le bromure d'éthidium.

Concentration : 200 µg/ml.

Conditions de dépôt recommandées : 2 µl de 100 pb LADDER + 2,5 µl de tampon de charge.

Tampon de stockage : 10 mM de tris-HCl, 50mM EDTA, pH 7,0.

Tampon de charge (6 X) : 0,06 % bleu de bromophénol, 15 % de Ficoll (Pharmacia), 0,06 % de Xylène cyanol, 30 mM EDTA.

Stockage : + 4° C.

ANNEXE 6

Références des différentes Taq polymérase utilisées



AMPLIFICATION ENZYMATIQUE IN VITRO

EUROBIOTAQ®II ADN POLYMERASE

ADN POLYMERASE THERMOSTABLE DE *Thermus aquaticus*

1/ INTRODUCTION

L'EUROBIOTAQ®II est une ADN polymérase thermostable de haute performance purifiée de la souche bactérienne recombinante *E. coli* exprimant le gène YT1 de *Thermus aquaticus*. Afin d'accroître la thermostabilité de l'enzyme, des substitutions d'acides aminés ont été réalisées en plusieurs endroits à l'extrémité NH₂ terminale de la protéine. L'EUROBIOTAQ®II a un poids moléculaire apparent sur gel SDS-PAGE de 85kDa.

2/ UTILISATION

L'EUROBIOTAQ®II est une enzyme clonée et garantit donc une excellente reproductibilité lot à lot. Elle peut être utilisée pour l'amplification enzymatique *in vitro* (PCR), le séquençage de l'ADN ou toute autre technique couramment utilisée en biologie moléculaire.

L'EUROBIOTAQ®II est une enzyme ubiquitaire qui se révèle être particulièrement adaptée à tout type de manipulation.

3/ REACTIFS FOURNIS

-EUROBIOTAQ®II : tubes de 250, 500, 1000 et 5 x 100 unités.
-Tampon de réaction 10 X sans MgCl₂
-Solution de MgCl₂ 50 mM

Conservation : -20°C. Le glycérol présent dans le tampon de conservation évite la congélation de l'enzyme à -20°C.
Stabilité : 24 mois.

Livraison : du fait de sa très grande thermostabilité L'EUROBIOTAQ®II ADN polymérase est livrée à température ambiante; nous recommandons de la stocker à -20°C dès réception.

4/ CARACTERISTIQUES

Concentration : 5 unités/µl.

Définition de l'unité : une unité est définie comme la quantité d'enzyme qui transforme en 30 minutes à 74°C, 10 nmoles de dNTPs sous forme insoluble en milieu acide dans les conditions de réaction suivantes: tampon TAPS (acide Tris-(hydroxyméthyl)-méthyl-ami-nopropanesulfonique, sel de sodium) 25 mM pH 9,3 (25°C); KCl 50 mM; MgCl₂ 2 mM; β-mercaptoéthanol 1 mM; dATP, dGTP et dTTP 200 µM chacun, dCTP 100 µM (mélange de non marqué et de marqué α-³²P); 12 µg d'ADN de sperme de saumon dans un volume réactionnel final de 50 µl.

Tampon de réaction (10X) fourni : 670 mM Tris HCl pH 8,8; 160 mM(NH₄)₂SO₄; 0,1 % Tween 20.

Solution de MgCl₂ fournie à part : 50 mM MgCl₂. Les conditions expérimentales optimales dépendent du système utilisé et doivent être déterminées individuellement; la concentration en Mg²⁺ et la quantité d'enzyme sont particulièrement déterminantes. Classiquement on utilise 2,5 unités d'enzyme pour 100 µl de volume réactionnel et une concentration finale en MgCl₂ de 1,5 mM.

Tampon de conservation : 20 mM TrisHCl pH 8,0 (25°C); 100 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 1mM DTT; 50% glycerol; 0,5 % Nonidet P-40; 0,5 % Tween 20.

Activités associées : absence d'activité endonucléase et exonucléase.

Test d'activité endonucléase : 1 µg d'ADN de phage Lambda est incubé en présence de 15 unités d'enzyme dans un volume réactionnel de 20 µl à 72°C pendant 6 heures.

Test d'activité exonucléase : 15 unités d'enzyme sont introduites dans 20 µl de milieu réactionnel renfermant 200 ng d'ADN génomique marqué au ¹⁴C pendant 1 heure à 72°C. La radioactivité incorporée dans la fraction insoluble en milieu acide est mesurée et n'excède pas 0,01%.

5/ CONDITIONNEMENT

Conditionnement	Anc. Référence	Nelle Référence
250 unités	018194	GAETAQ01-4D
500 unités	018195	GAETAQ01-4F
1000 unités	018197	GAETAQ01-4G
5 x 100 unités	018196	GAETAQ01-4W

*La PCR est une technologie couverte par les brevets Hoffman-La Roche Inc.

Laboratoires EUROBIO
7, avenue de Scandinavie - 91953 Les Ulis Cedex France
Tél. : 33 (0)1 69 07 94 77- Fax: 33 (0)1 69 07 95 34
Internet : <http://www.eurobio.fr>



Wegu (

2

AMPLIFICATION ENZYMATIQUE IN VITRO

EXTRA-POL® I ADN POLYMERASE

ADN POLYMERASE THERMOSTABLE ISOLEE DE *Thermus brockianus*

1/ INTRODUCTION

L'EXTRA-POL® I ADN polymérase est une nouvelle polymérase thermostable isolée et purifiée de *Thermus brockianus*. Elle ne présente pas d'activité endonucléase ou exonucléase contaminante. L'EXTRA-POL® I ADN polymérase est caractérisée par une très grande thermostabilité : sa demi-vie est de 2,5 heures à 96°C. Bien que dépourvue d'activité de contrôle de lecture 3'→5' son taux d'erreur est deux fois inférieur à celui d'une Taq ADN polymérase classique. L'EXTRA-POL® I ADN polymérase possède une activité exonucléase 5'→3'.

2/ UTILISATION

L'EXTRA-POL® I ADN polymérase peut être utilisée pour toutes les applications classiques en biologie moléculaire y compris le séquençage en raison de son faible taux d'erreur. L'EXTRA-POL® I ADN polymérase permet l'extension de grands fragments; son efficacité a pu être démontrée pour des fragments de 7000 pb.

3/ REACTIFS FOURNIS

- EXTRA-POL® I : tubes de 250, 500, 1000 et 5x100 unités
- Tampon de réaction 10X sans MgCl₂
- Solution de MgCl₂ 50mM

Conservation : -20°C. Le glycérol présent dans le tampon de conservation évite la congélation de l'enzyme à -20°C.
Stabilité : 24 mois.

Livraison : du fait de sa très grande thermostabilité l'EXTRA-POL® ADN polymérase est livrée à température ambiante; nous recommandons de la stocker à -20°C dès réception.

4/ CARACTERISTIQUES

Concentration : 5 unités/µl.

Définition de l'unité : une unité est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à l'incorporation de 10 nmoles de dNTPs sous

forme insoluble en milieu acide en 30 minutes à 74°C dans le milieu réactionnel défini ci-après: tampon TrisHCl 20mM pH 7,4 (25°C); KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5mM; 0,1% Triton X100; 200 µM de chaque dTTP, dGTP, dCTP et ³HdATP; 10µg d'ADN de sperme de saumon dans un volume réactionnel final de 50 µl.

Tampon de réaction (10X) fourni : 100 mM TrisHCl pH8,8; 500mM KCl; 1% Triton X100.

Solution de MgCl₂ fournie à part : 50mM MgCl₂. Les conditions expérimentales optimales dépendent du système utilisé et doivent être déterminées individuellement; la concentration en Mg²⁺ et la quantité d'enzyme sont particulièrement déterminantes. Classiquement on utilise 2,5 unités d'enzyme pour 50 µl de volume réactionnel et une concentration finale en MgCl₂ de 1,5mM.

Tampon de conservation : 20mM TrisHCl pH7,4 (25°C); 0,1mM EDTA; 1mM DTT; 100mM KCl; 0,1% Triton X100; 160µg/ml BSA; 50% glycérol.

Activités associées : absence d'activité endonucléase et exonucléase.
Test d'activité endonucléase : 1 µg d'ADN de phage Lambda/Hind III est incubé avec 10 unités d'enzyme dans le milieu réactionnel pendant 4 heures à 72°C.
Test d'activité exonucléase : 10 unités d'enzyme sont incubées à 72°C pendant 4 heures en présence de 1 µg de ³H-ADN génomique soniqué. La radioactivité relarguée est inférieure à 2%.

5/ CONDITIONNEMENT

Quantité	Référence
250 unités	018013
500 unités	018014
1000 unités	018015
5x100 unités	018016

*La PCR est une technologie couverte par les brevets Hoffman-La Roche Inc.

Laboratoires EUROBIO
7, avenue de Scandinavie - 91953 Les Ulis Cedex France
Tél. : 33 (0)1 69 07 94 77- Fax: 33 (0)1 69 07 95 34
Internet : <http://www.eurobio.fr>





3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765
Fax (314) 286-7828
email: sigma-techserv@sial.com
http://www.sigma-aldrich.com

**Taq DNA Polymerase,
Recombinant From *E. coli***

Product No. **D1806**
Technical Bulletin No. MB-300
March 1999

Introduction

Taq DNA Polymerase is a thermostable enzyme derived from the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*. The enzyme is in a recombinant form, expressed in *E. coli*. It is able to withstand repeated heating to 95°C without significant loss of activity. The enzyme is approximately 94 kDa by SDS-PAGE with no detectable endonuclease or exonuclease activity. It has 5'→3' DNA polymerase activity and 5'→3' exonuclease activity. Each lot of *Taq* DNA Polymerase is tested for PCR⁺ amplification and double-stranded sequencing. The enzyme is supplied at 5 units/μl and comes with an optimized 10X reaction buffer.

Unit Definition: One unit incorporates 10 nmol of total deoxyribonucleoside triphosphates into acid precipitable DNA in 30 minutes at 74°C.

Reagents Provided

- *Taq* DNA Polymerase, Product No. D6677 1 vial
5 units/μl in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl,
0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween 20,
0.5% Igepal CA-630, 50% glycerol
- 10X PCR Buffer, Product No. P2192 1 vial
100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl,
15 mM MgCl₂ and 0.01% gelatin

Product Information

Reagents Required but Not Provided

(Sigma Product Numbers have been given where appropriate.)

- 10 mM dATP, Product No. D6920
- 10 mM dCTP, Product No. D7045
- 10 mM dGTP, Product No. D7170
- 10 mM TTP, Product No. T7791
or (in place of individual nucleotides)
- Deoxynucleotide Mix, Product No. D7295
containing 10 mM dATP, 10 mM dCTP,
10 mM dGTP, 10 mM TTP
- Water, Product No. W1754
- Mineral Oil, Product No. M8662 (optional)
- Thermal cycler
- Primers
- DNA to be amplified
- Termination Mixes (for cycle sequencing):
ddATP termination mix (25 μM each of dATP,
dCTP, dGTP and TTP, 850 μM ddATP, 950 μM
MgCl₂)
ddCTP termination mix (25 μM each of dATP,
dCTP, dGTP and TTP, 400 μM ddCTP, 500 μM
MgCl₂)
ddGTP termination mix (25 μM each of dATP,
dCTP, dGTP and TTP, 210 μM ddGTP, 315 μM
MgCl₂)
ddTTP termination mix (25 μM each of dATP,
dCTP, dGTP and TTP, 1275 μM ddTTP, 950 μM
MgCl₂)

Precautions and Disclaimer

Sigma's *Taq* DNA Polymerase is for laboratory use only; not for drug, household or other uses. When radioactive tracers are used, standard procedures for safely handling radioactive materials should be followed. Refer to Material Safety Data Sheet.

Storage

Store at -20°C

8 References

*Products marked "licensed for PCR" are sold under licensing arrangements with F. Hoffmann-La Roche Ltd., Roche Molecular Systems, Inc., and Applied Biosystems Division, The Perkin-Elmer Corporation.

9 Ordering information

Product	Package size	International order number	North American order number
HotMaster™ Taq DNA Polymerase	100 units	0032 002.676	954 14 015-6
	250 units	0032 002.684	954 14 016-4
	1000 units	0032 002.692	954 14 017-2
MasterTaq® Kit	100 units	0032 002.404	954 14 003-2
	250 units	0032 002.501	954 14 004-1
	500 units	0032 002.552	954 14 008-3
TripleMaster™ PCR System Plus	1000 units	0032 002.650	954 14 009-1
	100 units	0032 008.208	954 14 020-2
	100 units	0032 008.216	954 14 022-9
TripleMaster™ PCR System	200 units	0032 008.224	954 14 024-5
	500 units	0032 008.232	954 14 026-1
	125 units	0032 002.250	954 14 040-7
Eppendorf® MasterMix	1250 units	0032 002.447	954 14 042-3
	200 µl	0032 003.001	954 14 300-7
Eppendorf® dNTP Mix (10 mM)	1000 µl	0032 003.109	954 14 301-5
	4 x 100 µl	0032 003.206	954 14 302-3
Eppendorf® dNTP Set (100 mM)	4 x 250 µl	0032 003.303	954 14 303-1
	25 mM, 1.5 ml	0032 002.749	954 14 102-1
Eppendorf® Magnesium Solution	100 U	0032 002.200	954 14 000-8
	250 U	0032 002.307	954 14 001-6
Eppendorf® Taq DNA Polymerase	500 U	0032 003.419	954 14 006-7
	1000 U	0032 007.724	954 14 007-5
	1000 µl	0032 006.302	955 15 503-3
Molecular Biology Grade Water	10 x 50 ml	0030 124.332	951 01 000-6
	1000 tubes	0030 124.502	951 01 005-7
PCR tubes, 0.2 ml	500 tubes	5333 000.026	950 00 005-8
Eppendorf® Mastercycler® personal,	120V	5332 000.049	950 00 003-1
	230V	5332 000.014	950 00 004-0
Eppendorf® Mastercycler® gradient,	120V	5331 000.045	950 00 001-5
	230V	5331 000.010	950 00 002-3

eppendorf
In touch with life

Eppendorf AG · 22331 Hamburg · Germany · Phone: +49 40-5 38 01-0 · Fax: +49 40-5 38 01-556
e-mail: eppendorf@eppendorf.com · Internet: www.eppendorf.com
Application Hotline: Phone: +49 180-3 65 67 69 · e-mail: application-hotline@eppendorf.com

Brinkmann Instruments, Inc. · One Cantiague Road, P.O. Box 1019 · Westbury, NY 11590-0207 (USA)
Phone: 800-645-3050 · Fax: 516-334-7506 · e-mail: info@brinkmann.com · Internet: www.brinkmann.com

0032 900 410 01 01 01 0032 Printed in the USA. HotMaster™, MasterTaq™, TripleMaster™, MasterMix™, dNTP Mix™, dNTP Set™, Magnesium Solution™, PCR tubes™, Mastercycler® personal™, Mastercycler® gradient™, and eppendorf™ are registered trademarks of Eppendorf AG. Taper™ and BEPAL™ are registered trademarks of ICI Americas, Inc. and Shell Petroleum Company, Limited, UK, respectively.

HotMaster™ Taq DNA Polymerase

Licensed for PCR¹ *Regu ee 16-10-02* For research use only

1 Introduction

The HotMaster Taq DNA Polymerase Kit is a superior alternative for performing PCR experiments generally known as "hot start" PCR. The HotMaster Taq DNA Polymerase formulation consists of a combination of Eppendorf's Taq Polymerase and the proprietary HotMaster inhibitor (patent pending). This multipotent competitive polymerase inhibitor was discovered by screening a combinatorial library of derivatized natural affinity ligands of DNA polymerases. HotMaster blocks the substrate binding site of DNA polymerases in a temperature-dependent manner. Inactive polymerase-inhibitor complexes are formed at temperatures < 40°C, where the affinity of HotMaster for Taq polymerase is higher than the binding affinity of the template DNA. Between 40°C and 55°C the HotMaster competes with the template DNA for binding to the Taq polymerase, thereby shifting the binding equilibrium towards complex formation with only target-specific primed template DNA. At temperatures above 55°C the HotMaster inhibitor is displaced from complexes with the Taq polymerase by target-specific primed template DNA. A unique performance feature of the HotMaster inhibitor is that it can go through multiple temperature cycles of binding-equilibrium competition-dissociation during PCR without irreversible heat inactivation. Where other Taq polymerase formulations for "hot start" PCR block the activity of Taq polymerase only prior to the first high temperature step, the Eppendorf HotMaster provides sustained temperature control throughout PCR.

Superior product features for "hot start" PCR applications

- HotMaster Taq Polymerase does not require heat activation
- Continuous annealing temperature control throughout the PCR
- Extended target size range for PCR amplification (up to 5 kb)
- Pre-optimized universal magnesium concentration in the buffer
- No protein contamination of the PCR by denatured antibodies

2 Materials

Materials supplied with the kits:

Component	HotMaster Taq DNA Polymerase		
	100 units	250 units	1000 units
HotMaster Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	20 µl	50 µl	200 µl
10x HotMaster Taq Buffer with 25 mM Mg ²⁺	1.8 ml	1.8 ml	3 x 1.8 ml

eppendorf

3 Enzyme concentration

5 U/µl*

*One unit is defined as the amount of enzyme that incorporates 10 nmoles of dNTPs into acid insoluble form in 30 minutes at 74°C under the assay conditions, using reaction conditions: 25 mM TAPS (N-Tris-(hydroxy-methyl)-methyl-3-amino-propanesulfonic acid, sodium salt) pH 9.3 (at 25°C); 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 1 mM β-mercaptoethanol; 200 µmole each dATP, dGTP, dTTP; 100 µM dCTP (a mix of unlabeled and [³²P]-labeled); 12.5 µg activated salmon sperm DNA in a final volume of 50 µl.

4 Enzyme storage buffer composition

25 mM Tris-HCl pH 8.0, 35 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 % glycerol, 0.5 % Tween® 20, 0.5% IGEPAL® CA-630 and stabilizers.

5 Storage and stability

Store at -20°C in a constant temperature freezer. If stored as recommended the kit is stable at least until the expiration date on the label.

6 Quality assurance

Each lot of HotMaster Taq DNA Polymerase is performance tested with human genomic DNA to amplify a specific 3 kb product from the human β-globin gene and a 131 bp product from the human TNF gene.

Endo- and Exonuclease activities were not detectable after overnight incubation, respectively, of 1 µg supercoiled plasmid DNA and 1 µg of Hind III digested Lambda DNA at 37°C in the presence of 15 to 20 units of HotMaster Taq DNA Polymerase.

7 Protocol

For a 50 µl reaction, mix the following components at ambient temperature in a thin-walled PCR tube:

Component	Volume	Final Conc./Amount per reaction
Molecular Biology Grade Water	variable	
10x HotMaster Taq Buffer with Mg ²⁺	5 µl	1x (2.5 mM Mg ²⁺)
10 mM dNTP Mix	1 µl	0.2 - 0.25 mM
Primer A (forward)	variable	0.1 - 0.5 µM
Primer B (reverse)	variable	0.1 - 0.5 µM
Template DNA	variable	0.1 - 200 ng
HotMaster Taq DNA Polymerase	0.25 - 0.5 µl	1.25 - 2.5 U
Total volume	50 µl	

Initial template denaturation should be performed at 94°C for no more than 2 minutes, HotMaster Taq Polymerase does not require heat activation. The magnesium concentration does not need to be adjusted. The concentration in the HotMaster Taq buffer has been optimized for all targets. The optimal concentrations of other variable reaction components such as template DNA and primer must be determined empirically.

The recommended synthesis temperature for the primer elongation step in a PCR cycle is 65°C in an allowed range of 60°C to 70°C. The optimal primer elongation temperature for quantitative real time PCR with TaqMan probes is 60°C.

Suggested cycling parameters:

PCR cycle	Temperature	PCR product size		
		100-500 bp	500-1000 bp	1kb-5 kb
Initial denaturation	94°C	2 min	2 min	2 min
Cycled template denaturation	94°C	20 sec.	20 sec.	20 sec.
Cycled primer annealing	50-65°C	10 sec.	10 sec.	20 sec.
Cycled primer extension	60-70°C	20-30 sec.	40-50 sec	1 min/kb

ANNEXE 7

Protocole de réalisation du test de sexage d'*Actinidia chinensis*

Ce protocole permet de déterminer le genre des plants d'*Actinidia chinensis* dès l'apparition des premières feuilles. Il a été adapté d'après la publication de Gill *et al.* (1998) : Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia* (Theor Appl Genet 97 : 439 – 445).

Le protocole d'extraction cité dans cette publication qui a été repris et modifié ici est celui d'Harvey *et al.* (1997 'Sex determination in *Actinidia*', Acta Horticulturae 444 (1): 85-88). Les conditions de PCR ont été trouvées dans l'article 'Sex determination in *Actinidia*. 1. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*', Harvey *et al.* (1997, Sex Plant Reprod 10: 149-154).

Ce test est décrit en 6 étapes :

I. Prélèvement des échantillons de feuilles des individus à tester	1
II. Extraction d'ADN	2
III. Dilution des extraits d'ADN	5
IV. Amplification PCR	6
V. La révélation sur gel d'agarose	9
VI. Lecture du test	10



I. Prélèvement des échantillons de feuilles des individus à tester

Chaque plant soumis au test doit porter un moyen d'identification durable, résistant à l'eau et à la lumière ; avant tout prélèvement, il est donc indispensable d'étiqueter les plants, le plus simple étant de leur attacher des étiquettes pré-numérotées.

Deux jeunes feuilles de 3 cm de long suffisent pour réaliser le test, mais il est recommandé d'en prélever 4 dans l'éventualité d'une mauvaise extraction. Les feuilles d'un même individu sont placées dans un sachet plastique (type sac de congélation) portant le même numéro que le plant. Les sachets peuvent ensuite être conservés au moins une semaine au réfrigérateur à 4°C jusqu'à l'extraction.

En fonction de la taille des plants, cette étape peut se révéler plus ou moins longue : s'ils sont petits, les prélèvements sont faciles et il faut compter environ 1 minute de collecte par plant à tester ; si les plants sont plus grands, il y a de fortes chances pour que les tiges s'emmêlent les unes aux autres et que la collecte prenne plus de temps. Il faudra alors compter environ 2 minutes par plant à tester.



II. Extraction d'ADN

L'extraction est une étape décisive du protocole, et son taux d'échec n'est pas nul. Elle doit se dérouler sur deux jours en raison d'une étape de re-dissolution du précipité d'ADN dans une solution de NaCl pendant une nuit.

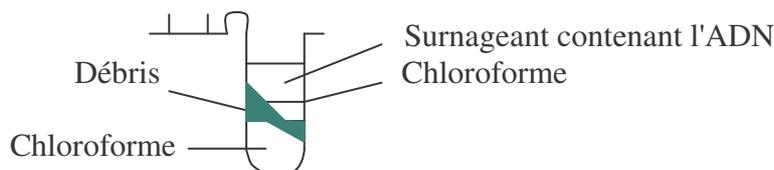
Nous allons d'abord voir le protocole de la manipulation, puis la composition des solutions utilisées sera décrite dans une deuxième partie.

A. Protocole d'extraction (2 demies journées pour 48 échantillons)

1. Enfiler des gants latex et numéroter des sachets de broyage ainsi que des tubes de 2 ml avec les numéros des plants à tester.
2. Pour chaque individu : nettoyer le plan de travail avec de l'éthanol puis découper chaque feuille afin d'ôter la nervure principale (utiliser une lame de scalpel par individu). Placer le limbe dans le sachet de broyage correspondant.
3. Ajouter 6 ml de tampon d'extraction dans le sachet de broyage.
Broyer à la perceuse et récupérer environ 700 μ l de liquide dans les tubes de 2 ml précédemment numérotés.
4. Incuber à 65°C pendant 20 min. Agiter 2-3 fois pour bien homogénéiser au cours de l'incubation. Pendant ce temps, numéroter des tubes de type eppendorf de 1,5 ml avec les numéros des plants à tester.

LAISSER REFROIDIR, sinon le CHCl_3 bout et l'ARN est extrait.

5. **Sous hotte** : ajouter 1 volume (700 μ l) de chloroforme / octanol (24 :1). Mélanger les tubes jusqu'à émulsion homogène (\approx 5 min). Le CHCl_3 ne doit pas former de phase mais décanter très doucement.
6. Centrifuger 10 minutes à 13000 g.
7. **Sous hotte** : prélever le surnageant (\approx 400 μ l) à l'aide d'une micro-pipette équipée d'un filtre à charbon. Transférer dans les tubes de 1,5 ml précédemment numérotés. Conserver le surnageant restant jusqu'à la fin de la manipulation.



L'extraction peut être arrêtée à cette étape et les échantillons conservés à 4°C.

8. Ajouter 1 volume d'isopropanol FROID ($\approx 400 \mu\text{l}$). Mélanger **délicatement** par basculement. Attendre de voir l'ADN qui précipite sous forme de pelote en mélangeant. S'il n'y a pas formation de la pelote, alors l'extraction est à recommencer (à partir de l'étape 7 ou à partir du début).
9. Centrifuger immédiatement 5 min à 13000 g. Moins d'impuretés précipitent avec l'ADN lorsque la centrifugation est réalisée rapidement après l'ajout de l'isopropanol.
10. Eliminer le surnageant avec la trompe à vide. Attention, la solution peut être visqueuse, surtout si elle est colorée, et elle risque d'entraîner le culot dans la trompe à vide! Si cela se produit, changer la verrerie de la trompe avant de commencer un nouvel échantillon.
11. Laver le culot avec 200 μl d'éthanol à 70%. Le culot doit être soulevé, au vortex si nécessaire.
12. Centrifuger 5 min à 13000 g.
13. Vider le surnageant dans l'évier avec la trompe à vide. Si le culot est entraîné dans la trompe à vide, changer la verrerie de la trompe avant de commencer un nouvel échantillon.
14. Passage à l'évaporateur concentrateur 2 min.
15. Re-dissolution du précipité dans 300 μl de solution NaCl à 1M pendant 1 nuit au réfrigérateur (attendre jusqu'à dissolution complète du culot).
16. Ajouter 1 volume d'isopropanol FROID ($\approx 300 \mu\text{l}$). Mélanger délicatement par basculement. Attendre de voir l'ADN qui précipite sous forme de pelote en mélangeant. S'il n'y a pas formation de la pelote, alors l'extraction est à recommencer (à partir de l'étape 7 ou à partir du début).
17. Centrifuger immédiatement 5 min à 13000 g. Moins d'impuretés précipitent avec l'ADN si la centrifugation est réalisée rapidement après l'ajout d'isopropanol.
18. Eliminer le surnageant avec la trompe à vide. Si le culot est entraîné dans la trompe à vide, changer la verrerie de la trompe avant de commencer un nouvel échantillon.
19. Laver le culot avec 200 μl d'éthanol à 70% . Le culot doit être soulevé, au vortex si nécessaire.
20. Centrifuger 5 min à 13000 g.
21. Vider le surnageant avec la trompe à vide. Si le culot est entraîné dans la trompe à vide, changer la verrerie de la trompe avant de commencer un nouvel échantillon.
22. Passer à l'évaporateur concentrateur 2 min.
23. Reprendre les culots dans 200 μl d'eau stérile ultra-pure.
Tapoter le tube pour décoller le culot.

24. Traitement à la RNase A : Ajouter 4 µl de RNase A (10 mg/ml) au fond du tube.
Mélanger. Incuber à 65°C pendant 1 à 2 heures.

Conserver à 4°C.

La re-suspension de l'ADN est totale au bout d'une nuit.

Les dilutions suivantes se feront dans l'eau.

Les échantillons seront conservés à 4°C pendant 2-3 mois ou à -20°C quelques années.

B. Les solutions utilisées

✓ NaOH 10 M

- NaOH 40 g
- Eau UP QSP 100 ml

Attention, la réaction est exothermique...

✓ EDTA 500mM

- EDTA 18.61 g
- Ajuster à pH 8 avec NaOH 10M (de 10 à 40 ml) avant de compléter à 100 ml
- H2O UP QSP 100 ml

Solution à autoclaver.

✓ Tris-HCl 1 M

- Tris (M = 121.1 g/mol) 24.23 g
- Ajuster à pH 8 avec HCl
- H2O UP QSP 200 ml

Solution à autoclaver.

✓ Tampon d'extraction TE1

- CTAB 20 g
- NaCl 82 g
- EDTA 40ml de solution à 500 mM
- Tris-HCl 100 ml de solution à 1 M
- H2O UP QSP 1l

Aliquoter en flacons de 100 ml

Le CTAB se solubilise aux environs de 50°C.

✓ Chloroforme-octanol (24/1)

- Chloroforme 240 ml
- Octanol 10 ml

A préparer sous la hotte ; agiter puis laisser décanter.

✓ Alcool 70 %

- Ethanol 95° 350 ml
- Eau 137 ml



III. Dilution des extraits d'ADN

Après avoir extrait l'ADN à partir de feuilles, il va falloir évaluer sa concentration afin de le diluer pour obtenir une solution à 5 ng / μ l. Voici le protocole de la manipulation :

1. Enfiler des gants latex et prendre une plaque ELISA pour l'analyse au spectrophotomètre. Faire un schéma de plaque (noter à quel échantillon correspond chaque puits).
2. Dans chaque puits, placer 135 μ l d'eau UP stérile.
3. Placer 15 μ l d'ADN dans chaque puits en mélangeant bien et en suivant le schéma de plaque.
4. Dans le puits H 12, placer 150 μ l d'eau UP stérile.
5. Allumer l'ordinateur sous le login « spectro24 », avec le mot de passe « spectro » et allumer le spectrophotomètre.
6. Lancer le logiciel « Multiscan Spectrum ». Activer la commande « Plate out » et placer la micro-plaque dans le spectrophotomètre.
7. Cliquer sur « Predefined protocols », ouvrir le programme « Kiwi concentration » et activer la commande « Start Kiwi concentration ». Le spectrophotomètre scanne alors les échantillons et un schéma de la plaque apparaît, avec les concentrations d'ADN de chaque extrait.
8. Imprimer les résultats ou les sauvegarder (commande Export).
9. Voici un tableau de conversion permettant de définir la dilution nécessaire pour chaque extrait afin de réaliser une solution à environ 5 ng / μ l d'ADN:

Concentration mesurée au spectrophotomètre	Quantité d'extrait à pipeter	Quantité d'eau UP stérile
< 25 ng / μ l	échantillon refusé	/
entre 25 et 49 ng / μ l	20 μ l	80 μ l
entre 50 et 99 ng / μ l	10 μ l	90 μ l
entre 100 et 499 ng / μ l	5 μ l	95 μ l
> 499 ng / μ l	1 μ l	99 μ l

Suivre ce tableau de conversion afin de réaliser la dilution appropriée des extraits dans des tubes de 1,5 ml numérotés.

Vous pouvez également exporter les données vers Excel pour un calcul exact des dilutions de la manière suivante :

1. Lancer Excel, ouvrir le fichier « Spectrophotomètre kiwi » ;
2. Effacer tout le contenu de la feuille « Importation données spectro » ;
3. Activer la cellule A1.
4. Cliquer sur « Données » puis sur « Données externes » et enfin « Importer le fichier texte ».
5. Sélectionner « Tous les fichiers » puis sélectionner le fichier export (extension « .exp ») du spectrophotomètre.
6. Cliquer sur « Importer », puis sur « Terminer » et enfin sur « OK ».
7. Cliquer sur « Edition » « Rechercher ». Il faut rechercher tous les points et les remplacer par des virgules pour que le logiciel Excel prenne les valeurs en compte.
8. Il ne reste plus qu'à lire les dilutions exactes à effectuer dans la feuille « Calcul des dilutions ».

Toute la manipulation peut s'effectuer en 1 heure.

IV. Amplification PCR



A. Préparation du mélange réactionnel (mix)

La composition du mix peut être calculée très facilement en fonction du nombre d'échantillons à traiter à l'aide de la feuille de calcul Excel du fichier « Préparation mix ». Il suffit d'entrer dans la case « G5 » le nombre d'échantillons souhaité et les quantités d'eau, de tampon, d'amorces, de dNTP, de Taq et d'ADN apparaissent automatiquement.

Ne pas oublier que les erreurs de pipetage sur de si petits volumes sont fréquentes, et qu'il faut donc prévoir deux échantillons supplémentaires pour préparer le mix. De même, il ne faut pas oublier de prévoir un échantillon qui servira de témoin et auquel aucun ADN ne sera ajouté. Il faut donc inscrire dans la case « G5 » le nombre d'échantillons à traiter plus 3 échantillons supplémentaires. Il faut également vérifier que les produits utilisés sont aux bonnes concentrations.

Voici un extrait de la feuille de calcul « Préparation mix », sur laquelle on peut voir les composants du mix, leur concentration initiale ainsi que leur concentration dans le mix :

Quantité d'échantillons 27

NB: ne pas oublier 2 échantillons supplémentaires pour les erreurs de pipetage et un échantillon supplémentaire pour le mix 'témoin'

	[C] i	[C] f	Qté pour mix de 25 µl	Qté totale
Eau			15,9 µl	429,3 µl
Tampon Eppendorf	10 x	1 x	2,5 µl	67,5 µl
Amorces SmYf1	100 µM	0,2 µM	0,05 µl	1,35 µl
Amorces SmYr1	100 µM	0,2 µM	0,05 µl	1,35 µl
Amorces 721r	100 µM	0,5 µM	0,125 µl	3,375 µl
Amorces 721f	100 µM	0,5 µM	0,125 µl	3,375 µl
dNTPs	100000 µM	200 µM	0,05 µl	1,35 µl
Taq Eppendorf	5 u/µl	1 u/25µl	0,2 µl	5,4 µl
ADN	5 ng/µl	30 ng/25µl	6 µl	162 µl
Total			25 µl	675 µl

Préparation de la PCR: 19µl de mix + 6µl d'ADN par microtube

Légende:	[C] i	Concentration initiale
	[C] f	Concentration finale dans le mix
	Qté totale	Quantité pour un volume de 25 µl multipliée par le nombre d'échantillons

1. Avant de préparer le mix, enfiler des gants latex, sortir et numéroter une micro-plaque ou des microtubes pour la PCR ainsi que des bouchons.
2. Le mix se prépare sous une hotte stérile sous laquelle les extraits d'ADN ne doivent jamais entrer. Les composants s'ajoutent dans l'ordre indiqué sur le tableau, la Taq étant la dernière à être ajoutée sous la hotte. Le mix est alors sorti de la hotte, et placé dans la glace. Une fois la Taq ajoutée, le mix ne se conserve pas et la PCR ne doit pas être retardée.
3. Placer la micro-plaque dans la glace et mettre 19µl de mix dans chaque puit.
4. Ajouter 6 µl d'ADN dans chaque puit en mélangeant bien, puis mettre les bouchons en place. Centrifuger quelques secondes afin que les gouttes en suspension descendent au fond des puits.
5. Placer la plaque dans le thermocycleur PTC 100 et lancer le programme « Kiwi-cou ».

B. Programmation du thermocycleur

Programme PCR *Actinidia chinensis* : 38 cycles

1 ^{ère} dénaturantion :	95°C pendant 10 minutes	
Cycles 1 et 2 :	Dénaturantion 94°C pendant 5 secondes	
	Hybridation 58°C pendant 30 secondes	2 Cycles
	Elongation 72°C pendant 1 minute	
Cycles 3 et 4 :	Dénaturantion 94°C pendant 5 secondes	
	Hybridation 57°C pendant 30 secondes	2 Cycles
	Elongation 72°C pendant 1 minute	
Cycles 5 et 6 :	Dénaturantion 94°C pendant 5 secondes	
	Hybridation 56°C pendant 30 secondes	2 Cycles
	Elongation 72°C pendant 1 minute	
Cycles 7 et 8 :	Dénaturantion 94°C pendant 5 secondes	
	Hybridation 55°C pendant 30 secondes	2 Cycles
	Elongation 72°C pendant 1 minute	
Cycles 9 à 38 inclus:	Dénaturantion 94°C pendant 5 secondes	
	Hybridation 54°C pendant 30 secondes	30 Cycles
	Elongation 72°C pendant 1 minute	
Elongation finale :	72°C pendant 10 minutes	
Programmer une température de 8°C en fin de programme.		

Il faut compter environ 40 minutes pour la préparation du mix et des micro-tubes.
L'amplification PCR dure environ 2h15 dans le PTC 100.

Les extraits amplifiés ne doivent pas être ramenés dans le laboratoire de préparation du mix mais conservés dans la salle de révélation.



V. Révélation sur gel d'agarose

La lecture du test a lieu dans la salle de révélation, où le port de la blouse et des gants est obligatoire. Dans cette salle a lieu la manipulation de bromure d'éthidium (Bet), un agent intercalant cancérigène. C'est pourquoi il faut lire les mises en garde affichées au sujet de ce produit avant toute manipulation. La révélation dure environ 1 heure.

1. Enfiler des gants nitrile.
2. Placer deux scotchs aux extrémités de la plaque portoir et placer les peignes.
3. Verser la quantité d'agarose correspondant au gel souhaité dans un erlenmeyer.

	Gel à 1,5%
Très grand gel (300ml) (36 puits)	4,5 g
Grand gel (50ml) (11 puits)	0,75 g
Petit gel (25ml) (7 puits)	0,37 g

(Les gels à 1% permettent de mieux visualiser les fragments vers 800pb alors que les gels à 2% permettent de mieux visualiser les fragments plus petits (vers 100pb).)

4. Ajouter dans l'erlenmeyer la quantité de TBE correspondant au volume du gel souhaité (rajouter 2 à 3ml supplémentaires car ils s'évaporeront au micro-ondes).
5. Chauffer environ 1 min au micro-ondes jusqu'à dissolution complète de l'agarose dans le TBE.
6. Verser la solution dans un tube plastique à bouchon (tube falcon) et rincer immédiatement l'erlenmeyer avant que le gel ne fige.
7. Attendre que la température du gel baisse jusqu'à pouvoir saisir le tube.
8. Verser **1 goutte de BEt (très dangereux)** pour **50ml de gel d'agarose** dans le tube plastique, refermer le bouchon et agiter.
9. Verser le contenu du tube plastique sur la plaque, ôter les bulles à l'aide d'une micro pipette.
10. Attendre que le gel prenne.
11. Préparer une micro-plaque avec **2µl de tampon de charge** par puits pour chaque échantillon.
12. Oter les scotchs une fois le gel pris.

13. Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie de TBE et ôter les peignes.
14. Compléter avec du TBE jusqu'à ce que les puits soient totalement recouverts.
15. Pipeter **8 µl d'amplifiat d'ADN**, mélanger avec le tampon de charge et déposer directement dans le puits du gel. Ne pas oublier le(s) ladder(s) (100pb ou 1kb à placer en dernier).
16. Brancher la cuve d'électrophorèse : l'ADN migre vers la cathode, le fil rouge se branche donc en bas (là où l'ADN va migrer) et le fil noir en haut (du côté de l'ADN).
17. La migration dure environ 20 minutes pour un gel de 50ml, et 30 à 50 minutes pour un gel de 300ml.
18. Une fois la migration terminée (le front de migration se trouve à environ 3,5 cm des puits), sortir le portoir de la cuve à l'aide d'une pince et l'essuyer.
19. Déposer le portoir dans le caisson de révélation. Allumer la lampe UV, le moniteur, et le polaroïd. Régler l'objectif afin de visualiser le gel dans son entier et imprimer la photo. Ne pas la toucher avec ses gants mais attendre d'avoir rangé le laboratoire pour les enlever et la prendre.

VI. Lecture du test et saisie des résultats



La lecture du test est très simple : il s'agit de distinguer les bandes visibles sous ultraviolets dans chaque colonne de migration.

- ✓ Tous les individus doivent présenter une bande à environ 200pb. Si ce n'est pas le cas, alors l'amplification PCR ou l'extraction n'a pas fonctionné et l'individu concerné doit subir le test à nouveau.
- ✓ Les mâles se distinguent par une bande à environ 770pb.
- ✓ Les femelles ne présentent pas cette bande à 770pb.
- ✓ Ne pas oublier de vérifier que le mix seul ne présente aucune de ces deux bandes, même s'il peut parfois présenter une trace correspondant à des dimères au bout de la colonne de migration.

Voici une photo de gel obtenue en suivant ce protocole, et l'interprétation que l'on peut en faire :

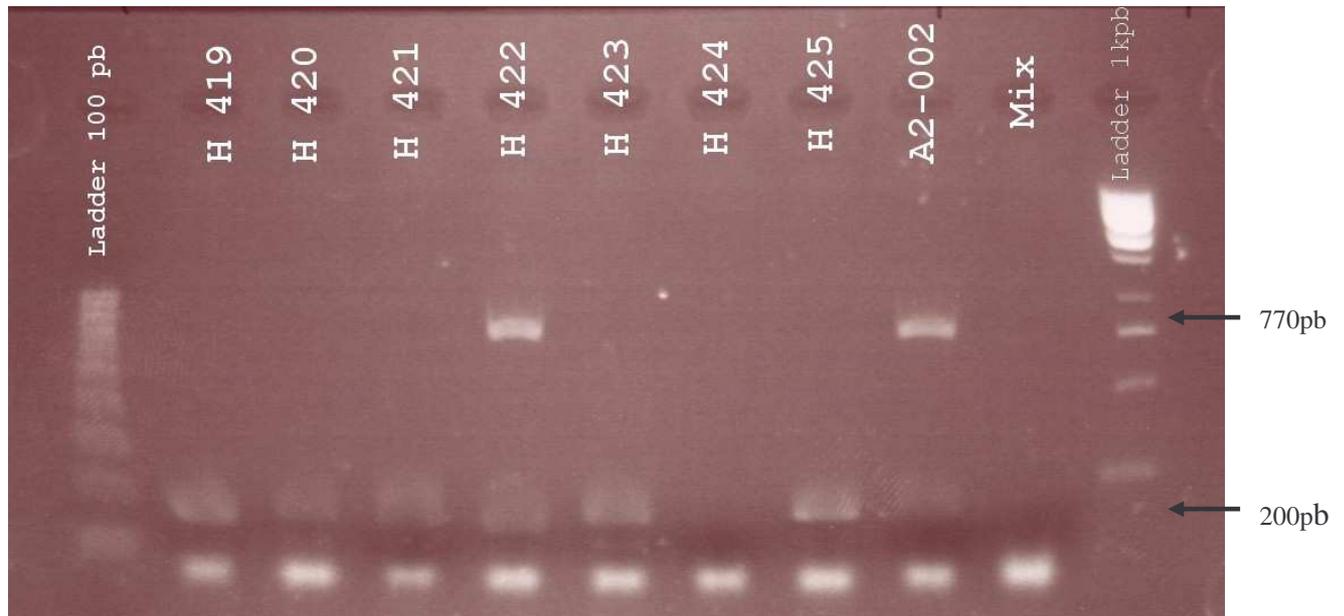


Photo réalisée le 31/07/2003, présentant le résultat du test pour 7 individus Hort 16 A en phase juvénile (H 419 à H 425) et un individu Pollichina mâle adulte (A2-002).

- ✓ Tous les individus ne présentent pas une bande à 200 pb : l'amplification PCR ou l'extraction n'a pas fonctionné pour H 424.
- ✓ H 422 et A2-002 sont des mâles car ils présentent une bande à environ 770 pb.
- ✓ H 419, H 420, H 421, H 423 et H 425 sont des femelles car elles ne présentent pas de bande à 770 pb.
- ✓ Le mix n'est pas contaminé, il ne présente aucune des bandes à 200 pb ou à 770 pb. On note juste la présence de dimères, comme dans toutes les colonnes de migration.

Il ne faut pas oublier de légender immédiatement les photos avec les numéros des échantillons. Elles doivent être conservées et les résultats sont saisis dans une feuille de données Excel. Ils seront validés ultérieurement, lors de la floraison des plants.

A noter : il existe un faible pourcentage de femelles recombinantes qui pourraient montrer une bande à 770 pb sans posséder aucun autre caractère mâle.

ANNEXE 8

Coût des consommables

Pour 24 échantillons

Quantité	Unité	Consommables	Prix à l'unité €	Prix x Quantité €
3		barettes de 8 tubes PCR	0,44	1,3200
3		barettes de 8 bouchons PCR	0,14	0,4200
2		flacons 100mL à bouchon	0,16	0,3200
2		flacons 50mL à bouchon	0,30975	0,6195
14		gants latex	0,07	0,9800
24		lames scalpel	0,079	1,8960
1		microplaque pour préparation dépôts	0,51	0,5100
1		microplaque spectro	5	5,0000
24		pipettes pour prélèvements dans les sachets de broyage	0,035	0,8400
56		pointes 10	0,042	2,3520
48		pointes 20	0,042	2,0160
2		pointes 200	0,038	0,0760
1		pointe 1000	0,038	0,0380
24		pointes 1000 à filtre à charbon	0,117	2,8080
24		sachets de broyage perceuse	1,2	28,8000
24		sachets polyéthylène pour prélèvements	0,4658	11,1792
4		seringues 10 mL multipipette +	0,88	3,5200
49		tubes 1,5mL	0,0336	1,6464
1		tube simple PCR avec bouchon	0,0336	0,0336
24		tubes 2mL	0,048	1,1520
48		agraffes	0,0135	0,6480
2	gouttes	Bet	0,185	0,3700
9,6	ml	éthanol 70%	0,69	6,6240
1,5	g	agarose	0,29	0,4350
3,25	µL	amorces 721f1 100µM	0,024	0,0780
3,25	µL	amorces 721r1 100µM	0,024	0,0780
1,3	µL	amorces SMYf1 100µM	0,024	0,0312
1,3	µL	amorces SMYr1 100µM	0,022	0,0286
16,8	ml	chloroforme-octanol	0,01375	0,2310
13	µL	dNTP 10mM	0,115	1,4950
19,2	ml	isopropanol	0,01302083	0,2500
6	µL	Ladder 100pb	0,4375	2,6250
6	µL	Ladder 1kb	0,4375	2,6250
6	ml	NaCl 1M	0,0586	0,3516
96	µL	RNAse A à 10mg/ml	0,0048	0,4608
50	µL	tampon de charge 6x	0,02	1,0000
5,2	µL	Taq Eppendorf + tampon associé	0,8	4,16
144	ml	TE1	0,0203125	2,9250
800	ml	TBE pour cuve électrophorèse	0,0644	51,5200
120	ml	TBE pour gel	0,0644	7,7280
TOTAL pour 24 échantillons				149,1909
TOTAL par échantillon				6,2163

ANNEXE 9
Coût de la main d'œuvre

Pour 48 échantillons			
	nombre d'heures pour la manipulation	salaire horaire charges comprises €	coût de la manipulation €
Prélèvements	2	24,99	49,98
Broyage et incubation	2,5	24,99	62,475
Extraction	4	24,99	99,96
Incubation RANase A	2	24,99	49,98
Mesure de la concentration	1	24,99	24,99
Dilutions	0,5	24,99	12,495
Préparation mix et PCR	3,5	24,99	87,465
Révélation	1	24,99	24,99
Saisie des données	0,5	24,99	12,495
TOTAL pour 48 échantillons			424,83
TOTAL pour 24 échantillons			212,415
TOTAL par échantillon			8,850625

ANNEXE 10

Amortissement du matériel

Matériel	Prix €
Adaptateur secteur pour balance	16,5
Agitateur chauffant	281,26
Agrafeuse	3,81
autoclave	3362
Bain-marie	940
Balance	72
Bécher verre 1L	30,32
Bécher verre 400mL x 10	47,7
Blouse	35
Caméra Photoprint	3425,17
Casque antibruit	35
Centrifugeuse	2962
Chambre UV TFX	794
Cuve électrophorèse 800ml + portoir gel	464,75
Déminéralisateur	
Ecran	293,8
Entonnoir	29,04
Eprouvette graduée verre 1L	38
Erlenmeyer 500mL x 10	19,81
Forêt broyeur à bille	127
Générateur	1358,3
Hotte pour manipulation chloroforme	5977,4
Hotte stérile	2133,81
Imprimante Photoprint	1395
Machine à glace	2795
Manche scalpel	68
Micro-ondes	200,7
Mini-centrifugeuse	323
Multipipette +	263,16
Ordinateur	1257,72
Peigne pour gel d'agarose	66,52
Perceuse + support	150
pH mètre	1034
Pipette P10	220,9
Pipette P100	191,12
Pipette P1000	191,12
Pipette P20	191,12
Pipette P200	191,12
Pipette P5000	220,9
Pissette éthanol	3
Portoir plexiglas 36 tubes pour bain-marie	89,41
Portoirs tubes x 2	46,28
Producteur d'eau UP	4051
Réfrigérateur-congélateur	375,87
Rotor 24 places pour centrifugeuse	240

Spatule	5,18
Spectrophotomètre	22544,6
Speed-vac (cocentracteur)	5515
Thermocycleur	5680
Timer rebours	9,91
Trompe à eau	41,47
Vortex	286,21
TOTAL	70093,98

Plan d'amortissement linéaire sur 10 ans :

Valeur à amortir : 70093,98 €

Taux d'amortissement : 10%

Amortissement annuel : 7009,398 €

Le nombre d'échantillons traités par le laboratoire est de 12000 par an. On a donc un amortissement du matériel de $7009,398 / 12000 = 0,584$ € par échantillon.

Amortissement du matériel : 0,584 € / échantillon

ANNEXE 11
Estimation du coût total

	prix € par échantillon	prix pour 24 échantillons
Amortissement du matériel par échantillon	0,58 €	14,02 €
Consommables	6,22 €	149,19 €
Main d'œuvre	8,85 €	212,42 €
SOUS-TOTAL	15,65 €	375,62 €
Coût des tests à ré-effectuer	0,71 €	17,15 €
TOTAL	16,37 €	392,78 €