



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude par Eco-Tilling du polymorphisme d'enzymes pectolytiques lors de la maturation de la fraise (*Fragaria x ananassa*)

Capron, Delphine

Award date:
2006

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**Etude par Eco-TILLING du polymorphisme d'enzymes pectolytiques lors de la
maturation de la fraise (*Fragaria x ananassa*)**

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

Delphine CAPRON

Juin 2006

Etude par Eco-TILLING du polymorphisme d'enzymes pectolytiques lors de la maturation de la fraise

CAPRON Delphine

Résumé

Un des principaux aspects de la maturation d'un fruit est la dégradation de sa paroi cellulaire qui provoque le ramollissement du fruit. Cette dégradation résulterait de l'activité de plusieurs systèmes enzymatiques parmi lesquels les enzymes pectolytiques, dont les pectate lyases. Lors de sa thèse présentée récemment au laboratoire, M. Draye a démontré que l'extinction du gène pectate lyase B chez la fraise cultivée (*Fragaria X ananassa*) par ARNi entraînait une augmentation significative de la fermeté du fruit lors de la maturation.

Il existe trois isoformes de pectate lyase chez la fraise : A, B et C. L'objectif de ce travail est d'approcher le polymorphisme des pectate lyases. En effet, ce polymorphisme pourrait être à la base des différences de fermetés contrastées chez les différents cultivars de *F. X ananassa*. Lors de ce mémoire, ce polymorphisme a été étudié grâce à une classe de marqueurs moléculaires : les SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Les SNP présents dans un fragment du gène pectate lyase sélectionné à l'extrémité 3' du gène ont été mis en évidence via l'approche Eco-TILLING (Targeting Induced Local Lesion IN Genome).

La fraise étant octoploïde, nous avons tout d'abord procédé à l'analyse individuelle de plusieurs allèles de la pectate lyase B de 4 variétés en clonant le produit PCR obtenu d'un fragment du gène. Ces résultats préliminaires nous ont permis de mettre au point l'approche Eco-TILLING et de nous rendre compte que l'analyse sur produit PCR (sans passer par une étape de clonage) était probablement possible. Dès lors, dans un second temps nous avons commencé à étudier la diversité allélique du gène pectate lyase B. L'obtention d'un nouveau kit d'isolement d'ADNg au cours de la dernière semaine précédant la remise de ce mémoire nous a enfin permis d'obtenir des amplifications permettant l'analyse en écotilling de 12 variétés de fraise. Ces résultats préliminaires encourageants laissent envisager la possibilité d'établir un profil des pectate lyases B pour des cultivars de *Fragaria X ananassa* mais également les pectates lyases A pour lesquelles une nouvelle paire d'amorce a été testée avec succès. Ceci permettrait de tester une corrélation éventuelle entre le polymorphisme des gènes pectate lyase et la fermeté du fruit à maturité.

Mémoire de licence en Sciences biologiques
Juin 2006

Promoteur : P. Van Cutsem

Je tiens en premier lieu à remercier le Professeur Van Cutsem de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et d'avoir accepté d'être le promoteur de ce mémoire.

Merci aux membres du jury d'avoir consacré un peu de leur temps à la lecture de ce travail.

Un tout grand merci à Nicolas pour m'avoir encadré tout au long de ce mémoire, merci également pour tous tes conseils judicieux, merci de m'avoir consacré ton temps si demandé et encore merci pour tout.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'URBV pour leur conseil, leur aide, leur bonne humeur au quotidien et leur disponibilité.

Un grand merci à mes parents et mes frères pour m'avoir soutenue tout au long de mes études.

Merci à Gaëlle, ma condisciple « végétale » pour ta compagnie, les rires, les ragots,...

Merci aux membres de la table de biologistes de l'arsenal pour ces moments de folies passagères.
Merci à Denis pour son aide.

A tous ceux que je n'ai pas cités et qui ont participé de près ou de loin à ce mémoire je n'ai qu'un mot à dire : merci.

Abréviations

- ❖ nm : nanomètre
- ❖ % : pourcent
- ❖ °C : degré Celsius
- ❖ µg : microgramme
- ❖ µl : microlitre
- ❖ µm : micromètre
- ❖ A: Adénine
- ❖ ADN ou DNA : Acide désoxyribonucléique
- ❖ ADNg: Acide désoxyribonucléique génomique
- ❖ AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism
- ❖ ARN : Acide ribonucléique
- ❖ ARNm: Acide ribonucléique messager
- ❖ C : Cytosine
- ❖ ddNTP: didésoxyribonucléique triphosphate
- ❖ dNTP : désoxyribonucléique triphosphate
- ❖ g: gramme
- ❖ DO : densité optique
- ❖ G : Guanine
- ❖ h: heure
- ❖ kDa: kiloDalton
- ❖ LB: Luria Broth
- ❖ M : Molaire
- ❖ mg: milligramme
- ❖ mM : millimole
- ❖ pb : paire de base
- ❖ PCR : Polymerase Chain Reaction
- ❖ Pel : gène pectate lyase
- ❖ PEL : Enzyme pectine lyase
- ❖ PL : enzyme pectate lyase
- ❖ PPi : Pyrophosphate inorganique
- ❖ rpm : tour par minute
- ❖ SL : Smart ladder
- ❖ SNP : Single nucleotide Polymorphism
- ❖ sp ou spp : espèce
- ❖ T : Tyrosine
- ❖ Tm: température de “melting”
- ❖ URBV: Unité de Recherche en Biologie Végétale
- ❖ UV : Ultra violet
- ❖ v/v: volume/volume

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
1. La fraise.....	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 Le développement du fruit : généralités.....	2
1.3 La maturation du fruit.....	3
1.4 Développement et maturation chez la fraise.....	3
2. La paroi.....	4
2.1 Description de la paroi.....	4
2.2 Les polysaccharides pariétaux.....	5
2.2.1 La cellulose.....	5
2.2.2 Les hémicelluloses.....	5
2.2.3 Les pectines.....	6
2.3 Les enzymes de dégradation de la paroi.....	7
2.3.1 Les enzymes pectolytiques.....	7
2.3.1.1 Les pectines méthylestérases.....	7
2.3.1.2 Les pectates lyases.....	7
2.3.1.3 Les polygaracturonases.....	7
2.3.2 Les cellulases.....	7
2.3.3 Les expansines.....	8
3. Pectate lyase.....	8
3.1 Introduction.....	8
3.2 Les PL bactériennes ou fongiques.....	8
3.3 Les PL chez les végétaux.....	9
3.4 Les PL et la maturation de la fraise.....	9
3.5 Les pectine lyases.....	10
4. Les marqueurs moléculaires.....	10
4.1 Introduction.....	10
4.2 Les marqueurs moléculaires.....	10
4.3 Techniques de détection des SNP.....	12
4.3.1 L'alignement de plusieurs séquences EST.....	13
4.3.2 Les techniques d'hybridation directes.....	13
4.3.3 Les techniques impliquant la génération et la séparation de produits allèles spécifiques.....	13
4.3.3.1 Digestion enzymatique.....	13
4.3.3.2 Conformation simple brin (SSCP) et hétéroduplexes.....	13
4.3.3.3 Extension d'amorce.....	14
4.3.3.4 Pyroséquençage.....	14
4.3.3.5 Détection par sonde spécifique (<i>TaqMan</i>).....	14
5. TILLING et Eco-TILLING.....	15
5.1 Le TILLING.....	15
5.2 Eco-TILLING.....	16
5.3 Les endonucléases SSS.....	16
5.3.1 Généralité.....	16
5.3.2 Cell.....	16
5.3.3 Les autres endonucléases.....	17
5.3.3.1 SP.....	17
5.3.3.2 Duplex-specific nuclease.....	17

MATÉRIEL ET MÉTHODES	18
1. Extraction d'ADN génomique.....	18
1.1 Extraction selon la méthode CTAB adaptée de Murray et Thompson (1981)	18
1.2 Purification à l'aide du kit nucléon Phytopure (Amersham Biosciences RPN 8510).....	19
1.3 Extraction d'ADN génomique grâce au kit Phytopass (DNAIs)	20
1.4 Extraction d'ADN génomique grâce au kit GenElute (Sigma)	21
2. Miniprep de plasmide en plaque, protocole adapté pour la centrifugeuse	21
ALC PK 120R avec rotor T536.....	22
3. PCR.....	22
4. Electrophorèse en gel d'agarose	23
5. Techniques relatives au clonage.....	23
5.1 Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose à l'aide du kit PCR clean-up gel extraction : Nucléo-spin® Extraction de Macherey Nagel (CAT No 740 609.50)	24
5.2 Ligation « T/A » vecteur PCR® II (Invitrogen Kit: 45-0046).....	24
5.3 Transformation en bactéries thermocompétentes	24
5.4 Criblage sur colonies.....	25
5.5 Purification du produit PCR par Microcon Miconbioseparation centrifugal filter device (Amicon Microcon YM-100 CAT No : 42413)	25
5.6 Séquençage des fragments amplifiés	26
6. Analyse Eco-TILLING.....	27
RÉSULTATS	29
1. Objectifs	29
2. Choix des amorces.....	30
3. Isolement de l'ADNg	31
4. Amplification de PelB	32
5. Transformation de bactéries	32
6. Mise au point de l'Eco-TILLING sur vecteur	33
7. Contrôle de l'approche Eco-TILLING	35
8. Résultats des analyses en pool.....	35
9. Discussion.....	39
10. Analyse de PelB des 13 variétés	39
11. Analyse de PelA/B des 13 variétés	45
12. Discussion pour les 13 variétés	45
13. Dernières analyses Eco-TILLING de PelB sur 12 cultivars	47
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS	50
PERSPECTIVES	52
BIBLIOGRAPHIE	53

Introduction

INTRODUCTION

1. La fraise

1.1 Introduction

La fraise, ou *Fragaria spp*, est une plante vivace des régions tempérées répandue dans le monde entier. Les fraisiers sont des rosacées non épineuses, à calice doublé d'un calicule, ayant un faux fruit charnu, qu'on appelle fraise. Le fruit (faux fruit) est formé par l'ensemble du réceptacle charnu de la fleur. Il a une couleur rouge ou jaune blanchâtre selon les variétés, et une forme ovoïde oblongue plus ou moins arrondie. La plante émet de nombreux rameaux horizontaux allongés portant des bourgeons de place en place. Ces rameaux sont des stolons qui émettent des racines adventives au niveau des feuilles et s'enracinent en formant de nouveaux pieds.

Lors de ce mémoire, nous allons nous intéresser plus particulièrement à *F. X ananassa* et *F. vesca*.

Règne :	Plantae
Embranchement :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Rosales
Famille :	Rosaceae
Genre :	<i>Fragaria</i>
Espèces étudiées:	<i>Fragaria X ananassa</i> (Fraisier cultivé) <i>Fgaria vesca</i> (Fraisier commun, fraisier des bois, fraisier de quatre saisons, caperon ou capron)

Les fraisiers sont connus depuis l'antiquité où les romains l'utilisaient comme produit cosmétique en raison de son odeur agréable : « la fragrance ». Entre le 14^{ème} et le 18^{ème} siècle, les trois principales espèces de fraisiers cultivées en Europe sont les formes sauvages *Fragaria vesca*, *Fragaria moschata* (Musky strawberry) et *Fragaria virginiana*.

Au début du 18^{ème} siècle Amédée François Frézier ramène d'Amérique du Sud la Blanche du Chili (*Fragaria chiloensis*), mais seuls 5 plants femelles survivent à la traversée. Transportés à Paris, ces plants n'ont pu fructifier qu'en présence de plants mâles du Fraisier de Virginie (*Fragaria virginiana*), une variété à petits fruits rouges ramenée du Québec un siècle plus tôt. De ce croisement naquit une nouvelle espèce appelée Fraisier ananas (*Fragaria x ananassa*), qui est à l'origine des variétés cultivées aujourd'hui (www.wikipedia.fr).

Il existe de très nombreuses variétés de fraises sauvages ou hybrides, cultivées ou non. Parmi la trentaine d'espèces dénombrées, on retrouve des organismes octoploïdes ($2n=56$) comme *Fragaria ananassa* ou *Fragaria virginiana* ; diploïdes ($2n=14$) comme *Fragaria vesca*, tétraploïdes ($2n=28$) comme *Fragaria orientalis* ou encore hexaploïdes ($2n=42$) comme *Fragaria moschata* et *Fragaria chiloensis* (Staudt, 1989). Certaines variétés de fraises sont originaires des régions tempérées d'Europe, alors que d'autres proviennent d'Amérique du Nord et du Sud.

Il existe de nombreux cultivars de l'espèce *F. X ananassa*. Nous en avons sélectionné 3 principaux pour leurs intérêts tant du point de vue de leurs caractéristiques intrinsèques que du point de vue industriel. Ces cultivars sont Mara des bois, Elsanta et Darselect. Le cultivar Elsanta, issu du croisement des cultivars Holiday et Gorella, a été sélectionné en 1975. Cette variété protégée a été obtenue par la firme PRI/CPRO basée aux Pays-Bas. De gros fruits coniques, rouges

brillants, juteux et possédant beaucoup d'arôme sont les qualités qui ont fait que ce cultivar représentait, jusqu'il y a un peu, la majorité des fraiseraies belges. Le cultivar Mara des Bois, possède un fruit conique, légèrement allongé, de calibre moyen, couleur rouge pourpre. Ce cultivar possède d'excellentes qualités gustatives avec un parfum fraise des bois. Cette variété protégée a été obtenue par la firme Marionnet basée en France. Enfin, le cultivar Darselect résulte d'un croisement entre les cultivars Elsanta et Parker. En pleine saison, la forme dominante est conique allongée, avec parfois l'extrémité carrée et plate (typique de la « fraise de Wépion »). La régularité de la forme du fruit peut varier, suite à des conditions de froid hivernales insuffisantes ou excessives (www.darbonne.fr).

Fragaria vesca est une espèce diploïde originaire d'Europe et d'Asie tempérée (de la Turquie à la Chine), ainsi que d'Amérique du Nord. Elle est très cultivée et souvent naturalisée dans les pays tempérés. C'est une plante herbacée vivace, formant une touffe basse. Les feuilles de la base, à long pétiole, sont trifoliées, dentées. Le limbe plus ou moins poilu est souvent un peu plissé selon les nervures secondaires. La dent terminale des feuilles est aussi grande ou plus longue que ses deux voisines. Les tiges fleuries peuvent atteindre 30 à 40 cm. Les fleurs blanches s'épanouissent d'avril à juillet. La plante refleurit parfois en automne (www.wikipedia.fr).

1.2 Le développement du fruit : généralités

Le développement du fruit commence dès la fécondation de l'ovule par le pollen, est suivi par sa maturation et se termine par son abscission. Les rôles fondamentaux du fruit sont la protection de la graine et sa dissémination.

La graine provient du développement de l'ovule, tandis que la croissance des tissus charnus du fruit peut avoir plusieurs origines différentes. En fonction des types de croissance, les fruits sont classés en 2 catégories: les vrais fruits (comme le raisin) dont les tissus charnus proviennent de la différenciation des tissus ovariens ; et les faux fruits (comme la fraise), dont la croissance provient de tissus accessoires et non ovariens (Figure 1)(Coombe 1976).

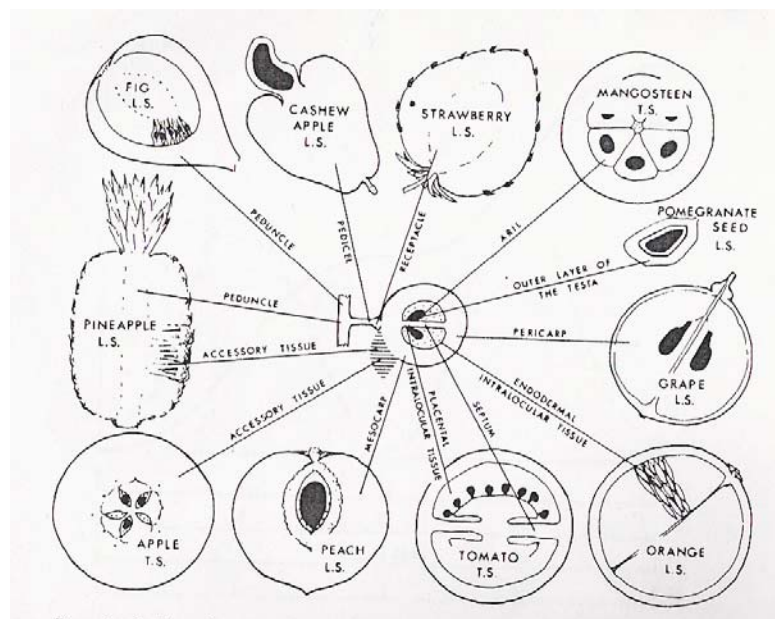


Figure 1 : Schéma représentant la diversité d'origine des tissus des faux fruits (Coombe 1976)

Lors du développement du fruit, on observe une multiplication accrue de cellules ainsi qu'une augmentation du volume induite par les cytokinines produites par la graine. Cette même graine va également produire de l'acide gibbérellique, responsable de l'expansion rapide de chacune de ses cellules. Ensuite, la plante va produire de l'acide abscissique, entraînant l'arrêt du développement de l'embryon dans la graine. Cette étape évite la germination dans ce milieu généralement chaud et humide (Koning, 1994 ; Draye, 2005).

Chez la fraise, le développement dépend de l'auxine. L'auxine, produite par les akènes, active la croissance du réceptacle mais inhibe la maturation du fruit. A partir du stade fruit blanc, quand les akènes sont à maturité, on peut observer une diminution du taux d'auxine qui va déclencher le processus de maturation de la fraise en levant l'inhibition de l'auxine sur des gènes spécifiques de la maturation (Draye, 2005).

1.3 La maturation du fruit

La maturation constitue l'étape finale du développement d'un fruit, concourt d'un ensemble complexe d'événements. Chez la majorité des fruits, la maturation comprend le ramollissement, la coloration et l'acquisition de parfums, souvent associée avec une diminution de l'acidité et une augmentation des composants aromatiques. Cette étape nécessite la synthèse de nombreux éléments : protéines, pigments, composés aromatiques,...

Les fruits sont classés en 2 catégories : climactériques et non climactériques. On parle d'un stade climactérique quand, au cours de la maturation, une consommation accrue d'oxygène traduit une forte augmentation de la respiration cellulaire. Ces processus de maturation sont précédés par une augmentation de la synthèse d'éthylène. Celle-ci joue un rôle très important dans le déclenchement et la régulation de la maturation des fruits climactériques, tels que la tomate, la pomme, la banane, ou encore la figue, en activant la synthèse et l'activité de protéines impliquées dans le phénomène de mûrissement. Chez ces fruits, l'éthylène va stimuler sa propre production (phénomène d'autocatalyse), ce qui permettra au fruit de mûrir même après la cueillette. Le développement des fruits non climactériques comme la fraise, au moment de la maturation ne dépend pas de l'éthylène. Parmi les fruits non climactériques, on retrouve également le raisin, l'ananas, le citron, la cerise ou encore l'orange.

Au départ, le fruit est dur, généralement de couleur verte due à la présence de chlorophylle, aigre, sans odeur et à la saveur insipide. Au cours de la maturation de nouvelles enzymes sont produites telles les amylases. Celles-ci hydrolysent l'amidon en sucre, réduisant ainsi le goût farineux et augmentant la succulence. De nouveaux pigments, caroténoïdes et anthocyanes sont aussi formés, donnant au fruit sa couleur finale. Pendant la formation de ces pigments, la chlorophylle est dégradée. Le fruit accumule également des composés phénoliques, des acides aminés et des vitamines. Des molécules organiques sont réduites en molécules plus petites et volatiles, donnant au fruit ses arômes. On observe également une dégradation des acides, le fruit passant d'un goût aigre à un goût plus neutre. Enfin, le fruit va subir un ramollissement de sa texture sous l'effet d'enzymes hydrolytiques capables de dégrader les constituants principaux de la paroi cellulaire végétale (Koning, 1994 ; Draye 2005).

1.4 Développement et maturation chez la fraise

Chez la fraise, l'augmentation de la taille et du poids en fonction du temps suit une simple courbe sigmoïde (Figure 2). Celle-ci est caractérisée par une phase de croissance rapide suivie d'un ralentissement correspondant à la mise en œuvre des processus de maturation (Woodward, 1972 ; Coombe, 1976).

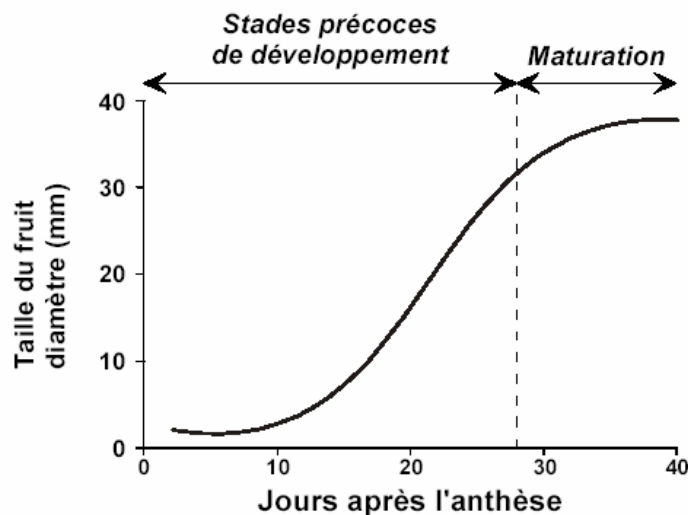


Figure 2 : Représentation schématique de la courbe de croissance de la fraise. (Draye, 2005)

Une phase de croissance rapide lors des stades précoces du développement, caractérisée par une augmentation du nombre et du volume des cellules du réceptacle, est suivie d'un ralentissement correspondant à la mise œuvre des processus de maturation.

De l'anthèse, période où la fleur est pollinisable, à la maturité du fruit, 30 à 40 jours s'écoulent en moyenne, bien que dans des conditions particulières de température la maturité de la fraise puisse être atteinte après presque 60 jours (Manning, 1993). Quelques cultivars présentent une courbe de développement de type double sigmoïde (Miura *et al.*, 1990), certains enfin peuvent suivre les deux types de courbes en fonction des conditions environnementales (Manning, 1993 ; Draye, 2005) .

On distingue classiquement six stades particuliers lors du développement et de la maturation de la fraise (Barnes et Patchett, 1976 ; Perkins-Veazie, 1995 ; Draye, 2005). Pendant cette maturation, la fraise, tout en se ramollissant, accumule des composés organoleptiques, des sucres et des pigments qui lui donneront sa saveur et sa coloration attractive (Figure 3).

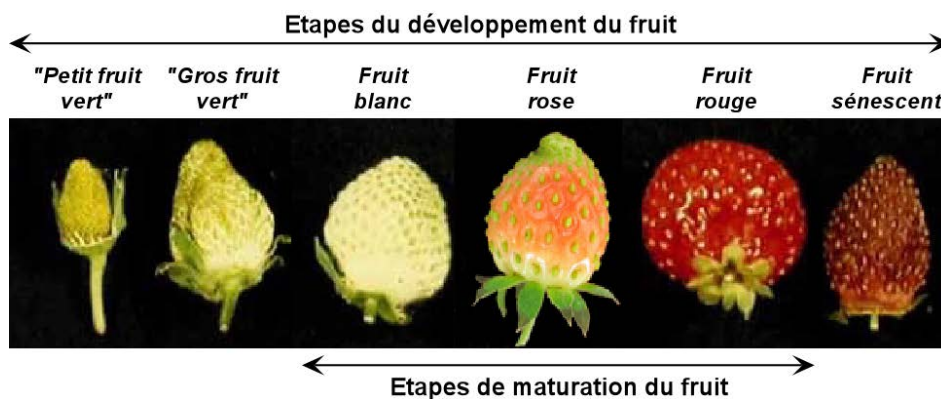


Figure 3 : Développement et maturation de la fraise (Draye, 2005)

Stade « petit fruit vert » : caractérisé par la multiplication rapide des cellules du fruit

1. Stade « gros fruit vert » : atteint lorsque les cellules du fruit ont augmenté en volume et que la chlorophylle commence à être dégradée
2. Stade « fruit blanc » : caractérisé par la dégradation complète de la chlorophylle et le début des premiers processus de maturation
3. Stade « fruit rose ou turning » : regroupe les fruits depuis le début de la coloration jusqu'au stade suivant, rouge mature
4. Stade « fruit rouge » : caractérisé par une fragilité élevée des fruits. Il est également le stade propice pour la cueillette
5. Stade « fruit rouge sénescant », nommé « over-ripe » : qui se produit lorsque le fruit a été laissé sur le plant après avoir atteint le point de maturation.

La fragilisation de la fraise lors du mûrissement, et des fruits en général, est le résultat de l'altération de la paroi cellulaire végétale par trois classes d'enzymes participant à la dégradation de la paroi (Draye, 2005):

- les enzymes pectolytiques qui agissent sur la pectine de la paroi (les pectines méthylestérases, les pectate lyases et les polygalacturonases)
- les cellulases dégradant le réseau hémicellulosique
- les expansines qui vont rompre les ponts hydrogènes entre les molécules de cellulose et le réseau hémicellulosique.

2. La paroi

2.1 Description de la paroi

Les cellules végétales sont entourées d'une paroi cellulaire extérieure à la membrane plasmique déterminant la forme de la cellule, la texture du tissu et la forme finale de l'organe. D'autres fonctions lui sont attribuées telles : le transport, l'absorption et la sécrétion de substances ainsi que la défense contre les pathogènes (Figure 4) (Raven *et al.*, 2000).

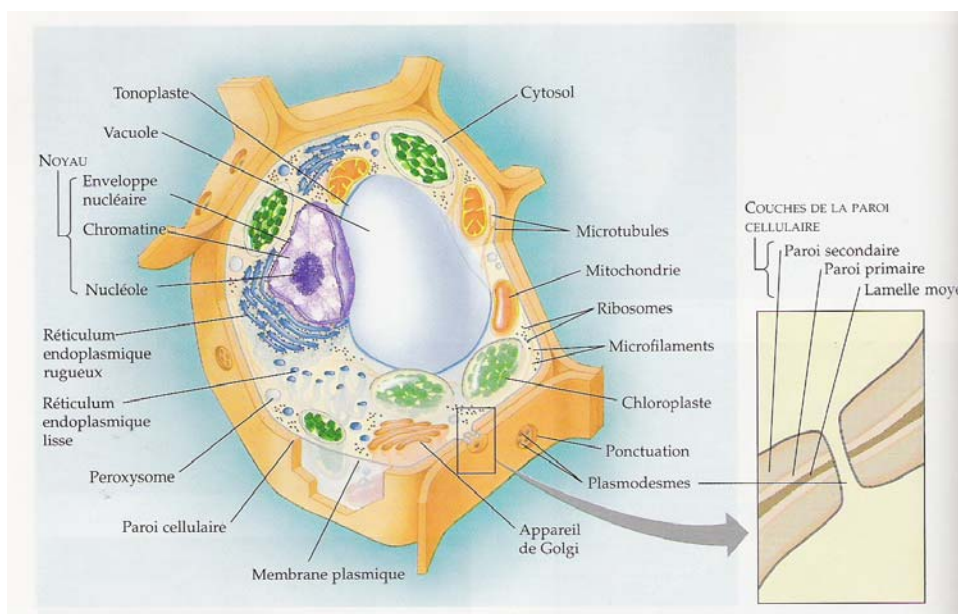


Figure 43 : Vue schématique d'une cellule végétale (Campbell, 1995)

Cette structure semi-rigide se compose de trois couches:

- La lamelle mitoyenne, située entre les parois primaires des cellules adjacentes est formée par le phragmoplaste lors de la division cellulaire
- La paroi primaire se forme lors de la division cellulaire de chaque côté de la lamelle mitoyenne des cellules filles
- La paroi secondaire commence à se former en fin de croissance cellulaire mais continue même après l'arrêt de la croissance cellulaire.

La paroi primaire est composée de polysaccharides (plus de 90% du poids sec), de glycoprotéines (de 2 à 10%), de composés phénoliques (2%), de minéraux (de 1 à 5%) et d'enzymes (O'Neil et York, 2003). Ces enzymes, correspondant à plus de 2% du génome végétal, sont impliquées dans la synthèse, les modifications et la dégradation de la paroi (Henrissat, 2001). La paroi est une structure fine constituée en grande partie de polysaccharides pectiques et qui assure l'adhésion intercellulaire (Brett et Waldron, 1990 ; Schols *et al.*, 1995, Draye, 2005). Le modèle de référence pour la paroi primaire est celui de Carpita et Gibeau (1993). Dans leur modèle, la paroi primaire est composée d'un réseau cellulosique organisé en microfibrilles enchâssées dans une matrice très hydratée, composée essentiellement d'hémicelluloses de type xyloglucane, de pectines et d'un peu de protéines. Les parois primaires peuvent se décomposer en trois domaines de structures différentes mais interagissant entre eux. Le premier domaine est composé du réseau de microfibrilles de cellulose reliées entre elles par les molécules d'hémicellulose via des ponts hydrogènes. Ce premier domaine est incorporé dans un second domaine : la matrice amorphe de pectines. Le troisième domaine quant à lui comprend les protéines de structures telles que les extensines.

La paroi secondaire est composée de cellulose et d'hémicellulose et est souvent imprégnée de lignine. L'épaisseur de la paroi secondaire peut fortement varier d'un type cellulaire à un autre. Par exemple, les parois secondaires des cellules parenchymateuses restent minces alors les cellules du xylème possèdent une paroi secondaire épaisse.

La composition de la paroi végétale variera tout au long de sa vie et il n'en existe pas deux identiques. Différents modèles se sont succédés afin d'expliquer l'organisation de la paroi des végétaux. En 1989, Fry et Hayashi proposent un modèle dans lequel ils suggèrent que les microfibrilles de cellulose sont attachées entre elles via de longues chaînes de xyloglucanes. Les protéines de structure et les polysaccharides pectiques forment un autre réseau indépendant empêtré dans celui de la cellulose et qui ne sont pas reliés de manière covalente. Ce modèle reste le plus populaire à l'heure actuelle, agrémenté de différentes variantes apportées par plusieurs équipes de chercheurs. Parmi celles-ci, on retrouve le modèle «multicoat » de Talbott et Ray dans lequel les fibrilles de cellulose sont recouvertes avec des couches successives de plus en plus lâches d'une matrice de polysaccharides.

2.2 Les polysaccharides pariétaux

2.2.1 La cellulose

La cellulose constitue entre 20 et 30% du poids sec de la paroi, ce qui en fait le polysaccharide majoritaire de la paroi. Elle est formée de chaînes linéaires de β 1-4D glucose réunies pour former une microfibrille d'un diamètre de 10 à 25 nm. Ces microfibrilles s'enroulent pour former des macrofibrilles dont le diamètre est estimé à 0,5 μ m (Raven *et al.*, 2000).

2.2.2 Les hémicelluloses

Ce groupe hétérogène de polysaccharides branchés, comprend les xyloglucanes, les xylanes, mannanes et arabinogalactanes.

Les xyloglucanes sont les polysaccharides hémicellulosiques les plus abondants dans la paroi primaire des plantes (jusqu'à 20% du poids sec de la paroi), excepté chez les graminées. Ils sont composés d'un squelette de type cellulosique, une chaîne de glucoses liés en β -1,4 et branchés sur le carbone 6 par des résidus xylose, s'étendant parfois en chaîne latérale: xylose-galactose-fucose (O'Neil et York, 2003) (Figure 5).

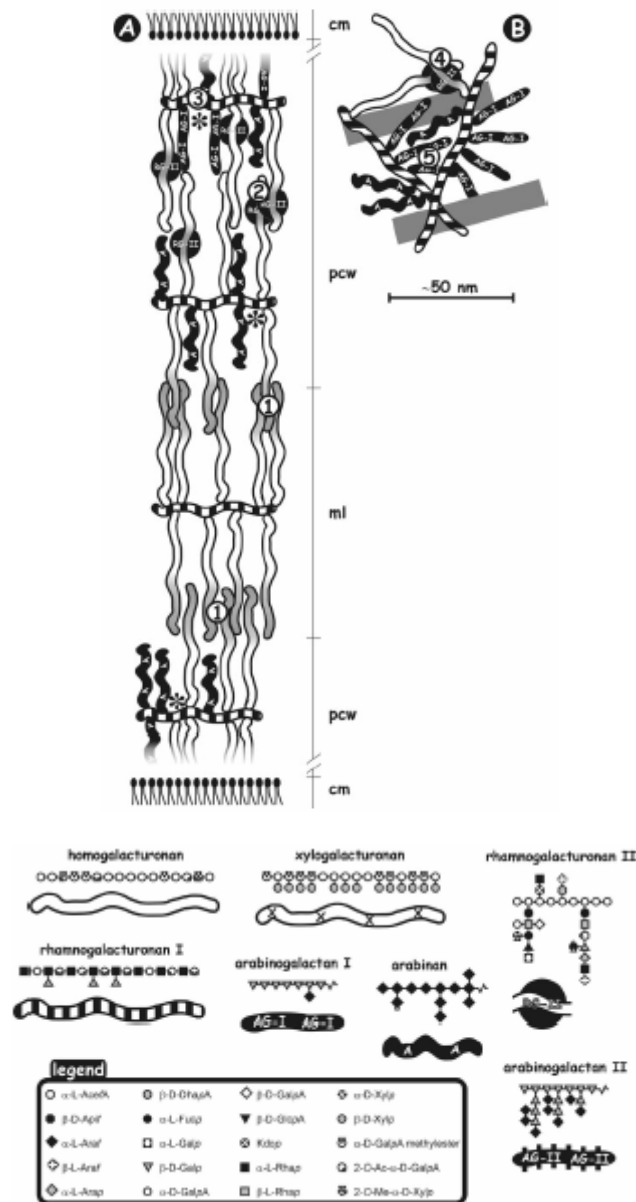


Figure 5 : Représentation schématique de la lamelle mitoyenne et de la structure primaire des pectines selon Vincken et al. (2003).

Les homogalacturonanes branchés aux RG-I forment des associations ioniques au niveau de la lamelle mitoyenne maintenant l'adhésion intracellulaire (1). Au niveau de la paroi secondaire, les RG-II de couches successives de pectines sont liés par des esters de borate (2). Les squelettes de RG-I sont serrés contre des microfibrilles de celluloses et maintenus par les chaînes latérales (3).

Les xylanes sont des composants mineurs de la paroi primaire des dicotylédones et des monocotylédones non graminées, mais sont abondants dans la paroi secondaire des espèces ligneuses et des graminées. Leur chaîne principale est constituée de résidus xylose liés en β -1,4 qui peuvent être branchés en position 2 ou 3 par des résidus arabinoses, glucoses ou des chaînes latérales (O'Neil et York, 2003).

Parmi les hémicelluloses contenant du mannose, on distingue: le mannane, le galactomannane et le glucomannane (O'Neil et York, 2003).

- Le mannane est un polymère composé d'un squelette de β -1,4 D mannose.
- Le galactomannane est abondant dans les graines de légumineuses et présente un squelette de mannoses liés en β -1,4 où sont greffées des chaînes ramifiées de galactoses.
- Le glucomannane est un polymère des parois secondaires des espèces ligneuses, constitué d'un squelette où alternent les résidus glucose et mannose liés en β -1,4

2.2.3 Les pectines

Les pectines sont des polysaccharides présents dans les parois cellulaires primaires, les lamelles mitoyennes des plantes supérieures et de quelques algues d'eau douce. Les pectines sont les composants majeurs des parois primaires des dicotylédones, elles sont abondantes chez les gymnospermes et les monocotylédones non-graminées et sont faiblement représentées chez les graminées. Elles sont absentes des parois secondaires. (Jarvis *et al.*, 1988 ; O'Neill *et al.*, 1990 ; Draye, 2005).

Les pectines font partie d'une famille complexe de polysaccharides qui contiennent essentiellement des résidus d'acide-D-galacturonique (GalpA) liés en α -1,4.

Trois groupes principaux de polysaccharides pectiques ont été mis en évidence au niveau des parois primaires et des lamelles mitoyennes de plantes supérieures : les homogalacturonanes, les rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) et les rhamnogalacturonanes de type II (RG-II) (O'Neill *et al.*, 1990 ; Visseur et Voragen, 1996).

Les homogalacturonanes sont des chaînes linéaires de résidus d'acide-D-galacturonique (GalAp) liés en α -1,4 (Fry, 1988). Les degrés de méthylation et d'acétylation des pectines varient suivant les espèces, les tissus et les stades de différenciation étudiés (Bédouet *et al.*, 2003).

Les rhamnogalacturonanes de type I (RGI) sont constitués d'un squelette formé de l'alternance de résidus d'acide galacturonique (GalA) et de rhamnoses (Rha) (O'Neill et York, 2003).

Les rhamnogalacturonanes de type II (RG-II) sont des polysaccharides pectiques de faible poids moléculaire (5-10kDa) contenant 11 résidus glycolyse différents. Le squelette du RGII contient au moins huit résidus linéaires d' α -1,4-D-acides galacturoniques sur lequel sont branchés quatre chaînes oligosaccharidiques (O'Neill et York, 2003).

Le modèle le plus communément admis est une succession de chaînes d'homogalacturonanes (formant les régions lisses) reliées entre elles par des molécules de rhamnogalacturonanes I ou II (formant les régions hérissées de la pectine). Toutefois, ce modèle a été récemment remis en question par Vincken et ses collaborateurs (2003). Ceux-ci ne décrivent plus une forme linéaire pour la pectine mais proposent un schéma où les molécules d'homogalacturonanes forment des chaînes latérales branchées au niveau de molécules de rhamnogalacturonanes I. Dans ce modèle alternatif, les rhamnogalacturonanes de type II seraient cependant toujours associés aux homogalacturonanes.

Les pectates sont quant à elles le produit désestérifié de la pectine et sont le composant majeur maintenant l'intégrité structurale de la paroi cellulaire chez les plantes évoluées (Carpita et Gibeau 1993).

2.3 Les enzymes de dégradation de la paroi

La maturation d'un fruit est associée à la dégradation de la paroi cellulaire (Seymour et Gros 1996 ; Draye 2005). La modification de la pectine, composant majeure des parois primaires des dicotylédones, est un des plus grands changements apparents dans la paroi cellulaire pendant la maturation (Marin-Rodriguez *et al.* 2002). Ce processus est entre autre dû à l'action solidaire de deux enzymes : les pectines méthylestérases et les pectate lyases (PL). Les premières déméthylestérifient la pectine synthétisée sous forme hautement méthylestérifiée (Grasdalen *et al.*, 1996 ; Draye, 2005), et les secondes, utilisant les pectines acides comme substrat, rompent des liaisons glycosidiques entre les résidus d'acide galacturonique (Gummadi et Panda, 2003 ; Draye, 2005).

2.3.1 Les enzymes pectolytiques

2.3.1.1 Les pectine méthylestérases

Les pectines méthylestérases sont des enzymes pariétales catalysant la déméthylestérification des polygalacturonanes des parois cellulaires végétales, libérant des pectines acides et du méthanol. Ces enzymes se retrouvent chez les plantes, les bactéries et les champignons (Figure 7).

2.3.1.2 Les pectates lyases

Les pectate lyases, ou pectate transéliminases, sont des enzymes pariétales catalysant le clivage de la liaison α -1,4 entre des résidus d'acides galacturoniques de la pectine. Le clivage enzymatique du lien glycosidique est réalisé par β -élimination, produisant une double liaison entre les carbones 4 et 5 du résidu galacturonosyle se situant à l'extrémité non réductrice du polysaccharide. Ces enzymes se rencontrent également chez de nombreux pathogènes fongiques et bactériens (Figure 8).

2.3.1.3 Les polygalacturonases

Les polygalacturonases catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -(1-4) entre les résidus d'acide galacturonique formant les molécules de pectine. Ces enzymes se retrouvent aussi bien chez les végétaux que chez certains champignons et bactéries (Figure 9).

2.3.2 Les cellulases

Les cellulases ou endo-1,4- β -glucanases hydrolysent les liens 1,4- β -glucane internes des molécules d'hémicellulose et de cellulose non cristalline. Les substrats hémicellulosiques des cellulases comprennent les xyloglucanes, les glucomannanes et sans doute d'autres composés en partie formés par des liaisons 1,4- β -glucanes. Les cellulases se retrouvent chez de nombreux organismes dont les végétaux, les bactéries, les champignons, et chez certains nématodes et insectes (Stålbrand *et al.*, 1998 ; Goellner *et al.*, 2001 ; Yuan *et al.*, 2001 ; Draye, 2005).

2.3.3 Les expansines

Les expansines sont des enzymes pariétales catalysant la rupture des ponts hydrogènes entre les microfibrilles de cellulose et le réseau hémicellulosique constituant le squelette des parois cellulaires végétales.

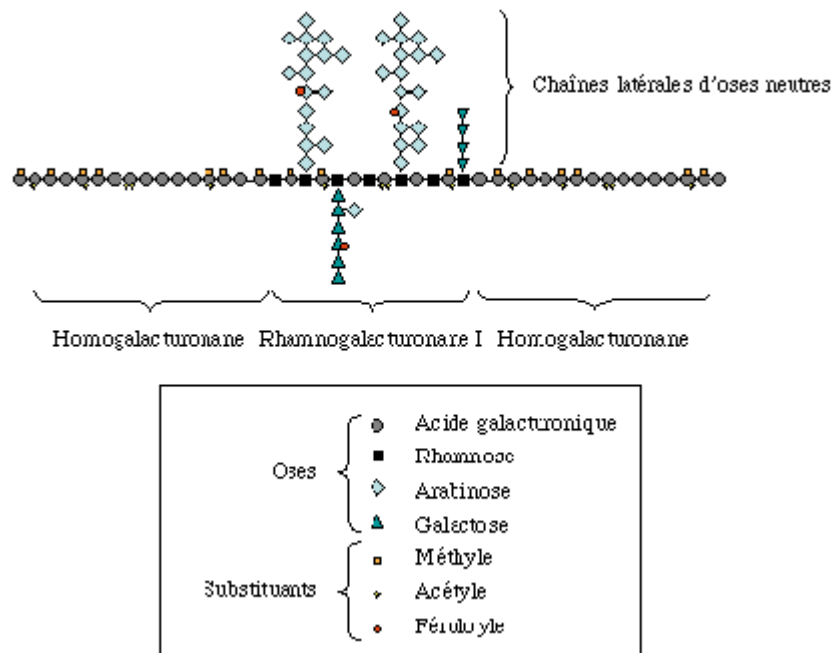


Figure 6 : Représentation schématique de la structure primaire des pectines (www.nantes.inra.fr). La chaîne principale est formée d'acide galacturoniques, d'acide galacturoniques méthylées et de rhamnoses. Des chaînes latérales constituent des branchements.

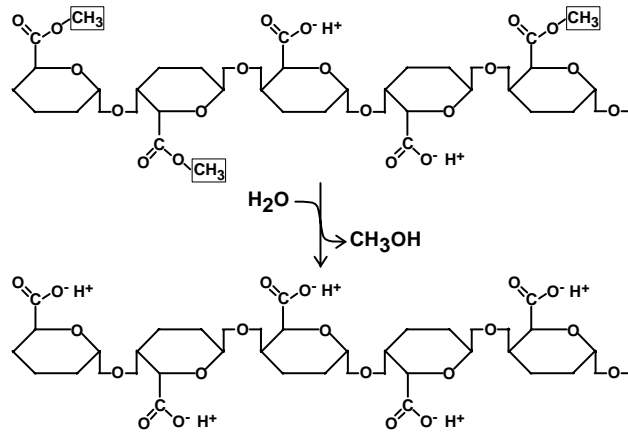


Figure 7 : Représentation schématique du mode d'action de la pectine méthylestérase (Bordenave, 1996).

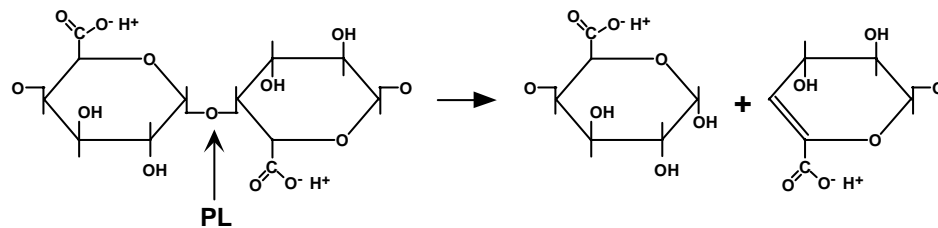


Figure 8 : représentation schématique du mode d'action de la pectate lyase (Gummadi et Panda, 2003).

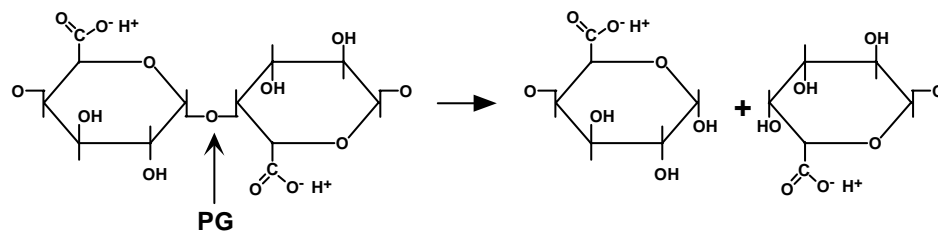


Figure 9 : Représentation schématique du mode d'action de la polygalacturonase (Gummadi et Panda, 2003).

3. Pectate lyase

3.1 Introduction

L'activité des pectate lyases (PL) a été découverte en 1962 dans la culture d'*Erwinia carotovora* et *Bacillus sp.* (Starr & Moran 1962 ; Draye, 2005). On les retrouve dans les fleurs au niveau des grains de pollen, des anthères et des pistils (Wing *et al.*, 1989 ; Kulikauskas et McCormick, 1997 ; Rogers *et al.*, 2001 ; Futamura *et al.*, 2002 ; Arilla *et al.*, 2003 ; Midoro-Horiuti *et al.*, 2003 ; Draye, 2005). Son rôle important lors de la maturation du fruit a également été mis en évidence par Pua et son équipe (2001). Les PL interviennent donc dans la dégradation de la paroi, l'activation du système de défense et le relarguage d'oligogaracturonides qui vont jouer le rôle d'éliciteurs (molécule de natures diverses induisant les mécanismes de défense de la plante) (Marin-Rodriguez 2002).

Les PL sont classées en ordre alphabétique selon le pI croissant de PLA à PLE (Thomas *et al.*, 2002), divisées en 2 sous-familles : PL ADE et PL BC. La classification s'effectue selon des propriétés diverses telles que le pI, le nombre de ponts disulfures,... (Henrissat *et al.*, 1995, Thomas *et al.* 2002).

Les séquences des PL d'origines végétale et microbienne sont peu conservées en dehors de quelques résidus intervenant au niveau du site actif de l'enzyme (Futamura *et al.*, 2002 ;). Le site actif a été localisé dans un long sillon défini par PB1 et une partie de « loops » T3 (Scavetta *et al.*, 1999), il a été identifié comme étant constitué des résidus 259 à 264 (RMPRPCR). Les PL d'origines différentes possèdent également un motif conservé, caractéristique de cette classe d'enzyme, vWiDH ; et un site conservé de liaison au Ca⁺⁺ sur les Asp 179, 203 et 207, ion nécessaire à leur activité (Domingo *et al.*, 1998).

Les PL sont également caractérisées par des brins β parallèles en une large hélice en pas droit. Cette formation est une échelle entièrement formée d'Asn qui stabilisent un type rare de courbure β (Domingo *et al.*, 1998, Henrissat *et al.*, 1995).

Jusqu'à présent, aucun acide aminé de PL n'a été identifié comme étant impliqué dans la reconnaissance ou la catalyse de saccharides et aucun état de transition analogue servant à l'inhibition de l'activité des PL n'est connu (Henrissat *et al.*, 1995).

Actuellement, les études menées sont principalement réalisées sur des PL de phytopathogènes. On connaît donc peu de choses sur les PL végétales, néanmoins les études sur le sujet deviennent de plus en plus nombreuses.

3.2 Les PL bactériennes ou fongiques

Les PL ont surtout été étudiées chez *Erwinia chrysanthemi*, bactérie pathogène chez de nombreux végétaux provoquant une pourriture molle, un flétrissement et un dépérissement des plantes. Chez cet organisme, il existe 4 familles de PL : Pel A, B, C et E.

- PLA catalyse la formation d'une série d'oligomères allant du dimère au dodécamère via un mécanisme de dépolymérisation endolytique.
- PLB et PLC sont des enzymes génératrices de trimères et tétramères avec une combinaison identique entre les mécanismes endolytiques et exolytiques.
- PLE catalyse une dépolymérisation endolytique non aléatoire avec la formation préférentielle de dimères (Preston *et al.*, 1992).

Ces isoformes agissent en synergie afin d'étendre la panoplie de substrats pectiques dégradables par la bactérie (Marin-Rodriguez *et al.*, 2002).

Chez *E. chrysanthemi*, Henrissat et son équipe (1995) ont démontré que les 2 sous-familles partagent toutes 3 séquences :

- AxDIKGxxxxVTxS
- VxxRxPxxRxGxxHxxxN
- vWiDH

Les séquences nucléotidiques de PelA et PelE possèdent 62% d'identité pour leurs enzymes respectives. De plus, leurs positions en tandem sur le gène suggèrent, comme dans le cas de PelB et PelC (84% d'identité), une duplication relativement récente des gènes (Preston *et al.*, 1992).

3.3 Les PL chez les végétaux

Il existe 27 gènes codant pour des protéines PL-like chez *Arabidopsis thaliana* (Figure 10). Les PL ont été découverte dans le pollen, elles permettraient la perte initiale de la paroi du pollen afin de faciliter l'émergence du tube pollinique, la croissance et le bris de la paroi ou tissu de transmission dans le style pour faciliter la pénétration du pollen (Marin-Rodriguez *et al.*, 2002).

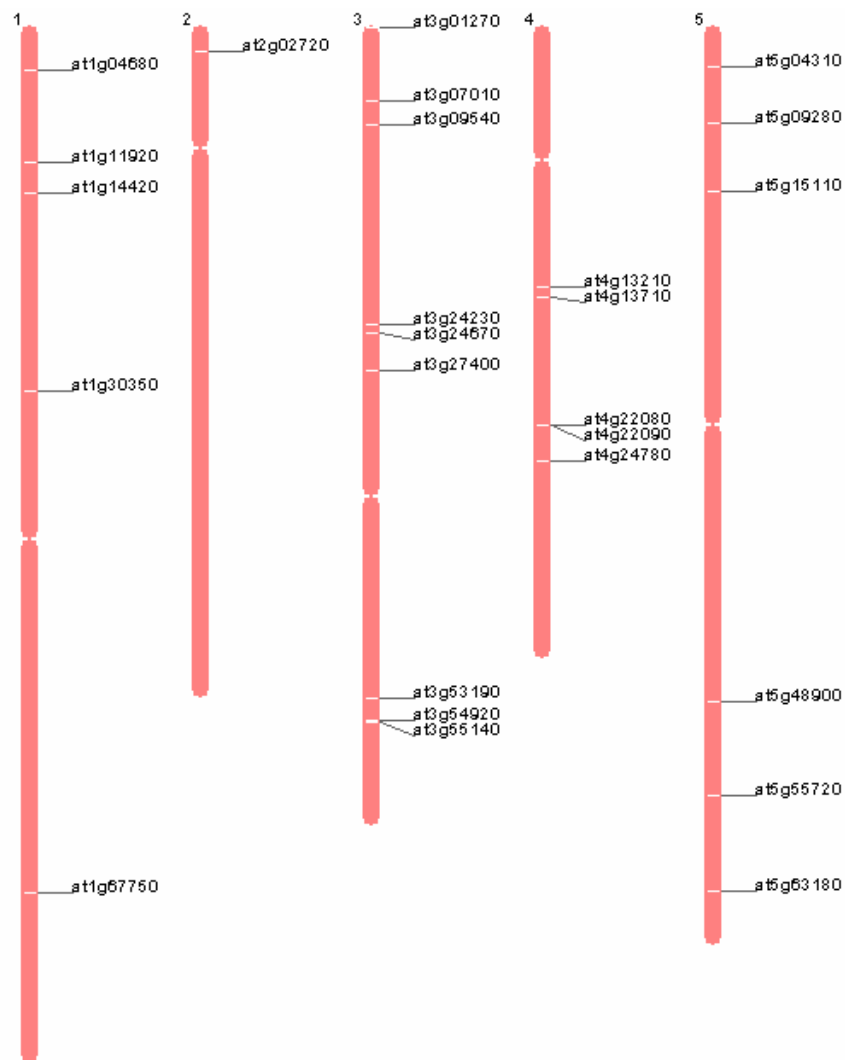


Figure 10 : Schéma montrant la distribution des loci de Pectate lyase chez *Arabidopsis thaliana* (www.arabidopsis.org)

On retrouve 3 types de pectate lyase chez la fraise : PL A, B et C. Le gène de la pectate lyase A (Pel A) appartiendrait à une famille multigénique, tandis que Pel B et C seraient en simple copie dans le génome (Benitez-Burraco *et al.*, 2003).

Le profil d'expression des PL varie d'une plante à l'autre (Pua *et al.*, 2001). Chez la fraise, aucune expression des 3 gènes Pel n'a été observée dans les tissus végétatifs comme les racines, les feuilles, le stolon et aux stades précoces du fruit. Ainsi, les 3 gènes Pel sont fortement, et de façon prédominante, exprimés dans les fruits en maturation aux stades fruit rose, fruit rouge et fruit sénéscent. Le gène PelB présente un plus haut taux de transcrits que PelA et PelC dans tous les stades de maturation étudiés.

3.4 Les PL et la maturation de la fraise

La diminution de façon expérimentale des ARNm de pectate lyase présents pendant la maturation a une influence significative dans la fermeté du fruit, surtout dans la transition fruit blanc à fruit rouge. Ceci n'affecte pas le poids, la couleur ou les solides solubles. L'expression du gène Pel est activée au stade blanc et montre un niveau d'expression maximum au stade rouge, c'est à dire le dernier stade (Jimenez-Bermudez *et al.*, 2002). Les 2 enzymes pectolytiques jouant également un rôle dans la maturation, c'est à dire les polygalacturonases et les polyméthylgalacturonases auraient une implication mineure dans la fermeté de la fraise car elles sont peu actives dans le fruit (Barnes et Patchett, 1976 ; Abeles et Takeda, 1990).

Mallory Draye, lors de sa thèse à l'URBV en 2005, a analysé des fruits issus de fraisiers transgéniques à ARN interférant les PL. Ce travail lui a permis de montrer l'importance des PL dans le ramollissement de la fraise lors des premiers stades de la maturation (entre le stade blanc et le stade rose). Le ramollissement précoce de la fraise serait alors à rapprocher de celui de la pêche chez qui les PL seraient responsables de l'initiation du ramollissement qui se poursuivrait ensuite sous l'action de polygalacturonases (Bonghi *et al.*, 1998). Les plants modifiés étaient caractérisés par une morphologie particulière et consistaient en des tiges courtes et cassantes, portant des feuilles aux dentelures profondes. Cette morphologie particulière serait à mettre en relation avec l'implication des PL dans les modifications subies par les parois des cellules en division ou en croissance au niveau de tissus jeunes en expansion. Cette hypothèse est confortée par le fait que Jimenez-Bermudez et ses collaborateurs (2002) ont observé également un phénotype particulier chez une petite fraction de leurs transformants anti-sens (Draye, 2005).

3.5 Les pectine lyases

Les pectine lyases (PEL) sont spécifiques des formes hautement méthylées, ne demandent pas de Ca⁺⁺, contrairement aux PL, et leur pH optimum est d'environ 5,5 (Mayans *et al.* 1997).

4. Les marqueurs moléculaires

4.1 Introduction

Lors de mon mémoire, je vais essayer d'identifier la diversité allélique du gène pectate lyase chez *F. X ananassa* et *F. vesca*. En effet, la plupart des populations naturelles présentent plusieurs haplotypes (un haplotype étant une combinaison unique de nucléotides que l'on retrouve à un locus

d'un chromosome) (Gibson et Muse, 2004). Les haplotypes résultant d'un déséquilibre de liaison lors de la transmission des gènes pendant la méiose. De plus, le génome octoploïde de *F. X ananassa* se comporte de façon di-polysomique. C'est à dire un comportement intermédiaire entre un comportement disomique et un comportement polysomique selon le groupe de liaison (Lerceteau-Köhler *et al.*, 2003). Chez les polyplôïdes à comportement disomique, les génotypes recombinants sont uniquement produits par crossing-over. Tandis que chez les espèces polysomiques ces recombinaisons dépendent également du comportement méiotique.

4.2 Les marqueurs moléculaires

Afin d'identifier ce polymorphisme, nous avons utilisé un type particulier de marqueur moléculaire : les SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Un marqueur moléculaire est un locus polymorphe renseignant sur le génotype de l'individu qui le porte. Contrairement aux marqueurs traditionnels (morphologique et biochimique), les marqueurs moléculaires ne sont pas influencés par les fluctuations de l'environnement et sont, dans le cas d'une étude sur ADNg, indépendants de l'organe utilisé et du stade de développement de la plante (Najimi *et al.*, 2003).

Un marqueur génétique « idéal » est (de Vienne, 1998):

- Polymorphe: un marqueur possédant de nombreux allèles permet de mieux mettre en évidence la variabilité des individus
- Codominant : l'hétérozygote présente simultanément les caractères de ses deux parents. On peut donc distinguer l'homozygote qui ne présente qu'un seul caractère, de l'hétérozygote qui en présente deux (dans le cas d'un marqueur dominant, un seul caractère peut être visualisé quelles que soient les conditions)
- Mutli-allélique
- Non épistatique : il ne peut y avoir d'interférence interlocus.

Les marqueurs moléculaires peuvent être classés selon 2 catégories :

- Marqueurs codominants et révélés individuellement (exemple : microsatellites, SNP)
- Marqueurs dominants et révélés en masse (exemple : AFLP)

En plus de leurs contributions dans les études moléculaires fondamentales, les marqueurs moléculaires suscitent un grand intérêt dans le domaine de la sélection végétale. La sélection assistée par marqueur est basée sur la possibilité d'inférer la présence d'un gène par la recherche d'un marqueur qui lui est étroitement liée (Najimi *et al.*, 2003).

A l'heure actuelle, les 3 marqueurs moléculaires les plus courants sont les SNP, les microsatellites et l'AFLP.

Les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont des polymorphismes de nucléotide unique, la plupart du temps de façon bi-allélique, et constituent la forme la plus répandue de variation moléculaire transmissible dans les populations naturelles. En moyenne, un SNP apparaît toutes les 1000 paires de bases chez l'humain ; la drosophile et le maïs ont chacun un polymorphisme plus de dix fois supérieur avec un SNP toutes les 50 à 100 bases. Ces valeurs peuvent varier de façon importante au sein d'un même génome ; la diversité des nucléotides peut dépasser 10% dans certaines parties du génome concernées par le système majeur d'histocompatibilité de l'être humain, alors que dans d'autres régions du génome on peut avoir un monomorphisme s'étendant sur plusieurs kilobases (Gibson et Muse, 2004). Aucun chiffre relatif à la fréquence des SNP chez la fraise n'est jusqu'à présent disponible dans la littérature.

Bien qu'en principe, à chaque position peut se trouver une des quatre bases nucléotidiques, les SNP sont majoritairement bi-alléliques. Deux hypothèses expliquant ce phénomène coexistent :

- Hypothèse de la faible fréquence de substitution d'une seule base : Cette fréquence se situe entre 1×10^{-9} et 5×10^{-9} par an et par nucléotide chez les mammifères pour une

position neutre. Dès lors, la probabilité que 2 changements de base aient lieu à la même position est très faible.

- Hypothèse du biais de mutation : Les mécanismes de mutation consistent en une transition (purine-purine ou pyrimidine-pyrimidine) ou en une transversion (purine-pyrimidine ou pyrimidine-purine). Cependant, le biais de mutation révèle que la transition est plus fréquente.

Les SNP possèdent plusieurs utilisations telle l'identification d'individu, la cartographie de QTL, la construction de carte génétique pour des gènes associés à des maladies via par exemple une étude cladistique des SNP (Durrant *et al.*, 2004), la sélection assistée en agriculture (Paris *et al.*, 2002),... La majorité des applications des SNP concernent l'être humain, cependant ils peuvent être utilisés chez tous les organismes. Par exemple, une étude du polymorphisme par l'analyse de SNP a permis une caractérisation intraspécifique d'un oiseau migrateur *Ficedula albicollis*, le gobe-mouche à collier (Primmer *et al* 2002).

L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de sites de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires. Cette technique utilise à la fois les enzymes de restriction et l'amplification PCR. La mise en évidence du polymorphisme se fait en plusieurs étapes :

1. L'ADNg est clivé par deux enzymes de restriction
2. Des adaptateurs de séquences connues et spécifiques des enzymes de restriction utilisées sont ajoutés aux extrémités des fragments de restriction générant ainsi une matrice pour l'amplification
3. Une pré-amplification est réalisée à l'aide d'amorces de séquences complémentaires à la séquence des adaptateurs et des sites de restriction
4. La deuxième amplification, dite sélective, utilise des amorces identiques aux premières mais prolongées à l'extrémité 3' de quelques nucléotides arbitraires. Ainsi, seuls sont amplifiés les fragments possédant les bases complémentaires de ces bases arbitraires. Ces amorces sélectives permettent de réduire le nombre de fragments amplifiés à une centaine
5. Ces fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant puis visualisés par coloration au nitrate d'argent ou révélés grâce à un marquage radioactif ou fluorescent réalisé lors de l'amplification sélective

Cette technique est puissante, stable, rapide et permet la mise en évidence d'un polymorphisme important chez toutes les plantes. En outre, l'AFLP ne nécessite aucune connaissance préalable de séquences du génome de la plante étudiée. Toutefois, la dominance, le coût élevé et les difficultés techniques liées au marquage par AFLP limitent son utilisation à grande échelle pour des applications comme la sélection assistée par marqueurs (Najimi *et al.*, 2003).

Les microsatellites sont constitués de séquences de di-, tri- ou tétra-nucléotides répétés en tandem. Ces éléments sont uniformément répartis en plusieurs exemplaires sur l'ensemble du génome d'une espèce et représentent un taux de polymorphisme élevé. Ce polymorphisme repose sur la variation du nombre d'unités de répétition constituant le microsatellite. Les séquences flanquant ces éléments répétés permettent de définir les amorces qui seront utilisées pour l'amplification PCR. L'analyse des produits amplifiés s'effectue sur gel d'acrylamide. C'est la paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche du microsatellite qui constitue le marqueur. Bien que ce soit un marqueur reproductible, co-dominant et aisé d'utilisation, l'inconvénient majeur de cette technique est la mise en œuvre initiale assez lourde (Najimi *et al.*, 2003).

4.3 Techniques de détection des SNP

Différentes techniques permettent la mise en évidence du polymorphisme SNP. Celles ci sont basées sur le même schéma (mis à part les techniques d'hybridation directe):

1. Génération de produits PCR spécifique d'un allèle
2. Séparation et détection du produit spécifique d'un allèle pour son identification.

Les techniques étant extrêmement nombreuses, je ne présenterais que les principales techniques de génotypage de SNP.

4.3.1 L'alignement de plusieurs séquences EST

Un algorithme identifie un site potentiel de polymorphisme en évaluant les probabilités de l'hétérogénéité d'un nucléotide à l'intérieur de différents alignement multiples de séquences d'EST (Marth *et al.*, 1999). Il existe de nombreux programmes de ce genre tels que PolyBayes (Marth *et al.* 1999), ou PolyFred (Wang et Huang, 2005 ; Nickerson *et al.*, 1997).

4.3.2 Les techniques d'hybridation directes

La plupart des techniques d'hybridation sont dérivées du Dot Blot. Dans cette technique, l'ADN testé (ADNc ou produit de réaction PCR) est fixé sur une membrane et hybridé avec une sonde, généralement un oligonucléotide (Vignal *et al.*, 2002).

Les dernières avancées dans cette famille de technique sont les damiers à ADN. Dans les essais conventionnels d'hybridation, on varie les conditions de stringence d'hybridation (température, concentration en formamide,...) mais dans les damiers à ADN, toutes les séquences sont exposées aux mêmes conditions. On applique un champ électrique supérieur à l'énergie entre les bases complémentaires (c'est donc en fonction du T_m), quand on atteint le T_m de la séquence, les séquences non complémentaires vont quitter le spot, il n'y aura pas de fluorescence. Il suffit alors de comparer ces valeurs de T_m avec les valeurs théoriques de la séquence. Une autre façon d'utiliser les damiers à ADN est le principe d'hybridation d'oligonucléotides spécifiques d'allèles (ASO). Les oligonucléotides de séquence connue sont immobilisés sur une surface appropriée. Les sondes cibles marquées sont hybridées sur les oligonucléotides marqués. Du fait de leur haute résolution, des marqueurs fluorescents sont recommandés. Le polymorphisme sera identifié grâce à des marqueurs différents pour chaque séquence cible. La taille des fragments testés dépend du nombre, de la taille et de la séquence de la sonde (Nollau et Wagener, 1997).

D'autres techniques d'hybridation existent également comme la détection grâce à des sondes LNA (Locked nucleic acids) et la polarisation fluorescente (Simeonov et Nikiforov, 2002)

4.3.3 Les techniques impliquant la génération et la séparation de produits allèles spécifiques

4.3.3.1 Digestion enzymatique

Deux stratégies peuvent être mises en place grâce aux enzymes. Premièrement, si le SNP étudié provoque un site de restriction enzymatique, une PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), méthode facile à mettre en œuvre, peut permettre le génotypage SNP. Les produits PCR, s'ils sont coupés par l'enzyme, va générer des fragments caractéristiques pouvant être analysés par électrophorèse en gel (Vignal *et al.*, 2002). Deuxièmement, l'hybridation de deux échantillons d'ADNg différents permettra de mettre en évidence la présence de SNP grâce à la formation de mismatch. Ces mismatch seront ensuite digérés par une enzyme spécifique comme l'endonucléase VII (Del Tito *et al.*, 1998 ; Youil *et al.*, 1995)

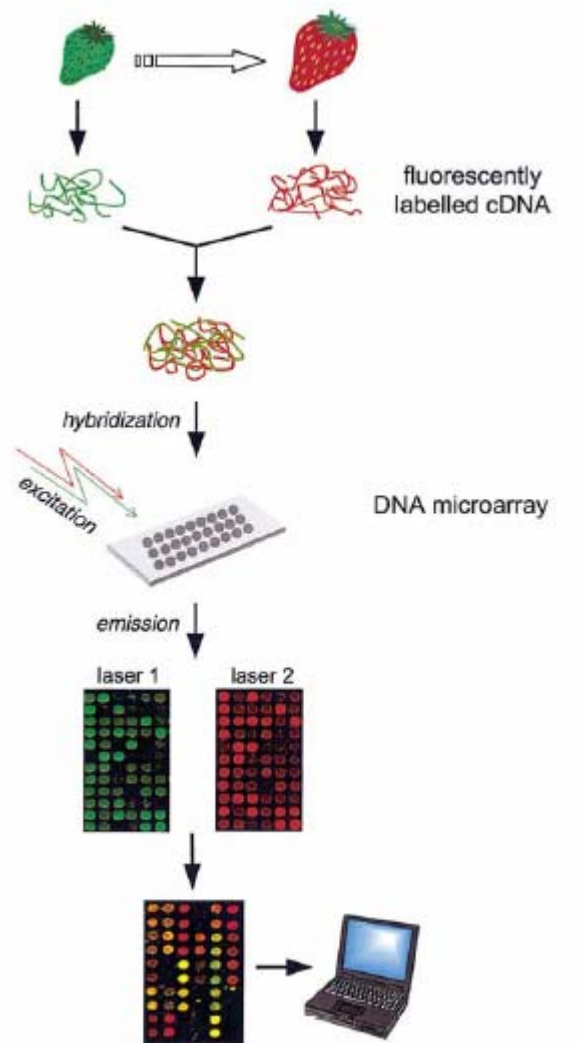


Figure 11 : Schéma d'une analyse d'expression génique typique en damier à ADN (Aharoni et Vorst, 2001)

4.3.3.2 Conformation simple brin (SSCP) et hétéroduplexes

La SSCP (Single Strand Polymorphism Conformation) est basée sur la spécificité de conformation tridimensionnelle des simples brins d'ADN en condition non-dénaturante. Un SNP dans une séquence de 300 paires de base peut faire changer cette conformation tridimensionnelle, ce changement peut être détecté par une électrophorèse en gel poly-acrylamide non dénaturant. Une électrophorèse en gel avec gradient de dénaturant est basée sur la propriété du « melting point » des doubles brins d'ADN pouvant être influencé par la présence d'un mismatch. Quand le « melting point » est atteint dans un gel poly-acrylamide contenant un gradient de dénaturant, la mobilité électrophorétique va être réduite. Dans une version plus récente de cette technique, la DHPLC (Denaturing High performance Liquid Chromatography) est utilisée pour la séparation des brins homoduplex et hétéroduplex (Vignal *et al.*, 2002, Sheffield *et al.*, 1993 ; Underhill *et al* 1997 ; Gross *et al.*, 1999).

4.3.3.3 Extension d'amorce

Cette technique utilise un oligonucléotide dans une réaction de séquençage standard ou en PCR. Il existe deux variantes de cette technique. Dans la première technique d'extension d'amorce, on utilise 2 amorces complémentaires des deux allèles SNP. Les deux produits allèles spécifiques peuvent être dissociés si les deux amplicons possèdent des tailles différentes ou si les deux amorces

possèdent des fluorochromes différents. Dans la deuxième technique, on utilise une amorce SBE (Single Base Extension) dont l'extrémité 3' correspond à la base nucléotidique précédent le SNP. La DNA polymérase va incorporer un ddNTPs, chacun des quatre ddNTPs étant marqué avec un fluorochrome différent une analyse du fluorochrome incorporé permettra de déterminer le locus (Vignal *et al.*, 2002 ; Kuppuswamy *et al.*, 1991). Récemment, la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight) a été développée afin de différencier les génotypes en comparant la masse des fragments d'ADN après une réaction d'extension d'amorce d'une seule base, où l'utilisation d'amorces marquées n'est pas nécessaire. Cette technique permet de déterminer la masse des fragments amplifiés car elle est spécifique du ddNTP incorporé. (Sauer 2006).

4.3.3.4 Pyroséquençage

Cette technique est basée sur la détection de pyrophosphate inorganique (PPi) relargués lors de la synthèse d'ADN (Langae et Ronaghi 2005). Dans une cascade de réactions enzymatiques, l'émission de lumière visible est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés. Cette cascade commence avec la réaction de polymérisation d'un acide nucléique dans laquelle un PPi est relargué à la suite de l'incorporation d'un nucléotide par une polymérase. Ce PPi libre est converti en ATP qui est immédiatement détecté produisant un produit via la luciférase qui est proportionnel à la somme de la lumière. Comme les nucléotides additionnés sont connus, on pourra déterminer la séquence du brin amplifié. Le pyroséquençage est précis, flexible, il permet une analyse en parallèle et peut être facilement automatisé. De plus, il ne requiert pas d'amorce marquée, de nucléotides marqués ni d'électrophorèse en gel. Récemment des génotypages de génomes triploïdes de pommes de terre (Rickert *et al* 2002) et de génome hexaploïde de blé (Mochida *et al* 2003) ont été réalisés à l'aide de cette technique. Actuellement, le pyroséquençage est une technique coûteuse pour la découverte de SNP, principalement à cause de deux facteurs : le manque de logiciel pour l'automatisation et la limitation dans la longueur de la séquence analysable (Langae et Ronaghi 2005).

4.3.3.5 Détection par une sonde spécifique (TaqMan)

Dans cette technique, l'activité exonucléase 5'>3' est utilisée afin de dégrader un sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) contenant un marqueur et un suppresseur. Aussi longtemps que cette sonde est liée, le marqueur et le suppresseur restent dans une proximité physique empêchant l'émission de lumière. Après dégradation de la sonde par la Taq polymérase, le marqueur est relargué et la fluorescence émise peut être mesurée. Cette réaction peut être spécifique d'un allèle par l'utilisation de deux sondes spécifiques (Armstrong et al, 2000 ;Whitcombe et al.,1998).

Dans la littérature, on peut également retrouver d'autres techniques de détection plus anecdotiques : le photoclivage d'ADN cible (Hart *et al* 2004) ; la méthode CCM (Chemical Cleavage Method) (Nollau et Wagener, 1997) ; l'hybridation en sandwiches (Park *et al.*, 2002 ; Syvanen et Soderlund, 2002),...

5. TILLING et Eco-TILLING

5.1 Le TILLING

La méthode TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) est une approche de génétique inverse à haut rendement permettant l'identification d'un SNP grâce à une mutagenèse chimique dans un gène cible.

Le TILLING se déroule en plusieurs étapes (Figure 12) :

1. Réalisation de pools d'ADN à partir d'une collection de plants mutagénéisés par un traitement avec de l'EMS (ethylméthanesulfonate)
2. Amplification par PCR de pools d'ADN par l'utilisation d'amorce marquée spécifique du gène cible
3. Dénaturation par la chaleur des produits PCR puis diminution progressive de la température afin de permettre l'hybridation des brins d'ADN
4. Digestion des produits hybridés par une nucléase SSS (Single Strand Specific), clivant le mismatch sur un des deux brins de l'hétéroduplex. L'enzyme utilisée à l'origine est CEL1, cependant celle-ci a une préférence pour certains nucléotides. L'enzyme utilisée lors de ce mémoire sera l'enzyme ENDO1.
5. Les fragments digérés étaient à l'origine analysés sur un gel polyacrylamide dénaturant. La position des mutations à l'intérieur de l'amplicon peut être estimée à partir de la taille des fragments portant le fluorochrome en extrémité 5' ou 3'. Cependant, afin de diminuer le coût et le temps, actuellement, l'analyse des fragments se fait en électrophorèse en capillaire
6. Identification de l'individu mutant
7. Séquençage du produit PCR du mutant.

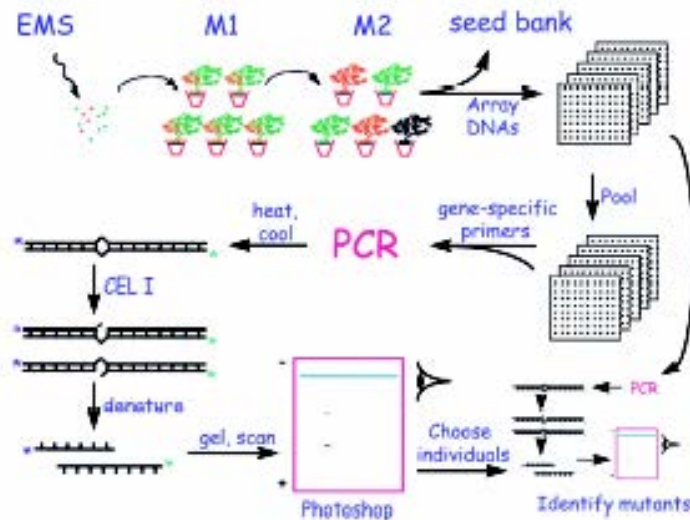


Figure 12: Représentation schématique de la méthode TILLING (Colbert al., 2001)

Le TILLING est applicable à chaque organisme pouvant être fortement mutagénéisé, mais aussi pour les espèces et hybrides ne pouvant être facilement homozygote. Les végétaux sont pour cela idéaux car on peut pratiquer l'autofécondation, mais le TILLING peut aussi être utilisé chez la souris. Il peut être adapté aussi bien à petite qu'à grande échelle, car il requiert relativement peu d'individus. En effet, 10 000 références suffisent pour obtenir la mutation souhaitée avec une seule amorce par gène. Le TILLING est donc une stratégie attrayante pour un petit groupe de recherche. Mais le TILLING peut aussi être envisagé sur une large échelle car c'est une méthode facilement automatisable (McCallum *et al.*, 2000).

Les avantages du TILLING sont la production d'un grand nombre d'allèles mutants, la rapidité, l'automatisation, ainsi que son haut potentiel d'application. Une autre force du TILLING est sa capacité à déterminer une gamme d'allèles misense en plus des knock-out. Cependant, son inconvénient réside dans le fait que l'on peut induire un haut taux de mutations secondaires (Feng et Mundy 2006).

Le TILLING peut être appliqué en génomique fonctionnelle mais également dans le domaine agricole puisque les plants obtenus après analyse en TILLING ne sont pas des OGM (Till *et al.*, 2004 ; Colbert *et al.*, 2001). Le TILLING a permis la création d'une population structurée de mutants chez l'orge, *Hordeum vulgare L.* (Caldwell *et al.*, 2004), et le knock-out de gènes cibles chez le poisson zébré (Wienholds *et al.*, 2003).

5.2 Eco-TILLING

L'Eco-TILLING est une adaptation de la technologie de détection des mutations utilisé dans le TILLING pour la découverte de polymorphisme dans les populations naturelles ou écotypes. Le principe du TILLING reste inchangé. La différence réside dans l'origine des échantillons constitutifs des pools. Dans le cadre du TILLING, des mutations sont induites, puis on vérifie si une mutation n'est pas présente dans notre gène d'intérêt. Dans le cadre de l'Eco-TILLING, les pools d'ADN sont constitués d'écotype que l'on souhaite comparer. Lors de la dénaturation/renaturation, il y aura formation d'hétéroduplex entre les brins d'ADN des deux origines différentes. Ces hétéroduplex pourront présenter des mismatch représentatifs des SNP caractéristiques de chaque écotype.

Cependant si cette approche permet d'identifier l'existence et la localisation d'un polymorphisme, elle ne permet pas d'en identifier le type (Comai, 2004). L'Ecotilling est très efficace pour passer en revue des centaines de milliers d'individus avec des SNP rares car le passage en revue de pools de fragments d'environ 1,5 kb permet la détection fine et la cartographie qui ne peut pratiquement pas être accomplie par full sequencing (Comai 2006).

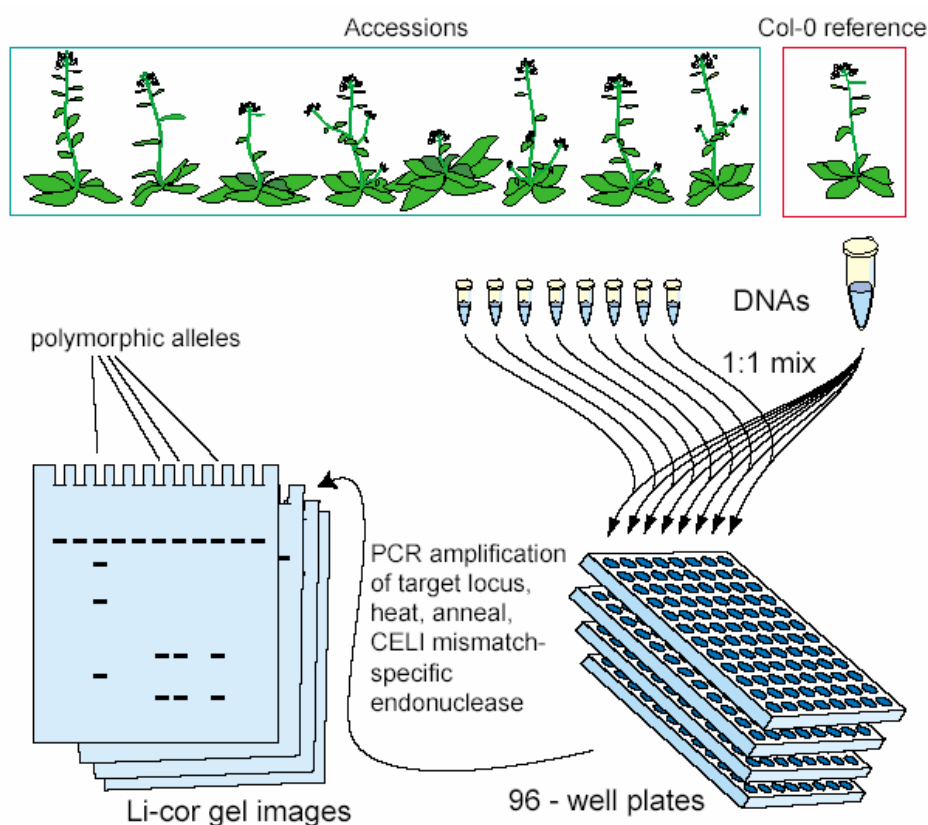


Figure 13 : représentation schématique de l'approche Eco-tilling

5.3 Les endonucléases SSS

5.3.1 Généralité

Les nucléases sont des enzymes importantes d'un point de vue analytique avec des applications fréquentes dans le milieu biomédical et biotechnologique. Leurs applications dépendent de la spécificité et du mode d'action intrinsèque à chaque nucléase. Certaines nucléases possèdent peu de spécificité de séquence mais reconnaissent certaines caractéristiques structurales de leur substrat respectif. Parmi celles-ci, on retrouve les enzymes clivant préférentiellement l'ADN simple brin (ssDNA), ou celles clivant préférentiellement l'ADN double brin (dsDNA) comme les nucléases P1 et S1.

5.3.2 CEL1

La nucléase CEL1 fait partie des nucléases SSS (Single Strand Specific). Cependant, il existe une forte variation dans leur capacité à cliver les « single base pair mismatch ». L'enzyme purifiée CEL1 du céleri est capable de cliver toutes les paires de bases mal appariées (Till *et al* 2004).

La nucléase CEL1 provient du céleri, elle est spécifique des distorsions de l'ADN et des mismatch, fonctionne à un pH allant de 6 à 9. Elle coupe l'extrémité 3' du mismatch sur un des deux brins de l'hétéroduplex. En absence de dNTP, il y a dégradation exonucléase de 3' en 5' des fragments d'ADN produits par l'incision de CEL1 au mismatch. En présence de dNTP, il y a une reconstitution avec une haute efficacité par le système de correction des mismatch *in vitro*. CEL1 ne coupe qu'un seul brin de l'hétéroduplex. L'activité CEL1 est présente dans énormément de plantes et tissus où le taux d'activité est constant : racine, tige, feuille, fleur et fruits. CEL1 a une préférence décroissante pour G, A, C et T en position extra-hélicoïdale (Oleykowski *et al* 1998).

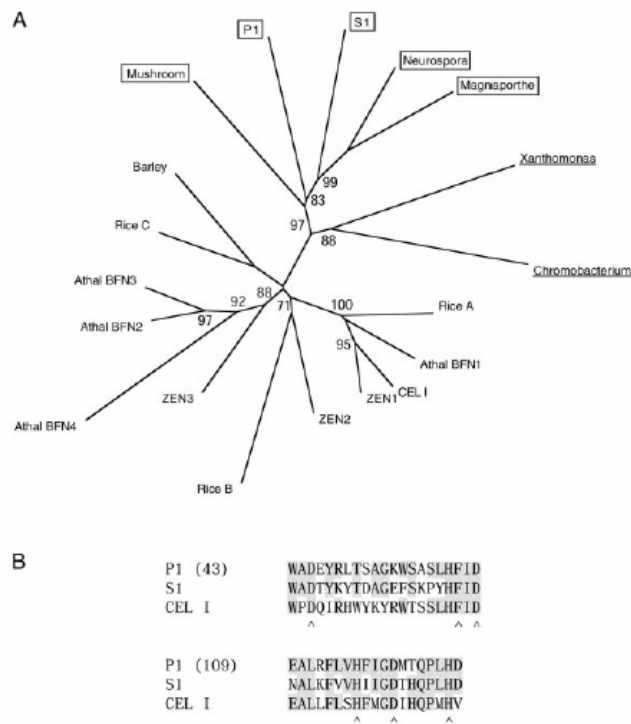


Figure 14 : (A) Arbre phylogénétique des membres de la famille des nucléases S1. (B) : alignement de CEL1, S1 et de 2 régions catalytiques de la nucléase P1

5.3.3 Les autres endonucléases

5.3.3.1 SP

Les feuilles d'épinards contiennent une nucléase hautement active nommée SP. La SP purifiée, similaire à S1, P1 et la nucléase du haricot mungo, est capable de dégrader les simples brins d'ADN, les doubles brins d'ADN, et l'ARN. Les propriétés de SP semblent être intermédiaires entre celles des nucléases de type S1 et celles du type CEL1. A la place d'avoir un optimum de pH acide semblable à S1, P1, et la nucléase de haricot mungo, SP possède un optimum de pH neutre. De plus, SP possède une propriété inattendue intéressante : l'incision des boucles dues à des insertions/délétions d'ADN, ainsi que les mismatches dûs à une substitution de base, en condition physiologique. In vitro, l'activité d'incision de SP pour les mismatches est stimulée par la présence d'une DNA polymérase ou une DNA ligase. L'activité de SP pour les insertions/délétions est constante malgré la préférence intrinsèque de SP pour les résidus A et T (Oleykowski *et al*, 1999). SP clive l'ADN en produisant une extrémité 3'-hydroxyle et 5'-phosphoryle (Doetsch *et al*, 1988).

5.3.3.2 Duplex-specific nuclease

La nucléase spécifique de duplex d'ADN (DSN) a été caractérisée chez le crabe du Kamchatka (*Paralithodes camtschaticus*). Elle est spécifique des duplex d'ADN (dsDNA, DNA et hybrides ADN-ARN), cependant elle discrimine parfaitement les petits brins biens ou mal appariés (8 à 12 paires de base). Elle requiert des ions Mg^{++} , est inhibée par l'EDTA. Son optimum d'activité se situe à une température de 55°C pour un pH de 7 et une température de 65°C pour un pH de 8. (Shagin *et al.*, 2002).

Matriel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Extraction d'ADN génomique

Dans le cadre de ce mémoire nous avons testé différentes méthodes d'extraction d'ADNg. L'extraction d'ADN génomique selon la méthode CTAB adaptée de Murray et Thompson est celle qui est la mieux adaptée au fraisier.

1.1 Extraction selon la méthode CTAB adaptée de Murray et Thompson (1981)

Matériel :

Centrifugeuse : Heraeus Sepatech Biofuge A,
Centrifugeuse Beckman Allegra™ X-22R

- Solution de CTAB 2x , pH 8:
- Tris HCl 100mM (Sigma # T-6066)
- EDTA 20mM (Sigma # E-5134)
- NaCl 1,4M (VWR # 1723)
- CTAB 2% p/v (Cethylmethyl ammonium bromide ; IGN biomedical 195029)
- PVP-40 soluble 1% p/v (polyvinyl pyrrolidone ; Sigma # P5288)
- 2-β mercaptoéthanol 0,2 % v/v (Sigma # M-6250) ce dernier étant à ajouter uniquement au moment de l'utilisation.
- Isopropanol (VWR Prod No 20 839.322), éthanol absolu (Riedel-de Haën 24103), éthanol 75% tous ces produits étant stockés à -20°C
- Azote liquide
- 0,5 g de feuille
- Phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 :24 :1) (Sigma # P2069-400ml)
- Tampon de lavage : 76% éthanol v/v, 10mM acétate d'ammonium (Merck # 1.01116.0500)
- TE (10mM Tris/ 0,1 EDTA pH8)
- RNase (10mg/ml) (Sigma # R-5503)
- Acétate de sodium 3M (Fluka # 71179)
- Chloroforme (-20°C) (Acros Organique 23209025)
- Résine nucléon phytopure du kit phytopure (Amersham Biosciences RPN 8510)

Protocole :

- Préparations :
 - Préchauffer à 60°C la solution de 2x
 - Refroidir le pilon et le mortier à l'azote liquide
 - Pesez 0,5 g de feuille et broyer l'échantillon en une fine poudre dans le mortier en présence d'azote liquide
- Extraction de l'ADN
 - Ajouter aux tissus broyés 3,75 ml de CTAB 2X et incuber sous agitation à 60°C pendant 1 heure. Mélanger de temps en temps et laisser refroidir l'échantillon à température ambiante
 - Extraire avec un volume de mélange phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 :24 :1) en agitant vigoureusement pendant 10 minutes à température ambiante
 - Centrifuger à 3300 rpm pendant 10 minutes à température ambiante et récupérer la phase aqueuse
 - Refaire l'étape d'extraction une deuxième fois.

- Précipitation de l'ADN
 - Précipiter en ajoutant 2/3 de volume d'isopropanol froid (-20°C)
 - Homogénéiser, laisser 1 heure à température ambiante
- Lavage de l'ADN
 - Centrifuger à 4000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante
 - Eliminer le surnageant, resuspendre dans 1 ml de tampon de lavage
 - Laisser incuber 1 heure sous agitation à 4°C
 - Laver une deuxième fois et incuber une nuit
 - Centrifuger 10 minutes à 4000 rpm, à température ambiante
 - Resuspendre dans 1 ml de TE sur agitateur rotatif pendant une heure
 - Ajouter 2 µl de RNase (10mg/ml) par tube, incuber 1h à 37°C
- Traitement à la résine
 - Dans un Eppendorf de 1.5 ml, placer 70 µl d'échantillon, 230 µl de TE, 300 µl de chloroforme (-20°C), 100 µl de résine
 - Placer sur un agitateur rotatif, à 4°C pendant 20 minutes
 - Centrifuger 10 minutes, 4°C, 4000 rpm
 - Récupérer le surnageant en faisant attention à ne pas prélever de résine
 - Faire précipiter la résine restante en centrifugeant 1 minute, 13 000 rpm, 4°C
 - Prélever le surnageant, ajouter 2 ml de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 :24 :1), mélanger vigoureusement
 - Centrifuger 10 minutes, 4000 rpm, 4°C. Récupérer le surnageant
 - Ajouter 1/10ème du volume d'acétate de sodium 3M, 3 volumes d'éthanol absolu (-20°C), mélanger par inversion, laisser reposer 30 minutes à -70°C
 - Centrifuger 5 minutes, 14 000 rpm, 4°C
 - Laver 3 fois le culot avec minimum 1 ml d'éthanol 70% (-20°C) en veillant bien à resuspendre entre chaque lavage/centrifugation.
 - Sécher le culot au Speed Vac
 - Resuspendre dans 50 µl de Tris 10 mM pH8

1.2 Purification à l'aide du kit Nucléon Phytopure (Amersham Biosciences RPN 8510)

Matériel

Centrifugeuse : Heraeus Sepatech Biofuge 13 et Biofuge A (4°C)

- Azote liquide
- 100 mg de fraise
- Réactif 1 provenant du kit
- RNase A (10mg/ml) (Sigma # R-5503)
- Phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1) (Sigma # P2069-400ml)
- Réactif 2 provenant du kit
- Résine nucléon phytopure provenant du kit
- Isopropanol (-20°C) (VWR Prod No 20 839.322)
- Ethanol 70% (-20°C) (Riedel-de Haën 24103)
- TE : Tris (Sigma # T-6066) 10 mM/ EDTA 0,1mM (Sigma # E-5134)

Protocole

- Broyer au pilon dans de l'azote liquide 100 mg de fraise
- Dans un tube Eppendorf, placer la fraise broyée ainsi que 600 µl de réactif 1, vortexer
- Ajouter 1 µl de RNase A
- Incuber 30 minutes à 37°C
- Ajouter 200 µl de réactif 2

- Inverser plusieurs fois à 65°C
- Réaliser 2 extractions successives au phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1)
- Reprendre la phase aqueuse
- Placer sur glace pendant 20 minutes
- Retirer l'échantillon de la glace, ajouter 100 µl de résine nucléon phytopure
- Placer sur un agitateur rotatif pendant 10 minutes à température ambiante
- Centrifuger 10 minutes, 1300g
- Récupérer la phase supérieure sans toucher l'interface et la placer dans un nouvel Eppendorf
- Ajouter 1 volume d'isopropanol (-20°C), inverser le tube
- Laisser précipiter 10 minutes à température ambiante
- Centrifuger 10 minutes, 13 000 rpm, 4°C
- Éliminer le surnageant
- Laver 2 fois à l'éthanol 70%
- Sécher le culot à température ambiante pendant une nuit
- Resuspendre dans 30 µl de TE (10/0,1)

1.3 Extraction d'ADN génomique grâce au kit Phytopass (DNAIs)

Matériel

Centrifugeuse : Heraeus Sepatech Biofuge 13

- Support de prélèvement
- Tampon KAJI dilué (4°C)

Protocole

- Le port de gant est recommandé lorsque le support de prélèvement est utilisé sans son boîtier de conditionnement
- Frotter le support de prélèvement sur le tissu végétal à échantillonner par un déplacement transversal par rapport au sens des fibres de tissu. Le mouvement de frottement doit être plus ou moins appuyé en fonction du type de tissu à prélever
- Une fois que le support de prélèvement est chargé de tissu, le laisser sécher à l'air libre pendant quelques secondes
- Placer le support chargé dans un tube Falcon de 15 ml
- Ajouter 1 ml de tampon KAJI (4°C)
- Vortexer pendant 30 secondes jusqu'au dépôt d'un lit de cristaux au fond du tube
- Laisser reposer l'extrait environ 2 minutes à 4°C
- Pipeter 300 µl de l'extrait en plaçant la pointe du tip au cœur du lit de cristaux. Laisser monter lentement le niveau d'extrait clarifié dans le tip
- Transférer ces 300 µl dans un nouvel Eppendorf
- Centrifuger, reprendre 50 µl
- Diluer l'extrait 100 fois et 500 fois dans de l'eau distillée avant son utilisation dans une PCR

1.4 Extraction d'ADN génomique grâce au kit GenElute (Sigma)

L'extraction d'ADNg a été réalisée à partir de jeunes feuilles de fraisiers. Le protocole suivi est celui préconisé par le fournisseur, il est disponible à l'adresse suivante : <https://www.sigmaaldrich.com/sigma/bulletin/g2n10bul.pdf>

2. Miniprep de plasmide en plaque, protocole adapté pour la centrifugeuse ALC PK 120R avec rotor T536

Matériel

Centrifugeuse ALC PK 120R avec rotor T536

- Milieu Circlegrow (Bio 101 Systems # 3000-12)
- Ampicilline (100mg/ml) (Sigma # A0166-5G)
- Boîte de tips stérile avec filtres
- Glycérol 40% stérile (Sigma # 023K0039)
- Tampon P1, P2, P3 : composition ci-dessus
- Plaque de filtration Multiscreen
- Plaque Deep Well
- Isopropanol (-20°C) (VWR Prod No 20 839.322)
- Ethanol 70-80% (-20°) (Riedel-de Haën 24103)
- Tris 10mM pH8 (Sigma # T-6066)

Protocole

Jour1 :

- Repiquer les clones obtenus sur boîte de Pétri, laisser pousser 24 h à 37°C

Jour 2 :

- Ensemencer 1.2 ml de milieu Circlegrow +antibiotique avec les colonies repiquées (de préférence lancer la culture avant 10 h du matin)
- Incuber les plaques Deep Well de 24 à 26 h à 37°C sous forte agitation (320 rpm)

Jour 3 : *stock glycérol*

- Prendre une boîte de tips avec filtres stériles. Tracer une croix sur le symbole de garantie afin de repérer le sens de la boîte
- Dans une plaque multipuits « 0.65 ml Deep Well Plate » munie de capuchons souples, placer 120 µl de glycérol 40% par puit. Avec la multichannel 12, prendre 120 µl de milieu de culture, les mettre dans le glycérol. Il n'est pas nécessaire de pipeter pour mélanger. Pendant toute la manipulation, replacer les tips filtres dans la boîte au bon endroit
- Noter le contenu des puits sur le coté de la plaque. Placer un morceau de papier collant sur les écritures. Stocker à -80°C

Isolation des plasmides

- Centrifuger la plaque de culture 10 minutes à 3000 rpm, 4°C
- Regarder où se trouve le culot. Eliminer le milieu de culture avec une pipette Pasteur placée sous vide reliée à un siphon contenant de l'eau de javel, le bout de la pipette ne rentre pas dans le milieu.
- Resuspendre le culot dans 300 µl de tampon P1 grâce à des tips munis de filtre, incuber 10 minutes à température ambiante
- Ajouter 300 µl de tampon P2 grâce à la seringue, mélanger grâce à la multichannel
- Incuber 10 minutes à température ambiante

- Ajouter 300 µl de tampon P3, mélanger à la pipette multichannel
- Incuber 30 minutes minimum dans la chambre froide (4°C)
- Centrifuger 1 heure minimum à 3500 rpm
- Passer 200 µl de surnageant sur une plaque de filtration Multiscreen. Celle ci est fixée avec du scotch sur une plaque Deep Well neuve. Centrifuger à 300 rpm, 5 minutes (maximum 500 rpm pour éviter de colmater les filtres). Refaire cette étape à 4 reprises en veillant à ne pas colmater les filtres. La dernière centrifugation se fera à 500 rpm pendant 10 minutes.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 700 à 800 µl d'isopropanol (-20°C). Placer sur la plaque le film argenté, veiller à bien coller la feuille. Au-dessus, placer un petit bloc de frigolite, serrer très fort et retourner cet assemblage 4x
- Mettre un poids sur la frigolite et laisser 30 minutes à température ambiante
- Centrifuger 1h30 à 3500 rpm à 4°C. Eliminer le surnageant avec une pipette pasteur
- Laver 2x l'ADN en ajoutant 500 µl d'éthanol 70-80% (-20°). Centrifuger 15 minutes, 3500 rpm, 4°C. Ajouter l'éthanol en formant un carré sur les parois afin de veiller à ce que l'éthanol nettoie bien les 4 parois
- Eliminer l'éthanol restant au fond des puits à l'aide d'une pipette pasteur affinée
- Placer à l'étuve (37°C) pendant la nuit pour éliminer toute trace d'éthanol
- Resuspendre dans 25 µl de tris 10mM pH8. Agitation pendant 1h

3. PCR

Appareil PCR: Bio Rad iCycler

Mix :

- X µl d'ADN (x est fonction de la concentration en ADN)
- 5 µl de tampon de la taq 10X (Promega # M3175)
- 1 unité de Taq polymérase (Promega # M3175)
- 1 µl de dNTP Mix (10 Mm) (Roche # 11 581 295 001)
- 10 pmoles d'amorce gauche
- 10 pmoles d'amorce droite
- Y µl d'H2O pour atteindre 50 µl

Programme PCR de base:

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation	95°C	4 min	1
Dénaturation	95°C	45 secondes	35
Hybridation	55°C (selon Tm)	45 secondes	
Elongation	72°C	1 min	
Terminaison de l'élongation	72°C	1min	1
Stand by	4°C	∞	

4. Electrophorèse en gel d'agarose

Matériel

Cuve d'électrophorèse (pharmacia biotech GNA 100)

- Agarose (Sigma # 065K0067)
- TAE IX (Tris-acétate (Sigma # T-6066) 4 mM, EDTA(Sigma # E-5134) 1 mM, pH 8,0)
- Bromure d'éthidium (BET ; stock à 10 mg/ml ; Sigma # E-8751)
- Solution de chargement (bleu de bromophénol (Sigma # B-8026) 0,025%, glucose 40 %)
- Standard de taille Smart Ladder (Eurogentec # MW-1700-10)

Protocole

- Préparer 50 ml d'agarose 1 % dans du tampon TAE 1X et y ajouter 3 µl de Bromure d'éthidium (10mg/ml)
- Couler le gel dans un support adéquat et placer les peignes.
- Ajouter 1 volume de solution de chargement à 5 volumes d'échantillon.
- Immerger le gel solidifié dans la cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE 1X.
- Déposer dans les puits un volume adéquat d'échantillon (ainsi que le standard de taille Smart Ladder)
- Faire migrer l'échantillon pendant environ 1 h. sous 80-90 mA à 150 V.
- Visualiser les acides nucléiques sur transilluminateur (302 nm-UV).

5. Techniques relatives au clonage

5.1 Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose à l'aide du kit PCR Clean-up gel extraction : Nucléo-spin® Extraction de Macherey Nagel (Cat No 740 609.50)

Matériel

Centrifugeuse Heraeus Sepatech Biofuge 13

- Tampon NT1 provenant du kit
- Colonnes Nucléo-spin® Extract provenant du kit
- Tampon NT3 provenant du kit
- Tampon d'élution NE provenant du kit

Protocole

- Exciser le fragment d'ADN du gel d'agarose à l'aide d'une lame de scalpel propre. Faire attention à minimiser le volume du gel. Transférer les bandes séparément dans un tube Eppendorf de 1,5ml
- Peser le contenu des Eppendorf
- Pour chaque 100 mg de gel d'agarose, ajouter 300µl de tampon NT1
- Incuber à 50°C jusqu'à ce que le gel soit dissout (5 à 10 minutes)
- Transférer le contenu de l'Eppendorf dans 1 colonne Nucléo-spin® Extract qui elle-même est dans un tube de collecte de 2 ml
- Centrifuger 1 minute à 13 000 rpm
- Vider le contenu du tube de collecte
- Ajouter 600 µl de tampon NT3

- Centrifuger 1 minute à 13 000 rpm
- Vider le contenu du tube de collecte
- Ajouter 200 µl de tampon NT3
- Centrifuger 2 minutes à 13 000 rpm
- Laisser reposer 5 minutes afin de bien sécher la membrane
- Placer la colonne Nucléo-spin® Extract dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml.
- Ajouter 25 µl de tampon d'élution NE
- Laisser incuber à température ambiante pendant minimum 1 minute
- Centrifuger 1 minute à 13.000 rpm
- Jeter la colonne Nucléo-spin® Extract

5.2 Ligation « T/A » vecteur PCR® II (Invitrogen Kit: 45-0046)

Matériel

- ADN
- Tampon 10x provenant du kit
- PCR® II vector provenant du kit
- T4 DNA ligase provenant du kit
- Eau pure provenant du kit

Protocole

- Dans un tube PCR stérile, RNase free, à température ambiante, mélanger afin d'obtenir un rapport 1/3. Pour un volume final de 10 µl:
 - X µl d' ADN
 - 1 µl de tampon 10x
 - 2 µl du PCR vector (50 ng)
 - 1 µl de T4 DNA ligase (X unités)
 - Y µl d'eau
- Incuber la solution à 14°C pendant la nuit

5.3 Transformation en bactéries thermocompétentes

Matériel

- Milieu SOC (Invitrogen 46-0700 Reorder No 15544-034)
- Boîtes de Pétri (2 boîtes par transformation) contenant le milieu LB solide avec 50 µg/ml d'ampicilline
- IPTG (100 mM) (Duchefa # I1401)
- X-Gal (Proméga # V394A 20064701)
- Produit de ligation
- 1 tube de cellules compétentes pour chaque transformation

Protocole

- Allumer la hotte 15 minutes avant utilisation
- Mettre un bain à 42°C
- Placer le milieu SOC à température ambiante
- Sortir les boîtes de Pétri (2 boîtes par transformation) contenant le milieu LB solide avec 50 µg/ml d'ampicilline.
- Ajouter sur chaque boîte 35µl d'IPTG (100 mM) et 35µl de X-Gal . Faire pénétrer et laisser aérer

- Centrifuger brièvement le produit de ligation et placer sur glace
- Placer sur glace 1 tube de cellules compétentes pour chaque transformation
- Ajouter 10 μl de produit de ligation directement sur les bactéries dégelées et pipeter légèrement
- Incuber sur glace pendant 30 minutes. Garder les produits de ligation à -20°C
- Placer les cellules à 42°C pendant exactement 30 secondes. Ensuite, replacer sur glace pendant 2 minutes précisément, jamais plus
- Ajouter 250 μl de SOC dans chaque tube
- Placer dans un bain à 37°C pendant exactement 1 heure. Placer sur glace
- Pour chaque tube de cellule : sur une boîte, ajouter 50 μl de cellules et sur l'autre 150 μl de cellules
- Incuber une nuit à 37°C
- Placer les boîtes de Pétri à 4°C pendant 2-3 heures pour le développement de la couleur
- Analyser 8 transformants par PCR pour chaque construction

5.4 Criblage sur colonies

Matériel

- dNTP (Roche # 11 581 295 001)
- Taq, Tampon de la Taq (Proméga M3175)
- Amorces Forward et Reverse

Protocole

- Préparer un mix PCR, pour un volume total de 50 μl :
 - 1 μl de dNTP
 - 0,3 μl de Taq
 - 10 μl de TP 5X
 - 1 μl d'amorce forward (10pm/ μl)
 - 1 μl d'amorce reverse: 1 μl (10pm/ μl)
 - 36,7 μl d'eau
- Pour chaque construction, réaliser un tube PCR de 10 μl , qui servira de contrôle via une électrophorèse, et un tube de 25 μl qui servira à la purification du produit PCR par Microcon Miconbioseparation centrifugal filter device

5.5 Purification du produit PCR par Microcon Miconbioseparation centrifugal filter device (Amicon Microcon YM-100 Cat No : 42413)

Matériel

Centrifugeuse Heraeus Sepatech Biofuge 13

- Filtre Microcon provenant du kit
- Tubes Eppendorf stérile
- Produit PCR
- Eau stérile
- TE (10 mM Tris/ 0,1 EDTA pH8)

Protocole

- Insérer un filtre Microcon dans le tube
- Y placer 25 μl de produit PCR et 400 μl d'eau stérile, sans toucher la membrane
- Centrifuger 12 minutes à 13.000 rpm

- Retourner le filtre et le placer dans un nouveau tube Eppendorf stérile
- Placer 25 µl de TE dans le filtre
- Centrifuger 3 minutes à 4.000 rpm
- Récupérer ce qui est passé à travers le filtre

5.6 Séquençage des fragments amplifiés

Matériel

- Mix 1 :
 - 6 µl d'ADN
 - 4 µl H₂O
- Mix 2:

CEQ DTCS Quick Start Kit (ref: 608120)	4,0 µl
Amorce FwM13 (100 pm/µl)	0,1 µl
CEQ sequencing reaction buffer (ref: 608074)	1,0 µl
H ₂ O	4,9 µl
- Stop solution:

3M Sodium Acetate pH 5,2	2,0 µl(Sigma, ref: 7899)
0,5M Na ₂ EDTA pH 8,0	0,4 µl(Sigma, ref: 7889)
Glycogen 20 mg/ml	1,0 µl(DTCS Kit ou Roche, ref: 901393)
H ₂ O molecular biology grade	1,6 µl
- éthanol 95 % stocké à -20°C
- d'éthanol 70 % stocké à -20°C
- Sample Loading Solution (Beckman ref: 608082)

Protocole

- Dénaturer le mix 1 pendant 15 minutes à 95°C.
- Placer sur glace
- Ajouter le mix 2
- Réaliser le cycle suivant :

Dénaturation longue	92°C	1 min 30 s	1X
Dénaturation	96°C	20 s	40X
Hybridation	50°C	20 s	
Elongation	60°C	4 min	
Stockage	4°C	infini	1X

- La purification est réalisée dans une plaque PCR thin wall (Greiner)
- Ajouter 5 µl de " stop solution " aux 20 µl de réaction de séquençage
- Ajouter 60 µl d'éthanol 95 % stocké à -20°C
- Vortexer et immédiatement centrifuger 60 minutes à 3500 rpm à 4°C (centrifugeuse ALC)
- Eliminer le surnageant en secouant 1 seule fois de manière ferme la plaque micro-puits
- Ajouter 200 µl d'éthanol 70 % stocké à -20°C
- Centrifuger 15 minutes à 3500 rpm et éliminer le surnageant tel que précisé ci-avant
- Répéter une seconde fois cette étape de lavage à l'éthanol 70 %
- Eliminer le surnageant en secouant 1 seule fois de manière ferme la plaque micro-puits
- Eliminer l'éthanol restant en plaçant 30 minutes sous vide
- Resuspendre dans 40 µl de Sample Loading Solution
- Pipeter pour resuspendre le culot

- Transférer le contenu de la plaque PCR thin wall dans une plaque de séquençage Beckman
- Ajouter dans chaque puits une goutte d'huile minérale.

Les échantillons se trouvent à présent dans une plaque " Sample microtiter plates, 96 wells " (Beckman ref: 609801). L'utilisation de ce type de plaque est indispensable afin de ne pas endommager les capillaires lors de l'analyse (ne se déforme pas avec la température).

6. Analyse Eco-TILLING

Matériel

- Produit PCR
- Enzyme Endo1 Diluée 50 fois
- Tampon de digestion
- Eau pure
- STOP solution
- SLS (Formamide désionisée, Sample Loading Solution Beckman Coulter PCI P/N 608083)
- Tampon Beckman Coulter (Reorder No : 608012)
- Standard de taille 600 (BCI P/N 608090)
- Ethanol absolu (-20°C) (Riedel-de Haën 24103)
- Mix de précipitation (mix pour 8 puits) :
 - 9µl de glycogène (Roche # 901 393)
 - 18 µl d'acétate de sodium (Fluka # 71179)
 - 14,4 µl d'eau
 - 3,6 µl d'EDTA (Sigma # E-5134)

Protocole

- Hybridation

Mélanger 2 ADN de provenance différente, préparer un mélange contenant environ 100 ng de produit PCR. L'hybridation est réalisée en chauffant la solution à 95°C puis en descendant la température graduellement.

- Digestion

Après hybridation, ajouter:

- 1,5µl d'enzyme Endo1 (dilué 50X)
- 1,5µl de tampon 10X
- X µl d'eau afin d'atteindre 15 µl

- Arrêt de l'activité enzymatique

Ajouter 3 µl de stop solution aux 15µl de produits de digestions

- Précipitation de l'ADN

Ajouter 5µl du mix de précipitation dans chaque puits, mélanger

Centrifuger 1h, 4°C, 3500 rpm

Laver deux fois les échantillons avec 200 µl d'éthanol absolu, centrifuger 10 minutes, 3500 rpm, 4°C

Sécher au Speed Vac

Resuspendre dans 20 µl de SLS

- Séparation et détection par électrophorèse capillaire

Préparer :

- 1 puits avec 8 gouttes de tampon (Beckman Coulter réf : 608012)

1 plaque avec 1 mélange SLS/standard de taille (608095 Beckman Coulter Std-600) : 2 μ l de standard de taille pour 340 μ l de SLS, 35 μ l par puits. Ajouter sur cette plaque X μ l d'échantillon en fonction de la quantité d'ADN présente dans le produit PCR et 1 goutte d'huile minérale par puits.

Résultats

Résultats

1. Objectifs

Ce mémoire se situe dans la continuité de la thèse réalisée au laboratoire par Mallory Draye. Dans le cadre de sa thèse, il a démontré que l'extinction du gène pectate lyase B chez la fraise par ARNi entraînait une augmentation significative de la fermeté du fruit. Lors de ce travail, nous allons étudier la diversité allélique de ce gène PelB, en essayant de caractériser les différents allèles présents chez la fraise.

Le génome d'*Arabidopsis thaliana*, une espèce diploïde, est disponible dans son entièreté, ce qui n'est pas le cas de la fraise cultivée *Fragaria x ananassa*. Chez l'Arabette des dames, on retrouve 27 pectate lyases like (Figure 1), ces 27 séquences ayant une forte homologie avec des PL d'*Erwinia*. On pourrait donc s'attendre à une grande variété d'allèles présents chez la fraise cultivée puisque cette espèce est octoploïde. Nos premiers résultats montrent que cette hypothèse était à nuancer.

Nous nous sommes penchés sur la fraise cultivée : *Fragaria x ananassa*, qui est une espèce octoploïde. Compte tenu du nombre potentiellement élevé de loci PL détectés chez *Arabidopsis* et étant donné le taux de ploïdie de la fraise, nous avons décidé de travailler selon deux approches. Premièrement, afin d'analyser chaque allèle séparément, nous avons décidé d'insérer les séquences partielles amplifiées de PelB dans un vecteur de clonage. Deuxièmement, nous avons étudié la fraise des Bois *Fragaria vesca*, une espèce diploïde.

Dans un premier temps, nous avons analysé 3 variétés cultivées : Mara des bois, Darselect, et Elsanta. Différents critères sont intervenus dans ce choix. Tout d'abord ce sont des variétés aux fermetés contrastées. Mara des bois possédant une fermeté de 1 (moins ferme), Darselect et Elsanta une fermeté de 5 (plus ferme). De plus, ces variétés sont cultivées en Wallonie. Dans un second temps, voyant que le nombre de SNP potentiels n'était pas aussi élevé qu'attendu, nous avons tenté d'obtenir des profils Eco-TILLING directement (pas d'étape de clonage) de PelB chez différents cultivars de *F. x ananassa*. Ces cultivars possèdent des fermetés différentes et sont en cours de caractérisation au CRA-W (Gembloux).

Les objectifs de mon mémoire seront :

- Mettre au point la technique d'analyse de SNP par Eco-TILLING sur la fraise
- Réaliser une estimation de la diversité des pectates lyases chez la fraise
- Obtenir un profil des PelB pour les différents cultivars
- A plus long terme, évaluer la corrélation entre les profils Eco-TILLING des pectate lyases et la fermeté des fruits.

2. Choix des amorces

Nous nous sommes intéressés au gène Pel. Parmi les trois formes de pectate lyases existant chez la fraise (Pel A, B et C), nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la forme PelB. C'est en effet cette forme qui a été éteinte lors du travail mené au sein du laboratoire par M. Draye et qui lui a permis de démontrer son implication dans la maturation de la fraise.

Nous avons décidé de travailler sur de l'ADN génomique pour plusieurs raisons. Premièrement, les introns possédant une vitesse d'évolution plus rapide que les exons (ils ne sont pas soumis à une pression de sélection), la probabilité de trouver des SNP dans les introns est donc plus élevée. Deuxièmement, l'ADN génomique est plus aisé à obtenir que l'ARNm. En effet, le fait de travailler avec des ARN messagers signifie qu'il faudrait attendre d'avoir des fruits matures afin de pouvoir extraire l'ARN messenger de pectate lyase des fraises puisque celles-ci y sont spécifiquement exprimées.

Et enfin, nous avons décidé de travailler sur une portion du gène et pas sur son intégralité, car nous cherchons à discriminer les différents allèles et non pas à connaître tous les SNP présents dans chaque allèle.

La région que nous avons décidé d'étudier plus particulièrement n'a pas été choisie au hasard. On peut retrouver dans cette région amplifiée 3 introns et 4 exons, dont 2 partiellement, comme on peut le voir sur la figure 2.

Suite à un alignement des séquences disponibles de Pel A et B (nous n'avons pas trouvé de séquence de pectate lyase C de fraise dans la littérature), nous avons observé des régions très conservées entre séquences, d'autres non conservées et donc spécifiques. Ces régions spécifiques nous ont permis de construire des amorces propres, respectivement, à PelA et PelB. La première paire d'amorce, constituée des amorces FrPLe3-2 et PrPLe5-819, a été construite sur base de la séquence de PLB du cultivar Chandler AF339024. Elle permet d'amplifier PelB. Trois paires d'amorce plus spécifiques ont été construites à la fin de ce travail. Parmi ces trois paires, on retrouve deux paires spécifiques des formes A et B, et une paire d'amorces dégénérées A/B permettant l'amplification simultanée des 2 isoformes. L'amorce forward est commune aux trois paires d'amorces, elle a été construite sur une région hautement conservée. Les deux amorces spécifiques de PLA et PLB ont été sélectionnées sur des régions spécifiques de chaque isoforme. L'amorce dégénérée 3' a été construite sur une région commune aux séquences alignées de Pel A et B (Figure 3).

Couple d'amorces	Taille attendue (bp)
FrPLe3-2 et PrPLe5-819	637
Amorces spécifiques PelA	903
Amorces spécifiques PelB	959
Amorces dégénérées A/B	663

Tableau 1: Tailles attendues des fragments de Pel lors de l'amplification PCR

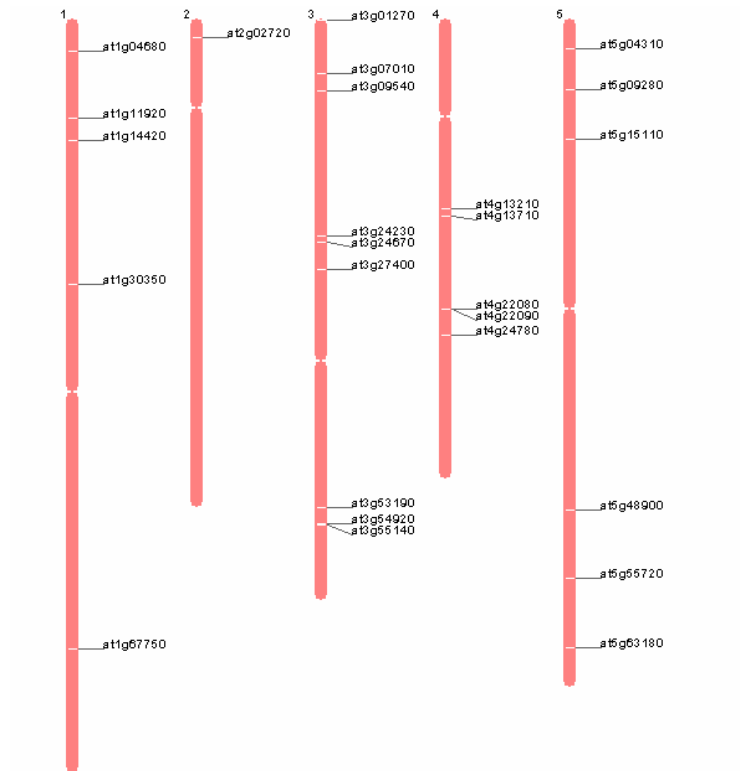


Figure 4: Représentation schématique de la position de 26 locus PL-like sur les 5 chromosomes d'*Arabidopsis thaliana* (www.arabidopsis.org)



Figure 5: Représentation schématique du gène PLB chez *Fragaria ananassa*. En mauve : les exons, en encadré transparent : les introns.

FraPLe5-819 : amorce forward PelB

FrPLe3-2 : amorce forward PelB

(4075) AF339024 CATCCAAAGACAGCCCTTTGTGGATTGTTTCAAGCGTGACATGGTGTATATGAAAGCTTTCAAGACCAATTTGACCGCTAGA
(2410) AF339025 CATCCAGGATGAGCCCTCTGGATTGTTTCAAGCGTGACATGGTGTATATGAAAGCTTTCAAGACCAATTTGATGACCGCT
(573) FXU63550 CATCCAAAGACAGCCCTTTGTGGATTGTTTCAAGCGTGACATGGTGTATATGAAAGCTTTCAAGACCAATTTGACCGCTAGA
(486) PL mallory CATCCAAAGACAGCCCTTTGTGGATTGTTTCAAGCGTGACATGGTGTATATGAAAGCTTTCAAGACCAATTTGACCGCTAGA
(4101) Consensus CATCCAAAGACAGCCCTTTGTGGATTGTTTCAAGCGTGACATGGTGTATATGAAAGCTTTCAAGACCAATTTGACCGCTAGA
4201
(4175) AF339024 GGTGTCAATGTCACATTTGTTTATGGAGGTTGCAATTAATGTTTACTAATGTTGATCAATCCAGTGGTCTACACATCCAGATGCAAGCTTACC
(2510) AF339025 GGAATGCTATGGTCCGAGCTCCCGAGTCAATTTGCAATTTACTAATGTTTACTAATGTTTACTAATGTTGATCAATCCAGTGGTCTACACATCCAGATGCAAGCTTACC
(573) FXU63550 GGTGTCAATGTCACATTTGTTTATGGAGGTTGCAATTAATGTTTACTAATGTTTACTAATGTTGATCAATCCAGTGGTCTACACATCCAGATGCAAGCTTACC
(586) PL mallory GGTGTCAATGTCACATTTGTTTATGGAGGTTGCAATTAATGTTTACTAATGTTTACTAATGTTGATCAATCCAGTGGTCTACACATCCAGATGCAAGCTTACC
(4201) Consensus GGTGTCAATGTCACATTTGTTTATGGAGGTTGCAATTAATGTTTACTAATGTTTACTAATGTTGATCAATCCAGTGGTCTACACATCCAGATGCAAGCTTACC
4301
(4275) AF339024 GAAATGCTATGGTCCGAGCTCCCGAGTCAATTTGCAATTTACTAATGTTTACTAATGTTGATCAATCCAGTGGTCTACACATCCAGATGCAAGCTTACC
(2610) AF339025 GAAATGCTATGGTCCGAGCTCCCGAGTCAATTTGCAATTTACTAATGTTTACTAATGTTGATCAATCCAGTGGTCTACACATCCAGATGCAAGCTTACC
(773) FXU63550 GAAATGCTATGGTCCGAGCTCCCGAGTCAATTTGCAATTTACTAATGTTTACTAATGTTGATCAATCCAGTGGTCTACACATCCAGATGCAAGCTTACC
(686) PL mallory GAAATGCTATGGTCCGAGCTCCCGAGTCAATTTGCAATTTACTAATGTTTACTAATGTTGATCAATCCAGTGGTCTACACATCCAGATGCAAGCTTACC
(4301) Consensus GAAATGCTATGGTCCGAGCTCCCGAGTCAATTTGCAATTTACTAATGTTTACTAATGTTGATCAATCCAGTGGTCTACACATCCAGATGCAAGCTTACC
4401
(4375) AF339024 TCACAAATCCCTCCTCAATTTGCGGATGGCTCAATTTGATGCTATCATGGGTTCTCACTGGCATTACCATTTCCAAACAATCTTCTACTCACCATTAAATGAG
(2710) AF339025 TCACAAATCCCTCCTCAATTTGCGGATGGCTCAATTTGATGCTATCATGGGTTCTCACTGGCATTACCATTTCCAAACAATCTTCTACTCACCATTAAATGAG
(873) FXU63550 TCACAAATCCCTCCTCAATTTGCGGATGGCTCAATTTGATGCTATCATGGGTTCTCACTGGCATTACCATTTCCAAACAATCTTCTACTCACCATTAAATGAG
(786) PL mallory TCACAAATCCCTCCTCAATTTGCGGATGGCTCAATTTGATGCTATCATGGGTTCTCACTGGCATTACCATTTCCAAACAATCTTCTACTCACCATTAAATGAG
(4401) Consensus TCACAAATCCCTCCTCAATTTGCGGATGGCTCAATTTGATGCTATCATGGGTTCTCACTGGCATTACCATTTCCAAACAATCTTCTACTCACCATTAAATGAG
4501
(4475) AF339024 GTGTGATCTACATAATCCCATACCAATTTCTTGTGCTTCAGAAATTTTGTGTTCCAAAGGAGACTAATTTGATGTTGGTTTTATGGAACAGAGTT
(2810) AF339025 GTATGTCATGATGCTCTCTGATTAATATTTACTTCCATCTA---TATTTAGTTGT---GATCTGTCAATTTTATCTATGCAATTAATCAATCAGGTA
(973) FXU63550 GT-----
(886) PL mallory GT-----
(4501) Consensus GTTG T CT T CC A ATTT T T A TA TTT GTTG GA ACT A ATTT T ATG A CAGGTT
4601
(4575) AF339024 ATGCTGTTGGGCAATAGTGCCTACACAGGGACCAAGCGATGCAAGTGCATTTGGTTTACAAATCAATTTGGTGAAGGACTTATCCAAGAAATGCCAA
(2902) AF339025 ATGCTGTTGGGCAATAGTGCCTACACAGGGACCAAGCGATGCAAGTGCATTTGGTTTACAAATCAATTTGGTGAAGGACTTATCCAAGAAATGCCAA
(976) FXU63550 ATGCTGTTGGGCAATAGTGCCTACACAGGGACCAAGCGATGCAAGTGCATTTGGTTTACAAATCAATTTGGTGAAGGACTTATCCAAGAAATGCCAA
(889) PL mallory ATGCTGTTGGGCAATAGTGCCTACACAGGGACCAAGCGATGCAAGTGCATTTGGTTTACAAATCAATTTGGTGAAGGACTTATCCAAGAAATGCCAA
(4601) Consensus ATGCTGTTGGGCAATAGTGCCTACACAGGGACCAAGCGATGCAAGTGCATTTGGTTTACAAATCAATTTGGTGAAGGACTTATCCAAGAAATGCCAA
4701
(4675) AF339024 GGTAAAATTTTC-----TGAAGTGGTTCTTTTAAACCTA-----CAAGTAAAC
(3002) AF339025 GGTAAATTTTCAACTAGAACCGGCAATTTAGCTTCCCATGCTGATATGTCGATTTCAATAGGATGGGTTCTGGACATAAACTTTGGCTGCAAGAAAC
(1076) FXU63550 G-----
(989) PL mallory G-----
(4701) Consensus GGTAA TTTTC TGA TG TTT A TA CAAG AAC
4801
(4714) AF339024 A-----TTTGGATTCCTCACTGACCAAAATGTGCTAA-----CCTCAATAAATGAACTGTGCAGAG
(3102) AF339025 A-----TTTGGATTCCTCACTGACCAAAATGTGCTAA-----CCTCAATAAATGAACTGTGCAGAG
(1077) FXU63550 A-----TTTGGATTCCTCACTGACCAAAATGTGCTAA-----CCTCAATAAATGAACTGTGCAGAG
(990) PL mallory A-----
(4801) Consensus A-----TTTGG T T T CA AT TG TAA CC A TGAA TGCAGA
5000

3. Isolement de l'ADNg

Les échantillons de fraise des cultivars Darselect, Elsanta et Mara des Bois analysés dans un premier temps, proviennent du CRA-W (Gembloux). Les échantillons de fraise *F. vesca* proviennent de plants sauvages. Les prélèvements ont été effectués le 1^{er} juillet 2005. Les échantillons de fraise des 13 cultivars étudiés dans un deuxième temps ont été prélevés au même endroit le 21 avril 2006 et le 19 mai 2006.

Afin d'étudier le gène pectate lyase, nous devons tout d'abord obtenir de l'ADNg de qualité. Cette étape cruciale a nécessité le test de différentes méthodes : CTAB, GenElute, Phytopure et Phytopass. Ces 3 dernières méthodes étant des kits d'extraction, il ne nous est pas toujours possible de connaître la nature exacte des réactifs.

Nous avons décidé d'utiliser ces différentes méthodes pour diverses raisons :

- Le kit d'extraction d'ADNg Phytopure renferme un composant particulier : une résine. Cette résine se lie de façon covalente aux polysaccharides et se place à l'interface des deux phases après extraction au phénol.
- Le kit Phytopass a été choisi pour sa facilité d'utilisation et les bons résultats obtenus sur d'autres organismes.
- Le kit GenElute a été choisi car il avait montré de bons résultats lors de la thèse de M. Draye. Ce kit se base sur le principe de fixation de l'ADN sur colonne suivie de nombreux lavages et permet d'éliminer les contaminants.

La méthode CTAB a été choisie car elle fournit de bons résultats sur la racine de chicorée qui est également une plante où l'extraction d'ADNg n'est pas chose aisée. Parmi ses différents réactifs, on retrouve le PVP et plusieurs extractions au phénol-chloroforme. Le PVP permet de se débarrasser des polyphénols, et des étapes d'extraction phénol-chloroformes permettent de se débarrasser des protéines en excès.

La méthode CTAB apporte comparativement les meilleurs résultats. Les méthodes Phytopass et GenElute ne donnent un ADNg permettant une amplification de PL que pour certains échantillons. La méthode Phytopure n'apporte pas de bons résultats.

	Absorbance 260 nm	Absorbance 280 nm	Pureté	Cc/μl
Mara des Bois	0,014	0,014	1,1	0,025
Darselect	0,01	0,005	2	0,02
Elsanta	0,15	0,094	1,5	0,36
<i>F. vesca</i>	0,005	0,003	1,7	0,01

Tableau 2: Résultats au spectrophotomètre des échantillons extraits avec la méthode CTAB

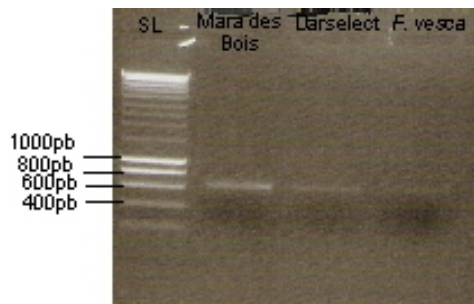


Figure 6: Electrophorèse en gel d'agarose suite à une amplification PCR en vue d'une obtention d'un amplicon de PL à partir d'ADNg obtenus grâce à la méthode CTAB pour les cultivars Mara des Bois, Darselect et F. vesca.

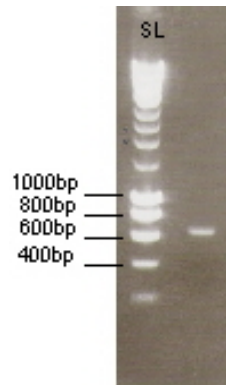


Figure 7: Electrophorèse en gel d'agarose suite à une amplification PCR en vue d'une obtention d'un amplicon de PL à partir d'ADNg obtenu grâce à la méthode CTAB pour le cultivar Mara des Bois. L'amplification de PelB à partir du cultivar Mara des Bois a dû être réeffectuée suite à des problèmes lors du clonage de bactéries.

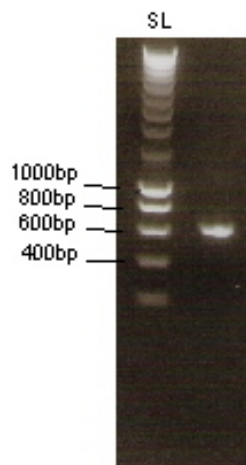


Figure 8: Electrophorèse en gel d'agarose suite à une amplification PCR en vue d'une obtention d'un amplicon de PL à partir d'ADNg obtenu grâce à la méthode CTAB pour le cultivar Elsanta

4. Amplification de PelB

La deuxième étape de l'analyse, après l'extraction d'ADNg, a été l'amplification du gène pectate lyase B. L'amplification à l'aide des amorces FrPLe3-2 et PrPLe5-819, permet d'obtenir des fragments de 637 paires de bases. On peut observer sur les figures 4, 5 et 6 une bande d'amplification à la taille attendue de 637 paires de base pour les différents produits PCR (Figure 2). L'amplification de PelB à partir du cultivar Mara des Bois a dû être réeffectuée suite à des problèmes lors du clonage de bactéries (figure 5).

5. Transformation de bactéries

Ces amplicons des différentes variétés ont été insérés dans un vecteur afin de transformer des bactéries. Le vecteur utilisé est le vecteur PCR II qui est un vecteur T/A. Nous avons choisi ce type de vecteur afin de ne pas devoir utiliser d'enzyme de restriction pouvant couper dans notre insert. En effet, la séquence de pectate lyase B est connue, mais la présence de SNP pourrait faire apparaître un site de restriction sinon absent. La sélection des colonies a été réalisée selon le test blanc-bleu, les colonies blanches étant considérées comme positives.

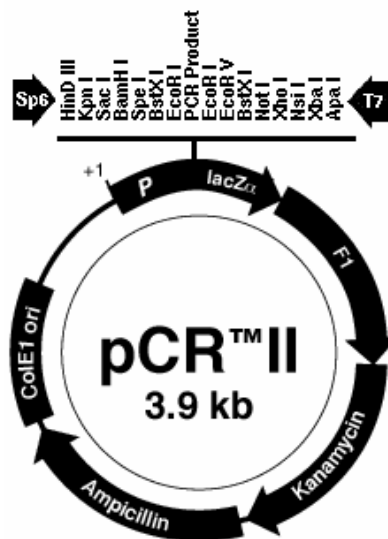


Figure 7: Vecteur utilisé pour la transformation de bactéries

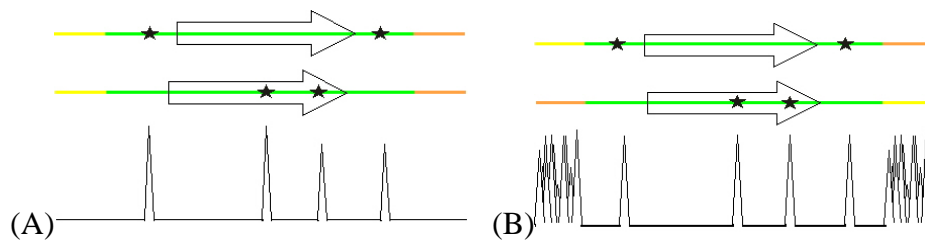


Figure 9: Schéma représentant les différents cas de figures rencontrés lors de l'insertion dans le vecteur

Vert : Insert dont l'orientation est indiquée par la flèche

Jaune : zone d'hybridation de l'amorce forward universelle

Orange : zone d'hybridation de l'amorce reverse universelle

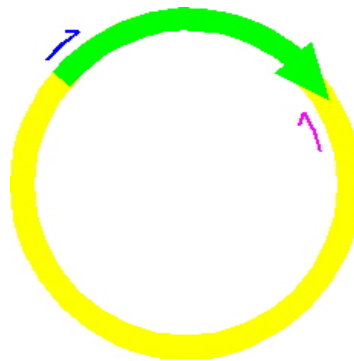


Figure 10: Schéma représentant le vecteur et la position des 2 amorces

Jaune : Vecteur **Vert :** Insert

Bleu : amorce Forward spécifique de l'insert

Rose : amorce Reverse spécifique du vecteur

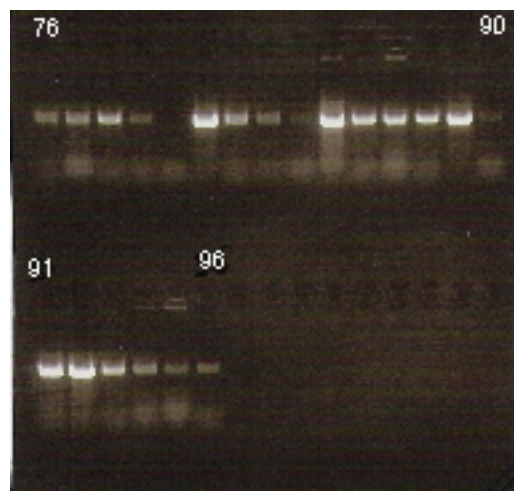


Figure 11: Electrophorèse en gel d'agarose d'une amplification PCR. Illustration du criblage de bactéries par une amplification PCR selon la stratégie exposée en figure 10. On observe certaines amplifications pour ces clones du cultivar Mara des Bois

6. Mise au point de l'Eco-TILLING sur vecteur

Nous avons réalisé une miniprep sur les colonies positives au test blanc bleu. Dans un premier temps, nous avons réalisé différents tests afin de mettre au point l'analyse Eco-TILLING pour notre travail. Pour rappel, l'approche Eco-TILLING consiste à mettre en présence deux brins d'ADN homologues, et à réaliser une hybridation de ces brins afin de révéler des SNP provoquant des mismatch. Les SNP sont ensuite détectés par une enzyme spécifique des mismatch : l'endonucléase Endo1. Ces produits digérés sont analysés par électrophorèse capillaire afin d'identifier la taille des différents fragments générés. Les premiers tests présentaient énormément de bruit de fond (Figure 8).

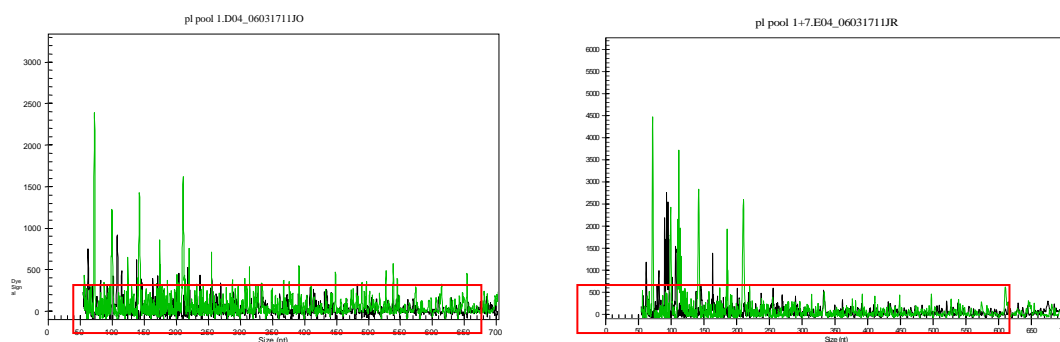


Figure 8: Sortie typique après analyse Eco-TILLING de *PelB* sur pool de clones de Darselect. On peut observer la présence d'un fort bruit de fond (encadré)

L'insertion dans le vecteur n'étant pas directionnelle, nous avons envisagé le fait que ce bruit de fond ait été dû à une différence d'orientation de l'insert. En effet, les premiers tests ont été accomplis sur une amplification PCR réalisée à l'aide de deux couples d'amorces marquées universelles M13 : Fw M13/ WellRed D3 et WellRed D2/Rev M13 (les amorces universelles sont marquées chacune avec un fluorochrome différent). L'utilisation de ces amorces universelles marquées avec de fluorochromes de longueurs d'ondes d'émission différentes permet de diminuer les faux positifs. En effet, le fragment PCR étant marqué à chaque extrémité, pour chaque digestion spécifique, on retrouve 2 pics de couleur différente mais de taille complémentaire (Taille fragment A + taille fragment B = taille produit PCR).

Le clonage dans un vecteur T/A n'étant pas orienté, nous pouvions être face à deux cas de figure. Premièrement, les deux fragments avaient été insérés selon la même orientation (Figure 9A). Pendant l'hybridation, les deux amplicons forment un hétéroduplex et lors de l'analyse en électrophorèse sur capillaire, nous ne détectons que les SNP. Dans le deuxième cas de figure, les inserts possèdent une orientation opposée. Pendant l'hybridation, les deux inserts s'hybrident correctement, cependant, la zone d'hybridation de l'amorce forward s'hybride avec la zone d'hybridation de la zone reverse. Nous observons alors énormément de bruit de fond (figure 9B).

Afin de résoudre ce problème, nous avons réalisé un criblage orienté sur bactéries. Nous avons amplifié l'insert à l'aide de l'amorce reverse universelle et de l'amorce forward spécifique du gène *pelB* (Figure 10) sur 96 clones pour les 3 cultivars *F. x ananassa* et *F. vesca*. Ensuite, nous avons sélectionné les 48 premiers clones ayant montré une amplification, pour chaque cultivar. Bien que l'insertion dans le vecteur soit en théorie aléatoire, nous avons pu observer une insertion préférentielle dans le vecteur (Figure 11).

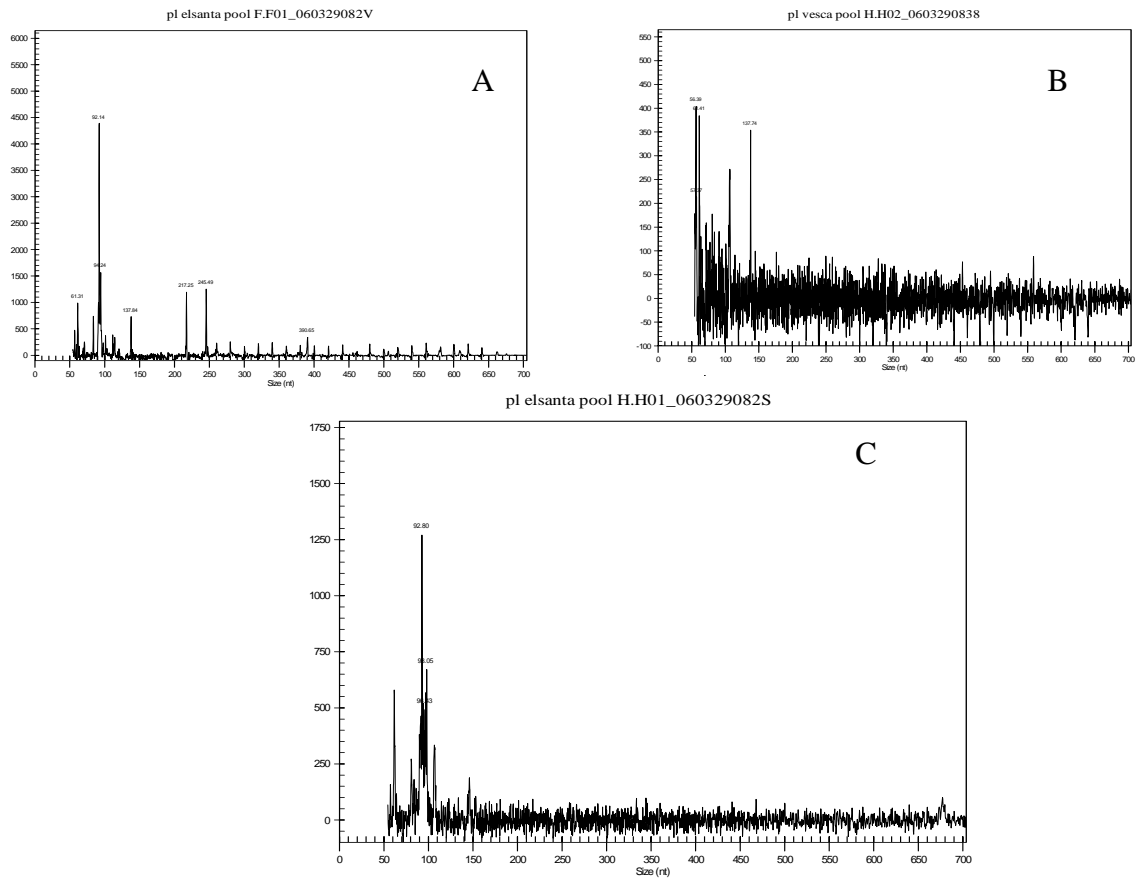


Figure 12: Sortie de l'électrophorèse capillaire après analyse Eco-Tilling sur des produits PCR à l'aide des amorces FrPLe5-819 et Rv-D2. On peut observer que le rapport signal / bruit de fond est très mauvais. A et C : Pool de clones Elsanta. B : Pool de clones F. vesca.

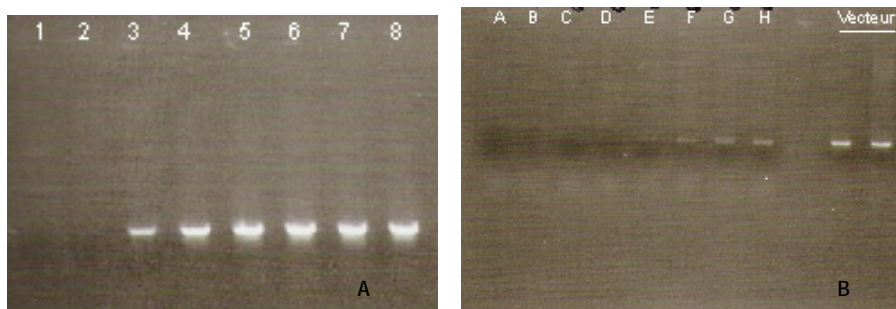


Figure 13: Amplification PCR de PelB sur ADNg de Mara des Bois réalisée avec gradient de température

(A): Première amplification PCR de PelB avec gradient de température

1 : 70°C 2 : 68,9°C 3 : 67,1°C 4 : 64,3°C
 5 : 60,5°C 6 : 57,9°C 7 : 56,1°C 8 : 55°C

(B) : Deuxième amplification PCR de PelB avec gradient de température (le gradient a été affiné)

A : 68,9°C B : 68,8°C C : 68,6°C D : 68,2°C
 E : 67,8°C F : 67,5°C G : 67,3°C H : 67,1°C

Cultivar	Nombre de clones dans la même orientation	Pourcentage de l'orientation préférentielle
Darselect	82	85%
F.vesca	96	100%
Elsanta	93	97%
Mara des Bois	93	97%

Tableau 3: Tableau récapitulatif de la préférence d'orientation des inserts

Suite à cette sélection de clones, nous avons pu observer, lors des tests préliminaires d'Eco-TILLING sur clone, une amélioration du bruit de fond (Figure 12). Par exemple, sur la figure 12A, nous avons pu observer des pics nets. Sur les deux autres exemples, Figure 12B et C, nous n'avons rien pu observer du fait du bruit de fond encore fort présent.

Afin de diminuer au maximum le bruit de fond, nous avons décidé d'utiliser une amorce spécifique PelB marquée de façon fluorescente. Cette amorce marquée a la même séquence que l'amorce FrPLe5-819 ; l'amorce reverse que nous avons utilisée est l'amorce FrPLe3-2. Lors des analyses postérieures, nous n'avons plus utilisé d'amorces universelles puisque nous disposons dorénavant d'une paire d'amorces spécifiques marquées. Nous avons réalisé différents tests avec ces amorces :

1. Une amplification PCR avec gradient de température ainsi qu'une analyse Eco-TILLING réalisée avec des échantillons amplifiés à différentes températures, en vue d'optimiser la température d'amplification du gène Pel (Figure 13 et 14).
2. La linéarisation du vecteur par une digestion enzymatique. Nous avons en effet observé des bandes multiples lors de la PCR pouvant provenir d'une amplification « circulaire » du vecteur : taille de l'insert + (n x taille vecteur). Nous avons observé que la simple augmentation de température permettait de diminuer le bruit de fond, la linéarisation du vecteur n'était alors pas nécessaire (Figure 14).

Sur base des résultats de la PCR avec gradient de température (Figure 13A), nous avons décidé d'affiner ce gradient et d'obtenir ainsi une température optimale plus précise (13B). La réalisation d'une analyse Eco-TILLING sur les produits PCR réalisés avec gradient de température nous a permis d'identifier la température optimale comme étant de 68,9°C (figure 14). Cette température nous a permis d'obtenir un signal important avec un minimum de bruit de fond aux 2 extrémités.

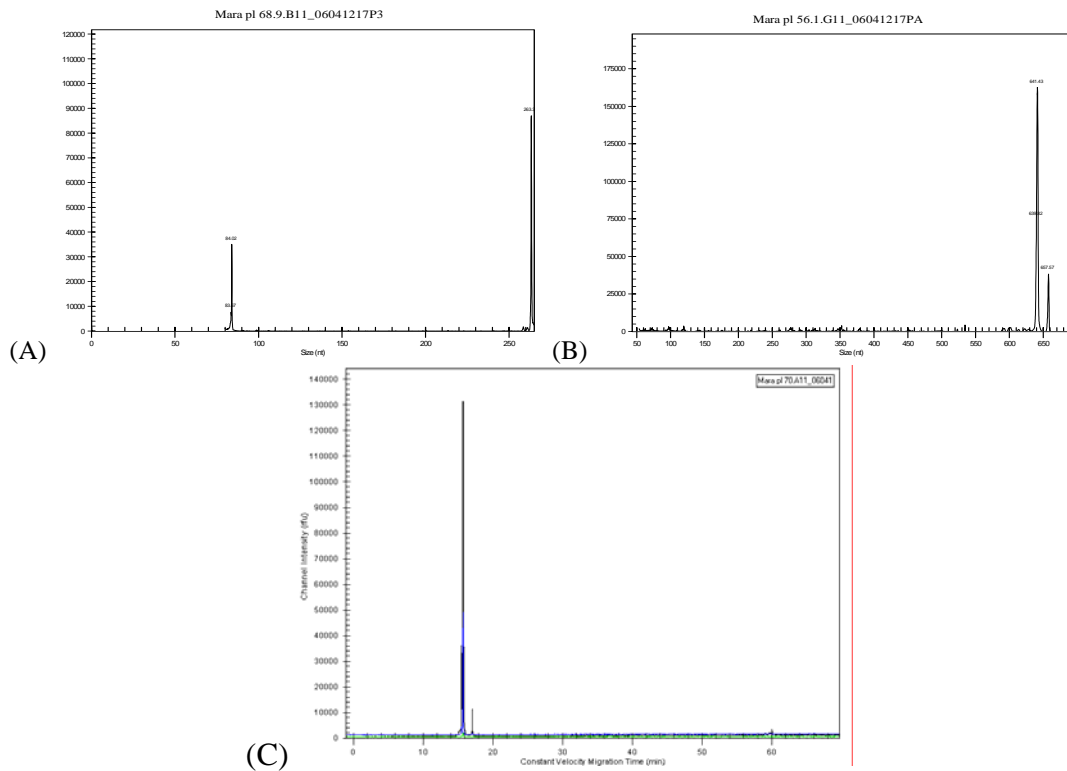


Figure 14: Illustration de la sortie d'électrophorèse capillaire des produits PCR de PeIB sur ADNg de Mara des Bois avec gradient de température.

(A) : 68,9°C (B) : 56,1°C (C): 70°C

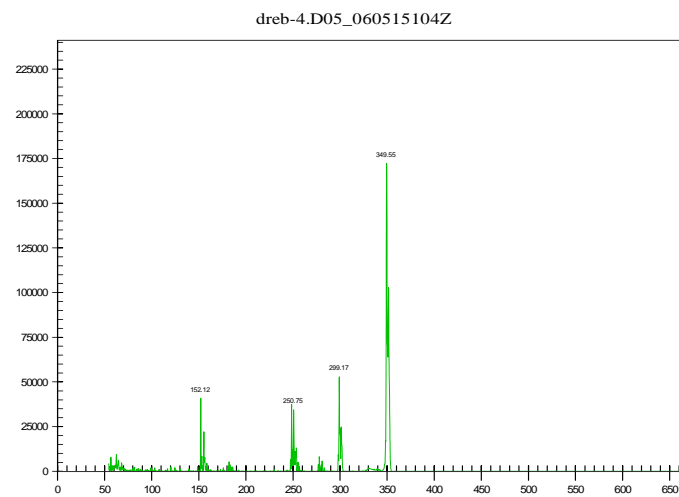


Figure 15: Sortie Eco-Tilling illustrant le test réalisé avec le gène DREB sur ADNg de *C. intybus*

7. Contrôle de l'approche Eco-TILLING

Au vu des problèmes d'obtention de résultats Eco-TILLING clairs, et suite à un changement de lot de l'enzyme, nous avons effectué un test afin de vérifier si la technique Eco-TILLING elle-même ne devait pas être remise en cause. Nous avons testé le nouveau lot d'enzyme à l'aide du gène contrôle bien caractérisé DREB. Nous avons réalisé une amplification PCR sur 15 échantillons d'ADNg de chicorée, *Cichorium intybus*. Ces produits d'amplification ont été hybridés sur eux-mêmes, digérés avec des dilutions croissantes d'enzyme ENDO1, purifiés et analysés en électrophorèse capillaire. Lors de ce test, nous avons pu observer d'une part que les pics attendus et observés correspondaient parfaitement, l'enzyme n'était donc pas en cause, et d'autre part que les meilleurs résultats étaient bien observés grâce à une digestion réalisée à l'aide de l'enzyme ENDO1 diluée 50X (Figure 15).

8. Résultats des analyses en pool

Ayant obtenu l'optimisation des conditions expérimentales suite aux différents tests effectués (Figure 11 à 15), nous avons analysé en pool les différents clones transformés avec le vecteur PCR II contenant un fragment PelB. L'analyse en pool nous a permis de réaliser une analyse croisée. Les pools de chiffres (par exemple A1-H1 ou A4-H4) se composent de 8 clones, les pools de lettres (par exemple : Pool A1-A3 ou Pool D7-D9) se composent de 3 clones. Les sorties de l'électrophorèse capillaire se trouvent en annexe 1.

Pool A1-A3				157						
Pool B1-B3		128		157						
Pool C1-C3				157						
Pool D1-D3		128		157					643	
Pool E1-E3		128		157		298				
Pool F1-F3								632		
Pool G1-G3	99						342			
Pool H1-H3				157						
Pool A1- H1								632		
Pool A2-H2										646
Pool A3-H3				157						
A1			140	157	190					

Tableau 4: Synthèse des SNP obtenus après analyse Eco-TILLING de PelB de clones du cultivar Darselect

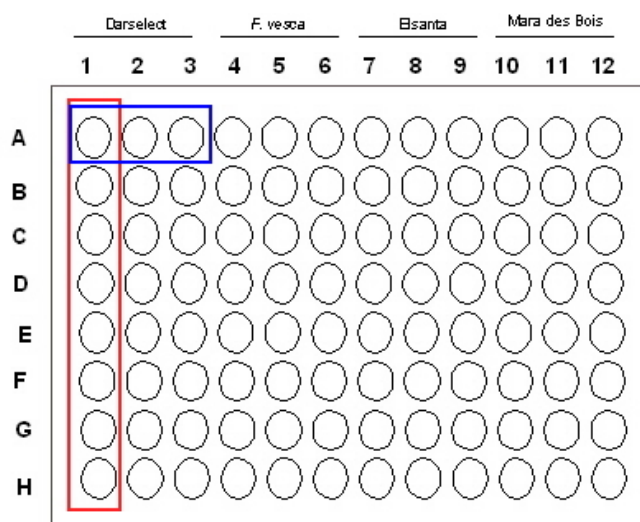


Figure 16: Schéma représentatif de la plaque utilisée permettant une visualisation des pools effectués. Chaque puits contient une miniprep de clone.

Rouge : Pool de chiffre - Bleu : Pool de lettre

Pool A4-A6	Les résultats ne sont pas interprétables							
Pool B4-B6	Les résultats ne sont pas interprétables							
Pool C4-C6	Les résultats ne sont pas interprétables							
Pool D4-D6	Les résultats ne sont pas interprétables							
Pool E4-E6		128	157				641	
Pool F4-F6		128	157				641	
Pool G4-G6	68	128		188			415	643
Pool H4-H6	Les résultats ne sont pas interprétables							
Pool A4-H4	Les résultats ne sont pas interprétables							
Pool A5-H5		128	157			390		
Pool A6-H6			157				641	
A4					342		641	

Tableau 5: Synthèse des SNP obtenus après analyse Eco-TILLING de PeIB de clones de l'espèce *F. vesca*

Pool A7-A9	128				250	300	390	575	590	592						
Pool B7-B9		157										643				
Pool C7-C9											630					
Pool D7-D9			159	160		300		575								
Pool E7-E9		157										643				660
Pool F7-E9		157									642			657		
Pool G7-G9						300										
Pool H7-H9		157										643				660
Pool A7-H7	128		159			300	390									
Pool A8-H8		157											653			
Pool A9-H9		157				300	390		590							
A7					242											

Tableau 6: Synthèse des SNP obtenus après analyse Eco-TILLING de PeIB de clones du cultivar Elsanta

Pool A10-A12	Les résultats ne sont pas interprétables													
Pool B10-B12									291					
Pool C10-C12				160	170	219	220							
Pool D10-D12													617	
Pool E10-E12														641
Pool F10-E12														
Pool G10-G12			158						291		380		610	
Pool H10-H12		157												
Pool A10-H10		157									380	580		
Pool A11-H11	120	157												
Pool A12-H12										371				641
A10									260					

Tableau 7: Synthèse des SNP obtenus après analyse Eco-TILLING de PelB de clones du cultivar Mara des Bois

L'analyse des tableaux 4 à 7 nous a permis de sélectionner certaines colonies sur base des différences alléliques potentiellement les plus importantes afin de les séquencer et de vérifier la pertinence des résultats obtenus lors de l'analyse Eco-TILLING.

Nom du cultivar ou espèce	Nom des pools
Darselect	B1-B3 et G1-G3
Elsanta	A7-A9 et B7-B9
Article I. <i>F. vesca</i>	E4-E6 et G4-G6
Mara des Bois	C10-C12, D10-D12 et G10-G12

Tableau 8: Pools de clones sélectionnés pour le séquençage de PelB

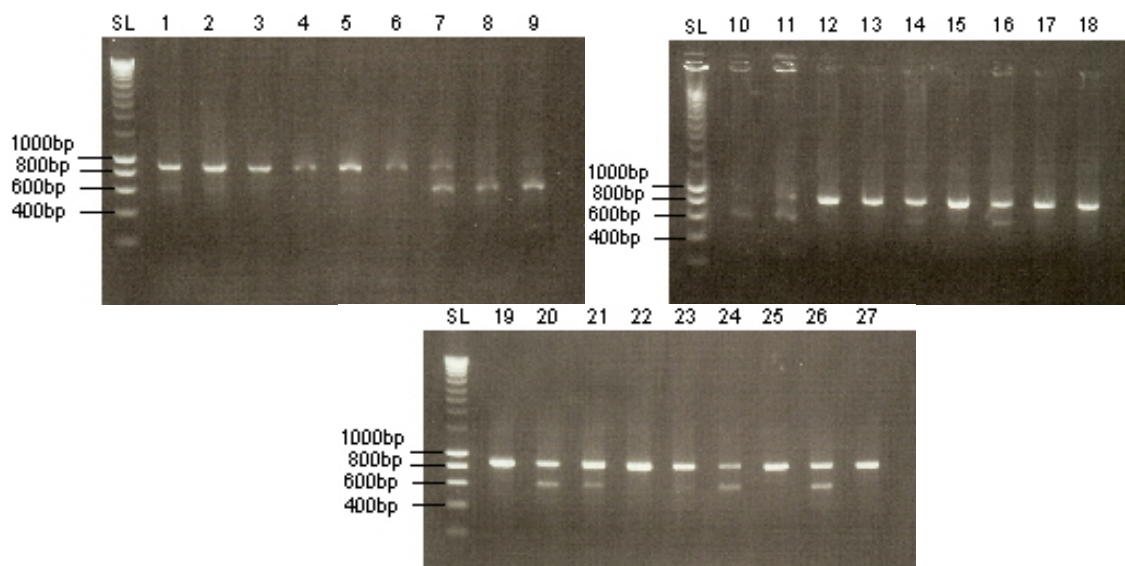


Figure 17: Electrophorèse sur gel d'agarose suite à une amplification PCR de PelB sur les 27 clones.

Clones 1 à 6 : Elsanta

Clones 7 à 15 : Mara des Bois

Clones 16 à 21 : Darselect

Clones 22 à 27 : *F. vesca*

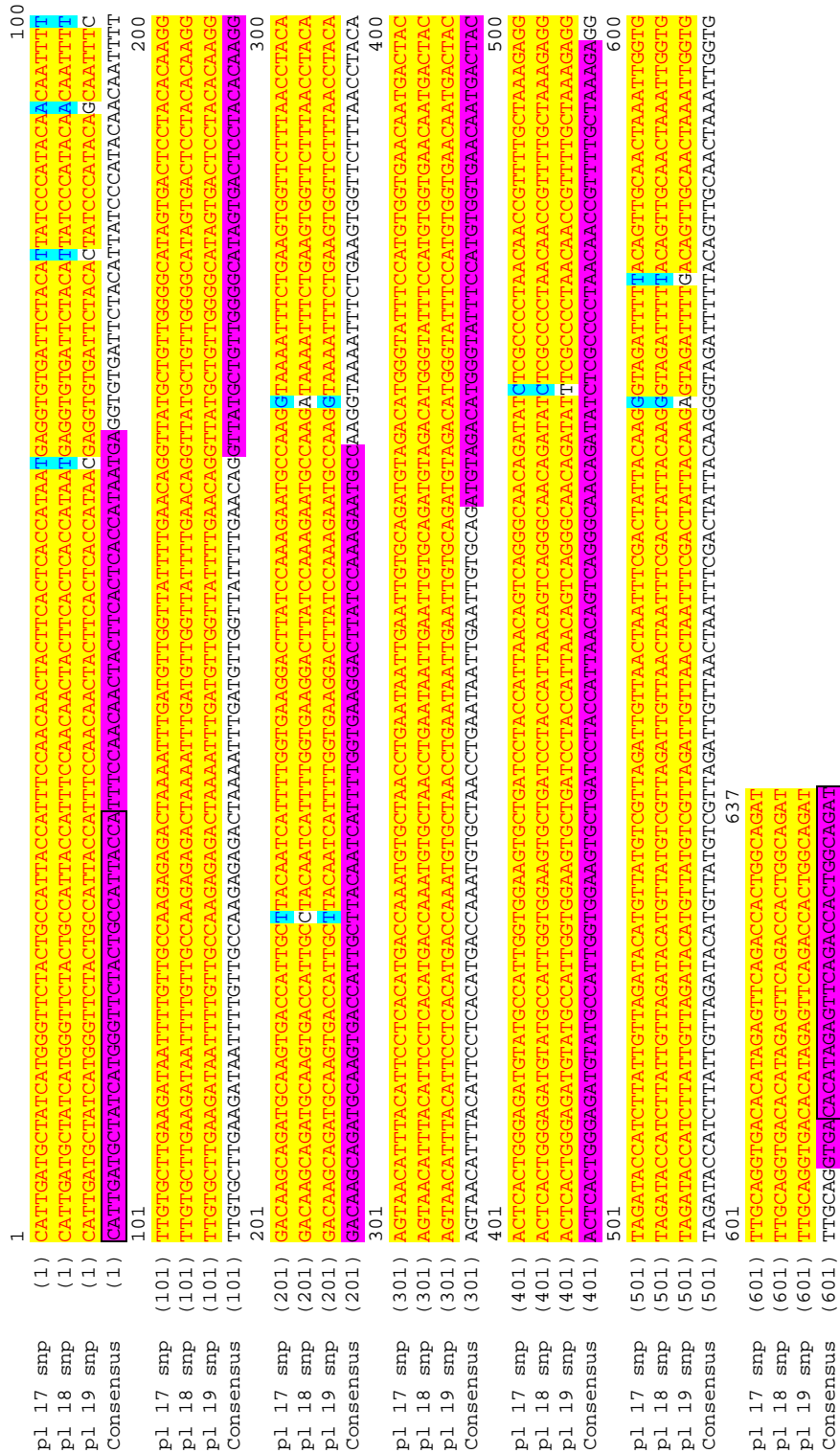


Figure 18: Alignement des séquences obtenues après séquençage de 3 clones Darselect, les amorces sont encadrées

Mauve : Exons

			100
			CATTGATGCTATCAATGGGTTCTACTGGCAATACCAATTTCCAAACAACACTACTTCACTACCATTAATGAGGTGTGATTTGCATATCCCATACACCAATTTTC
p1 12 snp	(1)		CATTGATGCTATCAATGGGTTCTACTGGCAATACCAATTTCCAAACAACACTACTTCACTACCATTAATGAGGTGTGATTTGCATATCCCATACACCAATTTTC
p1 13 snp	(1)		CATTGATGCTATCAATGGGTTCTACTGGCAATACCAATTTCCAAACAACACTACTTCACTACCATTAATGAGGTGTGATTTGCATATCCCATACACCAATTTTC
Consensus	(1)		CATTGATGCTATCAATGGGTTCTACTGGCAATACCAATTTCCAAACAACACTACTTCACTACCATTAATGAGGTGTGATTTGCATATCCCATACACCAATTTTC
			200
			TTGTGCTTGAAGATAAATTTTGTGTCAAGGGGAGACTAAAAATTTGATGTGGTTTATTGGAAACAGGTATTGCTGTGGGGCATAGTACTCCTACACAAGG
p1 12 snp	(101)		TTGTGCTTGAAGATAAATTTTGTGTCAAGGGGAGACTAAAAATTTGATGTGGTTTATTGGAAACAGGTATTGCTGTGGGGCATAGTACTCCTACACAAGG
p1 13 snp	(101)		TTGTGCTTGAAGATAAATTTTGTGTCAAGGGGAGACTAAAAATTTGATGTGGTTTATTGGAAACAGGTATTGCTGTGGGGCATAGTACTCCTACACAAGG
Consensus	(101)		TTGTGCTTGAAGATAAATTTTGTGTCAAGGGGAGACTAAAAATTTGATGTGGTTTATTGGAAACAGGTATTGCTGTGGGGCATAGTACTCCTACACAAGG
			300
			GACAAGCAGATGCAAGTGACCATTGCTTACAATCATTTTGTGTGAAGGACTTTATCCAAAGAATGCCAAAGGTAAAAATTTCTGAAAGTGGTTCTTTTAAACCTACA
p1 12 snp	(201)		GACAAGCAGATGCAAGTGACCATTGCTTACAATCATTTTGTGTGAAGGACTTTATCCAAAGAATGCCAAAGGTAAAAATTTCTGAAAGTGGTTCTTTTAAACCTACA
p1 13 snp	(201)		GACAAGCAGATGCAAGTGACCATTGCTTACAATCATTTTGTGTGAAGGACTTTATCCAAAGAATGCCAAAGGTAAAAATTTCTGAAAGTGGTTCTTTTAAACCTACA
Consensus	(201)		GACAAGCAGATGCAAGTGACCATTGCTTACAATCATTTTGTGTGAAGGACTTTATCCAAAGAATGCCAAAGGTAAAAATTTCTGAAAGTGGTTCTTTTAAACCTACA
			400
			AGTAACATTTGCATTCCTCAGATGACCAATGGCTTACAATCATTTTGGTGAAGGACTTTATCCAAAGAATGCCAAAGGTAAAAATTTCTGAAAGTGGTTCTTTTAAACCTACA
p1 12 snp	(301)		AGTAACATTTGCATTCCTCAGATGACCAATGGCTTACAATCATTTTGGTGAAGGACTTTATCCAAAGAATGCCAAAGGTAAAAATTTCTGAAAGTGGTTCTTTTAAACCTACA
p1 13 snp	(301)		AGTAACATTTGCATTCCTCAGATGACCAATGGCTTACAATCATTTTGGTGAAGGACTTTATCCAAAGAATGCCAAAGGTAAAAATTTCTGAAAGTGGTTCTTTTAAACCTACA
Consensus	(301)		AGTAACATTTGCATTCCTCAGATGACCAATGGCTTACAATCATTTTGGTGAAGGACTTTATCCAAAGAATGCCAAAGGTAAAAATTTCTGAAAGTGGTTCTTTTAAACCTACA
			500
			ACTCAGTGGGAGATGTATGCCAATGGTGGAAAGTGTGATCCTACCATCAACAGTCAAGGGCAACAGATATCTGCCCCCTAACAAACCCGTTTTTGGCTAAAGAGG
p1 12 snp	(401)		ACTCAGTGGGAGATGTATGCCAATGGTGGAAAGTGTGATCCTACCATCAACAGTCAAGGGCAACAGATATCTGCCCCCTAACAAACCCGTTTTTGGCTAAAGAGG
p1 13 snp	(401)		ACTCAGTGGGAGATGTATGCCAATGGTGGAAAGTGTGATCCTACCATCAACAGTCAAGGGCAACAGATATCTGCCCCCTAACAAACCCGTTTTTGGCTAAAGAGG
Consensus	(401)		ACTCAGTGGGAGATGTATGCCAATGGTGGAAAGTGTGATCCTACCATCAACAGTCAAGGGCAACAGATATCTGCCCCCTAACAAACCCGTTTTTGGCTAAAGAGG
			600
			TAGATACCATCTTATTATTAGATACATGTATGTCATTAGATTGTTAACTAATAACGACTAATAAGAGTAGAATTTGACAGTTGCAACTAAAATTTGGTG
p1 12 snp	(501)		TAGATACCATCTTATTATTAGATACATGTATGTCATTAGATTGTTAACTAATAACGACTAATAAGAGTAGAATTTGACAGTTGCAACTAAAATTTGGTG
p1 13 snp	(501)		TAGATACCATCTTATTATTAGATACATGTATGTCATTAGATTGTTAACTAATAACGACTAATAAGAGTAGAATTTGACAGTTGCAACTAAAATTTGGTG
Consensus	(501)		TAGATACCATCTTATTATTAGATACATGTATGTCATTAGATTGTTAACTAATAACGACTAATAAGAGTAGAATTTGACAGTTGCAACTAAAATTTGGTG
			637
			TTGCAGGTGACACATAGAGTTTCAGACCACCTGGCAGAT
p1 12 snp	(601)		TTGCAGGTGACACATAGAGTTTCAGACCACCTGGCAGAT
p1 13 snp	(601)		TTGCAGGTGACACATAGAGTTTCAGACCACCTGGCAGAT
Consensus	(601)		TTGCAGGTGACACATAGAGTTTCAGACCACCTGGCAGAT

Figure 19: Alignement de séquence suite au séquençage de clones Mara des Bois, les amorces sont encadrées

Mauve : Exons

p.l 22 snp	(1)	CATTTGATGCTATCATGGGTTCTACTGCCATTACCATTTTCCAAACAACACTACTCACTCACCATAATGAGGTGTGATTTCTACACTATCCCATAACCAATTTTC
p.l 25 snp	(1)	CATTTGATGCTATCATGGGTTCTACTGCCATTACCATTTTCCAAACAACACTACTCACTCACCATAATGAGGTGTGATTTCTACACTATCCCATAACCAATTTTC
p.l 27 snp	(1)	CATTTGATGCTATCATGGGTTCTACTGCCATTACCATTTTCCAAACAACACTACTCACTCACCATAATGAGGTGTGATTTCTACACTATCCCATAACCAATTTTC
Consensus	(1)	CATTTGATGCTATCATGGGTTCTACTGCCATTACCATTTTCCAAACAACACTACTCACTCACCATAATGAGGTGTGATTTCTACACTATCCCATAACCAATTTTC
		101
p.l 22 snp	(101)	TTGTGCTTTGAAAGATAAATTTTGTGGCCAAAGGAGACTAAAAATTTGATGTTGGTTTATTTGGAAAAGGTTTATGCTGTTGGGCCATAGTGACTCCTACACAAGG
p.l 25 snp	(101)	TTGTGCTTTGAAAGATAAATTTTGTGGCCAAAGGAGACTAAAAATTTGATGTTGGTTTATTTGGAAACAGGTTTATGCTGTTGGGCCATAGTGACTCCTACACAAGG
p.l 27 snp	(101)	TTGTGCTTTGAAAGATAAATTTTGTGGCCAAAGGAGACTAAAAATTTGATGTTGGTTTATTTGGAAACAGGTTTATGCTGTTGGGCCATAGTGACTCCTACACAAGG
Consensus	(101)	TTGTGCTTTGAAAGATAAATTTTGTGGCCAAAGGAGACTAAAAATTTGATGTTGGTTTATTTGGAAACAGGTTTATGCTGTTGGGCCATAGTGACTCCTACACAAGG
		201
p.l 22 snp	(201)	GACAAAGCAGATGCAAGTGCATTCCTTACAATCAATTTTGGTGAAGGACTTATCCAAAGAAATGCCAAGTAAATTTCTGAAAGTGGTCTTTTAAACCTTACA
p.l 25 snp	(201)	GACAAAGCAGATGCAAGTGCATTCCTTACAATCAATTTTGGTGAAGGACTTATCCAAAGAAATGCCAAGTAAATTTCTGAAAGTGGTCTTTTAAACCTTACA
p.l 27 snp	(201)	GACAAAGCAGATGCAAGTGCATTCCTTACAATCAATTTTGGTGAAGGACTTATCCAAAGAAATGCCAAGTAAATTTCTGAAAGTGGTCTTTTAAACCTTACA
Consensus	(201)	GACAAAGCAGATGCAAGTGCATTCCTTACAATCAATTTTGGTGAAGGACTTATCCAAAGAAATGCCAAGTAAATTTCTGAAAGTGGTCTTTTAAACCTTACA
		301
p.l 22 snp	(301)	AGTAAACATTTTACATTCCTCACAATGACCCAAATGTGCTAACCTGAAATTAATGAAATTTGCGCAGATGTAGACATGGGTATTTCCATGTGGTGAACAATGACTAC
p.l 25 snp	(301)	AGTAAACATTTTACATTCCTCACAATGACCCAAATGTGCTAACCTGAAATTAATGAAATTTGCGCAGATGTAGACATGGGTATTTCCATGTGGTGAACAATGACTAC
p.l 27 snp	(301)	AGTAAACATTTTACATTCCTCACAATGACCCAAATGTGCTAACCTGAAATTAATGAAATTTGCGCAGATGTAGACATGGGTATTTCCATGTGGTGAACAATGACTAC
Consensus	(301)	AGTAAACATTTTACATTCCTCACAATGACCCAAATGTGCTAACCTGAAATTAATGAAATTTGCGCAGATGTAGACATGGGTATTTCCATGTGGTGAACAATGACTAC
		401
p.l 22 snp	(401)	ACTCACCTGGGAGATGTAATGCCCAITGGTGGAAAGTGTGATTCCTACCAITTAACAGTCAAGGCAATAAGATATCTCGCCCCCTAACCAACCCTTTTTCGGAAGAGGG
p.l 25 snp	(401)	ACTCACCTGGGAGATGTAATGCCCAITGGTGGAAAGTGTGATTCCTACCAITTAACAGTCAAGGCAATAAGATATTTGCGCCCCCTAACCAACCCTTTTTCGGAAGAGGG
p.l 27 snp	(401)	ACTCACCTGGGAGATGTAATGCCCAITGGTGGAAAGTGTGATTCCTACCAITTAACAGTCAAGGCAATAAGATATCTCGCCCCCTAACCAACCCTTTTTCGGAAGAGGG
Consensus	(401)	ACTCACCTGGGAGATGTAATGCCCAITGGTGGAAAGTGTGATTCCTACCAITTAACAGTCAAGGCAATAAGATATCTCGCCCCCTAACCAACCCTTTTTCGGAAGAGGG
		501
p.l 22 snp	(501)	TAGATACCATCTTATTTAGATACATGTAATGTGCGTTAGATTTGTTAACTAAATCGACTATTTAAGAGTAGATTTTGGACAGTTGCAACTAAATTTGGTTG
p.l 25 snp	(501)	TAGATACCATCTTATTTAGATACATGTAATGTGCGTTAGATTTGTTAACTAAATCGACTATTTAAGAGTAGATTTTGGACAGTTGCAACTAAATTTGGTTG
p.l 27 snp	(501)	TAGATACCATCTTATTTAGATACATGTAATGTGCGTTAGATTTGTTAACTAAATCGACTATTTAAGAGTAGATTTTGGACAGTTGCAACTAAATTTGGTTG
Consensus	(501)	TAGATACCATCTTATTTAGATACATGTAATGTGCGTTAGATTTGTTAACTAAATCGACTATTTAAGAGTAGATTTTGGACAGTTGCAACTAAATTTGGTTG
		601
p.l 22 snp	(601)	TTGCAGGTGACACATAGAGTTTCAGACCCTGGCCAGAT
p.l 25 snp	(601)	TTGCAGGTGACACATAGAGTTTCAGACCCTGGCCAGAT
p.l 27 snp	(601)	TTGCAGGTGACACATAGAGTTTCAGACCCTGGCCAGAT
Consensus	(601)	TTGCAGGTGACACATAGAGTTTCAGACCCTGGCCAGAT
		637

Figure 20: Alignement de séquences obtenues après séquençage de clones *F. vesca*, les amorces sont encadrées

Mauve : Exons

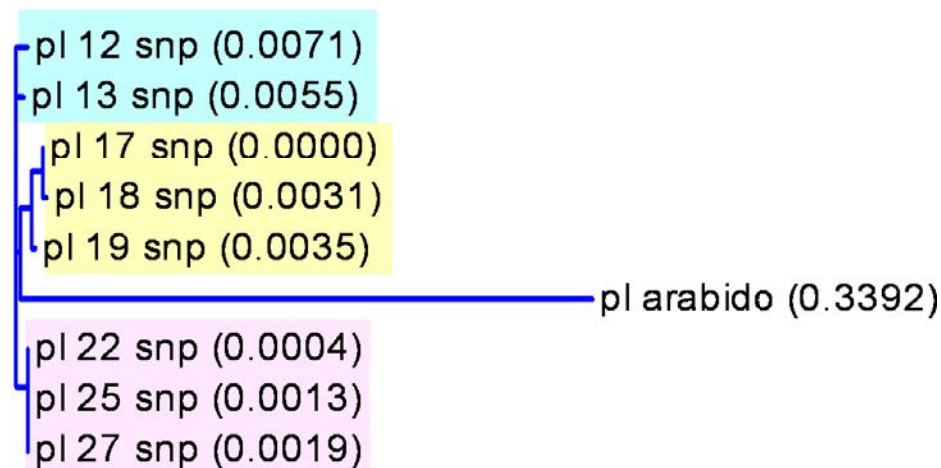


Figure 21: Arbre phylogénétique construit selon la méthode Neighbor Joining sur base du séquençage des 8 clones contenant un amplicon de PelB.

Séquence de référence : AT1G04680.1 (Pectate lyase d'Arabidopsis)

PL 17, 18 et 19 : Darselect PL 12, 13 : Mara des Bois PL 22, 25, 27 : *F. vesca*

Groupe 1 (rouge): reprenant les séquences du cultivar *F. vesca*

Groupe 2 (jaune): reprenant les séquences de l'espèce Darselect

Groupe 3 (bleu) : reprenant les séquences de l'espèce Mara des Bois

Les amplifications réalisées en vue d'un séquençage sur les clones sélectionnés a révélé la présence de deux bandes d'amplification pour certains clones. Sur base de la figure 17, nous avons sélectionné 8 clones ne montrant qu'une bande nette d'amplification à la taille attendue de 637 paires de bases afin de les séquençer. Nous n'avons pas pu déterminer la cause de la bande située entre 800 et 1000 paires de bases.

Nous avons aligné les séquences obtenues (Figure 18, 19 et 20) grâce au programme vectorNTI. De cet alignement, nous avons pu dégager des positions de SNP potentiels. On peut observer que les SNP se situent indifféremment dans les exons et les introns. Cet alignement de séquences nous a permis de réaliser un arbre phylogénétique à l'aide du programme vectorNTI (Figure 21), ainsi qu'un tableau récapitulatif des pourcentages d'homologie entre chaque séquence (Tableau 9).

	PL 12 SNP	PL 13 SNP	PL 17 SNP	PL 18 SNP	PL 19 SNP	PL 22 SNP	PL 25 SNP	PL 27 SNP
PL 12 SNP	100%	98,7%	97,5%	97,2%	97,8%	98,4%	98,3%	98,1%
PL 13 SNP		100%	97,2%	96,9%	97,5%	98,7%	98,4%	98,4%
PL 17 SNP			100%	99,7%	98,9%	97,5%	97,2%	97,2%
PL 18 SNP				100%	98,6%	97,2%	96,9%	96,9%
PL 19 SNP					100%	97,8%	97,8%	97,5%
PL 22 SNP						100%	99,7%	99,7%
PL 25 SNP							100%	99,7%
PL 27 SNP								100%

Tableau 9: Tableau reprenant les pourcentages d'homologie entre chaque séquence.

PL12 et 13 : Mara des Bois

PL17, 18, 19 : Darselect

PL 22, 25, 27 : *F.vesca*.

L'analyse de l'arbre phylogénétique (figure 21) réalisé à l'aide des séquences obtenues de clones des deux cultivars et de *F. vesca* selon la méthode Neighbor Joining permet d'observer trois groupes distincts. Ces trois groupes correspondent aux différents cultivars à partir desquels les séquences ont été obtenues. La réalisation d'un alignement de séquence de PelB peut donc nous permettre d'identifier le cultivar dont est issu une séquence. Il serait intéressant de parvenir à réaliser le même parallélisme selon l'approche Eco-TILLING.

L'analyse du tableau 9 nous révèle que les séquences de PelB des cultivars Mara des Bois et Darselect (respectivement en rouge et jaune) présentent un taux d'homologie plus faible que les séquences *F. vesca* (en bleu). Cette différence pourrait être en relation avec la polyploidie de *F. x ananassa*.

Les 8 clones séquencés ont également été analysés par Eco-TILLING (tableau 10), afin de corréler les SNP obtenus lors de l'alignement des séquences. Les sorties de l'électrophorèse capillaire se trouvent en annexe 2.

Combinaison hybridée	Position des SNP																				
					95	125				145		189	205		300						
13																					
12 + 13										145		189	205		300	323		345		430	480
17 + 13		70	79	90					131			189	205		300						
18 + 13		70	79	90				128	131		157	189	205		300	323	338				
19 + 13	60	70		90					131		157	189	205		300						
22 + 13		70			95		127			145		189	205		300				368		
25 + 13		70			95		127			145		189	205		300				368	388	465
27 + 13				90						145		189		260			338		368		410

Tableau 10: Synthèse des SNP obtenus après analyse Eco-TILLING de PelB sur les 8 clones séquencés.

PL12 et 13 : Mara des Bois PL17, 18, 19 : Darselect PL 22, 25, 27 : *F.vesca*

La comparaison du tableau 10 et des figures 18, 19 et 20 ne permet pas de trouver des SNP concordants. Cependant, le fait que certains SNP soient décalés d'une base pourrait être dû à la technique utilisée. Nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse et étayer ces résultats par l'analyse d'autres clones.

9. Discussion

Lors de cette première partie du mémoire, nous avons analysé via l'approche Eco-TILLING 24 clones en pool (analyse croisée) pour chacun des cultivars étudiés (Elsanta, Mara des Bois et Darselect) ainsi que pour *F. vesca*. Cette analyse croisée nous a permis de sélectionner des clones possédant une diversité de SNP potentielle élevée, 8 de ces clones ont été séquencés et analysés par l'approche Eco-TILLING (Figures 18, 19, 20. Tableau 9). Certains SNP ont pu être identifiés mais des analyses complémentaires seront nécessaires pour mettre en évidence les allèles restants. Le séquençage des clones disponibles sera poursuivi.

Les résultats obtenus dans la première partie de ce mémoire tendent à indiquer que les SNP localisés dans notre région amplifiée ne seraient pas aussi nombreux que prévu lors de l'analyse des PL-like chez *A. thaliana*. Le nombre de locus PL-like chez *A. thaliana* est de 27. *A. thaliana* étant diploïde et *F. X ananassa* étant octoploïde, nous nous attendions à trouver un grand nombre d'allèles possibles chez un même individu.

Constatant ce polymorphisme modéré, nous avons envisagé l'analyse directe du polymorphisme de l'ensemble des PelB sur produit PCR obtenu à partir d'ADNg .

10. Analyse de PelB des 13 variétés

Nous sommes alors passés de l'analyse des clones à celle des variétés. Nous avons ainsi réalisé une extraction d'ADNg à l'aide d'un kit d'extraction Phytopass (DNAlis) sur un premier prélèvement, suivie d'une amplification PCR de PelB à l'aide des amorces PrPle5-819 et FrPLe3-2. Ce premier prélèvement contenait 13 cultivars (Tableau 11). L'analyse par spectrophotométrie des échantillons d'ADN obtenus par la méthode Phytopass, ne permet pas de vérifier la qualité de l'ADN, car même des ADN de mauvaise qualité au spectrophotomètre permettent tout de même d'obtenir une amplification PCR. Nous avons dès lors réalisé une amplification PCR d'un fragment du gène PelB sur ces échantillons (Figure 22).

1	Florence
2	Manille
3	Arosa
4	Isaura
5	Yamaska
6	Matis
7	Divine
8	Madeleine
9	Clery
10	Thulana
11	Thuchampion
12	Elsanta
13	Darselect

Tableau 11: Tableau récapitulatif des différents cultivars

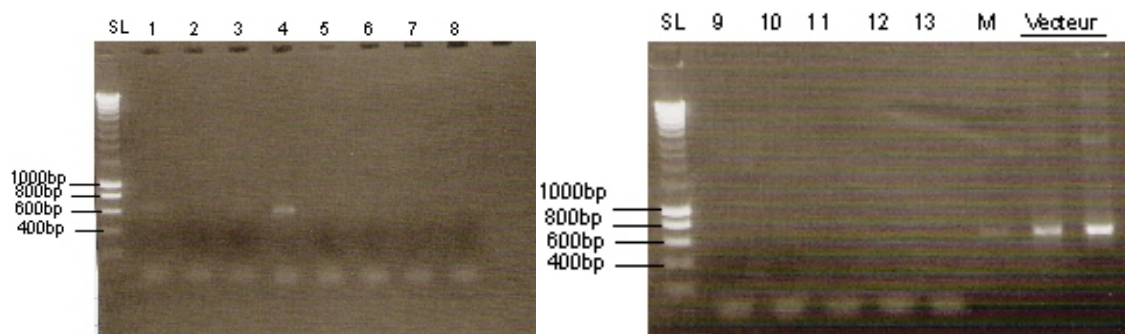


Figure 22: Electrophorèse en gel après une amplification PCR de PelB sur ADNg. Cette amplification permet d'obtenir des amplicons de PL en vue de l'hybridation pour l'analyse Eco-TILLING. Les numéros correspondent au tableau 11. Les contrôles positifs sont Mara des Bois (M) et la miniprep de vecteur obtenu lors de précédentes analyses.

Suite à cette électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 22), nous avons pu observer une amplification de PelB pour les cultivars 1, 3 et 4, c'est à dire Florence, Arosa et Isaura. Lors de cette amplification PCR, nous avons également réalisé deux contrôles positifs : Mara des Bois obtenu par extraction CTAB ainsi que deux échantillons de miniprep de vecteur PelB. Ces deux contrôles positifs montrant une amplification, nous en avons conclu que le problème d'absence d'amplification de PelB pour certains cultivars devait être dû à des substances contaminantes toujours présentes après l'extraction d'ADNg.

Nous avons réalisé une analyse Eco-TILLING sur les produits PCR des 3 cultivars ayant montré une amplification ainsi que sur le produit PCR de Mara des Bois obtenu à partir d'ADNg purifié par CTAB, ce dernier ADN étant notre contrôle positif (Tableau 12). Les sorties de l'électrophorèse capillaire se trouvent en annexe 3.

Florence		157		
Florence + ref	128	157		
Arosa +ref	128			
Isaura		157		
Isaura + ref	128	157		
Mara	128	157	186	
Mara + ref	128	157		191

Tableau 12: Synthèse des SNP obtenus lors de l'électrophorèse capillaire des produits de digestion par Endo1 de la PCR de PelB sur ADNg obtenus par la méthode Phytopass. L'échantillon Arosa n'a pas permis d'identifier de SNP en raison d'un signal trop faible. La référence était une miniprep du clone H12 de *F. vesca*.

L'analyse du tableau 12 nous a permis de révéler au moins une incohérence dans les résultats. L'analyse de Mara des Bois hybridé sur lui-même révèle un SNP en position 186. Dès lors, quand on hybride Mara des Bois avec une référence, on devrait obtenir ce pic de digestion accompagné éventuellement d'autres. Les signaux des cultivars étant trop faibles, nous n'avons peut être pas pu détecter tous les SNP potentiels.

Nous avons alors eu recours à la méthode d'extraction d'ADNg avec le kit GenElute afin d'améliorer l'amplification de PelB lors de la PCR, ce kit ayant montré son efficacité lors de la thèse de M. Draye. Un test préliminaire d'amplification du fragment PelB par PCR a été réalisé sur 4 variétés prises au hasard : l'amplification sur PelB a fonctionné pour Isaura et Yamaska (2/4)

alors que le contrôle positif tubuline n'avait, lui, montré aucune amplification sur les 4 ADN (sans doute un problème de mélange) (Figure 23).

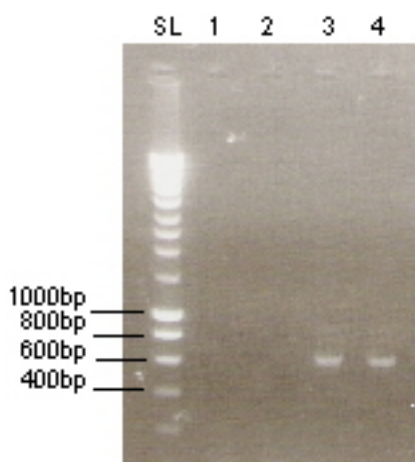


Figure 23: Electrophorèse en gel après une amplification PCR. Cette amplification permet d'obtenir des amplicons de PLB en vue de l'hybridation pour l'analyse Eco-TILLING. Les échantillons utilisés pour la réalisation de cette PCR ont été obtenus grâce à un kit GenElute.

(1): Elsanta (2): Darselect (3): Isaura (4): Yamaska

Suite à ces résultats mitigés, n'obtenant que 50% des amplifications attendues, nous avons refait une extraction d'ADNg grâce au même kit GenElute pour les 9 autres cultivars afin de vérifier si nous pouvions obtenir une amplification pour d'autres cultivars (Figure 24).

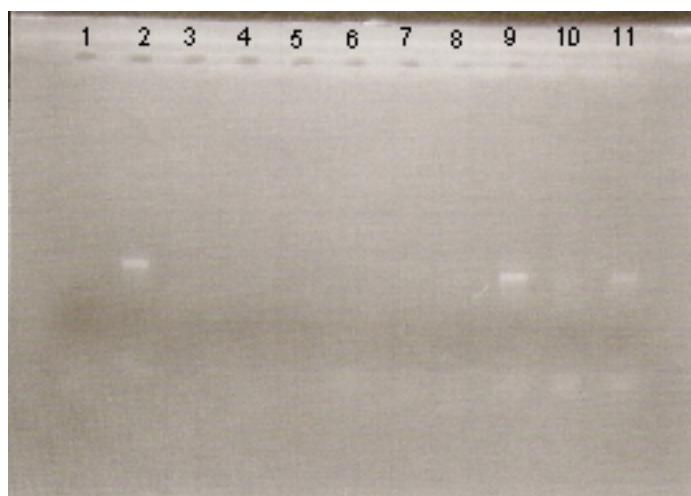


Figure 24: Electrophorèse en gel d'agarose après une amplification PCR. Cette amplification permet d'obtenir des amplicons de PLB en vue de l'hybridation pour l'analyse Eco-TILLING. Les échantillons utilisés pour la réalisation de cette PCR ont été obtenus grâce à un kit GenElute.

(1) Florence (2) Madeleine (3) Arosa (4) Clery (5) Thuchampion

(6) Matis (7) Divine (8) Thulana (9) Darselect (10) Elsanta

(11) Manille

N'ayant obtenu une amplification que pour certains cultivars, nous avons tout de même réalisé une analyse Eco-TILLING (les échantillons ont été hybridés sur eux-mêmes) pour les variétés dont nous possédions un produit PCR, c'est à dire Isaura, Yamaska (Figure 23), Darselect, Elsanta,

Manille et Madeleine (Figure 24). La synthèse de ces résultats est reprise dans le tableau 13. Les sorties de l'électrophorèse capillaire se trouvent en annexe 4.

Isaura					128	157			592			
Darselect	64		99			157	298	591		596		
Yamaska	64		99		128	157	298		592			
Elsanta	64	86	99	109		157						
Manille	64	86	99	109		157	298	591		596		
Madeleine + Darselect	64	86	99	109		157	298		592	596		623
Madeleine + Elsanta	64	86	99	109		157	298	591		596		
Madeleine + Manille	64	86	99	109			298		592		597	623

Tableau 13: Synthèse des SNP obtenus lors de l'électrophorèse capillaire des produits de digestion par EndoI de la PCR de PelB sur ADNg obtenu par le kit GenElute.

Une observation rapide du tableau, nous fournit l'indication de positions de SNP assez fréquents : 64, 86, 99, 109, 157, 298, 591 et 596.

Cependant, certains SNP sont contestables.

- Si l'hybridation de Darselect met évidence un SNP en position 591, ce SNP devrait être présent quand on réalise une hybridation entre Darselect et Madeleine. En théorie, l'électrophorèse en capillaire est précise à 0,2 bases près. Cependant, on peut imaginer qu'il y ait eu un décalage d'une base lors de l'analyse ou bien que la Taq polymérase ait rajouté un A en cours d'amplification. Il faudrait réitérer l'analyse Eco-TILLING afin d'être sûr que ces SNP soient différents.
- Si l'hybridation de Manille met évidence un SNP en position 157, ce SNP devrait être présent quand on réalise une hybridation entre Manille et Madeleine. Or nous n'observons pas de pic de digestion pour cette taille.

D'autres analyses sont nécessaires afin d'identifier si ces SNP sont spécifiques. En effet, les doubles pics 591/596, 592/596 ou 591/597 se retrouvent chez presque tous les cultivars. Il se pourrait que ces doubles pics soient des artefacts ou que les pics 591/592, d'une part et 596/597 d'autre part correspondent en fait au même SNP

C'est pourquoi nous avons tenté de corroborer ces résultats en effectuant la même analyse sur des échantillons d'ADNg de pureté plus grande permettant une amplification de PelB pour tous les cultivars. Nous avons ainsi extrait l'ADNg selon la méthode CTAB déjà utilisée précédemment, mais cette extraction a été suivie d'une élimination des polysaccharides à l'aide de la résine du kit d'extraction Phytopure (Figure 25)

Cette extraction ayant été réalisée sur un nouveau prélèvement faute de matériel suffisant restant du premier prélèvement, nous avons malencontreusement déposé les ADN dans un ordre différent sur les gels d'agarose. Pour les analyses ultérieures, la numérotation utilisée correspondra donc au tableau 14.

		A 260 nm	A 280 nm	Rapport A 260/ A 280	cc µg/µl
1	Thuchampion	3,1	1,5	2,0	7,8
2	Thulana	3,1	1,8	1,7	7,8
3	Madeleine	1,3	0,8	1,7	3,3
4	Elsanta	3,1	1,6	2,0	7,8

5	Divine	0,9	0,5	1,8	2,3
6	Matis	0,1	0,1	1,3	0,2
7	Yamaska	2,0	1,1	1,8	5,0
8	Darselect	0,1	0,1	1,5	0,2
9	Arosa	0,6	0,4	1,6	1,5
10	Isaura	3,1	1,6	1,9	7,8
11	<i>F. vesca</i>	0,6	0,3	1,8	1,4
12	Clery	0,1	0,1	1,6	0,3
13	Manille	2,5	1,3	1,9	6,3
14	Florence	0,1	0,0	1,4	0,2

Tableau 14: Résultats de l'analyse en spectrophotométrie

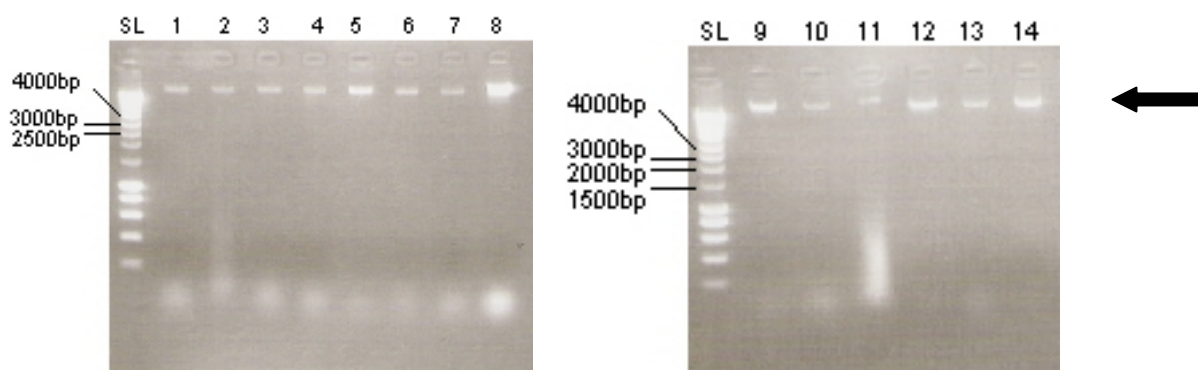


Figure 25 : Electrophorèse en gel d'agarose permettant d'observer les ADNg purifiés (100 ng/µl) (Les numéros correspondent aux variétés du tableau 14)

Les amplifications PCR sur ces nouveaux échantillons d'ADNg purifiés ne nous ont toujours pas permis d'obtenir une amplification pour chaque cultivar. Nous avons alors testé différentes conditions d'amplification PCR, en faisant varier les températures, temps d'élongation et nombre de cycles, afin d'obtenir un amplicon de pectate lyase. Suite à ces différents tests, nous avons réussi à amplifier le gène *PelB* pour certaines variétés (Figure 26). Ces variétés ont été analysées selon la démarche Eco-TILLING. Les sorties de l'électrophorèse capillaire se trouvent en annexe 5.

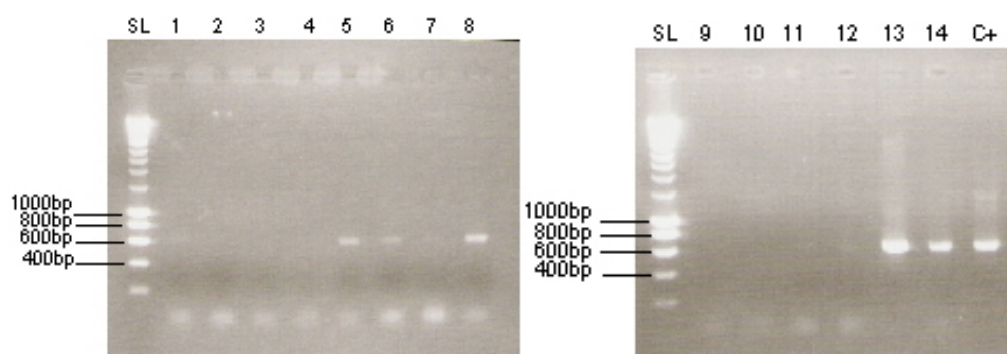


Figure 26: Electrophorèse en gel d'agarose après une amplification PCR sur ADNg. Cette amplification permet d'obtenir des amplicons de PL en vue de l'hybridation pour l'analyse Eco-TILLING (les numéros correspondent aux variétés du tableau 14)

Florence					157				
Elsanta			99		157				
Divine					157				
Matis		69		128	157				
Darselect	64		99	128	157		298		592
Arosa			99	128	157			507	592
Clery					157				
Mara des Bois			99	128	157	282			

Tableau 15: Synthèse des SNP obtenus lors de l'électrophorèse capillaire des produits de digestion par EndoI de la PCR de PelB sur ADNg de variétés de fraise.

Le signal était tellement faible pour le cultivar Manille que nous n'avons pu identifier de SNP. Certains SNP pourraient être des faux positifs puisque le signal était très faible pour tous les échantillons (SNP Arosa 128, Arosa 99, Darselect 298, Matis 128, Mara des Bois 99, Elsanta 99, Elsanta 157). Cependant, comme lors des précédentes analyses, nous avons déjà pu identifier des SNP à ces positions, nous les avons donc considérés comme SNP potentiels.

En analysant le tableau 15, nous avons également pu observer que les différents cultivars semblent être caractérisés par une combinaison spécifique de SNP, excepté les cultivars Florence, Divine et Clery qui sembleraient être homozygotes à l'exception de la position 157. Il pourrait être possible d'effectuer un profil de présence de SNP caractéristique pour chaque cultivar en hybridant les cultivars avec une référence dont la séquence serait bien caractérisée. Cependant, les résultats ne concordent pas pour tous les SNP avec les analyses précédentes (Tableaux 12 et 13).

N'obtenant pas d'amplification efficace pour chacune des variétés cultivées, nous avons décidé de construire de nouvelles amorces plus spécifiques de chaque forme de pectate lyase, PelA et PelB, ainsi qu'une paire d'amorces dégénérées permettant l'amplification simultanée de ces deux formes (Figures 27, 28 et 29).

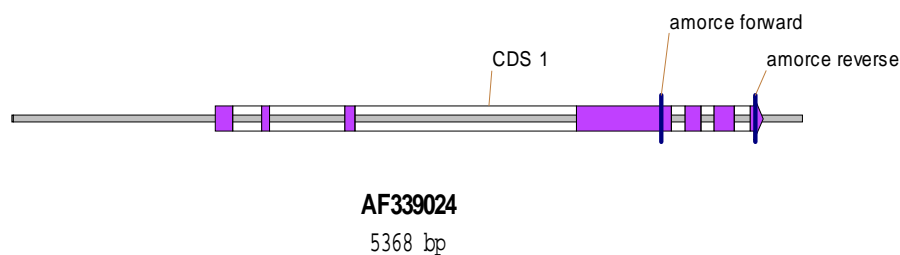


Figure 27: Représentation schématique de PIB. L'amorce forward ainsi que l'amorce reverse dégénérée A/B sont indiqués par des traits bleus verticaux.

Mauve : Exons Rectangle transparent : intron

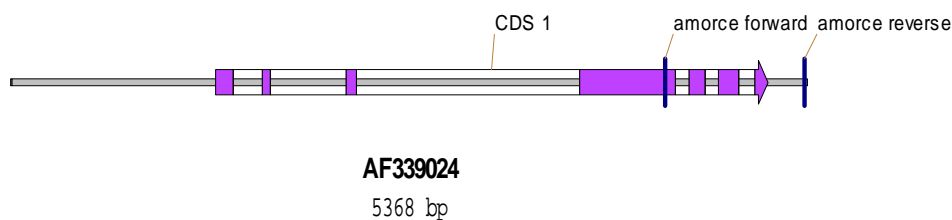
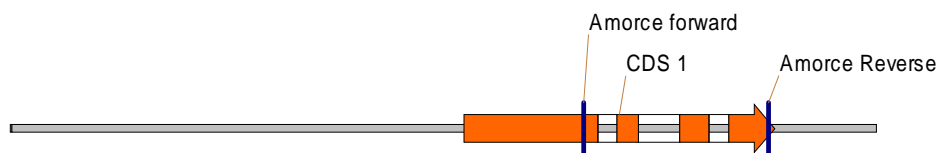


Figure 28: Représentation schématique de PIB. L'amorce forward ainsi que l'amorce reverse B sont indiqués par des traits bleus verticaux. L'amorce reverse se situe dans le 3'UTR.

Mauve : Exons Rectangle transparent : intron



AF339025

4143 bp

Figure 29 : Représentation schématique de PIA On peut observer l'amorce forward ainsi que l'amorce reverse spécifique PIA

11. Analyse de PelA/B des 13 variétés

Les amorces spécifiques de pectate lyase A et B n'ont pas permis une amplification lors de la PCR. Nous avons cependant obtenu une amplification grâce à la paire d'amorces dégénérées PelA/B pour certains cultivars : Thuchampion, Thulana, Elsanta, Divine, Isaura, Clery, Manille et Mara des Bois (Figure 30). Nous avons hybridé ces échantillons sur eux-mêmes pour ensuite les analyser selon l'approche Eco-TILLING. Lors de l'analyse en électrophorèse capillaire, seules quelques variétés ont été analysables, les signaux des autres cultivars étant trop faibles (Tableau 16). Les sorties de l'électrophorèse capillaire se trouvent en annexe 6.

Elsanta			176
Divine	56		176
Clery	56	58	
Manille	56	58	176
Isaura	56	58	

Tableau 16: Synthèse des SNP obtenus lors de l'électrophorèse capillaire des produits de digestion par EndoI de la PCR de PelA/B sur ADNg .

L'analyse du tableau 16 nous révèle des SNP discutables. Nous n'avons jamais obtenu de produits de digestion de PelB correspondant à ceux de ce tableau. Or nous devrions retrouver des produits de digestion comparables puisque les amorces permettent l'amplification de PelB. Il faudrait pouvoir comparer avec des SNP de PelA, cependant nous n'avons pas su obtenir d'amplicon pour cette isoforme.

Nous n'avons pas pu déterminer pourquoi nous avons obtenu une amplification grâce aux amorces dégénérées PelA/B alors que les deux paires d'amorces spécifiques n'ont pas permis d'amplification. Il pourrait y avoir plusieurs raisons. Premièrement, un SNP situé dans la zone d'hybridation de l'amorce spécifique pourrait empêcher l'amplification. Mais comment se fait-il que nous n'observions aucune amplification pour aucun cultivar ? Ensuite, l'amplification observée grâce aux amorces dégénérées pourrait être due à l'amplification de PelC. Cette hypothèse ne peut être vérifiée, car aucune séquence de PelC n'est disponible à l'heure actuelle.

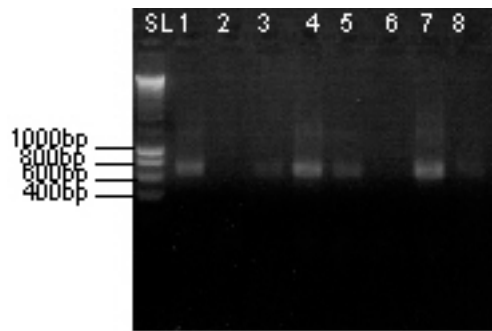


Figure 30 : Electrophorèse en gel d'agarose suite à une amplification PCR PelA/B à partir d'ADNg.

(1) : Thuchampion (2) : Thulana(3) : Elsanta (4): Divine
 (5): Isaura (6): Clery (7): Manille (8): Mara des Bois

12. Discussion pour les 13 variétés

L'analyse comparée des différents résultats obtenus (Tableaux 12, 13 et 15) nous permet d'identifier des SNP potentiels pour PelB. Cependant, les problèmes d'obtention d'un ADNg nous permettant l'amplification de PelB ne nous ont pas permis de vérifier la reproductibilité de ces résultats.

Arosa (11)					99			128	157							507			592					
Arosa +ref (8)								128																

Clery (11)									157														
------------	--	--	--	--	--	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Darselect (11)	64				99			128	157							298			592				
Darselect (9)	64				99				157							298			591			596	

Divine (11)									157														
-------------	--	--	--	--	--	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Elsanta (11)					99				157														
Elsanta (9)	64		86		99	109			157														

Florence (11)									157														
Florence (8)									157														
Florence + ref (8)								128	157														

Isaura (8)									157														
Isaura (9)								128	157													592	

Isaura + ref (8)							128	157											
Madeleine + Darselect (9)	64		86	98	99	109		157					298			592	596	623	
Madeleine + Elsanta (9)	64		86		99	109		157							591		596		
Madeleine + Manille (9)	64		86		99	109							298		591			597	623
Manille (9)	64		86		99	109		157					298		591		596		
Mara (8)							128	157	186										
Mara + ref (8)							128	157		191									
Mara des Bois (11)					99		128	157			282								
Matis (11)		69					128	157											
Yamaska (9)	64				99			157					298			592			

Tableau 17: Tableau de synthèse reprenant l'ensemble des résultats des tableaux 8, 9 et 11 (le numéro entre parenthèses correspond au numéro du tableau)

En observant ce tableau, on peut envisager des profils de SNP caractéristiques de certains cultivars. Malheureusement, ces résultats ne sont pas à chaque fois reproductibles et l'analyse du tableau fait apparaître certaines anomalies. Par exemple, le SNP 99 d'Arosa disparaît quand l'hybridation est réalisée avec la référence. Ce problème se rencontre pour d'autres SNP également. La qualité de l'ADNg ou l'amplification PCR pourraient être en cause puisque nous n'avons jamais obtenu de signaux d'amplification puissants pour les ADN que nous allions hybrider.

13. Dernières analyses Eco-TILLING de PelB sur 12 cultivars

Dans la dernière semaine précédent la remise de ce travail, nous avons pu obtenir une version modifiée du kit Phytopass précédemment utilisé. Le tampon d'extraction a été modifié pour permettre l'isolement d'acide nucléiques chez des plantes particulièrement récalcitrantes telles la vigne ou le fraisier. Nous avons dès lors réalisé une dernière série de tests sur 12 variétés de fraisier prélevées à l'aide du Phytopass et dont l'ADN a été purifié avec le nouveau tampon KajiP suivi d'une précipitation à l'acétate de sodium, puis d'une précipitation à l'isopropanol. Le culot ainsi obtenu est lavé à l'éthanol et, après séchage, est resuspendu dans 50 µl d'eau désionisée. Pour pouvoir être utilisé en PCR, cette solution est encore diluée 100X dans de l'eau désionisée juste avant utilisation et introduite dans la réaction PCR (1/10^{ème} du volume final). Les 12 ADN obtenus ont été testés en PCR avec diverses combinaisons d'amorces. Un contrôle négatif a également été réalisé lors de chaque amplification. La figure 31 reprend l'ensemble des résultats obtenus.

Le premier test a été réalisé avec la paire d'amorce contrôle tubuline. Après 35 cycles à 55°C, on peut observer que l'ensemble des 12 ADN purifié avec le tampon KajiP/acétate donne un signal d'amplification clairement détectable sur agarose 1%. Nous avons alors testé l'amplification de 4 combinaisons d'amorces (voir figure 31) permettant respectivement l'amplification de :

- Pectate lyase B : Pl819F et Ple3-2 (paire d'amorce utilisée pour le clonage des PelB)
- Pectate lyase A : PLABF et PLAR (amplification spécifique de PelA)
- Pectate lyase B : PLABF et PLBR (amplification spécifique de PelB)
- Pectate lyase AB : PLABF et PLABR (amplification simultanée de PelA et PelB)

Comme on le voit sur la figure 27, l'amplification à l'aide de ces 4 paires d'amorces dans des conditions standard (10 pm de chaque amorce pour un volume réactionnel de 50 µl) donne de bons résultats pour les 12 ADNg. Le contrôle négatif quant à lui ne montre pas de produit d'amplification. On observe clairement une efficacité d'amplification similaire pour le couple spécifique PLABF/PLAR et PLABF/PLBR. Le couple PLABF/PLABF quand a lui montre une efficacité d'amplification supérieure. Ces amorces dégénérées permettent en effet l'amplification simultanée de PelA et PelB. Aucune séquence de PLC de fraise n'étant disponible dans les banques de données publiques (NCBI), il est également possible que celle-ci soit également amplifiée par la paire d'amorces PLABF/PLABF, expliquant de ce fait la forte amplification observée.

Ces tests ont été réalisés avec des amorces non marquées. Cependant, afin de pouvoir les analyser selon l'approche Eco-TILLING, nos produits doivent posséder, au moins à une de leur extrémité, un fluorochrome. Nous disposons de l'amorce PL819F marquée avec le fluorochrome WellRed D2. Cette amorces nous a permis de générer des produits d'amplification marqué pour le couple PL819F/ Ple3-2 (voir figure 31). Le fluorochrome WellRed D2 ayant une faible énergie d'émission, une grande quantité de produit PCR a dès lors été nécessaire pour les analyses ultérieures.

En ce qui concerne les 3 autres couples d'amorces, nous ne disposons plus de suffisamment de temps que pour commander une amorce marquée (idéalement l'amorce PLABF puisque celle-ci est commune au trois combinaisons). Nous avons cependant décidé d'ajouter une séquence adaptatrice à l'extrémité de cette amorce afin de pouvoir tenter le marquage universel de nos produits PCR tel que décrit dans l'article de Schuelke (2000). La figure 32 décrit le principe de cette amplification particulière. Ce protocole fait intervenir 3 amorces : deux amorces spécifiques de la séquence à amplifier et une amorce dite « universelle » identique à une séquence adjointe à l'extrémité 5' d'une des deux amorces. L'amorce portant cette séquence est introduite en faible quantité dans le mélange PCR. Lors des premiers cycles d'amplification, seul le couple d'amorce spécifique est utilisé. Lorsque l'amorce pourtant l'adaptateur est épuisé, les premiers produits PCR générés, possédant cette séquence, pourront être amplifiés à l'aide de l'amorce spécifique restante (ici la 3') et l'amorce marquée. Cette étape permettant dès lors le marquage des fragments amplifiés. Dans ce cas, une seule amorce marquée pour être utilisée pour le marquage de plusieurs produits d'amplification différent.

Comme on peut le voir sur la figure 31, cette méthode délicate ne nous a pas permis d'amplifier PelA ni PelB, dans les conditions décrites par Schuelke. Seules les amorces permettant l'amplification conjointe de PelA et PelB semblent fournir un signal, bien que celui-ci soit comparativement plus faible à celui obtenu dans les conditions standard d'amplification (2 amorces non marquées).

Nous avons dès lors uniquement poursuivi les analyses via l'approche Eco-TILLING sur le produits d'amplification obtenu avec le couple d'amorce PL819F (WellRedD2)/ Ple3-2. Les 12 produits d'amplification ont été dénaturés et hybridés sur eux même (pas de référence introduite) puis digérés à l'aide de l'endonucléase Endo 1. Les figures 33 à 36 présentent les sorties obtenues pour les 12 variétés. On peut observer sur ces sorties des profils de pics de digestions clairement identifiables. En comparant les variétés, on peut observer certains pics présents systématiquement tels les pics de taille 128 et 157 ainsi que d'autres variables tel le pic 298 présent chez la variété Thuchampion, mais absent chez Arosa et Clery. On peut également noter qu'en plus des pics principaux, on retrouve des pics, reproductibles dans leur taille, mais variable dans leur intensité voire, absence/présence. La fraise étant octoploïde, il est possible que seuls certains des allèles présent au sein d'une variété présente un SNP par rapport aux autres séquences, dès lors seule une petite partie des séquences sera digérée, générant un signal de faible intensité. Il se peut également qu'il s'agisse de pics provenant d'amplifications parasites.

Deux tests peuvent être réalisés : premièrement, faire migrer les produits d'amplification hybridés mais non digérés. La figure 31 ne met en évidence aucun de ces pics. Il s'agit de pics bien de pics correspondant à des SNPs. Ensuite, il nous est possible de comparer ces résultats Eco-TILLING avec les résultats obtenus lors du séquençage. On constate dès à présent que de nombreux SNPs mis en évidence sur l'alignement (figure 30) sont concordant avec le pic observé en Eco-TILLING. Il est important de noter que l'ajout de fluorochrome à l'extrémité de l'amorce 5' conduit à un décalage entre la taille estimée du fragments et sa taille réelle.

Ce décalage est variable. Ainsi, les pics de 129, 150 et 155 bp ne sont pas confirmés sur les bases de séquences obtenues (sur l'alignement et l'absence de séquences). En effet, si un pic n'est observable que si le pic ne sera pas observé chez *Fragaria vesca* (d'introduire un ADN de PCR ou lors de la digestion).

TUBULINE
PLABF-PLABR
PLABF-PLBR
PLABF-PLAR
PI819F*-Ple3-2
PI819F-Ple3-2
PLABF-PLABR
PLABF-PLBR
PLABF-PLAR

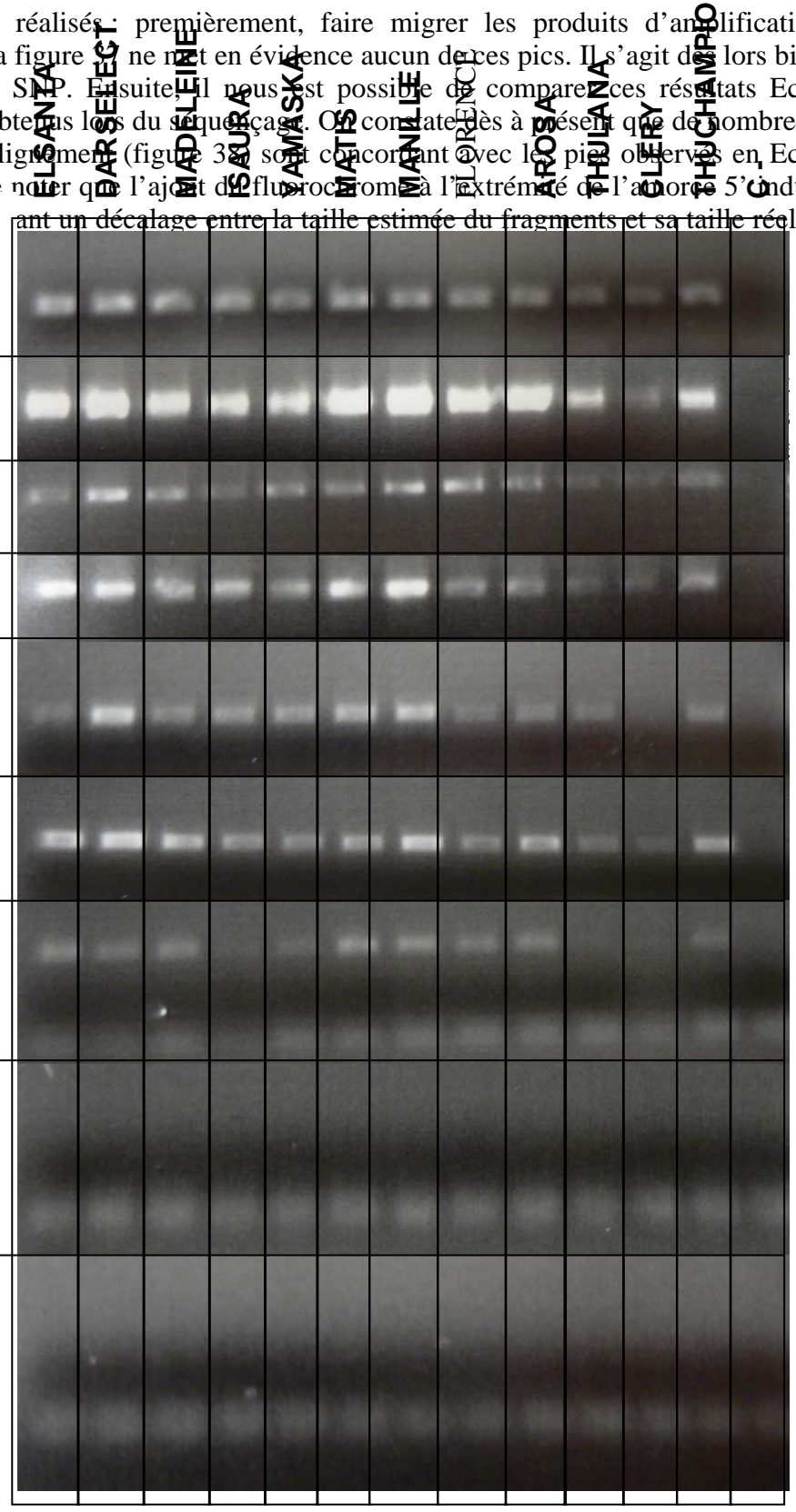


Figure 31 : Résultats d'amplification de 4 couples d'amorce PL sur ADNg purifié à l'aide du protocole Phytopass avec tampon KajiP et précipitation à l'acétate de sodium.

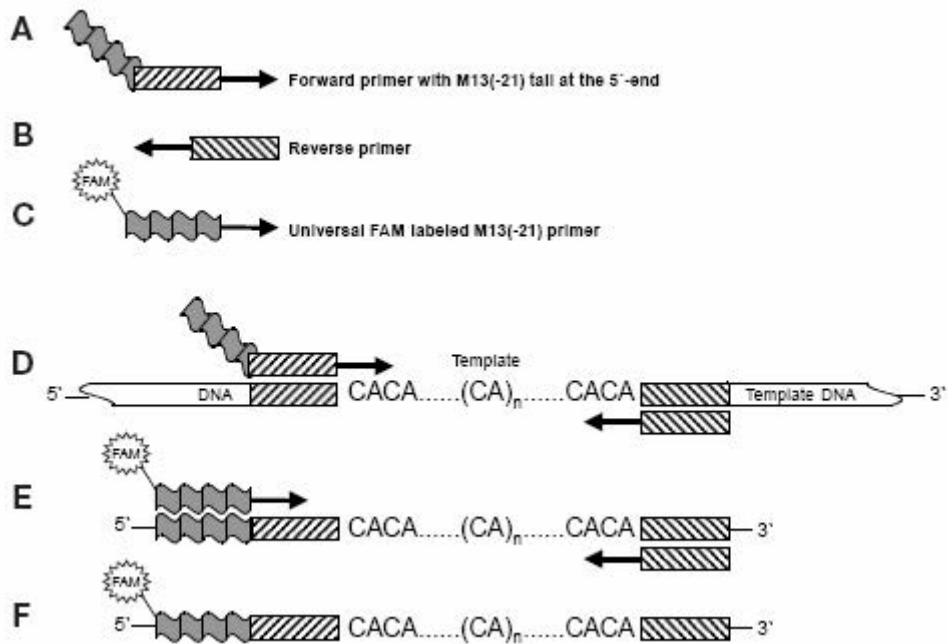


Figure 32 : principe du marquage universel de produits PCR (Schuelke, 2000)

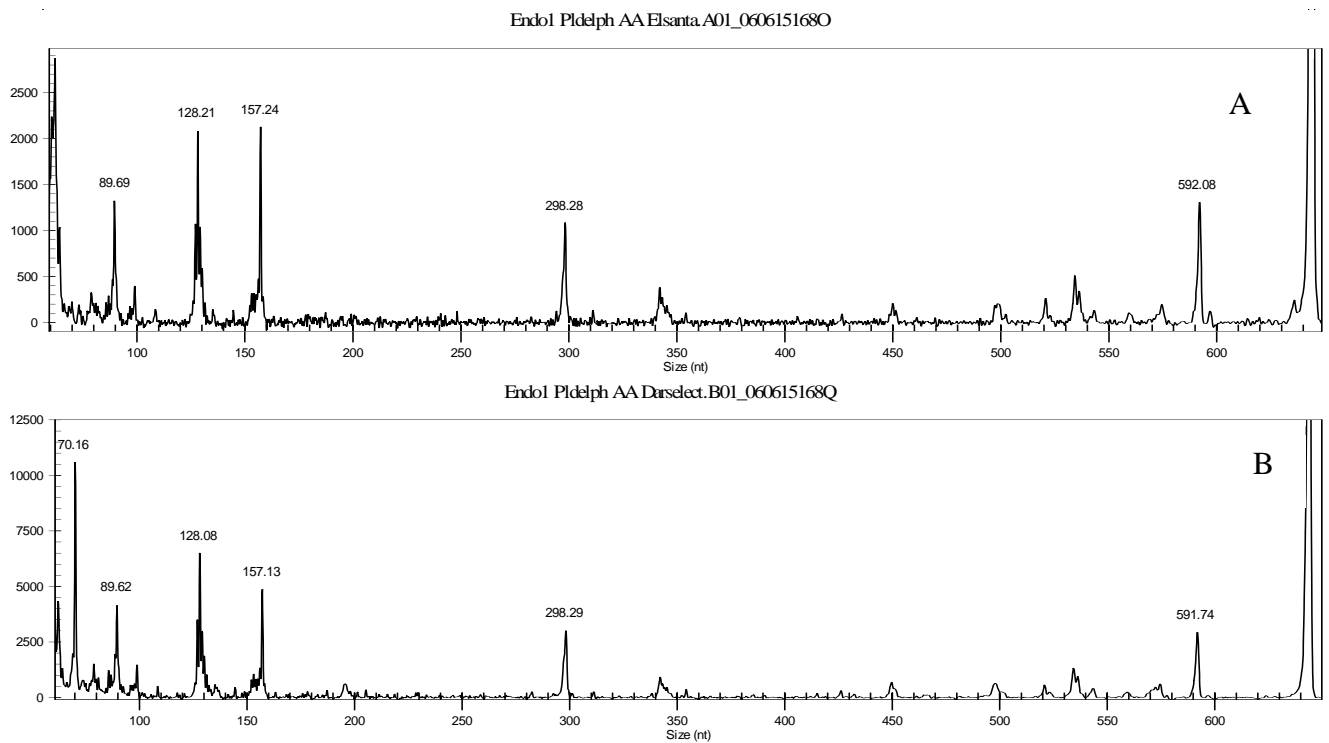
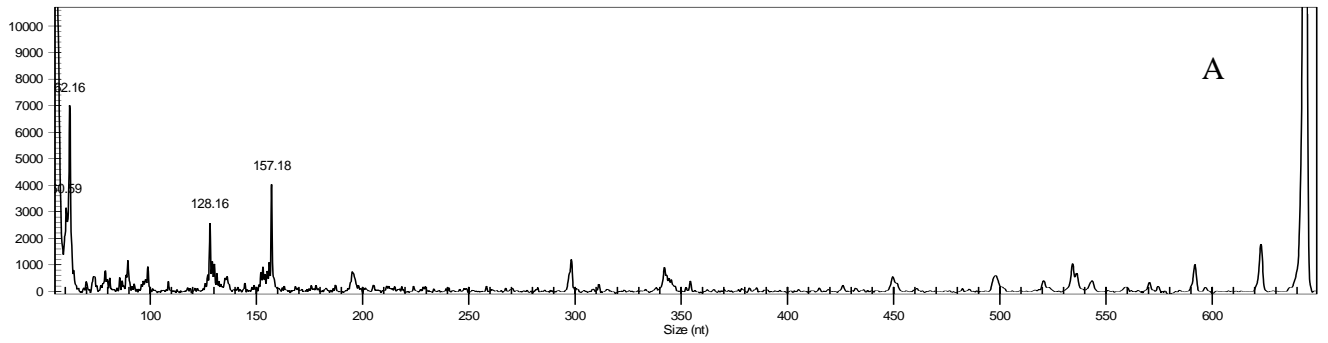
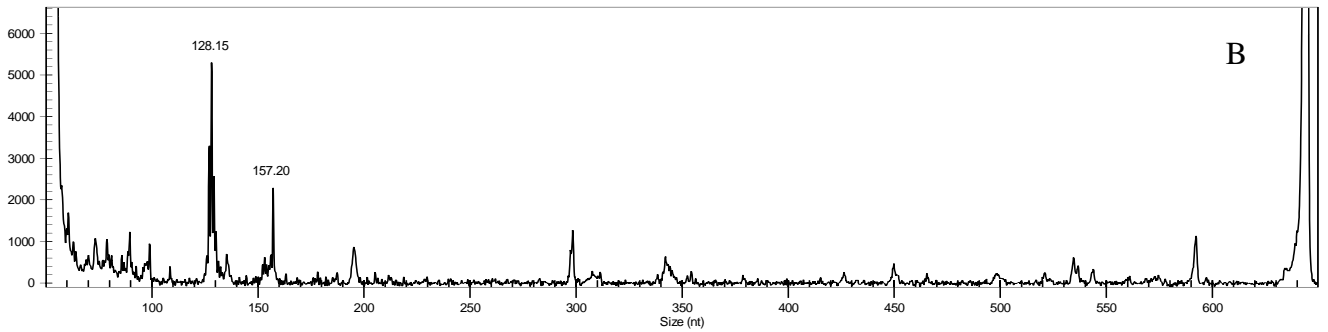


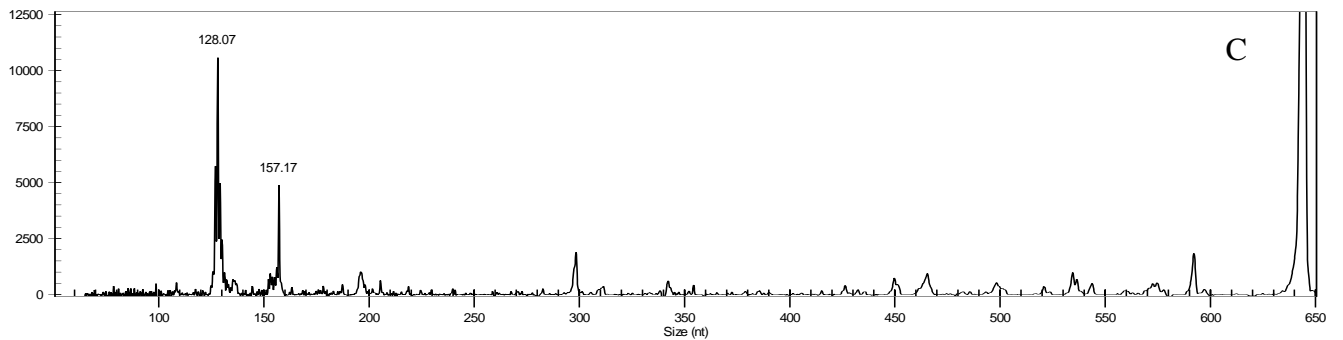
Figure 33 : Sortie de l' électrophorèse capillaire après analyse Eco-Tilling sur des produits PCR à l'aide des amorces FrPLE5-819 (WellRedD2) et Ple3-2 sur ADNg extrait avec le kit Phytopass KajiP. (A) : Elsanta (B) : Darselect



Endo1 Pldelph AA Isaura.D01_060615168T



Endo1 Pldelph AA Yamaska.E01_060615168U



Endo1 Pldelph AA Matis.F01_060615168V

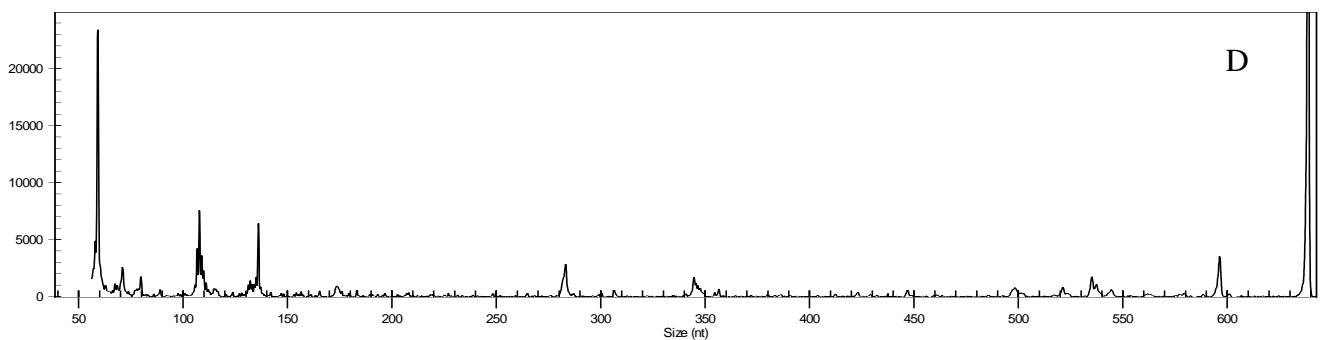


Figure 34 : Sortie du électrophorèse capillaire après analyse Eco-Tilling sur des produits PCR à l'aide des amorces FrPLE5-819 (WellRedD2) et Ple3-2 sur ADNg extrait avec le kit Phytopass KajiP.

(A) : Madeleine

(B) : Isaura (C): Yamaska

(D): Matis

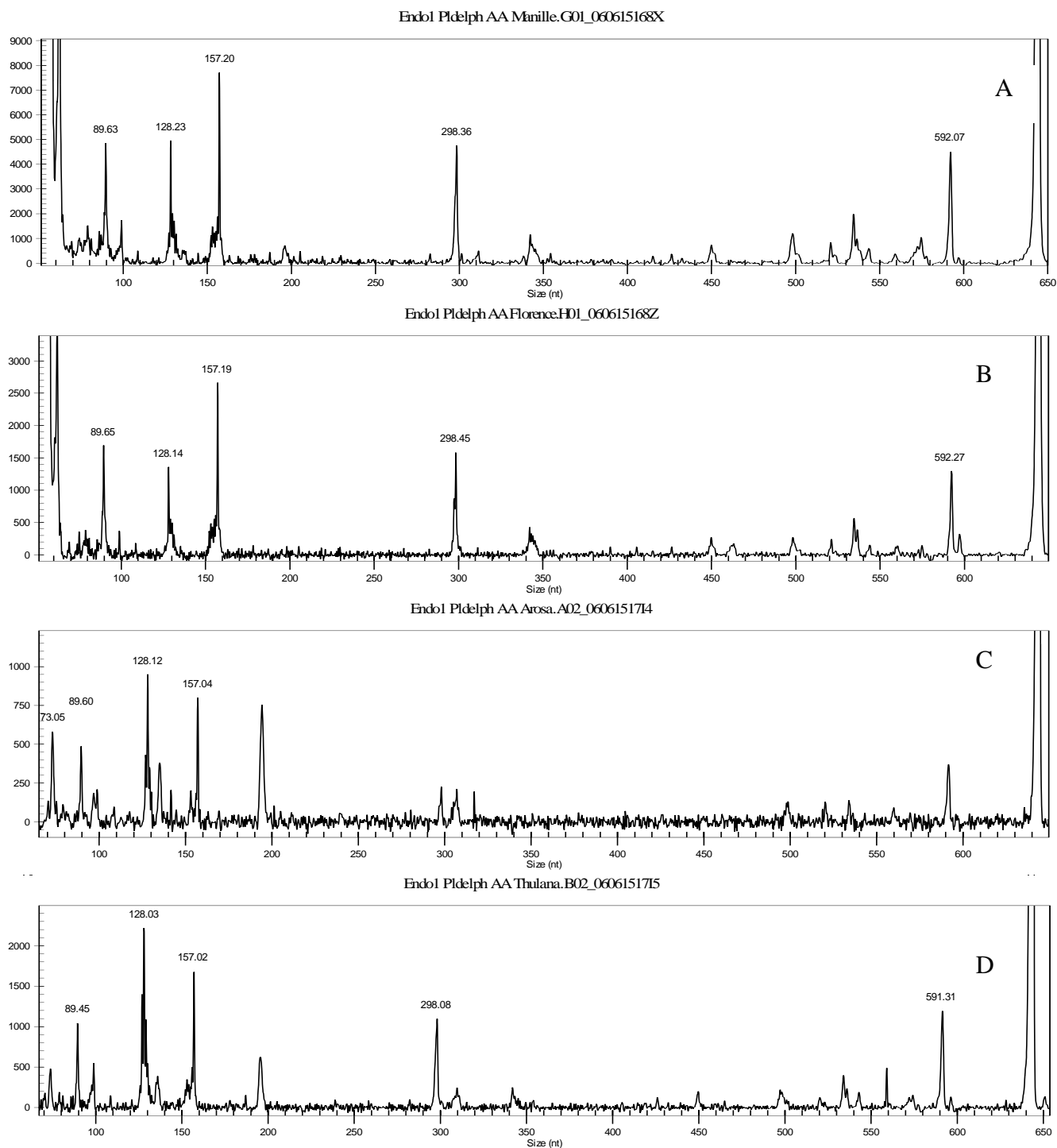


Figure 35 : Sortie de l' électrophorèse capillaire après analyse Eco-Tilling sur des produits PCR à l'aide des amorces FrPL5-819 (WellRedD2) et Ple3-2 sur ADNg extrait avec le kit Phytopass KajiP.

(A) : Manille (B) : Florence

(C) : Arosa (D) : Thulana

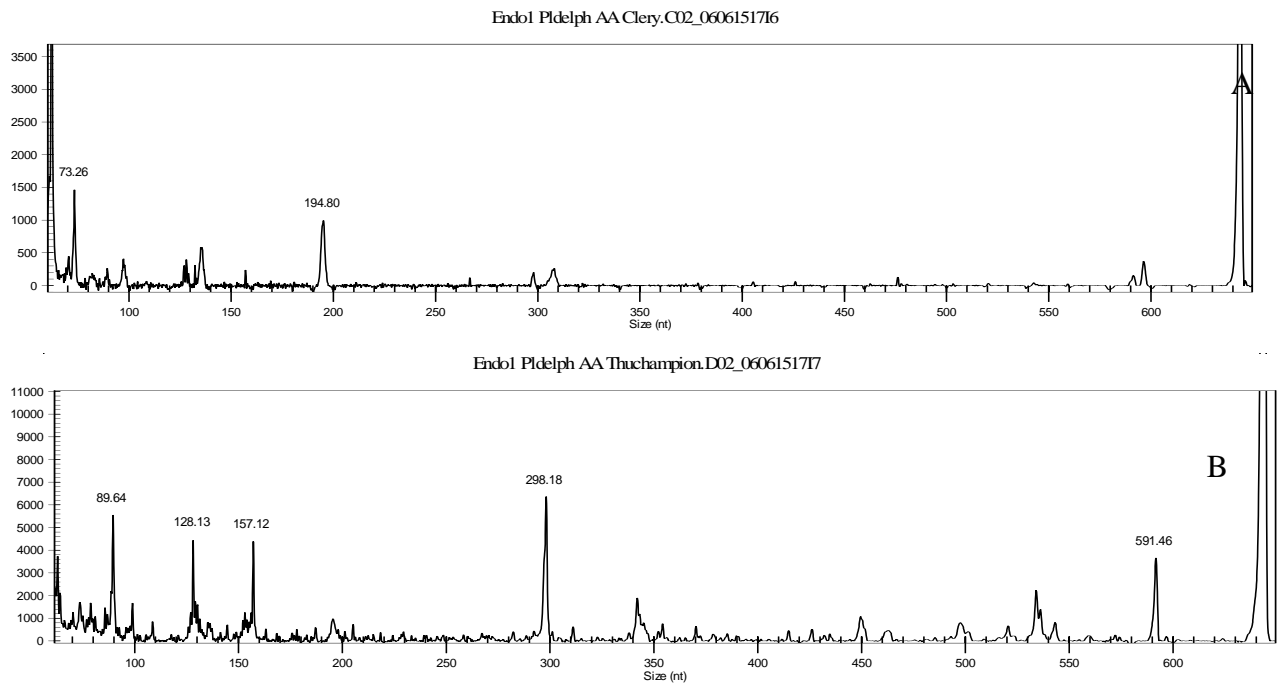


Figure 36 : Sortie d'électrophorèse capillaire de après analyse Eco-Tilling sur des produits PCR à l'aide des amorces FrPL5-819 (WellRedD2) et Ple3-2 sur ADNg extrait avec le kit Phytopass Kajip.

(A) : Clery (B) : Thuchampion

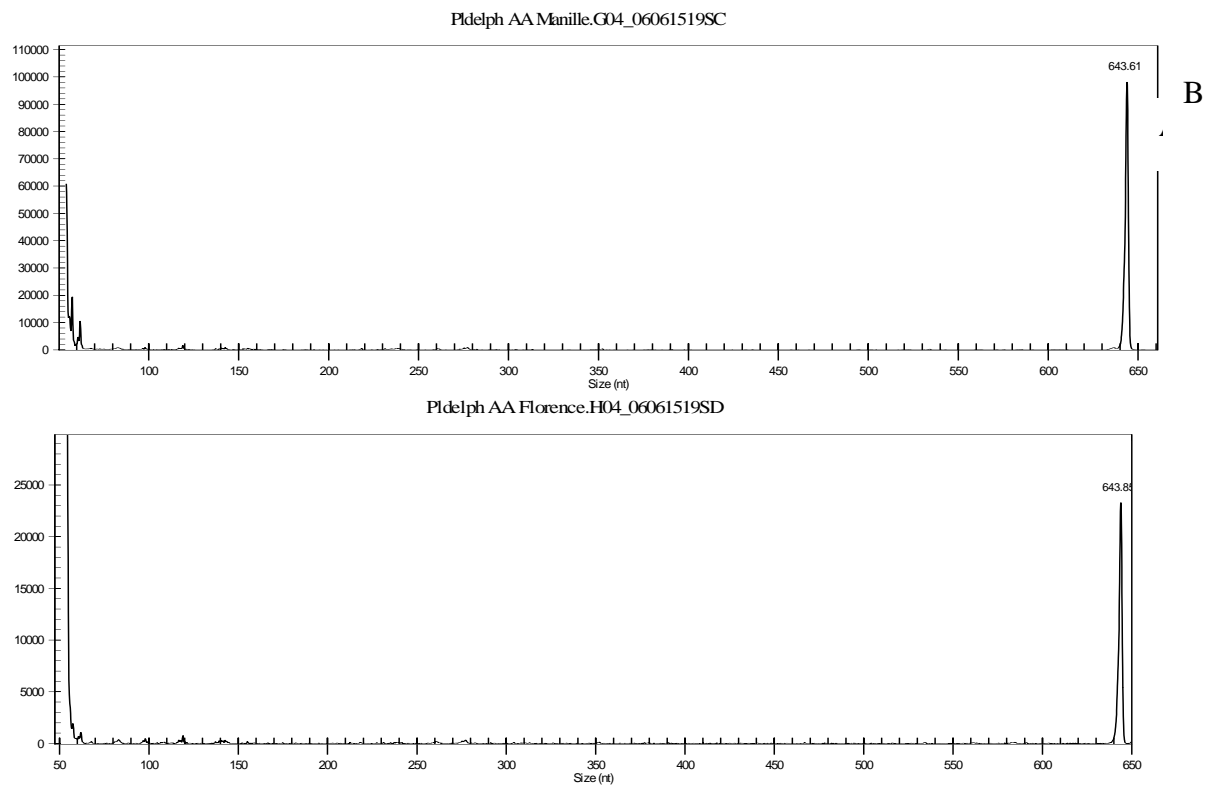
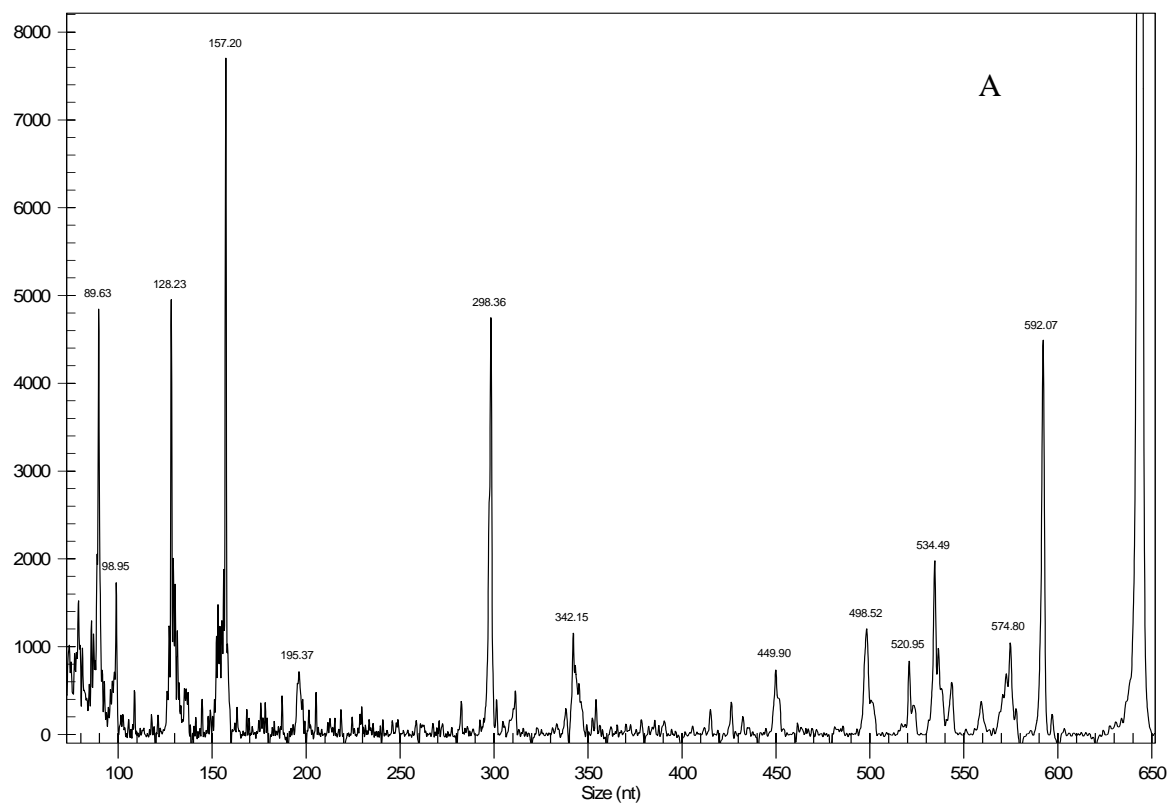


Figure 37 : Sortie d'électrophorèse capillaire de produits d'amplification hybridés mais non digérés.

(A) : Manille (B) : Florence



Endo1 Pldelph AA Darselect.B01_060615168Q

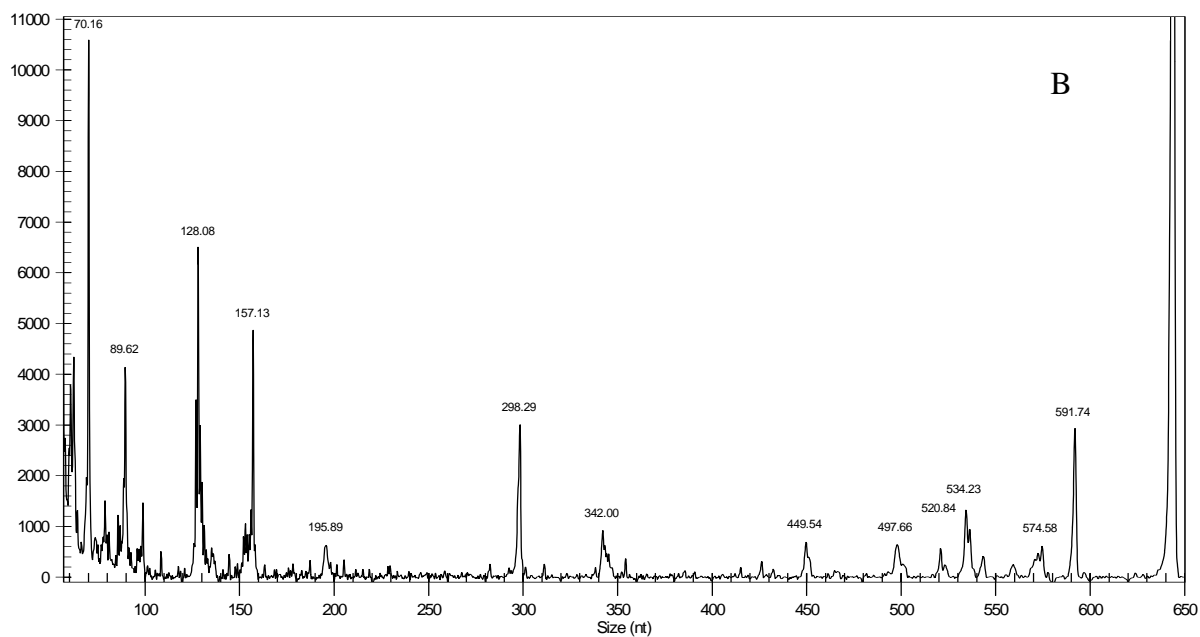


Figure 38: Sortie de l' électrophorèse capillaire après analyse Eco-Tilling sur des produits PCR à l'aide des amorces FrPLe5-819 (WellRedD2) et Ple3-2 sur ADNg extrait avec le kit Phytopass KajiP.

(A) : Manille (B) : Darselect

					64		78-81		93	100	
pl 12 snp	(1)	CATTGATGCTATCATGGGTTCTACTG	CATTACCATTCCAAACA	ACTACTTCACTCACCATAA	TGAGGTTGATTCTGCA	TATCCCATACAC	CAATTT	C			
pl 13 snp	(1)	CATTGATGCTATCATGGGTTCTACTGCCATTACCATTCCAAACA	ACTACTTCACTCACCATAA	TGAGGTTGATTCTAC	TATCCCATACAC	CAATTT	C				
pl 17 snp	(1)	CATTGATGCTATCATGGGTTCTACTGCCATTACCATTCCAAACA	ACTACTTCACTCACCATAA	TGAGGTTGATTCTACA	TATCCCATACAC	CAATTT	T				
pl 18 snp	(1)	CATTGATGCTATCATGGGTTCTACTGCCATTACCATTCCAAACA	ACTACTTCACTCACCATAA	TGAGGTTGATTCTACA	TATCCCATACAC	CAATTT	T				
pl 19 snp	(1)	CATTGATGCTATCATGGGTTCTACTGCCATTACCATTCCAAACA	ACTACTTCACTCACCATAA	TGAGGTTGATTCTACA	TATCCCATACAC	CAATTT	C				
pl 22 snp	(1)	CATTGATGCTATCATGGGTTCTACTGCCATTACCATTCCAAACA	ACTACTTCACTCACCATAA	TGAGGTTGATTCTACA	TATCCCATACAC	CAATTT	C				
pl 25 snp	(1)	CATTGATGCTATCATGGGTTCTACTGCCATTACCATTCCAAACA	ACTACTTCACTCACCATAA	TGAGGTTGATTCTACA	TATCCCATACAC	CAATTT	C				
pl 27 snp	(1)	CATTGATGCTATCATGGGTTCTACTGCCATTACCATTCCAAACA	ACTACTTCACTCACCATAA	TGAGGTTGATTCTACA	TATCCCATACAC	CAATTT	C				
Consensus	(1)	CATTGATGCTATCATGGG	125	GCC	129-130	AAC	154-155	CA	158	GAGGTTGATTCTACTATCCCATACACCAATTT	200
pl 12 snp	(101)	TTGTGCTTGAAGATAAATTTGTTG	CAAGG	GAGACTAAAATTTGATGTTGGTT	ATTG	GAACAGGTTATGCTGTTGGGGCATAGTGACTCCTACACAAGG					
pl 13 snp	(101)	TTGTGCTTGAAGATAAATTTGTTG	CAAGG	GAGACTAAAATTTGATGTTGGTT	ATTG	GAACAGGTTATGCTGTTGGGGCATAGTGACTCCTACACAAGG					
pl 17 snp	(101)	TTGTGCTTGAAGATAAATTTGTTG	CAAGA	GAGACTAAAATTTGATGTTGGTT	ATTT	GAACAGGTTATGCTGTTGGGGCATAGTGACTCCTACACAAGG					
pl 18 snp	(101)	TTGTGCTTGAAGATAAATTTGTTG	CAAGA	GAGACTAAAATTTGATGTTGGTT	ATTT	GAACAGGTTATGCTGTTGGGGCATAGTGACTCCTACACAAGG					
pl 19 snp	(101)	TTGTGCTTGAAGATAAATTTGTTG	CAAGA	GAGACTAAAATTTGATGTTGGTT	ATTT	GAACAGGTTATGCTGTTGGGGCATAGTGACTCCTACACAAGG					
pl 22 snp	(101)	TTGTGCTTGAAGATAAATTTGTTG	CAAGG	GAGACTAAAATTTGATGTTGGTT	ATTG	GAACAGGTTATGCTGTTGGGGCATAGTGACTCCTACACAAGG					
pl 25 snp	(101)	TTGTGCTTGAAGATAAATTTGTTG	CAATG	GAGACTAAAATTTGATGTTGGTT	ATTG	GAACAGGTTATGCTGTTGGGGCATAGTGACTCCTACACAAGG					
pl 27 snp	(101)	TTGTGCTTGAAGATAAATTTGTTG	CAATG	GAGACTAAAATTTGATGTTGGTT	ATTG	GAACAGGTTATGCTGTTGGGGCATAGTGACTCCTACACAAGG					
Consensus	(101)	TTGTGCTTGAAGATAAATTT	227	AGGGAGACTAAAATTTGATGTTGGTTATTGGAAC	269	GCTGTTGGGGCATAGTGACTCCTACACAAGG				300	
pl 12 snp	(201)	GACAAGCAGATGCAAGTGACATTGCT	TACAATCATT	TGGTGAAGGACTTATCCAAAGAATGCCAAG	TAAAATTTCTGAAGTGGTTC	TTAACCTACA					
pl 13 snp	(201)	GACAAGCAGATGCAAGTGACATTGCT	TACAATCATT	TGGTGAAGGACTTATCCAAAGAATGCCAAG	TAAAATTTCTGAAGTGGTTC	TTAACCTACA					
pl 17 snp	(201)	GACAAGCAGATGCAAGTGACATTGCT	TACAATCATT	TGGTGAAGGACTTATCCAAAGAATGCCAAG	TAAAATTTCTGAAGTGGTTC	TTAACCTACA					
pl 18 snp	(201)	GACAAGCAGATGCAAGTGACATTGCT	TACAATCATT	TGGTGAAGGACTTATCCAAAGAATGCCAAG	TAAAATTTCTGAAGTGGTTC	TTAACCTACA					
pl 19 snp	(201)	GACAAGCAGATGCAAGTGACATTGCT	TACAATCATT	TGGTGAAGGACTTATCCAAAGAATGCCAAG	TAAAATTTCTGAAGTGGTTC	TTAACCTACA					
pl 22 snp	(201)	GACAAGCAGATGCAAGTGACATTGCT	TACAATCATT	TGGTGAAGGACTTATCCAAAGAATGCCAAG	TAAAATTTCTGAAGTGGTTC	TTAACCTACA					
pl 25 snp	(201)	GACAAGCAGATGCAAGTGACATTGCT	TACAATCATT	TGGTGAAGGACTTATCCAAAGAATGCCAAG	TAAAATTTCTGAAGTGGTTC	TTAACCTACA					
pl 27 snp	(201)	GACAAGCAGATGCAAGTGACATTGCT	TACAATCATT	TGGTGAAGGACTTATCCAAAGAATGCCAAG	TAAAATTTCTGAAGTGGTTC	TTAACCTACA					
Consensus	(201)	GACA	311	GCAAGTGACATTGCTTACAATCA	342	GAAGGACTTA	353	AATGCCAAGGTAAAATTTCTGAAGTGGTTC	TTAACCTACA	400	
pl 12 snp	(301)	AGTAACATTTACATTCTCACATGACCAAATGTGCTAACCTGAATAATTGAAT	TGTGCAGATGTAGACATGGGTATTTCCATGTGGTGAACAATGACTAC								
pl 13 snp	(301)	AGTAACATTTACATTCTCACATGACCAAATGTGCTAACCTGAATAATTGAAT	TGTGCAGATGTAGACATGGGTATTTCCATGTGGTGAACAATGACTAC								
pl 17 snp	(301)	AGTAACATTTACATTCTCACATGACCAAATGTGCTAACCTGAATAATTGAAT	TGTGCAGATGTAGACATGGGTATTTCCATGTGGTGAACAATGACTAC								
pl 18 snp	(301)	AGTAACATTTACATTCTCACATGACCAAATGTGCTAACCTGAATAATTGAAT	TGTGCAGATGTAGACATGGGTATTTCCATGTGGTGAACAATGACTAC								
pl 19 snp	(301)	AGTAACATTTACATTCTCACATGACCAAATGTGCTAACCTGAATAATTGAAT	TGTGCAGATGTAGACATGGGTATTTCCATGTGGTGAACAATGACTAC								
pl 22 snp	(301)	AGTAACATTTACATTCTCACATGACCAAATGTGCTAACCTGAATAATTGAAT	TGTGCAGATGTAGACATGGGTATTTCCATGTGGTGAACAATGACTAC								
pl 25 snp	(301)	AGTAACATTTACATTCTCACATGACCAAATGTGCTAACCTGAATAATTGAAT	TGTGCAGATGTAGACATGGGTATTTCCATGTGGTGAACAATGACTAC								
pl 27 snp	(301)	AGTAACATTTACATTCTCACATGACCAAATGTGCTAACCTGAATAATTGAAT	TGTGCAGATGTAGACATGGGTATTTCCATGTGGTGAACAATGACTAC								
Consensus	(301)	AGTAACATTTACATTCTCACATGACCAAATGTGCTAACCTGAATAATTGAAT	TGTGCAGATGTAGACATGGGTATTTCCATGTGGTGAACAATGACTAC								

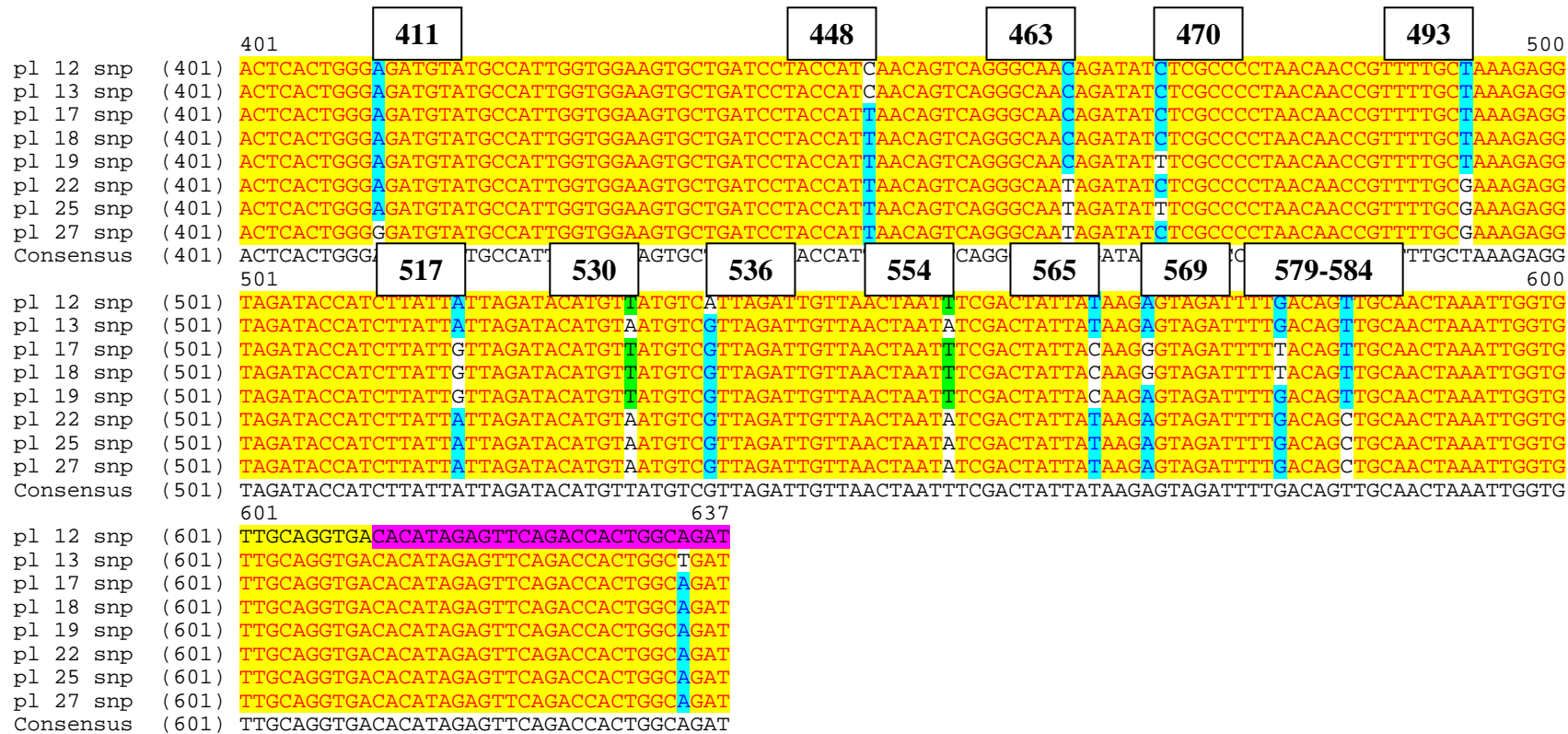


Figure 39: Position des SNP potentiels détectables sur base du séquençage. Tous ces SNP ne seront pas automatiquement détectés en Eco-TILLING lors d'une dénaturation/hybridation sur produit PCR PelB. En effet, si la différence de base observée sur l'alignement ne fait intervenir que des séquences provenant d'une seule variété, aucun mismatch ne sera généré et aucune digestion ne sera observable. Ce cas de figure peut être observé pour le SNP 448 : la base « C » n'est détecté que chez pl12 et pl13 qui sont issues de la variété Mara des bois ou les SNP 463 et 493 présents uniquement chez pl22, pl25 et 27 toutes trois issues de *Fragaria Vesca*.

Discussion générale et conclusions

Discussion générale et conclusion

Dans notre introduction, nous avons expliqué que le réceptacle de la fraise subit un ramollissement de sa texture lors des derniers stades du développement. Ce ramollissement est la conséquence de la dégradation des parois cellulaires par différentes enzymes : les enzymes pectolytiques, les cellulases et les expansines. Lors de sa thèse, M. Draye a démontré grâce à des ARNi de PelB que la pectate lyase B était fortement impliquée dans cette action enzymatique. Le travail que nous avons réalisé lors de ce mémoire se situe dans le prolongement de cette thèse.

Notre objectif était de réaliser une évaluation de la diversité allélique du gène pectate lyase B chez la fraise *F. X ananassa* (octoploïde) et chez le fraiser des bois *F. vesca* (diploïde). Afin d'atteindre cet objectif, nous avons mis en place plusieurs démarches en vue d'analyser trois variétés cultivées octoploïdes présentant des fermetés contrastées et l'espèce diploïde *F. vesca*.

La fraise *F. X ananassa* étant polyploïde, et suite à l'analyse des données disponibles chez *Arabidopsis thaliana*, nous nous attendions à obtenir des données Eco-TILLING surchargées et complexes à analyser en cas d'analyse directe des produits PCR du gène PL. Afin de diminuer la complexité d'analyse, nous avons décidé de cloner un fragment de pectate lyase. Ce fragment, situé à l'extrémité 3' du gène, a été choisi afin de reprendre 3 introns et 4 exons (dont deux partiellement) pour, après clonage, pouvoir réaliser une analyse individuelle de chaque allèle. L'insertion en vecteur possède également d'autres avantages. Tout d'abord, cela devrait permettre d'utiliser des amorces universelles afin d'amplifier l'insert. Il serait alors possible de travailler avec la même paire d'amorces marquées pour différentes recherches. Ensuite, l'utilisation de ces deux amorces universelles, forward et reverse, marquées de façon fluorescente mais avec des fluorochromes différents permet de diminuer les faux positifs. En effet, le fragment PCR étant marqué à chaque extrémité, pour chaque digestion spécifique, on retrouve deux pics de couleur différente mais de taille complémentaire (Taille fragment A + taille fragment B = taille produit PCR).

Une fois ces clones obtenus pour chaque variété, nous devions les analyser. Afin de diminuer le nombre d'analyses à effectuer, nous avons décidé de travailler en analyse croisée par pools de 3 ou 8 individus. En analysant les sorties obtenues après électrophorèse en capillaire, nous avons pu détecter les pools constitués d'allèles semblables ou non. Sur base de ces résultats, nous avons décidé d'analyser séparément certains clones par séquençage et Eco-TILLING. L'observation de l'arbre phylogénétique construit à l'aide des PelB séquencés de clones et de la séquence d'une pectate lyase d'*Arabidopsis*, AT1G04680.1, permet de distinguer les 3 cultivars. Il serait donc possible d'identifier le cultivar dont on connaît la fermeté, sur base de la séquence PelB.

Lors de nos analyses en pool, nous avons observé que le nombre de SNP potentiels restait limité. Nous avons donc décidé de passer à une analyse sur ADNg.

Le problème principal rencontré lors de ce mémoire a été l'obtention d'un ADNg de fraisier qui soit de qualité permettant une amplification du gène pectate lyase. Les tissus de fraise regorgent de métabolites secondaires comme les polyphénols, les tanins, et de polysaccharides inhibant l'action d'enzymes. Les polysaccharides ont un impact évident sur des extraits d'ADN de par leur viscosité qui rend leur manipulation difficile, en plus de leur interférence avec l'activité de la Taq polymérase lors de l'amplification par PCR (Fang *et al*, 1992). Nous avons testé différentes méthodes d'extraction d'ADNg et nous les avons évaluées par spectrophotométrie ainsi que par électrophorèse en gel d'agarose (Tableau 1 et 10, Figure 25). Les résultats de ces deux types d'analyses nous laissaient penser à des échantillons de bonne qualité (DO supérieure à 1,6 et pas de trace de dégradation). Quand nous sommes passés à une analyse par amplification PCR, nous avons

observé des résultats peu concluants (Figures 22, 23, 24 et 26). Pour certaines variétés, nous ne sommes jamais arrivés à obtenir une amplification. Pour d'autres variétés, nous sommes arrivés à une amplification faible. Le gène utilisé comme contrôle positif, le gène tubuline, est un contrôle positif puissant ayant déjà montré son efficacité à maintes reprises. Cependant, nous n'avons pas pu montrer de corrélation entre l'amplification du gène tubuline et les dosages d'ADN en spectrophotométrie. En effet, malgré les bons résultats obtenus en spectrophotométrie, nous n'avons pu obtenir d'amplification du gène tubuline pour chaque amplification PCR et pour chaque cultivar. Ce genre de problème concernant la fraise se retrouve dans la littérature, la solution apportée étant généralement une extraction CTAB quelque peu modifiée (Mercado *et al.* , 1999). Dans le cadre de ce travail, nous avons également utilisé cette méthode, mais elle ne nous a pas permis d'obtenir de l'ADNg de qualité permettant une amplification de PelB pour chaque cultivar.

Sur base de ces analyses, nous pouvons dégager des résultats préliminaires. L'observation du tableau 17 de la partie résultats fait ressortir certains profils potentiels. De plus, nous pouvons observer que la fréquence moyenne des SNP est de un SNP toutes les 167 paires de base. Ce chiffre semblerait inférieur à ceux du maïs (un SNP tous les 60,8 paires de bases) mais nettement supérieur aux chiffres disponibles chez l'être humain. Cependant, le maïs possède un génome assez particulier avec par exemple beaucoup d'éléments génétiques mobiles. Nous ne pouvons faire de comparaison entre la fréquence présente chez *F. X ananassa* (octoploïde) et *F. vesca* (diploïde) vu le faible nombre d'analyses réalisées.

Au vu des problèmes rencontrés et du nombre d'analyses faites, nous ne pouvons tirer de conclusion définitive. Premièrement, les signaux obtenus étaient à chaque expérience fort faibles, les risques de faux positifs sont donc évidents. Ensuite, au vu de nos problèmes d'obtention d'ADNg nous n'avons pu obtenir des analyses indépendantes et répétitives pour chaque cultivar. Par exemple, certains cultivars, comme Yamaska, n'ont pu être analysés qu'une seule fois.

En conclusion, les SNP obtenus reflètent le polymorphisme présent dans le fragment de PL analysé lors de mon mémoire. Ces résultats préliminaires nécessiteraient d'être confirmés par d'autres expériences tout en conservant le schéma expérimental suivi. C'est à dire : premièrement l'analyse individuelle de séquences de clones différents et deuxièmement l'hybridation sur eux-mêmes d'ADNg de cultivars permettant la génération d'un profil SNP caractéristique des PLB de ce cultivar.

Perspectives

Perspectives

Les résultats obtenus lors de ce travail nous permettent d'envisager différentes perspectives dans le cadre de l'étude de la diversité allélique de gènes d'enzymes pectolytiques chez les fraises *F. X ananassa* et *F. vesca*.

Il faudrait poursuivre le séquençage des clones : en effet, il apparaît que l'alignement des séquences de PL provenant de clones obtenus au départ de Mara des bois, Elsanta, Darselect et *Fragaria Vesca* se regroupent par variété. Ces séquences semblent donc, pour celles analysées jusqu'à présent tout au moins, être spécifiques de chacune des variétés.

Une méthode complémentaire d'étude des pectate lyases consisterait en la réalisation d'un Southern blot sur les ADNg de *F. X ananassa* et *F. vesca*. Cela nous permettrait de définir le nombre de loci de PL pour chaque espèce. De plus, au vu des derniers résultats positifs obtenus dans les conditions standard d'amplification, la suite logique serait de commander l'amorce unique 5' PLABF marquée avec un fluorochrome WellRed. Elle nous permettrait l'analyse de PLA, PLB et PLA/B en Eco-TILLING.

A court terme, il faudrait approfondir les analyses déjà effectuées pour certains cultivars et envisager l'étude de nouveaux cultivars pour lesquels les caractérisations phénotypiques seront prochainement disponibles au CRA-W. je n'ai pas réussi à obtenir de résultats. Cette analyse pourrait alors se conclure par une caractérisation des profils de PIA et B pour chaque cultivar.

A moyen terme, ces profils pourraient servir à tester une corrélation haplotypes/phénotypes sur base des caractérisations phénotypiques des cultivars. En effet, la construction d'un arbre phylogénétique grâce aux séquences de clones permet de regrouper ces séquences selon leur origine (cultivar ou espèce). L'inconvénient du séquençage est son coût élevé. De plus, *F. X ananassa* étant octoploïde le séquençage total demanderait beaucoup de travail. Les SNP obtenus par la méthode d'alignement des fragments séquencés peuvent être obtenus via l'approche Eco-TILLING. L'inconvénient de cette technique est la difficulté d'obtenir de l'ADNg de qualité permettant de bons signaux lors de l'électrophorèse capillaire.

Cette corrélation pourrait nous amener dans le futur à pouvoir réaliser une sélection assistée par marqueurs. Cette méthode permettrait de sélectionner des fraisiers hybrides possédant le ou les haplotype(s) de PL semblant être lié à une fermeté recherchée du fruit, par ailleurs couplée à de bonnes qualités organoleptiques.

Bibliographie

Bibliographie

1. Abeles, F. B. & Takeda, F. Cellulase Activity and Ethylene in Ripening Strawberry and Apple Fruits. *Scientia Horticulturae* **42**, 269-275 (1990).
2. Arilla, M. C., Ibarrola, I., Garcia, R., de la Hoz, B., Martinez, A. & Asturias, A. Quantification of the major allergen from cypress (*Cupressus arizonica*) pollen, Cup a 1, by monoclonal antibody-based ELISA. *International Archives of Allergy and Immunology* **134**, 10-16 (2004).
3. Armstrong, B., Stewart, M. & Mazumder, A. Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping. *Cytometry* **40**, 102-8 (2000).
4. Barnes, M. F. & Patchett, B. J. Cell wall degrading enzymes and the softening of senescent strawberry fruit. *J Food Sci* **41**, 1392-1395 (1976).
5. Bedouet, L., Courtois, B. & Courtois, J. Rapid quantification of O-acetyl and O-methyl residues in pectin extracts. *Carbohydr Res* **338**, 379-83 (2003).
6. Benitez-Burraco, A., Blanco-Portales, R., Redondo-Nevado, J., Bellido, M. L., Moyano, E., Caballero, J. L. & Munoz-Blanco, J. Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. *Chandler*) pectate lyase genes. *Journal of Experimental Botany* **54**, 633-645 (2003).
7. Bonghi, C., Ferrarese, L., Ruperti, B., Tonutti, P. & Ramina, A. Endo-beta-1,4-glucanases are involved in peach fruit growth and ripening, and regulated by ethylene. *Physiologia Plantarum* **102**, 346-352 (1998).
8. Brett, C. & K., W. in *Topics in plant physiology* (London, 1990).
9. Caldwell, D. G., McCallum, N., Shaw, P., Muehlbauer, G. J., Marshall, D. F. & Waugh, R. A structured mutant population for forward and reverse genetics in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant J* **40**, 143-50 (2004).
10. Carpita, N. C. & Gibeaut, D. M. Structural Models of Primary-Cell Walls in Flowering Plants - Consistency of Molecular-Structure with the Physical-Properties of the Walls During Growth. *Plant Journal* **3**, 1-30 (1993).
11. Colbert, T., Till, B. J., Tompa, R., Reynolds, S., Steine, M. N., Yeung, A. T., McCallum, C. M., Comai, L. & Henikoff, S. High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiology* **126**, 480-484 (2001).
12. Comai, L. & Henikoff, S. TILLING: practical single-nucleotide mutation discovery. *Plant J* **45**, 684-94 (2006).
13. Comai, L., Young, K., Till, B. J., Reynolds, S. H., Greene, E. A., Codomo, C. A., Enns, L. C., Johnson, J. E., Burtner, C., Odden, A. R. & Henikoff, S. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant J* **37**, 778-86 (2004).
14. Coombe, B. G. The development of fleshy fruits. *Annual Review of Plant Physiology* **27**, 207-228 (1976).
15. de Vienne, D. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales (INRA, Paris, 1998).
16. Del Tito, B. J., Jr., Poff, H. E., 3rd, Novotny, M. A., Cartledge, D. M., Walker, R. I., 2nd, Earl, C. D. & Bailey, A. L. Automated fluorescent analysis procedure for enzymatic mutation detection. *Clin Chem* **44**, 731-9 (1998).
17. Doetsch, P. W., McCray, W. H., Jr., Lee, K., Bettler, D. R. & Valenzuela, M. R. Nuclease SP: a novel enzyme from spinach that incises damaged duplex DNA preferentially at sites of adenine. *Nucleic Acids Res* **16**, 6935-52 (1988).
18. Domingo, C., Roberts, K., Stacey, N. J., Connerton, I., Ruiz-Teran, F. & McCann, M. C. A pectate lyase from *Zinnia elegans* is auxin inducible. *Plant J* **13**, 17-28 (1998).
19. Draye, M. in *Facultés des Sciences Département de Biologie 264 (Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, 2005)*.

20. Durrant, C., Zondervan, K. T., Cardon, L. R., Hunt, S., Deloukas, P. & Morris, A. P. Linkage disequilibrium mapping via cladistic analysis of single-nucleotide polymorphism haplotypes. *Am J Hum Genet* 75, 35-43 (2004).
21. Fang, G., Hammar, S. & Grumet, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* 13, 52-4, 56 (1992).
22. Feng, C. P. & Mundy, J. Gene discovery and functional analyses in the model plant *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology* 48, 5-14 (2006).
23. Fry, S. C. The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis., 217-237 (1988).
24. Futamura, N., Kouchi, H. & Shinohara, K. A gene for pectate lyase expressed in elongating and differentiating tissues of a Japanese willow (*Salix gilgiana*). *Journal of Plant Physiology* 159, 1123-1130 (2002).
25. Gibson, G., Muse, S.-V., Cunin, R. C. & Domenjoud, L. Précis de génomique (De Boeck, 2004).
26. Goellner, M., Wang, X. & Davis, E. L. Endo-beta-1,4-glucanase expression in compatible plant-nematode interactions. *Plant Cell* 13, 2241-55 (2001).
27. Gross, E., Arnold, N., Goette, J., Schwarz-Boeger, U. & Kiechle, M. A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Human Genetics* 105, 72-78 (1999).
28. Gummadi, S. N. & Panda, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. *Process Biochemistry* 38, 987-996 (2003).
29. Hart, J. R., Johnson, M. D. & Barton, J. K. Single-nucleotide polymorphism discovery by targeted DNA photocleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14040-4 (2004).
30. Henrissat, B., Coutinho, P. M. & Davies, G. J. A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 47, 55-72 (2001).
31. Henrissat, B., Heffron, S. E., Yoder, M. D., Lietzke, S. E. & Journak, F. Functional implications of structure-based sequence alignment of proteins in the extracellular pectate lyase superfamily. *Plant Physiol* 107, 963-76 (1995).
32. Jarvis, M. C., Forsyth, W. & Duncan, H. J. A Survey of the Pectic Content of Nonlignified Monocot Cell Walls. *Plant Physiol* 88, 309-314 (1988).
33. Jimenez-Bermudez, S., Redondo-Nevado, J., Munoz-Blanco, J., Caballero, J. L., Lopez-Aranda, J. M., Valpuesta, V., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M. A. & Mercado, J. A. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiology* 128, 751-759 (2002).
34. Koning, R. E. (Plant physiology website, 1994).
35. Kulikauskas, R. & McCormick, S. Identification of the tobacco and *Arabidopsis* homologues of the pollen-expressed LAT59 gene of tomato. *Plant Mol Biol* 34, 809-14 (1997).
36. Kuppuswamy, M. N., Hoffmann, J. W., Kasper, C. K., Spitzer, S. G., Groce, S. L. & Bajaj, S. P. Single nucleotide primer extension to detect genetic diseases: experimental application to hemophilia B (factor IX) and cystic fibrosis genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1143-7 (1991).
37. Langae, T. & Ronaghi, M. Genetic variation analyses by Pyrosequencing. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 573, 96-102 (2005).
38. Lerceteau-Kohler, E., Guerin, G., Laigret, F. & Denoyes-Rothan, B. Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa*) using AFLP mapping. *Theor Appl Genet* 107, 619-28 (2003).
39. Manning, K. in *Biochemistry of Fruit Ripening* (ed. (eds.), G. B. S. e. a.) 347-373 (Chapman and Hall, London (GBR), 1993).
40. Marin-Rodriguez, M. C., Orchard, J. & Seymour, G. B. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J Exp Bot* 53, 2115-9 (2002).
41. Marth, G. T., Korf, I., Yandell, M. D., Yeh, R. T., Gu, Z., Zakeri, H., Stitzel, N. O., Hillier, L., Kwok, P. Y. & Gish, W. R. A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery. *Nat Genet* 23, 452-6 (1999).

42. Mayans, O., Scott, M., Connerton, I., Gravesen, T., Benen, J., Visser, J., Pickersgill, R. & Jenkins, J. Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. *Structure* 5, 677-89 (1997).
43. McCallum, C. M., Comai, L., Greene, E. A. & Henikoff, S. Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol* 123, 439-42 (2000).
44. Mercado, J. A., El Mansouri, I., Jimenez-Bermudez, S., Plieco-Alfaro, F. & Quesada, M. A. A convenient protocol for extraction and purification of DNA from *Fragaria*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 35, 152-153 (1999).
45. Midoro-Horiuti, T., Mathura, V., Schein, C. H., Braun, W., Yu, S., Watanabe, M., Lee, J. C., Brooks, E. G. & Goldblum, R. M. Major linear IgE epitopes of mountain cedar pollen allergen Jun a 1 map to the pectate lyase catalytic site. *Mol Immunol* 40, 555-62 (2003).
46. Miura, H., Imada, S. & Yabuuchi, S. Double Sigmoid Growth Curve of Strawberry Fruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 59, 527-531 (1990).
47. Mochida, K., Yamazaki, Y. & Ogiwara, Y. Discrimination of homoeologous gene expression in hexaploid wheat by SNP analysis of contigs grouped from a large number of expressed sequence tags. *Mol Genet Genomics* 270, 371-7 (2003).
48. Najimi, B., EL Jaafaris, S., Jlibene, M. & Jacquemin, J. Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 7, 17-35 (2003).
49. Nickerson, D. A., Tobe, V. O. & Taylor, S. L. PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. *Nucleic Acids Res* 25, 2745-51 (1997).
50. Nollau, P. & Wagener, C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques. *Clin Chem* 43, 1114-28 (1997).
51. Oleykowski, C. A., Bronson Mullins, C. R., Godwin, A. K. & Yeung, A. T. Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Res* 26, 4597-602 (1998).
52. Oleykowski, C. A., Mullins, C. R. B., Chang, D. W. & Yeung, A. T. Incision at nucleotide insertions/deletions and base pair mismatches by the SP nuclease of spinach. *Biochemistry* 38, 2200-2205 (1999).
53. O'Neill, e. a. in *Methods in Plant Biochemistry* (ed. Press, A.) 415-441 (London, 1990).
54. O'Neill, M. A. & York, W. S. in *The Plant Cell Wall* (ed. Jocelyn Rose, D. o. P. B., Cornell University, Ithaca, New York, USA) 1-54 (Blackwell publishing, Ithaca, New York, USA, 2003).
55. Paris, M., Jones, M. G. K. & Eglinton, J. K. Genotyping single nucleotide polymorphisms for selection of barley beta-amylase alleles. *Plant Molecular Biology Reporter* 20, 149-159 (2002).
56. Park, S. J., Taton, T. A. & Mirkin, C. A. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science* 295, 1503-1506 (2002).
57. Perkins-Veazie, P. Growth and ripening of strawberry fruit. *Hortic Rev.* 17, 267-297 (1995).
58. Preston, J. F., Rice, J. D., Ingram, L. O. & Keen, N. T. Differential Depolymerization Mechanisms of Pectate Lyases Secreted by *Erwinia-Chrysanthemi* Ec16. *Journal of Bacteriology* 174, 2039-2042 (1992).
59. Primmer, C. R., Borge, T., Lindell, J. & Saetre, G. P. Single-nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avian genome. *Mol Ecol* 11, 603-12 (2002).
60. Pua, E. C., Ong, C. K., Liu, P. & Liu, J. Z. Isolation and expression of two pectate lyase genes during fruit ripening of banana (*Musa acuminata*). *Physiologia Plantarum* 113, 92-99 (2001).
61. Raven, P. H., Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. *Biology of plants* (Freeman and Company, New York, 2005).

62. Rickert, A. M., Premstaller, A., Gebhardt, C. & Oefner, P. J. Genotyping of Snps in a polyploid genome by pyrosequencing. *Biotechniques* 32, 592-3, 596-8, 600 passim (2002).
63. Rogers, H. J., Bate, N., Combe, J., Sullivan, J., Sweetman, J., Swan, C., Lonsdale, D. M. & Twell, D. Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene g10. *Plant Mol Biol* 45, 577-85 (2001).
64. Sauer, S. Typing of single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry: principles and diagnostic applications. *Clin Chim Acta* 363, 95-105 (2006).
65. Scavetta, R. D., Herron, S. R., Hotchkiss, A. T., Kita, N., Keen, N. T., Benen, J. A., Kester, H. C., Visser, J. & Jurnak, F. Structure of a plant cell wall fragment complexed to pectate lyase C. *Plant Cell* 11, 1081-92 (1999).
66. Schols, H. A., Bakx, E. J., Schipper, D. & Voragen, A. G. J. A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research* 279, 265-279 (1995).
67. Schuelke, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18, 233-4 (2000).
68. Shagin, D. A., Rebrikov, D. V., Kozhemyako, V. B., Altshuler, I. M., Shcheglov, A. S., Zhulidov, P. A., Bogdanova, E. A., Staroverov, D. B., Rasskazov, V. A. & Lukyanov, S. A novel method for SNP detection using a new duplex-specific nuclease from crab hepatopancreas. *Genome Res* 12, 1935-42 (2002).
69. Sheffield, V. C., Beck, J. S., Kwitek, A. E., Sandstrom, D. W. & Stone, E. M. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16, 325-32 (1993).
70. Simeonov, A. & Nikiforov, T. T. Single nucleotide polymorphism genotyping using short, fluorescently labeled locked nucleic acid (LNA) probes and fluorescence polarization detection. *Nucleic Acids Res* 30, e91 (2002).
71. Stalbrand, H., Mansfield, S. D., Saddler, J. N., Kilburn, D. G., Warren, R. A. & Gilkes, N. R. Analysis of molecular size distributions of cellulose molecules during hydrolysis of cellulose by recombinant *Cellulomonas fimi* beta-1,4-glucanases. *Appl Environ Microbiol* 64, 2374-9 (1998).
72. Starr, M. P. & Moran, F. Eliminative split of pectic substances by phytopathogenic soft-rot bacteria. *Science* 135, 920-1 (1962).
73. Stauct, G. The species of *Fragaria*, their taxonomy and geographical distribution. *Acta Horticulturae* 265, 23-33 (1989).
74. Syvanen, A. C. & Soderlund, H. DNA sandwiches with silver and gold. *Nat Biotechnol* 20, 349-50 (2002).
75. Talbott, L. D. & Ray, P. M. Molecular Size and Separability Features of Pea Cell Wall Polysaccharides : Implications for Models of Primary Wall Structure. *Plant Physiol* 98, 357-368 (1992).
76. Thomas, L. M., Doan, C. N., Oliver, R. L. & Yoder, M. D. Structure of pectate lyase A: comparison to other isoforms. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58, 1008-15 (2002).
77. Till, B. J., Burtner, C., Comai, L. & Henikoff, S. Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. *Nucleic Acids Research* 32, 2632-2641 (2004).
78. Underhill, P. A., Jin, L., Lin, A. A., Mehdi, S. Q., Jenkins, T., Vollrath, D., Davis, R. W., Cavalli-Sforza, L. L. & Oefner, P. J. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res* 7, 996-1005 (1997).
79. Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M. & Eggen, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* 34, 275-305 (2002).
80. Vincken, J. P., Schols, H. A., Oomen, R., Beldman, G., Visser, R. & Voragen, A. G. J. Pectin - the hairy thing: evidence that homogalacturonan is a side chain of rhamnogalacturonan I. *Advances in Pectin and Pectinase Research*, 47-111 (14) (2003).
81. Visseur, V. & J., V. A. G. *Pectin and pectinases, progress in biotechnology* (Elsevier, Amsterdam, 1996).

82. Wang, J. & Huang, X. A method for finding single-nucleotide polymorphisms with allele frequencies in sequences of deep coverage. *BMC Bioinformatics* 6, 220 (2005).
83. Whitcombe, D., Brownie, J., Gillard, H. L., McKechnie, D., Theaker, J., Newton, C. R. & Little, S. A homogeneous fluorescence assay for PCR amplicons: its application to real-time, single-tube genotyping. *Clin Chem* 44, 918-23 (1998).
84. Wienholds, E., van Eeden, F., Kusters, M., Mudde, J., Plasterk, R. H. & Cuppen, E. Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Res* 13, 2700-7 (2003).
85. Wing, R. A., Yamaguchi, J., Larabell, S. K., Ursin, V. M. & McCormick, S. Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *Plant Mol Biol* 14, 17-28 (1990).
86. Woodward, J. R. Physical and chemical changes in developing strawberry fruits. *J Sci Food Agric* 23, 465-73 (1972).
87. Youil, R., Kemper, B. W. & Cotton, R. G. Screening for mutations by enzyme mismatch cleavage with T4 endonuclease VII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 87-91 (1995).
88. Yuan, S., Wu, Y. & Cosgrove, D. J. A fungal endoglucanase with plant cell wall extension activity. *Plant Physiol* 127, 324-33 (2001).