DK534857 CD_RP_15766

Faisabilité des extractions d'ARN totaux et des études d'expression par RT-PCR à la station de l'IRRI (Palembang, Sumatra) et de l'IBRIEC (Bogor, Java)

Rapport de mission en Indonésie
Du 09 au 23 juillet 2006

Julie LECLERCQ
CIRAD-CP
UMR BEPC

CP - 1984
Juillet 2006

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette

CIRAD
000081736

Sommaire

Remerciements ii
Personnes rencontrées iii
Emploi du temps iv
Résumé v
Introduction 1
1. Travaux réalisés à l'IRRI (Sembawa) 3
1.1 Repérage des arbres 3
1.1.1. Arbres non saignés et non stimulés (Arbre1, 2 et 3, Ecorce : ENS, feuille : FNS, latex : LNS) 3
1.1.2. Arbres non saignés et stimulés (Arbre 4, 5 et 6, Ecorce : ES, feuille : FS, latex : LS) 3
1.1.3. Problèmes rencontrés 3
1.2 Broyage et début d'extraction d'ARN 4
1.3 Extraction d'ARN avec le Kit Qiagen 4
1.4 Préparation des échantillons pour le transfert vers l'IBRIEC (Bogor) 4
2. Travaux réalisés à l'IBRIEC (Bogor) 4
1.1 Dosage et qualité des ARNs extraits à Sewbawa avec le kit Qiagen 4
1.2 Extraction classique des ARNs du latex (LS1-3, LNS1-3) 4
1.3 Extraction à partir des tissus congelés 5
1.4 Extraction à partir des échantillons dans du RNA later® 5
1.5 Prélèvements d'échantillons frais à Ciomas 6
1.6 Extraction avec le protocole mis au point pour des échantillons de cacaoyer ... 6
1.7 Problèmes rencontrés 8
3. Bilan 8
Conclusion 9

Annexes
1 – Liste des produits amenés
2 – Protocole d'extraction d'ARN avec le kit Qiagen
3 – Protocole d'extraction avec le protocole mis au point sur l'hévéa
4 – Protocole d'extraction avec le protocole mis au point sur le cacao

Remerciements

Mes premiers remerciements vont au Ministère des Affaires étrangères pour le financement de cette mission dans le cadre du projet « *Intégration des biotechnologies pour l'amélioration de l'hévéa en Indonésie*».
Je remercie la direction du département des cultures pérennes pour avoir autorisé cette mission.
Je remercie M. Jean-Guy Bertault pour son soutien et ses conseils.
Je remercie les directeurs de l'IRRI, Mr. Anvar, et de l'IBRIEC, Mr. Darmono, pour leurs invitations.
Je remercie Pascal Montoro de sa confiance et de m'avoir permis de faire l'expérience d'un travail scientifique en Indonésie.
Je remercie Mme Tetty et Mme Asmini et tout particulièrement Mr. Kuswanhadi pour sa gentillesse et l'organisation concrète de cette mission.

Personnes rencontrées

Organismes visités	Personnes rencontrées
IRRI (station de Sembawa)	- Dr Chaidir Amypalupy, chef du centre - Dr Heru Suryaningtyas, directeur de recherche - Sigit Ismawanto, maîtrise en biologie, Université de Gajamada (Yobjakarta) - Fetrina Oktavia, Master en biologie moléculaire, Université de Bogor
IBRIEC (Bogor)	- Dr Darmono, directeur - Dr Djoko Santoso, responsable du laboratoire de biologie moléculaire - Dr Siswanto, coordinateur de la recherche - Mr Sumaryono, responsable du site de Ciomas - Dr Asmini Budiani, chercheure (palmier à huile) - Dr Tetty Chaidamsari, chercheure (cacao) - Dr Nurhaimi Haris, chercheure (hévéa)

Emploi du temps

08-09/07/06 : Montpellier-Paris-Amsterdam-Jakarta-Palembang
Dimanche 9/07: Arrivée à l'hôtel à 22h45
Lundi 10/07: Départ pour Sembawa à 7h30 (arrivée vers 8h30)
8h30-9h: Rencontre avec Dr Chaidir, Chef du centre
9h-10h: Choix des protocoles d'extraction d'ARN avec Kuswan (extraction Qiagen sur place, prélèvement dans RNA later pour Bogor et Montpellier, Prélèvement dans le tampon d'extraction pour Bogor
10h-12h30: Visite de plantations d'hévéa
12h30-13h30: pause déjeuner
13h30-14h30: Repérage de 6 arbres PB260 (3 vierges et 3 stimulés avec Ethrel)
Traitement vers 14h (récolte le lendemain vers 9h) d'écorce de 3 arbres et feuilles (attention période de défoliation)
14h30-16h30: préparation des solutions, commande d'azote liquide, congélation d'eau pour faire de la glace
Mardi 11/07: Départ pour Sembawa à 7h (arrivée vers 8h)
9h-11h: prélèvement des échantillons (FS, FNS, LS1, LS2, LS3 (6ml), LNS1, LNS2, LNS3, (3ml)
11h-13h: broyage
13h-13h45: pause déjeuner
13h45-16h45: extraction Qiagen
Mercredi 12/07: Départ pour Sembawa à 7h (arrivée vers 8h)
8h-9h45: Visite des plantations, saignée
9h45-13h: Préparation des solutions pour les prélèvements J3 et J6
Bilan avec Kuswanhadi et rédaction du compte-rendu
13h-13h45: pause déjeuner
13h45-16h30: Précipitation des ARNs et préparation des colis pour le transfert à Bogor
Jeudi 13/07:
8h00-15h30: transfert vers Bogor
15H30-16h30: pause déjeuner
16H30-17H30: visite de l'IBRIEC
Vendredi 14/07:
7h30-11h30: Réunion, planification des expériences et préparation des solutions
12h30-13h30: Pause déjeuner
13h30-16h: centrifugation des ARNs extraits à Sembawa et reprise dans l'eau
Lundi 17/07:
7h30-13h30: début de l'extraction des ARNs conservés dans RNA later (kit) et extraction des échantillons latex (classique)
13h30-14h30: Pause déjeuner
14h30-16h: dosage des ARNs extraits à Sembawa
Mardi 18/07:
7h30-9h00-13h: Panne d'électricité dans tout Bogor, repérage de PB260 et RRIM600 (13ans) à Ciomas et stimulation
13h-14h: pause déjeuner
14h-16h: Fin des extractions latex-dosage (latex et kit)
17h-22h: préparation du séminaire
Mercredi 19/07:
7h30-13h00:Collecte de latex, feuille et écorce, migration des ARNs latex extraits
13h-14h: pause déjeuner
14h-17h: Début Extraction avec le protocole cacao-plan de manip
jeudi 20/07:
7h30-10h: Extraction d'ARN (protocole cacao)
10h-12h30: Séminaire scientifique à l'IBRIEC (une conférence sur mon CV et mon projet de recherche, une conférence sur le projet Ethylène)
12h30-13h10: Déjeuner
13h10-17h:suite extractions ARNs, dosage, bilan avec Kuswan, préparation des protocoles
Vendredi 21/07:
7h30-13h00: Migration ARNs extraits-bilan avec Kuswan, Tetty et Asmini – Planning
13h-14h: pause déjeuner
14h-17h: préparation des échantillons pour Montpellier
Samedi 22/07:
Echantillons tissus et latex dans la carboglace
Déjeuner avec Mr Jean-Guy Bertault, réunion de synthèse
22-23/07/06 : Jakarta-Amsterdam-Paris-Montpellier

Résumé

Le dynamisme de l'hévéaculture indonésienne a permis à ce pays de s'élever au rang de second producteur mondial de caoutchouc naturel. Ce pays possède encore une marge d'amélioration de la production notamment grâce à l'utilisation de clones d'hévéa.
Dans le cadre du projet « ***Intégration des biotechnologies pour l'amélioration de l'hévéa en Indonésie***», le but de cette mission était d'assurer un transfert technologique et d'évaluer la faisabilité d'une étude d'expression de gène impliqués dans la production de latex.
Plusieurs étapes devaient être évaluées :

1- Prélèvements des échantillons de différents tissus (IRRI et IBRIEC)
2- Assurer le transfert des échantillons de l'IRRI vers l'IBRIEC
3- Trouver les protocoles d'extraction d'ARNs adaptés à chaque tissu

Sur la station de Sembawa, le prélèvement des échantillons PB260 latex-écorce-feuille s'est fait dans d'excellentes conditions avec l'aide de Mr Kuswanhadi.
A Bogor, les ARNs ont été extraits avec succès à partir d'échantillon de latex issus d'arbres stimulés ou non avec le protocole classique.
Pour tester d'autres protocoles d'extractions, Mr Siswanto a proposé d'utiliser des arbres PB260 et RRIM600 présents sur la plantation de Ciomas. Des échantillons d'écorce, de feuille et du latex ont été ramenés à Montpellier ainsi qu'une partie des ARNs extraits à partir du latex.
Les équipes indonésiennes sont motivées et possèdent toutes les compétences pour mener à bien ce projet. Toutefois, les moyens de fonctionnement des laboratoires indonésiens sont insuffisants et une source de financement doit être identifiée. L'appui des chercheurs CIRAD doit être maintenue pour finaliser le transfert méthodologique ainsi que la formation des chercheurs indonésiens (analyse de l'expression de gène).

Mots clés
Hevea brasiliensis, biotechnologie, extraction d'ARN, RT-PCR

Abbreviations

IRRI: Indonesian Rubber Research Institute
IBRIEC: Indonesian Biotechnology Research Institute for Estate Crops

Introduction

Le dynamisme de l'hévéaculture indonésienne a permis à ce pays de s'élever au rang de second producteur mondial de caoutchouc naturel. Ce pays possède encore une marge d'amélioration de la production.

Dans le cadre de la convention ***« Intégration des biotechnologies pour l'amélioration de l'hévéa en Indonésie»*** (Mission Montoro, septembre 2005), deux programmes de recherche ainsi que les acteurs ont été identifiés. Le premier sous-projet porte sur la création de clone de porte-greffe (mission Carron, mars 2006) et le deuxième consiste en l'analyse des bases moléculaires et physiologiques de la production de caoutchouc naturel. Ce dernier sous-projet dans lequel je suis impliquée vise l'amélioration génétique grâce à l'identification des gènes clefs ainsi que le développement d'un diagnostique précoce de la potentialité des arbres. Un essai comportant 6 clones à métabolisme contrasté a été planté en 2003. C'est à partir de cet essai que des expériences combinant l'étude du potentiel de production en latex sous stress d'exploitation et l'analyse du métabolisme (réponse physiologique et moléculaire) seront menées. Cet essai « potentiel de production » sera mis en œuvre quand les arbres auront atteints leur maturité et quand le transfert technologique des méthodes de conditionnement des échantillons et d'analyses sera opérationnel.

Dans le cadre de ce sous-projet, l'objectif de cette mission était d'assurer un transfert technologique et d'évaluer la faisabilité d'une étude d'expression de gène par RT-PCR semi-quantitative. Les expériences ont été menées à partir de matériel tout venant d'essais matures hors projet.

Plusieurs étapes devaient être évaluées.

- Prélèvements des échantillons de différents tissus (IRRI et IBRIEC)
- Assurer le transfert des échantillons de l'IRRI vers l'IBRIEC (carboglace, RNA later®)
- Trouver les protocoles d'extraction d'ARNs adaptés à chaque tissu
- Si possible, effectuer les premières expériences d'expression génique par RT-PCR

Cette mission a permis le transfert de matériel (cf annexe1) pour pouvoir faire des expériences visant la comparaison de l'expression génique de gènes candidats chez des hévéas immatures (en serre à Montpellier) et des hévéas matures (station de l'IRRI en Indonésie).

Avant de partir, il a été convenu d'essayer de suivre le plan d'expérience suivant pour les arbres de l'IRRI (Sembawa).

Plan d'expérience

		J-1	J0	2 jours (J3)	6 jours (J6)	1 mois (M+1)	3 mois (M+3)	6 mois (M+6)
Arbres non saignés	Arbre 1	Non stimulé	Ecorce Feuille Latex	Latex	Latex	Ecorce Feuille Latex	Ecorce Feuille Latex	Ecorce Feuille Latex
	Arbre 2	Non stimulé	Ecorce Feuille Latex	Latex	Latex	Ecorce Feuille Latex	Ecorce Feuille Latex	Ecorce Feuille Latex
	Arbre 3	Non stimulé	Ecorce Feuille Latex	Latex	Latex	Ecorce Feuille Latex	Ecorce Feuille Latex	Ecorce Feuille Latex
Arbres non saignés + stimulation (1 fois/mois)	Arbre 4	Ethéphon 2,5%	Ecorce Feuille Latex	Latex	Latex	Feuille, écorce ; latex 2 prélèvements avant/après stimulation	Feuille, écorce ; latex 2 prélèvements avant/après stimulation	Feuille, écorce ; latex 2 prélèvements avant/après stimulation
	Arbre 5	Ethéphon 2,5%	Ecorce Feuille Latex	Latex	Latex	Feuille, écorce ; latex 2 prélèvements avant/après stimulation	Feuille, écorce ; latex 2 prélèvements avant/après stimulation	Feuille, écorce ; latex 2 prélèvements avant/après stimulation
	Arbre 6	Ethéphon 2,5%	Ecorce Feuille Latex	Latex	Latex	Feuille, écorce ; latex 2 prélèvements avant/après stimulation	Feuille, écorce ; latex 2 prélèvements avant/après stimulation	Feuille, écorce ; latex 2 prélèvements avant/après stimulation

1. Travaux réalisés à l'IRRI (Sembawa)

1.1 Repérage des arbres

Kuswanhadi a choisi 6 arbres PB 260 âgés de 4 ans et ayant une circonférence supérieure à 45 cm à un mètre du sol.

1.1.1. Arbres non saignés et non stimulés (Arbre1, 2 et 3, Ecorce : ENS, feuille : FNS, latex : LNS)

Trois arbres non saignés et non stimulés ont été ouverts le mardi 12 juillet vers 9h.
Sur l'arbre A1, A2 et A3, 3 ml de latex ont été prélevés directement dans le tampon d'extraction (protocole hévéa). Six rondelles d'écorce ont été prélevées à l'emporte-pièce et placées dans 4ml de RNA later® (pour une extraction à l'IBRIEC). Huit autres rondelles ont été prélevées et placées dans l'azote liquide, 4 pour un broyage immédiat et 4 pour une extraction à l'IBRIEC.
Sur l'arbre 3, des feuilles ont été prélevées, une partie a été conservée dans du RNA later® (pour une extraction à l'IBRIEC), une autre partie a été congelée dans l'azote liquide pour une extraction immédiate et à l'IBRIEC.

1.1.2. Arbres non saignés et stimulés (Arbre 4, 5 et 6, Ecorce : ES, feuille : FS, latex : LS)

Trois arbres non saignés (A4, A5 et A6) ont été stimulés le lundi 11 juillet vers 14h. Kuswanhadi a dessiné sur l'arbre la zone d'application de l'Ethrel. Le saigneur a gratté l'écorce et a appliqué au pinceau de l'Ethrel à 2,5% dilué dans de l'huile de palme (couleur orange). Des feuilles de l'arbre 3 ont aussi été badigeonnées. Les arbres ont été ouverts le mardi 12 juillet vers 9h.
Sur les arbres A4, A5 et A6, 6 ml de latex ont été prélevés directement dans le tampon d'extraction (protocole hévéa). Six rondelles d'écorce ont été découpées et placées dans 4ml de RNA later® (pour une extraction à l'IBRIEC). Huit autres rondelles ont été prélevées et placées dans l'azote liquide, 4 pour un broyage immédiat et 4 pour une extraction à l'IBRIEC
Sur l'arbre 3, des feuilles ont été prélevées, une partie a été conservée dans du RNA later® (pour une extraction à l'IBRIEC), une autre partie a été congelée dans l'azote liquide pour une extraction immédiate et à l'IBRIEC.

1.1.3. Problèmes rencontrés

Les génotypes PB217 et RRIM600 ne sont pas disponibles pour cette mission, PB 217 a été planté mais les analyses moléculaires (rapport Rio, septembre 2005, page 3) ont montré que ce n'était pas le bon génotype. RRIM600 n'a pas été planté car il n'est pas dans la liste des génotypes recommandés en ce moment.
Il faut signaler que les arbres sont en pleine défoliation et qu'il a été difficile de trouver de feuilles en bon état. Enfin, le broyage d'écorce sans lyophilisation préalable est assez difficile.

1.2 Broyage et début d'extraction d'ARN

A Sembawa, toutes les solutions ont été prélevées et aliquotées de manière stérile pour une meilleure conservation des solutions mères.
Kuswanhadi dispose de 3 mortiers. Les feuilles et les écorces ont été broyées dans l'azote liquide. Une partie de la poudre a été transférée dans un tube Eppendorf 1,5 ml et 450 µl de tampon RLT contenant du béta-mercaptoéthanol (aliquot de la quantité nécessaire de la solution du kit Qiagen). L'autre partie a été transférée dans un tube de 13ml et 1 volume du tampon d'extraction 2X (protocole hévéa) a été rajouté.

1.3 Extraction d'ARN avec le Kit Qiagen

Les ARNS pont été extraits à partir de feuilles et d'écorces, stimulées ou non (ES1-3, ENS1-3, FS, FNS). Le protocole suivi est celui préconisé par Qiagen (Annexe 2).
Kuswanhadi dispose d'une centrifugeuse réfrigérée (Himac CF 16 RX) en état de marche.
Une fois extraits, les ARNs ont été placés dans la glace puis conservés au congélateur (-10°C). Avant le transfert vers l'IBRIEC, les ARNs ont été précipités avec 1/10 volume NaAc 3M pH 4.5 et 2.5 volume d'éthanol absolu.

1.4 Préparation des échantillons pour le transfert vers l'IBRIEC (Bogor)

Malheureusement, l'entreprise qui fabrique la carboglace était en panne ce jour là. On a donc pris le pari de transférer le matériel congelé dans de la glace refroidie avec de l'azote liquide. Les ARNs précipités ainsi que les échantillons dans le RNA later® sont transférés dans de la glace et dans un sac isotherme contenant 3 blocs réfrigérants.

2. Travaux réalisés à l'IBRIEC (Bogor)

Il faut compter une journée de transfert entre l'IRRI (Sembawa) et l'IBRIEC (Bogor).

1.1 Dosage et qualité des ARNs extraits à Sewbawa avec le kit Qiagen

Malheureusement, le dosage des ARNs extraits à Sembawa (ES1-3, ENS1-3, FS, FNS) a montré l'échec de l'extraction. Une nouvelle tentative sera effectuée avec des échantillons provenant de Ciomas (cf §1.4) pour savoir si le kit n'est pas adapté pour les tissus d'hévéa ou s'il y a eu un problème au cours du transfert.

1.2 Extraction classique des ARNs du latex (LS1-3, LNS1-3)

Les ARNs issus de latex prélevés à Sembawa et transférés dans tampon d'extraction (échantillon LS et LNS) ont pu être isolées. Le dosage ainsi que la migration montrent que ces ARNs sont de bonne qualité.

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette

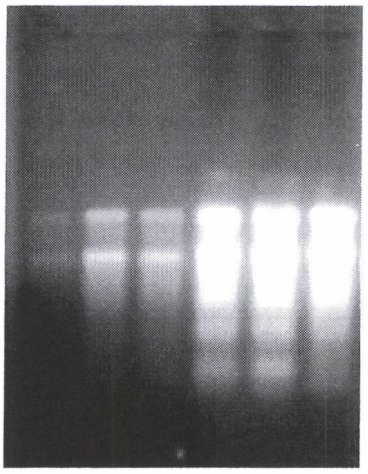

Photo1 : Migration de 200 ng d'ARN de latex (LNS1-LNS2-LNS3-LS1-LS2-LS3)

Dr. Asmini et Dr. Tetty vont finir l'extraction à partir des échantillons de feuille et d'écorce conservés dans le tampon d'extraction.

1.3 Extraction à partir des tissus congelés

Malheureusement, les échantillons n'ont pas été transportés dans de bonnes conditions (transfert dans de la glace refroidie avec de l'azote liquide car pas de carboglace disponible ce jour là). La récupération des échantillons a été difficile et les tissus ont été endommagés.
Il faut noter ici que le transfert d'échantillon frais dans la carboglace est possible tous les 15 jours grâce aux déplacements de Mr Siswanto.

1.4 Extraction à partir des échantillons dans du RNA later®

Le kit Qiagen a été de nouveau testé avec les échantillons de feuilles et d'écorces, stimulées ou non (ES1-3, ENS1-3, FS, FNS) conservés dans du RNAlater®. Malgré les données de dosage positives, la migration a montré qu'il n'y avait pas d'ARNs.

Tableau 1: Dosage des ARNs

PB260 RNA later date of Extraction-protocole	tissuss	OD 260 nm	migration
11/7/2006- Qiagen	Ecorce non stimulée (ENS1)	244 ng/µl	RNA not present
11/7/2006- Qiagen	Ecorce stimulée (ES1)	0 ng/µl	
11/7/2006- Qiagen	Ecorce non stimulée (ENS2)	44 ng/µl	RNA not present
11/7/2006- Qiagen	Ecorce stimulée (ES2)	0 ng/µl	
11/7/2006- Qiagen	Ecorce non stimulée (ENS3)	32 ng/µl	RNA not present
11/7/2006- Qiagen	Feuille non stimulée (FNS)	16 ng/µl	RNA not present
11/7/2006- Qiagen	Ecorce stimulée (ES3)	56 ng/µl	RNA not present
11/7/2006- Qiagen	Feuille stimulée (FS)	60 ng/µl	RNA not present

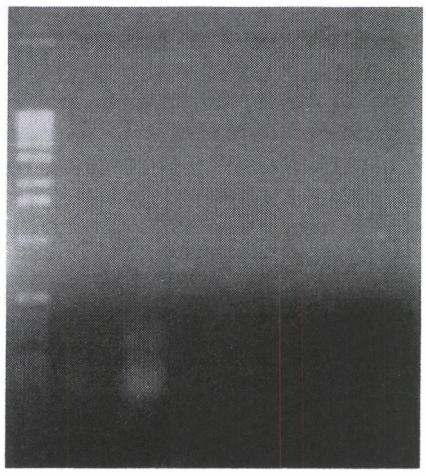

Photo 2 : Migration de 200 ng d'ARN (ES-3, FS, ENS-1, ENS-2, ENS-3, FNS)

Dr.Tetty et Dr. Asmini pourront essayer le protocole mis au point pour le cacaoyer sur ces échantillons (protocole amélioré).

1.5 Prélèvements d'échantillons frais à Ciomas

A la suite de ces résultats négatifs, de nouveaux prélèvements ont été effectués à Ciomas car M. Siswanto a proposé d'utiliser des arbres PB260 et RRIM600 de la collection de Ciomas. Trois arbres de chaque génotype ont été stimulés avec 2.5% d'éthéphon en solution aqueuse. Des échantillons de latex, de feuille et d'écorce provenant d'arbres stimulés ou non ont été prélevés en quantité suffisante pour pouvoir faire plusieurs extractions à Bogor et en ramener à Montpellier.
Les codes sont pour
- PB260 non stimulé : Ecorce : PB-BNS, latex : PB-LNS
- PB260 stimulé : Ecorce : PB-BS, feuille : PB-L, latex : PB-LS
- RRIM600 non stimulé : Ecorce : RM-BNS, latex : RM-LNS
- RRIM600 stimulé : Ecorce : RM-BS, latex : RM-LS

1.6 Extraction avec le protocole mis au point pour des échantillons de cacaoyer

Une partie du latex a été centrifugé et l'extraction a été faite à partir de 2ml de sérum C. Pour les tissus, 2,5g d'écorce et de feuille ont été utilisés.

Tableau 2: échantillons prélevés à Ciomas et date d'extractions pour certains.

		PB260 date of extraction with cocoa protocole	OD 260 nm
Tree 1	latex without stimulation (PB-LNS1)	19/07/2006	128 ng/µl
	bark without stimulation (PB-BNS1)	19/07/2006	464 ng/µl
	leaf (PB-L)	19/07/2006	300 ng/µl
	latex with stimulation (PB-LS1)	19/07/2006	108 ng/µl
	bark with stimulation (PB-BS1)	19/07/2006	304 ng/µl
	leaf from stimulated tree (PB-L)		
Tree 2	latex without stimulation (PB-LNS2)		
	bark without stimulation (PB-BNS2)		
	leaf (PB-L)		
	latex with stimulation (PB-LS2)		
	bark with stimulation (PB-BS2)	20/07/2006	108 ng/µl
	leaf from stimulated tree (PB-L)		
Tree 3	latex without stimulation (PB-LNS3)		
	bark without stimulation (PB-BNS3)		
	leaf (PB-L)		
	latex with stimulation (PB-LS3)		
	bark with stimulation (PB-BS3)		
	leaf from stimulated tree (PB-L)		

		RRIM600 date of extraction with cocoa protocole	OD 260 nm
Tree 1	latex without stimulation (RM-LNS1)		
	bark without stimulation (RM-BNS1)	20/07/2006	128 ng/µl
	leaf (RM-L)	20/07/2006	244 ng/µl
	latex with stimulation (RM-LS1)	19/07/2006	456 ng/µl
	bark with stimulation (RM-BS1)	20/07/2006	56 ng/µl
	leaf from stimulated tree (RM-L)		
Tree 2	latex without stimulation (RM-LNS2)		
	bark without stimulation (RM-BNS2)	20/07/2006	140 ng/µl
	leaf (RM-L)		
	latex with stimulation (RM-LS2)		
	bark with stimulation (RM-BS2)	20/07/2006	128 ng/µl
	leaf from stimulated tree (RM-L)		
Tree 3	latex without stimulation (RM-LNS3)		
	bark without stimulation (RM-BNS3)		
	leaf (RM-L)		
	latex with stimulation (RM-LS3)		
	bark with stimulation (RM-BS3)		
	leaf from stimulated tree (RM-L)		

Malheureusement, là encore, malgré des données de DO encourageantes, les ARNs n'étaient pas visibles après migration.
Les ARNs n'ont pas été extraits et la DO mesurée ne représente que les impuretés de type polysaccharides et polyphénols.

1.7 Problèmes rencontrés

Pour les extractions d'ARNs, seuls 13 tubes en téflon sont utilisables et recyclables et il n'y a qu'une seule centrifugeuse réfrigérée disponible. Le nombre de tube étant limité, il n'est possible que de faire 2 extractions par semaine.

3. Bilan

Malgré de nombreuses tentatives, seul le protocole hévéa a permis d'extraire des ARNs à partir de latex.

Tableau 3 : Bilan des extractions faite et à venir avec la précision des lieux

Conservation Protocole / Tissu		**Tissu frais (Sembawa)** Feuille et écorces dans RNAlater® ou congelées dans N_2 liquide Latex prélevé dans le tampon d'extraction Extraction-qualité	**RNAlater® (Sembawa)** Extrac-qualité	**Tissus frais (Ciomas)** Feuille et écorces congelées dans N_2 liquide Latex conservé dans la glace **Pour Montpellier (carboglace)** Feuille et écorces congelées Latex dans le tampon d'extraction Extraction-qualité
Qiagen	Feuille	Pas d'ARN	Pas d'ARN	Pas testé
	Écorce	Pas d'ARN	Pas d'ARN	Pas testé
	Latex	Pas testé	Pas testé	Pas testé
Hévéa	Feuille	À venir	Pas testé	Pas testé
	Écorce	A venir	Pas testé	Pas testé
	Latex	OK	Pas testé	A venir Bogor/Montpellier
Cacao	Feuille	Pas testé	A venir Bogor	Pas d'ARN
	Écorce	Pas testé	A venir Bogor	Pas d'ARN
	Latex	Pas testé	Pas testé	Pas d'ARN
Tri Reagent	Feuille	Pas testé	Pas testé	A venir Montpellier
	Écorce	Pas testé	Pas testé	A venir Montpellier
	Latex	Pas testé	Pas testé	Pas testé
RNA Reagent	Feuille	Pas testé	Pas testé	A venir Montpellier
	Écorce	Pas testé	Pas testé	A venir Montpellier
	Latex	Pas testé	Pas testé	Pas testé

Conclusion

Les objectifs de cette mission étaient d'évaluer la faisabilité des extractions d'ARNs totaux à partir de différents tissus d'hévéa (feuille, écorce et latex) en assurant un appui scientifique et technique aux chercheurs indonésiens.

Concernant les résultats obtenus en Indonésie, l'extraction des ARN totaux à partir de latex marche très bien avec le protocole déjà établi (protocole hévéa). Par contre, l'extraction d'ARNs à partir d'écorce et de feuille reste toujours problématique. Le mois de juillet correspondait avec la période de défoliation et les feuilles prélevées n'étaient pas de qualité optimale. En ce qui concerne l'écorce, c'est un tissu connu pour être récalcitrant à l'extraction d'ARNs et de nombreux autres protocoles devront être testés. Il a donc été convenu qu'un protocole «cacao» modifié sera testé à Bogor ainsi que deux autres méthodes à Montpellier (Tri Reagent de Sigma et Plant RNA Reagent d'Invitrogen). Pour ce faire, des échantillons d'écorce et de feuille congelés ont été ramenés à Montpellier afin de tester d'autres méthodes d'extractions.

Une partie des ARNs extraits à partir du latex (échantillons de Sembawa) ainsi que du latex dans le tampon d'extraction (échantillons de Ciomas) ont aussi été ramenés à Montpellier pour pouvoir les tester en RT-PCR.

La prochaine mission d'appui scientifique et technique devrait pouvoir permettre de déterminer un protocole d'extraction pour chaque tissu (Mission de Pascal Montoro, septembre 2006). Une fois les ARNs totaux extraits, la seconde phase consistant en la synthèse d'ADNc et d'amplification par PCR devrait pouvoir se mettre en place assez rapidement étant donné l'expérience de M. Kuswanhadi dans le domaine.

En conclusion générale, cette mission a permis de s'assurer de la participation active des chercheurs indonésiens ainsi que l'état d'avancement du projet. Les moyens de fonctionnement pour l'approvisionnement en produits chimiques reste limités. L'extraction d'ARNs à partir de latex est d'ores et déjà acquise et l'obtention d'un protocole d'extraction d'ARNs à partir de feuille et d'écorce est en cours d'obtention. Une liaison entre l'IRRI et l'IBRIEC, pour les transferts de matériel, peut se faire tous les 15 jours grâce aux déplacements réguliers du Dr. Siswanto. De mon point de vue, les équipes indonésiennes sont motivées et possèdent toutes les compétences pour mener à bien ce projet. Il est important de les aider au niveau des moyens de fonctionnement et de soutenir des missions de formation. A Sembawa, une centrifugeuse réfrigérée avec plusieurs types de rotor est nécessaire pour pouvoir faire les extractions sur place. D'autres protocoles faciles à utiliser (TriReagent et Plant Reagent) seront testés à Montpellier.

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette

ANNEXES

Annexe 1

Liste des produits amenés

Pour Kuswanhadi
RNAeasy Plant Mini Kit (50 extractions, Qiagen)
RNA later (500 ml, Ambion)
Amorces Actines-ACO-ACS
LiCl (poudre dans 1 tube de 50 ml)
Tris (poudre dans 1 tube de 50 ml)
EDTA (poudre dans 1 tube de 50 ml)
SDS 20% (200 ml)
Consommables (tube eppendorf 1,5 et 2 ml, tube à visse, 1 sac de pipette stérile 10 ml, tube de 13 et 50 ml)
Eau Merck (4 tubes de 50 ml)
Générateur (Consort)
Bondonne d'azote 10 litres (Bioblock)

Pour Bogor
RT, RNAse inhibitor et DNAse
Taq polymerase du labo

Annexe 2

Protocole d'extraction avec le kit Qiagen

Protocol: Purification of Total RNA from Plant Cells and Tissues and Filamentous Fungi

This protocol requires the RNeasy Plant Mini Kit.

Determining the correct amount of starting material

It is essential to use the correct amount of starting material in order to obtain optimal RNA yield and purity. A maximum amount of 100 mg plant material or 1 x 10^7 cells can generally be processed. For most plant materials, the RNA binding capacity of the RNeasy spin column and the lysing capacity of Buffer RLT will not be exceeded by these amounts. Average RNA yields from various plant materials are given in Table 2 (page 19).

If there is no information about the nature of your starting material, we recommend starting with no more than 50 mg plant material or 3–4 x 10^6 cells. Depending on RNA yield and purity, it may be possible to use up to 100 mg plant material or up to 1 x 10^7 cells in subsequent preparations.

Do not overload the RNeasy spin column, as this will significantly reduce RNA yield and quality.

Counting cells or weighing tissue is the most accurate way to quantitate the amount of starting material. As a guide, a 1.5 cm diameter leaf disc weighs 25–75 mg.

Important points before starting

- If using the RNeasy Plant Mini Kit for the first time, read "Important Notes" (page 18).
- If working with RNA for the first time, read Appendix A (page 63).
- Fresh or frozen tissues can be used. Tissues can be stored at –70°C for several months. Flash-freeze tissues in liquid nitrogen, and immediately transfer to –70°C. Do not allow tissues to thaw during weighing or handling prior to disruption in Buffer RLT. Homogenized tissue lysates from step 4 can also be stored at –70°C for several months. Incubate frozen lysates at 37°C in a water bath until completely thawed and salts are dissolved before continuing with step 5. Avoid prolonged incubation, which may compromise RNA integrity.
- The RNeasy Plant Mini Kit provides a choice of lysis buffers: Buffer RLT and Buffer RLC, which contain guanidine thiocyanate and guanidine hydrochloride, respectively. In most cases, Buffer RLT is the lysis buffer of choice due to the greater cell disruption and denaturation properties of guanidine thiocyanate. However, depending on the amount and type of secondary metabolites in some tissues (such as milky endosperm of maize or mycelia of filamentous fungi), guanidine thiocyanate can cause solidification of the sample, making extraction of RNA impossible. In these cases, Buffer RLC should be used.

- Buffer RLT may form a precipitate upon storage. If necessary, redissolve by warming, and then place at room temperature (15–25°C).
- Buffer RLT, Buffer RLC, and Buffer RW1 contain a guanidine salt and are therefore not compatible with disinfecting reagents containing bleach. See page 8 for safety information.
- Perform all steps of the procedure at room temperature. During the procedure, work quickly.
- Perform all centrifugation steps at 20–25°C in a standard microcentrifuge. Ensure that the centrifuge does not cool below 20°C.

Things to do before starting

- β-Mercaptoethanol (β-ME) must be added to Buffer RLT or Buffer RLC before use. Add 10 µl β-ME per 1 ml Buffer RLT or Buffer RLC. Dispense in a fume hood and wear appropriate protective clothing. Buffer RLT or Buffer RLC containing β-ME can be stored at room temperature for up to 1 month.
- Buffer RPE is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add 4 volumes of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- If performing optional on-column DNase digestion, prepare DNase I stock solution as described in Appendix D (page 69).

Procedure

1. **Determine the amount of plant material. Do not use more than 100 mg.**

   Weighing tissue is the most accurate way to determine the amount.

2. **Immediately place the weighed tissue in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into an RNase-free, liquid-nitrogen–cooled, 2 ml microcentrifuge tube (not supplied). Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw. Proceed immediately to step 3.**

   RNA in plant tissues is not protected until the tissues are flash-frozen in liquid nitrogen. Frozen tissues should not be allowed to thaw during handling. The relevant procedures should be carried out as quickly as possible.

3. **Add 450 µl Buffer RLT or Buffer RLC** (see **"Important points before starting"**) **to a maximum of 100 mg tissue powder. Vortex vigorously.**

   A short 1–3 min incubation at 56°C may help to disrupt the tissue. However, do not incubate samples with a high starch content at elevated temperatures, otherwise swelling of the sample will occur.

Note: Ensure that β-ME is added to Buffer RLT or Buffer RLC before use (see "Things to do before starting").

4. **Transfer the lysate to a QIAshredder spin column (lilac) placed in a 2 ml collection tube, and centrifuge for 2 min at full speed. Carefully transfer the supernatant of the flow-through to a new microcentrifuge tube (not supplied) without disturbing the cell-debris pellet in the collection tube. Use only this supernatant in subsequent steps.**

   It may be necessary to cut off the end of the pipet tip to facilitate pipetting of the lysate into the QIAshredder spin column. Centrifugation through the QIAshredder spin column removes cell debris and simultaneously homogenizes the lysate. While most of the cell debris is retained on the QIAshredder spin column, a very small amount of cell debris will pass through and form a pellet in the collection tube. Be careful not to disturb this pellet when transferring the lysate to the new microcentrifuge tube.

5. **Add 0.5 volume of ethanol (96–100%) to the cleared lysate, and mix immediately by pipetting. Do not centrifuge. Proceed immediately to step 6.**

   Note: The volume of lysate may be less than 450 µl due to loss during homogenization.

   Note: Precipitates may be visible after addition of ethanol. This does not affect the procedure.

6. **Transfer the sample (usually 650 µl), including any precipitate that may have formed, to an RNeasy spin column (pink) placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at ≥8000 x *g* (≥10,000 rpm). Discard the flow-through.***

   Reuse the collection tube in step 7.

   If the sample volume exceeds 700 µl, centrifuge successive aliquots in the same RNeasy spin column. Discard the flow-through after each centrifugation.*

   Optional: If performing optional on-column DNase digestion (see "Eliminating genomic DNA contamination", page 23), follow steps D1–D4 (page 69) after performing this step.

7. **Add 700 µl Buffer RW1 to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at ≥8000 x *g* (≥10,000 rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.***

   Reuse the collection tube in step 8.

Note: After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Be sure to empty the collection tube completely.

Skip this step if performing optional on-column DNase digestion (page 69).

8. **Add 500 µl Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at ≥8000 x *g* (≥10,000 rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.**

   Reuse the collection tube in step 9.

   Note: Buffer RPE is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer RPE before use (see "Things to do before starting").

9. **Add 500 µl Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at ≥8000 x *g* (≥10,000 rpm) to wash the spin column membrane.**

   The long centrifugation dries the spin column membrane, ensuring that no ethanol is carried over during RNA elution. Residual ethanol may interfere with downstream reactions.

   Note: After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Otherwise, carryover of ethanol will occur.

10. **Optional: Place the RNeasy spin column in a new 2 ml collection tube (supplied), and discard the old collection tube with the flow-through. Close the lid gently, and centrifuge at full speed for 1 min.**

    Perform this step to eliminate any possible carryover of Buffer RPE, or if residual flow-through remains on the outside of the RNeasy spin column after step 9.

11. **Place the RNeasy spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30–50 µl RNase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at ≥8000 x *g* (≥10,000 rpm) to elute the RNA.**

12. **If the expected RNA yield is >30 µg, repeat step 11 using another 30–50 µl RNase-free water, or using the eluate from step 11 (if high RNA concentration is required). Reuse the collection tube from step 11.**

    If using the eluate from step 11, the RNA yield will be 15–30% less than that obtained using a second volume of RNase-free water, but the final RNA concentration will be higher.

Annexe 3

Protocole mis au point pour l'hévéa

Ce protocole a été utilisé pour le latex mais le sera aussi pour les feuilles et les écorces.

To avoid contaminations with RNAses, use only sterile disposable plastic ware, or plastic ware treated with DEPC and autoclaved (see procedure hereafter). The glassware should be heat-sterilized at 150°C for 2 hours. All solutions should be made RNAse-free (treated with DEPC or made with DEPC-treated water) and autoclaved. Gloves should be worn at all time.

Latex collection

Use leaks that have been sterilized in an oven (150°C) for 2 hours (or overnight). Wear gloves.

The 20 first drops of latex (or more if it contains a lot of debris) should be discarded.

The latex is collected in sterile Falcon tubes containing 2 x extraction buffer (1 vol. latex / 1 vol. buffer). Routinely, we collect 6 ml of latex in 15 ml Falcon tubes containing 6 ml of buffer.

It is important to **carefully shake the tubes during latex collection** so that the latex is properly mixed with the buffer (to protect RNA from degradation by RNAses).

After collection, the tubes should be immediately frozen in liquid nitrogen, for transportation, then kept in a deep-freezer (-70°C) until use.

RNA Extraction

1. Thaw the latex samples in a water bath at 50°C (as briefly as possible) and transfer them into centrifuge tubes.

2. Centrifuge for 30 min at 15,000 g, 20°C.

3. Collect the "white fraction" and transfer it into 50 ml Falcon tubes.

4. Add 1 volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1; v/v/v) saturated with DEPC water. Mix well (hand shaking or electric shaker) at room temperature, for 15 min. Transfer to 30 ml Corex tubes.

5. Centrifuge for 15 min at 10 000 g, 4°C.

6. Collect the acqueous (upper) phase into 50 ml Falcon tubes. Add 1 volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1; v/v/v) saturated with DEPC water. Mix well (electric shaker), at 4°C (in a cold room or in ice), during 15 min. Transfer to 30 ml Corex tubes.

7. Centrifuge for 15 min at 10 000 g, 4°C.

8. Collect the acqueous phase into 50 ml Falcon tubes and repeat step 6.

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette

9. Centrifuge for 15 min at 10 000 g, 4°C.

10. Collect the acqueous (upper) phase into 50 ml Falcon tubes. Add 1 volume of chloroform/isoamyl alcohol (24/1; v/v/v) saturated with DEPC water.
    Mix well (electric shaker), at 4°C (in a cold room or in ice), during 15 min. Transfer to 30 ml Corex tubes.

11. Centrifuge for 10 min at 10 000 g, 4°C.

12. Collect the acqueous phase and volume it precisely. Transfer into 15 ml Corex tubes. Add 1/3 volume of LiCl 8M, mix by inverting tube (closed with parafilm) several times and keep overnight at 4°C.

13. Centrifuge for 30 min, at 10 000 g, 4°C.

14. Remove the supernatant (beeing carefull not to loose the RNA pellet) and drain off the liquid by inverting the tube onto tissue paper for a few minutes. Then keep on ice.

15. Add 400 µl of DEPC water, on ice. Shake periodically to help to dissolve the RNA pellet.

16. Transfer the RNA solution into 1.5 ml microcentrifuge tubes. Add 400 µl phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1; v/v/v) and mix thoroughly.

17. Centrifuge for 15 min at maximum speed (13 000 g), 4°C.

18. Collect the acqueous phase, beeing carefull not to drag up any of the phenolic phase.

19. Add 40 µl Na acetate 3M pH 5.2 and 1 ml absolute ethanol, to precipitate the RNA. Keep overnight (or longer) at -20°C.

19. Centrifuge for 30 min at maximum speed (13 000 g), 4°C. Discard the supernatant. Rinse with 1 ml 70 % ethanol and centrifuge for 10 min at maximum speed (13 000 g), 4°C. Discard the supernatant and dry the pellet in a speed-vac. Resupend in 100 µl DEPC water, on ice.

    For long term conservation, the RNA should be kept precipitated in ethanol at -20 °C.

Treatment with diethylpyrocarbonate (DEPC)

Solutions : Add DEPC for a final concentration of 0.1 % (v/v). Stir (with a magnetic stirrer) for at least 1 h (or overnight). Autoclave.

Plasticware: Soak in water containing 0.1 % DEPC, with stiring (magnetic stirer), overnight. Remove from the water and autoclave.

RNAse-free stock solutions :

Use molecular biology grade chemicals. Avoid using spatula.

Tris-HCL pH 9: 1 M

As **Tris-HCl, cannot be mixed with DEPC**, the Trizma base powder is dissolved in DEPC-treated water in an RNAse free container, the pH is ajusted to 9 with HCl, then the solution is autoclaved.

EDTA pH 8 0.5 M

Can be treated with DEPC and then autoclaved

LiCl (Lithium chloride) 8 M

Can be treated with DEPC and then autoclaved

SDS (Sodium dodecyl sulfate, or Lauryl sulfate) 20 % (w/v)

As **SDS cannot be autoclaved**, prepare the stock solution with sterile DEPC water in an RNAse-free container. No need to autoclave.

2 x extraction buffer:

Tris-HCl pH 9	100 mM
EDTA pH 8	10 mM
LiCl	300 mM
SDS	10 %

Use Rnase-free stock solutions described above. Mix everything with autoclaved DEPC water in an RNAse-free container.

H_2O-saturated phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1; v/v/v).

Allways wear gloves, lab coat and protection glasses when using these organic solvents and work under a chemical hood.

H_2O-saturated phenol:

Cover the cristallized phenol with about half volume of autoclaved DEPC water. Warm it (at 50°C) until liquid. Add about 0.1 % (w/v) hydroxyquinoleine and 1 volume of sterile DEPC water. Mix thoroughly.

Leave at room temperature until the separation of the two phases is complete (under the chemical hood).

Discard the non-absorbed water (upper phase). Repeat the operation 3 times. Discard the water as much as possible.

Chloroform/isoamyl alcohol (24/1; v/v).

Mix 24 volumes of chloroforme with 1 volume of isoamyl alcohol.

H2O-saturated Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1; v/v/v).

Mix one volume of H_2O-saturated phenol with one volume of chloroforme/isoamyl-alcohol (24/1). Leave it at room temperature until the too phases are separated. Discard the upper water phase.

Keep at room temperature if you plan to use quickly (within a month), otherwise, keep at 4°C.

Annexe 4

Protocole mis au point sur le cacaoyer

One gram of tissue, mixed with 1.5%polyvinylpirrolidone was ground by hand using a pestle and mortar in the presence of liquid nitrogen. The powder was transferred to a 50 ml tube, resuspended in 15 ml of preheated (65°C) extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.2, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2 % (w/v)CTAB, and 75 µl of β-mercaptoethanol) and homogenized in a warring blender at maximum speed for two minutes. The tubes were kept at room temperature for 5 min and then an equal volume of chloroform: isoamyl alcohol (24:1) was added. The mixture was shaken vigorously until an emulsion was formed, and then centrifuged at 12,000 g for 15 min at room temperature. The upper aqueous phase containing nucleic acids and polysaccharides was carefully transferred to a new tube, and extracted subsequently with phenol, phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1), and chloroform: isoamyl alcohol (24:1), each time followed by centrifugation at 12,000 g for 15 min. The aqueous phases were transferred to new tubes and 10 M LiCl was added to a final concentration of 2 M. The RNA was allowed to precipitate overnight at 4°C and then recovered by centrifugation at 17,000 g at 4°C for 30min. The pellet was dissolved in milliQ grade water and was extracted with phenol, phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1), and chloroform: isoamylalcohol (24:1), respectively each time followed by centrifugation 12,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant was transferred to a new tube and RNA was precipitated with 0.1 volumes of 3 M sodium acetate pH 5.8 and 3 volumes of 100 % ethanol at –70°C for 4 hrs to overnight. The RNA was recovered by centrifugation at 17,000 g in a microfuge at 4°C for 30 min. The pellet was washed with an equal volume of 70% cold ethanol, the ethanol was allowed to evaporate at room temperature for 15 min, and the purified RNA pellet was then resuspended in an appropriate volume of nuclease-free water.

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette