

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Contribution à l'amélioration de la réponse hypersensible chez *Chicorium Intybus* L.

VERSTRAETE, Philippe

*Award date:*  
2002

[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.



---

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**CONTRIBUTION À L'AMÉLIORATION DE LA RÉPONSE HYPERSENSIBLE CHEZ  
*CICHORIUM INTYBUS L.***

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

Philippe VERSTRAETE

Juin 2002

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
FACULTE DES SCIENCES  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## CONTRIBUTION À L'AMÉLIORATION DE LA RÉPONSE HYPERSENSIBLE CHEZ *CHICORIUM INTYBUS L.*

VERSTRAETE Philippe

### Résumé

Les espèces actives d'oxygène (ROS), et en particulier le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sont impliquées de diverses façons dans les mécanismes de défense des plantes, et plus précisément dans le déroulement de la Réponse Hypersensible (HR). La HR ne se déclenchant pas toujours chez la chicorée, l'apport d'un nouveau moyen de production du peroxyde d'hydrogène indépendant de la HR a été réalisé lors d'un mémoire précédent. Ces recherches ont permis d'obtenir des plantes transformées exprimant constitutivement la glucose oxydase (GO). Bien que la faisabilité d'une expression constitutive de la GO chez la pomme de terre ait été démontrée, l'expression constitutive de cette enzyme chez la chicorée entraîne la mort des transformants.

La solution proposée par ce mémoire a été de placer la GO sous le contrôle d'un promoteur inductible intervenant dans la défense des plantes de telle manière que l'expression de l'enzyme n'aura lieu qu'en présence d'un agent pathogène. Pour ce faire, deux plasmides ont été construits pour transformer la chicorée avec *Agrobacterium tumefaciens*; ils portent des promoteurs inductibles de protéines PR (Pathogenesis-Related) du tabac et du persil, sensibles à l'acide salicylique et à de nombreux stress biotiques. Les différentes constructions ont été réalisées dans le plasmide pGreen appartenant à une nouvelle génération de plasmides binaires. Des plants de chicorée ont été transformés et sont actuellement en phase de régénération.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

**Promoteur:** J. Messiaen

En premier lieu, je tiens à remercier particulièrement le professeur Pierre Van Cutsem de m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir permis d'y réaliser ce mémoire

Je tiens aussi à remercier tous les membres du jury pour avoir consacré une partie de leur temps à la lecture de ce travail

Un grand merci à Johan Messiaen pour m'avoir encadré tout au long de ce mémoire, de ses connaissances et de sa bonne humeur

Merci à tous ceux qui sont passés par l'unité pour leur aide, conseils, rires et grande disponibilité

Merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ces quatre années aux facultés, et tout particulièrement à ceux de mon année

Enfin, un grand merci à mes parents, à ma sœur et à mon frère pour leur soutien constant malgré les distances physiques qui nous séparent

## Table des matières

<b>I. Introduction</b>	8
<b>Premier Chapitre : Les Défenses des Plantes</b>	8
Les pathogènes de plantes	8
La paroi végétale	9
Structure de la paroi	10
La paroi cellulaire et la défense des végétaux:	14
Les éliciteurs	16
L'interaction plante-pathogène en particulier	17
Les défenses des plantes	19
Dégâts mécaniques:	19
Dégâts chimiques:	20
L'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et la Réponse Hypersensible	25
Généralités	25
Particularités de la HR par rapport aux autres mécanismes de défense	25
Les ROS et le choc oxydatif dans la réponse hypersensible	25
L'induction de la HR, de la SAR et le mécanisme de défense	28
<b>Deuxième Chapitre : La Transformation Végétale</b>	31
Les méthodes de transformation des végétaux	31
La transformation par Agrobacterium	32
Des plasmides Ti aux plasmides binaires	34
Historique de l'évolution des plasmides binaires	35
Diminution en taille	35
Flexibilité :	37
Accessibilité et information :	37
Nouveautés :	37
Un plasmide Ti sur mesure :	38
Le système pGreen.	38
La construction de pGreen :	39
La construction de pSoup :	39
Les cassettes :	39
Transformation d'Agrobacterium :	41
Efficacité de pGreen en transgénèse végétale :	41
<b>Objectifs du mémoire</b>	42
<b>II. Matériel et Méthodes</b>	43
<b>Premier Chapitre : Matériel</b>	44
Culture de chicorée	44
a) Milieu de culture à base de sels de "Murashige & Skoog"	44
b) Stérilisation d'akènes de chicorée industrielle	44
c) Dépôt d'akènes sur milieu MS:	45
Culture d'E. coli	45

a) Milieu LB liquide (ou solide):	45
b) Milieu SOC:	45
c) Transformation de bactéries TOP 10F' par choc thermique	45
Culture d'Agrobacterium	46
a) Préparation de cellules Agrobacterium tumefaciens LBA 4404 électro-compétentes.	46
b) Préparation de cellules Agrobacterium tumefaciens "VirG" électro-compétentes.	47
<b>Deuxième Chapitre : Méthodes</b>	<b>47</b>
1. Méthodes relatives aux acides nucléiques	47
a) Miniprep d'ADN plasmidique:	47
b) Midiprep d'ADN plasmidique:	48
c) Maxiprep d'ADN plasmidique:	49
d) Electrophorèse d'Acides Désoxyribonucléiques	50
e) Extraction d'ADN d'un gel d'électrophorèse (Protocole QIAEX)	52
f) Purification d'ADN sur colonne « Microcon » :	52
g) Purification d'ADN par « QIAquick PCR purification kit »	53
h) Purification d'ADN par « QIAquick nucleotide removal kit »:	53
i) Concentration d'ADN en solution par précipitation à l'alcool	55
j) Réaction de ligation	55
k) Remplissage de site de restriction (protocole « Klenow »):	56
m) Réaction de séquençage :	56
n) Quantification d'ADN par spectrophotométrie:	58
o) Amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) avec la TaqPolymérase:	59
<b>III. Résultats et discussion</b>	<b>61</b>
<b>Rappel du cadre et des objectifs du travail</b>	<b>62</b>
<b>Constructions disponibles :</b>	<b>62</b>
Glucose Oxydase (GO) d'Aspergillus niger:	62
Les promoteurs inductibles :	62
Promoteur 35S (422 bp):	63
Terminateur de la Nopaline Synthase (tNOS):	63
<b>Clonage des nouveaux inserts dans pCRII</b>	<b>63</b>
Définition de nouvelles amorces	63
Amplification des fragments	65
Clonage dans pCRII et sélection des transformants	65
Séquençage des inserts	67
<b>Clonage de la GO dans le vecteur pGreen</b>	<b>67</b>
Obtention et restriction du vecteur pGreen	67
Restriction du plasmide PCRII-GO	67
Obtention du plasmide pGreen-GO	68
<b>Clonage du terminateur tNOS dans le vecteur pGreen-GO</b>	<b>69</b>
Isolement et restriction du terminateur tNOS	69
Restriction de pGreen-GO	70
Clonage du terminateur tNOS dans le vecteur pGreen-GO	71
Vérification du clone 6 par PCR	71
Restriction diagnostique du clone 6	72
<b>Clonage des promoteurs dans le plasmide pGreen-GO-tnos.</b>	<b>72</b>

Restriction de pGreen-GO-tnos _____	72
Isolement des promoteurs à partir du plasmide pCRII _____	72
Clonage des promoteurs dans pGreen-GO-tnos restreint _____	77
<b>Introduction de la cassette de sélection nos-kan dans le T-DNA _____</b>	<b>80</b>
Amplification, extraction et restriction de la cassette nos-kan _____	80
Ligation de la cassette nos-kan dans les plasmides pGreen-promoteur-GO-tnos _____	80
<b>Co-Electroporation de pSoup et pGreen-promoteur-noskan d'Agrobacterium tumefaciens _____</b>	<b>82</b>
pSoup _____	82
pGreen _____	82
<b>Transformation de la chicorée _____</b>	<b>82</b>
<b>IV. Discussion Générale et perspectives _____</b>	<b>84</b>
<b>Bibliographie _____</b>	<b>87</b>

# I. INTRODUCTION

# **I. Introduction**

## **Premier Chapitre : Les Défenses des Plantes**

### **Les pathogènes de plantes**

Dans son environnement naturel, une plante est en contact avec le sol et l'atmosphère. Cette distinction se retrouve dans la physiologie de la plante, puisque la partie aérienne a un rôle et un fonctionnement très différent de la partie souterraine. Par exemple la photosynthèse se déroule dans les tissus aériens contenant la chlorophylle (typiquement les feuilles) alors que les organes de stockage (tels que les tubercules) se retrouvent dans le sol. Ces deux milieux offrent des voies d'entrée à différents pathogènes. La partie souterraine sert de voie d'entrée aux bactéries (telles que *Agrobacterium*), nématodes et vers du sous-sol. Par contre des insectes phytophages, piqueurs-suceurs et herbivores en tous genres emprunteront la voie de la partie aérienne. Le cas des virus est particulier de par leur dépendance vis à vis d'autres organismes pour survivre. Ils sont le plus souvent véhiculés à la plante par d'autres pathogènes, tels que les insectes piqueurs-suceurs.

Les moyens mis en œuvre pour attaquer les plantes varient énormément d'une espèce de pathogène à l'autre. Il est possible de distinguer les pathogènes capables d'entrer spontanément (par eux-mêmes) dans la plante de ceux qui, pour entrer, nécessitent une blessure préalable de la plante. Une blessure dans ce cas peut être n'importe quelle lésion qui expose les tissus de la plante qui sont normalement inaccessibles au pathogène. Il s'agit par exemple d'une branche brisée, ou d'une blessure causée par un autre pathogène, un herbivore par exemple. Ces blessures permettent aux pathogènes de passer outre les premières barrières physiques mises en place par la plante. Les barrières en question sont, par exemple, la cuticule des feuilles, l'écorce ou l'épiderme des racines. Indépendamment du mode d'entrée, la dernière barrière physique rencontrée par les pathogènes est la paroi cellulaire végétale.

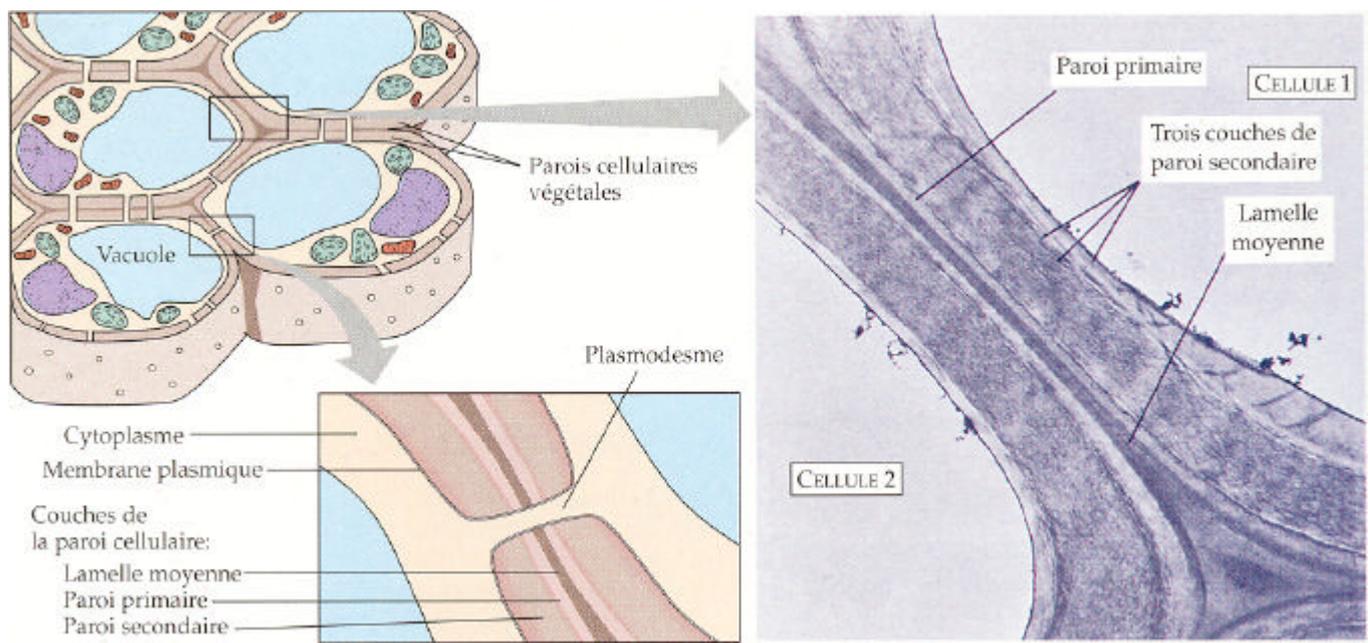


Figure I.1: Schéma représentant la paroi cellulaire végétale (en bas à gauche) et son observation au microscope électronique à transmission (à droite).

## La paroi végétale

### 2.1. Structure de la paroi

La formation de la paroi végétale se fait en une ou deux étapes. Les jeunes cellules végétales produisent une paroi « primaire », séparant leurs membrane plasmique de la lamelle mitoyenne. Lors de sa différenciation, la cellule peut produire une deuxième paroi (dite « secondaire ») entre la membrane plasmique et la paroi primaire (figure I.1). Cette paroi secondaire se dépose souvent en plusieurs couches, et est la composante principale du bois.

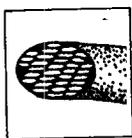
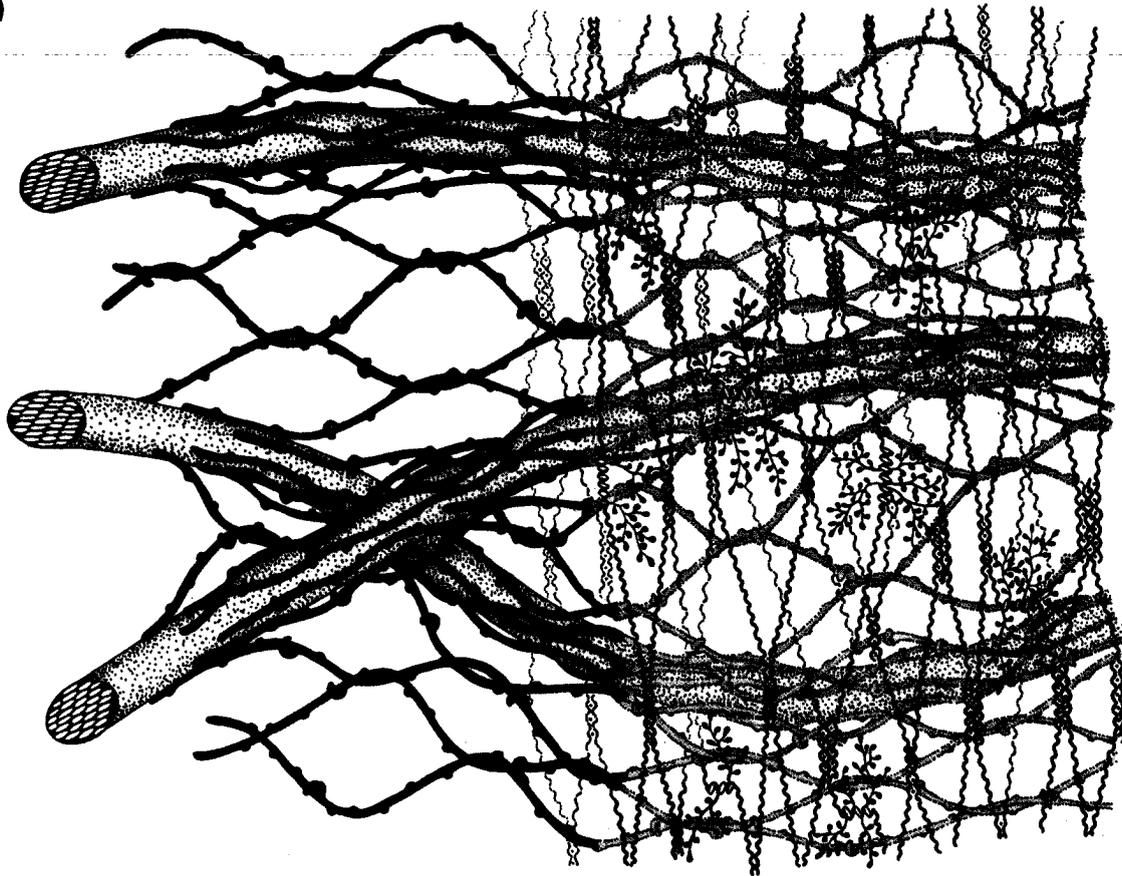
Deux modèles de la paroi primaire végétale ont été élaborés, appelés « type 1 » et « type 2 » (Carpita *et al* 1993). Le modèle de type 1 représente la paroi cellulaire des dicotylées, mais est également valable chez quelques monocotylées. Le modèle de type 2 quant à lui ne se retrouve que chez des monocotylées.

La paroi cellulaire est composée de carbohydrates et de protéines. Les carbohydrates sont: la cellulose, les xyloglucanes ou encore les pectines (figure I.2).

La cellulose est un long polymère non ramifié de résidus D-glucose liés en  $\beta$ (1-4). De nombreuses molécules de cellulose s'assemblent pour former une structure appelée microfibrille, et plusieurs microfibrilles s'associent pour former une fibrille (figure I.3). Ces fibrilles, qui enrobent la cellule et forment la « matrice cellulosique », sont synthétisées à partir de complexes enzymatiques membranaires parcourant la membrane plasmique de la cellule. L'orientation du dépôt des fibrilles dépend donc du mouvement de ces complexes.

Les Xyloglucanes (XG) sont, comme la cellulose, des chaînes de  $\beta$ (1-4) D-glucose mais ont, en plus, des résidus xylosyl en liaison O-6 à intervalles réguliers comme illustré à la figure I.2(b). L'unité de base des XG, qui est répétée de nombreuses fois dans leur structure, est une suite non ramifiée de trois résidus glucosyl chacun greffé d'un résidu  $\beta$ -D-xylosyl. Ces unités de base sont attachées en chaînes linéaires espacées d'un résidu glucosyl sans  $\beta$ -D-xylosyl. D'autres sucres peuvent être ajoutés, tels que le  $\beta$ -D-galactose,  $\beta$ -L-arabinose et  $\beta$ -L-fucose. Un seul côté du squelette des XG peut se lier intimement aux fibrilles de cellulose, ce qui leur confère une orientation préférentielle lorsqu'ils sont liés aux fibrilles. Les XG peuvent également se lier entre eux afin d'attacher les microfibrilles de cellulose ensemble, empêcher qu'elles se superposent et compléter la matrice cellulosique (figure I.2).

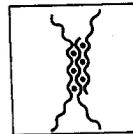
(a)



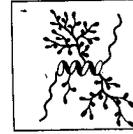
Fibrille de cellulose



Xyloglucan



PGA junction zone



RG I with arabinogalactan side-chains

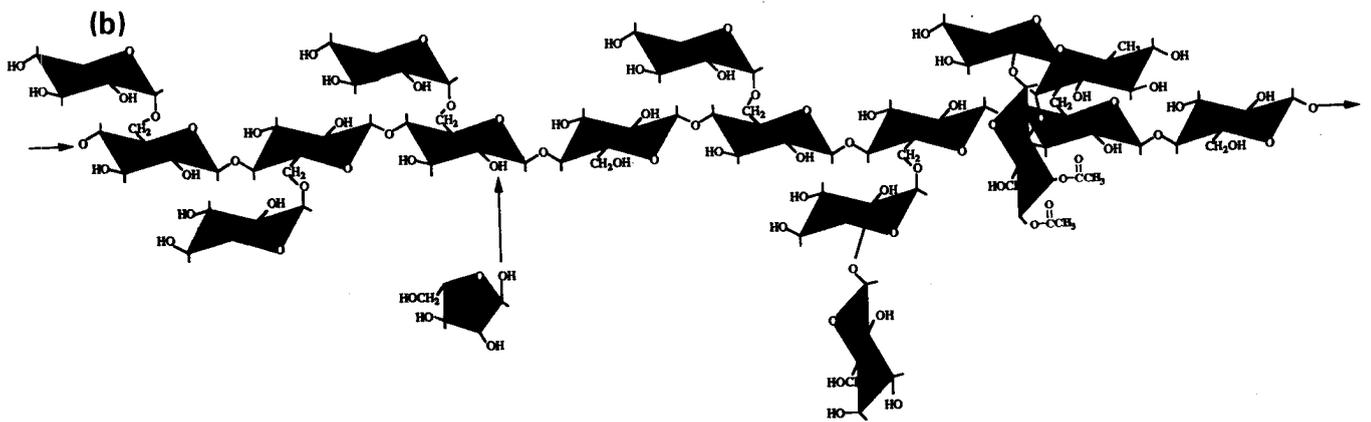


Figure I.2: (a) structure générale de l'agencement des principaux constituants de la paroi cellulaire de type 1. (b) illustration des Xyloglucanes, des liaisons en b 1-4 (flèches de gauche et droite) et la ramification en O-6 (flèche du centre).

Les pectines, formant le « réseau de polysaccharides pectiques », ont deux constituants principaux: les acides polygalacturoniques (PGA) et les rhamnogalacturonanes I (RG I). Les PGA sont des homopolymères d'acide (1-4)-D-galactosyluronique (GalA), alors que les RG I sont des hétéropolymères de GalA et de résidus (1-2)-L-rhamnosyl. Les rhamnogalacturonanes portent des chaînes latérales qui peuvent être de trois types: arabinanes, arabinogalactanes de type I ou arabinogalactanes de type II (figure 1.4).

Les principales protéines structurales de la paroi végétale se divisent en 5 classes (Showalter 1993) : les Extensines, les GRP (Glycine Rich Proteins), les PRP (Proline Rich Proteins), les lectines et les AGP (Arabinogalactan Proteins). Toutes les protéines de la paroi ne se retrouvent pas dans ces 5 classes. En effet, les plantes produisent et sécrètent également des enzymes dans la paroi cellulaire. Ces enzymes sont capables de dégrader les constituants de la paroi afin de la remodeler (par exemple, lors de la croissance cellulaire).

Les extensines forment une famille de protéines HRGP (Hydroxyproline-Rich Glycoprotein) qui sont présentes dans les parois de plantes supérieures. Leur expression est dépendante d'une multitude de signaux (signaux de croissance et division cellulaire ainsi que de lésions et attaques de pathogènes), comme la plupart des protéines structurales, et est spécifique du tissu, voire de la cellule. La localisation de ces protéines varie également selon la plante, le tissu, et même la cellule, en accord avec les différentes fonctions des types cellulaires et tissulaires (Showalter 1993). Dès leur sécrétion dans l'espace extracellulaire, les extensines deviennent rapidement insolubles. Ceci rend difficile leur étude, mais représente un moyen très rapide de défense qui renforce la paroi cellulaire par dépôt de protéines et augmentation de leurs liens (covalents et ioniques) aux carbohydrates de la paroi.

Les GRP sont caractérisées par une structure primaire répétitive qui peut contenir jusqu'à 70 % de glycine, d'où leur nom. La plupart de ces GRP ont des séquences signal qui les acheminent vers la paroi, mais il y en a qui restent dans le cytosol, et certaines même qui ont une séquence de liaison à l'ARN (Strum 1992). Leur expression est, comme les extensines, induite par de nombreux signaux. Les GRP se retrouvent surtout dans les parois de cellules qui seront lignifiées par la suite, et sont co-localisées avec les

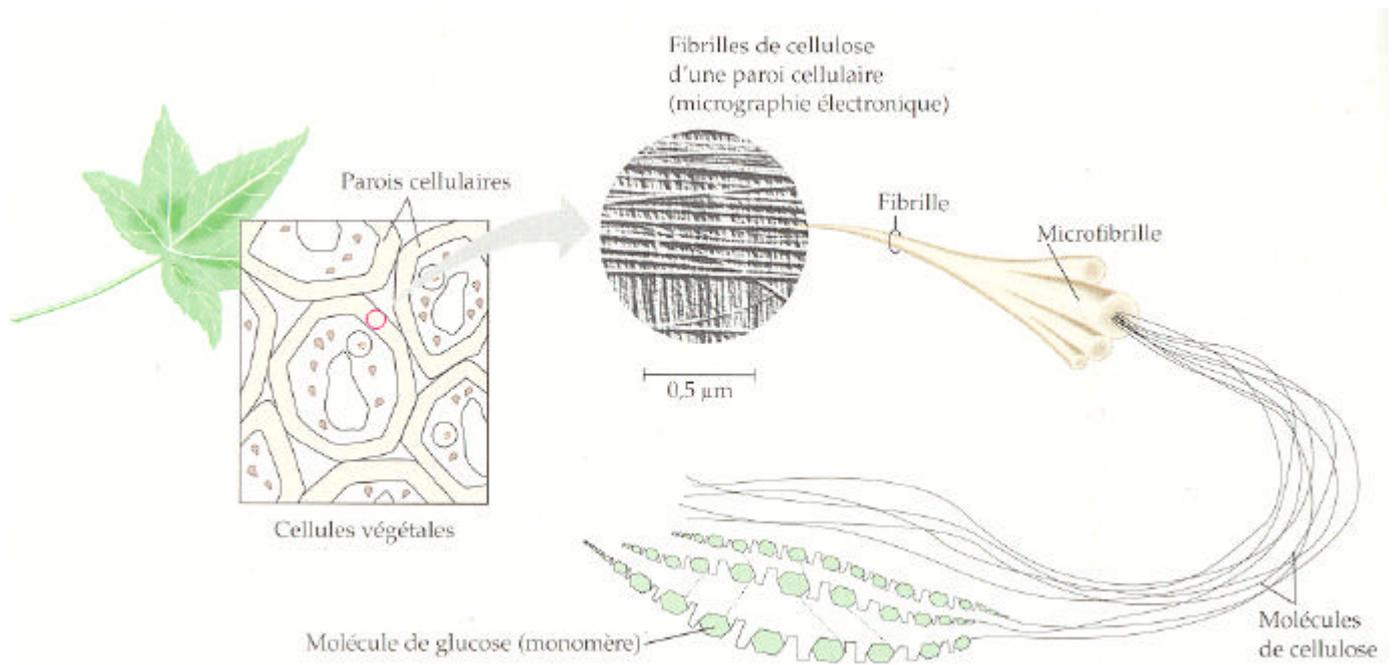


Figure I.3: Représentation de la structure et la composition de la matrice cellulosique.

PRP. Des liens entre GRP et d'autres protéines de la paroi sont probables, mais moins avec les extensines car ces dernières ne co-localisent pas.

De structure similaire aux extensines, les lectines peuvent avoir les mêmes types d'interactions avec les polysaccharides de la paroi, sauf les liaisons ioniques. Ces glycoprotéines auraient un rôle dans l'interaction intercellulaire, le transport de sucres, la réparation post-lésion, et la défense contre les pathogènes. Dans ce dernier cas, leur action serait d'immobiliser le pathogène en liant des oligomères (N-acetyl glucosamines) de sa surface.

La cinquième classe de protéines structurales est celle des arabinogalactanes protéines. Ces protéines sont en grande partie composées de carbohydrates, majoritairement des résidus D-galactose et L-arabinose. Leurs arbres glycosydiques permettent de nombreuses interactions avec les autres constituants de la paroi (Showalter 1993, Darjania *et al* 2001), et leur fonction est attribuée au développement (Van Hengel *et al* 2002).

La paroi primaire contient ainsi trois domaines structurels indépendants (Carpita *et al* 1993). Un domaine comprenant la matrice cellulosique et les XG associés, compte pour 50% de la masse de la paroi et est ancré dans un second domaine, le réseau de polysaccharides pectiques (30% de la masse de la paroi). Le troisième domaine indépendant est celui des protéines structurales. L'indépendance de ces domaines n'est que relative car les trois interagissent ensemble.

C'est donc la paroi primaire qui se retrouve face au milieu extracellulaire, et sera le lieu de prédilection des attaques de pathogènes, et donc de l'interaction de ces derniers avec la plante.

## 2.2.La paroi cellulaire et la défense des végétaux:

La paroi est la première structure cellulaire rencontrée par les agents pathogènes. Il n'est dès lors pas étonnant qu'elle ait un rôle primordial direct ou indirect dans la défense. Un exemple de la défense directe assuré par la paroi est sa fortification, qui consiste en une augmentation quantitative de ses constituants et des liens entre ceux-ci. La fortification de la paroi peut ainsi contribuer à mettre en place une résistance vis-à-vis

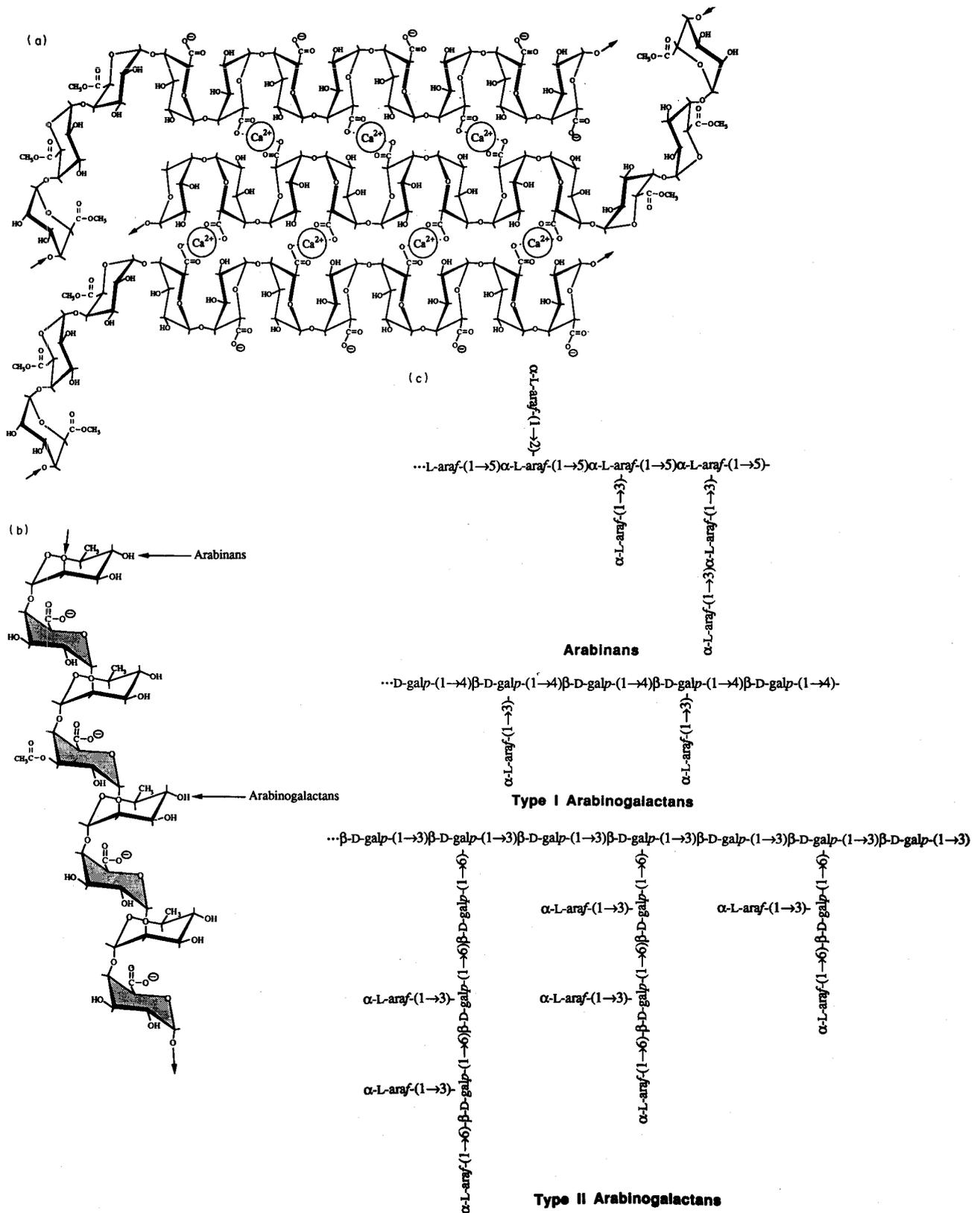


Figure I.4: Les pectines de la paroi cellulaire végétale. (a) PGA: leur structure permet la formation de zones jonctions en présence de calcium. Ces zones sont appelées "eggbox". (b) Structure des RGI et sites de liaison des ramifications. (c) Les trois types de chaîne latérale des RGI.

de plusieurs agresseurs de manière non spécifique. En imperméabilisant la paroi, la fortification réduit la disponibilité des nutriments pour le pathogène qui proviendraient d'une fuite du cytoplasme. De plus, l'acheminement des toxines et enzymes du pathogène vers la plante sera retardé (Hammond-Kosack 1996).

De nombreux pathogènes produisent ainsi des enzymes capables de dégrader les composants de la paroi végétale: polygalacturonases (PGs), cellulases ou xylanases attaquant respectivement les pectines, la cellulose ou les XG de la paroi. Les oligosaccharides résultant de l'action de certaines de ces enzymes peuvent exercer de manière indirecte une fonction signalétique dans l'induction de réponses de défense: on parle d'éliciteur.

### 2.3. Les éliciteurs

Les éliciteurs sont des molécules produites soit par l'agent pathogène, soit par la plante. Dans le premier cas, ils sont dits "exogènes"; dans le deuxième, "endogènes". Une fois produits, les éliciteurs sont reconnus par des récepteurs membranaires, et induisent une cascade de transduction du signal à l'intérieur de la cellule. Ce signal peut aboutir à une ou plusieurs réponses de défense, aussi bien au niveau cellulaire que systémique (figure 1.5 et point 5.3).

L'éliciteur endogène le mieux caractérisé est celui libéré par la dégradation de la paroi par des polygalacturonases. Les oligomères d'acide galacturonique libérés peuvent stimuler diverses réponses de défense ou augmenter les réponses déjà opérationnelles (Hammond-Kosack 1996). Les plantes produisent également des Protéines inhibitrices de Polygalacturonases (PGIPs) qui ralentissent l'action des PGs du pathogène, ce qui conduit à une dégradation incomplète des pectines. Ceci provoque l'accumulation d'oligomères de plus de 8 résidus d'acide galacturonique (oligogalacturonides) qui sont les seuls à pouvoir induire des réponses de défense en adoptant une conformation induite par le calcium ().

D'autres éliciteurs sont, par exemple, des peptides d'origine bactérienne ou fongique, l'eau oxygénée ou l'ozone; ou encore, des éliciteurs de synthèse tel que le BTH (benzothiadiazole) (Kohler *et al* 2002).

La variété des structures chimiques de ces éliciteurs constitue ainsi une première difficulté dans l'étude de la défense des plantes, auquel vient se superposer la complexité de la transduction du signal (Somssich *et al* 1998).

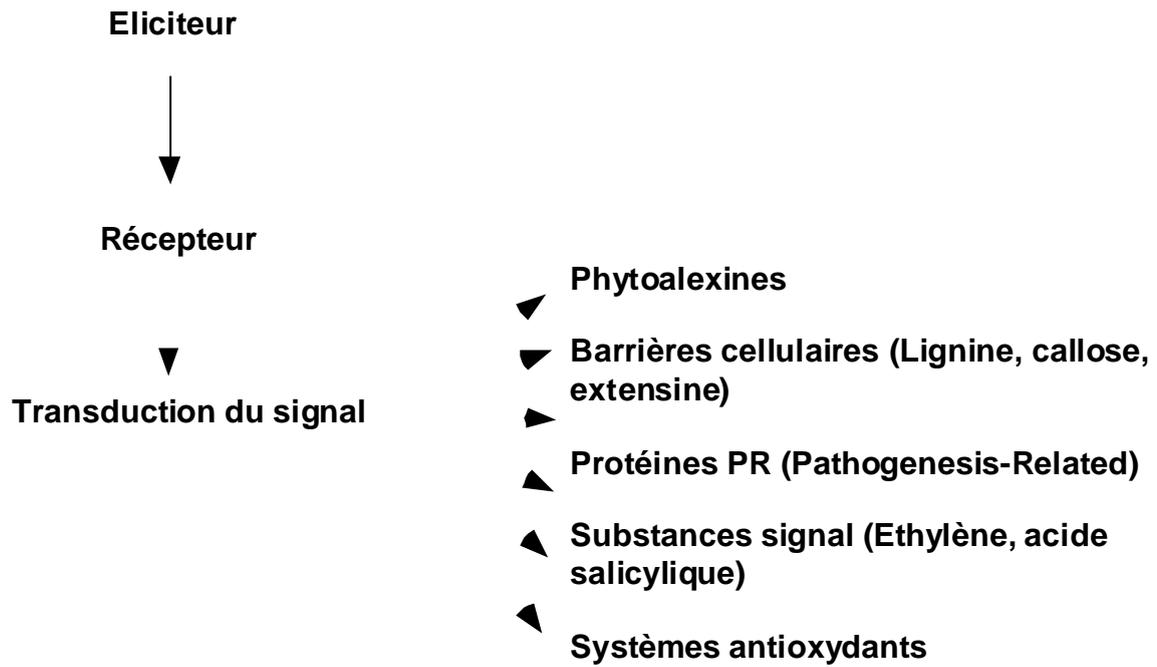


Figure I.5 : Schéma résumant l'induction de diverses réponses de défense par éliciteurs.

## L'interaction plante-pathogène en particulier

Cette interaction peut être de deux types : compatible (relativement rare) ou incompatible (très fréquente). Dans le premier cas, la plante subit l'attaque du pathogène et la maladie se développe. Le deuxième cas est celui d'une plante qui se défend de façon efficace, évitant l'apparition de la maladie. Les travaux de Flor (1946 et 1947) ont permis de postuler que l'incompatibilité dépend des caractères monogéniques dominants *R* et *Avr*, définissant la relation "gene for gene". L'incompatibilité dépend de la plante, par le produit du gène résistance (*R*) spécifique du cultivar, et du pathogène, par le gène d'avirulence (*Avr*) (Hammond-Kosack 1996). Toute autre combinaison d'allèles possédant au moins un de ces caractères sous forme récessive conduira à la compatibilité (la maladie chez la plante) (Esquerré-Tugayé 2001). La résistance est donc un phénomène défini génétiquement par l'interaction directe ou indirecte des produits des gènes *Avr* et *R* (Hammond-Kosack 1996).

L'étude des gènes d'avirulence n'a pas mis en évidence une forte homologie entre gènes de différentes espèces (Esquerré-Tugayé 2001). Par contre des homologies importantes ont été trouvées entre des gènes de résistance d'espèces distantes. Cette homologie s'explique par la présence de domaines communs (Esquerré-Tugayé 2001) tels que les LRR (Leucine Rich Repeats), NBS (Nucleotide Binding Sequences) ou LZ (Leucine Zipper). Ces domaines sont typiques de récepteurs membranaires, ce qui est en accord avec le rôle de récepteur des produits des gènes *R* et donc de l'interaction des produits des gènes *R* et *Avr*. Une interaction entre produits *R* et *Avr* permet la reconnaissance rapide d'intrus potentiels qui est un prérequis pour une réponse de défense efficace (Leister *et al* 2000). Un exemple de cette interaction a été matérialisé en 2000 (Leister et Katagiri 2000) par co-immunoprécipitation. Bien plus, montrant l'interaction directe d'un produit de gène *R* (RPS2) avec un produit de gène *Avr* (AvrRpt2), Leister et Katagiri (2000) ont également remarqué la présence d'une troisième protéine de 75 kDa dans le complexe RPS2/AvrRpt2. Lorsque les produits RPS2 et AvrRpt2 sont mis en présence de cette protéine, ils s'y lient. Ceci expliquerait une interaction indirecte, via la protéine de 75 kDa, des produits de gènes *R* et *Avr*.

Trois généralités peuvent être tirées de ces études: (i) L'expression d'une résistance ou d'une sensibilité chez l'hôte lors de l'interaction avec un pathogène dépend du génotype du pathogène; (ii) Le degré de pathogénicité de ce dernier est fonction du génotype de l'hôte (Crute *et al* 1996); (iii) Le degré d'incompatibilité qui en résulte dépend du couple de gènes *Avr* et *R* en question (Crute *et al* 1996).

Dans la nature, les plantes sont soumises continuellement aux attaques de pathogènes, mais les maladies sont peu fréquentes. Trois raisons pour lesquelles l'attaque d'un pathogène peut ne pas aboutir à une maladie chez la plante sont (Hammond-Kosack 1996) :

1. La plante ne peut fournir une niche, un environnement, adéquat pour le développement du pathogène en question. Dans ce cas la plante n'est pas un hôte convenable et le pathogène ne peut subsister.
2. Les barrières physiques préformées de la plante, ainsi que ses composés toxiques limitent les infections à certaines espèces de pathogènes.
3. Des systèmes de reconnaissance du pathogène et des mécanismes de défense sont mis en place et limitent la zone infectée. (voir interaction « gene for gene »).

Le corollaire de ces trois points est : L'attaque d'un pathogène ne donne lieu à une maladie chez la plante que si les barrières préformées sont inadéquates, que la plante ne détecte pas le pathogène, ou que les défenses activées sont inefficaces.

## **Les défenses des plantes**

Les attaques et dégâts occasionnés aux plantes peuvent être de nature mécanique ou chimique et les défenses des plantes peuvent être préexistantes ou induites.

### 4.1. Dégâts mécaniques

Les dégâts mécaniques majeurs sont dus aux herbivores. En effet, ces dégâts peuvent aller jusqu'à tuer la plante, voire même toute une culture.

#### Défenses préexistantes pour des dégâts mécaniques

Nombreuses espèces végétales sont munies de structures macroscopiques (par exemple des épines) qui servent dans la défense contre les herbivores de grande taille. L'accumulation de substances toxiques peut également servir de protection en conférant un mauvais goût à la plante ou rendant difficile sa digestion.

### Défenses induites suite à des dégâts mécaniques

Ces réponses induites sont typiquement la production de chitinases, glucanases et de substances volatiles. L'action des chitinases et glucanases est dirigée contre l'exosquelette des insectes qui peuvent être à l'origine des dégâts mécaniques. Des dégâts de ce type peuvent libérer des substances volatiles contenues dans le tissu végétal. Ces substances peuvent avoir comme fonction d'attirer un prédateur de l'agent pathogène, qui agirait donc en faveur de la plante (Han *et al* 2002).

### 4.2. Dégâts chimiques

Les dégâts chimiques sont occasionnés par des produits du pathogène et agissent au niveau de la paroi et/ou à l'intérieur de la cellule. Un exemple est celui des pectinases produites par des bactéries ou des champignons qui dégradent les pectines de la paroi végétale.

### Défenses préexistantes pour des dégâts chimiques

La paroi végétale en elle-même constitue une barrière physique et chimique qui peut empêcher le pathogène d'atteindre le cytoplasme. (Voir point 2)

### Défenses induites suite à des dégâts chimiques

Ces défenses sont nombreuses et leurs voies d'induction s'influencent parfois l'une l'autre, on parle de « cross-talking ».

### **Synthèse de lignine**

La lignine est un polymère de la paroi cellulaire surtout trouvé au niveau des tissus vasculaires et est le composant principal du bois. La voie de biosynthèse de la lignine se fait à partir de phénylalanine et fait partie du métabolisme des phénylpropanoïdes (figure 1.6). Les derniers produits du métabolisme des phénylpropanoïdes ont des rôles importants dans la structure et le développement d'une plante, mais également dans les mécanismes de défense contre les stress biotiques et abiotiques (Franke *et al* 2002).

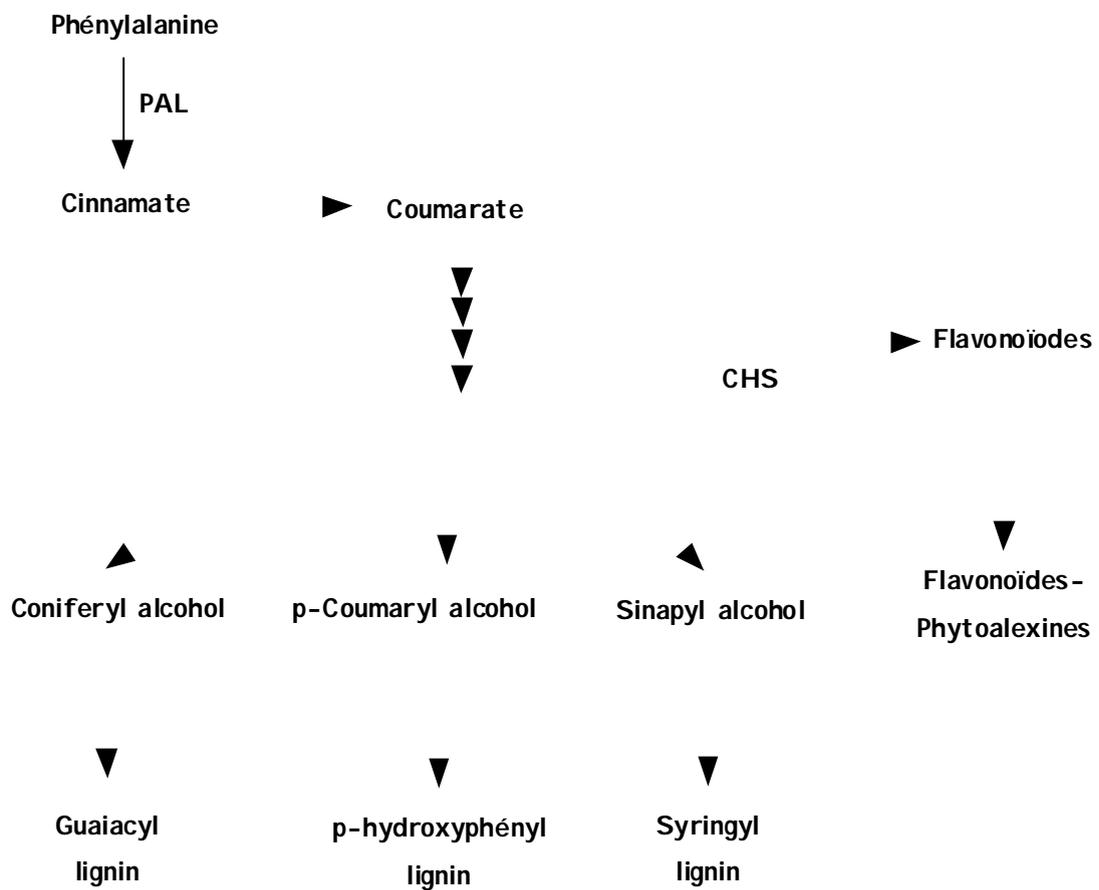


Figure I.6: Schéma résumant la voie des phenylpropanoïdes et ses produits finaux. Les deux enzymes clé dans la production de phytoalexines par cette voie sont la PAL (phénylalanine ammonia lyase) et la CHS (chalcone synthase).

Pour produire la lignine, la chaîne latérale de la phénylalanine est modifiée afin d'obtenir les trois composés suivants : p-Coumaryl alcool, Coniferyl alcool et Sinapyl alcool. Ces trois unités de structure peuvent se polymériser pour donner trois types de lignine, respectivement de type: p-hydroxyphenyl, guaiacyl, et syringyl

L'ozone peut mimer des éliciteurs fongiques et induire une enzyme qui intervient dans la biosynthèse de la lignine (Sandermann *et al* 1998). Ceci montre que la lignine sert de barrière physique pouvant être induite.

### **Accumulation de phytoalexines**

Les phytoalexines sont des molécules lipophiles de bas poids moléculaire qui ont une action antimicrobienne. Lors d'une interaction incompatible, ces composés s'accumulent aux sites d'infection et participent de diverses façons à la défense de la plante. En effet, outre leur action antimicrobienne, elles sont également toxiques pour la plante et pourraient jouer un rôle dans la mort cellulaire qui accompagne une interaction incompatible. Produites à partir de métabolites primaires détournés de leur voie habituelle vers d'autres voies du métabolisme secondaire (Hammond-Kosack *et al* 1996), certaines phytoalexines dérivent de flavonoïdes par exemple de la voie des phenylpropanoïdes (figure I.6).

### **Dépôt de callose**

La callose est constituée de chaînes de (1-3)  $\beta$ -D-glucoses qui peuvent s'associer en hélices de deux ou trois chaînes. En temps normal la production de callose est limitée dans l'espace (à quelques types cellulaires) et dans le temps (certains stades de développement), par exemple lors de la croissance du tube pollinique. La production de callose a également été remarquée suite à des lésions ou l'attaque de pathogènes, son rôle étant de renforcer la paroi cellulaire. Afin d'étudier ce lien avec la pathogénèse, des plants d'*Arabidopsis* ont été traités avec du BTH (benzothiadiazole), un inducteur synthétique de la SAR (Résistance Systémique Acquise). Les feuilles de ces plants ont ensuite subi des lésions ou une infiltration d'eau. Le priming au BTH a augmenté la production de callose induite par rapport aux plants non traités. Une production de callose a aussi été mise en évidence suite à un traitement à un autre éliciteur : l'ozone (Sandermann *et al* 1998).

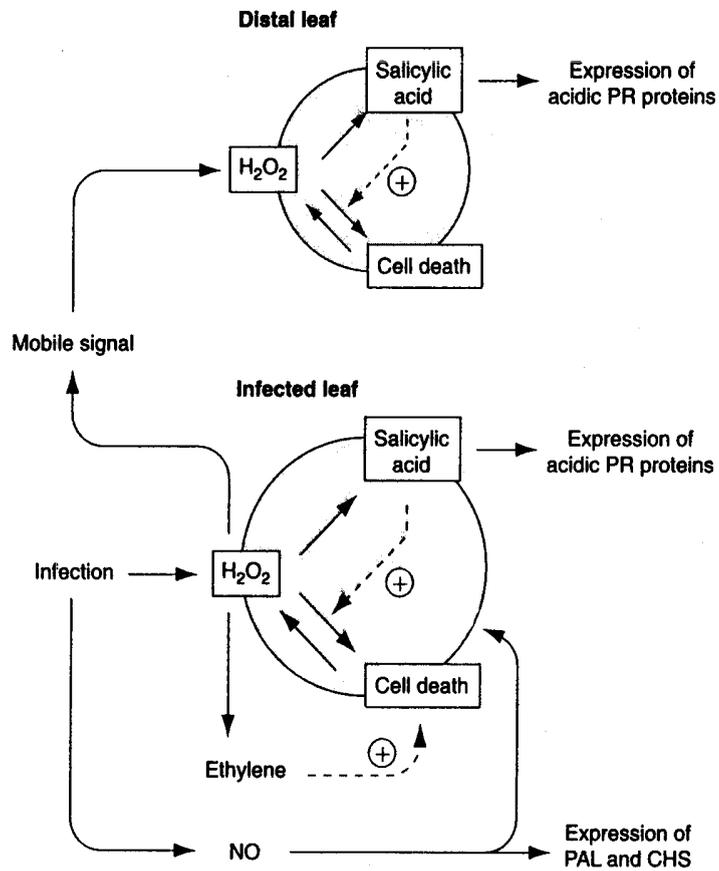


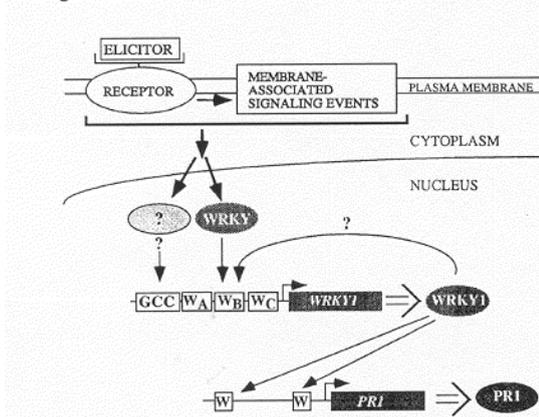
Figure I.7 : Schéma illustrant le rôle de l' $H_2O_2$  dans la SAR et ses interactions possibles avec l'acide salicylique (Salicylic acid) et la mort cellulaire (Cell death).

## SA et accumulation de protéines PR (Pathogenesis-Related Proteins)

La grande famille des protéines PR contient de nombreuses protéines de fonctions très différentes qui peuvent être intracellulaires (vacuolaires) ou extracellulaires (paroi et espace intercellulaire). Elles interviennent le plus souvent dans la défense des plantes, mais de diverses façons. Par exemple les protéines PR-2 et PR-3 sont respectivement des glucanases et chitinases à activité anti-fongique. La structure des gènes du group PR-1 a été étudiée en 1987 par Cornelissen *et al.* Depuis, les activateurs de ces gènes ont été trouvés et étudiés à leur tour (Gruner *et al* 1994, Obergon *et al* 2001).

Les voies d'induction de ces protéines répondent à de nombreux signaux, entre autres l'Acide Salicylique (SA) et des protéines nucléaires de la famille WRKY (Rushton *et al* 1996). La synthèse de ces protéines WRKY est induite par des éliciteurs exogènes

T.Eulgem *et al.*



se liant à des boîtes spécifiques (dits "W Box motifs") (Euglem *et al* 1999). Eulgem *et al* (1999) proposent un modèle des évènements nucléaires allant de la perception de l'éliciteur à la production de protéines PR. Ces protéines sont également induits par l'acide salicylique (Chen *et al* 2000).

L'acide salicylique est produite à partir de phénylalanine par le biais de la voie des phenylpropanoïdes. L'accumulation de SA est provoquée lors d'attaques de pathogènes et sa concentration atteint un maximum au lieu de contact avec ces derniers (Hammond-Kosack *et al* 1996).

Dans un modèle proposé par Delaney (2000) des facteurs de transcription jouent le rôle d'intermédiaire entre la SA et les protéines PR. En effet, lorsqu'une plante est attaquée, l'augmentation de la concentration locale et systémique de SA précède ou est parallèle avec celle de protéines PR (Buchanan *et al* 2000). Leur apparition en grande quantité ne prend que quelques heures (figure I.7) (Wojtaszek 1997).

## **L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la Réponse Hypersensible**

### 5.1. Généralités

La Réponse Hypersensible (HR) est une forme commune de résistance aux pathogènes et fait intervenir localement la PCD « programmed cell death » ou mort cellulaire programmée.

En 1915, Stakman défini la HR pour la première fois en tant que "réponse d'une plante à l'inoculation d'un champignon, et les premiers stades de développement du pathogène dans les tissus de l'hôte". L'hypersensitivité était définie à la même époque comme la "mort anormalement rapide des cellules de l'hôte qui subissent l'attaque du pathogène". Des éliciteurs purifiés suffisent pour induire une HR complète chez un hôte résistant.

La HR se caractérise par un taux ou vitesse de réaction très élevé(e), un nombre limité de cellules végétales mortes et un arrêt de la maladie. Elle nécessite une transcription et une traduction chez l'hôte. Il est important de noter que la HR ne se caractérise pas nécessairement par une nécrose répandue et une mort complète du pathogène infectieux.

Chez certaines plantes mutantes, la PCD survient même dans l'absence d'agents pathogènes, (ex maïs et *Arabidopsis*) ce qui renforce l'hypothèse de l'existence d'une programmation de la PCD chez les plantes.

### 5.2. Particularités de la HR par rapport aux autres mécanismes de défense

La réponse hypersensible se distingue des autres mécanismes de défense ou de résistance aux pathogènes qui convergent vers la protection ou la sauvegarde des cellules hôtes. La HR, est l'anti-thèse de ces dernières, et requiert une mort cellulaire rapide! Il est dès lors important de bien comprendre le mécanisme de mort cellulaire chez l'hôte.

### 5.3. Les ROS et le choc oxydatif dans la réponse hypersensible

Les intermédiaires d'oxygène réactif (par exemple l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'oxygène radicalaire O<sub>2</sub><sup>-</sup> et OH<sup>\*</sup>) sont des éléments clés de la PCD qui accompagne la HR. Deux cinétiques d'induction ont été décrites pour des cultures de cellules végétales en

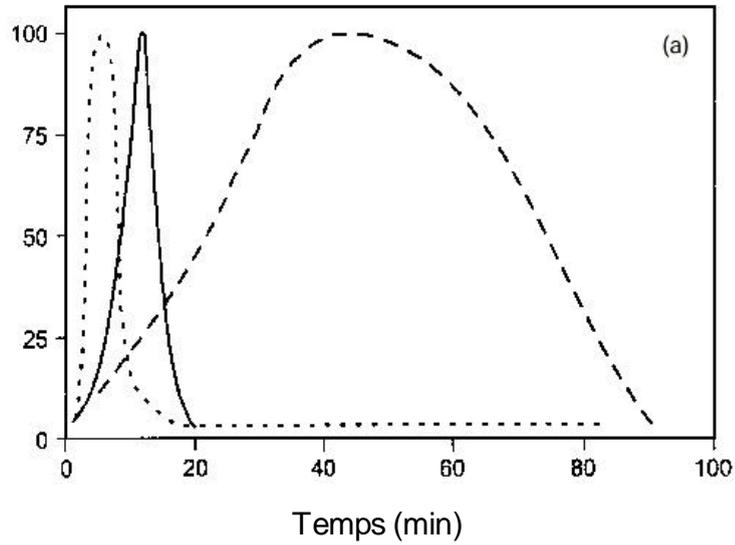
suspension (Hammond-Kosack *et al* 1996). La première (provoquée par éliciteurs seuls) se limite à une production immédiate de ROS ou premier choc oxydatif. La deuxième cinétique se manifeste lorsque la plante est en contact avec un pathogène complet (une bactérie, par ex.). La présence du pathogène induit un premier choc oxydatif similaire à celui induit par éliciteur mais également un deuxième choc, beaucoup plus important 2h à 4h après l'ajout des bactéries aux cellules en suspension (figure I.8)(Wojtaszek 1997).

Suite à la reconnaissance du pathogène, les premières manifestations cellulaires sont l'ouverture de canaux ioniques ( $H^+$  in,  $Ca^{2+}$  in,  $K^+$  out,  $Cl^-$  out; voir figure I.9) et la formation d'espèces réactives d'oxygène (ROS) tels que  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$  et  $OH^{\bullet}$ . Ces ROS sont produits par des oxydases membranaires NADPH dépendantes et/ou des peroxydases apoplastiques. Ces réponses membranaires sont indispensables au bon déroulement de la transduction de signal qui fait intervenir entre autres, des cascades de phosphorylation (MAP kinases, kinases dépendantes du calcium...) et des dérivés de phospholipides de la membrane plasmique (par exemple l'acide jasmonique). La transduction du signal abouti au noyau, où des gènes impliqués dans la défense sont activés, et les réponses de défense sont mises en place (figure I.9).

Un dégagement rapide et puissant de ROS et de leurs intermédiaires (appelés ROI), place les cellules concernées dans un état de stress oxydatif qui peut être à l'origine de la PCD (Mittler *et al* 1999). Les ROS en faible concentration (par exemple dans les tissus voisins) induisent des mécanismes de détoxification, afin de limiter les dégâts occasionnés à ces tissus. Ils y sont en effet détruits par des enzymes telles que les superoxide dismutases, ascorbate peroxydases et glutathione-S-tranferases. A l'inverse, au point de contact avec le pathogène les enzymes de détoxification sont inhibées et les ROS peuvent, en effet, provoquer la mort du pathogène et des cellules de la plante. C'est ce que l'on appelle la mort cellulaire par hypersensibilité, ou "hypersensitive cell death" (HCD).

Les ROS peuvent jouer plusieurs rôles dans la défense (Mittler *et al* 1999). Par exemple, l' $H_2O_2$  est toxique en tant que bactéricide, mais intervient également dans le durcissement de la paroi végétale. En effet, l' $H_2O_2$  a un rôle dans la formation des précurseurs de lignine et dans le « crosslinking » de protéines de la paroi riches en proline, PRP (Hammond-Kosack *et al* 1996). Les gènes impliqués dans la défense activés par ROS sont également induits lors de stress abiotiques. Ceci semblerait indiquer que la production de ROS fait partie d'une voie générale de réponse aux stress,

Production de ROS (%)



Production de ROS (%)

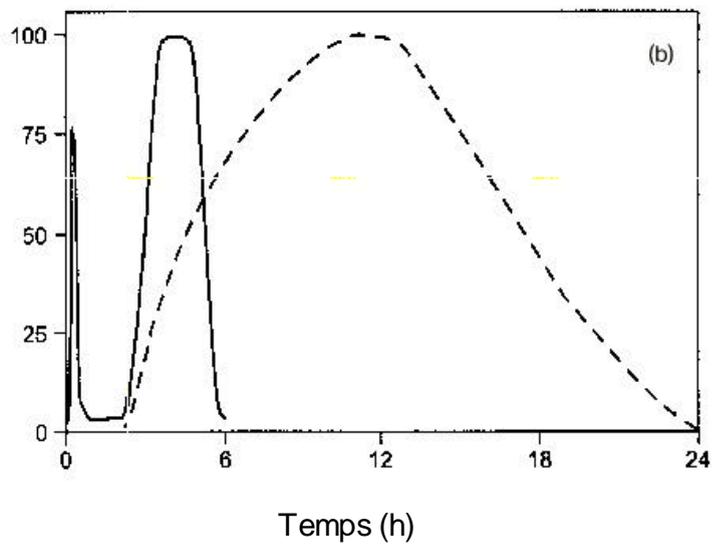


Figure I.8: **Schéma illustrant la cinétique de production de ROS.**

(a) réaction monophasique lors d'une induction par éliciteur fongique (en ligne continue), par éliciteur de la paroi végétale (en pointillé) et par agent pathogène (en traits)

(b) réaction biphasique à un éliciteur bactérien (ligne continue) et à un éliciteur de la paroi végétale

plutôt que d'une voie propre à la réponse aux pathogènes (Camp *et al* 1998). Il existe également un lien entre les ROS et le potentiel redox des cellules. Les ROS stimulent la transduction d'un signal qui fait intervenir des protéines dont l'activation est sensible au potentiel redox de la cellule (Vranová *et al* 2002, Storz *et al* 1999).

## **L'induction de la HR, de la SAR et le mécanisme de défense**

L'attaque d'un pathogène qui aboutit à une reconnaissance, et donc à une interaction incompatible, est suivie d'une réponse hypersensible. Celle-ci donne lieu à une mort cellulaire localisée, et une nécrose également localisée. L'apparition de protéines PR se remarque quelques heures après la nécrose (Maleck *et al* 1999) et provoque la réponse systémique acquise (SAR). Les tissus non infectés voient leur résistance augmenter face à l'attaque de nombreux pathogènes fongiques, bactériens et viraux (Maleck *et al* 1999). Chez *N. tabacum* et *Arabidopsis*, l'expression de protéines PR est précédée par une augmentation de la concentration en SA, et peut être induite par l'ozone (Eckey-Kaltenbach *et al* 1997). Cette augmentation de SA est nécessaire et suffisante à l'induction de la production de protéines PR et la mise en place de la SAR (Goodman *et al* 1994). Toute fois le lien entre SA et l'activation de protéines PR est indirecte (Delaney T.P. 2000). C'est une résistance non spécifique due entre autres à la synthèse *de novo* de phytoalexines (Goodman *et al* 1994) et de protéines PR.

La non spécificité de la réponse SAR peut être illustrée par l'exemple suivant. Lorsque des plantes de Tabac sont prétraitées avec une bactérie non pathogène du sol, puis inoculées avec un virus de poivron (PMMoV), elles présentent une accumulation plus rapide de transcrits de gènes liés à la défense (PR1-a et la PAL) que des plantes non prétraitées. Les feuilles contiennent moins d'ADN viral que lors d'une infection sans prétraitement. Ce prétraitement a donc aidé la plante à se défendre au site d'infection du virus. D'autres feuilles qui ont subi le prétraitement, mais pas l'inoculation du virus, montrent également une expression plus importante de gènes impliqués dans la défense (Ahn *et al* 2002).

La HR et la SAR qui en découle font intervenir toute une série de voies de transduction du signal. Comme il a été montré ci-dessus au point 5.3, certains acteurs des voies de transduction du signal peuvent interagir avec d'autres voies, formant un réseau de transduction du signal (Somssich *et al* 1998a). La figure I.10 présente un

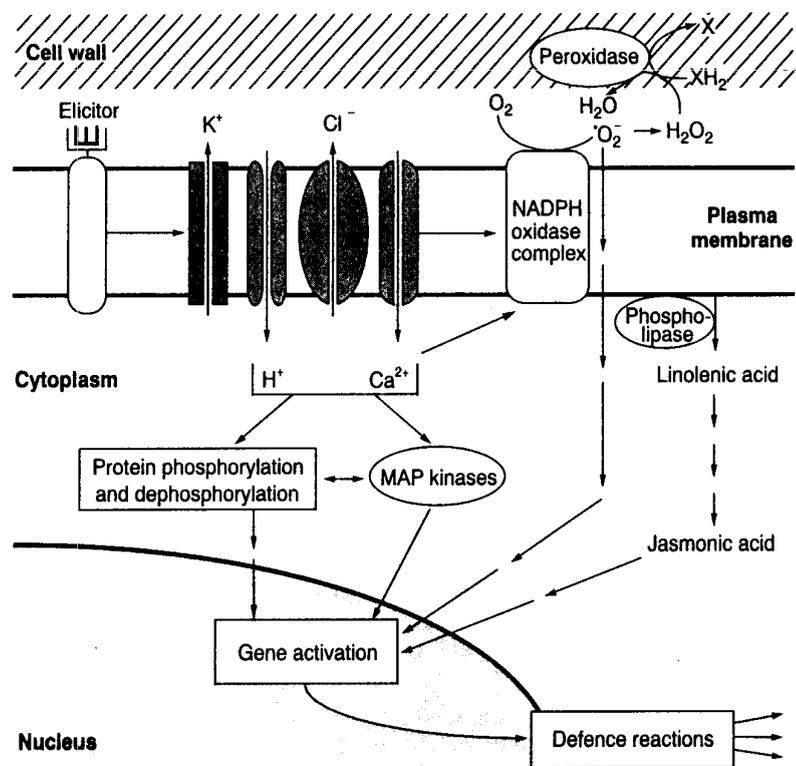


Figure I.9: Schéma général de la transduction du signal aboutissant à l'activation génique et aux réponses de défense après perception d'un éliciteur.

résumé des voies de transduction du signal qui aboutissent à la mise en place des défenses chez les plantes.

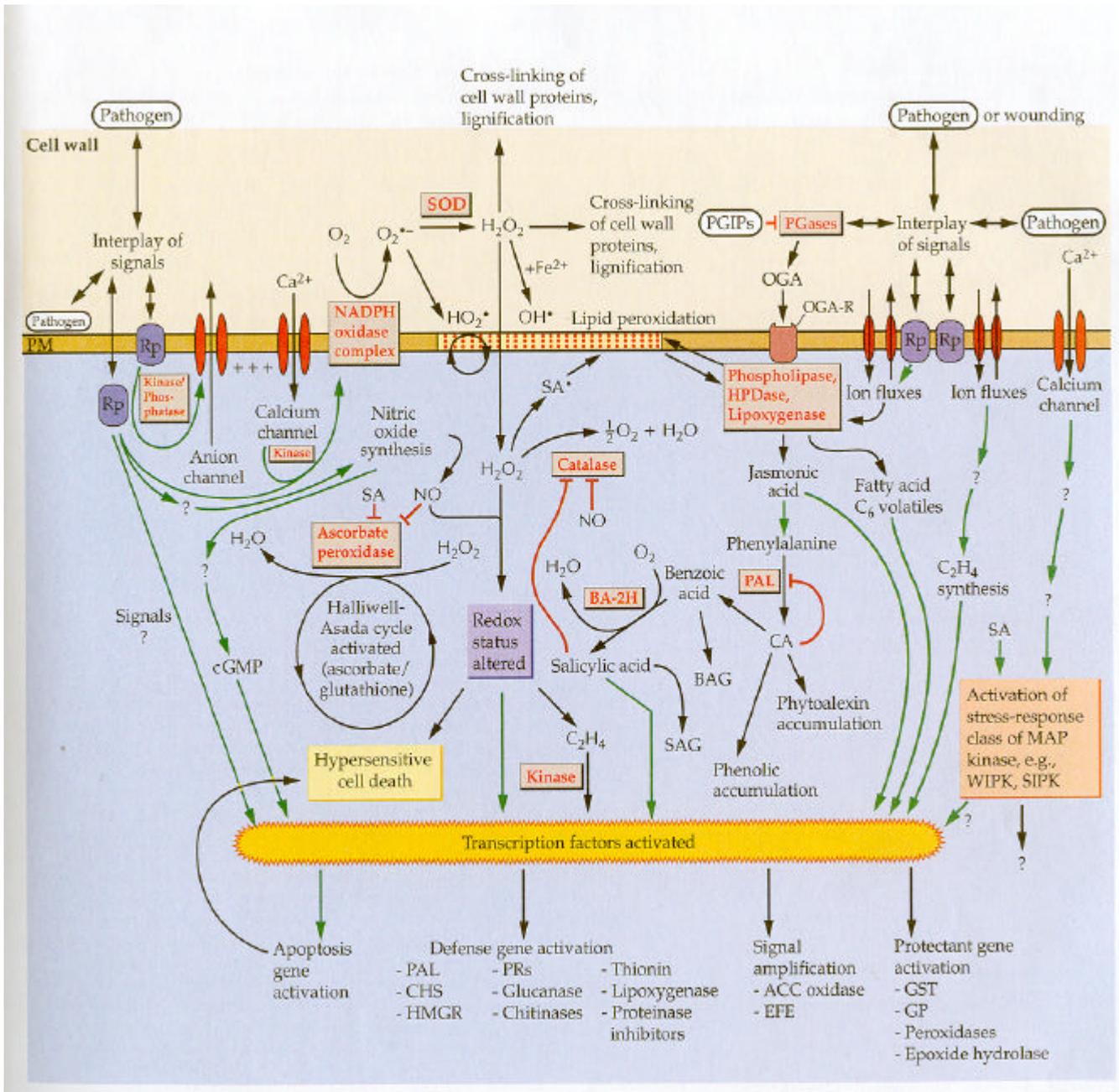


Figure I.10: Schéma représentant l'ensemble des voies de transduction du signal aboutissant aux réponses de défense chez les végétaux.

## Deuxième Chapitre : La Transformation Végétale

### **Les méthodes de transformation des végétaux**

Depuis que l'Homme cultive des espèces végétales, il cherche à les améliorer sur différents plans (rendement, résistance, valeur organoleptique...). Le premier grand changement dans ce domaine a été la découverte des lois de Mendel sur l'hérédité, qui ont permis de mieux comprendre et donc diriger les croisements afin d'obtenir ces améliorations. Le deuxième grand changement est dû au développement de la génétique moléculaire et des biotechnologies. Ces dernières ont permis de comprendre et de mettre sur pied différentes méthodes de transformation. Ces méthodes sont par exemple la micro-injection, l'électroporation, la biolistique, et la transformation par *Agrobacterium*.

Pour la méthode par injection, les cellules végétales doivent obligatoirement être dépourvues de leur paroi et l'ADN est injecté dans leur cytoplasme par une micropipette. Ces cellules sans paroi sont appelées « protoplastes » et peuvent être obtenues par digestion enzymatique de la paroi. La perte de matériel pendant ces manipulations peut être importante. Les méthodes par injection sont lourdes au niveau pratique, et nécessitent une transformation cellule par cellule.

L'électroporation est une méthode de choix pour d'autres systèmes vivants (par exemple certaines bactéries ou cellules animales). Toutefois, comme la méthode par injection, l'électroporation nécessite des cellules sans paroi, et aussi bien l'obtention que la manipulation de ces protoplastes peut être délicate. Les protoplastes sont soumis à un choc électrique de très courte durée qui produit des disruptions de la membrane plasmique, et permet l'entrée d'un fragment d'ADN se trouvant à proximité dans le milieu. La membrane est rapidement réparée si les disruptions ne sont pas trop importantes, mais de nouveau les pertes de matériel végétal peuvent être conséquentes.

La biolistique consiste en une projection de microparticules recouvertes du matériel transformant (ADN, ARN ou encore des particules virales). Aussi appelé « particle bombardment », cette méthode introduit sans précision ces particules à l'intérieur des cellules grâce à leur vitesse très élevée. Le processus qui permet l'incorporation du transgène dans le génome n'est pas connu. En effet des insertions multiples et fragmentées ont déjà été remarquées. Cette méthode est particulièrement

puissante lors d'une étude de l'expression transitoire d'un gène étranger, car des tissus développés ou des plantes entières peuvent être utilisés (Komari *et al* 1998).

La transformation par *Agrobacterium* exploite un mécanisme naturel par lequel la bactérie infecte et transforme une plante, causant une maladie appelée « galle du collet ». Cette maladie se caractérise par la formation d'un tissu désorganisé qualifié de « tumeur » et repose sur le transfert d'une séquence d'ADN. Cette séquence est appelée « T-DNA » pour « transferred DNA », et s'intègre dans le matériel génétique de la cellule végétale. Ce T-DNA contient des gènes qui causent la maladie, mais ceux-ci ne sont pas nécessaires pour le transfert. En remplaçant ces gènes par d'autres, il est possible de transformer des cellules végétales avec n'importe quelle séquence voulue. Cette méthode de transformation a plusieurs avantages par rapport aux autres : l'insertion et l'intégration d'un faible nombre de copies se fait sans endommager la cellule, et sans traitement préalable nécessaire du tissu végétal. Les limites de cette méthode correspondent aux limites du spectre d'hôtes d'*Agrobacterium* qui recouvre une vaste gamme de dicotylédones, et un nombre très limité de monocotylédones. Ces monocotylées sont par exemple différents types de riz : Japonica, Javanica, et Indica (Komari *et al* 1998). Lors de ces études les tissus des monocotylédones étaient composés de cellules en division active, tels que des cals.

Une limite commune à ces différentes techniques de transformation végétale est le manque de spécificité du site d'intégration du transgène dans le génome de l'hôte. Dans le cas où la plante à transformer est une dicotylédone, il semble évident que la méthode de choix est celle par *Agrobacterium* de par ses avantages et les limites des autres méthodes.

## **La transformation par *Agrobacterium***

Les espèces sauvages (wild-type) d'*Agrobacterium* hébergent un grand plasmide appelé Ti (pour Tumor Inducing) chez *A. tumefaciens* et Ri (pour Root Inducing) chez *A. rhizogenes* (Moriguchi *et al* 2001). Sur ce plasmide se trouvent, entre autres, le T-DNA et les gènes de virulence. Ces gènes, regroupés en une région « Vir », sont responsables du transfert et de l'intégration du T-DNA. L'infection de la plante par *Agrobacterium* est illustrée à la figure I.11. Une cellule végétale blessée produit de l'acétosyringone et la sécrète dans le milieu. Cette molécule est capable d'activer des gènes chez *Agrobacterium*, notamment ceux de la région Vir. Un de ces gènes (VirG)

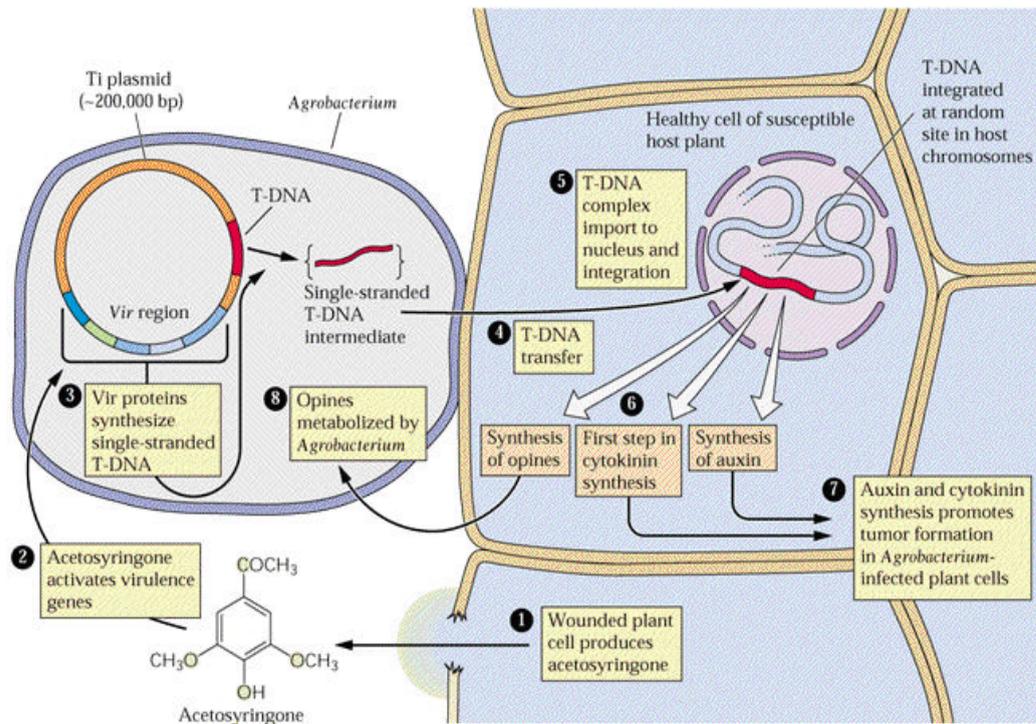


Figure I.11: Schéma illustrant les étapes du transfert du T-DNA par *Agrobacterium*. 1: Production d'acetosyringone par une cellule végétale suite à une blessure. 2: L'acetosyringone active les gènes de la région Vir. 3: Les protéines Vir synthétisent un T-DNA simple brin. 4: Transfert du T-DNA. 5: Importation du T-DNA dans le noyau et intégration au génome végétal. 6: (de gauche à droite) Synthèse d'opines/Première étape de la synthèse de cytokinines/Synthèse d'auxine. 7: La synthèse d'auxines et cytokinines induit la formation de tumeurs. 8: Les opines sont métabolisées par *Agrobacterium*.

code pour une protéine qui active les autres gènes de la région Vir. L'action coordonnée de ces gènes est de synthétiser une copie simple brin du T-DNA, promouvoir son transfert à la cellule végétale et son intégration au génome de l'hôte. Certains produits de la région Vir sont impliqués dans la chémotaxie vers et l'attachement à des cellules végétales blessées. La blessure du tissu végétal libère également des molécules facilitant l'adhésion d'*Agrobacterium* à la cellule végétale. C'est la liaison de la bactérie à des composés précis de la paroi végétale qui induit la synthèse du T-DNA à transférer. Les produits des gènes *vir D1* et *D2* ont une activité endonucléase et agissent au niveau des bords droit (*right border*, RB) et gauche (*left border*, LB) qui délimitent le T-DNA. *Vir D2* reste attaché aux bords gauche et droit du T-DNA pendant son transfert à la cellule végétale. Ces bords sont des répétitions imparfaites de 25 bp et délimitent le T-DNA. *Vir E<sub>2</sub>* se lie à l'ADN simple brin, et protège le T-DNA pendant son transport. Plusieurs gènes *Vir B* jouent un rôle dans le passage du T-DNA de la bactérie à la cellule végétale. Une fois dans la cellule végétale, le T-DNA est dirigé vers le noyau et intégré au génome de la cellule hôte et les gènes transférés sont exprimés. Dans le processus naturel d'infection, cette expression aboutit à une surproduction d'hormones végétales (auxine et cytokine) et à la production d'opines. Ces gènes d'origine bactérienne, ont évolué et ne sont fonctionnels que chez les plantes (Hellens *et al* 2000(b)). Le dérèglement hormonal qui s'en suit provoque l'apparition de « tumeurs ». Les opines sont des acides aminés particuliers qui sont sécrétés par la cellule végétale et métabolisés par *Agrobacterium*. Ces acides aminés ne peuvent servir ni à la plante, ni à d'autres pathogènes du sol, ce qui produit une niche écologique idéale pour le développement d'*Agrobacterium*. Les opines constituent ainsi un apport important de carbone et d'azote pour *Agrobacterium*, au détriment de la plante.

## **Des plasmides Ti aux plasmides binaires**

Les plasmides Ti contiennent tous certains éléments essentiels à leur fonctionnement : un T-DNA, une région Vir et une origine de répllication. Comme il a déjà été mentionné ci-dessus, le transfert du T-DNA n'est pas perturbé par la suppression des gènes qu'il contient. Un plasmide Ti sans ces gènes, ainsi que la souche d'*Agrobacterium* qui le porte, n'est plus source de maladie et est dit « désarmé ».

Les deux fonctions importantes pour le transfert vers la cellule hôte sont celles de la région Vir et du T-DNA. Comme les produits de la région Vir agissent en *trans* sur le

T-DNA, il n'est pas nécessaire que cette région soit sur le plasmide qui porte le T-DNA (Bevan 1984). De ce concept sont apparus les « plasmides binaires » qui sont des couples de plasmides, l'un avec le T-DNA et l'autre avec la région Vir. De plus, la manipulation *in vitro* de plasmides se fait beaucoup plus facilement en *E. coli* qu'en *A. tumefaciens*. Pour permettre cela, des origines de réplication pour *E. coli* (généralement ColE1) ont été ajoutées aux « vecteurs » portant le T-DNA.

## Historique de l'évolution des plasmides binaires

Les premiers plasmides binaires étaient de très grande taille (ex pBIN19, 11777 bp). Peu d'information était donnée à leur propos, en particulier leurs séquences n'étaient pas connues en entier ou en tous cas pas publiées ou facilement accessibles. La flexibilité était réduite, dans ce sens qu'il était difficile de changer ses caractéristiques (marqueurs de sélection, sites de restrictions...). Tout ceci rendait leur manipulation difficile. Par exemple, le manque de données concernant la séquence exacte empêchait la création de cartes de restriction précises, et leur grande taille rendait précaire leur manipulation *in vitro*. Ces problèmes et limitations ont été résolus ou dépassés avec les besoins pressants de systèmes plus performants.

### 4.1 Diminution en taille

La réduction de la taille du plasmide est importante pour faciliter sa manipulation *in vitro*. Certains plasmides Ti dépassent les 25000 bp (Cf. pJJ1881) d'autres ont une taille raisonnable, 11000 bp (pBIN19) et certains sont bien plus petits; 4600 bp (pGreen0029) (Table I.1).

Le choix des origines de réplication a permis de diminuer la taille des plasmides Ti. Par exemple, pour le vecteur pGreen, l'origine pSa a été choisie pour sa petite taille et son éventail d'hôtes malgré que le nombre de plasmides par cellule est de moitié celui d'autres origines telles que RK4. Plusieurs plasmides Ti ont également vu leurs fonctions de réplication séparées des origines elles-mêmes. C'est la cas pour pPCV001, pMON10098 et pGreen. Ainsi pGreen ne porte plus le gène pour la réplicase (Rep A), mais uniquement l'origine pSa à proprement parler (figure I.12).

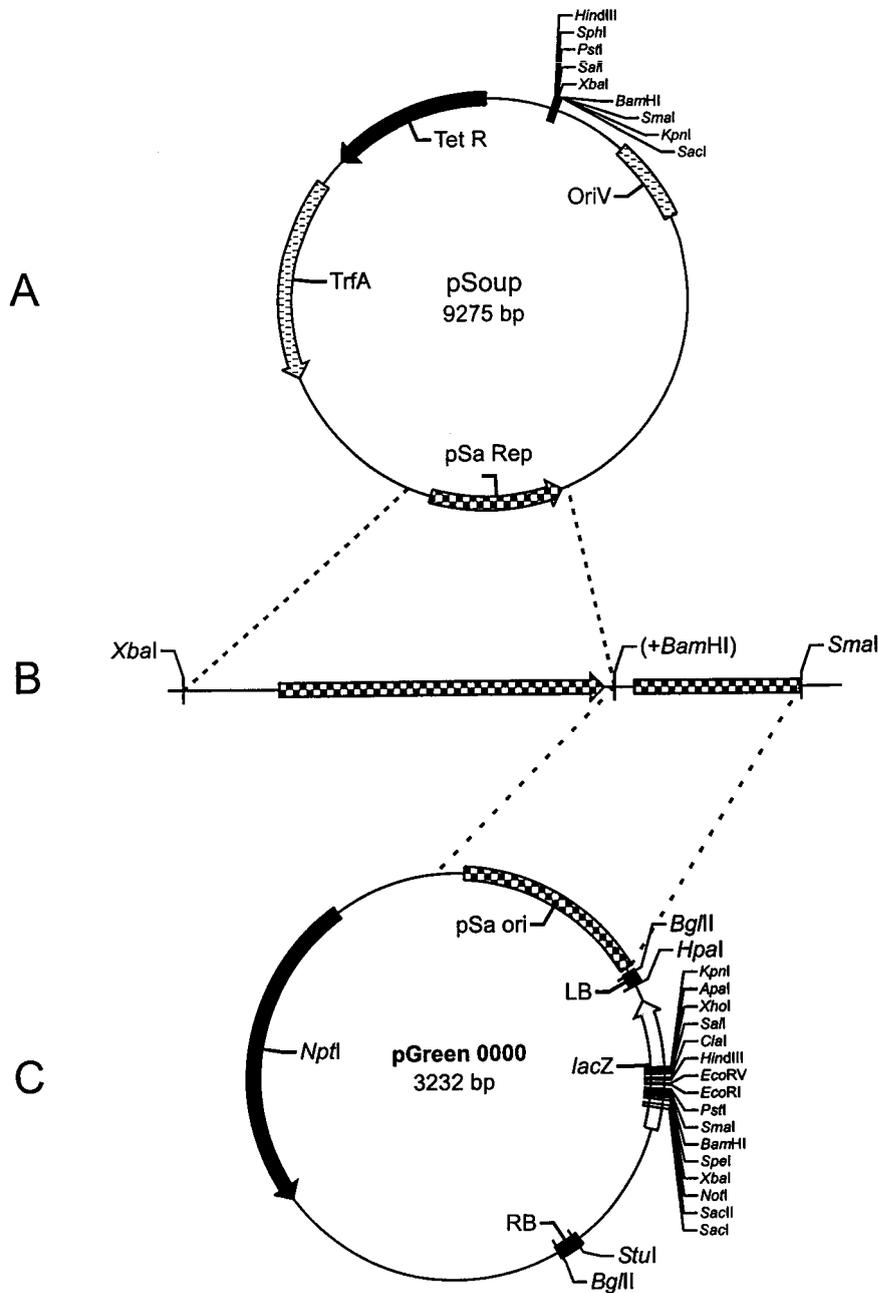


Figure I.12: Schéma représentant les plasmides pSoup et pGreen. pSoup (A) est un plasmide RK2 modifié portant le gène de la réplicase (pSa Rep) de l'origine pSa (B). pGreen (C) est le vecteur portant le T-DNA et l'origine de réplication (pSa ori). Le locus de réplication pSa a été modifié par mutagenèse dirigée afin d'introduire un site *Bam*HI permettant la séparation de ces deux régions.

## 4.2 Flexibilité

Les séries récentes de plasmides Ti proposent des sites multiples de clonage (multiple cloning site, MCS) étendus de sites uniques afin de faciliter l'introduction du (ou des) transgène(s). Pour certains, il est même possible de choisir le marqueur de sélection à utiliser.

## 4.3 Accessibilité et information

Avec le développement d'Internet depuis les années '80, l'accessibilité de toute information a été multipliée et re-multipliée. Les banques de données, et parmi celles-ci les banques de séquences nucléotidiques, ont permis de rassembler et rendre accessible les résultats expérimentaux de façon cohérente. Les séquences des plasmides binaires récents peuvent généralement être trouvées dans ces banques (pMON et pGreen) et des sites Internet permettent une meilleure compréhension de ces plasmides (pMON, pCAMBIA, pGreen).

## 4.4 Nouveautés

Les plasmides binaires actuels contiennent parfois des bords droits et gauches synthétiques. Les séquences des LB et RB ne varient pas beaucoup d'un type de plasmide Ti à l'autre, et les séquences de l'un fonctionnent chez les autres.

Une séquence « overdrive » peut être ajoutée juste à l'extérieur du T-DNA du côté du bord droit (RB) afin d'améliorer le transfert du T-DNA à partir de souches d'*Agrobacterium* courantes (telles que LBA4404). Cette séquence stimule la production du brin de T-DNA de façon indépendante de son orientation (Van Haaren *et al* 1987). L'action endonucléasique des protéines VirD1 et VirD2 sur les bords droits et gauche est influencée positivement par la séquence overdrive (Niwa *et al* 1988). La liaison de la protéine VirC1 à la séquence overdrive (24 bp) a été mise en évidence par "mobility shift assay" et par "DNase1 footprinting" (Toro *et al* 1989).

De plus le MCS des dernières séries de plasmides Ti est placé dans un gène de la  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*) permettant une sélection par complémentation (Test blanc/bleu classique).

#### 4.5 Un plasmide Ti sur mesure

La flexibilité des plasmides Ti actuels a permis de les façonner selon leur utilisation :

Plasmide(s)	Utilisation(s)
pC22 pUCD2340	Etudes de promoteur ou d' "enhancer", d'activation génique, l'inactivation de gènes par insertion du T-DNA, et la mutagenèse par transposon.
PBIN19	Fusions transcriptionnelle ou traductionnelle d'un promoteur à un gène rapporteur.
PMON	Expression Inductible de séquences codantes.
BiBAC	Clonage de grand fragments d' ADN (150 kb) pour transformation d' <i>Agrobacterium</i> et végétale.

Pour de nouvelles applications, il apparaît plus intéressant de construire un nouveau plasmide plutôt que de trouver un compromis avec les versions existantes.

### **Le système pGreen**

Au vu de ce qui précède, et de la volonté du laboratoire de tester un nouveau système de transformation, le système pGreen a été choisi pour cette étude. Ce système a été mis au point par l'équipe : Hellens, Edwards, Leyland, Bean et Mullineaux (Hellens *et al* 2000(a)) et est décrit sur internet : <http://www.pgreen.ac.uk>.

Les inconvénients des plasmides binaires, pour lesquels pGreen offre une solution, sont les suivants : Taille trop importante du vecteur Ti, manque de flexibilité et de choix dans les marqueurs de sélection et des sites de restriction et nombre fiable de copies dans *E. coli*.

Comme nous l'avons illustré ci-dessus, la taille du plasmide a été réduite en séparant les fonctions de réplication et de virulence de l'origine de réplication et du T-DNA respectivement. Ceci afin de permettre une manipulation plus aisée en *E.coli*, même face aux T-DNA qui sont de plus en plus grands. La taille du vecteur pGreen0000 est réduite à 3232 bp (figure I.12). Son T-DNA ne contient ni de marqueur de sélection ni de gène rapporteur. Des sites uniques de clonage à proximité des RB et LB (respectivement *StuI* et *HpaI*) sont prévus pour l'intégration de cassettes de sélection. La

flexibilité vient aussi du MCS (figure I.12) avec 16 sites uniques afin de faciliter le clonage.

### 5.1 La construction de pGreen

A la base, pGreen est un plasmide de la famille pBluescript. La résistance à l'ampicilline (bordée des sites *SpeI-BspHI*) que portent ces plasmides a été remplacée par celle à la kanamycine (gène *NptI* venant de pACYC177 et bordé par les sites *NheI-NcoI*). L'origine de répllication pSa (venant de pJIT134SaBam) bordée par *BamHI-SmaI* a été introduite à ces mêmes sites (figure I.12).

L'origine f1 et le gène *LacZ'* ont été supprimés de pBluescript, laissant un site *BglII* dans lequel le T-DNA (813 bp) sera cloné. Ce T-DNA contient des bords gauches et droits synthétiques (sur base des bords de pTiT37), le gène *LacZ'* et le MCS de pBluescript SKII. Une séquence « overdrive », qui améliorera le transfert à la cellule végétale, a été insérée juste à l'extérieure du RB.

La réduction de la taille de pGreen a cependant introduit un nouvel inconvénient qui est la dépendance de sa répllication vis à vis du plasmide pSoup dans *Agrobacterium*. Le plasmide pSoup contient en effet, le gène de la réplicase autorisant la répllication de pGreen dans l'hôte bactérien.

### 5.2 La construction de pSoup

Le plasmide pSoup (figure I.12) a été construit au départ du plasmide pBIN 19 doté d'une origine de répllication pRK2. Le T-DNA de pBin a été remplacé par le gène *RepA*; le gène de résistance *NptIII* a été remplacé par le gène *tet* (du plasmide pAlter) conférant la résistance à la tétracycline. Dans le cas présent, l'origine pRK2 est compatible avec pSa, ce qui permet la co-existence de pSoup et de pGreen dans *Agrobacterium*. Le fait que pSoup contienne également un MCS permettra une augmentation ultérieure de la flexibilité de ce système s'il y en a besoin.

### 5.3 Les cassettes

Deux cassettes pouvant contenir les gènes rapporteurs ou marqueurs sont repris à la figure I.13. L'une ayant respectivement le promoteur et terminateur des gènes 35S et 19S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV); l'autre, le promoteur et terminateur du gène de la Nopaline Synthase (nos). Ces cassettes peuvent contenir un

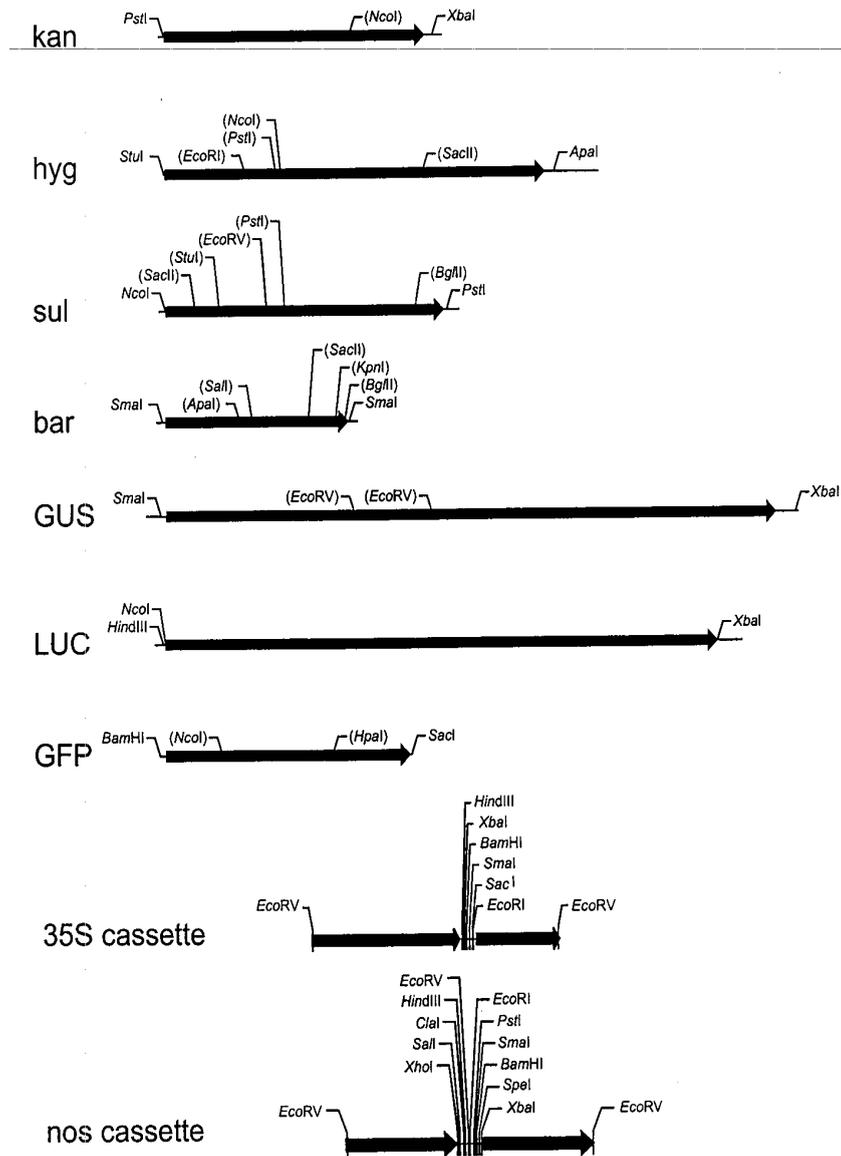


Figure I.13: Illustration des marqueurs de sélection (kan, hyg, sul, bar), des gènes rapporteurs (GUS, LUC, GFP) et des cassettes (nos et 35S) fournis avec le kit pGreen.

des quatre marqueurs ou un des deux gènes rapporteurs (figure I.13). Les deux cassettes sont bordées de sites *EcoRV*, tous les sites de restriction inutiles ont été retirés par mutagenèse dirigée afin de ne pas avoir de doublons avec les sites de restriction du MCS.

Les cassettes bordées de sites *EcoRV* sont insérées dans les sites *Stu1* et/ou *Hpa1* se trouvant immédiatement à l'intérieur du T-DNA à proximité du bord droit et gauche respectivement (figure I.12). Après intégration, la restriction au niveau de ces sites ne peut plus se faire puisque la nouvelle séquence bordant la cassette ne correspond plus ni à la séquence reconnue par *EcoRV* ni à celles des sites de départ (*Hpa1* et *Stu1*). Ceci est exploité pour intégrer les marqueurs de sélection de façon irréversible dans le T-DNA.

#### 5.4 Transformation d'*Agrobacterium*

La transformation d'*Agrobacterium* peut se faire en une ou deux étapes. Le plasmide pSoup est introduit dans *Agrobacterium* sur base d'une sélection à la tétracycline. Cette souche est électroporée en présence de pGreen et les transformants sélectionnés en présence de kanamycine. Une double transformation en présence des deux plasmides est également possible. Dans ce cas, la résistance à la kanamycine suffit, puisque l'expression de cette résistance dépend de la répllication de pGreen et donc de la présence de pSoup.

#### 5.5 Efficacité de pGreen en transgénèse végétal

La série de plasmides pGreen a été testée chez différentes espèces végétales. Les conclusions de ces travaux (Hellens *et al* 2000) montrent que pGreen peut promouvoir une transformation efficace, donnant les mêmes proportions de transformants qu'avec des plasmides de type RK2 et que les caractères transmis sont hérités de façon mendélienne. De plus, aucune trace du vecteur (autre que le T-DNA) n'a été trouvée chez les plantes transformées. Ceci est également un bon atout du point de vue de la biosécurité.

## **Objectifs du mémoire**

Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est impliqué de diverses façons dans les mécanismes de défense des plantes, et plus particulièrement dans le déclenchement de la Réponse Hypersensible (HR). La HR ne se déclenche pas toujours chez certaines plantes d'intérêt agronomique, par exemple chez la chicorée. Cette problématique rentre dans le cadre d'une étude en cours au laboratoire, qui a déjà fait l'objet d'un mémoire et d'un DES. Cette recherche avait abouti à des plantes transformées exprimant constitutivement la glucose oxydase (GO), mais l'expression constitutive de cette enzyme a provoqué la mort des transformants.

L'objectif de ce mémoire est d'obtenir des plantes transgéniques produisant la GO de façon régulée, uniquement lors d'attaques de pathogènes.

La solution proposée est de placer la GO sous le contrôle d'un promoteur de protéine PR (Pathogenesis-Related) intervenant dans la défense des plantes. Pour ce faire, deux promoteurs sont envisagés : le promoteur du gène PR1-a du tabac, et celui du gène PR1-2 du persil.

## II. MATERIEL et METHODES

## II Matériel et Méthodes

### 1. Matériel

#### **Culture de chicorée**

##### a) Milieu de culture à base de sels de "Murashige & Skoog"

###### Matériel

- ?? Milieu MS (Duchefa M0222)
- ?? Plant agar (Duchefa P1001)
- ?? Eau désionisée
- ?? Sucrose

###### Protocole pour un litre de milieu

1. Peser 4,7 g de MS.
2. Pour un milieu avec sucrose, ajouter 30 g de sucrose.
3. Ajouter 1 litre d'eau désionisée et mettre à pH 5,8.
4. Ajouter 10 g/l de plant-agar.
5. Autoclaver.
6. Laisser refroidir, puis couler environ 100 ml de milieu par boîte (*9 à 10 boîtes au litre*) pour les akènes et 200 ml (*5 boîtes au litre*) dans le cas de plantes.

##### b) Stérilisation d'akènes de chicorée industrielle

###### Solutions et matériel

- ?? Ethanol 80 %
- ?? Eau de javel 30 %
- ?? Tween 20
- ?? Eau stérile (eau désionisée et autoclavée)
- ?? Tubes Falcon (50 ml), pinces et boîtes pétri

###### Protocole (en conditions stériles)

1. Placer les akènes à stériliser dans un tube Falcon (50 ml). Ajouter 20 ml d'éthanol 80 % et 20 µl de tween. Mélanger pendant 10 minutes par inversion, de manière à maintenir les akènes en contact avec la solution.
2. Laisser sédimenter les akènes dans le fond du tube et éliminer l'éthanol. Ajouter 20 ml d'eau de javel 30 % + 20 µl de tween et mélanger pendant 25 minutes.
3. Laisser sédimenter les akènes et éliminer l'eau de javel. Ajouter 20 ml deau stérile et mélanger pendant 10 minutes. Recommencer cette opération 2x pour un total de trois rinçages à l'eau stérile.
4. Les akènes ainsi stérilisés peuvent être conservés dans l'eau stérile à 4°C.

### c) Dépôt d'akènes sur milieu MS

En conditions stériles, les akènes stériles peuvent être déposés à raison de 12 à 15 par boîte. Annoter les boîtes (mentionner nom, date et contenu), et les mettre dans la chambre de culture (25°C).

## **Culture d'*E. coli***

### a) Milieu LB liquide (ou solide)

Le milieu LB est un milieu riche non sélectif convenant à de nombreuses espèces bactériennes.

1. Peser ces trois composants suivant le volume de milieu à préparer.

Bactotryptone	10 g/l
Yeast extract	5 g/l
NaCl	10 g/l

2. Pour du milieu solide, ajouter 15 g/l de Bacti Agar (Remel).
3. Mettre à volume avec de l'eau désionisée et à pH 7.5.
4. Autoclaver aussitôt.

### b) Milieu SOC

#### Composition de base

Bactotryptone	2 %
Yeast extract	0.5 %
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucose	20 mM

#### Protocole

1. Réunir les quantités voulues des différents constituants.
2. Mettre à pH 7, et porter à 50 ml avec de l'eau désionisée.
3. Sous hotte, stériliser le milieu par filtration (0.22 µm) et aliquoter par 10 ml.
4. Garder à -20°C jusqu'à utilisation.

### c) Transformation de bactéries TOP 10F' par choc thermique

## Matériel

- ?? Cellules électrocompétentes (TOP 10 F') (One shot transformation kit, Invitrogen).
- ?? Milieu SOC
- ?? Bain thermostaté à 42°C
- ?? Etuve de culture à 37°C

## Protocole

1. Sortir les cellules compétentes conservées à -70°C et les placer dans la glace.
2. Lorsque les cellules sont dégelées, ajouter 2 µl du mélange de ligation. Mélanger délicatement au moyen d'une pipette et incuber les cellules 5 minutes dans la glace.
3. Incuber ensuite les cellules pendant 30 secondes dans un bain thermostaté à 42°C.
4. Sortir les cellules du bain le plus rapidement possible et incuber celles-ci dans la glace pendant 2 minutes.
5. Ajouter 250 µl de milieu SOC (maintenu à 37°C) et incuber les cellules à 37°C durant une heure.
6. Étaler 100 µl des bactéries sur milieu sélectif adéquat.
7. Sélectionner les transformants par le test blanc-bleu et vérifier l'efficacité de la transformation par PCR sur colonie.

## **Culture d'*Agrobacterium***

### a) Préparation de cellules *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 électro-compétentes

1. Inoculer 500 ml de milieu LB liquide contenant 25 µg/ml streptomycine avec la souche d'*Agrobacterium*. Incuber les bactéries à 30°C sous forte agitation pendant une nuit ou jusqu'à obtenir une absorbance à 600 nm comprise entre 0,5 et 1,0.
2. Centrifuger les cellules à 4000 rpm pendant 10 minutes (Centrifugeuse Beckman J2-21).
3. Éliminer le surnageant et reprendre les cellules dans 500 ml d'eau froide stérile. Recentrifuger comme ci-dessus. Répéter cette étape une deuxième fois.
4. Resuspendre le culot dans 20 ml de glycérol 10 % froid. Transvaser les bactéries dans un Falcon de 50 ml. Centrifuger à 4000 rpm et à 4 °C pendant 10 min.
5. Éliminer le surnageant et resuspendre le culot de bactéries dans 2 ml de glycérol 10 % froid.
6. Aliquoter par 100 µl et stocker à -70°C jusqu'à utilisation.

## b) Préparation de cellules Agrobacterium tumefaciens "VirG" électro-compétentes

1. Inoculer une pré-culture de 5 ml (milieu LB liquide) contenant les antibiotiques suivant : Streptomycine (concentration finale de 25 µg/ml) Rifampicine (conc. finale de 10 µg/ml) et Gentamicine (conc. finale de 20 µg/ml). Mettre cette culture à 27°C et sous forte agitation pendant 24 heures.
2. Ensemencer un litre de milieu LB liquide (contenant les mêmes antibiotiques) par la pré-culture. Mettre à 27°C sous forte agitation, pendant une nuit, pour obtenir une D.O. à 600 nm comprise entre 0,5 et 1.
3. Centrifuger les bactéries à 4000 rpm pendant 10 minutes.
4. Éliminer le surnageant et rincer chaque culot avec 100 ml d'eau froide (4°C) stérile.
5. Re-centrifuger les bactéries à 4000 rpm pendant 10 minutes (3 rinçages).
6. Re-suspendre les culots dans 20 ml de glycérol 10 % froid (4°C).
7. Transvaser la suspension finale dans un tube Falcon de 50 ml et centrifuger à 4000 rpm, à 4°C pendant 10 minutes.
8. Éliminer le surnageant et re-suspendre le culot de cellules dans 2 ml de glycérol 10 % à 4°C.
9. Répartir les bactéries dans des eppendorfs stériles (100 µl par tube).
10. Plonger les cellules dans de l'azote liquide, puis les stocker à -70°C jusqu'à utilisation.

## 2. Méthodes

### **1. Méthodes relatives aux acides nucléiques**

#### a) Miniprep d'ADN plasmidique

##### Matériel et solutions

- ?? Tampon de lyse : glucose 50 mM, Tris 25 mM, EDTA 10 mM (pH 8,0) + lysozyme 4 mg/ml (fraîchement préparé)
- ?? Solution NaOH/SDS : NaOH 2,0 M, SDS 0,1 %
- ?? Solution d'acétate : acétate de potassium 3M, acide acétique glacial 10%
- ?? Phénol/chloroforme/alcool iso amylique (25 :25 :1)
- ?? Ethanol 96 % maintenu à -20°C
- ?? Tampon TE-RNase : Tris-EDTA pH 8,0, RNase 5 µg/ml (DNase free)

##### Protocole

1. Centrifuger 1,5 ml de suspension bactérienne à 12000 rpm (2 minutes, 4°C).
2. Ajouter au culot 150 µl de tampon de lyse.
3. Incuber l'échantillon pendant 5 min dans la glace.

4. Ajouter 300 µl de solution NaOH/SDS. Incuber 5 min sur glace.
5. Ajouter 150 µl solution d'acétate. Vortexer 10 secondes et incuber 5 min sur glace.
6. Centrifuger à 12000 rpm pendant 10 min à 4°C.
7. Au surnageant, ajouter 400 µl de phénol/chloroforme/alcool iso amylique (25 :25 :1). Vortexer énergiquement.
8. Centrifuger à 12000 rpm pendant 2 min à 4°C.
9. A la phase aqueuse (supérieure) ajouter 500 µl d'éthanol et incuber au moins 10 min à -70/80°C.
10. Centrifuger à 12000 rpm pendant 10 min à 4°C.
11. Sécher le culot (décanter à la pipette ; puis au speedvac)
12. Resuspendre le culot dans 20 µl de tampon TE-RNase et incuber à 37°C pendant 1h.
13. Conserver les plasmides à -20°C jusqu'à une prochaine utilisation.

#### b) Midiprep d'ADN plasmidique

Cette méthode permet une préparation de jusqu'à 100 µg d'ADN plasmidique en utilisant un QIAGEN-tip 100. Volumes Maximaux de culture recommandés :

	QIAGEN-tip 100
High-copy	25 ml
Low-copy	100 ml

#### Remarques préliminaires

- ?? Vérifier que le tampon P1 contient la RNase A (concentration finale = 100 µg/ml)
- ?? Vérifier que le tampon P2 n'a pas de dépôt de SDS. Si nécessaire, chauffer à 37°C
- ?? Mettre le tampon P3 à 4°C en début de manipulation

#### Matériel et solutions

- ?? Kit Qiagen-TIP 100
- ?? Isopropanol
- ?? Ethanol 70 % (température ambiante)

#### Protocole

1. Choisir une colonie isolée d'une boîte sélective nouvellement striée, et inoculer une pré-culture de 2 à 5 ml (LB + antibiotiques de sélection). Incuber à 37°C pendant >8 h sous forte agitation (jusqu'à 300 rpm).
2. Diluer la pré-culture 1/500 à 1/1000 dans du milieu LB sélectif (muni des antibiotiques adéquats). Pour les plasmides high-copy, inoculer 25 ml, pour les low-copy, inoculer 100 ml de milieu LB. Incuber à 37°C pendant 12 à 16 h sous forte agitation (jusqu'à 300 rpm).
3. Culoter les cellules par 15 minutes de centrifugation à 6000 g et à 4°C. Décanter le surnageant et égoutter en renversant les tubes sur du papier buvard.

4. Resuspendre le culot et homogénéiser les cellules dans 4 ml de tampon P1.
5. Ajouter 4 ml de tampon P2, mélanger délicatement mais complètement par 4 à 6 inversions, et incuber à température ambiante 5 min.
6. Ajouter 4 ml de P3 (refroidi à 4°C), mélanger immédiatement mais délicatement par 4 à 6 inversions, et incuber sur glace 15 min.
7. Centrifuger >20000 g pendant 30 min. à 4°C, puis récupérer sans tarder le surnageant contenant l'ADN plasmidique.
8. Re-centrifuger le surnageant >20000 g pendant 15 min. à 4°C. Récupérer le surnageant rapidement.
9. Equilibrer le QIAGEN-tip 100 en y ajoutant 4 ml de tampon QTB et laisser la colonne se vider.
10. Ajouter le surnageant de l'étape 8 au QIAGEN-tip et laisser entrer l'échantillon dans la résine.
11. Laver la colonne deux fois avec 10 ml de tampon QC.
12. Eluer l'ADN avec 5 ml de tampon QF.
13. Précipiter l'ADN en ajoutant 3.5 ml (0.7 volumes) d'isopropanol à temp. ambiante. Mélanger et centrifuger immédiatement à >15000 g pendant 30 min. à 4°C.
14. Décanter prudemment le surnageant.
15. Laver le culot avec 2 ml d'éthanol 70 % à temp. ambiante et centrifuger >15000 g pendant 10 min. Décanter le surnageant en prenant soin de ne pas toucher le culot.
16. Sécher le culot à l'air libre 5 à 10 min. et le re-dissoudre dans du TE, pH 8,0 (ou du Tris-Cl, pH 8,5).

### c) Maxiprep d'ADN plasmidique

#### Matériel et solutions:

- ?? Kit Qiagen-tip 500
- ?? Isopropanol (température ambiante)
- ?? Ethanol 70 % (température ambiante)

#### Protocole QIAGEN

Volumes maximum de culture recommandés

- Plasmides High-Copy: 100 ml
- Plasmides Low-Copy : 500 ml

1. Inoculer une culture de départ de 25 ml de milieu LB (ou TB pour Low-Copy) contenant les antibiotiques de sélection. Incuber environ 8h à 37°C sous agitation, 300 rpm.
2. Diluer la culture de départ (1/500 à 1/100) dans du milieu LB liquide. Pour des plasmides high-copy ensemercer 100 ml, pour des low-copy 500 ml. Incuber pendant 12-16 h à 37°C, sous agitation.
3. Précipiter les bactéries par centrifugation à 4°C, pendant 15 min, à 6000 g.
4. Resuspendre le culot de bactéries dans 10 ml de tampon P1.
5. Ajouter 10 ml de tampon P2, mélanger doucement par inversion. Incuber 5 min à température ambiante.
6. Ajouter 10 ml de tampon P3 refroidi, mélanger immédiatement mais doucement par inversion; incuber 20 min sur glace.

7. Centrifuger 30 min à 20000 g à 4°C. Récupérer le surnageant contenant l'ADN plasmidique dans un nouveau tube.
8. Re-centrifuger le surnageant 15 min à 20000 g à 4°C.
9. Sur une colonne QIAGEN-tip500 faire passer 10 ml de tampon QBT.
10. Faire pénétrer le surnageant de l'étape 8 dans la résine.
11. Laver la résine avec 2X30 ml de tampon QC.
12. Eluer l'ADN avec 15 ml de tampon QF.
13. Précipiter l'ADN de l'éluat en ajoutant 0.7 volume (10.5 ml) d'isopropanol à température ambiante. Mélanger et centrifuger immédiatement 30 min à 15000 g à 4°C. Enlever prudemment le surnageant.
14. Laver le culot d'ADN avec 5 ml d'éthanol 70 % à température ambiante; centrifuger 10 min à 15000 g à 4°C. Oter le surnageant avec précautions sans décrocher le culot.
15. Laisser sécher le culot à l'air libre et redissoudre l'ADN dans du tampon (TE pH 8.0 ou Tris HCl 10 mM, pH 8.5).
16. Quantifier l'ADN sur gel d'agarose.

#### d) Electrophorèse d'Acides Désoxyribonucléiques

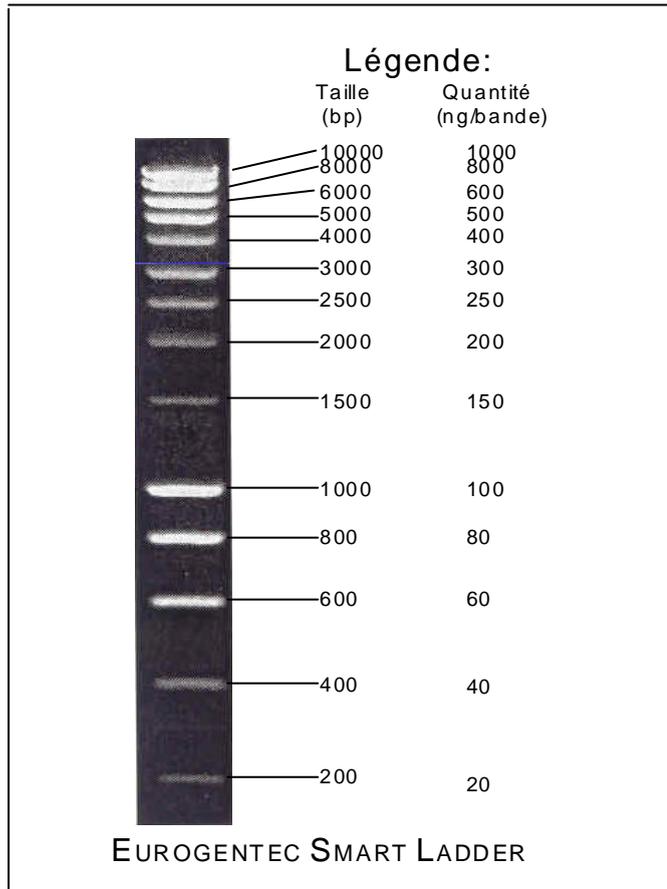
Des fragments d'ADN de tailles différentes peuvent être séparés par électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose. Le pourcentage d'agarose peut être varié en fonction de la taille des fragments à séparer. Plus ce pourcentage est élevé, plus le gel est dense et donc sépare mieux les acides nucléiques de faible taille. Le bromure d'éthidium permet la visualisation de l'ADN double brin par ses propriétés d'agent intercalant et son excitation aux U.V. La taille des fragments d'ADN est estimée en faisant migrer en même temps un étalon de poids moléculaire (SmartLadder, EUROGENTEC), contenant une série de fragments de taille connue.

#### Matériel et solutions

- ?? Cuve d'électrophorèse (Pharmacia biotech GNA 100)
- ?? Agarose (Gibco BRL)
- ?? Tampon TAE : Tris-acétate 4 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0.
- ?? Bromure d'éthidium (BET) : stock à 10 mg/ml
- ?? Solution de chargement : bleu de bromophénol 0,025 %, glucose 40 %

#### Protocole

1. Préparer 50 ml d'agarose fondu dans du tampon TAE et y ajouter 3 µl de BET.
2. Couler le gel dans un support adéquat et placer les peignes.
3. Ajouter 1 volume de solution de chargement à 5 volumes d'échantillon.
4. Placer le gel solidifié dans la cuve d'électrophorèse.
5. Déposer dans les puits un volume donné d'échantillon selon le volume des puits utilisés.



6. Faire migrer l'échantillon pendant environ 1 h à 150 V, 80 mA dans le tampon TAE.
7. Visualiser les bandes sur transilluminateur (302 nm UV).

#### e) Extraction d'ADN d'un gel d'électrophorèse (Protocole QIAEX)

##### Matériel

- ?? QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (QIAGEN)
- ?? Bain chauffant thermostaté à 50°C

##### Protocole:

1. Exciser la bande d'ADN du gel avec un scalpel propre.
2. Peser la tranche extraite du gel. Ajouter 3 volumes de tampon QX1.
3. Resuspendre la résine QIAEX II au vortex pendant 30 sec.
4. Ajouter 30 µl de QIAEX II et mélanger. Incuber 10 min à 50°C. Mélanger tous les 2 minutes.
5. Centrifuger l'échantillon 30 sec et décanter le surnageant avec précaution à la pipette.
6. Laver le culot avec 500 µl de tampon QX1. Recentrifuger 30 sec et décanter le surnageant.
7. Laver le culot deux fois avec 500 µl de tampon PE.
8. Sècher le culot à l'air libre 10-15 minutes.
9. Eluer l'ADN avec 20 µl d'H<sub>2</sub>O, pH 8.0 en resuspendant le culot au vortex. Incuber 5 min à température ambiante.
10. Centrifuger 30 sec. Pipetter le surnageant.
11. Refaire les deux étapes précédentes et combiner les éluats.

#### f) Purification d'ADN sur colonne « Microcon »

##### Matériel

- ?? Kit de purification « Microcon » (Amicon)

##### Protocole

1. Mélanger 400 µl d'eau désionisée au produit PCR ou à l'échantillon à purifier dans un eppendorf.
2. Déposer l'échantillon sur la colonne (bouchon bleu au-dessus) et centrifuger 15 minutes à 7000 rpm à température ambiante.
3. Mettre la colonne dans un nouveau tube (bouchon blanc au-dessus).
4. Déposer en son centre 20 µl d'eau désionisée et centrifuger à 4000 rpm pendant 15 minutes à température ambiante.
5. Conserver à -20°C jusqu'à une utilisation ultérieure.

#### g) Purification d'ADN par « QIAquick PCR purification kit »

Ce protocole est prévu pour purifier des produits PCR simple- ou double-brins de 100 bp à 10 kb, éliminant les amorces, nucléotides, polymérase et sels à l'aide d'une colonne et d'une micro-centrifugeuse.

##### Matériel et solutions

- ?? Kit de purification QIAquick (QIAGEN)
- ?? Centrifugeuse de table
- ?? Eau de pH 7,0 à 8,5

##### Protocole

1. Ajouter 5 volumes de tampon PB à l'échantillon et mélanger.
2. Placer une colonne QIAquick dans un tube collecteur (de 2 ml).
3. Déposer l'échantillon sur la colonne et centrifuger 30 à 60 secondes à 13000 rpm afin de lier l'ADN à la colonne.
4. Vider le contenu du tube collecteur et replacer la colonne sur ce dernier.
5. Laver la colonne en y déposant 0.75 ml de tampon PE et centrifuger 30 à 60 secondes à 13000 rpm.
6. Vider le contenu du tube collecteur et replacer la colonne sur ce dernier, re-centrifuger l'échantillon une minute à 13000 rpm.
7. Placer la colonne sur un nouveau tube Eppendorf (1.5 ml).
8. Pour éluer l'ADN de la colonne, déposer 50 µl de tampon EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) ou d'eau (pH entre 7,0 et 8,5) au centre de la colonne ; centrifuger 1 min à 13000 rpm.
9. Afin de concentrer l'échantillon, l'élution est réalisée avec 30 µl de tampon EB ou d'eau. Laisser à température ambiante quelques minutes, et ensuite centrifuger l'échantillon une minute à 13000 rpm.

#### h) Purification d'ADN par « QIAquick nucleotide removal kit »

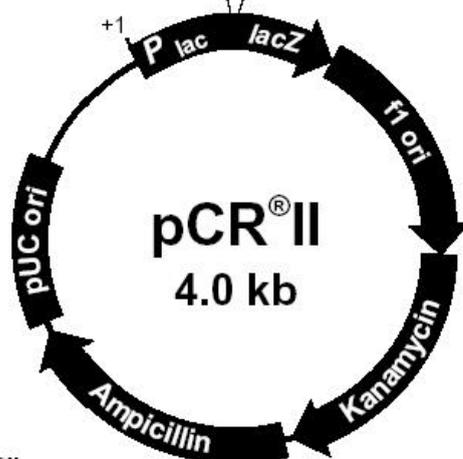
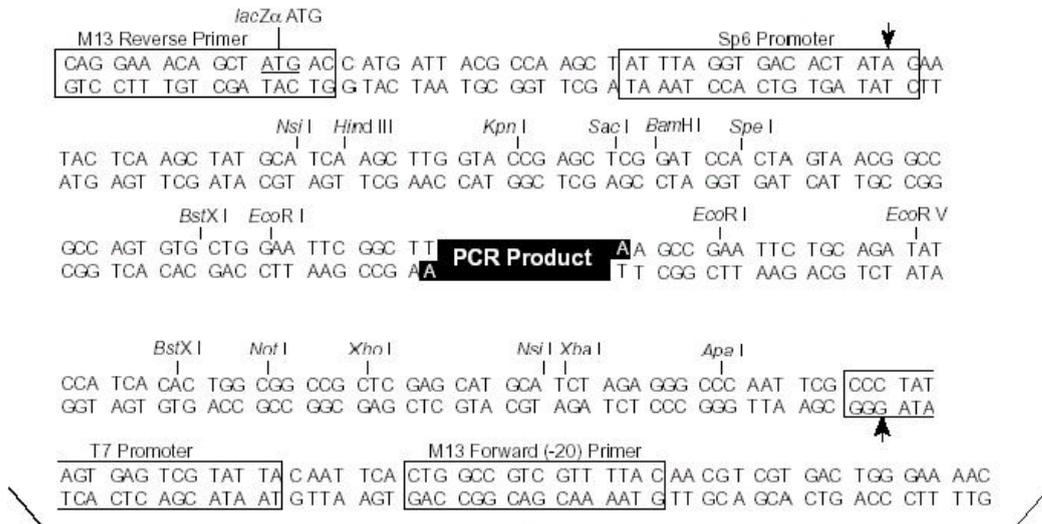
Ce protocole enlève les amorces <10 bp, enzymes, sels et nucléotides non incorporés.

##### Matériel

- ?? « QIAquick nucleotide removal kit » (QIAGEN)
- ?? Eau (pH entre 7,0 et 8,5)

##### Protocole

1. Ajouter 10 volumes de tampon PN à l'échantillon et mélanger. Pour des fragments d'ADN de taille > ou = à 100 bp, n'utiliser que 5 volumes.
2. Placer la colonne QIAquick sur un tube collecteur de 2 ml.
3. Afin de lier l'ADN, ajouter l'échantillon à la colonne et centrifuger 1 minute à 6000 rpm.
4. Laver l'échantillon en ajoutant 750 µl de tampon PE et centrifuger 1 minute à 6000 rpm.
5. Jeter le contenu du tube collecteur, y replacer la colonne et centrifuger à nouveau 1 minute à 13000 rpm.



**Comments for pCR<sup>®</sup> II**  
3971 nucleotides

- LacZα gene: bases 1-587
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- Sp6 promoter: bases 239-256
- Multiple Cloning Site: bases 269-381
- T7 promoter: bases 404-423
- M13 (-20) Forward priming site: bases 431-446
- f1 origin: bases 588-1025
- Kanamycin resistance ORF: bases 1359-2153
- Ampicillin resistance ORF: bases 2171-3031
- pUC origin: bases 3176-3849

6. Placer la colonne sur un tube eppendorf (1.5 ml) dans lequel sera élué l'ADN.
7. Eluer l'ADN avec 100 à 200 µl de tampon EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) ou de l'eau (pH entre 7,0 et 8,5). Appliquer la solution d'élué au centre de la colonne, et centrifuger 1 minute à 13000 rpm.
8. Afin de concentrer l'échantillon, l'élué est réalisée avec 30 µl de solution. Laisser à température ambiante quelques minutes, et ensuite centrifuger l'échantillon une minute à 13000 rpm.

i) Concentration d'ADN en solution par précipitation à l'alcool

Matériel et solutions

- ?? Ethanol 96 % maintenu à -20°C
- ?? Eau désionisée

Protocole

1. Ajouter 2.5 volumes d'éthanol.
2. Mettre 1 h à -70 °C.
3. Centrifuger à 13000 rpm 15 minutes à 4°C.
4. Décanter le surnageant à la pipette.
5. Sécher le culot (15 minutes à l'air libre ou 5 minutes au speedvac).
6. Conserver le culot à -20°C ou le re-suspendre dans le tampon adéquat.

j) Réaction de ligation

Matériel:

- ?? « pCRII Cloning Kit » (Invitrogen)
- ?? Appareil PCR (Biozym mini-cycler)

Protocole de ligation dans pCR? II

1. Réaliser le mix réactionnel suivant

Produit PCR	2 µl
Tampon de Ligation 10X	1 µl
Vecteur PCRII (25 ng/µl)	2 µl
Eau Stérile (pour un volume de 9 µl)	4 µl
T4 DNA Ligase (4.0 unités de Weiss)	1 µl
VolumeTotal	10 µl

2. Incuber la réaction de ligation à 14°C pendant au moins 4 heures, de préférence pendant une nuit. Le mélange de ligation peut être stocké à -20°C jusqu'à son utilisation ultérieure.

### Protocole général de ligation

1. Réaliser le mélange suivant :

X µl de l'insert  
1 µl du tampon de ligation 10x  
Y µl du plasmide  
Z µl d'eau stérile  
Pour un volume total de 9 µl ( $X + Y + Z = 8$ )

2. Ensuite ajouter 1 µl de T4 DNA ligase pour un volume final de 10 µl.
3. Incuber le mix à 14° pour au moins 4 h, de préférence un nuit
4. Le mélange de ligation peut être stocké à -20°C jusqu'à son utilisation ultérieure.

### k) Remplissage de site de restriction (protocole « Klenow »)

#### Solutions et Protocole

1. Faire le mélange suivant :

Vecteurs purifiés	18 µl
Tampon Klenow (10X)	2.5 µl
dNTP (1 mM)	1 µl
BSA (0.5 mg/ml)	1 µl
Klenow (5 U/ml)	0.6 µl
H <sub>2</sub> O	2 µl
Volume Total	25.1 µl

2. Incuber le mélange 10 minutes à température ambiante.
3. Après ces 10 minutes, l'échantillon est purifié sur colonne Microcon pour éliminer le tampon, les dNTPs et l'enzyme (voir protocole: Purification d'ADN sur colonne « Microcon »).

### m) Réaction de séquençage

#### Matériel et solutions

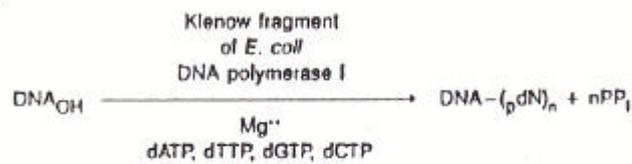
- ?? Mix de nucléotides (dNTP) pour réaction PCR (10 mM) (Roche)
- ?? Tampon PCR (10x) (Roche)
- ?? TaqPolymérase (5 U/µl) (Roche)
- ?? Eau désionisée
- ?? Appareil PCR (Biozym mini-cycler)
- ?? Séquenceur: ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer) au laboratoire de neurobiologie
- ?? Kit: Abi Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction kit (PE applied biosystems)

## E. coli DNA Polymerase I Klenow Fragment

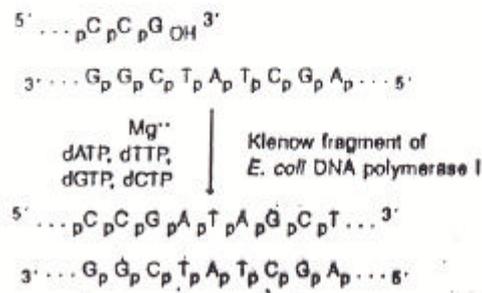
**Activity:** 5' → 3' DNA polymerase

**Substrate:** Single-stranded DNA template with a primer containing a free 3'-hydroxyl group.

**Reaction:**



**For example:**



## Protocole

### 1. Pré-amplification de l'insert à séquencer

Cette étape permet d'amplifier spécifiquement (grâce à deux amorces spécifiques) le segment du plasmide dans lequel se trouve l'insert à séquencer. Réaliser le mélange réactionnel suivant :

- 5 µg d'ADN plasmidique
- 1 µl d'amorce droite (par exemple Reverse) à 10 pmoles/µl
- 1 µl d'amorce gauche (par exemple Forward) à 10 pmoles/µl
- 1 µl de dNTP (10 mM)
- 5 µl de tampon PCR (10x)
- 1 U de TaqPolymérase (5 U/µl)
- Porter à 50 µl avec de l'eau (40.5 µl)

### 2. Amplification type

30 cycles :

Dénaturation	1 min	94°C
Hybridation (selon amorces ex.FWD/REV)	1 min	55°C
Elongation	3 min	72°C

1 cycle :

Elongation finale	10 min	72°C
-------------------	--------	------

3. Purification du produit d'amplification: Cf. les protocoles de purification « Microcon » ou « QIAquick »
4. Dépôt sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %) afin de vérifier la pré-amplification.
5. Réaction de séquençage :

Adapter la quantité d'eau (Y) en fonction du volume de solution d'ADN (X).

Solution d'ADN purifié à séquencer	X µl
Amorce gauche <b>ou</b> droite (100 pmoles/µl)	0.72 µl
Eau	Y µl
Volume final	12 µl

6. Séquençage (Kit: Abi Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction kit (PE applied biosystems)).

#### n) Quantification d'ADN par spectrophotométrie

La quantification d'ADN est faite sur base de mesures d'absorbances à une longueur d'onde de 260 nm. Cette mesure permet le calcul de la concentration en acides nucléiques. Une densité optique (DO) de 1 correspond approximativement à 50 µg/ml d'ADN double brin, à 40 µg/ml d'ADN simple brin ou d'ARN, et à 20 µg/ml d'oligonucléotides simples brins.

Le rapport des mesures à 260 nm et 280 nm ( $DO_{260}/DO_{280}$ ) donne une estimation de la pureté des acides nucléiques. Des échantillons purs d'ADN et d'ARN ont respectivement un rapport ( $DO_{260}/DO_{280}$ ) de 1,8 et 2,0. Si une contamination par des protéines ou du phénol a lieu, le rapport  $DO_{260}/DO_{280}$  sera nettement inférieur.

### Matériel et solutions

- ?? Spectrophotomètre: Shimadzu (UV 1601PC)
- ?? Solution de mise à zéro : le tampon dans lequel se trouve l'ADN à quantifier

### Méthode

1. Mettre l'appareil à la longueur d'onde désirée (260 nm).
2. Mettre à zéro avec la solution de mise à zéro.
3. Diluer l'ADN 1000x (1 µl dans 1 ml de solution de mise à zéro) et mélanger.
4. Placer la cuvette dans l'appareil et mesurer la DO à 260 nm puis à 280 nm.

### o) Amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) avec la TaqPolymérase

#### Matériel et Solutions

- ?? Appareil PCR (Biozym mini-cyclcler)
- ?? X µg de matrice
- ?? 1 µl d'amorce droite (100 pmoles/µl)
- ?? 1 µl d'amorce gauche (100 pmoles/µl)
- ?? 2 µl de dNTP (10 mM) (Roche)
- ?? 5 µl de tampon PCR (10x) (Roche)
- ?? 1 U de TaqPolymérase (5 U/µl) (Roche)
- ?? Porter à 50 µl avec de l'eau désionisée

#### Protocole d'amplification type

Etape	Durée	Température	Nombre de cycles
Dénaturation	1 minute	94 °C	1
Dénaturation	1 minute	94 °C	30
Hybridation	1 minute	T °C	
Elongation	3 minutes	72 °C	
Elongation finale	10 minutes	72 °C	1

La température d'hybridation (T) dépend des amorces utilisées.

Amorces (EUROGENTEC):

Amorces utilisées afin d'amplifier la séquence codante de la glucose oxydase<sup>1</sup>:

SOUPGOG 5'-cgc-cca-tcc-atg-cag-act-ctc-ctt-gtg-agc-3'

SOUPGOD 5'-ccc-aag-ctt-tca-ctg-cat-gga-agc-ata-atc-ttc-c-3'

Température d'hybridation utilisée en PCR : 55 °C

Amorces utilisées afin d'amplifier différents promoteurs et un terminateur:

---

<sup>1</sup> Numéro d'Accession: J05242

le promoteur PR1-2 du Tabac<sup>2</sup>:

SOUPTABG 5'-tgc-tct-aga-gga-cta-aga-tat-acg-agg-3'

SOUPTABD 5'-cgc-gga-tcc-gac-tat-agg-aga-aat-gtt-gta-tc-3'

Température d'hybridation utilisée en PCR : 55 °C

le promoteur PR1-a du Persil<sup>3</sup>:

SOUUPERG 5'-tgc-tct-aga-gga-tac-gaa-tgc-aga-tat-ttc-aga-cgg-a-3'

SOUUPERD 5'-cgc-gga-tcc-tat-atg-tta-ata-taa-act-gac-gag-aga-aa-3'

Température d'hybridation utilisée en PCR : 55 °C

le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur:

SOUUP35G 5'-tgc-tct-aga-gta-ccc-cta-ctc-caa-aaa-tgt-cao-3'

SOUUP35D 5'-cgc-gga-tcc-ggg-ctg-tcc-tct-cca-aat-gaa-atg-aac-3'

Température d'hybridation utilisée en PCR : 55 °C

le terminateur de la Nopaline Synthase (NOS):

SOUPTERG 5'-ccc-aag-ctt-gaa-ttt-ccc-cga-tcg-ttc-aaa-cat-ttg-3'

SOUPTERD 5'-cgg-ggt-acc-ccg-atc-tag-taa-cat-aga-tga-3'

Température d'hybridation utilisée en PCR : 55 °C

Amorces permettant d'amplifier entre le bord droit et gauche de pGreen:

LBOG 5'-ctt-ggc-agg-ata-tat-tgt-ggt-gta-ac-3'

RBOD 5'-tct-cao-aca-aac-aca-tac-agc-gac-tta-3'

Température d'hybridation utilisée en PCR : 50 °C

Amorces permettant d'amplifier la cassette de sélection nos-kan:

NOSKANG 5'-ccc-gat-atc-gat-aca-tga-gaa-tta-a-3'

NOSKAND 5'-ccc-gat-atc-agc-ttg-cat-gcc-ggt-cga-t-3'

Température d'hybridation utilisée en PCR : 50 °C

---

<sup>2</sup> Numéro d'Accession: X76982

<sup>3</sup> Numéro d'Accession: U48863

### III. RESULTATS et DISCUSSION

## **III Résultats et discussion**

### **Rappel du cadre et des objectifs du travail**

La glucose oxydase représente une voie de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indépendante de la HR. Son expression en plante permet d'assurer la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la paroi végétale. Les recherches précédentes au laboratoire ont montré qu'une expression constitutive de la GO était nuisible aux plantes de chicorée (C. Benet, 1998).

Ce mémoire a comme objectif d'obtenir des chicorées produisant la GO de façon régulée en utilisant des promoteurs inductibles. L'attaque d'un pathogène déclenchera ainsi la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de manière ponctuelle.

Pour ce faire, dans un premier temps, les constructions des T-DNA seront réalisées dans le vecteur binaire pGreen; et, dans un deuxième temps, ces constructions seront introduites dans le génome de la chicorée par *Agrobacterium tumefaciens*.

### **Constructions disponibles**

#### **Glucose Oxydase (GO) d'*Aspergillus niger***

La séquence codante (1818 bp) du gène de la GO dont nous disposons a été précédemment clonée par C. Benet, 1998 dans le vecteur pMOS.

#### **Les promoteurs inductibles**

?? Promoteur du gène PR1-a du Tabac (1500 bp)

?? Promoteur du gène PR1-2 du Persil (900 bp):

Ces promoteurs sont, entre autres, induits par l'acide salicylique qui est un médiateur dans la réponse aux pathogènes. De plus, ces promoteurs contiennent des séquences reconnues par des protéines nucléaires (de la famille WRKY) qui sont induites par des éliciteurs (Euglem *et al* 1999). Ces deux mécanismes seront, nous l'espérons, exploités pour induire la transcription de la GO lors d'attaques de pathogènes uniquement.

Les promoteurs dont nous disposons ont été clonés dans le plasmide pMOS et proviennent également du travail de mémoire de C. Benet, 1998.

## **Promoteur 35S (422 bp)**

Le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) sera amplifié à partir d'une cassette fournie avec le kit pGreen.

## **Terminateur de la Nopaline Synthase (tNOS)**

Le terminateur de la nopaline synthase (282 bp) sera amplifié au départ d'une cassette *nos* également fournie avec le kit pGreen.

Les sites de restrictions bordant les fragments décrits ci-dessus ne permettent pas un clonage direct dans pGreen. Il faudra donc border ces fragments avec de nouveaux sites afin de construire le vecteur de transformation adéquat. Ces sites seront introduits au moyen d'amorces PCR.

## **Clonage des nouveaux inserts dans pCRII**

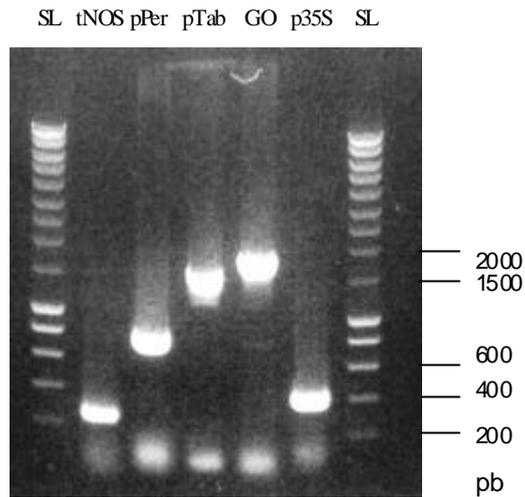
### **Définition de nouvelles amorces**

De nouvelles amorces PCR ont été définies pour amplifier chacun des inserts et y introduire des nouveaux sites de restriction. Les sites utilisés ont été choisis parmi les sites présents dans le MCS du vecteur pGreen et absents des séquences des divers fragments à cloner. Les séquences de ces amorces sont reprises dans le matériel et méthodes. Il s'agit des couples d'amorces SOUPGOG/SOUPGOD, SOUPERG/SOUPERD, SOUPTABG/SOUPTABD, SOUP35G/SOUP35D et SOUPTERG/SOUPTERD, qui permettent d'amplifier respectivement la GO, le promoteur PR1-2 du Persil, le promoteur PR1-a du Tabac, le promoteur 35S (CaMV) et le terminateur de la Nopaline Synthase.

Les amorces de la GO introduisent le site HindIII (AAGCTT) en 3' et BamHI (GGATCC) en 5'.

Les amorces spécifiques des promoteurs introduisent le site BamHI (GGATCC) en 3' et XbaI (TCTAGA) en 5' permettant un clonage en amont de la GO.

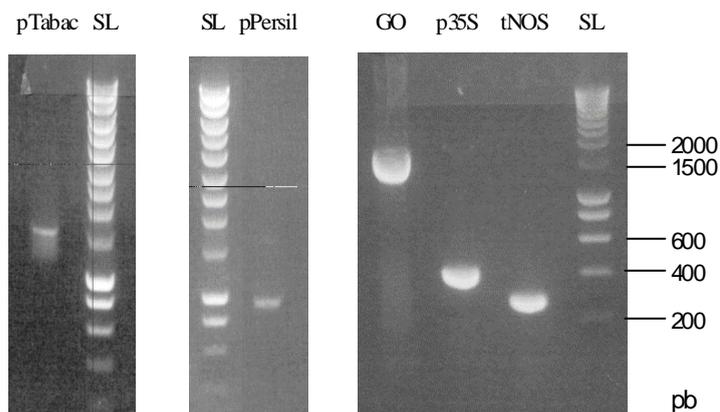
Les amorces du terminateur tNOS introduisent le site KpnI (GGTACC) en 3' et HindIII (AAGCTT) en 5' permettant son intégration immédiatement en aval de la GO.



**Figure III.1: Amplifications PCR des fragments tNOS, pPer, pTab, GO et p35S sur les plasmides pCRII correspondants.**

Des aliquots (5 $\mu$ l) des produits PCR des fragments GO (séquence codante de la glucose oxidase), p35S (promoteur 35S) et tNOS (terminateur NOS) ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %). Un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec) a été déposé en première et dernière piste.

Les amplicons obtenues correspondent aux tailles attendues : 300 bp (tNOS), 900 bp (pPer), 1500 bp (pTab), 1800 bp (GO) et 400 bp (p35S).



**Figure III.2: Vérification de la purification des fragments GO, p35S, tNOS, et pTabac.**

Les produits PCR des fragments GO (séquence codante de la glucose oxidase), p35S (promoteur 35S) et tNOS (terminateur NOS) ont été purifiés sur colonne Microcon (Millipore) et des aliquots (5 $\mu$ l) de ces produits purifiés ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %) (SL=Smart Ladder, Eurogentec).

## **Amplification des fragments**

Les clones bactériens contenant les fragments GO, pTab, pPer, p35S et tNOS respectivement, ont été mis en cultures liquides. Les plasmides correspondants ont été préparés par miniprep et les différents inserts amplifiés par PCR au départ de ces plasmides.

Un échantillon de chaque amplification a été déposé sur gel d'agarose 1 % afin de vérifier la présence de bandes d'ADN à la taille attendue. D'après la figure III.1, la GO (1818 bp), le promoteur pPer (900 bp), pTab (1500), 35S (422 bp) et le terminateur tNOS (282 bp) présentent une bande d'amplification intense de taille attendue.

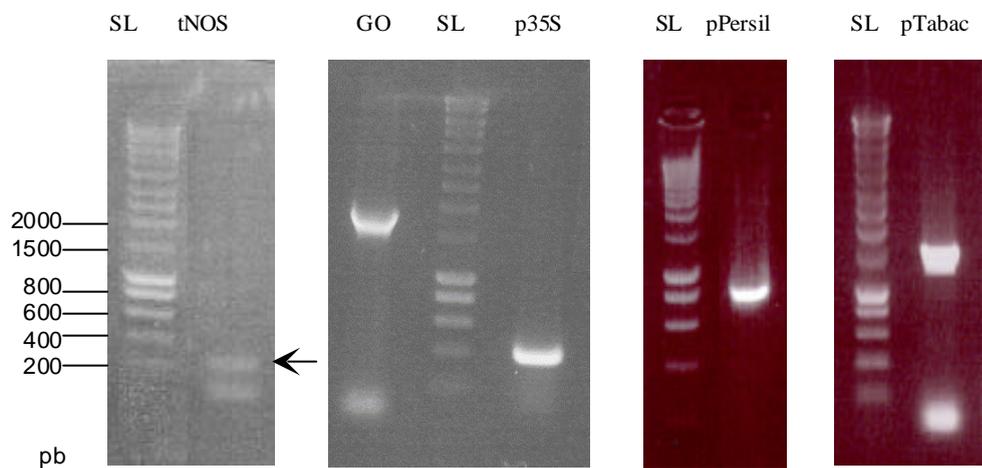
## **Clonage dans pCRII et sélection des transformants**

Les PCR sur les cinq plasmides étant positives, les mélanges PCR ont été purifiées sur colonne « microcon » et vérifiées sur gel d'agarose (figure III.2) avant l'étape de clonage.

Ces inserts ont été clonés dans le vecteur pCRII et des bactéries TOP10F' ont été transformées par choc thermique. La sélection des transformants a été réalisée par un test blanc/bleu sur milieu sélectif (Ampicilline 50 µg/ml) contenant de l'IPTG (28 µg/ml) et du Xgal (28 µg/ml).

Pour chaque insert, une vingtaine de colonies blanches ont été repiquées sur un milieu de même composition ainsi qu'une colonie bleue qui a servi de contrôle négatif. Les transformants ont alors été identifiés par PCR sur colonie afin de vérifier la présence des différents inserts avec leurs amorces respectives. Les produits d'amplification ont été analysés sur gel d'agarose 1%. La figure III.3 présente des amplifications-types réalisées sur des colonies positives. Nous observons les fragments de 1818 bp, 900 bp, 1500 bp, 422 bp et 282 bp respectivement pour les fragments de la GO, pPer, pTab, p35S et tNOS.

Un clone positif en PCR pour chaque insert a été mis en culture liquide et l'ADN plasmidique a été purifié par miniprep. Des stocks glycérol ont été constitués pour chaque clone.



**Figure III.3: Vérification du clonage dans PCRII des inserts tNOS, GO, p35S, pPersil et pTabac par amplifications PCR sur des colonies bactériennes (Top10F') transformées.**

Des aliquots (5 $\mu$ l) des amplifications PCR sur colonies bactériennes des fragments GO (séquence codante de la glucose oxidase), p35S (promoteur 35S), pPersil (promoteur PR1-2 du persil), pTabac (promoteur PR1-a du tabac) et tNOS (terminateur NOS) ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %) . Un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec) a été déposé.

## **Séquençage des inserts**

Les différents inserts ont été séquencés afin de vérifier la présence des nouveaux sites de restriction.

La PCR de préséquençage a été effectuée au moyen des amorces Forward et Reverse et vérifiée sur gel d'agarose (figure III.4). Les amorces étant spécifiques du plasmide pCRII, les produits d'amplification obtenus ont une taille supérieure à celle des inserts : GO (2000 bp), pTabac (1700 bp), pPersil (1200 bp), 35S (1600 bp) et tNOS (600 bp). --88

Les échantillons des PCR de préséquençage ont été purifiés par le kit QiaQuick, vérifiés sur gel d'agarose et séquencés grâce au kit Abi Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing.

Maintenant que nous disposons des différents fragments d'ADN bordés des sites de restriction adéquats, ceux-ci seront utilisés pour construire le T-DNA au sein du plasmide pGreen.

## **Clonage de la GO dans le vecteur pGreen**

### **Obtention et restriction du vecteur pGreen**

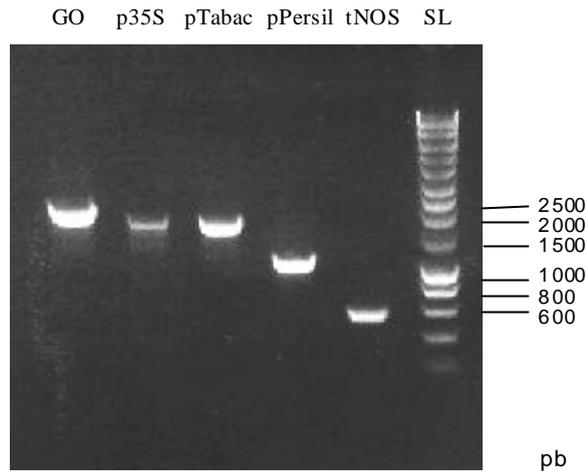
Un clone bactérien portant le plasmide pGreen a été utilisé pour inoculer une préculture liquide de 5 ml de milieu LB + kanamycine à 50 µg/ml. Cette préculture a servi à inoculer 100 ml de milieu LB + kanamycine à 50 µg/ml. Le plasmide pGreen a été purifié par midiprep au moyen du kit QIAGEN-Tip100.

Le plasmide pGreen a été restreint par HindIII et BamHI. Le produit de la restriction a été analysé sur gel d'agarose (figure III.5). La bande du fragment d'ADN d'intérêt a été excisée et l'ADN extrait du gel grâce au kit QIAEX.

### **Restriction du plasmide PCRII-GO**

Le plasmide pCRII-GO a été restreint avec les enzymes HindIII et BamHI (figure III.5). La bande d'ADN correspondant à la glucose oxydase a été excisée du gel et l'ADN extrait grâce au kit QIAEX.

Le fragment GO de 1818 bp a été inséré dans le vecteur pGreen par ligation en respectant le rapport insert : vecteur de 3 : 1.

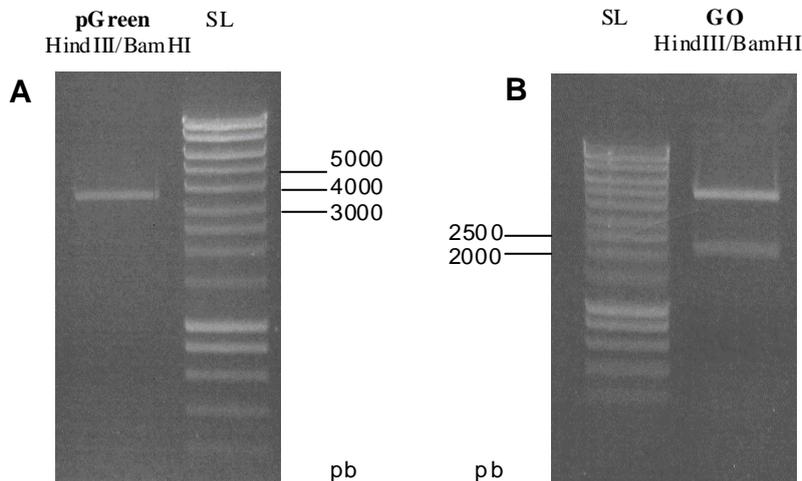


**Figure III.4: Vérification des amplifications PCR de préséquénçage des inserts GO, p35S, tNOS, pPersil et pTabac.**

Des PCR de préséquénçage (amorces Forward et Reverse) ont été effectuées sur les clones positifs contenant les inserts GO (séquence codante de la glucose oxidase), p35S (promoteur 35S), pPersil (promoteur PR1-2 du persil), pTabac (promoteur PR1-a du Tabac) et tNOS (terminateur NOS).

Des aliquots (5 $\mu$ l) des ces produits PCR ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %) . Un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec) a été déposé.

Les amplicons obtenues ont les tailles suivantes : 2000 bp (GO), 1600 bp (p35S), 1700 bp (pTab), 1200 bp (pPer) et 600 bp (tNOS).



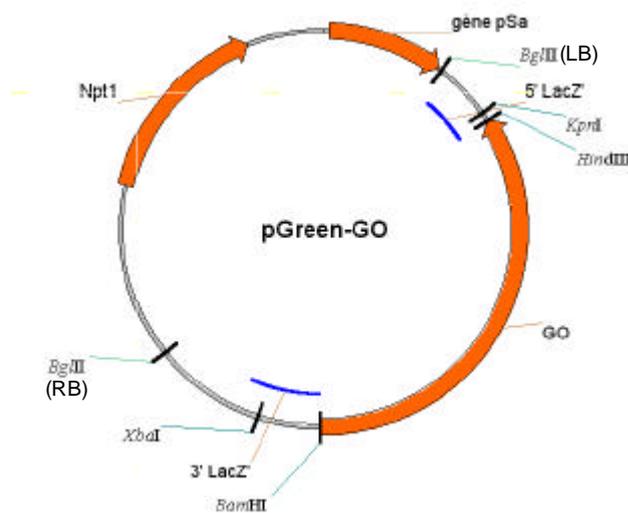
**Figure III.5 : Restriction diagnostique des plasmides pGreen et pCRII-GO.**

**A** : Le plasmide pGreen a été doublement restreint avec les enzymes HindIII et BamHI. Le produit de restriction ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec) ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %). Un fragment de 3300 pb a ainsi été excisé.

**B** : Le plasmide pCRII-GO a été restreint avec les enzymes HindIII/BamHI. L'insert GO a ainsi été excisé (1818 pb).

## Obtention du plasmide pGreen-GO

Les produits de la ligation pGreen et GO restreints par HindIII et BamHI ont été utilisés pour transformer des cellules TOP10F' par choc thermique. La sélection des transformants a été réalisée sur milieu LB contenant de la kanamycine (50 µg/ml) du Xgal (28 µg/ml) et de l'IPTG (28 µg/ml). Les colonies blanches ont subi un criblage par PCR avec les amorces SOUPGOG et SOUPGOD (figure III.). Deux clones (colonies 9 et 33) se sont avérés positifs en PCR. Ces deux clones ont été mis en culture pour en extraire l'ADN plasmidique. Des restrictions diagnostiques (HindIII/BamHI) ont été réalisées sur chaque clone. Seule la colonie 33 s'est avérée donner le bon profil de restriction et sera retenue pour la suite du travail.

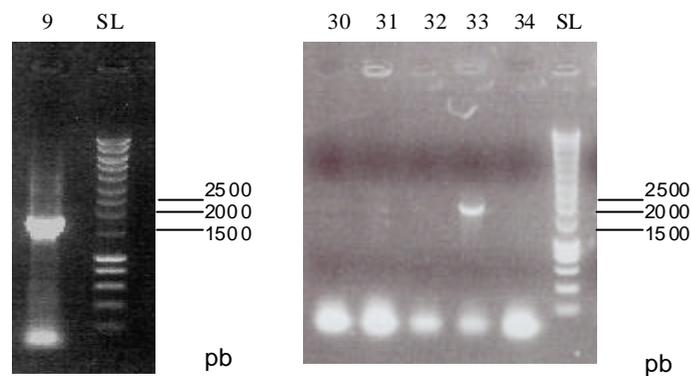


Représentation schématique du vecteur pGreen contenant la séquence codante de la GO au sein du T-DNA

## Clonage du terminateur tNOS dans le vecteur pGreen-GO

### Isolement et restriction du terminateur tNOS

Le plasmide pCRII portant le terminateur tNOS a été restreint par HindIII et cette restriction a été vérifiée sur gel d'agarose (figure III.7). Ce premier mélange de restriction a été purifié par « microcon » afin de permettre le changement de tampon de restriction, et sujette à une deuxième restriction, cette fois, par Kpn1. La double restriction a été vérifiée sur gel d'agarose (figure III.7); la bande d'ADN correspondant au terminateur tNOS a été extraite du gel grâce au kit QIAEX (figure III.8).



**Figure III.6: Vérification du clonage dans le plasmide pGreen HindIII/BamHI de l'insert GO HindIII/BamHI.**

Des amplifications PCR ont été effectuées sur des colonies blanches TOP10F' issues de la transformation avec le produit de ligation pGreen HindIII/BamHI et GO HindIII/BamHI. Des aliquots (5 $\mu$ l) de ces produits PCR ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec) ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %). L'amplification sur les colonies 9 et 33 a permis d'obtenir une bande de taille attendue (1818 bp).

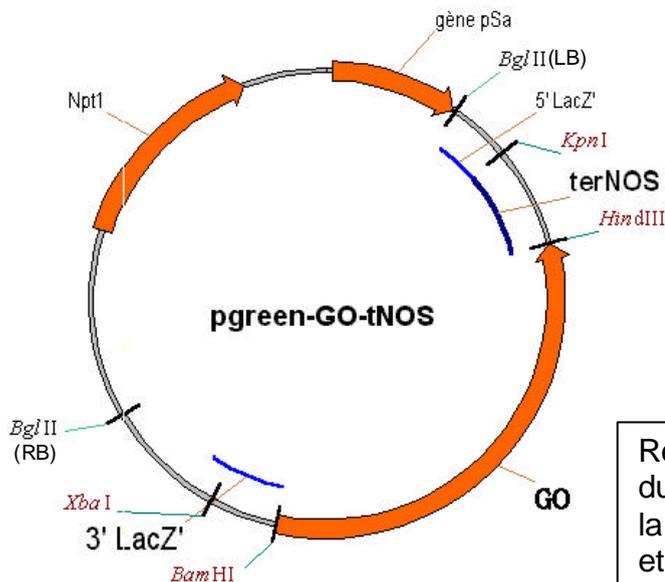
## Restriction de pGreen-GO

Le produit de la miniprep du clone 33 a été restreint par HindIII puis purifié grâce au kit QIAquick. Le produit purifié a été restreint par KpnI et soumis à une seconde purification QIAquick.

Le fragment du terminateur tNOS a été cloné dans le vecteur pGreen-GO par ligation en respectant le rapport insert : vecteur de 3 :1

## Clonage du terminateur tNOS dans le vecteur pGreen-GO

Des cellules TOP10F' ont été transformées par choc thermique avec le mélange de ligation du terminateur tNOS dans l'intermédiaire pGreen-GO. Les colonies ont été sélectionnées sur milieu LB contenant kanamycine (50 µg), Xgal (28 µg/ml) et IPTG (28 µg/ml). Une vingtaine de colonies blanches ont été repiquées et testées par PCR avec les amorces du terminateur NOS (SOUPTEG et SOUPTERD) (figure III.9). Le clone numéro 6 a été retenu sur base d'un résultat positif en PCR. Ce clone a été mis en culture liquide dans du milieu LB + kanamycine (50 µg/ml) et le plasmide (pGreen-GO-tnos) a été préparé par miniprep.



## Vérification du clone 6 par PCR

Afin de vérifier la présence du terminateur en aval de la GO, une PCR a été effectuée avec l'amorce gauche de la GO (SOUPGOG) et l'amorce droite du terminateur

(SOUPTERD). Le fragment amplifié devrait contenir la séquence codante de la Glucose Oxydase et le terminateur tNOS ; la taille attendue de ce fragment devrait être de (282+1818) 2100 bp. Une PCR sur le même plasmide a été réalisée avec les amorces SOUPGOG et SOUPGOD (figure III.10).

Nous avons remarqué une différence de taille entre les deux produits PCR. Cette différence est de l'ordre de 300 bp, ce qui correspond bien à la taille du terminateur (282 bp). Nous pouvons en déduire que le terminateur est juxtaposé à la séquence de la GO puisque la taille de l'amplicon est celle attendue (2100 bp).

## **Restriction diagnostique du clone 6**

Le plasmide issu de la miniprep du clone 6 a été vérifié par digestion enzymatique. Après une première digestion par HindIII, l'échantillon a été purifié pour subir ensuite la deuxième restriction par Kpn1. Sur base de la figure III.11, une différence de taille a été observée entre les deux fragments à environ 6000 bp. En effet, la bande de droite (la double restriction) est légèrement plus basse que celle de gauche. Le fragment d'ADN correspondant au terminateur tNOS (282 bp) a été observé au transilluminateur mais n'apparaît pas sur la photo du gel. Le clone numéro 6 contient donc la bonne construction, qui sera appelée l'intermédiaire "pGreen-GO-tnos", et qui servira de vecteur pour le clonage des différents promoteurs.

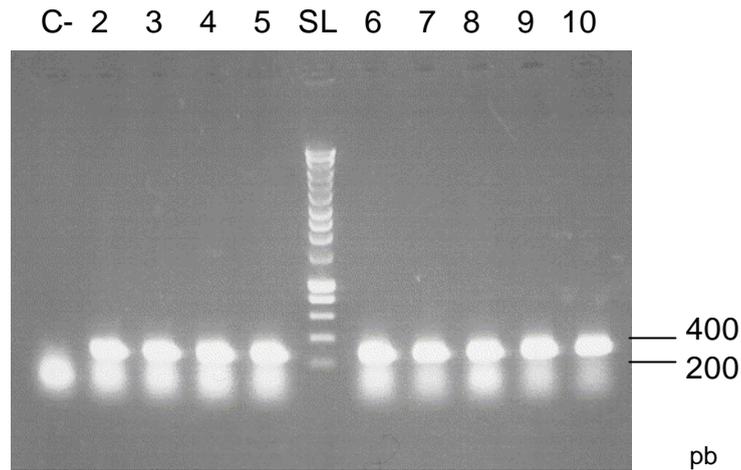
## **Clonage des promoteurs dans le plasmide pGreen-GO-tnos.**

### **Restriction de pGreen-GO-tnos**

Le plasmide pGreen-GO-tnos, préparé par miniprep, a été restreint par Xba1 et BamHI. L'intermédiaire doublement restreint a ensuite été purifié par le kit QIAquick et vérifié sur gel d'agarose (figure III.12).

### **Isolement des promoteurs à partir du plasmide pCRII**

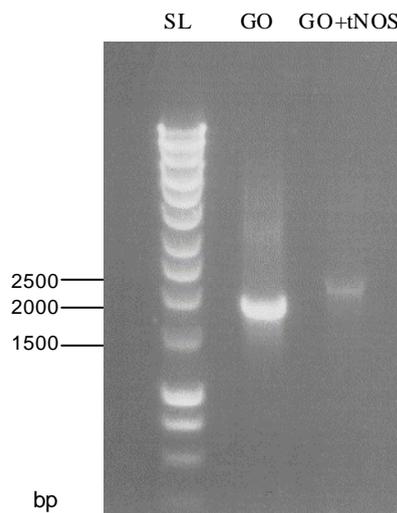
Les trois promoteurs ont été restreints des plasmides pCRII correspondants par Xba1 et BamHI et déposés sur gel d'agarose (figure III.13). Les restrictions du promoteur de Tabac et de Persil ont bien libéré des fragments de taille attendue (respectivement de 1500 bp et 900 bp). Ces fragments ont été extraits du gel grâce au kit QIAEX.



**Figure III.9: Vérification du clonage dans le plasmide pGreen-GO HindIII/KpnI de l'insert tNOS HindIII/KpnI.**

Des amplifications PCR ont été effectuées sur les 20 colonies blanches TOP10F' issues de la transformation avec le produit de ligation pGreen-GO HindIII/KpnI et tNOS HindIII/KpnI. Des aliquots (5µl) de ces produits PCR ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec) ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %). Pour chacune des amplifications, une bande de taille attendue a été obtenue (422 bp).

Un contrôle négatif a été effectué sur une colonie bleue et 5 µl ont été déposés dans le premier puits.



**Figure III.10: Vérification de la proximité du terminateur NOS et de la GO.**

Des amplifications PCR ont été effectuées sur le clone 6 avec les couples d'amorces SOUPGOG/SOUPGOD et SOUPGOG/SOUPTERD. Des aliquots (5µl) de ces produits PCR ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec) ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %). Pour chacune des amplifications, une bande de taille attendue a été obtenue (1818 bp et 2100 bp).

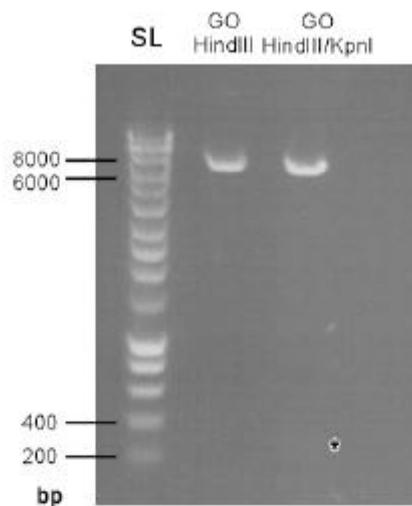


Figure III.11: Restriction diagnostique de la miniprep du clone 6 pGreen-GO-tNOS.

Le plasmide pGreen-GO-tNOS a été doublement restreint avec les enzymes HindIII et KpnI. Le produit de restriction ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec) ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %). Nous pouvons remarquer une différence de taille entre les fragments des vecteurs restreints. Le fragment du terminateur a été observé au trans-illuminateur et son emplacement est indiqué par une astérisque.

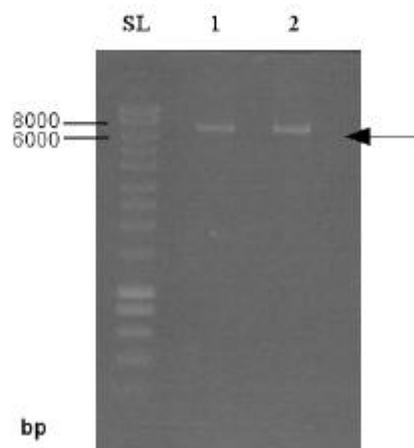
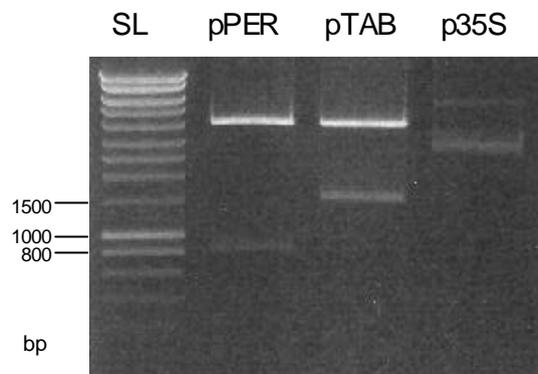


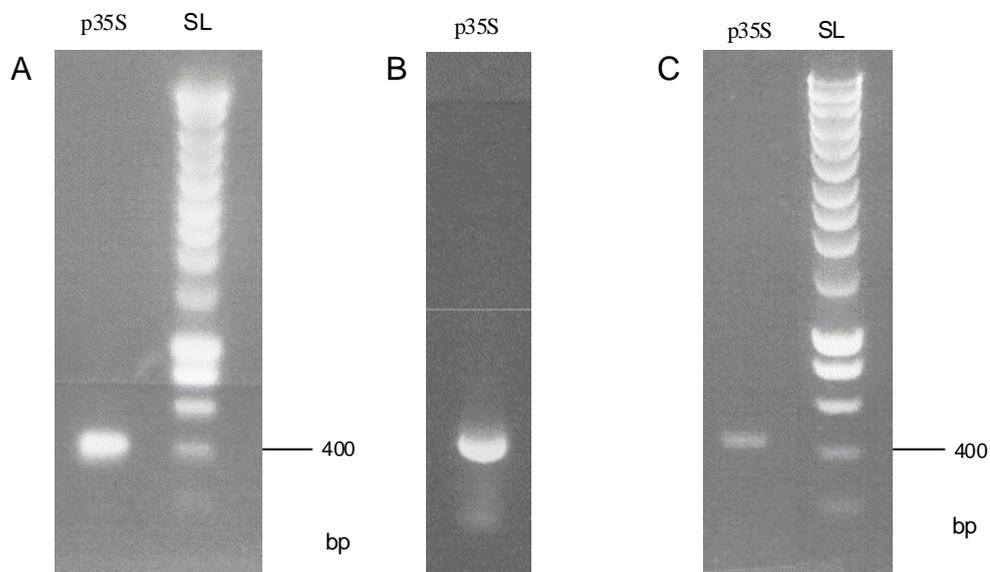
Figure III.12: Restrictions de deux minipreps du clone 6 pGreen-GO-tNOS par XbaI et BamHI en vue du clonage des promoteurs.

Le produit de restriction de miniprep 1 (1) et 2 (2), ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec) ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %).



**Figure III.13: Restriction diagnostique des plasmides pCRII contenant les promoteurs pPER, pTAB et p35S par XbaI et BamHI.**

Les plasmides pCRII ont été doublement restreint avec les enzymes XbaI et BamHI. Le produit de restriction ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec) ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %). Des fragments de 1600 pb et 900 bp ont ainsi été excisés, correspondants aux promoteurs PR1-a du tabac et PR1-2 du persil. La double restriction devant libérer le promoteur 35S n'ayant pas réussi, une voie alternative a été choisie pour l'isoler du plasmide pCRII correspondant.



**Figure III.14: Amplifications PCR du fragment p35S à partir du plasmide pCRII correspondant.**

Un aliquot (5 $\mu$ l) de produit PCR du fragment p35S (promoteur 35S) amplifié à partir du plasmide pCRII avec les amorces spécifiques de p35S, a été déposé sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %). Un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec) a aussi été déposé (A).

Une nouvelle PCR est réalisée après avoir "piqué" dans la bande à 422 bp, un aliquot (5 $\mu$ l) est déposé sur gel d'agarose 1 % (B).

Le nouveau produit PCR a été purifié grâce au kit QIAquick, et un aliquot a été déposé sur gel pour vérification (C) ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec).

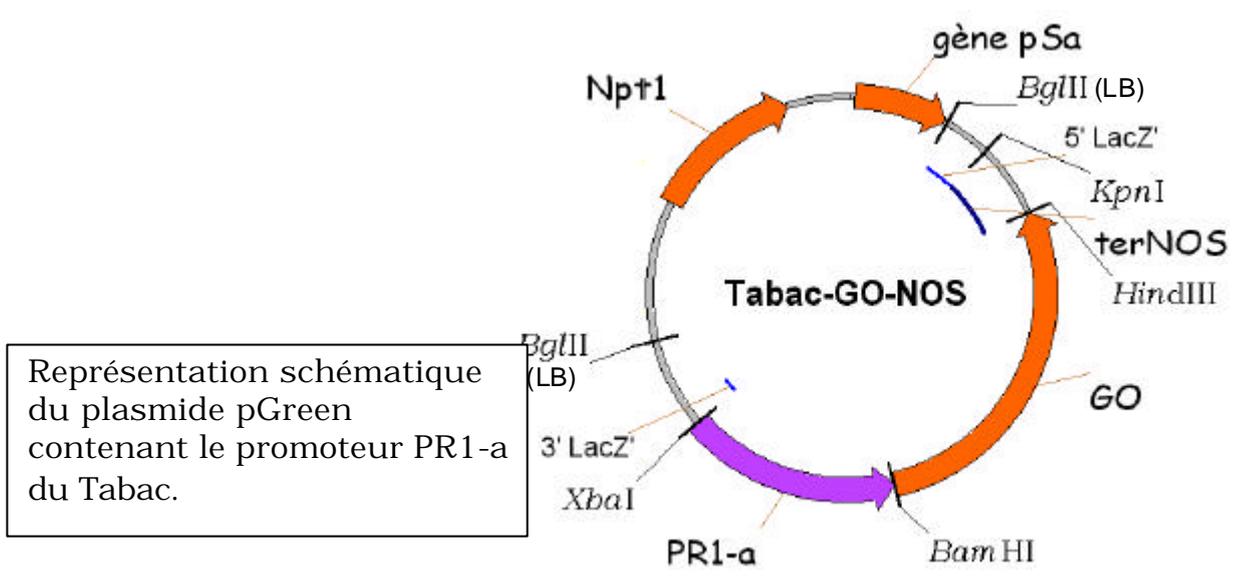
La restriction du promoteur 35S n'ayant pas libéré le fragment voulu de 422 bp, une voie alternative a été choisie. Ce promoteur a alors été amplifié à partir du plasmide pCRII et déposé sur gel d'agarose 1 % (figure III.14A). Après avoir « piqué » dans la bande d'ADN d'intérêt, une nouvelle PCR a été réalisée avec les amorces adéquates afin de se débarrasser du plasmide de départ. Le résultat de cette nouvelle PCR a été vérifié sur gel d'agarose (figure III.14B). Ce mélange PCR a été purifié par le kit QIAquick et vérifiée sur gel d'agarose (figure III.14C).

L'amplicon 35S a alors été restreint par BamHI et XbaI, avant de subir une nouvelle purification par le kit QIAquick.

### Clonage des promoteurs dans pGreen-GO-tnos restreint

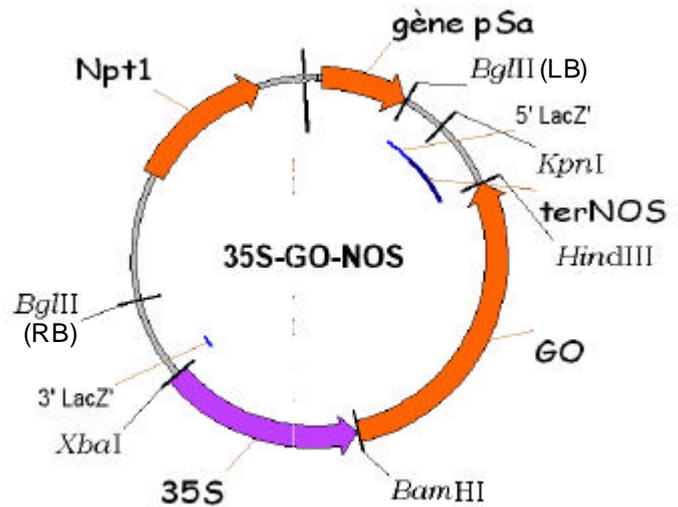
Les trois promoteurs doublement restreints ont été incorporés dans l'intermédiaire pGreen-GO-tnos par ligation. Le produit de ligation a été utilisé pour transformer des bactéries TOP10F' par choc thermique. La sélection des transformants a été réalisée sur milieu contenant de la kanamycine (50 µg/ml), du Xgal (28 µg/ml) et de l'IPTG (28 µg/ml). Les colonies blanches ont été repiquées sur un milieu sélectif de même composition et criblées par PCR avec les amorces appropriées.

Des 28 colonies criblées pour le promoteur PR1-a du Tabac, un seul clone s'est avéré positif (figure III.15). Ce clone ("tab 1") a été mis en culture et utilisé pour la suite du travail.



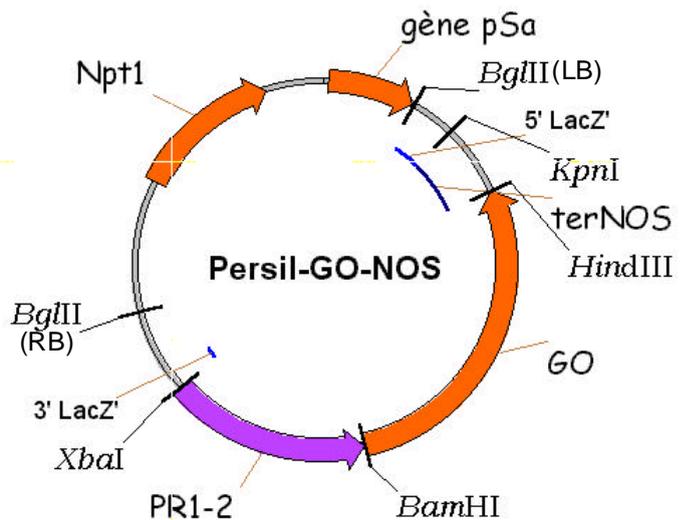
Des 21 colonies testées pour le promoteur 35S, 10 étaient positives. Le clone "35S 4" a été choisi et mis en culture pour la suite du travail (figure III.16).

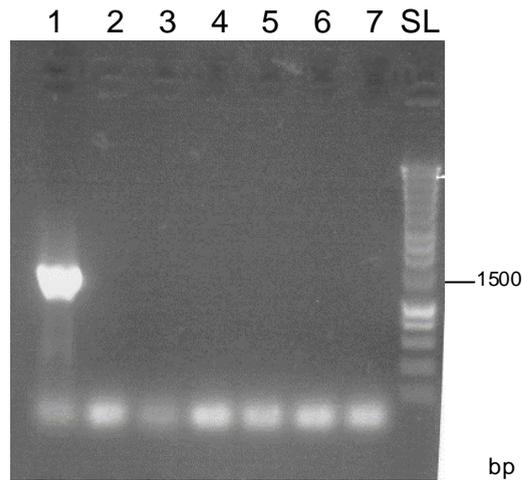
Représentation schématique du plasmide pGreen contenant le promoteur 35S du virus CaMV.



Des 30 colonies ayant été criblées pour le promoteur PR1-2 du Persil, 20 étaient positives. Quatre clones positifs ("per1", "per2", "per3" et "per4") ont été mis en culture pour la suite du travail (figure III.17).

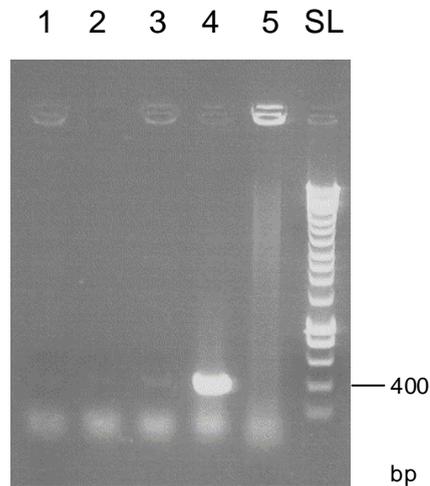
Représentation schématique du plasmide pGreen contenant le promoteur PR1-2 du Persil.





**Figure III.15: Vérification du clonage dans le plasmide pGreen-GO-tnos XbaI/BamHI de l'insert pTab XbaI/BamHI.**

Des amplifications PCR ont été effectuées sur des colonies blanches TOP10F' issues de la transformation avec le produit de ligation pGreen-GO-tnos XbaI/BamHI et pTab XbaI/BamHI. Des aliquots (5µl) de ces produits PCR ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec) ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %). L'amplification sur la colonie 1 a permis d'obtenir une bande de taille attendue (1500 bp).



**Figure III.16: Vérification du clonage dans le plasmide pGreen-GO-tnos XbaI/BamHI de l'insert p35S XbaI/BamHI.**

Des amplifications PCR ont été effectuées sur des colonies blanches TOP10F' issues de la transformation avec le produit de ligation pGreen-GO-tnos XbaI/BamHI et p35S XbaI/BamHI. Des aliquots (5µl) de ces produits PCR ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec) ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %). L'amplification sur la colonie 4 a permis d'obtenir une bande de taille attendue (422 bp).

Ces six cultures de transformants ont été utilisées pour préparer l'ADN plasmidique par miniprep. Seuls les plasmides résultants des quatre minipreps contenant le promoteur du Persil ont été analysés par une restriction diagnostique (XbaI et BamHI) (figure III.18).

Nous disposons maintenant de trois constructions correspondant à trois TDNA différents. Afin de pouvoir sélectionner les plantes transgéniques après transformation, un marqueur de sélection doit encore être ajouté au T-DNA.

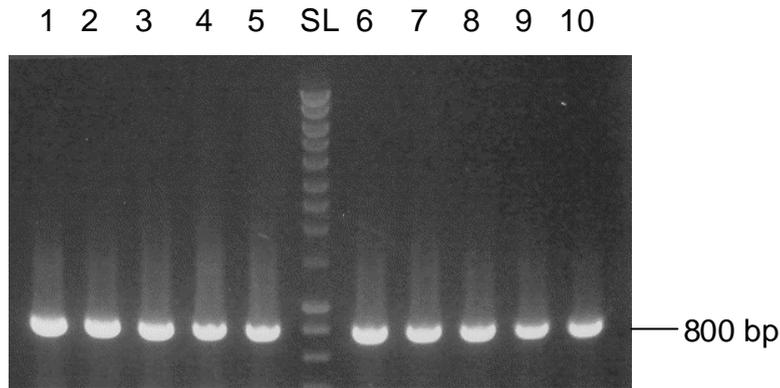
## **Introduction de la cassette de sélection nos-kan dans le T-DNA**

### **Amplification, extraction et restriction de la cassette nos-kan**

A partir d'un clone de référence fourni avec le kit pGreen, une culture liquide (LB + ampicilline à 50 µg/ml) a été inoculée et l'ADN plasmidique a été isolé par miniprep. Le produit de la miniprep a été restreint par EcoRV et déposé sur gel (figure III.19). La bande d'ADN de taille attendue, de l'ordre de 1500 bp, a été extraite du gel grâce au kit QIAEX.

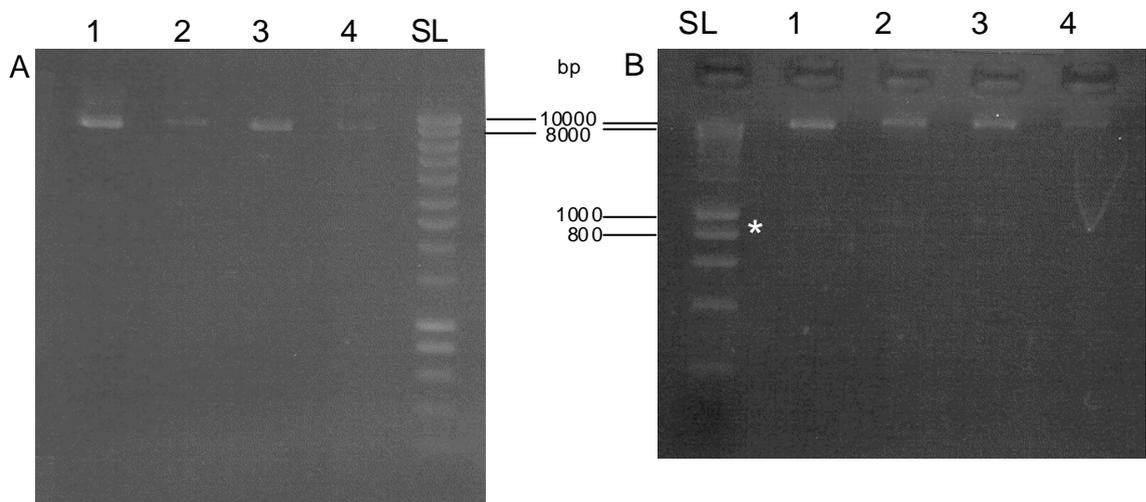
### **Ligation de la cassette nos-kan dans les plasmides pGreen-promoteur-GO-tnos**

Les plasmides des clones Tab1, 35S4 et Per1 ont été restreints par HpaI (qui se situe à proximité du bord gauche du T-DNA). La cassette nos-kan, bordée de sites EcoRV, a été clonée par ligation dans les plasmides restreints par HpaI obtenus des clones Tab1, Per1 et 35S4. Les produits de ces ligations (pGreen-promoteur-noskan) ont été utilisés pour transformer des bactéries TOP10F' par choc thermique. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu LB contenant 50 µg/ml de kanamycine, 28 µg/ml d'IPTG et 28 µg/ml de Xgal. Les transformants ont été criblés par PCR avec des amorces spécifiques de la cassette nos-kan (NOSKANG/NOSKAND). Aucun clone positif parmi ceux testés ne s'est révélé positif pour les constructions contenant les promoteurs 35S et du tabac. Pour la transformation avec le plasmide contenant le promoteur du persil, le clone 19 a été retenu.



**Figure III.17: Vérification du clonage dans le plasmide pGreen-GO-tnos XbaI/BamHI de l'insert pPer XbaI/BamHI.**

Des amplifications PCR ont été effectuées sur des colonies blanches TOP10F' issues de la transformation avec le produit de ligation pGreen-GO-tnos XbaI/BamHI et le promoteur PR1-2 du persil XbaI/BamHI. Des aliquots (5µl) de ces produits PCR ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec) ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %). L'amplification sur les 10 colonies présentées a permis d'obtenir une bande de taille attendue (900 bp). Les clones 1, 2, 3 et 4 ont été mis en culture pour la suite du travail.



**Figure III.18: Restriction diagnostique des plasmides pGreen-Persil-GO-tnos par XbaI/BamHI.**

**A :** Le plasmide pGreen-Persil-GO-tnos a été restreint avec l'enzyme XbaI et le produit de restriction ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec) ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %).

**B :** Le plasmide pGreen-Persil-GO-tnos a été doublement restreint avec les enzymes XbaI/BamHI. Le promoteur PR1-2 du persil a ainsi été libéré (900 pb, indiqué par une astérisque).

Une PCR a été réalisée au moyen d'amorces spécifiques des bords droit et gauche du T-DNA, respectivement RBOD et LBOG (voir matériel et méthode). Cette PCR a été réalisée sur le clone 19 et un clone ne portant pas la cassette (clone 4). On observe une différence de taille entre les deux amplicons correspondant à la taille de la cassette, soit 1500 bp (figure III.20).

## **Co-Electroporation de pSoup et pGreen-promoteur-noskan d'*Agrobacterium tumefaciens***

### **pSoup**

Un clone bactérien contenant pSoup a été utilisé pour inoculer une culture de 10 ml de milieu LB liquide + tétracycline à 5 µg/ml. Une miniprep a été réalisée sur base de cette culture.

Le plasmide purifié par miniprep a subi une restriction diagnostique par BamHI, un site unique du MCS de pSoup (voir figure I.12 de l'introduction).

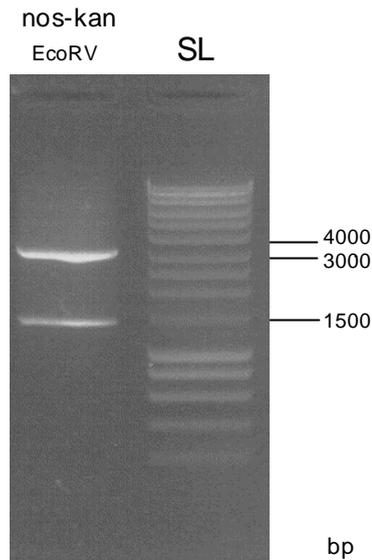
### **pGreen**

Le clone 19 a été utilisé pour inoculer une culture liquide (10 ml de LB + kanamycine à 50 µg/ml) et le plasmide a été purifié par miniprep. Ce plasmide pGreen complet contenant le promoteur du Persil et la cassette de sélection nos-kan a été co-électroporé avec le plasmide pSoup dans *Agrobacterium tumefaciens* (souche LBA4404 pBR9MCS5 virGN54D). La sélection des transformants a été réalisée sur milieu avec kanamycine (50 µg/ml), car la réplication de pGreen (et donc la résistance à la kanamycine qu'il porte) n'est effective qu'en présence de pSoup.

## **Transformation de la chicorée**

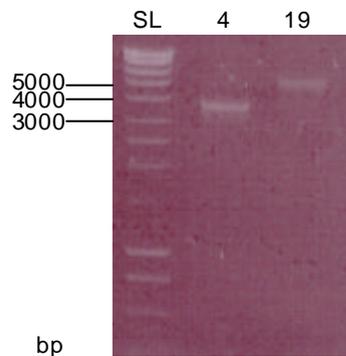
Des feuilles de chicorée ont été transformées par *Agrobacterium tumefaciens* contenant le plasmide pSoup et pGreen-promoteur-noskan.

Au terme de cette rédaction, le processus d'infection et de transformation sont terminés et nous attendons la régénération de cals et /ou de plantules transformées.



**Figure III.19: Restriction diagnostique du plasmide contenant la cassette nos-kan du kit pGreen.**

Le plasmide a été restreint avec l'enzyme EcoRV afin de libérer la cassette. Le produit de restriction ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec) ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %). Un fragment de 1500 pb a été excisé du gel.



**Figure III.20: Amplifications PCR des T-DNAs sur les plasmides provenant du clone 19 contenant la cassette et du clone 4 ne la contenant pas.**

Des aliquots (5µl) des produits PCR des T-DNAs ont été déposés sur gel d'électrophorèse (agarose 1 %) ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (SL=Smart Ladder, Eurogentec). Les amplifications obtenues ont une différence de taille de l'ordre de 1500 bp, ce qui correspond à la taille attendue pour la cassette de sélection nos-kan.

## IV. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

## IV Discussion Générale et perspectives

Comme il a été présenté dans l'introduction, la production d'espèces actives d'oxygène (ROS) est nécessaire à la mise en place de la Réponse Hypersensible (HR) et de la Résistance Systémique Acquisée (SAR). L' $H_2O_2$  et l' $O_2^{\cdot-}$  sont les principaux composants du choc oxydatif (Wojtaszek 1997), leur production artificielle de la HR. C'est dans ce cadre qu'un projet de recherche au laboratoire, auquel participe ce mémoire, a été mis sur pied. La production d' $H_2O_2$  dans la paroi de la chicorée industrielle serait assurée, dans ce travail, par la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* après transformation par *Agrobacterium*. L'expression constitutive de la GO a déjà été réalisée chez la pomme de terre et conférerait une protection contre de nombreux pathogènes (Wu *et al* 1995). L'expression constitutive de cette enzyme chez la chicorée entraîne, quant à elle, la mort des transformants (Benet 1998)

L'objectif de ce mémoire est, pour rappel, d'obtenir des chicorées exprimant la GO en présence de pathogènes, grâce au système de transformation pGreen. Au cours de ce mémoire, nous avons réalisé deux constructions de T-DNA portant des promoteurs inductibles des gènes PR1-2 du persil et PR1-a du tabac. La construction portant le promoteur du persil a été utilisée pour transformer des chicorées dont nous attendons la régénération.

L'utilisation d'enzymes exo- ou endogènes a déjà été exploitée dans d'autres plantes.

Une oxalate oxydase de blé a été utilisée par Liang *et al* (2001) dans le but de renforcer la résistance du peuplier (*Populus X euramericana*). Leurs résultats confirment le rôle de l'Oxo dans la défense des plantes. L'action de cette enzyme a été mise en évidence entre-autre par la plus grande tolérance des transformants à l'acide oxalique. L'équipe de Li *et al* (2002), quant à elle, s'est penchée sur l'effet de la surexpression d'une autre oxydase (Polyphénol oxydase, PPO) sur la résistance de plants de tomate face à une attaque bactérienne. Les plants de tomate surexprimant la PPO ont montré une résistance accrue face au pathogène (*P syringae*) de par un nombre réduit de lésions et une forte inhibition de la croissance bactérienne.

D'autres études ont été réalisées avec une glucose oxydase fongique, provenant de *Talaromyces flavus* (Murray *et al* 1998) ou d'*Aspergillus niger* (Wu *et al* 1995). Ces deux

enzymes produisent de l' $H_2O_2$  lors de l'oxydation du glucose en présence d'oxygène moléculaire et confèrent une résistance aux plantes qui les surexpriment.

Au terme de ce mémoire, nous ne pouvons malheureusement pas évaluer les plantes transformée en voie de régénération. Lorsque ces plantes seront disponibles, il faudra tester l'industrialisé de la production d'  $H_2O_2$  de la paroi cellulaire en présence d'acide salicylique exogène, et de divers pathogènes. Il faudra ensuite vérifier qu'une augmentation de l'activité GO est accompagnée d'une résistance plus grande à l'infection aussi bien au niveau local que systémique.

Il n'a pas échappé à notre attention que le peroxyde d'hydrogène n'est pas le seul acteur de la défense des plantes intéressant pour les études sur le choc oxydatif, la réponse hypersensible ou la résistance systémique acquise. Le NO (oxide nitrique) est actuellement aussi étudié à ces fins. En effet, le NO pourrait également agir en tant qu'agent antimicrobien, et molécule signal dans la défense des plantes (Foissner *et al* 2000). Suite à la perception du pathogène un choc NO atteint son maximum en quelques minutes seulement, et ceci indépendamment du choc oxydatif impliquant le peroxyde d'hydrogène (Foissner *et al* 2000) . Le NO a également un rôle dans la croissance des plantes, dans le retardement de la sénescence et dans l'activation de la production de phytoalexines (Camp *et al* 1998). Son rôle dans l'activation de la mort cellulaire programmée (PCD) a été documenté par Clarke *et al* (2000). Dans leur étude, cette PCD a été assimilée à celle accompagnant la réponse hypersensible et incite à investiguer cette voie.

# Bibliographie

1. Ahn IP, Park K, Kim CH. (2002) Rhizobacteria-induced resistance perturbs viral disease progress and triggers defense-related gene expression. *Molecules and Cells* 13 (2): 302-308.
2. Benet C. (1998) Clonage de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger*, obtention de sondes immunologiques et transformation de la chicorée industrielle.
3. Bevan M. (1984) Binary agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic acid research*. 12(22): 8711-8721.
4. Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. 2000
5. Camp WV, Van Montagu M, Inzé D. (1998) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science* 3(9): 330-334.
6. Carpita NC, Gibeaut DM. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3(1): 1-30.
7. Chen C, Chen Z. (2000) Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Mol. Bio.* 42: 387-396.
8. Clarke A, Desikan R, Hurst RD, Hancock JT, Neill SJ. (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *The Plant J.* 24(5): 667-677.
9. Cornelissen BJ, Horowitz J, van Kan JA, Goldberg RB, Bol JF. (1987) Structure of tobacco genes encoding pathogenesis-related proteins from the PR-1 group. *Nucleic Acid Res.* 15(17): 6799-811.
10. Crute IR, Pink DAC. (1996) Genetics and Utilization of Pathogen Resistance in Plants. *The Plant Cell* 1747-1755.
11. Darjania L, Ichise N, Ichikawa S, Okamoto T, Okuyama H, et Thomson GA Jr. (2001) Dynamic turnover of Arabinogalactan proteins in cultured *Arabidopsis* cells. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 69-79.
12. Delaney T. (2000) New mutants provide clues into regulation of systemic acquired resistance. *Trends in Pl. Sc.* 5(2) : 49-51.
13. Eckey-Kaltenbach H, Kiefer E, Grosskopf E, Ernst D, Sandermann H Jr. (1997) Differential transcript induction of parsley by ozone and heat shock. *Plant Mol. Biology* 33(2): 343-50.
14. Esquerré-Tugayé M-T. (2001) Plantes et agents pathogènes, une liaison raffinée et dangereuse: l'exemple des champignons. *Life sciences* 324: 899-903.
15. Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich IE. (1999) Early nuclear events in plant defence signalling : rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.* 18(17): 4689-4699.
16. Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, Durner J. (2000) In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *The Plant J.* 23(6): 817-824.
17. Franke R, Hemm MR, Denault JW, Ruegger MO, Humphreys JM, Chapple C. (2002) Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.* 30(1): 47-59.
18. Glazebrook J. (2001) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* – 2001 Status. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 301-308.

19. Goodman RN, Novacky AJ. The hyper sensitive reaction in plants to pathogens. St Paul Minnesota: The American Phytopathological Society 1994.
20. Gruner R, Pfitzner UM. (1994) The upstream region of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco responds to environmental as well as to developmental signals in transgenic plants. *Eur J Biochem* 220(1): 247-55.
21. Gus-Mayer S, Naton B, Hahlbrock K, Schmelzer E. (1998) Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 8398-8403.
22. Hammond-Kosack KE, Jones JDG. (1996) Resistance gene-dependant plant defense responses. *The Plant Cell* 8: 1773-1791.
23. Han BY, Chen ZM. (2002) Composition of the volatiles from intact and mechanically peirced tea aphid-tea shoot complexes and their attraction to natural enemies of the tea aphid. *J Agric Food Chem.* 50(9): 2571-5.
24. Hellens RP(a), Edwards A, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM. (2000) pGreen a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant tranformation. *Plant Mol. Biology* 42: 819-832.
25. Hellens RP(b), Mullineaux PM, Klee H. (2000) A guide to Agrobacterium binary Ti vectors. *Trends in Plant Science* 5(10): 446-451.
26. Karimi M, Inze D, Depicker (2002) A GATEWAY(TM) vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation *Trends in Plant Science* 7 (5): 193-195.
27. Kohler A, Schwindling S, Conrath U. (2002) Benzothiadiazole-Induced Priming for Potentiated Responses to Pathogen Infection, Wounding, and Infiltration of Water into Leaves Requires the NPR1/NIM1 Gene in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 128(3): 1046-56.
28. Komari T, Hiei Y, Ishida Y, Kumashiro T, Kubo T. (1998) Advances in cereal gene transfer. *Current Opinion In Plant Biology* 1 (2): 161-165.
29. Leister RT, Katagiri F. (2000) A resistance gene product of the nucleotide binding site – leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins in vivo. *The Plant Journal* 22(4): 345-354.
30. Li L, Steffens JC. (2002) Overexpression of phenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215 (2): 239-47.
31. Maleck K, Dietrich RA. (1999) Defense on multiple fronts : how do plants cope with deverse enemies ? *Trends in Plant Science* 4(6): 215-219.
32. Mellersh DG, Foulds IV, Higgins VJ, Heath MC. (2002) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *The Plant Journal* 29(3): 257-268.
33. Mittler R, Herr EH, Orvar BL, van Camp W, Willekens H, Inzé D, Elis BE. (1999) Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *PNAS* 96(24): 14165-14170.
34. Moriguchi K, Maeda Y, Satou M, Hardayani NS, Kataoka M, Tanaka N, Yoshida K. (2001) The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae. *J Mol Biol.* 307(3): 771-84.

35. Murray F, Llewellyn D, McFadden H, Last D, Dennis ES, Peacock WJ. (1999) Expression of the *Talaromyces flavus* glucose oxidase gene in cotton and tobacco reduces fungal infection, but is also phytotoxic. *Mol. Breeding* 5:219-232
36. Niwa Y, Yamamoto A, Machida C, Takebe I, Machida Y. (1988) Right hand border regions of octopine T-DNA are recognized by RNA polymerase of *Agrobacterium* as well as by VirD1 and VirD2 proteins. *16 (15) : 7647-7661.*
37. Obregón P, Martín R, Sanz A, Castresana C. (2001) Activation of defence-related genes during senescence : a correlation between gene expression and cellular damage. *Plant Mol. Bio.* 46: 67-77.
38. Rushton PJ, Torres JT, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich IE. (1996) Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J.* 15(20): 5690-700.
39. Sambrook J, Fritsch EF, Magnatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
40. Sandermann HJr, Ernst D, Heller W, Langebartels C. (1998) Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends in Plant Science* 3(2): 47-50.
41. Showalter AM. (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell* 5: 9-23.
42. Somssich IE(a), Hahlbrock K. (1998) Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science* 3(3): 86-90.
43. Somssich IE(b), Schmelzer E, Kawalleck P, Hahlbrock K. (1998) Gene structure and in situ transcript localization of pathogenesis-related protein 1 in parsley. *Mol Gen Genet.* 213: 93-98.
44. Stennis MJ et al. (1998) Systemin potentiates the oxidative burst in cultured tomato cells. *Plant Physiology* 117: 1031-1036.
45. Storz G, Imlay JA. (1999) Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol.* 2(2): 188-94.
46. Strum A. (1992) A wound-inducible glycine-rich protein from *Daucus carota* with homology to single-stranded nucleic acid-binding proteins. *Plant Physiology* 99: 1689-1692.
47. Toro N, Datta A, Carmi CA, Young C, Prusti RK, Nester EW. (1989) the *agrobacterium tumefaciens* VirC1 gene product binds to overdrive, a T-DNA transfer enhancer. *J. Bacteriol* 171(12) : 6845-9.
48. Van Haaren MJ, Sedee NJ, Schilperoort RA, Hooykaas PJ. (1987) Overdrive es a Tregion transfer enhancer which stimulates T-strand production in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucleic Acids Res.* 15(21) : 8983-97.
49. Van Hengel AJ, Van Kammen A, De Vries SC. (2002) A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis *Physiol Plant.* 114(4): 637-644.
50. Vranová E, Inzé D, Van Breusegem F. (2002) Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany.* 53(372): 1227-1236.
51. Wojtaszek P. (1997) Oxidative burst : an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322 : 681-692.
52. Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Levine EB, Fitzsimmons KC, Shah DM. (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxydase in transgenic potato plants. *The Plant Cell* 7 : 1357-1368.