



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

**Clonage de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger*, obtention de sondes immunologiques et transformation de la chicorée industrielle.**

Benet, Cindy

*Award date:*  
1998

[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.

SECRETARIAT BIOLOGIE

F. U. N. D. P.

Rue de Bruxelles, 61  
B - 5000 NAMUR

12 JUIN 1998

FACULTES UNIVERSITAIRES  
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

**Faculté des Sciences**

**CLONAGE DE LA GLUCOSE OXYDASE D'*ASPERGILLUS NIGER*, OBTENTION  
DE SONDAS IMMUNOLOGIQUES ET TRANSFORMATION DE LA CHICOREE  
INDUSTRIELLE**

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

Cindy BENET

Juin 1998



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 - Telefax +32(0)81/72.44.20  
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be-http://www.fundp.ac.be/fundp.html

## Clonage de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger*, obtention de sondes immunologiques et transformation de la chicorée industrielle

BENET Cindy

### Résumé

Les plantes luttent contre les agressions pathogènes en élicitant une série de mécanismes de défense, y compris le renforcement de la paroi cellulaire, la synthèse de phytoalexines et l'activation des gènes de défense. Ces réponses sont précédées d'une production, rapide et transitoire, de molécules à oxygène actif. L'accumulation d'eau oxygénée et d'espèces à oxygène actif est l'un des événements les plus précoces résultant de la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante. Ce choc oxydatif induit la mort des cellules infectées au cours d'une réponse dite «hypersensible».

Dans ce travail, nous avons étudié la possibilité d'augmenter la production de peroxyde d'hydrogène dans la paroi cellulaire végétale de plants de chicorée afin de promouvoir la résistance de la chicorée vis-à-vis d'agents pathogènes bactériens et fongiques.

Pour ce faire, nous avons, dans un premier temps, cloné le gène de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger*. Ce gène code pour une enzyme qui transforme le glucose en gluconolactone et en peroxyde d'hydrogène. Des plants de chicorée ont été transformés avec ce gène en utilisant la méthode d'infection des disques foliaires par *Agrobacterium tumefaciens*.

Dans un second temps, nous avons cloné le gène de la glucose oxydase dans un vecteur d'expression et surexprimé la protéine dans *Escherichia coli*. La glucose oxydase a été partiellement purifiée et utilisée pour la production de sondes immunologiques anti-glucose oxydase. Celles-ci seront utilisées, dans un travail ultérieur, pour localiser la glucose oxydase au sein des chicorées transgéniques obtenues.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 1998

Promoteur : Prof. P. Van Cutsem

Directeur de mémoire : Dr. J. Messiaen

## REMERCIEMENTS

Au terme de ces quelques mois passés dans le département de Biologie Végétale, j'aimerais vivement remercier Monsieur le Professeur P. Van Cutsem pour m'avoir accueillie et permis de réaliser mon mémoire au sein de son unité. Je tiens également à le remercier pour sa bonne humeur et pour la bonne ambiance qu'il a su créer dans son laboratoire.

Je souhaite aussi remercier Monsieur le Professeur P. du Jardin de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux pour avoir accepté de participer au jury chargé d'examiner ce travail.

Merci à Johan qui m'a guidée et encouragée tout au long de mon travail en me prodiguant aide et conseils avec une grande disponibilité.

Merci à Long pour ses précieux conseils et à Françoise pour ses talents artistiques et son entrain.

J'exprime également ma profonde gratitude à Madame C. Dernoncourt-Sterpin pour avoir pris le temps d'examiner mes séquences et pour son travail de séquençage.

Merci à Pierre pour l'intérêt permanent qu'il m'a témoigné au cours de cette année et pour sa bonne humeur communicative.

Merci à Laurent et Stéphanie pour leur collaboration amicale et leur support quotidien.

Merci à Mallo qui a été le compagnon d'une longue aventure et à tous ceux qui ont rythmé la vie de cette année.

Merci à tous les membres du laboratoire de biologie végétale (principalement à Johan, Laurent, Mallo et Pierre) et aux autres (Caro, Fanny, Frédérique, Johanne,...) qui, par leur sourire et leur bonne humeur, ont su créer une ambiance que je ne suis pas prête d'oublier. Merci pour ces nombreuses parties de cartes, le bowling et nos soirées folles. Bref, merci de m'avoir donné le cadeau le plus précieux à mes yeux, votre amitié.

Merci à Denis pour ton réconfort moral et tes encouragements.

Merci enfin à toute ma famille et plus précisément à mes parents pour leur soutien durant ces quatre années d'études, et surtout pour leur foi en ma réussite.



## LISTE DES ABREVIATIONS

|                  |  |
|------------------|--|
| aa               | Acide aminé  |
| ABA              | Acide abscissique                                    |
| ADN              | Acide désoxyribonucléique                            |
| Amp              | Ampicilline  |
| Amp <sup>r</sup> | Marqueur de résistance à l'ampicilline               |
| AOS              | Espèces oxygéniques actives                          |
| APS              | Ammonium persulfate                                  |
| ARN              | Acide ribonucléique                                  |
| BA               | Acide benzoïque                                      |
| BAP              | N <sup>6</sup> benzyladénine                         |
| β-ME             | β-mercaptoéthanol                                    |
| °C               | Degré celsius  |
| C4H              | Cinnamate 4-hydroxylase                              |
| CHS              | Chalcone synthase                                    |
| 4CL              | 4-coumarate-CoA ligase                               |
| CTAB             | Bromure d'hexadécyl-triméthylammonium                |
| CoA              | Coenzyme A   |
| DAB              | Diaminobenzidine                                     |
| DMSO             | Diméthyl sulfoxyde                                   |
| DNase            | Désoxyribonucléase                                   |
| dNTP             | Désoxyribonucléotide triphosphate                    |
| DO               | Densité optique                                      |
| DP               | Degré de polymérisation                              |
| DPI              | Diphénylène iodonium                                 |
| DTT              | Dithiothréitol                                       |
| EDTA             | Ethylènediamine-tétraacétate                         |
| GO               | Glucose oxydase                                      |
| GSP              | Gene specific primer                                 |
| HR               | Réponse d'hypersensibilité (hypersensitive response) |
| HRGP             | Glycoprotéine riche en hydroxyprolines               |
| IPTG             | Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside                  |
| JA               | Acide jasmonique                                     |
| JIP              | Jasmonic acid induced protein                        |
| kb               | Kilobase   |
| kDa              | KiloDalton   |
| LB               | Milieu de Luria-Bertani                              |
| LOX              | Lipoxygénase   |
| LRR              | Répétition riche en leucine                          |
| MAPK             | Mitogen-associated protein kinase                    |
| MCS              | Site multiple de clonage (Multiple Cloning Site)     |
| MEC              | Matrice extracellulaire                              |
| MeJA             | Méthyl jasmonate                                     |
| MS               | Milieu Murashige et Skoog                            |
| NAA              | acide 1-naphthylacétique                             |
| NAD(P)H          | Nicotinamide dinucléotide phosphate (forme réduite)  |

|        |  |
|--------|--|
| ORF    | Phase ouverte de lecture (Open Reading Frame)                    |
| PAGE   | Polyacrylamide gel   |
| PAL    | Phénalanine ammonia-lyase  |
| pb     | Paire de base  |
| PCR    | Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction) |
| PDA    | Acide phytodiénoïque   |
| PGIP   | Inhibiteur de polygalacturonases                                 |
| PKC    | Protéine kinase C  |
| PM     | Poids moléculaire  |
| PR     | Pathogenesis related   |
| p/v    | Poids/Volume   |
| PVP-40 | Polyvinylpyrrolidone   |
| RNase  | Ribonucléase   |
| rpm    | Rotation par minute  |
| SA     | Acide salicylique  |
| SAG    | Glucoside de l'acide salicylique                                 |
| SAR    | Systemic aquired resistance                                      |
| SDS    | Sodium Dodécyl Sulfate   |
| TBS    | Tris-Buffered Saline   |
| TEMED  | N,N,N',N', -Tétraméthyl Ethylène Diamine                         |
| Tris   | Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane                                 |
| Tween  | Polyoxyéthylène sorbitan monolaurate                             |
| U      | Unité enzymatique  |
| v/v    | Volume/Volume  |
| Wak    | Wall asociated kinase  |
| X-Gal  | 5-Bromo 4-Chloro 3-indyol, $\beta$ -D galactopyranoside          |



# TABLE DES MATIERES

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUCTION .....</b>   | <b>3</b>  |
| 1.1      | INTRODUCTION GENERALE .....   | 3         |
| 1.2      | LES MECANISMES DE DEFENSE DE LA PLANTE .....  | 4         |
| 1.2.1    | Perception des pathogènes par le végétal.....   | 4         |
| 1.2.2    | Les principales réponses de défense de la plante.....   | 6         |
| 1.2.3    | Entre la perception du pathogène et les réponses de défense.....                                      | 9         |
| 1.3      | LE CHOC OXYDATIF .....  | 10        |
| 1.3.1    | Généralités.....  | 10        |
| 1.3.2    | La chimie des espèces à oxygène actif chez les végétaux supérieurs.....                               | 11        |
| 1.3.3    | Le rôle des espèces oxygéniques actives dans les réponses de défense de la plante.....                | 14        |
| 1.3.4    | Cross-talking entre la production de molécules à oxygène actif et d'autres messagers secondaires..... | 15        |
| <b>2</b> | <b>BUT DU TRAVAIL.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>3</b> | <b>MATERIEL ET METHODES .....</b>   | <b>21</b> |
| 3.1      | SOUCHES BACTERIENNES ET FONGIQUES.....  | 21        |
| 3.1.1    | Souches .....   | 21        |
| 3.1.2    | Conservation des clones.....  | 21        |
| 3.2      | PLASMIDE UTILISES .....   | 21        |
| 3.3      | METHODES RELATIVES A L'ADN .....  | 21        |
| 3.3.1    | Isolement d'ADN de la chicorée .....  | 21        |
| 3.3.2    | Isolement de l'ADN d' <i>Aspergillus niger</i> (ATCC 9029).....                                       | 23        |
| 3.3.3    | PCR typique sur de l'ADN génomique.....   | 24        |
| 3.3.4    | Préparation d'ADN plasmidique .....   | 24        |
| 3.3.5    | Restriction de l'ADN.....   | 26        |
| 3.3.6    | Dosage d'ADN au spectrophotomètre .....   | 26        |
| 3.3.7    | Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose.....  | 26        |
| 3.3.8    | Purification de l'ADN.....  | 27        |
| 3.3.9    | Réaction de ligation.....   | 29        |
| 3.3.10   | Transformation des bactéries et sélection.....  | 29        |
| 3.3.11   | Réaction de séquençage.....   | 31        |
| 3.3.12   | Transformation de la chicorée.....  | 33        |
| 3.4      | METHODES RELATIVES AUX PROTEINES.....   | 35        |
| 3.4.1    | Electrophorèse en gel SDS-PAGE (méthode de Laemmli).....  | 35        |
| 3.4.2    | Extraction des protéines d' <i>Aspergillus niger</i> .....  | 37        |
| 3.4.3    | Induction et extraction des protéines surexprimées de <i>E. coli</i> BL21 .....                       | 37        |
| 3.4.4    | Purification sur résine His-Bind (Novagen) et digestion à la thrombine.....                           | 38        |
| 3.4.5    | Elution des protéines à partir d'un gel SDS-PAGE .....  | 39        |
| 3.4.6    | Immunisation des lapins (hybride New-Zelande californian, IFFA crédo) .....                           | 40        |
| 3.4.7    | Transfert de protéines d'un gel SDS-PAGE sur membrane de nitrocellulose .....                         | 40        |
| 3.4.8    | Epuisement d'un polysérum : .....   | 42        |
| 3.4.9    | Dot-blot et western-blot .....  | 42        |
| 3.4.10   | Dosage de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par spectrofluorométrie.....                                | 43        |
| <b>4</b> | <b>RESULTATS.....</b>   | <b>44</b> |
| 4.1      | BREF RAPPEL .....   | 44        |
| 4.2      | CLONAGE DE LA GLUCOSE OXYDASE D' <i>ASPERGILLUS NIGER</i> .....                                       | 44        |
| 4.2.1    | La glucose oxydase d' <i>Aspergillus niger</i> .....  | 44        |
| 4.2.2    | Isolement du gène de la glucose oxydase d' <i>Aspergillus niger</i> .....                             | 45        |
| 4.3      | TRANSFORMATION DE LA CHICOREE .....   | 49        |
| 4.3.1    | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : un outil biologique pour la transformation des plantes.....        | 49        |



|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 4.3.2      | <i>Le plasmide pBI121</i> .....  | 51        |
| 4.3.3      | <i>Construction du plasmide intégratif pBI121-GO</i> .....                     | 52        |
| <b>4.4</b> | <b>PRODUCTION DE SONDAS IMMUNOLOGIQUES CONTRE LA GLUCOSE<br/>OXYDASE</b> ..... | <b>55</b> |
| 4.4.1      | <i>Le vecteur pET-15b</i> .....  | 55        |
| 4.4.2      | <i>Préparation du gène de la glucose oxydase</i> .....                         | 55        |
| 4.4.3      | <i>Surexpression du gène de la glucose oxydase et immunisation</i> .....       | 57        |
| 4.4.4      | <i>Dot-blots et western-blots</i> .....  | 59        |
| <b>5</b>   | <b>DISCUSSION GENERALE</b> .....   | <b>61</b> |
| <b>6</b>   | <b>BIBLIOGRAPHIE.</b> .....  | <b>63</b> |



# **INTRODUCTION**



# 1 INTRODUCTION

## 1.1 INTRODUCTION GENERALE

Au cours de son existence, une plante est exposée à différents types de contraintes pouvant se classer en deux grandes catégories : les contraintes abiotiques et les contraintes biotiques.

Les contraintes abiotiques regroupent l'ensemble des conditions climatiques qui affectent directement la morphologie de la plante. Les contraintes biotiques, elles, regroupent toutes les agressions par des agents pathogènes (bactéries, champignons, virus, ...), par des insectes phytophages et par des herbivores de grande taille. Dans la suite de cette introduction, nous nous intéresserons uniquement aux contraintes biotiques infligées par des bactéries et/ou des champignons.

Les plantes s'opposent aux attaques des pathogènes en utilisant des mécanismes de défense physico-chimiques. Parmi ceux-ci, on retrouve des mécanismes de renforcement de la paroi végétale cellulaire et des défenses chimiques, pour la plupart non spécifiques (synthèse de phytoalexines, d'hydrolases, etc ... ; voir point 1.2.2). Un grand nombre de ces mécanismes de défense sont inductibles et constituent, de ce fait, des réponses potentiellement exploitables par le biologiste pour lutter contre un agent pathogène (Greenberg, 1997).

Une interaction plante-pathogène est une interaction dynamique. La toute première étape de cette interaction est une « adhésion » du pathogène à la plante. Il s'établit alors un dialogue moléculaire entre les deux partenaires de l'interaction dont l'issue sera le développement d'une interaction dite « incompatible » (la plante se défend) ou d'une interaction dite « compatible » (la plante ne se défend pas ou se défend mal). L'interaction plante-pathogène incompatible est la plus fréquente dans la nature.

Une interaction incompatible peut être hôte spécifique ou non-hôte spécifique. La première implique l'existence, chez la plante, de gènes de résistance permettant de reconnaître spécifiquement des facteurs d'virulence produits par un pathogène particulier et de le repousser (on parle d'interaction « gene-for-gene »). La deuxième englobe d'autres mécanismes de reconnaissance qui ne sont pas spécifiques d'un agent pathogène en particulier.

Dans la suite de cette introduction, nous allons successivement décrire les principaux mécanismes de perception et de transduction des signaux pathogènes ainsi que les principales réponses de défense induites par ceux-ci. Nous continuerons par une analyse plus détaillée de la production de molécules à oxygène actif, réponse que nous essaierons de « mimer » au cours de ce mémoire. Nous terminerons par une analyse des liens tissés entre ce choc oxydatif et d'autres voies de transduction du signal et mécanismes de défense chez la plante.



| Eliciteurs exogènes              | Exemples de facteurs éliciteurs   | Organismes pathogènes  |
|----------------------------------|---|--|
| Les oligosaccharides             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fragments de glucosides contenant au moins une unité heptagluco-sidique</li> <li>• Oligomères de chitine</li> </ul>              | <i>Phytophthora megasperma</i> f. sp. <i>glycinea</i><br>Champignons phytopathogènes   |
| Les glycopeptides                | Glycopeptides portant une chaîne latérale de 9 à 11 résidus mannosyl  | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et champignons phytopathogènes   |
| Les peptides et protéines        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Elicitines</li> <li>• Protéines hrp (harpin)</li> <li>• Protéines Pop</li> <li>• Peptides Avr</li> <li>• Peptides NIP</li> </ul> | <i>Phytophthora</i><br><i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i> et <i>Erwinia</i><br><i>Pseudomonas solanaceum</i><br><i>Cladosporium fulvum</i><br><i>Rhynchosporium secalis</i> |
| Les substances lipophiles        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nystatine, amphotéricine B, digitonine</li> <li>• Acide arachidonique</li> <li>• Syringolide</li> <li>• Ergostérol</li> </ul>    | Bactéries et champignons<br><i>Phytophthora infestans</i><br><i>Phytophthora syringae</i> pv. <i>tomato</i><br>Champignons supérieurs  |
| Les lipo- chitoooligosaccharides | Facteurs Nod (cas particulier d'interaction plante-pathogène conduisant à une relation symbiotique)   | <i>Rhizobium</i> et <i>Azorhizobium</i>  |

| Eliciteurs endogènes | Exemples de facteurs éliciteurs  |
|----------------------|--|
| Les oligosaccharides | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Les oligogalacturonides de DP &lt; 9 inducteurs d'inhibiteurs de protéases</li> <li>• Les oligogalacturonides de DP &gt; 9 inducteurs de phytoalexines, de protéines PR, de la lignification,...</li> </ul> |
| Les peptides         | Système inductrice de réponse systémique acquise en cas de blessures mécaniques  |

**Tableau 1 :** Quelques exemples des principaux éliciteurs exogènes et endogènes produits lors d'une agression pathogène

|                 |                |                                 |
|-----------------|----------------|---------------------------------|
|                 | <b>Plante</b>  |                                 |
|                 | <b>gène R</b>  | <b>gène r</b>                   |
| <b>Parasite</b> | <b>gène AV</b> | <b>Interaction incompatible</b> |
|                 | <b>gène av</b> | <b>Interaction compatible</b>   |

|                 |  |                                 |
|-----------------|--|---------------------------------|
|                 | <b>Plante</b>                              |                                 |
|                 | <b>Présence d'un récepteur</b>             | <b>Absence d'un récepteur</b>   |
| <b>Parasite</b> | <b>Production d'un signal de proximité</b> | <b>Interaction incompatible</b> |
|                 | <b>Absence d'un signal de proximité</b>    | <b>Interaction compatible</b>   |

**Tableau 2** : Modèle de l'interaction "gene-for-gene" et exemple



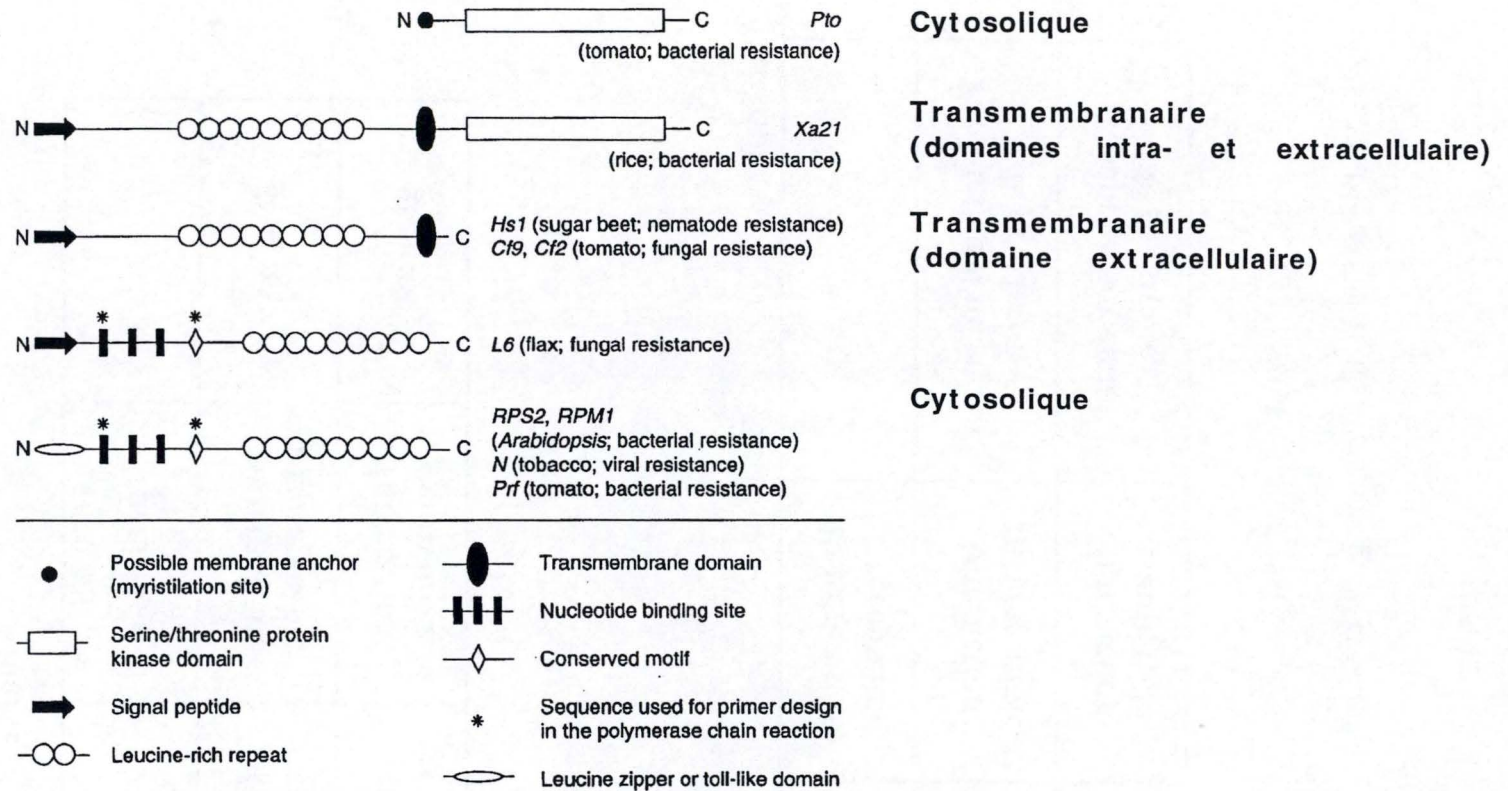


Fig. 1 : Représentation schématique de quelques protéines de résistance parmi lesquelles on retrouve les récepteurs à sérine/thréonine kinase



## 1.2 LES MECANISMES DE DEFENSE DE LA PLANTE

### 1.2.1 Perception des pathogènes par le végétal

La reconnaissance rapide d'un envahisseur potentiel par la plante est une condition préalable et indispensable pour l'initiation d'une réponse de défense efficace. Celle-ci est déclenchée par la reconnaissance de molécules spécifiques du végétal ou du pathogène, appelées éliciteurs endogènes ou exogènes (tableau 1). Ces éliciteurs sont souvent des composés de faible poids moléculaire qui sont synthétisés comme tels ou qui sont libérés à partir de précurseurs polymériques durant l'infection (Somssich et Hahlbrock, 1998).

Différentes classes d'éliciteurs déclenchent les réponses de défense par liaison spécifique à des récepteurs distincts localisés pour la plupart dans la membrane plasmique. Les récepteurs actuellement les mieux connus chez les végétaux supérieurs sont des récepteurs à sérine/thréonine kinase ou à histidine kinase découverts dans les phénomènes d'interaction hôte-pathogène, de pollinisation et dans la voie de transduction du signal activée par l'éthylène.

#### *Les récepteurs à sérine/thréonine kinase*

Ces récepteurs ont été découverts dans le cadre d'une interaction hôte-pathogène régie par le modèle « gene-for-gene » (tableau 2).

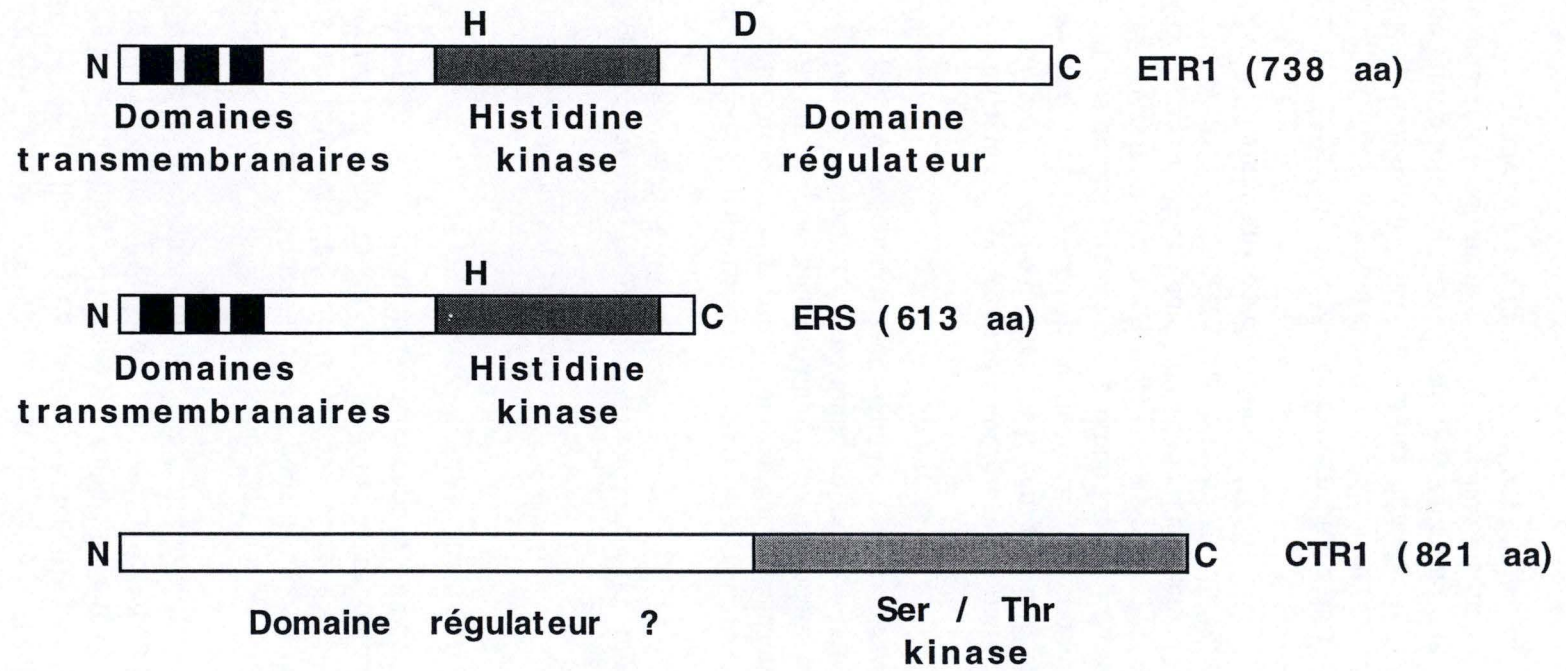
Dans ce modèle, le pathogène produit un facteur d'avirulence encodé par un gène dit d'avirulence (Avr). La plante, elle, produit un facteur de résistance encodé par un gène dit de résistance (R). Une interaction plante-pathogène sera incompatible si les deux gènes sont présents et s'expriment. Tout autre combinaison aboutira à une interaction plante-pathogène compatible. Les gènes de résistance sont, dans de nombreuses situations, des récepteurs des facteurs d'avirulence.

Le gène Pto (figure 1), par exemple, confère à la tomate une résistance aux espèces de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* qui portent le gène d'avirulence Pto. Ce fut le premier gène de résistance spécifique de l'espèce à être isolé. Ce gène code pour une protéine cytosolique de 321 acides aminés qui est une sérine/thréonine kinase. La protéine Pto possède 27 sérines et 13 thréonines et fait partie de la même classe de protéines kinases que le facteur mammalien Raf. Pto est un récepteur cytosolique du facteur d'avirulence AvrPto « injecté » dans le cytosol de la cellule infectée. Cette interaction induit l'activation des mécanismes de défense de la plante (Hammond-Kosack et Jones, 1997).

Le gène Xa 21, par contre, code pour une protéine de 125 acides aminés possédant un peptide signal putatif, 23 répétitions extracellulaires riches en leucines (LRR) supposées interagir avec le facteur d'avirulence, un unique domaine transmembranaire, et un domaine sérine/thréonine kinase intracellulaire (figure 1) (Hammond-Kosack et Jones, 1997). Le gène Xa 21 confère une résistance à plus de 30 souches distinctes de la bactérie *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, laquelle cause le flétrissement des feuilles chez le riz.

Les protéines kinases associées à la paroi cellulaire (Waks) font partie d'une seconde classe de récepteurs kinases échangeant des signaux entre les compartiments extra- et





**Fig. 2 :** Représentation schématique des récepteurs à histidine kinase (ETR1 et ERS) et de la protéine régulatrice CTR1



intracellulaires similaires aux intégrines animales. Ces protéines possèdent un domaine transmembranaire séparant une région N-terminale extracellulaire étroitement associée à la matrice extracellulaire (MEC) et une région C-terminale cytosolique dotée d'une activité sérine/thréonine kinase. La structure et la localisation des protéines Wak suggèrent qu'elles puissent être sensible aux changements ultrastructuraux de la paroi cellulaire observés au cours de différents processus physiologiques (He *et al*, 1996).

### *Les récepteurs à histidine kinase*

Cette deuxième famille de récepteurs est notamment représentée par le récepteur ETR 1 (ou ERS), le récepteur à l'éthylène (figure 2). Ce récepteur est fortement apparenté aux régulateurs bactériens à deux composants. Ceux-ci contrôlent la perception d'une série de stimuli environnementaux tels que la concentration en azote, en gaz carbonique et la pression osmotique. Les deux composants de ce système sont un senseur membranaire et un régulateur de réponse (lié ou non au domaine senseur). La perception du signal par le domaine aminoterminal du senseur induit l'autophosphorylation d'un résidu histidine conservé du senseur. Le phosphate de cette histidine est alors transféré sur un résidu aspartate conservé du régulateur, qui médie les étapes suivantes de la voie de transduction du signal (Chang, 1996).

Dans le cadre de la transduction du signal médié par l'éthylène, le récepteur de l'éthylène interagit avec une protéine CTR 1 cytosolique (figure 2) présentant une homologie avec la protéine Raf, une sérine/thréonine kinase, initiant la voie de transduction du signal des MAP (mitogen-activated protein) kinases chez les mammifères.

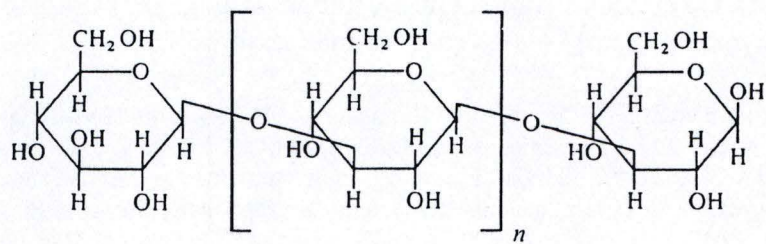
Rem : Chez les mammifères, les protéines Raf sont des MAPKKK qui régulent la différenciation et la croissance cellulaire via la phosphorylation des MAPKs. Cette voie de transduction est activée par des récepteurs à tyrosine kinase ou, indirectement, par des récepteurs à sept domaines transmembranaires reconnaissant des facteurs de croissance (Chang, 1996 ; Wurgler-Murphy et Saito, 1997).

### *Autres récepteurs*

Contrairement aux récepteurs précédents qui ont été découverts par une approche moléculaire (cartographie, chromosome walking,...), d'autres récepteurs ont été découverts par une approche biochimique. Le récepteur de l'éliciteur heptaglycosidique de *Phytophthora megasperma*, des glycoprotéines de levure, des oligomères de chitine, et d'un peptide éliciteur de *Phytophthora megasperma* sont actuellement les mieux caractérisés du point de vue des interactions avec leur ligand respectif (Hahn, 1996). Les gènes codant pour ces protéines ne sont pas encore clonés.

La perception des signaux à l'extérieur de la cellule, à peine entrevue dans ce paragraphe, aboutit à la mise en place de différentes stratégies défensives dont la fonction est de stopper l'agent pathogène. Nous verrons dans le paragraphe suivant les différents mécanismes chimiques et physiques utilisés par la plante pour arriver à cette fin.





**Fig. 3 :** Structure générale de la callose



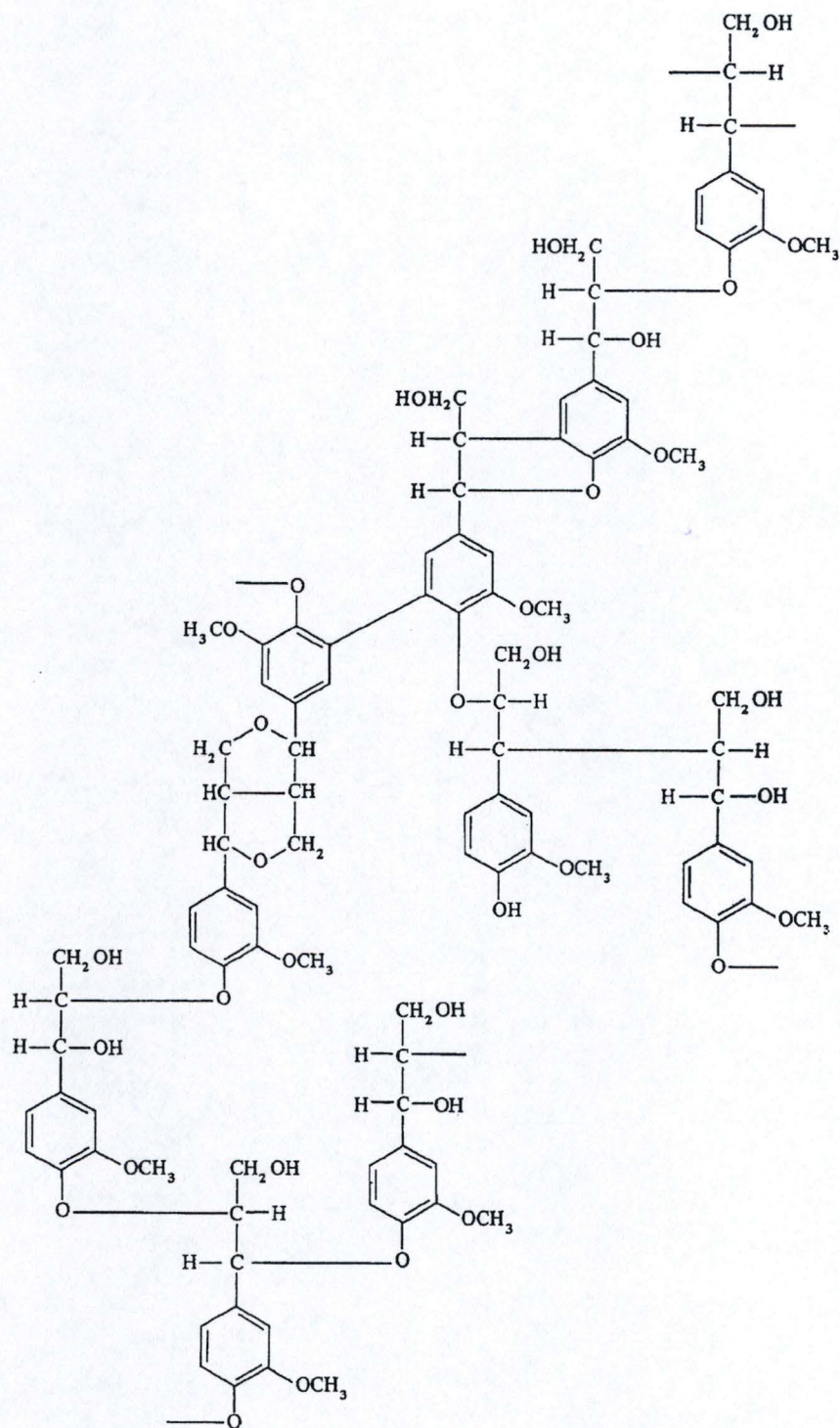


Fig. 4 : Structure hypothétique d'une portion de molécule de lignine



## 1.2.2 Les principales réponses de défense de la plante

### *La réticulation de la paroi cellulaire végétale*

#### a) Les glycoprotéines riches en hydroxyproline ou HRGP

Les HRGP, également appelées extensines, sont de petites glycoprotéines dont le squelette principal est une succession de motifs sérine-(hydroxyproline)<sub>4</sub> sur lequel sont greffées des chaînes latérales composées essentiellement d'arabinose et de galactose.

Les extensines sont sécrétées dans la paroi et y subissent un phénomène de réticulation permettant de diminuer considérablement la porosité de la paroi. Ce réseau de protéines se superpose, en effet, au réseau déjà existant de polysaccharides pariétaux. Cette double réticulation de la paroi rend celle-ci beaucoup plus difficile à dégrader pour les agents pathogènes (Stafstrom et Stachelin, 1986).

#### b) La synthèse de callose

La callose est un polymère de D-glucose en liaison  $\beta$ -1,3 sécrété par une enzyme membranaire appelée callose synthase et localisée au niveau de la membrane plasmique (figure 3) (Slay *et al.*, 1992). La callose est synthétisée dans la paroi pour rendre celle-ci plus compacte et isoler les cellules infectées du reste du tissu végétal (Brett et Waldron, 1990).

#### c) La lignification

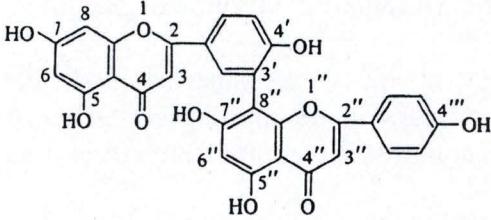
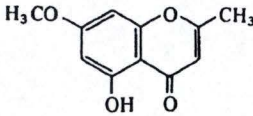
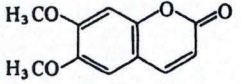
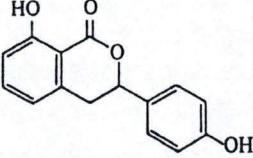
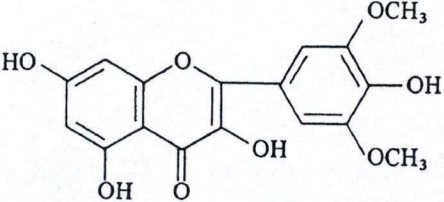
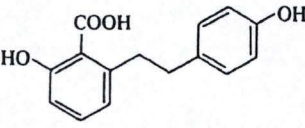
La lignification est un processus physiologique de renforcement de la paroi végétale par imprégnation de lignine. La lignine est un polymère très complexe de composés phénoliques différents qui subissent une polymérisation radicalaire spontanée dans la paroi sans faire intervenir d'enzymes particulières (figure 4). La lignification, tout comme la synthèse de callose, est un processus physiologique qui se produit également dans des situations non pathologiques (formation du bois, du parenchyme lignifié, du sclérenchyme, etc...). La lignification de la paroi végétale entraîne sa déshydratation et une augmentation de son caractère hydrophobe avec pour conséquence la mort de la cellule (Mac Dougall, 1992).

### *Le choc oxydatif*

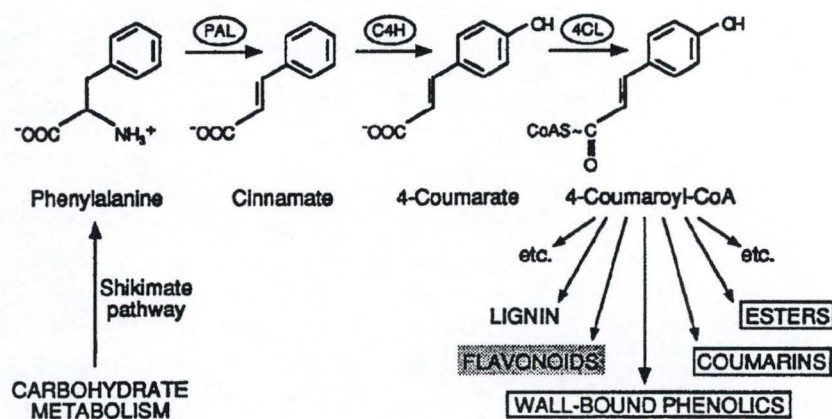
Le choc oxydatif comprend la production de peroxyde d'hydrogène dans la paroi végétale. Celle-ci est sous le contrôle d'une NAD(P)H oxydase qui transforme l'oxygène moléculaire en anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Allan et Fluhr, 1997). Ce dernier est rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase. Cette molécule à oxygène actif agit directement en tant qu'agent bactéricide, mais peut également pénétrer dans la cellule végétale où elle peut induire la synthèse de phytoalexines et de protéines PR ainsi que l'accumulation d'acide salicylique indispensable pour les réponses de défense acquises à distance.

Cet aspect de la défense cellulaire sera traité plus en détail au point 1.3.



| Classe des phytoalexines | Exemple  | Source                        |
|--------------------------|--|-------------------------------|
| Biflavonoïdes            |  <p data-bbox="622 636 982 667">Amentoflavone (= 3',8''-biapegenine)</p> | Gymnospermes                  |
| Chromones                |  <p data-bbox="740 927 833 958">Eugénine</p>                              | <i>Eugenia aromatica</i>      |
| Coumarines               |  <p data-bbox="643 1122 883 1151">6,7-diméthoxycoumarine</p>            | <i>Dendrobium densiflorum</i> |
| Isocoumarines            |  <p data-bbox="729 1357 859 1391">Hydrangénol</p>                       | <i>Hydrangea macrophylla</i>  |
| Flavones                 |  <p data-bbox="632 1704 920 1733">Myricetine 3',5'-diméthyl ether</p>  | <i>Lathyrus pratensis</i>     |
| Stilbènes                |  <p data-bbox="705 1939 883 1966">Acide lunulaire</p>                   | <i>Lunularia cruciata</i>     |

**Fig. 5 :** Quelques exemples des principales phytoalexines produites par différentes plantes lors d'une agression pathogène



**Fig. 6 :** Voie générale des phénylpropanoïdes : La phénylalanine (Phe) est transformée en coumaroyl-CoA via l'action de la phénylalanine amonia-lyase (PAL), la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) et la 4-coumarate-CoA ligase (4CL). Le coumaroyl-CoA servira de précurseurs à la synthèse de phytoalexines, de subérine, de lignine et d'autres composés phénoliques liés ou non à la paroi végétale.



### *Les phytoalexines*

Une attaque par un agent pathogène s'accompagne d'une synthèse accrue de différents composés phénoliques parmi lesquels on retrouve des phytoalexines (figure 5). Par définition, les phytoalexines sont des composés antibiotiques sécrétés par la plante pour repousser une attaque pathogène. Ces substances sont toxiques non seulement pour le pathogène mais également pour la cellule végétale productrice. Cette dernière peut soit accumuler les phytoalexines et mourir (mort cellulaire programmée), soit conjuguer celles-ci à des sucres. Ces complexes phytoalexines-sucres sont sécrétés directement dans la paroi et les phytoalexines y sont activées par déglycosylation (Hahlbrock et Schell, 1989).

Les phytoalexines de nature phénolique sont synthétisées à partir de l'activation de la voie générale des phénylpropanoïdes. Cette voie transforme la phénylalanine en acide cinnamique sous l'action de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), l'enzyme-clé de la synthèse des phytoalexines. L'acide cinnamique est, lui-même, transformé en acide coumarique en présence de la cinnamate 4-hydroxylase (C4H). L'acide coumarique est ensuite transformé en coumaroyl-CoA en présence de la 4-coumarate-CoA ligase (4CL). Le coumaroyl-CoA sert alors de précurseur à la synthèse de toute une série de composés phénoliques nécessaires à la synthèse des phytoalexines, mais également indispensables à la synthèse de la lignine (figure 6) (Hahlbrock et Schell, 1989).

### *Les glycoprotéines liées à la pathogénèse (protéines PR)*

#### a) Les hydrolases

Les hydrolases les mieux connues sont les chitinases et les glucanases. Ces enzymes, existant sous la forme de plusieurs isoenzymes, sont présentes en faibles quantités dans la paroi et en grandes quantités dans la vacuole des cellules. Les hydrolases pariétales ont pour fonction de s'attaquer aux parois des agents pathogènes et de relarguer des molécules-signal dans les espaces intercellulaires. Les hydrolases vacuolaires, plus concentrées que dans la paroi, ne sont libérées que lors de l'éclatement de la cellule infectée (Qin *et al*, 1994).

Ces enzymes sont naturellement abondantes dans les cellules des racines. Cette localisation peut s'expliquer par le fait que la racine est un organe particulièrement exposé aux agents pathogènes de par sa position dans le sol. Cet organe vital doit donc être protégé avant même d'entrer en contact avec un pathogène (Dempsey et Klessig, 1994).

#### b) Les inhibiteurs de protéases

Les inhibiteurs de protéases, également produits sous la forme de plusieurs isoenzymes, s'accumulent dans la vacuole des cellules et sont particulièrement efficaces contre les insectes et leurs larves. Ils inhibent les enzymes digestives de l'insecte et provoquent une sorte d'indigestion pouvant entraîner la mort par malnutrition.

Les inhibiteurs de protéases sont surtout abondants dans des organes vitaux participant à la propagation de la plante tels que les organes de réserve et les fruits particulièrement sensibles aux attaques pathogènes (Hansen et Hannapel, 1992).



## c) Les peroxydases

Les peroxydases sont des hémoprotéines contenant un hème complexé à du fer. Elles existent également sous la forme de plusieurs isoenzymes permettant à ces enzymes d'agir dans différentes conditions environnementales. Les peroxydases sont présentes dans la paroi également en situation non pathogénique et participent à de nombreuses réponses physiologiques de la plante : la lignification de la paroi (Fry, 1988), la synthèse de subérine (Bowles, 1990), la réticulation des extensines pariétales (Montillet et Degoussée, 1991) et la réaction hypersensible.

## d) Les inhibiteurs de polygalacturonases (PGIP)

Les polygalacturonases sont des déterminants essentiels de la pathogénicité d'un grand nombre de bactéries et champignons. Elles provoquent la macération de la paroi et la libération de fragments pectiques à fonction signalétique. Du point de vue du végétal, il est important de limiter l'action de ces enzymes par des inhibiteurs de polygalacturonases. Il a été montré que la présence de PGIP permettait aux fragments pectiques éliciteurs de rester dans la paroi pendant au moins 24 heures sans être dégradés. Ce gain de temps est exploité par la plante pour activer d'autres mécanismes de défense adéquats permettant de repousser l'agent pathogène (Devoto *et al*, 1998).

*Les réponses locale et systémique*

L'ensemble des réactions de défense décrites ci-dessus se met en place plus ou moins simultanément à proximité du site d'infection. Cette réponse locale, dite hypersensible, est accompagnée de la mort de plusieurs cellules. Cette mort cellulaire ne concerne que les cellules qui ont été en contact avec l'agent pathogène lors de la primo-infection. Ces cellules ont modifié leur paroi afin d'être isolées du reste du tissu sain. Elles accumulent une grande quantité de phytoalexines, de protéines PR, et subissent un choc oxydatif avec libération de concentrations importantes d'espèces oxygénées réactionnelles (Tsuji *et al*, 1992).

La signification physiologique de l'isolement et de l'apoptose cellulaire est de constituer une barrière physico-chimique importante pour ralentir, voire arrêter, la progression de l'agent pathogène. Les cellules infectées ne sont cependant pas mortes pour rien puisqu'elles émettent, en mourant, des molécules-signal qui migrent vers les cellules voisines non infectées. Celles-ci peuvent, à leur tour, envoyer des signaux à des tissus ou organes situés très loin du site d'infection. Cette deuxième réponse, post-posée dans le temps, est désignée sous le nom de défense acquise à distance ou réponse systémique. Cette réponse est non spécifique car elle est efficace non seulement contre le pathogène qui attaque la plante, mais aussi contre des pathogènes que la plante n'a pas encore rencontrés (Tsuji *et al*, 1992).

Après avoir décrit les mécanismes de perception et les différentes réponses de défense de la plante, nous allons passer en revue les principales étapes de la transduction du signal activée lors de la perception du pathogène et menant à une réponse de défense effective.



### 1.2.3 Entre la perception du pathogène et les réponses de défense...

Notre but n'est pas ici de faire une description de chacune des voies de transduction du signal mais de donner une idée générale des grandes étapes de la transduction du signal menant à l'activation des mécanismes de défense.

Nous venons de voir que les deux partenaires d'une interaction hôte-pathogène échangent des signaux et que le résultat de ce dialogue moléculaire est une interaction compatible ou incompatible. Dans le cas d'une interaction incompatible, la plus intéressante pour la plante, la reconnaissance de molécules-signal par des récepteurs induit l'activation de plusieurs voies de transduction du signal permettant à la plante de se défendre activement et d'éliminer l'agent pathogène. Dans les paragraphes qui vont suivre, nous allons brièvement passer en revue les principales réponses cellulaires induites par différents agents pathogènes.

La reconnaissance d'un agent pathogène à la surface d'une cellule entraîne différentes réponses intracellulaires. Parmi les premières, on retrouve l'activation de différents flux ioniques ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$ ,...) qui résultent le plus souvent de l'ouverture de canaux ioniques spécifiques localisés au niveau de la membrane plasmique (Dangl *et al*, 1996). Ces canaux sont ouverts par couplage à un récepteur, par un stress mécanique ou par une dépolarisation de la membrane plasmique. Ces flux ioniques entraînent des variations de l'activité de certains ions dans le cytosol et l'activation (ou l'inhibition) de différents effecteurs enzymatiques.

Une modification de l'activité de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol peut également être provoquée par l'activation de la voie des phosphoinositides. Cette voie est, à quelques détails près, identique chez les cellules animales et végétales. Cette voie trouve son origine au sein de la membrane plasmique et active la mobilisation d'ions calcium dans le cytosol à partir de réserves de calcium intracellulaires (essentiellement la vacuole chez les plantes). La durée, l'amplitude, la forme et la compartimentation des variations des concentrations en calcium libre cytosolique et d'autres ions constituent des signaux « interprétables » par les cellules (Dangl *et al*, 1996). Chez les cellules végétales, cette voie est impliquée, entre autres, dans la fermeture/ouverture des stomates, dans le choc oxydatif et dans l'activation de certaines réponses de défense (p.e., la synthèse de phytoalexines) (Legendre *et al*, 1993).

Une autre réponse membranaire précoce induite par la reconnaissance du pathogène est la production de méthyl jasmonate, une molécule volatile, produite à partir d'acide linoléique détaché de la membrane plasmique par une phospholipase. Cette réponse est homologue à la production de prostaglandines et de leucotriènes à partir d'acide arachidonique chez les cellules animales. Le méthyl jasmonate induit également la synthèse d'un peptide de dix-huit acides aminés, la systémine, responsable de l'induction de réponses à distance, c'est-à-dire, des réponses de défense dans toute les cellules de la plante sans que celle-ci n'ait été en contact avec l'agent pathogène (Farmer et Ryan, 1992).

A l'ensemble des réponses précoces précédentes se superpose une production de molécules à oxygène actif et de peroxyde d'hydrogène. Ces molécules constituent à la fois des agents anti-bactériens et des messagers secondaires dans l'induction de la synthèse de phytoalexines et de protéines PR. Elles sont également indispensables à la mort cellulaire programmée ou apoptose (Greenberg, 1997). Ce choc oxydatif est, dans le cas particulier d'une interaction avec des bactéries, des champignons ou des virus, accompagné d'une accumulation d'acide salicylique dans les cellules infectées. La synthèse d'acide salicylique



est actuellement considérée comme nécessaire pour induire une réponse à distance dans la plante (Du et Klessig, 1997).

Même si les réponses membranaires précoces et la production des messagers secondaires principaux sont relativement bien connus à l'heure actuelle chez les végétaux supérieurs, il existe encore un grand fossé entre la production d'un messenger secondaire et l'activation d'une réponse défensive. Les phénomènes d'amplification de l'information via des kinases (ou phosphatases) sont encore très peu connus chez les végétaux supérieurs ; de même, la caractérisation des facteurs de transcription médiant l'activation des gènes de défense n'en est qu'à ses débuts. Ce manque d'informations rend la manipulation de ces voies de transduction du signal encore très difficile à l'heure actuelle.

Dans ce mémoire, nous tenterons néanmoins d'exploiter une réponse défensive précoce de la plante, à savoir le choc oxydatif. Nous essaierons, en effet, de « reproduire » artificiellement la production de molécules à oxygène actif et de protéger, de manière préventive, la plante contre les agressions pathogènes. Mais avant de passer aux résultats de ce mémoire, nous consacrerons les derniers paragraphes de cette introduction au métabolisme et à la fonction des molécules à oxygène actif, tout en accordant une attention particulière aux interactions de ces substances très réactionnelles avec d'autres voies de transduction du signal.

## 1.3 LE CHOC OXYDATIF

### 1.3.1 Généralités

Nous venons de voir que les plantes se protègent des infections pathogènes en élicitant une série de mécanismes de défense à l'échelle de quelques cellules (réponses locales). Les cellules infectées renforcent leur paroi, synthétisent des phytoalexines, induisent la transcription de gènes de défense et déclenchent un mécanisme de mort cellulaire programmée. Cette réaction porte le nom de réaction hypersensible.

Dans le processus de mort cellulaire programmée, la production rapide et transitoire d'espèces oxygéniques actives (AOS) telles que le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) sont nécessaires. L'accumulation d' $H_2O_2$  et d'AOS a été déterminée comme étant un des événements les plus précoces lors de la reconnaissance de l'agent pathogène.

En plus de son potentiel oxydatif, en tuant ou en inhibant la croissance du pathogène, l' $H_2O_2$  est impliquée dans de nombreux processus de défense chez la plante. En effet, l'eau oxygénée produite durant le choc oxydatif active la biosynthèse des phytoalexines et induit la réticulation des glycoprotéines riches en hydroxyproline dans la paroi cellulaire végétale (Wu *et al.*, 1995). De plus, le choc oxydatif généré durant les interactions incompatibles n'est pas seulement impliqué directement dans la mort cellulaire hypersensible locale, mais également, considéré comme un signal diffusible activant des gènes de défense dans les cellules environnantes (Wu *et al.*, 1995). L' $H_2O_2$  est également impliquée, indirectement, dans l'induction de la résistance systémique acquise (SAR) via la production d'acide salicylique (Wu *et al.*, 1995).



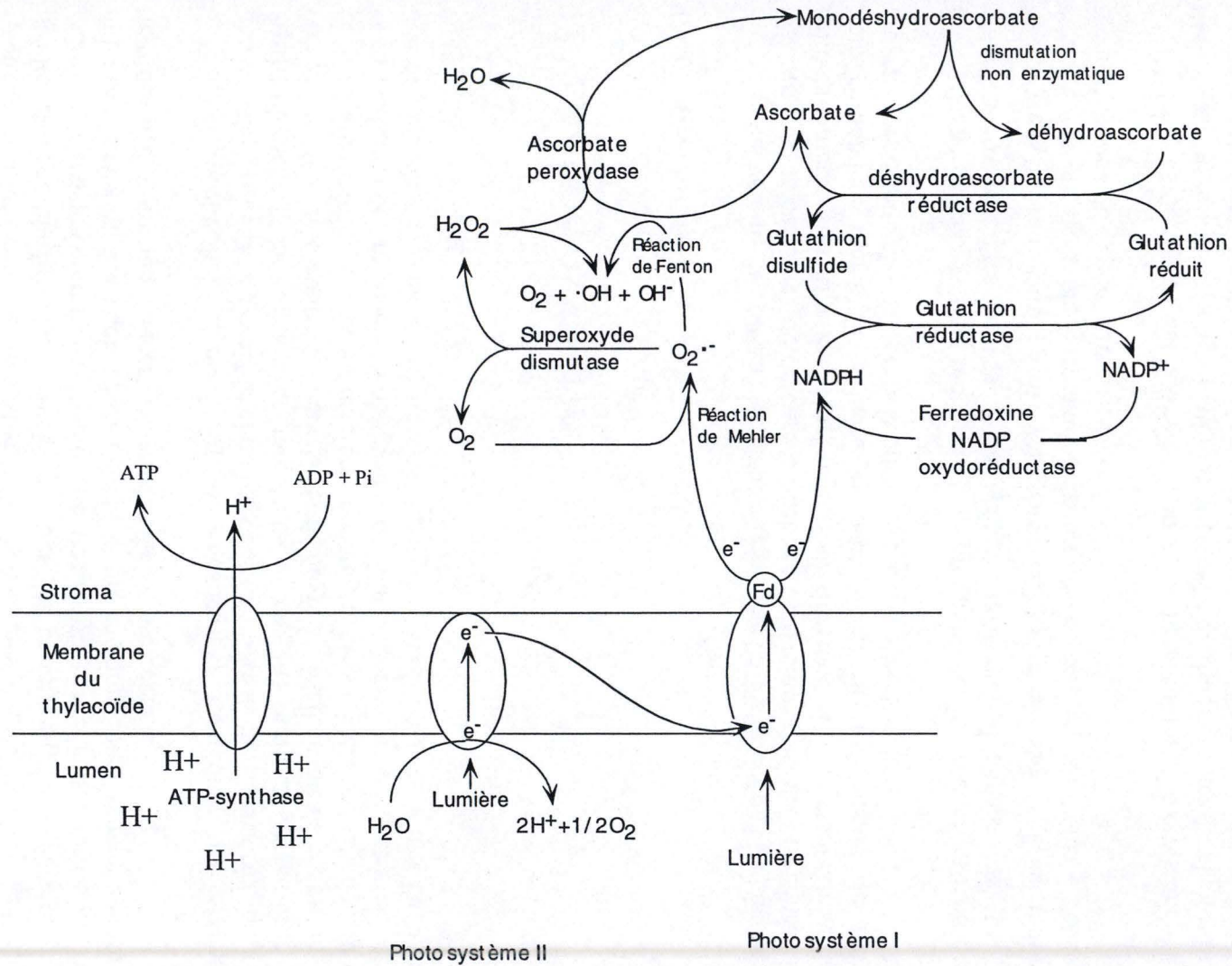


Fig. 7 : Réactions qui conduisent à la formation des molécules à oxygène actif dans le chloroplaste lors de la photosynthèse



Après cette brève introduction sur les rôles des molécules à oxygène actif chez les végétaux supérieurs, nous allons décrire comment la plante produit ces molécules, comment ces molécules évoluent dans la cellule et, finalement, comment la cellule utilise ces molécules pour se défendre.

### 1.3.2 La chimie des espèces à oxygène actif chez les végétaux supérieurs

Les plantes, comme la majorité des organismes terrestres vivants, se développent dans une atmosphère riche en oxygène (21 % de l'atmosphère), dont la plus grande partie est d'ailleurs produite par les plantes elles-mêmes au cours de la photosynthèse. Utilisé par les mitochondries lors de la respiration pour produire de l'énergie à partir de la matière organique, l'oxygène est également à l'origine de la production de radicaux libres (molécules avec un électron non apparié, donc très réactives) et d'autres molécules réactives comme l'eau oxygénée, susceptibles de dégrader les molécules végétales en leur arrachant des charges négatives. Les radicaux libres, ainsi que le peroxyde d'hydrogène, sont générés dans tous les compartiments de la cellule de la plante : la mitochondrie, le peroxysome, le cytosol, et au niveau de la membrane plasmique. En situation physiologique « normale », les radicaux libres sont éliminés par des systèmes de défense naturels des plantes mais il arrive, en particulier lorsque les conditions environnementales se font plus contraignantes, que ces derniers soient débordés et que les oxydants s'accumulent de façon dangereuse dans les tissus.

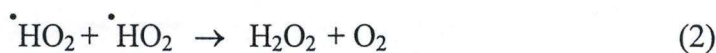
#### *La production du peroxyde d'hydrogène*

Dans les chloroplastes, organites cellulaires où s'effectue la photosynthèse, des électrons sont arrachés à l'eau, sous l'effet de la lumière, puis transférés à des accepteurs spécifiques qui sont réduits (figure 7). Simultanément, des molécules d'oxygène sont libérées. La cascade de réactions d'oxydo-réduction qui s'ensuit aboutit à la formation d'énergie sous forme d'ATP et à la réduction de  $\text{NADP}^+$  en NADPH, molécule nécessaire à la synthèse de matière organique par l'intermédiaire du cycle de Calvin-Benson.

Lorsque les conditions de l'environnement se font plus difficiles (fort ou faible éclairage, stress hydrique, température basse ou élevée), en présence de polluants (ozone, oxyde de soufre), ou au cours d'agressions par des bactéries, par des virus ou par des champignons pathogènes, le métabolisme normal du chloroplaste est interrompu. Une partie des électrons issus du clivage de l'eau lors de la photosynthèse peut alors être transférée à l'oxygène. Cette réduction de l'oxygène (réaction de Mehler), qui s'accroît avec les contraintes environnementales, aboutit à la formation d'ions superoxydes (Foyer *et al*, 1997). Ceux-ci peuvent être protonés à pH bas ( $\text{pK}_a = 4,8$ ) pour donner le radical perhydroxyle (équation 1).



Ce radical perhydroxyle et l'anion superoxyde subissent alors spontanément une dismutation qui produit le peroxyde d'hydrogène (équations 2 et 3).

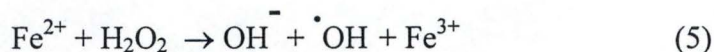
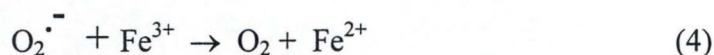






L'équation 3 représente la route majoritaire pour la « destruction », à pH bas, de l'anion superoxyde. Cependant, à cause de l'équilibre dans l'équation 1, la dismutation radicalaire spontanée diminue lorsque le pH cellulaire augmente. Une enzyme contenant un ion métallique, la superoxyde dismutase accélère cette même réaction 3 de dix fois par rapport au taux de dismutation spontanée.

L'eau oxygénée est stable et moins réactive que l'anion superoxyde. Cependant, en présence d'ions métalliques transitoirement réduits (tels que l'ion ferreux,  $\text{Fe}^{2+}$ ) pouvant être libres ou complexés à des agents chélatants ou à des protéines, la formation du radical hydroxyle peut avoir lieu et l'anion superoxyde peut agir comme l'agent réducteur initial de l'ion métallique (équations 4 et 5).



Il est à noter que les peroxydases peuvent aussi catalyser la formation d'anions superoxydes et d'eau oxygénée par une réaction complexe dans laquelle le NADH est oxydé en utilisant une trace de peroxyde hydrogène préalablement produit par dégradation non-enzymatique de NADH. Le radical NAD formé réduit alors le dioxygène en anions superoxydes, dont certains seront dismutés en  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{O}_2$ . Cette réaction est stimulée par des monophénols et du manganèse. Cette voie de production particulière d'eau oxygénée extracellulaire assurerait la polymérisation de la lignine (Lamb et Dixon, 1997).

Toutes les formes actives de l'oxygène ainsi produites sont extrêmement dangereuses pour les plantes. L'eau oxygénée est un inhibiteur de certaines enzymes du cycle d'assimilation photosynthétique du carbone (cycle de Calvin-Benson). Les radicaux libres  $\cdot\text{OH}$ , quant à eux, sont des oxydants redoutables, capables d'arracher des électrons aux macromolécules organiques cellulaires, provoquant ainsi la peroxydation des lipides membranaires, la destruction de protéines, l'inactivation d'enzymes et la détérioration de l'ADN des chromosomes. De tels dommages peuvent aboutir à la destruction des structures cellulaires. Pour limiter ces dommages, le végétal possède des systèmes de détoxification des molécules à oxygène actif (Foyer *et al*, 1997).

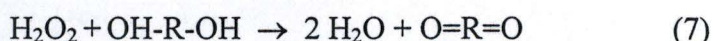
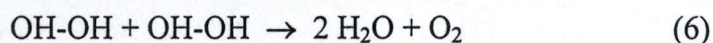
#### *La détoxification des molécules à oxygène actif*

Pour survivre dans des conditions environnementales difficiles, et néanmoins courantes, les plantes ont la capacité de faire appel à des systèmes de détoxification enzymatiques et non enzymatiques très efficaces : les superoxydes dismutases, les peroxydases, les catalases, l'ascorbate (ou vitamine C), le glutathion et l' $\alpha$ -tocophérol (ou vitamine E).



Les superoxydes dismutases catalysent la transformation des ions superoxydes en eau oxygénée, en évitant ainsi l'accumulation des ions hydroxydes susceptibles d'engendrer les « catastrophes » cellulaires irrémédiables signalées précédemment. Les superoxydes dismutases sont des métallo-protéines présentes en quantité importante dans les feuilles, plus particulièrement dans les chloroplastes. Il en va de même pour les ascorbate-peroxydases, qui doivent leur nom au fait qu'elles réduisent le peroxyde d'hydrogène en eau par l'intermédiaire de l'oxydation de l'ascorbate.

L'eau oxygénée est éliminée par des peroxydases variées comprenant l'ascorbate, la glutathione peroxydases ou par des catalases. Les équations générales pour les réactions dues aux catalases et aux peroxydases sont similaires car la réaction due aux catalases peut être vue comme une réaction peroxydative avec l'eau oxygénée comme substrat et accepteur d'électrons (équations 6 et 7). Dans l'équation 7, le groupement R est souvent aromatique.



L'ascorbate, lui-même, est ensuite réduit sous l'action d'autres réducteurs comme le glutathion et la ferrédoxine. Cette cascade de réduction, utilisant comme anti-oxydants des réducteurs puissants tels que l'ascorbate et le glutathion, présents en grande quantité dans les compartiments cellulaires, est appelée le cycle ascorbate-glutathion. Toutes les enzymes de ce cycle ont été identifiées et localisées dans le chloroplaste (figure 7). Il faut toutefois signaler qu'il existe une autre voie d'élimination du peroxyde d'hydrogène par le biais des catalases situées dans les peroxysomes, petits organites localisés dans le cytoplasme des cellules végétales (Foyer *et al.*, 1997; Willekens *et al.*, 1995). Certaines de ces enzymes sont également présentes dans le cytosol et la vacuole.

Les catalases végétales ont été principalement associées à l'élimination du peroxyde d'hydrogène dans les peroxysomes. La source majoritaire d'eau oxygénée dans les peroxysomes sont des oxydases variées, lesquelles incluent l'acyl-CoA oxydase et la glycolate oxydase. L'acyl-CoA oxydase intervient dans la conversion des acides gras en carbohydrates, via  $\beta$ -oxydation, dans les glyoxysomes (peroxysomes spécialisés) durant la germination des graines. La glycolate oxydase convertit le glycolate, produit dans les chloroplastes pendant la photorespiration, en glyoxylate (figure 7). Cette enzyme est trouvée essentiellement dans les peroxysomes des cellules photosynthétiques (Foyer *et al.*, 1997).

En dépit du rôle important des catalases dans le contrôle des niveaux du peroxyde d'hydrogène dans la cellule, leur fonction physiologique reste relativement incertaine dans de nombreuses situations stressantes. Cela est dû, en partie, à leur localisation peroxysomale et parce que la plupart des études réalisées sur le choc oxydatif ont été focalisées sur les événements chloroplastiques. Néanmoins, la participation des catalases dans la photorespiration suggère que l'activité de ces enzymes est un facteur déterminant pour la protection des cellules photosynthétisantes contre le stress oxydatif (Willekens *et al.*, 1995).

Bien que ces enzymes « salvatrices » soient très exprimées et très actives, et bien que les anti-oxydants, nécessaires à leur bon fonctionnement, soient présents en grande quantité dans les cellules, leur protection peut être insuffisante en cas de stress oxydatif important.



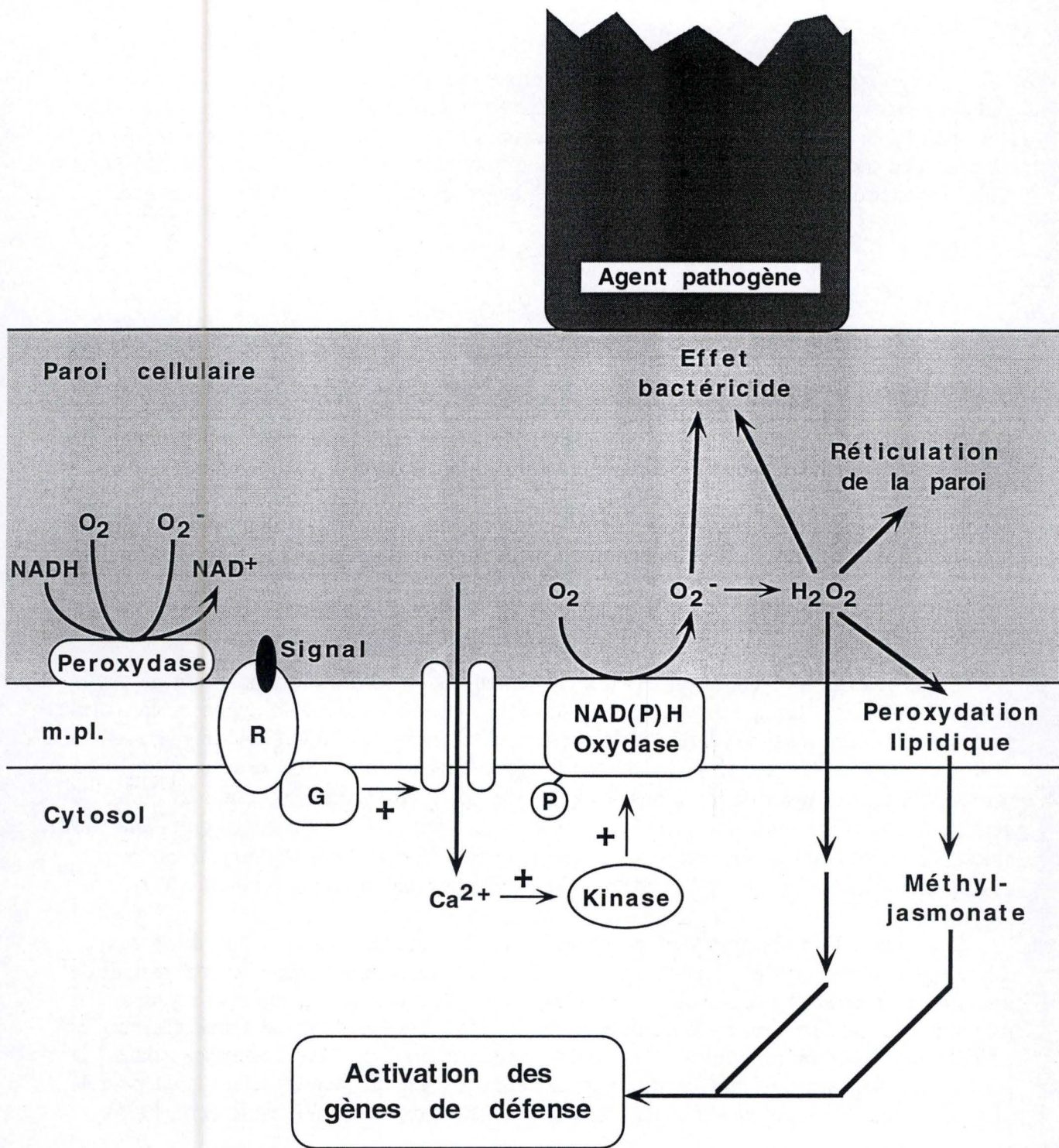


Fig. 8 : Représentation schématique de l'activation de la production d'espèce à oxygène actif chez les végétaux supérieurs. G, protéine G ; m.pl., membrane plasmique ; P, phosphate ; R, récepteur.



Enfin, la question se pose de savoir si certaines espèces actives de l'oxygène ne sont pas finalement indispensables aux plantes.

### 1.3.3 *Le rôle des espèces oxygéniques actives dans les réponses de défense de la plante*

L'apparition de formes actives de l'oxygène est, en effet, inévitable et les plantes ont valorisé au mieux cette situation. Par exemple, la réaction de Mehler, au sein des membranes chloroplastiques, permet de réguler l'intensité et la distribution des flux d'électrons photosynthétiques. Cette réaction contribue de cette manière à une meilleure protection des plantes dans des conditions environnementales extrêmes. On a remarqué qu'en l'absence de dérivés actifs de l'oxygène, les plantes résistent moins bien à la photo-inhibition de la photosynthèse. Par ailleurs, les radicaux libres et le peroxyde d'hydrogène sont impliqués, sans que l'on connaisse très bien les mécanismes en jeu, dans la défense des végétaux contre les organismes pathogènes : une forte et rapide production d'espèces actives de l'oxygène apparaît dans les cellules, tuant les pathogènes et renforçant la paroi cellulaire. Les radicaux libres interviendraient aussi dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans les réponses au stress (Foyer *et al.*, 1997).

Contrairement à la production des molécules à oxygène actif durant la photosynthèse ou lors de la  $\beta$ -oxydation des acides gras, la production de ces molécules durant une interaction plante-pathogène est un mécanisme de défense inductible et finement contrôlé à l'échelle moléculaire.

Dans le cas d'une interaction plante-pathogène, la reconnaissance d'un éliciteur à la surface des cellules entraîne une mobilisation d'ions calcium dans le cytosol. Cette réponse précoce est médiée par des protéines G hétérotrimériques. L'augmentation de l'activité en calcium cytosolique induit, via la formation de complexes  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline, l'activation d'une kinase  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM dépendante. Cette dernière va, à son tour, activer la NAD(P)H oxydase membranaire responsable de la production d'anions superoxydes dans la paroi (figure 8) (Hammond-Kosack et Jones, 1996).

La NAD(P)H oxydase membranaire responsable du choc oxydatif chez les plantes peut être, du point de vue structurel, homologue à la NADPH oxydase des phagocytes mammaliens. Différents anticorps dirigés contre des protéines du complexe NADPH oxydase animal sont, en effet, capables de reconnaître leurs équivalents au sein de la NAD(P)H oxydase végétale (Mehdy, 1994).

Une autre oxydase qui pourrait également être une composante du choc oxydatif est une peroxydase dépendante du NADPH et associée à la surface externe de la membrane plasmique. Néanmoins, il y a peu d'informations sur les mécanismes d'activation de ces enzymes par des éliciteurs (Hammond-Kosack et Jones, 1996).

La génération, étendue et rapide, des dérivés actifs de l'oxygène, par la NAD(P)H oxydase, exerce un stress oxydatif sévère sur les cellules infectées de la plante et occasionne simultanément des mesures de protection pour limiter les dommages tissulaires. Bien que de hautes concentrations locales de ces composés participent directement à la mort du pathogène et de la cellule végétale infectée (mort cellulaire par hypersensibilité), de faibles doses agissent comme signaux pour l'induction des mécanismes de détoxification impliquant des superoxydes dismutases, des glutathion-S-transférases, des ascorbate peroxydases, des



glutathione peroxydases et de la polyubiquitine, et l'activation d'autres voies de transduction du signal dans les cellules voisines (Foyer *et al*, 1997) (voir point 1.2.3).

Les principales propriétés des molécules à oxygène actif peuvent être résumées de la manière suivante :

- 1) les AOS réduisent directement la viabilité du pathogène (Wu *et al*, 1995).
- 2) la toxicité des AOS et celle de leurs composés dérivés est telle qu'ils peuvent contribuer à la mort cellulaire (Mehdy, 1994) de la plante durant la réponse hypersensible (Greenberg, 1997). En effet, l'inhibition de la NADPH oxydase par le diphénylèneiodonium (DPI) limite l'importance de la réponse hypersensible. Par contre, des inhibiteurs de phosphatase 2A activent la mort cellulaire en empêchant la régulation négative de la NAD(P)H oxydase membranaire par déphosphorylation (Allan et Fluhr, 1997).
- 3) le choc oxydatif joue un rôle fondamental dans le renforcement de la paroi cellulaire à une attaque pathogène (Lamb et Dixon, 1997) : plusieurs protéines pariétales solubles perdent leur solubilité suite au choc oxydatif généré par une agression pathogène (Brisson *et al*, 1994 ; Waffenschmidt, 1993).
- 4) les AOS sont des signaux intermédiaires induisant la biosynthèse des phytoalexines chez certaines plantes (Low et Merida, 1996).
- 5) les peroxydes lipidiques, générés par une réaction non-enzymatique des AOS avec les lipides membranaires, peuvent servir de précurseurs dans la synthèse d'acide jasmonique, un régulateur connu de plusieurs mécanismes de défense exprimés durant la réponse hypersensible (Mehdy, 1994).

#### 1.3.4 *Cross-talking entre la production de molécules à oxygène actif et d'autres messagers secondaires*

La production d'espèces oxygénées réactionnelles influence directement ou indirectement deux messagers secondaires également impliqués dans l'induction de réponses de défense : l'acide salicylique et le méthyl jasmonate.

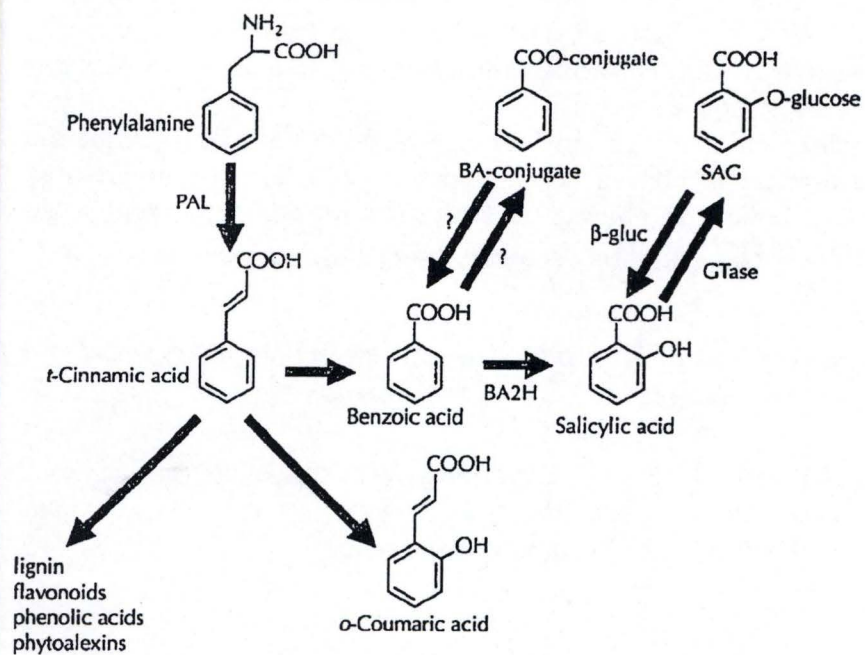
##### *Interaction avec la voie de transduction de l'acide salicylique*

###### a) Généralités

L'acide salicylique (SA) affecte de nombreux processus physiologiques dans les plantes tels que la floraison (Hew, 1987) et la thermogenèse (Raskin *et al*, 1987). Ces dernières années, l'importance de cet acide phénolique dans les interactions plante-pathogène est devenue apparente. L'acide salicylique s'accumule, en effet, dans les cellules infectées et est indispensable, chez de nombreuses plantes, à l'induction d'une réponse systémique acquise (SAR). Cette dernière réponse, non spécifique, confère une résistance à distance aux pathogènes viraux, bactériens et fongiques. La SAR est accompagnée, entre autres, par l'induction de nombreux gènes SAR codant essentiellement pour des protéines PR à travers toute la plante (Vernooij *et al*, 1994).

Dans certains cas particuliers, il apparaît que l'acide salicylique est également important dans l'établissement de la réponse de défense locale (Chasan, 1995).





**Fig. 9 :** Métabolisme de l'acide salicylique. PAL, phénylalanine amonia-lyase ; GTase, UDP-glucose : SA 3-O-glucosyltransférerase ;  $\beta$ -gluc,  $\beta$ -glucosidase ; SAG, glucoside de l'acide salicylique.



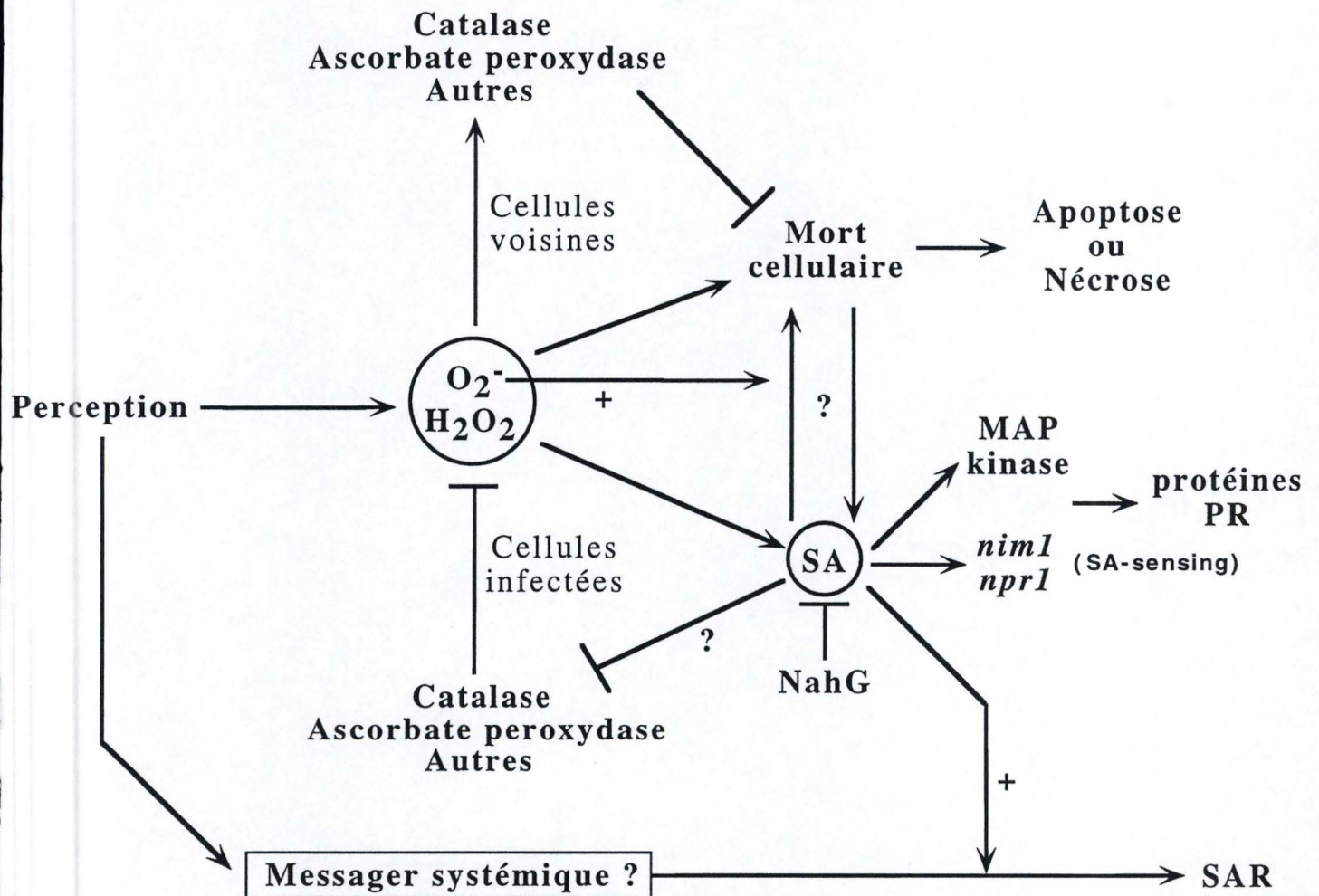


Fig. 10 : Lien entre la production d'espèces à oxygène actif, la production d'acide salicylique et la mort cellulaire



## b) Biosynthèse de l'acide salicylique

L'acide salicylique est synthétisé par conversion de la phénylalanine en acide trans-cinnamique par la phénylalanine ammonia lyase (PAL), une enzyme clé dans la voie des phénylpropanoïdes menant à la synthèse de phytoalexines, de lignine et d'acide hydroxybenzoïque. L'acide cinnamique est ensuite converti en acide salicylique via deux intermédiaires alternatifs : l'acide ortho-coumarique ou l'acide benzoïque (BA) (figure 9). Il apparaît, cependant, que l'acide salicylique est principalement synthétisé à partir d'acide benzoïque. L'enzyme qui catalyse cette réaction, la benzoate-2-hydroxylase, est induite 4 ou 5 fois par le virus de la mosaïque du tabac (TMV), une réponse qui peut être bloquée par la cycloheximidine (Malamy *et al*, 1996).

Après sa synthèse, l'acide salicylique est rapidement conjugué à du glucose pour former le glucoside d'acide salicylique (SAG), un processus commun à beaucoup d'acides phénoliques végétaux. L'enzyme responsable de cette conversion, l'UDP-glucose : SA glucosyltransférase, a été caractérisée dans plusieurs plantes, y compris le tabac. Cette enzyme est activée lors d'une interaction hôte-pathogène (Durner *et al*, 1997).

Un conjugué hydrolysable d'acide benzoïque a aussi été identifié dans le tabac. Comme le SAG, des niveaux significatifs de ce conjugué s'accumulent dans le tabac sain. Après inoculation avec le TMV, une augmentation de la concentration d'acide benzoïque et d'acide salicylique coïncide avec la diminution de la quantité de conjugué d'acide benzoïque, suggérant que celui-ci constitue une forme de stockage hydrolysable d'acide benzoïque.

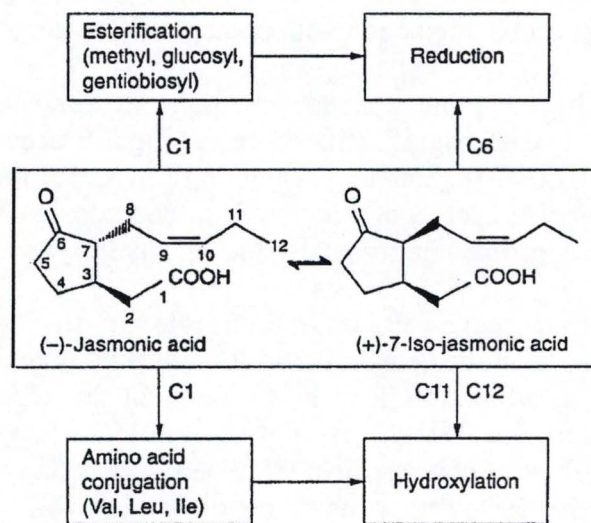
Le SAG pourrait également assurer un rôle de stockage similaire pour l'acide salicylique, et sa présence, probablement dans les feuilles non-inoculées de plantes infectées, fournirait une source métabolisable lors du déploiement des réponses de défense durant la résistance systémique acquise (Dempsey et Klessig, 1994). Le SAG est, en effet, hydrolysable par le fluide extracellulaire et pourrait ainsi être libéré lors de la lyse cellulaire résultant de la nécrose cellulaire induite par le pathogène (Vernooij *et al*, 1994).

## c) Mode d'action et rôles de l'acide salicylique

Dans un effort pour isoler le récepteur à l'acide salicylique, une protéine liant l'acide salicylique fut identifiée chez le tabac. Cette protéine de liaison présente de fortes homologues avec une catalase, une enzyme qui convertit le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Il a été postulé que l'interaction entre l'acide salicylique et la catalase entraînerait une inhibition de la catalase. Cette inhibition serait accompagnée indirectement d'une augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène favorisant la réponse hypersensible. L'injection d'inhibiteurs de catalase dans les feuilles induit, en effet, au moins un des gènes SAR, impliquant que l'inhibition de la catalase peut entraîner une réponse de défense locale et systémique. Ces résultats sont néanmoins contestés par le fait que chez de nombreuses plantes accumulant de l'acide salicylique, on n'observe aucune inhibition de l'activité des catalases (Vernooij *et al*, 1994).

Chez certaines plantes, l'acide salicylique joue également un rôle dans la nécrose et joue alors le même rôle que le peroxyde d'hydrogène (figure 10) (Vernooij *et al*, 1994).





**Fig. 11** : L'acide jasmonique et ses dérivés naturels. L'estérification et la conjugaison amino-acide ont lieu sur le carbone 1 ; la réduction a lieu sur le carbone 6 ; et l'hydroxylation se fait sur les carbones 11 et 12.



## d) Interaction de l'acide salicylique avec d'autres messagers

L'acide salicylique interagit avec l'éthylène, une hormone végétale gazeuse, contrôlant l'expression de certains gènes codant pour les protéines PR. On constate, en effet, que les inhibiteurs de l'éthylène abolissent l'accumulation de ces protéines médiées par l'acide salicylique. Malgré le fait que l'éthylène ne soit pas une molécule indispensable à l'établissement d'une résistance systémique acquise, celui-ci augmenterait la sensibilité des tissus à l'acide salicylique (Durner *et al*, 1997).

La voie de l'acide salicylique interagit également avec la voie de l'acide jasmonique, lequel induit la synthèse d'inhibiteurs de protéinases suite à des dommages causés par des insectes. L'acide salicylique joue ici le rôle de régulateur négatif de la production de jasmonate. Ces observations sous-entendent l'existence de voies de défense anti-insectes et anti-microbiennes soumises à des mécanismes de régulation opposés (Dempsey et Klessig, 1994).

Il est aussi probable que l'acide salicylique interagisse avec la systémine. Or, la synthèse de la systémine apparaît en réponse à une blessure causée par un dommage mécanique ou par un insecte phytophage. Elle induit alors l'expression d'inhibiteurs de protéinases sérines. Ces inhibiteurs seraient inductibles par des protéines de défense qui protégeraient la plante contre les herbivores par une baisse de la digestibilité et de la qualité nutritionnelle des protéines des feuilles. De ces observations, on peut affirmer le rôle régulateur de la systémine dans la résistance systémique acquise (Enyedi *et al*, 1992).

*Interaction avec la voie de l'acide jasmonique*

## a) Généralités

Le jasmonate (JA) et ses dérivés sont des composés cyclopentanones qui sont synthétisés à partir d'acide linoléique particulièrement abondant dans la membrane des chloroplastes. Le produit biosynthétique naturel de la voie du jasmonate, dans la plupart des espèces, paraît être le 7-iso-jasmonate (7-iso-JA) rapidement converti en jasmonate par isomérisation. Le jasmonate subit des modifications variées donnant « naissance » à de nombreux métabolites différant en structure et en activité biologique. Les composés physiologiquement actifs majeurs sont : le jasmonate et son méthyl ester, et les conjugués du jasmonate avec l'isoleucine, la leucine, ou la valine (figure 11) (Wasternack et Parthier, 1997).

Après sa première description comme composé de l'huile essentielle du *Jasminum grandiflorum*, le méthyl jasmonate et ses composés relatifs furent trouvés largement répandus dans le règne végétal y compris chez les champignons et les algues. En ce qui concerne le méthyl jasmonate (MeJA), il s'avère être également un composé de phéromones attirant les femelles chez certains papillons de nuit. Le jasmonate et le méthyl jasmonate affectent la croissance et le développement végétal de manière pléiotropique. Ils affectent entre autres : l'inhibition de la germination des graines non dormantes, la stimulation de la germination des graines dormantes, la relocalisation des protéines de stockage à partir des organes de réserve, la régulation de l'expression des gènes nucléaires et chloroplastiques durant le développement de la feuille, et la régulation de la formation des fruits, des fleurs et des graines (Chow et Kao, 1992).



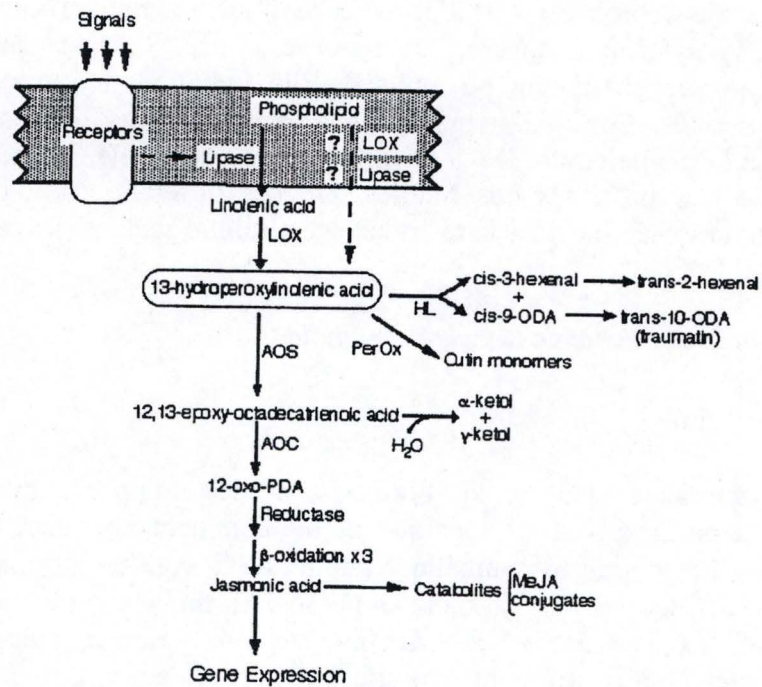


Fig. 12 : Voie de biosynthèse du jasmonate.



Le méthyl jasmonate, en particulier, est une molécule-signal libérée dans les plantes en réponse à différents stress tels qu'une blessure ou une attaque pathogène, un traitement des tissus avec des éliciteurs, ou la soumission des tissus à l'osmose ou à la dessiccation (Farmer et Ryan, 1990 ; Farmer et Ryan, 1992). Les dérivés jasmoniques sont transportés localement (et systémiquement ?) dans une plante blessée. En tant que molécule volatile, le méthyl jasmonate est également capable de traverser l'atmosphère et donc d'atteindre les plantes voisines dans lesquelles des réactions de défense caractéristiques peuvent être induites dans certains cas particuliers.

La production de jasmonate par la plante en situation de stress se traduit par :

- la synthèse de nouveaux polypeptides (JIPs, jasmonate induced proteins) (Reinbothe *et al*, 1992 ; Reinbothe *et al*, 1994),
- la répression sélective de plusieurs gènes non impliqués dans les réponses de défense,
- la régulation générale différée dans le temps de la biosynthèse protéique, ayant lieu dans des feuilles traitées au méthyl jasmonate ou stressées, et ce à long terme (Reinbothe *et al*, 1994).

#### b) La biosynthèse du jasmonate et de ses dérivés

Les molécules de type jasmonate dérivent de l'acide linoléique via une voie octadécanoïde inductible constituée d'au moins sept étapes enzymatiques (Wasternack et Parthier, 1997). L'acide linoléique est « détaché » de la membrane plasmique par une phospholipase A. On postule actuellement que cette phospholipase A serait activée par phosphorylation via une kinase présentant une homologie avec les MAP kinases des cellules animales (Wurgler-Murphy et Saito, 1997). L'acide linoléique est converti en acide 13-hydroperoxylinoléique par une lipoxygénase. Cet acide est lui-même le substrat d'une allène oxyde synthase, d'une hydroperoxyde déhydratase (ou hydroperoxyde déhydrase), et d'une allène oxyde cyclase qui le transforme en acide 12-oxo-phytodiénoïque (12-oxo-PDA). Une réduction et trois étapes de  $\beta$ -oxydation consécutives donnent finalement le 7-iso-jasmonate (figure 12). Il est à noter que la conversion de l'acide 13-hydroperoxylinoléique en 12-oxo-PDA peut être inhibée par l'acide salicylique et ses dérivés tels que l'aspirine et l'acide dichloroisonicotinique (Grimes *et al*, 1992). L'acide jasmonique peut ensuite être catabolisé pour former le méthyl jasmonate et les nombreux conjugués qui peuvent avoir une activité biologique (figure 11).

L'augmentation de la concentration en jasmonate dans la plante résulte donc soit d'une nouvelle synthèse, soit de sa libération à partir des formes conjuguées de l'acide jasmonique.

Après sa production, le jasmonate interagit avec les récepteurs cellulaires (encore inconnus) qui contrôlent l'expression de plusieurs gènes (tableau page 19) (Creelman et Mullet, 1997).



Tableau . Gènes induits en présence de jasmonate/méthyl jasmonate et leur expression sous diverses conditions de stress (Choi et al, 1992 ; Kauss et al, 1992)

| Produits de gènes            | Espèces                | Autres inducteurs                     |
|------------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| Inhibiteurs de protéinases   | Pomme de terre, tomate | Sucrose, ABA, blessure                |
| Thionines                    | Orge                   | Pathogène, ions métalliques divalents |
| Protéines riches en prolines | Haricot                | Déficit en eau, ABA                   |
| Phénylalanine ammonia-lyase  | Persil                 | U.V., éliciteurs fongiques            |
| 4-coumarate : CoA ligase     | Persil                 | U.V., éliciteurs fongiques            |
| Chalcone synthase            | Persil, Pétunia        | Sucrose, U.V., éliciteurs fongiques   |
| Lipoxygénase                 | Haricot                | Déficit en eau, blessure              |
| Systémine                    | Pomme de terre, tomate | Blessure                              |

## c) Interaction entre l'acide jasmonique et le choc oxydatif

Lors du choc oxydatif, nous avons vu que les cellules produisent des radicaux  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  et  $HO_2^{\cdot}$  susceptibles d'entraîner des dommages oxydatifs aux lipides membranaires. Il a été démontré, chez plusieurs plantes, que les phospholipases avaient une affinité plus importante pour les acides gras peroxydés que pour les acides gras non modifiés. L'oxydation des acides gras membranaires lors d'une interaction plante-pathogène, mais également en présence d'U.V. et d'ozone, stimulerait indirectement l'activité des phospholipases et la biosynthèse du jasmonate (Enyedi *et al*, 1992).



## 2 BUT DU TRAVAIL.

Comme nous l'avons signalé dans l'introduction, la production d'eau oxygénée constitue pour différents végétaux un moyen de défense précoce non spécifique contre une série d'agents pathogènes. Elle permet, en association avec d'autres réponses de défense, de ralentir et/ou de stopper la progression du pathogène dans les tissus de la plante.

L'objectif de ce mémoire est d'étudier la possibilité de produire du peroxyde d'hydrogène dans la paroi cellulaire végétale chez la chicorée industrielle afin de lutter contre une infection par *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, une bactérie pectolytique posant des problèmes phytosanitaires lors de la culture de la chicorée. La production de peroxyde d'hydrogène permettrait à la plante d'« avoir le temps » de mobiliser d'autres réponses de défense.

L'augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène sera obtenue en transformant la chicorée avec le gène de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger*, une enzyme transformant le glucose en gluconolactone tout en libérant le peroxyde d'hydrogène. Ce travail sera divisé en trois grandes étapes :

- clonage du gène de la glucose oxydase à partir d'ADN génomique d'*Aspergillus niger*.
- sous-clonage du gène de la glucose oxydase dans le plasmide intégratif pBI121 et transformation de la chicorée industrielle par *Agrobacterium tumefaciens*.
- sous-clonage du gène de la glucose oxydase dans le plasmide pET-15b et production de sondes immunologiques anti-glucose oxydase permettant de localiser le produit du transgène dans un travail ultérieur.



**MATERIEL**  
**et**  
**METHODES**



### 3 MATERIEL ET METHODES

#### 3.1 SOUCHES BACTERIENNES ET FONGIQUES

##### 3.1.1 Souches

Au cours de ce travail, quatre souches bactériennes et une souche de champignon ont été utilisées :

- *Escherichia coli* (souche BL21, souche HB 101 et souche TOP 10)
- *Agrobacterium tumefaciens* (LBA 4404)
- *Aspergillus niger* (ATCC 9029)

##### 3.1.2 Conservation des clones

Les clones bactériens obtenus au cours de ce mémoire ont été conservés à  $-70^{\circ}\text{C}$  dans du milieu LB contenant 15 % de glycérol (aliquotes de 1 ml). Ces mêmes clones ont également été conservés en boîtes de Pétri maintenues à  $4^{\circ}\text{C}$  et repiquées régulièrement.

#### 3.2 PLASMIDES UTILISES

Durant ce mémoire, nous avons utilisé trois plasmides :

- Le vecteur pMOS (Amersham)
- Le vecteur pET (Novagen)
- Le vecteur pBI121 (Clontech)

Ceux-ci seront décrits en détail dans le chapitre traitant des résultats.

#### 3.3 METHODES RELATIVES A L'ADN

##### 3.3.1 Isolement d'ADN de la chicorée

###### *Solutions et tampons utilisés*

Tampon CTAB (2x) : 2 % (p/v) CTAB  
1,4 M NaCl  
2 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoéthanol (à rajouter à la dernière minute)  
20 mM EDTA  
100 mM Tris-HCl  
1 % PVP-40  
mettre à pH = 8,0



Rem : le CTAB permet de précipiter les polysaccharides

Tampon de lavage « Murray et Thompson » : 76 % (v/v) éthanol  
10 mM acétate d'ammonium

Tampon TE (1x) : 10 mM Tris-HCl  
1 mM EDTA  
mettre à pH = 8,0

### Protocole

- Préchauffer la solution de CTAB (2x) à 60°C et mettre l'isopropanol au frigo (4°C).
- Sectionner 2 ou 3 rondelles de feuilles de chicorée (sans les nervures) et les placer dans un tube Eppendorf.
- Remplir le tube Eppendorf d'azote liquide et broyer l'échantillon à l'aide d'un pilon pendant une minute.
- Ajouter 500 µl de CTAB (2x) et remettre en suspension sans vortexer.
- Incuber à 60°C pendant 30 minutes avec agitation périodique (toutes les 5 minutes).
- Extraire avec 500 µl de chloroforme : alcool isoamylique (24 : 1) en agitant manuellement par inversion des tubes pendant 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 15 minutes à 12000 rpm à température ambiante et récupérer la phase aqueuse.
- Précipiter les acides nucléiques avec 350 µl d'isopropanol froid (4°C). Homogénéiser par inversion et laisser précipiter 1 heure à température ambiante.
- Centrifuger à 8000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante.
- Eliminer le surnageant et ajouter 1 ml de tampon de lavage « Murray et Thompson ».
- Placer 1 heure dans l'agitateur vertical à température ambiante.
- Centrifuger à 8000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante.
- Eliminer le surnageant en inversant délicatement le tube sur du papier absorbant et sécher le culot 10 minutes à l'air libre.
- Sécher 5 minutes au speed-vac. Resuspendre le culot dans 70 µl de tampon TE (1x) et laisser à 4°C pendant une nuit sous agitation verticale.
- Ajouter 0,5 µl de RNase (stock à 10 mg/ml), incuber 30 minutes à 37°C.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 140 µl de tampon TE et 77 µl d'acétate d'ammonium 7,5 M.
- Ajouter 730 µl d'éthanol froid. Homogénéiser par inversion et mettre à -70°C pendant 30 minutes.
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant et laver le culot d'ADN avec 500 µl d'éthanol 75 %.
- Sécher le culot au speed-vac pendant 3 minutes et le resuspendre dans 20 µl de tampon TE (1x). Stocker l'échantillon à -20°C.



### 3.3.2 Isolement de l'ADN d'*Aspergillus niger* (ATCC 9029)

#### Solutions et tampons utilisés

Tampon d'extraction (pH = 7,5) : Tris 200 mM  
 CTAB 2 %  
 NaCl 1,4 M  
 EDTA 20 mM  
 β-mercaptoéthanol 1 %

Tampon de précipitation (pH = 7,5) : Tris 50 mM  
 EDTA 10 mM  
 CTAB 1 %

Tampon TE (pH = 8,0) : Tris 10 mM  
 EDTA 1 mM

#### Protocole

- Mettre *Aspergillus niger* en culture sur un milieu LBA (37 g/l Luria Agar, Gibco BRL). Incuber à 25°C pendant 2 à 3 jours.
- Ensemencer 100 ml de milieu LB (20 g/l LB BrothBase, Gibco BRL) avec quelques spores d'*Aspergillus niger*. Incuber la culture à 25°C sous agitation pendant 2 à 3 jours.
- Récolter le mycélium par filtration sur Miracolth (Calbiochem-Novabiochem Corporation).
- Dans un mortier autoclavé et maintenu à -20°C, verser un peu d'azote liquide et plonger le mycélium dans l'azote. Broyer le mycélium en rajoutant de l'azote régulièrement. Après obtention d'une fine poudre, récolter celle-ci dans un tube Falcon. Ce flacon est placé à -70°C pour conservation.
- Extraction : à 3 gr de poudre de mycélium, ajouter 6 ml de tampon d'extraction. Homogénéiser pendant 5 secondes à l'ultra-turax.
- Transférer le broyat dans un tube Falcon de 15 ml et incuber pendant 40 minutes à 60°C. Mélanger par inversion toutes les 10 minutes.
- Ajouter 3 ml de chloroforme-octanol (24 :1) et mélanger par inversion pendant 10 minutes.
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 10 minutes (à 4°C).
- Récupérer la phase aqueuse et ajouter 1/10 de volume de CTAB 10 % (p/v), NaCl 0.7 M.
- Mélanger puis ajouter 3 ml de chloroforme-octanol (24 :1) et mélanger par inversion pendant 5 minutes.
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
- Récupérer la phase aqueuse et ajouter un volume de tampon de précipitation.
- Mélanger et laisser précipiter pendant 30 minutes à température ambiante.
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 10 minutes à 4°C et éliminer le surnageant.
- Au précipité, ajouter 450 µl de NaCl 1 M.
- Incuber à 56°C pendant 5 minutes avec agitation pour aider la dissolution du précipité.



- Transvaser l'échantillon dans un Eppendorf et ajouter 2 volumes d'éthanol 96 % (v/v).
- Placer l'échantillon à -20°C pendant une heure, puis centrifuger à 13000 rpm pendant 2 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant et laver le culot d'ADN 2 fois avec 1 ml d'éthanol 76 % (v/v) maintenu à -20°C.
- Sécher le culot d'ADN au speed-vac pendant 10 minutes.
- Resuspendre l'ADN dans 200 µl de tampon TE. Incuber une nuit à 28°C sous légère agitation.

### 3.3.3 PCR typique sur de l'ADN génomique

#### *La composition d'une réaction PCR*

- x µl d'ADN à amplifier.
- 1 µl d'amorce gauche (10 à 100 pmoles par réaction).
- 1 µl d'amorce droite (10 à 100 pmoles par réaction).
- 1 µl de dNTP (stock à 10 mM).
- 5 µl de tampon de PCR (avec magnésium) concentré 10 fois.
- 1 unité de Taq polymérase (Boehringer Mannheim, stock à 5 U/µl).
- y µl d'H<sub>2</sub>O pour atteindre 50 µl.

#### *Programme d'une amplification typique*

25 cycles :    Dénaturation : 1 minute à 94°C  
                  Hybridation : 1 minute à x°C (la température dépend des amorces utilisées).  
                  Elongation : 3 minutes à 68°C.

1 cycle :        Elongation finale : 10 minutes à 68°C.

Toutes les amplifications ont été réalisées sur l'appareil PTC-100<sup>TM</sup> Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc.

### 3.3.4 Préparation d'ADN plasmidique

#### *Mini-prep*

- A l'aide d'un cure-dent stérile, piquer dans une colonie et inoculer 5 ml de milieu LB contenant l'antibiotique adéquat.
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Transvaser 1,5 ml de la solution bactérienne dans un Eppendorf. Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Eliminer le surnageant en retournant le tube.
- Répéter cette dernière opération deux fois.
- Resuspendre le culot dans 150 µl de tampon Tris 25 mM (pH = 8,0), glucose 50 mM, EDTA 10 mM + lysosyme 2 mg/ml (à préparer juste avant utilisation et à stocker à 4°C). Incuber pendant 5 minutes dans la glace.
- Ajouter 300 µl de NaOH 0.2 M + SDS 1 %. Vortexer et incuber 5 minutes dans la glace.



- Ajouter 150 µl d'acétate de potassium 3 M/acide acétique 1,8 M. Vortexer et incubé 5 minutes dans la glace.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 15 minutes à 4°C.
- Récolter le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf.
- Ajouter 400 µl de phénol-chloroforme (24:1). Vortexer pendant quelques secondes.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes à 4°C.
- Récolter la phase aqueuse supérieure dans un nouveau tube Eppendorf.
- Ajouter 1 ml d'éthanol 96 % (maintenu à -20°C) et incubé pendant 10 minutes à -70°C.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 15 minutes à 4°C.
- Enlever le surnageant en retournant délicatement le tube. Laver le culot avec 1 ml d'éthanol à 76 % (maintenu à -20°C).
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant en retournant délicatement le tube.
- Sécher le culot au speed-vac pendant 10 minutes.
- Resuspendre le culot dans 20 µl de tampon TE.
- Ajouter 1 µl de RNase (solution stock à 10 mg/ml) et incubé pendant 1 heure à 37°C.

Remarque : ne pas vortexer lors de l'isolement du plasmide pBI 121.

#### *Midi-prep*

- A l'aide d'un cure-dent stérile, piquer dans une colonie et inoculer 50 ml de milieu LB contenant l'antibiotique adéquat.
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Transvaser la solution bactérienne dans un Falcon de 50 ml. Centrifuger à 3000 rpm pendant 15 minutes.
- Resuspendre le culot dans 5 ml de tampon Tris 25 mM (pH 8,0), glucose 50 mM, EDTA 10 mM + lysozyme 2 mg/ml (à préparer juste avant utilisation et à stocker à 4°C). Incuber pendant 5 minutes dans la glace.
- Ajouter 10 ml de NaOH 0.2 M + SDS 1 %. Vortexer et incubé 10 minutes dans la glace.
- Ajouter 7,5 ml d'acétate de potassium 3 M/acide acétique 1,8 M. Vortexer et incubé 10 minutes dans la glace.
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 30 minutes à 4°C.
- Resuspendre le culot dans 2 ml d'H<sub>2</sub>O.
- Ajouter 2 ml de LiCl 5 M, Tris 50 mM (pH 8,0). Mélanger énergiquement et incubé 15 minutes dans la glace.
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 5 minutes à 4°C.
- Ajouter au surnageant un volume d'éthanol 96 % (maintenu à -20°C) et incubé pendant 10 minutes à -70°C.
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 15 minutes à 4°C.
- Resuspendre le culot dans 1 ml de tampon TE (pH 8,0).
- Ajouter 1 µl de RNase (solution stock à 10 mg/ml) et incubé pendant 1 heure à 37°C.



- Extraire 3 fois avec 1 volume de phénol-chloroforme (24 : 1) (récolter chaque fois la phase aqueuse, voir mini-prep).
- Ajouter 1/10 volume d'acétate de sodium 3 M (pH = 5,2) et 2,5 volumes d'éthanol 96 % (maintenu à -20°C) et laisser précipiter 10 minutes à -70°C.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 15 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant en retournant délicatement le tube. Laver le culot avec 1 ml d'éthanol à 76 % (maintenu à -20°C).
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant en retournant délicatement le tube.
- Sécher le culot au speed-vac pendant 10 minutes.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 50 à 250 µl de tampon TE (pH = 8,0).

### 3.3.5 Restriction de l'ADN

#### *Enzymes utilisées*

- Eco R1 (Gibco BRL, 10 U/ µl, à utiliser avec le tampon REact 3).
- Bam H1 (Gibco BRL, 10 U/ µl, à utiliser avec le tampon REact 2).
- Sma 1 (Gibco BRL, 10 U/ µl, à utiliser avec le tampon REact 4).
- Sst 1 (Gibco BRL, 10 U/ µl, à utiliser avec le tampon REact 3).
- Xba 1 (Gibco BRL, 10 U/ µl, à utiliser avec le tampon REact 2).
- Xho 1 (Gibco BRL, 10 U/ µl, à utiliser avec le tampon REact 2).

#### *Protocole-type*

Composition du milieu réactionnel (pour un volume de restriction de 20 µl) :

- x µl d'ADN à restreindre (dans de l'eau ou du tampon TE)
  - 2 µl de tampon de restriction (concentré 10 fois)
  - 1 unité d'enzyme de restriction par µg d'ADN
  - y µl d'eau distillée pour atteindre le volume final de 20 µl
- Incuber à 37°C pendant une heure.

### 3.3.6 Dosage d'ADN au spectrophotomètre

Le dosage de l'ADN au spectrophotomètre a été réalisé d'après Wilfinger *et al* (1997).

### 3.3.7 Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose

#### *Généralités*

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera donc inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer.







- Eluer l'ADN en ajoutant 30 µl d'eau (pH = 8,0) au centre de la colonne; laisser reposer une minute et centrifuger à 13000 rpm pendant une minute à température ambiante.

Remarque : la composition des tampons PN et PE n'est pas fournie avec le protocole du kit.

*Kit de purification " QIAEX II agarose gel extraction " (Qiagen)*

Le kit QIAEX II permet d'extraire des fragments d'ADN d'un gel d'agarose. L'agarose contenant l'ADN à extraire est dissous en présence de sels chaotropiques. L'ADN est adsorbé sur des particules de silice en présence de fortes concentrations en sels, lavé et élué en diminuant la force ionique.

Protocole

- Découper la bande à partir du gel d'agarose avec un scalpel propre et peser le morceau d'agarose excisé.
- Ajouter 3 volumes de tampon QX 1 à un volume de gel pour les fragments d'ADN de 100 pb à 4 kb. Pour les fragments d'ADN supérieurs à 4 kb (pour la purification du plasmide pBI 121), ajouter 6 volumes de tampon QX 1 et 2 volumes d'eau à un volume de gel .
- Resuspendre la résine QIAEX II en vortexant pendant 30 secondes.
- Ajouter 60 µl de résine QIAEX II et mélanger. Incuber à 50°C pendant 10 minutes. Mélanger toutes les 2 minutes pour garder la résine en suspension.
- Centrifuger l'échantillon pendant une minute et enlever le surnageant à la pipette.
- Laver le culot avec 500 µl de tampon QX 1. Resuspendre le culot en vortexant. Centrifuger l'échantillon à 13000 rpm pendant une minute et éliminer toute trace de surnageant avec une pipette.

Remarque : pour les fragments supérieurs à 4kb, ne pas utiliser le vortex pour resuspendre le culot.

- Laver le culot avec 2 fois 500 µl de tampon PE. Resuspendre le culot en vortexant. Centrifuger l'échantillon une minute à 13000 rpm et enlever toutes traces de surnageant au moyen d'une pipette.
- Sécher le culot pendant 10 à 15 minutes à l'air libre.
- Pour éluer l'ADN, ajouter 20 µl d'eau (pH = 8,0) et resuspendre le culot en vortexant.
- Incuber :
  - à température ambiante pendant 5 minutes pour les fragments inférieurs ou égaux à 4 kb.
  - à 50°C pendant 5 minutes pour les fragments de 4 à 10 kb.
  - à 50°C pendant 10 minutes pour les fragments supérieurs à 10 kb.
- Centrifuger pendant une minute à 13000 rpm. Récolter le surnageant dans un tube Eppendorf.

Remarque : la composition des tampons QX 1 et PE ne sont pas données dans le kit.



### 3.3.9 Réaction de ligation

*Protocole-type (kit pMOS, Amersham LIFE SCIENCE)*

- 1 µl de tampon de ligation (10 fois concentré).
  - 0.5 µl de DTT (stock à 100 mM).
  - 0.5 µl d'ATP (stock à 10 mM).
  - 1 µl de vecteur (50 ng).
  - x µl d'insert.
  - 0.5 µl de T4 DNA ligase (4 U/µl).
  - y µl d'eau distillée pour atteindre 10 µl.
- Mélanger délicatement et incuber à 16°C pendant une nuit.

Remarque : le rapport vecteur/insert utilisé le plus fréquemment était de 1/10.

La quantité d'insert à introduire dans la réaction de ligation est donnée par la formule suivante :

$$\frac{\text{taille de l'insert (pb)} \times \text{quantité de vecteur (ng)}}{\text{taille du vecteur (pb)}} \times \frac{10}{1} = \text{ng d'insert}$$

### 3.3.10 Transformation des bactéries et sélection

*Par choc thermique (kit "One Shot<sup>TM</sup> TOP 10 competent cells")*

Milieu SOC

2 % bactotryptone  
 0,5 % extraits de levure  
 NaCl 10 mM  
 KCl 2,5 mM  
 MgCl<sub>2</sub> 10 mM  
 MgSO<sub>4</sub> 10 mM  
 Glucose 20 mM

- Placer les cellules compétentes (conservées à -70°C) dans la glace.
- Lorsque les cellules sont dégelées, ajouter 2 µl de β-mercaptoéthanol et x µl du mélange de ligation. Mélanger délicatement au moyen d'une pipette et incuber les cellules pendant 30 minutes dans la glace.
- Incuber ensuite les cellules pendant 30 secondes dans un bain thermostaté à 42°C.
- Sortir les cellules du bain le plus rapidement possible et incuber celles-ci dans la glace pendant 2 minutes.
- Ajouter 450 µl de milieu SOC (maintenu à 37°C) et incuber les cellules à 37°C durant une heure.
- Étaler les bactéries (125 µl) sur le milieu sélectif adéquat.
- Incuber pendant une nuit à 37°C.



*Par électroporation*

## a) Protocole général pour l'obtention de cellules électrocompétentes

- Ensemencer 100 ml de milieu LB (plus l'antibiotique adéquat) avec la bactérie désirée et incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- Transvaser les 100 ml de LB ensemencés dans un erlenmeyer contenant 1 l de milieu LB et l'antibiotique adéquat. Incuber une nuit sous agitation à 37°C.
- Répartir la culture dans 4 " biberons " de centrifugation de 250 ml. Centrifuger à 4000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant et resuspendre les 4 culots de bactéries dans un volume total de 500 ml d'eau stérile maintenue à 4°C. Centrifuger comme ci-dessus et recommencer l'opération une fois.
- Resuspendre le culot dans 20 ml d'une solution stérile de glycérol 10 % maintenue à 4°C.
- Transvaser les bactéries dans un tube Falcon de 50 ml et centrifuger à 4000 rpm à 4°C pendant 15 minutes.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot de bactéries dans 3 ml de glycérol 10 % maintenues à 4°C.
- Aliquoter (100 µl/Eppendorf) les bactéries et les plonger dans l'azote liquide. Stocker les tubes à -70°C.

Remarque : les cultures d'*Agrobacterium tumefaciens* sont réalisées à une température d'incubation de 28°C.

## b) Protocole d'électroporation

- Introduire 2 µl (1 ng/µl) de matériel plasmidique dans un eppendorf contenant 100 µl de bactéries électrocompétentes et homogénéiser plusieurs fois à la pipette.
- Placer les bactéries dans une cuvette d'électroporation (Pulser™ Cuvette, 0,2 cm electrode gap, Bio-RAD) et les maintenir dans la glace pendant 5 minutes.
- Placer la cuvette entre les 2 électrodes d'un Gene Pulser (BIO-RAD) équipé d'un Pulse Controller et de capacités additionnelles.
- Electroporer les cellules dans les conditions suivantes : 25 µF, 2,5 kV et 400 ohms.
- Ajouter le plus rapidement possible 1 ml de milieu SOC maintenu à 37°C. Incuber les bactéries pendant 1 heure à 37°C.
- Etaler 250 µl du mélange de transformation à la dilution désirée sur le milieu de sélection adéquat.
- Incuber une nuit à 37°C.

Remarques : 1) le milieu SOC est maintenu à 28°C pour les électroporations d'*Agrobacterium tumefaciens*.

2) la sélection d'*Agrobacterium tumefaciens* est réalisée à 28°C après 3 jours de culture.



### *Sélection par le test " blanc-bleu "*

#### a) Principe

La sélection des recombinants (bactéries transformées par un plasmide porteur de l'insert d'intérêt) s'effectue à l'aide du test blanc-bleu qui se base sur la propriété de complémentation intragénique.

La souche TOP 10 utilisée dans ce mémoire, déficiente pour la  $\beta$ -galactosidase, possède un épisode F' porteur du gène codant pour la partie C-terminale inactive  $\alpha'$  de la  $\beta$ -galactosidase. Le plasmide pMOS que nous avons utilisé est porteur d'un fragment du gène lac Z' codant pour l'extrémité N-terminale inactive  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidase. Il est à noter que, par construction, le site multiple de clonage (MCS) du plasmide a été inséré en phase dans une région peu importante pour l'activité  $\beta$ -galactosidase, ce qui maintient la propriété de complémentation.

La complémentation intragénique consiste en l'assemblage des peptides  $\alpha$  et  $\alpha'$  inactifs, pour donner une  $\beta$ -galactosidase fonctionnelle. Lorsqu'un fragment d'ADN est inséré dans le MCS, l'ORF de la portion Z' est disruptée et le peptide  $\alpha$  ne peut plus former une  $\beta$ -galactosidase fonctionnelle en s'associant au peptide  $\alpha'$ . En présence d'IPTG et d'X-gal, les bactéries transformées par de tels vecteurs donnent naissance à des colonies blanches. Des bactéries transformées par des vecteurs refermés sur eux-mêmes ou contenant un petit insert donnent naissance à des colonies bleues.

#### b) Protocole

Les bactéries transformées sont étalées sur le milieu LBA (125  $\mu$ l/boîte) contenant l'antibiotique adéquat, 35  $\mu$ l d'IPTG (1mM) et 35  $\mu$ l d'X-gal (200 ng/ml).

### **3.3.11 Réaction de séquençage**

#### *Pré-amplification de l'insert à séquencer*

Cette étape permet d'amplifier spécifiquement le segment de plasmide dans lequel se trouve l'insert à séquencer. Cette amplification se fait grâce à deux amorces spécifiques du vecteur.

#### a) Réaction PCR de pré-séquençage

- 0,5  $\mu$ l d'ADN plasmidique (10  $\mu$ g/ $\mu$ l) .
- 1  $\mu$ l d'amorce droite (3.3 pmoles).
- 1  $\mu$ l d'amorce gauche (3.3 pmoles).
- 1  $\mu$ l de dNTP (stock à 10 mM).
- 5  $\mu$ l de tampon de PCR avec magnésium.
- 1 U de Taq polymérase.
- 40,5  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O.



Remarques :

- 1) Pour le séquençage d'inserts contenus dans le plasmide pMOS, les amorces FORWARD et REVERSE universelles ont été utilisées.
- 2) Pour le séquençage d'inserts contenus dans le plasmide pET, les amorces T<sub>7</sub> terminator et T<sub>7</sub> promotor ont été utilisées.

b) Amplification-type

- 1 cycle :        Dénaturation : 1 minute à 96°C.  
30 cycles :     Hybridation : 30 secondes à 96°C.  
                  Elongation : 15 secondes à 45°C.  
                  Elongation finale : 4 minutes à 60°C

Toutes les amplifications ont été réalisées sur l'appareil PTC-100™ Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc.

*Purification du produit d'amplification via le protocole du QIAquick Nucléotide Removal kit*

Cette étape permet d'éliminer les dNTP, les amorces, l'enzyme et les petits produits d'amplification. La purification de l'ADN à séquencer est indispensable pour garantir une bonne réaction de séquençage (cfr. point 3.3.8).

*Réaction de séquençage*

Mix PCR

- 6 µl d'ADN purifié à séquencer (purifié par le kit QIAquick).
- 1 µl d'amorce gauche ou droite (3.3 pmoles).
- 8 µl de mix de séquençage (Terminator Ready Reaction Mix, PE Applied Biosystems).
- 5 µl d'H<sub>2</sub>O.

Programme d'amplification

Cfr. point 3.3.11. Pré-amplification de l'insert à séquencer (b).

Purification de l'ADN à séquencer

- Ajouter aux 20 µl de la réaction PCR, 2 µl d'acétate de sodium 3 M et 50 µl d'éthanol 96 % (maintenu à -20°C).
- Mélanger avec une pipette et transvaser le mélange dans un tube Eppendorf. Vortexer et incuber dans la glace pendant 10 minutes.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 20 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant (culot invisible) en retournant délicatement les tubes Eppendorf.
- Ajouter 250 µl d'éthanol à 76 % (maintenu à -20°C).



- Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant en retournant délicatement les tubes Eppendorf.
- Sécher le culot au speed-vac pendant 5 minutes.

### Séquençage

Les échantillons ont été séquencés au moyen d'un séquenceur automatique ABIPRISM 337 ADN Sequencer de Perkin Elmer.

### Analyse des séquences

L'identification des séquences clonées a été réalisée par consultation d'une banque de séquences non redondantes, GenBank, au moyen de l'algorithme BLAST, accessible sur le réseau Internet à l'adresse :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast?Jform=0>

### 3.3.12 Transformation de la chicorée

- Prélever quelques jeunes feuilles de chicorée (variété Madona) et les stériliser dans une solution d'hypochlorite de calcium 3 % + Tween-80 0,1 % pendant 25 minutes.
- Rincer les feuilles deux fois dans de l'eau désionisée stérile pendant 2 fois 5 minutes.
- Découper des fragments de feuilles de 1 cm x 1 cm au niveau de la nervure centrale et placer ces explants foliaires dans une culture liquide d'*Agrobacterium tumefaciens* agée de 3 jours.
- Sécher les feuilles entre deux filtres stériles.
- Placer les explants foliaires sur les boîtes de Pétri contenant le milieu d'infection (la face la plus verte contre l'agar).

Milieu d'infection (pH=5,6) :

|         |           |  |
|---------|-----------|--|
| Sels MS | 4,708 g/l |  |
| NAA     | 0,2 mg/l  | (Stock à 2 g/l préparé dans du NaOH 1 M) |
| BAP     | 2 mg/l    | (Stock à 2 g/l préparé dans du NaOH 1 M) |
| Sucrose | 30 g/l    |  |
| Agar    | 1,2 %     |  |

Stérilisé par autoclavage (20 minutes à 120°C, 1 bar).

- 3 jours plus tard, transférer les morceaux de feuilles sur le milieu de régénération.

Milieu de régénération : Idem que pour le milieu d'infection

+

Carbenicilline 300 mg/l  
Kanamycine 100 mg/l



Les solutions d'antibiotiques sont stérilisées au moyen de filtres (Acrodisc, 0,2  $\mu\text{m}$ ) et ajoutées au milieu de culture juste avant de le couler en boîte de Pétri.



### 3.4 METHODES RELATIVES AUX PROTEINES

#### 3.4.1 Electrophorèse en gel SDS-PAGE (méthode de Laemmli)

##### *Gel de polyacrylamide*

Le gel de polyacrylamide résulte de la polymérisation de monomères d'acrylamide en longues chaînes pontées avec du méthylènebisacrylamide. La polymérisation est initiée par des catalyseurs produisant des radicaux libres, généralement le persulfate d'ammonium et le TEMED. Elle est inhibée en présence d'un excès d'oxygène. La réticulation du gel, qui dépend du pourcentage d'acrylamide et de bisacrylamide, influence la mobilité électrophorétique des protéines. Cette dernière diminue si la taille des pores diminue. La mobilité électrophorétique dépend également de la charge des protéines.

##### *SDS-PAGE*

En présence d'un excès de SDS (un détergent anionique) et d'un réducteur des ponts disulfures ( $\beta$ -mercaptoéthanol), les protéines se déroulent et perdent leur structure tridimensionnelle. De nombreuses molécules de SDS se fixent via leur queue hydrophobe aux protéines et les rendent toutes négatives, quelle que soit leur charge de départ. La mobilité électrophorétique des protéines dans le gel est alors directement proportionnelle au logarithme du PM des protéines.

##### *Préparation des échantillons pour l'électrophorèse*

Les protéines qui sont soumises à l'électrophorèse sont solubilisées dans un mélange de chargement 5 fois concentré :

250 mM Tris (pH = 6,8)  
 SDS 10 %  
 $\beta$ -Mercaptoéthanol 10 %  
 Glycérol 50 %  
 Bleu de Bromophénol 0,25 %

##### *Préparation des gels*

|                       | Gel de séparation 8 %<br>(composition pour 10 ml) | gel de séparation 15 %<br>(composition pour 10 ml) | gel d'empilement 5 %<br>(composition pour 5 ml) |
|-----------------------|---|--|---|
| H <sub>2</sub> O      | 4,6 ml  | 2,3 ml   | 3,4 ml  |
| 30 % acrylamide mix   | 2,7 ml  | 5,0 ml   | 0,83 ml   |
| 1,5 M Tris (pH = 8,8) | 2,5 ml  | 2,5 ml   | 0,63 ml   |
| 10 % SDS              | 0,1 ml  | 0,1 ml   | 0,05 ml   |
| 10 %APS               | 0,1 ml  | 0,1 ml   | 0,05 ml   |
| TEMED                 | 0,006 ml  | 0,004 ml   | 0,005 ml  |

Après avoir ajouté les 2 catalyseurs (APS et TEMED) aux mélanges acrylamide-bisacrylamide, le gel de séparation est coulé entre 2 plaques de verre séparées par des espaceurs de 0,75 mm d'épaisseur. Après 10 minutes de polymérisation, placer le



peigne et couler le gel d'empilement. Après la polymérisation du gel d'empilement, enlever le peigne et rincer les puits avec quelques ml de tampon d'électrophorèse.

### Migration

15 µl d'échantillon sont analysés par puits. L'électrophorèse est réalisée dans une cuve Mini-PROTEAN II (BIO-RAD) sous une tension de 150 V.

Tampon d'électrophorèse (pH = 8,3):      Tris 25 mM  
    Glycine 250 mM  
    SDS 0,1 %

### Marqueurs protéiques utilisés

| 1) Pharmacia Biotech : |          | 2) BIO-RAD :           |           |
|------------------------|----------|------------------------|-----------|
| Phosphorylase b        | 94,0 kDa | Myosine                | 203,0 kDa |
| Albumine bovine        | 64,0 kDa | β-galactosidase        | 116,0k Da |
| Ovalbumine             | 43,0 kDa | Albumine bovine        | 83,0 kDa  |
| Anhydrase carbonique   | 30,0 kDa | Ovalbumine             | 48,7 kDa  |
| Inhibiteur de trypsine | 20,1 kDa | Anhydrase carbonique   | 33,4 kDa  |
| α-Lactalbumine         | 14,4 kDa | Inhibiteur de trypsine | 28,2 kDa  |
|                        |          | Lysozyme               | 20,7 kDa  |
|                        |          | Aprotinine             | 7,6 kDa   |

### Détection des protéines

Après migration électrophorétique, le gel est retiré délicatement de son support de verre et plongé dans une solution de coloration à base de bleu de Coomassie.

#### Solution de coloration :

|                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| Bleu de Coomassie Brillant Blue R250 | 0,1 % |
| Méthanol                             | 40 %  |
| H <sub>2</sub> O                     | 50 %  |
| Acide acétique                       | 10 %  |

#### Solution de décoloration :

|                  |      |
|------------------|------|
| Méthanol         | 40 % |
| Acide acétique   | 10 % |
| H <sub>2</sub> O | 50 % |

#### Coloration au nitrate d'argent :

Faire passer successivement le gel SDS-PAGE dans les solutions suivantes :



- Fixateur 1 : méthanol 50 %  
acide acétique glacial 10 %  
pendant 30 minutes.
- Fixateur 2 : méthanol 5 %  
acide acétique glacial 7 %  
pendant 30 minutes.
- Fixateur 3 : glutaraldéhyde 10 %  
pendant 30 minutes.
- Eau distillée pendant 2 h 30 ( en changeant l'eau toutes les 30 minutes).
- Réduction : dithiothréitol 10 mg/l  
pendant 30 minutes.
- Nitrate d'argent 0,1 % pendant 30 minutes.
- Rincer à l'eau distillée quelques secondes.
- Développeur : carbonate de sodium 3 %  
formaldéhyde 50 µl/100 ml  
jusqu'à apparition des bandes sur le gel.
- Arrêt de la réaction de développement par de l'acide acétique 0,1 % (pendant 10 minutes).

### 3.4.2 Extraction des protéines d'*Aspergillus niger*

- Mettre en culture *Aspergillus niger* dans 1 l de milieu LB et incuber 2 jours à 28°C.
- Récupérer le mycélium à l'aide d'un buchner et d'un filtre Miracloth.
- Mettre le mycélium dans un berlin maintenu à 4°C.
- Ajouter 5 ml de tampon Tris 50 mM, glycérol 15 % et β-mercaptoéthanol 1 %.
- Homogénéiser à l'ultra-turax pendant 2 minutes.
- Centrifuger à 12000 rpm pendant 15 minutes à 4°C et récupérer le surnageant.
- Conserver le surnageant à -20°C.

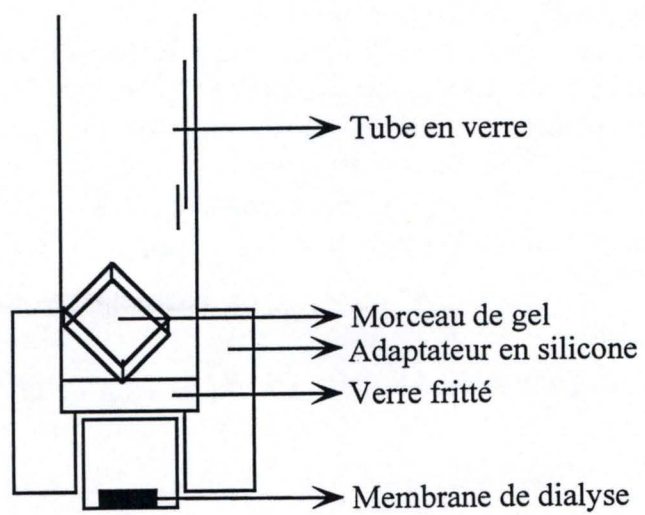
### 3.4.3 Induction et extraction des protéines surexprimées de *E. coli* BL21

#### *Induction en présence d'IPTG*

- ensemencer 50 ml de LB + 100 µg/ml d'ampicilline avec la souche BL21 transformée. Incuber à 37°C sous agitation.
- Après 3-4 heures de culture, mesurer la densité optique de la culture à 540 nm.







**Fig. 1 :** Assemblage des tubes d'électroélution



- Ajouter 5 volumes de tampon de chargement (1 fois concentré) et centrifuger à 4000 rpm pendant 2 minutes à 4°C.
- Enlever le surnageant et ajouter 3 volumes de tapon de liaison (1x). Mélanger pendant 5 minutes à 4°C.
- Centrifuger à 4000 rpm à 4°C pendant 2 minutes et enlever le surnageant.

#### *Purification de la fraction soluble en « batch » et digestion à la thrombine*

- A la résine, ajouter 3 volumes de tampon de liaison (1x) et les protéines à purifier.
- Incuber pendant une heure à 4°C sous agitation. Centrifuger à 4000 rpm pendant 2 minutes à 4°C et enlever le surnageant.
- Ajouter 10 volumes de tampon de chargement (1x) et centrifuger à 4000 rpm pendant 2 minutes à 4°C.
- Enlever le surnageant et laver 2 fois la résine avec 6 volumes de tampon de lavage (1x).
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 2 minutes à 4°C. Enlever le surnageant et laver 2 fois la résine avec 6 volumes de tampon d'élution (1x).
- Incuber pendant une heure à 4°C sous agitation.
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 2 minutes à 4°C et récupérer le surnageant.
- Aliquoter le surnageant dans des tubes Eppendorf (1,5 ml/Eppendorf) dont le capuchon a été préalablement troué. Refermer les tubes Eppendorf sur une membrane de dialyse (Medicell international LTD, 10000).
- Incuber une nuit dans du tampon thrombine à 4°C et sous agitation.

Tampon thrombine (1x) : 20 mM Tris-HCl , pH = 3,4  
 150 mM NaCl  
 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>

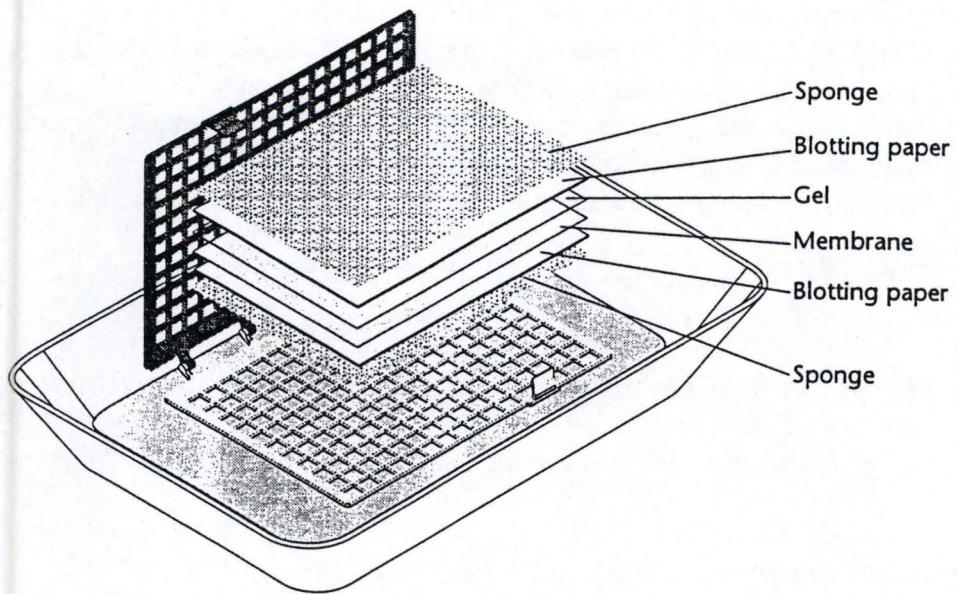
- Digérer les protéines dialysées avec x unités de thrombine (Novagen) pendant y heures à 37°C.
- Les protéines digérées sont ensuite analysées sur un gel SDS-PAGE.

#### **3.4.5 Elution des protéines à partir d'un gel SDS-PAGE**

L'extraction de protéines à partir de morceaux de gel de polyacrylamide a été réalisée au moyen de l'appareil Electro-Eluter modèle 422 (BIO-RAD). Cet appareil permet d'extraire entre 70 et 100 % du matériel de départ dans un volume de 200 µl de tampon d'électrophorèse.

- Chauffer les membranes à dialyse à 60°C dans du tampon d'élution (tampon d'électrophorèse SDS-PAGE, voir point 3.4.1 Migration) pendant au moins une heure avant l'utilisation. Fixer les membranes aux adaptateurs de silicone (voir figure 1).
- Prendre un nombre approprié de tubes en verre et y placer un verre fritté au fond de chaque tube (voir figure 1).
- Placer un adaptateur à l'extrémité de chaque tube après l'avoir préalablement rempli de tampon pour enlever les bulles d'air autour de la membrane de dialyse. Remplir les tubes de morceaux de gel (voir figure 1).





**Fig. 2 :** Assemblage d'une cassette de transfert



- Placer les tubes sur le support prévu à cet effet et mettre celui-ci dans la cuve d'électroélution.
- Remplir la cuve d'électroélution avec du tampon d'électrophorèse. Veiller à enlever les bulles collées à la membrane de dialyse.
- L'électroélution des protéines est réalisée sous agitation à 10 mA par tube de verre.
- Arrêter l'élution quand les morceaux de gel ne contiennent plus de bleu de Coomassie.

#### **3.4.6 Immunisation des lapins (hybride New-Zelands californian, IFFA crédo)**

- Mélanger 500 µl de protéines éluées et 500 µl d'adjuvant QuilA (Spikoside, Isotec product).
- Injecter l'entièreté du mélange et effectuer les rappels toutes les deux semaines.

#### **3.4.7 Transfert de protéines d'un gel SDS-PAGE sur membrane de nitrocellulose**

##### *Protocole*

- Séparer le gel d'empilement du gel de migration. Equilibrer le gel de migration dans le tampon de transfert (25mM Tris, 192 mM glycine, 20 % de méthanol) pendant 10 minutes.
- Découper les papier buvards et la membrane de nitrocellulose (Hybond™-C extra, Amersham) à la dimension du gel de migration.
- Humidifier la membrane de nitrocellulose avec de l'eau distillée, puis tremper celle-ci dans le tampon de transfert pendant 5 minutes.
- Assembler la cassette de transfert dans le tampon de transfert en évitant les bulles d'air (voir figure 2).
- Remplir la cuve (Hoefer TE 50X) avec du tampon de transfert jusqu'au niveau des électrodes et placer la cassette de transfert. Réajuster le niveau de tampon si nécessaire.
- Placer un barreau magnétique dans le fond de la cuve et connecter celle-ci à un bain thermostaté à une température de 15°C.
- Connecter la source de courant à la cuve de transfert (1.0 A et 100 V).
- Après 3 heures de transfert sous agitation, retirer la cassette de la cuve.
- Placer le gel dans du bleu de Coomassie pour vérifier l'efficacité du transfert.
- Visualiser les protéines transférées au ponceau S ou à l'encre de chine.

##### *Visualisation des protéines transférées*

###### a) Coloration à l'encre de chine

L'encre de chine permet de visualiser les protéines transférées sous la forme de bandes noires sur un fond gris. La coloration de la membrane de nitrocellulose à l'encre de chine est irréversible.

### Solutions et tampons utilisés

Tampon PBS (PH = 7,4): 8 g/l de NaCl  
0,2 g/l de KCl  
1,44 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,24 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Solution Tween-20 (pH = 7.4) : 0.3 % Tween-20 dans PBS

### Protocole

- Incuber la membrane de nitrocellulose 5 minutes dans une solution de KOH 1 % sous agitation.
- Rincer deux fois la membrane de nitrocellulose pendant 15 minutes avec le tampon PBS sous agitation.
- Laver la membrane de nitrocellulose 3 fois pendant 30 minutes à 37°C avec la solution Tween-20 sous agitation.
- Laver la membrane 2 fois pendant 30 minutes à température ambiante avec la solution Tween-20 et sous agitation.
- Incuber la membrane de nitrocellulose avec la solution d'encre de chine 0.1% (Pelikan 17 black) pendant une nuit sous agitation.
- Rincer brièvement la membrane de nitrocellulose deux fois à température ambiante avec la solution Tween-20.
- Décolorer la membrane à température ambiante avec la solution Tween-20.
- Sécher la membrane de nitrocellulose et la conserver à 4°C.

### b) Coloration au Ponceau S

Le rouge Ponceau permet de visualiser les protéines transférées sous la forme de bandes rouges. Cette coloration étant non permanente, la membrane peut ensuite être utilisée dans un western blot.

Solution Ponceau S : acide acétique 5 %  
Ponceau S 0,1 %

### Protocole :

- Incuber la membrane de nitrocellulose 30 minutes dans la solution Ponceau S.
- Décolorer partiellement la membrane dans de l'eau distillée.
- Repérer l'emplacement des marqueurs de taille.
- Décolorer complètement la membrane avec de l'eau distillée.



### 3.4.8 Epuisement d'un polysérum :

L'épuisement du polysérum est réalisé pour éliminer d'éventuels anticorps anti-*E. coli* que le lapin aurait produit naturellement et qui risqueraient de perturber la réalisation des dot-blots et des western-blots.

- Ensemencer 1 l de milieu LB avec une souche BL21 (+ 5 ml d'ampicilline 60 µg/ml) contenant le plasmide pET sans insert. Incuber à 37°C pendant 3-4 heures sous agitation.
- Lorsque la densité optique à 540 nm est de 0,6 nm, ajouter de l'IPTG à une concentration finale de 1 mM. Incuber à 37°C pendant 3-4 heures sous agitation.
- Récolter stérilement les bactéries par centrifugation à 4000 rpm pendant 5 minutes et à 4°C.
- Reprendre le culot de bactéries par 20 ml de tampon TBS (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 3 g/l Tris, pH = 7,4).
- Ajouter du lysozyme à une concentration finale de 20 µg/ml et laisser reposer pendant 5 minutes.
- Homogénéiser la suspension bactérienne pendant 5 fois 30 secondes à l'ultra-turax.
- Centrifuger les bactéries à 12000 rpm pendant 30 minutes à 4°C.
- Récupérer le surnageant dans un berlin et ajouter x ml de polysérum de lapin (dilution finale 500 fois).
- Conserver le mélange à -20°C.

### 3.4.9 Dot-blot et western-blot

#### *Dot-blot*

La technique du dot-blot est utilisée pour vérifier rapidement la production d'anticorps par les lapins. Pratiquement, les protéines sont « déposées » directement sur une membrane de nitrocellulose et incubées en présence du polysérum à tester.

#### a) Solutions et tampons utilisés

TBS : 8 g/l NaCl  
0.2 g/l KCl  
3 g/l Tris

Solution de révélation (à préparer avant utilisation) :

- 1) 10 ml de méthanol  
60 mg d'HRP  
50 ml de TBS  
30 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 2) 0,1 mg de DAB/200 ml  
20 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/200 ml

## b) Protocole

- Humidifier la membrane avec le tampon TBS.
- Placer la membrane de nitrocellulose dans l'appareil Bio-blot (BIO-RAD).
- Déposer 5 µl de l'extrait bactérien à analyser.
- Saturer la membrane dans la solution de saturation Tween-20 0.1 % (une nuit à 4°C).
- Rincer brièvement la membrane dans le tampon PBS.
- Incuber la membrane pendant 1 heure à température ambiante avec le polysérum épuisé.
- Laver la membrane trois fois avec le tampon PBS à température ambiante.
- Incuber la membrane pendant 1 heure, à température ambiante, dans une solution d'anticorps secondaires couplés à une peroxydase diluée 500 fois (Amersham) dans le tampon PBS.
- Laver la membrane trois fois dans le tampon PBS à température ambiante.
- Révéler la membrane avec une des deux solutions de révélation.

*Western-blot*

- Transférer les protéines du gel sur la membrane de nitrocellulose (point 3.4.7).
- Saturer la membrane pendant une nuit, à 4°C, avec la solution de saturation Tween-20 0.1 %.
- Rincer la membrane dans le tampon PBS.
- Incuber la membrane, à température ambiante, pendant 1 heure dans le polysérum épuisé.
- Laver la membrane trois fois dans le tampon PBS à température ambiante.
- Incuber la membrane pendant 1 heure dans une solution d'anticorps secondaires couplés à une peroxydase diluée 500 fois dans le tampon PBS à température ambiante.
- Laver la membrane trois fois dans le tampon PBS à température ambiante.
- Révéler la membrane avec une des deux solutions de révélation.

**3.4.10 Dosage de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par spectrofluorométrie**

La production de peroxyde d'hydrogène par les bactéries transformées a été mesurée en présence de pyranine (acide 8-hydroxypyrrène-1,3,6-trisulfonique ; Molecular Probes, Eugene, Oregon, OSA). Le peroxyde d'hydrogène a été dosé par spectrofluorométrie (excitation : 405 nm ; émission : 512 nm) en mesurant la diminution de la fluorescence (« quenching ») émise par la sonde comme décrit par Legendre *et al* (1993).



## **RESULTATS**



## 4 RESULTATS

### 4.1 BREF RAPPEL

Les études de la réponse hypersensible induite par un pathogène ont montré que l'inoculation de la plante avec des espèces pathogènes conduit rapidement à la mort des cellules végétales infectées. L'utilisation de suspensions cellulaires, en plus des plantes entières, a permis l'identification des réponses végétales précoces, lesquelles précèdent la réponse hypersensible. Une de ces réponses précoces est la production, rapide et transitoire, de molécules à oxygène actif ( $O_2^{\cdot\cdot}$ ,  $H_2O_2$ , et  $OH^{\cdot}$ ) quelques minutes après l'addition d'un pathogène. Ces dérivés actifs de l'oxygène sont des intermédiaires indispensables à l'induction de la mort cellulaire programmée.

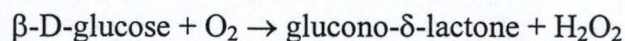
L'objet de ce mémoire est une étude sur la possibilité de produire de manière préventive du peroxyde d'hydrogène dans la paroi cellulaire dans le but de ralentir ou de stopper une infection bactérienne par *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. L'induction de la production d'eau oxygénée dans la paroi sera obtenue en transformant la chicorée avec la glucose oxydase d'*Aspergillus niger*.

Dans un second temps, nous produirons des sondes immunologiques anti-glucose oxydase. Celles-ci permettront de localiser la glucose oxydase, au sein de la plante transgénique.

### 4.2 CLONAGE DE LA GLUCOSE OXYDASE D'*ASPERGILLUS NIGER*

#### 4.2.1 La glucose oxydase d'*Aspergillus niger*

La glucose oxydase ( $\beta$ -D-glucose : oxygène 1-oxydoréductase) catalyse l'oxydation du  $\beta$ -D-glucose en glucono- $\delta$ -lactone et la réduction simultanée de l'oxygène moléculaire en peroxyde d'hydrogène :

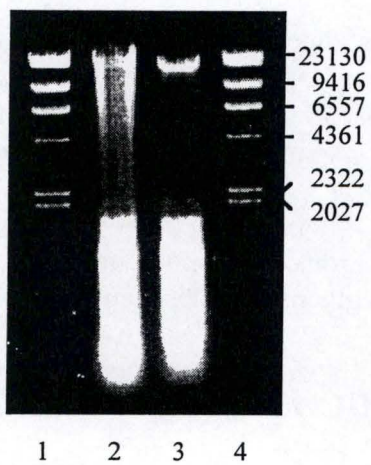


La glucose oxydase n'a pas été détectée ni chez les animaux, ni chez les végétaux (Wu *et al*, 1995).

L'activité de l'enzyme fut rapportée pour la première fois par Muller (1928) dans des extraits d'*Aspergillus niger*, et, par la suite, l'enzyme a été purifiée à partir d'*Aspergillus* (par Pazur et Kleppe en 1964 et par Swoboda et Massey en 1965) et d'espèces de *Penicillium* (par Kusai et ses collaborateurs en 1960). L'enzyme fongique native est un dimère constitué de deux sous-unités identiques, d'un poids moléculaire de 150000 daltons et contenant deux cofacteurs FAD étroitement liés. Ce dimère migre, sur un gel SDS-PAGE 8 %, comme une protéine d'une masse moléculaire apparente de 75 à 80 kDa.

Le mécanisme d'action de l'enzyme a été analysé en détail dès 1964. La glucose oxydase a aussi été utilisée comme base des senseurs glucose, dans les kits de détection du





**Fig.1** : Analyse de l'ADN d'*Aspergillus niger* par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %

Pistes 1 et 4 : Etalon de poids moléculaire  $\lambda$  DNA / Hind III (pb)

Pistes 2 et 3 : Echantillons d'ADN d'*Aspergillus niger*

glucose et comme une source de peroxyde d'hydrogène dans la préservation de la nourriture (Frederick *et al*, 1990).

Le gène de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* a été cloné à partir d'une banque génomique et d'une banque de cDNA en utilisant des sondes oligonucléotidiques dérivées de séquences d'acides aminés de fragments peptidiques de l'enzyme. Un total de 2821 pb du gène de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* a été séquencé y compris 485 pb non transcrites à l'extrémité 5' et 517 pb non transcrites à l'extrémité 3'. Une sous-unité de glucose oxydase fait par conséquent 1819 pb (Frederick *et al*, 1990).

Pour déterminer s'il y a des gènes multiples de glucose oxydase, l'entièreté du cDNA a été utilisée pour sonder l'ADN d'*Aspergillus niger*. Les résultats ont montré que la glucose oxydase est plus que probablement encodée par un gène unique.

La protéine montre 26 % d'homologie avec l'alcool oxydase d'*Hansenula polymorpha*, et l'extrémité N-terminale a une séquence homologue à la région liant l'AMP chez d'autres flavoenzymes telles que la p-hydrobenzoate hydroxylase et la glutathione réductase (Frederick *et al*, 1990).

La méthionine indique une phase ouverte de lecture (ou ORF) de 605 acides aminés, encodant une protéine potentielle d'un poids moléculaire de 65700 daltons. La protéine possède un peptide signal de 22 acides aminés similaire à celui de la glucose amylase d'*Aspergillus niger*. La protéine mature de 583 acides aminés contient 3 résidus cystéine et 8 sites consensus de N-glycosylation. Au moins deux des huit sites potentiels sont utilisés au sein d'*Aspergillus niger*. De ces sites, cinq contiennent la séquence Asn-X-Thr et trois la séquence Asn-X-Ser (Frederick *et al*, 1990).

#### 4.2.2 Isolement du gène de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger*

##### *Purification de l'ADN d'Aspergillus niger*

Une boîte de Pétri, contenant du milieu LB agar, a étéensemencée par quelques spores d'*A. niger* et incubée à 28°C pendant deux jours. A partir de cette culture, 100 ml de milieu LB ont été, à leur tour, ensemencés et incubés à 28°C pendant trois jours. Cette culture liquide nous a permis d'isoler *Aspergillus niger*.

Une fois le champignon récolté, nous avons procédé à l'isolement de son ADN. L'intégrité de l'ADN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % (figure 1).

##### *Amplification du gène de la glucose oxydase avec des amorces de la littérature*

Wu et ses collaborateurs ont montré que l'expression d'un gène de glucose oxydase confère une résistance aux bactéries aussi bien qu'aux pathogènes fongiques dans des pommes de terre transgéniques. Les amorces PCR utilisées par ces auteurs sont reprises à la page suivante :



```

ccatcatgca gactctcctt gtgagctcgc ttgtggtctc cctcgtgcg gccctgccac
actacatcag gagcaatggc attgaagcca gcctcctgac tgateccaag gatgtctccg
gccgcacggg cgactacatc atcgctgggt gaggtctgac tggactcacc accgctgctc
gtctgacgga gaacccaac atcagtgtgc tcgtcatcga aagtggctcc tacgagtcgg
acagaggtcc tatcattgag gacctgaacg cctacggcga catctttggc agcagtgtag
accacgccta cgagaccgtg gagctcgcta ccaacaatca aaccgcgctg atccgctccg
gaaatggtct cgggtggctct actctagtga atggtggcac ctggactcgc cccacaag
cacaggttga ctcttgggag actgtctttg gaaatgaggg ctggaactgg gacaatgtgg
ccgcctactc cctccaggct gagcgtgctc gcgcaccaa tgccaaacag atcgtgctg
gccactactt caacgcatcc tgccatgggt ttaatggtac tgtccatgcc ggaccccgcg
acaccggcga tgactattct cccatcgtca aggtctcat gagcgtgctc gaagaccggg
gcgttcccac caagaaagac ttcggatgcg gtgacccca tgggtgtgctc atgttcccca
acaccttgca cgaagaccaa gtgcgctccg atgccgctcg cgaatggcta cttcccaact
accaacgtcc caacctgcaa gtcctgaccg gacagtatgt tggtaagggt ctccttagcc
agaacggcac caccctcgt gccgttggcg tggaaatcgg caccacaag ggcaacaccc
acaacgttta cgtaagcac gaggtcctcc tggccgctgg ctcgctgtc tctcccacia
tctctgaata ttccggtatc ggaatgaagt ccatcctgga gcccttggg atcgacaccg
tcgttgacct gcccgctcggc ttgaacctgc aggaccagac caccgctacc gtccgctccc
gcatcacctc tgctgggtgca ggacagggac aggcgcttg gttcgccacc ttcaacgaga
cctttggtga ctattccgaa aaggcacacg agctgctcaa caccaagctg gagcagtggg
ccgaagaggc cgtcgcccgt ggcggattcc acaacaccac cgccttgctc atccagtagc
agaactaccg cgactggatt gtcaaccaca acgtcgcgta ctcggaactc ttctctgaca
ctgcgggagt agccagcttc gatgtgtggg accttctgcc cttcacccga ggatacgttc
acatcctcga caaggacccc taccttcacc acttcgcta cgaccctcag tacttctca
acgagctgga cctgctcggg caggctgccg ctactcaact ggcccgaac atctccaact
ccggtgccat gcagacctac ttcgctgggg agactatccc cggtgataac ctgcggtatg
atgccgattt gagcgcctgg actgagtaca tcccgtacca cttccgtcct aactaccatg
gcgtgggtac ttgctccatg atgccgaagg agatgggctg tgttgttgat aatgctgccc
gtgtgtatgg tgtgcaggga ctgcgtgtca ttgatggttc tattcctcct acgcaaatgt
cgtcccattg catgacgggt ttctatgcca tggcgctaaa aatttcggat gctatcttgg
aagattatgc ttccatgcag tga

```

Fig. 2 : Séquence nucléotidique du gène de la glucose oxydase d' *Aspergillus niger*

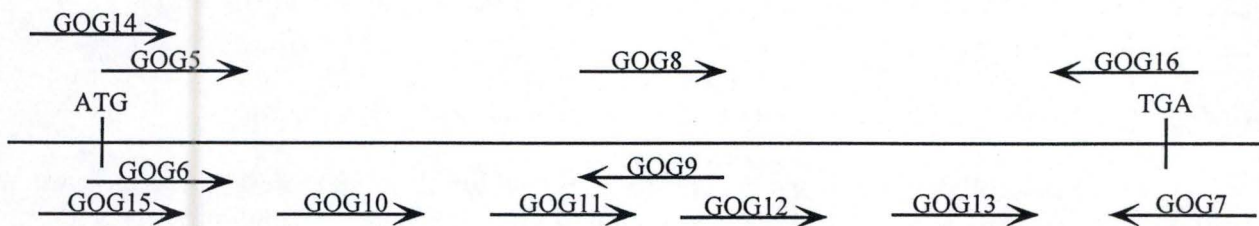


Fig. 3 : Représentation schématique de la disposition des nouvelles amorces spécifiques de la glucose oxydase



GOG1 : 5' -CCA-TCT-AGA-AGA-TCT-ATC-ATG-CAG-ACT-CTC-CTT- 3' (restriction Xba 1)  
 GOG2 : 5' -TGG-GGT-ACC-GGA-TCC-TTA-TCA-CTG-CAT-CGA-AGC-ATA- 3'  
 (restriction Kpn 1 et BamH 1)  
 GOG3 : 5' -CCA-TCT-AGA-AGA-CCC-ATC-ATG-CAG-ACT-CTC-CTT- 3' (restriction Xba 1)  
 GOG4 : 5' -TGG-GGT-ACC-GGA-TCC-CAC-TCA-CTG-CAT-GGA-AGC-ATA- 3'  
 (restriction Kpn 1 et BamH 1)

Nous avons utilisé ces mêmes amorces pour amplifier le gène de la glucose oxydase d'*A. niger*. Ces amorces n'ont pas permis d'amplifier le gène de la glucose oxydase.

#### *Définition de nouvelles amorces*

Les amorces décrites dans la littérature n'ayant pas fonctionné, nous avons dû en définir d'autres. Les nouvelles amorces ont été définies au départ de la séquence de la glucose oxydase se trouvant dans les banques de données (figure 2). La définition de nouvelles amorces a tenu compte de deux paramètres :

- 1) comme nous voulions amplifier le gène complet de la glucose oxydase, les amorces devaient impérativement recouvrir l'ATG et le stop (au minimum).
- 2) nous voulions aussi que certaines de ces amorces possèdent un site de restriction utilisable pour les clonages ultérieurs et compatible avec le vecteur intégratif pBI121 que nous allons utiliser pour la transformation de la chicorée.

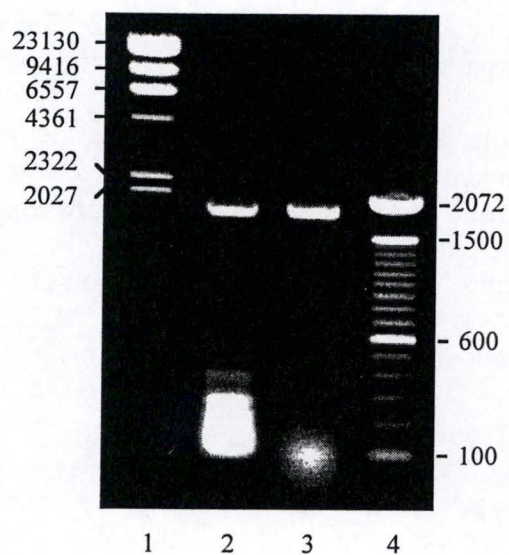
Douze nouvelles amorces ont été définies pour faciliter le clonage et le séquençage ultérieur du gène (figure 3) :

GOG5 : 5' -GG-TCT-AGA-CCC-ATC-ATG-CAG-ACT-CTC-CTT- 3' (restriction Xba 1)  
 GOG6 : 5' -GG-TCT-AGA-CAT-CTG-CCC-ATC-ATG-CAG-ACT- 3' (restriction Xba 1)  
 GOG7 : 5' -GG-GAG-CTC-CCC-ATC-ATA-CCA-CTC-ACT-GCA- 3' (restriction Sst 1)  
 GOG8 : 5' -GCC-GTT-GGC-GTG-GAA-TTC- 3'  
 GOG9 : 5' -CCG-AAT-TCC-ACG-CCA-ACG- 3'  
 GOG10 : 5' -GAG-CGT-GCT-CGC-GCA-CCA-A- 3'  
 GOG11 : 5' -GAC-TAT-TCT-CCC-ATC-GTC- 3'  
 GOG12 : 5' -CAG-TAT-GTT-GGT-AAG-GTG-C- 3'  
 GOG13 : 5' -AGA-ACT-ACC-GCG-ACT-GGA- 3'  
 GOG14 : 5' -CCC-ATC-ATG-CAG-ACT-CTC-CTT- 3'  
 GOG15 : 5' -CAT-CTG-CCC-ATC-ATG-CAG-ACT- 3'  
 GOG16 : 5' -CCC-ATC-ATA-CCA-CTC-ACT-GCA- 3'

#### *Amplification du gène de la glucose oxydase avec les nouvelles amorces*

Le gène de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* a été amplifié avec les amorces GOG5-GOG7 et GOG14-GOG16. Le protocole de PCR utilisé a été le suivant :





**Fig. 4 :** Amplification de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger*  
 Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %

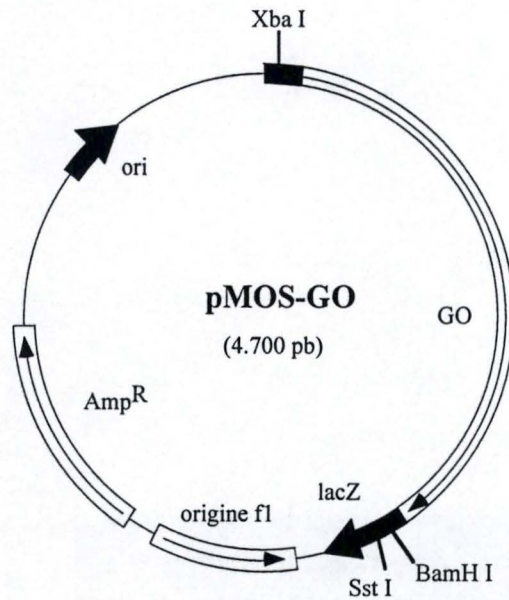
Piste 1 : Etalon de poids moléculaire  $\lambda$  DNA/Hind III (pb)

Piste 2 : Echantillon d'ADN amplifié avec les amorces GOG5 et GOG7

Piste 3 : Echantillon d'ADN amplifié avec les amorces GOG14 et GOG16

Piste 4 : Etalon de poids moléculaire 100 pb DNA ladder

a)



b)

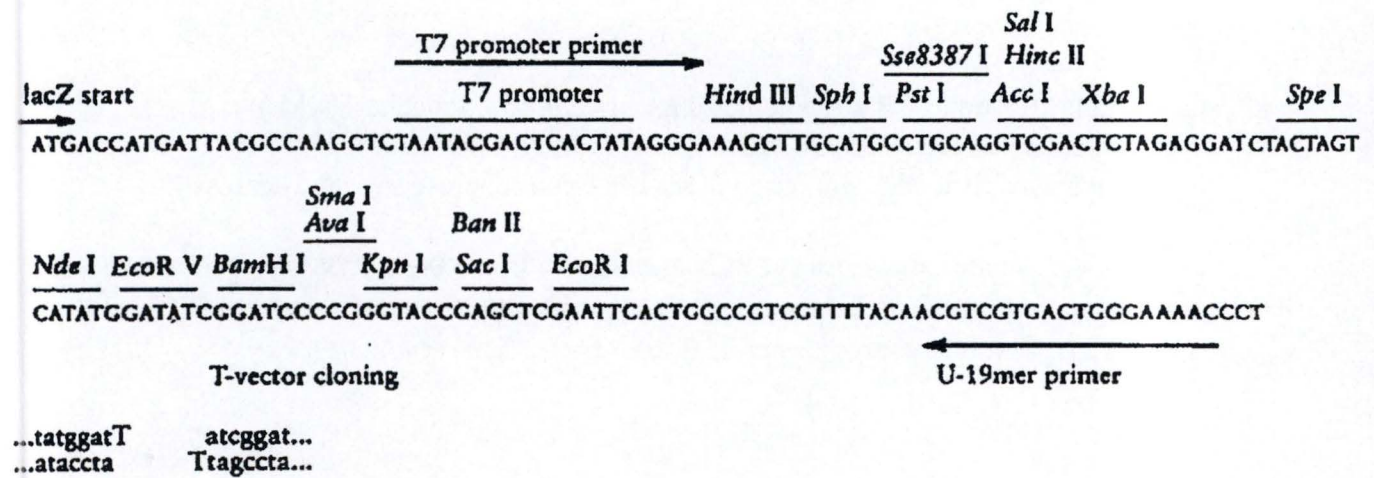
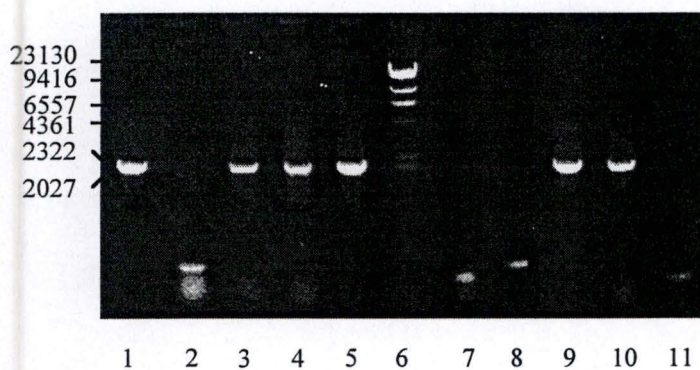


Fig. 5 : Représentation schématique du plasmide pMOS-GO

a) Schéma général du plasmide

b) Localisation du promoteur lacZ et du site de clonage de la glucose oxydase





**Fig. 6 :** Amplification PCR sur colonies d'*Escherichia coli* (souche TOP 10) transformé avec le vecteur pMOS-GO  
 Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %

Pistes 1 à 5 : Colonies analysées par PCR avec les amorces FOR et REV

Piste 6 : Etalon de poids moléculaire  $\lambda$  DNA/Hind III (pb)

Pistes 7 à 11 : Colonies analysées par PCR avec les amorces FOR et REV



| Cycle             | Température | Temps      |
|-------------------|-------------|------------|
| Dénaturation      | 94°C        | 1 minute   |
| Hybridation       | 58°C        | 1 minute   |
| Elongation        | 68°C        | 1 minute   |
| Elongation finale | 68°C        | 10 minutes |

← 25 cycles

Le produit de cette PCR a été analysé sur un gel d'agarose 2 %. L'amplification montre une bande d'ADN d'un peu moins de 2000 paires de bases (pb), ce qui correspond à la taille attendue du gène de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* qui fait 1819 pb (figure 4).

Une seconde PCR, identique à la première, a été réalisée sur les échantillons obtenus précédemment afin d'avoir suffisamment d'ADN de glucose oxydase pour nos prochaines manipulations. Les échantillons ayant subi cette dernière PCR ont été purifiés à l'aide du kit QIAquick et dosés au spectrophotomètre.

#### *Clonage du gène de la glucose oxydase dans le vecteur pMOS et transformation d'E. coli*

Le gène de la glucose oxydase a été cloné dans le vecteur pMOS linéarisé de ± 2900 pb (figure 5) en suivant le protocole du kit : 1 ng de plasmide et 7,5 ng d'insert ont été utilisés. Le mélange de ligation a été incubé à 16°C pendant deux heures.

Un microlitre du mélange de ligation a été utilisé pour transformer *E. coli* (souche TOP 10) par le produit pMOS-GO. Les bactéries transformées ont été étalées sur un milieu LB agar + ampicilline (60 µg/ml) + X-gal (200 ng/ml) + IPTG (1 mM) incubé à 37°C pendant une nuit. La sélection des bactéries recombinantes a été réalisée grâce au test blanc-bleu (ou test LacZ). Une deuxième sélection, semblable à la précédente, a été effectuée sur les clones retenus afin d'éliminer les révertants éventuels.

#### *Analyse des bactéries recombinantes*

##### a) Vérification par PCR

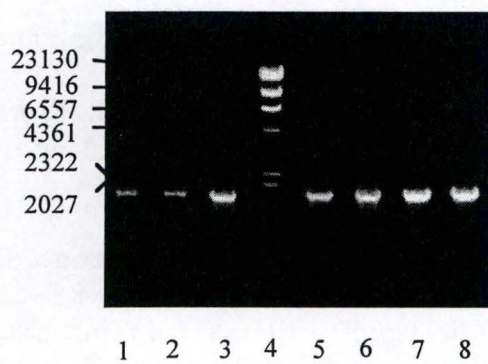
Les colonies blanches provenant de la deuxième sélection du test blanc-bleu ont été amplifiées avec les amorces FOR (5' GTAAAACGACGGCCAGT 3') et REV (5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'), spécifiques du vecteur. Cette PCR permet de réaliser une sélection des inserts ayant une taille correspondant à celle de la glucose oxydase. Le protocole de cette PCR est repris ci-dessous :

| Cycle                 | Température | Temps       |
|-----------------------|-------------|-------------|
| Dénaturation initiale | 96°C        | 1 minute    |
| Dénaturation          | 96°C        | 30 secondes |
| Hybridation           | 45°C        | 15 secondes |
| Elongation            | 60°C        | 4 minutes   |

← 30 cycles

Les produits d'amplification ont été visualisés sur un gel d'agarose 2 % (figure 6). On peut y voir une bande légèrement inférieure à 2000 pb et pouvant correspondre au gène de la glucose oxydase. Seules les bactéries présentant ce profil de PCR ont été retenues pour la suite de nos manipulations. Ces colonies retenues ont subi une deuxième PCR utilisant, cette fois, les





**Fig. 7 :** Amplification PCR sur colonies d'*Escherichia coli* (souche TOP 10) transformé avec le vecteur pMOS-GO

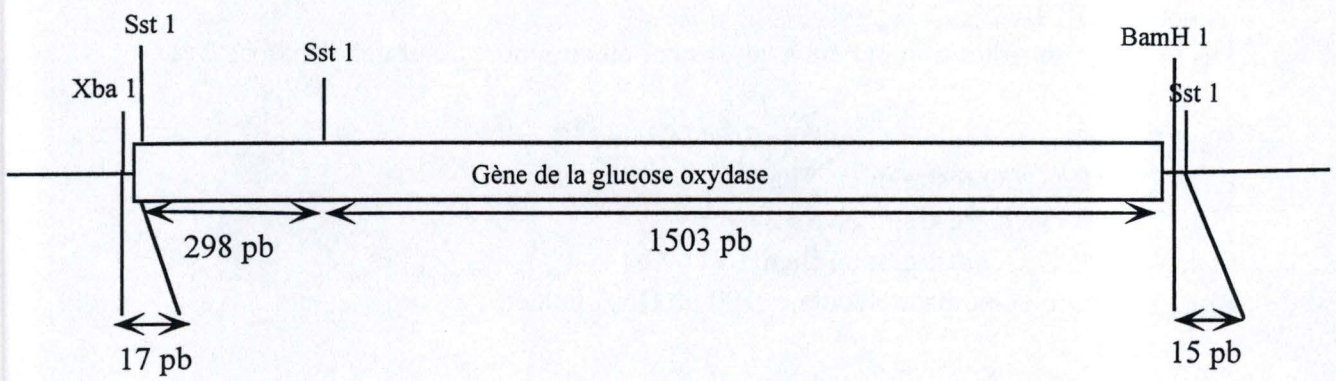
Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %

Piste 1 : Colonie analysée par PCR avec les amorces GOG5 et GOG7

Pistes 2 et 3 : Colonies analysées par PCR avec les amorces GOG14 et GOG16

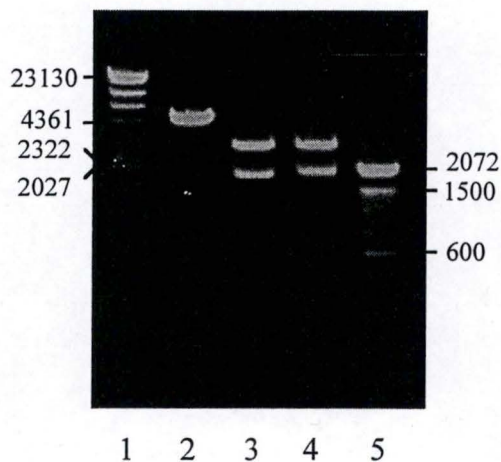
Piste 4 : Etalon de poids moléculaire  $\lambda$  DNA/Hind III (pb)

Pistes 5 à 8 : Colonies analysées par PCR avec les amorces GOG14 et GOG16



**Fig. 8 :** Représentation schématique d'une portion plasmide pMOS-GO





**Fig. 9 :** Restriction diagnostique du plasmide pMOS-GO isolé à partir d'*Escherichia coli* (souche TOP10)

Les produits de restriction ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %

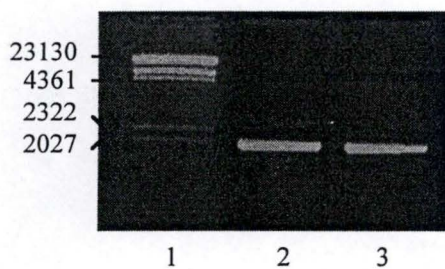
Piste 1 : Etalon de poids moléculaire  $\lambda$  DNA/Hind III (pb)

Piste 2 : pMOS-GO restreint en Xba 1

Piste 3 : pMOS-GO restreint en Sst 1

Piste 4 : pMOS-GO restreint en BamH 1 et Xba 1

Piste 5 : Etalon de poids moléculaire 100 pb DNA ladder



**Fig. 10 :** Amplification de l'ADN plasmidique pMOS-GO à partir d'*Escherichia coli* (souche TOP 10)

Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %

Piste 1 : Etalon de poids moléculaire  $\lambda$  DNA/Hind III (pb)

Pistes 2 et 3 : Echantillons d'ADN amplifiés avec les amorces FOR et REV

paires d'amorces spécifiques de la glucose oxydase (GOG5-GOG7 et GOG14-GOG16). Le protocole de PCR utilisé est repris ci-dessous :

| Cycle             | Température | Temps      |
|-------------------|-------------|------------|
| Dénaturation      | 94°C        | 1 minute   |
| Hybridation       | 58°C        | 1 minute   |
| Elongation        | 68°C        | 1 minute   |
| Elongation finale | 68°C        | 10 minutes |

25 cycles

Les produits d'amplification ont été visualisés sur un gel d'agarose 2 % (figure 7). Nous avons pu constater que toutes les colonies sélectionnées, sauf une, correspondaient au résultat attendu, à savoir l'amplification d'un fragment d'ADN de taille légèrement inférieure à 2000 pb.

b) Vérification par restriction diagnostique du plasmide pMOS

Une culture liquide de chacune des colonies a été initiée (milieu LB + 60 µg/ml d'ampicilline) et incubée à 37°C pendant une nuit. Dix millilitres de chaque culture ont servi à l'isolement de l'ADN plasmidique par mini-prep. L'équivalent de 10 ng d'ADN plasmidique a, ensuite, été restreint avec les enzymes de restriction suivantes :

- Xba 1 : le gène de la glucose oxydase ne contenant pas de site Xba 1 (figure 8), cette restriction ne doit donner, sur gel d'agarose, qu'une seule bande correspondant à une taille de ± 4700 pb (2900 pb + 1819 pb).
- Sst 1 (ou Sac 1) : le gène de la glucose oxydase contenant deux sites Sst 1, cette restriction devait nous fournir, sur gel d'agarose, quatre bandes (figure 8) : une de 17 pb (impossible à voir), une de 298 pb (difficile à visualiser), une de 1503 pb et une de ± 2900 pb.
- BamH 1 et Xba 1 : le gène de la glucose oxydase ne contenant ni le site BamH 1 ni le site Xba 1, nous nous attendions à voir apparaître, sur gel d'agarose, deux bandes correspondant, l'une, à une taille de ± 1800 pb et l'autre à une taille de ± 2900 pb (figure 8).

Le résultat de ces trois restrictions a été analysé sur un gel d'agarose 2 %. Les différents profils de restriction obtenus correspondent à ce qui était attendu (figure 9).

c) Vérification par séquençage du gène de la glucose oxydase

La dernière vérification réalisée a été le séquençage du gène de la glucose oxydase dans le plasmide pMOS-GO. Avant de passer au séquençage proprement dit, l'insert a été pré-amplifié avec les amorces FOR et REV (figure 10). Le protocole PCR utilisé est repris ci-dessous :

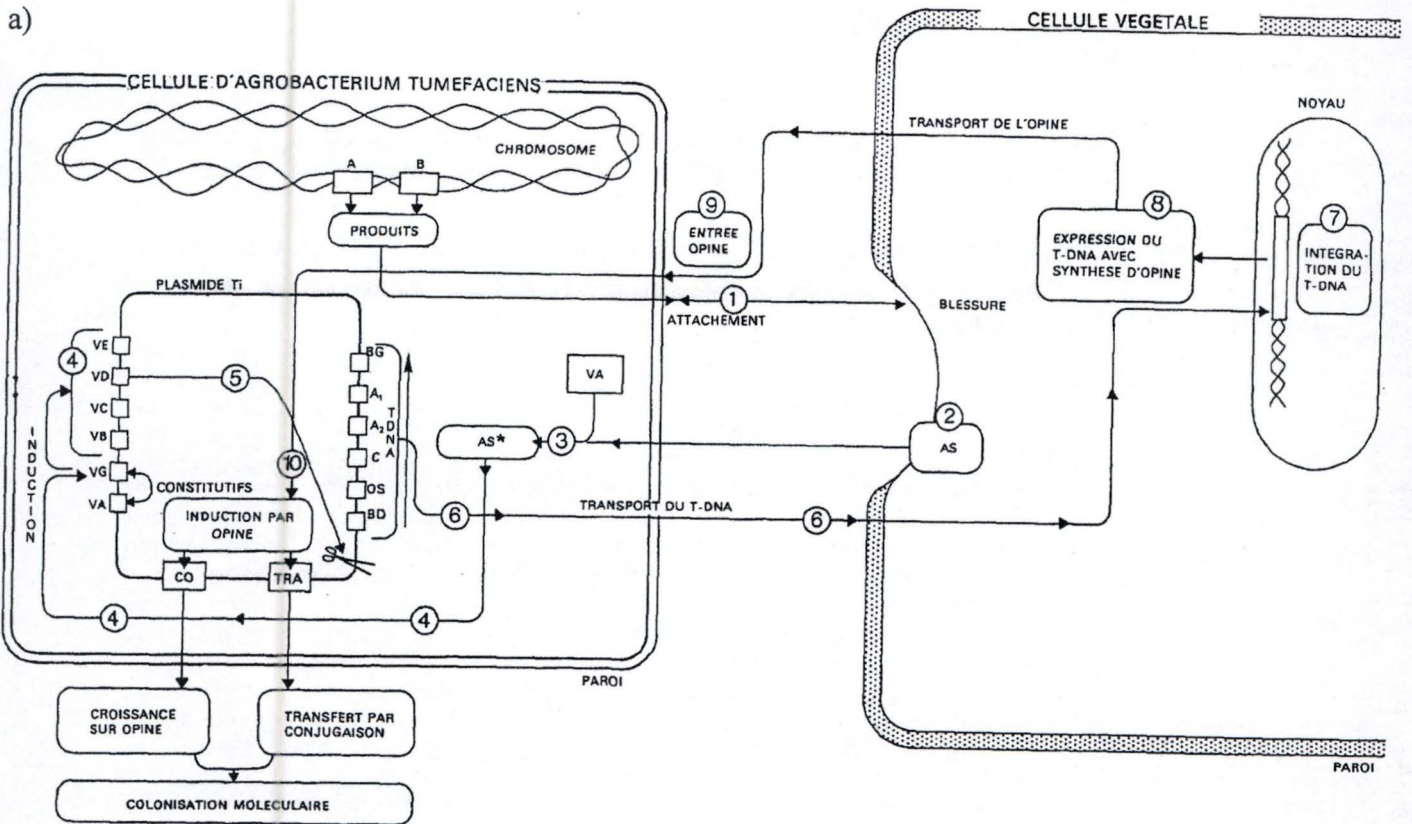
| Cycle                 | Température | Temps       |
|-----------------------|-------------|-------------|
| Dénaturation initiale | 96°C        | 1 minute    |
| Dénaturation          | 96°C        | 30 secondes |
| Hybridation           | 45°C        | 15 secondes |
| Elongation            | 60°C        | 4 minutes   |

30 cycles









b)

| Processus cellulaire              | Etape spécifique dans l'interaction entre <i>Agrobacterium</i> et la cellule végétale   | Protéines d' <i>Agrobacterium</i> impliquées dans le processus  |
|-----------------------------------|---|---|
| Reconnaissance cellule-cellule    | Liaison d' <i>Agrobacterium</i> aux récepteurs de surface de la cellule hôte  | ChvA, ChvB, PscA, Att   |
| Transduction du signal            | Reconnaissance des molécules signal de la plante et activation de la voie de transport du T-DNA   | ChvE, VIRA, VIRG  |
| Activation transcriptionnelle     | Expression des gènes VIR après phosphorylation de l'activateur transcriptionnel   | VIRG  |
| Mécanisme de conjugaison de l'ADN | Excision du T-DNA et mobilisation de la copie transférable simple brin du T-DNA (T-strand)  | VIRD1, VIRD2, VIRC1   |
| Transport intercellulaire         | Formation du complexe protéines-DNA, T-complexe ; formation d'un pore transmembranaire ; exportation du T-complexe dans le cytoplasme de la cellule végétale hôte | VIRE2, VIRE1, VIRD2, VIRD4, VIRB4, VIRB7, VIRB9, VIRB10, VIRB11 |
| Importation dans le noyau         | Interaction avec les récepteurs de l'hôte et transport du T-complexe à travers le pore nucléaire  | VIRD2, VIRE2  |
| Intégration du T-DNA              | Intégration dans le génome cellulaire végétal ; synthèse du deuxième brin du T-DNA  | VIRD2, VIRE2  |

**Fig. 11 :** Mécanisme de l'infection d'une cellule végétale par *Agrobacterium tumefaciens*  
a) Schéma général d'intégration du T-DNA dans le génome de la plante. Les numéros de la figure font référence au texte de la page 50  
b) Tableau représentant les différentes étapes de l'intégration du T-DNA



filaments de cellulose qui stabilisent le lien initial. Il en résulte une association étroite entre *Agrobacterium* et la cellule-hôte (figure 11) (Sheng et Citovsky, 1996).

En 1974, Schell et Van Montagu montraient que les souches tumorigènes d'*Agrobacterium tumefaciens* contiennent un plasmide circulaire de grande taille (environ 200 kb) dont la présence est corrélée au pouvoir tumorigène. Ce plasmide (appelé Ti) porte de nombreux gènes, notamment ceux qui sont nécessaires à sa propre répllication (Semal, 1996).

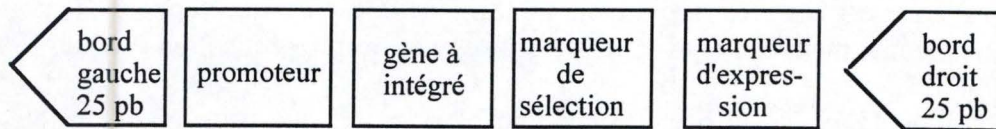
Après l'inoculation de la bactérie sur une blessure récente d'un hôte sensible, une petite partie du plasmide Ti (le T-DNA) est intégrée dans le génome nucléaire des cellules végétales infectées et s'y exprime. La tumorigénèse résulte de la présence, au sein du T-DNA, de gènes tumoraux codant pour trois enzymes, dont deux participent à la synthèse d'une auxine (l'acide indol acétique) et la troisième est liée à la synthèse d'une cytokinine (la zéatine riboside). La production continue de ces substances de croissance provoque une multiplication incontrôlée des cellules transformées de la plante (tumorigénèse) et rend compte par ailleurs de la capacité des tissus tumoraux à croître *in vitro* en l'absence de tout apport d'hormones exogènes (Semal, 1996). Le T-DNA porte également les gènes nécessaires à la synthèse d'opines, des sources de carbone et d'azote pour la bactérie.

Le T-DNA est flanqué, à droite et à gauche, d'une terminaison répétitive directe de 25 pb qui joue un rôle dans le transfert du T-DNA sous forme d'ADN monocaténaire et dans son insertion dans un des chromosomes de la cellule-hôte. Le transfert du T-DNA est polaire et s'effectue de droite à gauche (figure 11). Toute délétion dans la terminaison droite du T-DNA supprime le pouvoir transformant de la bactérie, tandis que la terminaison gauche n'est pas indispensable à l'infection (Semal, 1996).

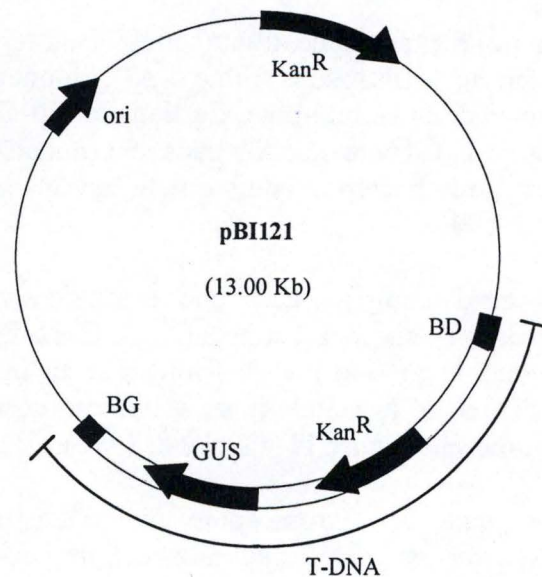
Outre le T-DNA, le plasmide Ti comporte aussi une région de « virulence » contenant des gènes de virulence (VIR) répartis en six loci distincts (A, B, C, D, E, et G). Les produits des gènes VIR jouent un rôle dans le mécanisme de l'infection en interagissant avec des produits du chromosome bactérien et de la cellule-hôte, selon une séquence d'événements moléculaires qui se résument comme suit (figure 11) (Tinland, 1996):

- 1) les produits de deux gènes du chromosome bactérien (A et B) favorisent l'attachement d'*Agrobacterium tumefaciens* aux cellules de la zone blessée de l'hôte ;
- 2) un composé phénolique, l'acétosyringone (AS), formé par la cellule-hôte au niveau de la blessure, pénètre dans la bactérie ;
- 3) le produit du gène VIR-A, exprimé de façon constitutive, active l'AS ;
- 4) l'AS activée stimule l'expression du gène VIR-G, dont le produit active l'ensemble des gènes VIR ;
- 5) le produit du gène VIR-D ouvre le T-DNA au niveau du bord droit ;
- 6) le T-DNA est transcrit sous forme monocaténaire à partir du bord droit (BD) jusqu'au bord gauche (BG) et est transporté vers le noyau de la cellule-hôte ;
- 7) le T-DNA s'intègre dans l'ADN d'un chromosome de l'hôte ;
- 8) le T-DNA s'exprime et synthétise de l'opine, de la cytokinine et de l'auxine ;
- 9) l'opine entre dans la cellule d'*A. tumefaciens* ;
- 10) l'opine induit l'expression du gène assurant son propre catabolisme, ainsi que la fonction de transfert du plasmide Ti dans d'autres bactéries par conjugaison.





**Fig. 12 :** Représentation schématique du T-DNA désarmé



**Fig. 13 :** Représentation schématique du vecteur pBI121

Le vecteur pBI121 contient :

- dans le T-DNA : un gène de résistance à la kanamycine sous le contrôle du promoteur de la nopaline synthase ; un gène GUS sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur.
- hors du T-DNA, le gène de résistance à la kanamycine sous le contrôle d'un promoteur bactérien ; une origine de répliation bactérienne.



La biologie particulière d'*Agrobacterium tumefaciens* a été exploitée par le biologiste pour transformer « naturellement » les plantes. Le plasmide Ti a d'abord été désarmé, c'est-à-dire que les gènes tumoraux ont été supprimés et remplacés par une séquence quelconque qui pourra être transférée dans le génome de la plante.

Les plasmides modernes contiennent, généralement, dans leur T-DNA (figure 12) :

- 1) un transgène sous le contrôle d'un promoteur de plantes. On utilise généralement celui de la lysopine déshydrogénase d'*Agrobacterium tumefaciens* ou celui du virus de la mosaïque du chou-fleur.
- 2) un « marqueur de sélection ». On utilisera souvent à cet effet la résistance à un antibiotique (généralement la kanamycine, qui est détoxifiée par le produit du gène de résistance codant pour la néomycine phosphotransférase). Dès lors, les cellules transformées (et elles seules) pourront se multiplier sur un milieu contenant de la kanamycine et y former des cals à partir desquels seront régénérées des plantules transgéniques porteuses du T-DNA (Lessl et Lanka, 1994 ; Sheng et Citovsky, 1996 ; Smith, 1998).

#### 4.3.2 Le plasmide pBI121

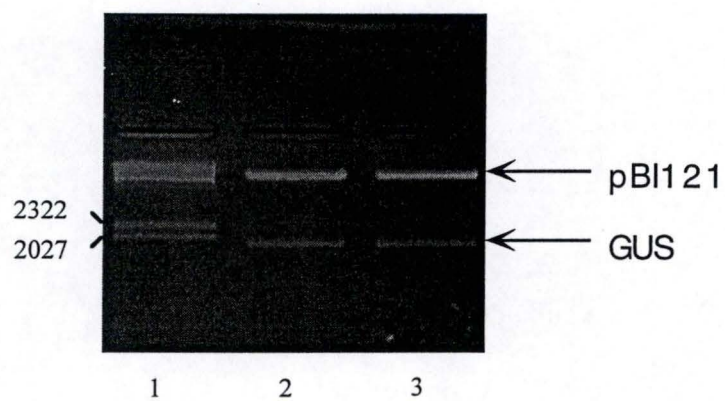
##### Description

Ce plasmide d'une taille de 13 kb comprend :

- Dans le T-DNA (figure 13) :
  - un gène de résistance à la kanamycine en amont d'un promoteur de plante.
  - un promoteur de plante, le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV).
  - le gène GUS codant pour une glucuronidase, cloné en aval du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, est représenté par un fragment de  $\pm 1900$  pb.
- Hors du T-DNA (figure 13) :
  - un gène de résistance à la kanamycine en amont d'un promoteur bactérien.
  - un promoteur bactérien.
  - une origine de répllication bactérienne, ori.

##### Purification du plasmide pBI121

Le plasmide a été isolé par midi-prep à partir d'une culture liquide (100 ml) de milieu LB (+ 50  $\mu\text{g/ml}$  de kanamycine) ensemencée d'une souche *E. coli* HB101 contenant le plasmide pBI121. Ce plasmide a été analysé par restriction diagnostique avec les enzymes de restriction Sst 1 et Xba 1. Cette restriction nous a donné, sur gel d'agarose 2 %, deux bandes d'ADN correspondant, l'une, à une taille de  $\pm 1900$  pb et l'autre à la taille de  $\pm 11100$  pb

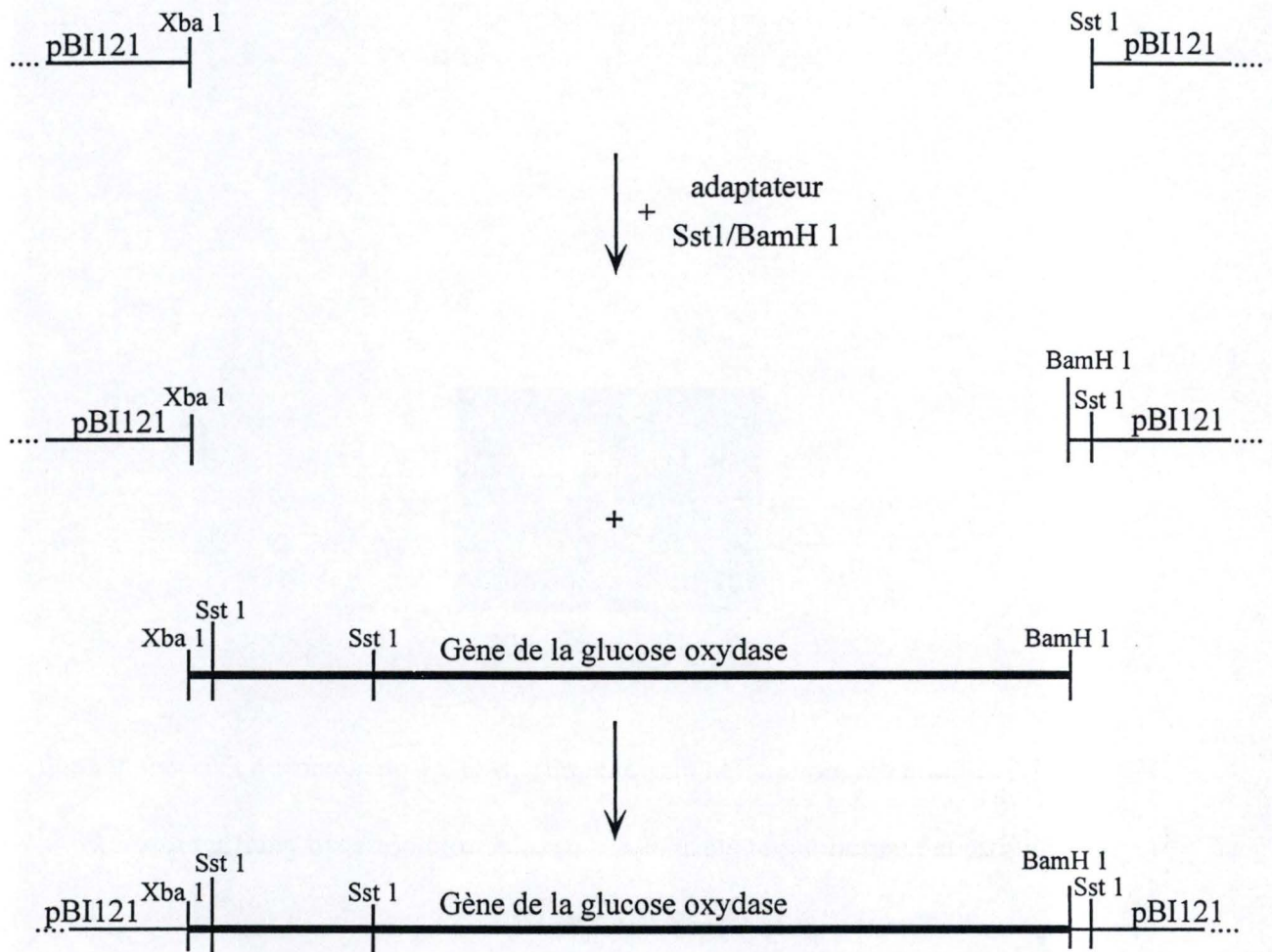


**Fig. 14 :** Restriction diagnostique du plasmide pBI121 d'*Escherichia coli* (souche HB101)  
 Les produits de la restriction ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %

Piste 1 : Etalon de poids moléculaire  $\lambda$  DNA/Hind III (pb)

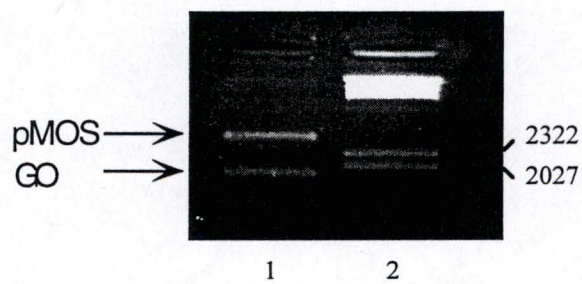
Pistes 2 et 3 : pBI121 restreint en Sst I et Xba I





**Fig. 15 :** Clonage de la glucose oxydase dans le plasmide pBI121

Le plasmide pBI121 a été linéarisé par restriction Sst 1/Xba 1 et purifié sur gel. Le site Sst 1 a été transformé en site BamH 1 au moyen d'un adaptateur BamH 1/Sst 1. Le gène de la glucose oxydase, bordé par les sites Xba 1 et Sst 1, a été inséré dans le plasmide pBI121 modifié.



**Fig. 16 :** Restriction diagnostique du plasmide pMOS-GO isolé à partir d'*Escherichia coli* (souche TOP 10)

Les produits de la restriction ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %

Piste 1 : pMOS-GO restreint en BamH 1 et Xba 1

Piste 2 : Etalon de poids moléculaire  $\lambda$  DNA/Hind III (pb)



(figure 14). Ces deux bandes d'ADN correspondent respectivement au gène GUS et au plasmide pBI121 dépourvu de ce même gène.

La bande de 11100 pb a ensuite été découpée du gel d'agarose et l'ADN a été purifié au moyen du kit QIAEX II.

#### *Ajout des adaptateurs*

Le site de restriction Sst 1 du vecteur ne peut pas être utilisé pour le clonage car le gène de la glucose oxydase contient deux de ces sites. Le site Sst 1 du plasmide pBI121 a été « transformé », grâce à un adaptateur BamH 1/Sst 1, en site BamH 1 (figure 15).

L'adaptateur BamH 1/Sst 1 double brin a été reconstitué à partir de deux séquences simples brins par hybridation à 60°C pendant 15 minutes et retour lent à la température ambiante.

Nous avons ensuite effectué la ligation du plasmide pBI121 (0,45 µg/µl), restreint en Sst 1 et Xba 1, avec le mélange d'adaptateurs dilué 25 fois (dans un rapport 1 vecteur/100 adaptateurs). Le plasmide pBI121 linéarisé délimité par BamH 1 et Xba 1 ainsi obtenu a été purifié à l'aide du kit QIAquick.

A ce stade, nous possédons un plasmide intégratif purifié et prêt à « recevoir » le gène de la glucose oxydase. L'étape suivante consistera à purifier le gène de la glucose oxydase à partir du plasmide pMOS.

### **4.3.3 Construction du plasmide intégratif pBI121-GO**

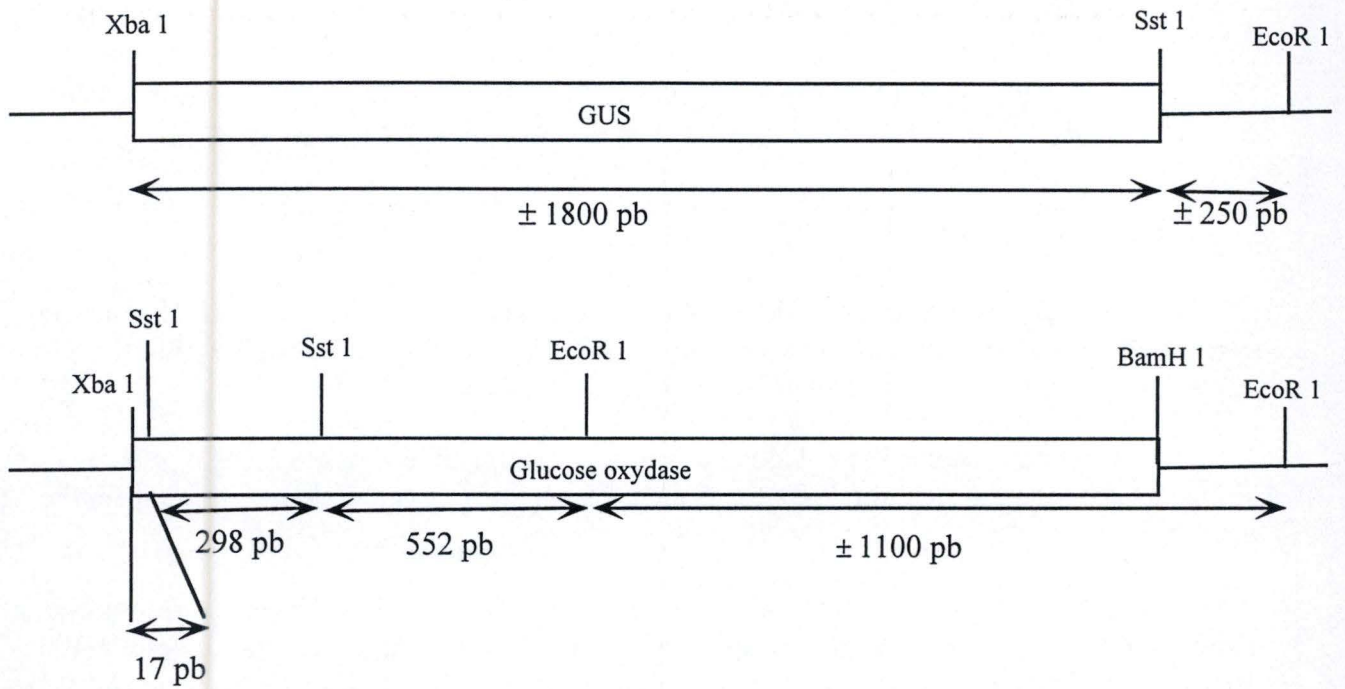
#### *Isolement de la glucose oxydase à partir du plasmide pMOS-GO*

Le plasmide pMOS-GO, préalablement isolé à partir de colonies sélectionnées lors des vérifications précédentes (voir point 4.2.2 Analyse des bactéries recombinantes), a été dosé et restreint en BamH 1 et Xba 1 (figure 5a). Le fragment d'ADN correspondant au gène de la glucose oxydase a été purifié par électrophorèse (figure 16) et par le kit QIAEX II.

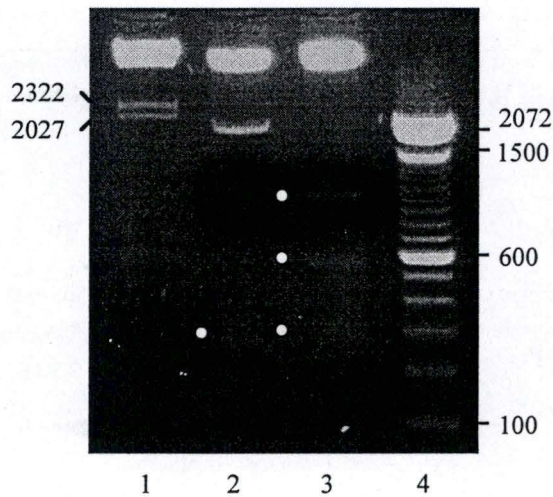
#### *Ligation du gène de la glucose oxydase dans le vecteur pBI121*

Le gène de la glucose oxydase a été « ligué » dans le plasmide intégratif pBI121 linéarisé. Différents rapports plasmide/vecteur ont été utilisés (2/1, 5/1, 7,5/1 et 10/1). Les ligations ont été réalisées à 16°C pendant deux heures.

Les produits de ligation pBI121-GO ont été utilisés pour transformer *E. coli* (souche TOP 10) par choc thermique. Les bactéries recombinantes ont été sélectionnées sur un milieu LB agar plus kanamycine (50 µg/ml) et analysées par restriction diagnostique.



**Fig. 17a :** Représentation schématique du plasmide pBI121-GUS et du plasmide pBI121-GO



**Fig. 17b :** Restriction diagnostique du plasmide pBI121-GO isolé à partir d'*Escherichia coli* (souche TOP 10)

- Piste 1 : Etalon de poids moléculaire  $\lambda$  DNA/Hind III (pb)
- Piste 2 : pBI121-GUS restreint en EcoR 1, Sst 1 et Xba 1
- Piste 3 : pBI121-GO restreint en EcoR 1, Sst 1 et Xba 1
- Piste 4 : Etalon de poids moléculaire 100 pb DNA ladder



Cette restriction a été réalisée avec les enzymes de restriction suivantes : EcoR 1, Sst 1 et Xba 1. La restriction du plasmide pBI121-GO devrait nous donner 5 fragments dont un de 17 pb (impossible à voir), un de 298 pb, un de 552 pb, un de ± 1100 pb et un de ± 11100 pb (figure 17a).

La même restriction a été réalisée sur le plasmide pBI121 contenant le gène GUS afin d'avoir une restriction contrôle. Celle-ci devrait nous donner 3 fragments dont la taille serait 250 pb, 1800 pb et ± 10900 pb (figure 17a).

Les résultats de ces deux restrictions ont été déposés sur gel d'agarose 2 % (figure 17b). Les colonies dont les plasmides présentaient le bon profil de restriction ont été retenues pour les étapes de transformation d'*Agrobacterium*.

#### *Transformation d'Agrobacterium tumefaciens*

Le plasmide pBI121-GO a été isolé par midi-prep et a été utilisé pour la transformation, par électroporation, d'*Agrobacterium tumefaciens*. Les bactéries transformées ont été étalées sur un milieu LB agar plus kanamycine (50 µl/ml) et incubées à 28°C pendant 4 jours.

Les différentes colonies d'*Agrobacterium tumefaciens* poussant sur kanamycine ont été analysées par PCR avec les amorces PETGOG (5' -GAG-CTC-GAG-ATG-CAG-ACT-CTC-CTT-GTG-3') et PETGOR (5' -GAG-GGA-TCC-ATC-ATA-CCA-CTC-ACT-GCA-3') spécifiques de la glucose oxydase. Le protocole PCR utilisé est repris ci-dessous :

| Cycle             | Température | Temps      |
|-------------------|-------------|------------|
| Dénaturation      | 94°C        | 1 minute   |
| Hybridation       | 55°C        | 1 minute   |
| Elongation        | 68°C        | 3 minutes  |
| Elongation finale | 68°C        | 10 minutes |

← 25 cycles

Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose 2 %. Sur les 48 colonies testées, seules 21 ont été retenues.

#### *Transformation de la chicorée*

Comme nous l'avons vu au point 4.3.1, l'infection d'une plante par *Agrobacterium tumefaciens* nécessite une blessure récente d'une plante sensible.

La transformation de la chicorée a été réalisée à l'aide de la méthode des disques foliaires. Pratiquement, des feuilles de chicorée ont été découpées en fragments de ± 1 cm<sup>2</sup> et ont été blessées au moyen d'un scalpel, créant ainsi de nombreux sites d'infection potentiels pour *A. tumefaciens*. Ces morceaux de feuilles ont ensuite été plongés dans une culture liquide d'*Agrobacterium* recombinant. Deux transformations ont été réalisées : la première avec le plasmide pBI121-GO ; la seconde, avec le plasmide pBI121-GUS qui nous servira de transformation contrôle.



a)



Etat des chicorées transformées deux jours après l'infection

b)



Etat des chicorées transformées un mois après l'infection



Après trois mois de culture, quelques plantules ont régénéré (figure 18). Celles-ci présentaient au départ un aspect « normal ». Après quelques semaines, ces plantes ont dégénéré : elles ont perdu leur couleur verte et ne poussaient plus sur le milieu de sélection. Les plantules contrôle, quant à elles, étaient caractérisées par une croissance et une morphologie normales.

Manifestement, l'introduction du gène de la glucose oxydase dans le génome de la chicorée se traduit par un effet toxique et létal pour la plante. Nous n'avons, cependant, pas eu l'occasion de vérifier la production d'eau oxygénée dans les plantules transformées à cause de leur petite taille.

c)

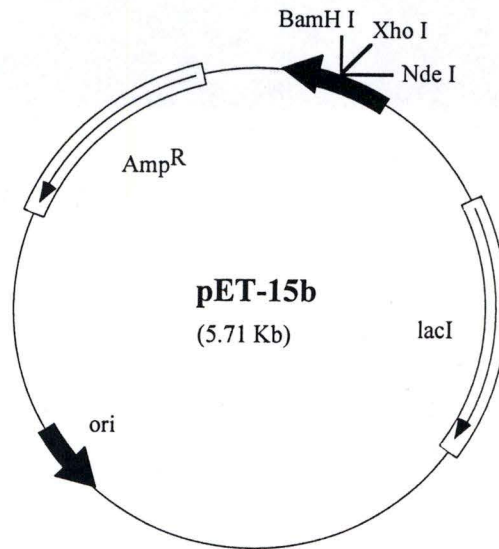


Etat des chicorées transformées trois mois après l'infection

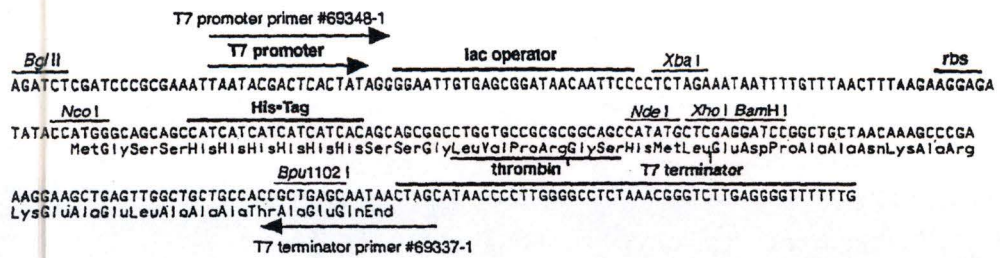
**Fig. 18 (a, b et c) :** Transformation des chicorées par *Agrobacterium tumefaciens* contenant le plasmide pBI121-GO

Pour réaliser cette transformation, la technique des disques foliaires a été utilisée

a)



b)

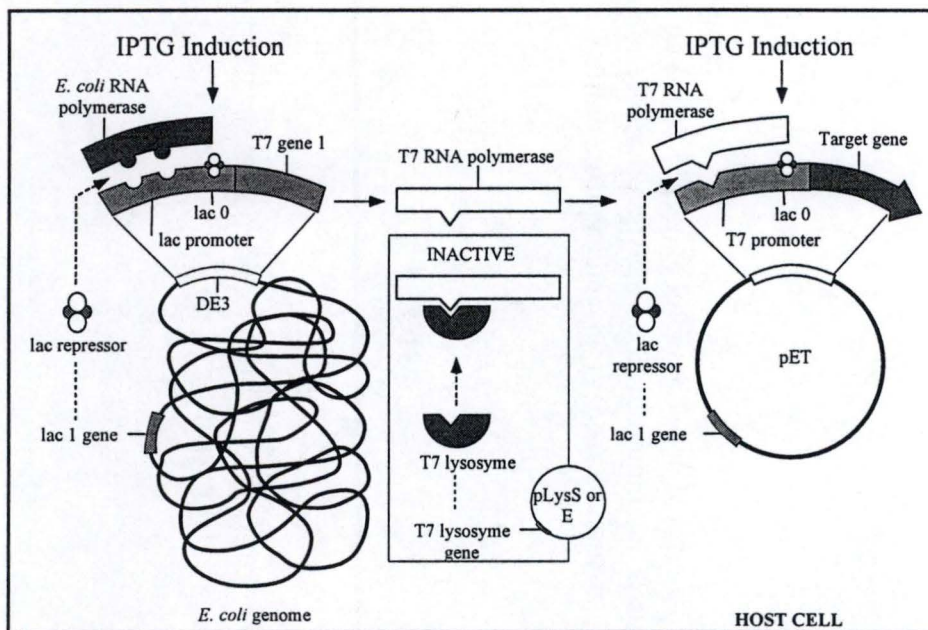


**Fig. 19 :** Représentation schématique du vecteur pET-15b

a) Schéma général du plasmide

b) Localisation du promoteur T7 et de la partie N-Terminale de la protéine de fusion.  
Le site de liaison du ribosome (rbs), le polyhistidine (His-Tag) et le site de clivage pour la thrombine sont indiqués





**Fig. 20 :** Le système pET est un système développé pour le clonage et l'expression de protéines recombinantes dans *E. coli*. les gènes cibles sont clonés dans le plasmide pET sous le contrôle de signaux transcriptionnel et translationel forts du bactériophage T7. L'expression est induite en transférant le plasmide dans un hôte possédant une copie du gène de la RNA polymérase T7 sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG.





## 4.4 PRODUCTION DE SONDAS IMMUNOLOGIQUES CONTRE LA GLUCOSE OXYDASE

L'objectif de cette opération est de pouvoir localiser, à l'aide d'anticorps anti-GO, la glucose oxydase au sein d'une plante de chicorée transformée. Pour cela, nous avons immunisé des lapins avec la glucose oxydase surexprimée dans *E. coli*.

### 4.4.1 Le vecteur pET-15b

Le plasmide pET-15b a plusieurs caractéristiques (figure 19a et b) : il possède un gène de résistance à l'ampicilline, un promoteur LacT7, une séquence codant pour un peptide tag (HIS-Tag), et un site de clivage pour la thrombine. Ce plasmide a trois sites de clonage disponibles : BamH 1, Xho 1 et Nde 1.

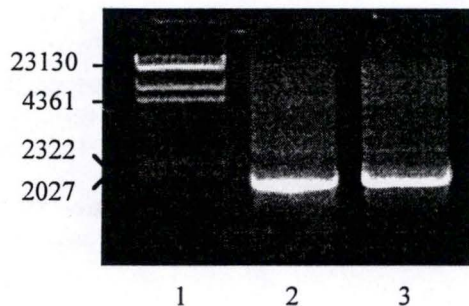
Le système pET est un système développé pour le clonage et l'expression de protéines recombinantes dans *Escherichia coli*. Les gènes cibles sont clonés dans le plasmide pET sous le contrôle de signaux transcriptionnel et translationnel forts du bactériophage T7. L'expression est induite en procurant une source de RNA polymérase T7 à la cellule-hôte. La RNA polymérase T7 est tellement sélective et active que le produit désiré peut représenter plus de 50 % des protéines cellulaires totales après quelques heures d'induction (figure 20).

Un autre avantage important de ce système est sa capacité de maintenir les gènes cibles silencieux, du point de vue transcriptionnel, dans l'état non induit. Les gènes cibles sont initialement clonés dans des hôtes ne contenant pas de gène de RNA polymérase T7, pour éliminer l'instabilité plasmidique due à la production de protéines potentiellement toxiques pour la cellule-hôte. Une fois « établi » dans un hôte qui ne permet pas l'expression (p.e., la souche TOP 10 d'*E. coli*), le plasmide est transféré dans un hôte possédant une copie chromosomique du gène de la RNA polymérase T7 sous le contrôle du promoteur lacUV5 (p.e., la souche BL21 d'*E. coli*) inductible par l'ajout d'IPTG (1 mM) au milieu de culture.

### 4.4.2 Préparation du gène de la glucose oxydase

#### *Modification des sites de restriction et mise en phase du gène de la glucose oxydase*

Une nouvelle amplification PCR avec les amorces PETGOG et PETGOR, lesquelles nous permettent d'obtenir le gène de la glucose oxydase précédé d'un site de restriction Xho 1 (5' – CTCGAG- 3'), a été réalisée. Celle-ci nous a permis d'amplifier le gène de la glucose oxydase et, par la même occasion, de pouvoir l'insérer correctement dans le plasmide pET-15b. En effet, pour que la phase de lecture soit respectée et donc pour que la glucose oxydase puisse être transcrite, il faut impérativement que le site Xho 1 se trouve juste avant l'ATG (figure 21).



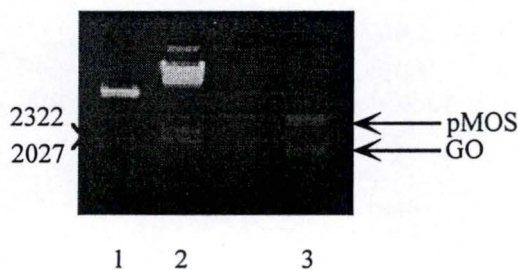
**Fig. 22 :** Amplification de l'ADN d'*Escherichia coli* (souche TOP 10) contenant le vecteur pMOS-GO

Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %

Piste 1 : Etalon de poids moléculaire  $\lambda$  DNA/Hind III (pb)

Piste 2 : Echantillon d'ADN amplifié avec les amorces PETGOG et PETGOR

Piste 3 : Contrôle positif (échantillon d'ADN amplifié avec les amorces GOG5 et GOG7)



**Fig. 23 :** Restriction du plasmide pMOS-GO contenant un gène de glucose oxydase préalablement amplifié avec les amorces PETGOG et PETGOR

Les produits de la restriction ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %

Piste 1 : Echantillon d'ADN restreint en Xho 1

Piste 2 : Etalon de poids moléculaire  $\lambda$  DNA/Hind III (pb)

Piste 3 : Echantillon d'ADN restreint en BamH 1 et Xho 1



Le gène de la glucose oxydase a donc été réamplifié à partir du plasmide pMOS-GO en utilisant les amorces PETGOG et PETGOR. Le protocole PCR utilisé est repris ci-dessous :

| Cycle             | Température | Temps      |
|-------------------|-------------|------------|
| Dénaturation      | 94°C        | 1 minute   |
| Hybridation       | 55°C        | 1 minute   |
| Elongation        | 68°C        | 3 minutes  |
| Elongation finale | 68°C        | 10 minutes |

← 25 cycles

Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose 2 % (figure 22) et ont été purifiés à l'aide du kit QIAquick.

#### *Ligation dans pMOS et sélection*

Le gène de la glucose oxydase a été cloné dans le vecteur pMOS en suivant le protocole décrit précédemment (point 4.2.2 Clonage du gène de la glucose oxydase dans le vecteur pMOS et transformation d'*E. coli*). Le mélange de ligation a été incubé à 16°C pendant deux heures avant d'être utilisé en vue de transformer, par choc thermique, *E. coli* (souche TOP 10). Le mélange de transformation a été maintenu à 37°C pendant une heure puis étalé sur une boîte de Pétri (contenant du milieu LB agar + 60 µg/ml d'ampicilline + 200 ng/ml de X-gal + 1 mM d'IPTG) et incubé à 37°C pendant une nuit.

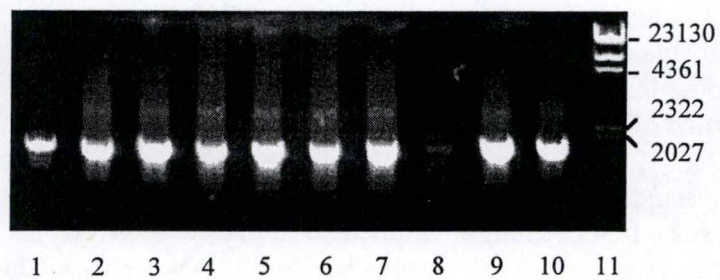
Les colonies blanches ont été analysées par PCR en utilisant les amorces PETGOG et PETGOR (voir ci-dessus). Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %. Les colonies présentant une bande d'ADN correspondant à une taille d'un peu moins de 2000 pb ont été retenues.

#### *Vérification des plasmides par restriction diagnostique*

Les plasmides des colonies retenues précédemment ont été isolés par mini-prep et restreints avec les enzymes BamH 1 et Xho 1. Les mélanges de restriction ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %. Ce gel nous permis de distinguer deux bandes (figure 23) : une bande de 2000 pb caractéristique de la glucose oxydase et une bande de ± 2900 pb correspondant au plasmide pMOS linéarisé. Lorsque le plasmide n'est restreint qu'avec l'enzyme de restriction Xho 1, une bande de ± 4700 pb, correspondant au plasmide linéarisé plus le gène de la glucose oxydase, est visible.

#### *Vérification de la phase par séquençage*

Les plasmides ont été séquencés avec les amorces FOR et REV en suivant le protocole décrit plus haut (point 4.2.2 Analyse des bactéries recombinantes c.). Par comparaison des séquences obtenues et de celles disponibles dans les banques de données, nous avons pu nous assurer que les colonies sélectionnées contenaient bien le gène de la glucose oxydase et que l'insert était bien en phase avec celle imposée par le vecteur pET-15b (voir plus loin) :



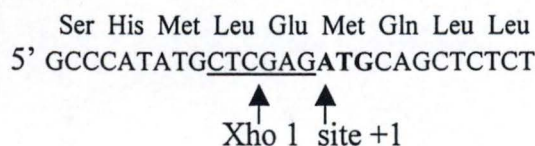
**Fig. 24 :** Amplification de l'ADN de la souche BL21 (DE3) d'*Escherichia coli* contenant le vecteur pET-GO

Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %

Pistes 1 à 10 : Echantillons d'ADN amplifiés avec les amorces PETGOG et PETGOR

Piste 11 : Etalon de poids moléculaire  $\lambda$  DNA/Hind III (pb)





#### *Clonage du gène de la glucose oxydase dans le vecteur pET-15b*

Le gène de la glucose oxydase, bordé des sites BamH 1 et Xho 1, a été purifié par électrophorèse et le kit QIAEX II, et a été inséré dans le plasmide pET-15b linéarisé en BamH 1 et Xho 1. Le protocole de ligation utilisé est le même que celui décrit précédemment (voir point 4.2.2 Clonage du gène de la glucose oxydase dans le vecteur pMOS et transformation d'*E. coli*).

Le produit de ligation a été utilisé pour transformer *E. coli* (souche TOP 10) par choc thermique. Les cellules ayant subi cette transformation ont été étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB agar + ampicilline (60 µg/ml) + X-gal (200 ng/ml) + IPTG (1 mM) et incubées à 37°C pendant 4 jours.

Les colonies ont été analysées par PCR en utilisant les amorces PETGOG et PETGOR et en suivant le protocole décrit précédemment (voir point 4.4.2 Modification des sites de restriction et mise en phase du gène de la glucose oxydase) (figure 22).

L'ADN plasmidique des colonies retenues a été analysé par restriction diagnostique et a été séquencé. Les résultats, non présentés ici, sont conformes à ce qui était attendu, à savoir la bonne position de l'insert par rapport à la phase de lecture imposée par pET.

#### *Transformation de la souche BL21 (DE3) d'*E. coli**

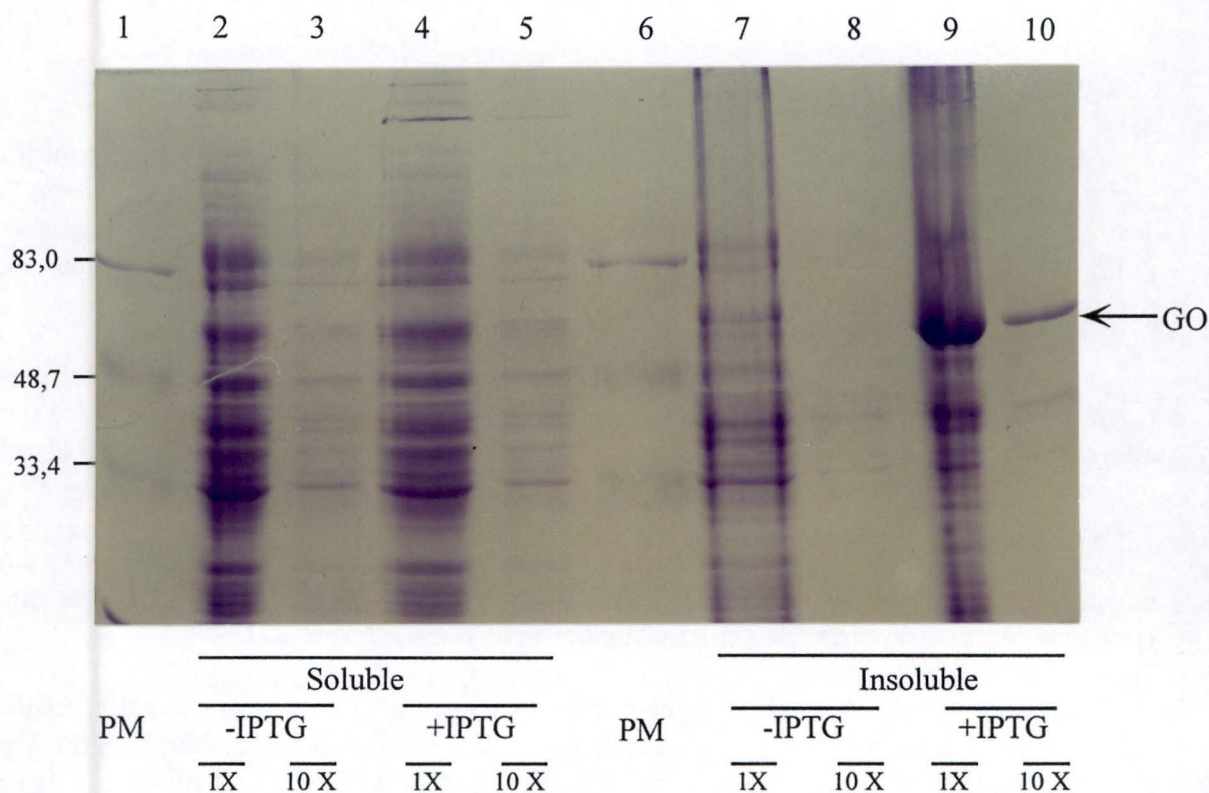
Des bactéries BL21 (DE3) ont été électroporées avec le plasmide pET-GO préalablement isolé (voir point 3.4.2 Clonage du gène de la glucose oxydase dans le vecteur pET-15b). Les bactéries transformées ont été étalées sur un milieu LB agar plus ampicilline (60 µg/ml) et incubées à 37°C durant une nuit.

Quelques colonies ont été analysées par PCR avec les amorces spécifiques de la glucose oxydase (PETGOG et PETGOR). Le programme de cette PCR a été décrit précédemment. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % (figure 24). Seules les colonies possédant un insert d'un peu moins de 2000 pb ont été retenues pour la suite des manipulations.

#### **4.4.3 Surexpression du gène de la glucose oxydase et immunisation**

##### *Principe*

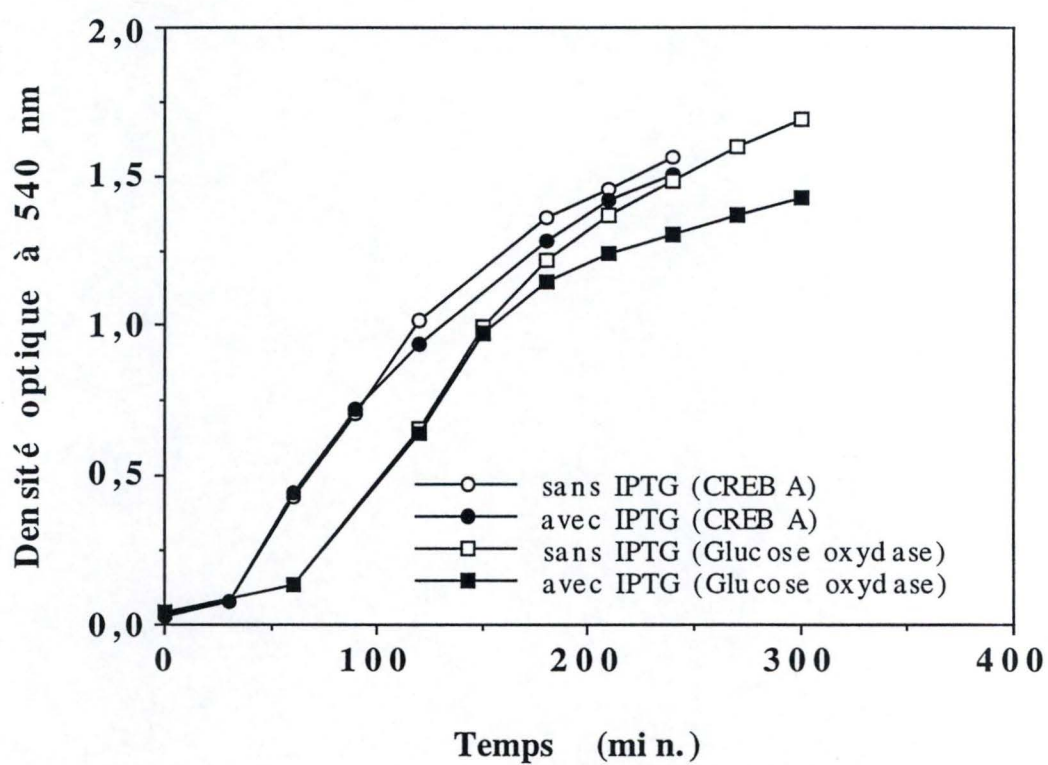
Le plasmide pET-GO se trouve maintenant dans une cellule-hôte, BL21 (DE3), possédant une copie chromosomique du gène de la RNA polymérase T7. En présence d'IPTG



**Fig. 25 :** Fractions solubles et insolubles de BL21 (DE3)-pETGO induit ou non par l'IPTG  
Les fractions ont été analysées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 8 %

- Piste 1 : Etalon de poids moléculaire SDS-PAGE standards (kDa)
- Piste 2 : Fraction soluble non induite et non diluée
- Piste 3 : Fraction soluble non induite et diluée 10 fois
- Piste 4 : Fraction soluble induite et non diluée
- Piste 5 : Fraction soluble induite et diluée 10 fois
- Piste 6 : Etalon de poids moléculaire SDS-PAGE standard (kDa)
- Piste 7 : Fraction insoluble non induite et non diluée
- Piste 8 : Fraction insoluble non induite et diluée 10 fois
- Piste 9 : Fraction insoluble induite et non diluée
- Piste 10 : Fraction insoluble induite et diluée 10 fois





**Fig. 26 :** Cinétique de croissance de BL21-pETCrebA et de BL21-pETGO en présence et en absence d'IPTG. L'IPTG a été ajouté aux cultures bactériennes lorsque leur densité optique à 540 nm était de 0.6.

(1 mM), la RNA polymérase T7 sera produite et celle-ci induira la transcription majoritaire du gène de la glucose oxydase qui se trouve sous le contrôle du promoteur T7.

La protéine glucose oxydase surexprimée dans la bactérie sera purifiée et injectée à des lapins dans le but de produire des anticorps anti-glucose oxydase.

#### *Analyse des fractions soluble et insoluble de BL21 (DE3)-pETGO induit par l'IPTG*

Un milieu liquide (milieu LB + ampicilline à une concentration finale de 60 µg/ml) a été ensemencé par une colonie BL21 (DE3) contenant le plasmide pET-GO et incubée à 37°C pendant six heures. Après ce laps de temps, la moitié de cette culture a été induite par ajout d'IPTG (à une concentration finale de 1 mM) et maintenue à 37°C pendant 4 heures.

Après 4 heures d'induction, les bactéries ont été récoltées et lysées en présence de lysozyme. Les fractions soluble et insoluble (corps d'inclusion) ont été récoltées et analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8 % en présence de SDS (figure 25).

Seule la fraction insoluble induite semblait contenir la glucose oxydase de 66 kDa. Cette protéine ne paraissait pas être surexprimée de façon importante contrairement à ce que l'on pensait en nous référant à d'autres protéines étudiées au laboratoire. Deux hypothèses pourraient expliquer de telles observations. Premièrement, la protéine surexprimée pourrait être toxique pour les bactéries étant donné son pouvoir bactéricide reconnu. Deuxièmement, la taille de la protéine, comparativement à d'autres protéines plus petites étudiées au laboratoire, pourrait être une limitation à son expression. Dans les deux cas, la croissance bactérienne s'en trouverait ralentie et donc moins de bactéries seraient récoltées pour l'analyse des fractions soluble et insoluble.

#### *Cinétique de croissance des souches BL21 (DE3)*

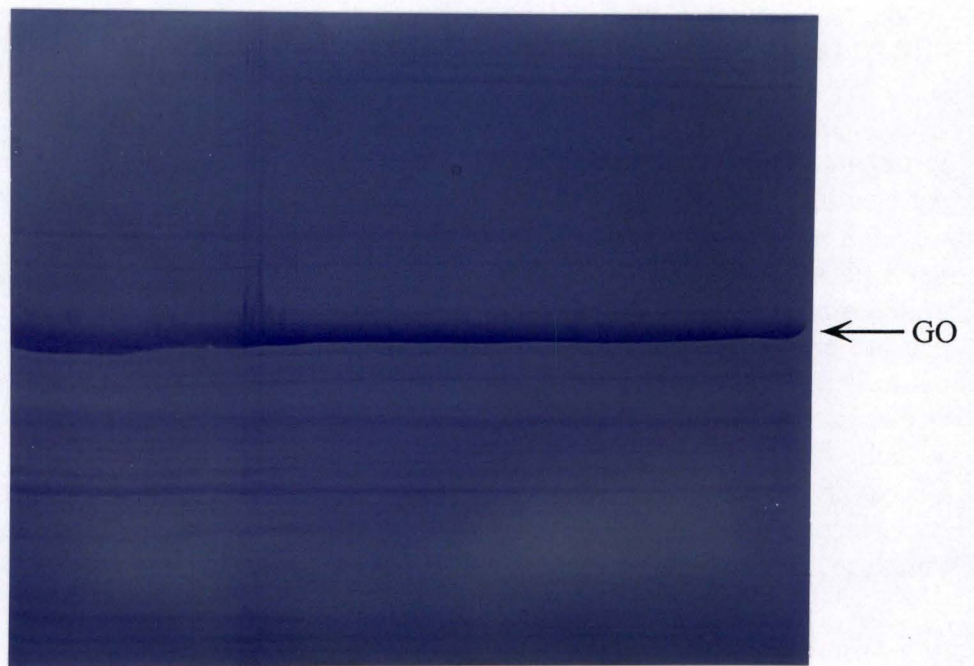
Nous avons comparé la cinétique de croissance des bactéries contenant le plasmide pET-GO en absence et en présence d'IPTG avec la cinétique de croissance de bactéries surexprimant un fragment de protéine de ± 20 kDa (fragment de la protéine CREB).

Deux cultures liquides de BL21 (DE3) contenant le plasmide pET-GO ont été incubées à 37°C pendant environ 6 heures. Des échantillons de 1 ml de chacune des cultures ont été prélevés toutes les 30 minutes afin de mesurer leur densité optique (DO). Lorsque la densité optique atteint 0,6 nm, l'IPTG est ajouté (à une concentration finale de 1 mM) et les deux cultures sont maintenues à 37°C pendant 4 heures. Pendant environ 4 heures, des échantillons des cultures ont été prélevés toutes les 30 minutes afin de mesurer l'évolution de la densité optique.

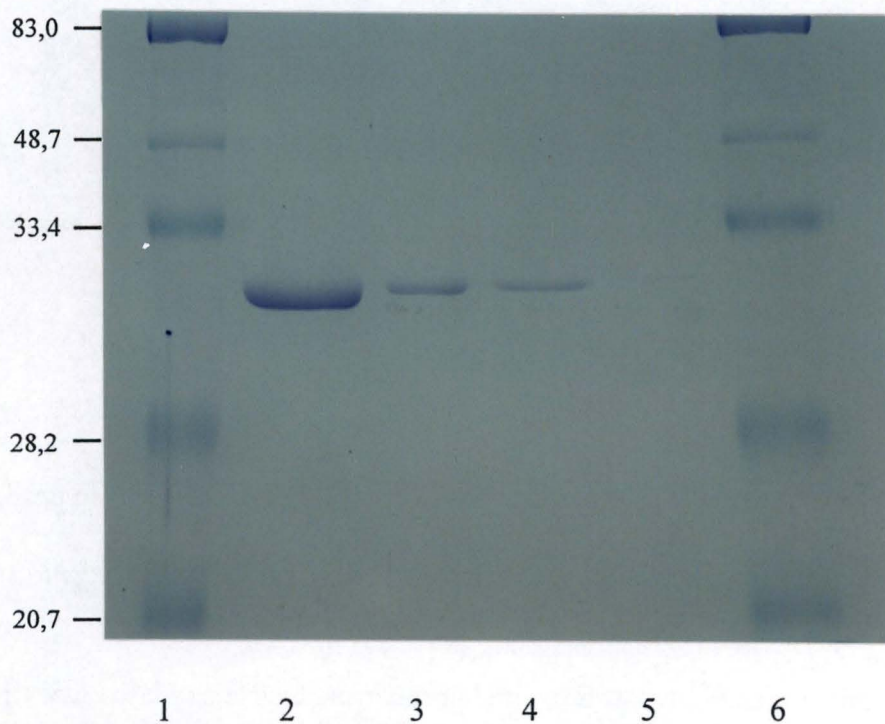
Nous avons pu ainsi, grâce à cette cinétique, constater que la croissance de la culture de BL21 induite était plus lente que celle de la culture non induite uniquement dans le cas des bactéries contenant le plasmide pET-GO (figure 26). Il y a donc bien une diminution de la densité de population bactérienne après induction.

Dans l'expérience suivante, nous avons mesuré la présence d'eau oxygénée dans le lysat des bactéries transformées par le vecteur pET-GO. Pour vérifier l'effet de la taille de la





**Fig. 27 :** Purification partielle de la glucose oxydase par électrophorèse préparative sur gel SDS-PAGE 8 %



**Fig. 28** : Vérification de l'efficacité de l'électro-élution de la protéine glucose oxydase

La protéine glucose oxydase élue a été analysée par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 8 %

Piste 1 et 6 : Etalon de poids moléculaire SDS-PAGE standard (kDa)

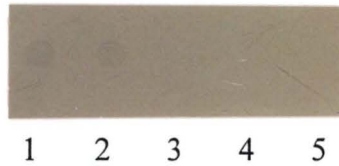
Piste 2 : Echantillon de la protéine élue diluée 2 fois

Piste 3 : Echantillon de la protéine élue diluée 5 fois

Piste 4 : Echantillon de la protéine élue diluée 10 fois

Piste 5 : Echantillon de la protéine élue diluée 100 fois





**Fig. 29 :** Dot blot vérifiant la production d'anticorps anti-glucose oxydase par le lapin injecté avec la protéine glucose oxydase éluée précédemment (voir figure 27)  
Le polysérum test a été épuisé en présence des protéines totales d'*Escherichia coli* transformé avec le plasmide pET-15b

- Piste 1 : Les anticorps ont été testés contre la protéines glucose oxydase éluée diluée 50 fois
- Piste 2 : Les anticorps ont été testés contre la protéines glucose oxydase éluée diluée 100 fois
- Piste 3 : Les anticorps ont été testés contre l'amylase
- Piste 4 : Les anticorps on été testés contre les protéines du lait
- Piste 5 : Les anticorps ont été testés contre l'albumine bovine (BSA)

protéine cible ou de la production du peroxyde d'hydrogène sur la densité de population bactérienne, nous avons dosé le peroxyde d'hydrogène dans les bactéries en fin de phase d'induction. Les résultats de ces dosages ont montré que les bactéries transformées ne produisent pas de quantité détectable de peroxyde d'hydrogène. Le taux d'expression apparemment faible du gène de la glucose oxydase pourrait, par conséquent, s'expliquer par la taille important de la protéine à synthétiser.

#### *Purification partielle de la glucose oxydase en vue de l'immunisation des lapins*

Un milieu liquide (1 l de milieu LB + ampicilline à une concentration finale de 60 µg/ml) a été ensemencé par une colonie BL21 (DE3) contenant le plasmide pET-GO et incubée à 37°C pendant six heures. Après ce laps de temps, la culture a été induite par ajout d'IPTG (1 mM) et maintenue à 37°C durant 4 heures supplémentaires.

Après ce délai, les bactéries ont été récoltées et lysées. Les corps d'inclusion ont été récoltés, solubilisés et déposés sur un gel SDS-PAGE 8 % préparatif. Après migration, le gel a été coloré au bleu de Coomassie (figure 27) et la bande correspondant à la glucose oxydase a été excisée du gel et électroéluée. L'efficacité de l'électroélution a été vérifiée sur gel SDS-PAGE 8 % (figure 28).

#### *Immunisation des lapins*

Le mélange d'électroélution a été dilué avec un volume équivalent d'adjuvant QuilA et injecté au lapin à raison de 1 ml/lapin. Des rappels ont été effectués toutes les deux semaines. Les sérums récoltés après le troisième rappel ont été analysés par dot blot et western blot.

#### **4.4.4 Dot-blots et western-blots**

##### *Les dot-blots*

Les dot-blots ont été utilisés pour vérifier, rapidement, la production d'anticorps anti-glucose oxydase au cours des différents rappels.

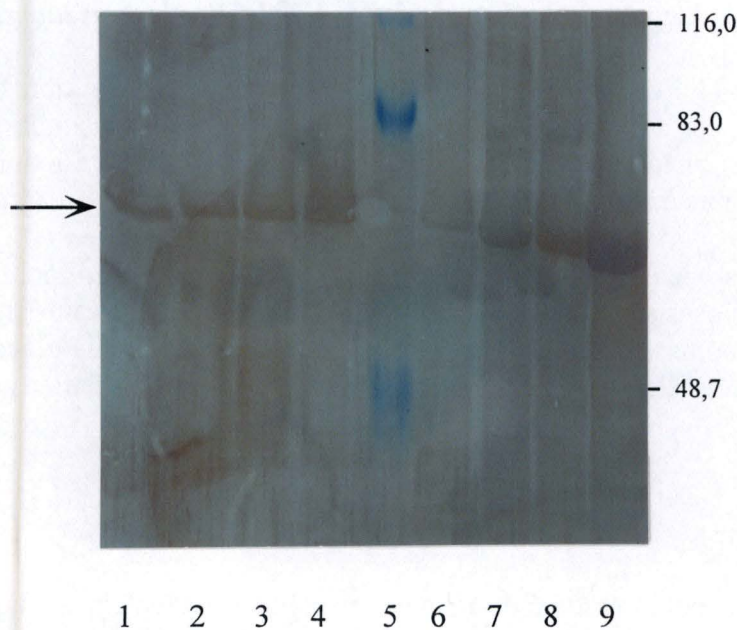
Les protéines issues de l'électroélution ont été déposées sur une membrane de nitrocellulose et testées en présence de polysérum naïf, de polysérum test non épuisé et de polysérum test épuisé.

Le polysérum testé reconnaît la protéine glucose oxydase (figure 29, pistes 1 et 2) et il ne reconnaît pas les protéines contrôle que nous avons utilisées, à savoir l'amylase, les protéines du lait et l'albumine bovine (figure 29, pistes 3 à 5).

##### *Digestion à la thrombine*

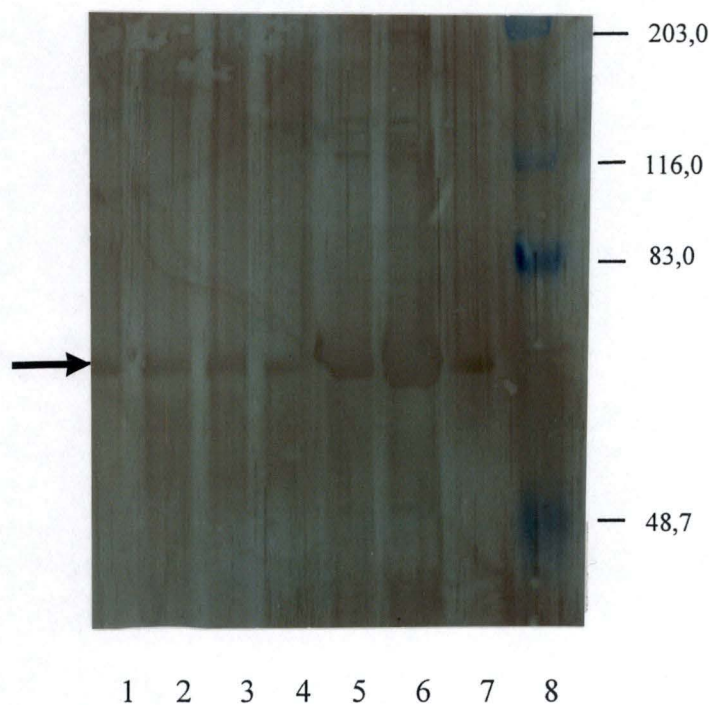
Après leur purification sur une résine His-Tag, la protéine glucose oxydase a été débarrassée de son peptide «tag», à savoir l'oligohistidine. L'enzyme utilisée pour enlever ce





**Fig. 30 :** Western blot vérifiant la spécificité des anticorps anti-glucose oxydase  
Le polysérum test a été épuisé en présence des protéines totales d'*Escherichia coli*  
transformé avec le plasmide pET-15b

- Piste 1 : Protéines totales extraites de la souche BL21 (DE3)-pETGO diluées 800 fois
- Piste 2 : Protéines totales extraites de la souche BL21 (DE3)-pETGO diluées 400 fois
- Piste 3 : Protéines totales extraites de la souche BL21 (DE3)-pETGO diluées 200 fois
- Piste 4 : Protéines totales extraites de la souche BL21 (DE3)-pETGO diluées 100 fois
- Piste 5 : Etalon de poids moléculaire SDS-PAGE standard (kDa)
- Piste 6 : Protéines totales extraites de la souche BL21 (DE3)-pETGO diluées 50 fois
- Piste 7 : Protéines totales extraites de la souche BL21 (DE3)-pETGO diluées 10 fois
- Piste 8 : Protéines totales extraites de la souche BL21 (DE3)-pETGO diluées 5 fois
- Piste 9 : Protéines totales extraites de la souche BL21 (DE3)-pETGO non diluées



**Fig. 31** : Western blot permettant de vérifier la spécificité des anticorps anti-glucose oxydase  
Le polysérum test a été épuisé en présence des protéines totales d'*Escherichia coli* transformé avec le plasmide pET-15b

Piste 1 : Protéines de glucose oxydase éluées et diluées 100 fois

Piste 2 : Protéines de glucose oxydase éluées et purifiées sur résine His-Tag

Piste 3 : Protéines de glucose oxydase éluées, purifiées sur résine His-Tag et digérées avec 0,1 unité de thrombine

Piste 4 : Protéines de glucose oxydase éluées, purifiées sur résine His-Tag et digérées avec 0,25 unité de thrombine

Piste 5 : Protéines totales extraites de la souche BL21 (DE3)-pETGO diluées 50 fois

Piste 6 : Protéines totales extraites de la souche BL21 (DE3)-pETGO diluées 10 fois

Piste 7 : Protéines de glucose oxydase éluées et diluées 100 fois

Piste 8 : Etalon de poids moléculaire SDS-PAGE standard (kDa)



peptide «tag», dans le système pET-15b, est la thrombine. Le site de clivage spécifique de cette enzyme (Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser) se trouve quelques acides aminés en aval de l'oligohistidine et en amont de la séquence d'intérêt de la protéine glucose oxydase.

La protéine purifiée par la résine His-Tag a été digérée avec différentes concentrations en thrombine comprise entre 0,0025 unité enzymatique et 1 unité enzymatique. La digestion enzymatique a été effectuée à 37°C pendant 6 heures.

#### *Les western-blots*

Après avoir vérifié, par dot blot, la présence d'anticorps dirigés contre la protéine glucose oxydase dans les polysérums, la dernière étape de ce mémoire a consisté à tester les polysérums, par western-blot, sur les protéines de BL21 (DE3). Les résultats obtenus lors de ces western-blots ont permis de vérifier la spécificité des anticorps produits par le lapin vis-à-vis d'un mélange de protéines.

Les protéines insolubles de la souche BL21 (DE3) transformée avec le gène de la glucose oxydase ont été solubilisées et déposées sur un gel SDS-PAGE 8 %. Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Celle-ci a ensuite été incubée en présence des différents polysérums.

- Rem : 1) la membrane n'a plus été testée en présence de polysérum naïf. Les dot-blots montrant, en effet, l'absence d'anticorps croissants avec la glucose oxydase.  
 2) la fixation non spécifique de l'anticorps secondaire a été vérifiée (résultats non montrés).

Le premier western-blot a été réalisé pour tester les anticorps du lapin contre les protéines totales extraites de la souche BL21 (DE3)-pETGO induite. En ce qui concerne le polysérum anti-glucose oxydase, une bande de poids moléculaire identique à celui de la protéine électroéluée est bien marquée (figure 30). Nous avons ainsi pu mettre en évidence la spécificité des anticorps anti-glucose oxydase pour la protéine glucose oxydase.

Lors du second western-blot, les différents polysérums ont été testés contre les protéines cibles purifiées sur résine His-Tag et digérées par la thrombine. Le western blot révèle, comme le précédent, une bande bien marquée dont le poids moléculaire est identique à celui de la protéine non digérée (figure 31). A ce stade, nous ne savons donc pas si la digestion à la thrombine a eu lieu et si le gel utilisé permet de révéler la perte d'un peptide de 17 acides aminés dont le poids moléculaire est inférieur à 1,8 kDa.

## DISCUSSION



## 5 DISCUSSION

Le choc oxydatif résultant de la reconnaissance du pathogène par le végétal est une réponse de défense précoce observée dans beaucoup d'interactions plante-pathogène. De plus, plusieurs études ont montré que cette réponse oxydative constituait un facteur direct de résistance et un signal modulateur des réponses de défense tardives. En effet, les molécules à oxygène actif peuvent agir comme agent toxique pour le pathogène à l'extérieur de la cellule, et comme messenger secondaire induisant des changements dans l'expression des gènes à l'intérieur des cellules infectées. Ces molécules sont également considérées comme des intermédiaires indispensables au déclenchement de la réponse hypersensible (mort programmée des cellules infectées).

Dans ce mémoire, nous nous sommes intéressés au pouvoir bactéricide et antifongique du peroxyde d'hydrogène et à la possibilité d'augmenter sa production dans la paroi cellulaire chez la chicorée industrielle. Cette plante est, en effet, confrontée à des problèmes phytosanitaires liés, notamment, à l'infection par la bactérie phytopathogène *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*.

Notre étude a débuté par le clonage du gène de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger*. Ce gène code pour une enzyme produisant du peroxyde d'hydrogène lors de la conversion du  $\beta$ -D-glucose en glucono- $\delta$ -lactone.

La chicorée a été transformée avec le gène de la glucose oxydase par la méthode d'infection des disques foliaires par *Agrobacterium tumefaciens*. Après quelques mois de régénération, plusieurs plantes transgéniques ont été obtenues. Au départ, celles-ci avaient une apparence «normale» puis ont «dégénéré». Les plantules transformées avec le gène de la glucose oxydase présentaient un phénotype particulier : absence de pigmentation et arrêt de la croissance.

Manifestement, l'introduction du gène de la glucose oxydase dans le génome de la chicorée est néfaste pour la survie de la plante. Nous ne savons cependant pas à quoi est due cette toxicité. Au moins deux hypothèses peuvent être posées:

- 1) la plante pourrait produire une quantité importante de peroxyde d'hydrogène qui lui serait néfaste;
- 2) l'événement d'intégration, lui-même, pourrait être à la base de la toxicité observée (hypothèse hautement improbable, voir ci-dessous).

Lors de travaux ultérieurs, plusieurs solutions devront être apportées afin d'obtenir des plantes transformées présentant un phénotype «normal» et produisant une quantité suffisante de peroxyde d'hydrogène pour repousser un agent pathogène.

- 1) Il faudra d'abord augmenter le nombre d'événements de transformation pour savoir si la construction utilisée donne systématiquement un phénotype «anormal». La transformation d'une plante par *Agrobacterium tumefaciens* est, en effet, un événement biologique peu contrôlable. L'expression du transgène est influencée par la force du promoteur utilisé, par la position du transgène dans le génome de la plante et par le nombre de copies du T-DNA dans le génome végétal.



- 2) Si la première solution échoue, le remplacement du promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur par un promoteur inductible permettrait d'induire la production de peroxyde d'hydrogène de manière transitoire, donc localisée dans le temps et dans l'espace (s'il y a un adressage de la glucose oxydase dans un organe particulier). Les promoteurs particulièrement intéressants sont ceux contrôlant l'expression des protéines PR (induction possible par l'acide salicylique).

Les anticorps anti-glucose oxydase que nous avons produits seront utilisés pour localiser la protéine glucose oxydase dans les plantes transgéniques. Pour ce faire, différentes techniques pourront être exploitées, telles que la localisation sur coupe microscopique ou les western-blots réalisés sur des extraits protéiques de différents organes de la plante transgénique.

Outre la production de peroxyde d'hydrogène dans la plante transgénique, il serait également intéressant d'étudier l'impact de cette production sur d'autres réponses de défense de la plante telles que l'activation de la synthèse de phytoalexines et l'activation des gènes de défense.

D'un point de vue écologique, il sera également nécessaire de modifier la construction utilisée ou le mode de transformation :

- 1) Le marqueur de sélection utilisé, la résistance à la kanamycine, pourra être remplacé par un gène de résistance à un herbicide. Les résistances les plus communément utilisées sont les résistances au Roundup® (surexpression du gène de la 5-enol-pyruvyl shikimate-3-phosphate synthase) et au BASTA® (gène de la phosphinotricine acétyl transférase), deux pesticides systémiques et biodégradables. Ce remplacement permettrait d'éviter le transfert horizontal, hautement improbable, d'un gène de résistance à un antibiotique de la plante à une bactérie de l'intestin des animaux ou de l'homme.
- 2) Le transgène ne doit pas être transmis à la flore sauvage qui serait ainsi dotée d'un avantage sélectif important puisqu'elle serait résistante aux agents pathogènes. En d'autres termes, il faut éviter que le transgène puisse être transmis via les grains de pollen. Il existe une technique de transformation particulière permettant d'introduire le transgène dans le chloroplaste, ce qui empêche son transfert via le pollen qui ne transmet pas de plastides à la descendance. Cette technique ne fonctionne actuellement que pour le tabac et pour des gènes de résistance à des herbicides (Daniell *et al*, 1998). Le développement de cette approche permettra la conception de nouvelles stratégies de transformation dans un avenir relativement proche.



## **BIBLIOGRAPHIE**

## 6 BIBLIOGRAPHIE.

- Allan, A. C., Fluhr, R. (1997). Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* 9 : 1559-1572.
- Berridge, M.J. (1993). Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 361 : 315-325.
- Bowles, D.J. (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Plant Physiol.* 102 : 233-240.
- Brett, C., Waldron, K. (1990). *In* physiology and biochemistry of plant cell walls. Topics in plant physiology 2. Eds Black and Chapman. Unwin . Hyman Ltd, London.
- Brisson, L.F., Tenhaken, R., Lamb, C.J. (1994). Fonction of oxydative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6 : 1703-1712.
- Chang, C. (1996). The ethylene signal transduction pathway in *Arabidopsis* : an emerging paradigm ? *Trends in biology science* 21 : 129-133.
- Chasan, R. (1995). SA : Source or signal for SAR ? *Plant Cell* 7 : 1519-1521.
- Choi, D., Ward, B. L., Bostock, R.M. (1992). Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* 4 : 1333-1344.
- Chow, C. M., Kao, C. H. (1992). Methyl jasmonate, calcium and leaf senescence in rice. *Plant Physiol.* 99 : 1693-1694.
- Creelman, R.A., Mullet, J.E.(1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Plant Physiol.* 48 : 355-381.
- Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S., Lee, S-B. (1998). Containment of herbicide resistance through genetic engineering of chloroplast genome. *Nat. Biotechnol.* 16 : 345-348.
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H. (1996). Death don't have no mercy : cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 6 : 1793-1807.
- Dempsey, D.A., Klessig, D.F. (1994). Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends In Cell Biology* 4 : 334-338.
- Devoto, A., Leckie, F., Lupotto, E., Cervone, F., De Lorenzo, G. (1998). The promoter of a gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein of *Phaseolus vulgaris* L. is activated by wounding but not by elicitors or pathogen infection. *Planta* 205 : 165-174.
- Du, H., Klessig, D. F. (1997). Role for salicylic acid in the activation of defense responses in catalase-deficient transgenic tobacco. *Molecular Plant - Microbe Interactions* 10 : 922-925.



- Durner, J., Shah, J., Klessig, D.F. (1997).** Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* 2 : 226-274.
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P., Raskin, I. (1992).** Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell* 70 : 879-886.
- Farmer, E.E., Ryan, C. A. (1990).** Interplant communication : airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 7713-7716.
- Farmer, E.E., Ryan, C. A. (1992).** Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4 : 129-134.
- Foyer, C., Noctor, G., Morot-Gaudry, J.-F. (1997).** L'oxygène : bienfait ou danger pour les plantes. *Biofutur* 169 : 27-29.
- Frederick, K.R., Tung, J., Emerick, R.S., Masiarz, F.R., Chamberlain, S.H., Vasavada, A., Rosenberg, S. (1990).** Glucose oxidase from *Aspergillus niger* : cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *J. Biol. Chem.* 265 : 3793-3802.
- Fry, S.C. (1988).** The growing plant cell wall : chemical and metabolic analysis. M. Wilkins, Ed. Longman scientific and technical, Harlow.
- Greenberg, J. T. (1997).** Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Plant Physiol.* 48 : 525-545.
- Grimes, H. D., Koetje, D. S., Franceschi, V. R. (1992).** Expression, activity, and cellular accumulation of methyl jasmonate-responsive lipoxygenase in soybean seedlings. *Plant Physiol.* 100 : 433-443.
- Hahlbrock, K., Scheel, D. (1989).** Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40 : 347-369.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (1997).** Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48 : 575-607.
- Hahn, M.G. (1996).** Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34 : 387-412.
- Hansen, J.D., Hannapel, D.J. (1992).** A wound-inducible potato inhibitor gene expressed in non-tuber-bearing species is not sucrose inducible. *Plant Physiol.* 100 : 164-169.
- He, Z.H., Fujiki, M., Kohorn, B.D. (1996).** A cell wall associated receptor-like kinase. *J. Biol. Chem.* 271 : 19789-19793.
- Hew, C.S. (1987).** The effects of 8-hydroxyquinoline sulfate ; acetylsalicylic acid and sucrose on bud opening of *Oneidium* flowers. *J. Hort. Sci.* 62 : 75-78.



- Kauss, H., Krause, K., Jeblick, W. (1992).** Methyl jasmonate conditions parsley suspension cells for increased elicitation of phenylpropanoid defense responses. *Biotechnological and Biophysical Research Communications* 189 : 304-308.
- Lamb, C. J., Dixon, R.A. (1997).** The oxydative burst in plant disease resistance. *Ann. Rev. Plant. Physiol Plant Mol. Biol.* 48 : 251-275.
- Legendre, L., Yueh, Y.G., Haddock, N., Heinstein, P.F., Low, P.S. (1993).** Phospholipase C activation during elicitation of the oxidative burst in cultured plant cells. *J. Biol. Chem.* 268 : 24559-24563.
- Lessl, M., Lanka, E. (1994).** Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. *Cell* 77 : 321-324.
- Low, P. S., Merida, J. R. (1996).** The oxidative burst in plant defense : function and signal transduction. *Physiologia Plantarum* 96 : 533-542.
- Malamy, J., Sanchez-Casas, P., Henning, J., Guo, A., Klessig, D. F. (1996).** Dissection of the salicylic acid signaling pathway in tobacco. *Molecular Plant - Microbe interactions* 9 : 474-482.
- Mc Dougall, G.J. (1992).** Changes in cell wall-associated peroxidases during the lignification of flax fibres. *Phytochemistry* 31 : 3385-3389.
- Mehdy, M. (1994).** Active oxygen species in plant defense against pathogen. *Plant Physiol.* 105 : 467-472.
- Montillet, J.-L., Degoussée, N. (1991).** Hydroperoxydases induce glyceollin accumulation in soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 29 : 694-696.
- Qin, X.-F., Holuigue, L., Horvath, D.M., Chua, N.-H. (1994).** Immediate early transcription activation by salicylic acid via the cauliflower mosaic virus as-1 element. *Plant Cell* 6 : 863-874.
- Raskin, I., Ehmann, A., Melander, W.R., Mecuse, B.J.D. (1987).** Salicylic acid, a natural inducer of heat production in *Arum lilies*. *Science* 237 : 1545-1556.
- Reinbothe, S., Mollenhauer, B., Reinbottre, C. (1994).** JIPs and RIPs : the regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell* 6 : 1197-1209.
- Reinbothe, S., Reinbottre, C., Lehmann, J. Parthier, B. (1992).** Differential accumulation of methyl jasmonate-induced mRNAs in response to abscisic acid and dissociation in barley. *Physiologia Plantarum* 86 : 49-56.
- Semal, J. (1989).** *Agrobacterium tumefaciens*, agent d'ingénierie génétique naturelle. In *Traité de pathologie végétale* (Semal, J., eds). Presses agronomiques de Gembloux, pp. 507-513 (ISBN 2-87016-033-X).



- Sheng, J., Citovsky, V. (1996).** *Agrobacterium*-plant cell DNA transport : have virulence proteins, will travel. *Plant Cell* 8 : 1699-1710.
- Slay, R.M., Watada, A.E., Frost, D.J., Wasserman, B.P. (1992).** Characterization of the UDP-glucose (1,3)- $\beta$ -glucan (callose) synthase from plasma membrane of celery : polypeptide profiles and photolabeling patterns of enriched fractions suggest callose synthase complexes from various sources share common structure. *Plant Science* 86 : 125-136.
- Smith, N. (1998).** More T-DNA than meets the eye. *Trends in Plant Science* 3 : 85.
- Somssich, I.E., Hahlbrock, K. (1998).** Pathogen defence in plants : a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science* 3 : 86-90.
- Stafstrom, B., Staehelin, L.A. (1986).** Cross-linking patterns in salt extractable extensin from carrot cell walls. *Plant Physiol.* 81 : 234-241.
- Tinland, B. (1996).** The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends in Plant Sciences* 1 : 178-184.
- Tsuji, J., Jackson, E.P., Gage, D.A., Hammerschmidt, R., Somerville, S.C. (1992).** Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol.* 98 : 1304-1309.
- Vernooij, B., Uknes, S., Ward, E., Ryals, J. (1994).** Salicylic acid as a signal molecule in plant-pathogen interactions. *Cell Biology* 6 : 275-279.
- Waffenschmidt, U.W. (1993).** Isodityrosine cross-linking mediates insolubilisation of cell walls in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 5 : 809-820.
- Wasternack, C., Parthier, B. (1997).** Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends In Plant Science* 2 : 302-307.
- Wilfinger, W.W., Mackey, K., Chomczynski, P. (1997).** Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22 : 474-481.
- Willekens, H., Inzé, D., Van Montagu, M., Van Camp, W. (1995).** Catalases in plant. *Molecular Breeding* 1 : 207-228.
- Wu, G., Shortt, B. J., Lawrence, E.B., Levine, E.B., Fitzsimmons, K.C., Shah, D.P. (1995).** Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7 : 1357-1368.
- Wurgler-Murphy, S.M., Saito, H. (1997).** Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends in biology science* 22 : 172-176.