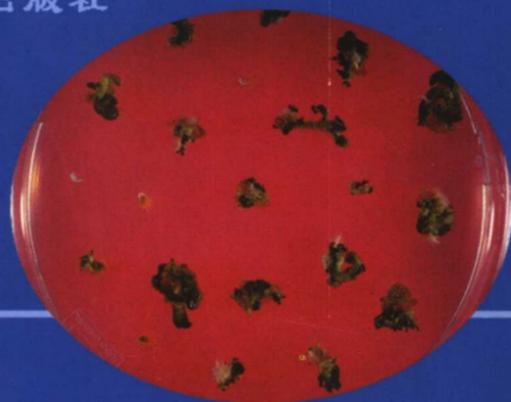


Plant Regeneration and
Agrobacterium-mediated
transformation
in *Hyoscyamus niger* L.

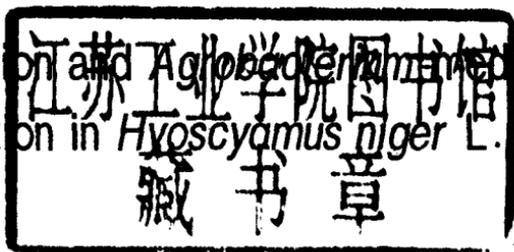
Contribution À L'étude
De La Régénération
Et De La Transformation
Par Agrobactéries,
Chez La Jusquiame noire

Shanjun Tu (屠善军) 著
黑龙江科学技术出版社



**Contribution À L'étude De La
Régénération Et De La Transformation Par
Agrobactéries, Chez La Jusquiame noire**

Plant Regeneration and Agrobacterium mediated
transformation in *Hyoscyamus niger* L.



Shanjun Tu (屠善军) 著

黑龙江科学技术出版社
中国·哈尔滨

图书在版编目(CIP)数据

黑天仙子体细胞发育及遗传转化体系研究/屠善军著.
哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,2006.8
ISBN 7-5388-5175-5

I.黑... II.屠... III.茄科—草本植物—体细胞
—遗传—研究—法文 IV.Q949.720.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 084415 号

责任编辑 常瀛莲
封面设计 洪 冰
版式设计 汪 涟

**Contribution À L'étude De La Régénération Et De La
Transformation Par Agrobactéries, Chez La Jusquiame noire
Plant Regeneration and Agrobacterium-mediated
transformation in *Hyoscyamus niger* L.**

Shanjun Tu (屠善军) 著

出 版 黑龙江科学技术出版社

(150001 哈尔滨市南岗区建设街 41 号)

电话 (0451)53642106 电传 53642143(发行部)

印 刷 黑龙江龙新印刷有限公司

发 行 黑龙江科学技术出版社

开 本 850×1168 1/32

印 张 6.125

字 数 168 000

版 次 2006 年 8 月第 1 版·2006 年 8 月第 1 次印刷

印 数 1-1 000

书 号 ISBN 7-5388-5175-5/Q·7

定 价 20.00 元

INTRODUCTION

La Biotechnologie végétale est une technologie en progrès. Elle représente de nos jours une partie importante des techniques scientifiques d'avant - garde. Elle se base sur les différentes méthodes de culture *in vitro* de cellules et de tissus végétaux, et s'associe avec la Biologie moléculaire.

Les techniques de culture *in vitro* ont été développées pendant une grande partie de ce siècle, et ceci, depuis 1902 (Haberlandt).

A partir de ce moment là et jusqu'à la fin des années 1950, diverses techniques de culture ont été développées. La théorie de la "totipotence" d'une seule cellule fut démontrée, et la théorie de la régulation par des hormones de la formation des organes fut améliorée.

Après les années 1960, ces travaux ont stimulé les technologies de culture de cellules et de tissus végétaux, pour aboutir au développement de la multiplication végétative en masse, ou micro-propagation industrielle, à l'obtention de plantes saines à partir de méristèmes de plantes virosées, à la production de métabolites secondaires, à la création de nouvelles espèces, à la conservation de graines de haute qualité. Ces techniques complètes de culture *in vitro* pallièrent certains des défauts des méthodes classiques de sélection de variétés comme par exemple l'utilisation des méthodes conventionnelles d'hybridation qui nécessitent beaucoup de temps pour identifier des génotypes et aboutir à la création de nouvelles variétés. De plus, des caractères indésirables étaient également sus-

ceptibles d'être présents dans la descendance.

Depuis les années 1980, l'usage des techniques de l'ADN recombinant et les études sur la façon de transférer ces gènes chez des plantes réceptrices ont élargi ce domaine. Ces travaux ont rendu possible la manipulation génétique de manière intensive et approfondie. Ces nouvelles techniques permettent d'aborder des aspects fondamentaux tels que la fixation de l'azote et son assimilation, l'adaptation de la plante à diverses conditions de culture, la production de métabolites secondaires, l'identification et l'isolement de certains gènes d'intérêt existant chez les espèces sauvages et leur transfert dans les génomes végétaux. Depuis, la Biotechnologie végétale a un impact très important sur les aspects de l'agriculture ou de l'industrie pharmaceutique. De plus en plus de pays utilisent et/ou développent la Biotechnologie végétale afin d'améliorer l'environnement de l'Homme.

La Biotechnologie végétale est un domaine pluridisciplinaire. La gamme de recherche est très large, par exemple, régénération de plantes, les relations entre morphologie et développement des cellules végétales, l'hybridation somatique (fusion de protoplastes), l'analyse du génome végétal ("gene mapping"), le clonage de gènes et leur expression dans divers systèmes, les technologies de fermentation, "RFLP", "RAPD", sont des sujets abordés par la Biotechnologie végétale.

Notre étude traite un des aspects de la Biotechnologie végétale: la recherche du potentiel de régénération de plantes et l'application à la transformation génétique au moyen d'*Agrobacterium* chez une plante médicinale, la Jusquiame noire (*Hyoscyamus niger*). Les techniques de transformation génétique de plantes par *Agrobacterium*, découvertes les années 1980, sont en pleine expansion depuis

les années 90. Leurs objectifs principaux portent sur l'obtention de plantes résistantes à divers pesticides, insecticides et autres herbicides, à des maladies ainsi que sur le développement des améliorations concernant les processus de transformation des produits végétaux à l'échelle industrielle.

ABREVIATIONS

A. :	<i>Agrobacterium</i>
AIA:	acide indole acétique
AIB:	acide indole butyrique
ANA:	acide naphthalène acétique
APS:	persulfate d'ammonium
AS:	acétosyringone
BAP:	6 - benzylaminopurine
CTAB :	"hexadecyltrimethyl - ammonium bromide"
2, 4 - D:	acide 2, 4 - dichlorophénoxyacétique
DAPI:	4', 6 - diamidino - 2 - phenylindole
FCM:	cytophotométrie en flux
GC - MS:	chromatographie phase gazeuse - spectrométrie de masse
GUS:	β - glucuronidase
H. :	<i>Hyoscyamus</i>
HPLC:	chromatographie liquide haute performance
HPT:	hygromycine phosphotransférase
2iP:	N6 - (2 - isopentenyl) adenine
Km ^R :	résistant à la kanamycine
LB:	bordure gauche
LB:	milieu de Luria Broth (Miller, 1972)
LS:	Linsmaier and Skoog (1965)
MES:	acide morpholino - éthane sulfonique
MI:	myo - inositol

Contribution À L'étude De La Régénération Et De La
Transformation Par Agrobactéries, Chez La Jusquiame noire

MS:	Murashige and Skoog (1962)
NN:	Nisch and Nisch (1969)
NEpHGE:	"non - equilibrium pH gradient electrophoresis"
NOS:	nopaline synthase
NPTII:	néomycine phosphotransférase II
PCR:	réaction d'amplification d'ADN
MU:	methylumbelliferone
MUG:	4 - methylumbelliferyl β - D - glucuronide
PVP:	polyvinylpyrrolidone
RB:	bordure droite
RMN:	Résonance magnétique nucléaire
SDS - PAGE:	"sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis"
SSC:	"NaCl + sodium citrate"
TBE:	"Tris - borate + EDTA"
T - DNA:	acide désoxyribonucléique transféré
TEMED:	N, N, N', N' - tetramethylethylenediamine
TLC:	chromatographie sur couche mince
X - Gluc:	sel cyclohexylammonium de l'acide 5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - β - D - glucuronique

SOMMAIRE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	(1)
1. HISTOIRE DE LA CULTURE <i>IN VITRO</i>	(1)
1.1 Hypothèse, essai et démonstration de la totipotence de la cellule végétale	(1)
1.2 Culture d'anthères et de pollen	(2)
1.3 Isolement et culture des protoplastes, génie génétique	(3)
2. HISTORIQUE DE LA TRANSFORMATION	
GENETIQUE	(4)
2.1 Une maladie: la Galle du collet	(4)
2.2 Les tumeurs et les opines	(6)
2.3 Les plasmides Ti - éléments oncogènes	(6)
2.4 Le plasmide et les ADN transférés	(7)
2.5 Une maladie: Racines chevelues ("Hairy root")	(8)
3. LA TRANSFORMATION GENETIQUE CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES	(12)
3.1 Moyens d'introduction de gènes étrangers	(12)
3.2 <i>Agrobacterium</i> : un vecteur de transformation génétique	(12)
3.3 Marqueurs de sélection pour la transformation végétale	(14)
3.4 La production de plantes transgéniques	(19)
4. APPROCHE PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE	

DU POTENTIEL DE REGENERATION CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES	(23)
— Les relations entre l'embryogenèse somatique et l'expression de gènes	(23)
CONTEXTE DE L'ETUDE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX	(27)
1. SITUATION GENERALE DE LA RECHERCHE CHEZ LA JUSQUIAME NOIRE	(27)
2. OBJECTIFS DES PRESENTS TRAVAUX	(28)
MATERIELS ET METHODES	(29)
1. MATERIEL VEGETAL	(29)
1.1 Source	(29)
1.2 Stérilisation et préparation des explants	(29)
1.2.1 Les anthères	(29)
1.2.2 Les graines pour la germination	(30)
1.2.3 Les graines pour les embryons zygotiques ..	(31)
2. MILIEUX DE CULTURE	(31)
2.1 Milieu pour la culture d'anthères	(32)
2.2 Milieu de germination	(32)
2.3 Milieux de culture de racines chevelues	(32)
2.4 Milieux de transformation génétique	(32)
2.4.1 Milieux de sélection de cellules transformées	(32)
2.4.2 Milieux d'enracinement	(32)
2.5 Milieu de culture d'embryons zygotiques	(32)
3. SOUCHE D'AGROBACTERIUM	(33)
3.1 <i>Agrobacterium</i> et plasmides	(33)
3.1.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	(33)
3.1.2 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	(34)

3.2	Stockage des Agrobactéries (cryoconservation) ...	(35)
3.3	Protocole de transformation génétique	(35)
3.3.1	Inoculum agrobactérien	(35)
3.3.2	Coculture du matériel végétal avec <i>Agrobacterium</i>	(35)
3.3.3	Sélection des cellules transformées	(37)
4.	CONDITIONS DE CULTURE <i>IN VITRO</i>	(38)
5.	ETUDES MICROSCOPIQUES	(39)
5.1	Préparation des échantillons et observation par microscope photonique	(39)
5.2	Préparation des échantillons et observations en microscopie électronique à balayage	(40)
6.	DETERMINATION ET DOSAGE DES ALCALOÏDES	(41)
6.1	Extraction d'alcaloïdes	(41)
6.2	Dosage d'alcaloïdes par la technique de "HPLC"	(41)
6.3	Séparation des alcaloïdes par la chromatographie sur couche mince ("TLC")	(42)
7.	TESTS HISTOCHIMIQUES ET SPECTROFLUOROMETRIQUE	(43)
7.1	Protocole du test histochimique avec le X - Gluc	(43)
7.2	Protocole de mesure de la fluorescence	(44)
7.2.1	Extraction de l'enzyme	(44)
7.2.2	Réaction enzymatique	(44)
8.	TESTS DE CALLOGENESE ("Recallusing assay")	(44)
9.	EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ADN	

GENOMIQUE VEGETAL	(45)
9.1 Extraction	(45)
9.2 Purification	(47)
9.3 Confirmation et quantification de l'ADN	(48)
9.4 Restriction enzymatique et électrophorèse d'ADN digéré	(48)
9.5 Transfert d'ADN sur membrane de nylon	(49)
10. PREPARATION DE LA SONDE (POUR HYBRIDATION DE SOUTHERN)	(49)
10.1 Extraction d'ADN à partir de plasmide pBI101	(49)
10.2 Purification d'ADN par ultracentrifugation	(50)
10.3 Isolement de fragments portant les gènes GUS et/ou NPT II	(51)
10.4 Marquage de sonde par α - 32 P dCTP	(52)
11. REACTION DE L'AMPLIFICATION D'ADN (" Polymerase chain reaction " ou PCR)	(53)
11.1 Principe de PCR	(53)
11.2 Composants de PCR	(54)
11.3 Réaction d'amplification	(55)
11.4 Electrophorèse et photographie	(55)
11.5 Transfert d'ADN sur membrane de nylon	(56)
12. HYBRIDATION DE SOUTHERN	(56)
13. ANALYSE DE PROTEINES	(57)
13.1 Extraction des protéines	(57)
13.2 Electrophorèse monodimensionnelle (" SDS - PAGE ")	(59)
13.3 Electrophorèse bidimensionnelle	(59)
13.4 Fixation, coloration et révélation des	

polypeptides	(60)
13.5 Séchage des gels	(60)
14. CYTOMETRIE EN FLUX	(61)
14.1 Principe	(61)
14.2 Présentation de l'utilisation du DAPI	(61)
14.3 Extraction des noyaux et coloration	(62)
14.4 Analyse de la ploïdie	(62)
15. TRAITEMENTS STATISTIQUES DES DONNEES	(62)
RESULTATS ET DISCUSSION	(65)
Chapitre 1. Maîtrise de la régénération <i>in vitro</i> chez la Jusquiame noire	(65)
1.1 Production de plantes par androgenèse	(66)
1.1.1 Régénération de plantes à partir d'anthères	(66)
1.1.2 Discussion et conclusion partielle	(67)
1.2 Régénération de plantes à partir d'embryons zygotiques excisés, via l'embryogenèse somatique	(68)
1.2.1 Embryogenèse somatique	(69)
1.2.2 Régénération des plantes et niveau de ploïdie	(69)
1.2.3 Effets des régulateurs de croissance, et de leurs combinaisons avec la glutamine et l'hydrolysate de caséine, sur l'embryogenèse somatique	(70)
1.2.4 Effets de différentes concentrations d'acide morpholinoéthane sulfonique (MES) et de myo - inositol (MI) sur l'embryogenèse	

Contribution À L'étude De La Régénération Et De La
Transformation Par Agrobactéries, Chez La *Jusquiame* noire

	somatique	(72)
1.2.5	Effets du MES et du MI sur la capacité de conversion des embryons somatiques en plantules.	(73)
1.2.6	Effets du MES sur le pH pendant l'embryogenèse somatique	(76)
1.2.7	Discussion partielle	(77)
1.3	Vérification de l'état de dédifférentiation et contrôle des profils protéiques après électrophorèse pendant l'embryogenèse somatique chez la <i>Jusquiame</i> noire	(79)
1.3.1	Observations microscopiques	(80)
1.3.2	Profils protéiques après électrophorèse	(80)
1.3.3	Discussion partielle et conclusion	(82)
Chapitre 2.	Transformation et régénération de plantes transgéniques de <i>Jusquiame</i> noire	(85)
2.1	Production des racines chevelues ("hairy roots") par les souches d' <i>A. rhizogenes</i>	(85)
2.1.1	Production de "hairy roots" et Test histochimique GUS	(85)
2.1.2	Effet du temps de germination sur la production des racines chevelues.	(87)
2.1.3	Essais de cultures des racines chevelues	(88)
2.1.4	Discussion partielle	(88)
2.2	Mise au point d'une technique pour la production de plantes transgéniques par l'intermédiaire d' <i>A. tumefaciens</i>	(90)
2.2.1	Essais de sensibilité à la kanamycine	(90)
2.2.2	Essais de sensibilité à l'hygromycine	(91)

2.2.3	Obtention de cals transformés résistants à la kanamycine.	(91)
2.2.4	Formation de bourgeons et régénération de plantes entières transgéniques	(94)
2.3	Etude de quelques facteurs affectant l'efficacité de la callogénèse après infection par	
	<i>A. tumefaciens</i>	(98)
2.3.1	Influence de la durée de coculture sur la callogénèse	(98)
2.3.2	Influence de la durée de préculture et de la température de culture sur la callogénèse	(100)
2.3.3	Influence de la souche bactérienne et de l'origine de l'explant sur la callogénèse	(103)
2.3.4	Influence du milieu de culture	(104)
2.3.5	Test histochimique GUS	(105)
2.4	Facteurs influençant l'efficacité de la transformation précoce après infection par	
	<i>A. tumefaciens</i>	(106)
2.4.1	Influence de l'origine de l'explant	(106)
2.4.2	Influence de l'acétosyringone	(107)
2.4.3	Répartition de "l'activité GUS précoce" à partir de différents types d'explants	(107)
2.5	Discussion partielle	(108)
Chapitre 3. Données supplémentaires: Contrôle des alcaloïdes par "HPLC" et "TLC"		
3.1	Dosage par la technique "HPLC"	(112)
3.2	Tests qualitatifs par la technique "TLC"	(113)
3.3	Discussion partielle	(114)

Contribution À L'étude De La Régénération Et De La
Transformation Par Agrobactéries, Chez La Jusquiame noire

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	(118)
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	(120)
PLANCHE I	(156)
PLANCHE II	(157)
PLANCHE III	(158)
PLANCHE IV	(159)
PLANCHE V	(160)
PLANCHE VI	(161)
PLANCHE VII	(162)
PLANCHE VIII	(164)
PLANCHE IX	(165)
PLANCHE X	(166)
ANNEXE 1	(167)
ANNEXE 2	(168)
ANNEXE 3	(169)
ANNEXE 4	(170)
ANNEXE 5	(172)
ABSTRACT	(173)
RESUME	(176)

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. HISTOIRE DE LA CULTURE *IN VITRO*

1.1 Hypothèse, essai et démonstration de la totipotence de la cellule végétale

L'idée de la totipotence cellulaire a été émise, dès 1838, par Schleiden, puis par Schwann en 1839. Mais, c'est Haberlandt qui, en 1902, fit le premier essai sur milieu de culture et obtint la survie d'amas cellulaires pendant une longue période. Son expérience ne fut pas une réussite parce qu'il n'y eut pas de multiplication cellulaire. Ce sont White (1934) et d'autres chercheurs (Went and Thimann 1937; Gautheret 1937, 1938) qui ont obtenu, en utilisant les auxines (AIA) dans le milieu, des cultures indéfinies de racines. Leurs résultats furent publiés en même temps que ceux de Nobécourt (1937, 1938a, b) se rapportant à la prolifération des cellules de Carotte et au développement de bourgeons de jeunes feuilles du *N. glauca* x *N. langsdorffi*. Les travaux de recherche se rapportant à l'induction de la différenciation vasculaire ont été menés par Camus en 1949. Par la suite, d'autres auteurs travaillèrent sur les facteurs contrôlant la différenciation de tissus vasculaires (Wetmore and Sorokin, 1955; Wetmore and Rier, 1963; Jeffs and Northcote 1967). C'est au cours des études sur l'induction de bourgeons à partir d'explants de Tabac par Miller et Skoog (1953) que fut découverte la