



UNIVERSITÉ
D'EVRY-VAL-D'ESSONNE



Licence 3^{ème} Année
Parcours Biologie Cellulaire et Physiologie

Université d'Evry-Val d'Essonne

TP de Biotechnologies Végétales

TRANSGENESE VEGETALE
PRODUCTION DE PROTOPLASTES

Année 2012-2013

Enseignants : Aurélie Andrieu et Nathalie Boudet

Ces séances de travaux pratiques permettront de transformer de manière stable des disques foliaires de tabac et de manière transitoire des feuilles de tabac par l'intermédiaire de cellules d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant des plasmides portant les gènes d'intérêt (gène *endo1*) et de sélection (kanamycine). Des tests d'activité d'ENDO1 seront effectués ainsi que la production de protoplastes.

J-4 (ces manipulations seront effectuées par les enseignants)

Prélevez une colonie isolée à partir d'une boîte de Pétri (LB agrobacterium+ kanamycine (50 mg/l) à l'aide d'un cure dent stérile.

Ensemencez 5 ml de milieu liquide LB + kanamycine (50 mg/l). Faire pousser à 28°C pendant 24h sous agitation (200 rpm).

J-2 (ces manipulations seront effectuées par les enseignants)

Prélever 1 ml de la pré-culture d'*Agrobacterium* et inoculer 50 ml de milieu liquide LB agrobacterium contenant de la kanamycine (50 mg/l). Faire pousser à 28°C pendant 48h sous agitation (200 rpm).

Première séance de TP : incubation de disques foliaires de tabac en présence d'Agrobactéries pour la transformation stable et préparation de la matrice pour tester l'activité d'endo1 en troisième séance.

- Transformation de disques foliaires

Jour J

Se laver les mains très soigneusement avec du savon. Se sécher les mains rapidement. Passez-vous ensuite les mains à l'alcool (en ayant vérifié au préalable l'absence dans le voisinage de toute flamme) en vous servant d'une pissette d'alcool. Frottez-vous les mains énergiquement pour les sécher (ne pas utiliser de tissu ou de serviette).

Centrifuger les bactéries à 3500 rpm pendant 15 minutes afin de culoter les bactéries. Reprendre ce culot dans du tampon MS liquide.

Mesurer la densité optique de la culture d'*Agrobacterium tumefaciens* à 600nm (DO 600 nm = 1 correspond à une densité de 2.10^8 cellules/ml).

Chaque binôme prélève plusieurs feuilles de *Nicotiana benthamiana*. Après les avoir lavées à l'eau claire, les mettre dans une boîte de Pétri et les déposer sous la hotte.

Prendre un béccher de 500 ml et y verser 450 ml d'eau stérile dans lequel vous aurez dilué un morceau de cachet de javel. Immerger les feuilles (le pétiole en haut) pendant 20 minutes en agitant légèrement de temps en temps. Pendant ce temps préparer 3 autres bécchers de 500ml remplis d'eau stérile.

Avec une pince stérile, prendre la feuille par son pétiole et la plonger dans le premier béccher en agitant doucement. L'enlever du premier béccher et la plonger dans le second béccher d'eau. Renouveler pour le troisième béccher. Laisser les feuilles dans le dernier bain d'eau stérile. A la fin, déposez la feuille délicatement entre deux feuilles de papier filtre stérile afin de la sécher.

Préparez deux épaisseurs de papier filtre, stérilisez les pinces et passez à l'alcool l'emporte pièce. Sortir la feuille de tabac de l'eau et déposez la feuille délicatement entre deux feuilles de papier filtre stérile afin de la sécher. Puis déposer **face inférieure vers le haut** sur un autre papier filtre. En évitant les nervures, découpez une trentaine de disques foliaires. Pour cela, positionnez l'emporte pièce bien verticalement sur la feuille, appuyez doucement et tournez l'emporte pièce. A l'aide d'une pince, immerger les disques foliaires dans les différentes solutions (avec ou sans *Agrobacterium*) pendant 60 secondes **face inférieure vers le milieu liquide**. Ensuite, prélevez un à un les disques foliaires et les déposez sur une couche de papier filtre afin que l'excédent d'*Agrobacterium* soit absorbé des 2 cotés des disques foliaires. NE PAS RINCER A L'EAU LES DISQUES. Déposez les disques, face inférieure de la feuille bien à plat sur le milieu, sur une boîte de Pétri contenant un milieu nutritif de type "shooting". Scellez les boîtes avec du parafilm et les mettre dans l'incubateur (25°C avec un cycle nuit/jour 6h/18h).

Pensez aux différents milieux qui devront être utilisés à partir de J+2 afin d'avoir tous les contrôles nécessaires ainsi que le milieu permettant d'obtenir les plantes transformées.

J+2 (ces manipulations seront effectuées par les enseignants)

A l'aide d'une pince stérile, transférez un à un les disques sur une boîte de Pétri contenant un milieu nutritif de type "shooting" contenant 200 mg/l de Céfotaxine (pour éliminer les *Agrobacterium*) et en absence ou présence de 50 mg/l de kanamycine (pour sélectionner les cellules végétales ayant été transformées).

Semaines suivantes (ces manipulations seront effectuées par les enseignants)

Les premières pousses apparaissent sur le pourtour des disques foliaires environ 3 semaines après la transformation. Au moindre signe de contamination, les disques seront transférés sur de nouvelles boîtes du milieu correspondant.

- Préparation de la matrice pour le test d'activité ENDO1: Amplification du fragment d'ADN par PCR

ENDO 1 est une endonucléase qui reconnaît les mésappariements au sein d'une molécule d'ADN double brin. Ainsi afin de tester cette activité nous devons avoir à notre disposition un fragment d'ADN contenant un mésappariement. Pour ce faire nous allons réaliser une PCR à partir de deux plasmides (M5 et M12) dont leur séquence ne diffère que d'une paire de bases.

Voici les éléments que vous avez à votre disposition :

- Tampon PCR à la concentration de 10X
- Amorces sens et antisens à la concentration de 10 μ M
- Enzyme Taq polymérase
- Eau distillée
- Plasmides M5 et M12

Réfléchissez à tous les contrôles que vous devez réaliser afin d'avoir une expérience scientifique.

Quelles sortes de produits PCR obtient-on ?

Vous réaliserez des PCR dans un volume total de 20 μ l.

Tp10X= 2 μ l

dNTP=1 μ l

ADN M5=1 μ l

ADN M12=1 μ l

Amorce sens=1 μ l

Amorce antisens=1 μ l

Taq=1 μ l

H₂O=12 μ l

Cycle PCR :

94°C pendant 5 minutes

94°C pendant 15 secondes

60°C pendant 30 secondes

72°C pendant 1 minute

} 40 cycles

72°C pendant 5 minutes

Vérification des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Avec 5 μ l de produit PCR + 5 μ l de tampon de charge. La taille attendue pour les produits M5 et M12 est de 661 pb.

Deuxième séance de TP : Observation et repiquage des cals et des plantules transformés et transformation transitoire de feuille de tabac et préparation de protoplastes

- Transformation transitoire de feuilles de tabac :

L'expression transitoire de la protéine ENDO1 va être obtenue par agroinfiltration. L'agroinfiltration est une infiltration d'une solution d'*Agrobacterium* contenant un plasmide portant le gène *endo1*, dans des feuilles de tabac (*N.benthamiana*). Pour cela une culture de ces agrobactéries ainsi qu'une culture d'agrobactéries portant un suppresseur du silencing (système naturel de défense des plantes contre les pathogènes), ici le suppresseur p19, ont été mis en culture à J-2 par les enseignants.

Au jour J :

Une centrifugation de ces cultures bactériennes est effectuée pendant 15 minutes à 3500g. Le culot est repris dans la solution d'agroinfiltration (MES 10mM pH5.6, MgCl₂ 10mM, Acétylsyringone 100mM).

Les solutions d'agrobactéries sont incubées pendant 2 heures à température ambiante et la DO est mesurée au spectrophotomètre à 600nm. Les solutions doivent avoir une DO comprise entre 0,6 et 0,8. Faire les dilutions nécessaires avec la solution d'agroinfiltration si besoin est.

Mélanger les deux solutions d'agrobactéries selon le ratio 1/3 d'agrobactéries p19 et 2/3 d'agrobactéries *endo1*.

Les feuilles de tabac sont délicatement agroinfiltrées à l'aide d'une seringue sans aiguille de 1 ml sur la face inférieure des feuilles.

Les feuilles de tabac sont délicatement agroinfiltrées à l'aide d'une seringue sans aiguille de 1 ml sur la face inférieure des feuilles.

- Observation et repiquage des cals

Sous la loupe binoculaire, observez les différents stades des cals et plantules sur les différentes boîtes de milieux. N'oubliez pas de bien regarder les milieux que vous observez afin de voir si vos résultats sont cohérents.

Sous la hotte, excisez grâce aux pinces et au scalpel (stériles) les pousses vertes d'au moins 0.5 cm en essayant de repérer l'apex.

Repiquez verticalement (l'apex vers le haut!) chaque pousse sur une boîte de Pétri contenant du milieu nutritif type "racines" contenant 200 mg/l de Céfotaxime et 50 mg/l de kanamycine. Enfoncez la pousse de 1 à 2 millimètres dans la gélose.

Lorsque les premières racines apparaissent, transférez les pousses dans un petit pot individuel contenant du milieu nutritif type "racines" contenant 200 mg/l de Céfotaxime et 50 mg/l de kanamycine. Enfoncez la pousse de 1 à 2 millimètres dans la gélose.

- Production des protoplastes : voir protocole joint

Troisième séance de TP :

Test de l'activité d'ENDO1 et rédaction du compte-rendu

- Test d'activité :

ENDO 1 est une enzyme de la classe des endonucléases qui coupe donc l'ADN au milieu de la séquence et non pas à partir des extrémités 5'phosphate et 3'OH. L'activité va donc être testée par digestion d'une séquence d'ADN qui contient une mutation.

Préparation des extraits végétaux

Prélever environ quelques grammes de matériel végétal. Bien faire attention à quelle catégorie de plantules vous vous intéressez. Les transférer dans un mortier.

Broyer sur glace en présence de tampon d'extraction pendant environ 1 à 2 minutes. Conservez les extraits sur glace jusqu'au moment de la mesure de l'activité. Pensez à noter les volumes dans lequel vous avez broyé les différents échantillons.

Mesure de la teneur en protéines

Faire un courbe talon de BSA allant de 1 µg à 30 µg. Pour cela utilisez différents volumes d'une solution stock de BSA de concentration 1mg/ml. Complétez le volume des échantillons de la courbe étalon à 100 µl avec de l'eau.

Prendre 10 µl de chaque échantillon d'extrait végétal. Complétez le volume des échantillons de la courbe étalon à 100 µl avec de l'eau.

Complétez avec 1 ml de la solution de Bradford et laisser incuber pendant 5 minutes.

Lire la densité optique à 595 nm.

Test de l'activité ENDO 1

Centrifuger les extraits cellulaires 5 minutes à 4°C à 3500g.

Faire une dilution de vos échantillons au 1/10^{ième}, 1/20^{ième}, 1/50^{ième}, 1/100^{ième}, 1/500^{ième}, 1/1000^{ième}.

Vous allez avoir à votre disposition des échantillons d'ADN qui contiennent ou non une mutation (sauvage et mutant) et que nous avons au préalable dissociés et réassociés de façon à créer des homoduplexes (association complète de deux brins sauvages ou de deux brins mutants) ou des hétéroduplexes (association d'un brin sauvage ou d'un brin mutant et qui ne sont donc pas appareillés à 100%) (préparé en première séance de TP)

Vous allez faire des incubations pendant 45 minutes à 37°C avec

- 5µl de votre échantillon dilué ou non dilué
- 3µl de tampon de réaction
- 5µl du mélange homoduplexe-hétéroduplexe
- qsp 30µl d'eau

Pendant l'incubation vous allez préparer un gel d'agarose 1% de façon à analyser les résultats de la digestion.

Après 45 minutes de digestion vous allez rajouter 5µl de tampon de charge pour ADN. Vous déposerez ensuite les produits de digestion sur le gel d'agarose.

Mettre à migrer à 100V. Ne pas oublier de déposer 10 μ l d'un marqueur de taille afin de pouvoir déterminer la taille des produits obtenus.

II Les milieux utilisés et tampon

MS 30 : 30 g de saccharose
4.4 g “Murashige et Skoog basal medium”
8g/l agar-agar type E
Ajuster le pH à 5.8 avec KOH
Autoclaver

Milieu “shooting”

MS30
1mg/l BAP (6-benzylaminopurine)
Céfotaxine 200mg/l
+/- Kanamycine 50 mg/l

Milieu “racines”

MS 30
Céfotaxine 200mg/l
+/- Kanamycine 50 mg/l

Tampon d'extraction

Tris-HCl	50 mM pH7
Triton X100	0.1 %
EDTA	10 mM
DTT	3mM