N° d'ordre : 951

50376
1982
41

50376
1982
H 1

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

Spécialité : "Amélioration et Transformation des Productions Végétales et Microbiennes"

Option MICROBIOLOGIE

par

Laurent CASSIER

ESSAIS D'INCORPORATION DE DNA BACTERIEN DANS DES PROTOPLASTES DE TABAC

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

Soutenue le 11 février 1982 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :	MM.	J. GUILLAUME	Président
		R. TAILLIEZ	Rapporteur
		R. BOURIQUET	
		J. KREMBEL	
		J. DUBOIS	Examinateurs

Au moment où s'achève cette étude, il m'est particulièrement agréable de témoigner à Monsieur le Professeur GUILLAUME toute ma gratitude. En m'accueillant dans le Laboratoire de Microbiologie, il n'a cessé, au cours de ces trois années, de suivre et de guider mes travaux. Qu'il en soit vivement remercié.

Ma reconnaissance va à Monsieur le Professeur TAILLIEZ dont les observations formulées avec beaucoup de patience ont permis la rédaction de ce Mémoire.

Je remercie Messieurs les Professeurs KREMBEL et BOURIQUET d'avoir gentiment accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur DUBOIS pour l'aide et les conseils précieux qu'il m'a apportés. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde sympathi

Je n'oublie pas Madame BONNIER et Mademoiselle CASSIER qui ont réalisé les travaux de dactylographie de ce Mémoire. C'est avec beaucoup de gentillesse qu'elles ont accepté cette charge, je leur renouvelle toute ma gratitude.

Il me tient à coeur d'exprimer ici ma reconnaissance à Philippe EB et ma profonde sympathie à Claudine BERTOUT pour leurs aides et leurs conseils précieux. Que ce Mémoire soit pour eux et pour Madame LETOQUART l'assurance d'une amitié sincère.

Enfin, je remercie le personnel, les étudiants et tous les chercheur du laboratoire, dont certains sont devenus mes amis.

I N T R O D U C T I O N

I HISTORIQUE 5

1.1 ISOLEMENT ET CULTURE DES PROTOPLASTES 5

111 Isolement mécanique 6

112 Isolement enzymatique 6

113 Méthode de culture 8

114 Régénération des parois et division des protoplastes 9

1.2 INTERET DES PROTOPLASTES EN RECHERCHE APPLIQUEE 10

121 Synthèse de la paroi cellulaire 11

122 La sélection clonale 11

123 Fusion des protoplastes et hybridation somatique 11

124 Transformation génétique 15

1.3 TRANSFORMATION VEGETALE PAR INCORPORATION 15

131 Pénétration de microorganismes et d'organites cellulaires. 16

132 Infection par des virus 20

133 Modification du génome d'une cellule végétale par du DNA bactérien 20

II BUT DE NOS RECHERCHES 26

M A T E R I E L E T T E C H N I Q U E S

I MATERIEL 27

11 MATERIEL BACTERIEN 27

12 MATERIEL VEGETAL 27

121 Le tabac 27

122 Les protoplastes 27

1221 Préparation du matériel 29

1222 Hydrolyse des parois pecto-cellulosiques 29

1223 Récupération et culture des protoplastes 30

II TECHNIQUES 31

21 TECHNIQUES D'OBSERVATIONS CYTOLOGIQUES 31

211 Microscopie optique 31

212 Microscopie électronique 31

213 Comptage des protoplastes 33

22 MISE EN EVIDENCE DE LA VITALITE DES PROTOPLASTES 33

23 ISOLEMENT DES FRACTIONS CELLULAIRES CHEZ LES PROTOPLASTES 33

231 Isolement des noyaux 33

232 Extraction et purification du DNA nucléaire 34

24 MILIEUX DE CULTURE BACTERIENS 35

241 Milieux riches 35

242 Milieu minimum 36

25 MARQUAGE DU DNA BACTERIEN 36

26 EXTRACTION ET PURIFICATION DU DNA BACTERIEN 37

261 Méthode de MARMUR 37

262 Méthode de KIM ICHIRO MIURA 39

27 ANALYSE DU DNA PAR ULTRACENTRIFUGATION 40

271 Gradients neutres de CsCl 40

272 Collecte et analyse des gradients 41

28 TECHNIQUES DE PENETRATION 41

281 Pénétration cellulaire 41

2811 Toxicité des adjuvants 42

2812 Milieu de pénétration 42

2813 Mesure de la radioactivité 43

2814 Etude de la cinétique de contact 43

2815 Incorporation par les protoplastes de précurseurs radioactifs 44

282 Pénétration nucléaire 44

2821 Sur des noyaux isolés 45

28211 Méthode directe 45

28212 Méthode indirecte 45

2822 Sur des cellules entières 46

28221 Méthode directe 46

28222 Méthode indirecte 46

R E S U L T A T S E T C O M M E N T A I R E S

I ISOLEMENT ET UTILISATION DES PROTOPLASTES DE TABAC 48

11 EVOLUTION DES PROTOPLASTES EN CULTURE 48

12 PROTOCOLE EXPERIMENTAL 55

II PREPARATION ET MARQUAGE DU DNA DE RHIZOBIUM MELILOTI 55

21 RECHERCHE D'UNE METHODE DE PREPARATION DE DNA DE RHIZOBIUM MELILOTI 55

22 MARQUAGE RADIOACTIF DU DNA DE RHIZOBIUM MELILOTI 57

221 Essais préliminaires 57

222 Choix d'une souche adénine dépendante 57

223 Protocole expérimental 59

III MISE AU POINT D'UNE METHODE DE PENETRATION 61

31 DETERMINATION DES DOSES TOXIQUES EN PLL ET PLO 61

32 TECHNIQUES DE PENETRATION 69

321 Choix des milieux 69

322 Traitement à la deoxyribonucléase 69

323 Résumé du protocole expérimental adopté 71

IV MISE EN EVIDENCE DES PENETRATIONS CYTOPLASMIQUES DE DNA DE RHIZOBIUM MELILOTI 71

41 ETUDE DE LA RADIOACTIVITE INCORPOREE DANS LES FRACTIONS ACIDO-INSOLUBLES DES PROTOPLASTES 71

42 ETUDE CINETIQUE DES PENETRATIONS CYTOPLASMIQUES 73

43 ETAT DU DNA EXOGENE APRES PENETRATION 76

431 Etat du DNA étranger non capturé 76

432 Etat du DNA étranger capturé 77

44 QUANTIFICATION DES PENETRATIONS CYTOPLASMIQUES 77

441 Quantification du DNA exogène lié ou capturé 77

442 Quantification du DNA exogène capturé 79

443 Dénaturation cytoplasmique du DNA exogène 81

V MISE EN EVIDENCE DES PENETRATIONS DE DNA DE RHIZOBIUM MELILOTI DANS DES NOYAUX DE TABAC 81

51 RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMALES POUR L'ISOLEMENT DE NOYAUX A PARTIR DES PROTOPLASTES DE TABAC 83

511 Protocole expérimental pour des noyaux d'Avena sativa 84

512 Modifications technologiques apportées 84

52 ETUDE DE LA CAPACITE D'INCORPORATION DE PRECURSEUR RADIOACTIF PAR DES NOYAUX ISOLES 87

53 ETUDE DE L'INCORPORATION DE DNA EXOGENE DE RHIZOBIUM MELILOTI PAR DES NOYAUX ISOLES 89

531 Etude directe 89

532 Etude indirecte par analyse en gradient de chlorure de césium 90

5321 Détermination des"densités apparentes" des DNA de Rhizobium meliloti et de tabac 90

5322 Etude de l'incorporation de DNA exogène par des noyaux isolés et analyse en gradient de CsCl 92

54 ETUDE DE L'INCORPORATION NUCLEAIRE DE DNA EXOGENE DE RHIZOBIUM MELILOTI PAR DES PROTOPLASTES DE TABAC 97

541 Etude directe 97

5411 Détermination du DNA total capturé 97

5412 Détermination du DNA étranger non dénaturé capturé 98

542 Etude indirecte 99

D I S C U S S I O N - C O N C L U S I O N 101

B I B L I O G R A P H I E 106

LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE

"D'un point de vue économique et politique, les conséquences d'une maîtrise par l'homme de la fixation biologique de l'azote seraient considérables, aussi bien en France que pour les pays en voie de développement.

Pour ne prendre que deux exemples, on peut faire remarquer que l'utilisation intensive des engrais azotés pour la production agricole oblige la France à importer un surplus de pétrole et que les besoins en protéines d'origine végétale pour l'élevage l'obligent à importer d'énormes quantités de soja.

La fixation biologique de l'azote est réalisée seulement par quelques espèces bactériennes possédant un complexe enzymatique désigné sous le nom de nitrogénase qui catalyse la réduction de l'azote pour donner de l'ammoniac selon la réaction $N_2 + 6\ H^+ + 6\ e^- \rightleftharpoons 2\ NH_3$.

Parmi ces bactéries, certaines vivent en symbiose avec les plantes. Le système symbiotique le plus étudié est celui qui s'établit entre la bactérie "Rhizobium" et les Légumineuses. Ces bactéries qui vivent dans le sol, pénètrent dans les racines des Légumineuses et y induisent la formation de nodosités dans lesquelles elles prolifèrent. Dans ces conditions, les Rhizobium fixent efficacement l'azote atmosphérique, et l'ammoniac formé est ensuite utilisé par la plante pour sa propre croissance. On estime que cette symbiose permet selon les types de plantes et de sols une fixation de 40 à 400 kg d'azote par hectare et par an.

Pour conférer à des plantes non légumineuses les propriétés symbiotiques des Légumineuses, un des moyens envisagés par les chercheurs consisterait à intégrer dans le génome des premières, les gènes bactériens de la fixation de l'azote appelés gènes "nif". Ces plantes ainsi modifiées pourraient alors se développer sur des sols ne contenant aucune source d'azote.

La génétique de la fixation de l'azote est maintenant suffisamment développée pour que l'on sache transférer les gènes "nif" de bactéries fixatrices dans des bactéries non fixatrices et qui, de ce fait, le deviennent. Toutefois le problème du transfert des gènes "nif" dans des cellules végétales et celui de leur expression dans ces cellules est d'une autre dimension et tout-à-fait à la limite des techniques actuelles.

On peut imaginer que dans ce domaine les progrès se feront comme suit : grâce à des vecteurs, comme des virus végétaux ou des plasmides, on pourra introduire des gènes bactériens dans des cellules végétales dépourvues de paroi (protoplastes) et étudier l'expression de ces gènes dans ces cellules, puis dans des plantes entières après régénération.

Même si ces recherches demeurent spéculatives, il n'en demeure pas moins qu'elles se réaliseront un jour ou l'autre et leur impact sera considérable".

- Sciences et Vie, Décembre 1980

Les perspectives très optimistes de cet article résument assez bien la finalité des travaux du laboratoire. La compréhension de cette symbiose n'est que partielle et à l'heure actuelle il est impossible d'envisager le transfert et l'expression des gènes "nif" dans une cellule végétale.

Notre travail se résume donc en des essais d'incorporation de DNA radioactif issu de Rhizobium, dans des cellules végétales, à l'état protoplaste . Ultérieurement, nous déterminerons si ce DNA exogène est capable de s'intégrer au génome de la cellule végétale.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, sous la direction de Messieurs les Professeurs J.B. GUILLAUME et R. TAILLIEZ.

I N T R O D U C T I O N

Le terme "Protoplaste" a été défini comme étant "la partie d'une cellule végétale susceptible d'être plasmolysée et se trouvant délimitée par la paroi cellulaire, on peut isoler un protoplaste par destruction enzymatique ou mécanique de la paroi cellulaire. Le protoplaste est donc une cellule nue délimitée par sa membrane cytoplasmique, il est potentiellement capable de régénérer sa paroi, de se développer et se multiplier" (VASIL - 1980 (1)).

L'absence de paroi rigide (enveloppe paraplasmique) implique un contact direct de la cellule avec le milieu extérieur, lui conférant une indépendance vis-à-vis des lois régissant les rapports entre les cellules de la plante entière. Ces cellules végétales ainsi modifiées sont capables lors de leur formation, d'inclure des particules par "endocytose". Ce phénomène de pénétration peut être réalisé avec du DNA, des virus, des bactéries, des chloroplastes, etc... Pour les mêmes raisons, ces protoplastes sont capables, à faible fréquence, de fusionner entre eux lorsqu'ils sont en suspension dans un milieu adéquat ; ces fusions permettent d'aboutir à des hybridations somatiques lors d'incompatibilités sexuelles ; ainsi l'obtention d'hybrides interspécifiques devient possible, puisque une cellule isolée est totipotente donc potentiellement capable de régénérer une plante entière.

I - HISTORIQUE

Dès 1913, GIAJA (2) obtint des protoplastes végétaux par dégradation des parois cellulaires de levures au moyen de suc digestif d'escargot ; les protoplastes obtenus possédaient encore un mécanisme respiratoire et fermentaient les sucres.

KUSTER en 1928 (3) isole des cellules d'oignon par plasmolyse et séparation mécanique ; mais ce n'est qu'en 1960, avec des méthodes plus sophistiquées que l'on recueille en grande quantité des cellules isolées dont la transformation aboutit à des protoplastes. La multiplication de ceux-ci est obtenue par passages sur des milieux de cultures de tissus végétaux.

En 1969, TAKEBE (4) obtint, pour la première fois en grande quantité et de façon aseptique des protoplastes de tabac par voie enzymatique, il réussit à les maintenir en culture, après élimination des produits toxiques utilisés lors de la dégradation des parois.

Les premiers travaux sur les protoplastes portent bien évidemment sur la régénération d'une plante entière à partir d'une cellule isolée. Pour surmonter cette difficulté des méthodes d'isolement et de culture ont été élaborées par de nombreuses équipes.

1.1 - ISOLEMENT ET CULTURE DES PROTOPLASTES

Les protoplastes étant des cellules isolées et dépourvues de paroi, ils ne peuvent être obtenus que par voie expérimentale. A ce jour, nous ne connaissons que deux méthodes d'isolement : mécanique ou enzymatique.

1.1.1 - *Isolement mécanique* :

Cette technique n'est utilisée que sur des tissus composés de cellules allongées et fortement vacuolisées. On induit la plasmolyse cellulaire, ce qui sépare le plasmalemme de la paroi cellulaire ; pour dégager les protoplastes ainsi formés, on coupe les tissus en petits fragments, la section des parois libérant les protoplastes dans le milieu. Cette méthode donne des rendements très faibles, elle est principalement utilisée pour des études, en microscopie électronique, de régénération de paroi (PRAT - 1972 (5)).

1.1.2 - *Isolement enzymatique* :

En règle générale, les protoplastes sont obtenus par macération d'un tissu végétal dans un mélange enzymatique comprenant des cellulases et des pectinases (COCKING - 1960 (6) ; GAMBORG - 1975 (7)). Ces enzymes permettent une destruction rapide et simultanée de la lamelle moyenne et de la cellulose qui composent la paroi végétale (POWER - 1970 (8)) (FIGURE I). Très souvent les protoplastes sont obtenus à partir des feuilles, la température optimale de macération enzymatique varie de 25 à 30° C sauf pour certaines espèces de céréales (POTRYKUS - 1977 (9)) qui demandent un passage à température faible. Le milieu de macération est toujours hypertonique afin d'éviter l'éclatement des cellules dont les parois sont en voie d'élimination.

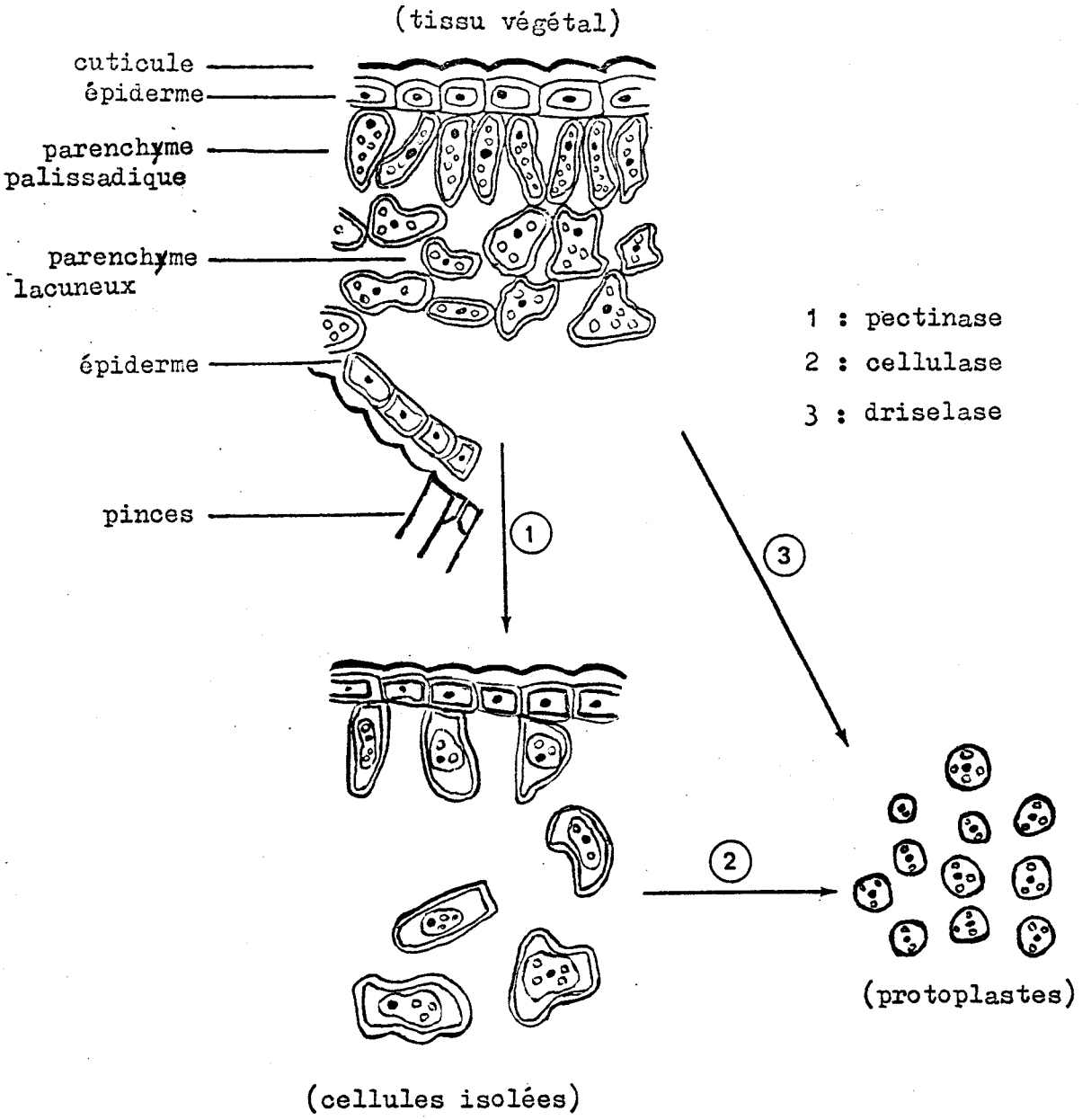


FIGURE N° 1 : Isolement enzymatique de protoplastes végétaux (représentation schématique)

BUS LILLE

Une culture de protoplastes est dite viable si l'on peut mettre en évidence la régénération des parois puis la division cellulaire ; pour distinguer les cellules mortes des vivantes, nous pouvons nous servir des tests de fluorescence de la paroi et du contenu cytoplasmique

(KANAI - 1973 (10) ; LARKIN - 1976 (11)). Les organes les plus employés pour l'obtention des protoplastes sont les feuilles et les racines, mais il est aussi possible de partir de tissus cultivés "in vitro". Pratiquement tous les tissus végétaux sont à même de donner des protoplastes (TABLEAU I).

Racine	COCKING, 1960 (6), VASIL et VASIL, 1974 (12)
Feuille	TAKEBE, 1968 (4), DURAND, 1973 (13).
Fruit	RAJ et HERR, 1971 (14)
Nodule	DAVEY, 1973 (15)
Coléoptile	COCKING, 1972 (16)
Microspore	BHOJWANI, 1972 (17)
Tube pollinique	CONDEELIS, 1974 (18)
Tissu "in vitro"	SCHENK et HILDEBRANDT, 1969 (19)
Suspension cellulaire	VARDI, 1975 (20)

TABLEAU I : TISSUS LES PLUS EMPLOYES POUR L'OBTENTION DE PROTOPLASTES.
(Liste non limitative des auteurs)

1.1.3 - Méthode de culture :

Les milieux utilisés pour les protoplastes sont très voisins de ceux que l'on emploie lors de la culture des tissus et des cellules multipliées "in vitro". L'absence de paroi cellulaire implique une intégration plus rapide par ces cellules des divers éléments du milieu et

l'on observe de fréquents phénomènes de toxicité. La mise au point d'un milieu est souvent laborieuse, mais presque tous ont pour base le milieu de MURASHIGE et SKOOG (21) et le milieu "B_5" de GAMBORG (12).

Les cultures de protoplastes peuvent s'effectuer de diverses manières :

- En suspension cellulaire dans une boîte de Petri ; c'est le cas le plus général ;

- Les cultures en gouttes, ou sous faible volume. Elles permettent de suivre les cultures au microscope (GRAMBOW, 1972 (23) - GAMBORG, 1973 (24)) ;

- Les cultures en milieux semi-solides : les protoplastes en suspension sont mélangés avec un volume égal de milieu gélosé à 1 ou 2 % (NAGATA, 1971 (25)) ;

- Les Microcultures : dans une micro-cupule, on suit le développement d'une cellule ; dans ce cas, il s'agit d'un véritable clonage (VASIL, 1973 (26) - DURAND, 1973 (13)).

1.1.4 - Régénération des parois et division des protoplastes

Avant 1970 (POJNAR, 1967 (27) - MISHRA, 1969 (28)), peu d'exemples de régénération ont été observés (NAGATA, 1970 (29)). La régénération d'une paroi commence après 10 à 20 minutes de culture, les premières microfibrilles de celle-ci sont visibles entre 8 et 24 heures (BURGESS, 1977 (30)). L'opération commence par la synthèse intra-cytoplasmique de précurseurs à partir des saccules golgiennes et du plasmalemme ; ces précurseurs sont ensuite excrétés vers le périplasme où ils sont progressivement assemblés en superstructures à trois dimensions (les microfibrilles),

puis en un vaste réseau résistant et continu autour de la cellule ; enfin ce réseau est remanié dans sa structure et sa composition pour former une paroi primaire se distinguant d'une paroi normale par son organisation moins complexe (FOWKE, 1974 (31) - FOWKE, 1978 (32)). Cette régénération qui dure de 2 à 7 jours précède toujours la division cellulaire ; il est même impossible d'obtenir une mitose sans cette régénération (VASIL, 1976 (33)).

Après 1 à 3 semaines, on obtient des colonies cellulaires qui peuvent "in vitro" être cultivées sous forme de cals (milieu solide) ou de suspension cellulaire (milieu liquide).

1.1.5 - Régénération de plantes entières :

En 1971, deux équipes ont obtenu simultanément la régénération de plantes entières à partir de protoplastes issus de mésophyles de tabac (NITSCH et OHYAMA, 1971 (34) - TAKEBE, LABIB et MELCHERS, 1971 (35)) ; depuis la liste s'est sensiblement allongée, mais les régénérations demeurent toujours difficiles, voire impossibles, pour les céréales et les légumineuses.

1.2 - INTERET DES PROTOPLASTES EN RECHERCHE APPLIQUEE

On pourrait se demander quel est l'intérêt de préparer des protoplastes, puisque rapidement ils reconstituent des cellules entières... En fait, cette propriété permet d'aborder d'une manière nouvelle divers problèmes de cytologie et de physiologie végétale. Les recherches dans ce domaine sont essentiellement les suivantes :

- L'étude de la synthèse des parois cellulaires chez les végétaux ;
- La sélection génétique à partir d'une cellule isolée ;
- L'étude des fusions entre deux ou plusieurs protoplastes intra ou interspécifiques ;
- La transformation génétique d'une cellule végétale par incorporation de particules tels que : virus, levure, bactérie, DNA ou RNA exogène, etc...

1.2.1 - *Synthèse de la paroi cellulaire* :

Les protoplastes permettent l'observation de la synthèse des parois cellulaires. Les modalités de la néosynthèse des parois ont été essentiellement étudiées en microscopie électronique dès 1967 par POJNAR et ses collaborateurs (27 et 36) ; puis par d'autres : MISHRA et COLVIN, 1969 (28) ; NAGATA et TAKEBE, 1970 (29) ; PRAT et ROLLAND, 1971 (37).

1.2.2 - *La sélection clonale* :

En 1973, CARLSON (38), sélectionne une souche de tabac résistante à une toxine bactérienne. Pour cela, il fait subir à des clones cellulaires issus de protoplastes haploïdes de grains de pollen, un traitement mutagène. En présence de la toxine bactérienne, quelques clones résistent. Grâce à la colchicine, il double le stock chromosomique de ces clones mutants et régénère des plantes diploïdes résistantes à la toxine.

1.2.3 - *Fusion des protoplastes et hybridation somatique* :

Les protoplastes, de par leur absence de paroi, ont la possibilité de fusionner. BINDING en 1966 (39) observe les premières fusions chez

des protoplastes de mousse. Il était dès lors prévisible que le contrôle de ce phénomène permettrait l'obtention d'hybrides somatiques interspécifiques en cas d'incompatibilité sexuelle. Les premières fusions intra et inter spécifiques ont été réalisées en 1970 par POWER (40) et KELLER (4), puis en 1971 par POTRYKUS (42).

Les fusions spontanées sont visibles lors de la dégradation enzymatique des parois cellulaires ; de telles fusions peuvent également se produire par simple accolement de 2 cellules en pré-division (VASIL, 1976 (33)). Les fréquences de ces fusions spontanées varient suivant les espèces de 1 à 5 % (POWER, 1972 (43)).

Depuis longtemps, on cherche à augmenter la fréquence de ces fusions. En 1973, KELLER et MELCHERS (44) décrivent une technique basée sur l'addition d'ions Ca^{2+}. En 1974, KAO (45) et WALLIN (46) préconisent l'emploi d'ions Ca^{2+} conjointement au polyéthylène- glycol (PEG) qui provoque l'agglutination des protoplastes. Des observations similaires sont décrites en 1978 par NAGATA (47) avec du polyvinyl-alcool. Le PEG reste le produit le plus couramment utilisé, il induit des fusions à des fréquences très élevées.

Le mode d'action des agents fusionnants s'explique de la manière suivante : la charge de surface des protoplastes varie de - 25 à - 35 mV, elle tombe à 0 mV lors d'addition de Ca^{2+} (NAGATA, 1978 (48)). Cette brusque variation provoque l'agglutination des protoplastes : cette dernière est plus importante en présence de PEG.

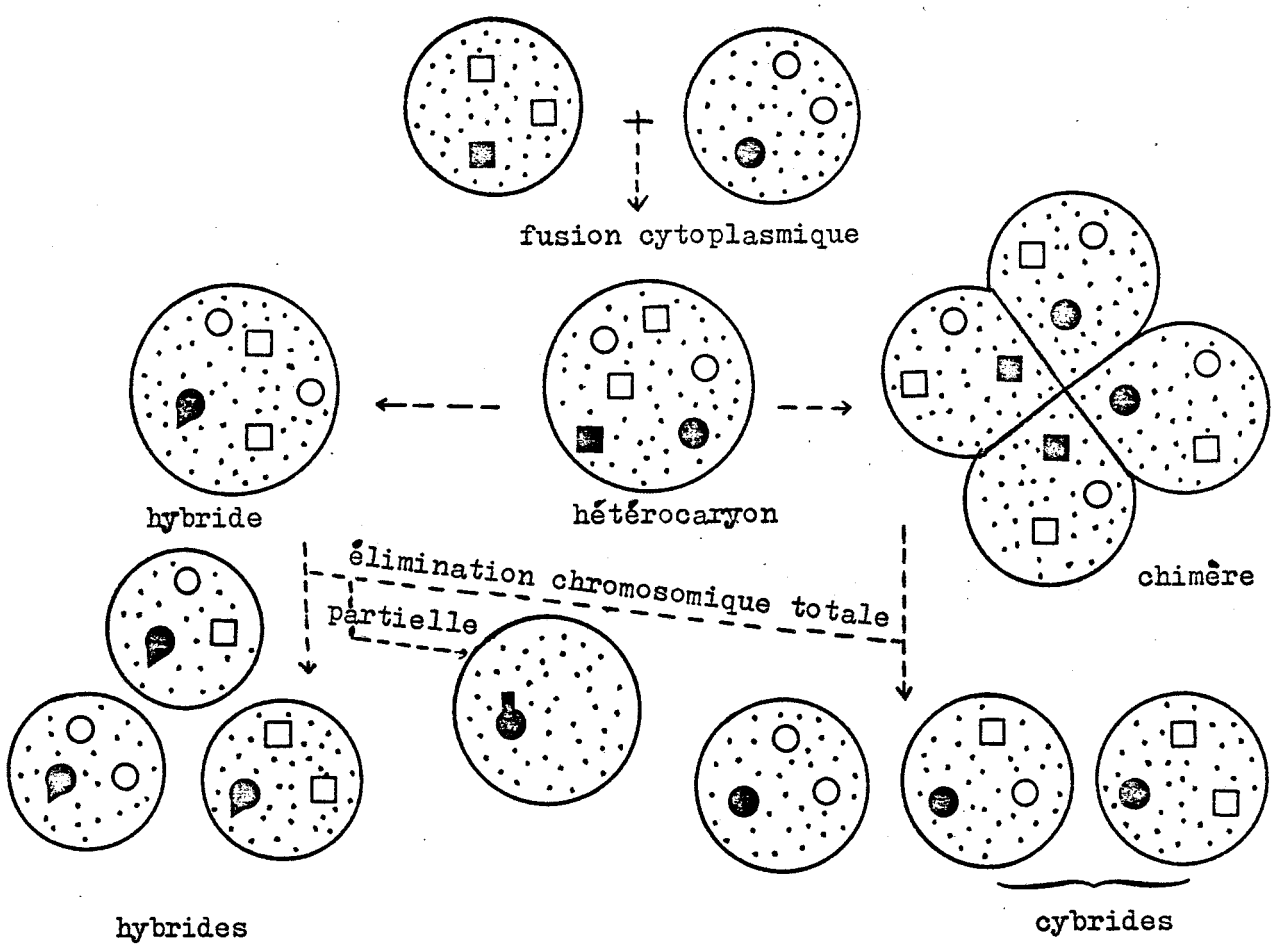


FIGURE N° 2 : Quelques situations cellulaires résultant du développement d'un hétérocaryon " in vitro "

- noir = noyau
- blanc = organite cytoplasmique

(d'après CHUPEAU, 1978(49))

BUS LILLE

Tous les produits de fusion (FIGURE II) ne sont pas semblables, on obtient des cellules parentales, cybrides ou hybrides (CHUPEAU, 1978 (50)). Sans plus attendre, certaines équipes ont mis à profit ces techniques pour étendre les hybridations somatiques à des couples très éloignés sur le plan taxonomique. Deux résultats spectaculaires ont été ainsi obtenus ; le premier est un hybride entre deux solanacées, la tomate et la pomme de terre (MELCHERS, 1978 (51)) ; le deuxième entre deux crucifères Arabidopsis thaliana et Brassica campestris (GLEBA, 1978 (52)). Dans le premier cas, les examens cytologiques ont montré que le nombre chromosomique ne correspond pas à la stricte addition des génomes parentaux, il y a donc certainement stérilité pour cette nouvelle plante. Dans le deuxième exemple, l'analyse des cals révèle leur nature hybride, mais la régénération donne des plantules anormales capables de fleurir, mais stériles.

La fusion de deux cellules végétales permet le mélange de deux cytoplasmes ; c'est ainsi qu'une équipe française (BELLIARD et PELLETIER, 1978 (53)) met en évidence l'hérédité cytoplasmique. Elle utilise deux variétés de tabac dont la forme des feuilles, caractère à hérédité mendelienne sous contrôle d'un gène nucléaire, varie. Ces variétés se différencient aussi grâce à un caractère transmis par le cytoplasme de la plante utilisée comme femelle. Ce caractère, s'il s'exprime, provoque une stérilité mâle s'accompagnant d'une morphologie florale anormale. Ces deux marqueurs génétiques ont permis de distinguer diverses catégories de plantes régénérées à partir de protoplastes fusionnés issus des deux variétés. De 70 à 90 % des plantes étaient de l'un ou l'autre type parental, 6 % de la population pré-

sentait une morphologie foliaire intermédiaire avec un nombre double de chromosomes caractéristique de l'hybride sexuel : ce sont les hybrides somatiques. Enfin, 8 à 24 % des plantes possédaient des feuilles de l'un ou l'autre type parental, mais leurs fleurs étaient soit caractéristique de l'autre parent, soit d'un type intermédiaire. De ces résultats, nous ne retiendrons que les observations suivantes :

- La fusion de protoplastes permet l'obtention de nouvelles plantes possédant les caractéristiques nucléaires de l'un des deux parents avec les caractéristiques cytoplasmiques de l'autre ;

- Dans le cas des plantes possédant des fleurs d'un type intermédiaire, le nouveau phénotype floral est stable et se transmet par voie maternelle. Ces plantes possèdent un cytoplasme hybride, ce sont des cybrides.

1.2.4 - *Transformation génétique* :

La transformation génétique d'une cellule végétale par incorporation de particules ou d'organismes étrangers (tels que : virus, levure, bactérie, DNA ou RNA exogène) se rapporte très exactement à notre travail, nous l'étudierons en détail dans la partie suivante.

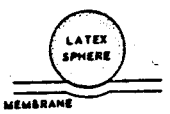
1.3 - TRANSFORMATION VEGETALE PAR INCORPORATION

La transformation du génome d'une plante par du matériel génétique étranger a été tentée par LEDOUX en 1965 (54) sur des cellules isolées. Depuis, nous disposons des protoplastes qui présentent dès leur isolement une grande activité métabolique pour synthétiser "de novo" une nouvelle paroi. Cela se traduit par une augmentation des relations entre le milieu

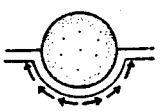
intra et extra-cellulaire, la membrane cytoplasmique est donc le siège de nombreux échanges (perméabilité et endocytose) (COCKING, 1976 (55)). L'absence de paroi, la fragilité de la membrane cytoplasmique et l'intense activité métabolique permettent d'envisager sans trop de difficultés la pénétration de particules étrangères dans ces cellules.

1.3.1 - *Pénétration de microorganismes et d'organites cellulaires* :

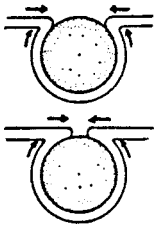
WILLISON, en 1971 (56), montre que des protoplastes de tomate sont capables d'inclure par endocytose des billes de latex de 0,1 µm de diamètre (FIGURE 3). Cette endocytose, qui peut être suivie en microscopie électronique, aboutit à la formation d'une vésicule membranaire contenant la bille de latex



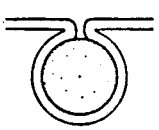
1 : phase d'adsorption
distorsion de la membrane
tension de surface



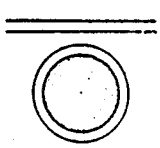
2 : Déformation initiale de la membrane
augmentation de la surface de contact
énergie d'origine cellulaire : la sphère est presque englobée



3 : Phase rapide de vésiculisation
la particule est englobée par la membrane



4 : Fin de vésiculisation



5 : Vésicule à l'état libre dans le cytoplasme

FIGURE 3 : Endocytose d'une sphère de latex par un protoplaste de tomate d'après WILLISON, 1971 (56)

En 1969, COCKING et POJNAR (57) décrivent un système analogue lors de l'infection de protoplastes végétaux par des virus : les capsides protéiques de ces virus semblent être entourées d'une vésicule d'endocytose. En 1975, TAKEBE (58) étudiant l'inoculation des protoplastes de tabac par le virus TMV n'observe pas de vésicule d'endocytose, par contre ces virus s'intègrent et se répliquent en utilisant le protoplaste comme cellule hôte ; il existe donc plusieurs systèmes de pénétration, seule l'endocytose est véritablement commune.

Si les inclusions de particules de moins de 0,5 µm semblent faiblement réalisables, il n'en va pas de même pour les plus importantes. DAVEY et COCKING, en 1972 (59), réalisent la capture, par des protoplastes de pois, de bactéries du genre Rhizobium, le mécanisme est très proche de l'endocytose, mais il est nécessaire de pratiquer une légère plasmolyse du protoplaste par un traitement au PEG (Polyéthylène Glycol). Le PEG favorise l'adhésion entre les microorganismes et les protoplastes, il induit une légère plasmolyse provoquant des dépressions sur la membrane cytoplasmique dans lesquelles sont piégés les microorganismes (DAVEY, 1975 (60)). En fin de compte, les bactéries sont incluses dans des vésicules de plasmolyse fort semblables aux vésicules d'endocytose.

De bonnes photographies, en microscopie optique, de captures de chloroplastes et de noyaux par des protoplastes de Petunia, de Nicotiana et de Zea mays sont obtenues en 1973 par POTRYKUS et HOFFMAN (61). Malheureusement, leur technique de pénétration est trop drastique et la survie des cellules ne dépasse pas 18 heures.

KUNG en 1975 (62) isole des chloroplastes de Nicotiana suaveolens et les incube avec des protoplastes isolés à partir de feuilles albinos (chloroplastes sans chlorophylle) de Nicotiana tabacum, il travaille en présence de Poly-L-Ornithine (PLO : action similaire au PEG). Après régénération de plantes entières, il analyse par électrophorèse le DNA, et il retrouve dans les plantes hybrides la trace des DNA chloroplastiques des deux espèces, cette expérience n'a jamais pu être répétée.

En 1975, DAVEY (60) montre que des protoplastes végétaux sont capables, après traitement au PEG, d'inclure des cellules complètes de levure, d'algue bleue ou verte. En 1976 (63), il complète son étude par des incorporations de chloroplastes, il suit son travail en microscopie électronique et remarque que seuls les chloroplastes endommagés sont inclus dans des vésicules de plasmolyse ; par contre, les chloroplastes entiers fusionnent avec les protoplastes. Dans ce dernier cas, le stroma du chloroplaste se trouve à l'état diffus dans le cytoplasme de la cellule hôte.

Toutes ces expériences démontrent qu'il est possible de régénérer une plante hybride après pénétration (ou capture) d'organites ou de micro-organismes étrangers dans des protoplastes. C'est le grand avantage du système végétal qui peut, à partir d'une cellule isolée, régénérer une plante entière. Il est donc maintenant envisageable de transformer le génome d'une plante. Dans ce genre de manipulations, il reste à étudier le devenir et surtout l'expression génétique de ces organites capturés par la cellule lors de ses divisions pour régénérer une plante entière et lors de la reproduction sexuelle de cette plante.

Les expérimentations actuelles s'orientent essentiellement sur les relations existantes entre des algues bleues ou des bactéries fixatrices d'azote avec leurs cellules hôtes après pénétration. Ces travaux étudient les relations "Endosymbiotiques" existantes entre deux cellules interdépendantes (COCKING, 1973 (64)).

A ce jour, les recherches les plus intéressantes sont celles de GILES qui, en 1978, (65), essaie d'incorporer dans des protoplastes de Zea mays des Azotobacter vinelandii (bactéries fixatrices libres d'azote) : malheureusement au bout de quelques heures de culture, les protoplastes meurent. Pour continuer ces expériences, il abandonne les protoplastes et utilise l'endosperme du Maïs qui après fécondation ressemble à un syncythium possédant des noyaux libres ; il injecte des bactéries dans le syncythium qu'il retrouve incluses dans les cellules lors du développement ultérieur de l'endosperme. Il cultive "in vitro" ce tissu et obtient des cals qu'il transplante sur des milieux dépourvus de source azotée. Il soumet ces cals au test de la réduction d'acétylène (le test de réduction de l'acétylène est couramment utilisé "in vitro" pour mettre en évidence l'activité nitrogénasique ; BURRIS, 1965 (66)), ils produisent de l'éthylène mais la quantité décroit pour devenir proche de zéro au bout de 21 jours si les cals sont obtenus à partir de l'endosperme seul. Si les cals sont issus de l'endosperme et de l'embryon, les tests restent positifs pendant plus de six semaines et l'embryon peut développer une plantule de 15-20 cm à partir d'un milieu dépourvu de toute source d'azote. C'est la première expérience "Endosymbiotique" réussie.

1.3.2 - *Infection par des virus* :

Pour introduire un gène étranger dans une cellule végétale, on peut se servir d'un vecteur. Les virus végétaux, de par leur pouvoir infectieux, semblent particulièrement appropriés.

Une équipe anglaise (HOWELL et HULL, 1977 (67), 1978 (68)) utilise le virus de la mosaïque du chou-fleur (virus à double brin de DNA) pour introduire le DNA étranger dans des cellules végétales isolées de navet. Le DNA de ce virus peut être isolé et fractionné en plasmides avant d'être inséré dans la bactérie Escherichia coli. La molécule de DNA est alors amplifiée, c'est-à-dire reproduite un grand nombre de fois, tout en conservant son pouvoir infectieux vis-à-vis du chou-fleur et d'un grand nombre de plantes voisines. On cherche actuellement les positions les plus intéressantes pour introduire sur ce DNA viral des gènes étrangers qui, après amplification, sont capables d'infecter des protoplastes de navet. Ce DNA modifié pénètre sans difficulté dans la cellule hôte, mais l'intégration et l'expression n'ont pas encore été réalisées.

D'autres essais avec des virus végétaux à simple brin de DNA(SANJER et all., 1977 (69)) ou avec des bactériophages (KLEINHOFS et BEHKI, 1977 (70)) sont pour l'instant à considérer avec septicisme, ils permettent seulement de mieux comprendre les mécanismes d'infection et de pénétration de DNA exogène dans une cellule végétale isolée.

1.3.3 - *Modification du génome d'une cellule végétale par du DNA bactérien* :

Les premiers essais de pénétration de DNA bactérien dans des cellules végétales remontent à 1972 (LEDOUX (71)). Il faut attendre

1974 (LEDOUX (72)) pour envisager des manipulations génétiques par ce procédé. LURQUIN et HOTTA en 1975 (73) font une étude critique de ces premiers essais et soulèvent les principales difficultés inhérentes à ce genre de manipulations. Les travaux de KLEINHOFS en 1975 (74) sont plus précis : pour cet auteur, les contaminations bactériennes, dues à la non stérilité des essais sont responsables de ce qui pourrait être considéré comme une intégration. Après les controverses de ces premières expériences, tous les essais d'intégration de DNA exogène ont été pratiqués stérilement sur des protoplastes végétaux. On suppose que l'absence de paroi des protoplastes facilite la pénétration du DNA bactérien ; grâce à cette capture plus rapide, on peut espérer que ce DNA d'un haut poids moléculaire à moins de chance d'être dégradé.

OHYAMA en 1972 (75) étudie la pénétration de DNA d'Escherichia coli marqué radioactivement au ^{14}C dans des protoplastes d'Ammi visnaga, il montre que 2 % de ce DNA pénètre dans la cellule. Il met également en évidence le rôle favorable du DEAE-dextran, de la poly-L-lysine et de la poly-L-ornithine dans l'accrochage et la pénétration du DNA bactérien. Des travaux identiques (HOFFMAN et HESS, 1973 (76) - HOFFMAN, 1973 (77)) effectués sur des protoplastes de Petunia montrent que seul 20 % de ce DNA pénétré se retrouve dans la fraction acido-précipitable des protoplastes : la dégradation intra cellulaire est donc très importante et il n'est pas évident que ces molécules fortement dégradées puissent être utilisées lors d'une intégration ultérieure dans le génome de la cellule hôte. Néanmoins ces études ne permettent pas de distinguer le DNA pénétré du DNA incorporé.

En 1973, HOLL (78) compare l'activité deoxyribonucléasique des tissus et des protoplastes : elle est faible chez les protoplastes et augmente à partir du moment où ces cellules entrent en division, à ce stade l'activité enzymatique des tissus végétaux est identique. Apparemment, il est donc impossible d'utiliser des prctoplastes puisque le DNA exogène est dégradé par les nucléases cellulaires. GRESSHOFF (1974, (79)) pense même que cette restriction cellulaire agit comme un "immunosystème" à l'encontre de tout matériel génétique étranger. Cette hypothèse confirme l'expérience de CARLSON (1973 (80)) qui réussit la première transformation chez un végétal supérieur ; en partant de protoplaste de tabac qu'il infecte avec du DNA issu d'une autre espèce de tabac, il obtient des cellules vivantes qui, après plusieurs divisions, gardent leur spécificité, "l'immunosystème" décrit par GRESSHOFF ne fonctionnant pas ici puisque le DNA exogène n'est pas à proprement parlé étranger.

Si le DNA linéaire du chromosome bactérien est en grande partie détruit par les nucléases végétales, on peut envisager qu'il n'en sera pas de même pour les plasmides bactériens dont le DNA se présente souvent sous forme circulaire. Si l'on arrive à localiser et à fixer le gène "nif" (complexe génétique responsable de la fixation de l'azote) sur un plasmide de Rhizobium ou d'une autre bactérie, on peut envisager son passage direct, ou après hybridation avec un vecteur, dans des cellules végétales isolées (SHANMUGAN et VALENTINE, 1975 (81)). Bien évidemment, il restera à déterminer si ce plasmide s'intègre effectivement dans le génome de ces cellules et s'il est capable de s'exprimer ultérieurement dans une plante régénérée.

Comme nous venons de le voir, l'introduction de gènes étrangers dans une cellule végétale constitue un objectif ambitieux. Des chercheurs (MERRICK et coll. (82)) ont construit un plasmide bactérien contenant les 17 gènes "nif" connus de la bactérie fixatrice d'azote Klebsiella pneumoniae et ils l'ont transféré dans Escherichia coli qui devient dès lors capable de fixer l'azote atmosphérique. D'autres équipes (travaux rapportés en 1981 par BRILL (83)) ont fusionné les plasmides d'un Escherichia coli avec celui d'une levure pour former un plasmide hybride unique (FIGURE 4). Celui-ci est reconnu par les cellules de levures puis intégré au sein du DNA chromosomique.

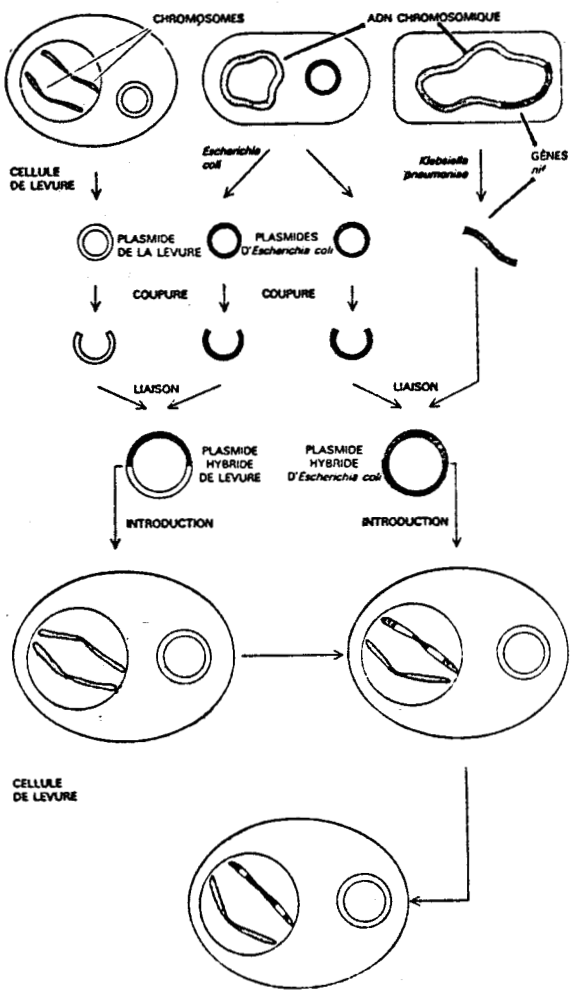


FIGURE N° 4 : Transformation d'une levure par incorporation du gène "nif" (d'apres W.BRILL (83))

Dans une seconde étape, les gènes que l'on désire introduire dans la levure sont isolés du chromosome de Klebsiella (17 gènes "nif") et introduits dans un plasmide d'Escherichia coli ouvert de manière à former un second plasmide hybride. Puisqu'un des chromosomes de la levure renferme déjà le DNA bactérien, elle reconnait le deuxième plasmide hybride qui peut être intégré sans dommage dans la cellule hôte. Malheureusement, les levures possédant ces gènes "nif" sont incapables de les exprimer : elles ne fixent pas l'azote atmosphérique. Cette incapacité illustre la complexité des méthodes de génie génétique quand il s'agit d'introduire des fonctions biologiques associées à plusieurs gènes. Le DNA transféré doit d'abord être transcrit correctement en RNA messager par la levure et les 17 protéines contrôlées par les gènes "nif" doivent ensuite fonctionner toutes ensembles dans le cytoplasme étranger que constitue la levure. De nombreuses inhibitions s'opposent à de tels fonctionnements simultanés.

L'introduction de DNA étranger dans des cellules végétales isolées pourrait aussi s'effectuer en utilisant les capacités naturelles d'infection d'une bactérie comme Agrobacterium tumefaciens. Cette bactérie possède un plasmide qui provoque, chez la plupart des dicotylédones, des tumeurs connues sous le nom de "crown-gall". Cette infection induit chez les plantes infectées la synthèse de composés azotés (opines). Ce mécanisme d'infection a été appelé "colonisation génétique" : une section de plasmide (le DNA de transfert) s'associe au DNA chromosomique dans le noyau de la cellule végétale. Ce plasmide peut servir de vecteur pour introduire du DNA étranger dans une cellule végétale (FIGURE 5, d'après BRILL (83)).

Le plasmide doit être coupé au niveau d'un site du DNA de transfert pour qu'on puisse y introduire le gène étranger. Le DNA de transfert se multiplie au fur et à mesure que les cellules tumorales de "crown-gall" se divisent ; les cellules tumorales qui croissent au sein de la culture possèdent donc toujours le DNA de transfert. Dans les quelques cas où on a pu régénérer une plante à partir des cellules tumorales cultivées, le DNA de transfert est toujours existant dans les chromosomes de la

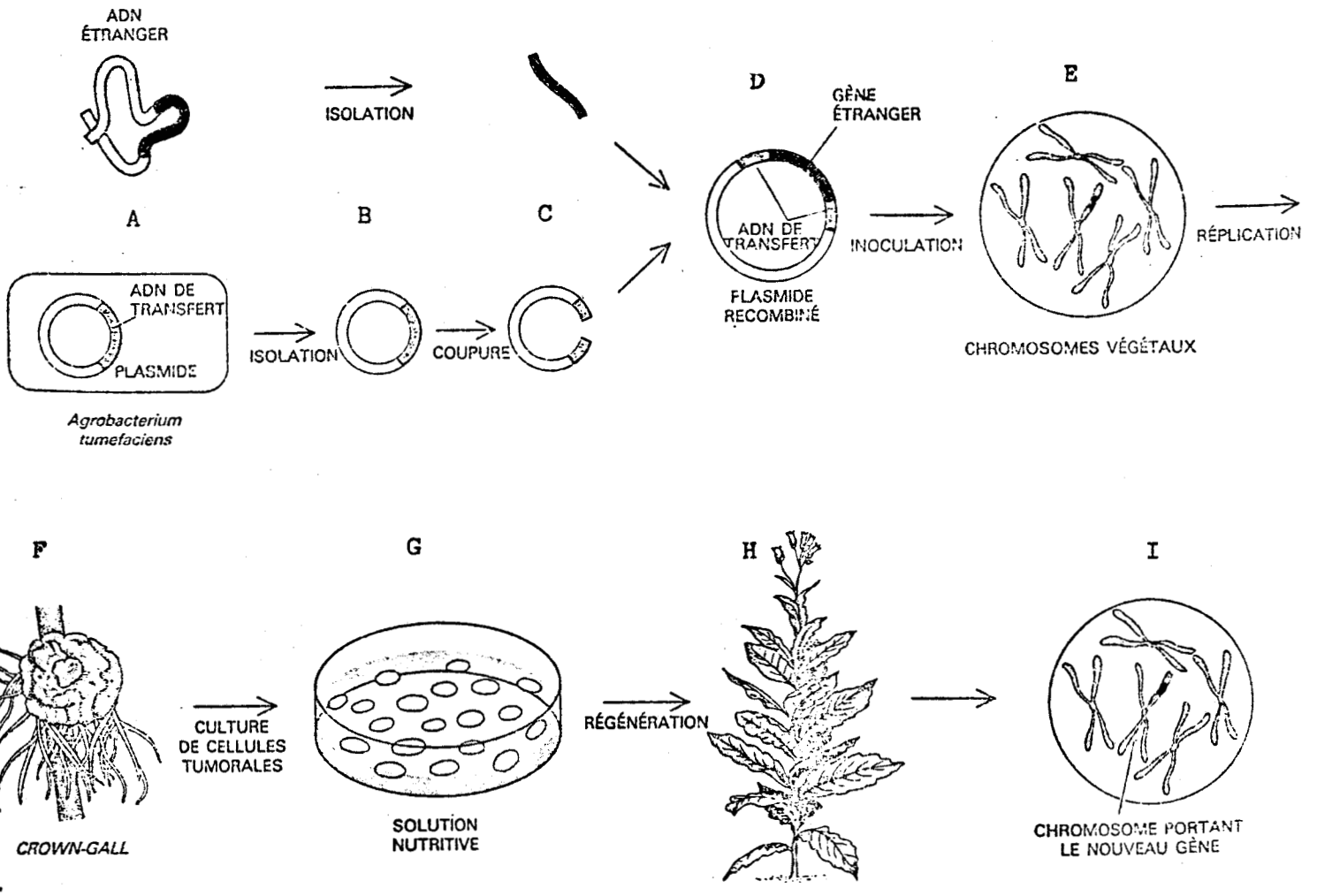


FIGURE N° 5 : Introduction hypothétique de DNA étranger par l'intermédiaire du plasmide d'Agrobacterium tumefaciens (d'après W.BRILL(83))

NHS LILLE

plante. De plus, le gène porté parle DNA de transfert qui code pour l'enzyme opine-synthétase est transmis aux plantes filles. Il est donc possible d'envisager que des gènes étrangers, présents dans le DNA de transfert, puissent aussi être transmis aux descendants de la plante. Par ce procédé, nous pouvons envisager l'obtention d'une plante supérieure possédant les gènes "nif".

II - BUT DE NOTRE TRAVAIL

Notre travail consiste en des essais d'incorporation de DNA de Rhizobium meliloti dans des protoplastes végétaux ; nous étudierons le devenir de ce DNA, dans le cytoplasme, puis dans les noyaux de ces cellules isolées.

Préalablement, nous avons tenté de mettre au point une technique de préparation de protoplastes de légumineuse à partir de feuilles de haricot, il nous a été malheureusement impossible de maintenir ces protoplastes en vie passés les premières divisions, ni à fortiori, de réaliser une régénération. Les difficultés rencontrées nous ont fait choisir comme modèle expérimental les protoplastes de tabac obtenus par une technique parfaitement connue, nous permettant même de régénérer une plante entière.

L'incorporation de DNA exogène dans une cellule végétale ne peut être suivie que par des marquages radioactifs, cela nous a permis d'étudier et de surmonter les difficultés suivantes :

- Obtention en grande quantité de DNA purifié de Rhizobium meliloti ;
- Marquage radioactif satisfaisant de ce DNA bactérien ;
- Mise au point d'une technique spécifique de pénétration de ce DNA dans des protoplastes de tabac ;
- Détermination de la quantité et de l'état du DNA pénétré dans le cytoplasme, puis dans le noyau de la cellule hôte ;
- Détermination d'une méthode fiable, répétitive et préservatrice, nous permettant d'obtenir des noyaux isolés de protoplastes de tabac.

PREMIÈRE PARTIE :

M A T E R I E L E T T E C H N I Q U E S

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

I - MATÉRIEL

1.1 - MATERIEL BACTERIEN

Nous utilisons des souches de Rhizobium meliloti conservées à l'état congelé en milieu glycérolé. Après décongélation, elles sont cultivées sur un milieu "Rhizobium complet" (RC) glucosé (DELATTRE et DELEPLANQUE, 1971 (84)) (TABLEAU IL).

1.2 - MATERIEL VEGETAL

1.2.1 - Le tabac :

Pour chacune de nos expérimentations, l'obtention de protoplastes se fait à partir de plantes cultivées en serre ou en plein champ . Nous utilisons du tabac "Nicotiana tabacum cv Wisconsin 38" dont nous prélevons les feuilles non cotylédonnaires agées au minimum d'un mois.

1.2.2 - Les protoplastes :

Les phases essentielles de l'isolement des protoplastes sont les suivantes (CHUPEAU et coll. 1970 (85)).

- plasmolyse et hydrolyse enzymatique des tissus végétaux ;
- élimination de la solution enzymatique ;
- libération des protoplastes dans une solution de lavage ;
- lavage des protoplastes ;
- mise en culture des protoplastes.

M_{11} Str		laboratoire
M_9m_3	adénine ou guanine dépendante	laboratoire
M_9m_5	adénine dépendante	laboratoire
2011m_8 Str	adénine dépendante	laboratoire
2011 i 12	adénine et lactose dépendante	laboratoire
2011 i 15	adénine et lactose dépendante	laboratoire
2011 i 16	adénine et lactose dépendante	laboratoire
2011 i 17	adénine et lactose dépendante	laboratoire

TABLEAU N° 1 : Souches de Rhizobium meliloti utilisées

BUS LILLE

1.2.2.1 - Préparation du matériel :

Les feuilles de tabac choisies subissent d'abord une stérilisation chimique par immersion dans une solution d'éthanol à 70° pendant 30 secondes, suivie d'un bain dans une solution d'hypochlorite de calcium à 50 g/l pendant 5 minutes. Pour terminer, nous effectuons 3 lavages successifs à l'eau distillée stérile de 5 minutes chacun, nécessaires à l'élimination des réactifs. Après cette opération, on enlève aseptiquement avec des pinces, l'épiderme inférieur des feuilles.

1.2.2.2 - Hydrolyse des parois pecto-cellulosiques:

On dispose dans une boîte de Petri en verre de 90 mm de diamètre contenant 10 ml de solution enzymatique hypertonique, les feuilles pelées, la face inférieure contre le liquide. Le mélange enzymatique composé de macerozyme R 10 à 0,02 % (ONOZUKA all japan Biochemicals Co. Ltd), de cellulase R 10 à 0,1 % (même référence) et de driselase à 0,05 % (FLUKA co. Ltd,), est dilué dans une solution hypertonique de mannitol à 8 % (0,45 M) additionnée des éléments suivants :

$NH_4 NO_3$	925 mg/l
KNO_3	950 mg/l
$CaCl_2$, 2 H_2O	220 mg/l
$Mg SO_4$, 7 H_2O	185 mg/l
$KH_2 PO_4$	85 mg/l
$Fe SO_4$, 7 H_2O	27,85 mg/l
Na_2 EDTA	37,25 mg/l
$Zn SO_4$	1 mg/l
$H_3 BO_3$	1 mg/l

$Mn\ SO_4,\ 4\ H_2O$	0,1	mg/l
$Cu\ SO_4,\ 5\ H_2O$	0,03	mg/l
$Al\ Cl_3$	0,03	mg/l
$Ni\ Cl_2,\ 6\ H_2O$	0,03	mg/l
K I	0,01	mg/l
Inositol.....	100	mg/l
Calcium panthotenate.....	1	mg/l
Biotine.....	0,01	mg/l
Niacine.....	1	mg/l
Pyridoxine.....	1	mg/l
Thiamine.....	1	mg/l
Acide naphtalène acétique (ANA).....	3	mg/l
6, Benzyladenine.....	1	mg/l
Mannitol.....	8.10^4	mg/l

Ce milieu (appelé milieu To) est ajusté à pH 5,5 avant autoclavage (85). La stérilisation de la solution enzymatique est effectuée par passage sur filtres Millipore de 0,22 µm. La macération enzymatique dure de 14 à 16 heures à une température de 22° C et sous un éclairage faible (environ 2 000 Lux).

1.2.2.3 - Récupération et culture des protoplastes :

Après macération, les boîtes de Pétri sont agitées doucement à la main pendant 5 minutes, ce qui favorise la séparation des protoplastes. Le contenu est alors centrifugé stérilement trois fois cinq minutes à une accélération légèrement inférieure à 100 g. Les culots contenant les protoplastes sont repris à chaque fois dans du milieu de culture "To"

Après la troisième centrifugation, le culot de protoplastes est remis en suspension dans 10 ml de milieu "Toc" (milieu "TO" additionné de 20 g/l de saccharose). La concentration en protoplastes est alors de 4.10^5 à 6.10^5 par ml. Pour une bonne mise en culture, cette suspension est ensuite diluée dans du milieu "Toc" afin de réaliser des cultures en boîte de Pétri de 90 mm de diamètre contenant 6.10^4 protoplastes par ml. Les cultures sont placées pendant 48 heures à l'obscurité à une température de 25° C, et ensuite laissées définitivement sous un éclairage artificiel de 3 000 Lux, avec une photopériode de 16 heures de jour.

II - TECHNIQUES

2.1 - TECHNIQUES D'OBSERVATIONS CYTOLOGIQUES

2.1.1 - Microscopie optique :

Pour les protoplastes entiers, les observations sont effectuées sans coloration sur une goutte de suspension entre lame et lamelle.

Les noyaux sont observés en microscopie optique après coloration au carmin acétique (4 % de carmin dans une solution à 45 % d'acide acétique).

2.1.2 - Microscopie électronique :

Le culot de protoplastes est récupéré par centrifugation lente (inférieure à 100×g) puis il subit quatre opérations : fixation, inclusion, confection et contraste des coupes.

Fixation : Les protoplastes sont fixés à 4° C dans une solution de glutaraldéhyde à 3 % dans un tampon phosphate (tampon de Soërensen) 0,1 M à pH 7,2. Après une heure de fixation, on effectue une centrifugation à 2 000×g pendant cinq minutes. Le culot de protoplastes obtenu est alors remis en suspension dans un liquide de lavage constitué du tampon phosphate additionné de sucrose 0,33 M. On pratique trois lavages successifs, de dix minutes chacun, avec des centrifugations intermédiaires de cinq minutes à 2 000×g. Pour faciliter les manipulations des protoplastes durant les opérations suivantes, le culot obtenu après le dernier lavage est mélangé à 1 ml de sérum albumine à 15 % dont la coagulation est provoquée par une goutte de glutaraldéhyde commercial à 25 %. Ce culot est alors post-fixé à la température ambiante par une solution de tetroxyde d'osmium à 1 % dans le tampon de Soërensen 0,1 M à pH 7,2.

Inclusion : Après déshydratation dans des bains d'acétone à 50, 70, 90 et 100 %, le culot est placé pendant 1 H 30 à température ambiante dans un mélange à volume égal d'acétone pure et d'araldite. Cette opération est suivie d'un bain dans de l'araldite pure pendant trois heures à 37° C. Le culot est alors découpé en petits fragments qui sont de nouveau inclus dans de l'araldite. La polymérisation s'effectue à 60° C pendant une nuit.

Confection des coupes : Les coupes sont effectuées avec un ultramicrotome PORTER BLUM équipé de couteaux de verre, et récupérées sur des treilles en cuivre.

Contraste des coupes : Les coupes sont contrastées par la méthode de "double coloration" par flottage des grilles sur les solutions suivantes :

. Acétate d'uranyle à saturation dans l'alcool absolu (Mordenseen) pendant deux minutes.

. Puis dans du citrate de plomb (colorant) selon REYNOLDS (1953 (86)) pendant huit minutes.

Les observations sont effectuées à l'aide d'un microscope Hitachi (Hull E.S.F. 75 K volts) sous une tension de 75 K Volts.

2.1.3 - *Comptage des protoplastes* :

Les comptages sont effectués au moyen de cellules à numération globulaire (Nageotte simple, Preciss). Pour chaque lot de protoplastes, 4 à 10 comptages sont effectués sur des échantillons de 100 µl.

2.2 - MISE EN EVIDENCE DE LA VITALITE DES PROTOPLASTES

Après deux semaines de culture, les protoplastes régénèrent des cellules complètes pouvant entrer en division. On transfère alors ces cellules sur un milieu "TOC" gélosé à 6 °/₀₀ préalablement réparti dans des boîtes de Petri. Dès que des cals apparaissent, ils sont transférés dans des tubes de 22 x 160 mm contenant du milieu gélosé à 7 °/₀₀ de MURASHIGE et SKOOG (21) modifié de la façon suivante (RADOSEVICH, 1978 (87)): le glucose est remplacé par du saccharose, l'extrait de caséine est supprimé, la kinétine et l'acide naphtalèneacétique (ANA) sont ajoutés aux concentrations respectives de 5.10^{-6} M et 10^{-5} M.

2.3 - ISOLEMENT DES FRACTIONS CELLULAIRES CHEZ LES PROTOPLASTES

2.3.1 - *Isolement des noyaux* :

Les divers paramètres qui interviennent au cours de l'isolement (composition du milieu, concentration en détergent et durée du traite-

ment) sont issus des travaux de ZUILY-FODIL (1979, (88)) et ont fait l'objet d'études détaillées pour les adapter à notre matériel ; ils seront précisés dans la deuxième partie de ce mémoire. Les principales étapes de l'isolement des noyaux peuvent être resumées comme suit :

- Isolement des protoplastes,
- Déplasmolyse des protoplastes pendant une durée de 3 min,
- Lyse des protoplastes au moyen d'un traitement détergent (Triton X 100),
- Sédimentation des noyaux par centrifugation à 700 x g pendant une durée de 4 min.
- Suspension du culot contenant les noyaux dans un "milieu d'isolement" et purification de ces noyaux par centrifugations successives.

Les noyaux isolés sont comptés au moyen d'une cellule à numération globulaire de Thomas (Preciss) et le rendement est calculé en fonction du nombre de protoplastes initiaux.

2.3.2 - *Extraction et purification du DNA nucléaire* :

Cette technique est utilisée pour déterminer la densité du DNA nucléaire par rapport au chlorure de cesium, mais aussi pour l'analyse du DNA total des noyaux, après nos essais de pénétration. Nous avons pour cela adapté la méthode décrite par LIEBKE et HESS en 1977 (89).

Les noyaux isolés sont repris dans 2,5 ml de tampon SSC (citrate trisodique 15 mM, NaCl 150 mM, pH 7). Ils sont lysés par 1 ml de SDS (sodium dodecyl sulfate) à 10 % W/V pendant 30 minutes à 55° C.

Le lysat contenant le DNA est déprotéinisé au cours d'une agitation d'une durée de 30 minutes à température ambiante dans deux volumes d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1, V/V).

Le mélange est centrifugé à 4° C et 1800×g pendant 15 minutes et le surnageant est traité avec 0,5 ml d'une solution de ribonucléase A (2 mg/ml dans une solution de NaCl 0,15 M pH 8) pendant 40 minutes à 37° C.

Le mélange est à nouveau déprotéinisé, centrifugé et l'on récupère le surnageant comme précédemment. Le DNA est précipité par addition de deux volumes d'alcool éthylique à - 20° C, après une heure à 4° C. le précipité de DNA est récupéré par centrifugation (10 minutes à 16 300×g et à 4° C). L'analyse en chlorure de césium se fait après dispersion du précipité dans 2,5 ml de SSC 0,1 (SCC au 1/10e).

2.4 - MILIEUX DE CULTURE BACTERIENS

2.4.1 - *Milieux riches* :

Les précultures et la conservation des souches sont réalisées sur milieu complexe RC de composition suivante (84) :

$K_2 HPO_4$	0,5 g
$Mg SO_4, 7 H_2O$	0,2 g
Extrait de levure (Difco)	1 g

q.s.p. 1 litre d'eau distillée ; pH 7,2 à 7,5

La source de carbone (glucose) est ajoutée à concentration finale de 1 %, la streptomycine (Sigma) pour les souches résistantes est ajoutée à la dose finale de 400 µg/ml, pour la conservation des souches à - 20° C, les cultures sont additionnées de 20 % de glycérol.

Les cultures en masse des bactéries sont effectuées sur milieu complexe TY de composition suivante (BERINGER JE (90)).

Bacto tryptone (Difco) ..... 5 g

Extrait de levure (Difco) ..... 3 g

$CaCl_2$, 2 H_2O ..... 1,3 g

q.s.p. 1 litre d'eau distillée ; pH 7,2 à 7,5

Une source de carbone (glucose) et de la streptomycine (Sigma) peuvent être ajoutées comme précédemment. Les milieux sont stérilisés à l'autoclave 20 minutes à 120° C.

2.4.2 - *Milieu minimum* :

Le marquage du DNA par un précurseur radioactif, ainsi que le lavage des cultures bactériennes sont effectués dans le milieu minimum décrit par OCHIN en 1980 (91) et modifié par nous-même. Il comporte les éléments suivants :

K_2HPO_4..... 0,5 g

$Mg\ SO_4$, 7 H_2O ..... 0,2 g

Glutamate de sodium ..... 2 g

Glucose..... 10 g

q.s.p. 1 litre d'eau distillée ; pH 7,2 à 7,5

Les vitamines thiamine (300 µg/l) et biotine (1 mg/l) sont stérilisées sur un filtre Millipore de 0,22 µm et ajoutées après autoclavage des milieux (30 minutes à 105° C).

2.5 - MARQUAGE DU DNA BACTERIEN

Les souches sont cultivées dans le milieu minimum auquel on ajoute :

2- déoxyadenosine (Merck) ..... 250 mg/l

Thymidine 6-^{3}H (CEA, activité spécifique = 26 Ci/mM) ..... 1 mCi/l

OU

Adénine à des doses variables déterminées dans le chapitre "Résultats"

Adénine 6-^{3}H (Amersham , activité spécifique = 25 Ci/mM) ..... 1 mCi/l

Tous les marquages sont réalisés dans des erlenmeyers sur 1 litre de culture ; dans tous les cas, l'inoculum de départ est de l'ordre de 10^{7} cellules/ml et le marqueur est incorporé pendant 24 heures. Les produits radioactifs sont reçus stériles ; tous les autres composés ajoutés dans les milieux sont stérilisés par filtration sur disques stériles Millipore de porosité 0,2 µm.

2.6 - EXTRACTION ET PURIFICATION DU DNA BACTERIEN

2.6.1 - *Méthode de MARMUR (92)* :

Nous avons employé cette technique, modifiée par FERRAGUT (98) de la façon suivante : les cellules, après culture sur milieu TY. (DNA non marqué) ou sur milieu minimum (DNA marqué) sont centrifugées à 16 300×g pendant 30 min. dans une centrifugeuse Sorvall RC-2 réfrigérée à 4° C ; le culot, remis en suspension dans du tampon (NaCl 0,15 M, éthylène acide-diamine-tetra acétique (EDTA) 0,1 M pH 8) est lavé par une nouvelle centrifugation puis repris dans vingt fois son poids du même tampon. Le

Lauryl-sulfate de sodium (SDS Prolabo) et la pronase (Sigma) sont ajoutés pour obtenir des concentrations finales respectives de 0,5 % et 50 µg/ml. La solution est incubée 15 heures à 37° C. Le lysat visqueux obtenu après addition d'un quart de volume de Na O_4 Cl 5 M puis d'un volume du mélange chloroforme-alcool isoamylique (24/1 - V/V) est déprotéinisé par agitation dans un erlenmeyer, fermé par un bouchon rodé, pendant 30 min. Après une centrifugation de 5 min. à 1 800 x g, trois phases sont observées :

- phase supérieure aqueuse : acides nucléiques + protéines + divers
- phase intermédiaire : protéines dénaturées
- phase inférieure organique : composés solubles dans le mélange chloroforme - alcool.

La phase aqueuse est soumise à une nouvelle déprotéinisation pendant 20 min, après adjonction d'un volume de chloroforme-alcool isoamylique. Le DNA est précipité par addition d'un volume d'éthanol (maintenu à - 20° C) à la phase aqueuse obtenue ; les fibres de DNA récupérées autour d'une tige de verre, sont dissoutes dans un demi volume de tampon SSC ("standart saline citrate", déjà décrit précédemment) durant une nuit à 42° C. Cette solution est successivement traitée à 37° C par la ribonucléase A (Sigma ; 50 µg/ml ; dissoute dans du NaCl 0,15 M pH 5 et chauffée 15 min. à 100° C au préalable inactivant toute déoxyribonucléase contaminante) pendant 60 min, puis par de la pronase (50 µg/ml) durant 90 min et ensuite par le SDS (0,5 %) pendant 15 heures. On déprotéinise alors 2 ou 5 fois par le mélange chloroforme-alcool iso-amylique ; le DNA est précipité par un volume d'éthanol (-20° C), redissout dans du SSC dilué au 1/10e auquel on ajoute 1/9 de volume d'acétate de sodium 3 M, EDTA 10^{-3} M pH 7. Après une nouvelle

précipitation par 0,54 volume d'alcool isopropylique à température ambiante, le DNA est dissous dans le tampon choisi. La solution finale est jugée d'une pureté satisfaisante si les rapports d'absorbance A 260 nm / A 280 nm et A 260 nm / A 230 nm (94) sont égaux ou supérieurs à 1,8.

2.6.2 - *Méthode de KIN ICHIRO MIURA(95)* :

Cette méthode permet l'extraction de DNA sur des culots bactériens de 3 à 100 grammes ; elle a été légèrement modifiée par nous-même. Toutes les valeurs sont données pour 6 grammes de cellules.

Les cultures effectuées sur des milieux T Y ou minimum sont centrifugées à 16 300xg pendant 10 minutes à 4° C, remises en suspension dans du tampon (NaCl 0,15 M, EDTA 0,1 M pH 8) et lavées grâce à une nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans 10 fois son poids du même tampon.

Pour 6 grammes de cellules, on dissout 12 mg de lysozyme (Sigma) dans 6 ml de tampon, le mélange cellules-lysosyme est homogénéisé à 37° C pendant 30 min dans une fiole à col rodé (on prolonge le temps si la lyse est incomplète). Cette lyse est complétée par des congélations-décongélations successives : le lysat, placé dans un pot en acier inoxydable, est congelé rapidement dans un bain d'azote liquide ; il est décongelé jusqu'à liquéfaction totale dans un bain marie à 60° C. Cette opération est répétée trois fois.

Après la dernière décongélation, le mélange est complémenté par 50 ml de tampon "Tris SDS" (tris-hydroxyméthyl aminométhane 0,1 M ; SDS 1 % ; NaCl 0,1 M ; pH 9) pour 6grammes de cellules. Après homogénéisation (avec une baguette de verre), le lysat est placé 30 min. à 60° C, si la lyse est incomplète une nouvelle congélation-décongélation est pratiquée.

Le mélange après addition d'un volume de tampon phénol (400 ml de "Tris SDS" dans 1 litre de phénol liquéfié) est déprotéinisé par agitation dans un erlenmeyer, fermé par un bouchon rodé, pendant 20 min dans un bain de glace. Après une centrifugation de 15 min à 1800×g, trois phases sont observées :

. phase supérieure aqueuse,

. phase intermédiaire,

. phase inférieure organique.

La phase aqueuse est récupérée et débarrassée des débris restants par centrifugation à 16 300×g de 20 minutes à 4° C, le DNA du surnageant est précipité par deux volumes d'alcool éthylique pur (- 20° C). Les fibres de DNA récupérées autour d'une tige de verre sont redissoutes dans du tampon SSC dilué au 1/10e (20 à 40 ml pour 6 g de cellules) durant une nuit à 45° C. Cette solution est traitée à 37° C par la ribonucléase A (30 µg/ml ; dissoute dans du NaCl 0,15 M pH 5) pendant 30 minutes. Une nouvelle déprotéinisation dans un volume de tampon phénol est effectuée et comme précédemment le surnageant est récupéré après centrifugation. Le DNA est précipité par deux volumes d'alcool éthylique pur à - 20° C et redissout dans du SSC dilué au 1/10e (20 ml pour 6 g de cellules) pendant 12 heures à 45° C. La solution finale est jugée d'une pureté satisfaisante grâce aux rapports d'absorbance, comme dans la méthode de MARMUR. L'échantillon peut être conservé plusieurs mois à 4° C en présence de quelques gouttes de chloroforme.

2.7 - ANALYSE DU DNA PAR ULTRACENTRIFUGATION

2.7.1 - Gradients neutres de CsCl :

Dans un tube de 16/160 mm muni d'un bouchon à vis contenant 5 ml de solution de DNA dans le tampon choisi, on dissout du CsCl par agitation

répétée du tube, jusqu'à l'obtention d'une "densité" de 1,7 g/ml à 25° C, correspondant à un indice de réfraction n_D 25° C = 1,398 selon la formule de IFFT et coll. (96) : $d^{25° C} = (10,8601 \times n_D{}^{25° C}) - 13,4974$.

Des tubes en nitrate de cellulose (Beckman) sont remplis jusqu'à 2 à 3 mm du bord ; la centrifugation est effectuée à 33 000 tours par min pendant 48 heures à 25° C, dans le rotor SW 50.1 (ultracentrifugeuse Beckman L 2 - 65 B).

2.7.2 - *Collecte et analyse des gradients* :

Les gradients à l'équilibre (sels de césium) sont fractionnés au nombre de gouttes et à un temps constant grâce à un fractionneur de gradients ISCO (modèle 185) ; le DNA est détecté grâce à l'absorptiomètre à 254 nm de cet appareil.

Les courbes d'absorption (en transmittance) sont directement tracées par un enregistreur ISCO (modèle UAS) couplé au fractionneur de gradients.

La radioactivité de chaque échantillon du gradient peut être comptée en présence d'un liquide scintillant (5 ml d' Aqua-Luma, Lumac).

2.8 - TECHNIQUES DE PENETRATION

Les pénétrations de DNA exogène dans des cellules isolées se font par simple contact. On peut favoriser ce phénomène par addition dans le milieu d'adjuvants tels la poly-L-lysine (PLL) ou la Poly-L-ornithine (PLO). Les observations peuvent être faites au niveau cellulaire ou nucléaire.

2.8.1 - *Pénétration cellulaire* :

Nous devrons pour obtenir une méthode fiable déterminer :

- la toxicité des adjuvants,
- le milieu de pénétration,
- une technique de mesure de la radioactivité,
- le temps de contact idéal et le traitement final par la déoxyribonucléase.

2.8.1.1 - Toxicité des adjuvants :

D'après les travaux antérieurs, la PLL et la PLO sont employées à des doses comprises entre 20 et 4 µg/ml : nous déterminerons donc pour le tabac les doses non toxiques de ces produits.

Les protoplastes sont ensemencés à des concentrations de 10^5 ou 2.10^5/ml en conditions normales de température et de lumière. Le milieu de culture est supplémenté en PLL ou PLO à des doses variables, comprises entre 1 et 20 µg/ml.

L'évolution des cultures nous permettant d'étudier l'éventuelle toxicité des adjuvants, est suivie pendant 10 jours grâce à des comptages effectués sur des cellules de NAGEOTTE. Un témoin blanc, sans adjuvant, est réalisé.

2.8.1.2 - Milieu de pénétration :

Les pénétrations ne peuvent pas être pratiquées dans le milieu de culture. On utilise une solution de pénétration qui garde une concentration suffisante en mannitol pour maintenir l'équilibre osmotique et supplémentée en $CaCl_2$ et $MgSO_4$, éléments favorisant la capture du DNA exogène.

Milieu de pénétration

Mannitol.....	80 g
$CaCl_2$ 10,5 mM = ...	1,5 g
$MgSO_4$ 6 mM = ...	1,4 g

q.s.p. 1 litre, pH 5,5 (autoclavé à 105° C pendant 30 min).

Après le traitement par la deoxyribonucléase, les protoplastes sont rincés soit par le milieu de culture "TOC", soit par la solution suivante :

Milieu de rinçage

Mannitol..... 80 g

EDTA Na_2 0,1 M = ... 37,2 g

q.s.p. 1 litre, pH 5,5 (autoclavé à 105° C pendant 30 min).

2.8.1.3 - Mesure de la radioactivité :

Les échantillons, après pénétration, sont additionnés d'un volume d'ATCA à 10 % (acide trichloracétique) et laissés en contact pendant une heure dans un bain de glace. Tous les protoplastes sont détruits etle DNA précipité. Le mélange est filtré (filtres Whatman GF/C), puis rincés avec 10 ml d'ATCA 5 %, 10 ml d'alcool éthylique pur et 10 ml d'éther (alcool et éther sont utilisés pour éliminer toute trace de chlorophylle).

Les filtres sont séchés, la radioactivité est évaluée en présence de 9 ml de Lipoluma (liquide scintillant Lumac).

2.8.1.4 - Etude de la cinétique de contact :

Des cinétiques de pénétration cytoplasmique en présence de PLL, de PLO et sans adjuvant sont effectuées comme suit :

- Obtention des protoplastes, avec un dernier rinçage effectué dans le milieu de pénétration décrit précédemment.

- Pour chaque cinétique une dizaine d'échantillons de 2 ml de milieu de pénétration sont préparés : ils contiennent de 10^5 à 2.10^6 protoplastes par ml, de 10 à 20 µg de DNA radioactif de Rhizobium meliloti en présence ou non d'adjuvant de pénétration.

- Ces échantillons sont placés dans des tubes à vis et laissés en incubation de 0 à 24 heures à température ambiante.

- Pour chaque prélèvement, on utilise un échantillon que l'on traite avec 0,1 ml d'une solution de deoxyribonucléase de 4 000 µg/ml (Sigma) à 37° C pendant un temps qui reste à déterminer.

- L'échantillon est ensuite complété avec 15 ml de milieu de rinçage et centrifugé 5 minutes à 100×g, le culot est récupéré dans 2 ml de milieu de rinçage.

- La radioactivité de l'échantillon est déterminée comme précédemment après précipitation et filtration du DNA total.

Tous les paramètres de ces cinétiques seront définis d'une manière plus précise dans la partie "Résultats" de ce mémoire. Ainsi, nous pourrons déterminer les conditions idéales pour la mise en évidence des pénétrations cytoplasmiques.

2.8.1.5 - Incorporation par les protoplastes de précurseurs radioactifs :

Nous avons vérifié la vitalité des protoplastes en étudiant l'incorporation d'adénine ^{3}H au cours du temps. Les échantillons sont préparés de manière identique au paragraphe précédent, mais le DNA et les adjuvants sont remplacés par de l'adénine radioactive.

2.8.2 - *Pénétration nucléaire* :

Les pénétrations nucléaires de DNA exogène peuvent être mises en évidence sur des noyaux isolés ou sur des cellules entières.

2.8.2.1 - Sur des noyaux isolés :

2.8.2.1.1 - Méthode directe :

Après obtention des protoplastes, les noyaux sont extraits et conservés à 4° C dans le milieu de récupération (décrit dans le chapitre Résultats).

Dans des tubes à vis de 16/160 mm, on place 2 ml de milieu de récupération avec 3.10^5 noyaux/ml en présence ou en absence de 2 µg/ml de PLL ou de PLO et de 10 µg/ml de DNA radioactif de Rhizobium meliloti.

Après une incubation d'une heure à température ambiante, les échantillons sont traités ou non avec 0,1 ml d'une solution de déoxyribonucléase (Sigma) à 4 000 µg/ml pendant 4 min à 37° C.

Les noyaux sont lavés grâce à deux centrifugations de 10 minutes à 1 500×g et à 4° C : le culot est repris dans 2 ml de milieu de récupération, puis dans 2 ml de milieu de rinçage après la deuxième centrifugation.

Le DNA est précipité par 1 volume d'une solution d'ATCA à 10 % (W/V) pendant 1 heure à 4° C ; ce précipité est filtré et la radioactivité comptée comme précédemment.

2.8.2.1.2 - Méthode indirecte :

Les pénétrations nucléaires peuvent être étudiées après passage sur un gradient de CsCl du DNA précipité après lyse complète des noyaux :

Dans un tube à vis de 16/160 mm, on place 10 ml de milieu de pénétration avec 3.10^5 noyaux/ml en présence ou en absence de 2 µg/ml de PLO ou de PLL et de 10 µg/ml de DNA radioactif de Rhizobium meliloti.

L'incubation et le rinçage sont effectués comme précédemment, mais en fin de deuxième centrifugation, le culot est repris dans 2,5 ml de SSC. Les noyaux sont lysés, le DNA est extrait suivant la technique décrite au paragraphe "extraction et purification du DNA nucléaire".

Les gradients neutres de CsCl, la collecte et l'analyse de ceux-ci (transmittance et radioactivité) sont contrôlés comme nous le décrivons dans la partie "Analyse du DNA par ultra centrifugation".

2.8.2.2 - Sur des cellules entières :

2.8.2.2.1 - Méthode directe :

Dans des tubes à vis de 16/160 mm, on place 14 ml de milieu de pénétration avec 3.10^5 protoplastes/ml en présence ou en absence de 2 µg/ml de PLL ou de PLO et 10 µg/ml de DNA radioactif de Rhizobium meliloti.

Après une incubation de 24 heures à température ambiante, les échantillons sont traités ou non avec 200 µg/ml de deoxyribonucléase (Sigma) pendant 4 min à 37° C. Les protoplastes sont rincés grâce à deux centrifugations de 5 min à 100×g et à 4° C : le culot est repris dans 14 ml du milieu de rinçage, puis 2 ml de ce même milieu après la deuxième centrifugation.

Les noyaux sont extraits, traités, lavés, précipités et la radioactivité comptée comme dans la méthode directe employée sur les noyaux isolés.

2.8.2.2.2 - Méthode indirecte :

Dans des tubes à vis de 16/160 mm, on place 10 ml de milieu de pénétration avec $1,5.10^6$ protoplastes/ml en présence ou en absence

de 2 µg/ml de PLL ou PLO et 20 µg/ml de DNA radioactif de Rhizobium meliloti. L'incubation, le traitement et le lavage des protoplastes sont effectués comme précédemment (méthode directe sur des cellules entières).

Les noyaux sont lysés, le DNA précipité et analysé en gradient de CsCl (comme pour la méthode indirecte des noyaux isolés).

DEUXIÈME PARTIE :

RESULTATS ET COMMENTAIRES

I - ISOLEMENT ET UTILISATION DES PROTOPLASTES DE TABAC

L'obtention de protoplastes de tabac a été réalisée grâce à la technique expérimentale établie par CHUPEAU et coll. (1974 (97)). Nos résultats sont illustrés par des photographies représentant les différentes étapes de notre travail.

1.1 - EVOLUTION DES PROTOPLASTES EN CULTURE

Tout de suite après obtention, les protoplastes sont dépourvus de paroi pectocellulosique (PHOTOGRAPHIES 1 et 2), ils peuvent au bout de quelques heures être accolés par leur plasmalemme (PHOTOGRAPHIE 3). Ce phénomène assez fréquent peut aboutir à une fusion complète et naturelle des cellules, il ne doit pas être confondu avec une fin de division. Au cinquième jour de culture, il est fréquent de remarquer des protoplastes en début ou en fin de division (PHOTOGRAPHIE 4) ; ils se distinguent par un plan de clivage très net. Entre le 10e et le 15e jour de culture, apparaissent des amas cellulaires issus de la division des protoplastes, appelés "micro cals" (PHOTOGRAPHIE 5) dont la taille varie de 0,1 à 0,5 mm. A ce stade de développement, les "micro cals" sont placés sur milieu "TOC" gélosé (PHOTOGRAPHIE 6).

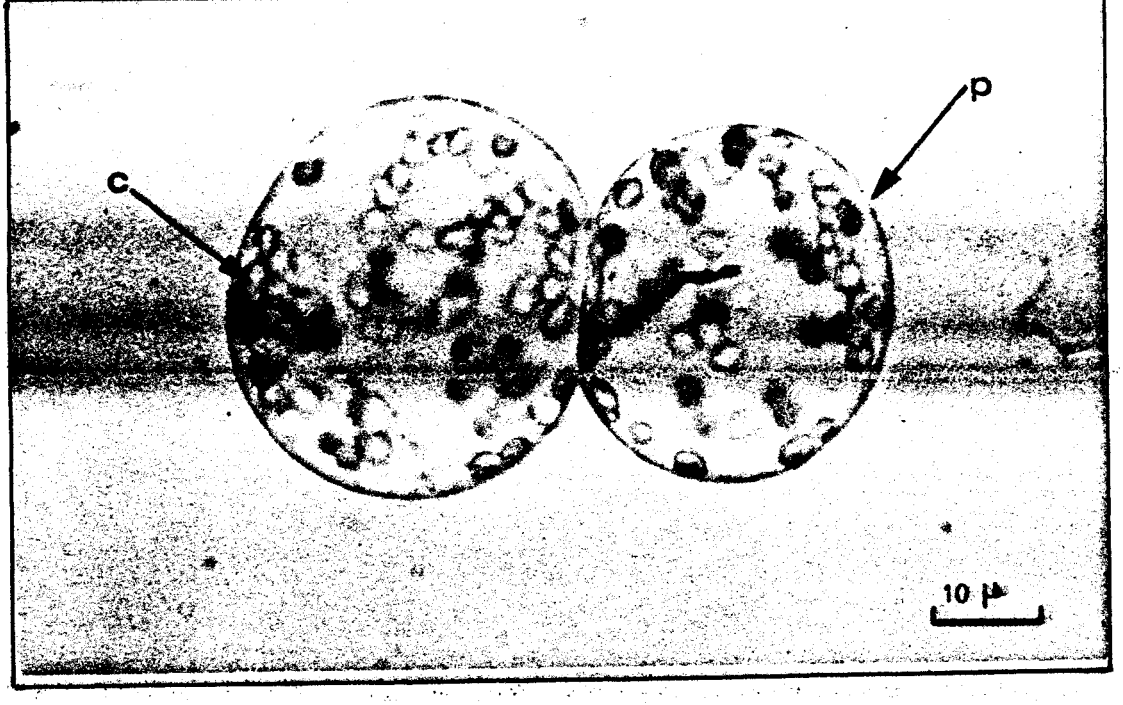
Au trentième jour, ces cals peuvent atteindre la taille de 1,5 à 2,5 mm : à ce stade, ils sont repiqués sur un milieu de MURASHIGE et SKOOG modifié (RADOSEVICH, 1978 (87)) dont les concentrations en facteurs de croissance, ANA et kinétine, sont respectivement de 10^{-5} M et 5.10^{-6}M, ce qui permet d'obtenir des cals non organogènes, incapables de régénérer des plantules. Par contre, un repiquage pratiqué dans les mêmes conditions au 45e jour nous a permis d'obtenir au 75e jour une plantule complète avec bourgeons et racines (PHOTOGRAPHIE 7).

1

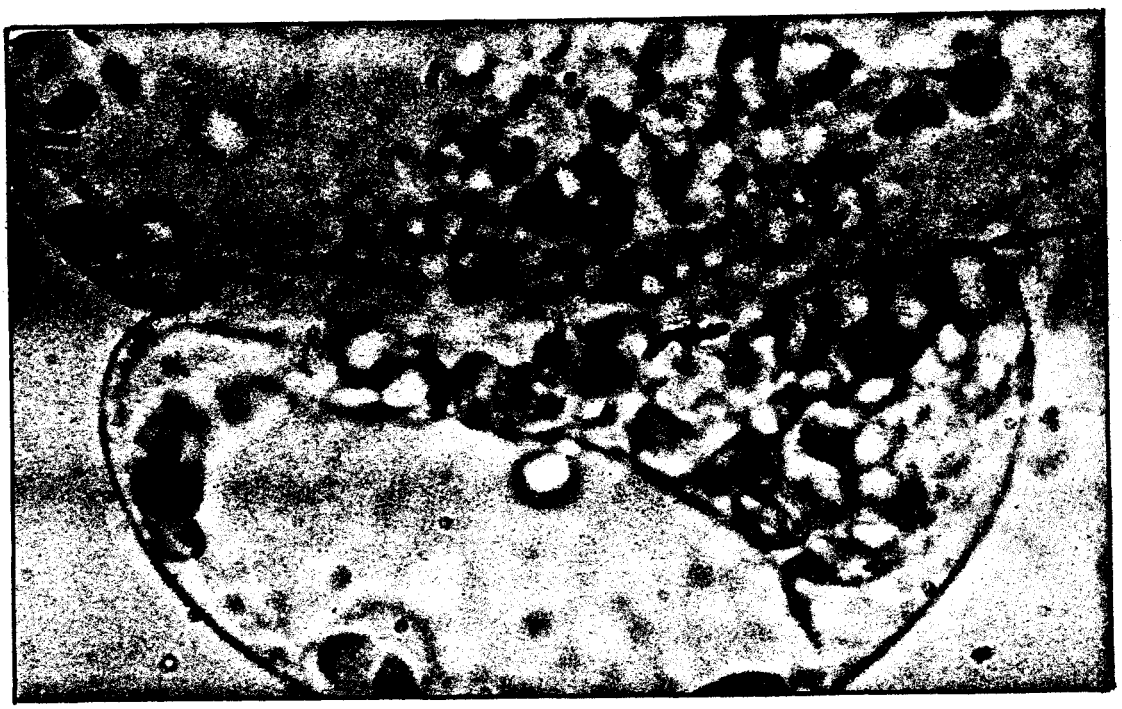
BUS LILLE

2

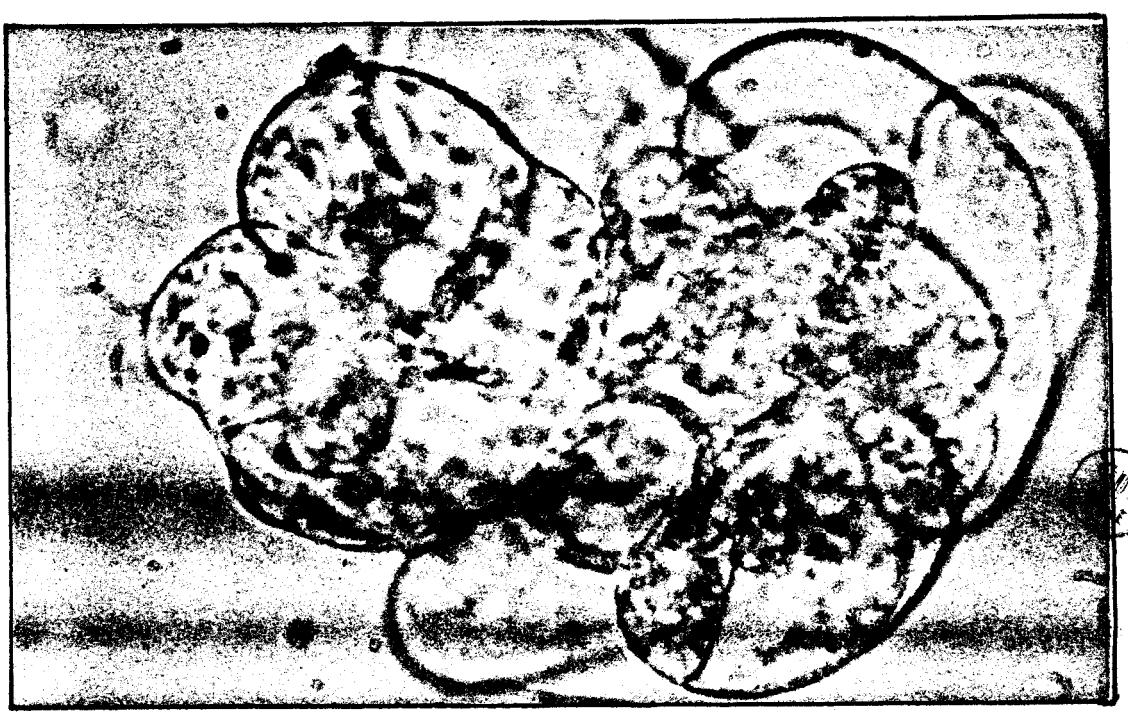
3



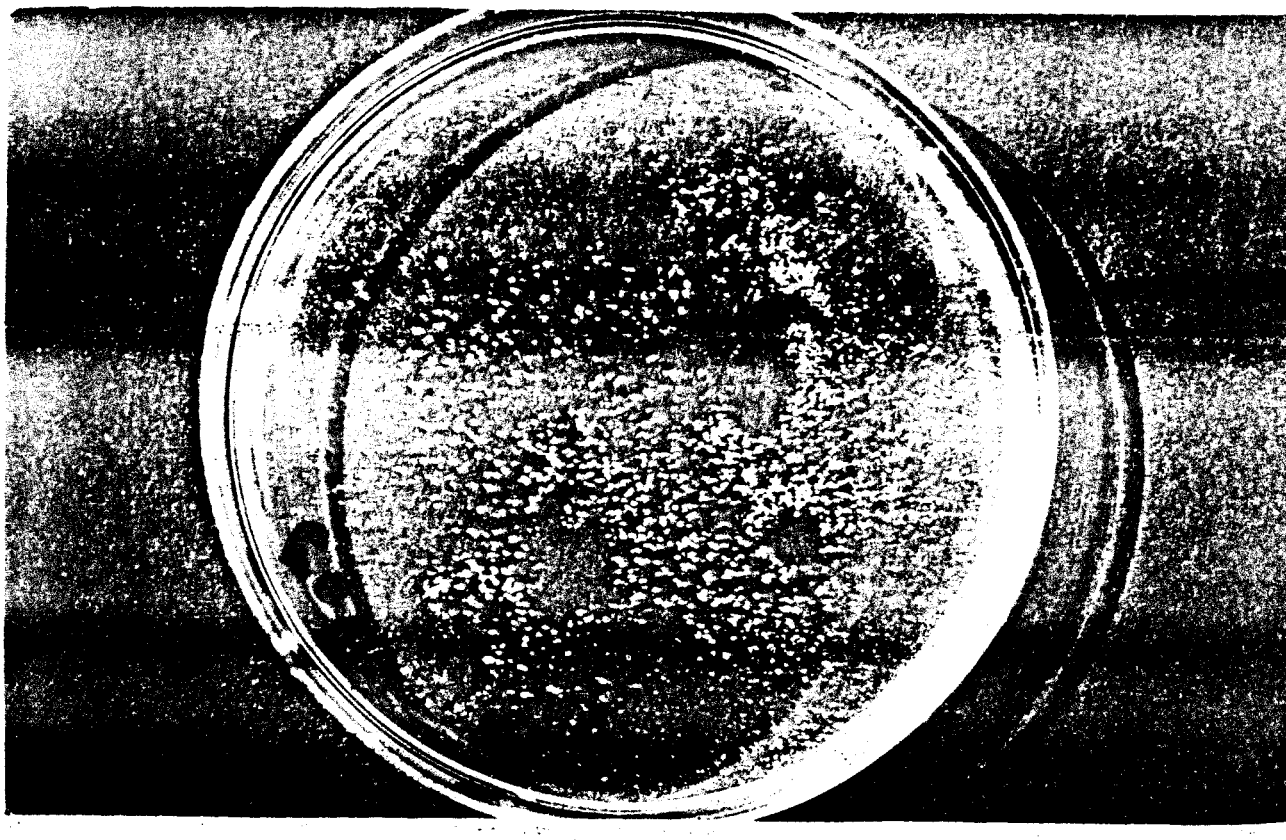
4



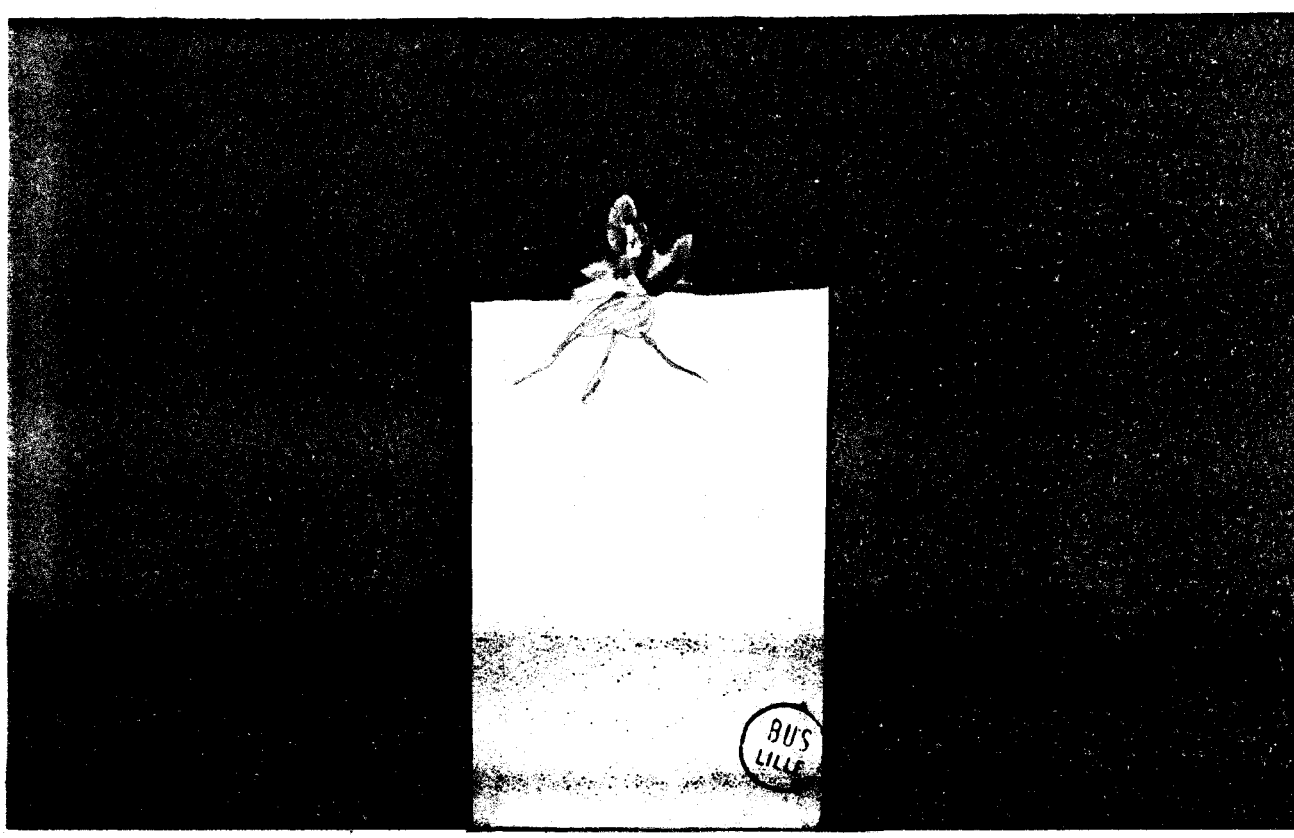
5



6



7



1.2 - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Nous pouvons résumer le procédé expérimental qui nous a permis d'obtenir des cals et accessoirement une plantule, de la manière suivante :

- Du 1er au 15e jour, les protoplastes sont cultivés sur un milieu "TOC" liquide jusqu'à apparition des "micro-cals" ;

- Du 15e au 30e jour, ces "micro-cals" sont placés sur un milieu "TOC" gélosé à 6 °/₀₀ ;

- Au 30e jour, les repiquages se font sur un milieu de MURASHIGE et SKOOG modifié, comprenant les facteurs de croissance suivants :

. ANA..... 10^{-5} M

. Kinétine ..... 5.10^{-6} M

- Ensuite, les cals peuvent être repiqués tous les 15 jours sur le même milieu.

Les travaux reportés ici et concernant la régénération de cals de tabac ont fait l'objet de maintes publications : grâce à elles, nous avons mis au point nos techniques concernant les phénomènes de pénétration

II - PRÉPARATION ET MARQUAGE DU DNA DE RHIZOBIUM MELILOTI

2.1 - RECHERCHE D'UNE METHODE DE PREPARATION DE DNA DE RHIZOBIUM MELILOTI

La méthode de MARMUR, que nous avons employée pour extraire le DNA de Rhizobium meliloti, ne nous permet pas d'obtenir des résultats reproductibles.

Les essais effectués avec la souche M_{11} Str, et sur des cultures d'un litre (environ 3 g de cellules) nous donnent les résultats suivants :

Essais	DNA en µg
1	935
2	125
3	700
4	825
5	100

Ce DNA est d'une pureté satisfaisante, comme le prouvent les rapports d'absorbances, mais les quantités obtenues sont très faibles. Avec des bactéries Eschericia coli, il est possible d'obtenir des quantités de 5 à 10 fois plus importantes (92). Les résultats obtenus avec Rhizobium meliloti sont probablement dus à une lyse imparfaite des cellules.

Grâce à la méthode de KIN ICHIRO MIURA, nous obtenons des résultats bien meilleurs. Pour 3 grammes de cellules de la même souche bactérienne, nous obtenons de 5 à 7 mg de DNA purifié suivant les essais. La lyse cellulaire est plus complète, et les déprotéinisations au phénol plus efficaces. Nous verrons ultérieurement que le DNA chromosomique n'est pas plus dénaturé par cette technique que par la méthode de MARMUR.

2.2 - MARQUAGE RADIOACTIF DU DNA DE RHIZOBIUM MELILOTI

2.2.1 - *Essais préliminaires* :

Nos premiers essais de marquage radioactif ont été pratiqués sur la souche M_{11}Str de Rhizobium meliloti avec de la thymidine ^{3}H comme précurseur radioactif. Le DNA est extrait et purifié soit par la méthode de MARMUR, soit par la méthode de KIN ICHIRO MIURA. Avec 1 m Ci par litre de culture, il nous a été impossible d'obtenir plus de 100 cpm/µg de DNA ; même en multipliant par deux la dose de précurseur radioactif, il est toujours impossible d'obtenir un marquage correct.

Si nous voulons augmenter fortement le nombre de cpm, nous devons utiliser une souche de Rhizobium meliloti "thymine" ou "thymidine" dépendante qui incorporera préférentiellement le précurseur. Ce genre de mutant (que l'on obtient facilement chez Escherichia coli, par mutagenèse) est à l'heure actuelle inconnu chez Rhizobium.

Nous avons donc envisagé d'utiliser des souches "adénine" dépendante de Rhizobium meliloti obtenues par mutagenèse au laboratoire : le marquage de ces cellules est réalisé avec de l'adénine ^{3}H. L'inconvénient est que l'adénine radioactive est incorporée aussi bien sur le DNA que sur le RNA cellulaire, nous devrons donc obtenir en fin d'extraction du DNA parfaitement purifié.

2.2.2 - *Choix d'une souche adénine dépendante* :

Nous disposons au laboratoire de huit souches adénine dépendante :

Rhizobium meliloti

M_9m_3 ..... adénine ou guanine dépendante

M_9m_5 ..... adénine dépendante

2011 m8 Str..... adénine dépendante, streptomycine résistante

2011 i 12..... lactose et adénine dépendante

2011 i 15..... lactose et adénine dépendante

2011 i 16..... lactose et adénine dépendante

2011 i 17..... lactose et adénine dépendante

Sur ces huit souches, seule la 2011 m_8 Str présente une bonne croissance sur milieu riche, et une absence totale de cette même croissance sur un milieu minimum liquide sans adénine.

Pour obtenir des marquages radioactifs corrects, nous déterminons la dose minimale d'adénine nécessaire pour obtenir une croissance optimale sur milieu minimum de la souche 2011 m_8 Str. Les résultats reportés dans le TABLEAU N° II analysent la croissance de cette souche en fonction de doses croissantes d'adénine.

µg/ml d'adénine \ Temps	24 heures	48 heures	72 heures
0	0	0	0
5	0	0	0
10	0	0	0
15	0	0	+
20	0	+	+
25	0	+	+
30	∓	++	+++
40	+	+++	+++

absence de croissance : 0 ; croissance : +, ++, +++ (observations visuelles)

TABLEAU II : Croissance de la souche 2011 m 8 Str en fonction de doses croissantes en adénine.

2.2.3 - *Protocole expérimental* :

La souche de Rhizobium M 2011 m 8 Str est cultivée dans le milieu minimum complété par :

Adénine 6 - ^{3}H ..... 1 m Ci/l

Adénine "froide"..... 30 µg/ml

Tous les marquages sont réalisés sur un litre de culture, avec un inoculum de départ de 10^{7} cellules/ml, le marqueur est incorporé pendant 36 heures. Les résultats de nos divers essais après extraction et purification du DNA, sont reportés sur le TABLEAU N° III.

m Ci/l de culture (adénine 3H)	Poids de cellules (en grammes)	Quantité de DNA (en µg après extraction)	DNA total (cpm/µg)	DNA précipitable à l'ATCA (cpm/µg)
1	3	$5 \cdot 10^3$	1 822	1 740
1	2,95	$4,3 \cdot 10^3$	1 512	1 364
1	6,75	$12 \cdot 10^3$	2 011	1 820
1	2,75	$4,75 \cdot 10^3$	1 705	1 489
2	3,2	$6 \cdot 10^3$	2 168	2 050

TABLEAU III : Marquage radioactif du DNA de Rhizobium meliloti.

Les nombres de cpm du DNA précipitable sont obtenus après précipitation dans l'ATCA et filtration de l'échantillon tandis que ceux du DNA total le sont par comptage direct en milieu liquide ; la différence qui est en moyenne de 8 % représente le DNA très fragmenté (donc imprécipitable) et les traces de RNA restantes après purification. Avec des cultures contenant 1 m Ci/l d'adénine ^3H, la radioactivité obtenue est approximativement du même ordre de grandeur ; le doublement de la quantité du précurseur radioactif (2 m Ci/l) n'augmente pas proportionnellement le marquage des cellules.

L'état et la pureté du DNA sont très satisfaisants, mais il est impossible pour l'instant d'obtenir un marquage plus important avec une souche adénine dépendante.

III - MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE PÉNÉTRATION

Les pénétrations de DNA exogène dans des cellules isolées peuvent être favorisées par la PLL et la PLO ; en premier lieu, nous déterminerons la toxicité de ces adjuvants pour les protoplastes.

3.1 - DETERMINATION DES DOSES TOXIQUES EN PLL ET PLO

Dans des échantillons de 2 ml de milieu de culture, on place 3.10^5 protoplastes/ml en présence de doses variables de PLL et PLO ; on suit par comptage la mortalité des protoplastes au cours du temps.

Seuls sont considérés comme vivants les protoplastes intacts ayant une forme sphérique ; les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes en fonction du temps (FIGURES N° 6 et 7). Un comptage plus rigoureux avec coloration des cellules nous donnant effectivement le nombre de protoplastes vivants n'a pas été pratiqué puisque seul nous intéresse la détermination des doses non toxiques en PLL et PLO que nous apprécions par visualisation au microscope des cellules en division. Ces doses doivent être inférieures ou égales à 5 µg/ml pour la PLL et 2,5 µg/ml pour la PLO (FIGURES N° 6 et 7) puisqu'avec des concentrations supérieures nous ne remarquons plus de divisions cellulaires.

Dans une deuxième série d'essais, nous adjoignons aux protoplastes en culture 15 µg/ml de DNA non marqué de Rhizobium meliloti (souche 2011 m 8 Str) en présence des doses non toxiques de PLL et de PLO ; nous déterminons de la même manière le pourcentage de protoplastes viables (FIGURES N° 9 et 10). Cette étude nous permet d'observer un effet toxique accru des adjuvants de pénétration en présence de DNA : ce phénomène pourrait être dû à un éclatement plus important des protoplastes provoqué par la formation rapide du complexe DNA - Adjuvants - Protoplastes (FIGURE N° 8).

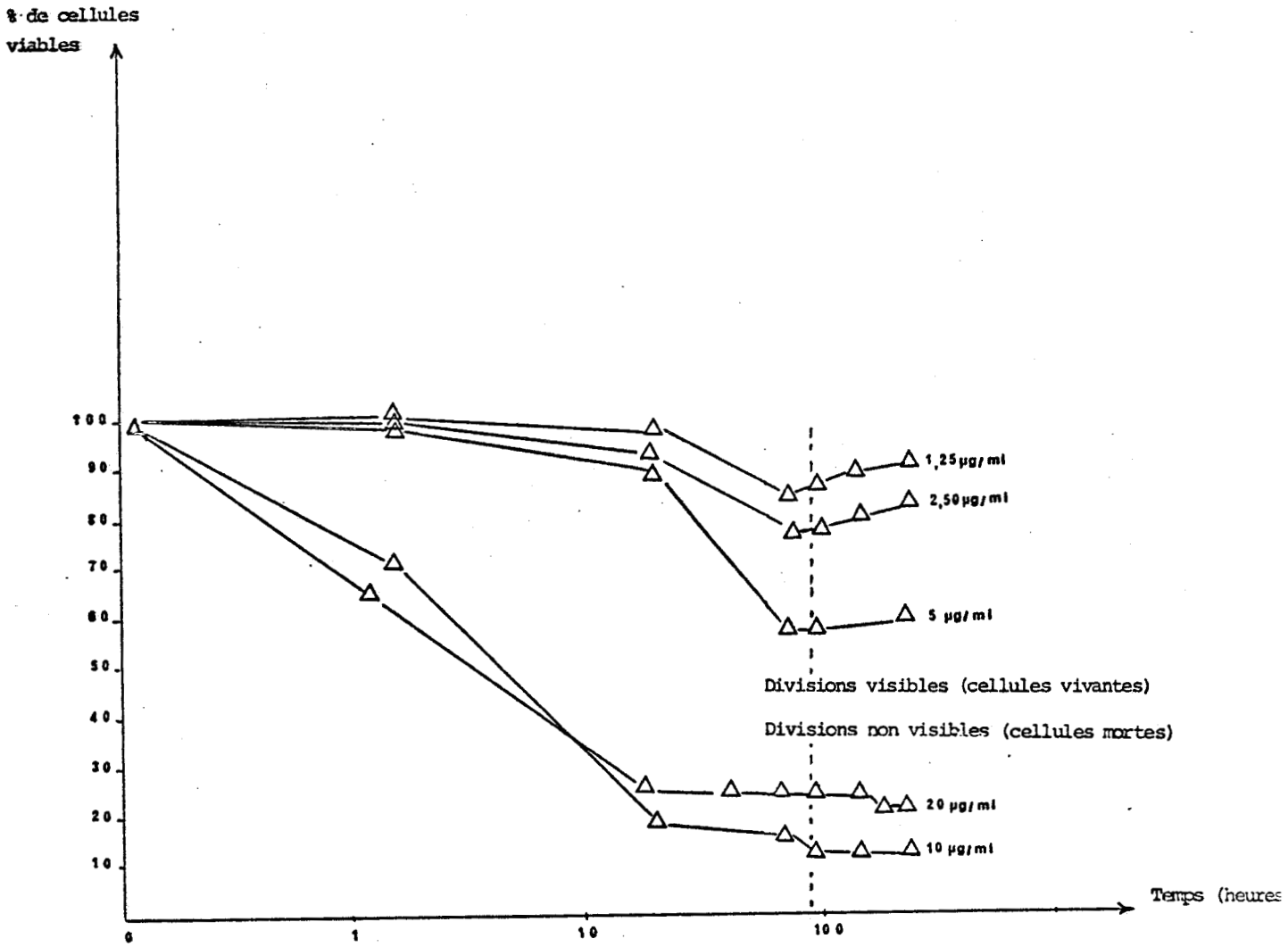


FIGURE N° 6 : Survie des protoplastes en présence de doses variables de PLL

FAC LIEGE

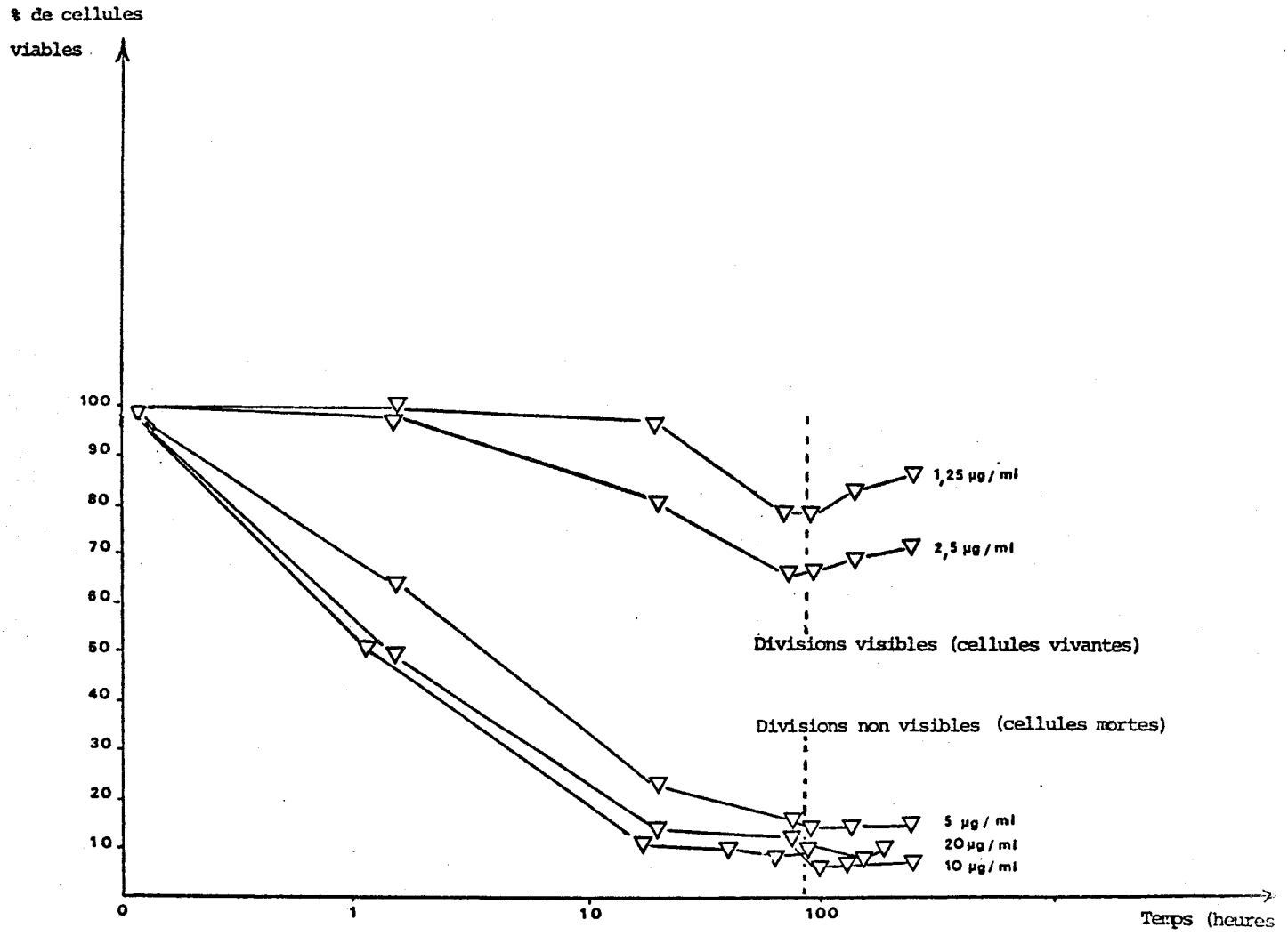
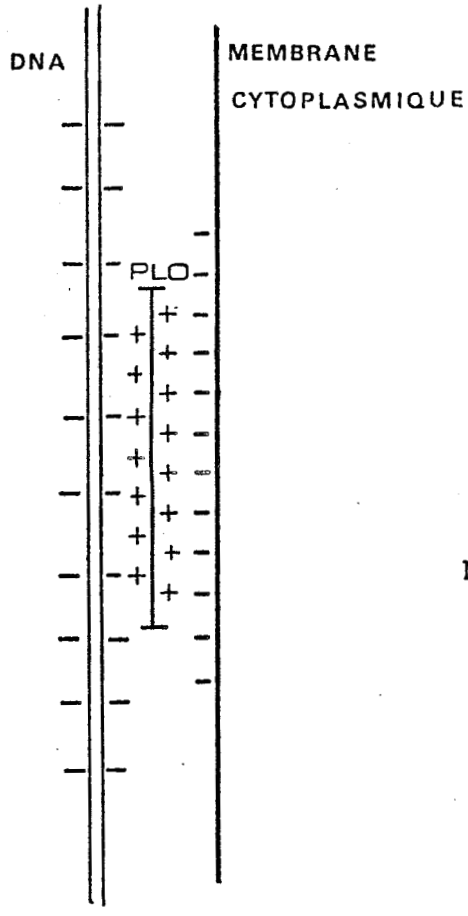


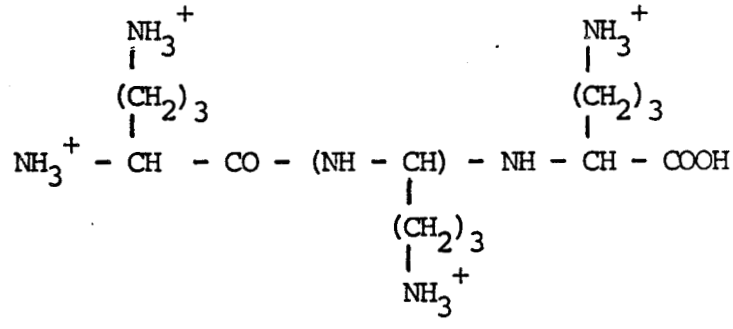
FIGURE N° 7 : Survie des protoplastes en présence de doses variables de PLO

BUS LILLE



- La membrane cytoplasmique à une charge de surface d'environ - 30 mV

- La poly L-ornithine est chargée positivement suivant la formule :



- Le DNA est chargé négativement grâce aux groupements phosphate (PO_4^-)

FIGURE 8 : Représentation schématique du complexe DNA - PLO - Protoplaste.

BUS LILLE

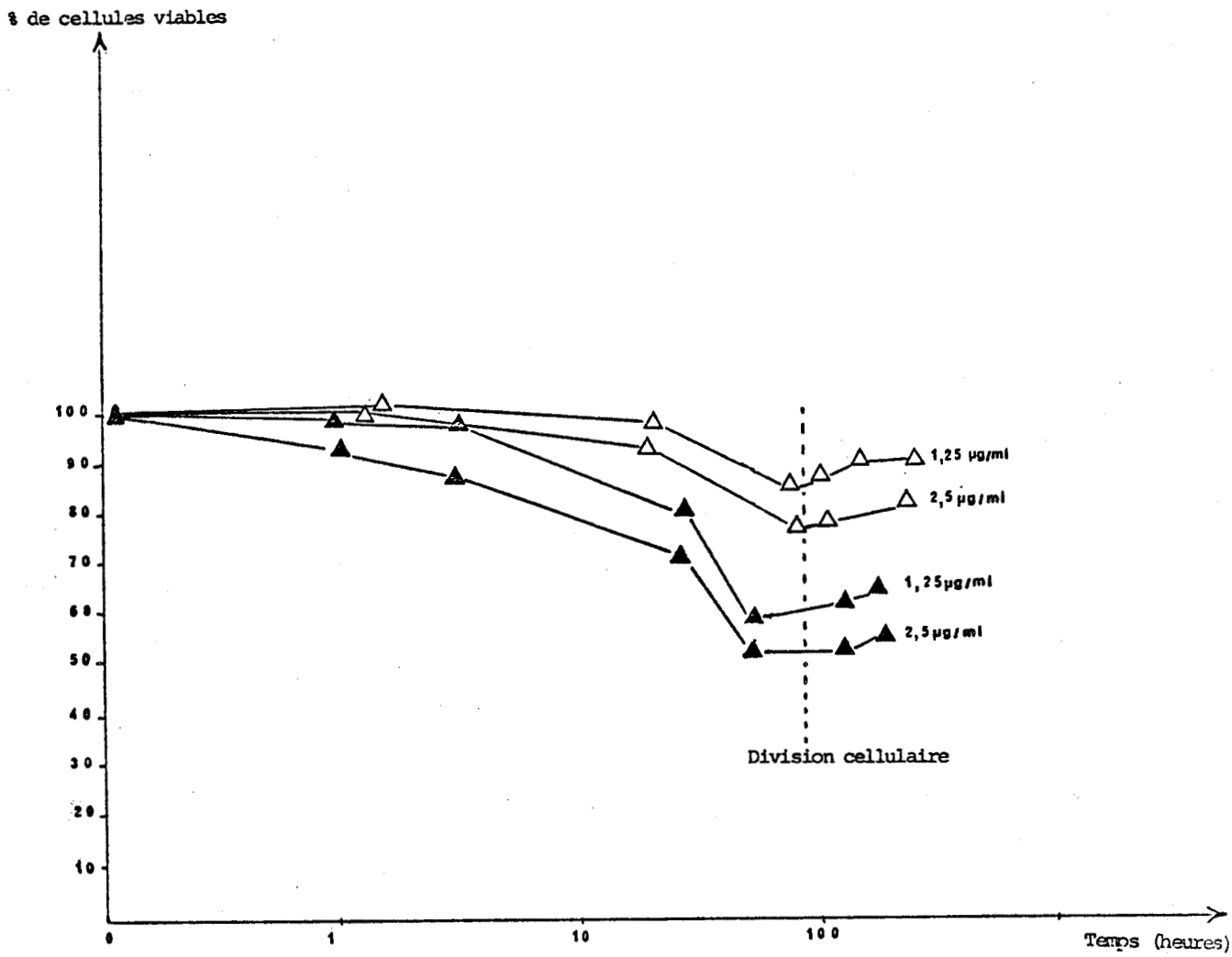


FIGURE N° 9 : Survie des protoplastes en présence ou en absence de 15 µg/ml de DNA froid de Rhizobium meliloti et de doses variables de PLL

△ : en absence de DNA

▲ : en présence de DNA

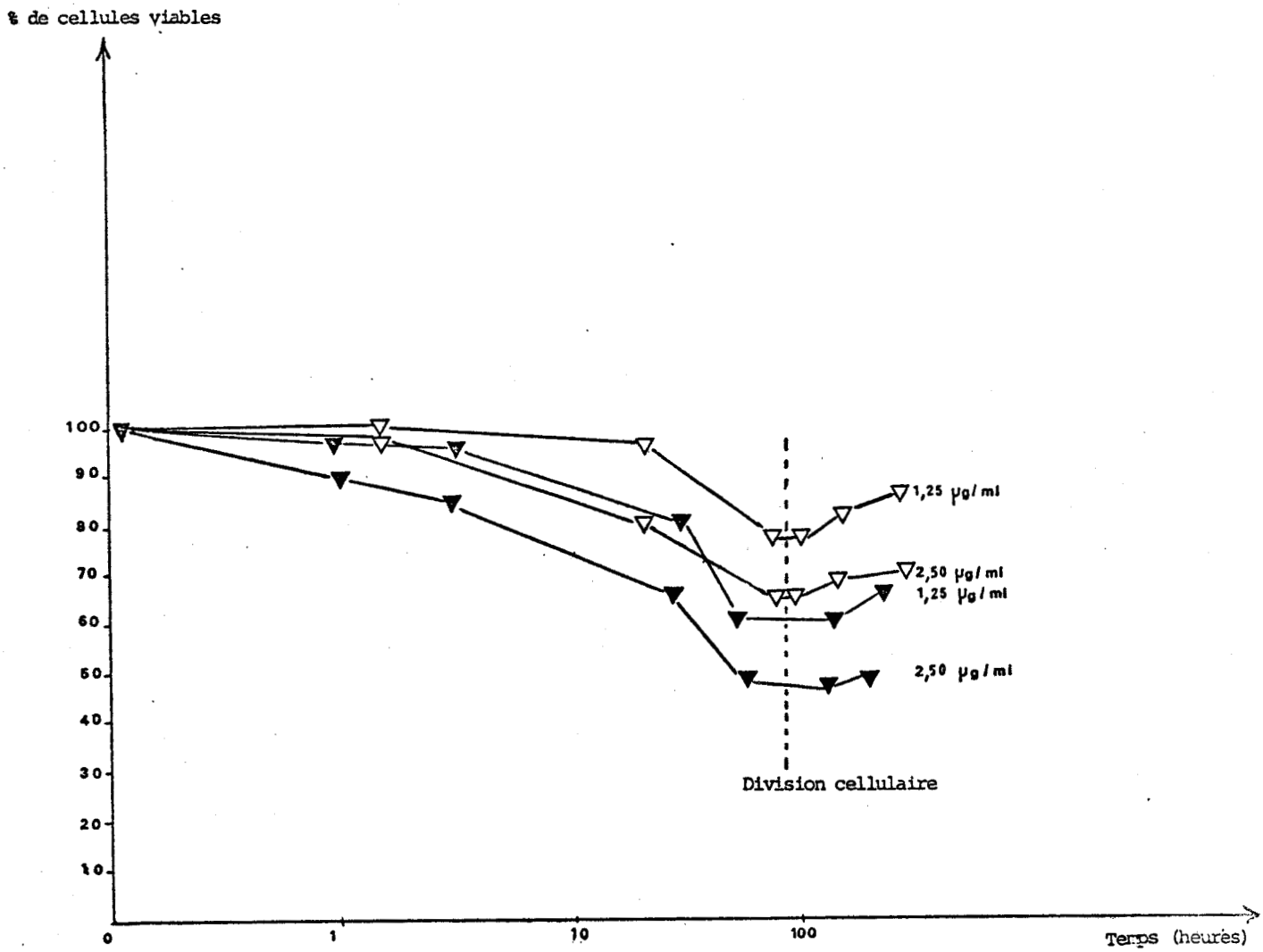


FIGURE N° 10 : Survie des protoplastes en présence ou en absence de 15 µg/ml de DNA froid de Rhizobium meliloti et de doses variables de PLO

▽ : en absence de DNA

▼ : en présence de DNA

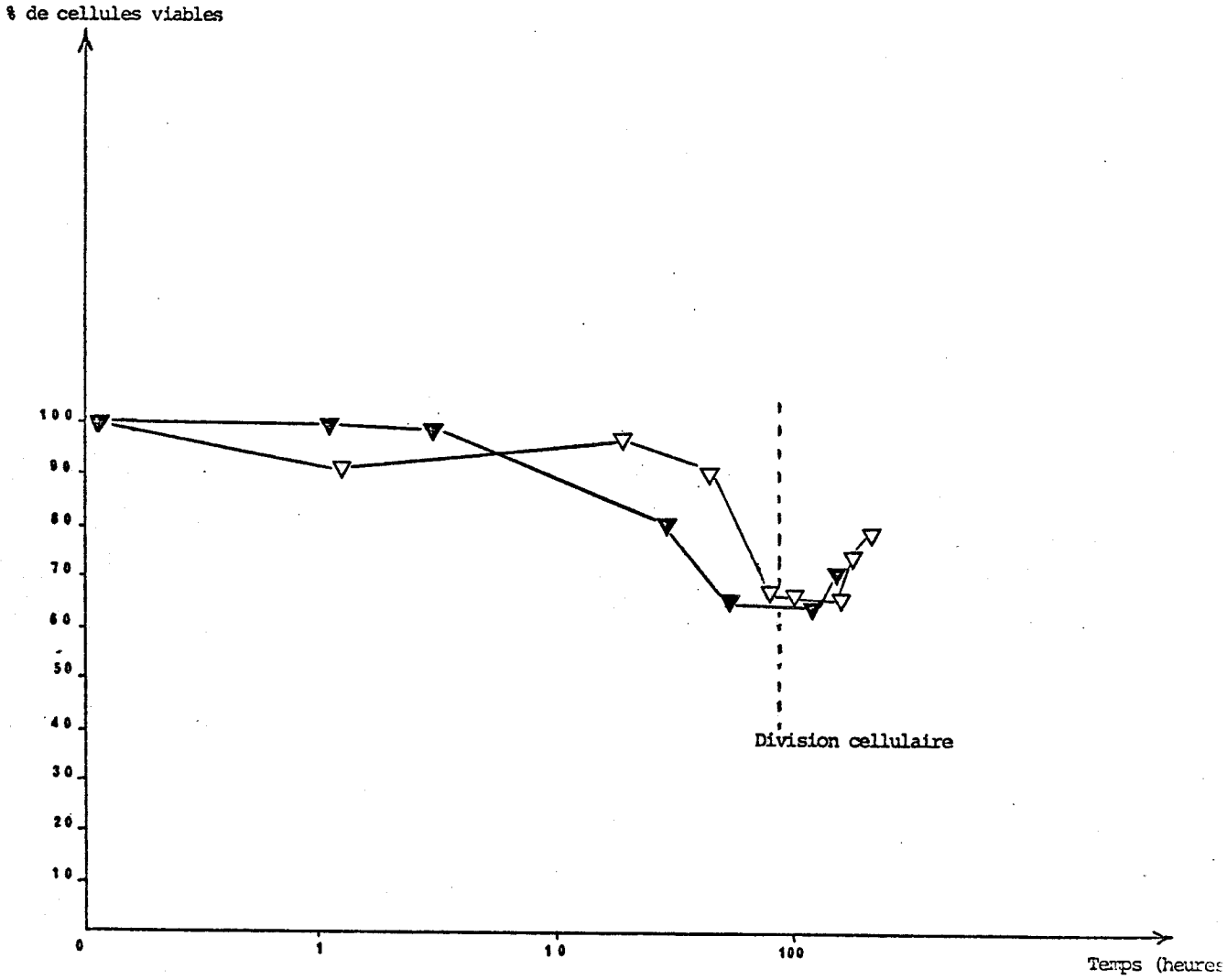


FIGURE N° 11 : Survie des protoplastes en présence ou en absence de 15 µg/ml de DNA froid de Rhizobium meliloti et en absence de PLL ou de PLO.

△ : en absence de DNA

▲ : en présence de DNA

BUS LILLE

Dans notre hypothèse, la PLL et la PLO induisant l'accrochage du DNA exogène sur la membrane cytoplasmique, ce qui, en principe, favoriserait une pénétration ultérieure. Nos essais réalisés en présence ou en absence de 15 µg/ml de DNA exogène et sans adjuvant (FIGURE N° 11) montrent des résultats, en pourcentage de survivants, très semblables. La toxicité est donc le fait de la PLO ou de la PLL et de leur association avec du DNA exogène.

En conclusion, nous nous proposons d'utiliser des échantillons de 2 ml comprenant au maximum 2.10^5 protoplastes/ml et 15 µg/ml de DNA exogène sans dépasser 2 µg/ml de PLL ou de PLO. Ces concentrations (FIGURES N° 9 et 10) nous donnerons une mortalité voisine à celle du témoin (FIGURE N° 11) pour la PLL et légèrement plus forte pour la PLO. Cette toxicité que nous venons d'étudier a un effet essentiellement mécanique : la PLL et la PLO à forte dose, s'accrochent trop brusquement sur la membrane cytoplasmique et provoquent l'éclatement des cellules ; à 2 µg/ml ce phénomène reste limité puisque les cellules sont susceptibles de se diviser.

3.2 - TECHNIQUE DE PENETRATION

3.2.1 - *Choix des milieux* :

Les pénétrations ne peuvent pas être pratiquées dans le milieu de culture Toc. Les concentrations en $CaCl_2$ (220 mg/l) et Mg SO_4 (185 mg/l) sont trop faibles pour favoriser une bonne capture du DNA exogène. Des concentrations de l'ordre de 10 mM en $CaCl_2$ et de 6 mM en $MgSO_4$ sont couramment employées et ainsi les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} libérés dans le milieu favorisent l'accrochage des cellules et la formation du complexe DNA-PLL ou PLO - protoplaste. De plus, dans ce milieu "Toc", nous trouvons de l'EDTA Na_2 qui est nuisible à l'action de la deoxyribonucléase que nous ajoutons en fin de pénétration pour détruire le DNA exogène non pénétré. Le milieu de pénétration sera donc : Mannitol 80 g/l, $CaCl_2$ 1,5 g/l et $MgSO_4$ 1,4 g/l.

Pour laver les protoplastes après la pénétration et le traitement à la deoxyribonucléase, nous utilisons un milieu de rinçage dont la concentration en EDTA Na_2 est élevé, ce qui permet de bloquer instantanément l'action de la deoxyribonucléase (mannitol 80 g/l, EDTA Na_2 37,2 g/l).

3.2.2 - *Traitement par la deoxyribonucléase* :

Après pénétration, il est indispensable de dénaturer le DNA exogène non pénétré. Ce DNA se trouve soit en solution dans le milieu, soit sous forme de complexe DNA - PLL ou PLO - Protoplaste ; comme nous le verrons par la suite, ce complexe est en grande partie deoxyribonucléase résistant, c'est pourquoi nous utilisons des doses massives de cette enzyme (200 µg/ml) pour détruire le DNA exogène non utilisé. Pour éviter une contamination possible des protoplastes par la deoxyribonucléase, nous l'utilisons pendant un temps très court.

Pour déterminer ce temps d'incubation nous avons effectué une cinétique de dénaturation du DNA de la manière suivante : 10 échantillons de 2 ml de milieu de pénétration contenant chacun 20 µg/ml de DNA radioactif de Rhizobium meliloti sont traités de 1 à 10 minutes par 200 µg/ml Déoxyribonucléase à 37°C. Les fractions acido précipitables (1 heure à 4°C par 2 ml d'ATCA 10 %) sont récupérées par filtration puis rincées, respectivement, par 1 volume d'ATCA 5 %, d'alcool et d'éther. Les résultats obtenus après séchage des échantillons et dosage de leur radioactivité figurent dans le tableau IV.

Temps en minutes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fraction acido précipitable (cpm)	17810	9981	2815	1210	1203	1419	1198	700	1209	1185
% de DNA dénaturé	78,3	87,8	96,5	98,5	98,5	98,2	98,5	99,1	98,5	98,6

TABLEAU IV : CINETIQUE DE DESTRUCTION DU DNA DE RHIZOBIUM MELILOTI

(on détermine le pourcentage de DNA dénaturé en sachant que 40 µg de DNA radioactif donne $8,2.10^4$ c.p.m.)

La durée de traitement idéale par la déoxyribonucléase que nous avons choisie est de 4 minutes à 37° C.

3.2.3. - *Résumé du protocole expérimental adopté*

Une fois obtenus les protoplastes sont répartis à une concentration de $3,10^4$/ml dans des échantillons de 2 ml de milieu de pénétration, en présence de 10 µg/ml de DNA radioactif et de 2 µg/ml de PLL ou de PLO (sauf pour les témoins).

Après des temps variables, les échantillons sont traités par 200 µg/ml de déoxyribonucléase pendant 4 minutes à 37° C. Les protoplastes sont ensuite lavés dans le milieu de rinçage grâce à deux centrifugations lentes (100xg) et le dernier culot est repris dans 2 ml de ce même milieu.

La fraction acido précipitable des échantillons est obtenue par ajout d'un volume d'ATCA 10 % pendant 1 heure à 4° C, elle est récupérée par filtration et rincée par de l'ATCA 5 %, de l'alcool et de l'éther jusqu'à élimination complète de toute trace de pigment chlorophyllien. Après séchage on détermine par comptage la radioactivité de chaque filtre.

IV - MISE EN EVIDENCE DES PENETRATIONS CYTOPLASMIQUES DE DNA DE RHIZOBIUM MELILO

4.1 - ETUDE DE LA RADIOACTIVITE INCORPOREE DANS LES FRACTIONS ACIDO-INSOLUBLES DES PROTOPLASTES

Des échantillons de 5 ml de protoplastes en culture à une concentration de 10^4/ml sont mis en présence de 10^{-2} mCi d'adénine ^3H/ml. A des temps variables (0 - 100 heures) on prélève un échantillon et on analyse la fraction acido insoluble (Figure 12).

La mesure de l'évolution des taux de radioactivité met en évidence une augmentation de l'absorption des précurseurs à partir de la dixième heure, l'augmentation maximale est observée vers la vingt cinquième

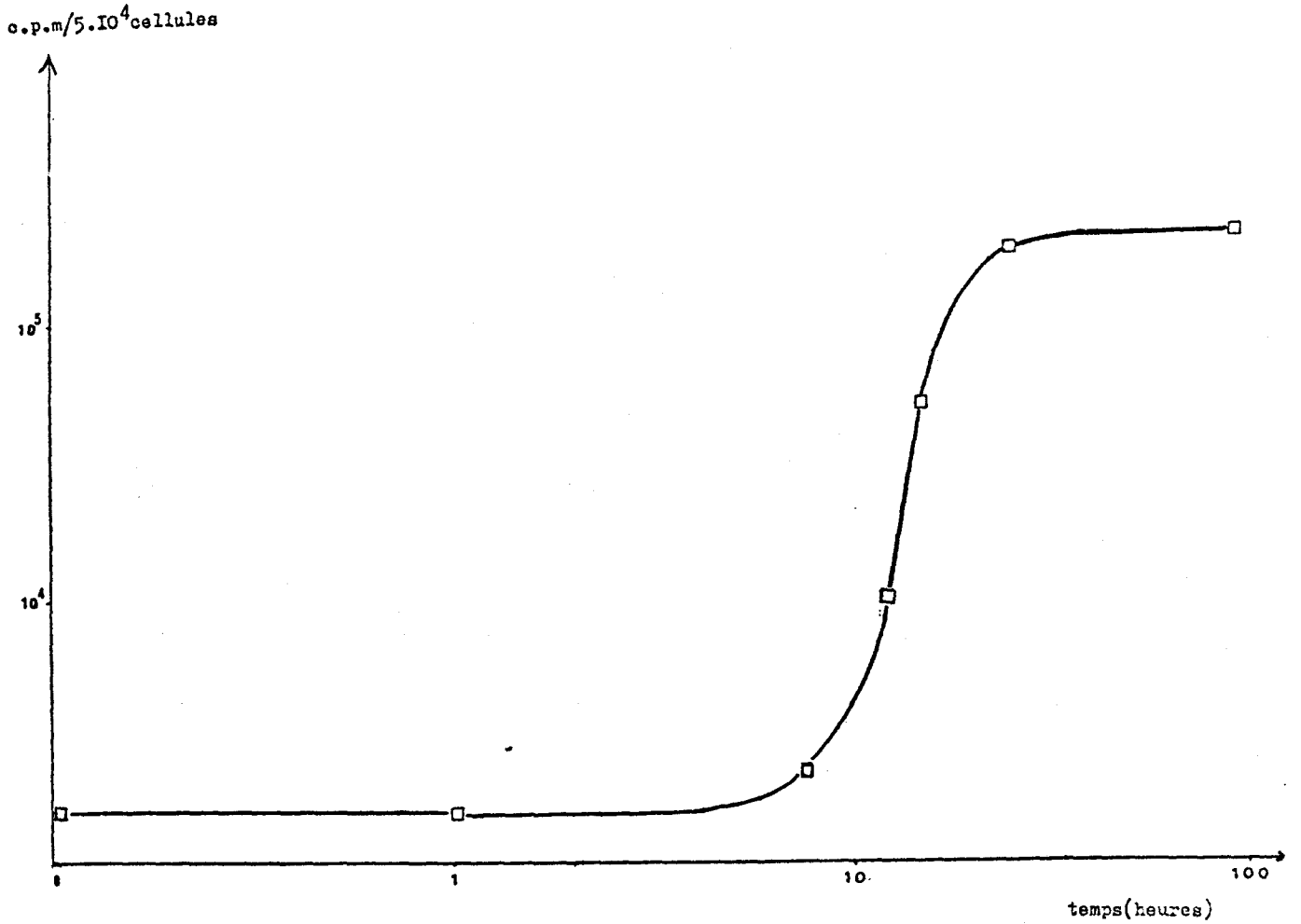


FIGURE N° 12 : Evolution du marquage radioactif des protoplastes en fonction du temps de contact avec 2 µCi/ml d'adénine ^{3}H

- Le dosage a été réalisé sur la fraction acido - insoluble .Les conditions expérimentales relatives à la culture des protoplastes (5.10^{4}) et au dosage de la radioactivité sont précisées précédemment

BUS LILLE

heure de culture et reste stable jusqu'à la centième heure. Ces résultats démontrent la viabilité des protoplastes, puisque l'augmentation de radioactivité traduit une synthèse d'acides nucléiques (fraction acido-insoluble = acides nucléiques) qui arrive à son maximum aux environs du deuxième jour de culture. Cela corrobore nos observations précédentes, puisqu'une synthèse d'acides nucléiques précède toujours une phase de division cellulaire qui en général débute entre le deuxième et le huitième jour.

4.2 - ETUDE CINETIQUE DES PENETRATIONS CYTOPLASMIQUES

Pour étudier les cinétiques de pénétration, nous avons préparé trois séries d'échantillons :

- Huit échantillons de 2 ml de milieu de pénétration avec 3.10^4 protoplastes /ml, 10 µg/ml de DNA radioactif de Rhizobium meliloti,

- Huit autres échantillons semblables supplémentés par 2 µg/ml de PLL,

- Huit échantillons de même composition complétés par 2 µg/ml de PLO,

A des temps variables (0 - 50 heures) on prélève un échantillon de chaque catégorie, ils sont traités par la déoxyribonucléase puis lavés comme nous l'avons précédemment déterminé . Les fractions acido-précipitables sont récupérées et leur taux de radioactivité déterminé.

L'étude des résultats obtenus (figure 13) nous montre une action favorable de la PLL et de la PLO sur le taux de radioactivité incorporé par les protoplastes. Les trois courbes présentent un maximum d'absorption à la deuxième heure de contact, et une stabilité entre la vingt cinquième et la cinquantième heure.

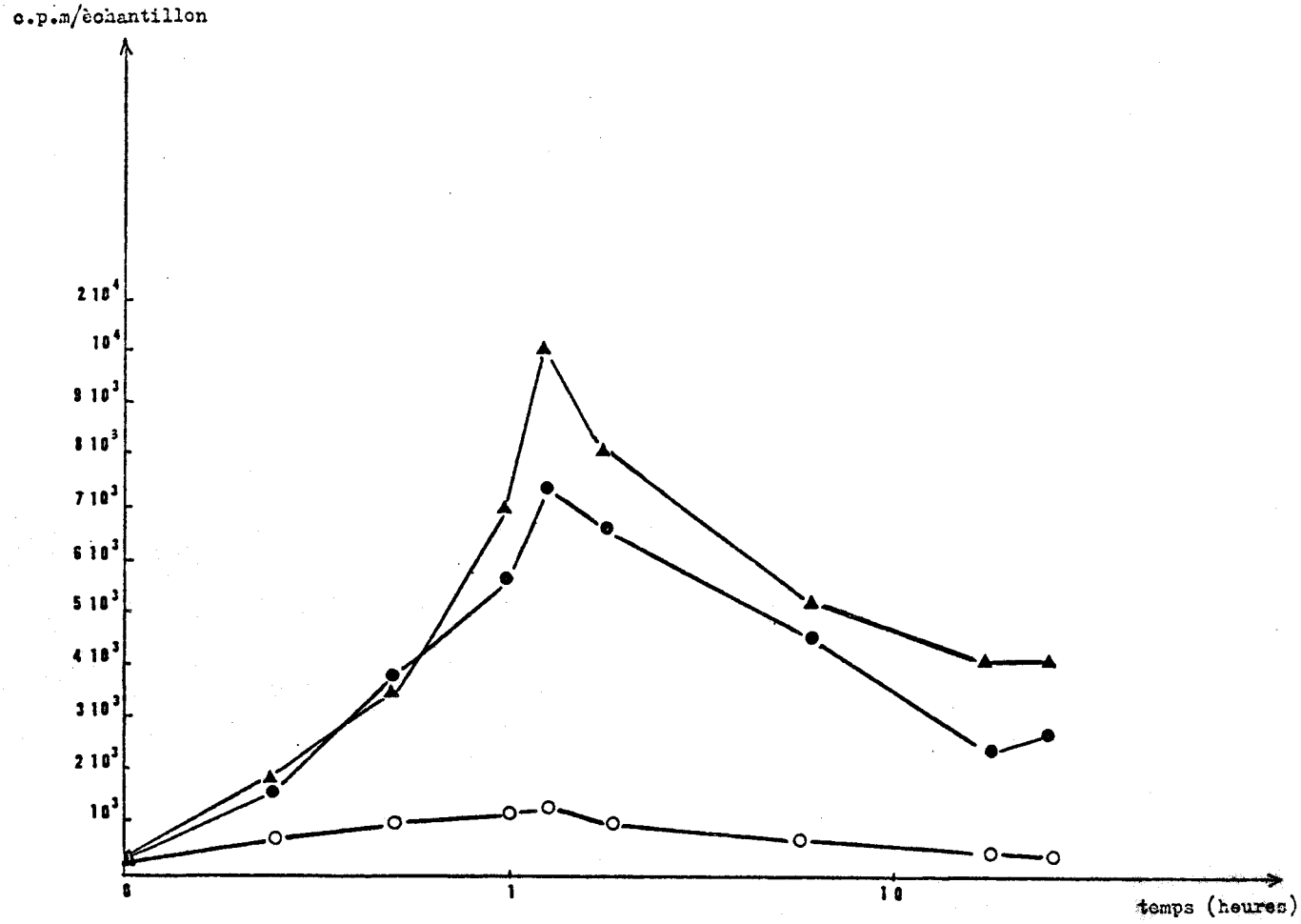


FIGURE N° 13 : Etude cinétique de la pénétration cytoplasmique du DNA exogène dans des protoplastes de tabac

- ○ : témoin
- ● : en présence de PLL
- ▲ : en présence de PLO

BUS LILLE

La capture du DNA exogène est donc nettement favorisée par la PLO et un peu moins par la PLL. Mais nous ne pouvons pas, par cette étude cinétique, déterminer le temps idéal de contact DNA - protoplastes. En effet, les maximums d'incorporation que nous observons vers la deuxième heure sont peut-être dûs, en grande partie, à la formation du complexe DNA - PLL ou PLO - protoplastes ,qui peut être à certains endroits résistant à la déoxyribonucléase (Figure n° 14)

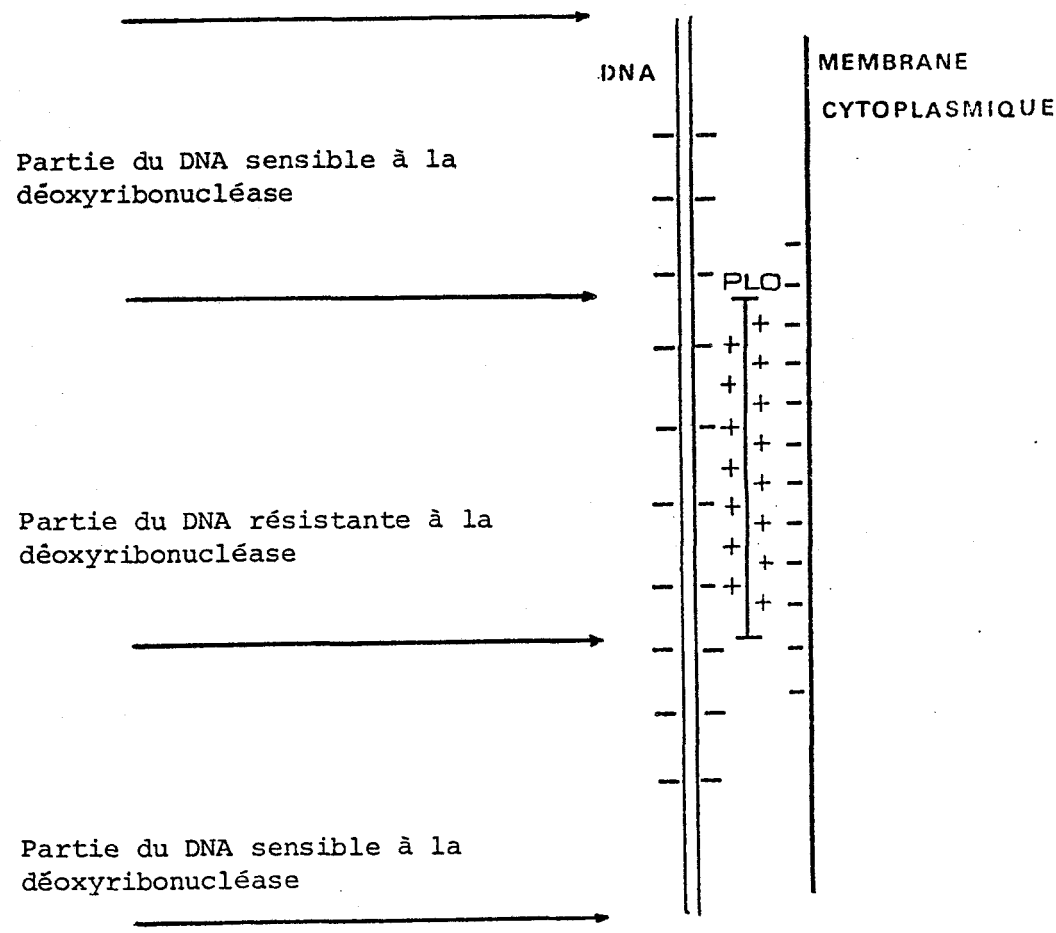


FIGURE n° 14 : COMPLEXE DNA - PLO - PROTOPLASTE
(Représentation hypothétique)

Après formation du complexe, le DNA lié indirectement à la PLO reste très sensible à la déoxyribonucléase, alors que le DNA fortement accroché reste très résistant.

La diminution du taux de radioactivité (figure n° 13) entre deux et vingt heures s'explique soit par une destruction cytoplasmique du DNA exogène pénétré, soit par un relâchement du complexe DNA - PLL ou PLO - protoplaste. Pour répondre à cette question nous approfondirons notre étude sur les pénétrations cytoplasmiques pour deux temps de contact : deux heures et vingt quatre heures.

4.3 - ETAT DU DNA EXOGENE APRES PENETRATION

Après capture, seule une partie du DNA se trouve dans la cellule, par contre le DNA qui n'a pas pénétré peut, soit être lié au complexe DNA - PLL ou PLO - protoplaste, soit rester en solution dans le milieu extérieur.

4.3.1 - Etat du DNA étranger non capturé

A l'état libre dans le milieu,le DNA non utilisé n'interfère pas dans les comptages puisqu'il est entièrement détruit par le traitement à la déoxyribonucléase.

Le DNA lié au complexe (figure n°14) est en partie résistant à la déoxyribonucléase : il interfère donc dans les comptages de radioactivité et nous avons beaucoup de difficultés à le différencier du DNA réellement pénétré dans la cellule hôte. Nous pouvons très facilement mettre en évidence la résistance de ce DNA lié à la déoxyribonucléase. Nous dénaturons par centrifugation rapide une culture de protoplastes, puis en présence de PLL ou de PLO, on adjoint du DNA radioactif de Rhizobium meliloti. Après quelques heures de contact, on traite l'échantillon par une forte dose de déoxyribonucléase, deux rinçages sont effectués, puis la radioactivité de la fraction acido-insoluble (complexe DNA - PLO ou PLL - débris de protoplaste = fraction acido-insoluble) est dosée. Nous retrouvons dans cette fraction 10 à 20 % du

DNA initial qui résiste à l'action de la déoxyribonucléase.

Pour déstabiliser les complexes non utilisés lors des pénétrations, nous provoquons des chocs osmotiques par des rinçages dans des milieux à molarité variable en mannitol.

4.3.2 - *Etat du DNA étranger capturé*

Après pénétration dans la cellule le DNA exogène transite dans le cytoplasme. Il est donc probable qu'une partie de ce DNA puisse être dénaturée par des nucléases cellulaires.

4.4 - QUANTIFICATION DES PENETRATIONS CYTOPLASMIQUES

Nous déterminerons la quantité de DNA acido précipitable intra-cellulaire pénétrée ou accrochée aux membranes des cellules hôtes. Par la suite, nous essaierons de nous débarrasser de la partie liée aux membranes.

4.4.1 - *Quantification du DNA exogène lié ou pénétré*

Nos échantillons sont préparés comme précédemment (2 ml de milieu avec 3.10^5 protoplastes/ml, 10 µg/ml de DNA radioactif en présence ou en absence de PLL ou de PLO), après des temps de contact de deux et de vingt quatre heures, nous traitons le mélange avec de la déoxyribonucléase et nous dosons la radioactivité de la fraction acido-insoluble. Nos résultats sont exprimés en picogrammes de DNA exogène par protoplaste . (Tableau n° V)

Temps (heures)	Qantité de DNA exogène par cellule (picogrammes) en présence de 2 µg/ml de PLO	en présence de 2 µg/ml de PLL	en absence de PLL et de PLO (témoin)
2	4,740	3,830	0,526
24	2,966	2,016	0,306

TABLEAU n° V : QUANTITE PAR PROTOPLASTE DE DNA EXOGENE LIE OU PENETRE

Les résultats sont exprimés en picogrammes par cellule. Les valeurs représentent la fraction acido-insoluble du DNA exogène après pénétration.

Les résultats ci-dessus montrent une action nettement favorable de la PLO, par rapport à la PLL et au témoin. Nous remarquons une différence notable entre les temps 2 et 24 heures qui pour l'instant demeure inexpliquée. La quantité maximale de DNA exogène lié ou capturé (PLO, 2 heures) représente 11,6 % du DNA total mis en contact : elle est à comparer avec la quantité minimale (témoin, 24 heures) qui est de 0,75 %.

Pour exprimer plus complétement nos résultats, il aurait fallu déterminer la fraction totale de DNA exogène pénétré (DNA total = DNA précipitable + DNA non précipitable) en dosant la radioactivité des échantillons après lavage des cellules. Malheureusement les pigments chlorophylliens atténuent d'environ 90 % (d'après nos témoins) les valeurs en c.p.m de nos comptages. Par contre lors de nos dosages radioactifs après précipitation et fi

tration, nous nous débarrassons presque totalement des pigments chlorophylliens (lavage à l'alcool et à l'éther) et l'atténuation reste comprise entre 5 et 10 %. De plus, les phénomènes de chimioluminescence sont de l'ordre de 3 % (calculé directement par le compteur L.K.B.). Tout comptage présentant des pourcentages supérieurs à ces valeurs sont exclus.

4.4.2 - *Quantification du DNA exogène capturé*

Nos essais de pénétration sont effectués de la même façon, mais tous les échantillons subissent trois lavages par centrifugation lente dans des milieux de rinçage à concentration variable en mannitol (60 - 80 et 50 g/l), le dernier culot est repris dans 2 ml de milieu de pénétration. Tous nos essais sont fait en double : une première série subit un traitement à la déoxyribonucléase, l'autre série ne subit aucun traitement. Nous comparons dans le tableau VI la radioactivité des fractions acido-insolubles.

temps (heures)	Quantité de DNA exogène par cellule (picogrammes)					
	en présence de 2 µg/ml de PLO		en présence de 2 µg/ml de PLL		en absence de PLL et de PLO	
	A	B	A	B	A	B
2	5,076	1,950	4,430	1,566	0,791	0,240
24	3,025	1,151	2,238	0, 866	0,458	0,085

TABLEAU n° VI : QUANTITE DE DNA EXOGENE PENETRE PAR PROTOPLASTE (picogramme/cellule)

A- après trois rinçages

B- après trois rinçages et traitement à la déoxyribonucléase

Les résultats représentent la fraction acido-insoluble du DNA exogène capturé.

L'analyse des résultats montre que les lavages en présence de mannitol en concentrations variables déstabilisent en grande partie les complexes DNA - PLL ou PLO - protoplastes : il en résulte une meilleure action de la déoxyribonucléase sur le DNA exogène non pénétré. La représentation spatiale schématique des molécules de PLL et de PLO pourrait expliquer en partie ce phénomène : le complexe représenté sous forme plane (figure n° 14) à en réalité une configuration tridimentionnelle provoquée par les chaines de PLL ou de PLO ; ceci expliquerait le fragilisation du système et une dislocation incomplète des complexes peut être envisagée lors des passages des échantillons dans les milieux à hypertonicité variable.

Ne sachant pas si par nos traitements le complexe DNA - PLL ou PLO - protoplaste est complètement dénaturé, il nous est impossible de déterminer la quantité réelle de DNA qui pénètre dans une cellule.

De plus il est intéressant de constater que les résultats du tableau VI montrent une similitude de comportement entre les échantillons témoins et les autres. En effet, les témoins présentent une quantité non négligeable de DNA lié qui peut être, comme pour les autres échantillons déstabilisé par trois lavages puis détruit par la déoxyribonucléase. En absence de PLL ou de PLO, il y a probablement formation d'un complexe grâce aux ions Ca^{2+} du milieu.

Pour expliquer la baisse observée entre 2 et 24 heures, nous devons envisager une dénaturation partielle par les cellules du DNA étranger capturé et seulement une légère déstabilisation du complexe au cours du temps.

4.4.3 - *Dénaturation cytoplasmique du DNA exogène*

Pour étudier la cinétique de dénaturation par les nucléases cellulaires du DNA étranger, nous réalisons des échantillons de 2 ml de milieu de culture (TOC) avec 3.10^5 protoplastes/ml. A des temps déterminés, compris entre 0 et 100 heures, un échantillon subit une centrifugation à 16.000 T/min durant 10 min (Centrifugeuse SORVAL), qui provoque l'éclatement de toutes les cellules. Après remise en suspension du culot dans le surnageant on ajoute 10 µg/ml de DNA radioactif de Rhizobium meliloti en présence de 10 µg/ml de PLL. Le mélange est incubé à 37°C durant une heure, la fraction insoluble des acides nucléiques est précipitée à l'ATCA et sa radioactivité est dosée comme précédemment. Les résultats observés (figure n°15) montrent qu'en une centaine d'heures, plus de 50 % du DNA étranger est dénaturé par le contenu cellulaire des protoplastes. Ces résultats correspondent avec ceux du tableau n° VI, qui mettent en évidence une chute d'environ 50 % de la quantité de DNA exogène pénétré ou lié après 24 heures de contact.

On peut donc admettre qu'une grande partie du DNA exogène linéaire qui pénètre dans les cellules est dénaturée par les nucléases. Il nous reste à savoir si une partie, si faible soit-elle, du DNA étranger non dénaturé peut atteindre le noyau des cellules végétales.

V - MISE EN EVIDENCE DES PENETRATIONS DE DNA DE RHIZOBIUM MELILOTI DANS DES NOYAUX DE PROTOPLASTES DE TABAC

Pour ces expérimentations, il fallait d'abord obtenir en grand nombre des noyaux ayant conservé leurs potentialités. Les travaux de ZUILY - FODIL (88) sur les protoplastes d'Avena sativa, nous ont servi de modèle expérimental.

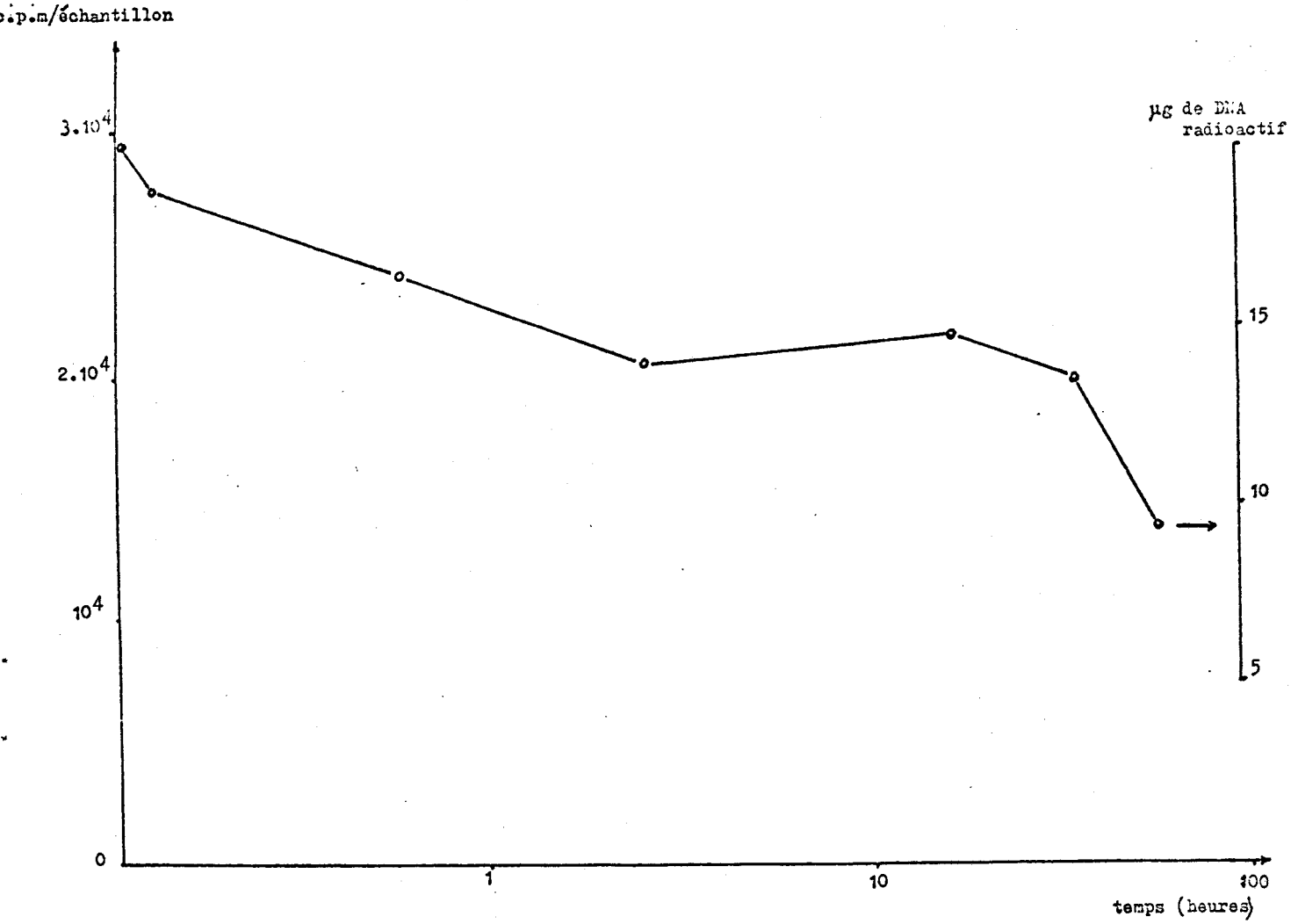


FIGURE N° 15 : Dénaturation du DNA exogène par le contenu cellulaire des protoplastes de tabac

- 1 échantillon = 6.10^5 protoplastes en présence de 20 µg de DNA radioactif
- 1 µg de DNA radioactif = 1489 c.p.m

BUS LILLE

5.1 - RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMALES POUR L'ISOLEMENT DE NOYAUX A PARTIR DES PROTOPLASTES DE TABAC

5.5.1 - *Protocole expérimental pour des noyaux d'Avena sativa*

La déplasmolyse des protoplastes est réalisée pendant trois minutes à 4°C dans un tampon tris maléate 0,05 M pH 6,6 contenant du $CaCl_2$, du $(CH_3\ COO)_2\ Mg$ et du mercaptoéthanol tous à la concentration de 0,005 M. L'ensemble constitue le "tampon salé" auquel on ajoute du sorbitol 0,5 M.

La lyse des protoplastes s'opère pendant 6 mn à 4°C, après addition de 4 volumes de "tampon salé" contenant 20 % (V/V) de glycérol et 6 % (w/v) de PVP (Polyvinyl pirrolidon). Cette solution constitue le "milieu d'isolement" auquel on ajoute du Triton X100 à la concentration finale de 5.10^{-3} (V/V).

La séparation des noyaux s'effectue à 700 x g pendant une durée de 2 min à 4°C ; ils sont remis en suspension dans 2 ml de milieu d'isolement (le surnageant contenant les débris et les autres organites est éliminé). La suspension de noyaux est ensuite déposée à la surface d'un "coussin" constitué de 12 ml de saccharose à 30 % (W/V) et de glycérol à 30 % (V/V) dilués dans du "tampon salé" qui est soumis à une centrifugation de 1300 x g pendant 10 min à 4°C. Les noyaux purifiés se trouvent à l'interface et le rendement est voisin de 70 %.

5.5.2 - *Modifications technologiques apportées*

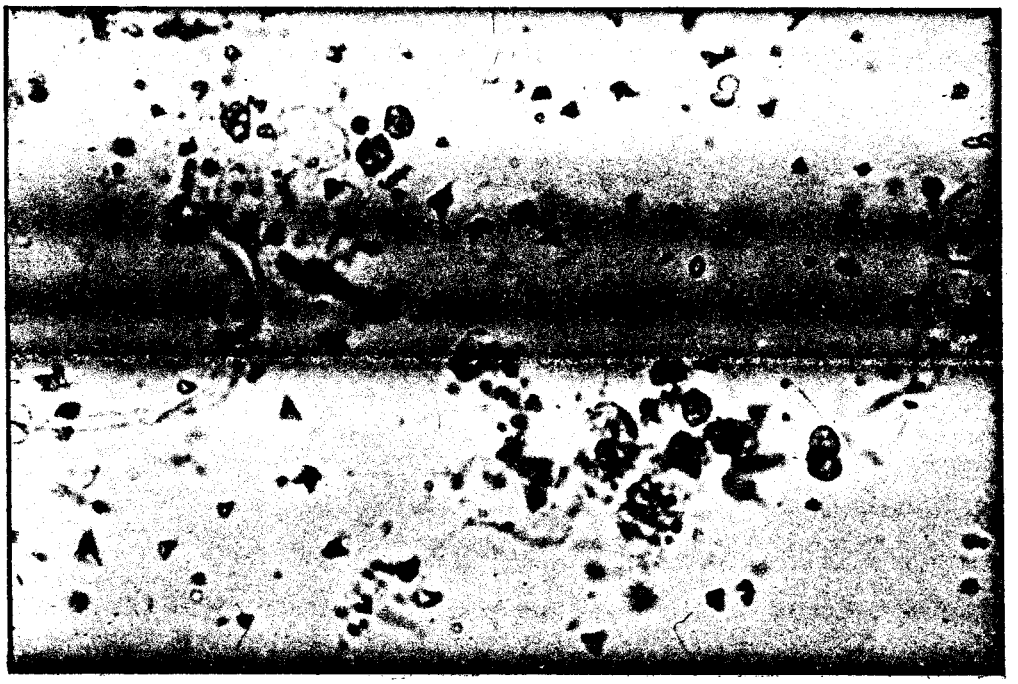
Les protoplastes sont préparés comme précédemment et 2.10^6 cellules sont mises en suspension dans 2 ml du milieu de déplasmolyse, mais pour cette déplasmolyse, nous ne pouvons utiliser le sorbitol puisque nos

protoplastes sont obtenus dans du mannitol. Nous devons trouver la concentration en ce dernier sucre permettant une bonne déplasmolyse, sans éclatement précoce des cellules. En faisant varier de 0,40 à 0,15 M les concentrations en mannitol les meilleurs résultats sont obtenus avec une concentration de 0,30 M.

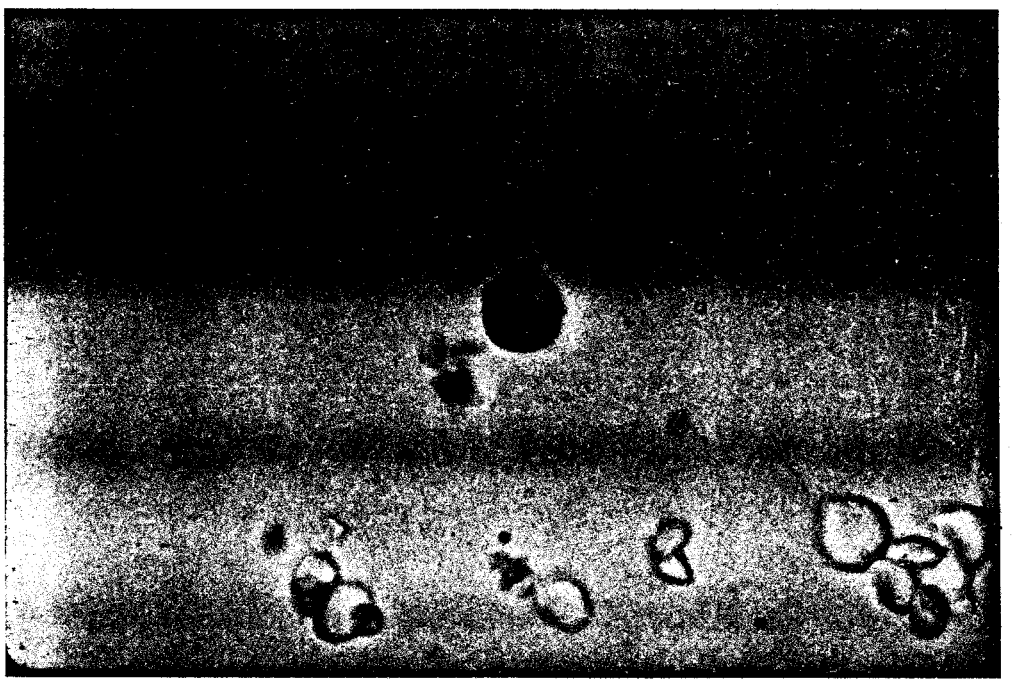
La lyse des protoplastes sans modification technologique ne permet pas d'obtenir un rendement supérieur à 16 % (les rendements étant calculés en fin de lyse) et les noyaux sont en grande partie entourés de débris cytoplasmiques dont de nombreux chloroplastes. La lyse est donc incomplète, une amélioration est réalisée en augmentant les concentrations en Triton X100 : des rendements intéressants sont obtenus en augmentant jusqu'à 0,75 % la concentration finale en Triton X100 ; au dessus de 1,5 % les rendements chutent au dessous de 15 % alors qu'ils restent de l'ordre de 60 à 80 % avec des concentrations comprises entre 0,75 % et 1 %. La concentration de 1 % donne non seulement un bon rendement, mais nous permet d'éliminer une grande partie des chloroplastes à l'état libre dans le milieu : c'est elle qui est retenue pour le milieu de lyse (que nous utilisons dans les proportions de 8 ml pour 2 ml de milieu de déplasmolyse).

A ce stade, nous obtenons des noyaux plus ou moins sphériques qui ne supportent ni la sédimentation ni la remise en suspension du culot de centrifugation. En effet, à la suite de ces deux traitements nous perdons par éclatement plus de la moitié de ceux-ci : pour pallier à cet inconvénient nous ajustons notre milieu de lyse, puis ultérieurement le milieu d'isolement à la même concentration en mannitol (0,3 M) que celui de déplasmolyse ; en opérant de cette façon les noyaux restent parfaitement sphériques et se conservent bien après sédimentation et suspension (Photographies 8,9 et 10).

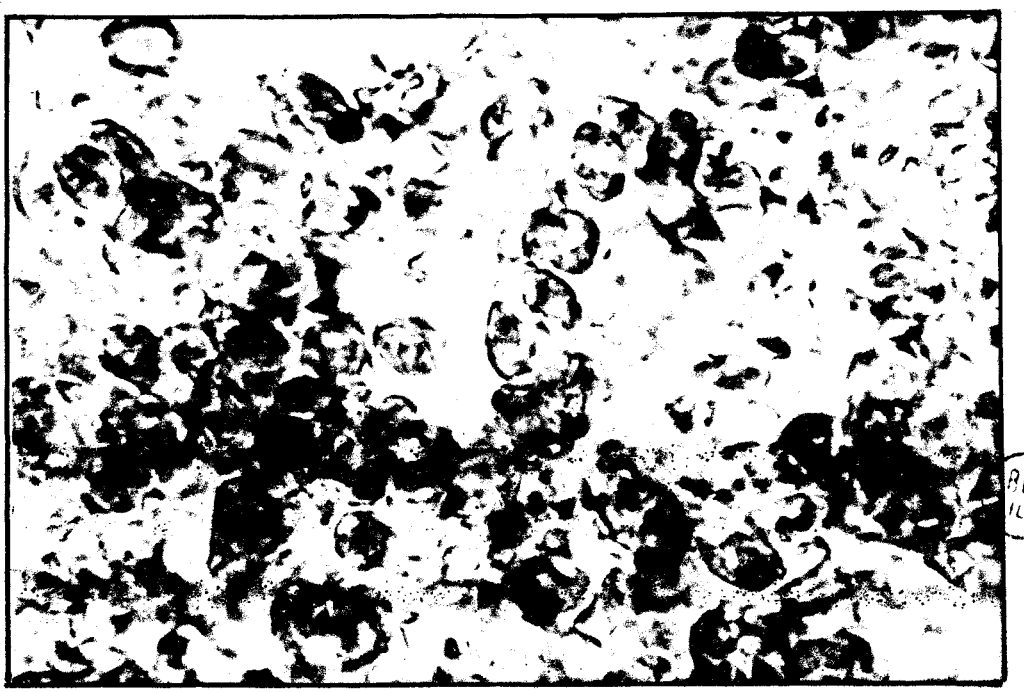
8



9



10



BUS
ILLE

La séparation finale des noyaux par sédimentation à 1500 x g sur un coussin de saccharose n'est pas utilisable avec notre matériel. Même quand nous augmentons considérablement la concentration en saccharose (60 % au lieu de 30 %) la majorité des noyaux ne reste pas à l'interface et rejoint le culot de centrifugation. Pour éliminer les contaminants nous effectuons trois centrifugations successives (à 1000 x g pendant 4 min et à 4°C) des noyaux en suspension dans 10 ml de milieu d'isolement : ainsi nous obtenons avec de bons rendements (60 à 75 %) des noyaux sphériques dans un milieu presque entièrement dépourvu de chloroplastes (Photographie 10).

Pour une bonne réalisation de cette technique, toutes les opérations doivent être effectuées à 4°C ; il est même possible à cette température de conserver les noyaux pendant 24 heures sans trop de perte.

5.2 - ETUDE DE LA CAPACITE D'INCORPORATION DE PRECURSEURS RADIOACTIFS PAR DES NOYAUX ISOLES

La cinétique d'incorporation d'adénine ^{3}H par des noyaux isolés est représentée sur la figure n° 16. Chaque point est obtenu à partir d'un échantillon de 2 ml de milieu d'isolement comprenant 3.10^{5} noyaux/ml et $2,5\ 10^{-2}$ m Ci/ml de précurseur. La radioactivité totale est dosée après deux rinçages, par centrifugation des noyaux. Le dernier culot étant repris dans 0,5 ml de milieu de pénétration, (pour éviter toute coagulation du PVP avec le liquide de scintillation).

On note que l'incorporation des précurseurs radioactifs est rapide et se stabilise vers la troisième heure pour rester constante jusqu'en fin d'expérience : les noyaux isolés sont donc capables au moins pendant huit heures d'un certain métabolisme en incorporant des précurseurs, nous pouvons donc réaliser le même genre d'expérimentation avec du DNA exogène.

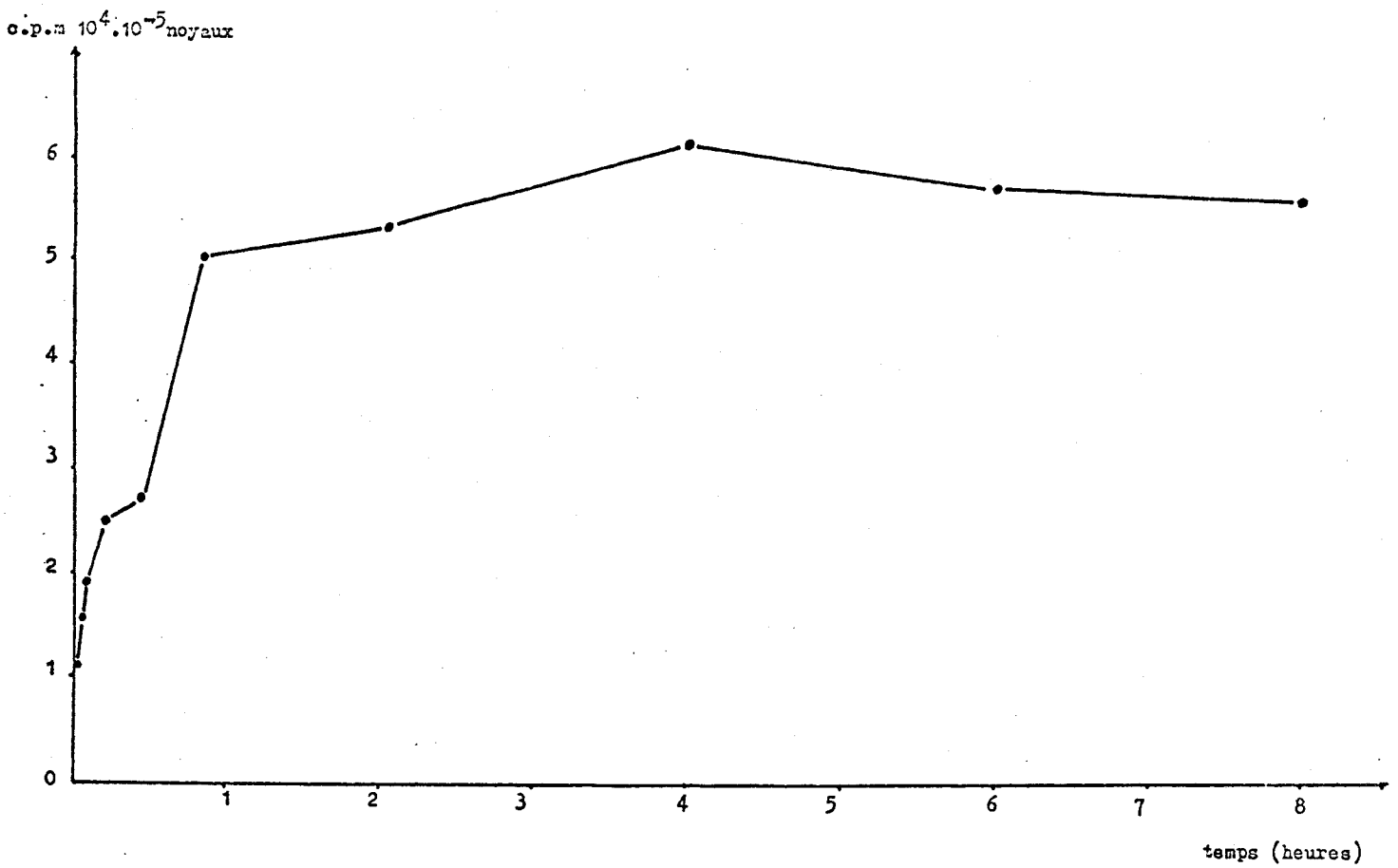


FIGURE N° 16 : Incorporation d'adénine ^3H dans des noyaux isolés la température d'incorporation est de 20°C et la quantité de précurseur est de 5.10^{-2}mCi pour 6.10^5noyaux

BUS LILLE

5.3 - ETUDE DE L'INCORPORATION DE DNA EXOGENE DE RHIZOBIUM MELILOTI PAR DES NOYAUX ISOLES

5.3.1 - *Etude Directe*

Dans un premier temps, nous étudierons l'incorporation de DNA exogène par 6.10^5 noyaux en présence de 20 µg de DNA radioactif de Rhizobium meliloti. Après des temps de contact de 30 ou 60 minutes, nous doserons la radioactivité des fractions acido-insolubles après précipitation à l'ATCA. Comme pour les protoplastes, nos essais d'incorporation se feront en présence ou en absence de PLL et de PLO. Le DNA exogène utilisé par les noyaux sera éliminé par une série de trois lavages, complétés ou non par un traitement à la déoxyribonucléase (200 µg/ml, 4 mn à 37 ° C°).

temps (min)	Quantité de DNA exogène par noyau (picogrammes)					
	en présence de 2 µg/ml de PLO		en présence de 2 µg/ml de PLL		en absence de de PLL et de PLO	
	A	B	A	B	A	B
30	2,306	1,331	2,028	0,953	0,683	0,585
60	3,943	1,921	2,726	1,201	0,898	0,505

TABLEAU n° VII : QUANTITE DE DNA EXOGENE INCORPORE PAR NOYAU ISOLE (picogramme/noyau)

A - Après 3 rinçages

B - Après 3 rinçages suivis d'un traitement à la déoxyribonucléase

Les résultats exprimés en picogrammes représentent la fraction acido-insoluble du DNA exogène incorporé.

Les résultats reportés dans le tableau n° VI montrent ici aussi une action favorable de la PLL et de la PLO : les noyaux comme les protoplastes entiers doivent donc présenter un complexe DNA- adjuvant identique. Le temps de 60 mn semble être celui qui convient le mieux, mais nous remarquons une chute très importante des quantités de DNA pénétrés après traitement à la déoxyribonucléase : nous analyserons plus particulièrement cette incidence dans le paragraphe suivant. Mais d'ores et déjà, nous sommes certains que les noyaux sont susceptibles d'incorporer du DNA exogène.

5.3.2 - *Etude indirecte par analyse en gradient de chlorure de Cesium*

Avant d'étudier l'incorporation de DNA exogène dans des noyaux isolés par des gradients de chlorure de cesium, nous déterminerons expérimentalement la "densité apparente" dans une solution de chlorure de cesium du DNA bactérien et du DNA chromosomique des noyaux de protoplastes de tabac.

5.3.2.1 - Détermination des "densités apparentes" du DNA de Rhizobium meliloti

Après extraction et purification du DNA de la souche de Rhizobium meliloti, nous l'analysons en gradient de CsCl en présence des deux témoins suivants (commercialisés par SIGMA) :

- DNA de Micrococcus ..... de "densité apparente" 1,731 g/ml
- Poly (dA - dT) ..... de "densité apparente" 1,678 g/ml

La figure n° 17 montre un exemple de détermination de la densité du DNA bactérien, nous trouvons après deux déterminations une "densité" de 1,721 g/ml pour la souche 2011 m8 str.

Pour la détermination de la densité du DNA de tabac, nous procédons de manière identique après extraction du DNA à partir de noyaux isolés.

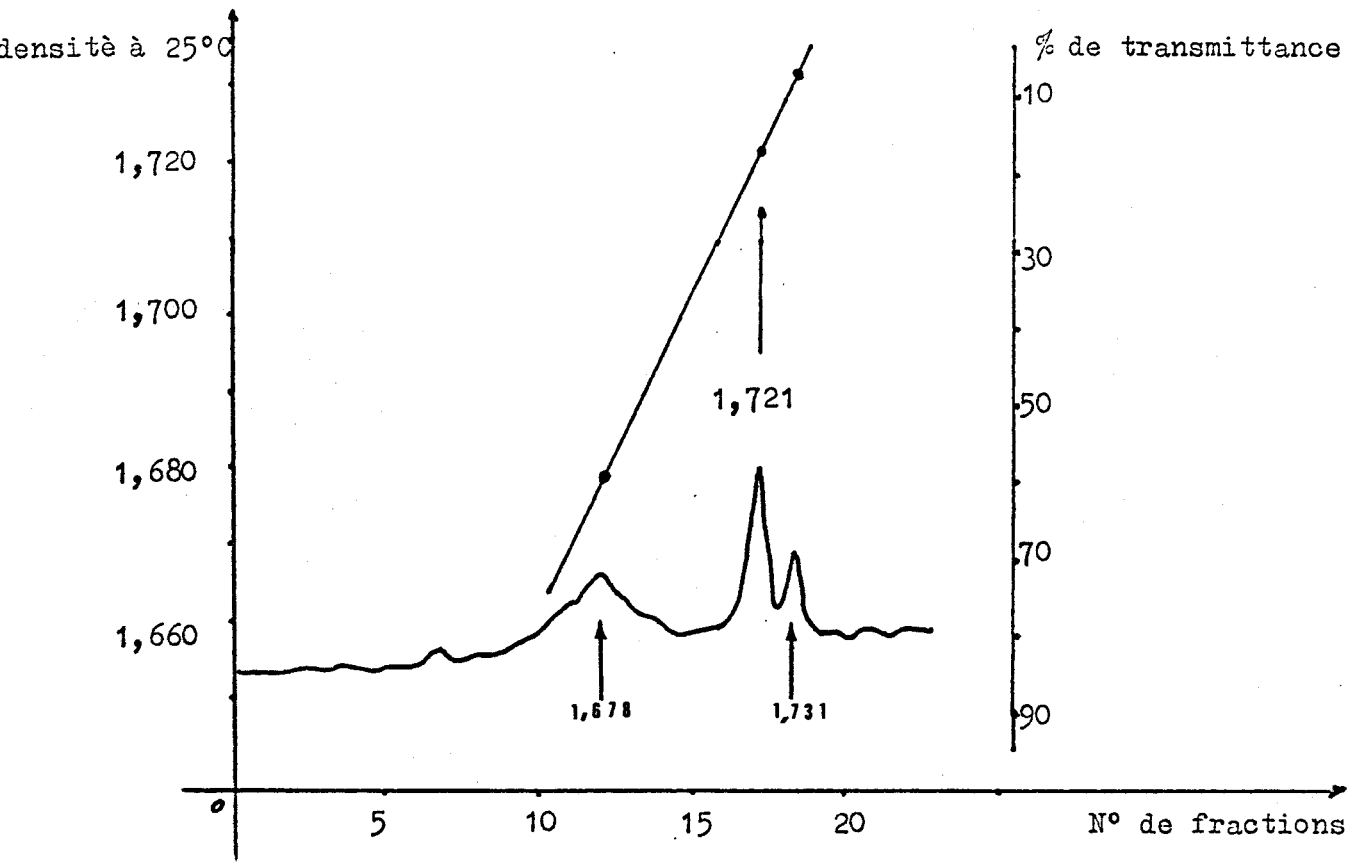


FIGURE n° 17 : DETERMINATION DE LA "DENSITE" DU DNA EXTRAIT DE LA SOUCHE DE DE RHIZOBIUM MELILOTI 2011 m 8 str

(chaque fraction est analysée automatiquement en transmittance)

La figure n° 18 montre un exemple de détermination, et nous trouvons après deux expérimentations une "densité apparente" de 1,694 g/ml pour le DNA de Tabac.

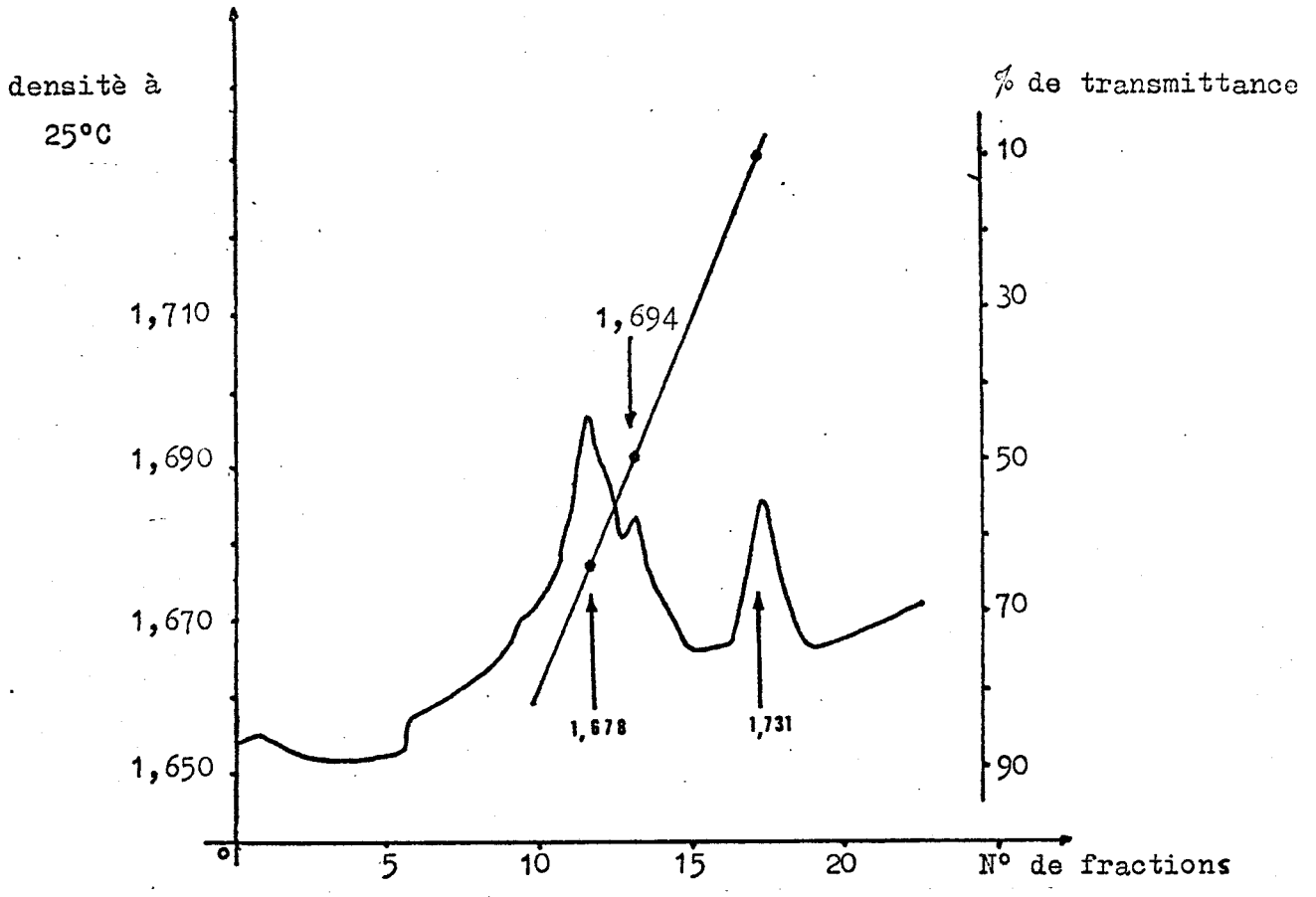


FIGURE n° 18 : DETERMINATION DE LA DENSITE DU DNA EXTRAIT DE NOYAUX DE DE PROTOPLASTES DE TABAC

(chaque fraction est analysée automatiquement en transmittance)

5.3.2.2 - Etude de l'incorporation de DNA exogène par des noyaux isolés et analyse en gradients de CsCl

Dans un premier temps, nous procédons comme pour l'étude directe avec des échantillons de 4 ml au lieu de 2 ml, mais après rinçage avec ou sans traitement à la déoxyribonucléase, nous lysons les noyaux pour récupérer le DNA total que l'on purifie. L'analyse en gradient de chlorure de cesium de ce DNA permet de déterminer la transmittance et la radioactivité de chaque fraction Les dosages de radioactivité sont pratiqués directement sans précipitation à l'ATCA. En fin de préparation des gradients, nous ajoutons 10 µg de DNA non radioactif de Rhizobium ce qui nous permettra après lecture de reconnaître les différents pics.

Trois séries de gradients sont réalisées :

- En présence de PLO, avec ou sans traitement des noyaux à la déoxyribonucléase (Figure n° 19),

- En présence de PLL, avec ou sans traitement des noyaux à la déoxyribonucléase (Figure n°20),

- Deux témoins sans PLL ni PLO, avec et sans traitement à la déoxyribonucléase (Figure n°21).

L'analyse des résultats montre comme toujours une action favorable de la PLO et de la PLL par rapport aux témoins ; il semble difficile de faire un parallèle entre la formation des "complexes" sur les membranes cytoplasmiques et l'action des adjuvants au niveau nucléaire : les actions de la PLL et de la PLO semblent être moins importantes sur les noyaux libres.

Ces pics de radioactivité sont bien visibles et strictement en regard de ceux observés en transmittance positionnant à 1,721 g/ml le DNA bactérien non radioactif. Ils ne sont remarquables que sur les gradients issus des noyaux n'ayant pas subit de traitement à la déoxyribonucléase : en fait, nous remarquons une destruction presque totale par la déoxyribonucléase du DNA endogène et étranger des noyaux et celà se traduit par une disparition des pics observés pour une densité de 1,694 g/ml. Il est impossible de quantifier exactement le DNA radioactif capturé par les noyaux étant donné les imprécisions de manipulation dues à l'extraction et la purification du DNA nucléaire total : nos résultats ne peuvent être interprétés que de façon qualitative .

La capture de DNA exogène par des noyaux isolés, nous permet d'envisager maintenant des pénétrations nucléaires de DNA étranger par des protoplastes entiers.

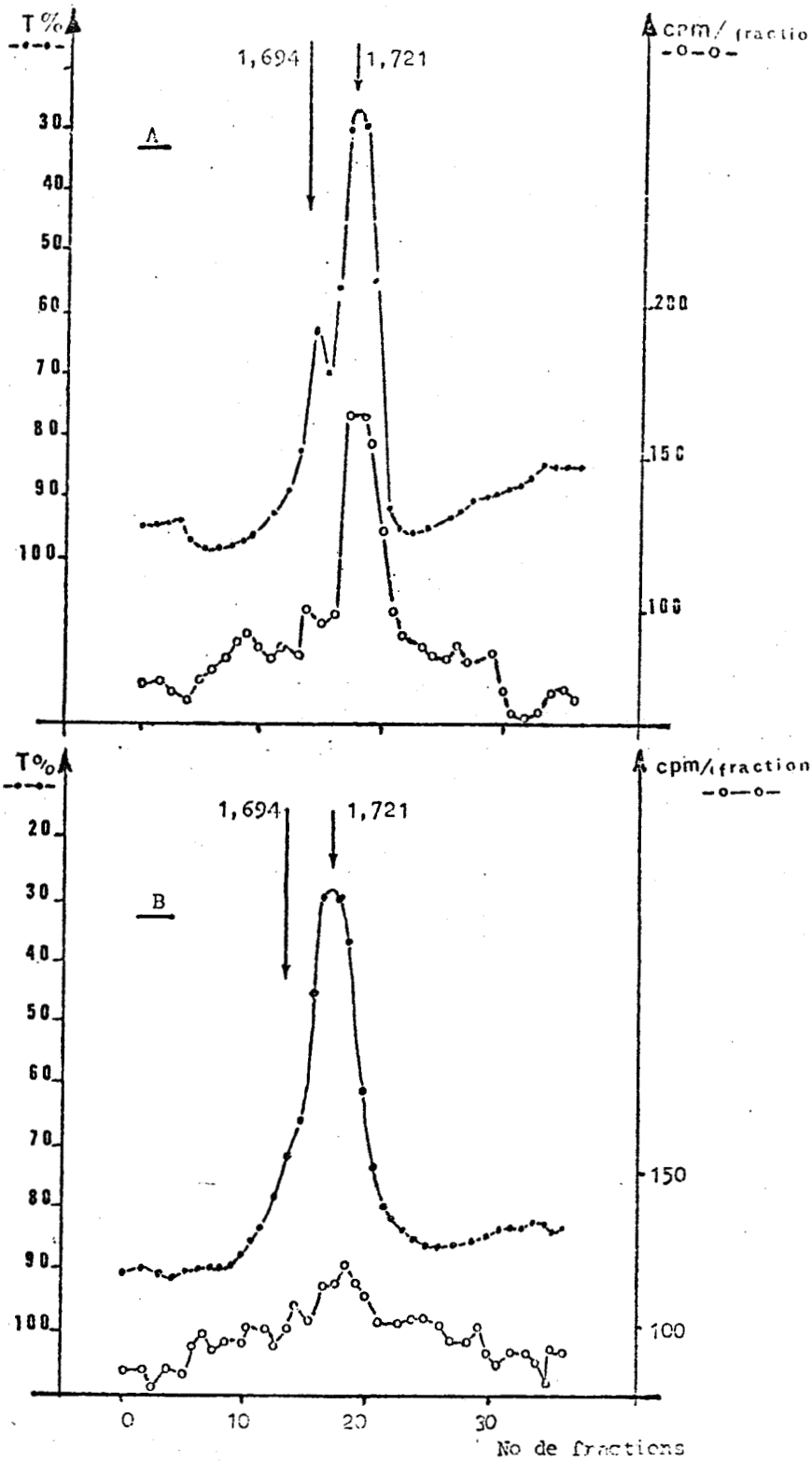


FIGURE N° 19: Centrifugations en gradients de chlorure de césium du DNA extrait de fractions nucléaires (isolées à partir de cellules de Tabac), après incubation avec du DNA ^{3}H de Rhizobium meliloti .

- Les échantillons de 4 ml sont complétés par 3.10^{5} noyaux/ml, 10 µg/ml de DNA ^{3}H et 2 µg/ml de PLO
- A: échantillon ayant subit un traitement à la déoxyribonuclèase, B: échantillon sans traitement

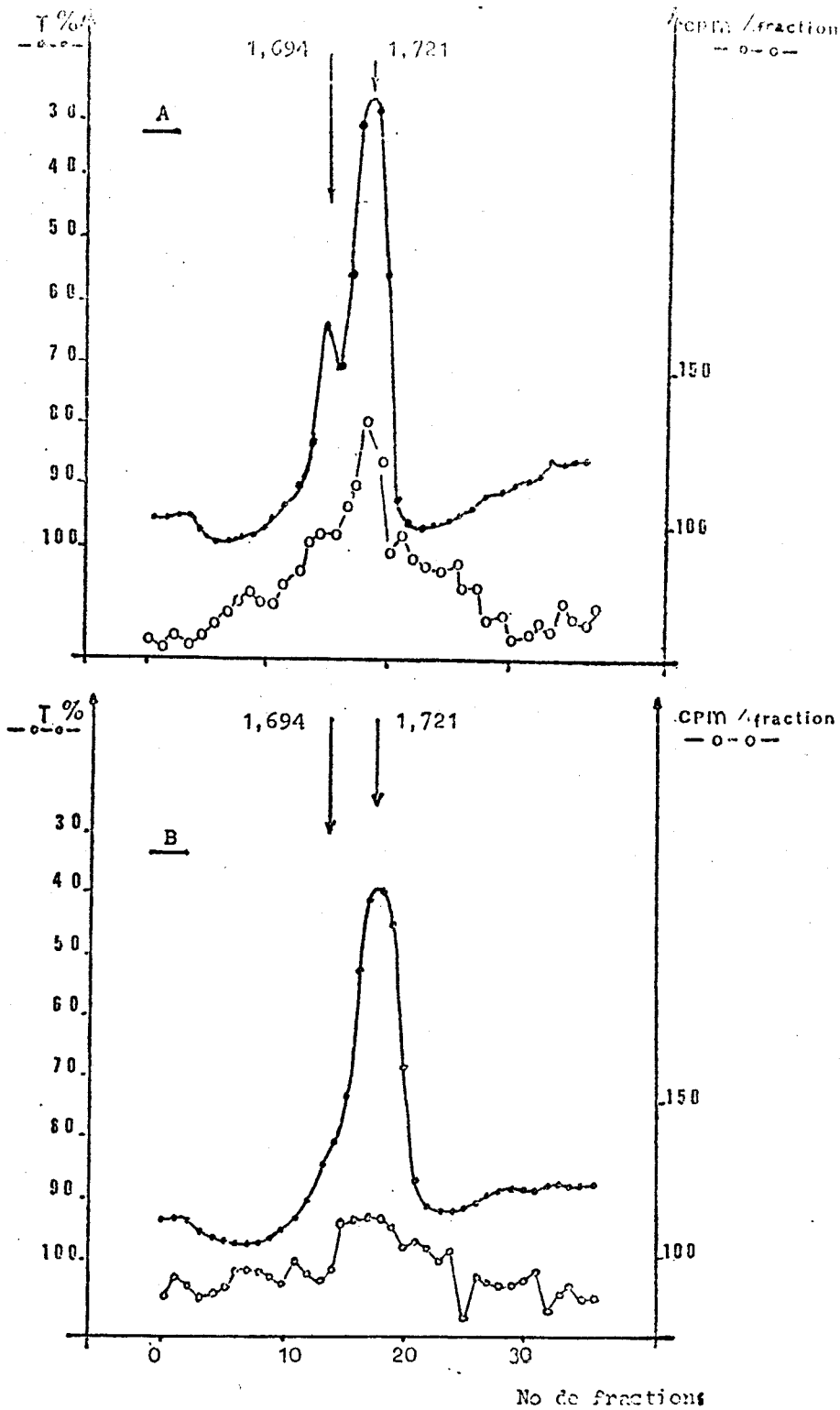


FIGURE N° 20 : Centrifugations en gradients de chlorure de césium du DNA extrait de fractions nucléaires (isolées à partir de cellules de Tabac) après incubation avec du DNA radioactif de Rhizobium meliloti.

- Les échantillons de 4 ml sont complétés par 3.10^5 noyaux/ml, 10 µg/ml de DNA ^3H et 2 µg/ml de PLL.
- A: échantillon ayant subit un traitement à la déoxyribonucléase, B: échantillon sans traitement.

BUS LILLE

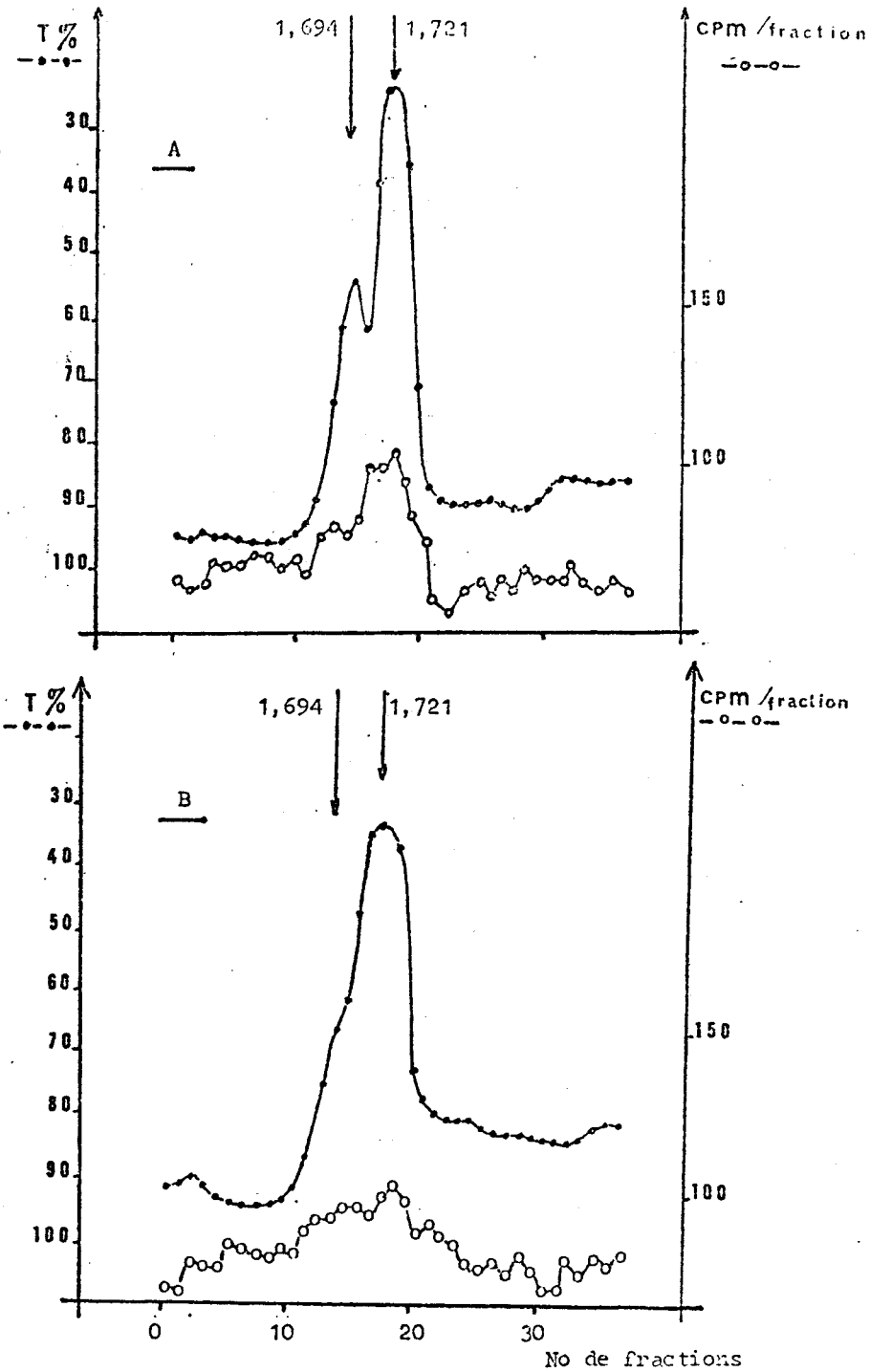


FIGURE N° 21 :Centrifugations en gradients de chlorure de cesium du DNA extrait de fractions nucléaires(isolées à partir de cellules de Tabac),après incubation avec du DNA ^{3}H de Rhizobium meliloti .

- Les échantillons de 4 ml sont complètés par 3.10^{5} noyaux/ml,et 10 µg de DNA ^{3}H .
- A:échantillon ayant subit un traitement à la déoxyribonucléase,B:échantillon sans traitement .

BUS LILLE

5.4 - ETUDE DE L'INCORPORATION NUCLEAIRE DE DNA EXOGENE DE RHIZOBIUM MELILOTI PAR DES PROTOPLASTES DE TABAC

5.4.1 - *Etude Directe*

Nous suivons l'incorporation par $4,2.10^6$ protoplastes, dans 14 ml de milieu de pénétration en présence ou en absence de 2 µg de PLL ou de PLO, et de 10 µg/ml de DNA radioactif de Rhizobium meliloti.

Nous étudions l'incorporation nucléaire en dosant la radioactivité avec ou sans précipitation des acides nucléiques après 24 heures de contact.

5.4.1.1 - Détermination du DNA total capturé

En dosant la radioactivité totale des noyaux sans précipitation à l'ATCA, nous prenons en compte le DNA total capturé dénaturé ou non. Comme précédemment, après 24 heures de contact les protoplastes sont traités à la déoxyribonucléase après lavage dans des milieux à concentrations variables en mannitol. Après extraction et purification des noyaux, nous calculons le rendement d'obtention (à partir du nombre initial de protoplastes) puis la radioactivité est directement mesurée (Tableau n° VIII)

Quantité de DNA exogène par noyau (picogrammes)		
en présence de 2 µg/ de PLO	en présence de 2 µg/ml de PLL	en absence de PLL et de PLO
0,073	0,067	0,055

TABLEAU n° VIII : QUANTITE DE DNA EXOGENE PAR NOYAU APRES ESSAIS D'INCORPORATION DANS DES PROTOPLASTES ENTIERS

(Les résultats sont exprimés en picogrammes par noyau et en tenant compte du rendement d'obtention des noyaux)

Les résultats rapportés dans le tableau VIII, montrent une action favorable de la PLO et de la PLL moins marquée que précédemment, mais de toute manière la quantité totale de DNA exogène pénétré par noyau reste très faible et ne représente, dans le meilleur des cas, que 0,22 % du DNA mis en jeu.

5.4.1.2 - Détermination du DNA étranger non dénaturé capturé

Nous procédons exactement comme précédemment, mais la radioactivité est mesurée après précipitation à l'ATCA du DNA total non dénaturé des noyaux. (Tableau n° IX)

Quantité de DNA exogène par noyau (picogrammes)		
en présence de 2 µg/ml de PLO	en présence de 2 µg/ml de PLL	en absence de PLL et de PLO
0,064	0,059	0,042

TABLEAU n° IX : QUANTITE DE DNA EXOGENE PRECIPITABLE APRES ESSAI DE CAPTURE SUR PROTOPLASTES ENTIERS

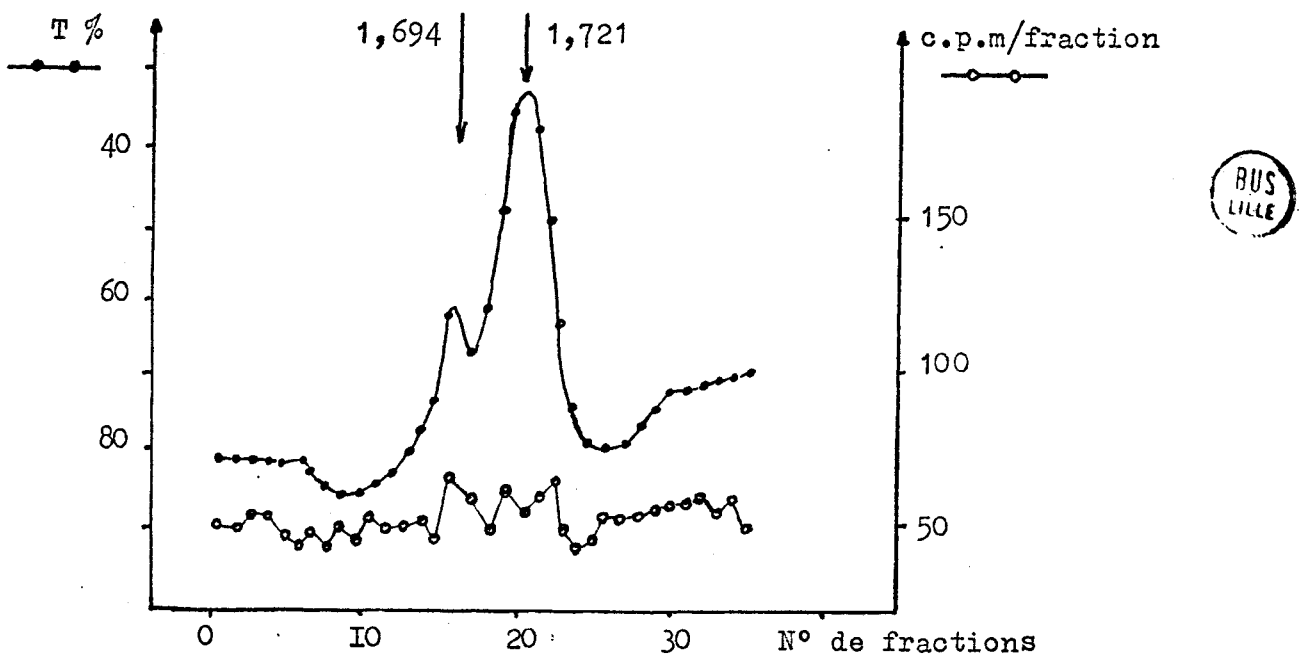
(Les résultats sont exprimés en picogrammes par noyau et en tenant compte du rendement d'obtention des noyaux)

Nous remarquons en comparant les tableaux VII et IX, que le DNA dénaturé représente environ 20 % du DNA total capturé. Il faut néanmoins préciser que ces résultats sont obtenus avec des valeurs de radioactivité très faibles, (225 à 399 c.p.m. pour les deux derniers tableaux), qui ne nous permettent pas de quantifier avec sureté le DNA capturé par les noyaux ; c'est pourquoi nous interprétons avec une grande réserve ces dernières valeurs.

5.4.2 - *Etude indirecte*

Nous procédons comme pour la méthode directe, mais le nombre total des protoplastes est de 15.10^6, les autres éléments comme la PLL et la PLO ainsi que le DNA bactérien radioactif sont augmentés dans les mêmes proportions. Après isolement et lyse des noyaux, le DNA est extrait et purifié puis analysé grâce à des gradients de CsCl.

Malheureusement, que ce soit en absence ou en présence de PLL ou de PLO, les résultats sont décevants : la figure n° 22 nous en donne un exemple.



BUS LILLE

FIGURE n° 22 : CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE CsCl DU DNA EXTRAIT DES FRACTIONS NUCLEAIRES. ISSUES DE PROTOPLASTES DE TABAC APRES INCUBATION AVEC DU DNA RADIOACTIF DE RHIZOBIUM MELILOTI

- Les échantillons de 10 ml de milieu sont complétés par $1,5\ 10^6$ protoplastes/ml en présence de 20 µg/ml de DNA et 2 µg/ml de PLO.

- Le gradient est complété par 15 µg de DNA bactérien non marqué.

Le marquage du DNA bactérien est trop faible, et la quantité incorporée par noyau trop petite pour que l'on puisse les mettre en évidence : en effet, au niveau des pics caractéristiques, la radioactivité mesurée ne dépasse pas de beaucoup le "bruit de fond".

L'étude indirecte ne pourrait donc être réalisée avec efficacité qu'en utilisant un DNA bactérien fortement radioactif.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La capture de DNA exogène par des protoplastes végétaux dépend essentiellement des conditions expérimentales utilisées, c'est pourqupi dans un premier temps, nous comparerons nos méthodes avec celles de HUGHES et coll (1977 (98)) qui étudient l'incorporation par des protoplastes de tabac de DNA de Bacillus subtilis radioactif.

Nous utilisons lors de nos essais des concentrations en polycations (PLL et PLO) de 2 µg/ml alors que la plupart des auteurs dont HUGHES ; (98) utilisent des doses de 5 µg et constatent des mortalités cellulaires de 50 à 60 % après 4 heures de culture. Nos observations sont concordantes ; mais avec 2 µg/ml les mortalités restent, dans nos essais, comprises entre 5 et 15 %.

La quantité de DNA exogène mise en contact avec les protoplastes varie suivant les études de 2 à 20 µg/ml (OHYAMA, 1975 (75)) - BEHKI, 1979(99) , etc ...) ; les phénomènes de toxicité en présence de polycation n'apparaissent que pour des doses de DNA supérieures à 100 µg/ml. Dans nos travaux nous utilisons des concentrations en acide nucléique de l'ordre de 10 µg/ml après avoir vérifié la non toxicité de cette concentration (en présence des polycations). Cette quantité relativement élevée est due au faible marquage de notre DNA bactérien.

Dans nos échantillons nous utilisons 3.10^5 protoplastes, ce qui est légèrement inférieur aux nombres préconisés (0,5 à $1,510^6$/ml) dans diverses études. Pour des raisons techniques, (filtration des précipités d'acides nucléiques) il nous est impossible d'augmenter le nombre de cellules par échantillon. Nous exprimons nos résultats en picogrammes par cellule ou par noyau, pour établir facilement des comparaisons.

La cinétique d'incorporation du DNA exogène par des protoplastes de tabac nous montre un optimum au temps 2 heures : il y a donc contradiction avec les valeurs obtenues par HUGHES (98) lors de l'incorporation de DNA de Bacillus par des protoplastes de tabac ; pour lui, cette incorporation est une fonction linéaire de 0 à 6 heures en absence de polycation et en leur présence l'optimum est atteint à la quatrième heure. Il est probable que cette différence ne soit due qu'à une dénaturation intra-cytoplasmique plus rapide du DNA de Rhizobium meliloti. A ce sujet nous remarquons, comme l'auteur précédemment cité, une dénaturation très importante du DNA exogène en présence d'un lysat cellulaire.

Si nous comparons nos résultats avec ceux d'OHYAMA en 1972 (75) concernant l'incorporation par des protoplastes d'Ammi visnaga de DNA d'Echerichia coli, nous remarquons quelques similitudes. Il met en évidence une incorporation de 0,2 % du DNA exogène insoluble dans descellules végétales, cette valeur passe respectivement à 2,5 puis 4 % en présence de PLL ou PLO. Par contre, lors de nos essais nous obtenons dans les mêmes conditions 0,7 ; 4,7 et 5,85 %. Malgré nos pourcentages plus importants, certainement dus à l'utilisation de DNA de Rhizobium, nous obtenons des valeurs proportionnelles à celles d'OHYAMA (75) en présence ou en absence de polycations.

Nous constatons une destruction de 50 à 75 % du DNA exogène capturé par hydrolyse cytoplasmique ce qui correspond aux 80 % constatés par HUGHES (98) ; ses travaux mettent en évidence une incorporation de 0,2 à 2,2 picogrammes par cellule de DNA exogène, alors que chez nous ces valeurs sont de l'ordre de 0,24 à 1,95 : cependant nous n'effectuons aucune correction en fonction de la mortalité des protoplastes, ce qui n'est pas le cas pour ce dernier auteur qui est obligé d'en tenir compte puisque 60 % de ceux-ci éclatent en présence de PLO ou de PLL. Par une étude rapide HUGHES (98)

montre que par noyau,il est incorporé 0,1 picogramme du DNA exogène capturé par cellule en absence de polycation ; dans nos essais nous n'en trouvons que 0,055 picogramme.

LIEBKE et HESS en 1977 (89) étudient d'une façon plus rigoureuse les incorporations de DNA exogène dans des noyaux issus de protoplastes de Pétunia ; comme dans nos propres essais et pour éviter toutes contaminations, les protoplastes sont lavés plusieurs fois et traités avec de la déoxyribonucléase. Les auteurs détectent le DNA exogène après lyse des noyaux isolés et analyse du DNA total insoluble en gradient de CsCl. Eux-aussi démontrent qu'un traitement à la déoxyribonucléase des noyaux isolés, dénature la totalité du DNA (LIEBKE et coll. 1977 (99)),ce qui va à l'encontre des travaux de HOFFMAN (1973 (77)) qui détecte du DNA exogène dans des noyaux de Pétunia après un traitement enzymatique intensif. Après leurs essais de pénétration sur des protoplastes LIEBKE et HESS (89) retrouvent 0,010 picogramme de DNA par noyau ; en présence de PLO cette quantité passe à 0,10 picogramme. Malheureusement, il nous a été impossible de mener à bien nos analyses en gradient de CsCl, mais si nous comparons nos résultats obtenus par une étude directe, avec ceux de LIEBKE et HESS (89), nous remarquons une certaine discordance. En effet, en absence de polycation nous retrouvons 0,042 picogramme de DNA par noyau et en leur présence, nous ne dépassons pas 0,064 picogramme : l'action des polycations est donc moins évidente dans notre étude mais celà peut être dû à l'imprécision de nos mesures de radioactivité (nombre de c.p.m faible).

Les polycations dont l'action favorable a déjà été démontrée Lors de l'incorporation de protéines (HESS 1973 (100)), et de particule virale (MOTOYOSHI et coll 1973 (101)) ; s' avère positive dans nos essais puisqu'ils augmentent la quantité de DNA exogène extractable des noyaux. Ces résultats confirment qu'une pénétration cytoplasmique est possible, mais nous ne pouvons pas être aussi catégorique au niveau nucléaire, même si les études de HOTTA

et STERN (1971 (102)) montrent que des noyaux isolés peuvent absorber du DNA exogène. En effet, nous ne savons pas si le DNA exogène peut être séparé du noyau par lavages répétés ; comme pour les protoplastes entiers il peut y avoir adsorption sur l'enveloppe nucléaire de ce DNA exogène et nous ne pourrons pas différencier le DNA adsorbé du DNA capturé. L'hypothèse formulée avec les protoplastes entiers peut être appliquée aux noyaux, le DNA peut se complexer avec la membrane nucléaire et comme nous l'avons déjà montré dans ce travail, il est impossible de déstabiliser cette éventuelle adsorption. Pour le moment, nous ne pouvons donc pas confirmer que le DNA bactérien trouvé dans le cytoplasme est réellement capturé par la fraction nucléaire ; la seule preuve pourrait être donnée par une étude autoradiographique qu'il nous a été impossible de réaliser, malgré plusieurs essais avec notre DNA bactérien qui malheureusement est trop faiblement marqué.

Toutes ces incertitudes font qu'il n'est pas possible de comparer ces travaux de pénétration avec les résultats de SUZUKI et TAKEBE (1976 (1(qui démontraient que le RNA du virus de la Mosaïque du tabac pénétrait facilemen dans les noyaux et s'exprimait ensuite ; il est difficile sans preuve de supposer qu'il existe une similitude de comportement entre ces deux acides nucléïques, l'un possédant un pouvoir naturellement infectieux, l'autre non.

En dernier lieu, nous préciserons que s'il nous est possible de mettre en évidence une incorporation cytoplasmique, nous ne pouvons toujours pas déterminer la quantité exacte de DNA exogène incorporé, puisque le complexe DNA - polycation - protoplastes n'est pas complètement déstabilisable : nous comptabilisons donc le DNA absorbé et adsorbé comme le montraient en 1978 les travaux de NAGATA et MELCHERS (48).

La poursuite de ce travail impliquerait une modification de notre modèle expérimental. Il serait interessant d'obtenir les protoplastes à partir de tissus ou de cals non chlorophylliens. En effet, les incorporations de DNA exogène seraient certainement plus importantes en l'absence de chloroplastes, mais surtout nous aurions moins de difficultés pour les mesures de radioactivité et la purification des noyaux poserait moins de problèmes.

Pour le matériel bactérien, nous avons remarqué une forte dénaturation cytoplasmique. Il est possible de limiter cet inconvénient de plusieurs manières :

- On peut envisager l'utilisation de DNA plasmidique qui par sa configuration moléculaire (LURQUIN et KADO 1977 (104), FERNANDEZ et coll. 1978 (105)) serait certainement moins dénaturé par les nucléases cellulaires. Nous avons pratiqué quelques essais préliminaires avec du DNA plasmidique de Rhizobium meliloti, mais les traces de chlorophylle rendent pour l'instant impossible sa mise en évidence par électrophorèse.

- On peut envisager l'utilisation de DNA protégé dans des vésicules lipidiques : LURQUIN en 1981 (106) démontre une incorporation possible de ces vésicules dans la chromatine nucléaire des protoplastes de tabac.

- Une autre possibilité consiste en l'utilisation de vecteur tel le plasmide Ti d'Agrobacterium tumefaciens qui peut être transféré, s'intégrer et s'exprimer en tant que DNA étranger dans une cellule végétale supérieure. Il est donc envisageable par des techniques de clonage de construire un plasmide hybride (DAVEY et coll 1980 (107)) et de l'intégrer dans le génome cellulaire d'une plante hôte, mais la démonstration qui consiste en la mise en évidence de l'expression des cellules ainsi transformées n'est pas encore faite

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1 - VASIL I.K.
Perspectives in plant cell and tissue culture.
International review of cytology. Supplements, Pt. B, N° II.
Ed. by I.K. Vasil, Academic Press (New-York), 1980, p. 1-80.

2 - GIAJA J.
Rev. Soc. Biol., 1913, 77, p. 719.
cité par : SCHILDE-RENTSCHLER L, in "Les protoplastes"
La Recherche, 1975, 56, p. 430-436.

3 - KUSTER E.
Protoplasma, 1929, 3, p. 223
cité par : SCHILDE-RENTSCHLER L, in "Les protoplastes"
La Recherche, 1975, 56, p. 430-436.

4 - TAKEBE I., OTSUKI Y. and AOKI S.
Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state
Plant cell Physiol., 1968, 9, p. 115-124.

5 - PRAT R.
Contribution à l'étude des protoplastes végétaux (effet de traitement d'isolement sur la structure cellulaire).
Journal de Microscopie, 1972, 14, p. 85-114.

6 - COCKING E.C.
A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles.
Nature, 1960, 187, p. 927-929

7 - GAMBORG O.L. and WETTER L.R.
Plant tissue, culture methods.
Ed. Nat. Research Council of Canada, 1975, p. 11-106

8 - POWER J.B. and COCKING E.C.
Isolation of leaf protoplasts : macromolecule uptake and growth substance reponse.
J. Exp. Bot., 1970, 21, p. 64-70.

9 - POTRYKUS I., HARMS C.T., LORZ H. and THOMAS S.E.
Callus formation from stem protoplasts of corn (Zea mays L.)
Molec. Gen. Genet., 1977, 156, p. 347-350.

10 - KANAI R. and EDWARDS G.E.
Purification of enzymatically isolated Mesophyll Protoplasts from C_3, C_4 and crassulacean acid metabolism Plants using an aqueous Dextran-Polyethylene Glycol two-phase system.
Plant Physiol., 1973, 52, p. 484-490.

11 - LARKIN P.J.
Purification and viability determinations of plant protoplasts.
Planta, 1976, 128, p. 213-6.

12 - VASIL V. and VASIL I.K.
Regeneration of tobacco and Petunia plants from protoplasts and culture of corn protoplasts.
In Vitro, 1974, 10, p. 83-96.

13 - DURAND J., POTRYKUS I. and DONN G.
Plantes issues de protoplastes de Petunia.
Z. Pflanzenphysiol., 1973, 69, p. 26-34.

14 - RAJS B. and HERR J.M.
Isolation of protoplasts from the placenta cells of Lycoperssicum pimpinellifolium mill.
Cell. Res., 1971, 64, p. 479-481

15 - DAVEY M.R., COCKING E.C. and BUSH E.
Isolation of Legume Root Nodule Protoplasts.
Nature, 1973, 244, p. 460-461

16 - COCKING E.C.
Plant cell protoplasts-isolation and development
Ann. Rev. Plant Physiol., 1972, 23, p. 29-50

17 - BHOJWANI S.S. and COCKING E.C.
Isolation of protoplasts from pollen tetrads.
Nature, 1972, 239, p. 29-30

18 - CONDEELIS J.S.
The identification of F. actin in the pollen tube and protoplasts of Amaryllis Belladonna.
Exp. Cell. Res., 1974, 88, p. 435-439

19 - SCHENK R.U. and HILDEBRANDT A.C.
Production of protoplasts from plant cells in liquid culture using purified commercial cellulases.
Crop. Sci., 1969, 9, p. 629-631.

20 - VARDI A., SPIEGEL ROY P. and GALUN E.
Citrus cell culture : isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos.
Plant Sci. Lett., 1975, 4, p. 231-236.

21 - MURASHIGE T. and SKOOG F.
Culture medium and tissue culture.
Plant Physiol., 1962, 15, p. 473-497.

22 - GAMBORG O.L., MILLER R.A. and OJIMA K.
Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells.
Exp. Cell. Res., 1968, 50, p. 151-158

23 - GRAMBOW H.J., KAO K.N., MILLER R.A. and GAMBORG O.L.
Cell Division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures.
Planta, 1972, 103, p. 348-355.

24 - GAMBORG O.L. and MILLER R.A.
Isolation, culture and uses of plant protoplasts.
Can. J. Bot., 1973, 51, p. 1795-1799.

25 - NAGATA T. and TAKEBE I.
Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium.
Planta, 1971, 99, p. 12-20.

26 - VASIL V. and VASIL J.K.
Growth and cell division in isolated plant protoplasts in "microchambers".
In : protoplastes et fusions de cellules somatiques végétales.
Colloques internationaux CNRS, 1973, 212, p. 139-149.

27 - POJNAR E. and COCKING E.C.
Cell wall regeneration by isolated tomato fruit protoplasts.
Biochem. J., 1967, 103, p. 74.

28 - MISHRA A.K., COLVIN L.
The formation of wall like enveloppes by isolated tomato fruits protoplasts.
Protoplasma, 1969, 65, p. 295-305.

29 - NAGATA T., TAKEBE I.
Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts.
Planta, 1970, 92, p. 301-308.

30 - BURGESS J. and LINSTEAD P.J.
Coumarin inhibition of microfibril formation at the surface of cultured protoplasts.
Planta, 1977, 133, p. 267-273.

31 - FOWKE L.C., BECH-HANSEN C.V. and GAMBORG O.L.
Electron-microscopic observations of cell regeneration from cultured protoplasts of Ammi-visnaga.
Protoplasma, 1974, 79, p. 235-248.

32 - FOWKE L.C.
Frontiers of plant tissue culture.
Ed. by Thorpe T.A. Univ of Calgary press, 1978, p. 223- 233.

33 - VASIL I.K.
The progress, problems and prospects of plant protoplasts research.
Adv. agronomy, 1976, 28, p. 119-160.

34 - NITSCH J.P. and OHYAMA K.
Obtention de plantes à partir de protoplastes haploïdes cultivés "in vitro".
C.R. Acad. Sci. Paris, 1971, 273, p. 801-804.

35 - TAKEBE I., LABIB G. and MELCHERS G.
Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco.
Naturwissenschaften, 1971, 58, p. 318-320.

36 - POJNAR E., WILLISON J.H.H. and COCKING E.C.
Cell wall regeneration by isolated tomato fruit protoplasts.
Protoplasma, 1967, 64, p. 460-475.

37 - PRAT R. and ROLLAND J.C.
Isolement mécanique et étude ultrastructurale préliminaire de protoplastes végétaux.
C.R. Acad. Sci. Paris, 1970, 271, p. 1862-1865.

38 - CARLSON P.S.
The use of protoplasts for genetic research.
Proc. nat. Acad. Sc., 1973, 70, p. 598- 602

39 - BINDING H.
Regeneration and versch mel zung kackter lanbmoos protoplasten.
Z. pflanzenphysiol., 1966, 55, p. 305-321.

40 - POWER J.B.
Fusion of isolated plant protoplasts.
Nature, 1970, 225, p. 1016-1018.

41 - KELLER W.A., HARVEY B., GAMBORG O.L., MILLER R.A., and EVELEIGH D.E.
Plant protoplasts for use in somatic cell hybridization.
Nature, 1970, 226, p. 280-284.

42 - POTRYKUS I.
Intra et interspecific fusion of protoplasts from petals of Torenia baillonii et Torenia fourmieri.
Nature, 1971, 231, p. 57-58.

43 - POWER J.B. and FREARSON E.M.
The inter- and intraspecific fusion of plant protoplasts
In "Protoplastes et fusions de cellules somatiques végétales".
Coll. Int. CNRS, 1972, 212, p. 409-414.

44 - KELLER W.A. and MELCHERS G.
The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion.
Z. Naturforsch., 1973, 28, p. 737-741.

45 - KAO KN. and MICHAYLUK M.R.
A method for high-frequency Intergeneric Fusion of Plant Protoplasts.
Planta, 1974, 115, p. 355-367.

46 - WALLIN A., GLIMELIUS K. and ERIKSSON T.
The induction of aggregation and fusion of Daucus carota protoplasts by polyethylene glycol.
Z. Pflanzenphysiol., 1974, 74, p. 64-80.

47 - NAGATA T.
A novel cell fusion method of protoplasts by polyvinyl alcohol.
Naturwissenschaften, 1978, 65, p. 263-4.

48 - NAGATA T. and MELCHERS G.
Surface charge of Protoplasts and their significance in cell-cell Interaction.
Planta, 1978, 142, p. 235-238.

49 - CHUPEAU Y. and BOURGIN J.P.
Les protoplastes de cellules végétales.
In : "La multiplication végétative".
Ed. Gauthier Villars, 1980, p. 191-221.

50 - CHUPEAU Y.
La fusion des protoplastes de plantes supérieures : problèmes et perspectives.
Physiol. vég., 1978, 16, p. 427-439.

51 - MELCHERS G., SACRISTAN M.D. and HOLDER A.A.
Somatic hybrid plants of Potato and Tomato regenerated from fused Protoplasts.
Carlsberg Res. Commun., 1978, 43, p. 203-218.

52 - GLEBA Y.Y. and HOFFMANN F.
Hybrid cell lines Arabidopsis thaliana + Brassica campestris : no evidence for specific chromosome elimination.
Molec. Gen. Genet., 1978, 165, p. 257-264.

53 - BELLIARD G. and PELLETIER G.
Les fusions de protoplastes.
Sélectionneur français, 1978, N° 26, p. 51-56.

54 - LEDOUX L.
Uptake of DNA by living cells.
Ed. by J.N. Davidson and W. Colin in "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology". Academic Press N.Y., 1965, 4, p. 231-267.

55 - COCKING E.C.
Uptake of Foreign Genetic Material by Plant Protoplasts.
Int. Rev. Cyt., 1977, 48, p. 323-343.

56 - WILLISON J.H.M., BAKE B.L. and HANCHEY P.
A mechanism for the pinocytosis of latex spheres by tomato fruit protoplasts
J. Bioenergetics, 1971, 2, p. 371-382.

57 - COCKING E.C. and POJNAR E.
An electron microscopic study of the infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaïc virus.
J. Gen. Virol, 1969, 4, p. 305-312.

58 - TAKEBE I.
The use of protoplasts in plant virology.
Ann. Rev. Phytopath., 1975, 13, p. 105.

59 - DAVEY M.R. and COCKING E.C.
Uptake of bacteria by isolated higher plant protoplasts.
Nature, 1972, 239, p. 455-456.

60 - DAVEY M.R. and POWER J.B.
Polyethylene Glycol-induced uptake of micro-organisms into higher plant protoplasts : an ultrastructural study.
Plant Science Letters, 1975, 5, p. 269-274.

61 - POTRYKUS I. and HOFFMAN F.
Transplantation of nuclei into protoplasts of higher plants.
Z. Pflanzenphysiol., 1973, 69, p. 287-289.

62 - KUNG S.D.
Polypeptide composition of fraction 1 Protein from parasexual hybrid plants in the genus Nicotiana.
Science, 1975, 187, p. 353-355.

63 - DAVEY M.R., FREARSON E.M. and POWER J.B.
Polyethylene glycol-induced transplantation of chloroplasts into protoplasts ultrastructural assessment.
Plant Science Letters, 1976, 7, p. 7-10

64 - COCKING E.C.
Plant cell modification : problems and perspectives.
In : Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales.
Colloques internationaux CNRS, 1973, 212, p. 327-337.

65 - GILES G.
Frontiers of plant tissue culture.
Ed. T.A. Thorpe, Univ. of Calgary Press, 1978, p. 67-73.

66 - BURRIS R.H.
Nitrogen fixation Assay:Methods and Techniques.
Methods in Enzymology, 1972, 24, 415-431.

67 - HOWELL S.H. and HULL R.
Uptake of cauliflower mosaïc virus by plant protoplast.
Plant physiol., 1977, 59, p. 105-105.

68 - HOWELL S.H. and HULL R.
Replication of cauliflower mosaïc virus and transcription of its genome in turnip leaf protoplasts.
Virology, 1978, 86, p. 468-481.

69 - SANGER F., NICKLEN S. and COWPSON A.R.
DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, 74, p. 5463-5467.

70 - KLEINHOFS A. and BEHKI R.
Prospects for plant genome by non conventional methods.
Ann. Rev. Genet., 1977, 11, p. 79-101.

71 - LEDOUX L. and CHARLES P.
Uptake of information molecules by living cells.
Ed. L. Ledoux, North Holland Publ., 1972, p. 29-46.

72 - LEDOUX L., HUART R. and JACOBS M.
DNA-mediated genetic correction of thiamineless Arabidopsis thaliana.
Nature, 1974, 249, p. 17-21.

73 - LURQUIN P.F. and HOTTA Y.
Rentilization of bacterial DNA by Arabidopsis thaliana cells in tissue culture.
Plant Science Letters, 1975, 5, p. 103-112.

74 - KLEINHOFS A., EDEN F.C., CHILTON M.D. and BENDICH A.
On the question of the integration of exogenous bacterial DNA into plant DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci., 1975, 72, p. 2747-2752.

75 - OHYAMA K., GAMBORG O.L., and MILLER R.A.
Uptake of exogenous DNA by plant protoplasts.
Can. J. Bot., 1972, 50, p. 2077-2080.

76 - HOFFMANN F. and HESS D.
Die Aufnahme radioaktiv markierter DNS in isolierten Protoplasten von Petunia hybrida.
Z. Pflanzenphysiol., 1973, 69, p. 81-83.

77 - HOFFMANN F.
Die Aufnahme doppelt markierter DNS in isolierte Protoplasten von Petunia hybrida.
Z. Pflanzenphysiol., 1973, 69, p. 249-261.

78 - HOLL F.B.
Cellular environment and the transfer of genetic information.
In "Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales".
Colloques internationaux CNRS, 1973, 212, p. 509-512.

79 - GRESSHOFF P.M.
Genetic manipulations with plant material.
Ed. L. Ledoux, North Holland Publ., 1974, p.

80 - CARLSON P.S.
The use of protoplasts for genetic research.
Proc. nat. Acad. Sc., 1973, 70, p. 598-602.

81 - SHANMUGAN K.T. and VALENTINE R.C.
Molecular Biology of nitrogene fixation.
Sciences, 1975, 187, p. 919-924.

82 - MERRICK M., FILSER M., DIXON R., ELMERICH Cl., SIBOLD L., and HOUMARD J.
The use of translocatable Genetic Elements to construct a fine structure map of the Klebsiella pneumoniae Nitrogen fixation (nif) Gene Cluster.
Journal of General microbiology, 1980, 117, p. 509-520.

83 - BRILL W.
Agriculture et Microbiologie.
Pour la Science, 1981, 49, p. 66-78.

84 - DELATTRE J.M. and DELEPLANQUE A.
Etude des caractères physiologiques et biochimiques de 63 souches isolées de nodules de légumineuses.
Ann. Inst. Past. Lille, 1971, 22, p. 215-230.

85 - CHUPEAU Y. and MOREL G.
Obtention de protoplastes de plantes supérieures à partir de tissus cultivés in vitro.
C.R. Acad. Sci., 1970, 270, p. 2659-2662.

86 - REYNOLDS E.S.
The use of lead citrate at hight pH as an electron opaque strain in electron microscopy.
J. of cell Biol., 1953, 17, p. 208-213.

87 - RADOSEVICH J.M.
Organogenèse des tissus de tabac cultivés "in vitro" et synthèse d'alcaloïdes.
DEA "Amélioration des Productions Végétales et Microbiennes" Université des Sciences et Techniques, Lille, 1978.

88 - ZUILY-FODIL Y.
Recherches sur les conditions et la physiologie des protoplastes de coleoptiles d'Avena sativa B. et de crown gall de Parthenocissus tricuspidata L. (contribution à la mise au point d'un modèle expérimental d'étude des relations nucléo-cytoplasmiques).
Thèse Doctorat d'Etat, Université Paris VII, 1979.

89 - LIEBKE B. and HESS D.
Uptake of bacterial DNA into isolated mesophyll protoplasts of Petunia hybrida.
Biochem. Physiol. Pflanzen, 1977, 171, p. 493-501.

90 - BERINGER J.E.
R factor transfer in Rhizobium leguminosarum.
J. Gen. Microbiol., 1974, 84, p. 188-198.

91 - OCHIN D.
Production en masse et préparation de cellules déshydratées de Rhizobium.
Thèse U.S.T.L. de 3e Cycle Biologie Végétale (option Microbiologie), 1980.

92 - MARMUR J.
A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms.
J. Mol. Biol., 1961, 3, p. 208-218.

93 - FERRAGUT C.
Contribution à l'étude du GC % chez les bactéries. Application à un groupe d'enterobactéries apparentées au genre Citrobacter.
Thèse U.S.T.L. de 3e Cycle Biologie Végétale (option Microbiologie), 1976.

94 - REIJNDERS L., VISSER L., ALBERS AMJ, VAN KAMMEN A. and HOUWERS A.
A comparison of DNA from free living and endosymbiotic Rhizobium leguminosarum (strain pre).
Biochim. Biophy. Acta, 1975, 414, p. 206-216.

95 - KIN-ICHIRO MIURA
Preparation of bacterial DNA by the Phenol-pH 9-RNases Method.
Methods in Enzymology, 1967, 12, p. 543-545.

96 - IFFT J.B., VOET D.H. and VINOGRAD J.
The determination of density distribution and density gradients in binary solutions at equilibrium in the ultracentrifuge.
J. Phys. Chem., 1961, 65, p. 1138-1144.

97 - CHUPEAU Y., BOURGIN J.P., MISSONIER C., DORION N. and MOREL G.
Préparation et culture de protoplastes de divers Nicotiana.
C.R. Acad. Sci., 1974, 278, p. 1565-1567.

98 - HUGHES B.G., WHITE F.G. and SMITH M.A.
Fate of bacterial DNA during uptake by barcley and tobacco protoplasts.
Z. Pflanzenphysiol., 1977, 87, p. 1-23.

99 - LIEBKE B., BLASCHEK, W. and HESS D.
Studies on the uptake of Bacterial DNA into isolated nuclei of Petunia hybrida.
Z. Pflanzenphysiol., 1977, 84, 265-274.

100 - HESS D.
Die Aufnahme von FITC adn FITC-Serumalbumine in solierte Protoplasten von Petunia hybrida.
Z. Pflanzenphysiol., 1973, 69, 280-286.

101 - MOTOYOSHI F., BANCROFT J.B., WATTS J.W. and BURGES J.
The infection of tobacco protoplasts with cowpea chlorotic mottle virus and its RNA
J. Gen. Virology, 1973, 20, p. 177-193.

102 - HOTTA Y. and STERN H.
Uptake and distribution of heterologous DNA in living cells.
Ed. L. Ledoux "Informative Molecules in Biological Systems", 1971, p. 176-186.

103 - SUZUKI M. and TAKEBE I.
Uptake of single stranded bacteriophage DNA by isolated tobacco protoplasts.
Z. Pflanzenphysiol., 1976, 78, p. 421-433.

104 - LURQUIN P.F. and KADO C.I.
Escherichia coli plasmid PBR 313 Insertion into plant protoplasts and into their nuclei.
Molec. Gen. Genet., 1977, 154, p. 113-121.

105 - FERNANDEZ S.M., LURQUIN P.F. and KADO C.I.
Incorporation and maintenance of recombinant-DNA plasmid vehicles PBR 313 and pCR 1 in plant protoplasts.
FEBS Letters, 1978, 87,p. 277-282.

106 - LURQUIN P.F.
Binding of plasmid loaded liposomes to plant protoplasts: validity of biochemical methods to evaluate the transfer of exogenous DNA.
Plant Science Letters, 1981, 21 p. 31-40.

107 - DAVEY M.R., FREEMAN J.P., DRAPER J. and COCKING E.C.
The use of protoplasts for transformation studies with Agrobacterium tumefaciens and its plasmids.
In Tissue Culture Methods for Plant Pathologists.
Ed. INGRAM D.S. and J.P. HELGESON, Blackwell Scientific Publications, 1980, p. 209-219.

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

A toi Brigitte et à tous -

ceux qui depuis le 9 Septembre 1978

m'ont aidé.